



Lokalisation und Funktion von Swiprosin-1 an Podosomen humaner Makrophagen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

**an der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Robert Herzog

geboren am 23.04.1993

in Bad Oeynhausen

Hamburg, im Oktober 2022

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2017 bis Juli 2022 unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Linder am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Stefan Linder
Zweitgutachter: PD Dr. Andreas Pommerening-Röser
Datum der Disputation: 19.01.2023

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. Ebenfalls erkläre ich an Eides statt, dass alle dem Prüfungsamt und den Gutachtern vorliegenden Exemplare dieser Dissertationsschrift identisch sind.

Hamburg, den 20.10.2022

(Robert Herzog)

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung III

Zusammenfassung..... 1

Summary 3

1 Einleitung..... 5

 1.1 Makrophagen 5

 1.2 Podosomen..... 7

 1.2.1 Aufbau der Podosomen..... 8

 1.2.2 Lebenszyklus von Podosomen..... 10

 1.2.3 Podosomen als mechanosensitive Strukturen 13

 1.2.3.1 Kernwachstum und Protrusion..... 13

 1.2.3.2 Ringproteine und Mechanotransduktion 15

 1.2.3.3 Myosin und Kontraktilität der Kabel 16

 1.2.3.4 Regulation durch Calciumsensitivität..... 18

 1.3 Swiprosin 19

 1.3.1 Struktur..... 20

 1.3.2 Funktion und Regulation 22

 1.4 Analyse von Podosomen 24

 1.4.1 Auswertungsmethoden für Podosomen 24

 1.4.2 Analyse der podosomaln Kräfte 25

 1.5 Zielsetzung..... 26

2 Materialien 27

 2.1 Chemikalien 27

 2.2 Zusätze für die Zellkultur 28

 2.3 Puffer 28

 2.4 Antikörper und Färbereagenzien 29

 2.5 Oligonukleotide (Primer und siRNA) 29

 2.6 Plasmide 30

 2.7 Enzyme 30

 2.8 Kits 30

 2.9 Verbrauchsmaterialien 31

 2.10 Inventar 31

 2.11 Mikroskope..... 32

 2.12 Software 33

3 Methoden 34

 3.1 Zellbiologische Methoden 34

3.1.1 Isolation und Kultivierung primärer humaner Makrophagen	34
3.1.2 Aussäen der Zellen	34
3.1.3 Transfektion mit Plasmiden und siRNA	35
3.1.4 Pharmakologische Behandlung der Zellen	35
3.1.5 Degradations-Assay	36
3.1.6 ERISM.....	36
3.1.7 Fixierung und Immunofluoreszenz.....	36
3.2 Mikroskopie.....	37
3.2.1 <i>Fixed-cell</i> -Mikroskopie.....	37
3.2.2 <i>Live-cell</i> -Mikroskopie.....	37
3.3 Gentechnische Methoden	38
3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion	38
3.3.2 Aufreinigung und Ligation	38
3.3.3 Transformation.....	39
3.3.4 Punktmutation.....	39
3.3.5 Synthese weiterer SWS1-Konstrukte	40
3.4 Proteinbiochemie Methoden	41
3.4.1 Western Blot und Expressionsstärke.....	41
3.4.2 Immunopräzipitation, <i>Pulldown</i> und Massenspektrometrie	41
3.5 Auswertung	42
4 Ergebnisse.....	44
4.1 Poji – Ein Auswertungsalgorithmus für Zellen und Podosomen	44
4.1.1 Die Programmierung des Makros.....	44
4.1.1.1 Auswahl der Detektionsmethode.....	45
4.1.1.2 Essentielle Podosomen-Analyse.....	48
4.1.1.3 Aufbau und Funktionsweise des Makros	49
4.1.1.4 Weiterentwicklung des Algorithmus nach Publikation	51
4.1.2 Datenausgabe des Makros	51
4.1.2.1 Zelluläre und allgemeine Parameter	52
4.1.2.2 Podosomale Parameter	55
4.1.3 Zusammenfassung Poji.....	57
4.2 SWS1.....	58
4.2.1 Lokalisation von SWS1.....	58
4.2.1.1 Lokalisation des endogenen SWS1.....	58
4.2.1.2 Einfluss der Calciumkonzentration.....	60
4.2.1.3 Depletion von SWS1	62

4.2.1.4 Überexpression von SWS1 und spezifischer Teilkonstrukte	64
4.2.1.5 Zusammenfassung Lokalisation.....	65
4.2.2 Einfluss von SWS1 auf podosomale Funktionen	66
4.2.2.1 Einfluss auf Lebenszeit und Oszillation von Podosomen	66
4.2.2.2 Einfluss auf die Aktindynamik	70
4.2.2.3 Einfluss auf die Protrusion.....	71
4.2.2.4 Einfluss auf die Myosin IIA-Aktivität.....	73
4.2.2.5 Zusammenfassung Funktion.....	76
4.2.3 Identifikation von Interaktionspartnern.....	77
4.3 Fazit	79
5 Diskussion	80
5.1 Poji – Ein Ausgangspunkt für viele Verbesserungen	80
5.1.1 Zelldetektion.....	80
5.1.2 Podosomendetektion und Profilerstellung	81
5.1.3 Kompatibilität mit <i>live-cell</i> -Mikroskopie	87
5.2 SWS1.....	88
5.2.1 Lokalisation am Podosom.....	89
5.2.2 Einfluss auf die Organisation des Aktinnetzwerks.....	92
5.2.3 Regulation der Podosomen-Kräfte und Mechanosensitivität.....	97
5.2.4 Interaktionen.....	101
5.2.5 Aktualisierung des Podosomenmodells	103
5.3 Limitierung durch Versuchsanordnungen	107
5.4 Ausblick.....	109
Literaturverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	XVI
Abbildungsverzeichnis.....	XVIII
Tabellenverzeichnis	XIX
Publikationsliste	XX
Danksagung	XXI

Zusammenfassung

Podosomen sind Aktin-reiche Strukturen die insbesondere in Zellen der monozytären Linie, wie Osteoklasten, dendritischen Zellen und Makrophagen vorkommen. Sie erfüllen eine Vielzahl von Funktionen, vor allem im Rahmen der Adhäsion und Migration, sowie der Degradation der extrazellulären Matrix. Bei Podosomen handelt es sich zusätzlich um mechanosensitive Strukturen, die durch eine regelmäßige Protrusion die Topografie und Rigidität des extrazellulären Raums detektieren können. Podosomen bestehen neben dem Aktin-reichen Kern auch aus einem Ring adhäsiver Plaqueproteine sowie einer Kappe aus regulatorischen Proteinen und weisen zwei verschiedene Gruppen von Kabeln aus Myosin-haltigen, parallelen Aktinbündeln auf. Die dorsalen Kabel verbinden dabei individuelle Podosomen miteinander zu übergeordneten Strukturen, während die lateralen Kabel Zugkräfte auf den mechanosensitiven Ring ausüben können.

Swiprosin-1 (SWS1) ist ein Aktin-bindendes und Calcium-sensitives Strukturprotein, das Einfluss auf die Organisation von Aktinfilamente nehmen kann. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkungsweise von SWS1 auf die Podosomen primärer humaner Makrophagen zu untersuchen. Dabei wurde beobachtet, dass SWS1 trotz seiner endogenen Lokalisation im Podosomenkern keinen nachweisbaren Einfluss auf deren Zahl oder Architektur nimmt, da diese sich weder durch Überexpression, noch durch Depletion ändern. Während SWS1 auch keinen Einfluss auf die Aktinpolymerisationsrate zu nehmen scheint, kontrolliert es offensichtlich die Organisation der Aktinfilamente im Podosomenkern und reguliert damit die Protrusionsstärke in den extrazellulären Bereich. Dabei reduzierte die Depletion von endogenem SWS1 die Fraktion stabilerer Aktinfilamente im Podosomenkern, was eine Reduktion in sowohl lateraler Protrusionsfläche, als auch vertikaler Protrusionstiefe nach sich zog. Bei endogener SWS1-Expression konnte eine Calcium-sensitive Aktivierung des Kabelproteins Myosin IIA beobachtet werden, was zu Veränderungen der Podosomenarchitektur führte. In SWS1-depletierten Zellen lag die Myosin IIA-Aktivierung im Gegensatz dazu deutlich reduziert vor, und auch die assoziierten Effekte auf die Podosomen wurden größtenteils aufgehoben. Zusätzlich zur Analyse podosomaler Effekte des SWS1 wurde eine erste Identifikation potentieller Interaktionspartner durchgeführt. Hierbei wurden neben Proteinen der Quervernetzung und Bündelung von Aktinfilamenten auch Regulatoren des Aktinfilamentwachstums identifiziert, sowie sowohl Ring- als auch Membran-Adhäsionsproteine detektiert.

Zusammengenommen scheint SWS1 Einfluss auf die Aktinorganisation des Kerns und damit auf die Kraftauswirkung und -weiterleitung der Podosomen zu nehmen. Zusätzlich konnten aktuelle Podosomenmodelle bestätigt und Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation der Aktinbündel des Kerns

und der Kabel erhalten werden. Die genaue Wirkungsweise und Regulation von SWS1 auf die Filamentorganisation muss in nachfolgenden Arbeiten weiter untersucht werden.

Ein Großteil der präsentierten Ergebnisse wurde mit dem Algorithmus Poji erhalten, der speziell für die Auswertungen im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Die Effektivität von Poji liegt dabei vor allem in seiner Fähigkeit, als erster Algorithmus im Kontext der Podosomenforschung eine große Datenmenge automatisch auszuwerten und dabei zelluläre und podosomale Parameter miteinander verbinden zu können. Die Entwicklung von Poji, die ebenfalls einen Teil dieser Doktorarbeit darstellt, wurde zusammen mit Anwendungsbeispielen publiziert (Herzog et al., 2020) und sein Algorithmus öffentlich zur Verfügung gestellt (www.github.com/roherzog/poji). Poji dient durch die transparente Dokumentation seines Quellcodes zudem als ideale Plattform, um Funktionserweiterungen und Anwendungsoptimierungen in seinen bereits existierenden Algorithmus zu integrieren und damit als Standardmethode der Podosomenforschung weit über den Rahmen dieser Doktorarbeit hinaus Verwendung zu finden.

Summary

Podosomes are actin-rich structures that are predominantly formed in cells of the monocytic line, like osteoclasts, dendritic cells and macrophages. They fulfil a variety of functions, especially in the context of adhesion and migration, as well as degradation of the extracellular matrix. Podomes are mechanosensitive structures that are able to detect the topography and rigidity of the extracellular space by means of a periodic protrusion. Podosomes contain an actin-rich core structure, as well as a ring of adhesive plaque proteins, a cap of regulatory proteins and two sets of cables, which are myosin-rich, parallel actin bundles. The dorsal cables connect individual podosomes into superstructures, while the lateral cables exert traction forces onto the mechanosensitive ring.

Swiprosin-1 (SWS1) is an actin-binding and calcium-sensitive structure protein that has an influence on the organization of actin filaments. The aim of the presented thesis was to investigate the impact of SWS1 on the podosomes of primary human macrophages. It was observed that SWS1, despite its endogenous localization in the podosome core, did not have an influence on their number or architecture, as these were unchanged upon SWS1-depletion or -overexpression. SWS1 did not seem to influence the polymerisation rate of actin but obviously controlled the organization of actin filaments in the podosome core and thus its protrusion into the extracellular space. The depletion of SWS1 reduced the fraction of stable actin filaments in the podosome core which resulted in a decrease of lateral protrusion area as well as vertical protrusion depth. In cells with endogenous SWS1-expression, a calcium-sensitive activation of the cable protein myosin IIA was observed, which led to changes in the architecture of podosome. In SWS1-depleted cells, the myosin IIA activation was strongly reduced and the associated effects were close to nullified. In addition to the analysis of SWS1-mediated effects on podosomes an initial identification of potential interaction partners was conducted. Here, proteins that regulate actin filament bundling and crosslinking were identified together with regulators of actin filament growth as well as ring- and membrane-adhesion-proteins.

Summarized, SWS1 seems to impact the actin organisation of the core and thus the force generation and -transmission of podosomes. Additionally, current podosome models were confirmed and initial hints towards a differentiated regulation of the actin bundles of core and cables were obtained. The specific function and regulation of the filament organisation by SWS1 has to be further elucidated in future research.

A majority of the presented results were obtained by means of the algorithm Poji, which was developed specifically for the evaluation of data in context of this thesis. The efficiency of Poji, as the first algorithm in the context of podosome research, lies primarily in its ability to analyse big data sets automatically and to relate the podosomal and cellular parameters it obtained. The development of Poji,

which also is a part of the presented thesis, was published together with proofs of principle (Herzog et al., 2020) and the algorithm is publicly available (www.github.com/roherzog/poji). Due to the transparent documentation of the source code, Poji additionally acts as platform for enhancements and improvements of the existing algorithm and may serve as a standard method in podosome research, well beyond the scope of this thesis.

1 Einleitung

1.1 Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems, die zusammen mit ihren Vorgängerzellen, den Monozyten, zum mononukleären Phagozytensystem gehören (van Fürth et al. 1968). Je nach Lokalisierung im Körper besitzen sie verschiedene Morphologien und Spezialisierungen und sind in Geweben, Nervensystem, Knochen und Organen zu finden (Epelman et al., 2014). Makrophagen entstehen durch die Differenzierung aus Knochemarks-Monozyten (van Furth et al., 1972), jedoch gibt es auch Hinweise auf einen von Monozyten unabhängigen Mechanismus, in dem sich Gewebe-Makrophagen aus embryonalen Vorläuferzellen entwickeln (Ginhoux et al., 2014). Je nach Aktivierung können Makrophagen als zwei verschiedenen Subtypen, M1 und M2, vorliegen (Yang et al., 2014). Die klassisch aktivierten M1-Makrophagen sind dabei pro-inflammatorisch (Italiani et al., 2014) und wirken unter anderem in der Pathogenabwehr (Wynn et al., 2013) und der Proliferations-Inhibierung zur Tumorbekämpfung (Dandekar et al., 2011). Die durch verschiedene Interleukine alternativ aktivierten M2-Makrophagen (Laskin et al. 2011), sind an der Inflammationsauflösung, sowie der Gewebeheilung beteiligt (Wynn et al., 2013). Zusätzlich regen sie die Proliferation an, was im pathologischen Kontext jedoch auch zum Wachstum von Tumorzellen beitragen kann (Mantovani et al., 2022).

Zusammengenommen erfüllen Makrophagen damit die Funktionen, die Homöostase von Geweben zu regulieren und eine Immunantwort sowohl auszulösen als auch zu begrenzen. Um dabei schnell und gerichtet ihre spezifischen Wirkorte erreichen zu können, verfügen Makrophagen über die Fähigkeit zur Migration. Auf zweidimensionalen Oberflächen, wie den Endothelzellen von Blutgefäßen (Fantin et al., 2010), können sie sich dabei lateral durch ein Zusammenspiel von Adhäsion, Kontraktion und Protrusion fortbewegen (Sheetz et al., 1999). In dreidimensionalen Geweben bewegen sich Makrophagen über zwei verschiedene Modi fort. Hier können sie entweder amöboid durch ausreichend große Zwischenräume des Gewebes migrieren oder die proteolytische mesenchymale Migration verwenden, bei der Migrationswege durch gezielte Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) geschaffen werden (van Goethem et al., 2010). Für die letztere Migrationsart sind Makrophagen dabei stark auf die Adhäsions- und Degradationsfunktion der Podosomen angewiesen. (Guiet, 2012).

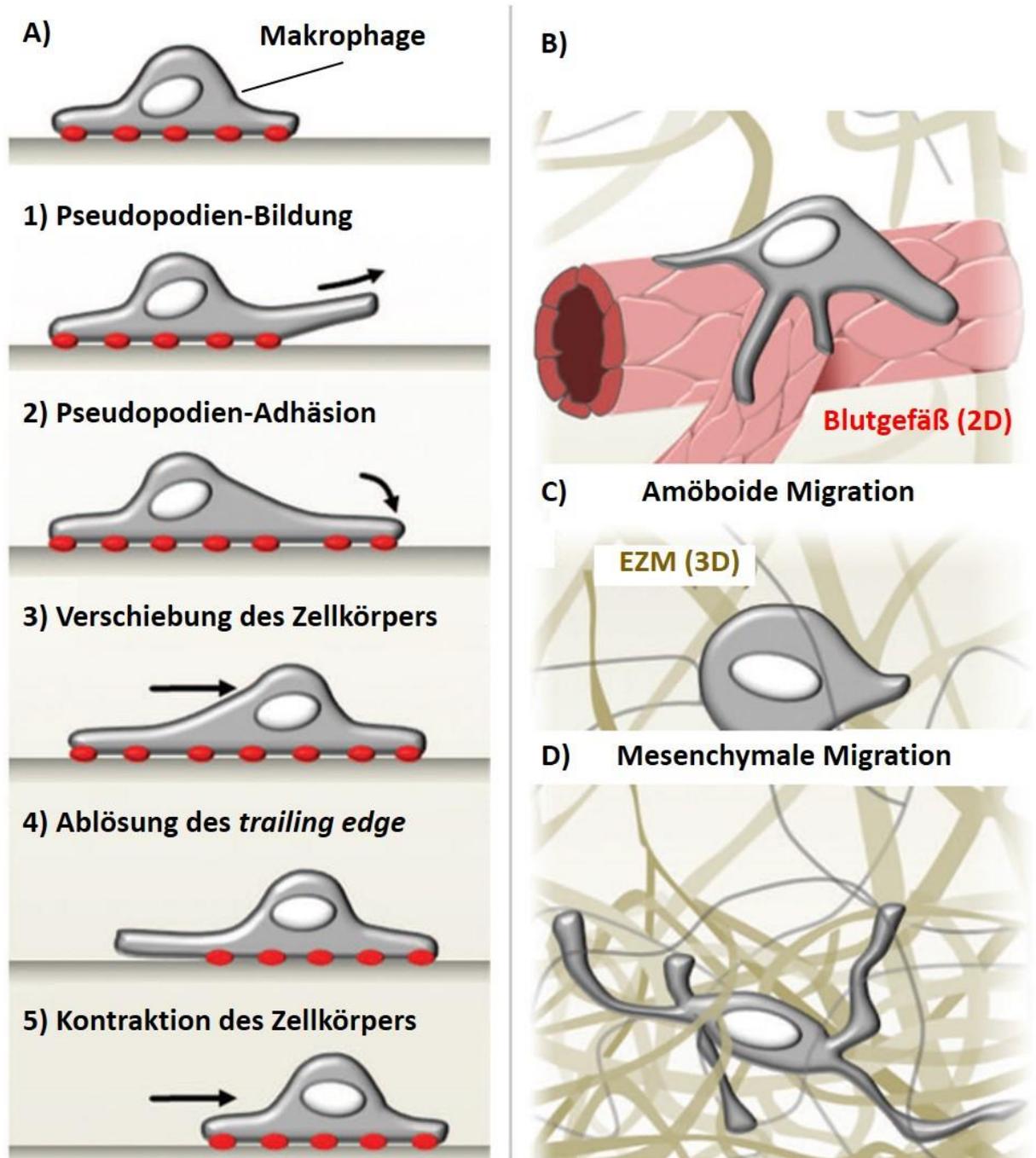


Abbildung 1: Migrationsmodi humaner Makrophagen. (A) Migration auf zweidimensionalen Oberflächen findet in einem fünfstufigen Prozess statt. Adhäsion an die Oberfläche, unter anderem gesteuert durch Podosomen, ist in rot markiert. (B) Diese zweidimensionale Migration findet in Geweben beispielsweise an der Oberfläche von Blutgefäßen statt. (C-D) Die Migration von Makrophagen im dreidimensionalen Raum findet durch eine amöboide (C), oder durch eine proteolytische, mesenchymale Form der Makrophagen statt (D). Modifiziert nach Wiesner et al., 2014.

1.2 Podosomen

Podosomen sind 0,5-1 µm große und bis zu 1 µm hohe Aktin-reiche Strukturen (Linder, 2007), die zuerst in Fibroblasten nach deren Transformation mit der Tyrosinkinase Src beschrieben wurden (Tarone et al., 1985). Seitdem wurden sie als integraler Bestandteil an der basalen Seite von Zellen der monozytären Linie identifiziert und werden unter physiologischen Bedingungen, beispielsweise in Monozyten (Linder et al., 2000), Makrophagen (Linder et al., 1999), dendritischen Zellen (Burns et al., 2001) und Osteoklasten (Destaing et al., 2003) gebildet. Podosomen sind sowohl an der Adhäsion (Gaidano et al., 1990) an die EZM als auch an deren proteolytischen Degradation (Wiesner et al., 2010), sowie an der Detektion von Topographie und Rigidität (Labernadie et al., 2015) der EZM beteiligt. Während sie in ruhenden Makrophagenzellen gleichmäßig über die gesamte Zellfläche verteilt sind, lokalisieren sie in migrierenden Zellen vorwiegend an der Zellfront (Evans et al. 2003). Podosomen werden unter physiologischen Bedingungen gebildet, besitzen jedoch auch eine strukturelle Ähnlichkeit zu den pathophysiologischen Invadopodien, welche in Tumorzellen gebildet werden (Monsky et al., 1993). Zusammen bilden beide Strukturen die Übergruppe der Invadosomen (Courtneidge et al., 2011).

Podosomen sind dynamische Strukturen, die sowohl durch eine *de novo*-Bildung als auch aus der Aufspaltung eines bereits bestehenden Podosoms entstehen können (Kopp et al., 2006). Während ihrer Lebenszeit unterliegen Podosomen einem konstanten Aktin-Turnover durch Aktinpolymerisation und -depolymerisation (Destaing et al., 2003). Dabei können sich sowohl die Gesamtmenge an Aktin pro Podosom als auch die Podosomengröße über die Zeit in einer regelmäßigen Oszillation ändern (Labernadie et al., 2014). Obwohl Podosomen an der Zellmembran verankert sind, können sie in lateraler Richtung innerhalb der Zelle migrieren. Zusätzlich können sie dynamischen Prozessen wie der Verschmelzung mehrerer Podosomen unterliegen (Luxenburg et al., 2007), bis sie nach einer mittleren Lebenszeit von 2 bis 20 Minuten wieder aufgelöst werden (Weber et al., 2022). Bei ihrer Auflösung hinterlassen sie eine Insel (*islet*) der membranständigen Matrix-Metalloproteinase MT1-MMP, welche als Ankerpunkt für eine Synthese neuer Podosomen dienen kann (El Azzouzi et al., 2016).

Podosomen können in zwei verschiedene Subformen eingeteilt werden, den größeren Vorläufer- (*precursor*; Evans et al., 2003) und den kleineren Nachfolger-Podosomen (*successor*; Bhuwania et al., 2012). Die Vorläufer-Podosomen sind dabei meist in der Zellperipherie lokalisiert und unterliegen einer höheren Dynamik, da sie sich öfter spalten oder auflösen (Kopp et al., 2006). Die kleineren Nachfolger-Podosomen entstehen meist aus der Abspaltung von Vorläufern, weisen eine höhere Stabilität auf und lokalisieren mehr im Zellinneren (Bhuwania et al., 2012). Die beiden Subformen der Podosomen unterscheiden sich nicht nur in Größe und Lokalisation innerhalb der Zelle, sondern weisen, bei grundsätzlich ähnlicher Struktur, teilweise unterschiedliche Komponenten auf. So lokalisieren sowohl das

Kappenprotein LSP1 (*Lymphocyte-specific protein 1*), als auch β -Aktin eher an den peripheren Vorläufer-Podosomen (Cervero et al., 2018), während α -cardiac-Aktin zusammen mit Supervillin stärker an Nachfolger bindet (Bhuwania et al., 2012, Cervero et al., 2018).

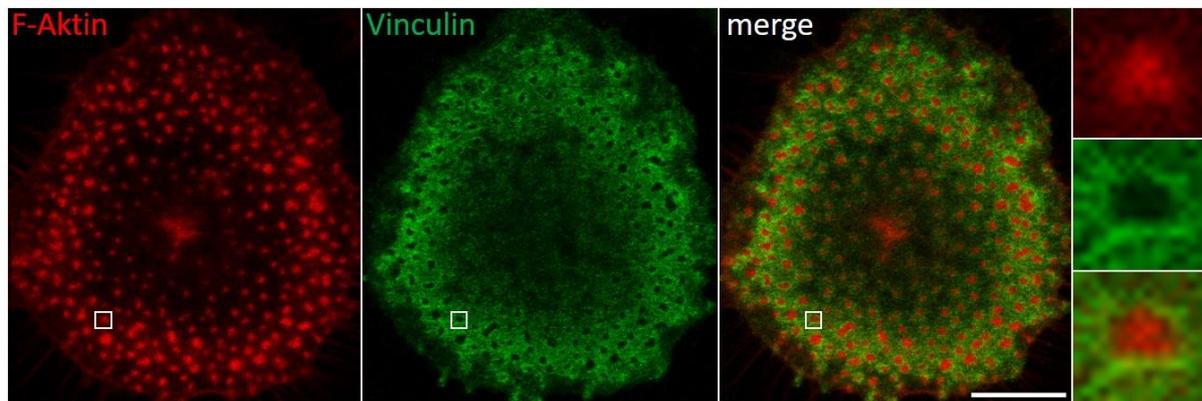


Abbildung 2: Makrophage mit Podosomen. Repräsentatives Bild eines primären humanen Makrophagen nach Fixierung und Immunofluoreszenz auf die Podosomenbestandteile F-Aktin und Vinculin. Zusätzlich gezeigt ist ein Podosom als Detailausschnitt der Zelle. Eigene Arbeit. Skala: 10 μ m.

1.2.1 Aufbau der Podosomen

Podosomen besitzen eine sehr komplexe Struktur und können aus mehr als 300 verschiedenen Proteinen bestehen (Cervero et al., 2013; Ezzoukhry et al., 2018). Diese reichen von transmembranären Adhäsionsproteinen, über Aktin und Aktin-interagierenden Proteine bis hin zu adhäsiven Plaqueproteinen, mechanosensitiven Adaptorproteinen und Regulatoren der Aktomyosin-Kontraktilität.

Die prominenteste und zuerst entdeckte Podosomenstruktur ist das F-Aktin-reiche Netzwerk des Kerns. Intrazellulär an das Transmembranprotein CD44 (Chabadel et al., 2007) gebunden, stellt der zentrale Kern die größte Struktur des Podosoms dar. Er wird durch eine Arp2/3-abhängige Nukleation (Linder et al., 2000) gebildet und besteht größtenteils aus verzweigten und quervernetzten Aktin-Filamenten. Ebenfalls im Kern lokalisieren Aktin-interagierende und -regulierende Proteine, welche das Wachstum des Kerns steuern. Dazu gehören neben Regulatoren der Aktin-Nukleation (Arp2/3, WASP; Linder et al., 2000), auch Filament-Elongatoren (Ena/VASP; Oikawa et al., 2013), sowie bündelnde (Fascin; van Audenhove et al., 2015) und quervernetzende Proteine (α -Actinin; Courson et al., 2010). Die Begrenzung des Kernwachstums wird durch Proteine kontrolliert, welche Aktinfilamente schneiden (Gelsolin; Chellaiah et al., 2000) und depolymerisieren (Cofilin; Blangy et al., 2012) können. Zusätzlich zum Aufbau und Erhalt seiner Struktur ist das Wachstum des Kerns durch die Aktinpolymerisation ein essentieller Bestandteil der Mechanotransduktion von Podosomen (siehe Kapitel 1.2.3.1).

Auf der basalen Seite wird der Kern umschlossen von einem Ring aus adhäsiven Plaqueproteinen. Der Ring besteht dabei sowohl aus primären Proteinen, welche an die intrazellulären Domänen von transmembran lokalisierenden Integrinen (Destaing et al., 2010) binden, sowie aus mechanosensitiv rekrutierten Proteinen. Prominente Vertreter der Ringproteine sind unter anderem Talin-1 (Zamboni-Zalzone et al., 1989) und p130Cas (Lakkakorpi et al., 1999), während zu den rekrutierten Ringproteinen unter anderem Zyxin und Vinculin gehören (van den Dries et al., 2013). Durch seine Mechanosensitivität spielt der Ring, neben der Stabilisation der podosomalen Struktur, eine wichtige Rolle in der Rekrutierung proteolytischer Proteine (siehe Kapitel 1.2.3.2).

Podosomen weisen zwei verschiedene Arten von Kabeln auf, welche aus eng gebündelten, parallelen Aktinfilamenten und daran gebundenem Myosin (bei humanen Makrophagen vor allem die Unterart Myosin IIA) bestehen. Die lateralen Kabel erstrecken sich von der Spitze des Podosomenkerns bis hin zu den basalen Ringproteinen (Luxenburg et al., 2007). Während sie am oberen Ende mutmaßlich in die Struktur des Aktinkerns übergehen (van den Dries et al., 2019), binden sie an ihrem basalen Ende an Proteine des Podosomenrings. Aufgrund mechanosensitiver Signale und der darauffolgenden Rekrutierung von Ringproteinen wie Vinculin wird diese Bindung verstärkt und stabilisiert (Bouissou et al., 2017). Die zweite Art der Aktomyosinkabel erstreckt sich dorsal zu anderen Podosomen, verknüpft diese zu einer Superstruktur, und ermöglicht damit eine mechanosensitive Wechselwirkung individueller Podosomen (Bhuwania et al., 2012, Proag et al., 2015). Die Verknüpfung der Superstruktur ist dabei von der Zellart abhängig, so dass Podosomenverbände entweder als Cluster (Linder et al., 1999), Rosetten (Moreau et al., 2003) oder als Ring- bzw. Gürtelformation auftreten (Destaing et al., 2005). Beide Kabelarten können durch ihre Aktomyosin-reiche Struktur kontrahieren und damit sowohl aktiv Kräfte ausüben als auch mechanosensitive Signale an benachbarte Strukturen weiterleiten (Bhuwania et al., 2012), wobei berichtet wurde, dass sich in den dorsalen Kabeln ein deutlich erhöhter Anteil an Myosin IIA im Vergleich zu den lateralen Kabeln befindet (van den Dries et al., 2019). Während erste Berichte die lateralen Kabel als einzelne Struktur des Podosoms definierten (Luxenburg et al., 2007), schlagen neuere Modelle vor, dass sie eher den äußeren Teil des Aktinkerns darstellen, der durch einen gleichzeitig erhöhten Grad an Bündelung und verringerten Grad an Quervernetzung entsteht (Linder und Cervero, 2020; Linder et al., 2022). Ein weiteres Modell geht davon aus, dass Aktinbündel ohne Myosin-Bindung, welche den verzweigten Kern ummanteln, zur Kernstruktur gehören und sich die Aktomyosinkabel als zusätzliche Struktur noch weiter in der Peripherie befinden (van den Dries et al., 2019).

Am dorsalen Ende von Podosomen befindet sich die Kappe, eine relativ neu entdeckte Struktur aus regulatorischen Proteinen. Eine große Proteingruppe in der Kappe sind die Formine, bei denen beispielsweise das INF2 (*inverted formin 2*) unter anderem das Wachstum des Aktinkerns kontrolliert,

während das FHOD1 die Bildung der Podosomenkabel reguliert (Panzer et al., 2016). Ebenso befinden sich Regulatoren der Myosinaktivität, wie LSP1 (Cervero et al., 2018) und Supervillin (Bhuwania et al., 2012) in der Kappe. Nach neueren Modellen wird davon ausgegangen, dass die Podosomenkappe aus mehreren Schichten besteht, die je nach Lokalisation am Podosom unterschiedliche Funktionen regulieren können (van den Dries et al., 2019b, Linder und Cervero, 2020).

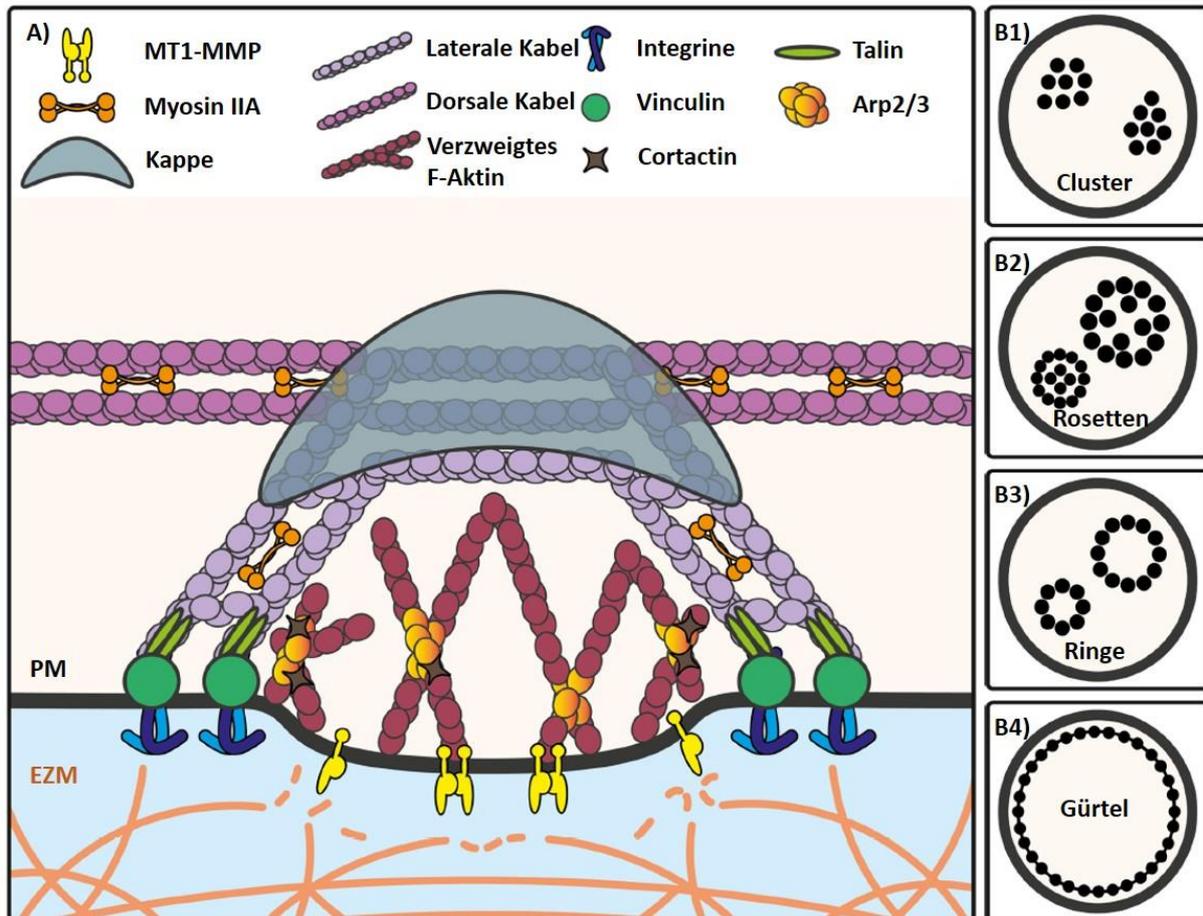


Abbildung 3: Schematischer Aufbau von Podosomen. (A) Vertikaler Querschnitt eines Podosoms mit dem Aktinnetzwerk des Kerns (inklusive interagierender Proteine), dem Ring, der Kappe sowie den lateralen und dorsalen Kabeln. Während die Aktinfilamente im Kern durch Arp2/3 verzweigt polymerisiert werden, bestehen die beiden Kabelarten aus parallelen, an Myosin IIA gebundenen Bündeln. Die lateralen Kabel binden an Proteine des Podosomenrings, die dorsalen Kabel verbinden mehrere Podosomen zu einer Superstruktur. (B) Schematische Beispiele der Organisation von Podosomen in Superstrukturen. Sie können je nach Zellart und -funktion als Cluster (B1), Rosetten (B2), Ring (B3) oder Gürtel (B4) vorliegen. Modifiziert nach Weber et al., 2022.

1.2.2 Lebenszyklus von Podosomen

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei Podosomen um dynamische Strukturen, deren Lebenszyklus durch Auf- und Abbau des Aktin-reichen Kerns bestimmt wird. Der Lebenszyklus von Podosomen findet dabei seinen Anfang an lokalen Aktinnetzwerken, die über eine geringe Kontraktilität verfügen. Dies wird durch eine p190RhoGAP-vermittelte Inhibition der Rho-Kinase (ROCK) induziert (Burgstaller

und Gimona, 2004). Infolge des Kontraktilitätsrückgangs findet durch ein präzises Zusammenspiel von Lipiden (Zhou et al., 2020), Integrinen (Gaidano et al., 1990) und CDC42 (Kühn und Geyer, 2014) die Initiierung von Podosomen statt. Dabei werden initiale Proteine wie WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) aktiviert, welches beispielsweise durch eine Aktivierung des Aktinnukleatoren-Komplexes Arp2/3 das Wachstum des zentralen Aktinkerns einleitet (Linder et al., 1999, Linder et al., 2000). Gleichzeitig wird über eine Rekrutierung von Plaqueproteinen an die intrazellulären Domänen von Integrinen der Vorläufer des Podosomenrings um den Kern herum aufgebaut. Dieser Vorläuferring besteht initial aus mechanosensitiven Proteinen wie Talin und p130Cas, die zu diesem Zeitpunkt noch eine schwache Verbindung zum Podosomenkern aufweisen. Mit der Zeit wird der Kern durch Nukleation, Elongation und Quervernetzung weiter aufgebaut, bis er im Mittel einen Durchmesser von 0,5-1 μm und eine Höhe von ungefähr 1 μm erreicht (Linder et al., 2007). Neben der Kappe aus regulatorischen Proteinen bilden sich die lateralen Kabel. Diese Myosin-enthaltenden Aktinbündel reichen von der Kappe bzw. dem oberen Teil des Kerns, bis zu den Ringproteinen. Die Verbindung der Kabel zum Ring wird in einer mechanosensitiven Wechselwirkung durch die Rekrutierung von Ringproteinen wie Vinculin verstärkt und stabilisiert (Bouissou et al., 2017). Gleichzeitig bilden sich die dorsalen Kabel aus, welche einzelne Podosomen zu Superstrukturen verbinden (Joosten et al., 2018). In dieser Form ist das Podosom voll ausgebildet und kann neben seiner Funktion zur Adhäsion an die EZM, sowie das Erkennen der EZM-Topographie (van den Dries et al., 2012) auch als Plattform für proteolytische Degradation wirken, indem es mechanosensitiv den Transport von MMPs über Mikrotubuli-gerichteten Transport reguliert (Wiesner et al., 2016).

Die Auflösung von Podosomen findet im Gegensatz zum Aufbau in einem Umfeld hoher lokaler Kontraktilität statt (Rafiq et al., 2019). Diese entsteht durch eine erhöhte Myosin IIA-Aktivierung, beispielsweise durch das dafür an Podosomen rekrutierte Protein Supervillin (Bhuwania et al., 2012), oder über eine RhoA-abhängige Aktivierung (*Ras-Homology family member A*) der Rho-Kinase (van Helden et al., 2008). Die durch das überaktivierte Myosin IIA-vermittelte Hyperkontraktilität der Kabel führt zu einer Wachstumslimitierung des Kernwachstums, während gleichzeitig Dissoziationsfaktoren rekrutiert und aktiviert werden. Parallel werden essentielle Nukleationsfaktoren wie das WASP durch inhibierende Proteine wie Calpain abgebaut (Calle et al., 2006). Dies führt zu einer Depolymerisation des Aktinnetzwerks und einer Dissoziation des Podosoms. Eine Transmembran-Insel aus MT1-MMP kann an der Stelle des ehemaligen Podosoms zurückbleiben, die entweder durch einen Rab5-abhängigen Weg (*Ras-related Protein 5A*) endozytiert und recycelt wird (Hey et al., 2022) oder als Ankerpunkt für eine Neubildung von Podosomen dienen kann (El Azzouzi et al., 2016).

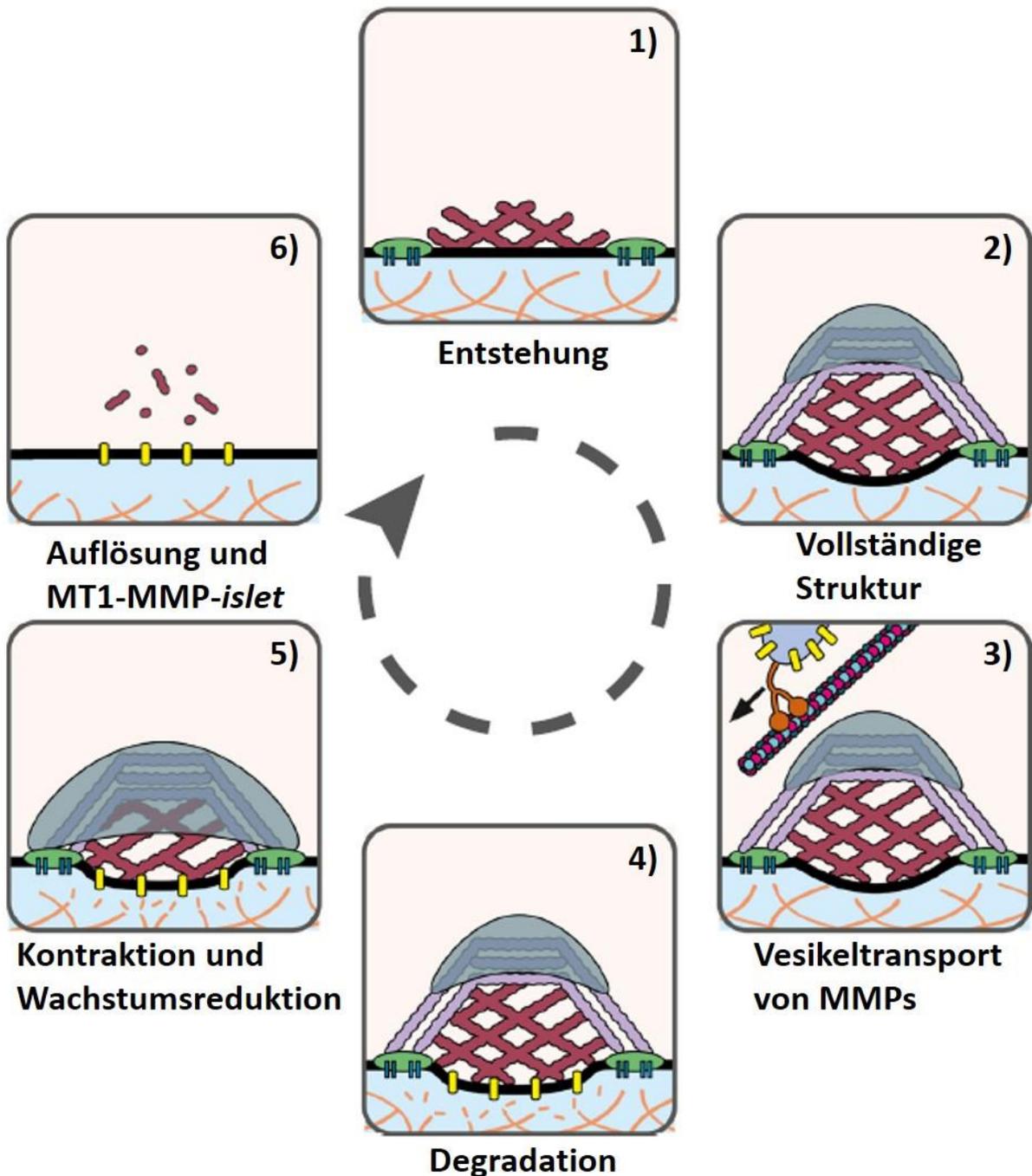


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Podosomenlebenszyklus. In einer Zone geringer Kontraktilität wird durch eine p190RhoGAP-vermittelte Reaktion die Polymerisation von Aktinfilamenten initiiert. Die Aktinfilamente wachsen zum Podosomenkern, während sich in der Peripherie ein Vorläufer des Podosomenrings bildet (1). Durch das Kernwachstum und Transduktionskräfte auf den Ring werden mechanosensitiv Adaptere rekrutiert, die die Podosomenstruktur stabilisieren, welche sich voll ausbildet. (2). Mikrotubuli mit Vesikeln können an Podosomen rekrutiert werden (3), was in einer proteolytischen Degradation der EZM durch membranständige und lösliche MMPs resultiert (4). Eine Hyperaktivierung des Myosin IIAs führt zu einer Kontraktion der Podosomenstruktur und schlussendlich zu dessen Dissoziation (5). Zurück bleiben Inseln von membranständigem MT1-MMP, die als Ankerpunkt einer neuen Podosomensynthese dienen können (6). Modifiziert nach Weber et al., 2022.

1.2.3 Podosome als mechanosensitive Strukturen

Initial wurden Podosome als adhäsive und degradative Strukturen beschrieben, die hauptsächlich für eine gerichtete Migration der Zelle an und durch Gewebe sorgen können. In neueren wissenschaftlichen Forschungen stehen sie vor allem wegen ihrer Rolle in der Mechanotransduktion im Fokus, die als essentieller Regulator der Podosomefunktion gilt. Dabei können Podosome nicht nur mechanosensitive Signale aus dem extrazellulären Raum empfangen und in einer intrazellulären Signalkaskade weiterleiten, sondern sind selbst zur Generation von Kräften befähigt (Schachtner et al., 2013). Dies wird durch ein Zusammenspiel der einzelnen Podosome-Substrukturen ermöglicht (Linder und Wiesner, 2016).

1.2.3.1 Kernwachstum und Protrusion

Der Polymerisation von Aktin in Filamente ist ein stark regulierter Prozess, der in nahezu allen eukaryotischen Zellen zum Aufbau des strukturellen Zytoskeletts beiträgt. Gleichzeitig stellt das Wachstum des Aktinnetzwerkes auch den zentralen Baustein der Podosome-synthese und seiner Kraftauswirkung dar (Labernadie et al., 2014). Aktin liegt in monomerer Form (G-Aktin) an ATP gebunden vor und kann durch Nukleatoren wie Arp2/3 oder Formine zu Polymeren verbunden werden, wobei das ATP zu ADP hydrolysiert wird. Das kurze Aktinfilament liegt dabei polarisiert vor und besitzt ein schnell wachsendes (+)-Ende (*barbed end*) und ein langsam wachsendes (-)-Ende (*pointed end*) (Goode und Eck, 2007). Die Elongation des Filaments wird wie die Nukleation durch Anlagerung von G-Aktin unter Hydrolyse des gebundenen ATPs durchgeführt, was durch Faktoren wie Ena/VASP (Oikawa et al., 2013) oder Profilin (Pollard und Cooper, 1984) unterstützt wird. Durch eine Formin-vermittelte Nukleation entstehen dabei unverzweigte Aktinfilamente (Hotulainen et al., 2006). Im Gegensatz dazu lagert sich der Arp2/3-Komplex an bereits bestehende Filamente an und initiiert durch die Nukleation die Synthese eines davon ausgehenden, verzweigten Aktin-Netzwerkes (Mullins et al., 1998). Zusätzlich können bestehende Filamente, reguliert beispielsweise durch α -Actinin (Courson et al., 2010), miteinander in einer lockeren Struktur quervernetzt oder durch Fascin (van Audenhove et al., 2015) eng gepackt gebündelt werden. Reguliert wird das Wachstum der Aktinfilamente dabei sowohl durch *Capping*-, als auch durch Schneide- und Dissoziationsproteine. Die Filament-*Capping*-Proteine binden dabei an das schnell wachsende (+)-Ende und verhindern so die Assoziation neuer Monomere, wodurch das Wachstum unterbrochen wird (Maun et al., 1996). Schneide-Proteine können hingegen ein bestehendes Filament teilen, wodurch ein neues (+)-Ende erzeugt wird, und eine Elongation trotz bestehendem *Cappings* des Mutterfilaments fortgesetzt wird. Dissoziationsfaktoren wie ADF/Cofilin (McGough und Chiu, 1999) unterstützen die Abspaltung von Aktinmonomere aus dem Filament heraus und sorgen damit für eine Verkürzung, oder einen Abbau des Filaments. Diese Reaktionen können dabei parallel ablaufen, so

dass ein Filament gleichzeitig am (+)-Ende aufgebaut und am (-)-Ende verkürzt wird. Dieser Prozess ist als Aktin-Tretmühlenmechanismus (engl. *actin-treadmilling*) bekannt, dessen Geschwindigkeit mit dem Begriff Aktin-Turnover-Rate beschrieben wird (Wegner und Isenberg, 1983). Die dissoziierten Monomere sind noch immer an das hydrolysierte ADP gebunden und müssen erst durch einen ADP/ATP-Austauschfaktor neu an ATP gebunden werden, um für eine neue Filament-Nukleation, oder -Elongation zur Verfügung zu stehen. Alle Reaktionen zusammen stellen dabei die Regulation des Aktinwachstums dar, was für eine korrekte Ausbildung von Zytoskelett und Migrationsstrukturen essentiell ist. In Podosomen erfüllt die Aktindynamik neben dem strukturellen Aufbau des Podosomenkerns auch noch die Funktion der Kraftgeneration für die Protrusion (Labernadie et al., 2014).

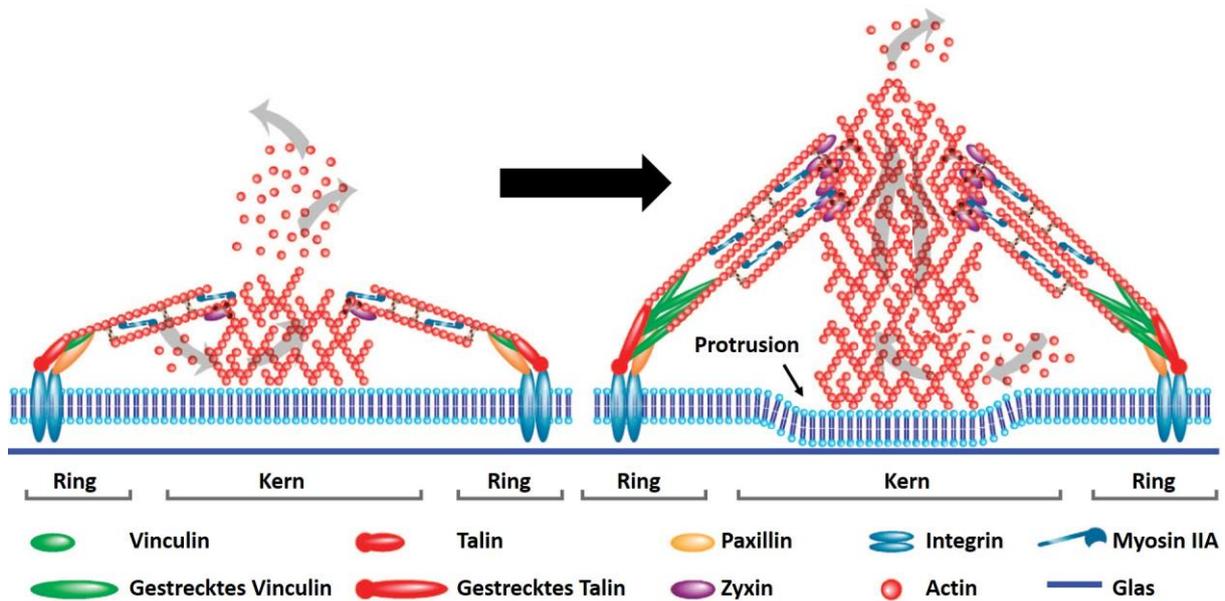


Abbildung 5: Protrusion des Podosoms durch Aktinpolymerisation. Gezeigt sind schematische Abbildungen eines kleinen (links), sowie großen (rechts) Podosoms. Der kleine Podosomenkern kann keine Protrusionskräfte auf die Membran ausüben und weist nur eine schwache Verbindung zu den Ringproteinen auf. Wenn im Kern die Aktin-Polymerisation gegenüber der -Dissoziation überwiegt, wächst der Kern, wodurch er eine Protrusionskraft auf die Membran ausüben kann, welche in den extrazellulären Raum gedrückt wird. Die Polymerisation wirkt zudem Zugkräfte auf den Ring auf, was zu einer Streckung der Ringproteine (z.B. Talin) führt und in einer mechanosensitiven Rekrutierung weiterer Proteine (z.B. Vinculin) resultiert. Modifiziert nach van den Dries et al., 2013.

Bei der Podosomenprotrusion drückt der zentrale Aktinkern die darunterliegende Zellmembran in die extrazelluläre Matrix, was die Oberfläche der Zelle leicht nach außen wölbt (Labernadie et al., 2014). Die Kraft für diese Reaktion entsteht aus dem Wachstum des Kerns durch Aktinpolymerisation. Je größer der Kern durch den Filamentaufbau wird, desto stärker ist seine wirkende Kraft auf die Zellmembran und dadurch auf die extrazelluläre Matrix. Diese Eigenschaft ist für die Funktion von Podosomen, die Topographie und Rigidität ihrer Zellumgebung zu detektieren, von zentraler Bedeutung. Die Protrusion der Podosomen in die extrazelluläre Matrix ist durch deren Rigidität begrenzt. Eine elastische EZM

lässt dabei bei gleicher Kraftauswirkung eine tiefere Protrusion zu als eine steife Matrix (Proag et al., 2015). Ist die Zelle auf einer sehr steifen, nur wenig verformbaren Matrix platziert, führt das Wachstum des Kerns dazu, dass die Kraft statt nach außen als eine Gegenkraft in den intrazellulären Bereich ausgeübt wird (Boiussou et al., 2017). Diese Kraft wird durch die lateralen Kabel als Zugspannung auf die verbundenen Ringproteine ausgeübt, was dort zu einer mechanosensitiven Signalkaskade führen kann.

1.2.3.2 Ringproteine und Mechanotransduktion

Die initiale Ringstruktur bildet sich früh im Lebenszyklus eines Podosoms durch die Bindung von Proteinen wie Talin an die intrazelluläre Domäne von Integrinen (Zambonin-Zallone et al., 1989). Bei Talin handelt es sich um ein mechanosensitives Protein, das unter physiologischen Bedingungen in einer sehr spezifischen Faltung vorliegt. So weist das Talin Bindungsstellen für das sekundäre Ringprotein Vinculin auf, diese sind jedoch durch die eigene dreidimensionale Struktur des Talins verdeckt und verhindern so eine Bindung („kryptische Bindungsstellen“) (del Rio et al., 2009). Talin ist zudem eines der Proteine, welches an das basale Ende der Aktomyosin-Kabel bindet. Erst durch eine Zugspannung der Kabel auf das Talin wird seine Struktur gestreckt und die kryptischen Bindungsstellen freigelegt. Vinculin wird in den Podosomenring rekrutiert, stabilisiert dessen Form und sorgt damit gleichzeitig für eine verstärkte Bindung zwischen Ring und Kabeln (Ciobanasu et al., 2014). Die Rekrutierung von Vinculin in die Struktur des Podosomenrings wird daher allgemein als Marker für ein physiologisch funktionales Podosom verwendet. Die Stabilisierung der Ring-Kabel-Bindung stellt zudem einen essentiellen Zwischenschritt in der Funktionsausübung von Podosomen dar, da Podosomen ohne korrekt ausgebildeten Ring eine deutlich verringerte Protrusionskraft aufweisen (Boiussou et al., 2017). Die Integrität des Podosomenrings inklusive seiner rekrutierten Proteine scheint dabei eher von der passiven Zugkraft durch das Kernwachstum (Herzog et al., 2020), als durch myosinvermittelte Kontraktionen reguliert zu sein (van den Dries et al., 2013).

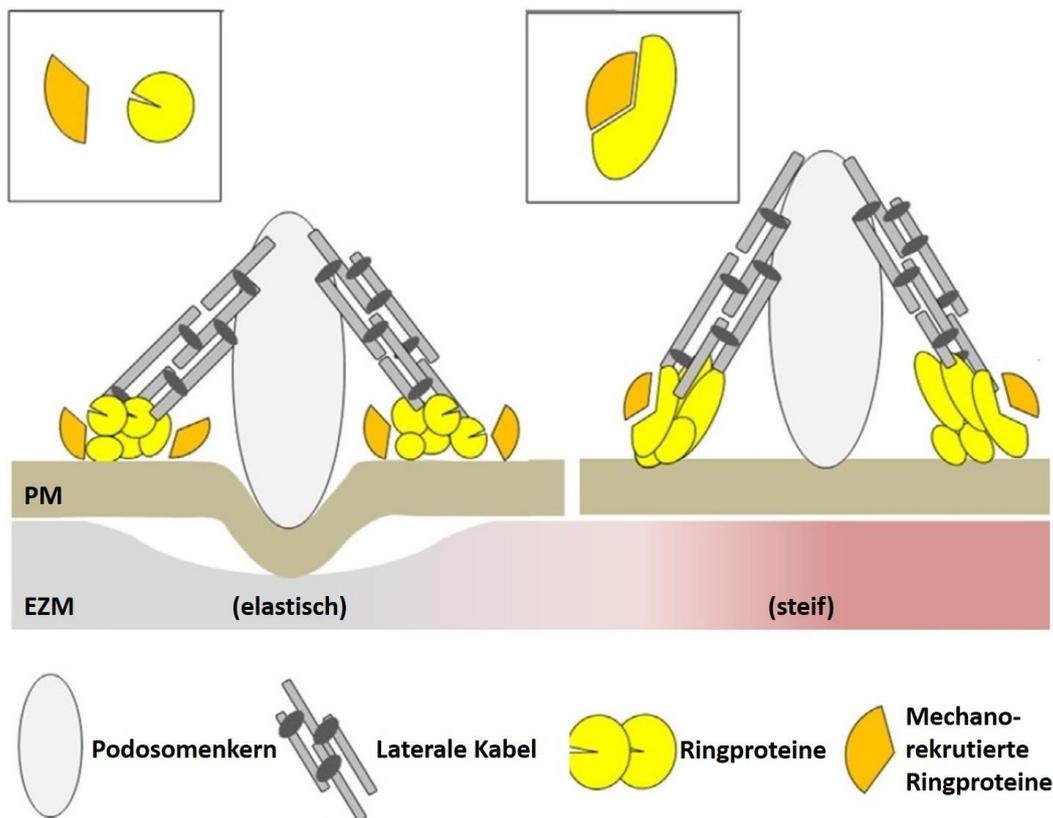


Abbildung 6: Mechanosensitive Rekrutierung von Ringproteinen. Gezeigt ist der schematische Aufbau eines Podosoms im Querschnitt mit F-Aktin-Kern (grau), lateralen Aktomyosin-Kabeln (dunkelgrau), sowie den Ringproteinen (gelb). Das Podosom protrudiert in eine verformbare extrazelluläre Matrix, wodurch nur geringe Kräfte auf die lateralen Kabel wirken. Podosomen auf einer steifen Matrix können weniger tief in die EZM protrudieren. Durch die Aktinpolymerisation des Kerns wirkt eine Kraft ins Zellinnere, wodurch die lateralen Kabel eine Zugspannung auf die Ringproteine ausüben. Deren Struktur wird gestreckt, verdeckte Bindungsstellen werden freigelegt und weitere Ringproteine (orange) können rekrutiert werden und binden. Modifiziert nach Linder und Wiesner, 2016.

Während die Talin-Vinculin-Interaktion im Kontext der fokalen Adhäsion bekannt ist (Humphries et al., 2007), wurde die spezifische Auswirkung der Rekrutierung mechanosensitiver Ringproteine auf intrazelluläre Kaskaden an Podosomen bisher nicht vollständig erforscht. Es ist jedoch bekannt, dass es neben der Talin-Vinculin-Wechselwirkung noch andere mechanosensitive Rekrutierungen an den Ring gibt (van den Dries et al., 2013). Es wird zudem vermutet, dass diese Reaktionen der Startpunkt für das Andocken von Mikrotubuli ist (Rafiq et al., 2019), auf denen über Kinesin-gerichteten Transport Vesikel mit proteolytischen Enzymen zu den Podosomen transportiert werden, die im Anschluss exozytiert werden, um die EZM zu degradieren (Linder und Wiesner, 2016).

1.2.3.3 Myosin und Kontraktilität der Kabel

Die Myosine sind eine Familie von Motorproteinen, die in verschiedenen Zelltypen für die Kontraktilität des Zytoskeletts essentiell sind. An Podosomen humaner Makrophagen lokalisiert vor allem die

Unterart Myosin IIA, welches als Dimer von zwei Proteinen vorliegt. Strukturell bestehen sie aus einer langen *coiled-coil*-Schwanzdomäne sowie aus einer Kopfdomäne. In der Kopfdomäne findet sich neben Aktin-Bindestellen auch eine ATPase-Domäne sowie eine essentielle und eine regulatorische leichte Kette (MLC, *myosin light chain*) (Slayter und Lowey, 1967). Während die meisten Vertreter der Myosinfamilie aus der Muskelkontraktion bekannt sind, befindet sich das nicht-muskuläre Myosin IIA in den Kabeln von Podosomen, wo es an die eng gebündelten, unverzweigten Aktinfilamente bindet (Labernadie et al., 2014). In einer ATP-abhängigen Reaktion kontrahiert das Myosin, wodurch es eine Kraft auf die gebundenen Aktinfilamente ausüben und eine Kontraktion der Kabel auslösen kann. Reguliert wird seine Funktion dabei durch die leichte Kette, wobei ihre Phosphorylierung (pMLC, *phosphorylated MLC*) durch einen RhoA/ROCK-abhängigen Signalweg die Aktivierung des Myosins anzeigt (Somlyo und Somlyo, 2000).

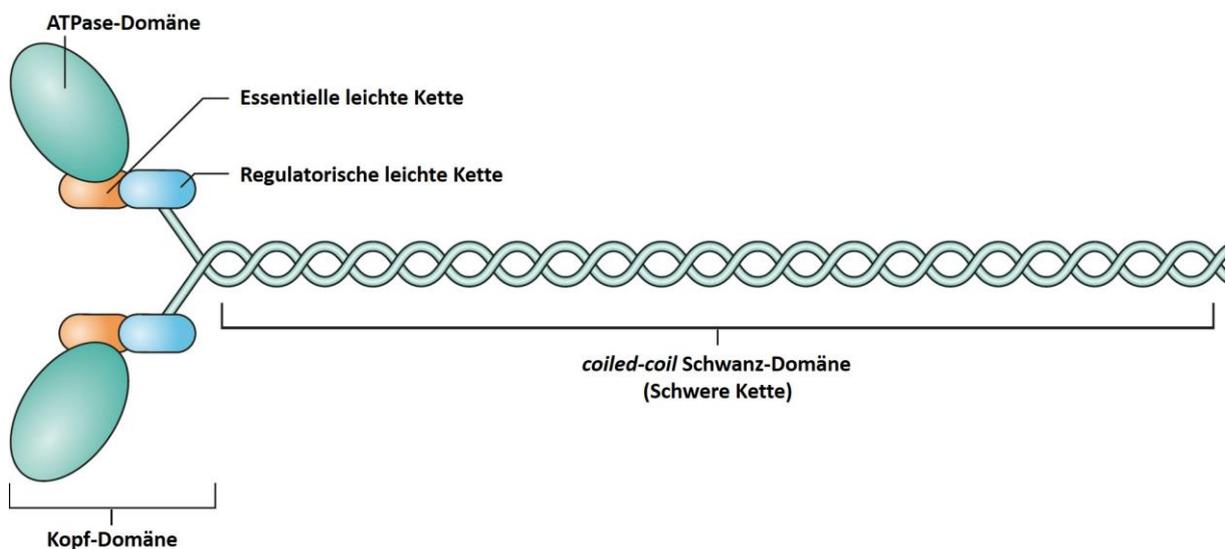


Abbildung 7: Schematische Struktur eines Myosin IIA-Dimers. Myosin IIA liegt durch die Interaktion der schweren Ketten in der coiled-coil-Domäne von zwei Monomeren als Homodimer vor. Zusätzlich weist die Struktur eine Kopfdomäne mit ATPase-Domänen und die leichte Kette auf. Diese ist unterteilt in einen essentiellen Teil und den phosphorylierbaren regulatorischen Teil. Modifiziert nach Vicente-Manzanares et al., 2009.

An Podosomen befindet sich der Großteil von Myosin IIA in den dorsalen Kabeln, welche Podosomen miteinander verbinden, was sie zur aktiven Kontraktion und damit Kraftausübung auf benachbarte Podosomen befähigt. Auch die lateralen Kabel, welche durch das Wachstum des Kerns eine passive Zugkraft auf den Ring ausüben können sind an Myosin IIA gebunden, wenn auch im Vergleich zu den dorsalen Kabeln mit deutlich verringertem Anteil (van den Dries et al., 2019). Ihre Kontraktion kann dabei eine Kraft ausüben, die vom Podosomenring ausgehend in Richtung des Zellinneren wirkt (Labernadie et al., 2014). Zu welchem Anteil diese aktive Kontraktion dabei im Vergleich zu der passiven Zugkraft

des Kernwachstums an der Weiterleitung mechanosensitiver Signale auf den Ring beteiligt ist, ist bisher noch nicht abschließend geklärt. Bekannt ist jedoch, dass die Kontraktionskraft der Kabel durch Proteine der Kappenstruktur beeinflusst werden kann, womit diese eine regulatorische Funktion auf verschiedene Podosomenfunktionen nehmen. So wurde beispielsweise berichtet, dass das Kappenprotein LSP1 die Aktivität von Myosin IIA stark erhöhen kann und damit einen Einfluss auf die Oszillation (wellenartige Größenänderung des Podosoms durch Veränderung der Aktin-Polymerisation) nehmen kann (Cervero et al., 2018). Der Einfluss auf die Aktinstruktur wurde zudem dadurch gezeigt, dass neben der Aktinpolymerisation auch die Myosin IIA-Aktivität die Generation von Protrusionskräften reguliert (Labernadie et al., 2014). Gleichzeitig führt eine Hyperaktivierung von Myosin IIA, die durch spezifische Kappenproteine wie Supervillin initiiert wird, zu einer Auflösung der Podosomen (Bhuwania et al., 2012).

1.2.3.4 Regulation durch Calciumsensitivität

Um die Aktivierung von Proteinen ausreichend kontrollieren zu können, gibt es in Zellen unterschiedliche Mechanismen. So wird die Regulation von Podosomen beispielsweise über den Phosphorylierungsstatus (Myosin IIA), die Strukturfaltung (Talin), sowie durch kompetitive Bindung anderer Faktoren (Maskierung des (+)-Endes von Aktinfilamenten durch *Capping*-Proteine) gesteuert. Ein weiterer Regulator ist die Bindung von elektrisch geladenen Ionen, welche zumeist eine Änderung der dreidimensionalen Struktur nach sich zieht und Proteine damit entweder in einer aktiven oder inaktiven Form stabilisiert. Im Kontext des Aktinzytoskeletts ist die Interaktion regulatorischer Proteine mit Calcium-Ionen bereits bekannt (Hepler, 2016) und auch an Podosomen konnte diese Reaktion bereits nachgewiesen werden. So handelt es sich beispielsweise beim Aktinfilament-bindenden Protein Calmodulin um ein Calcium-bindendes Protein (Cervero et al., 2018). Auch die Filament-schneidenden Proteine Villin und Gelsolin binden Calciumionen, wobei Gelsolin unter hohen Calcium-Konzentrationen auch eine hohe Affinität für das (+)-Ende besitzt und als *Capping*-Protein fungieren kann (Cehllia et al., 2000). Das Protein α -Actinin, ebenfalls Calcium-sensitiv, wirkt in der Bündelung und Quervernetzung von Aktinfilamenten (van den Dries et al., 2019). Auch die Interaktion der Formine INF2 (Wales et al., 2016) und FMNL-1 (Han et al., 2013) mit Calcium-Ionen wurde bereits beschrieben. Viele dieser Regulationsproteine des Aktinfilament-Wachstums wurden bereits als Podosomenproteine und zusätzlich zu einem großen Anteil als Teil der Podosomenkappe identifiziert (Linder und Cervero, 2020). Aber nicht nur aktinregulatorische Proteine werden durch Calciumbindung kontrolliert, so bindet beispielsweise auch das Myosin-aktivierende Kappenprotein LSP1 über seine C2-Domäne an Calcium-Ionen (Cervero et al., 2018). Die Aktivität des Myosin IIA wird auch direkt über eine Calcium-abhängige

RhoA-vermittelte Signalkaskade reguliert, die in einer verstärkten Phosphorylierung der leichten regulatorischen Kette resultiert (Somlyo und Somlyo, 2000). Ob die Akkumulation von Calcium-regulierten Proteinen an Podosomen und speziell in der Kappestruktur dabei einen Rückschluss auf einen gemeinsamen aktivierenden Signalweg oder die Funktionsvorhersage anderer calciumsensitiver Proteine zulässt, ist bisher nicht abschließend geklärt.

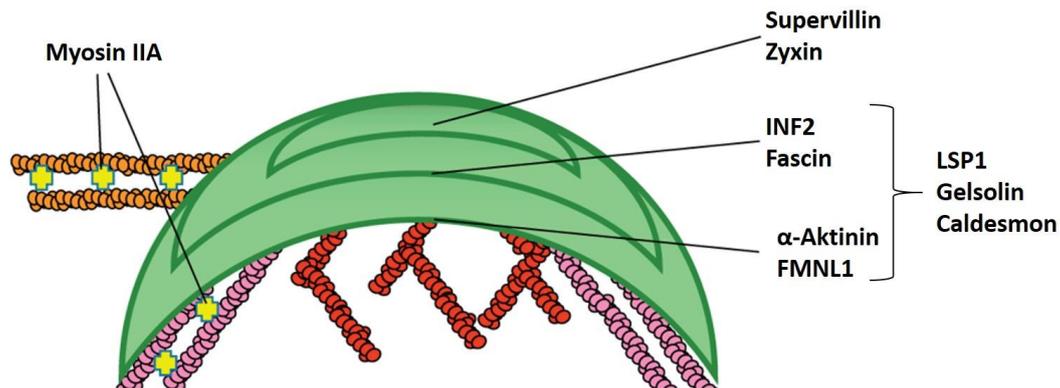


Abbildung 8: Schematische Abbildung des oberen Podosomenteils. Abgebildet sind ausgewählte Proteine, die direkt mit Calciumionen interagieren können (Kappen- und Kernproteine), sowie durch Calcium-vermittelte Signalkaskaden reguliert werden (Myosin IIA). Viele der Calcium-sensitiven Proteine sind in mehreren Schichten der Podosomenkappe lokalisiert. Modifiziert nach van den Dries et al., 2019b.

1.3 Swiprosin

Das *EF-hand-domain-containing protein 2* (EFhd2), auch Swiprosin-1 (im Folgenden SWS1) genannt, wurde zuerst in humanen Lymphozyten (Vuadens et al., 2004) identifiziert, seitdem aber in einer Vielzahl von Zelltypen und Organismen detektiert. So wurde es neben Zellen des Immunsystems, inklusive der Makrophagen (Tu et al., 2018), auch in Lunge, Niere und Gehirn (Avramidou et al., 2007) sowie im Nervensystem (Mielenz und Gunn-Moore, 2016) nachgewiesen. Für SWS1 wurde dabei ein breites Spektrum an Funktionen in sowohl normalem als auch pathologischem Kontext beschrieben. So wurde von Einflüssen auf Alzheimer (Ferrer-Acosta et al., 2013), Suchtverhalten (Mielenz et al., 2018) und Metastasierung von Tumorzellen (Fan et al., 2017), sowie auf Wundheilung (Moreno-Layseca et al., 2021) und Reparatur von Herzgeweben nach Herzinfarkten (Giricz et al., 2020) berichtet. Diese Funktionen erfüllt SWS1, indem es unter anderen mit apoptotischen (Avramidou et al., 2007) und inflammatorischen (Thylur et al., 2009) Signalwegen interagiert, seine wichtigsten Funktionen jedoch durch die Bindung von Calciumionen (Vega et al., 2008) und seine Interaktion mit dem Aktinzytoskelett (Ramesh et al., 2009) erhält. SWS1 wurde bereits durch eine massenspektrometrische Analyse des Podosomen-Proteoms als podosomales Protein identifiziert (Cervero et al., 2012), jedoch war seine genaue Lokalisation, Funktion und Regulation an dieser Struktur noch unbekannt.

1.3.1 Struktur

Bei SWS1 handelt es sich um ein Aktin-bindendes und Calcium-sensitives Protein, dessen Struktur in Wirbeltieren (vor allem *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*) über Insektenzellen (*Drosophila melanogaster*) (Hornbruch-Freitag et al., 2011) bis hin zu Fadenwürmern (*Caenorhabditis elegans*) (Dütting et al., 2011) konserviert vorliegt. Humanes SWS1 besteht dabei aus 240 Aminosäuren, die auf 4 funktionelle Domänen sowie eine wenig komplexe Region (englisch *low complexity*, im Weiteren LC-Region genannt) aufgeteilt sind. Die N-terminale LC-Region umspannt die ersten 42 Aminosäurereste. Bisher ist es weder gelungen, diese Region über Kristallografie darzustellen, noch gibt es gesicherte Informationen über Regulation und Interaktionspartner (Kwon et al., 2013, Park et al., 2016). Weiter in C-terminaler Richtung liegt eine Prolin-reiche Domäne, welche mit ihrem PxxP-Motif als Bindungsdomäne für Proteine mit SH3-Domänen dienen kann. Zudem kann das gehäufte Vorkommen von Prolinen in dieser Region auch einen Einfluss auf die dreidimensionale Struktur des Proteins haben, da Prolin als Brecher von α -Helices gilt (Li et al., 1996) und zu einer Linearisierung der Strukturfaltung führt. Des Weiteren weist SWS1 zwei verschiedene EF-hand-Domänen auf. Diese bestehen jeweils aus zwei flankierenden α -Helices, E- und F-Helix genannt, in deren Mitte sich eine Schleife aus 12 Aminosäureresten befindet. Während beide Helices die Schleife stabilisieren, bindet diese durch die Interaktion geladener Aminosäuren an Calcium-Ionen (Zhou et al., 2009). Am C-terminalen Ende von SWS1 liegt die *coiled-coil*-Domäne, ein lange α -Helix, die zur Homodimerisierung von zwei einzelnen SWS1-Molekülen dient. Zwischen der zweiten EF-hand-Domäne und der coiled-coiled-Domäne besitzt das SWS1 zudem noch ein Serin (Aminosäurerest S183), das als Stabilisierungspunkt der dreidimensionalen Struktur dient. Einige Publikationen berichten zusätzlich von einer kleinen Linker-Helix (Park et al., 2016 und 2017) zwischen der zweiten EF-hand-Domäne und dem Stabilisationspunkt, welche jedoch in folgenden Publikationen nicht in die Domänenstruktur übernommen wurde (Vega et al., 2019, Moreno-Layseca et al., 2021). Über seine gesamte Struktur verteilt weist SWS1 zudem drei Aktinbindestellen auf, die sich jeweils an der PR-Domäne, den zwei EF-hands, sowie C-terminal davon befinden.

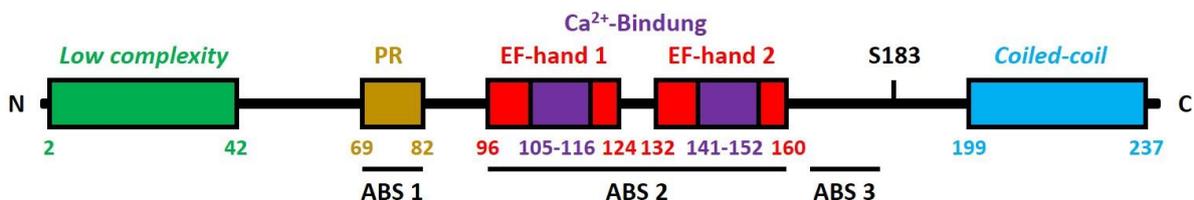


Abbildung 9: Domänenübersicht des humanen SWS1. SWS1 verfügt am N-Terminus über eine nicht näher definierte LC-Region (*low complexity*). In Richtung des C-Terminus liegt eine Prolin-reiche Domäne (PR), sowie zwei EF-hand-Domänen. Vor der C-terminalen coiled-coil-Domäne befindet sich der Stabilisationspunkt Serin-183. Zusätzlich markiert sind die drei Aktinbindestellen (ABS), sowie die Aminosäurepositionen der jeweiligen Domäne.

Die Struktur von SWS1 wurde durch Kristallographie aufgeklärt, jedoch konnte dabei nicht die N-terminale Region dargestellt werden, was auf eine sehr flexible Struktur, mutmaßlich durch wenige dreidimensionale Faltungen, schließen lässt. Zusätzlich war die Kristallographie nur möglich, während das SWS1 an Calcium-Ionen gebunden war, was auch hier auf eine flexible Konformation in calciumfreien Umgebungen hinweist, welche sich erst durch Calcium-Ionen stabilisiert (Park et al., 2016). Eine künstliche Intelligenz zur dreidimensionalen Strukturvorhersage von Proteinen, AlphaFold (Jumper et al., 2021), generierte ein in weiten Teilen mit der Kristallographie übereinstimmendes, dreidimensionales Modell von SWS1. Im Gegensatz zur empirischen Strukturbestimmung annotiert dieses Vorhersageprogramm für die N-terminale Sequenz jedoch zusätzlich zwei α -helikale Strukturen. Die erste Helix befindet sich dabei direkt am N-Terminus, während die zweite Helix die Aminosäurereste 51 bis 65 umfasst und damit direkt vor der Prolin-reichen Region endet. Die restliche LC-Region wird mit nur geringer Sicherheit als lineare Schleife vorhergesagt.

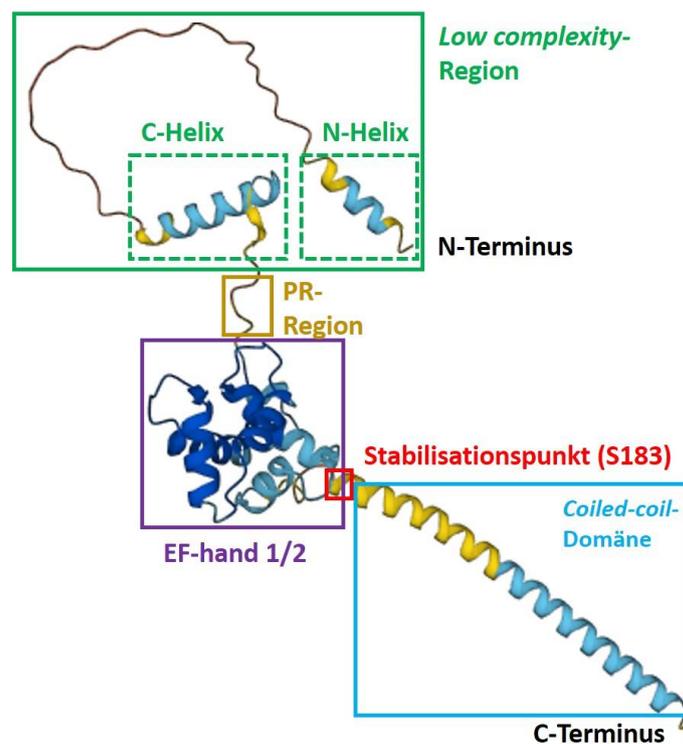


Abbildung 10: Strukturvorhersage des humanen SWS1 durch AlphaFold. Gezeigt sind die bereits durch Kristallografie bestätigten Strukturen der α -helikalen coiled-coil-Domäne am C-Terminus, sowie die beiden EF-hand-Domänen. Die Prolin-reiche Domäne wurde als lineare Kette vorhergesagt. Neue Erkenntnisse liegen über den bisher nicht kristallografierten N-Terminus vor, da hier eine lineare Kette mit zwei flankierenden α -Helices (N- und C-Helix) vorhergesagt wird. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q96C19>

1.3.2 Funktion und Regulation

Während für SWS1 Interaktionen mit apoptotischen und inflammatorischen Signalwegen, sowie mit dem Alzheimer-assoziierten Tau-Protein publiziert wurden, ist im Kontext dieser Doktorarbeit vor allem sein Einfluss auf das Aktinzytoskelett von großer Bedeutung. So wurde berichtet, dass SWS1-Expression zu einer stärkeren Bildung von Invadopodien in Tumorzellen (Fan et al., 2017) sowie Lamellipodien in B-Lymphozyten (Reimer et al., 2017) beiträgt. Diese Phänotypen entstehen dabei mutmaßlich, weil SWS1 durch seine Fähigkeit als Aktinbündler Einfluss auf sowohl Organisation als auch Dynamik von Aktinfilamenten nehmen kann. Für das Bündeln von Filamenten muss SWS1 Aktin über seine drei spezifischen Bindungsstellen binden, die sich alle im Bereich zwischen der Prolin-reichen Domäne, sowie der C-terminalen Dimerisierungsdomäne befinden. Zusätzlich müssen zwei SWS1-Moleküle miteinander interagieren, indem die jeweiligen *coiled-coil*-Domänen ineinander interkalieren, so dass ein Y-förmiges Homodimer entsteht (Kwon et al. 2013).

Damit dieses Dimer Aktinfilamente zu Bündeln zusammenbringen kann, muss es in der richtigen Konformation stabilisiert werden. In seiner nativen Form liegt der Stabilisierungspunkt S183 unphosphoryliert vor, wodurch er eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Aminosäure Aspartat-181 (D181) eingehen und das SWS1 in der richtigen Konformation halten kann. Nach einer Phosphorylierung der S183 durch einen EGF-abhängigen Signalweg wird diese Brückenbindung unterbrochen, das SWS1 weist eine flexiblere Struktur auf und verliert seine Fähigkeit Aktinfilamente zu bündeln (Park et al., 2017). Die restliche Stabilität der dreidimensionalen Struktur von SWS1 wird durch die Bindung der EF-hand-Domänen an Calcium-Ionen reguliert. Ohne gebundene Ionen trägt vor allem die erste EF-hand zu einer flexibleren Struktur von SWS1 bei, welche zwar eine vergleichbar starke Affinität für Aktin besitzt, jedoch nicht zur Aktinbündelung befähigt ist (Park et al., 2016). Eine Interaktion der Prolin-reichen Domäne mit der ersten EF-hand soll ebenfalls zur Stabilität beitragen, doch von der restlichen N-terminalen Sequenz ist keine regulatorische Funktion bekannt (Park et al., 2016).

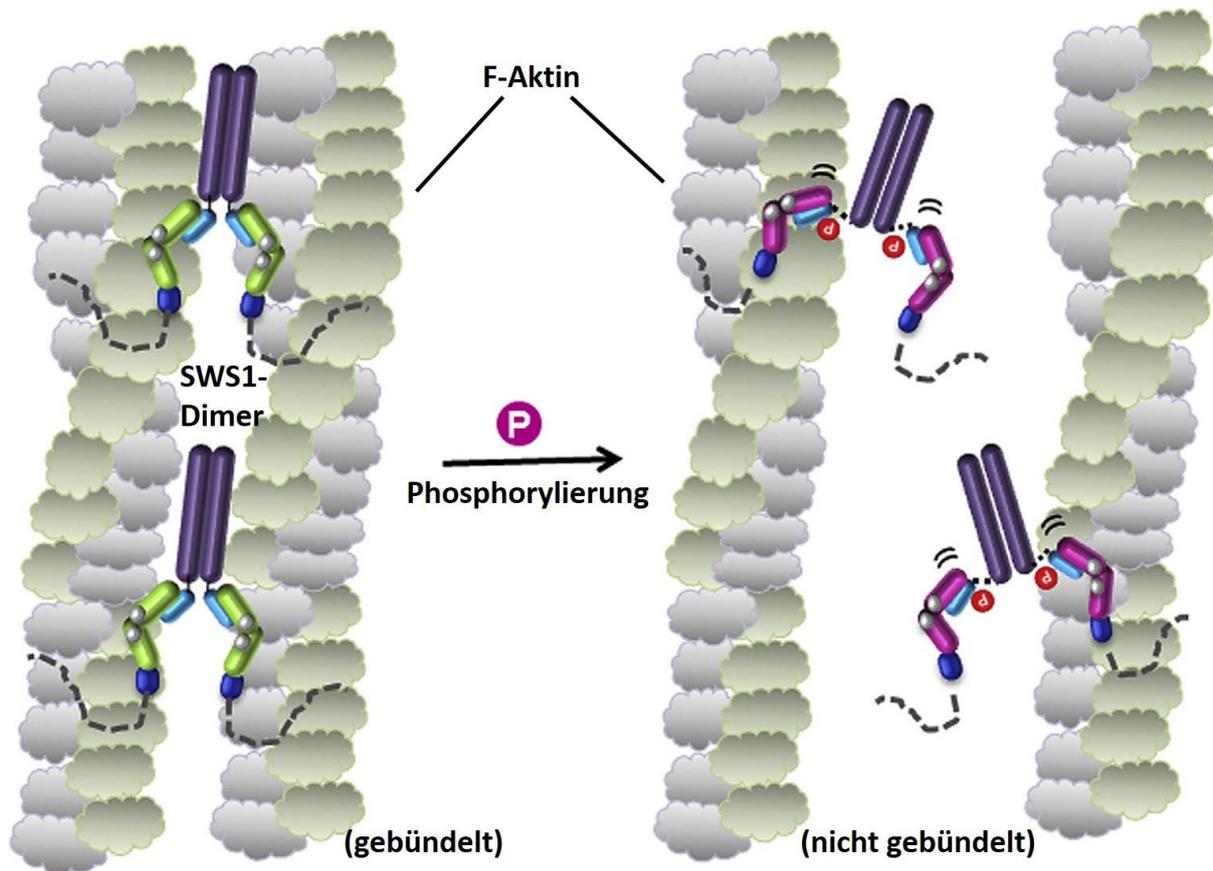


Abbildung 11: Regulation der Aktinbündelung durch SWS1-Phosphorylierung. Die SWS1-Homodimere interagieren über ihre C-terminale coiled-coil-Domäne und binden durch die Aktinbindungsstellen an Aktinfilamente. Bei unphosphoryliertem Stabilisationspunkt können sie dabei mehrere Filamente gleichzeitig binden und zu engen Bündeln zusammenführen. Durch eine Phosphorylierung des Aminosäurerests S183 wird die SWS1-Konformation geändert, so dass die Bündelungsfähigkeit verloren geht. Modifiziert nach Park et al., 2017.

Durch seine Regulation der Aktinfilament-Organisation beeinflusst SWS1 auch deren Dynamik. So verhindert das enge Bündeln von Aktinfilamenten, dass sich das Depolymerisationsprotein ADF/Cofilin an sie anlagern und deren Dissoziation initiieren kann (Huh et al., 2013). Zusätzlich zum Bündeln wurde berichtet, dass SWS1 auch zur Quervernetzung der Aktinfilamente beitragen kann. So scheint der Wechsel zwischen Vernetzen und Bündeln sowohl von der lokalen Konzentration von SWS1 als auch von der Calciumbindung seiner *EF-hand*-Domänen abhängig zu sein. Liegt das SWS1 in niedriger Konzentration vor, begünstigt es unabhängig von seiner Calciumbindung die Aktinquervernetzung (Lehne et al., 2022). Eine hohe Konzentration von SWS1 führt eher zu einer Bündelung von Aktinfilamenten, wobei es hierfür, wie bereits beschrieben, Calcium-Ionen binden muss. Während hiermit einige Signalwege und Mechanismen zur Regulation der SWS1-Funktion bereits beschrieben wurden, ist deren genaue Abstimmung aufeinander, sowie deren Einfluss auf die Podomenarchitektur bisher noch nicht bekannt.

1.4 Analyse von Podosomen

1.4.1 Auswertungsmethoden für Podosomen

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei Podosomen um sehr komplexe Strukturen mit über 300 verschiedenen Proteinen, die unter physiologischen Konditionen in unterschiedlicher Organisation in Zellen gebildet werden können und dabei eine Anzahl von 500 Strukturen pro Zelle überschreiten können. Sowohl Strukturkomplexität als auch Anzahl von Podosomen erschweren ihre quantitative Analyse. So wurden die Parameter fixierter und lebender Zelle nach der Mikroskopie oft durch eine zeitintensive, manuelle Auswertung einzelner Podosomen erhalten. Dies hatte zur Folge, dass meist nur wenige Podosomen pro Zelle (Guet et al., 2012) bzw. kleine Zellausschnitte analysiert und verglichen werden konnten. Zudem wurden zwischen verschiedenen Publikationen keine standardisierten Podosomenparameter verwendet, sondern teils auf subjektive Kategorien zurückgegriffen, was eine Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich erschwerte (Panzer et al., 2016). Auch die Lokalisation von Proteinen wurde anhand manuell gezogener Profillinien bestimmt, die meistens auf nur einem Podosom oder einem einzelnen kleinen Zellausschnitt, beruhten (van den Dries et al., 2010).

Dabei wäre eine robuste Methode zur Auswertung der gesamten Podosomenpopulation auch über das eigentliche Fachgebiet der Migrations- und Degradationsstrukturen hinaus von hohem Interesse. Podosomen sind nicht nur prominente Vertreter des Zytoskeletts, sondern können durch die Lokalisierung von sowohl Strukturproteinen als auch dem Großteil ihrer regulatorischen Proteine als Modellstruktur für unterschiedliche wissenschaftliche Fachrichtungen dienen. So ist es möglich, über die Messung von Anzahl und individueller Größe der Podosomen einen Rückschluss auf die Aktivität der Aktindynamik zu treffen, während beispielsweise die Interaktion von Talin und Vinculin als Modell für Mechanosensitivität dienen kann (Grashoff et al., 2010). Auch die Regulation der Myosinaktivität durch eine Vielzahl der in der Kappe vertretenen Proteine, kann an Podosomen untersucht werden (Cervero et al., 2018).

Aktuelle Methoden zur Analyse von Podosomen konzentrieren sich zu einem Großteil auf die optische Detektion und Profilanalyse in Bildern der Mikroskopie lebender (*live-cell*) und fixierter (*fixed-cell*) Zellen. Zusätzlich spezialisieren sie sich je nach Anwendung entweder auf die Analyse der gesamten Zelle oder auf die Strukturanalyse einzelner Podosomen. So wurden Algorithmen beschrieben, die automatisch Zellumrisse erkannten und die Anzahl der Podosomen pro Zelle detektierten (Cervero et al., 2013), oder die Fluoreszenzprofile der Proteine in Podosomen erstellten. Die Profile wurden dabei entweder als segmentierte Umrisse des Podosoms (Meddens et al., 2013), oder als Intensitätsverteilung anhand einer Profillinie (Joosten et al., 2018) ermittelt. In der *live-cell*-Mikroskopie wurden meistens

einzelne Strukturen über die Zeit verfolgt oder die Intensitätsänderung spezifischer Marker in der gesamten Zellfläche detektiert (Berginski et al., 2014). Einen Durchbruch des *live-cell-Trackings* stellte dabei das ImageJ-Plugin Trackmate dar, das das gleichzeitige Verfolgen aller zirkulären Strukturen innerhalb einer Zelle ermöglichte (Tinevez et al., 2017). Unter anderem durch die Integration moderner Segmentationsalgorithmen wurde diese Methode noch weiter verbessert (Ershov et al., 2022). Da die Funktion podosomal Proteine aber sowohl Einfluss auf individuelle Podosomen als auch auf die gesamte Zellfläche nehmen kann, ist für eine verlässliche Analyse eine Methode vonnöten, die Strukturänderungen an Podosomen in Relation zu Morphologie und Proteinlokalisierung der Zelle setzt. Eine solche Methode war bis zum Beginn dieser Doktorarbeit nicht vorhanden.

1.4.2 Analyse der podosomalen Kräfte

Wie beschrieben, wirken in Podosomen mehrere Arten von Kräften. Dazu gehören die nach außen gerichtete Protrusion, die auf die Kabel wirkende Zugspannung, sowie die entgegengerichtete Kontraktionskraft der lateralen Kabel. Die Stärke der Protrusion von Podosomen kann durch mehrere Methoden analysiert werden, wobei die beiden prominentesten Beispiele AFM und ERISM sind. Bei der AFM (*Atomic Force Microscopy*) (Binnig et al., 1986) wird ein elastischer, federnder Träger mit einer Spitze auf die Zelloberfläche aufgelegt. Ein Laser reflektiert auf der Oberfläche des Trägers und wird von einem Detektor registriert. Die Spitze des Trägers wird langsam über die gesamte Zelloberfläche bewegt, bis sie auf eine durch Protrusion ausgelöste Membrankrümmung trifft. Dies biegt die Spitze nach oben, wodurch der Träger deformiert und der Laser ablenkt wird. Der Grad der Laserauslenkung gibt dabei Aufschluss über die Tiefe der Protrusion und damit über die Kraftauswirkung des Aktinnetzwerks. Diese Methode wurde speziell für die Kraftmessung von Podosomen durch die Einführung einer zusätzlichen, verformbaren Schicht zwischen Zelle und Trägerspitze weiterentwickelt (PFM, *Protrusion Force Microscopy*) (Labernadie et al., 2014). Dadurch konnten zusätzlich zur Protrusion auch die entgegenwirkenden Traktionskräfte der Kabel identifiziert werden (Bouissou et al., 2017).

Bei der ERISM-Methode (*Elastic Resonator Interference Stress Microscopy*) (Kronenberg et al., 2017) wird die Zelle auf einem Sensor platziert, der aus einem elastischen Material zwischen mehreren dünnen Goldschichten besteht. Ein Laser wird in das Elastomer gelenkt und nach Reflektion an der Goldschicht detektiert. Die Protrusion der Podosomen verformt dabei sowohl die Goldschichten als auch das Elastomer, was durch eine Ablenkung des Laserstrahls charakterisiert werden kann. Hier dient der Grad der Elastomer-Verformung als Referenz für die Protrusionsstärke. Der Vorteil gegenüber der AFM liegt dabei darin, dass nicht nur mehrere Strukturen gleichzeitig beobachtet werden können, sondern

dass zudem eine zeitliche Beobachtung dieser dynamischen Prozesse möglich ist. Dadurch konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Protrusionstiefe von Invadopodien und deren degradativer Fähigkeit hergestellt werden (Dalaka et al., 2020).

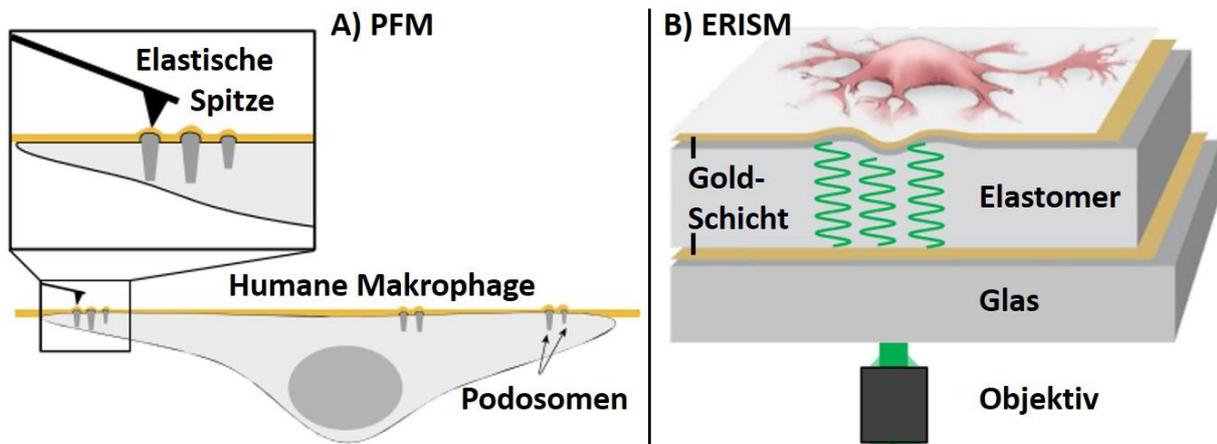


Abbildung 12: Übersicht über Methoden der Protrusionsmessung. (A) Bei der *Protrusion Force Microscopy* (PFM) adhärirt die Zelle an eine *Formvar*-Schicht, die durch die Protrusion einzelner Podosomen verformt wird. Die Stärke der Verformung wird durch einen elastischen Träger mit Spitze analysiert. Modifiziert nach Labernadie et al., 2014. (B) Für die *Elastic Resonator Interference Stress Microscopy* (ERISM) wird die Zelle auf einem goldbeschichteten Elastomer platziert und dessen Verformung durch Protrusion über die Detektion eines abgelenkten Laserstrahls analysiert. Im Gegensatz zur PFM sind hier Beobachtungen mehrerer Strukturen und über längere Zeiträume möglich. Modifiziert nach Kronenberg et al., 2017.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit wurde in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Teil sollte eine robuste Analysemethode entwickelt werden, die eine schnelle, automatisierte und objektive Analyse von Podosomen zuließ. Diese Methode sollte dabei Parameter wie die Größe und Proteinkomposition individueller Podosomen, die Proteinlokalisierung innerhalb der gesamten Podosomenpopulation einer Zelle, sowie die Morphologie der Zelle analysieren und automatisch in Relation zueinander setzen. Dadurch sollte ermöglicht werden, den Einfluss verschiedener Proteine auf Podosomen sowie auf das gesamte Zytoskelett charakterisieren zu können.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit sollte diese Methode als Standardwerkzeug verwendet werden, um Lokalisation, Funktion und Regulation von SWS1 an Podosomen zu erforschen. Dabei sollte vor allem aufgeklärt werden, in welchem Teil der Podosomenstruktur SWS1 lokalisiert, ob bereits bekannte Interaktionen mit der Aktindynamik auf Podosomen übertragen werden können und ob diese Beobachtungen dazu beitragen können, das Modell der Podosomenfunktion und -regulation zu ergänzen.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe (D)
BAPTA-AM	Abcam, Milton (UK)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Blebbistatin	Merck, Darmstadt (D)
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt (D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe (D)
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
CD14-Kügelchen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe (D)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (D)
DPBS (steril)	Thermo Scientific, Waltham (USA)
ECL-Substrat (Pico)	Thermo Scientific, Waltham (USA)
ECL-Substrat (Femto)	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Essigsäure (100%)	Roth, Karlsruhe (D)
Ethyldiamin-Tetra-Acetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe (D)
Ethanol (96%)	Roth, Karlsruhe (D)
Glutaraldehyd (50%)	Roth, Karlsruhe (D)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (D)
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Hefeextrakt	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Ionomycin	Santa Cruz, Dallas (USA)
Isopropanol	Merck, Darmstadt (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (D)
Methanol	Roth, Karlsruhe (D)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (D)
Mowiol	Roth, Karlsruhe (D)
NaCl	Roth, Karlsruhe (D)
NaOH 32%	Roth, Karlsruhe (D)
NHS-Rhodamin	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Penzberg (D)
Salzsäure (2 N)	Roth, Karlsruhe (D)
SDS	Roth, Karlsruhe (D)
Streptavidin-Agarose-Harz	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Sucrose	Roth, Karlsruhe (D)
SybrSafe	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Triethylamin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tris-Base	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Triton-X	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypton	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

2.2 Zusätze für die Zellkultur

Tabelle 2: Übersicht der Zellkultur-Zusätze.

Bezeichnung	Hersteller
Humanes Serum	Transfusionsmedizin, UKE Hamburg (D)
Kanamycin (200 µg/ml)	Serva, Heidelberg (D)
L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin (100x)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Lymphozyt-Trenn-Medium-1077	PAA Laboratories, Pasching (A)
Opti-MEM	Thermo Scientific, Waltham (USA)
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

2.3 Puffer

Tabelle 3: Rezepte für die verwendeten Pufferlösungen.

Bezeichnung	Herstellung
Blockierlösung (IF)	PBS mit 3% (v/v) bovinem Serumalbumin
Blockierlösung (WB)	TBS-T mit 5% (v/v) bovinem Serumalbumin
Färbepuffer (IF)	PBS mit 1,5% (v/v) bovinem Serumalbumin
Prim. Antikörper-Puffer (WB)	TBS-T mit 5% (v/v) bovinem Serumalbumin
Sek. Antikörper-Puffer (WB)	TBS-T mit 5% (v/v) Milchpulver
Gelatine-Lösung	50 mM Natriumboratlösung mit 0,36% (w/v) NaCl und 0,2% (w/v) Gelatine
Permeabilisierungs-Puffer	PBS mit 0,1% (v/v) Triton-X
Glyoxal (4 ml)	H ₂ O (2,835 ml) mit 789 µl Ethanol (96%), 313 µl Glyoxal, 30 µl HCl (2M) und 180 µl NaOH (32%), pH 5
Lämmli-Puffer	H ₂ O mit 125 mM Tris-HCl, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol und 0,02% (w/v) Bromphenolblau
LB-Agar	H ₂ O mit 1% (w/v) Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 5% NaCl und 1,6% Agar-Agar; pH 7,2
LB-Medium	H ₂ O mit 1% (w/v) Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 5% NaCl; pH 7,2
Lysepuffer	H ₂ O mit 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 1% (v/v) Triton-X-100
Mild stripping buffer	H ₂ O mit 1,5% (w/v) Glycin, 0,1% (w/v) SDS und 1% (v/v) Tween-20; pH 2,2
Monozytenpuffer	PBS mit 2 mM EDTA und 0,5% (w/v) humanem Serumalbumin; pH 7,4
Monomedium	RPMI mit 20% (w/v) humanem Serumalbumin und 1:1000 Penicillin/Streptomycin
Mowiol	H ₂ O mit 100 mM Tris-HCl, 10% (w/v) Mowiol, 25% (v/v) Glycerin und 2,5% (w/v) Triethylamin
PBS (10x)	H ₂ O mit 8% (w/v) NaCl, 1,4% (w/v) Na ₂ HPO ₄ , 0,2% KH ₂ PO ₄ und 0,2% (w/v); pH 7,3
Permeabilisierung (IF)	PBS mit 0,1% (v/v) Triton-X
SDS-Laufpuffer (10x)	H ₂ O mit 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS
TAE-Puffer (10x)	H ₂ O mit 40 mM Tris-HCl, 20 mM Essigsäure und 1 mM EDTA, pH 8,4
TBS-T (10x)	H ₂ O mit 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 3% Tween-20; pH 7,4

2.4 Antikörper und Färbereagenzien

Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Färbereagenzien. WB: Western Blot, IF: Immunofluoreszenz.

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung WB	Verdünnung IF	Hersteller
Anti-GAPDH	Kaninchen	1:20.000	-	Proteintech, Planegg (D)
Anti-Kaninchen-AF-568	Esel	-	1:200	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:5.000	-	Cell signalling, Cambridge (UK)
Anti-Maus-AF-488	Ziege	-	1:200	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Anti-Maus-HRP	Schaf	1:5.000	-	GE Healthcare, Chicago (USA)
Anti-Phospho-MLC	Kaninchen	-	1:100	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Anti-Swiprosin-1	Kaninchen	1:500	1:100	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Anti-Vinculin	Maus	-	1:200	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Anti-Zyxin	Maus	-	1:200	Thermo Scientific, Waltham (USA)
DAPI	-	-	1:1.000	Roth, Karlsruhe (D)
Phalloidin-AF-488/568/647	Knollenblätterpilz	-	1:100	Thermo Scientific, Waltham (USA)

2.5 Oligonukleotide (Primer und siRNA)

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide. Aufgelistet sind die DNA-Primer für die PCR, sowie die siRNA für Depletionen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
SWS1-EcoRI-fw	AAATTTGAATTCATGGCCACGGACGAGCTGGCC
SWS1-XhoI-fw	AAATTTCTCGAGATGGCCACGGACGAG
SWS1-ΔLC-XhoI-fw	CTCGAGATGGAGGCGGCCGAGGCGCTGGGC
SWS1-LC-EcoRI-rev	AAATTTGAATCCCCTCGGCCGCTCGTCGGG
SWS1-XhoI rev	AAATTTCTCGAGCTTAAAGGTGGACTGCAGCTC
SWS1-EcoRI rev	AAATTTGAATTCCTACTTAAAGGTGGACTG
SWS1-noStop-rev	ACCGTCGACTGCAGAATTCATACTTAAAGGTGGACTGCAG
SWS1-si-insens-fw	AAGGAGGTGGATGAGGATTTTGATAGCAAACCTGAGCTCCGGGAGTTCC
SWS1-si-insens-rev	GGAACCTCCGGAAGCTCAGTTTGCTATCAAAAATCCTCATCCACCTCCTT
siLuciferase	(dTdT)AGGUAGUGUAACCGCCUUGUU
siSWS1 #1	(dTdT)GACUUUGACAGCAAGCUGA
siSWS1 #2	(dTdT)GGGAGUCCUCCUGAUCUU

2.6 Plasmide

Tabelle 6: **Verwendete Konstrukte.** Aufgelistet sind sowohl selbst hergestellte, als auch aus anderen Quellen erhaltene Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Hersteller
β-Actin-GFP	Markierung Aktin in FRAP-Experimenten	P. Cervero, Hamburg (D)
C3-GFP	Rückgratplasmid für die Klonierung	Clontech, Saint-Germain-en-Laye (F)
GFP-SWS1	Volllängenkonstrukt für SWS1 (GFP N-terminal)	R. Herzog, Hamburg (D)
GFP-SWS1-ΔLC	Deletion der LC-Region (AS 1-42)	R. Herzog, Hamburg (D)
GFP-SWS1-LC	Ausschließlich LC-Region (AS 1-42)	R. Herzog, Hamburg (D)
Lifeact-mCherry	Markierung F-Aktin in <i>live-cell</i> -Mikroskopie	Ibidi, Gräfelfing (D)
miniTurbo	Ursprungsvektor miniTurbo	T. Spielmann, Hamburg (D)
miniTurbo-SWS1	SWS1 mit gebundener miniTurbo für Massenspektrometrie	R. Herzog, Hamburg (D)
pCMV-SWS1-Sport6	Ursprungsvektor SWS1	D.Mielenz, Erlangen (D)

2.7 Enzyme

Tabelle 7: **Verwendete Enzyme.**

Bezeichnung	Hersteller
Accutase	eBioscience, San Diego (USA)
EcoRI	Thermo Scientific, Waltham (USA)
T4-DNA-Ligase	Promega, Fichtburg (USA)
XhoI	Thermo Scientific, Waltham (USA)

2.8 Kits

Tabelle 8: **Kommerziell erworbene Kits.**

Bezeichnung	Hersteller
FastDigest Restriction Enzyme Kit	Thermo Scientific, Waltham (USA)
iBlot 2 NC miniStack-Kit	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Miniprep Classic Kit	Zymo Research, Freiburg (D)
Neon Transfection Kit	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Phusion High Fidelity Kit	Thermo Scientific, Waltham (USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden (D)
μMacs ProteinA/G-Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
μMacs GFP-Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)

2.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Dialyse-Kassetten	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Glasplättchen (Ø 12 mm)	Karl Hecht GmbH, Söndheim v. d. Rhön (D)
Kultivierungsplatten (6-/12-Kammern)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Mikroskopieplatte (Glasboden, 8 Kammern)	Ibidi, Gräfelfing (D)
Objektträger	Karl Hecht GmbH, Söndheim v. d. Rhön (D)
Petrischalen	Nerbe plus GmbH, Winsen (Luhe) (D)
Pipettenspitzen (10/100/1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Reaktionsröhrchen (15/50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Serologische Pipetten (5/15/25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Skalpell (Plastik)	B.Braun, Melsungen (D)
Stericup Vakuum Filter 0,2 mm mit Flasche	Millipore, Billerica (USA)
Sterilfilter, Filtopur S, 0,2 µm Poren	Sarstedt, Nümbrecht (D)

2.10 Inventar

Tabelle 10: Inventar der Laborarbeit.

Bezeichnung	Typ, Hersteller
Elektorporator	Neon Transfection System, Thermo Scientific, Waltham (USA)
Gelkammer (Agarose)	Peqlab, Erlangen (D)
Gelkammer (SDS)	Bio-Rad, Hercules (USA)
Inkubator	Heracell 150i, Thermo Scientific, Waltham (USA)
Kühlschank (4°C)	Liebherr Premium, Bulle (CH)
Magnetrührer	IKA RH Basic 2, Thermo Scientific, Waltham (USA)
pH-Meter	Five easy, Mettler Toledo, Columbus (USA)
Pipetten	Peqette, VWR International, Radnor (USA)
Schüttler	Biometra LT 12, Analytik Jena, Jena (D)
Spektralphotometer	Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham (USA)
Sterilbank	MSC Advantage, Thermo Scientific, Waltham (USA)
Taumler	KL 2, Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen (D)
Tiefkühlung (-20°C)	Gram bioline, Vojens (DK)
Thermomixer	Thermomix Compact, Eppendorf, Hamburg (D)
Tischmikroskop	Eclipse TS100, Nikon, Chiyoda (JP)
Transilluminator	TFX-20M, Bio-Rad, Hercules (USA)
Vortexer	Reax top, Heidolph Instruments, Schwabach (D)
Waage	PFB-300, Kern und Sohn GmbH, Ballingen (D)
Western Blot	iBlot, Life Technologies, Carlsbad (USA)
Western Blot Detektor	C-Digit, Licor, Lincoln (USA)
Western Blot Detektor	Cytiva, Amersham (UK)
Zählkammer	Neubauer, Hartenstein, Würzburg (D)
Zellkulturpumpe	Integra Vacusafe, Integra.Bioscience, Zizers (CH)
Zentrifuge (klein)	5417R, Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge (groß)	5810R, Eppendorf, Hamburg (D)

2.11 Mikroskope

Tabelle 11: SP5-Mikroskop für fixierte Zellen.

Bezeichnung	Komponenten	Parameter	Einstellung
Detektoren	3x Hybrid-Detektor 1x Photomultiplier (PMT) 1x Trans-PMT	Auflösung	120,2 nm/Pixel (Übersicht) 60,1 nm/pixel (Detail)
Laserlinien	Multi-Argon: 488 nm DPSS: 561 nm Helium-Neon: 633 nm	Bidirektionaler Scan	Ja
Mikroskop	Leica DMI 600	Biologische Größe (lateral)	246,15 µm x 246,15 µm (Übersicht) 61,57 µm x 64,57 µm (Detail)
Objektiv	63x HCX PL APO Lbd. Bl. Oil NA: 1,4-0,6 WD: 0,1 mm	Biologische Größe (vertikal)	250 nm/optische Ebene 2-2,5 µm Gesamtgröße
Software	Leica LAS AF	Pinhole	95,54 µm
		Pixelanzahl	2048x2048 (Übersicht) 1024x1024 (Detail)
		Zoomfaktor	1x (Übersicht), 4x (Detail)

Tabelle 12: Visitron-Mikroskop für lebende Zellen.

Bezeichnung	Komponenten	Parameter	Einstellung
Beweglicher Schlitten	Ludl BioPrecision2	Auflösung	110 nm/Pixel
Inkubations-Einheit	Okolab bold line	Biologische Größe (lateral)	131,76 µm x 131,76 µm (Generell) 65,88 µm x 65,88 µm (Detail)
Kameras	2x Photometric Prime 95B	Frame-Rate	1 Bild/10 Sekunden (Generell) 1 Bild/Sekunde (FRAP)
Laserlinien	Festphase: 405/488/568 nm	Pixelanzahl	1200x1200 (Generell) 600x600 (FRAP)
Mikroskop	Nikon Eclipse TiE	Spinning Disk	Konfokal (50 µm Pinhole)
Objektiv	100x CFI Plan APO Lambda NA: 1,45 WD: 0,13 mm	Videolänge	30 Minuten (Generell) 2 Minuten (FRAP)
Software	VisiView	Zoomfaktor	1x

2.12 Software

Tabelle 13: Verwendete Software.

Bezeichnung	Herkunft
Endnote	Clarivate, Philadelphia (USA)
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., San Diego (USA)
ImageJ/FIJI	Wayne Rasband (NIH), Bethesda (USA)
MS-Office	Microsoft, Redmond (USA)
Poji	Herzog et al., 2020
SnapGene Viewer	GSL Biotech LLC, Chicago (USA)
Trackmate	Tinevez et al., 2017
Volocity Demo	Perkin Elmer, Waltham (USA)

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Isolation und Kultivierung primärer humaner Makrophagen

Humane periphere Blut-Monozyten wurden aus den *buffy coats* isoliert. Dabei handelt es sich um die bei der Blutspende zwischen Plasma und Erythrozytenkonzentrat verbleibende Grenzschicht aus Thrombozyten und Leukozyten (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Franz Bentzien, Transfusionsmedizin, UKE Hamburg). Hierfür wurden 15 ml Lymphozyten-Trennmedium mit je 20 ml der *buffy coats* überschichtet und bei 450 x g und 4°C ohne Bremse für 30 Minuten abzentrifugiert. Die entstandene Schicht aus Leukozytenzellen wurde abgenommen und in drei aufeinanderfolgenden Schritten mit jeweils 50 ml RPMI-Medium gewaschen, indem sie resuspendiert und dann abzentrifugiert wurden. Die Zellen wurden in 1,5 ml Monozytenpuffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis an 250 µl CD14-bindende magnetische Kügelchen gebunden. Die Suspension wurde auf eine Separationssäule mit Prä-Separationsfilter gegeben und die Monozyten unter mehrmaligen Waschen mit je 1 ml Monozytenpuffer in einem Magnetfeld über positive Selektion isoliert. Das Monozyten-Konzentrat wurde mit 3 ml Monozytenpuffer in RPMI eluiert und in einer Konzentration von 2×10^6 pro 1 ml RPMI in Kulturplatten für 4 Stunden kultiviert. Danach wurde das RPMI entfernt und die Zellen in 1,5 ml Monomedium erst über Nacht und nach einem weiteren Mediumswechsel für weitere 5 Tage zu Makrophagen differenziert. Die Kultivierungsbedingungen für diesen, sowie alle folgenden Inkubationsschritte der Makrophagen, betrug dabei 37°C bei 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Gehalt.

3.1.2 Aussäen der Zellen

Alle folgenden Experimente mit primären humanen Makrophagen wurden in einem Zeitraum von 6 bis 10 Tagen nach dem Kultivierungsstart durchgeführt. Nach erfolgter Differenzierung wurden die adherenten Makrophagen mit 1 ml PBS gewaschen und durch Zugabe von 500 µl Accutase und Inkubation für 50 Minuten bei 37°C aus der Kultivierungsplatte abgelöst. Die Accutase-Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl Monomedium gestoppt, die Zellen über mehrmaliges, vorsichtiges Resuspendieren abgelöst und die Konzentration der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde bei 450 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in RPMI zu einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 1 ml Medium resuspendiert. Im Anschluss wurden jeweils 1×10^5 Zellen auf 12 mm-Glasplättchen gegeben und zunächst für eine Stunde inkubiert. Nach einem Mediumswechsel auf 1 ml Monomedium wurden die Zellen weitere 3 Stunden kultiviert, bevor sie bei Raumtemperatur fixiert wurden. Dieser

Zeitablauf wurde vor der Fixation je nach durchgeführtem Experiment um zusätzliche Schritte erweitert.

3.1.3 Transfektion mit Plasmiden und siRNA

Um Proteinexpressionslevel der Makrophagen zu verändern, wurden sie mit Hilfe von Elektroporation transient transfiziert, wodurch sie entweder DNA-Plasmide oder siRNA (*small interfering RNA*) internalisierten. Für diesen Schritt wurden die Zellen nach Ablösen und Waschen in PBS zu einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro 110 μl in R-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 5 μg Plasmid-DNA oder mit 100 pmol siRNA versetzt und anschließend elektroporiert. Dafür wurde die Suspension in einer goldummantelten Stempelspitze aufgezogen und in einer Küvette mit 3 ml E2-Puffer mit zwei Pulsen von je 40 ms bei jeweils 1000 Volt transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden im Anschluss, wie bereits beschrieben, in RPMI resuspendiert und nach einer weiteren Stunde in Monomedium kultiviert. Die Kultivierungszeit in Monomedium betrug weitere drei Stunden bei den DNA-Plasmiden und drei Tage für die Depletion über siRNA. Dabei wurden folgende Zellzahlen und Inkubationsformate verwendet:

Plasmidtransfektion (<i>fixed-cell</i>)	1×10^5 Zellen auf einem 12-mm-Glasplättchen
Plasmidtransfektion (<i>live-cell</i>)	2×10^5 Zellen pro Kammer einer 8-Kammer-Glasbodenplatte
siRNA-Transfektion	1×10^6 pro Kammer einer 6-Kammer-Platte

3.1.4 Pharmakologische Behandlung der Zellen

Die Veränderung endogener Funktionen von Zelle und Podosomen wurde durch die jeweilige Zugabe von pharmakologischen Chemikalien nach der vierstündigen Inkubation ausgesäeter Zellen initiiert. Die Chemikalien waren jeweils in DMSO gelöst und wurden in individueller Konzentration und Inkubationszeit in RPMI verdünnt auf die Zellen gegeben. Parallel wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei denen die entsprechende Menge DMSO in RPMI ohne weitere Chemikalien zu den Zellen gegeben wurde. Verwendet wurden mit je 10 Minuten Inkubationszeit BAPTA-AM (10 μM), CytochalasinD (2 μM) und Ionomycin (0,5 μM und 2 μM), sowie mit 30 Minuten Inkubationszeit (\pm)-Blebbistatin (10 μM).

3.1.5 Degradations-Assay

Der Degradations-Assays wurde auf einem mit Gelatinematrix beschichteten Glasplättchen durchgeführt. Hierfür wurden 29,4 µl einer Gelatinelösung mit 0,6 µl Sucrose vermischt und auf dem Glasplättchen für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Glasplättchen für 15 Minuten auf Eis mit 0,5%-iger Glutaraldehydlösung quervernetzt und in PBS gewaschen. Die Plättchen wurden in Monomedium über Nacht inkubiert, bevor Makrophagen mit einer Zellzahl von 5×10^4 zugegeben wurden. Die Zellen wurden für sowohl 4, 6 und 8 Stunden, sowie über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.6 ERISM

Für das ERISM (*Elastic Resonator Interference Stress Microscopy*) wurden die Zellen auf die einzelnen Sensoren gegeben. Die Sensoren bestanden aus einer elastischen Matrix, die von mehreren Goldschichten umgeben waren. Die Zellen wurden unter Kultivierungsbedingungen inkubiert und die Auslenkung der Matrix durch die Podosomen über einen Beobachtungszeitraum von 20 Minuten ermittelt. Die ERISM-Versuche wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Malte Gather und Dr. Nils Kronenberg an der Universität Köln durchgeführt und ausgewertet.

3.1.7 Fixierung und Immunfluoreszenz

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen aus dem Kultivierungsmedium entfernt, einmal in PBS gewaschen und nach Vorfixierung für 1 Sekunde in -20°C kaltem Methanol mit je 1 ml Glyoxal (Richter et al., 2018) für 50 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Tropfen 0,1% Triton-X in PBS für 10 Minuten permeabilisiert und danach für 30 Minuten in 30 µl Blockierungslösung inkubiert. Die primären Antikörper wurden in Färbepuffer auf ihre individuelle Konzentration verdünnt und zu je 30 µl über Nacht bei 4°C auf die fixierten Zellen gegeben. Nach dreimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen der Zellen in PBS wurden fluoreszenzgekoppelte sekundäre Antikörper zusammen mit markiertem Phalloidin gemeinsam in Färbepuffer verdünnt und zu 30 µl für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach erneutem Waschen wurden die Glasplättchen mit voll-entionisiertem Wasser gespült und in 6 µl Mowiol über Nacht auf Objektträgern immobilisiert. Die Verdünnung des primären Rabbit-anti-pMLC, des Rabbit-anti-SWS1-Antikörpers und des Phalloidins betrug 1:100. Die primären Maus-anti-Vinculin- und Maus-anti-Zyxin-Antikörper, sowie alle sekundären Antikörper wurden 1:200 verdünnt. Sowohl das Phalloidin, als auch die sekundären Antikörper waren mit AlexaFluor(AF)-488, AF-568 und AF-647 fluoreszenzmarkiert.

3.2 Mikroskopie

3.2.1 *Fixed-cell*-Mikroskopie

Die fixierten und Immunfluoreszenz-markierten Zellen wurden mit Hilfe des konfokalen Laser-scanning-Mikroskops Leica DMI 6000 (mit Leica TCS SP5 AOBS konfokalem Punktscanner) mikroskopiert. Dazu wurden die Objektträger mit immobilisierten Glasplättchen nach Zugabe eines Tropfens Immersionsöls invertiert auf das 63x/1,4 NA-Objektiv gelegt und eingespannt. Das Mikroskop wurde über die Leica-Application-Suite-Software gesteuert und die Fluoreszenz mithilfe von jeweils 2 HyD- und 2 PMT-Detektoren detektiert. Die Aufnahme von Übersichtsbildern wurde dabei mit einer biologischen Größe von 246,15 μm x 246,15 μm mit 2048 x 2048 Pixeln durchgeführt, was einer Auflösung von 120,2 nm/Pixel entsprach. Die Detailaufnahmen bildeten eine biologische Größe von 61,57 μm x 61,57 μm bei 1024 x 1024 Pixeln ab, was in einer Auflösung von 60,1 nm/Pixel resultierte. Die dreidimensionale Darstellung von Zellen und ihren Substrukturen wurde durch die sequentielle Aufnahme einzelner konfokalen Ebenen erreicht, die jeweils in einem vertikalen Abstand von 250 μm aufgenommen wurden.

3.2.2 *Live-cell*-Mikroskopie

Die lebenden Zellen, welche nach erfolgter Plasmidtransfektion fluoreszenzmarkierte Proteine überexprimierten, wurden mithilfe des VisiTron-Spinning-Disk-Mikroskops visualisiert. Dazu wurden die Zellen in der 8-Kammer-Glasbodenplatte aufrecht, nach Zugabe eines Tropfens Immersionsöls, auf das 100x/1,45 NA-Objektiv gelegt und in einem beweglichen Schlitten festgespannt. Die 8-Kammer-Platte war zusammen mit dem Schlitten von einer Kultivierungskammer umgeben, in der die Kultivierungsatmosphäre von 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit herrschte. Das Mikroskop wurde über die ViSiView-Software gesteuert und die Fluoreszenzen über ein duales Kamerasystem detektiert. Für die Detektion von Standardparametern der Makrophagen (Lebenszeit und Oszillation) wurden die Zellen für je 30 Minuten mit 10 Sekunden pro Bild (181 Bilder pro Video) mikroskopiert. Für die FRAP-Experimente (*Fluorescence recovery after Photobleaching*) wurden die Zellen für je 2 Minuten mit je einem Bild pro Sekunde (120 Bilder pro Video) aufgenommen. Dabei wurde eine kleine Region der Zelle nach den ersten 5 Bildern mit einem 405 nm-Laser mit 50% Leistung bestrahlt und die Erholung der dabei ausgebleichten Fluoreszenz über die anschließenden 115 Bilder beobachtet. Die Auflösung bei allen Experimenten betrug 110 nm/Pixel, da eine biologische Größe von 131,76 μm x 131,76 μm auf 1200 x 1200 Pixeln detektiert wurde.

3.3 Gentechnische Methoden

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Herstellung des Volllängen-Plasmidkonstrukts, durch das das SWS1 an GFP gebunden exprimiert wird, wurde das humane pCMV-Sport6-hEFhd2-Konstrukt verwendet, welches freundlicherweise von Prof. Dirk Mielenz (Universität Erlangen) bereitgestellt wurde. Mithilfe von je einem Vorwärts- und einem Rückwärts-Primer wurde die SWS1-Sequenz über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und gleichzeitig die Restriktionsenzym-Erkennungssequenz für XhoI an das 5'- und die Sequenz für EcoRI an das 3'-Ende der SWS1-DNA eingefügt.

Tabelle 14: Mastermix der Standard-PCR.

Bezeichnung	Volumen
Plasmid (1 µg/µl)	0,5 µl
Vorwärts-Primer (100 µM)	0,5 µl
Rückwärts-Primer (100 µM)	0,5 µl
Deoxy-NTP (40 mM)	1 µl
DMSO	1 µl
HF-Puffer (5x)	5 µl
Phusion-Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl
DNase-freies Wasser	16,3 µl
Σ	25 µl

Tabelle 15: Programm der Standard-PCR.

Schritt	Wiederholung	Temperatur	Zeit
Initial-Denaturierung	1x	98°C	3 Minuten
Denaturierung	30x	98°C	30 Sekunden
Anlagerung		55°C	30 Sekunden
Elongation		72°C	1 Minute
Finale Elongation	1x	72°C	5 Minuten

3.3.2 Aufreinigung und Ligation

Das erhaltene PCR-Produkt wurde für 1 Stunde bei 37°C mit je 1 µl der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI, sowie mit 3 µl des Restriktionspuffers gemischt. Der Verdau fand bei 37°C für 1 Stunde statt und die Restriktionsansätze wurden im Anschluss aufgereinigt. Dazu wurden die Ansätze auf einem Agarsegel (1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer) inklusive 0,1 µl SybrSafe für 30 Minuten bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt und die unter UV-Licht sichtbare Bande ausgeschnitten. Die Plasmide wurden bei 50°C in 300 µl GC-Puffer mit chaotropen Salzen aus den Gelstücken gelöst, mit 100 µl Isopropanol gefällt und abzentrifugiert. Die Überstände wurden auf einer Aufreinigungssäule mit 750 µl Ethanolhaltigem Puffer gewaschen, und im Anschluss in 30 µl DNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration

der Plasmide wurde am Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm detektiert. 30 ng des aufgereinigten PCR-Produkts wurden mit 10 ng des ebenfalls verdauten GFP-Plasmid gemischt und durch Zugabe von 1 μ l T4-DNA-Ligase und 1 μ l Ligationspuffer über Nacht bei 16°C ligiert.

3.3.3 Transformation

Der Ligationsansatz wurde in DH5 α -*E.coli*-Bakterien transformiert, indem er zunächst für einen halben Stunde auf Eis zu den Bakterien gegeben und, einem 40-sekündigen Hitzeschock bei 42°C folgend, bei 37°C für eine Stunde in 250 μ l LB-Medium inkubiert wurde. Die Bakteriensuspension wurde auf Kanamycin-versetzten Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Antibiotikum wurde entsprechend der Resistenz des Plasmids gewählt, um eine Positivselektion transformierter Bakterien zu ermöglichen. Eine Bakterienkolonie wurde gepickt und die DNA über das Miniprep-Classic-Kit isoliert. Dazu wurden die Zellen zunächst in 200 μ l P1-Puffer resuspendiert und mit 200 μ l P2-Puffer lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 400 μ l P3-Puffer gestoppt, die Zelltrümmer für 1 Minute bei 14.000 x g abzentrifugiert und die Überstände auf eine Separationssäule gegeben. Die Plasmide wurden mit 750 μ l Ethanol-haltigem Puffer gewaschen und in 30 μ l DNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration wurde, wie bereits beschrieben, ermittelt und die Plasmide durch die Firma MicroSynth-Seqlab sequenziert.

3.3.4 Punktmutation

Die Punktmutationsplasmide wurden durch ein abgewandeltes PCR-Protokoll erhalten, bei denen Primer verwendet wurden, welche komplementär an das Plasmid banden und 3 spezifische Fehlbindungen aufwiesen. Die PCR amplifizierte das gesamte Plasmid inklusive der Fehlbindungen, so dass das Plasmid nur noch aufgereinigt und transformiert, aber nicht ligiert werden musste. Diese Methode wurde verwendet um alle verwendeten Plasmide auch als siRNA-insensitive Konstrukte zu erhalten.

Tabelle 16: Mastermix der Punktmutations-PCR

Bezeichnung	Volumen
Plasmid (100 ng/ μ l)	1 μ l
Vorwärts-Primer (100 ng/ μ l)	1 μ l
Rückwärts-Primer (100 ng/ μ l)	1 μ l
Deoxy-NTP (40 mM)	1 μ l
DMSO	1,5 μ l
GC-Puffer (5x)	10 μ l
Phusion-Polymerase (2 U/ μ l)	0,5 μ l
DNase-freies Wasser	34 μ l
Σ	50 μ l

Tabelle 17: Programm der Punktmutations-PCR.

Schritt	Wiederholung	Temperatur	Zeit
Initial-Denaturierung	1x	98°C	3 Minuten
Denaturierung	25x	98°C	30 Sekunden
Anlagerung		55°C	1 Minute
Elongation		72°C	5 Minuten
Finale Elongation	1x	72°C	5 Minuten

3.3.5 Synthese weiterer SWS1-Konstrukte

Ausgehend vom GFP-SWS1-Volllängenkonstrukt wurden weitere Plasmide hergestellt. Da die Funktion der N-terminalen Region von SWS1 bisher nicht bekannt ist, wurden zusätzlich zwei Teillängenkonstrukte hergestellt, für deren PCR das Volllängenplasmid die Basis darstellte. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden so gewählt, dass die Aminosäuren 2-42 aus der N-terminalen Domäne beim Δ LC-Konstrukt (LC für *low complexity*) entfernt wurde. Das LC-Konstrukt hingegen bestand nur aus diesen 42 Aminosäureresten. Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI wurden in die jeweiligen 5'- und 3'-Enden des PCR-Produkts inseriert und dieses im Anschluss, wie bereits beschrieben, verdaut, aufgereinigt und in das GFP-Plasmid ligiert. Zusätzlich wurde ein weiteres Volllängenkonstrukt erstellt, welches mit dem Biotinylierungsenzym miniTurbo exprimiert wurde. Das miniTurbo-Rückgrat-Plasmid wurde aus einem freundlicherweise von Dr. Tobias Spielmann (Bernhard Nocht-Institut, Hamburg) zur Verfügung gestellten Plasmid erstellt. Alle verwendeten Konstrukte wurden zusätzlich als insensitive Punktmutations-Konstrukte gegenüber der spezifischen siRNA erstellt. Eine Übersicht über alle erstellten und verwendeten Konstrukte ist in Abbildung 13 gezeigt.

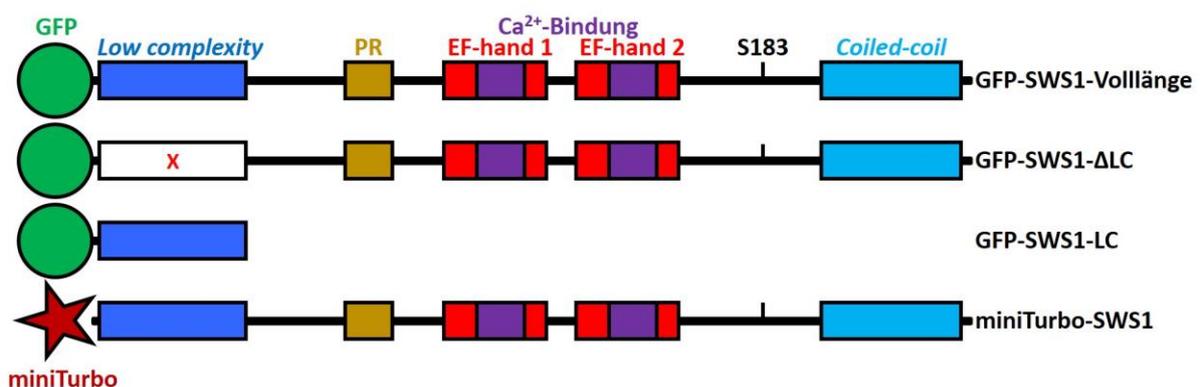


Abbildung 13: Übersicht über die erstellten SWS1-Konstrukte. Skizziert sind die Struktur von SWS1 inklusive seiner Domänen und Regionen von N-terminal (links) nach C-terminal (rechts): LC-Region (dunkelblau), Prolin-reiche Domäne (gold), EF-hand-Domänen 1 und 2 (rot) mit jeweiliger Calcium-Bindungsdomäne (violett), dem Stabilisationspunkt S183 (schwarz), sowie der coiled-coil-Dimerisierungsdomäne (hellblau). Zusätzlich gezeigt sind die N-terminal gebundenen Fluorophore GFP (grüner Kreis), sowie miniTurbo (dunkelroter Stern). Alle Konstrukte wurden durch drei stille Mutationen im Bereich der EF-hand 2-Domäne zusätzlich mit einer siRNA-Insensitivität erstellt.

3.4 Proteinbiochemie Methoden

3.4.1 Western Blot und Expressionsstärke

Die Bestimmung der Expressionsstärke in nativen Bedingungen und nach siRNA-gesteuerter Protein-depletion wurde über einen Western Blot durchgeführt. Dazu wurden die kultivierten Zellen mit 250 µl Lysepuffer + 10% PIC (Proteinase-Inhibitor-Cocktail) versetzt und auf Eis für 15 Minuten lysiert. Die Lysate wurden bei 4°C für 20 Minuten bei 14.000 x g zentrifugiert, der Überstand mit 50 µl Lämmli-Denaturierungspuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Die denaturierten Lysate wurden auf ein 12%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen (bestehend aus ca. 4/5 Trenngel und 1/5 Sammelgel) und bei 160 V für eine Stunde elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden über das Western Blot-Verfahren bei 20 V für 7 Minuten auf eine Membran übertragen. Diese wurde im Anschluss mit einer Blockierungslösung aus 5% Milchpulver in TBS-T (*tris-buffered saline* mit Tween-20) für mindestens 30 Minuten überschichtet, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Markierung von SWS1 durch 1:500 in 5% BSA/TBS-T (bovines Serumalbumin) verdünnte primäre Antikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen in TBS-T wurden HRP-gekoppelte (*horseradish peroxidase*) sekundäre Antikörper 1:5.000 in 5% Milchpulver/TBS-T verdünnt und für je 1 Stunde auf dem Blot inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen und im Anschluss mit Pico-/ oder Femto-Detektionsreagenz überschichtet. Die HRP-gesteuerte Chemolumineszenz wurde im Amersham Cytiva-Detektor dokumentiert. Im Anschluss wurden die gebundenen Antikörper über zweimalige, jeweils zehnmünütige Inkubation mit *mild stripping buffer* von der Membran entfernt. Die Membran wurde zweimalig in je PBS und TBS-T gewaschen, erneut blockiert und mit primären (1:20.000) und sekundären (1:5.000) Antikörpern gegen die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) inkubiert. Die Proteinexpressionsstärke wurde durch eine Ratio der Chemolumineszenz von SWS1 gegen das GAPDH berechnet. Die SWS1-Expression in der Kontrollkondition wurde dabei als 100% definiert und alle weiteren Konditionen dementsprechend normalisiert.

3.4.2 Immunopräzipitation, *Pulldown* und Massenspektrometrie

Zur Identifikation von Interaktionspartnern von SWS1 wurden Makrophagen verwendet, die entweder eine endogene SWS1-Expression aufwiesen, oder ein Plasmid für GFP-, bzw. miniTurbo-SWS1 überexprimierten. Bei den miniTurbo-Zellen wurde nach der Expressionszeit die Biotinylierungsreaktion durch die Zugabe von 50 µM Biotin in OptiMEM gestartet. Die Zelllysate der jeweiligen Experimente wurde durch eine 15-minütige Inkubation von 1 ml Lysepuffer + 10% PIC auf Eis mit anschließender Zentrifugation erhalten. Die Überstände wurden im Folgenden nicht denaturiert, sondern mit Reagenzien zur positiven Selektion versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Verwendet wurden dazu 10 µg

anti-SWS1-Antikörper (endogen), 10 µg anti-GFP-Antikörpern mit gebundenen magnetischen Kügelchen (GFP-Überexpression), oder magnetische Streptavidin-Agarose-Kügelchen (miniTurbo-Überexpression). Nach der Inkubation des anti-SWS1-Antikörper wurden 25 µl eines Gemischs aus an magnetische Kügelchen gebundenes Protein A/G für 1 Stunde zu den Zellen gegeben. Die Lösungen der endogenen und GFP-IP, sowie des Biotin-*Pulldowns* wurden jeweils auf eine Säule im Magnetfeld gegeben, mehrmals mit Lysepuffer gewaschen und durch Inkubation mit 95°C heißem Lämmli-Puffer eluiert. Die Eluate wurde auf ein 12%-iges Polyacrylamidgel gegeben und für wenige Minuten elektrophoretisch bei 160 V aufgetrennt, bis die Banden vollständig in das Gel gewandert waren. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt und die Eluatbande aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gelstückchen wurde an die *Core Facility* Massenspektrometrie des UKE übergeben, einem proteolytischen Verdau unterzogen und durch ein MALDI-TOF/TOF massenspektrometrisch analysiert. Die Auswertung der erhaltenen Ergebnisse fand durch eine Ratio der detektierten Proteine zwischen den Eluaten und einer gleichzeitig mitgeführten Negativkontrolle statt.

3.5 Auswertung

Die Mikroskopieauswertung fixierter Zellen fand mithilfe des eigens entwickelten Algorithmus Poji (Herzog et al., 2020) statt, dessen genaue Funktion und Parameterausgabe im Ergebnisteil näher beschrieben wird. Für die Analyse lebender Zellen wurde der Algorithmus TrackMate (Tinevez et al., 2017) verwendet, der die Podosomen annotieren und ihre Position über die Zeit verfolgen konnte. Ausgehend von den Podosomenpositionen wurde die Lebenszeit der Podosomen sowie ihre Intensität mithilfe eines selbstgeschriebenen Algorithmus ermittelt. Kurz zusammengefasst importierte dieser Algorithmus die Positionsdaten von TrackMate, ermittelte aus Start- und End-Einzelbild eines Podosoms seine Lebenszeit und detektierte die Intensität innerhalb einer zirkulären Fläche mit ca. 1,2 µm im Durchmesser. Derselbe Durchmesser wurde für die Intensitätsanalyse der FRAP-Experimente verwendet. Beim Degradationsassay wurde die gesamte Intensität der Rhodamingelatine unterhalb der Zellflächen ermittelt und gegen den gemittelten Hintergrundwert normalisiert. Um den Hintergrundwert zu erhalten wurde die Intensität von zellfreier Rhodamin-Gelatine in einer einer äquivalent großen Fläche detektiert. Die Effizienz der siRNA-Depletionen, sowie einiger Überexpressionen wurde durch eine parallele Lyse und Western Blot-Analyse der Zellen erhalten, indem die Expressionslevel von SWS1 auf die der GAPDH normalisiert und mit einer Negativkontrolle verglichen wurde. Diese Expressionskontrolle wurde bei allen Depletionsversuchen mitgeführt, auch wenn sie nicht in jedem Ergebnis explizit aufgeführt wurde. Die Sequenzanalyse der Plasmide wurde durch einen Vergleich der jeweiligen Sequenzierungsergebnisse mit der publizierten Sequenz von SWS1 durchgeführt. Die Podosomengrößen wurden über eine Gauß'sche Annäherung ermittelt:

$$f(x) = A * e^{-\frac{(x-\mu)^2}{(2\sigma)^2}}$$

mit

A = Höhe des Maximums (bei normalisierten Profilen = 100)

x = Abstand zum Podosomenzentrum

μ = Position des Maximum als Abstand zum Podosomenzentrum

σ = Standardabweichung

Die Größe der Podosomen wurde ausgehend von dieser Gleichung durch die Breite bei halbmaximaler Intensität (*full width at half maximum*, FWHM) ermittelt:

$$FWHM = 2 * \sqrt{2 * \ln(2)} * \sigma$$

Für die grafische Darstellung der Podosomenprofile wurden diese gemittelt und normalisiert. Eine optische Annäherung der FWHM wurde in die Graphen annotiert. Wenn ein halbes Podosomenprofil gezeigt wurde, entsprach diese optische Annäherung dem halben Wert der FWHM.

Soweit nicht anders angegeben, wurden Signifikanzen über den *student's t-test* (Kontrolle mit einer Bedingung) bzw. über den *One-Way-ANOVA-Test* (Kontrolle mit mehreren Bedingungen) durchgeführt und die Signifikanzen abhängig vom ermittelten p-Wert mit * markiert. Hierbei gilt: nicht signifikant (ns) $p > 0,05$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

4 Ergebnisse

Für die Erstellung der vorliegenden Doktorarbeit wurden Regulation und Funktion von Podosomen humaner Makrophagen untersucht. Der Fokus lag dabei auf dem Aktin-bindenden Protein Swiprosin-1 (SWS1), dessen Wirkungsweise an Podosomen trotz publizierter Assoziation mit diesen Strukturen noch unbekannt ist. Da sich durch den Einfluss von regulatorischen Proteinen eine Vielzahl zellulärer und podosomaler Parameter ändern können, wurde zunächst ein Auswertungsalgorithmus entwickelt, der diese Parameter automatisch aus Mikroskopiedaten analysiert. Dieser Algorithmus mit dem Namen Poji (*Podosome analysis by Fiji*) wurde in seiner ersten Version bereits publiziert (Herzog et al., 2020) und ist ebenfalls in aktualisierter und erweiterter Version online verfügbar (www.github.com/roherzog/poji). Im ersten Abschnitt wird zunächst die Entwicklung, Verwendung und Validierung des Algorithmus beschrieben, bevor im zweiten Abschnitt die mit seiner Hilfe erhaltenen Ergebnisse für SWS1 und dessen Einfluss auf Podosomen gezeigt werden.

4.1 Poji – Ein Auswertungsalgorithmus für Zellen und Podosomen

Wie bereits beschrieben, ist eine Auswertung von Podosomen sehr kompliziert, da die Effekte der beteiligten Proteine durch Veränderungen der Anzahl, Größe oder Architektur von Podosomen angezeigt werden können. Eine gleichzeitige, manuelle Auswertung all dieser Parameter stellt auch deswegen eine große Hürde dar, weil Podosomen in hoher Anzahl in Zellen vorliegen und Effekte sowohl in der gesamten Population, als auch in individuellen Podosomen sichtbar sein können. Die vor dem Start dieser Doktorarbeit entwickelten Auswertungsmethoden konzentrierten sich meist auf einzelne podosomale Parameter und verbanden diese nicht mit Informationen der gesamten Zelle. Aus diesem Grund wurde als erster Schritt dieser Arbeit ein automatischer Auswertungsalgorithmus entwickelt, der nicht nur Parameter der Zelle, sondern auch die der durchschnittlichen Podosomenpopulation sowie individueller Podosomen charakterisieren konnte.

4.1.1 Die Programmierung des Makros

Die Plattform für die Auswertung von Mikroskopiedaten war im Rahmen dieser Doktorarbeit vor allem FIJI (*FIJI is just ImageJ*) (Schindelin et al., 2012), eine durch Add-Ons und Plugins erweiterte Version der Software ImageJ. Diese OpenSource-Software ist online frei erhältlich und wird regelmäßig von Nutzern und einem festen Entwicklerteam erweitert. Der Auswertungsalgorithmus Poji wurde in der Makrosprache von FIJI geschrieben, wobei es sich um eine vereinfachte, um programmspezifische Funktionen erweiterte, Variante der Java-Programmiersprache handelt. Das Ziel des Algorithmus war, eine

Auswertung von Mikroskopiedaten vorzunehmen, in der die Bilder automatisch durch verschiedene Funktionen von FIJI bearbeitet und analysiert werden. Durch die Verwendung etablierter, programm-spezifischer Befehle, sowie durch die Veröffentlichung des Quellcodes, wurde der Algorithmus transparent gestaltet, um eine möglichst breite Anwendbarkeit zu ermöglichen. Die Entwicklung des Algorithmus wurde stets parallel von einer manuellen Überprüfung begleitet, um die einzelnen Programmschritte zu validieren und Programmierfehler auszuschließen.

4.1.1.1 Auswahl der Detektionsmethode

Der erste Schritt der Makro-Entwicklung konzentrierte sich auf die Podosomendetektion. Dabei waren zwei Parameter, die Sensitivität und die Selektivität, von ausschlaggebender Wichtigkeit. Bei einer hohen Sensitivität besitzt der Algorithmus die Fähigkeit, möglichst viele Podosomen als einzelne Strukturen zu erkennen und damit die Rate an falsch-negativen Signalen so gering wie möglich zu halten. Eine hohe Selektivität dagegen beschreibt eine Minimierung der falsch-positiven Rate, die durch die fälschliche Detektion nicht-podosomaler Strukturen charakterisiert wird. Mithilfe dieser Werte wurden zwei verschiedene Detektionsmöglichkeiten miteinander verglichen, die Podosomen jeweils über den mit Alexa-Fluor-Phalloidin gefärbten Aktinkern identifizieren sollten. Die Detektion der Podosomen fand dabei stets in der gesamten Zellfläche humaner Makrophagen statt. Die Zellfläche wurde hierfür manuell bestimmt, indem die Umrisse individueller Zellen mit einer Freihand-Funktion des Programms FIJI annotiert und gleichzeitig von umliegenden Nachbarzellen abgetrennt wurden.

Bei der ersten Detektionsmöglichkeit handelte es sich um die *Analyze-Particles*-Funktion von FIJI, welche bereits in einem publizierten Podosomen-Auswertungsalgorithmus verwendet wurde (Cervero et al., 2013) und auf der Erkennung individueller Strukturen abhängig von ihrer Größe und Zirkularität basiert. Die Zirkularität wurde entsprechend der bereits publizierten Methode mit 0,8-1 (auf einer Skala von 0: linear bis 1: zirkulär) angesetzt (Cervero et al., 2013), womit Podosomen vor allem von linearen, nicht-podosomalen Hintergrundsignalen wie radiären Aktin-Filamenten unterschieden werden konnten. Trotz intuitiver und bereits publizierter Parameter wies diese Methode den großen Nachteil auf, dass die *Analyze-Particles*-Funktion nur binäre Bilddaten verarbeiten kann. Um die Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie in binäre Bilder umzuwandeln mussten sie zunächst mit einer Reihe verschiedener Filter bearbeitet werden. Diese beinhalteten unter anderem die Subtraktion eines festen Pixel-Intensitätswertes, um Hintergrundsignale zu reduzieren. Des Weiteren wurden die Bilder mit Konvolutions-, und Weichzeichnungsfunktionen bearbeitet, damit die einzelnen Pixel eines Podosoms zu einer zusammenhängenden Struktur zusammengefasst wurden. Im Anschluss wurden die Intensitätswerte des Bildes binär umgewandelt, wodurch alle Werte oberhalb einer empirisch bestimmten

Grenze auf das Intensitätsmaximum (255 bei 8-bit-Bildern) und alle Werte darunter auf 0 gesetzt wurden. Um zu verhindern, dass dabei aneinander angrenzende, aber individuelle Podosomen als eine zusammenhängende Struktur detektiert wurden, wurde das binäre Bild im Anschluss mit einem *Watershedding*-Algorithmus bearbeitet. Erst im Anschluss konnte die eigentliche Detektion über die *Analyze-Particles*-Funktion stattfinden.

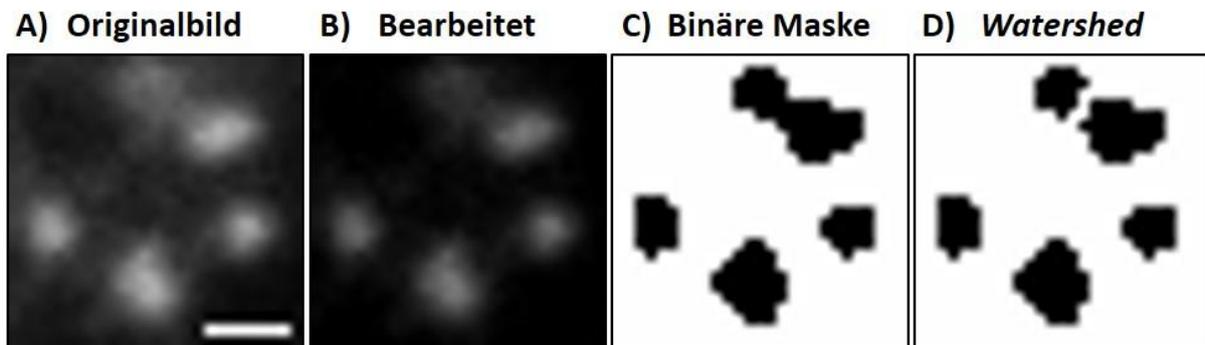


Abbildung 14: Podosomendetektion über die *Analyze-Particles*-Funktion. (A) Originalbild der konfokalen Mikroskopie (Ausschnitt) mit Skala: 1 μm . (B) Durch mehrere Filter (u.a. Subtraktion des Hintergrundes, Weichzeichnung, Konvolution) bearbeitetes Bild der Mikroskopie. (C) Binäre Maske des bearbeiteten Bildes, teilweise mit fälschlich verbundenen Strukturen. (D) Nachträgliches Trennen der falsch-verbundenen Strukturen durch die *Watershedding*-Funktion.

Im Test ergaben sich dadurch mehrere Probleme. Zuerst wurde deutlich, dass die Trennung zwischen angrenzenden Strukturen durch die *Watershedding*-Funktion bei Zellen mit einer hohen Podosomendichte nicht verlässlich funktionierte. So unterteilte es regelmäßig einzelne Podosomen in zwei verschiedenen Strukturen und hatte gleichzeitig eine hohe Fehlerquote beim Unterscheiden eng aneinander grenzender Strukturen. Dadurch folgte, dass der Erfolg der Podosomendetektion dieser Methode im Vergleich mit der manuellen Annotation von drei voneinander unabhängigen Wissenschaftlern nur geringe Werte für Spezifität und Sensitivität besaß. Des Weiteren stellte die Vorbereitung des binären Bildes eine große Hürde dar, da die einzeln einzustellenden Parameter sich gegenseitig beeinflussten und keine lineare Kopplung an die Menge von detektierten Strukturen aufwiesen. Dadurch dass selbst Fluoreszenzbilder des gleichen Experiments leichte Unterschiede in Fluoreszenzintensität aufwiesen, musste für jedes einzelne Bild eine individuelle Verteilung der Parameter bestimmt und eingestellt werden, was einen hohen Zeitaufwand erforderte. Eine zeitintensive und schwer anzuwendende Detektionsmethode, die gleichzeitig eine hohe Fehleranfälligkeit in sowohl falschpositive als auch falschnegative Richtung aufwies, war für die automatisierte Auswertung einer hohen Anzahl an Daten nicht geeignet.

Daher wurde im Anschluss eine zweite Variante der Podosomendetektion etabliert, die *Find Maxima*-Funktion. Diese Funktion verwendet, anstatt ein binäres Bild zu benötigen, einen Intensitätsgrenzwert

um Podosomen als einzelne Strukturen zu identifizieren. Dieser Grenzwert beschreibt dabei den Unterschied an Intensitätswerten, den eine zusammenhängende Fläche an Pixeln zu seiner Umgebung aufweisen muss. Der jeweils maximale Intensitätswert der Struktur wurde dabei durch das Programm annotiert und seine jeweiligen Koordinaten gespeichert. Die Menge an detektierten Strukturen ist bei dieser Methode an die Größe des Grenzwerts gekoppelt, wodurch bei hohen Grenzwerten weniger und bei kleinen Grenzwerten mehr Strukturen erkannt werden. Der Detektionserfolg von Podosomen dieser einfacher zu bedienenden Methode wurde ebenfalls im Vergleich mit den Ergebnissen der drei Wissenschaftler sowohl auf Sensitivität als auch Spezifität verglichen.

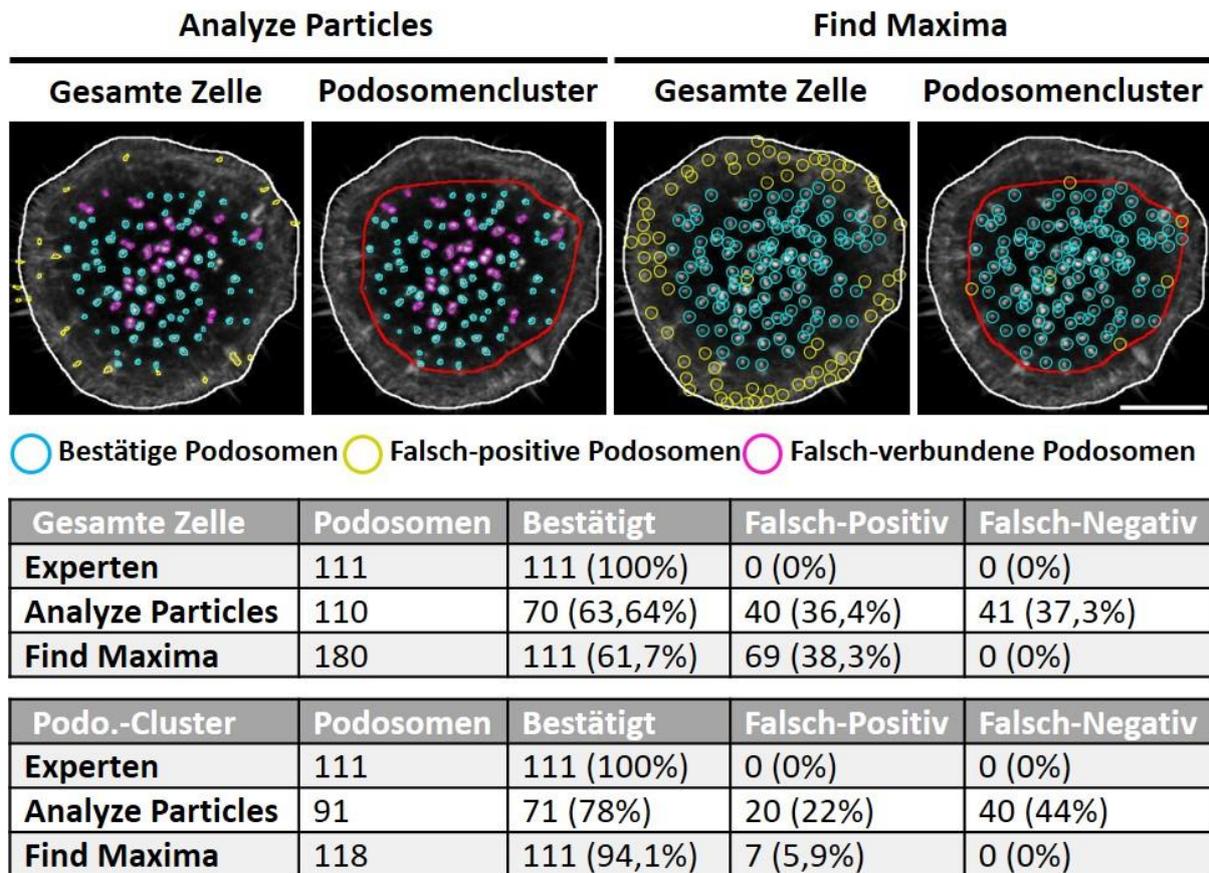


Abbildung 15: Vergleich der zwei Detektionsmethoden. Humane Makrophagen mit Phalloidin auf F-Aktin gefärbt. Markiert sind jeweils die manuell annotierten Umrisse der Zelle (weiß), sowie der Podosomencluster (rot). Automatisch ermittelte Umrisse der Podosomen für sowohl von 3 Experten unabhängig bestätigte (Cyan), falsch-positive (gelb), sowie falsch verbundene Podosomen (magenta) nach der *Analyze-Particles* und der *Find Maxima*-Methode. Skala: 10 µm. Zusätzlich gezeigt sind die statistischen Auswertung von Sensitivität und Spezifität durch drei unabhängige Wissenschaftler nach Analyse der gesamten Zellfläche sowie des Podosomenclusters. Die falsch verbundenen Podosomen wirkten sich auf die Rate von sowohl falsch-positiven als auch falsch-negativen Signalen aus.

Dabei zeigte sich, dass diese Detektionsmethode sowohl bei Zellen mit hoher als auch bei Zellen mit geringer Podosomendichte die einzelnen Strukturen gut unterscheiden und identifizieren konnte. Da diese Methode die Strukturen jedoch nur anhand der Intensität, nicht aber anhand der Zirkularität

detektierte, war die Rate an falsch-positiven Signalen sehr hoch. So konnte beobachtet werden, dass über die *Find Maxima*-Methode neben den validen Podosomen vor allem periphere Membranstrukturen fälschlicherweise annotiert wurden, was die Selektivität stark verringerte. Interessanterweise lagen die falsch-positiven peripheren Membranstrukturen meistens in Zellbereichen ohne Podosomenbildung vor. Daher wurde die Möglichkeit untersucht, diese Regionen bei der Podosomendetektion auszuschließen. Hierfür wurde nach der manuellen Definition der Zellumrisse ein zweiter Schritt eingeführt, in dem manuell nur der mit Podosomen bedeckte Teil der Zelle ausgewählt wurde. Diese Podosomencluster wurden im Folgenden statt der gesamten Zellfläche als Grundlage für die Podosomendetektion verwendet. Durch einen erneuten Vergleich des Detektionserfolgs zeigte sich, dass durch die Auswahl der Podosomencluster die Menge an falsch-positiven Signalen stark reduziert werden konnte, während die Werte für die Sensitivität davon unbeeinflusst waren. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es sich bei der *Find Maxima*-Funktion um eine sensitive und durch die Einführung der Podosomencluster sehr spezifische Detektionsmethode handelte, die für die Grundlage des Algorithmus sehr gut geeignet war.

4.1.1.2 Essentielle Podosomen-Analyse

Im Gegensatz zur *Analyze-Particles*-Funktion detektierte *Find-Maxima* keine Flächen, sondern lokalisierte die Koordinaten der einzelnen podosomal Intensitätsmaxima. Um die gesamte Struktur zu erfassen, wurde daher im Anschluss eine zirkuläre Flächenauswahl um jedes Podosomenzentrum gezogen. Die Flächengröße orientierte sich dabei an der mittleren Größe von Podosomen (Linder et al., 2007) und wurde, um auch die Ringstruktur vollständig auflösen zu können, auf einen Durchmesser von ca. 1,25 μm festgelegt. Diese Fläche wurde für alle Podosomen innerhalb einer Zelle verwendet, unabhängig davon, ob es sich bei ihnen um die größeren Vorläufer-, oder die kleineren Nachfolger-Podosomen handelte. Nachdem die zirkulären Flächen um alle detektierten Podosomen gezogen worden waren, wurden diese aus dem Ursprungsbild kopiert und in einen neuen Bildstapel übertragen. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Podosoms gemessen, wodurch eine Intensitätsverteilung individueller Podosomen innerhalb der gesamten Population erhalten wurde. In einem darauffolgenden Schritt wurde durch die *Z-Projection*-Funktion ein optisches Mittel aller Podosomen einer Zelle erhalten. Für die Analyse der Proteinlokalisierung an Podosomen wurde eine zentrale Profillinie durch das Zentrum dieses gemittelten Bildes gelegt und die Fluoreszenzverteilung entlang der Linie gemessen. Dabei wurde die Linie nach jeder erfolgten Messung für eine vordefinierte Anzahl an Schritten mit der jeweiligen Gradzahl um die eigene Achse gedreht, um ein vollständiges Profil des gesamten Podosoms zu erstellen. Bei allen im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigten Daten waren dies 360 Schritte mit je einem Grad Drehung pro Schritt. Der Schritt der Profilanalyse konnte optional statt

auf dem gemittelten Bild auch auf den Einzelpodosomen durchgeführt werden, so dass Fluoreszenzintensität, wie auch deren räumliche Verteilung sowohl an individuellen Podosomen, als auch der gesamten Podosomenpopulation detektiert werden konnte. Eine grafische Übersicht dieses essentiellen Schritts ist in Abbildung 16 aufgezeigt.

4.1.1.3 Aufbau und Funktionsweise des Makros

Nachdem die Detektionsmethode ermittelt und um die essentiellen Podosomenanalysen erweitert worden waren, wurde der Rest des Algorithmus entwickelt. In diesem wurden zusätzlich zu den podosomalen Analysen noch generelle Parameter, wie Zellgröße, Podosomenanzahl, sowie Fluoreszenzintensitätswerte der gesamten Zelle ermittelt. Zusammen mit der Benutzeroberfläche für die Parametereingabe ergab sich der folgende Arbeitsablauf für Poji:

Die Mikroskopiebilder eines zusammenhängenden Experiments werden durch den Algorithmus nacheinander geöffnet und die jeweils zu analysierenden Zellumrisse manuell durch die Freihand-Selektion ausgewählt. In einem weiteren, optionalen, Schritt können manuell Podosomencluster ausgewählt werden, die die Podosomendetektion auf den zugewiesenen Teilbereich der Zelle beschränken. Nach diesem Schritt wird ein Optionsfenster geöffnet, in dem pro Zelle die Parameter für eine optimale Podosomendetektion eingestellt werden können. Zudem werden die Durchmesser für die podosomalen Flächen der Intensitätsmessung und der Profilanalyse festgelegt. Die Qualität von Detektion und Flächengeneration können mithilfe eines Vorschaubildes überprüft und die Parameter bei Bedarf angepasst werden. Durch diese Vorgehensweise werden sukzessive die Detektionsparameter für alle Bilder definiert. Nachdem die Detektionsparameter für das letzte Bild eingegeben wurden, startet der Algorithmus die Analyse der Bilder konsekutiv und ohne weitere Nutzerinteraktion. Dabei werden sowohl generelle zelluläre als auch essentielle podosomale Parameter detektiert und durch mathematische Operationen automatisch miteinander in Relation gesetzt, wodurch der Algorithmus nach Beendigung der Analyse insgesamt 19 verschiedene Datenarten ausgeben kann. Die am häufigsten in dieser Doktorarbeit verwendeten Parameter werden in Kapitel 4.1.2 detailliert vorgestellt.

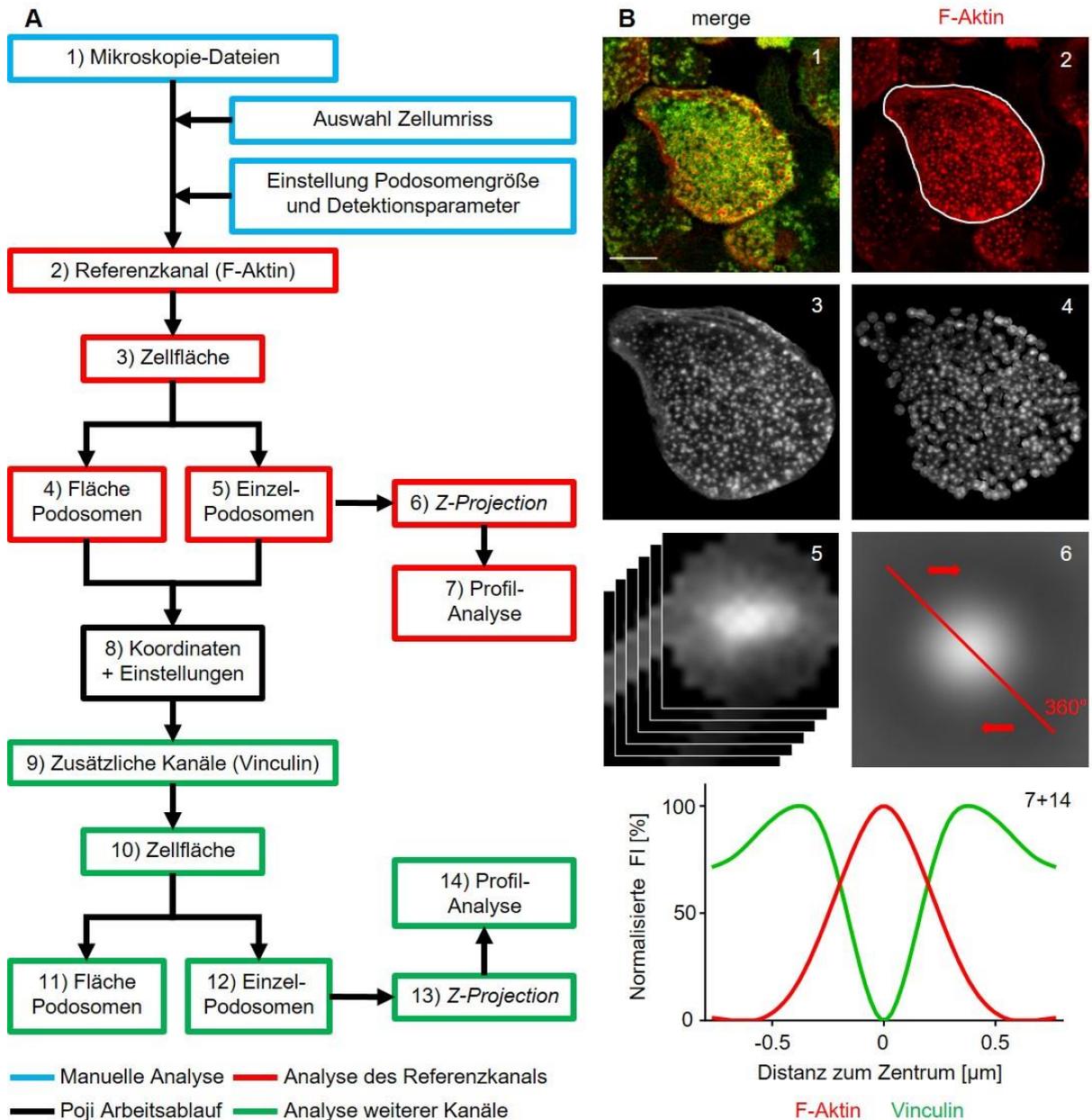


Abbildung 16: Übersicht über die Funktionsweise von Poji. (A) In einem ersten Schritt werden die Mikroskopiedaten durch den Algorithmus geöffnet und Analyseflächen und -parameter durch den Nutzer bestimmt (1). Der Referenzkanal (2) wird für die Bestimmung zellulärer Parameter wie Größe und Podosomenanzahl (3), sowie für die Podosomendetektion genutzt. Die Parameter der podosomalen Fläche werden ermittelt (4) und individuelle Podosomen isoliert (5). Diese werden analysiert und im Anschluss optisch gemittelt (Z-Projection) (6). Auf dieser Mittelung wird die Profilanalyse durchgeführt (7). Alle erhaltenen Koordinaten werden gespeichert (8), auf die restlichen Kanäle übertragen und korrespondierende Analysen durchgeführt (9-14). (B) Korrespondierende Übersichtsbilder der Poji-Analyse. Humane Makrophage, gefärbt auf F-Aktin (rot) und Vinculin (grün). Skala: 10 µm. Zusätzlich gezeigt ist das normalisierte Podosomenprofil aller optisch gemittelten Podosomen.

Der Algorithmus wurde bereits zusammen mit der Präsentation einzelner Parameter und den durch sie identifizierten Funktionen bestimmter Proteine an humanen Makrophagen veröffentlicht (Herzog et al., 2020) und im Internet zur Verfügung gestellt (www.github.com/roherzog/poji). In der veröffentlichten Form war der Algorithmus in der Lage die Eingabe von Bildern zu akzeptieren, die jeweils einen

Fluoreszenzkanal und eine optische Ebene aufwiesen. Da dies für die Analyse von Podosomen im dreidimensionalen Vergleich, wie er im Rahmen der Doktorarbeit verwendet wurde, nur bedingt geeignet war, wurde der Algorithmus auch nach seiner ursprünglichen Publikation noch weiterentwickelt und um verschiedene Funktionen und Analysen erweitert.

4.1.1.4 Weiterentwicklung des Algorithmus nach Publikation

Nach der Veröffentlichung des Algorithmus im *Journal of Cell Science* wurden weitere Veränderungen vorgenommen, um eine verbesserte Automatisierung der Podosomenanalyse zu gewährleisten. Diese Updates wurden ebenfalls online veröffentlicht (www.github.com/roherzog/poji). Neben verschiedenen Fehlerbehebungen und Verbesserungen der Benutzeroberfläche zur einfacheren Bedienung wurde als wichtigste neue Funktion eine Kompatibilität mit Bilderstapeln eingeführt. Diese Bilderstapel wurden erhalten, indem jeweils nach 250 nm Höhenunterschied eine optischen Ebene der Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen und übereinandergestapelt gespeichert wurde. Dies war essentiell, um Podosomen auch in ihrer dritten Dimension, der Höhe, zu charakterisieren. Dazu wurde sowohl die Zellfläche, als auch die individuellen Podosomen für jede optische Ebene einzeln analysiert um Informationen über Fluoreszenzverteilung in der gesamten Podosomenstruktur zu erhalten. Gleichzeitig wurden Funktionen eingeführt, um Bilderstapel besser miteinander vergleichen zu können. So wurde die Ebene im Referenzkanal, bei der die Podosomenintensität ihr Maximum erreichte, als z=0-Ebene definiert (z als Variable für die Höhe), anhand derer die ausgegebenen Daten automatisch sortiert und verglichen wurde. Zusätzlich wurde nach der Sortierung der Ebenen auch automatisch eine dreidimensionale Projektion aller analysierten Podosomen ausgegeben, was dazu beitrug, dass Änderungen an der Podosomenarchitektur einfacher zu erkennen waren. Weitere Updates, die eine vereinfachte Handhabung der ausgegebenen Daten zum Ziel haben, befinden sich zum Zeitpunkt der Dissertationserstellung in Entwicklung.

4.1.2 Datenausgabe des Makros

Nach der manuellen Bestimmung von Zellumrissen und optional auch der Podosomencluster, sowie der Eingabe der Detektions- und Analyseparametern analysierte der Algorithmus automatisiert die Mikroskopiebilder und gab Daten über verschiedene Ebenen aus. Diese unterteilten sich in die generellen Zellparameter und in podosomale Eigenschaften. Abhängig vom Experimentaufbau wurden Zellen im Rahmen dieser Doktorarbeit unter der Verwendung verschiedener Parameter charakterisiert.

Diese ausgewählten Parameter werden im Folgenden anhand verschiedener Beispielsversuche vorgestellt, die zum Teil bereits in der Algorithmus-Veröffentlichung präsentiert wurden (Herzog et al., 2020).

4.1.2.1 Zelluläre und allgemeine Parameter

Während der initialen Phase einer jeder Bildanalyse wurde der vom Benutzer definierte Zellumfang mit der Auflösung des Bildes verrechnet, um die Zellgröße in Quadrat-Mikrometern zu bestimmen. Anschließend wurde die Podosomenanzahl ermittelt und eine zirkuläre Fläche in vorbestimmter Größe um jedes Podosom gezogen und gespeichert. Die Summe all dieser Flächen (ausgenommen der Überschneidungen) wurde als kombinierte podosomale Fläche bezeichnet, während der Teil der Zelle, der nicht von Podosomen bedeckt war, als nicht-podosomale Fläche definiert wurde. Die Analyse über Poji fand dabei stets in diesen beiden Flächen, sowie als Kombination, in der gesamten Zellfläche statt. Sowohl die kombinierte podosmale, als auch die kombinierte nicht-podosomale Fläche wurde im Anschluss auf die jeweilige Zellgröße normalisiert, um eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Zellen zu ermöglichen. Diese Normalisierung führte zu drei verschiedenen Parametern:

$$\text{Podosomendichte} = \frac{\text{Anzahl Podosomen}}{\text{Zellfläche}}$$

$$\text{Podosomenbedeckte Fläche (PBF)} = \frac{\text{Kombinierte podosomale Fläche}}{\text{Zellfläche}}$$

$$\text{Podosomenfreie Fläche (PFF)} = \frac{\text{Kombinierte nichtpodosomale Fläche}}{\text{Zellfläche}}$$

$$PFF + PBF = 1$$

Durch die einzelnen Parameter konnten bereits Unterschiede in der Zellgröße und der Podosomenanzahl analysiert werden. Durch die in den Formeln beschriebenen Kombination konnten auch Informationen über die Podosomenverteilung, sowie auch über die Zellmorphologie erhalten werden. So zeigte eine beispielhaft ausgewählte ruhende Zelle eine gleichmäßige Verteilung von Podosomen innerhalb der Zellfläche, was in einer Podosomenbedeckte Fläche (PBF) von 45,4 % und eine vergleichbar große Podosomendichte von 0,167 Podosomen/ μm^2 resultierte. Eine migrierende Zelle des gleichen Experiments zeigte hingegen eine konzentrierte Podosomenlokalisation an der Zellfront mit einer vergleichbaren Anzahl an Podosomen auf leicht vergrößerter Zellfläche. So wurde die Podosomendichte nur auf 0,127 Podosomen/ μm^2 Zellfläche reduziert (Reduktion von 24%), während die PBF mit einem Wert von 29,5% um 36% reduziert wurde.

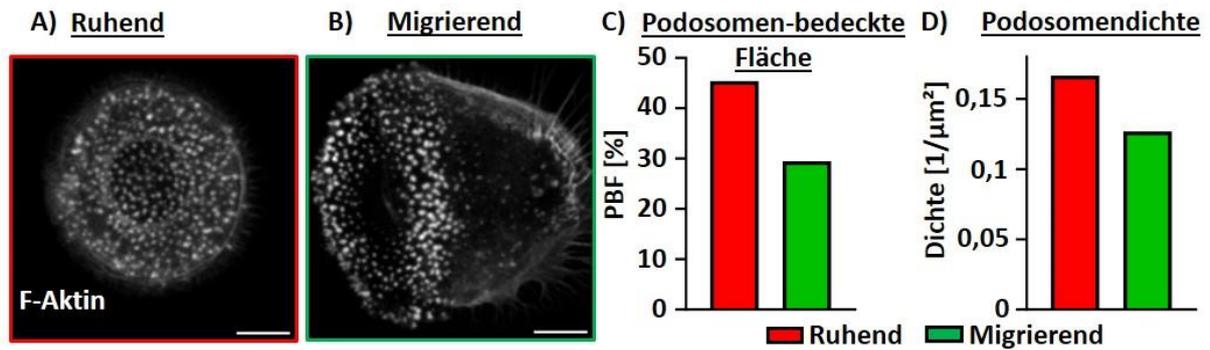


Abbildung 17: Unterscheidung des Migrationsverhaltens durch Poji. Gezeigt sind humane Makrophagen nach der Färbung auf F-Aktin durch Phalloidin bei sowohl einer ruhenden (A) als auch einer migrierenden (B) Zelle. Skala: 10 µm. (C-D) Korrespondierende Poji-Analyse der Podosomebedeckten Fläche (C) und der Podosome-dichte.

Zusätzlich zur Größenbestimmung wurde auch eine Signalverteilung fluoreszent markierter Proteine analysiert. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Kanäle wurde sowohl in der gesamten Zellfläche, als auch den kombinierten podosomal und nicht-podosomal Flächen detektiert. Durch die individuelle Fluoreszenzmessung der verschiedenen Flächen konnten jedoch nicht nur generelle Intensitätsunterschiede detektiert, sondern auch die differentielle Akkumulation von Proteinen, sowie Degradationsprozesse charakterisiert werden. Dazu wurde zunächst ein Quotient der Podosome-bedeckten Fläche und der Zellfläche berechnet, welcher als Nenner für den Quotienten der korrespondierenden Fluoreszenzintensitäten diente.

Die daraus berechnete Ratio beschrieb den Anteil der zellulären Fluoreszenzintensität in der PBF und normalisierte diesen Wert auf dessen biologische Größe. Dabei beschreibt eine Akkumulationsratio von 1 eine gleichmäßige Fluoreszenzverteilung in der gesamten Zelle und zeigt eine gleichförmige Lokalisation des gefärbten Proteins sowohl innerhalb als auch außerhalb der PBF an. Ein Wert über 1 zeigt dabei eine Akkumulation des Proteins in der podosomal und ein Wert von unter 1 eine Akkumulation außerhalb der podosomal Fläche an.

$$\text{Akkumulationsratio PBF} = \frac{\frac{\text{Intensität PBF}}{\text{Intensität Zelle}}}{\frac{\text{Fläche PBF}}{\text{Fläche Zelle}}} = \frac{\text{Intensitätsratio}}{\text{Flächenratio}}$$

Mit

$$PBF = \text{Podosomebedeckte Fläche}$$

$AR = 1 \rightarrow$ gleichmäßige Verteilung in der Zelle

$AR > 1 \rightarrow$ Akkumulation an Podosome

$AR < 1 \rightarrow$ Akkumulation außerhalb von Podosome

Diese Ratio kann verwendet werden, um die podosomenvermittelte Degradation von fluoreszenzmarkierter Gelatine zu detektieren. Dabei zeigte die Intensitätsverteilung von F-Aktin, dem Marker für den Podosomenkern, in einer beispielhaft ausgewählten Zelle eine deutliche Akkumulation von 170% in der kombinierten podosomal Fläche an. Außerhalb der Podosomen-bedeckten Fläche lag es dagegen mit einer Ratio von 88% vor. Die Ratio der Rhodamingelatine war in der podosomal Fläche auf 73% verringert, während diese Ratio in der Podosomen-freien Fläche leicht auf 104% erhöht wurde. Die Reduktion der Rhodamin-Gelatine-Fluoreszenz in der Podosomen-bedeckten, nicht aber in der Podosomen-freien Fläche der Zelle, wies damit auf eine degradative Funktion der Podosomen hin.

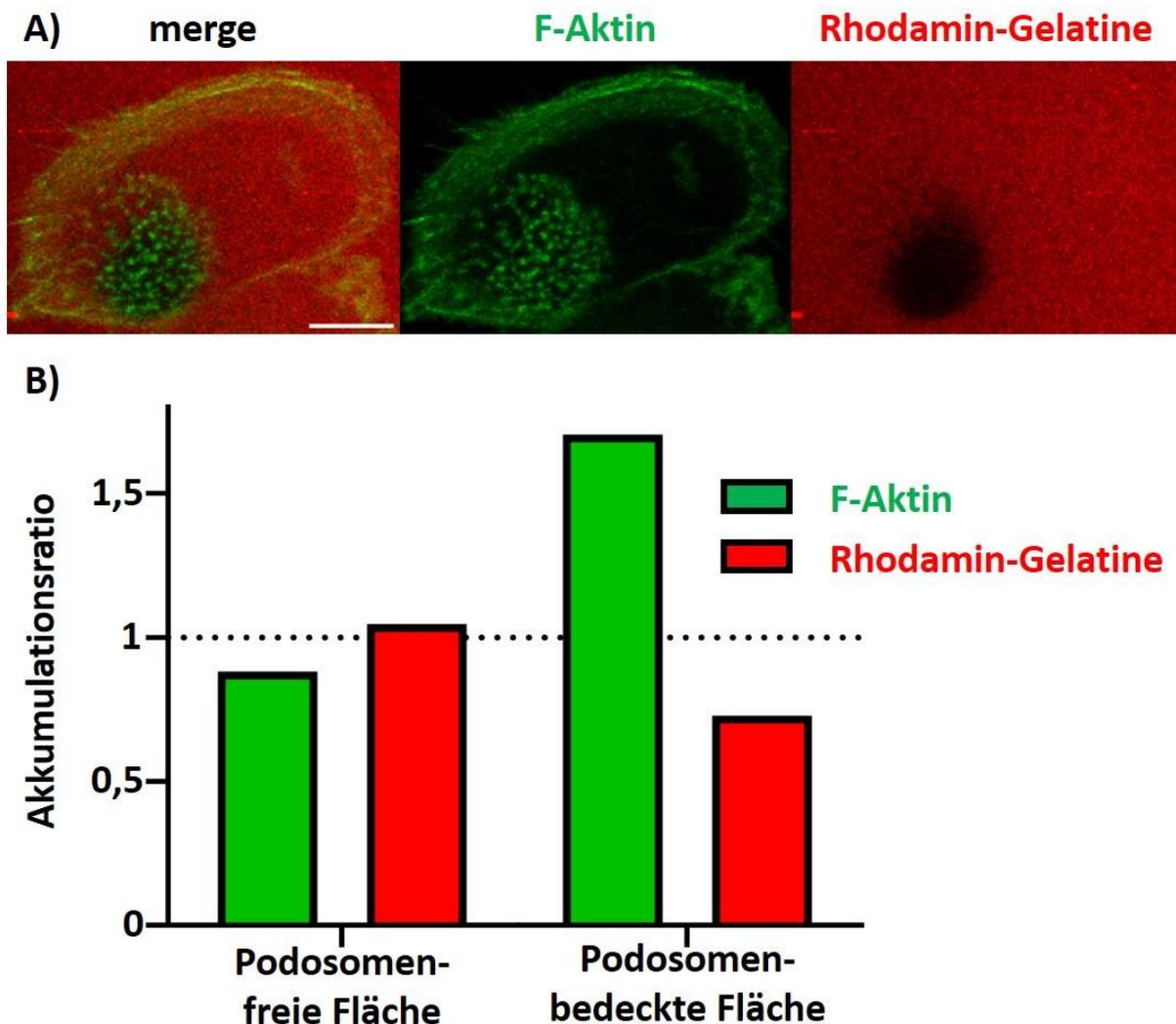


Abbildung 18: Degradation von Rhodamin-Gelatine durch Podosomen. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines humanen Makrophagen auf einer Rhodamin-Gelatine-Matrix (rot), mit Färbung auf F-Aktin (grün). Skala: 10 μ m. (B) Korrespondierende, normalisierte Fluoreszenzauswertung der Podosomen-bedeckten und Podosomen-freien Fläche der repräsentativ ausgewählten Zelle.

4.1.2.2 Podosomale Parameter

Da die Podosomen durch den Algorithmus nicht nur als kombinierte Fläche, sondern auch als individuelle Strukturen analysiert wurden, konnten zusätzlich zu den generellen Parametern auch spezifische podosomale Eigenschaften analysiert werden. Zum einen konnten die Fluoreszenzintensitäten an individuellen Podosomen charakterisiert werden, um verschiedene Podosomenpopulationen innerhalb der Zelle anhand der Signalverteilung zu identifizieren. Zum anderen wurde durch ein Fluoreszenzprofil entlang des Podosomendurchmessers die laterale Lokalisation von Proteinen in der Podosomenstruktur untersucht. Dazu wurden alle Podosomen einer Zelle in einen Bilderstapel kopiert und über eine *Z-Projection* ein optisches Mittel gebildet. Über das erhaltene Durchschnitts-Podosom wurde eine Profilinie gelegt und anhand der Linie die Fluoreszenzintensität gemessen. Nach insgesamt 360 Einzelmessungen mit je einem Grad Rotation wurden die Werte jedes Messpunktes gemittelt und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in Relation zum Podosomenzentrum aufgetragen. Hierdurch konnten Veränderungen von Lokalisationen detektiert werden, welche eine Rekrutierung oder eine Depletion spezifischer Proteine an Podosomen anzeigen konnten. So wurde beispielsweise nach der Zugabe des Aktin-Polymerisations-Inhibitors Cytochalasin D (Casella et al., 1981) beobachtet, dass die Kernstruktur des Podosoms zwar noch intakt, die Lokalisation des mechanosensitiven Vinculins jedoch stark vermindert war. Hierdurch konnten Rückschlüsse über die Kraftgeneration des Aktinkerns und dadurch vermittelte Rekrutierung mechanosensitiver Ringproteine gezogen werden.

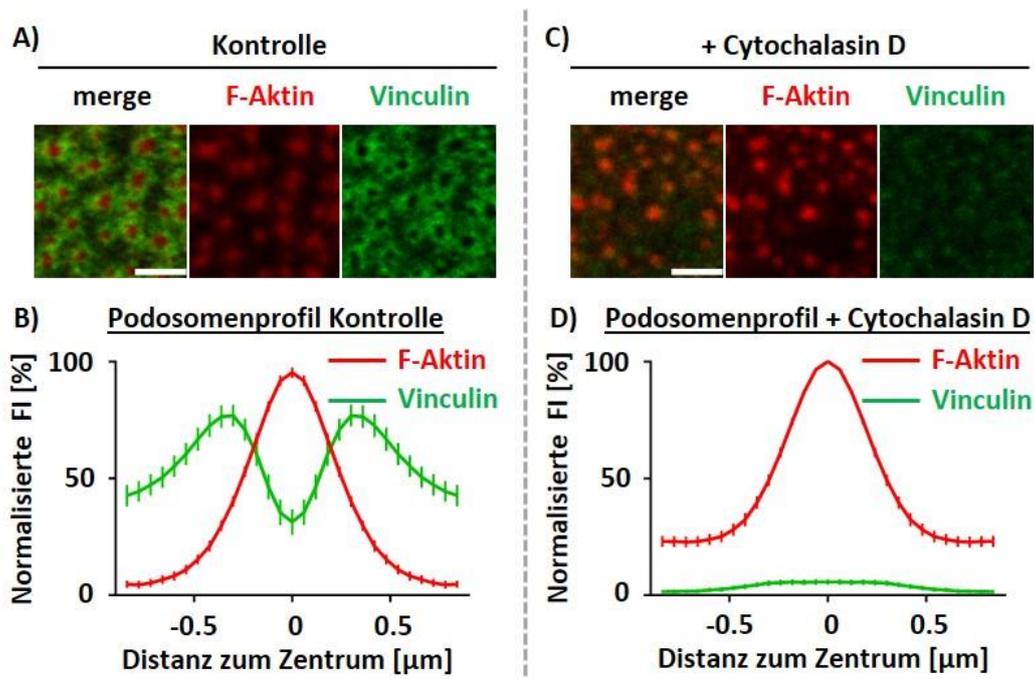


Abbildung 19: Verlust des Vinculin-Rings durch Cytochalasin D. (A, C) Repräsentativer Ausschnitt eines Makrophagen mit Färbung auf F-Aktin (rot) und Vinculin (grün), sowohl ohne (A) als auch mit Inkubation von 2 µM Cytochalasin D für 10 Minuten (C). Skala: 5 µm. (B, D) Korrespondierende mittlere Podosomenprofile mit normalisierter Fluoreszenzintensität der Kontroll- (B) und Cytochalasin D-Zellen (D). Mittelwert mit SEM von mindestens 15 Zellen pro Kondition, die Intensitäten wurden auf Maximum und Minimum beider Fluoreszenzkanäle normalisiert, um Intensitätsunterschiede zu zeigen.

Podosomen sind dreidimensionale Strukturen, so dass das gemittelte Profil einer optischen Ebene nur einen Teil zur Strukturklärung beitragen kann. Um die gesamte dreidimensionale Struktur von Podosomen darzustellen, wurde während der Mikroskopie ein Stapel einzelner optischer Ebenen erhalten, der das Podosom auch in seiner Höhe abbildete. Im Anschluss wurden durch Poji erneut alle Podosomen detektiert und gemittelt. Die einzelnen Koordinaten wurden für jede optische Ebene konsequent verwendet, um nacheinander die gesamte dreidimensionale Struktur nicht nur in lateraler, sondern auch in vertikaler Verteilung zu charakterisieren. Diese Untersuchung wurde verwendet, um die Lokalisation des Kappenproteins Zyxin zu ermitteln, die sich durch eine ringähnliche Form in unteren und eine kernähnliche Lokalisation in oberen optischen Ebenen zeigte. Interessanterweise änderte sich diese Lokalisation nach der Zugabe des Ionophors Ionomycin, durch welches die intrazelluläre Calciumkonzentrationen erhöht wurde (Liu und Hermann, 1978). Das Zyxin zeigte hier in allen Ebenen eine kernähnliche Lokalisation an, womit eine calciumabhängige Änderung der Podosomenstruktur durch eine sequentielle Profilanalyse detektiert werden konnte.

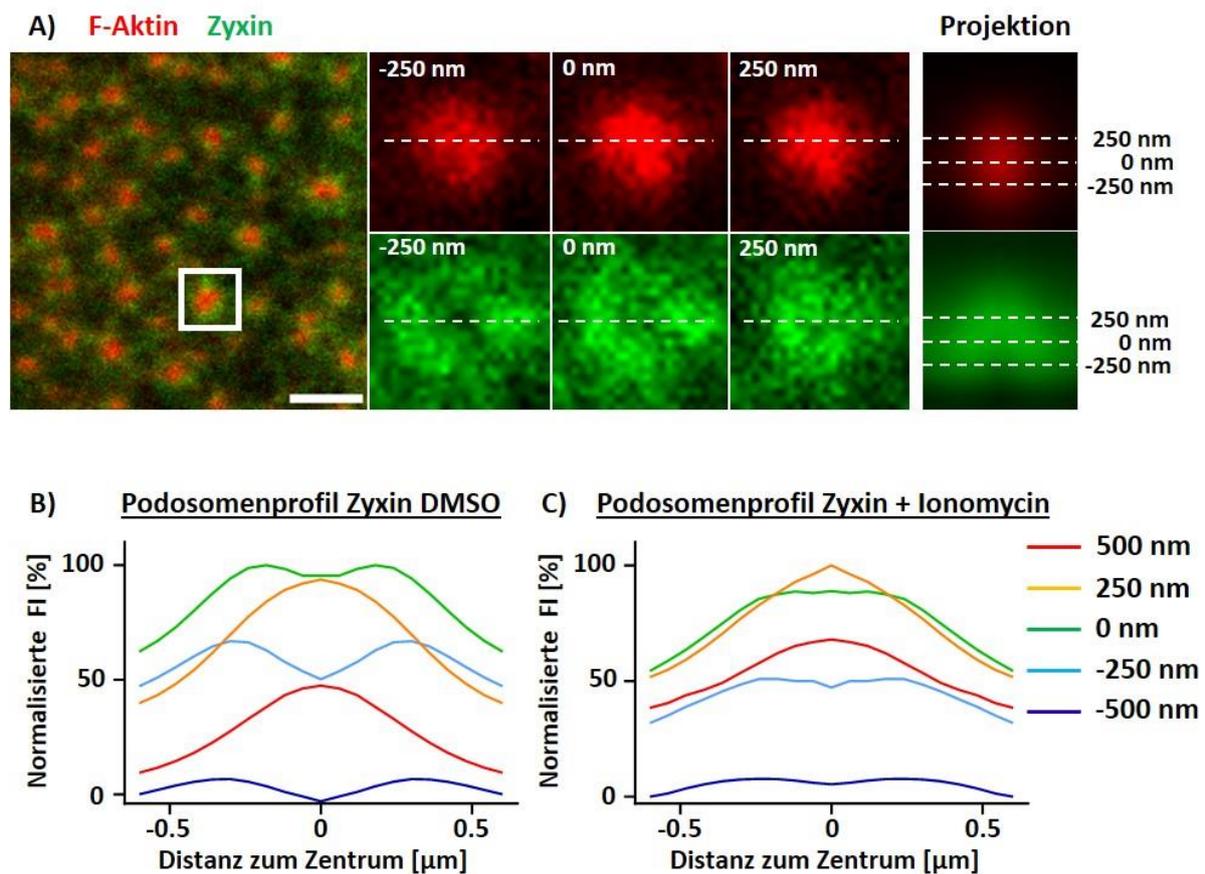


Abbildung 20: Podosomenmodell nach Poji-Analyse. (A) Humaner Makrophage, gefärbt auf F-Aktin (rot) und Zyxin (grün) als Ausschnitt, sowie mit der Detailansicht eines Podosoms über drei verschiedene Z-Ebenen, sowie mit einer korrespondierenden dreidimensionalen Projektion aller Podosomen. Skala: 2 µm. (B, C) Mittleres, normalisiertes Podosomenprofil einzelner optischer Ebenen in der Höhe von -500 bis 500 nm im Bezug auf die Referenzebene. Gezeigt sind Profile der Kontrollbedingung DMSO (B), sowie nach einer zehnmütigen Inkubation mit 2 µM Ionomycin (C). Profile gemittelt aus mindestens 5 Zellen pro Bedingung, die Intensitäten wurden auf Maximum und Minimum aller Z-Ebenen normalisiert, um Intensitätsunterschiede zu zeigen.

4.1.3 Zusammenfassung Poji

Wie durch die beispielhaft vorgestellten Parameter gezeigt wurde, ermöglicht der Algorithmus eine schnelle, robuste und vielseitige Analyse humaner Makrophagen und ihrer Podosomen. Hierbei wird automatisch eine Analyse von generellen Zell- und essentiellen podosomalen Parametern durchgeführt, welche in Kombination oder einzeln die Podosomenfunktion, sowie den Einfluss regulatorischer Proteine oder spezieller Inhibitoren anzeigen können. Da der Algorithmus die Analyse, abgesehen von der Definition von Zellflächen und Detektionsparametern, automatisch durchführt, ermöglicht er eine objektive Untersuchung wissenschaftlicher Fragen, die noch vor wenigen Jahren lediglich manuell und nur anhand kleiner Stichproben durchgeführt werden konnte. Poji stellte dabei nicht nur eine Erweiterung der bisher zur Verfügung stehenden Methoden der Podosomenforschung dar, sondern diente auch als Grundlage für den zweiten Forschungsbereich dieser Doktorarbeit, in der mit seiner Hilfe die Funktion und Regulation von Podosomen durch Swiprosin-1 untersucht wurde.

4.2 SWS1

Swiprosin-1 (SWS1) ist ein Calcium-sensitives Protein, das neben den zwei Calcium-bindenden EF-*hand*- und einer *coiled-coil*-Dimerisierungs-Domäne zusätzlich über 3 Aktinbindestellen verfügt. Durch die massenspektrometrische Analyse von Podosomen-angereicherten Zellfraktionen wurde bereits gezeigt, dass es sich bei SWS1 wahrscheinlich um ein prominentes Podosomenprotein handelt (Cervero et al., 2013). Es waren jedoch bisher keine näheren Informationen über Lokalisation, Regulation und Funktion von SWS1 an diesen Strukturen bekannt. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde daher zunächst die Lokalisation von SWS1 an Podosomen untersucht. Im Anschluss wurden die durch SWS1 regulierten Funktionen charakterisiert, sowie potentielle Interaktionspartner identifiziert.

4.2.1 Lokalisation von SWS1

Während die generelle Interaktion von SWS1 mit dem Aktinzytoskelett bereits publiziert wurde (Ramesh et al., 2009), wurde seine potentielle Lokalisation an Podosomen noch nicht erforscht. Daher wurde in einer ersten Versuchsreihe die endogene Lokalisation von SWS1 in primären humanen Makrophagen untersucht. In darauffolgenden Experimenten wurde analysiert, ob diese Lokalisation durch eine Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration moduliert wurde. Zusätzlich wurde auch die Konzentration von SWS1 durch sowohl Überexpressionen spezifischer Konstrukte als auch siRNA-vermittelte Depletionen verändert. Bei allen Experimenten wurden neben der Lokalisation von SWS1 an Podosomen auch potentielle Einflüsse des Proteins auf podosomale und zelluläre Parameter untersucht.

4.2.1.1 Lokalisation des endogenen SWS1

Um die endogene Lokalisation von SWS1 an Podosomen und innerhalb der Zelle zu analysieren, wurden humane Makrophagen nach Standardprotokoll für 4 Stunden auf Glasplättchen kultiviert und im Anschluss über Methanol-Vor- und Glyoxal-Fixierung immobilisiert. Im Anschluss wurde SWS1 zusammen mit F-Aktin gefärbt und die Zellen konfokal mikroskopiert. Die Aufnahmen wurden anschließend über Poji analysiert.

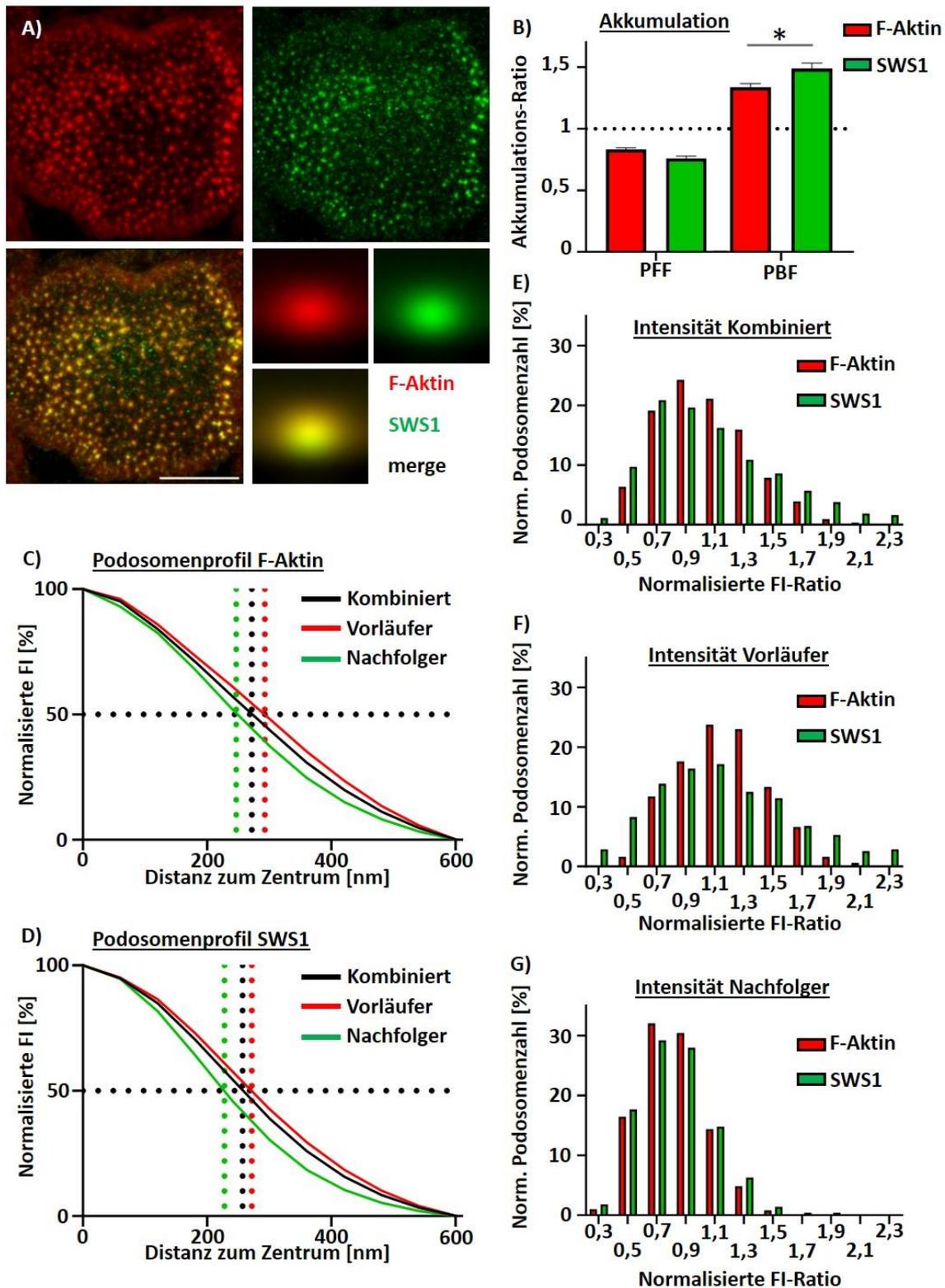


Abbildung 21: Endogene Lokalisation von SWS1. (A) Fluoreszenzmikroskopie mit F-Aktin (rot) und SWS1 (grün), sowie drei-dimensionaler Projektion eines durchschnittlichen Podosoms. Skala: 10 μ m. (B) Akkumulationsratio von F-Aktin und SWS1 in der Podosomen-bedeckten sowie Podosomen-freien Zellfläche. Mittelwert mit SEM. (C, D) Mittleres Podosomenprofil der Vorläufer- und Nachfolgerpodosomen mit einer kombinierten Analyse beider Subformen für F-Aktin (C) und SWS1 (D). Markiert ist die jeweilige biologische Größe bei halbmaximaler Intensität. (E-G) Auf den jeweiligen Median normalisierte Intensitätshistogramme individueller Podosomen von F-Aktin (rot) und SWS1 (grün) von sowohl der kombinierten Podosomenpopulation (E), sowie der differentiellen Analyse von Vorläufer- (F) und Nachfolger-Podosomen (G). n=50 Zellen aus 3 unabhängigen Versuchen.

Hierbei zeigte sich, dass SWS1 sowohl in lateraler als auch in vertikaler Ausbreitung im Zentrum der Podosomenstruktur lokalisierte. Im direkten Vergleich zu F-Aktin akkumulierte zudem ein signifikant größerer Anteil des zellulären SWS1 an der Podosomen-bedeckten Fläche und wies gleichzeitig eine vergleichsweise geringe Assoziation mit nicht-podosomalen Strukturen auf. Zusätzlich zeigte ein Vergleich der Intensitätshistogramme von F-Aktin und SWS1, dass SWS1 keine veränderte Präferenz für die Podosomensubformen der Vorläufer oder Nachfolger aufwies. Vielmehr korrelierte die Menge des an Podosomen akkumulierten SWS1 mit der Menge des F-Aktin und damit der Größe des Podosomenkerns. Eine Profilanalyse zeigte zudem, dass sich die SWS1-Lokalisation am Podosomenkern stärker im Zentrum konzentrierte und sich im Gegensatz zum F-Aktin nicht bis in die äußerste Peripherie des Podosoms erstreckte. Dieser Unterschied blieb auch bei einer differentiellen Analyse der kleineren Nachfolger- und der größeren Vorläufer-Podosomen bestehen, welche sowohl bei F-Aktin als auch für SWS1 einen vergleichbaren Einfluss auf die Podosomengröße nahmen. Die Lokalisationsunterschiede der Fluoreszenzsignale wurden durch eine Gauß'sche Näherung des halben Fluoreszenzsignals errechnet. Die Größe wurde dabei als der Abstand zum Podosomenzentrum definiert, bei dem die halbmaximale Fluoreszenzintensität vorlag und wurde im halben Podosomenprofil markiert (siehe Abbildung 21, C und D). Um die korrespondierende Größe des gesamten Profils zu ermitteln, wurde dieser Wert im Anschluss mit zwei multipliziert. Dadurch zeigte sich, dass die Größe des Fluoreszenzsignals als gemittelter Wert aller Podosomen für F-Aktin bei 542 nm lag, während sich das SWS1-Signal nur über eine laterale Fläche von 514 nm erstreckte.

4.2.1.2 Einfluss der Calciumkonzentration

Es wurde bereits gezeigt, dass die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration zu einer veränderten Akkumulation calciumsensitiver Proteine an Podosomen führen kann (Cervero et al., 2018, Herzog et al., 2020). Für SWS1 wurde der Einfluss der Calcium-Konzentrationserhöhung durch die Zugabe des Ionophors Ionomycin auf humane Makrophagen in zwei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Zudem wurden die Makrophagen mit dem Chelator BAPTA-AM inkubiert, welcher die Calcium-Konzentrationen verringert. Der Einfluss der drei Bedingungen auf Zelle und SWS1-Lokalisation wurde im Vergleich zu einer Negativkontrolle analysiert.

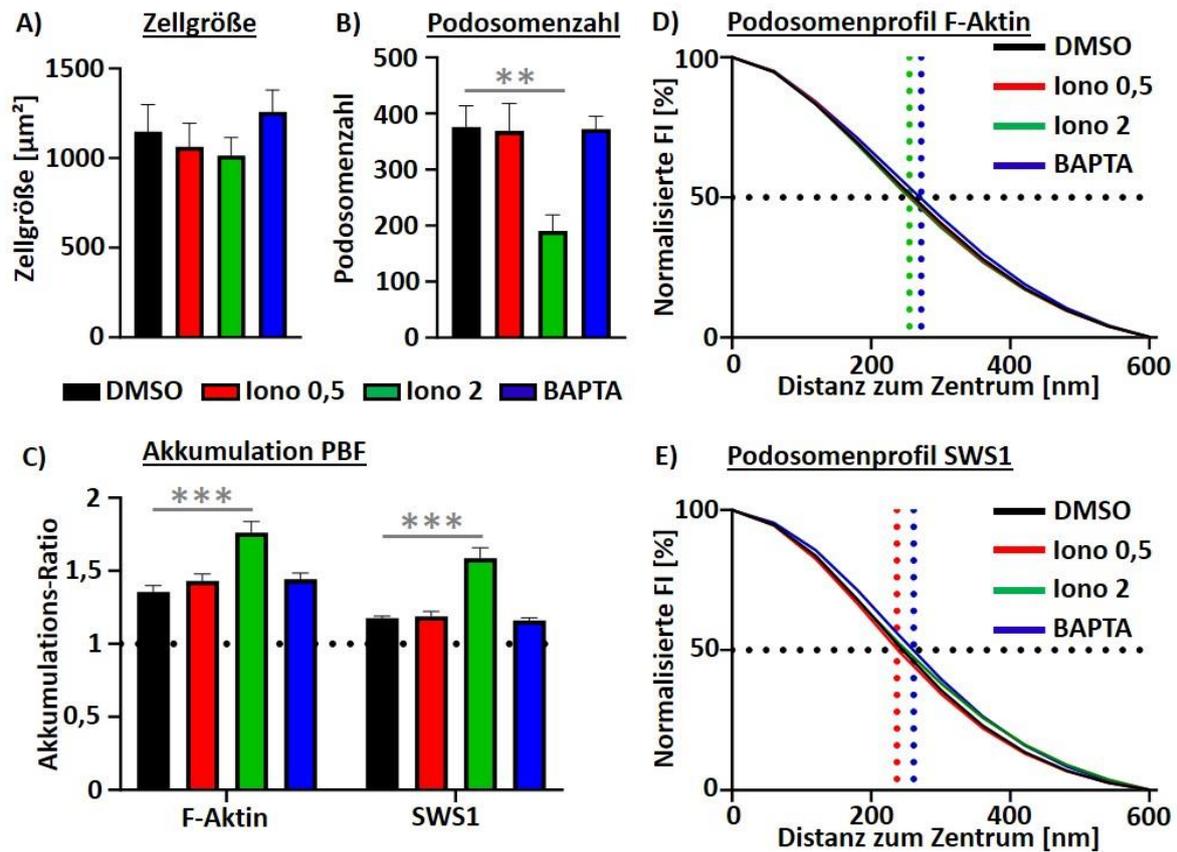


Abbildung 22: Einfluss der Calcium-Konzentration auf fixierte Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse nach Zugabe von 0,5 (rot), bzw. 2 μM Ionomycin (grün), und 10 μM BAPTA-AM (blau) für jeweils 10 Minuten im Vergleich zur DMSO-Negativkontrolle (schwarz). (A-C) Generelle Zellparameter mit Zellgröße (A), Podosomenanzahl (B) sowie der Ratio der Proteinakkumulation in der Podosomen-bedeckten Fläche (C) für F-Aktin und SWS1. (D, E) Mittleres, normalisiertes Podosomenprofil von F-Aktin (D) und SWS1 (E) in den jeweiligen Konditionen. Markiert sind die Konditionen mit maximaler und minimaler biologischer Größe der Fluoreszenzsignale bei halbmaximaler Intensität. Mittelwert mit SEM von mindestens 13 Zellen pro Kondition aus 3 unabhängigen Experimenten.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung der Calcium-Konzentration zwar einen signifikanten Effekt auf die Podosomenanzahl, nicht jedoch auf ihre Architektur hatte. Während die Zellgröße in allen Bedingungen vergleichbar vorlag, wurde die Podosomenanzahl durch die Zugabe hoher Konzentrationen von Ionomycin stark reduziert. Sowohl F-Aktin als auch SWS1 zeigten bei hohen Ionomycin-Konzentrationen zudem eine stärkere Akkumulations-Ratio in der Podosomen-bedeckten Fläche, während diese in allen anderen Konditionen nahezu unverändert vorlag. Da die Ratio-Veränderungen von F-Aktin und SWS1 jedoch ein einer vergleichbaren Höhe vorlagen, sprach dies für einen systemischen und nicht für einen SWS1-spezifischen Effekt. In der Profilanalyse wurde zudem ersichtlich, dass die Podosomen in beiden Fluoreszenzkanälen bei hohen Calcium-Konzentrationen in leicht verringerter Größe vorlagen, während eine Reduktion der Calcium-Konzentration keinen erkennbaren Effekt auf die Podosomengröße aufwies. Dabei fiel die Reduktion für das F-Aktin-Signal von 542 nm bei BAPTA-AM auf 510 nm bei Ionomycin (2 μM) geringer aus, als die Reduktion bei SWS1 (521 nm auf 474 nm).

4.2.1.3 Depletion von SWS1

Wie bereits beschrieben wurde, akkumulierte das endogene SWS1 sowohl unter physiologischen, wie auch unter veränderten Calcium-Konzentrationen, nach wie vor an der Kernstruktur der Podosomen. Um die Wirkung einer SWS1-Konzentrationsreduktion auf dessen Lokalisation sowie die Architektur von Podosomen zu untersuchen, wurde eine siRNA-basierte Depletion von SWS1 vorgenommen. Hierbei wurden zwei verschiedene, spezifisch auf die RNA des humanen SWS1 ausgerichtete, *small interfering-RNAs* (siRNA) transient in humane Makrophagen transfiziert und damit die Translation des endogenen SWS1 unterdrückt. Die Zellen wurden nach der Transfektion für drei Tage inkubiert, bevor sie ausgesät und fixiert wurden. Über eine parallel durchgeführte Zelllyse und daran anschließenden Western Blot wurde dabei die Effizienz der Depletion gegen eine Kontrolle evaluiert.

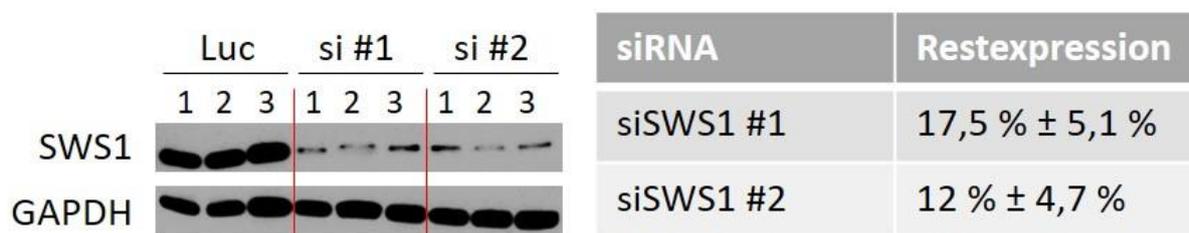


Abbildung 23: siRNA-vermittelte Depletionseffizienz von SWS1. Restexpression von SWS1 nach Depletion zwei verschiedener siRNAs gegen die Negativkontrolle Luc (siRNA gegen Luciferase) aus je drei unabhängigen Experimenten. Gezeigt sind die Detektionen von SWS1 als Zielprotein und GAPDH als Referenz im Western Blot, sowie die mittlere Restexpression der jeweiligen SWS1-siRNAs (mit Standardabweichung) im Vergleich zur Negativkontrolle aus drei unabhängigen Experimenten.

Für die Evaluation der Restexpression nach Depletion wurde das Proteinlevel von SWS1 auf die Expressionsstärke der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als *housekeeping*-Protein normalisiert und mit einer Negativkontrolle verglichen. Hier wurde gezeigt, dass nach der Depletion mit zwei verschiedenen siRNAs nur noch eine relative SWS1-Restexpression von 17,5% ± 5,1% (siRNA #1), bzw. 12% ± 4,7% (siRNA #2) vorlag. Da beide siRNAs eine vergleichbar starke Reduktion des Expressionslevels aufwiesen, wurden sie in folgenden Experimenten parallel durchgeführt und die Ergebnisse beider Depletions gemittelt.

Zusätzlich wurden die fixierten Depletionszellen auf F-Aktin und SWS1 gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch detektiert.

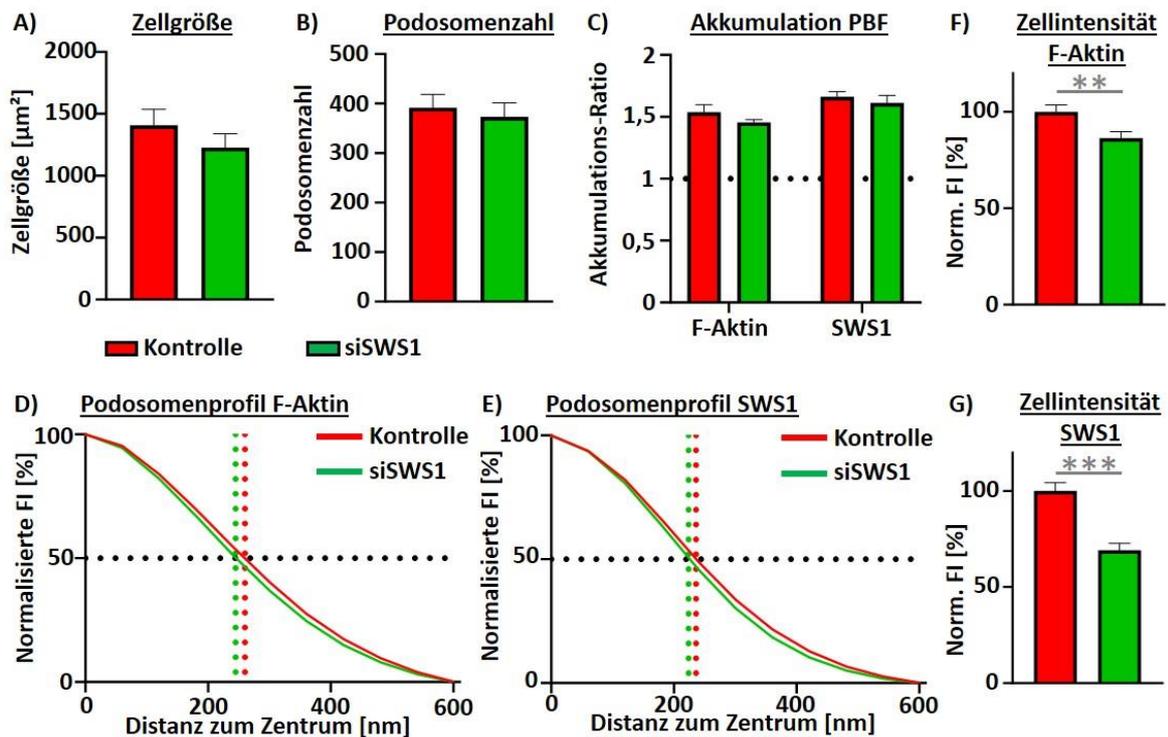


Abbildung 24: Einfluss der SWS1-Depletion auf Parameter fixierter Zellen. (A-C) Generelle Zellparameter nach SWS1-Depletion (grün) im Vergleich zur Negativkontrolle (rot) mit der Zellgröße (A), der Podosomenzahl (B), sowie der Ratio der Proteinakkumulation von F-Aktin und SWS1 in der Podosomen-bedeckten Fläche (C). (D, E) Mittleres, normalisiertes Podosomenprofil von F-Aktin (D) und SWS1 (E) in Kontroll- und Depletionszellen. Markiert ist die biologische Größe bei halbmaximaler Intensität. (F, G) Normalisierte Zellintensität für F-Aktin (F) und SWS1 (G) im Vergleich der Kontroll- und Depletionszellen. Mittelwert mit SEM von mind. 18 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten pro Kondition.

Hierbei zeigte sich, dass die SWS1-Depletion keinen starken Einfluss auf generelle Zellparameter hatte. Die Zellgröße wurde leicht, jedoch nicht signifikant reduziert, während sowohl die Podosomenanzahl, wie auch die normalisierte Proteinakkumulation von F-Aktin und SWS1 in der Podosomen-bedeckten Zellfläche nahezu unverändert vorlagen. Eine starke Reduktion um mehr als 30% lag hingegen bei der Detektion der absoluten SWS1-Fluoreszenzintensität vor und auch das normalisierte F-Aktin-Signal wurde signifikant um mehr als 14% reduziert. Dies zeigte an, dass das generelle Proteinlevel der analysierten optischen Ebene beider Proteine durch die Depletion reduziert wurde, dies jedoch keinen Einfluss auf deren relative Akkumulation an Podosomen zeigte. Im Gegensatz dazu wurde die Podosomengröße beeinflusst, da sie sowohl beim F-Aktin-Signal, als auch bei SWS1 nach der Depletion reduziert vorlag. Das F-Aktin-Signal wies eine Reduktion von 520 nm auf 490 nm auf, während die SWS1-Lokalisation von 472 nm auf 448 nm reduziert wurde. Analog zur endogenen Lokalisation wurde auch hier eine zentralere Lokalisation von SWS1 beobachtet, während sich das F-Aktin weiter in die Peripherie erstreckte.

4.2.1.4 Überexpression von SWS1 und spezifischer Teilkonstrukte

In einem folgenden Experiment wurde der Einfluss der SWS1-Konzentrationserhöhung auf die Podosomen- und Zellarchitektur untersucht. Verwendet wurden hier die Überexpressionen des SWS1-Volllängen-Konstrukts, sowie zur Funktionsuntersuchung der N-terminalen LC-Region das Δ LC-, sowie das LC-Konstrukt. Nach deren Expression wurden die Zellen fixiert, auf F-Aktin gefärbt und zusammen mit auf endogenes SWS1 gefärbten Kontrollzellen analysiert. Hierbei wurde festgestellt, dass sowohl das Volllängen- als auch das Δ LC-Konstrukt an Podosomen lokalisierten, das LC-Konstrukt jedoch eine unspezifische Verteilung in der gesamten Zellfläche aufwies, weswegen es für alle folgenden Experimente nicht mehr verwendet wurde.

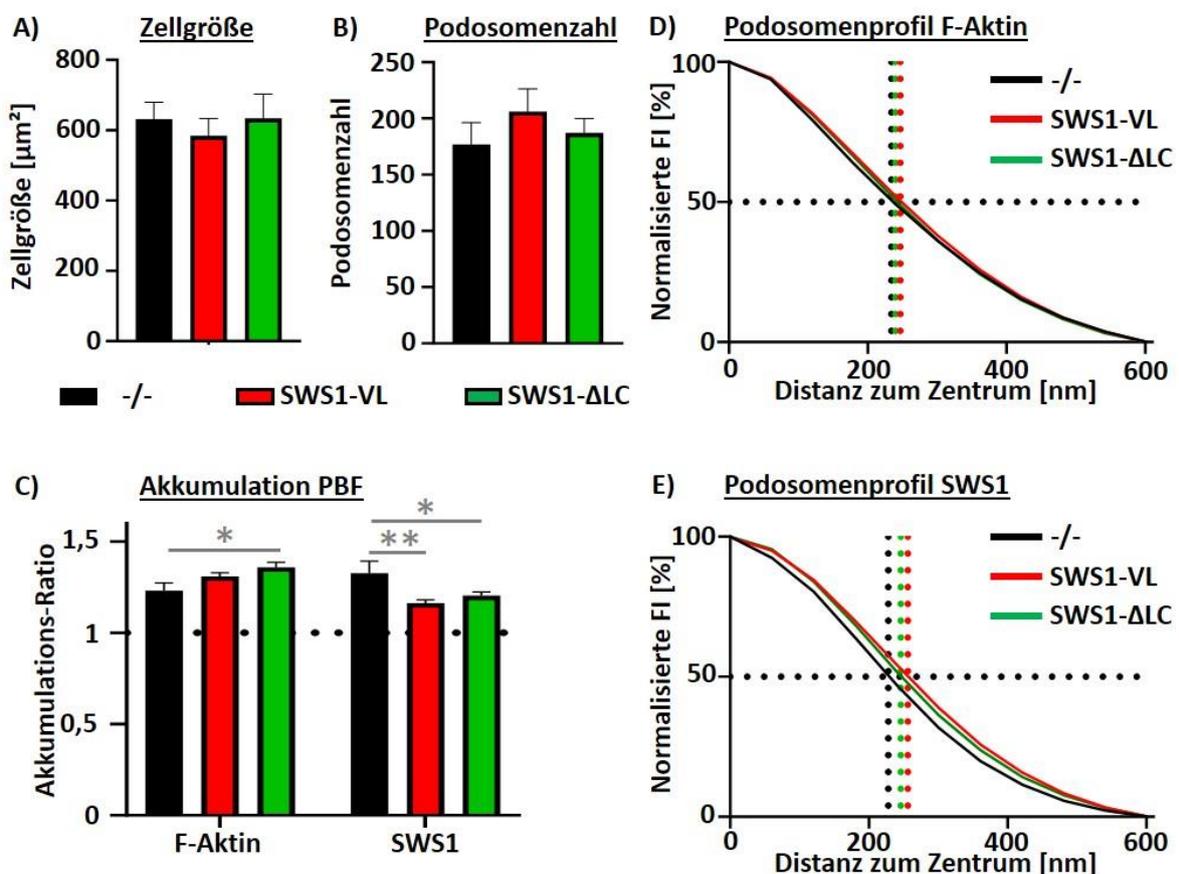


Abbildung 25: Einfluss der SWS1-Überexpression auf die Parameter fixierter Makrophagen. Gezeigt sind die Ergebnisse nach Überexpression des Volllängen- (rot), bzw. Δ LC-Konstrukts (grün) gegen eine endogene Negativkontrolle (schwarz). (A-C) Generelle Zellparameter inklusive Zellgröße (A) und Podosomenanzahl (B), sowie der Proteinakkumulation von F-Aktin und SWS1 in der Podosomen-bedeckten Fläche (C). (D, E) Mittleres, normalisiertes Podosomenprofil von F-Aktin (D) und SWS1 (E) der jeweiligen Expressionen mit markierter biologischer Größe bei halbmaximaler Intensität. Mittelwert mit SEM von mind. 22 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten pro Bedingung.

Während die Konstrukt-Überexpression keinen signifikanten Einfluss auf die zellulären Parameter hatte, wurde bei der normalisierten SWS1-Proteinakkumulation eine signifikante Reduktion der Konstrukte an der Podosomen-bedeckten Fläche detektiert. Dies zeigte an, dass ein erhöhter Anteil der

Konstrukte im Vergleich zur endogenen Kontrolle in der Podosomen-freien Fläche lokalisierte. Zusätzlich zeigte sich bei F-Aktin eine Erhöhung der relativen Akkumulation in der PBF, welche beim Volllängenkonstrukt nur leicht, beim Δ LC-Konstrukt jedoch signifikant vorlag. Bei der Podosomen-Profilanalyse zeigte sich, dass sowohl die endogene Kontrolle als auch beide SWS1-Konstrukte nach wie vor im Podosomenkern lokalisierten. Durch die Überexpression wurde die Lokalisationsfläche von SWS1 jedoch erhöht, so dass die Fluoreszenzen beider Konstrukte im Vergleich zur endogenen Kontrolle (456 nm) weiter außen in der Peripherie des Kerns detektiert wurden. Die stärkste Größenänderung fand dabei nach der Überexpression des Volllängenkonstrukts mit 512 nm statt, während das Signal nach der Δ LC-Überexpression über einen lateralen Durchmesser von 492 nm lokalisierte. Interessanterweise hatte die Überexpression keinen starken Einfluss auf die Größe der F-Aktin-Lokalisation. So wurde in der Kontrolle eine mittlere Größe von 468 nm und in den beiden Überexpression eine Größe von 480 nm (VL), bzw. 494 nm (Δ LC) detektiert. Während bei den Δ LC-Konstrukten demnach zum ersten Mal eine vergleichbar große Lokalisation von SWS1 und F-Aktin beobachtet wurde, wurde nach der Expression des Volllängenkonstrukts sogar eine größere Lokalisationsfläche bei SWS1 als bei F-Aktin detektiert.

4.2.1.5 Zusammenfassung Lokalisation

Es wurde gezeigt, dass es sich bei SWS1 tatsächlich um einen Bestandteil von Podosomen und im Speziellen der Podosomen-Kernstruktur handelt. Sowohl in der endogenen Färbung, nach der Überexpression von Voll- und Teillängenkonstrukten als auch als Restexpression nach siRNA-gesteuerter Depletion, lokalisierte das SWS1 in lateraler Richtung stets im geometrischen Zentrum des Podosoms. Auch die dreidimensionale Darstellung eines durchschnittlichen Podosoms zeigte, dass das SWS1 im Zentrum der fokalen Ebenen des Podosoms lokalisiert und sich weniger in die Peripherie ausbreitet, als das Kernprotein F-Aktin. Weder durch die Erhöhung, noch durch die Verringerung intrazellulärer Calcium-Konzentrationen wurde die Lokalisation des Calcium-sensitiven SWS1 maßgeblich verändert. Bei hohen Calcium-Konzentrationen wurde eine leichte Verringerung der Podosomengröße, sowie eine starke Reduktion der Podosomenzahl beobachtet, dies sprach jedoch für einen systematischen Effekt. Die Depletion des SWS1 zeigte eine signifikante Verringerung zellulärer SWS1- und F-Aktin-Level, jedoch war kein starker Effekt auf Podosomengröße und weitere zelluläre Parameter zu detektieren. Die Überexpression GFP-gebundener Konstrukte erhöhte die Akkumulation von F-Aktin in der Podosomenbedeckte Fläche und reduzierte gleichzeitig diese Ratio für SWS1, ansonsten wurden keine zellulären Parameter signifikant verändert. Nach der Überexpression lag das SWS1 jedoch zum ersten Mal in einer mit F-Aktin vergleichbare großen Lokalisation am Podosom vor.

4.2.2 Einfluss von SWS1 auf podosomale Funktionen

SWS1 wurde im Rahmen dieser Arbeit als Bestandteil der Podosomen-Kernstruktur identifiziert. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob auch spezifische Podosomenfunktionen durch SWS1 reguliert werden. Hierbei wurde wegen der bereits publizierten Interaktion von SWS1 mit Aktinfilamenten (Park et al., 2016, Lehne et al., 2022) besonderes Augenmerk auf die Aktin-Organisation in Podosomen gelegt. Da in diesem Rahmen dynamische Prozesse beobachtet werden sollten, wurde die Charakterisierung der primären humanen Makrophagen zusätzlich zu der Zellfixierung auch um die Mikroskopie lebender Zellen erweitert.

4.2.2.1 Einfluss auf Lebenszeit und Oszillation von Podosomen

Um Podosomen in der *live-cell*-Mikroskopie sichtbar zu machen, wurde ein LifeAct-mCherry-Konstrukt zur Visualisierung von F-Aktin-haltigen Strukturen überexprimiert. Dieses Plasmid codiert dabei die Expression eines kleinen, Aktin-interkalierenden Proteins mit gebundenem roten Fluoreszenzfarbstoff. SWS1 wurde analog durch die Überexpressionen der entsprechenden GFP-gekoppelten Konstrukte sichtbar gemacht.

Ein potentieller Einfluss der SWS1-Konzentration auf die Podosomendynamik wurde dabei über drei verschiedene Parameter untersucht. Dazu wurden alle Podosomen, die eine Lebenszeit von mehr als 2 Minuten aufwiesen durch den FIJI-basierten Algorithmus TrackMate (Tinevez et al., 2017) annotiert und die Koordinaten dieser Podosomen über die Zeit isoliert. Dadurch konnte sowohl die durchschnittliche Lebensdauer der Podosomen ermittelt, als auch ein Histogramm erstellt werden, in welchem die einzelnen Lebenszeiten in drei Gruppen eingeteilt wurden. Diese Gruppen beschrieben kurzlebige (2-8 Minuten), mittellebige (10-28 Minuten) und langlebige Podosomen (30 Minuten, was der maximalen Aufnahmezeit entsprach). In einem ersten Versuch wurden die SWS1-Volllängen- und Δ LC-Konstrukte verwendet, indem sie parallel mit dem Lifeact-mCherry für 4 Stunden überexprimiert und in der *live-cell*-Mikroskopie mit einer Negativkontrolle verglichen wurde.

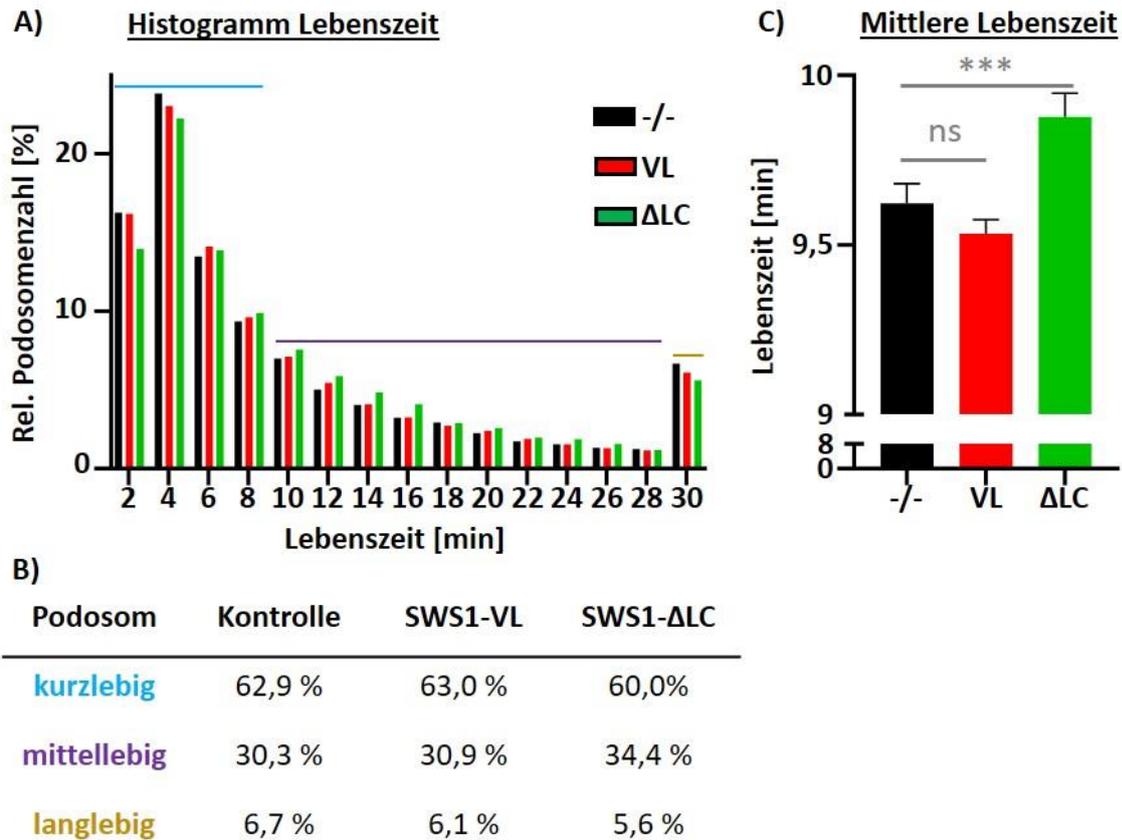


Abbildung 26: Einfluss der SWS1-Überexpression auf die Podosomen-Lebenszeit. Gezeigt sind die Ergebnisse nach der Überexpression des GFP-SWS1-Volllängen- (rot) und Δ LC-Konstruktes (grün) gegen eine Negativkontrolle (schwarz). (A) Histogramm der Podosomenlebenszeit, mit prozentualem Anteil der Gesamt-Podosomenanzahl. (B) Korrespondierende relative Anzahl von kurzlebigen (2-8 Minuten), mittellebigen (10-28 Minuten) und langlebigen (30 Minuten) Podosomen. (C) Mittlere Lebenszeit der drei Konditionen. Mittelwert mit SEM von mind. 35 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten pro Bedingung.

Eine Analyse der Podosomen über die Zeit zeigte, dass die durchschnittliche Podosomenlebenszeit nach der Transfektion des Δ LC-Konstruktes signifikant erhöht vorlag, während die Podosomen durch die Überexpression des Volllängenkonstruktes eine leicht reduzierte Lebenszeit aufwiesen. Die mittlere Lebenszeit der Δ LC-Zellen wurde dabei durch einen reduzierten Anteil kurzlebiger und einen gleichzeitig deutlich erhöhten Anteil mittellebiger Podosomen beeinflusst. Interessanterweise wiesen die Δ LC-Zellen im Vergleich zu Kontrolle und Volllängenkonstrukt den geringsten Anteil langlebiger Podosomen auf.

Zusätzlich zur Lebenszeit wurde auch die zeitliche Änderung der Fluoreszenzintensität, die sogenannte Oszillation, für beide Überexpressionen untersucht. Dabei wurde von jeder Kondition jeweils ein Vorläufer- ein Nachfolger- und ein reifendes Podosom analysiert. Die letzte Gruppe beschrieb dabei ein Vorläuferpodosom, welches während seiner Lebenszeit aus der Zellperipherie in das Zellzentrum migrierte und mindestens einem Spaltungsprozess unterlag.

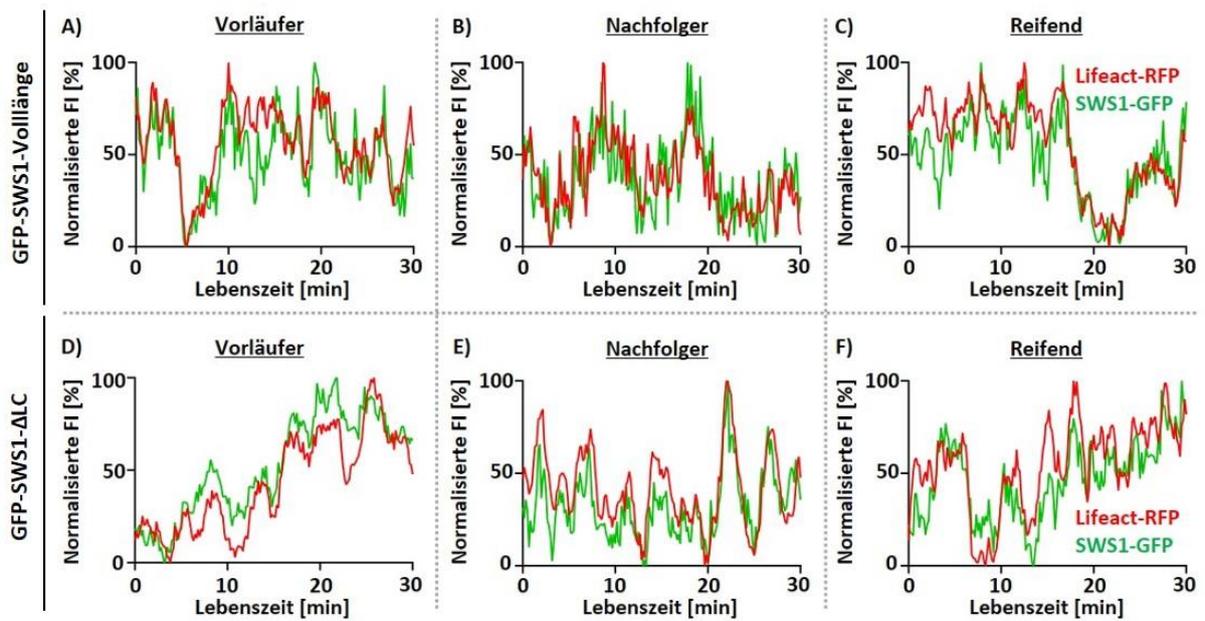


Abbildung 27: Podosomenoszillation verschiedener Podosomensubformen. Gezeigt sind die normalisierten Fluoreszenzintensitäten der LifeAct-mCherry (rot), sowie SWS1-GFP-Überexpressionen (grün) über einen Zeitraum von 30 Minuten. (A-C) Repräsentative Oszillation eines Vorläufer- (A), Nachfolger- (B) bzw. reifenden Podosoms (C) nach SWS1-Volllängen-Überexpression. Analog gezeigt sind die drei Subformen nach der Überexpression des Δ LC-Konstrukts (D-F).

Die Fluoreszenzoszillation, welche die kombinierte Menge an Protein in einem Podosom zu einem bestimmten Zeitpunkt anzeigt, wies unabhängig vom verwendeten Konstrukt und der repräsentativen Podosomensubformen eine nahezu parallele Intensitätskurve für Lifeact-mCherry und SWS1 auf. Dies ließ den Schluss zu, dass die Stärke der Rekrutierung von SWS1 an den Podosomenkern mit der Größe des Kerns und damit der Menge an F-Aktin korrelierte. Gleichzeitig wurden hierdurch keine Hinweise erhalten, dass das SWS1 erst zu einem bestimmten Zeitpunkt in die Kernarchitektur aufgenommen, oder während des Reifungsprozesses aus ihr dissoziiert wird.

Nach der Überexpression von SWS1 wurde in einem zweiten Versuch seine intrazelluläre Konzentration über siRNA-gesteuerte Depletion reduziert. Die Podosomen wurden erneut durch Überexpression von Lifeact-mCherry markiert und die Zellen mikroskopiert. Zusätzlich wurden Wiederherstellungs-Experimente durchgeführt, bei denen die Zellen nach erfolgter Depletion mit siRNA-insensitiven Konstrukten von Volllängen- und Δ LC-SWS1 transfiziert wurden. Hiermit sollte deren Funktion untersucht werden, ohne dass die endogene Expression von SWS1 mit den Konstrukten interferieren kann.

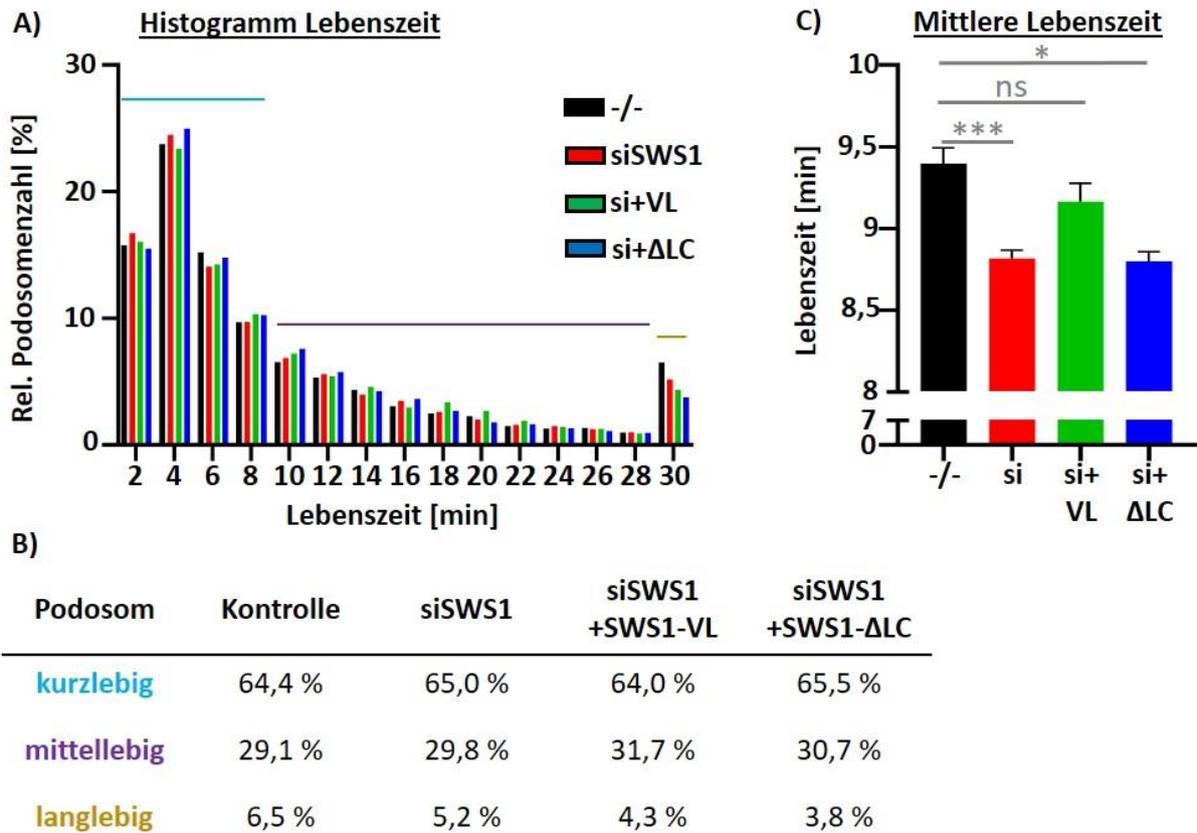


Abbildung 28: Lebenszeitanalyse nach SWS1-Depletion und Wiederherstellung. Gezeigt sind Ergebnisse aus Zellen der Negativkontrolle (schwarz), der Depletion ohne Funktionswiederherstellung (rot), sowie der Depletion mit gleichzeitiger Wiederherstellungsexpression des Volllängen- (grün), bzw. Δ LC-Konstruktes (blau). (A) Lebenszeit-Histogramm von Podosomen mit prozentualer Verteilung der Podosomen. (B) Korrespondierende relative Anzahl von kurzlebigen (2-8 Minuten), mittellebigen (10-28 Minuten) und langlebigen (30 Minuten) Podosomen. (C) Mittlere Lebenszeit der 4 Konditionen gezeigt als Mittelwert mit SEM. Gemittelte Ergebnisse von mind. 16 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten pro Kondition.

Hier konnte festgestellt werden, dass die mittlere Lebenszeit durch die SWS1-Depletion signifikant verringert wurde. Dies wurde vor allem durch eine erhöhte Anzahl kurzlebiger mit der gleichzeitigen Verringerung langlebiger Podosomen beeinflusst. Die Lebenszeitreduktion konnte durch die Wiederherstellungsexpression des Volllängenkonstruktes teilweise wieder ausgeglichen werden, wobei hier vor allem die Anzahl mittellebiger Podosomen erhöht wurde, während der Anteil langlebiger Podosomen noch stärker verringert vorlag. Interessanterweise konnte die Reduktion der mittleren Lebenszeit nicht durch die Überexpression des Δ LC-Konstruktes ausgeglichen werden, obwohl dieses in der Überexpression sogar zu einer Erhöhung der Lebenszeit geführt hatte. Hier wies seine Wiederherstellungsexpression den höchsten Anteil kurzlebiger und gleichzeitig den geringsten Anteil von mittellebigen Podosomen auf.

4.2.2.2 Einfluss auf die Aktindynamik

Da bisher weder in der *fixed-cell*-, noch in der *live-cell*-Mikroskopie ein starker Einfluss von SWS1 auf die Anzahl von Podosomen zu beobachten war, eine Depletion aber anscheinend zu einer reduzierten Lebenszeit führte, wurde ein potentieller Einfluss von SWS1 auf die Aktindynamik des Podosomenkerns untersucht. Hierfür wurde SWS1 aus den humanen Makrophagen mithilfe von siRNA depletiert und die Zellen im Anschluss mit GFP- β -Aktin transfiziert. Die Aktindynamik wurde über das FRAP (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*) untersucht, bei dem die GFP-Fluorophore einzelner Podosomen inaktiviert wurden. Über einen Zeitraum von 2 Minuten wurde die Wiederherstellung des Fluoreszenzsignals durch den Einbau ungebleichter GFP-markierter Aktin-Monomere in den Podosomenkern beobachtet. Die Zeit nach der die Hälfte der maximal wiederherstellbaren Intensität erreicht wurde, lässt hierbei Rückschlüsse auf die Dynamik des Aktineinbaus zu. Durch den Quotienten aus der maximal wiederhergestellten gegen die Ausgangs-Intensität wurden die Anteile von mobiler und immobil Fraktion der Podosomen bestimmt. Die mobile Fraktion beschreibt dabei eine Aktinorganisation mit hoher *Turnover*-Rate, während in der immobilen Fraktion nur wenig Aktinaustausch stattfindet.

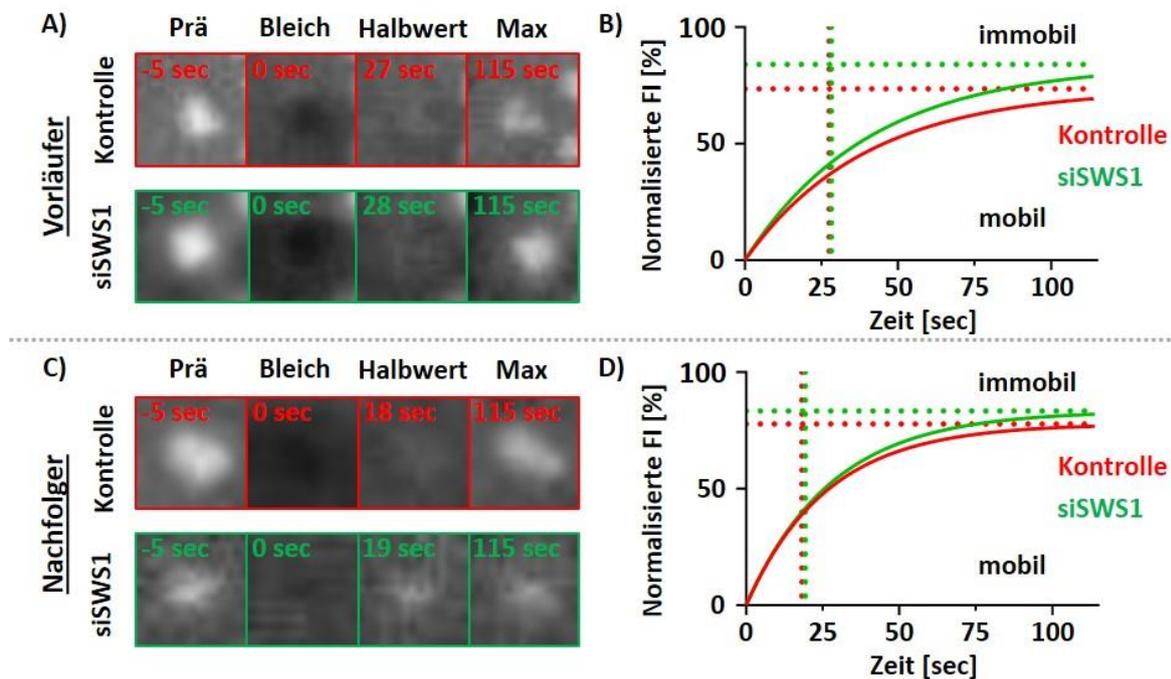


Abbildung 29: FRAP von Vorläufer- und Nachfolger-Podosomen nach SWS1-Depletion. (A, C) Repräsentative Videoausschnitte eines Podosoms für sowohl Kontroll-, als auch SWS1-Depletionszellen. Gezeigt sind neben dem initialen Bild auch der Zeitpunkt des Fluorophor-Ausbleichens bei 0 Sekunden, sowie das jeweilige Bild der Halbwertszeit und der Endpunkt der Messung für sowohl Vorläufer- (A), als auch Nachfolger-Podosomen (C). (B, D) Mittelwerte der korrespondierenden Fluoreszenz-Analyse. Gezeigt sind Gauß'sche Annäherungen der Mittelwerte von Kontroll- und Depletionszellen in sowohl Vorläufer- (B) als auch Nachfolger-Podosomen (D). Markiert sind jeweils die berechnete Plateauintensität, sowie der Zeitpunkt der halbmaximalen Intensität dieses Werts. Gemittelte Werte von mind. 15 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch die siRNA-Depletion die immobile Fraktion von F-Aktin in Vorläufer-Podosomen von 27,5% auf 16% verringert wurde, was einer relativen Reduktion von mehr als 41% entspricht. Interessanterweise fiel dieser Unterschied bei den zentraler gelegenen Nachfolger-Podosomen mit einer Reduktion von 23,2% auf 16,7%, was einer relativen Verringerung von ca. 28% entsprach, geringer aus. Die Rate der Aktindynamik, welche durch die Zeit der halbmaximalen Intensitätserholung bestimmt wurde, unterschied sich zwischen den beiden Podosomen-Unterarten deutlich. So erreichten die Vorläufer-Podosomen diese Halbwertszeit nach 27,5 (Kontrolle) bzw. 28,3 Sekunden (Depletion), während das halbe Intensitätslevel bei den Nachfolgern bereits nach 18,2 (Kontrolle), bzw. 19,3 Sekunden (Depletion) wiederhergestellt wurde. Während die Podosomen-Subformen zueinander einen großen Unterschied der Halbwertszeit aufwiesen, wurde diese durch die SWS1-Depletion in der gleichen Subform nur in sehr geringem Maße um jeweils ca. eine Sekunde verlängert.

4.2.2.3 Einfluss auf die Protrusion

Die Aktinpolymerisation im Podosomenkern ist neben der Filamentorganisation einer der zentralen Kraftgeneratoren für die podosomale Protrusion in die extrazelluläre Matrix. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die im FRAP-Experiment festgestellte Änderung der Aktinorganisation im Podosom, charakterisiert durch die Einteilung des Kerns in mobile und immobile Fraktionen, mit einer Änderung der Protrusion korrelierte. Hierzu wurde eine siRNA-regulierte Depletion von SWS1 durchgeführt, bevor die Zellen über die ERISM-Methode (Kronenberg et al., 2017) analysiert wurden. Dazu wurden die Zellen auf einem goldbeschichteten Elastomer ausgesät und die Protrusion durch die Auslenkung eines darunter befindlichen Sensors angezeigt. Die Durchführung dieser Experimente fand mit freundlicher Unterstützung von Dr. Nils Kronenberg und Prof. Malte Gather an der Universität Köln statt.

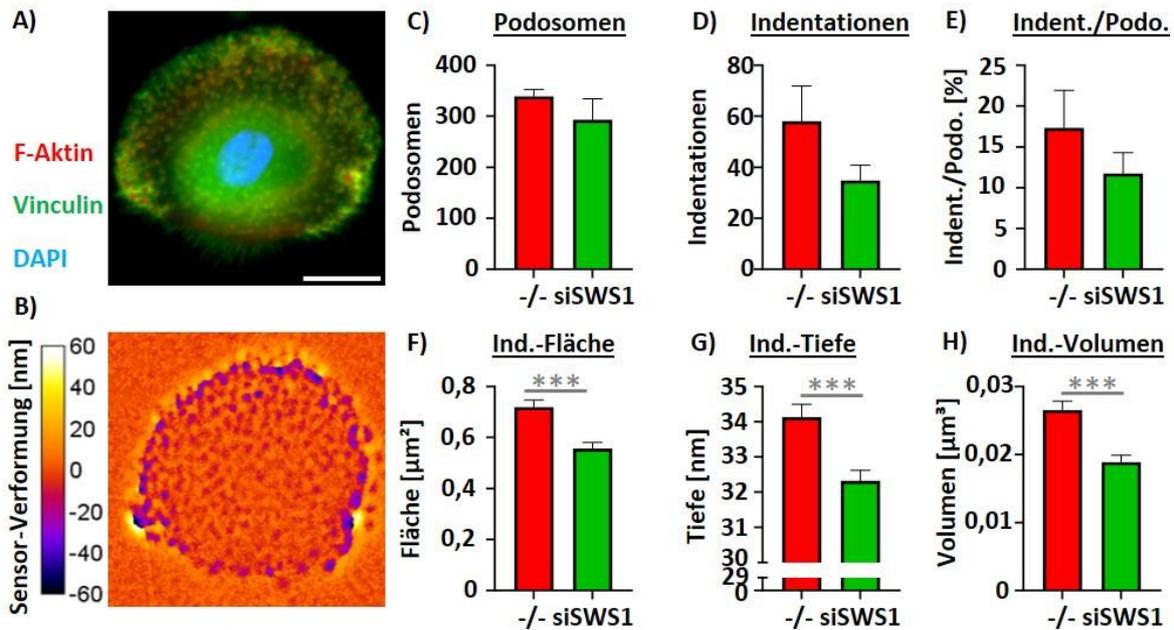


Abbildung 30: Einfluss der SWS1-Depletion auf die Protrusionskraft. (A) Übersicht einer repräsentativen Zelle nach Immunofluoreszenzfärbung auf F-Aktin (rot), Vinculin (grün) und DAPI (blau). Skala: 10 μm . (B) Korrespondierende Deformation des ERISM-Sensors durch die Protrusionskraft einzelner Podosomen mit Skala. (C-E) Einfluss auf Podosomenanzahl und Protrusion mit Gesamtanzahl der Podosomen pro Zelle (C), Gesamtanzahl der Protrusionen pro Zelle (D), sowie dem daraus berechneten prozentualen Anzahl protrudierender Podosomen (E). (F-H) Einfluss auf die Indentationsparameter protrudierender Podosomen mit lateraler Indentations-Fläche (F), vertikaler -Tiefe (G) und korrespondierendem -Volumen (H). Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) von 6 Zellen je Bedingung.

Im Laufe dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass die SWS1-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen eine leicht reduzierte Anzahl an Podosomen, jedoch eine starke Reduktion der Elastomer-Indentationen aufwiesen. Die Anzahl der Indentationen zeigte dabei ausschließlich die protrudierende Population der Podosomen an. Selbst in der Kontrolle waren im Mittel mit 58 Indentationen bei 339 Podosomen nur weniger als ein Fünftel (17,3%) aller Podosomen zur Protrusion befähigt. Bei der Depletion lag dieses Verhältnis mit durchschnittlich 34 Protrusionen bei 293 Podosomen noch stärker reduziert vor (11,7%), wies jedoch wie alle anderen Parameter keine statistische Signifikanz auf. Die verbliebenen Protrusionen der Depletionszellen zeigten jedoch signifikant reduzierte Parameter der Elastomerverformung. Die durchschnittliche laterale Fläche der Indentationen wurde nach der SWS1-Depletion von $0,7 \mu\text{m}^2$ auf $0,55 \mu\text{m}^2$ signifikant um 21,5% verringert. Auch die Tiefe der Protrusionen wies nach der Depletion eine leichte, jedoch signifikante Verringerung von $34,1 \text{ nm}$ auf $32,2 \text{ nm}$ auf (6% Reduktion). Die korrespondierende Indentationsfläche wurde durch die SWS1-Depletion von $0,025 \mu\text{m}^3$ auf $0,0186 \mu\text{m}^3$ um 28% verringert.

4.2.2.4 Einfluss auf die Myosin IIA-Aktivität

Die Möglichkeit von Podosomen, nicht nur mechanosensitiv zu reagieren, sondern auch selbst Kräfte zu generieren wird neben der Aktinpolymerisation auch durch die Myosin IIA-Kontraktilität der Podosomenkabel vermittelt. Da die Protrusionskraft des Kerns sowie dessen Organisation durch SWS1 beeinflusst wurde, wurde in einem folgenden Experiment untersucht ob die Lokalisation von SWS1 an Podosomen mit der Myosin IIA-Aktivität der kontraktilen Kabel interagiert. Deren Aktivität wird durch eine Calcium-abhängige Phosphorylierungskaskade reguliert, weswegen die Calcium-Konzentration durch die Zugabe von Ionomycin und BAPTA-AM moduliert wurde. Zusätzlich wurde SWS1 aus Makrophagen mittels siRNA depletiert und die Zellen neben Phalloidin auch auf den Marker des aktivierten Myosin IIA, phospho-MLC (pMLC) gefärbt. Zusätzlich fand eine Färbung des Ringproteins Vinculin statt, um dessen mechanosensitive Rekrutierung an das Podosom zu untersuchen.

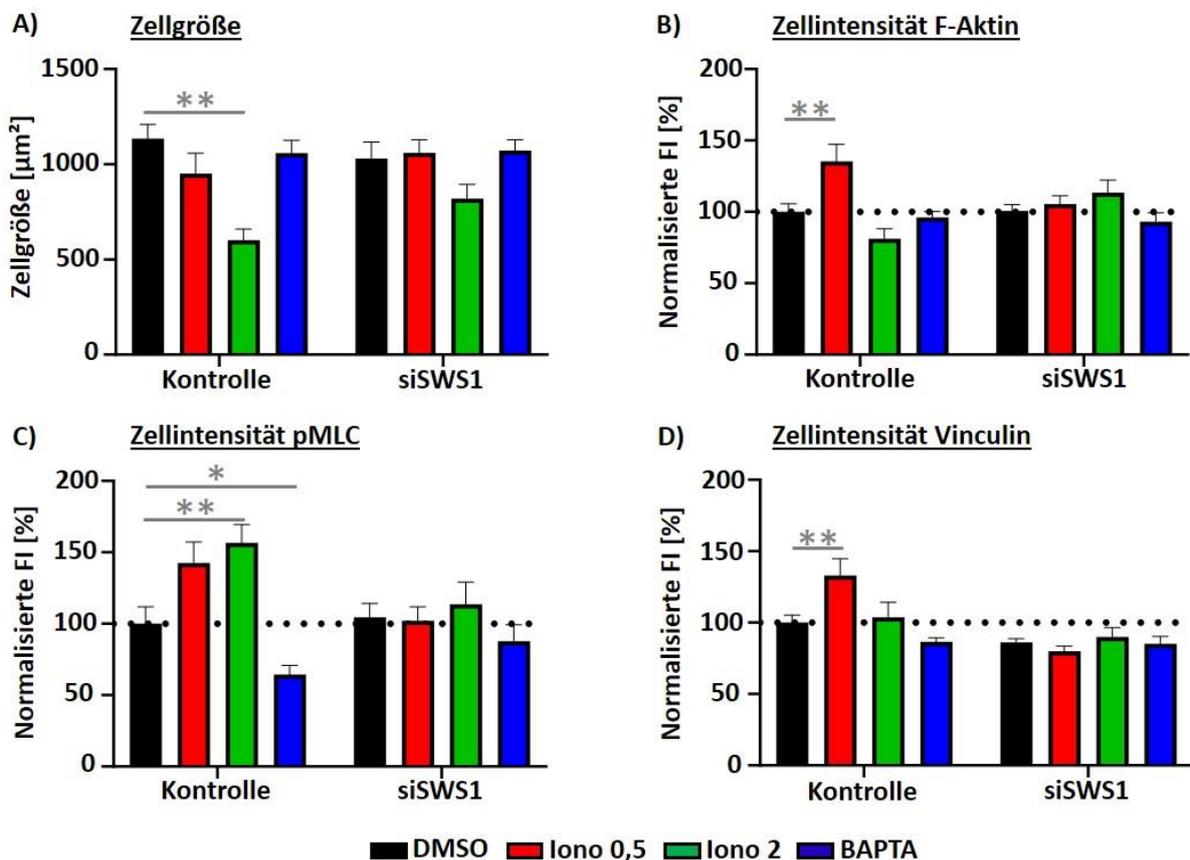


Abbildung 31: Untersuchung der Myosin-Aktivität (zellulär). Gezeigt sind die Ergebnisse nach Zugabe von 0,5 (rot), bzw. 2 µM Ionomycin (grün), und 10 µM BAPTA-AM (blau) für jeweils 10 Minuten im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO (schwarz), in sowohl Kontroll- als auch SWS1-Depletionszellen. (A) Zellgröße. (B-D) Normalisierte Zellintensität. Die Fluoreszenzintensität der gesamten Zelle wurde mit der Zellgröße normalisiert, um einen vergleichbaren Wert pro µm² Zellfläche zu erhalten. Diese Werte wurden auf die Kontrollzelle mit DMSO-Zugabe normalisiert. Gezeigt sind die Werte für F-Aktin (B), pMLC (C) und Vinculin (D). Mittelwert mit SEM von mind. 24 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten pro Bedingung.

Hier konnte beobachtet werden, dass die Zellgröße durch eine Erhöhung der Calcium-Konzentration reduziert wurde, wobei dieser Effekt mit steigender Calcium-Konzentration korrelierte. So war eine starke und signifikante Reduktion bei der Zugabe von 2 μM Ionomycin zu beobachten. Die Zugabe der gleichen Konzentration von Ionomycin auf SWS1-depletierte Zellen reduzierte auch hier die Zellfläche, allerdings war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt und lag auch nicht statistisch signifikant vor. Zusätzlich konnte die leichte Verringerung der Zellfläche unter Kontrollbedingungen durch 0,5 μM Ionomycin nicht in den SWS1-depletierten Zellen beobachtet werden. Im Vergleich zur DMSO-Zugabe zeigten Zellen nach Ionomycin-Zugabe zusätzlich eine stark erhöhte zelluläre Fluoreszenzintensität von pMLC, wobei die Stärke des Effektes mit steigender Konzentration des Ionomycins korrelierte. Im Gegenzug dazu zeigten BAPTA-AM-behandelte Zellen eine signifikant verringerte Fluoreszenzintensität von pMLC an. Diese Unterschiede wurden durch die SWS1-Depletion nahezu vollständig aufgehoben. So zeigte zwar die hohe Ionomycin-Konzentration noch eine leichte Erhöhung, sowie die BAPTA-AM-Behandlung eine Verringerung der pMLC-Intensitäten an, jedoch war die Stärke dieser Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert. Zusätzlich war der erhöhende Effekt der geringen Ionomycin-Konzentration (0,5 μM) nach der SWS1-Depletion nicht mehr zu beobachten.

Bei den zellulären Intensitäten von sowohl F-Aktin als auch Vinculin zeigte sich, dass diese durch die geringe Ionomycin-Konzentration signifikant erhöht vorlagen. Im Gegensatz den den pMLC-Leveln wurde dieser Effekt durch eine Konzentrationssteigerung jedoch nicht weiter erhöht, sondern führte zu einer Reduktion auf (Vinculin), oder sogar unter (F-Aktin) das DMSO-Kontrollniveau. Eine Reduktion der Calcium-Konzentration durch BAPTA-AM zeigte auf beide Proteinlevel keinen Unterschied. Auch bei diesen Proteinen konnte beobachtet werden, dass eine SWS1-Depletion die beobachteten Intensitätsunterschiede der Kontrollzellen nahezu vollständig aufhob. In allen Parametern konnte durch den Vergleich der beiden DMSO-Bedingungen zudem gezeigt werden, dass allein durch die Depletion des SWS1 kein signifikanter Einfluss auf die zellulären Proteinsignale genommen wurde.

Während die Stärke der pMLC-Signale in der gesamten Zellfläche mit der intrazellulären Calcium-Konzentration zu korrelieren schien, konnte in einer weiteren Analyse beobachtet werden, dass diese aktive Form des Myosin IIA überwiegend nicht mit Podosomen lokalisierte. Dies wurde durch die Akkumulations-Ratio der Podosomen-bedeckten Fläche gezeigt, die in nahezu allen Bedingungen mit weniger als 100% vorlag. Im Vergleich dazu zeigten sowohl F-Aktin als auch Vinculin eine starke Akkumulation an der Podosomen-bedeckten Fläche. Bei allen drei Proteinen wurde die Akkumulationsrate jedoch durch keine Kondition signifikant verändert. Da pMLC nicht an Podosomen akkumulierte, wurde das mittlere Podosomenprofil nur von F-Aktin und Vinculin erstellt.

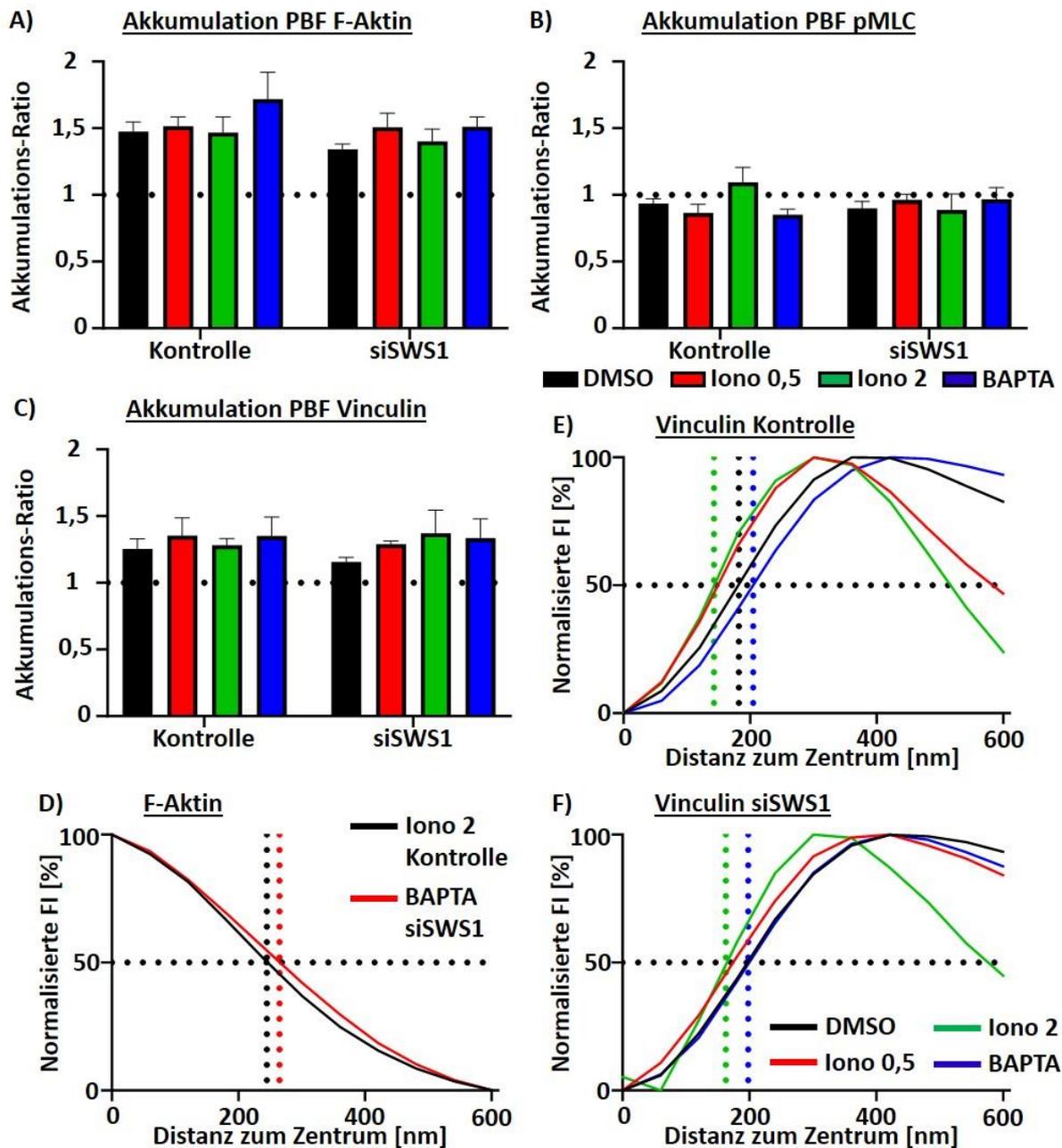


Abbildung 32: Untersuchung der Myosin-Aktivität (podosomal). Gezeigt sind die Ergebnisse nach Zugabe von 0,5 (rot), bzw. 2 μ M Ionomycin (grün), und 10 μ M BAPTA-AM (blau) für jeweils 10 Minuten im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO (schwarz) in sowohl Kontroll- als auch SWS1-Depletionszellen. (A-C) Akkumulationsratio in der Podosomen-bedeckten Fläche von F-Aktin (A), pMLC (B) und Vinculin (C). (D) Mittleres, normalisiertes Podosomenprofil von F-Aktin in den beiden Bedingungen des maximalen Größenunterschieds, Ionomycin 2 μ M aus Kontrollzellen (schwarz) und BAPTA 10 μ M aus SWS1-Depletionszellen (rot). (E-F) Mittleres, normalisiertes Podosomenprofil von Vinculin nach den 4 oben genannten Konditionen sowohl in Kontroll- (E) als auch Depletionszellen (F). Markiert ist die biologische Größe bei halbmaximaler Intensität (D-F). Mittelwerte mit SEM von 3-5 Zellen pro Bedingung aus 3 unabhängigen Experimenten.

Hierbei zeigte sich, dass die Calciumerhöhung einen starken Effekt auf den Vinculin-Ring zeigte. So wies der Vinculinring ohne Veränderung der Calciumkonzentration in den Kontrollzellen eine durchschnittliche Größe von 362 nm auf, die durch die Zugabe von Ionomycin auf bis zu 286 nm reduziert und durch

BAPTA-AM auf 410 nm erhöht wurde. Die Stärke dieser Größenveränderung wurde jedoch durch die SWS1-Depletion verringert. Während hier der Ring eine Größe von 394 nm aufwies, wurde er durch die Zugabe von Ionomycin nur auf 326 nm reduziert, während durch die Zugabe von BAPTA-AM kein Größenzuwachs mehr beobachtet werden konnte. Die Größe des Aktinkerns zeigte dabei bei allen acht Konditionen nur eine geringe Veränderung. Die maximale Größe lag hier nach der BAPTA-Zugabe auf SWS1-Depletionszellen mit 530 nm vor, während die minimale Größe in Kontrollzellen bei 2 μ M Ionomycin mit einer Größe von 490 nm erreicht wurde.

4.2.2.5 Zusammenfassung Funktion

Der Einfluss von SWS1 auf humane Makrophagen wurde nach der Veränderung der intrazellulären SWS1-Konzentration durch Überexpressions- und Depletions-Experimente in mehreren Experimenten untersucht. So zeigte sich ein Einfluss auf die Lebenszeit von Podosomen, welche durch die Überexpression des Δ LC-Konstrukts im Mittel erhöht, durch eine Depletion jedoch verringert wurde. Interessanterweise war das Δ LC- im Vergleich zum Volllängenkonstrukt nicht in der Lage die Lebenszeitverringerung durch die SWS1-Depletion wieder auszugleichen. Diese Depletion änderte bei gleichbleibender Aktindynamik zudem die Aktinorganisation von Podosomenkernen, da es die immobile Fraktion im Kern deutlich verringerte. Gleichzeitig wurde durch eine Depletion die Rate der protrudierenden Podosomen in einer Zelle reduziert. Während die Tiefe der Protrusion in den extrazellulären Bereich dadurch nur schwach verringert wurde, führte eine SWS1-Depletion zu einer starken Reduktion der lateralen Indentationsfläche. Die Aktivierung von Myosin IIA durch die Phosphorylierung seiner leichten Kette wurde durch erhöhte Calcium-Konzentrationen verstärkt, sowie durch deren Reduktion verringert. Die SWS1-Depletion selbst zeigte keinen Einfluss auf die Myosin IIA-Aktivierung, jedoch reduzierte sie den Calcium-sensitiven Effekt. Zusätzlich wurde eine Änderung der Podosomenstruktur beobachtet, da sich die Größe des Podosomenrings bei erhöhten Calcium-Konzentrationen verkleinerte und bei niedrigen Konzentrationen vergrößerte. Auch hier reduzierte eine SWS1-Depletion die Stärke des beobachteten Effektes, während die Depletion selbst nur einen geringen Einfluss auf die Ringgröße hatte. Es kann daher vermutet werden, dass SWS1 die Organisation der Aktinfilamente, nicht jedoch deren Polymerisationsrate beeinflusst und damit einen regulierenden Effekt auf die Kraftgeneration des Podosomen-Kerns aufweist.

4.2.3 Identifikation von Interaktionspartnern

Für SWS1 wurden bereits eine Funktion in verschiedenen Signalwegen (Avramidou et al., 2007), sowie ein Einfluss auf die Aktinregulation beschrieben (Huh et al., 2013). Bisher sind jedoch nur wenige Proteine bekannt, die direkt mit SWS1 interagieren. Zusätzlich wurde SWS1 vor dieser Doktorarbeit noch nie im Kontext von Podosomen beschrieben. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wiesen allerdings stark auf eine Assoziation von SWS1 mit der Aktinorganisation, sowie mit der Kraftgeneration von Podosomen hin. Unklar ist hierbei jedoch, über welche Interaktion diese Funktion vermittelt wird. Daher wurde versucht, potentielle Interaktionspartner zu identifizieren.

Hierfür wurde zunächst die Methode der Immunopräzipitationen (IP) verwendet. Bei diesem Experiment wurden die Zellen lysiert, die erhaltene Proteinsuspension aufgereinigt und das Eluat von SWS1 mit seinen gebundenen Interaktionspartnern in der Massenspektrometrie charakterisiert. Die erhaltenen Ergebnisse wurden nach der Anzahl detektierter Proteine, sowie der Ratio zwischen SWS1-Eluat und einer Negativkontrolle sortiert und auf bekannte Podosomen- und Aktin-interagierende Proteinen untersucht.

In der ersten Iteration dieser Versuchsreihe wurde die IP mit endogen exprimiertem SWS1 durchgeführt. In diesem Versuch konnte mit Arp-2/3 ein Aktinnukleator, sowie mit Myosin-1e ein Bestandteil der Plasmamembran-nahen Podosombasis identifiziert werden. Jedoch wiesen sowohl die Negativkontrolle, als auch die SWS1-Elution einen hohen Anteil an Aktin inklusive einiger Aktin-regulierender Proteine auf, was eine Trennung zwischen Hintergrundsignalen und SWS1-spezifischen Interaktionen nahezu unmöglich machte. Um die Aussagekraft dieses Versuchs zu verbessern, wurde er nach der Überexpression des GFP-gebundenen SWS1-Volllängenkonstrukts mit anschließender Immunopräzipitation wiederholt. Zusätzlich wurde die Salzkonzentration der Waschpuffer erhöht, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Auch nach diesen Optimierungsschritten wies die massenspektrometrische Charakterisierung eine hohe Rate an Aktin-Hintergrundsignalen auf. Es konnten mit Gelsolin, Filamin A und dem *Macrophage-capping Protein* (CapG) jedoch auch Aktin-interagierende Proteine identifiziert werden, die in der SWS1-Elution stark akkumuliert vorlagen.

Um die Aktin-Hintergrundsignale weiter zu minimieren, wurde in der letzten Iteration ein *Pulldown-Assay* nach Überexpression von SWS1 mit dem Biotinylierungsenzym miniTurbo durchgeführt. Dieses Enzym wurde verwendet, da es enzymatisch nahe gelegene Proteine in einem kleinen Radius von ca. 10 nm biotinylieren und damit die Analyse deutlich spezifizieren kann (Branon et al., 2018). Hierfür wurde nach der vierstündigen Überexpression des Konstrukts 50 μ M Biotin zu den Zellen gegeben, um die Biotinylierungsreaktion zu starten. Im Anschluss wurden die biotinylierten Proteine aufgereinigt und massenspektrometrisch charakterisiert. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 18 gezeigt.

Tabelle 18: Übersicht der potentiellen SWS1-Interaktionspartner. Aufgelistet sind ausgewählte Treffer der massenspektrometrischen Charakterisierung nach miniTurbo-vermittelter Biotinylierung inklusive bereits bekannten Funktionen und Podosomenlokalisationen.

Protein	Funktion	Lokalisation
Filamin-A/B	Aktinbündelung	unbekannt
α-Actinin	Aktinbündelung/-Quervernetzung	Kappe
Hematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS-1)	Aktinbindung/-Nucleation	Kappe
Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP)	Aktinfilament-Elongation	unbekannt
F-actin-capping protein (CapZ)	Aktinfilament-(un-)capping	unbekannt
Macrophage-capping protein (CapG)	Aktinfilament-(un-)capping	unbekannt
Twinfilin	Aktinfilament-(un-)capping	unbekannt
Vinculin	Mechanosensitives Plaqueprotein	Ring
Zyxin	Mechanosensitives Plaqueprotein	Kappe
Myosin-1e	Aktin-Plasmamembran-Linker	Basis
Myosin-1f	Aktin-Plasmamembran-Linker	Basis

Die potentiellen Interaktionspartner von SWS1 konnten aufgrund ihrer Funktion und Lokalisation in vier Kategorien unterteilt werden. So interagiert SWS1 mutmaßlich mit Proteinen der Aktinorganisation, wie α -Actinin und den Filaminen A und B, die als Quervernetzer und Bündler ähnliche Funktionen wie das SWS1 aufwiesen. Die zweite Gruppe bestand aus Regulatoren der Aktinpolymerisation, darunter VASP und HS-1. Ebenfalls Einfluss auf die Polymerisationsrate nehmen Capping-Proteine, welche die Menge an freien (+)-Enden der Filamente regulieren, von denen unter anderem Twinfillin, CapZ und CapG detektiert wurden. Die dritte Gruppe umfasste mechanosensitive Proteine wie Vinculin und Zyxin. Zusätzlich wurden als letzte Gruppe die unkonventionellen Myosine-1e und -1f detektiert, welche an der Podosomen-Basis lokalisieren und eine Verbindung zwischen dem Aktinnetzwerk und der Plasmamembran herstellen. Unter anderem wurden mit Filamin A, Myosin-1e und CapG auch Proteine identifiziert, die bereits in vorherigen IP-Iterationen charakterisiert wurden. Während die Lokalisation einiger dieser potentiellen Interaktionspartner zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch unbekannt sind, wurden neben Ring- und basalen Protein vor allem Kappenproteine identifiziert.

4.3 Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwei Teilbereiche bearbeitet. Zuerst wurde mit dem Auswertungsalgorithmus Poji (Podosome analysis by Fiji) eine Methode entwickelt und verifiziert, die die automatische Analyse von Zellen und Podosomen ermöglichte. Der Poji-Algorithmus wurde bereits veröffentlicht und seitdem um mehrere Funktionen und Kompatibilitäten erweitert. Der Algorithmus wurde im Anschluss verwendet, um Lokalisation und Funktion von SWS1 zu untersuchen.

Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei SWS1 um einen Bestandteil des Podosomenkerns handelt, dessen Lokalisation sich jedoch nicht bis in die äußerste Peripherie des Podosoms erstreckt. Diese Lokalisation war größtenteils sowohl von den Veränderungen der Calcium-, als auch der SWS1-Konzentration unabhängig, einzig durch die Überexpression von Volllängen- und Δ LC-Konstrukten wurde eine Assoziation mit der Podosomen-Peripherie beobachtet. In keiner dieser Konditionen nahm SWS1 dabei einen erkennbaren Einfluss auf Zellgröße oder Podosomenanzahl. Die Überprüfung, ob SWS1 weitere podosomale Parameter beeinflussen konnte zeigte, dass Podosomenzahl und Zellgröße zu meist unverändert vorlagen, jedoch ein Einfluss auf die Lebenszeit von Podosomen beobachtet wurde. So reduzierte eine SWS1-Depletion die durchschnittliche Lebenszeit, während eine Überexpression des Δ LC-, nicht jedoch des Volllängenkonstruktes die Lebenszeit erhöhte. Umgekehrt war das Volllängen-, aber nicht das Δ LC-Konstrukt in der Lage, die Reduktion der Lebenszeit durch SWS1-Depletion auszugleichen. Nach einer SWS1-Depletion wurde zudem die immobile Aktinfraktion des Podosomenkerns stark verringert. Während die Protrusionstiefe des Aktinkerns in den extrazellulären Bereich nur schwach reduziert wurde, zeigte die laterale Protrusionsfläche, sowie der Anteil protrusionsfähiger Podosomen eine starke Verringerung. Zusätzlich wurde durch die Depletion auch der Einfluss der Calcium-Konzentration sowohl auf die Aktivität des Kabelproteins Myosin IIA als auch auf die Regulation der Podosomenring-Größe vermindert. Durch eine Biotinylierung räumlich naher Proteine wurde gezeigt, dass SWS1 potentiell mit einer Reihe von Proteinen interagiert, die unter anderem für ihren Einfluss auf das Größenwachstum und die Organisation von Aktinfilamenten bekannt sind. Die genaue Regulation der beschriebenen Funktionen ist hierbei, ebenso wie die molekulare Wechselwirkung von SWS1 mit potentiellen Interaktionspartnern eine nicht abschließend geklärte wissenschaftliche Fragestellung für weiterführende Forschungsarbeiten.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Lokalisation und Funktion von Swiprosin-1 (SWS1) an Podosomen humaner Makrophagen untersucht. Der Großteil der Ergebnisse wurde dabei durch die Mikroskopie fixierter und lebender primärer Makrophagen erhalten. Während für die Aufnahme der *live-cell*-Mikroskopie unterschiedliche Analysemethoden verwendet wurden, fand die Analyse fixierter Zellen ausschließlich mithilfe von Poji, einem selbst entwickelten Auswertungsalgorithmus, statt.

5.1 Poji – Ein Ausgangspunkt für viele Verbesserungen

Poji wurde bereits mit wissenschaftlichen Anwendungsbeispielen publiziert (Herzog et al., 2020) und in einer erweiterten und verbesserten Form, inklusive einer ausführlichen Anleitung veröffentlicht (www.github.com/roherzog/poji). Die transparente und breite Anwendungsmöglichkeit des Algorithmus führte dazu, dass er bis zum Erstellen dieser Doktorarbeit bereits für mehrere Forschungsarbeiten verwendet (Gong et al., 2021; Urbano et al., 2022) und in mehreren Reviews (Linder und Cervero, 2020; Weber et al., 2022) hervorgehoben wurde. Trotz der positiven Rezeption der Methode durch die Forschungsgemeinschaft muss erwähnt werden, dass Poji im Zusammenhang mit bestimmten Anwendungen nach wie vor Einschränkungen aufweist. Auch die Verwendung der Methode in dieser Doktorarbeit hat gezeigt, dass es sich bei Poji zwar um ein starkes Werkzeug handelt, dieses jedoch noch weiter spezialisiert und verbessert werden kann.

5.1.1 Zelldetektion

In der bisherigen Version von Poji findet die Definition der Zelumrisse und der Podosomencluster durch den Nutzer statt. Dazu wird zunächst der entsprechende Fluoreszenzkanal und die korrekte optische Ebene ausgewählt, bevor die Umriss manuell definiert werden. Während die Einstellung von Kanal und Ebene unumgänglich vom Benutzer durchzuführen ist, könnte die manuelle Zelldetektion auch durch eine automatisierte Methode ersetzt werden. Während der Entwicklung von Poji wurde dafür die Verwendung der *Analyze-Particles*-Methode untersucht, welche bereits für einen publizierten Zelldetektionsalgorithmus verwendet wurde (Cervero et al., 2013). Die große Stärke dieser Methode besteht darin, dass sie eine große Anzahl klar voneinander getrennter Zellen gleichzeitig detektieren kann, was den Zeitaufwand gegenüber der manuellen Methode deutlich reduziert. Während der Entwicklung von Poji stellte sich jedoch bei Bildern mit einer hohen Dichte von nah aneinander-

grenzenden Zellen heraus, dass die *Analyze-Particles*-Methode die gleichen Nachteile wie bei der Verwendung in der Podosomendetektion aufwies (siehe Kapitel 4.1.1.1). So benötigte jedes untersuchte Bild auch hier eine individuelle Kombination der verschiedenen Bearbeitungsmethoden und selbst nach deren zeitaufwändiger Ermittlung konnten viele Zellen nicht optimal voneinander getrennt detektiert werden. Zudem wurden diese Übergangsbilder im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit nur selten verwendet, da der Hauptteil der Daten aus Detailaufnahme einzelner Zellen erhalten wurde. Da die manuelle Definition einzelner Umrisse keinen großen zeitlichen Aufwand darstellte, wurde die manuelle Bestimmung in der aktuellen Version von Poji als die Standardmethode zur Zelldetektion verwendet.

Die Implementierung alternativer Detektionsmethoden in den Algorithmus ist jedoch möglich. Die effektivste Lösung hierfür wäre es, eine Auswahl der beiden Detektionsmethoden zur Verfügung zu stellen und dem Nutzer die Wahl über die beste Eignung für die vorliegenden Daten zu überlassen. So könnten Detailaufnahmen einzelner Zellen nach wie vor manuell definiert werden, während eine automatische Zelldetektion bei Übersichtsbildern ermöglicht werden würde. Als dritte Möglichkeit kann zusätzlich die Funktion eingeführt werden, bereits bestehende Zellkoordinaten zu laden und den Schritt der Detektion zu überspringen. So kann der Anwender die Zellen bereits vor Nutzung des Algorithmus mit der Methode seiner Wahl definieren und in Poji nur noch auf den Speicherort dieser Definitionen verweisen. Die Addition weiterer Alternativen der Zelldetektion in den Algorithmus sollte dabei immer mit der zusätzlichen Option verbunden sein, den Nutzer selbst die präferierte Detektionsmethode auswählen zu lassen.

5.1.2 Podosomendetektion und Profilerstellung

Wie bereits beschrieben, wurde für die Podosomendetektion nicht die *Analyze Particles*-Funktion verwendet, da diese bei gleichzeitig schwierigerer Bedienung einen schlechteren Detektionserfolg als die *Find Maxima*-Methode aufwies. Diese Methode bestimmt jedoch keine Podosomenflächen, sondern detektiert die Pixel mit höchster Fluoreszenzintensität innerhalb einer zusammenhängenden Struktur als Koordinaten des Podosomenzentrums. Die Umrisse von Podosomen werden im Anschluss durch das Erstellen einer zirkulären Fläche vordefinierter Größe um das Podosomenzentrum bestimmt. Diese Methode wurde ausgewählt, da Podosomenflächen gleicher Größe gestapelt und durch die *Z-projection* optisch gemittelt werden können, wodurch der Durchschnitt aller Podosomen pro Zelle analysiert wird. Dieser Durchschnitt erlaubt eine schnellere Profilanalyse der gesamten Podosomenpopulation anstatt einer individuellen Analyse jedes individuellen Podosom mit anschließender mathematischer Mittelung. Eine beispielhafte Überprüfung zeigte zudem, dass sowohl die optische als auch die mathematische Mittelung nahezu identische Ergebnisse aufwiesen.

Tabelle 19: Vergleich der optischen und der mathematischen Podosomenmittelung. Aufgetragen ist die Distanz zum Podosomenzentrum inklusive der korrespondierenden Intensitätswerte. Verglichen wurden die relativen Fluoreszenzintensitäten der Analyse von optisch gemittelten Podosomen mit der mathematischen Mittelung individueller Podosomprofile. Die Genauigkeit wurde als prozentualer Wert des Quotienten aus optische/mathematische Mittelung ermittelt.

Distanz zum Zentrum [μm]	Optische Mittelung [% Fluoreszenz-Int.]	Mathematische Mittelung [% Fluoreszenz-Int.]	Genauigkeit [%]
0	88.00	87.75	100.2
0,06	84.73	84.92	99.7
0,12	78.09	78.09	99.9
0,18	69.93	69.9	100
0,24	61.50	61.42	100.1
0,3	53.72	53.70	100
0,36	46.89	46.93	99.9
0,42	41.93	41.94	99.9
0,48	38.36	38.39	99.9
0,54	36.15	36.15	100
0,6	34.65	34.66	99.9

Die Darstellung der Podosomenarchitektur folgte dabei der bereits publizierten Methode, in der eine Profillinie durch das Podosomenzentrum gelegt und die Fluoreszenzintensität anhand dieser Linie gemessen wird (Proag et al., 2016). Hierdurch konnte nicht nur die Proteinakkumulation am Podosom, sondern auch die Größe des Podosoms analysiert werden, indem der Abstand des Wertes halbmaximaler Intensität gemessen wurde (van den Dries et al., 2019). Die Profilanalyse wurde dabei 360-mal wiederholt und die Profillinie für jede der Messungen um je ein Grad rotiert, um den gesamten Umriss des Podosoms abzubilden. Die jeweiligen Messwerte wurden im Anschluss gemittelt und das Podosomenprofil als zweidimensionaler Graph aufgetragen. Die entstehende Kurve besaß dabei immer einen symmetrischen Verlauf mit einer Spiegelachse durch das Podosomenzentrum, selbst wenn das zugrundeliegende Bild eine leichte Polarisierung aufwies. Dieses Artefakt entstand, da jeder Pixel des Bildausschnittes bei einer kompletten Umdrehung der Profillinie doppelt detektiert wurde. So analysierte das linke Ende der Profillinie nach einer halben Umdrehung den gleichen Pixel, den das rechte Ende als ersten Messwert detektiert hatte.

Für die Erhebung der Daten dieser Doktorarbeit wurde trotz des bekannten Artefakts die 360-Grad-Rotation der Profillinie verwendet, da hiermit mehrere Messartefakte verhindert und eine bessere

Vergleichbarkeit der Daten hergestellt werden konnten. So könnte eine halbe Umdrehung der Profillinie in einem polarisierten Podosomenprofil resultieren, bei der die Proteinakkumulation an einer Seite des Podosoms stärker als an der gegenüberliegenden Seite erscheinen würde. Während für Podosomen zwar beschrieben wurde, dass beispielsweise der Ring als nicht-durchgängige Clusterstruktur erscheinen kann (van den Dries et al., 2013b), wurde noch nie von einer signifikanten Polarisierung der Podosomenarchitektur, besonders nicht innerhalb einer gesamten Population, berichtet. Zudem würden sich die Ergebnisse über eine Polarisierung des gleichen Podosoms widersprechen, wenn beispielsweise der Objektträger in unterschiedlicher Orientierung im Mikroskop eingespannt oder die Profillinie im entgegengesetzten Uhrzeigersinn rotieren würde. Die Charakterisierung mehrerer Zellen könnte zudem dazu führen, dass Polarisierungen des Aktinkerns in zwei verschiedene Richtungen detektiert werden, welche durch eine Mittelung der Daten fälschlicherweise ein lokales Minimum im Podosomenzentrum aufweisen und damit als Ring- oder Kappenformation erscheinen könnten.

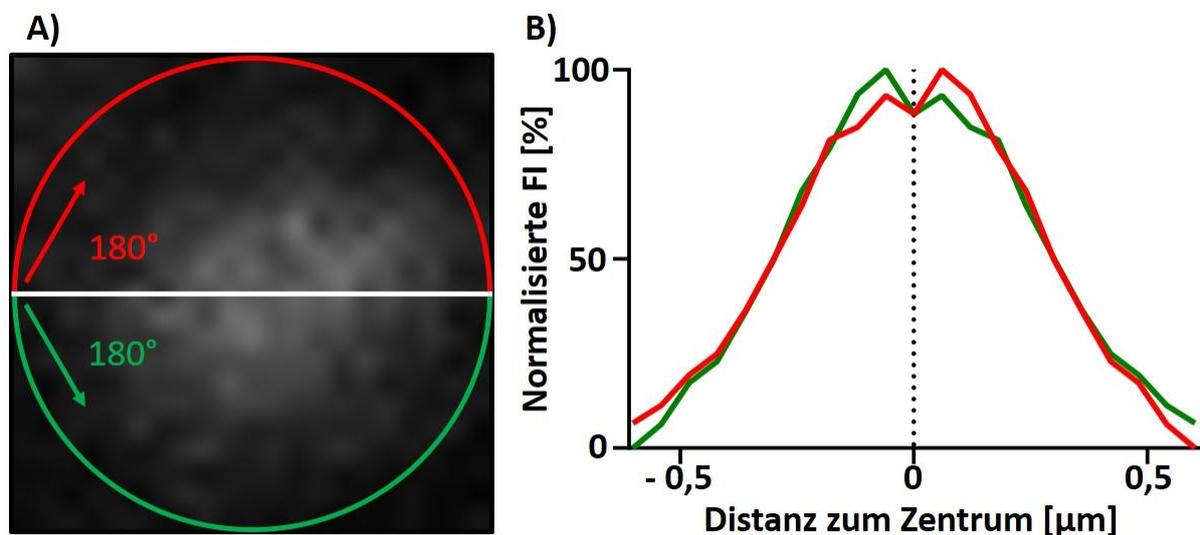


Abbildung 33: Polarisiertes Podosomenprofil durch halbe Rotation. (A) Einzelpodosom eines humanen Makrophagen, gefärbt auf F-Aktin. Markiert ist die Profillinie (weiß) an der die Profilitensität detektiert wird, sowie die jeweilige Richtung der Rotation um je 180°. (B) Korrespondierendes Podosomenprofil der Analysen nach der Rotation der Profillinie um 180° mit (rot) und gegen den Uhrzeigersinn (grün). Eine Mittelung der Profile würde fälschlicherweise ring-ähnlich erscheinen.

Poji ist unabhängig von der hier getroffenen Entscheidung für symmetrische Profile jedoch auch für die Detektion und Analyse von polarisierten Strukturen geeignet. Wie alle Parametereingaben ist auch die Wahl über Anzahl der Rotationsschritte und Rotation pro Messschritt dem Nutzer überlassen, was eine transparente und einfache Anpassung des Algorithmus an den individuellen Versuchsaufbau ermöglicht.

Obwohl die Verwendung der *Find Maxima*-Funktion sowie der optischen Mittelung individueller Podosomen eine schnelle und einfache Profilanalyse aller Podosomen einer Zelle ermöglichte, zeigten

sich hier mehrere Schwierigkeiten. Beispielsweise führte die *Find Maxima*-vermittelte Definition des Podosomenzentrums als Pixel mit höchster Fluoreszenzintensität zu einem Messartefakt. So konnten einzelne Pixel außerhalb des geometrischen Podosomenzentrums lokale Intensitätsmaxima aufweisen und die ermittelten Koordinaten entsprechend vom Zentrum der Struktur abweichen. Die später erzeugte Profillinie schnitt dementsprechend nicht mehr korrekt die Mitte des Podosoms und die Strukturzentren lokalisierten nicht mehr in der Mitte der im Anschluss generierten Podosomenflächen. Bei der Bildung des optischen Mittels aller Podosomen entstand dadurch ein Artefakt, bei dem durch die falsche Ausrichtung der einzelnen Strukturen der zentrale Pixel mit stark erhöhter, alle restlichen Pixel aber mit stark reduzierter Intensität gezeigt wurden.

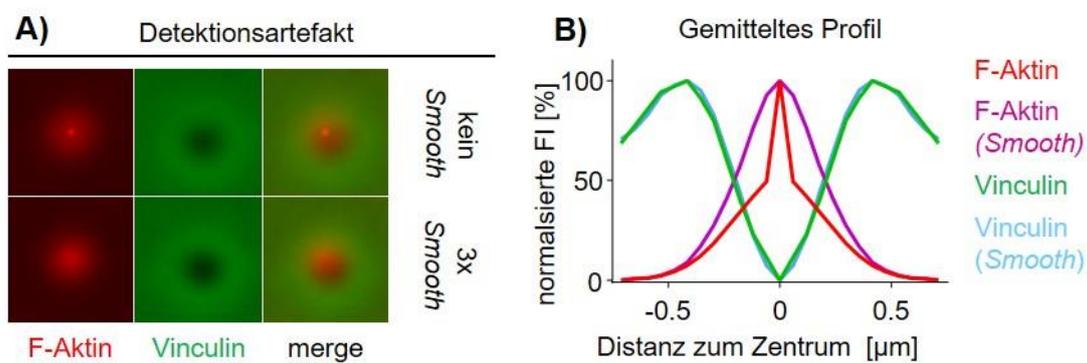


Abbildung 34: Detektionsartefakt bei der Erstellung des mittleren Podosomenprofils. (A) Mittleres normalisiertes Podosomen eines humanen Makrophagen nach Färbung auf F-Aktin (rot) und Vinculin (grün), sowohl vor als auch nach dreimaliger Weichzeichnung des Ursprungsbildes. (B) Korrespondierendes Podosomenprofil von F-Aktin und Vinculin des originalen sowie des weichgezeichneten Podosoms.

Um das geometrische Zentrum von Podosomen korrekt zu lokalisieren, wurden die analysierten Bilder vor der Podosomendetektion durch die Funktion *smooth* weichgezeichnet. Bei dieser Funktion wird der Intensitätswert jeden Pixels durch das Mittel des umliegenden 3x3-Pixel-Rasters ersetzt, wodurch lokale Maxima und Minima der Pixelintensitäten geglättet werden. Dies hatte zur Folge, dass nicht mehr einzelne Pixel außerhalb, sondern nur die Koordinaten in der geometrischen Mitte des Podosoms die höchste Intensität aufwiesen. Da durch die *smooth*-Funktion jedoch die absoluten Intensitätswerte des Bildes geändert wurden, war es wichtig zu beachten, dass sie nur der Podosomendetektion vorgeschaltet wurde. Die Intensitätsanalyse anhand der erhaltenen Koordinaten wurde im Gegensatz dazu wieder auf dem unbearbeiteten Bild durchgeführt.

Eine zweite Ungenauigkeit kam durch die Definition der Podosomenfläche als zirkuläre Region fester Größe um das Podosomenzentrum zustande. Zum einen weisen Podosomen in einer Zelle zwar annähernd eine zirkuläre Struktur auf, liegen jedoch nicht als perfekter Kreis vor. Zum anderen besitzen Podosomen unterschiedliche Größen, was durch eine feste Größe der Analyseflächen nur unzureichend abgebildet werden kann. Dabei sind Podosomen nicht nur in die beiden Subformen unterteilt,

in denen sie entweder als größere Vorläufer in der Zellperipherie oder als kleinere Nachfolger in der Zellmitte (Evans et al., 2003, Kopp et al., 2006) auftreten. Auch innerhalb der gleichen Subform unterscheiden sich die Größen von Podosomen voneinander, da unter anderem die Aktkerne über ihre Lebenszeit hinweg einer wellenartigen Größenveränderung durch Änderung der Polymerisationsrate unterliegen (Labernadie et al., 2014). Eine gleich große Podosomenfläche besaß damit nicht nur einen verzerrenden Einfluss auf die Bestimmung der Fluoreszenzprofile, sondern auch auf die generelle Intensitätsmessung.

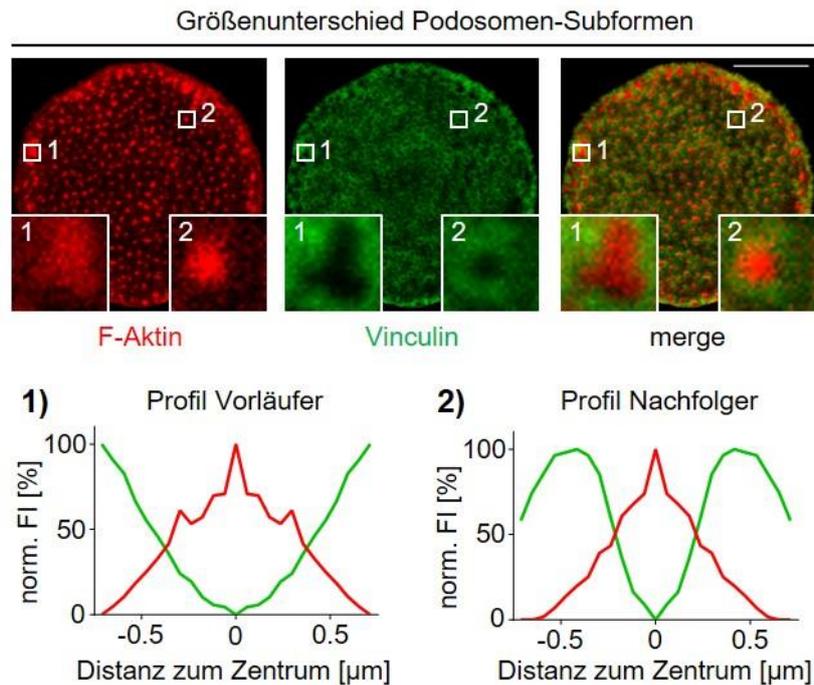


Abbildung 35: Unterschiedliche Podosomengrößen. Humaner Makrophage nach Färbung auf F-Aktin (rot) und Vinculin (grün) als Übersicht inklusive der vergrößerten Darstellung eines Vorläufer- (1) und eines Nachfolgerpodosoms (2). Korrespondierende Fluoreszenzprofile des isolierten Vorläufer- (1) und Nachfolgerpodosoms (2).

Zusätzlich führte die Definition einer generellen Podosomenfläche dazu, dass während der optischen Mittelung der Podosomen keine Unterscheidung zwischen den Subformen stattfand. Es wurde bereits gezeigt, dass spezifische Unterschiede in Proteinassoziationen zwischen Vorläufer- und Nachfolger-Podosomen (Bhuwania et al., 2014, Cervero et al., 2018) bestehen. Diese Unterschiede würden durch eine gemittelte Profilanalyse aller Podosomen nicht angezeigt werden können. Zusätzlich kann die Rekrutierung unterschiedlicher Assoziationsproteine an die individuellen Subformen auch zu veränderter Dynamik und Größe der Podosomen führen (Kopp et al. 2006, Bhuwania et al., 2012). So könnten beispielsweise Effekte, welche spezifisch an Vorläufer-Podosomen beobachtet werden, schlecht oder gar nicht sichtbar gemacht werden, wenn sie gleichzeitig mit den unveränderten Nachfolgern

gemittelt analysiert werden. Zudem ist eine Veränderung der Podosomengröße nur begrenzt nachzuvollziehen, da dieser Wert nicht nur durch die Strukturgröße individueller Podosomen, sondern auch durch die Mengenverhältnisse von größeren Vorläufer- zu kleineren Nachfolger-Podosomen innerhalb einer Zelle beeinflusst wird. Dass sich die Größen der beiden Podosomen-Subformen voneinander unterscheiden wurde bereits in Kapitel 4.2.1.1 gezeigt.

Es ist mit der aktuellen Version von Poji möglich diese Ungenauigkeiten zu einem großen Teil zu beheben. Zum einen gibt es die Möglichkeit, statt der gemittelten Ergebnisse sowohl die Intensitätsmessung als auch die Profilbestimmung an individuellen Podosomen vorzunehmen. Gerade die individuelle Bestimmung von Fluoreszenzprofilen stellt dabei jedoch einen sehr zeitintensiven Schritt dar. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde daher ein anderer Ansatz gewählt um die beiden Subformen unabhängig voneinander zu analysieren. Hierfür wurde die Bestimmung der Podosomencluster verwendet, die ursprünglich in Poji eingefügt wurde, um den Ausschluss von podosomenfreien Zellflächen zu ermöglichen. Die Zellen für die Bestimmung der SWS1-Lokalisation (siehe 3.2.2.1) wurden insgesamt dreimal analysiert. In einer ersten Iteration wurde kein Podosomencluster ausgewählt, so dass alle Podosomen kombiniert analysiert und anschließend gemittelt wurden. In der zweiten Iteration wurden die Cluster so definiert, dass nur die größeren Podosomen in der Zellperipherie analysiert wurden, bevor in der letzten Messung die kleineren Podosomen im Zellinneren charakterisiert wurden. Die jeweiligen Ergebnisse wurden aufgetragen und miteinander verglichen, um so eine Aussage über spezifische Lokalisationsunterschiede von SWS1 an den Podosomen-Subformen zu treffen. Zudem wurde hierdurch gezeigt, dass die Trennung verschiedener Podosomen-Subformen durch eine Clusterauswahl eine einfache Methode zur Erhöhung der Aussagekraft von Poji darstellt. Um eine einfachere Handhabung zu gewährleisten, könnte der Algorithmus für diesen Schritt in Zukunft geändert werden, damit eine mehrfache Messung der gleichen Daten verhindert werden kann. So könnte die Option eingeführt werden, dass einzeln ausgewählte Cluster nicht zu einer gesamten podosomalen Fläche addiert, sondern von Poji individuell analysiert werden, womit eine selektive Analyse der Subformen ermöglicht wird.

Eine deutlich aufwändigere Möglichkeit wäre es, in einem mehrstufigen Detektionsverfahren sowohl die *Find Maxima*- als auch die *Analyze-Particles*-Funktion miteinander zu verbinden. So könnte im ersten Schritt die Detektion der Podosomen unverändert durch *Find Maxima* mit anschließender Generation der Flächen vordefinierter Größe um die Podosomenzentren stattfinden. Im zweiten Schritt würde dann die *Analyze-Particles*-Funktion ausschließlich innerhalb dieser Flächen durchgeführt werden, um die tatsächlichen Umrisse der Podosomen zu definieren und deren Intensität zu messen. In einem dritten Schritt würde die Länge der Profillinie auf die ermittelte Podosomengröße angepasst und das Fluoreszenzprofil detektiert. Diese gestaffelte Methode würde dabei mehrere Vorteile aufweisen. Zum einen würde die unzureichende Spezifität und Sensitivität der *Analyze-Particles*-Funktion

durch die vorgeschaltete *Find Maxima*-Methode ausgeglichen, zum anderen würden die tatsächlichen Podosomenurisse eine deutlich genauere Aussage über Fluoreszenzintensität und Podosomengröße zulassen. Vor allem die Podosomengröße wurde bisher über das Fluoreszenzprofil definiert, indem der Abstand der halbmaximalen Intensität vermessen wurde (van den Dries et al., 2019), eine Methode, die stark vom Auflösungsmaximum des zugehörigen Mikroskops abhängig ist. Eine automatische Anpassung der Profillinie an die Größe der detektierten Fläche würde zudem dazu beitragen, dass die Podosomenprofile nur aus der optischen Mittelung von Podosomen gleicher Größe erstellt werden, was spezifische Unterschiede der Subformen deutlicher darstellen könnte.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Podosomendetektion der aktuellen Poji-Version eine robuste und schnelle Analysemethode ist, die für eine standardisierte Anwendung an Podosomen geeignet ist. Im Rahmen dieser Doktorarbeit ist jedoch deutlich geworden, dass bestimmte podosomale Effekte von der jeweiligen Subform abhängig sein können und dass Poji für deren Unterscheidung noch stärker spezialisiert werden muss. Während einige Subformen-spezifische Ergebnisse auch mit der jetzigen Version von Poji erhalten werden konnten, würde eine Überarbeitung des Detektionsprozesses für eine deutliche Verbesserung der Anwendbarkeit sorgen. Da es sich dabei jedoch um einen großen Eingriff in einen essentiellen Schritt des Algorithmus handelt, muss die Einführung dieser Optionen von ausführlichen Validierungsschritten begleitet werden. Wie bei den vorgeschlagenen Änderungen an der Methode der Zelldefinition wäre es auch nach der Implementierung des neuen Detektionsschritts für Podosomen möglich, dem Nutzer durch ein Optionsfenster schlussendlich die Wahl der zu verwendenden Methode zu überlassen.

5.1.3 Kompatibilität mit *live-cell*-Mikroskopie

Die bereits beschriebene Podosomendetektion ist mit dreidimensionalen Stapelaufnahmen fixierter Zellen kompatibel, da sich die lateralen Koordinaten der Podosomen über die verschiedenen optischen Ebenen nicht ändern. Dies ermöglicht es, die Podosomendetektion auf einer fokalen Ebene durchzuführen und die Koordinaten für den gesamten Bilderstapel verwenden zu können, ohne dass Podosomen auf jeder Ebene individuell detektiert werden müssen. Diese Vorgehensweise des Algorithmus erleichtert zwar die Analyse fixierter Zellen, macht jedoch die Kompatibilität mit Aufnahmen lebender Zellen unmöglich. Die Videos werden in FIJI zwar ebenfalls als Bilderstapel dargestellt, hier entsprechen die einzelnen Bilder jedoch nicht unterschiedlichen optischen Ebenen, sondern zeigen die Zelle zum jeweiligen Zeitpunkt der Aufnahme (in dieser Doktorarbeit entsprach das einem Bild pro 20 Sekunden). Da sowohl die Zelle als Ganzes, als auch die Podosomen innerhalb der Zellfläche mit der Zeit migrieren, ändern sich zwischen den Einzelbildern die Koordinaten der jeweiligen Podosomenzentren.

Würde Poji demnach wie bei dreidimensionalen Stapelaufnahmen nur einmal die Koordinaten definieren, würden die Podosomen mit der Zeit aus den annotierten Flächen herausmigrieren. Zwar könnte dies durch den zeitaufwändigen Prozess umgangen werden, die Podosomen jedes Einzelbildes einzeln zu definieren, doch selbst dann wäre es unmöglich sie über die Zeit zu verfolgen, da alle detektierten Podosomen pro Einzelbild als individuelle Signale und nicht als eine über die Zeit bestehende Struktur erkannt werden würden.

Tracking-Algorithmen könnten dieses Problem beheben. Bei ihnen handelt es sich um Datenverarbeitungen, die Strukturen auf allen Einzelbildern detektieren und ihre Bewegung zwischen individuellen Zeitpunkten interpolieren. Signale, die auf aneinanderhängenden Einzelbildern in räumlicher Nähe zueinander stehen, werden dann zu einer über die Zeit bestehenden Struktur verbunden. Die prominenteste Tracking-Funktion in FIJI ist das Plugin TrackMate (Tinevez et al., 2017), welches bereits für die Analyse von *live-cell*-Mikroskopie-Aufnahmen im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurde. Durch dieses Plug-In können die einzelnen Koordinaten der Podosomen über die Zeit identifiziert und in einer Liste ausgegeben werden. Diese Liste könnte anschließend in Poji geladen werden, indem die zusätzliche Option eingeführt würde, statt einer eigenen Podosomendetektion das Öffnen bereits ermittelter Podosomenkoordinaten zu ermöglichen. Diese Option in Poji zu implementieren, würde die Kompatibilität mit Videos ermöglichen, ohne dass ein eigener Tracking-Algorithmus in die Auswertungsmethode implementiert werden müsste. Die Möglichkeit zur Videobearbeitung würde dazu beitragen, die Anwendbarkeit von Poji auf weitere essentielle Versuchsanordnungen der Podosomenforschung erweitern.

5.2 SWS1

Swiprosin-1 (SWS1) ist ein aktinbindendes Protein, das aus 240 Aminosäureresten besteht und in 5 verschiedene Regionen unterteilt werden kann. Die Wirkungsweise von SWS1 ist stark reguliert und kann durch das Bündeln (Kwon et al., 2013) und die Quervernetzung (Lehne et al., 2022) Einfluss auf die Organisation von Aktinfilamenten nehmen. Reguliert wird diese Funktion sowohl von der Calciumbindung (Park et al., 2016), wie auch von der korrekten Orientierung der SWS1-Homodimere (Kwon et al., 2013), was jeweils durch unterschiedliche Phosphorylierungskaskaden reguliert werden kann (Vazquez-Rosa et al., 2014; Park et al., 2017). Während die Assoziation von SWS1 mit unterschiedlichen zellulären Strukturen und Signalwegen bereits bekannt ist und es als Teil des Podosomen-Proteoms identifiziert wurde (Cervero et al., 2012), wurden bisher weder Lokalisation und Funktion noch potentielle Interaktionspartner im Kontext von Podosomen beschrieben.

5.2.1 Lokalisation am Podosom

Die Lokalisation von Proteinen wird im podosomalen Kontext meist entweder der Kern-, Ring- oder Kappenstruktur zugeordnet (Wiesner et al., 2014). Kernproteine weisen dabei sowohl in der lateralen als auch der vertikalen Ebene ein Intensitätsmaximum im Zentrum des Podosoms auf (Linder et al., 1999). Ringproteine lokalisieren im Vergleich dazu am unteren Ende der Struktur und besitzen zwei Intensitätsmaxima in der Peripherie des Podosoms (Zambonin-Zallone et al., 1989). Im Strukturzentrum besitzen sie hingegen ein lokales Intensitätsminimum. Kappenproteine zeigen meist eine zweiteilige Struktur, die ihre höchste Intensität im oberen Bereich der Podosomenstruktur aufweist (Bhuvania et al., 2012). Während sie in den obersten optischen Ebenen direkt über dem Aktinkern lokalisieren, lagern sie sich am unteren Ende der Kappenstruktur außen an den Kern an. Eine sequenzielle Profilanalyse der Kappenproteine zeigt daher in basaler Richtung eine ringähnliche Formation an, die sich in oberen Ebenen zu einer kernähnlichen Struktur schließt (Cervero et al., 2018). Die ringähnliche Struktur der Kappe reicht dabei jedoch nur selten bis auf den eigentlichen Podosomenring herab, was durch einen Vergleich der Intensitätsmaxima dieser Strukturen beschrieben werden kann. Zur Unterscheidung der unterschiedlichen Substrukturen kann eine dreidimensionale Analyse von Podosomenprofilen verwendet werden.

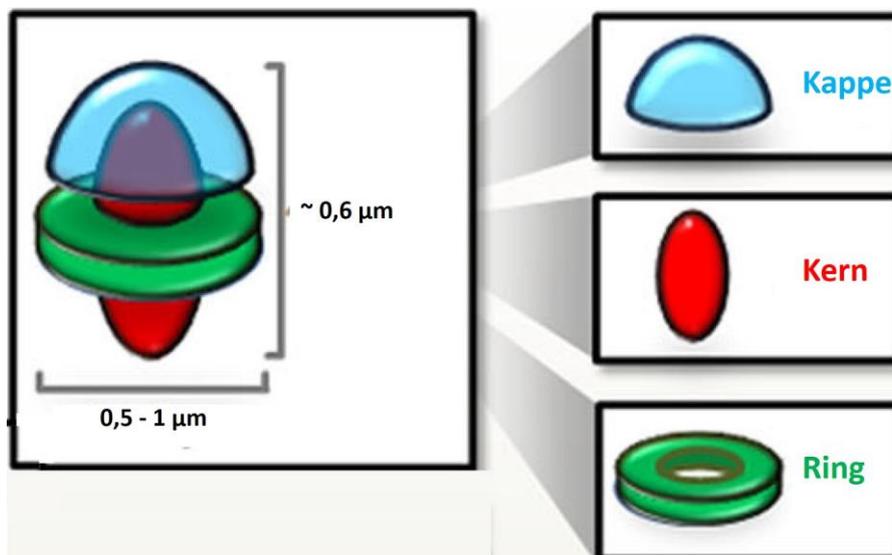


Abbildung 36: Überblick über das Podosomenmodell in vereinfachter Form. Gezeigt sind die drei Strukturen der Kappe, des Kerns und des Rings. Während der Kern durch alle optische Ebenen die lokalen Maxima in der Strukturmitte aufweist, legen diese beim Ring jeweils in der Peripherie, während die Strukturmitte ein lokales Minimum zeigt. Die Kappe weist in den unteren Ebenen eine ringähnliche Formation auf, die sich in den oberen Ebenen zu einer kernförmigen Struktur schließt. Modifiziert nach Linder und Wiesner, 2015.

Die Profilanalyse zur Strukturaufklärung ist eine essentielle Funktion von Poji und wurde verwendet, um die Lokalisation von SWS1 an Podosomen humaner Makrophagen zu zeigen. Dazu wurde zunächst

endogenes SWS1 mit Hilfe spezifischer Antikörper angefärbt. Die anschließende Mikroskopie und Analyse zeigte, dass SWS1 sowohl an Vorläufer- als auch an Nachfolgerpodosomen jeweils im Zentrum der Struktur lokalisierte und diese Lokalisation über alle vertikalen Ebenen beibehielt. Im direkten Vergleich zum Aktin-interkalierenden Phalloidin zeigte sich zudem, dass sich das SWS1 nicht bis in die Peripherie der Aktinstruktur ausbreitete, sondern im lateralen Zentrum des Podosoms konzentriert war. Keine Unterschiede waren hingegen in der Höhe der Struktur zu beobachten. All diese Eigenschaften sprachen für eine Kernlokalisierung von SWS1.

Eine Kernlokalisierung von SWS1 war durch den Kontext seiner aktinbindenden Fähigkeit (Rameh et al., 2009) durchaus zu erwarten gewesen, die unterschiedliche Lokalisation mit dem Phalloidin stellt jedoch ein interessantes Ergebnis dar. Fluorophor-gekoppeltes Phalloidin interkaliert zwischen die Untereinheiten eines Aktin-Filaments (Adams et al., 1991) und kann dadurch sowohl das verzweigte Netzwerk des Aktinkerns im Podosomenzentrum als auch die parallelen Bündel der Kabel in der Peripherie anfärben. Das SWS1-Signal hingegen war eher im Podosomenzentrum konzentriert und reichte weniger weit in die Podosomenperipherie als das Phalloidin-Signal. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass SWS1 unter endogenen Bedingungen keine Interaktion mit den lateralen Kabeln eingeht und vorwiegend an das Netzwerk des Kerns bindet. Der innere Kern von Podosomen weist neben einem erhöhten Grad von verzweigten Filamenten auch einen höheren Grad der Quervernetzung auf (Linder und Cervero, 2020). Tatsächlich wurde für SWS1 bereits eine Funktion in der Quervernetzung von Aktin-Filamenten beschrieben (Lehne et al., 2022). Gleichzeitig wurde gezeigt, dass SWS1 in hohen Proteinkonzentrationen und abhängig von der Calcium-Bindung ebenfalls zum Bündeln von Aktinfilamenten fähig ist (Park et al., 2016). Im Bezug auf diese Funktion wurde jedoch ebenfalls berichtet, dass diese erforderlichen Calcium- und SWS1-Konzentrationen unter endogenen Bedingungen mutmaßlich nicht vorliegen (Lehne et al., 2022) und nur durch Überexpressionen zu erreichen sind. Dieser Bericht könnte erklären, warum das SWS1 trotz berichteter Bündelfunktion nicht mit den gebündelten Podosomenkabeln zu interagieren scheint.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in unabhängigen Experimenten sowohl die Calcium- als auch die SWS1-Konzentration verändert. In einem ersten Experiment wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration durch Ionomycin erhöht bzw. durch BAPTA-AM verringert und der Einfluss auf die SWS1-Lokalisation am Podosom untersucht. In der anschließenden Profilanalyse wurde dabei ersichtlich, dass weder durch eine Verringerung noch durch die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration ein Einfluss auf die Kernlokalisierung von SWS1 genommen wurde. Darüber hinaus wiesen die BAPTA-AM-behandelten Zellen eine vergleichbare Morphologie zu den Kontrollzellen auf. Lediglich die Ionomycin-Zellen zeigten eine stark reduzierte Podosomenanzahl, wobei dieser Effekt nur bei einer

hohen Konzentration der Chemikalie zu beobachten war. Die verbleibenden Podosomen besaßen jedoch, bis auf eine systemische Reduktion der Podosomengröße, nach wie vor eine größtenteils unveränderte Lokalisation sowohl von SWS1 als auch von F-Aktin.

Durch eine Überexpression GFP-gebundener SWS1-Konstrukte konnte im Gegensatz dazu tatsächlich eine SWS1-Lokalisation in der Podosomen-Peripherie beobachtet werden. Während der F-Aktin-Kern durch die Überexpression leicht vergrößert vorlag, wies die Lokalisationsfläche der SWS1-Konstrukte einen stärkeren Größenzuwachs auf und wurden nach der Überexpression des Δ LC-Konstrukts auf der gleichen Fläche wie das Phalloidin-Signal beobachtet. Bei der Verwendung des Volllängenkonstrukts war diese sogar leicht über die Fläche des F-Aktins hinaus erhöht. Dies konnte ein Hinweis sein, dass SWS1 in erhöhten Konzentrationen tatsächlich zusätzlich zur Kernstruktur auch an den lateralen Kabeln lokalisieren konnte. Interessanterweise reduzierte sich bei beiden Konstrukten die podosomen-spezifische Akkumulationsratio, während sie für F-Aktin bei der Überexpression erhöht war. Die erhöhte Akkumulation von F-Aktin konnte ein Hinweis darauf sein, dass eine höhere SWS1-Konzentration zu einer verstärkten Bildung von Aktinfilamenten führte, wodurch größere Podosomen gebildet wurden. Diese Vergrößerung wurde sowohl im Podosomenprofil des Aktins, als auch durch das erhöhte Vorkommen von Aktinfilamenten in der Podosomen-bedeckten Fläche beobachtet. Diese Hypothese wird durch eine berichtete SWS1-Funktion in Maus-Makrophagen unterstützt, wo die Expression von SWS1 die Ratio von F-Aktin/G-Aktin erhöht (Tu et al., 2018). Dass die SWS1-Konstrukte eine geringere Akkumulation aufwiesen könnte dadurch zu erklären sein, dass die Überexpression zu einer so hohen Konzentration an SWS1 führt, dass die endogenen SWS1-Bindungsstellen im Aktinkern gesättigt waren und die Konstrukte daher ohne Interaktionspartner als Hintergrund im Zellplasma vorlagen.

Im Gegensatz dazu zeigte sich keine spezifische Veränderung der SWS1-Lokalisation nach siRNA-gesteuerter Depletion. Vielmehr wurde eine leichte Reduktion der Podosomengröße detektiert, was durch eine parallele Reduktion der SWS1- und F-Aktin-Lokalisation angezeigt wurde. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass die Depletion des endogenen SWS1 nicht nur das SWS1-Signal, sondern auch das Signal für F-Aktin signifikant verringerte. Dass eine Depletion des endogenen SWS1 einen reduzierenden Effekt auf das zelluläre F-Aktin-Level hatte würde die Hypothese bekräftigen, dass SWS1 die Filamentenbildung unterstützt. Diese Funktion schien aber ein generelles Merkmal der F-Aktin-SWS1-Wechselwirkung zu sein welche unabhängig von der Podosomenstruktur ist, da trotz unterschiedlich starker Reduktion der Zellintensitäten keine spezifische Änderung der Akkumulations-Ratio an Podosomen zwischen F-Aktin und SWS1 beobachtet werden konnte.

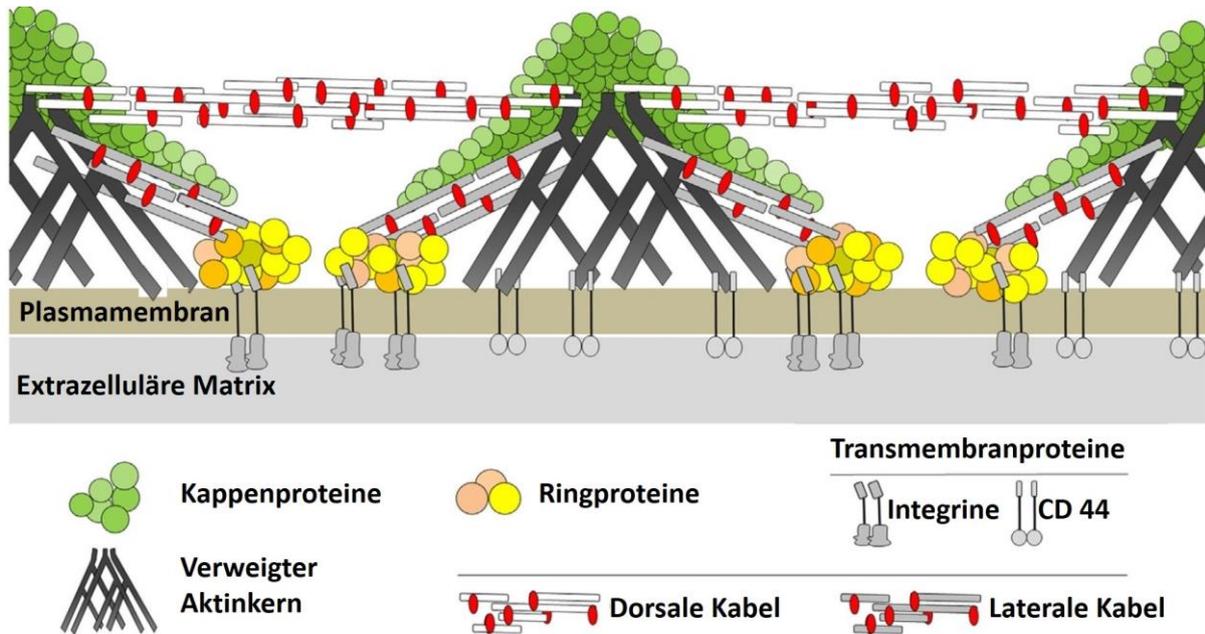


Abbildung 37: Schematische Einteilung der Podosomen. Gezeigt sind der verzweigte F-Aktin-Kern im Zentrum des Podosoms (schwarz), zusammen mit den Clustern an Ringproteinen (gelb) sowie der Kappe (grün). Zusätzlich gezeigt sind die beiden Kabelarten, welche aus Myosin IIA-bindenden, parallelen Aktinbündeln bestehen. Modifiziert nach Linder und Wiesner, 2016.

5.2.2 Einfluss auf die Organisation des Aktinnetzwerks

Die Kernlokalisierung, der leichte Einfluss auf die Podosomengröße, sowie die bisher beschriebenen Funktionen von SWS1 ließen die Vermutung zu, dass SWS1 einen Einfluss auf Organisation und Dynamik von Podosomen nehmen kann. Der Einfluss auf Podosomen wurde daher zusätzlich über die *live-cell*-Mikroskopie evaluiert. Als erste Größe wurde dabei die Lebenszeit von Podosomen untersucht, die von der korrekten Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten kontrolliert wird. Während ihrer durchschnittlichen Lebenszeit von 2-20 Minuten (Weber et al., 2022) unterlaufen Podosomen dabei wellenartigen Größenveränderungen, der sogenannten Oszillation (Labernadie et al., 2014). Untersucht wurde sowohl der Einfluss von der Überexpression GFP-markierter SWS1-Konstrukte, sowie von der siRNA-basierter SWS1-Depletion.

Dabei zeigte sich, dass die mittlere Lebenszeit von Podosomen durch die Überexpression des Volllängenkonstrukts leicht verringert wurde. Im Gegensatz dazu lag eine signifikante Erhöhung der mittleren Lebenszeit nach der Expression des Δ LC-Konstrukts vor. Interessanterweise wiesen beide Überexpressionen einen geringeren Anteil der langlebigen Podosomen als Zellen mit endogener SWS1-Expression auf. Gleichzeitig konnte durch die Depletion des endogenen SWS1 eine signifikante Reduktion der Lebenszeit beobachtet werden. Interessanterweise konnte diese reduzierte Lebenszeit zwar durch die Wiederherstellungs-Expression eines siRNA-insensitiven Volllängenkonstrukts, nicht jedoch durch das entsprechende Δ LC-Konstrukts ausgeglichen werden. Dies ließ mehrere Schlüsse zu.

So könnte es sein, dass das SWS1 in endogenen Konzentrationen eine stabilisierende Wirkung auf Podosomen hat, da sein Verlust durch die Depletion zu einer signifikanten Reduktion der Lebenszeit führte. Im Gegensatz dazu führte eine Erhöhung der endogenen SWS1-Konzentration durch das Volllängenkonstrukt aber nicht zu einer Verlängerung der Lebenszeit, was bedeuten würde, dass die stabilisierende Wirkung des SWS1 bereits bei der endogenen Expression mit maximaler Stärke erfüllt wurde. Die Überexpression des Δ LC-Konstrukts hingegen führte zu einer Erhöhung der Lebenszeit, was auf eine regulatorische Funktion der LC-Region schließen lässt. Dass diese Lebenszeit-Erhöhung aber nur bei gleichzeitig endogen exprimierten SWS1 beobachtet wurde, jedoch nach der Depletion des endogenen Proteins nicht einmal ein ausgleichender Einfluss auf die Lebenszeit durch die Überexpression des Δ LC-Konstrukts ausgeübt wurde, lässt zwei mögliche Interpretationen zu.

Zum einen könnte dies ein Hinweis dafür sein, dass die LC-Region essentiell zur Wechselwirkung mit mehreren unbekanntem Interaktionspartnern beiträgt. Einer dieser Interaktionspartner könnte ein Regulator der SWS1-Aktivität sein. Der Verlust der Wechselwirkung würde demnach zu einer konstitutiv aktiven Form des SWS1 führen, was in einer erhöhten Lebenszeit der Podosomen resultiert. Gleichzeitig müsste die LC-Region dann jedoch auch zur Interaktion mit einem initiierenden Faktor beitragen. Wurde das endogene SWS1 depletiert und das Δ LC-Konstrukt überexprimiert, könnte diese initiierte Interaktion nicht mehr durchgeführt werden und der Effekt, der bei gleichzeitiger endogener SWS1-Expression vorlag, konnte folgerichtig nicht mehr beobachtet werden. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass die N-terminale LC-Region eine Wechselwirkung mit SWS1-eigenen Domänen eingeht. Es wurde bereits gezeigt, dass die Deletion der N-terminalen Region die Calciumbindung der EF-hand 1-Domäne erhöhen kann (Acosta et al., 2013). Dies könnte drauf hinweisen, dass das überexprimierte Δ LC-Konstrukt durch die Deletion des N-Terminus eine höhere Calcium-Affinität aufwies und dadurch mutmaßlich stärker aktiviert vorlag. Da die Calciumbindung essentiell für die Aktinfilamentbündlung ist (Park et al., 2016, Lehne et al., 2022), würde dies bedeuten, dass das Δ LC-Konstrukt diese Funktion eher als das Volllängenkonstrukt erfüllen könnte. Möglicherweise trug das Δ LC-Konstrukt also zu einer stärkeren Filamentbündlung an Podosomen bei und erhöhte dadurch deren Lebenszeit. Diese Hypothese würde dem bisher unbekanntem N-Terminus von SWS1 daher sowohl eine Aktivitäts-regulierende Funktion, als auch eine essentielle Wirkung in der Filamentbündlung zukommen lassen.

Im Gegensatz zur Lebenszeit wiesen die Podosomen keine Veränderung der Oszillation des Aktinkerns auf, die über die Messung der Gesamtfluoreszenz des Lifeact-mCherry-Konstrukts pro Podosom identifiziert wurde. Eine parallele Oszillationsmessung des Aktinkerns und der überexprimierten SWS1-Konstrukte zeigte zudem, dass der Anteil an SWS1 über die gesamte Lebenszeit des Podosoms mit dem Anteil des F-Aktins im Podosom korrelierte. Auch zwischen den Vorläufer- und den Nachfolger-Podo-

somen wurde keine signifikante Veränderung des Verhältnisses zwischen F-Aktin und SWS1 beobachtet. Damit wurden die Ergebnisse der fixierten Zellen bestätigt, dass es sich bei SWS1 um ein Kernprotein handelt, das weder eine präferentielle Lokalisation an Podosomensubformen aufweist, noch für bestimmte Reaktionen an das Podosom rekrutiert wird. Vielmehr scheint SWS1 ein essentielles Protein zu sein, das von Aufbau bis Dissoziation des Podosoms in der Kernstruktur lokalisiert.

Nicht nur die Größe und die Oszillation von Podosomen werden durch die Aktinorganisation beeinflusst, sondern auch die Unterteilung von Aktinstrukturen in mobile und immobile Fraktionen. Mobile Fraktionen weisen dabei gleichzeitig hohe Raten für Polymerisation und Depolymerisation auf, was einen schnelleren Austausch einzelner Aktin-Monomere zur Folge hat (hoher Aktin-*Turnover*) (Wegner und Isenberg, 1983). Durch die höhere Dynamik weist das mobile Aktinnetzwerk jedoch eine geringere strukturelle Stabilität auf. Ein immobiles Aktinnetzwerk, auf der anderen Seite, wird als eine sehr stabile Aktinorganisation beschrieben, in der der Austausch von Aktinmonomeren nur langsam erfolgt (Lorente et al., 2014). Ermittelt wird der Monomer-Austausch dabei über die FRAP-Methode (*fluorescence recovery after photobleaching*) (Axelrod et al., 1976), bei der die Fluorophore eines einzelnen Podosoms durch einen ultravioletten Laser ausgebleicht werden. Diese an Aktinmonomere gebundenen Fluorophore werden durch Depolymerisationsprozesse aus der Struktur entfernt, während neue Monomere mit funktionellen Fluorophoren aus umliegenden Bereichen rekrutiert und in die Filamente eingebaut werden. So kann über die Zeit eine Erholung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, die mit der Aktin-*Turnover*-Rate korreliert. Diese Methode wurde verwendet, um die Dynamik in Podosomen nach siRNA-regulierter Depletion zu analysieren.

Hier konnte gezeigt werden, dass Podosomen in humanen Makrophagen nach der SWS1-Depletion eine um mehr als 41% reduzierte immobile Fraktion aufwiesen. Dieser Unterschied war bei den Vorläufer-Podosomen stärker ausgeprägt, da die Fluoreszenzerholung von Nachfolger-Podosomen einen um nur 28% verringerten Anteil der immobilen Fraktionen nach SWS1-Depletion aufwies. Die Reduktion der immobilen Fraktion deckte sich dabei mit der publizierten Fähigkeit von SWS1, durch seine Bündelfunktion die Cofilin-regulierte Depolymerisation von Aktin-Filamenten zu verhindern (Huh et al., 2013). Da die Geschwindigkeit der (De-)Polymerisation von Aktinfilamenten dessen *Turnover* bestimmt, könnte dies bedeuten, dass die immobile Fraktion in Podosomen vorwiegend aus durch SWS1 gebündelten Filamenten besteht. Diese sind nicht durch Cofilin angreifbar und weisen dadurch einen langsamen *Turnover* auf. Das Aktinnetzwerk des restlichen Kerns hingegen kann in unverändert schneller Rate polymerisiert und depolymerisiert werden und stellt damit die mobile Fraktion des Podosomenkerns dar. Da SWS1 nur in hohen Konzentrationen zum Bündeln befähigt ist, würde in Podosomen von SWS1-depletierten Zellen ein verringerter Anteil an Bündeln zu erwarten sein, was mit der beobachteten Reduktion der immobilen Fraktion einhergehen würde.

Interessanterweise war die Erholungszeit der halbmaximalen Fluoreszenz in beiden Subformen nach der SWS1-Depletion nahezu unverändert. Hierfür könnte sprechen, dass SWS1 nicht mit Nukleatoren wie Arp2/3 interagiert (Huh et al., 2013). Es würde daher keinen direkten Einfluss auf die Geschwindigkeit der Aktin-Polymerisation nehmen, was den Schluss zulassen würde, dass eine SWS1-Depletion zwar die Organisation des der Aktinfilamente, nicht aber die Geschwindigkeit der Aktinpolymerisation beeinflusste. Dieses Ergebnis würde sich mit der bereits formulierten Hypothese über die SWS1-Funktion decken. Wenn die Depletion von SWS1 zu einer Reduktion der Aktinbündel führt, müsste eine Überexpression im Umkehrschluss zu einer verstärkten Bündelung beitragen. Ein verstärkter Grad der Bündelung würde einen höheren Anteil an stabilen Filamenten bedeuten, so dass eine Wiederholung des FRAP-Experiments mit der Überexpression von SWS1-Konstrukten nicht zu einer Verringerung, sondern zu einer Erhöhung der immobilen Fraktion führen müsste. Dieses Experiment wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch nicht durchgeführt.

Gleichzeitig kann die Hypothese formuliert werden, dass ein hoher Grad an Aktinbündeln in der Kernstruktur sich positiv auf die Lebenszeit von Podosomen auswirkt, da die Reduktion der immobilen Fraktion mit einer Reduktion der Lebenszeit korrelierte (vgl. Lebenszeitanalyse und FRAP der Depletionszellen). Da die Lebenszeit nicht durch das Δ LC-Konstrukt alleine, sondern nur in Kombination mit endogen exprimiertem SWS1 erhöht werden konnte, würde diese Verknüpfung von Aktin-Bündelung und Podosomen-Lebenszeit bedeuten, dass zusätzlich zu den bereits publizierten Domänen auch die LC-Region positiv zur Aktinbündelung beiträgt. Diese Hypothese müsste durch weitere FRAP-Experimente bestätigt werden, in denen der Einfluss beider SWS1-Konstrukte auf die Aktinorganisation sowohl zusätzlich zum endogenen als auch als Wiederherstellungsexpression nach Depletion untersucht wird.

Diese Erkenntnis müssen dabei im Kontext mit den Ergebnissen der Lokalisationsstudie betrachtet werden. Wie bereits beschrieben, wurden Podosomen in früheren Modellen strikt in verzweigten Kern und gebündelte Kabel unterteilt (Linder und Wiesner, 2016). SWS1 wies in allen Bedingungen außer der Überexpression im Vergleich zum F-Aktin eine zentrumsnähere Lokalisation im Podosomenkern auf und erstreckte sich nicht bis in die Peripherie, in der die lateralen Kabel zu vermuten wären. Dies würde bedeuten, dass SWS1 nur durch die Überexpression, nicht aber unter endogenen Bedingungen und besonders nicht nach einer Depletion mit den gebündelten Kabeln zu interagieren scheint. Da das FRAP-Experiment jedoch auf einen Verlust von Bündeln hinweist, obwohl SWS1 mutmaßlich nicht mit den gebündelten Kabeln interagiert, würde dies bedeuten, dass auch im Podosomenkern eine gebündelte Aktinorganisation vorliegen muss. Tatsächlich berichten neuere Podosomenmodelle von einer Übergangszone zwischen dem verzweigten Kern und den gebündelten Kabeln, in der beide Organisationen graduell ineinander übergehen (Linder und Cervero, 2020). Laut diesem Modell wäre es vorstellbar, dass der Podosomenkern schon erste gebündelte Aktinfilamente aufweist, die jedoch noch

nicht den lateralen Kabeln zuzuordnen sind, sondern im peripheren Teil des Kerns lokalisieren. Dies würde sich sowohl mit der beobachteten Lokalisation, als auch der publizierten Funktion von SWS1 decken.

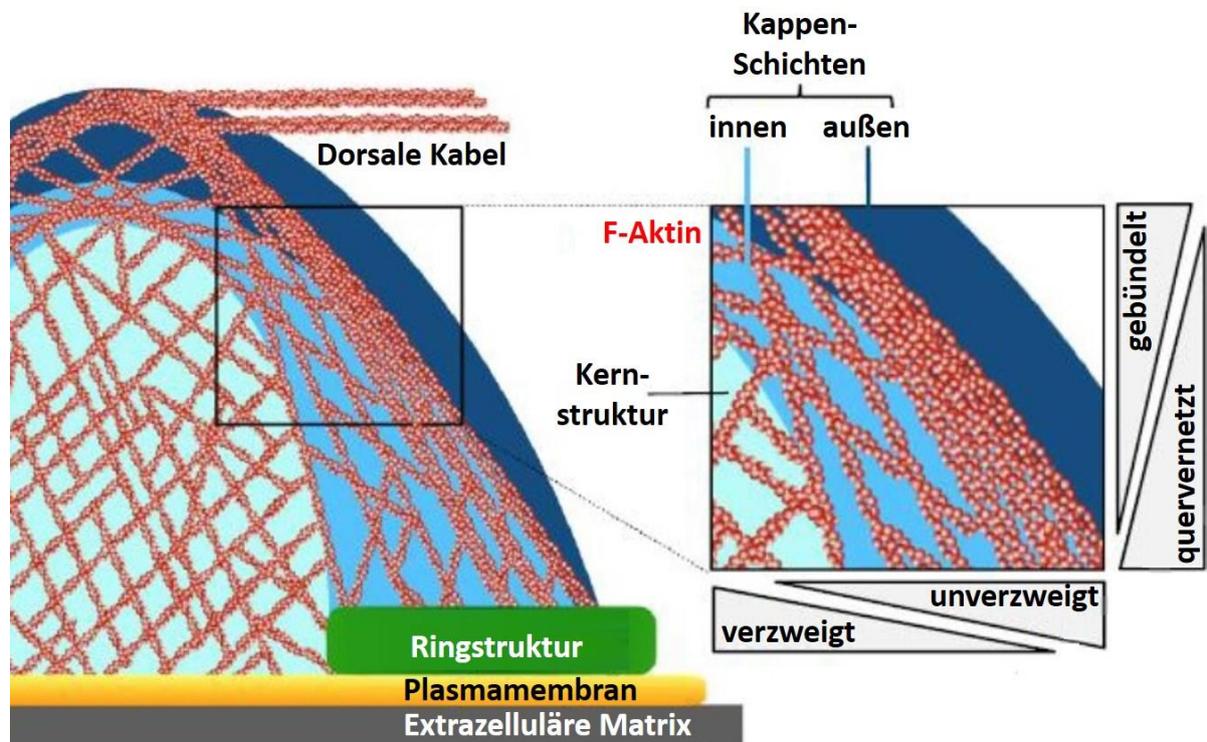


Abbildung 38: Übersicht über die Aktinorganisation im Podosomenkern. Die Aktinfilamente im zentralen Kernbereich werden durch Quervernetzung und Verzweigung zu einem Netzwerk aufgebaut, während die Filamente der Peripherie aus parallelen und eng gepackten Bündeln bestehen. Zwischen beiden Arten der Aktinfilamente befindet sich nach diesem Modell eine Übergangszone, in welcher die Filamentorganisationen graduell ineinander übergehen. Modifiziert nach Linder und Cervero, 2020.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit könnten darauf hinweisen, dass SWS1 vom Kernzentrum bis an die periphere Übergangszone lokalisiert. Sowohl der beobachtete Einfluss auf die Aktin-Fraktionen im Kern, als auch die berichtete Funktion von SWS1, konzentrationsabhängig zu quervernetzen (Lehne et al., 2022) und zu bündeln (Kwon et al., 2013), lässt die Vermutung zu, dass SWS1 zur Regulation dieser Übergangszone beitragen kann. Dies würde bedeuten, dass SWS1 durch die Kontrolle der Aktinfilamenten-Organisation einen wichtigen Beitrag zur Podosomenintegrität leistet. Die korrekte Organisation der Aktinfilamente ist, neben der Polymerisationsrate, zusätzlich ein essentieller Faktor für die Ausbildung von Kräften im Podosomenkern (Labernadie et al., 2014). Daher wurde im Anschluss untersucht, ob die beobachteten Effekte des SWS1 auf die Kernorganisation einen Einfluss auf podosomale Kräfte nehmen konnte.

5.2.3 Regulation der Podosomen-Kräfte und Mechanosensitivität

Podosomen sind mechanosensitive Strukturen, die sowohl Signale durch extrazelluläre Kräfte empfangen als auch diese Signale durch die Ausbildung eigener Kräfte ins Zellinnere weiterleiten können (Schachtner et al., 2013, Linder und Wiesner, 2016). Hierfür bedienen sie sich verschiedener Mechanismen. Zum einen wird durch die konstante Polymerisation des Aktinkerns eine Protrusionskraft auf die Plasmamembran und den extrazellulären Raum ausgeübt, zum anderen sind die Aktomyosinkabel der Podosomen zur Kontraktion befähigt (Labernadie et al., 2014). Die lateralen Kabel können, zum großen Teil gesteuert durch das Kernwachstum, Kräfte auf den Podosomenring ausüben und durch eine Zugspannung auf mechanosensitive Proteine Rekrutierungs- und Signalkaskaden auslösen. Da nach der SWS1-Depletion zwar kein Einfluss auf die Polymersationsrate, jedoch auf die Aktinorganisation und damit potentiell auf die Strukturstabilität von Podosomen beobachtet wurde, wurde zunächst die Protrusion von Podosomen unter endogenen und Depletionsbedingungen untersucht. Hierfür wurden Zellen mit Hilfe der ERISM-Methode analysiert, bei der Zellen auf einem verformbaren Polymer platziert und die Protrusionen-basierte Auslenkung der Matrix detektiert wurde (Kronenberg et al., 2017).

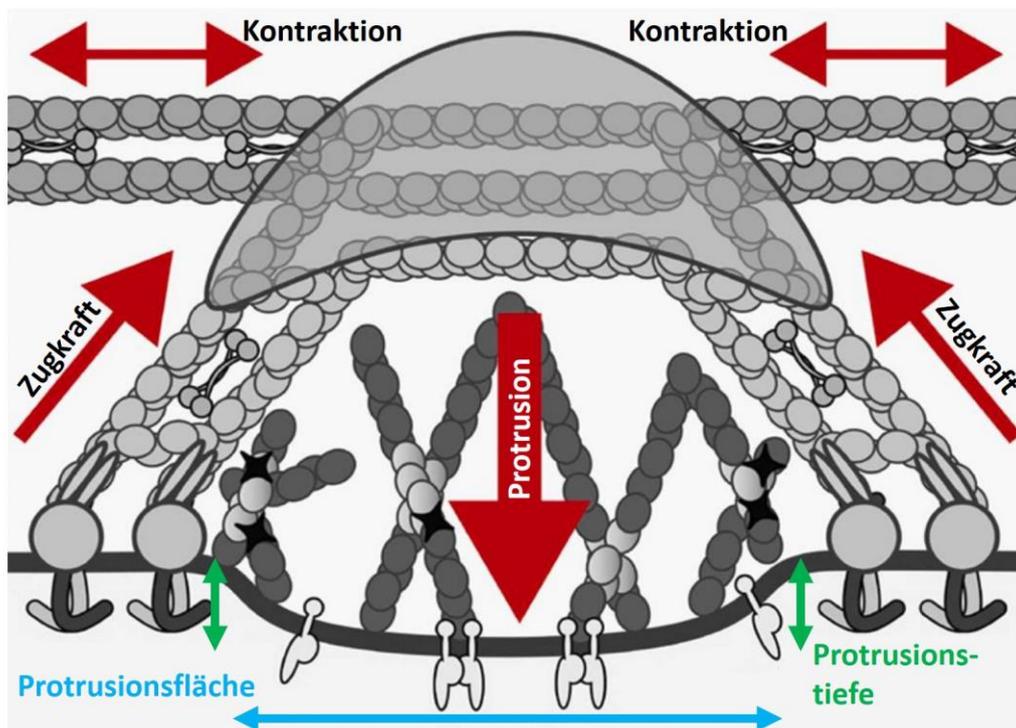


Abbildung 39: Übersicht über die podosomalen Kräfte. Schematischer Querschnitt eines Podosoms, mit Kern, Ring, Kappe und Kabeln. Rot markiert sind die podosomalen Kräfte. Dabei wirkt durch die Aktinpolymerisation des Kerns eine Protrusionskraft auf die Plasmamembran und den extrazellulären Raum (mittlerer Pfeil). Die Stärke dieser Kraft kann durch die Tiefe (grüner Doppelpfeil), sowie die Fläche (blauer Doppelpfeil) der Protrusion charakterisiert werden. Durch das Kernwachstum werden gleichzeitig Zugkräfte auf die lateralen Kabel ausgeübt werden (seitliche Pfeile). Die Myosin IIA-Aktivität in den dorsalen Kabeln führt zudem zu einer inter-podosomalen Kraftausübung (Doppelpfeile). Modifiziert nach Weber et al., 2022.

Während der ERISM-Analyse zeigte sich, dass die Protrusion von Podosomen durch die SWS1-Depletion beeinflusst wurde. So wurde zuerst beobachtet, dass die Podosomenanzahl in Kontroll- und Depletionszellen zwar nahezu unverändert war, nach der SWS-Depletion aber ein höherer Anteil der Podosomen keine Protrusion aufwies. Beim Vergleich der restlichen funktionellen Podosomen wurde festgestellt, dass die durchschnittliche Protrusion nach der SWS1-Depletion eine um 6% leicht, aber signifikant reduzierte Indentationstiefe in den extrazellulären Raum aufwies. Stärker war der Einfluss in den Depletionszellen dabei auf die laterale Protrusionsfläche der Podosomen. Diese war im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 21,5% reduziert, wodurch das kombinierte Protrusionsvolumen als Produkt dieser beiden Parameter sogar um 28% verringert wurde.

Vergleichbar zu den FRAP-Experimenten könnten auch die Ergebnisse der ERISM-Analyse Hinweise auf die Filamentorganisation von Aktin in Podosomenkernen geben. Wie bereits beschrieben, könnte die SWS1-Depletion den Verlust der stabileren Aktinbündel in der Kernperipherie auslösen. Laut einem neueren Podosomenmodell kann der Aktinkern abhängig von seiner Filamentorganisation in zwei protrudierende Module eingeteilt werden (van den Dries et al., 2019). In diesem Modell stellt das Aktinnetzwerk des zentralen Kerns das zentrale protrudierende Modul dar, das von einer Schicht eng gepackter Aktinbündel, dem peripheren protrudierenden Modul, umgeben wird. Diese Bündel begrenzen dabei das Höhenwachstum des zentralen Moduls und sorgen damit dafür, dass die Aktinpolymerisation den Kern statt in das Zellinnere in die extrazelluläre Membran protrudieren lässt. Ein Verlust dieser Bündel durch eine SWS1-Depletion würde damit auch diese Begrenzung schwächen und damit die Protrusionskraft reduzieren. Tatsächlich wurde eine reduzierte Protrusionskraft über das verringerte Protrusionsvolumen beobachtet.

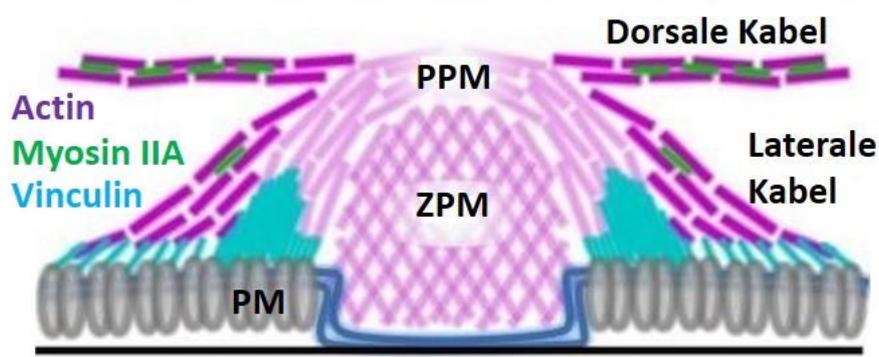


Abbildung 40: Einfluss der Aktinarchitektur auf die Protrusion. In diesem Modell ist die Kernstruktur in zwei protrudierende Module unterteilt, dem zentralen (ZPM) und dem peripheren (PPM). Das zentrale Modul besteht dabei aus dem Arp2/3-nukleierten Netzwerk, während das periphere Modul aus Aktinbündeln besteht. Die lateralen Kabel bilden dabei eine eigenständige Struktur, die noch außerhalb der peripheren Kernbündel existiert. Modifiziert nach van den Dries et al., 2019.

Der Verlust des peripheren protrudierenden Moduls schien dabei jedoch im Vergleich zur lateralen Fläche nur eine geringe Auswirkung auf die Protrusionstiefe zu haben. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Indentationstiefe maßgeblich durch die Aktinpolymerisationsrate reguliert wird (Luxenburg et al., 2012), welche bei SWS1 bisher als unverändert beobachtet wurde. Die laterale Protrusionsfläche könnte jedoch mit der SWS1-abhängigen Reorganisation des Aktinkerns begründet werden. So wurde durch die Depletion eine leichte Reduktion der Podosomengröße beobachtet. Zusätzlich könnte die gesamte Protrusionsstruktur durch den Verlust der stabilen Bündel destabilisiert worden sein, wodurch nicht mehr das gesamte zentrale Modul in die extrazelluläre Matrix gedrückt wurde. Dass der Verlust der Stabilität einen Effekt auf die Protrusion haben kann, wurde auch dadurch gezeigt, dass die Rate der protrudierenden Podosomen in der SWS1-Depletion im Vergleich zur Kontrolle reduziert war. Der Einfluss von SWS1 auf die Aktinorganisation trug also nicht nur dazu bei, die Protrusion individueller Podosomen zu beeinflussen, sondern konnte in einigen Podosomen auch die generelle Befähigung zur Protrusion verhindern. Hierbei muss gesagt werden, dass auch in der Kontrolle mit etwa einem Fünftel aller Podosomen nur die Minderheit dieser Strukturen zur Protrusion befähigt waren. Durch welche Mechanismen kontrolliert wird, welche Podosomen innerhalb einer Zelle protrudieren, ist noch nicht abschließend geklärt. Durch die Daten dieser Doktorarbeit konnte jedoch ein Hinweis darauf erhalten werden, dass Aktin-interagierende Proteine wie SWS1 durch die mutmaßliche Reorganisation der Filamentorganisation einen Einfluss darauf haben könnten.

Während Aktinpolymerisation und Strukturintegrität als essentielle Faktoren der Protrusion bekannt sind, wurde auch vom Einfluss der Myosin-haltigen Kabel auf diese Funktion berichtet (Labernadie et al., 2014). Daher wurde in einem folgenden Experiment die Regulation der Myosin IIA-Aktivität durch SWS1 untersucht. Da bereits gezeigt wurde, dass eine erhöhte Calcium-Konzentration die Funktion des Rho-Kinase-Signalwegs verstärken kann, welcher in einer erhöhten Myosin IIA-Aktivität resultiert (Somlyo und Somlyo, 2000), wurde parallel auch die Calciumsensitivität untersucht. Dabei zeigte sich in Kontrollzellen, dass eine steigende Calcium-Konzentration auch in erhöhten zellulären Fluoreszenzintensitäten von phospho-MLC resultierte. Dieser Effekt korrelierte dabei mit der Konzentration des verwendeten Ionophors Ionomycin. Die Verwendung des Chelators BAPTA-AM reduzierte hingegen die endogenen pMLC-Level. Interessanterweise beeinflusste eine SWS1-Depletion die pMLC-Level im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht direkt, verringerte jedoch die Stärke des Calcium-sensitiven Effekts. Zusätzlich wurde gezeigt, dass pMLC in nahezu allen Bedingungen nicht spezifisch in der Podosome-bedeckten Fläche akkumulierte, sondern vor allem in den Podosomen-freien Bereichen vorlag. Trotzdem wurde eine Wirkung auf den Podosomenring festgestellt, da die Größe des Vinculinrings durch steigende Calciumkonzentrationen reduziert und durch sinkende Konzentrationen vergrößert wurde.

Auf den ersten Blick erscheint eine nicht-podosomale Lokalisation des pMLC widersprüchlich, da Myosin IIA als Bestandteil der Aktomyosinkabel definiert wurde (Chabadel et al., 2007). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der pMLC-Antikörper nur die phosphorylierte und damit die aktivierte Form des Myosin IAs anzeigt, jedoch keine Information über die Gesamtlokalisierung des Proteins liefert. Während bekannt ist, dass die grundlegende Myosin IIA-Aktivität für die Generation der podosomalen Kräfte wichtig ist (Labernadie et al., 2014) und es daher auch in seiner aktiven Form an Podosomen bindet, wurde ebenfalls berichtet, dass die Hyperaktivierung von Myosin IIA zur Podosomenauflösung führt (Bhuwania et al., 2012). Offensichtlich wurde durch den pMLC-Antikörper vor allem das hyperaktivierte Myosin IIA angezeigt, was die Lokalisation außerhalb der Podosomen-bedeckten Fläche erklärt. Eine andere Erklärung wäre, dass Myosin IIA zu einem großen Teil in den dorsalen Kabeln lokalisiert, die nicht vollständig durch das Podosomenprofil erfasst werden und daher in der Podosomen-freien Fläche vorliegen, während nur ein geringer Anteil an die lateralen Kabel bindet (van den Dries et al., 2019). Ebenfalls muss beachtet werden, dass zwar keine spezifische Akkumulation an Podosomen beobachtet wurde, jedoch auch an diesen Strukturen pMLC-Signal detektiert wurde. Dies könnte auch dafür sprechen, dass das hyperaktivierte pMLC in Podosomen-freien-Flächen mit deutlich stärkerer Signalintensität vorlag, als das moderat aktivierte Myosin IIA in den Kabeln. Was durch die Ergebnisse ebenfalls gezeigt wurde ist, dass diese Hyperaktivierung in Makrophagen anscheinend durch Calcium-sensitive Signalwege ausgelöst, jedoch von SWS1 moduliert wird.

Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtungen wäre, dass SWS1 durch seine Bündlungsfunktion einen direkten Einfluss auf die strukturelle Integrität der Podosomenkabel hat. Denkbar wäre, dass die Integrität der Kabel, welche aus gebündelten Aktinfilamenten bestehen, durch den SWS1-Verlust reduziert wurde und damit keine ausreichende Stabilität für eine Myosin-Aktivierung vorlag. Es wurden unter anderem mit LSP1 (Cervero et al., 2018) und Supravillin (Bhuwania et al., 2012) bereits mehrere Podosomenkomponenten identifiziert, die einen Einfluss auf die Myosin IIA-Aktivität und damit auf die Regulation der Kabel aufweisen. Bei diesen beiden Proteinen handelt es sich jedoch um Kappenproteine, die zumindest eine räumliche Nähe zu den Kabeln aufweisen, was für SWS1 hingegen nicht beobachtet wurde. Zudem würden weniger funktionale Kabel auch nicht die verhinderte Reduktion des pMLC-Levels durch BAPTA-AM erklären. Gegen diese Möglichkeit spricht ebenfalls, dass ein Defekt der Podosomenkabel einen Effekt auf den mechanosensitiven Ring haben müsste. Die Rekrutierung von Plaqueproteinen wie Vinculin wird durch die Zugkräfte der Kabel reguliert (del Rio et al., 2009) und es wäre zu erwarten gewesen, dass eine Reduktion der Kabelintegrität auch in einer Reduktion der Vinculinakkumulation resultierte. Interessanterweise wies Vinculin jedoch auch nach der SWS1-Depletion eine unveränderte Akkumulation an Podosomen auf, so dass von einer unveränderten Zugkraft der Kabel auf die Ringproteine ausgegangen werden kann.

Im Gegensatz dazu wurde ein Einfluss der Calcium-Konzentration auf die Größe der Ringstruktur beobachtet, wobei auch dieser Effekt durch SWS1 moduliert wurde. So lokalisierte Vinculin in Bedingungen hoher Calcium-Konzentrationen sehr eng um den Podosomenkern, während es bei niedrigen Calcium-Leveln eine Lokalisation mit vergleichsweise großem Durchmesser aufwies. Dieser Effekt wurde beobachtet, obwohl gleichzeitig nur ein geringer Einfluss auf die Größe des Aktinkerns detektiert wurde. Nach einer SWS1-Depletion wurde zwar noch immer ein reduzierender Effekt hoher Calcium-Konzentrationen auf die Ringgröße beobachtet, jedoch lag diese im Vergleich zur Kontrolle weniger stark vor. Ob dabei die Aktivität des Myosin IIA, oder unabhängige calciumsensitive Signalwege diesen Effekt auslösten, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht geklärt werden. Dass der Ring auch nach der Reduktion des aktiven Myosin IIA vorlag unterstützt dafür die publizierten Erkenntnisse, dass die Zugspannung vor allem durch das Aktinpolymerisation-gesteuerte Kernwachstum und nicht durch eine Myosin-vermittelte Kontraktilität vermittelt wird (van den Dries et al., 2013, Herzog et al., 2020).

5.2.4 Interaktionen

Es wurden bereits mehrere Assoziationen von SWS1 mit verschiedenen Signalwegen beschrieben und auch seine eigene Regulation durch Phosphorylierungskaskaden ist zum Teil bekannt. So wurde bereits sein Einfluss auf inflammatorische (Thylur et al., 2009) und apoptotische (Avramidou et al., 2007) Signalwege beschrieben. SWS1 wurde zudem als Aktin-bindendes Protein identifiziert (Rahmesh et al., 2009), eine Funktion, die es über seine drei Aktinbindestellen ausüben kann (Kwon et al., 2013). Abgesehen von einer Interaktion mit Tau-Proteinen (Vega et al., 2008) und der Bindung an die Tyrosin-Protein-Kinase Fgr (Kroczeck et al., 2010) ist jedoch nur wenig über direkte Interaktionspartner von SWS1 bekannt.

Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung der Funktion von SWS1 war daher die Identifikation potentieller Interaktionspartner. Dies wurde durch zwei Immunopräzipitationen und einen *Pulldown-Assay* mit anschließender massenspektrometrischer Charakterisierung durchgeführt. Bei diesen Experimenten wurde das humane SWS1 zusammen mit potentiell interagierenden Proteinen aus den Zelllysaten isoliert. Dieser Versuch wurde über drei verschiedene Iterationen durchgeführt, sowohl mit endogenem SWS1, nach der Überexpression eines GFP-gebundenen Konstrukts als auch mit Hilfe des Biotinylierungsenzyms miniTurbo (Branon et al., 2018). Alle massenspektrometrischen Charakterisierungen wurden durch die Anreicherung detektierter Peptide im Vergleich zur Kontrolle in Kombination mit dem Wert der Detektionsspezifität analysiert.

Bei der ersten Iteration wurde endogenes SWS1 mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gebunden, über Protein-A/G-gebundene Kügelchen isoliert und mit einer Kontrolle ohne SWS1-Antikörper verglichen. Während bei dieser Methode Hinweise auf einige potentielle Interaktoren erhalten wurden, musste festgestellt werden, dass nur wenige Proteinsignale einen Unterschied zwischen SWS1-Elution und Kontrolle aufwiesen. Dies war der Fall, weil hohe Anteile an Aktin- und Myosin-Isoformen in der Kontrolle detektiert werden, die unspezifisch zusammen mit ihren Interaktoren eluiert wurden. Die unspezifische Bindung konnte auch durch die Verwendung von Waschpuffern mit höherer Salzkonzentration nicht verhindert werden, weswegen die Charakterisierung mithilfe der Überexpression von SWS1-Konstrukten wiederholt wurde.

Doch auch nach der Überexpression konnte keine aussagekräftige Auswahl potentieller Interaktoren getroffen werden. Nicht nur wies auch dieser Versuch einen hohen Anteil an Aktin- und Myosin-Isoformen auf, auch SWS1 war überraschenderweise in der GFP-Leervektor-Kontrolle höher angereichert, als in der SWS1-Überexpression. Dies war mutmaßlich auf das GFP zurückzuführen, das unspezifisch an Aktin binden und sogar spezifisch mit Myosin interagieren (Agbulut et al., 2007) und dadurch auch viele der interagierenden Proteine, wie SWS1, ins Eluat überführen kann. Auch hier konnte durch eine Erhöhung der Salzkonzentration von Waschpuffern keine Verbesserung der Spezifität erhalten werden. In einem dritten Versuch wurde daher eine spezifische Biotinylierung durch ein an SWS1 gekoppeltes Enzym verwendet.

Bei diesem SWS1-gekoppelten Enzym handelte es sich um die miniTurbo, die nach Zugabe von Biotin auf exprimierende Zellen Proteine in einem Umkreis von ca. 10 nm zum Zielprotein durch kovalente Biotinylierung markieren kann (Branon et al., 2018). Durch die spezifische Isolation biotinylierter Proteine mit ihren Interaktionspartnern konnte ein Großteil der Hintergrundsignale voriger Methoden verhindert werden. So wurden neben Proteinen der Adhäsion und mechanosensitiven Maschinerie vor allem Aktin-interagierende Proteine identifiziert. Unter anderem fanden sich dabei Vertreter der Filamin-Familie, sowie α -Actinin, welches bereits als Podosomenkappenprotein identifiziert wurde (van den Dries et al., 2019). Beide Proteine regulieren die Funktionen des Aktinfilamentbündelns und -Quervernetzens, was ebenfalls beschriebene Funktionen von SWS1 sind (Kwon et al., 2013, Lehne et al., 2022). Zusätzlich wurden mit *Capping*-Proteinen und Aktin-Elongatoren auch Proteine identifiziert, die für eine Regulation der Aktinpolymerisationsrate zuständig sind. Auch bei SWS1 ist unter anderen durch die inhibierende Wirkung auf Cofilin ein Einfluss auf die Aktindynamik bekannt (Huh et al., 2013). Die Häufung von *Capping*-Proteinen stellt dabei ein sehr interessantes Ergebnis dar, da diese Funktion noch nie im Zusammenhang von SWS1 beschrieben wurde. Sie würde allerdings sehr gut zu den beobachteten Ergebnissen dieser Doktorarbeit passen. So führt das *End-Capping* eines Aktin-Filaments zu einer langsameren Aktin-Turnover-Rate (Maun et al., 1996). Die reduzierte Funktion dieser Proteine

würde daher zu einem höheren Anteil an Filamenten mit schnellem Aktinaustausch führen. Dies würde im Umkehrschluss zu einer Reduktion der immobilen Fraktion führen, was nach SWS1-Depletion auch tatsächlich zu beobachten war. Ob die Reduktion der Podosomen-Lebenszeit, wie sie nach der SWS1-Depletion beobachtet wurde, dabei neben dem Einfluss auf die Filamentbündelung auch mit dem *End-Capping* von Aktinfilamenten begründet werden könnte, ist eine bisher ungeklärte Frage, die in weiterführenden Forschungsarbeiten untersucht werden müsste. Auf der anderen Seite ist eine Funktion des SWS1 auf das Filament-*End-Capping* durch die massenspektrometrische Analyse jedoch auch nicht bewiesen, da die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zwar eine räumliche Nähe der Proteine aufzeigen, jedoch nicht als Beweise für deren direkte Interaktion, oder geteilte Funktionen ausreichen.

Da eine Lokalisation des aktinbindenden SWS1 in der räumlichen Nähe einer Reihe aktininteragierender Proteine keine gesicherten Aussagen über potentielle Bindungspartner zulässt, muss für zukünftige Experimente eine genauere Aufklärung von Interaktionen stattfinden. Hierfür könnten in einem ersten Schritt *in silico*-Modellierungen durch ColabFold (Mirdita et al., 2022) durchgeführt werden, wobei es sich um eine Erweiterung des bereits verwendeten Strukturvorhersage-Programms AlphaFold (Jumper et al., 2021) handelt. Mithilfe dieser Modelle können Interaktionen potentieller Bindungspartner vorhergesagt werden und eine Vorauswahl für labortechnischen Experimente getroffen werden. Zusätzlich könnte für die Biotin-*Pulldown*-Assays auch eine weitere Verbesserung der Biotinylierungsreaktion stattfinden. Während die verwendete miniTurbo-Methode bereits die Spezifität der erhaltenen Ergebnisse stark erhöhte, handelt es sich auch hier mit 28 kDa (Branon et al., 2018) im Vergleich zu den 27 kDa von SWS1 um eine relativ große Addition an das Zielprotein. Dessen Bindung an den N-Terminus von SWS1 könnte die Funktion des Zielproteins, sowie die Bindung potentieller Interaktionspartner dieser Domäne negativ beeinflussen. Vor allem im Hinblick auf eine potentielle Funktion der LC-Region würde dies möglicherweise mit Regulatoren und Interaktionspartnern interferieren. Für zukünftige Versuche sollten daher kleinere Varianten der miniTurbo verwendet werden. Ein vielversprechender Kandidat wäre hierfür die erst kürzlich entwickelte und publizierte Variante miniID2 (Johnson et al., 2022), welche nicht nur eine reduzierte Größe, sondern auch einen noch präziseren Reaktionsradius aufweist. Das miniID2 könnte zudem auch in Kombination mit verschiedenen SWS1-Deletionskonstrukten verwendet werden, um Bindungspartner des bisher wenig erforschten N-Terminus zu identifizieren und die Interaktion der anderen Domänen auch im podosomal Kontext zu bestätigen.

5.2.5 Aktualisierung des Podosomenmodells

Die erste, vereinfachte Grundstruktur von Podosomen wurde in Kern, Ring, und Kabel unterteilt, wobei zuerst wenig Details über die einzelnen Strukturen bekannt waren. Das Podosomenmodell wurde im Kontext neuer Forschungsergebnisse laufend angepasst und spezifiziert. So wurde hervorgehoben,

dass der Podosomenring nicht aus einer durchgängigen Struktur, sondern aus einzelnen Clustern von Plaqueproteinen besteht (van den Dries et al., 2013b). Bei der Kappenstruktur wird inzwischen von einer mehrstufigen Struktur ausgegangen, bei denen die Proteine in verschiedenen Schichten an das obere Ende des Kerns angelagert werden (Linder und Cervero, 2020). Während die Organisation des Aktinkerns initial als ein Arp2/3-reguliertes Netzwerk aus verzweigten Filamenten beschrieben wurde (Linder et al., 2000), wurden auch hier inzwischen mehrere Substrukturen identifiziert. So wurde beispielsweise die Existenz von zwei verschiedenen Modulen beschrieben, durch die die Protrusion von Podosomen gesteuert wird. Das zentrale Modul besteht dabei aus einem verzweigten Aktinnetzwerk, welches durch die parallelen Aktinbündel des peripheren Moduls umschlossen wird (Joosten et al., 2018, van den Dries et al., 2019). In einer Erweiterung dieses Modells wurde beschrieben, dass die beiden Module dabei nicht strikt voneinander getrennt vorliegen, sondern die Organisation der Aktinfilamente über eine Übergangszone graduell von verzweigt zu gebündelt übergeht (Linder und Cervero, 2020). Im neuesten Modell wurde zusätzlich berichtet, dass auch die Organisation des zentralen Moduls in mehrere Schichten unterteilt ist. So liegt das Aktin im Zentrum des Podosoms durch eine Arp2/3-vermittelte Polymerisation in verzweigter Form vor. Weiter zur Peripherie hin werden die verzweigten Filamente durch spezialisierte Proteine quervernetzt. In einem fließenden Übergang werden diese Filamente dann durch weitere Proteine zu engen Bündeln gepackt. Am äußersten Bereich der Podosomenstruktur wird Myosin IIA in diese Bündel eingelagert und bildet damit die an die Ringproteine bindenden Aktomyosinkabel (Linder et al., 2022). Die genaue Kontrolle der einzelnen Schichten und ihrer Übergangszonen ist dabei noch weitestgehend unbekannt.

Während SWS1 im Kontext der Aktininteraktion zunächst als Filamentbündler beschrieben wurde (Kwon et al., 2013), wurde später auch seine Fähigkeit zur Quervernetzung identifiziert (Lehne et al., 2022). Dabei wurde hervorgehoben, dass SWS1 bei niedrigen Konzentrationen Filamente eher quervernetzt und sie bei höheren Proteinkonzentrationen präferentiell bündelt. Interessanterweise wurde hierbei ebenfalls berichtet, dass das Filamentbündeln, im Gegensatz zur Quervernetzung, unabhängig von der Calciumbindung durchgeführt wird (Lehne et al., 2022), was bisherigen Forschungsarbeiten widerspricht (Kwon et al., 2013, Park et al., 2016). Zusammenfassend handelt es sich bei SWS1 demnach um ein Aktin-interagierendes Protein, dessen Wechsel von Quervernetzer zu Bündler stark reguliert wird. Diese Regulation könnte eine erste Erklärung für die unterschiedliche Aktinorganisation des Podosoms sein.

Unter endogenen Bedingungen lokalisiert SWS1 im Podosomenkern, weist jedoch eine geringe Verteilung in die Peripherie des Podosoms auf. Dies könnte darauf hinweisen, dass SWS1 mit sowohl den verzweigten, als auch den quervernetzt und leicht gebündelten Aktinfilamenten des Kerns interagiert, diese Lokalisation sich jedoch nicht bis in die lateralen Aktomyosinkabel erstreckt. Im Kern kann es

unter anderem die Quervernetzung der Filamente regulieren (Lehne et al., 2022) wobei es als wahrscheinlicher anzusehen ist, dass SWS1 die Übergangszone von quervernetzten zu gebündelten Filamenten reguliert. Der Verlust der Aktinbündel reduziert hingegen den Anteil des peripheren protrudierenden Moduls im Podosomenkern (Joosten et al., 2018). Diese Annahme wurde durch die jeweiligen Ergebnisse der FRAP- und ERISM-Experimente gestützt, in denen gezeigt wurde, dass nach einer SWS1-Depletion sowohl der Anteil stabiler Filamente, als auch die Protrusionsfläche verringert wurde. Gleichzeitig wurde nur ein geringer Einfluss auf die Protrusionstiefe gezeigt, die neben der Aktinpolymerisation (Luxenburg et al., 2012) auch von der Myosin-Aktivität (Labernadie et al., 2014) und der Integrität des Podosomenrings (Bouissou et al., 2017) kontrolliert wird. Tatsächlich zeigte eine SWS1-Depletion dabei keinen direkten Effekt auf die Stärke der zellulären phospho-MLC-Level, jedoch reduzierte es dessen calciumsensitive Aktivierung. Sowohl die zentrumsnahe Lokalisation von SWS1 im Podosomenkern, als auch eine unverändert starke Akkumulation des mechanosensitiven Ringproteins Vinculin weisen darauf hin, dass der Effekt von SWS1 auf die Aktivierung von Myosin IIA nicht durch eine Strukturänderung der lateralen Kabel durchgeführt wird. Es ist daher wahrscheinlicher, dass das ebenfalls Calcium-sensitive SWS1 direkt oder indirekt mit der Aktivierungskaskade des Myosin IIA interagiert.

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit lassen den Schluss zu, dass SWS1 die Organisation des peripheren Kernmoduls, nicht jedoch die der ebenfalls gebündelten Podosomenkabel beeinflusst. Dies kann auf mehrere, unterschiedlich regulierte Signalwege zur Filamentbündelung im Podosom hinweisen. Tatsächlich wurden durch eine massenspektrometrische Charakterisierung potentieller Interaktionspartner von SWS1 mehrere Filamentbündler identifiziert. Neben Filamin A und B, deren Lokalisation in Podosomen noch unbekannt sind, wurde auch α -Actinin detektiert, was bereits als Teil der Podosomenkappe identifiziert wurde (van den Dries et al., 2019). Als Kappenprotein lokalisiert α -Actinin in der Peripherie des Podosoms und bindet im Gegensatz zum SWS1 nicht die Kernstruktur. Die periphere Lokalisation von α -Actinin bringt es damit eher in die Nähe der lateralen Kabel als SWS1 und macht somit eine direkte Interaktion wahrscheinlicher. Demzufolge wäre SWS1 für die Organisation der Filamente in der Kernperipherie zuständig, indem es beispielsweise in der Übergangszone eine leichte Bündelung initiieren könnte. Die Bildung der lateralen Kabel würde dann von effizienteren Bündlern, wie dem α -Actinin oder potentiell weiteren Proteinen, übernommen werden und wäre vom SWS1 unabhängig. Dieses Modell könnte erklären, warum ein Effekt der SWS1-Depletion auf das periphere Kernmodul, nicht aber auf die Kabel beobachtet wurde. Unklar ist hingegen, ob oder in welchem Ausmaße die potentielle Assoziation von SWS1 mit *Capping*-Proteinen einen Einfluss auf das Akin-Turnover im Kern nimmt. Eine Wechselwirkung von SWS1 mit F-Aktin-*Capping*-Proteinen könnte dazu beitragen die Verteilung von mobiler und immobiler Fraktion im Kern zu beeinflussen. Diese Funktion würde dann jedoch nicht durch die differentielle Filamentorganisation der Übergangszone, sondern

durch die Verfügbarkeit freier (+)-Enden im Kern-Netzwerk gesteuert wird. Ob SWS1 überhaupt einen Effekt auf das *Capping* hat muss in weiterführenden Forschungsarbeiten geklärt werden.

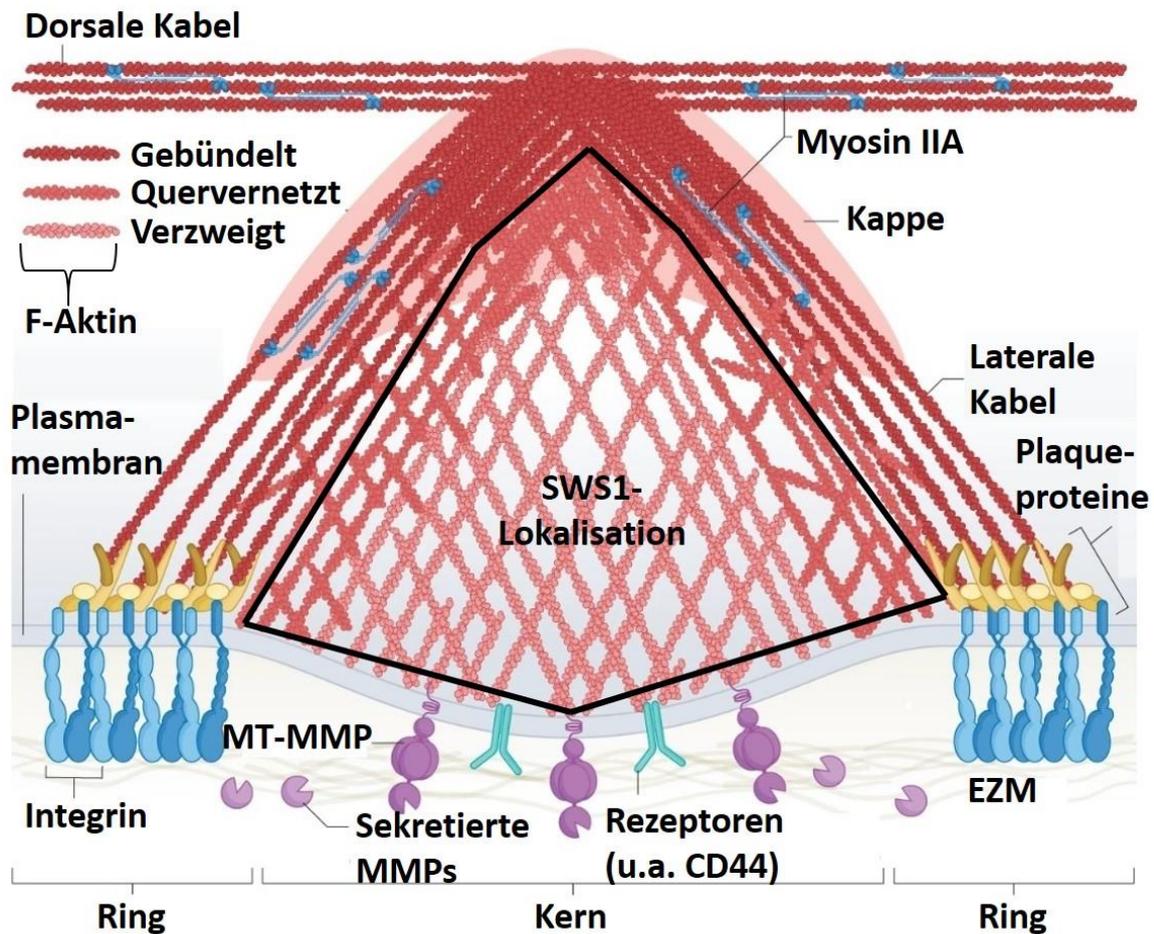


Abbildung 41: Aktualisiertes Modell des Podosomenkerns. Gezeigt sind die drei verschiedenen Organisationen des F-Aktin-Kerns. In der Mitte sind die durch Arp2/3-Nucleation verzweigten Filamente gezeigt, die zur Peripherie hin zu einem Netzwerk quervernetzt werden. Am Rand des Kerns werden sie zu engen Bündeln gepackt und können Myosin IIA binden, wodurch sie die lateralen Kabel bilden. Zusätzlich sind neben den verbindenden Kabeln am oberen Ende des Podosoms auch die Ringproteine gezeigt, die in Membrannähe an die Integrine binden. In schwarz markiert ist der Teil des Aktinnetzwerks, in dem SWS1 den Ergebnissen dieser Doktorarbeit zur Folge unter endogenen Bedingungen lokalisieren kann. Dort reguliert es mutmaßlich den Übergang des Aktinnetzwerks zu eng gepackten Bündeln. Modifiziert nach Linder et al., 2022.

5.3 Limitierung durch Versuchsanordnungen

Die Beobachtung von Podosomen wurde sowohl in fixierten als auch in lebenden Zellen durchgeführt, wobei beide Methoden Vor- und Nachteile aufwiesen. Nach der Zellfixierung wurden einzelne Podosomenkomponenten durch die Verwendung spezifischer Antikörper sichtbar gemacht. Dies hatte den Vorteil, dass fixierte Strukturen deutlich präziser mikroskopiert werden konnten und die Abbildung endogener Expressionslevel möglich war. Im Gegenzug konnte durch die Beobachtung fixierter Podosomen kein Aufschluss über Dynamik, Migrationsverhalten oder Lebenszeit gewonnen werden. Diese Parameter wurden durch die Mikroskopie von Podosomen lebender Zellen erhoben. Da hier jedoch keine Antikörperfärbung durchgeführt werden konnte, mussten diese Experimente nach der Überexpression Fluoreszenz-markierter Proteine stattfinden. Da durch die Überexpression eine deutliche Erhöhung der Proteinkonzentration vorlag, bestand bei jedem Experiment die Möglichkeit, dass die natürliche Podosomendynamik und -architektur beeinflusst wurde. Besonders groß war diese Möglichkeit bei SWS1, da dessen Funktion auf die Aktinorganisation unter anderem konzentrationsabhängig ist (Kwon et al., 2013; Lehne et al., 2022) und in dieser Arbeit zudem eine veränderte Lokalisation nach dessen Überexpression beobachtet werden konnte. Zudem konnten weder endogenes SWS1 noch eine SWS1-Depletion in der *live-cell*-Mikroskopie sichtbar gemacht werden, was eine repräsentative Auswahl der Zellen erschwerte. Die Auswahl repräsentativer Zellen wurde auch durch die hohe biologische Varianz der verwendeten Makrophagen erschwert, die als primäre Zellen aus dem Blut verschiedener Spender isoliert wurden.

Für die FRAP-Experimente wurde fluoreszenzmarkiertes Aktin überexprimiert, um das *Turnover* des Netzwerks korrekt darzustellen. Hierdurch wurde jedoch die Konzentration der Aktinmonomere erhöht, was einen Einfluss auf die Aktinpolymerisationsrate nehmen konnte, da diese unter anderem durch die Verfügbarkeit freier Monomere reguliert wird (Oser und Condeelis, 2009). Um diesen potentiellen Einfluss zu umgehen, wurde der Podosomenkern in allen übrigen Experimenten mit Lifeact-mCherry sichtbar gemacht, einem 17 Aminosäuren langen Peptid, das zwischen die Aktinfilamente interkaliert (Riedl et al., 2008). Obwohl Lifeact nicht direkt die Anzahl der Monomere beeinflusst, wurde dennoch berichtet, dass es einen Einfluss auf die Stabilität der Filamente nehmen kann, da es die Bindung sowohl von Myosin als auch von Cofilin an Aktin verhindern kann (Belyy et al., 2020).

Unabhängig vom gewählten Konstrukt könnten auch die fluoreszierenden Proteine selbst einen Einfluss auf die natürliche Funktion der gebundenen Zielproteine nehmen. Beim *green fluorescent protein* (GFP) handelt es sich um eine 238 Aminosäuren große Faserstruktur, die größtenteils aus beta-Faltblättern besteht (Yang et al., 1996) und ein Molekulargewicht von 27 kDa aufweist. Eine so große Struktur kann die Bindung von Interaktionspartnern erschweren, oder ein Protein daran hindern zwischen

Strukturen zu interkalieren. So wurde beispielsweise gezeigt, dass GFP-Aktin nur sehr schwach in Formin-nukleierte Aktinfilamente eingebaut wird, jedoch eine unveränderte Assoziation mit dem verzweigten Netzwerk aufweist (Belin et al., 2014). Auch bei der Immunoprecipitation von SWS1 wurde gezeigt, dass die höchste Rate an Hintergrundsignalen bei den verwendeten GFP-Konstrukten erhalten wurde, da GFP mutmaßlich viele unspezifische Bindungen mit Aktin und seinen interagierenden Proteinen eingegangen war.

Die Funktion von SWS1 ist stark von seiner Konformation abhängig. Nicht nur der Phosphorylierungsstatus des Stabilisationspunktes S183 (Park et al., 2017), sondern auch die Calcium-Bindung an die *EF-hand*-Domänen beeinflusst die Stabilität des Proteins (Park et al., 2016). Auch interagieren die Domänen des SWS1 miteinander, um beispielsweise die Affinität für Calcium-Ionen zu regulieren (Acosta et al., 2013, Vazquez-Rosa et al., 2014). Die Deletion ganzer Regionen aus der Proteinstruktur, beispielsweise bei dem hier verwendeten Δ LC-Konstrukt, könnte daher die korrekte Faltung von SWS1 beeinträchtigen, bzw. intra-strukturelle Regulationen verändern. Um isolierte Effekte einzelner Domänen beobachten zu können, sollten daher alternative Plasmide generiert werden. Ein besserer Weg der Funktionsaufklärung wäre die Einführung von Punktmutationen, die die SWS1-Funktion durch den Austausch einzelner Aminosäurereste beeinflusst, während dessen grundlegende Struktur beibehalten wird. Die Calciumbindung an den *EF-hand*-Domänen kann beispielsweise durch den Austausch der letzten Aminosäuren der jeweiligen Bindungsschleife (E116 und E152) durch Alanin verhindert werden (Park et al., 2016). Durch diese Konstrukte könnte die Calciumsensitivität des SWS1 untersucht werden, ohne dass intrazelluläre Calciumkonzentrationen moduliert werden müssten. Dies könnte sicherstellen, dass die beobachteten Effekte isoliert durch die Funktion des SWS1 und nicht durch die Vielzahl calciumsensitiver, aber SWS1-unabhängiger Signalwege (Somlyo und Somlyo, 2000) am Podosom ausgelöst wurden. Sollte die Calcium-Konzentration weiter systemisch moduliert werden, muss zudem ein besonderes Augenmerk auf die verwendeten Chemikalien gerichtet werden. Diese wurden im Rahmen der Doktorarbeit in DMSO verdünnt, welches aber selbst einen erhöhenden Effekt auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration haben kann (Yamaoto, 1989) und damit Calcium-verringerte Bedingungen zu einem Teil ausgleichen könnte.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden erste Ergebnisse für SWS1 an Podosomen humaner Makrophagen erhalten. So wurde gezeigt, dass es sich bei SWS1 um einen Bestandteil des Podosomen-Kerns handelt, der sowohl Einfluss auf die Filamentorganisation als auch auf die Kernprotrusion nehmen kann. Damit wurde eine Grundlage bereitet, auf der weitere Forschungen durchgeführt werden können.

Aufgrund des Einflusses von SWS1 auf Aktinfilamente und der in mehreren Modellen beschriebenen differentiellen Filamentorganisation im Podosomenkern muss die genaue Lokalisation von SWS1 im Kern weiter untersucht werden. Hierzu sollte in zukünftigen Experimenten neben der Färbung aller Aktin-Filamente durch Phalloidin auch eine differentielle Färbung der Quervernetzung und der Bündel erfolgen. Dies kann beispielsweise durch eine parallele Färbung von Arp2/3 und Filamin oder α -Actinin durchgeführt werden. Hierbei kann nicht nur aufgeklärt werden, unter welchen Bedingungen SWS1 mit welcher Art der Filamentorganisation assoziiert, sondern auch wie diese sich aufgrund der SWS1-Funktion verändert. Vor allem die Konzentration und die Calcium-Abhängigkeit von SWS1 sind hierbei von großer Wichtigkeit, da deren Einfluss auf die Aktin-Organisation bereits beschrieben (Kwon et al., 2013, Park et al., 2016), in neueren Forschungen jedoch teilweise widerlegt (Lehne et al., 2022) wurde. Dabei sollten vor allem Calcium-insensitive SWS1-Konstrukte verwendet werden, da die systemische Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration auch weitere, SWS1-unabhängige Signalwege beeinflussen kann. Dadurch würde der isolierte Effekt der SWS1-Funktion besser auszuwerten sein. Die SWS1-Konstrukte könnten dabei statt an große Proteine wie GFP an kleinere Peptide wie den HA-, den Myc/His- oder den Alfa-tag (Götzke et al., 2019) gebunden werden, um sterische Wechselwirkungen zu minimieren. Diese könnten sowohl in fixierten Zellen mit anschließender Antikörperfärbung, bzw. *Nanobody*-Bindung visualisiert, als auch in der *live-cell*-Mikroskopie zur Konzentrationserhöhung von SWS1 eingesetzt werden.

Zudem sollte ein genauerer Blick auf die Mechanosensitivität des Podosoms, sowie auf die Lokalisation und Regulation der Kabel gerichtet werden. Während SWS1 nicht an den Kabeln zu lokalisieren scheint, beeinflusst es zumindest die Calcium-abhängige Aktivierung von Myosin IIA. Hierbei müsste als erstes bestätigt werden, dass SWS1 tatsächlich nur an die Aktinbündel des peripheren Kernmoduls, nicht aber an die gebündelten Kabel bindet. Ferner müsste untersucht werden, wodurch diese differentielle Lokalisation reguliert wird und ob daraus ein Rückschluss auf die Organisation und Regulation sowie die Herkunft der Kabel gezogen werden kann. Zuletzt stellt sich die Frage, ob SWS1 durch den Einfluss auf die Myosin IIA-Aktivität trotz differentieller Lokalisation einen Einfluss auf die Kabelkontraktionen nehmen kann. Sollte dies der Fall sein, müsste auch untersucht werden, zu welchen Teilen es die lateralen und die dorsalen Kabel beeinflusst, da letztere mit einem höheren Anteil Myosin IIA dekoriert sind.

Eine genauere Aufklärung der potentiellen Kabelregulation würde damit auch zum bisher nur wenig erforschten Feld der inter-podosomalen Kräfte und Interaktionen beitragen.

Zusätzlich sollten für eine Vervollständigung der hier präsentierten Ergebnisse zukünftige Experimente grundsätzlich in lebenden und fixierten Zellen durchgeführt werden. Bei der *live-cell*-Mikroskopie ist dabei das Hauptaugenmerk auf die hier beschriebenen SWS1-Funktionen der Aktinorganisation und Kraftgeneration zu legen. Zusätzlich zu der bereits durchgeführten Depletion muss hier auch der Einfluss der Überexpression, sowie der Calciumsensitivität aufgeklärt werden. Hierdurch könnte besser geklärt werden, in welchem Ausmaß SWS1 die Aktinorganisation im Kern beeinflusst. Durch die Identifikation der SWS1-Regulation auf das Bündeln und Quervernetzen von Aktinfilamenten könnte nicht nur dessen Funktion präzise erforscht, sondern auch die substrukturelle Regulation von Podosomen genauer aufgeklärt und ein besseres Verständnis von Architektur und Funktion dieser Strukturen erhalten werden.

Poji stellt dabei einen guten Ausgangspunkt dar, um die Versuchsergebnisse automatisch auszuwerten. Während es bereits in der verwendeten Form eine robuste und verlässliche Methode darstellte, könnte es durch einige Funktionsaufwertungen und -Zusätze zu einer Standardmethode werden, um auch spezifische strukturelle Unterschiede besser darstellen zu können. Hierfür sind neben der Kompatibilität mit der *live-cell*-Mikroskopie vor allem die Unterscheidung der Podosomensubformen, sowie eine detailliertere Detektion der Podosomenarchitektur wichtige Funktionen zur Verbesserung der Methode. Poji kann demnach auch dazu beitragen, die beiden Subformen von Podosomen besser zu differenzieren und sowohl in fixierten, als auch lebenden Zellen einen Beitrag für die Erforschung ihrer individuellen Funktion und Regulation zu leisten. Zudem könnte Poji durch seine automatisierte Analyse dazu beitragen, eine allgemeingültige Standardisierung podosomal Parameter in der Invadosomforschung darstellen und damit die Reproduzierbarkeit zwischen unterschiedlichen Arbeitsgruppen und Zellsystem zu verbessern.

Literaturverzeichnis

- Acosta, Y.F., Rodríguez Cruz, E.N., Vaquer, A.d.C. and Vega, I.E. (2013). "Functional and Structural Analysis of the Conserved EFhd2 Protein." *Protein and peptide letters* 20(5): 573-583.
- Adams, A.E.M. and Pringle, J.R. (1991). [51] Staining of actin with fluorochrome-conjugated phalloidin. *Methods in Enzymology*, Academic Press. 194: 729-731.
- Agbulut, O., Huet, A., Niederländer, N., Puceat, M., Menasché, P. and Coirault, C. (2007). "Green Fluorescent Protein Impairs Actin-Myosin Interactions by Binding to the Actin-binding Site of Myosin*." *Journal of Biological Chemistry* 282(14): 10465-10471.
- Avramidou, A., Kroczeck, C., Lang, C., Schuh, W., Jack, H.M. and Mielenz, D. (2007). "The novel adaptor protein Swiprosin-1 enhances BCR signals and contributes to BCR-induced apoptosis." *Cell Death Differ* 14(11): 1936-1947.
- Axelrod, D., Koppel, D.E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W.W. (1976). "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics." *Biophys J* 16(9): 1055-1069.
- Belin, B.J., Goins, L.M. and Mullins, R.D. (2014). "Comparative analysis of tools for live cell imaging of actin network architecture." *BioArchitecture* 4(6): 189-202.
- Belyy, A., Merino, F., Sitsel, O. and Raunser, S. (2020). "Structure of the Lifeact-F-actin complex." *PLoS Biol* 18(11): e3000925.
- Berginski, M.E., Creed, S.J., Cochran, S., Roadcap, D.W., Bear, J.E. and Gomez, S.M. (2014). "Automated analysis of invadopodia dynamics in live cells." *PeerJ* 2: e462.
- Bhuwania, R., Cornfine, S., Fang, Z., Kruger, M., Luna, E.J. and Linder, S. (2012). "Supervillin couples myosin-dependent contractility to podosomes and enables their turnover." *J Cell Sci* 125(Pt 9): 2300-2314.
- Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C. (1986). "Atomic force microscope." *Phys Rev Lett* 56(9): 930-933.
- Blangy, A., Touaitahuata, H., Cres, G. and Pawlak, G. (2012). "Cofilin activation during podosome belt formation in osteoclasts." *PLoS One* 7(9): e45909.
- Block, M.R., Badowski, C., Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Bouin, A.P., Faurobert, E., Gerber-Scokaert, D., Planus, E. and Albiges-Rizo, C. (2008). "Podosome-type adhesions and focal adhesions, so alike yet so different." *Eur J Cell Biol* 87(8-9): 491-506.
- Bouissou, A., Proag, A., Bourg, N., Pingris, K., Cabriel, C., Balor, S., Mangeat, T., Thibault, C., Vieu, C., Dupuis, G., Fort, E., Leveque-Fort, S., Maridonnew-Parini, I. and Poincloux, R. (2017). "Podosome Force Generation Machinery: A Local Balance between Protrusion at the Core and Traction at the Ring." *ACS Nano* 11(4): 4028-4040.
- Branon, T.C., Bosch, J.A., Sanchez, A.D., Udeshi, N.D., Svinkina, T., Carr, S.A., Feldman, J.L., Perrimon, N. and Ting, A.Y. (2018). "Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID." *Nat Biotechnol* 36(9): 880-887.
- Burgstaller, G. and Gimona, M. (2004). "Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains." *J Cell Sci* 117(Pt 2): 223-231.
- Burns, S., Thrasher, A.J., Blundell, M.P., Machesky, L. and Jones, G.E. (2001). "Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation." *Blood* 98(4): 1142-1149.
- Calle, Y., Carragher, N.O., Thrasher, A.J. and Jones, G.E. (2006). "Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility." *J Cell Sci* 119(Pt 11): 2375-2385.
- Casella, J.F., Flanagan, M.D. and Lin, S. (1981). "Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change." *Nature* 293(5830): 302-305.

- Cervero, P., Himmel, M., Kruger, M. and Linder, S. (2012). "Proteomic analysis of podosome fractions from macrophages reveals similarities to spreading initiation centres." *Eur J Cell Biol* 91(11-12): 908-922.
- Cervero, P., Panzer, L. and Linder, S. (2013). "Podosome reformation in macrophages: assays and analysis." *Methods Mol Biol* 1046: 97-121.
- Cervero, P., Wiesner, C., Bouissou, A., Poincloux, R. and Linder, S. (2018). "Lymphocyte-specific protein 1 regulates mechanosensory oscillation of podosomes and actin isoform-based actomyosin symmetry breaking." *Nature Communications* 9(1): 515.
- Chabadel, A., Banon-Rodriguez, I., Cluet, D., Rudkin, B.B., Wehrle-Haller, B., Genot, E., Jurdic, P., Anton, I.M. and Saltel, F. (2007). "CD44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts." *Mol Biol Cell* 18(12): 4899-4910.
- Ciobanasiu, C., Faivre, B. and Le Clairche, C. (2014). "Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin-vinculin complex reinforces actin anchoring." *Nat Commun* 5: 3095.
- Courson, D.S. and Rock, R.S. (2010). "Actin cross-link assembly and disassembly mechanics for alpha-Actinin and fascin." *J Biol Chem* 285(34): 26350-26357.
- Dalaka, E., Kronenberg, N.M., Liehm, P., Segall, J.E., Prystowsky, M.B. and Gather, M.C. (2020). "Direct measurement of vertical forces shows correlation between mechanical activity and proteolytic ability of invadopodia." *Sci Adv* 6(11): eaax6912.
- Dandekar, R.C., Kingaonkar, A.V. and Dhabeekar, G.S. (2011). "Role of macrophages in malignancy." *Ann Maxillofac Surg* 1(2): 150-154.
- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M. and Sheetz, M.P. (2009). "Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding." *Science* 323(5914): 638-641.
- Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J.C., Jurdic, P. and Bard, F. (2003). "Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein." *Mol Biol Cell* 14(2): 407-416.
- Destaing, O., Saltel, F., Gilquin, B., Chabadel, A., Khochbin, S., Ory, S. and Jurdic, P. (2005). "A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts." *J Cell Sci* 118(Pt 13): 2901-2911.
- Destaing, O., Planus, E., Bouvard, D., Oddou, C., Badowski, C., Bossy, V., Raducanu, A., Fourcade, B., Albiges-Rizo, C. and Block, M.R. (2010). "beta1A integrin is a master regulator of invadosome organization and function." *Mol Biol Cell* 21(23): 4108-4119.
- Dutting, S., Brachs, S. and Mielenz, D. (2011). "Fraternal twins: Swiprosin-1/EFhd2 and Swiprosin-2/EFhd1, two homologous EF-hand containing calcium binding adaptor proteins with distinct functions." *Cell Commun Signal* 9: 2.
- El Azzouzi, K., Wiesner, C. and Linder, S. (2016). "Metalloproteinase MT1-MMP islets act as memory devices for podosome reemergence." *J Cell Biol* 213(1): 109-125.
- Epelman, S., Lavine, K.J. and Randolph, G.J. (2014). "Origin and functions of tissue macrophages." *Immunity* 41(1): 21-35.
- Ershov, D., Phan, M.S., Pylvänäinen, J.W., Rigaud, S.U., Le Blanc, L., Charles-Orszag, A., Conway, J.R.W., Laine, R.F., Roy, N.H., Bonazzi, D., Duménil, G., Jacquemet, G. and Tinevez, J.Y. (2022). "Track-Mate 7: integrating state-of-the-art segmentation algorithms into tracking pipelines." *Nat Methods* 19(7): 829-832.
- Evans, J.G., Correia, I., Krasavina, O., Watson, N. and Matsudaira, P. (2003). "Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation." *J Cell Biol* 161(4): 697-705.
- Ezzoukhry, Z., Henriët, E., Cordelieres, F.P., Dupuy, J.W., Maitre, M., Gay, N., Di-Tommaso, S., Mercier, L., Goetz, J.G., Peter, M., Bard, F., Moreau, V., Raymond, A.A. and Saltel, F. (2018). "Combining laser capture microdissection and proteomics reveals an active translation machinery controlling invadosome formation." *Nat Commun* 9(1): 2031.

- Fan, C.C., Cheng, W.C., Huang, Y.C., Sher, Y.P., Liou, N.J., Chien, Y.C., Lin, P.S., Lin, P.S., Chen, C.H. and Chang, W.C. (2017). "EFHD2 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and correlates with postsurgical recurrence of stage I lung adenocarcinoma." *Sci Rep* 7(1): 14617.
- Fantin, A., Vieira, J.M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhiy, S., Peri, F., Wilson, S.W. and Ruhrberg, C. (2010). "Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction." *Blood* 116(5): 829-840.
- Ferrer-Acosta, Y., Rodriguez-Cruz, E.N., Orange, F., De Jesus-Cortes, H., Madera, B., Vaquer-Alicea, J., Ballester, J., Guinel, M.J., Bloom, G.S. and Vega, I.E. (2013). "EFhd2 is a novel amyloid protein associated with pathological tau in Alzheimer's disease." *J Neurochem* 125(6): 921-931.
- Gaidano, G., Bergui, L., Schena, M., Gaboli, M., Cremona, O., Marchisio, P.C. and Caligaris-Cappio, F. (1990). "Integrin distribution and cytoskeleton organization in normal and malignant monocytes." *Leukemia* 4(10): 682-687.
- Ginhoux, F. and Jung, S. (2014). "Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis." *Nat Rev Immunol* 14(6): 392-404.
- Gircz, Z., Makkos, A., Schreckenber, R., Pöling, J., Lörchner, H., Kiss, K., Bencsik, P., Braun, T., Schulz, R., Ferdinandy, P. and Schlüter, K.D. (2020). "Swiprosin-1/EFhd-2 Expression in Cardiac Remodeling and Post-Infarct Repair: Effect of Ischemic Conditioning." *Int J Mol Sci* 21(9).
- Gong, Z., van den Dries, K., Cambi, A. and Shenoy, V.B. (2021). "Chemo-mechanical Diffusion Waves Orchestrate Collective Dynamics of Immune Cell Podosomes." *bioRxiv*: 2021.2011.2023.469591.
- Goode, B.L. and Eck, M.J. (2007). "Mechanism and function of formins in the control of actin assembly." *Annu Rev Biochem* 76: 593-627.
- Götzke, H., Kilisch, M., Martínez-Carranza, M., Sograte-Idrissi, S., Rajavel, A., Schlichthaerle, T., Engels, N., Jungmann, R., Stenmark, P., Opazo, F. and Frey, S. (2019). "The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications." *Nature Communications* 10(1): 4403.
- Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T. and Schwartz, M.A. (2010). "Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics." *Nature* 466(7303): 263-266.
- Guiet, R., Vérollet, C., Lamsoul, I., Cougoule, C., Poincloux, R., Labrousse, A., Calderwood, D.A., Glogauer, M., Lutz, P.G. and Maridonneau-Parini, I. (2012). "Macrophage mesenchymal migration requires podosome stabilization by filamin A." *J Biol Chem* 287(16): 13051-13062.
- Han, Y., Yu, G., Sarioglu, H., Caballero-Martinez, A., Schlott, F., Ueffing, M., Haase, H., Peschel, C. and Krackhardt, A.M. (2013). "Proteomic investigation of the interactome of FMNL1 in hematopoietic cells unveils a role in calcium-dependent membrane plasticity." *J Proteomics* 78: 72-82.
- Hepler, P.K. (2016). "The Cytoskeleton and Its Regulation by Calcium and Protons." *Plant Physiol* 170(1): 3-22.
- Herzog, R., van den Dries, K., Cervero, P. and Linder, S. (2020). "Poji: a Fiji-based tool for analysis of podosomes and associated proteins." *J Cell Sci* 133(8).
- Hey, S., Ratt, A. and Linder, S. (2022). "There and back again: Intracellular trafficking, release and recycling of matrix metalloproteinases." *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1869(4): 119189.
- Hornbruch-Freitag, C., Griemert, B., Buttgereit, D. and Renkawitz-Pohl, R. (2011). "Drosophila Swiprosin-1/EFHD2 accumulates at the prefusion complex stage during Drosophila myoblast fusion." *J Cell Sci* 124(Pt 19): 3266-3278.
- Hotulainen, P. and Lappalainen, P. (2006). "Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells." *Journal of Cell Biology* 173(3): 383-394.
- Huh, Y.H., Kim, S.H., Chung, K.H., Oh, S., Kwon, M.S., Choi, H.W., Rhee, S., Ryu, J.H., Park, Z.Y., Jun, C.D. and Song, W.K. (2013). "Swiprosin-1 modulates actin dynamics by regulating the F-actin accessibility to cofilin." *Cell Mol Life Sci* 70(24): 4841-4854.

- Humphries, J.D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M.J. and Ballestrem, C. (2007). "Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin." *J Cell Biol* 179(5): 1043-1057.
- Italiani, P. and Boraschi, D. (2014). "From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation." *Front Immunol* 5: 514.
- Johnson, B.S., Chafin, L., Farkas, D., Adair, J., Elhance, A., Farkas, L., Bednash, J.S. and Londino, J.D. (2022). "MicroID2: A Novel Biotin Ligase Enables Rapid Proximity-Dependent Proteomics." *Mol Cell Proteomics* 21(7): 100256.
- Joosten, B., Willemsse, M., Franssen, J., Cambi, A. and van den Dries, K. (2018). "Super-Resolution Correlative Light and Electron Microscopy (SR-CLEM) Reveals Novel Ultrastructural Insights Into Dendritic Cell Podosomes." *Front Immunol* 9: 1908.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P. and Hassabis, D. (2021). "Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold." *Nature* 596(7873): 583-589.
- Kopp, P., Lammers, R., Aepfelbacher, M., Woehlke, G., Rudel, T., Machuy, N., Steffen, W. and Linder, S. (2006). "The kinesin KIF1C and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages." *Mol Biol Cell* 17(6): 2811-2823.
- Kronenberg, N.M., Liehm, P., Steude, A., Knipper, J.A., Borger, J.G., Scarcelli, G., Franze, K., Powis, S.J. and Gather, M.C. (2017). "Long-term imaging of cellular forces with high precision by elastic resonator interference stress microscopy." *Nat Cell Biol* 19(7): 864-872.
- Kühn, S. and Geyer, M. (2014). "Formins as effector proteins of Rho GTPases." *Small GTPases* 5: e29513.
- Kwon, M.S., Park, K.R., Kim, Y.D., Na, B.R., Kim, H.R., Choi, H.J., Piragyte, I., Jeon, H., Chung, K.H., Song, W.K., Eom, S.H. and Jun, C.D. (2013). "Swiprosin-1 is a novel actin bundling protein that regulates cell spreading and migration." *PLoS One* 8(8): e71626.
- Labernadie, A., Bouissou, A., Delobelle, P., Balor, S., Voituriez, R., Proag, A., Fourquaux, I., Thibault, C., Vieu, C., Poincloux, R., Charriere, G.M. and Maridonneau-Parini, I. (2014). "Protrusion force microscopy reveals oscillatory force generation and mechanosensing activity of human macrophage podosomes." *Nat Commun* 5: 5343.
- Lakkakorpi, P.T., Nakamura, I., Nagy, R.M., Parsons, J.T., Rodan, G.A. and Duong, L.T. (1999). "Stable Association of PYK2 and p130Cas in Osteoclasts and Their Co-localization in the Sealing Zone*." *Journal of Biological Chemistry* 274(8): 4900-4907.
- Laskin, D.L., Sunil, V.R., Gardner, C.R. and Laskin, J.D. (2011). "Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction?" *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51: 267-288.
- Lehne, F., Pokrant, T., Parbin, S., Salinas, G., Großhans, J., Rust, K., Faix, J. and Bogdan, S. (2022). "Calcium bursts allow rapid reorganization of EFhD2/Swip-1 cross-linked actin networks in epithelial wound closure." *Nat Commun* 13(1): 2492.
- Li, S.C., Goto, N.K., Williams, K.A. and Deber, C.M. (1996). "Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(13): 6676-6681.
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M. and Aepfelbacher, M. (1999). "Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(17): 9648-9653.

- Linder, S., Higgs, H., Hufner, K., Schwarz, K., Pannicke, U. and Aepfelbacher, M. (2000). "The Polarization Defect of Wiskott-Aldrich Syndrome Macrophages Is Linked to Dislocalization of the Arp2/3 Complex." *The Journal of Immunology* 165(1): 221-225.
- Linder, S. (2007). "The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation." *Trends Cell Biol* 17(3): 107-117.
- Linder, S. and Wiesner, C. (2015). "Tools of the trade: podosomes as multipurpose organelles of monocytic cells." *Cell Mol Life Sci* 72(1): 121-135.
- Linder, S. and Wiesner, C. (2016). "Feel the force: Podosomes in mechanosensing." *Exp Cell Res* 343(1): 67-72.
- Linder, S. and Cervero, P. (2020). "The podosome cap: past, present, perspective." *Eur J Cell Biol* 99(5): 151087.
- Linder, S., Cervero, P., Eddy, R. and Condeelis, J. (2022). "Mechanisms and roles of podosomes and invadopodia." *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Liu, C. and Hermann, T.E. (1978). "Characterization of ionomycin as a calcium ionophore." *J Biol Chem* 253(17): 5892-5894.
- Lorente, G., Syriani, E. and Morales, M. (2014). "Actin filaments at the leading edge of cancer cells are characterized by a high mobile fraction and turnover regulation by profilin I." *PLoS One* 9(1): e85817.
- Luxenburg, C., Parsons, J., Addadi, L. and Geiger, B. (2007). "Involvement of the Src-cortactin pathway in podosome formation and turnover during polarization of cultured osteoclasts." *Journal of cell science* 119: 4878-4888.
- Luxenburg, C., Winograd-Katz, S., Addadi, L. and Geiger, B. (2012). "Involvement of actin polymerization in podosome dynamics." *J Cell Sci* 125(Pt 7): 1666-1672.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. and Sica, A. (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." *Trends Immunol* 23(11): 549-555.
- Maun, N.A., Speicher, D.W., DiNubile, M.J. and Southwick, F.S. (1996). "Purification and properties of a Ca(2+)-independent barbed-end actin filament capping protein, CapZ, from human polymorphonuclear leukocytes." *Biochemistry* 35(11): 3518-3524.
- May, D.G., Scott, K.L., Campos, A.R. and Roux, K.J. (2020). "Comparative Application of BioID and TurboID for Protein-Proximity Biotinylation." *Cells* 9(5).
- Meddens, M.B., Rieger, B., Figdor, C.G., Cambi, A. and van den Dries, K. (2013). "Automated podosome identification and characterization in fluorescence microscopy images." *Microsc Microanal* 19(1): 180-189.
- Mielenz, D. and Gunn-Moore, F. (2016). "Physiological and pathophysiological functions of Swiprosin-1/EFhd2 in the nervous system." *Biochem J* 473(16): 2429-2437.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S. and Steinegger, M. (2022). "ColabFold: making protein folding accessible to all." *Nature Methods* 19(6): 679-682.
- Monsky, W.L. and Chen, W.T. (1993). "Proteases of cell adhesion proteins in cancer." *Semin Cancer Biol* 4(4): 251-258.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C. and Génot, E. (2003). "Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA." *Mol Cell Biol* 23(19): 6809-6822.
- Moreno-Layseca, P., Jääntti, N.Z., Godbole, R., Sommer, C., Jacquemet, G., Al-Akhrass, H., Conway, J.R.W., Kronqvist, P., Kallionpää, R.E., Oliveira-Ferrer, L., Cervero, P., Linder, S., Aepfelbacher, M., Zauber, H., Rae, J., Parton, R.G., Disanza, A., Scita, G., Mayor, S., Selbach, M., Veltel, S. and Ivaska, J. (2021). "Cargo-specific recruitment in clathrin- and dynamin-independent endocytosis." *Nat Cell Biol* 23(10): 1073-1084.

- Mullins, R.D., Heuser, J.A. and Pollard, T.D. (1998). "The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(11): 6181-6186.
- Murphy, D.A. and Courtneidge, S.A. (2011). "The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(7): 413-426.
- Oikawa, T., Okamura, H., Dietrich, F., Senju, Y., Takenawa, T. and Suetsugu, S. (2013). "IRSp53 mediates podosome formation via VASP in NIH-Src cells." *PLoS one* 8: e60528.
- Panzer, L., Trube, L., Klose, M., Joosten, B., Slotman, J., Cambi, A. and Linder, S. (2016). "The formins FHOD1 and INF2 regulate inter- and intra-structural contractility of podosomes." *J Cell Sci* 129(2): 298-313.
- Park, K.R., Kwon, M.S., An, J.Y., Lee, J.G., Youn, H.S., Lee, Y., Kang, J.Y., Kim, T.G., Lim, J.J., Park, J.S., Lee, S.H., Song, W.K., Cheong, H.K., Jun, C.D. and Eom, S.H. (2016). "Structural implications of Ca(2+)-dependent actin-bundling function of human EFhd2/Swiprosin-1." *Sci Rep* 6: 39095.
- Park, K.R., An, J.Y., Kang, J.Y., Lee, J.G., Lee, Y., Mun, S.A., Jun, C.D., Song, W.K. and Eom, S.H. (2017). "Structural mechanism underlying regulation of human EFhd2/Swiprosin-1 actin-bundling activity by Ser183 phosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* 483(1): 442-448.
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A. (1984). "Quantitative analysis of the effect of Acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation." *Biochemistry* 23(26): 6631-6641.
- Proag, A., Bouissou, A., Mangeat, T., Voituriez, R., Delobelle, P., Thibault, C., Vieu, C., Maridonneau-Parini, I. and Poincloux, R. (2015). "Working Together: Spatial Synchrony in the Force and Actin Dynamics of Podosome First Neighbors." *ACS Nano* 9(4): 3800-3813.
- Proag, A., Bouissou, A., Vieu, C., Maridonneau-Parini, I. and Poincloux, R. (2016). "Evaluation of the force and spatial dynamics of macrophage podosomes by multi-particle tracking." *Methods* 94: 75-84.
- Rafiq, N.B.M., Nishimura, Y., Plotnikov, S.V., Thiagarajan, V., Zhang, Z., Shi, S., Natarajan, M., Viasnoff, V., Kanchanawong, P., Jones, G.E. and Bershadsky, A.D. (2019). "A mechano-signalling network linking microtubules, myosin IIA filaments and integrin-based adhesions." *Nat Mater* 18(6): 638-649.
- Ramesh, T.P., Kim, Y.D., Kwon, M.S., Jun, C.D. and Kim, S.W. (2009). "Swiprosin-1 Regulates Cytokine Expression of Human Mast Cell Line HMC-1 through Actin Remodeling." *Immune Netw* 9(6): 274-284.
- Reimer, D., Heyland, E., Wiesmann, V., Wittenberg, T., Brachs, S., Voehringer, D., Hauser, A., Niesner, R. and Mielenz, D. (2017). "EFhd2/ Swiprosin-1 regulates the cytoskeleton of B lymphocytes and impacts germinal center reaction." *The Journal of Immunology* 198(1 Supplement): 143.111-143.111.
- Richter, K.N., Revelo, N.H., Seitz, K.J., Helm, M.S., Sarkar, D., Saleeb, R.S., D'Este, E., Eberle, J., Wagner, E., Vogl, C., Lazaro, D.F., Richter, F., Coy-Vergara, J., Coceano, G., Boyden, E.S., Duncan, R.R., Hell, S.W., Lauterbach, M.A., Lehnart, S.E., Moser, T., Outeiro, T.F., Rehling, P., Schwappach, B., Testa, I., Zapiec, B. and Rizzoli, S.O. (2018). "Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy." *Embo j* 37(1): 139-159.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M. and Wedlich-Soldner, R. (2008). "Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin." *Nat Methods* 5(7): 605-607.
- Rould, M.A., Wan, Q., Joel, P.B., Lowey, S. and Trybus, K.M. (2006). "Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states." *J Biol Chem* 281(42): 31909-31919.
- Schachtner, H., Calaminus, S.D., Thomas, S.G. and Machesky, L.M. (2013). "Podosomes in adhesion, migration, mechanosensing and matrix remodeling." *Cytoskeleton (Hoboken)* 70(10): 572-589.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A. (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." *Nature Methods* 9(7): 676-682.
- Sheetz, M.P., Felsenfeld, D., Galbraith, C.G. and Choquet, D. (1999). "Cell migration as a five-step cycle." *Biochem Soc Symp* 65: 233-243.
- Slyter, H.S. and Lowey, S. (1967). "Substructure of the myosin molecule as visualized by electron microscopy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 58(4): 1611-1618.
- Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (2000). "Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II." *J Physiol* 522 Pt 2(Pt 2): 177-185.
- Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R. and Mitchison, T.J. (2003). "Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor." *Science* 299(5613): 1743-1747.
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M. and Marchisio, P.C. (1985). "Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes." *Exp Cell Res* 159(1): 141-157.
- Thylur, R.P., Kim, Y.D., Kwon, M.S., Oh, H.M., Kwon, H.K., Kim, S.H., Im, S.H., Chun, J.S., Park, Z.Y. and Jun, C.D. (2009). "Swiprosin-1 is expressed in mast cells and up-regulated through the protein kinase C beta I/eta pathway." *J Cell Biochem* 108(3): 705-715.
- Tinevez, J.Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G.M., Reynolds, G.D., Laplantine, E., Bednarek, S.Y., Shorte, S.L. and Eliceiri, K.W. (2017). "TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking." *Methods* 115: 80-90.
- Tu, Y., Zhang, L., Tong, L., Wang, Y., Zhang, S., Wang, R., Li, L. and Wang, Z. (2018). "EFhd2/swiprosin-1 regulates LPS-induced macrophage recruitment via enhancing actin polymerization and cell migration." *Int Immunopharmacol* 55: 263-271.
- Urbano, R., Park, E.-S., Tretina, K., Tunaru, A., Gaudet, R.G., Hu, X., Wang, D.-Z. and MacMicking, J.D. (2022). "Human XIRP1 is a macrophage podosome protein utilized by *Listeria* for actin-based motility." *bioRxiv*: 2022.2008.2028.505595.
- Van Audenhove, I., Debeuf, N., Boucherie, C. and Gettemans, J. (2015). "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." *Biochim Biophys Acta* 1853(5): 940-952.
- van den Dries, K., van Helden, S.F., te Riet, J., Diez-Ahedo, R., Manzo, C., Oud, M.M., van Leeuwen, F.N., Brock, R., Garcia-Parajo, M.F., Cambi, A. and Figdor, C.G. (2012). "Geometry sensing by dendritic cells dictates spatial organization and PGE(2)-induced dissolution of podosomes." *Cell Mol Life Sci* 69(11): 1889-1901.
- van den Dries, K., Meddens, M.B., de Keijzer, S., Shekhar, S., Subramaniam, V., Figdor, C.G. and Cambi, A. (2013). "Interplay between myosin IIA-mediated contractility and actin network integrity orchestrates podosome composition and oscillations." *Nat Commun* 4: 1412.
- van den Dries, K., Schwartz, S.L., Byars, J., Meddens, M.B., Bolomini-Vittori, M., Lidke, D.S., Figdor, C.G., Lidke, K.A. and Cambi, A. (2013b). "Dual-color superresolution microscopy reveals nanoscale organization of mechanosensory podosomes." *Mol Biol Cell* 24(13): 2112-2123.
- van den Dries, K., Nahidiazar, L., Slotman, J.A., Meddens, M.B.M., Pandzic, E., Joosten, B., Ansems, M., Schouwstra, J., Meijer, A., Steen, R., Wijers, M., Fransen, J., Houtsmuller, A.B., Wiseman, P.W., Jalink, K. and Cambi, A. (2019). "Modular actin nano-architecture enables podosome protrusion and mechanosensing." *Nat Commun* 10(1): 5171.
- van den Dries, K., Linder, S., Maridonneau-Parini, I. and Poincloux, R. (2019b). "Probing the mechanical landscape - new insights into podosome architecture and mechanics." *J Cell Sci* 132(24).

- van Furth, R. and Cohn, Z.A. (1968). "The origin and kinetics of mononuclear phagocytes." *J Exp Med* 128(3): 415-435.
- van Furth, R., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphrey, J.H., Spector, W.G. and Langevoort, H.L. (1972). "The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells." *Bull World Health Organ* 46(6): 845-852.
- Van Goethem, E., Poincloux, R., Gauffre, F., Maridonneau-Parini, I. and Le Cabec, V. (2010). "Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures." *J Immunol* 184(2): 1049-1061.
- van Helden, S.F., Oud, M.M., Joosten, B., Peterse, N., Figdor, C.G. and van Leeuwen, F.N. (2008). "PGE2-mediated podosome loss in dendritic cells is dependent on actomyosin contraction downstream of the RhoA-Rho-kinase axis." *J Cell Sci* 121(Pt 7): 1096-1106.
- Vazquez-Rosa, E., Rodriguez-Cruz, E.N., Serrano, S., Rodriguez-Laureano, L. and Vega, I.E. (2014). "Cdk5 phosphorylation of EFhd2 at S74 affects its calcium binding activity." *Protein Sci* 23(9): 1197-1207.
- Vega, I.E., Traverso, E.E., Ferrer-Acosta, Y., Matos, E., Colon, M., Gonzalez, J., Dickson, D., Hutton, M., Lewis, J. and Yen, S.H. (2008). "A novel calcium-binding protein is associated with tau proteins in tauopathy." *J Neurochem* 106(1): 96-106.
- Vega, I.E., Umstead, A. and Kanaan, N.M. (2019). "EFhd2 Affects Tau Liquid-Liquid Phase Separation." *Front Neurosci* 13: 845.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S. and Horwitz, A.R. (2009). "Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(11): 778-790.
- Vuadens, F., Rufer, N., Kress, A., Corthésy, P., Schneider, P. and Tissot, J.-D. (2004). "Identification of swiprosin 1 in human lymphocytes." *PROTEOMICS* 4(8): 2216-2220.
- Wales, P., Schuberth, C.E., Aufschneider, R., Fels, J., García-Aguilar, I., Janning, A., Dlugos, C.P., Schäfer-Herte, M., Klingner, C., Wälte, M., Kuhlmann, J., Menis, E., Hockaday Kang, L., Maier, K.C., Hou, W., Russo, A., Higgs, H.N., Pavenstädt, H., Vogl, T., Roth, J., Qualmann, B., Kessels, M.M., Martin, D.E., Mulder, B. and Wedlich-Söldner, R. (2016). "Calcium-mediated actin reset (CaAR) mediates acute cell adaptations." *Elife* 5.
- Weber, K., Hey, S., Cervero, P. and Linder, S. (2022). "The circle of life: Phases of podosome formation, turnover and reemergence." *Eur J Cell Biol* 101(2): 151218.
- Wegner, A. and Isenberg, G. (1983). "12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(16): 4922-4925.
- Wiesner, C., Faix, J., Himmel, M., Bentzien, F. and Linder, S. (2010). "KIF5B and KIF3A/KIF3B kinesins drive MT1-MMP surface exposure, CD44 shedding, and extracellular matrix degradation in primary macrophages." *Blood* 116(9): 1559-1569.
- Wiesner, C., Le-Cabec, V., El Azzouzi, K., Maridonneau-Parini, I. and Linder, S. (2014). "Podosomes in space." *Cell Adhesion & Migration* 8(3): 179-191.
- Wynn, T.A., Chawla, A. and Pollard, J.W. (2013). "Macrophage biology in development, homeostasis and disease." *Nature* 496(7446): 445-455.
- Yamamoto, N. (1989). "Effect of dimethyl sulfoxide on cytosolic ionized calcium concentration and cytoskeletal organization of hepatocytes in a primary culture." *Cell Struct Funct* 14(1): 75-85.
- Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. and Wang, H. (2014). "Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases." *Biomarker Research* 2(1): 1.

- Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Grano, M., Rubinacci, A., Abbadini, M., Gaboli, M. and Marchisio, P.C. (1989). "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." *Exp Cell Res* 182(2): 645-652.
- Zhou, Y., Frey, T.K. and Yang, J.J. (2009). "Viral calciomics: interplays between Calcium and virus." *Cell Calcium* 46(1): 1-17.
- Zhou, Y., Feng, Z., Cao, F., Liu, X., Xia, X. and Yu, C.H. (2020). "Abl-mediated PI3K activation regulates macrophage podosome formation." *J Cell Sci*.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADF	<i>Actin depolymerizing factor</i>
ADP	Adenosin-Diphosphat
AF	AlexaFluor
AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
Arp2/3	<i>Actin related protein-2/3</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CapG	<i>Macrophage-capping protein</i>
CapZ	<i>F-Actin capping protein</i>
CD14/44	<i>Cluster of Differentiation 14/44</i>
CDC42	<i>Cell division control protein 42</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxy-Nukleosid-Triphosphat
(D)PBS	<i>(Dulbecco's) Phosphate buffered saline</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylendiamin-Tetraacetat</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERISM	<i>Elastic Resonator Interference Stress Microscopy</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
F-Aktin	Filamentäres Aktin
FHOD 1	<i>FH1/FH2 domain-containing protein 1</i>
FIJI	<i>FIJI is just imageJ</i>
FMNL-1	<i>Formin-like protein 1</i>
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
G-Aktin	Globuläres Aktin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HCl	Salzsäure
HRP	<i>Horse raddish peroxidase</i>
HS-1	<i>Hematopoietic lineage cell-specific protein 1</i>
IF	Immunofluoreszenz
INF 2	<i>Inverted formin 2</i>
IP	Immunopräzipitation
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	<i>Low complexity region</i>
LSP1	<i>Lymphocyte specific protein 1</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight</i>
min	Minute
µm	Mikrometer
(MT1)-MMP	(Membrantyp 1)-Matrixmetalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
Opti-MEM	Optimiertes <i>minimal essential medium</i>
p190RhoGAP	<i>p190-Rho-GTPase-activating protein</i>

PBF	Podosomen-bedeckte Fläche
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFF	Podosomenfreie Fläche
PFM	<i>Protrusion force microscopy</i>
PIC	Proteinase Inhibitor Cocktail
(p)MLC	<i>(phospho)-Myosin light chain</i>
Poji	<i>Podosome analysis by Fiji</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i>
Rab5	<i>Ras-related Protein 5A</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RhoA	<i>Ras-Homology family member A</i>
SDS	<i>Sodium-dodecylsulfat</i>
sec	Sekunde
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
siRNA	<i>Small interferin ribonucleic acid</i>
SWS1	Swiprosin-1
TAE-Puffer	<i>Tris-Aceta-EDTA-Puffer</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline mit Tween-20</i>
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WB	Western Blot

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Migrationsmodi humaner Makrophagen.	6
Abbildung 2: Makrophage mit Podosomen	8
Abbildung 3: Schematischer Aufbau von Podosomen.	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Podosomenlebenszyklus.....	12
Abbildung 5: Protrusion des Podosoms durch Aktinpolymerisation.	14
Abbildung 6: Mechanosensitive Rekrutierung von Ringproteinen	16
Abbildung 7: Schematische Struktur eines Myosin IIA-Dimers.....	17
Abbildung 8: Schematische Abbildung des oberen Podosomenteils.....	19
Abbildung 9: Domänenübersicht des humanen SWS1.....	20
Abbildung 10: Strukturvorhersage des humanen SWS1 durch AlphaFold.....	21
Abbildung 11: Regulation der Aktinbündelung durch SWS1-Phosphorylierung.....	23
Abbildung 12: Übersicht über Methoden der Protrusionsmessung.	26
Abbildung 13: Übersicht über die erstellten SWS1-Konstrukte.	40
Abbildung 14: Podosomendetektion über die <i>Analyze-Particles</i> -Funktion	46
Abbildung 15: Vergleich der zwei Detektionsmethoden	47
Abbildung 16: Übersicht über die Funktionsweise von Poji.....	50
Abbildung 17: Unterscheidung des Migrationsverhaltens durch Poji.	53
Abbildung 18: Degradation von Rhodamin-Gelatine durch Podosomen.....	54
Abbildung 19: Verlust des Vinculin-Rings durch Cytochalasin D.....	55
Abbildung 20: Podosomenmodell nach Poji-Analyse.....	56
Abbildung 21: Endogene Lokalisation von SWS1.	59
Abbildung 22: Einfluss der Calcium-Konzentration auf fixierte Zellen.....	61
Abbildung 23: siRNA-vermittelte Depletionseffizienz von SWS1.	62
Abbildung 24: Einfluss der SWS1-Depletion auf Parameter fixierter Zellen.	63
Abbildung 25: Einfluss der SWS1-Überexpression auf die Parameter fixierter Makrophagen.....	64
Abbildung 26: Einfluss der SWS1-Überexpression auf die Podosomen-Lebenszeit.	67
Abbildung 27: Podosomenoszillation verschiedener Podosomensubformen.	68
Abbildung 28: Lebenszeitanalyse nach SWS1-Depletion und Wiederherstellung.	69
Abbildung 29: FRAP von Vorläufer- und Nachfolger-Podosomen nach SWS1-Depletion.....	70
Abbildung 30: Einfluss der SWS1-Depletion auf die Protrusionskraft.	72
Abbildung 31: Untersuchung der Myosin-Aktivität (zellulär).....	73
Abbildung 32: Untersuchung der Myosin-Aktivität (podosomal).	75
Abbildung 33: Polarisiertes Podosomenprofil durch halbe Rotation.....	83
Abbildung 34: Detektionsartefakt bei der Erstellung des mittleren Podosomenprofils.....	84
Abbildung 35: Unterschiedliche Podosomengrößen.	85
Abbildung 36: Überblick über das Podosomenmodell in vereinfachter Form.....	89
Abbildung 37: Schematische Einteilung der Podosomen.....	92
Abbildung 38: Übersicht über die Aktinorganisation im Podosomenkern.	96
Abbildung 39: Übersicht über die podosomalen Kräfte.....	97
Abbildung 40: Einfluss der Aktinarchitektur auf die Protrusion.....	98
Abbildung 41: Aktualisiertes Modell des Podosomenkerns.....	106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien.....	27
Tabelle 2: Übersicht der Zellkultur-Zusätze.....	28
Tabelle 3: Rezepte für die verwendeten Pufferlösungen.....	28
Tabelle 4: Verwendete Antikörper und Färbereagenzien.....	29
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide.....	29
Tabelle 6: Verwendete Konstrukte.....	30
Tabelle 7: Verwendete Enzyme.....	30
Tabelle 8: Kommerziell erworbene Kits.	30
Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	31
Tabelle 10: Inventar der Laborarbeit.....	31
Tabelle 11: SP5-Mikroskop für fixierte Zellen.	32
Tabelle 12: Visitron-Mikroskop für lebende Zellen.....	32
Tabelle 13: Verwendete Software.....	33
Tabelle 14: Mastermix der Standard-PCR.	38
Tabelle 15: Programm der Standard-PCR.....	38
Tabelle 16: Mastermix der Punktmutations-PCR.....	39
Tabelle 17: Programm der Punktmutations-PCR.	40
Tabelle 18: Übersicht der potentiellen SWS1-Interaktionspartner.....	78
Tabelle 19: Vergleich der optischen und der mathematischen Podosomenmittelung	82

Publikationsliste

Teile der Daten der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits wissenschaftlich präsentiert:

Publikation:

Herzog, R., van den Dries, K., Cervero, P. and Linder, S. (2020). "Poji: a Fiji-based tool for analysis of podosomes and associated proteins." *J Cell Sci* 133(8).

Konferenzen:

Robert Herzog, Koen van den Dries, Stefan Linder (2019). A semi-automated tool for analysis of podosomes and proteins (Poster) 6. ZOO-meeting Rotterdam: *Cell Adhesion and Migration in Inflammation and Cancer*, 15-18. Mai 2019, Rotterdam, Niederlande

Kathrin Weber, Robert Herzog, Stefan Linder (2019). Influence of podosome cap components on MT1-MMP transport to podosomes (Poster) 6. ZOO-meeting Rotterdam: *Cell Adhesion and Migration in Inflammation and Cancer*, 15-18. Mai 2019, Rotterdam, Niederlande

Robert Herzog, Koen van den Dries, Stefan Linder (2019). A semi-automated tool for analysis of podosomes and proteins (Poster und Vortrag) Invadosome-meeting 2019: *Mechano-chemical signals in invasion*, 19.-22. Juni 2019, London, England

Kathrin Weber, Robert Herzog, Stefan Linder (2019). Influence of podosome cap components on MT1-MMP transport to podosomes (Poster und Kurzvortrag) Invadosome-meeting 2019: *Mechano-chemical signals in invasion*, 19.-22. Juni 2019, London, England

Danksagung

Diese Doktorarbeit ist mit der Unterstützung von mehr Menschen zustande gekommen, als ich in diesem Abschnitt nennen kann. Ich möchte jedoch einige wichtige von ihnen besonders betonen.

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Stefan Linder für die Aufnahme in diese Arbeitsgruppe, sowie für die ausgezeichnete Unterstützung während der Promotion von ganzem Herzen danken, wobei ich besonders die freundliche Arbeitsatmosphäre, die Kombination aus Hilfsbereitschaft, Motivation und wissenschaftlichem Input, sowie die Fähigkeit, durch sein konstant konstruktives Feedback nicht nur die Rückschläge im Labor in ein aufmunterndes Licht rücken zu können, sondern auch Lektionen zu vermitteln, die noch weit über diese Promotion hinaus einen positiven Einfluss auf meine weiterführende Karriere nehmen werden, beispielsweise, dass in wissenschaftlichen Publikationen die Verwendung unnötig langer und verschachtelter Sätze nicht unbedingt zu befürworten ist, betonen möchte. Zudem war es eine Freude in ihm auf dem Feld der schlechten Wortwitze einen nahezu ebenbürtigen Gegner zu finden.

Herrn PD Andreas Pommerening Röser möchte ich für herzlich für die Begutachtung dieser Doktorarbeit und die hilfreiche Unterstützung beim Promotionsverfahren danken.

Vielen Dank an die DFG für die Finanzierung dieser Arbeit.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Malte Gather und Dr. Nils Kronenberg für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der ERSIM-Experimente. Danke an die UMIF mit Virgilio, Bernd und Sabine für die Verwaltung und Hilfe bei der Mikroskopie. Vielen Dank auch an Prof. Dirk Mielenz und Tobias Spielmann für die Bereitstellung der SWS1- und miniTurbo-Konstrukte.

Danke an alle Mitglieder des LinderLabs! Vor allem möchte ich Kathrin als unersätzbliche Begleitung in guten und vor allem schlechten Labor- und Dissertationszeiten hervorheben und mich für ihre Freundschaft bedanken. Herzlichen Dank auch an Pasquale für die fachliche Unterstützung während meiner Promotion und auch für seine außerordentliche Fähigkeit diese in den wenigen „few minutes“ meiner „short questions“ bereitstellen zu können. Danke an Sven, Artur und Lars dafür, dass ihr nie die Hoffnung aufgegeben habt, mich zu einer Kafferunde rekrutieren zu können. Danke auch an Philipp für die kurzweilige Laborbegleitung und vor allem die selbstlosen Angebote, mir seine Arbeit kostenfrei zu überlassen. Danke auch an die Neuen, Hanna und Bryan, für euch komme ich doppelt gerne ins Labor zurück. Danke an Johann und allen ehemaligen Mitglieder für die vielen Geschichten und Erinnerungen. Da das Beste zum Schluss kommt, möchte ich hier auch einen herzlichen Dank an unsere Labor-Mutti Andrea aussprechen. Ohne dich würde schlicht und ergreifend gar nichts in diesem Labor funktionieren, am allerwenigsten die Promotionsstudenten!

Einen außerordentlichen Dank möchte ich an Dragonforce, Basshunter und TwilightForce für den Soundtrack dieser Doktorarbeit aussprechen und möchte hierbei besonders meinen jahrelangen treuen Begleiter, die absolut geniale Herr-der-Ringe-Symphonie, hervorheben.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken. Ihr seid mir immer ein unersetzlicher Rückhalt in allen Lebenslagen gewesen. Vermutlich habt ihr zusätzlich auch die Hauptmotivation dargestellt, dieses Forschungsthema in einem angemessenen Zeitrahmen erfolgreich abzuschließen, da ich die unschuldige Frage „Und wann genau bist du jetzt fertig?“ langsam nicht mehr hören konnte. Danke dafür und für überhaupt alles, ihr seid die Besten!