

**Untersuchung der Podosomendynamik:
Das Formin FHOD1 reguliert
Podosomenkabel**

- DISSERTATION -

zur Erlangung des Doktorgrades

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

vorgelegt von

Linda Panzer

geboren am

16.05.1985 in Kempen

Hamburg, im August 2015

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2011 bis August 2015 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Stefan Linder am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angefertigt.

Tag der Disputation: 20.11.2015

Folgende Gutachter empfehlen die Annahme der Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Linder
2. Gutachter: PD Dr. Andreas Pommerening-Röser

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Makrophagen	1
1.2. Podosomen	2
1.3. Das Aktinzytoskelett	4
1.4. Aktin und Aktin-assoziierte Proteine an Podosomen	11
1.5. Ziel der Arbeit	14
2. Material	16
2.1. Verbrauchsmaterialien	16
2.2. Chemikalien	16
2.3. Lösungen, Puffer und Medien	16
2.4. Antikörper	22
2.5. siRNA	22
2.6. Vektoren	23
2.7. Inhibitoren	23
2.8. Bakterienstämme	24
2.9. Eukaryotische Zellen	24
2.10. Käufliche „Kits“	24
2.11. Geräte	24
2.12. Programme	29
3. Methoden	30
3.1. Molekularbiologische Methoden	30
3.2. Zellkulturtechniken	31
3.3. Proteinbiochemische Verfahren	36
3.4. Immunzytochemie	38

3.5. Mikroskopie und mikroskopiebasierte Analysen	39
3.6. Statistik	45
4. Ergebnisse	46
4.1. Entwicklung eines Live Cell Imaging Assays zur Analyse der Podosome- neubildung	46
4.2. Formine an Podosomen	52
4.3. Das Formin FHOD1 an Podosomen	54
5. Diskussion	74
5.1. Podosomen primärer humaner Makrophagen als Modellsystem zur Untersu- chung von Aktindynamik	74
5.2. Bedeutung des Podosomenreformationsversuchs im Live Cell Imaging . . .	75
5.3. Formine, essenzielle Bestandteile von Podosomen	76
5.4. FHOD1, ein neuer Bestandteil von Podosomen	77
5.5. FHOD1, ein neuer Regulator von Podosomenkabeln	79
5.6. Ausblick	82
6. Zusammenfassung	86
Abkürzungsverzeichnis	88
Literaturverzeichnis	92
A. Anhang	110
A.1. Publikationen	110
A.2. Posterpräsentationen auf Konferenzen	110
Danksagung	112
Eidesstattliche Erklärung	115

Abbildungsverzeichnis

1.1. Funktionale Vielfalt von Makrophagen	2
1.2. Podosomen in monozytären Zellen	3
1.3. Aktinnukleatoren ermöglichen die Aktinpolymerisation.	6
1.4. Struktur und Aktivierung von DRFs	8
1.5. Das aktivierte Formindimer	9
1.6. Domänenstruktur von FHOD1	11
1.7. Podosomenaufbau	12
1.8. Kontraktilität an Podosomen	15
2.1. PageRuler Unstained Protein Ladder	20
4.1. Analyse eines Podosomenreformatsversuchs in fixierten Proben	47
4.2. Der Podosomenreformatsversuch im Live Cell Imaging	49
4.3. Phasen der Podosomenbildung während der Podosomenreformation	51
4.4. Formin abhängige Formation von Podosomen	53
4.5. Das Formin FHOD1 wird in primären humanen Makrophagen exprimiert.	54
4.6. FHOD1 lokalisiert am Podosomenkern und an Podosomenkabeln.	55
4.7. Verwendete EGFP-FHOD1-Konstrukte	56
4.8. EGFP-FHOD1 lokalisiert um den Podosomenkern und an Podosomenkabeln.	57
4.9. EGFP-FHOD1 Δ C lokalisiert um den Podosomenkern und an Podosomenkabeln.	58
4.10. EGFP-FHOD1 Δ C lokalisiert an induzierten Aktinfasern und Podosomen.	59
4.11. FHOD1 und Myosin IIA lokalisieren an Podosomen und Aktinfasern.	61
4.12. SiRNA vermittelter FHOD1-Knockdown	63
4.13. Erhöhung des Anteils der Zellen mit wenigen Podosomen im FHOD1-Knockdown	63
4.14. Keine Veränderung der Podosomengröße im FHOD1-Knockdown	64
4.15. Erhöhung der Podosomenlebenszeit im FHOD1-Knockdown	65

4.16. Unveränderte Fähigkeit zur Matrixdegradation im FHOD1-Knockdown . .	66
4.17. Unveränderte Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown	67
4.18. Leicht veränderte Podosomendichte während der Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown	68
4.19. Keine Kontraktilitätssteigerung an Podosomen während der Podosomenre- formation im FHOD1-Knockdown	70
4.20. Unveränderte Podosomenbildung während der Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown	71
4.21. Veränderte Podosomen- und Podosomenkabel-Struktur im FHOD1-Knock- down	73

1. Einleitung

1.1. Makrophagen

Makrophagen sind den Leukozyten, d.h. den weißen Blutzellen, zugehörig und zählen somit zu den Zellen des Immunsystems. Sie übernehmen im Organismus verschiedene zentrale Aufgaben (Abb. 1.1). Als professionelle Phagozyten (= Fresszellen) sind sie an der Erkennung und Beseitigung von körperfremden Erregern und Antigenen sowie Tumorzellen oder alternden bzw. abgestorbenen Zellen des Körpers beteiligt (= angeborene Immunantwort) [66, 148, 155]. In diesem Zuge können sie zum einen Substanzen sekretieren, die die Entzündungsreaktion und damit Wundheilung steuern; so können beispielsweise ausgeschüttete Zytokine das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zellen regulieren. Zum anderen besitzen Makrophagen die Fähigkeit, Erreger-spezifische Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, was der weiteren Pathogenabwehr dient (= adaptive Immunantwort) [98]. Um diese hoch diversen Aufgaben ausführen zu können, haben Makrophagen die Möglichkeit verschiedene Phänotypen auszubilden, die in der Regel über spezifische Oberflächen-Proteine verfügen. Es gibt demnach mehrere Populationen an Makrophagen, die unterschiedliche Funktionen ausüben. Man spricht dabei von der Plastizität von Makrophagen. Klassische Beispiele sind die pro-inflammatorischen M1- und die anti-inflammatorischen M2-Makrophagen, wobei der M1-Typ u.a. für die Abwehr von Mikroorganismen und der M2-Typ beispielsweise für die Beseitigung von Zelltrümmern und Wundheilung verantwortlich ist [97].

Alle Makrophagen entwickeln sich aus im Blut befindlichen peripheren Monozyten, welche im Knochenmark gebildet werden. Diese können ins Gewebe migrieren und differenzieren dort unter dem Einfluss von Zytokinen und Antigenen zu für das jeweilige Gewebe spezifischen Makrophagen, den sog. Gewebs-Makrophagen [52]. Diese machen neben dem ortsunabhängigen, mobilen Anteil den Großteil aller Makrophagen aus und sind in nahezu allen Geweben des Körpers zu finden. Beispiele für Gewebs-Makrophagen sind die Mikroglia-Zellen im Gehirn und die Osteoklasten im Knochen [52]. Der enge Kontakt zwi-

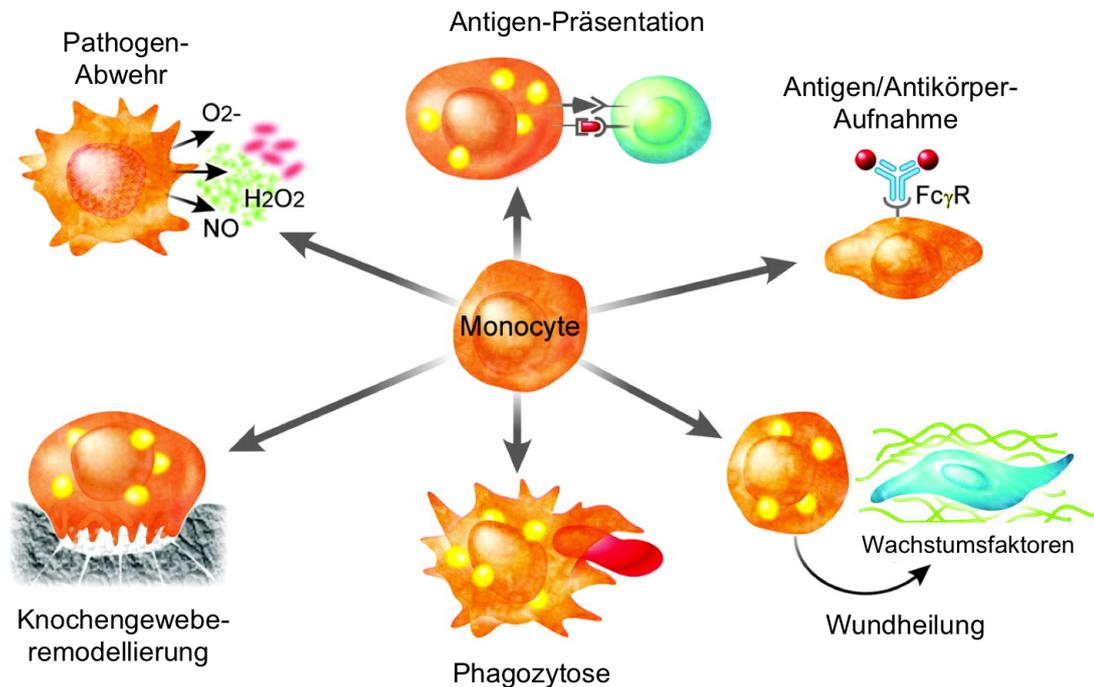


Abbildung 1.1.: Funktionelle Vielfalt von Makrophagen

Monozyten können in Geweben zu Makrophagen mit sehr unterschiedlichen Funktionen differenzieren. Im Uhrzeigersinn von oben links; Makrophagen führen Abwehrfunktionen gegen intrazelluläre Pathogene aus, indem sie reaktive Sauerstoffspezies ausschütten und Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren, um die adaptive Immunantwort einzuleiten; indem sie Immunkomplexe aufnehmen, um die inflammatorische Antwort herunterzuregulieren; und Wundheilung durch Wachstumsfaktoren-Ausschüttung einleiten. Manche Gewebs-Makrophagen spezialisieren sich sehr stark, wie die der roten Pulpa der Milz, welche für die Beseitigung und das Recycling von seneszenten roten Blutzellen sorgen und die des Knochens (Osteoklasten), die für die essenzielle Knochengeweberemodellierung sorgen. [26]

schen Osteoklast und Knochen (= „sealing zone“) zur Knochengeweberemodellierung wird hauptsächlich durch sog. Podosome bewerkstelligt [131]. Diese sind bei Makrophagen ebenfalls von zentraler Bedeutung [88].

1.2. Podosome

Podosome lassen sich als 0,5-1 μm große Aktin-reiche Anheftungs- und Invasionsstrukturen beschreiben [85]. Man findet sie vor allem in monozytären Zellen wie Makrophagen [81], Monozyten [83], dendritischen Zellen [20], Osteoklasten [38] und Megakaryozyten [128, 135] (Abb. 1.2). Darüber hinaus können sie von Endothelzellen [105] und glatten Muskelzellen [67] gebildet werden. In Fibroblasten lassen sie sich zudem durch eine Transformation mit der Tyrosinkinase Src induzieren. In letzteren wurden sie 1985 zum ersten

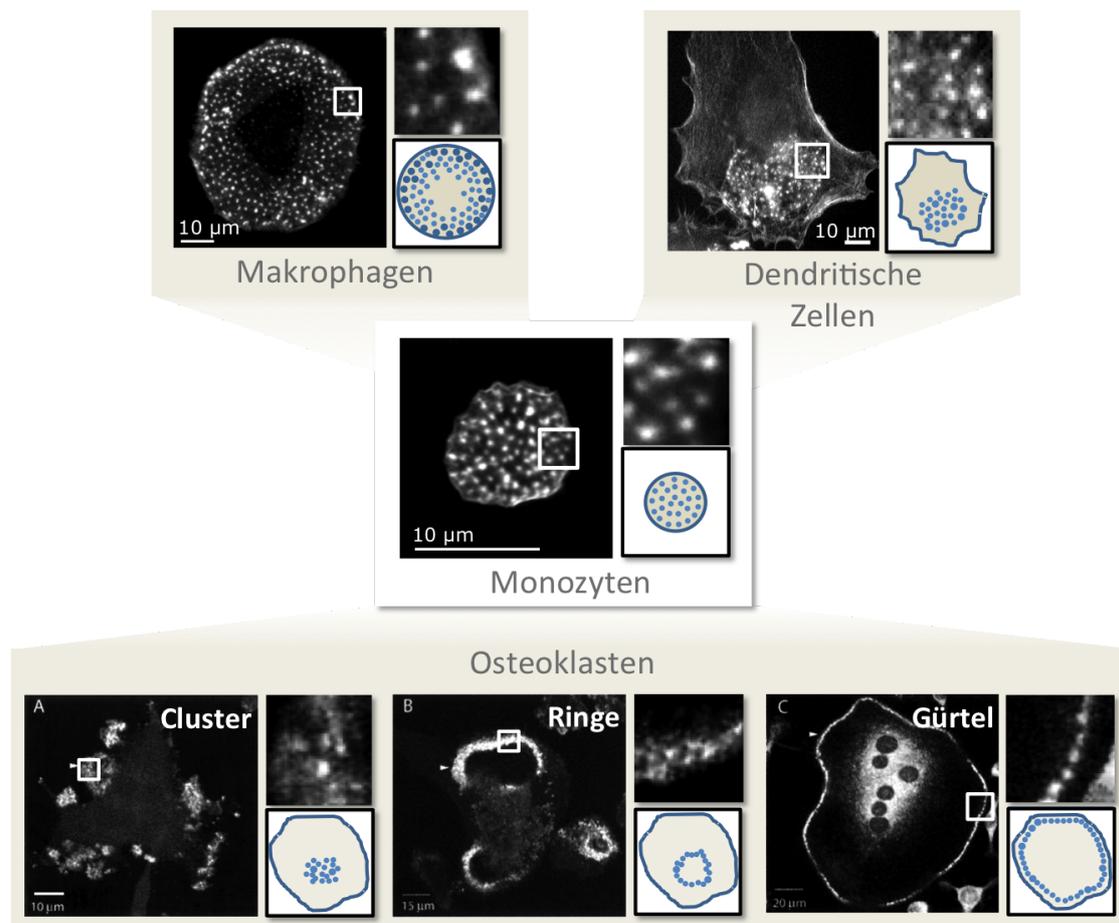


Abbildung 1.2.: Podosomen in monozytären Zellen

Mitte: Aus Blut isolierter Monozyt, 6 h nach dem Aussäen fixiert, mit gleichmäßig verteilten Podosomen. Oben: Aus Monozyten differenzierter Makrophage mit typischer Podosomenanordnung und unreife dendritische Zelle mit Podosomenclustern. Unten: Osteoklasten mit verschiedenen Podosomenansammlungen: Cluster, Ringe und Gürtel. Maßstabsbalken, 10 µm. [88]

Mal beschrieben [152]. Die Bildung, Regulation, Funktion und Anordnung von Podosomen können sich in den verschiedenen Zelltypen sehr unterscheiden. Alle folgenden Angaben beziehen sich, sofern es nicht anders vermerkt ist, auf Beobachtungen in Makrophagen. In der Zelle besitzen Podosomen vielfältige Funktionen, wie Zelladhäsion, Abbau der Extrazellulären Matrix (EZM) mittels Metalloproteinasen [171] und Erkennung der Struktur und Beschaffenheit ihrer Umgebung [158], was sie zum Mechanosensing befähigt [34, 35]. Mechanosensing bedeutet, dass Zellen auf mechanische Reize wie hydrostatischen Druck oder Matrixbeschaffenheit reagieren können, indem sie beispielsweise bestimmte intrazelluläre Signalwege einleiten; der mechanische Reiz wird in einen chemischen umgewandelt [59, 90]. Die in Makrophagen zahlreich vorhandenen Podosomen – mehrere 100 pro Zelle [86] – ver-

teilen sich gleichmäßig [42] und sind mit einer mittleren Lebenszeit von ca. 10 Minuten hoch dynamisch [84, 89]. Sie bilden sich neu, können sich teilen, aber auch verschmelzen und sich schlussendlich auflösen [44, 71, 11]. Die vielfältige Podosomalendynamik bedarf fein abgestimmter Regulation, wobei Rho-GTPasen, Src-Kinasen und Aktin-regulierende Proteine als Hauptregulatoren von Podosomen gelten [86, 41, 39, 17, 5].

Die generelle Podosomenbildung setzt bei Makrophagen Kontakt mit einem unter ihnen liegenden Substrat voraus, wobei sie dabei konstitutiv Podosomen bilden. Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts (siehe dazu 1.3) spielt dabei die Hauptrolle [86].

Nach erster Adhäsion der Zelle mittels Zell-Matrix Rezeptoren wie den Integrinen [174, 28, 50] oder dem Hyaluronsäurerezeptor CD44 [24], werden mit Hilfe von Integrinen, Rho-GTPasen und Src-Kinasen aktiviert [68].

Rho-GTPasen zählen zu den Hauptregulatoren des Aktinzytoskeletts und der Integrin vermittelten Adhäsion [145]. Src-Kinasen phosphorylieren mehrere Aktin-assoziierte Proteine, die an der Podosomenbildung beteiligt sind. Dazu gehören Cortaktin, WASP („Wiskott-Aldrich syndrome protein“), Paxillin, β_1 - und β_2 -Integrine [61, 8, 167, 37, 130]. Wie der gesamte Prozess der Podosomenbildung präzise abläuft, ist allerdings bisher nicht genau aufgeklärt.

Auf die Struktur und Regulation des Aktinzytoskeletts und dessen Bedeutung für Podosomen wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

1.3. Das Aktinzytoskelett

Aktin zählt neben Mikrotubuli und Intermediärfilamenten zu den Bestandteilen des Zytoskeletts. Dieses ist für die mechanische Stabilisierung und Formgebung der Zelle verantwortlich, verleiht ihr Fähigkeiten wie die Zellmigration und ermöglicht intrazelluläre Bewegungs- und Transportvorgänge [62].

Aktin besteht aus globulären Aktinmonomeren (G-Aktin) mit einer molekularen Masse von je 43 kDa, die ATPase-Aktivität besitzen. Diese Untereinheiten können sich nach Bildung eines aus drei Aktinmonomeren bestehenden Nukleus selbstständig zu filamentösem Aktin (F-Aktin) zusammensetzen. Da die Bildung der Nuklei aufgrund der Instabilität kleiner Aktinologomere [143] in Zellen ein sehr seltener Prozess ist, wird die Bildung neuer Aktinfilamente mit Hilfe von bestimmten Proteinen, den Aktinnukleatoren initiiert (Abb. 1.3). Zu Aktinnukleatoren zählen Formine, der Arp2/3-Komplex und Tandem-Monomer-bindende Aktinnukleatoren wie „Spire“ [120]. Die weitere Elongation der Aktinfilamente erfolgt spon-

tan. Damit entstehen in Zellen asymmetrische Filamente mit einem schnell wachsenden Ende (+-Ende oder „barbed end“) und einem langsamer wachsenden Ende (–-Ende oder „pointed end“), die sich zu Netzwerken zusammensetzen können.

Je nach Nukleator entstehen unterschiedliche Formen des F-Aktin-Netzwerks. Nachdem der Arp2/3-Komplex durch NPFs („Nucleation promoting factors“) beispielsweise aus der WASP-Familie aktiviert wurde [94, 95], lagert er sich zusammen mit dem NPF an die Seite eines bereits existierenden Aktinfilaments an und führt dort zur Ausbildung eines neuen Filaments. Dies resultiert in einem verzweigten Aktin-Netzwerk [107]. Formine hingegen bilden unabhängig vom Arp2/3-Komplex und NPFs unverzweigte Aktinfilamente [122, 129] (siehe 1.3.1). Die Tandem-Monomer-bindenden Aktinnukleatoren bringen mit Hilfe ihrer Tandem-G-Aktin-Bindungsmotive (typischerweise WH2 = „WASP homology 2“-Domänen) Aktinmonomere zur Bildung von Aktin-Nuklei zusammen [123, 1], was die weitere Polymerisation eines Aktinfilaments ermöglicht.

Innerhalb eines Aktinfilamentes reguliert die ATP-Hydrolyse sowohl die Kinetik des Filamentauf- und -abbaus als auch die Assoziation mit interagierenden Proteinen, wodurch sie eng mit der Filamentpolymerisation verknüpft ist. An eine Aktinuntereinheit gebundenes ATP hydrolysiert mit einer Halbwertszeit von zwei Sekunden zu ADP [14]. Das dadurch entstehende γ -Phosphat dissoziiert mit einer Halbwertszeit von sechs Minuten vergleichsweise langsam [13, 101]. Da das durch die ATP-Hydrolyse entstandene ADP-Aktin vom „barbed end“ schneller dissoziiert als ATP-Aktin [117], können ATP-Hydrolyse und γ -Phosphat-Dissoziation den Filamentabbau hervorrufen. Der Austausch von ADP zu ATP findet nach heutigem Wissensstand ausschließlich an freien Aktinmonomeren statt [118].

Ein Filamentende befindet sich im Aufbau, wenn die Monomerassoziation an diesem Ende schneller ist als die Dissoziation; es befindet sich umgekehrt im Abbau, wenn die Dissoziationsgeschwindigkeit höher ist. Die Monomerassoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten werden an den jeweiligen Filamentenden neben der ATP-Hydrolyse durch die sog. kritische Konzentration (Konzentration an freiem ATP-Aktin, bei der sich Auf- und Abbau im Gleichgewicht befinden) und die am jeweiligen Filamentende vorliegende ATP-Aktin Konzentration beeinflusst [168, 117]. Plus und Minusende von Aktinfilamenten können aufgrund ihrer unterschiedlichen kritischen Konzentration verschiedene Geschwindigkeiten des Filamentaufbaus und -abbaus zu einem bestimmten Zeitpunkt zeigen. Als Konsequenz kann es zum sog. Tretmühlenmechanismus kommen, bei dem ein Filamentende abgebaut wird, während sich das andere Ende im Aufbau befindet. Dies ist in Prozessen wie der Fortbewegung von Zellen und in vielen intrazellulären Transportvorgängen von fundamen-

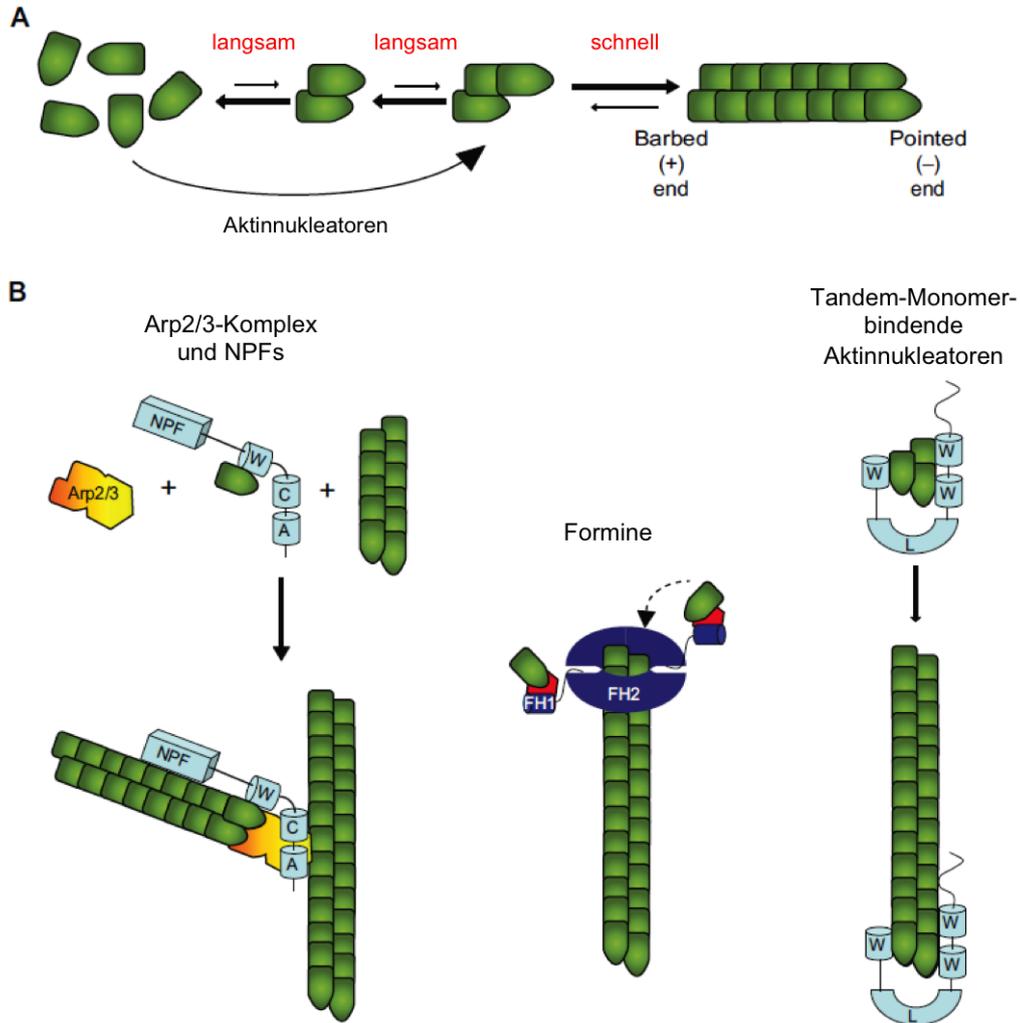


Abbildung 1.3.: Aktinnukleatoren ermöglichen die Aktinpolymerisation.

(A) F-Aktin entsteht aus Aktinmonomeren (= G-Aktin). Der initiale Dimerisierungs- und Trimerisierungsschritt ist energetisch ungünstig. Aktinnukleatoren überwinden dies und ermöglichen somit die schnelle Aktinpolymerisation. Dabei entsteht ein polares Aktinfilament mit einem langsam („pointed (-) end“) und einem schnell wachsenden („barbed (+) end“) Ende. (B) Der Arp2/3-Komplex, durch NPFs („Nucleation promoting factors“) aktiviert, initiiert die Bildung neuer Aktinfilamente an der Seite eines bereits existierenden Aktinfilaments, was am Verzweigungspunkt zu einem Winkel von 70° führt (links). Ein Formin FH2-Domänen Dimer bindet an das „barbed end“ eines Aktinfilaments, wohin die FH1-Domänen Profilin-Aktin rekrutieren und ausliefern. Das Formin bleibt am wachsenden „barbed end“ gebunden (Mitte) (siehe dazu 1.3.1). Die Tandem-G-Aktin-Bindungsmotive von Tandem-Monomer-bindender Aktinnukleatoren bringen Aktinmonomere zusammen, wodurch Aktinnuklei geformt werden. Sie bleiben dabei am „pointed end“ gebunden (rechts). [169]

taler Bedeutung [119, 112]. Die nötige hohe Konzentration an Aktinmonomeren wird in der Zelle durch Aktinmonomer-sequestrierende Proteine, wie Profilin, bereit gehalten [119].

Neben Aktinnukleatoren und Aktinmonomer-sequestrierenden Proteinen gibt es zahlreiche weitere Aktin-regulierende Protein-Gruppen. Dazu zählen Filament-depolymerisierende Proteine wie Cofilin, Filament-schneidende Proteine wie Gelsolin, Capping Proteine des +- und --Endes, welche einen Austausch von Monomeren verhindern, querverbindende Proteine wie α -Aktinin, Filament-stabilisierende, vor Depolymerisierung schützende Proteine wie Tropomyosin und Motor Proteine wie aus der Myosin-Familie [40].

Bestimmte Signalwege können ebenfalls für eine lokale Modulation des Aktinzytoskeletts sorgen, bei der die Familie der Rho-GTPasen eine wichtige Rolle spielt. Rho-GTPasen empfangen äußere Signale, die von Zelloberflächenrezeptoren wahrgenommen und weitergeben werden, und leiten diese an zahlreiche nachgeschaltete Zielproteine weiter [4]. Sie wechseln dabei zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand. Dieser Prozess wird durch Guanin-Nukleotid-Austausch Faktoren (GEFs = „Guanine nucleotide exchange factors“), GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs = „GTPase-activating proteins“) und Guanin-Nukleotid-Dissoziierungs Inhibitoren (GDIs = Guanin nucleotide dissociation inhibitors“) reguliert [12].

Dabei führt die Aktivität der Rho-GTPase Cdc42 zur Ausbildung von Filopodien, die von Rac zu Lamellipodien und Rho zur Ausbildung von Stressfasern [54].

Eine exakte Regulation des Aktinzytoskeletts ist für dessen funktionellen Bedeutung bei den verschiedensten zellulären Prozessen unentbehrlich. Dazu zählen neben der Zellmigration, Endozytose und Vesikeltransport die Zelladhäsion und Polarität. [113]

1.3.1. Formine

Die Proteinfamilie der Formine besteht in Säugetieren aus 15 Mitgliedern. Diese lassen sich in 8 Unterfamilien unterteilen. Die Familie der Dia („Diaphanous-related formin“)-Formine mit mDia1, mDia2, mDia3. Daam1 und Daam2 gehören zu der Daam („Dishevelled-associated activator of morphogenesis“)-Familie. Die FMNL („Formin-like protein“)-Proteinfamilie besteht aus FMNL1, FMNL2 und FMNL3. Die FHOD („FH1/FH2 domain-containing protein“)-Familie weist die beiden Mitglieder FHOD1 und FHOD3 auf. Ebenfalls zwei Vertreter, FMN1 und FMN2 lassen sich in der Familie der FMN („Formin“)-Proteine finden. INF1 („Inverted formin 1“), INF2 und Delphinin bilden jeweils ihre eigene Unterfamilie. [137, 76].

Im Allgemeinen besitzen Formine den Multidomänenbau Diaphanous-ähnlicher Formi-

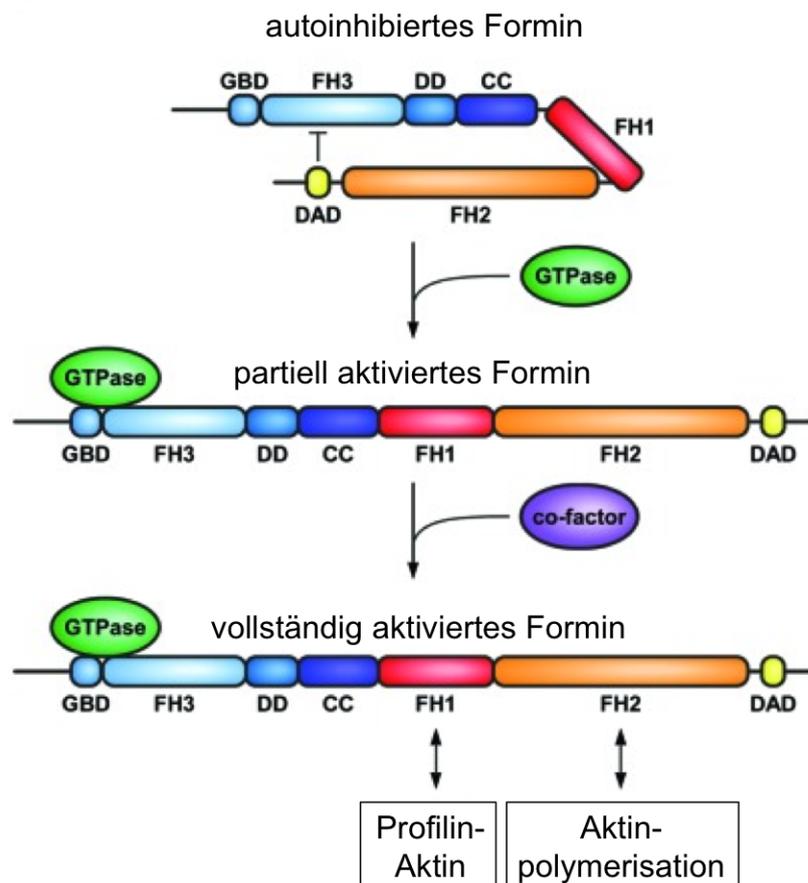


Abbildung 1.4.: Domänen-Struktur und Aktivierung von DRFs

Diaphanous-verwandte Formine (DRFs) bestehen aus einer zentralen Prolin-reichen FH1-Domäne, der die Aktin-polymerisierende FH2-Domäne folgt. Im autoinhibierten Zustand interagiert die C-terminale DAD-Domäne mit der DID-Domäne, welche in der N-terminalen FH3-Domäne integriert ist. Die Bindung einer GTP-gebundenen Rho-GTPase an die N-terminale GBD führt zur partiellen Aktivierung durch Auffalten der autoinhibierten Konformation. Es werden zusätzliche, bisher unbekannte Faktoren zur vollen Aktivierung benötigt. Weitere Dimerisierungselemente DD („Dimerization domain“) und CC („Coiled coil“-Domäne) verhelfen zur Bildung eines aktiven Formindimers. [76]

ne (mDia-, Daam-, FMNL1- und FHOD1-Familien) wie in Abb. 1.4 gezeigt. Sie haben eine N-terminale GTPase Bindungsdomäne (GBD = „GTPase-binding domain“), eine benachbarte DID („Diaphanous inhibitory domain“) und Dimerisierungsdomäne (DD = „Dimerization domain“), die typischen Formin Homologie Domänen, FH1 und FH2 („Formin homology domain“), und eine C-terminale DAD („Diaphanous autoregulatory domain“) [3, 79, 110, 127, 111, 31, 137]. DRFs liegen durch die intramolekulare Bindung der DID an die DAD autoinhibiert vor. Eine teilweise Aktivierung kann durch die Bindung von aktiven Rho-GTPasen an die GBD zustande kommen [79, 96]. Welche zusätzlichen Faktoren zur vollständigen Aktivierung benötigt werden, ist bisher nicht vollständig bekannt. Neben der Autoinhibition wurde eine weitere Funktion der DAD Domäne beschrieben. Sie verstärkt den Aufbau von F-Aktin, indem sie Aktinmonomere rekrutieren kann [53].

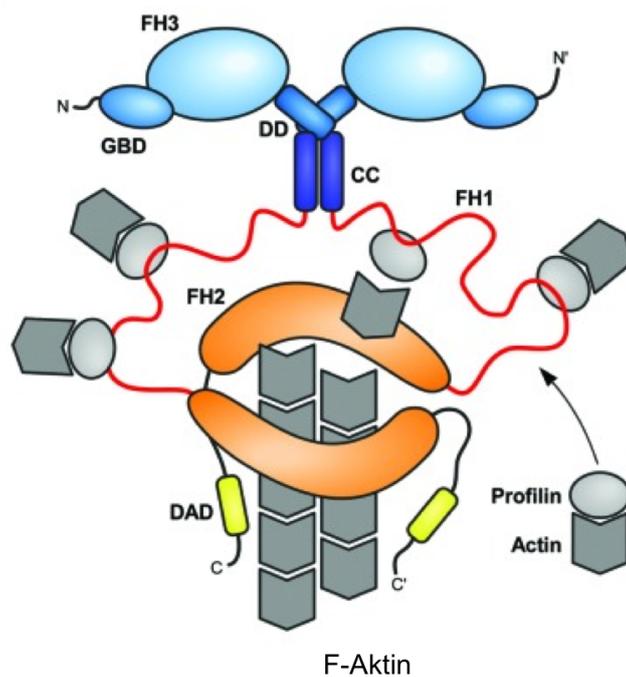


Abbildung 1.5.: Das aktivierte Formindimer

Formine bilden über die gegenseitige Bindung ihrer DD- bzw. CC-Domänen ein aktives Formindimer aus. In diesen rekrutiert die Prolin-reiche FH1-Domäne Profilin-Aktin in die räumliche Nähe der FH2-Domäne. Aktinmonomere werden durch die FH2-Domäne zu F-Aktin polymerisiert. [76]

Im aktivierten Zustand bilden Formine Dimere aus (Abb. 1.5). Die Prolin-reichen FH1-

Domänen können nun Profilin gebundene Aktinmonomere rekrutieren [25, 63, 129, 72, 73] und die FH2-Domänen bilden ein ringförmiges, anti-paralleles Dimer [170]. Dieses kann sowohl Aktin nukleieren, als auch mit hoher Affinität an das „barbed end“ von Aktinfilamenten binden und zur weiteren Elongation führen. Dabei bleiben die FH2-Domänen am „barbed end“ gebunden und schützen somit vor Capping Protein-Bindung, welche zum Filamentabbau führen kann [122, 72, 176].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Formine lineare, unverzweigte Aktinfilamente sowohl nukleieren als auch elongieren können. Außerdem sind sie z.T. in der Lage Mikrotubuli zu binden, Aktinfilamente zu bündeln, schneiden und/oder zu depolymerisieren [57, 104, 106, 32, 56, 43, 9, 58, 93, 142, 146]. Die Ausprägung bzw. der Besitz dieser Fähigkeiten variiert innerhalb der verschiedenen Familienmitglieder sehr [46, 51]. Dies, genauso wie unterschiedliche Regulationsmechanismen unter den verschiedenen Forminen, ist durch die Variabilität des Proteinaufbaus vor allem im N-Terminus zu erklären. Die hoch konservierte FH2-Domäne bildet dabei eine Ausnahme [21].

Die Vielseitigkeit innerhalb der Formin-Familie lässt sie in zahlreichen essenziellen Prozessen der Zelle mitwirken. Dazu gehören Filopodien- [114, 136, 172, 16, 100, 58], Lamellipodien- [172, 132, 16] und Stressfaserbildung [64, 134, 48, 60, 133, 150], Vesikeltransport [78, 7, 80, 116, 139] und die Formation des zytokinetischen Aktinrings [144, 164] und des phagozytischen „Cups“ [18]. [19, 76]

1.3.2. FHOD1

Neben FHOD1 besteht die Familie der FHOD-Proteine aus einem weiteren Protein, FHOD3. Da FHOD3 ausschließlich in Herz- und Skelettmuskelzellen exprimiert wird, wird im Folgenden ausschließlich auf FHOD1 eingegangen. Dieses Formin findet man ubiquitär in allen bislang untersuchten Zellen und Geweben [75].

FHOD1 besitzt den typischen Domänenaufbau von DRFs, wobei es eine zusätzliche Aktinbindedomäne (ASBD = „Actin side-binding domain“) in seinem N-Terminus aufweist (Abb. 1.6).

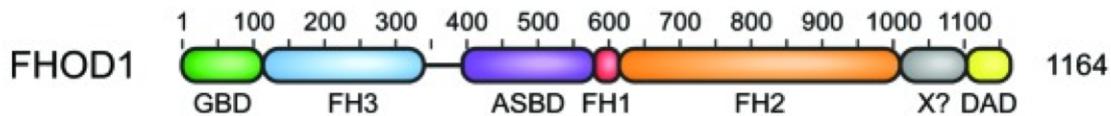


Abbildung 1.6.: Domänenstruktur von FHOD1

Das 1164 Aminosäuren große FHOD1 Protein besteht neben den DRF-typischen Domänen (GBD, FH3, FH1, FH2 und DAD) aus einer zusätzlichen „Actin side-binding domain“ (ASBD) und einer ca. 90 Aminosäuren lange Sequenz im C-Terminus (X?), die für die FHOD-Familie spezifisch ist. [137, 76]

Damit kann es seitlich an existierende Aktinfilamente binden [150]. Frühe Experimente mit überexprimiertem aktiven FHOD1 zeigten die Bildung von Stressfasern [48]. Dazu passend wurde FHOD1 kürzlich als Aktin-bündelndes und weniger als Aktin-nukleierendes Protein beschrieben, wobei es mit seiner FH2-Domäne ebenfalls an das „barbed end“ von Aktinfilamenten binden kann, um diese vor dem Abbau zu schützen [138]. Für die Lokalisation an Stressfasern wurde in weiterführenden Untersuchungen die GBD-FH3-Domäne als essenziell beschrieben. Diese ist ebenfalls für die Kolokalisation von FHOD1 mit dem Motorprotein Myosin (siehe dazu 1.4.1) ausschlaggebend [141]. In anderen Untersuchungen wurde zudem gezeigt, dass FHOD1 in MEF (= „Mouse embryonic fibroblasts“)-Zellen zu Integrin-Clustern rekrutiert wird, woraufhin dort eine Bildung von F-Aktin stattfindet [65]. Wie FHOD1 aktiviert wird, und ob FHOD1 mit Rho-GTPasen interagiert, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt worden. Es ist jedoch bekannt, dass FHOD1 an drei spezifischen Aminosäureresten der C-terminalen DAD-Domäne durch die Rho-Effektor-Kinase ROCK phosphoryliert wird [151, 55].

1.4. Aktin und Aktin-assoziierte Proteine an Podosomen

Der kontinuierliche Umsatz von F-Aktin in Podosomen – das gesamte Aktin wird ca. drei mal während der Podosomen-Lebenszeit ausgetauscht [38] – ermöglicht ihre hohe Dynamik und beeinflusst ihre Organisation sowie molekulare Zusammensetzung [92].

Podosomen bestehen aus einem Aktin-reichen Kern, um welchen sich Proteine zum einen als Ring und zum anderen als Kappe gruppieren. Außerdem gehen vom Podosomenkern Aktinfasern (= Podosomenkabel) aus, die die Podosomen zum einen untereinander und zum anderen mit dem Untergrund verbinden [38, 2, 91, 11] (Abb. 1.7).

Der Podosomenkern besteht aus einem verzweigten F-Aktin-Netzwerk, welches durch den Arp2/3-Komplex generiert wird [108, 82, 67]. Der WASP-Komplex, welcher den Arp2/3-

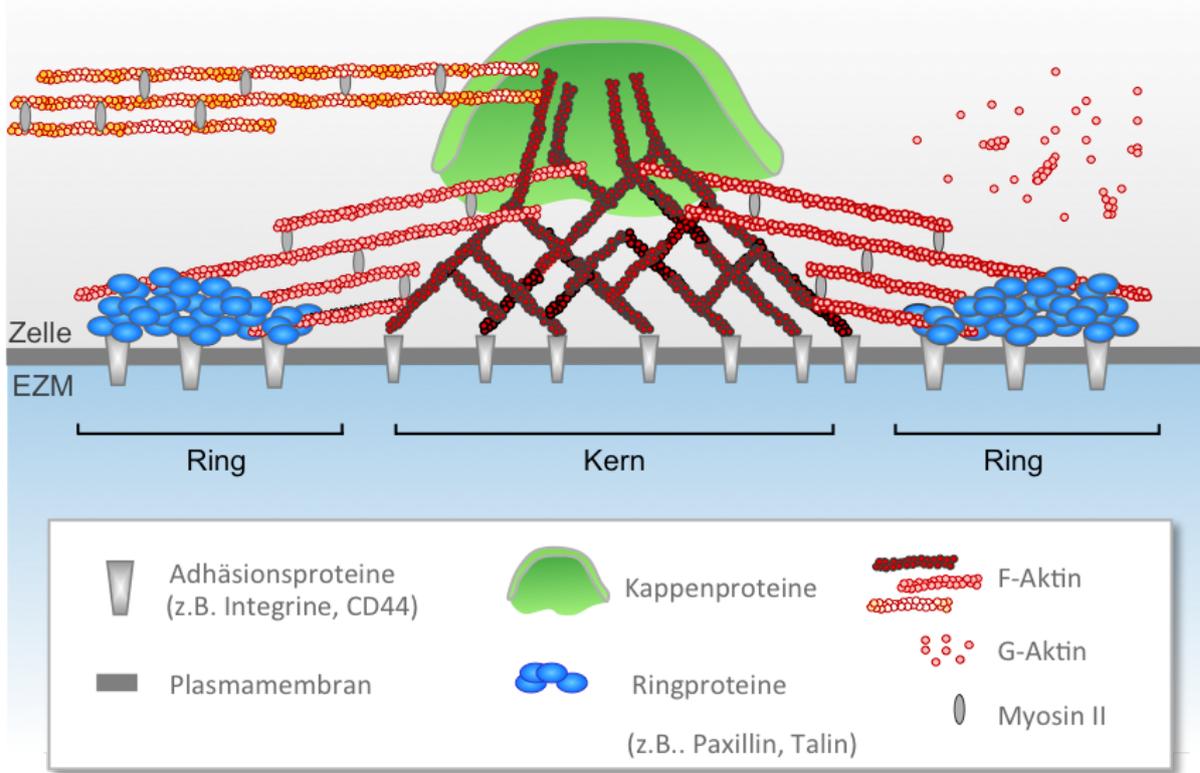


Abbildung 1.7.: Podosomenaufbau

Podosomen sind aus mehreren Substrukturen aufgebaut. Dazu gehören verzweigtes F-Aktin (dunkelrot) im Kern, umgeben von unverzweigten Aktinfilamenten, die durch Myosin II gebündelt werden und den Kern mit dem Untergrund (rot) und weiteren Podosomen (rot mit gelb) verbinden, eine Kappe über dem Kern und ein Ring um den Kern herum. Matrixkontakt wird durch Integrine und CD44 gewährleistet. Eine Wolke aus G- und F-Aktin ist oben rechts gekennzeichnet. Größe ca. 50 μm . [89]

Komplex aktiviert, wurde ebenfalls als essenzielle Komponente für Podosomen beschrieben. Ohne diesen unterbleibt die Bildung von Podosomen in Makrophagen [81], was genauso für die Abwesenheit des Arp2/3-Komplexes zutrifft [82].

Die verschiedenen Podosomenkabel bestehen im Gegensatz zum Podosomenkern aus unverzweigten Aktinfilamenten [2, 91]. Dies setzt neben dem Arp2/3-Komplex weitere Aktinregulatoren voraus. Da Formine Regulatoren des unverzweigten Aktinzytoskeletts sind, kommen diese dazu in Frage. Für das Formin FMNL1 wurde bereits eine Lokalisation an der Podosomenkappe und eine schwächere Anheftung der Makrophagen sowie eine geringere Podosomenanzahl in seiner Abwesenheit beschrieben. Daraus wurde geschlossen, dass FMNL1 an der Podosomenkappe die Struktur der Podosomen stabilisiert und dort für eine Reorganisation von Aktinfilamenten zu Aktinkabeln sorgt [102]. Wegen der hohen Dynamik

und den diversen Funktionen von Podosomen sowie dem Vorhandensein von verschiedenen Populationen an unverzweigten Aktinfilamenten an Podosomen auf der einen Seite und der Vielseitigkeit der Formine in Bezug auf die Regulation von Aktin auf der anderen, ist es wahrscheinlich, dass FMNL1 nicht das einzige wichtige Formin an Podosomen ist. Untersuchungen, die diese Hypothese bestätigen würden, fehlen bisher.

Neben den Aktinnukleatoren findet man im Podosomenkern und in den Podosomenkabeln weitere Aktin-assoziierte Proteine. Im Kern sind dabei Cortaktin [109] und Gelsolin [27] zu nennen. Cortaktin interagiert mit dem Arp2/3-Komplex und ist damit beim Aufbau und der Stabilisierung von verzweigten Aktin-Netzwerken behilflich [156]. Gelsolin ist ein Aktin-schneidendes Protein, mit welchem die Dynamik eines F-Aktin-Netzwerks reguliert werden kann [149].

α -Aktinin, ein Aktin-quervernetzendes Protein, ist sowohl bei der Ausbildung der Podosomenkabel als auch an der Ringbildung beteiligt [92].

Der Ring um den Podosomenkern setzt sich aus Adapterproteinen wie Paxillin, Vinculin und Talin und Kinasen wie aus der Src-Familie, Phosphoinositid 3-Kinase, Proteinkinase C (PKC = „Proteinkinase C“) und Fokaladhäsions-Kinase (FAK = „Focal adhesion kinase“) zusammen [174, 81, 115, 124, 89]. Die Annahme dieser Ringform kommt durch frühe Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zustande [86]. Neueste hochauflösende Mikroskopietechniken haben gezeigt, dass sich die Ringproteine in Clustern um den Kern gruppieren [36, 157, 162].

In der Podosomenkappe wurde außer FMNL1 [102] auch das Aktin-assoziierte Protein Supervillin (ein Mitglied der Villin- und Gelsolin-Familie) identifiziert [11]. Die Funktion der Podosomenkappe wurde als Kontaktstelle für Vesikel über Mikrotubuli-vermittelten Transport oder zur Regulation des Podosomenwachstums bzw. Podosomen-assoziiierter Kontraktilität postuliert [11].

Eine weitere Art der Podosomen-assoziierten Proteine sind die Adhäsionsproteine, die dafür sorgen, dass die Podosomen einen engen Kontakt zwischen der Zelle und dem Substrat herstellen können [87]. Dazu zählen zum einen Integrine mit β 1- oder β 3-Untereinheiten [115, 153] und zum anderen der Hyaluronsäure Rezeptor CD44 [24]. Die Adhäsion ermöglicht die Aktomyosin-abhängige Kontraktilität an und zwischen Podosomen, welche durch die Konsistenz der Extrazellulären Matrix reguliert wird [35].

1.4.1. Myosin an Podosomen

Myosin IIA gehört zu den nicht muskulären Motorproteinen der Myosin-Familie und ist für die zelluläre Kontraktilität essenziell [45]. Seine Aktivität wird über die Phosphorylierung seiner regulatorischen leichten Kette (MLC = „Myosin light chain“) angeschaltet. Der RhoA-ROCK Signalweg führt durch MLC-Phosphorylierung zur Ausbildung von Stressfasern, während MLCK („Myosin light chain kinase“) die Bildung von Fokaladhäsionen reguliert. [99, 161, 154].

Bei Podosomen ist Myosin IIA am Podosomenkern und an den von diesem ausgehenden unverzweigten Aktinfilamenten lokalisiert [71, 159, 11]. An den unverzweigten Aktinfilamenten sorgt die Myosin IIA-Aktivität für deren Kontraktilität [11] (Abb. 1.8). Myosin IIA ist somit ideal platziert, um sowohl einzelne Podosomen zu beeinflussen, als auch bei der Ausbildung des typischen Podosomenmusters zu helfen [89]. Es wurde beschrieben, dass Podosomen eher als eine Einheit, als als individuelle Organellen handeln [44], wobei die Koordination ein noch offenes Feld ist. Da Podosomen sich durch die unverzweigten Aktinfilamente zu einem Netzwerk zusammensetzen, ist der Prozess des Mechanosensing möglich [35, 88]. Eine Beteiligung von Myosin IIA ist dabei in Kombination mit der Regulation der Ausbildung und Erhaltung der Struktur des gesamten Podosomennetzwerks sehr gut vorstellbar [89].

1.5. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen durch Entwicklung eines „Live Cell Assays“ inklusive adäquater Analyseverfahren den bisher nicht aufgeklärten Prozess der Podosomenbildung in primären humanen Makrophagen detaillierter abzubilden. Zum anderen war die Funktion von Forminen an Podosomen von Interesse. Insbesondere sollte mit Hilfe bekannter Techniken sowie der hier neu entwickelten Methode die Funktion des Formins FHOD1 an Podosomen primärer humaner Makrophagen untersucht werden, wozu bislang nichts bekannt war.

Dazu sollten zunächst mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie Lokalisationsstudien von FHOD1 an Podosomen durchgeführt werden. Um gleichzeitig Informationen über mögliche Funktionen von FHOD1 an Podosomen zu bekommen, waren Knockdown-Experimente vorgesehen. Es sollte dabei geklärt werden, welchen Einfluss FHOD1 auf die Struktur, Bildung, Lebenszeit und Funktion von Podosomen hat. Abschließend sollte hochauflösende Mikroskopie das Bild der Funktion von FHOD1 an Podosomen abrunden.

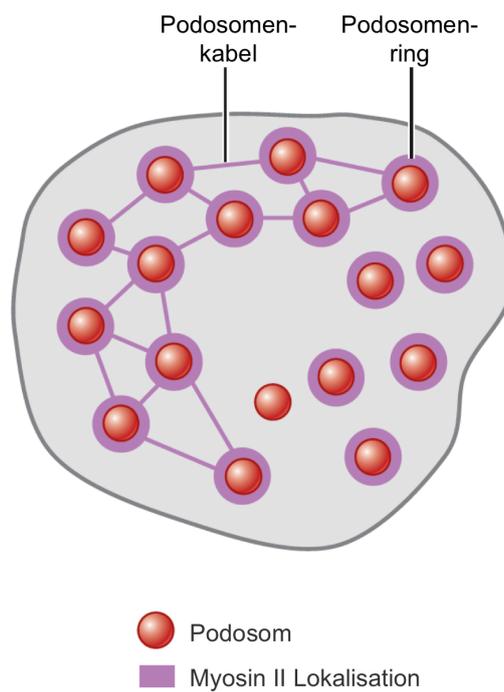


Abbildung 1.8.: Kontraktilität an Podosomen

Lokale Kontraktilität an Podosomen wird sehr wahrscheinlich durch Myosin II vermittelt, welches sowohl am Podosomenkern, als auch an den von diesem ausgehenden unverzweigten Aktinfilamenten zu finden ist. Die unverzweigten Aktinfilamente könnten den regelmäßigen Abstand zwischen den Podosomen regulieren. [89]

2. Material

2.1. Verbrauchsmaterialien

Alle Plastikwaren und Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nürnberg), Greiner (Kremsmünster, Österreich), VWR (Radnor, PA, USA), Roth (Karlsruhe) und Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) bezogen.

2.2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), GE Healthcare (München), Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich (St. Louis, USA), PAA (Pasching, Österreich), AppliChem (Darmstadt), BD Biosciences (Heidelberg), Biozyme (Oldendorf) und Dianova (Hamburg) bezogen.

2.3. Lösungen, Puffer und Medien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Lösungen, Puffer und Medien mit deionisiertem Wasser (VE-Wasser) angesetzt und nach Einstellen der pH-Werte, durch Verwendung von Natronlauge (NaOH) bzw. Salzsäure (HCl), autoklaviert.

2.3.1. Allgemeine Lösungen und Puffer

PBS (10-fach) (pH 7,4)	1,37 M	NaCl
	27 mM	KCl
	100 mM	Na ₂ HPO ₄
	18 mM	KH ₂ PO ₄

TBS (10-fach) (pH 7,4)	200 mM	Trizma base (Sigma Aldrich)
	1,5 M	NaCl

2.3.2. Lösungen, Puffer und Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	25 g/l	LB-Medium (Luria/Miller), Roth
LB-Agar	40 g/l	LB-Agar (Luria/Miller), Roth
Kanamycin-Stammlösung	100 mg/ml	sterilfiltriert, Aliquots bei -20 °C gelagert, 1:1000 zu verdünnen
RFI-Puffer (pH 5,8)	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂
	10 mM	CaCl ₂
	30 mM	Kaliumacetat
	15 % v/v	Glycerin
	sterilfiltriert	
RFII-Puffer (pH 6,8)	10 mM	MOPS
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂
	15 % v/v	Glycerin
	sterilfiltriert	

2.3.3. Lösungen, Puffer und Medien für die Zellkultur

Alle käuflichen Medien und Lösungen sind Zellkultur-getestet. Angesetzte Lösungen wurden autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

RPMI-1640 Gibco

DPBS Gibco

Lymphozyten Separations Medium LSM 1077

anti-CD14 MicroBeads, Miltenyi, Bergisch Gladbach

Monozyten-

Isolierungspuffer	2 mM	EDTA (pH 7,5)
	500 mg	humanes Serumalbumin
	100 ml	DPBS
	sterilfiltriert	

Makrophagen- Kulturmedium	20 % v/v	humanes Serum
	100 Units/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	in	RPMI-1640
	sterilfiltriert	
Serumentzugs- Medium	100 Units/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	in	RPMI-1640
	sterilfiltriert	
Zellysepuffer	50 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	150 mM	NaCl
	1 % v/v	Triton X-100
	+	Proteaseinhibitoren (complete mini, Roche)
PP2	10 mM	PP2 In Solution (Merck)
Rhodamin gekoppelte Gelatine	50 mM	BNa ₃ O ₃
	62 mM	NaCl
	2 mg/ml	Gelatine, 30 min bei 37 °C
	36 µg/ml	NHS-Rhodamin, 2 h bei Raumtemperatur (RT) rühren, Dialyse in
	3 l	PBS für ca. 24 h
Sukrose-Lösung	1 g/ml	Sukrose
	1x	PBS
Glutaraldehyd	0,5 % w/v	Glutaraldehyd
70 % Ethanol (v/v)		
Alfazyne, PAA		
DMSO		

2.3.4. Lösungen und Puffer für die Western Blot-Analyse

Trenngelpuffer	1,5 M	Trizma base (Sigma Aldrich)
(pH 8,8)	0,004 % w/v	SDS
Sammelpuffer	0,5 M	Trizma base (Sigma Aldrich)
(pH 6,8)	0,004 % w/v	SDS
Acrylamid-Lösung	30 % w/v	Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
SDS-Lösung	10 % w/v	SDS
APS-Lösung	10 % w/v	APS

Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

5 x SDS-PAGE-

Ladepuffer	60 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
(pH 6,8)	30 % v/v	Glycerin
	15 % w/v	SDS
	5 mM	EDTA
	7,5 % v/v	β -Mercaptoethanol
	0,1 % w/v	Bromphenolblau

SDS-PAGE-

Laufpuffer	25 mM	Trizma base (Sigma Aldrich)
(10-fach) (pH 8,3)	192 mM	Glyzin
	0,1 % w/v	SDS
TBST	0,3 % v/v	Tween20
	1x	TBS
Blockierungslösung	3 % w/v	BSA
	1x	TBST

„SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate“ (Life Technologies)

Proteinmarker: PageRuler Unstained Protein Ladder (Life Technologies)

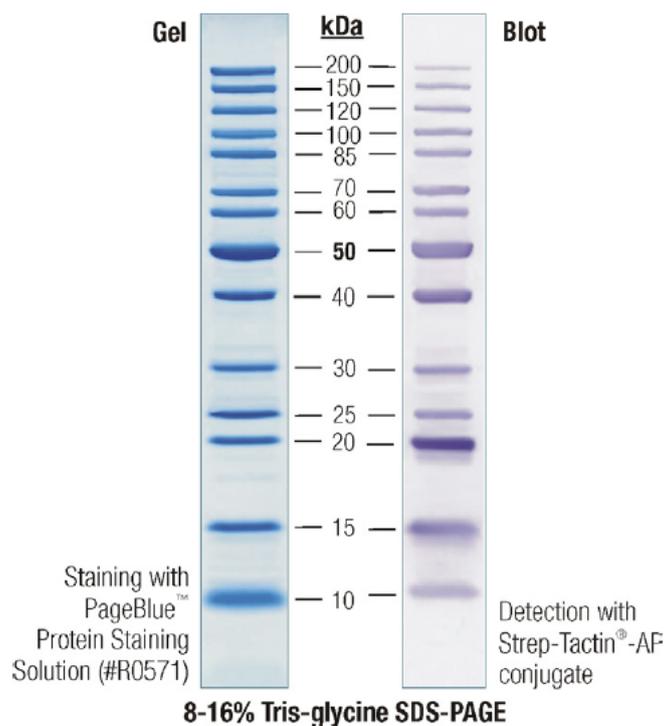


Abbildung 2.1.: PageRuler Unstained Protein Ladder

2.3.5. Lösungen und Puffer für die Immunfluoreszenzanalyse

Formaldehyd	1:10	37 % Formaldehydlösung (Sigma Aldrich)
(Fixierung)	1x	PBS
Permeabilisierungslösung	0,5 % v/v	Triton X-100
	1x	PBS
Blockierungslösung	0,05 % v/v	Triton X-100
	1 % w/v	BSA
	5 % v/v	NHS
	5 % v/v	NGS
	1x	PBS
Waschlösung	0,05 % v/v	Triton X-100
	1x	PBS

Einbettungsmedium	25 % w/v	Glyzerin
	0,1 g/ml	Mowiol (4-88, Roth 0713), 1 h bei RT rühren
	25 % v/v	H ₂ O, 1 h bei RT rühren
	0,1 M	Tris-HCl (pH 8,5), für 2 h bei 50 °C (alle 20 min mischen)
	25 mg/ml	DABCO

HCS CellMask Red stain (Life Technologies)

Proben für SIM (= „Structured Illumination“ Mikroskopie) mussten nach einem besonderen Protokoll vorbereitet werden. Dazu wurden folgende spezielle Lösungen und Puffer benötigt:

Zytoskelettpuffer (pH 6,1)	10 mM	MES
	138 mM	KCl
	3 mM	MgCl
	2 mM	EGTA
		sterilfiltriert
Vorfixierungspuffer	0,25 % w/v	Paraformaldehyd
	0,05 % v/v	Triton X-100 in Zytoskelettpuffer
Fixierungspuffer	4 % w/v	Paraformaldehyd in Zytoskelettpuffer
Permeabilisierungspuffer	0,5 %	Triton X-100 in Zytoskelettpuffer
SIM-Waschpuffer I	0,1 M	Glyzin in Zytoskelettpuffer
SIM-Waschpuffer II	0,1 %	Tween
	1x	TBS

1 µm Tetraspec beads (Life Technologies)

2.4. Antikörper

2.4.1. Primär-Antikörper

Antigen	Wirt	Typ	WB	IF	Quelle
Aktin	Maus	IgG1k	1:20.000		Merck
FHOD1	Maus	monoklonal	1:200		Santa Cruz
FHOD1	Maus	polykonal		1:50	ECM Biosciences
Myosin IIA	Kaninchen			1:100	Sigma Aldrich
pMLC	Kaninchen	polykonal		1:100	Abcam

2.4.2. Sekundär-Antikörper

Konjugat	Wirt	Reaktivität (anti-)	WB	IF	Quelle
Alexa Fluor 488	Ziege	Maus		1:500	Life Technologies
Alexa Fluor 568	Ziege	Kaninchen		1:500	Life Technologies
HRP	Ziege	Maus	1:5000		GE Healthcare

2.4.3. Phalloidine

- **Alexa Fluor 488 Phalloidin**; 1:50 Verdünnung, Life Technologies, Carlsbad, CA (USA)
- **Alexa Fluor 568 Phalloidin**; 1:100 Verdünnung, Life Technologies, Carlsbad, CA (USA)
- **Alexa Fluor 647 Phalloidin**; 1:100 Verdünnung, Life Technologies, Carlsbad, CA (USA)

2.5. siRNA

- **FHOD1 p siRNA**; ON-TARGETplus SMARTpool, Human FHOD1, GE Healthcare Dharmacon Inc., Lafayette, CO (USA)

Zielsequenzen:

GCGCUUGAGUAUCGGACUU

GAUACUACCUGGACACCGA

ACGCAUGAUCACCGAGACA

CCACAUACCGUGAGCGCAA

- **FHOD1 #1 siRNA**; ON-TARGETplus, Human FHOD1, GE Healthcare Dharmacon Inc., Lafayette, CO (USA)

Zielsequenz:

GCGCUUGAGUAUCGGACUU

- **FHOD1#2 siRNA**; ON-TARGETplus, Human FHOD1, GE Healthcare Dharmacon Inc., Lafayette, CO (USA)

Zielsequenz:

GAUACUACCGGACACCGA

- **Kontroll siRNA**; siGENOME Non- Targeting siRNA No. 2, GE Healthcare Dharmacon Inc., Lafayette, CO (USA)

2.6. Vektoren

2.6.1. Klonierungsvektoren

- „pUC18“ [173]

2.6.2. Vektorkonstrukte

- **EGFP-FHOD1** [49]
- **EGFP-FHOD1 Δ C** [49]
- **Lifeact-GFP** [125]

2.7. Inhibitoren

- **Formin FH2 domain inhibitor, SMIFH2**; Merck, Darmstadt
- **InSolution PP2**; Merck, Darmstadt

2.8. Bakterienstämme

- *E. coli* DH5 α ;
F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ^- [103]

2.9. Eukaryotische Zellen

- primäre humane Makrophagen;
wöchentliche Isolierung und Differenzierung aus Buffy Coats (Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)

2.10. Käufliche „Kits“

- „PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep“ Kit;
Life Technologies, Carlsbad, CA (USA)
- „Neon Transfection System 10 μ l Kit“, „Neon Transfection System 100 μ l Kit“; Life Technologies, Carlsbad, CA (USA)
- „Pierce BCA Protein Assay“ Kit; Life Technologies, Carlsbad, CA (USA)
- „iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, Mini“, „iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, Regular“;
Life Technologies, Carlsbad, CA (USA)

2.11. Geräte

- diverse Kühl- und Gefrierschränke, -80 C° - Gefrierschrank
- Eismaschine; FM-120DE-50, Hoshizaki, Amsterdam (NL)
- Waage; 440-47N, Kern, Balingen-Frommern
- Feinwaage; Analytical Plus AP2500, Ohaus, Florham Park NJ (USA)
- pH-Meter; FiveEasy pH, Mettler Toledo, Greifensee (Schweiz)

- **Zentrifugen**; Sorvall RC-5B, RC28S, Thermo Scientific, Rockford (USA); 5417R und 5810R, Eppendorf, Hamburg
- **Magnetrührer mit Edelstahlheizplatte**; RH basic 2, IKA, Staufen
- **Pipetten**; 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl, Eppendorf, Hamburg
- **Pipettierhilfe**; Accu-jet pro, Brand, Wertheim
- **Bakterienbrutschrank**; Typ B12, Heraeus, Hanau
- **Bakterienschüttler**; Certomat BS-1, Sartorius, Göttingen
- **Sterilwerkbank**; Hera Safe, Thermo Scientific, Rockford (USA)
- **Zell-Inkubator**; CB Series, Binder, Tuttlingen; BBD 6220, Heraeus, Hanau
- **magnetische Separations-Apparatur**; QuadroMACS Separations Einheit und MACS MultiStand (= magnetischer Säulenständer), mit LS Separationssäulen und Prä-Separations Filtern, Miltenyi, Bergisch Gladbach mit LS Columns (Miltenyi, 130-042-401) and Pre-Separation Filters (Miltenyi, 130-041-407)
- **Neubauer-Zählkammer**; Hartenstein, Würzburg (G)
- **Photometer**; Ultrospec 3100 pro, Amersham/GE Healthcare Europe, München
- **Nanodrop**; NanoDrop® ND 1000 Spektrophotometer, PeqLab, Erlangen
- **Thermomixer**; Thermomixer® compact, Eppendorf, Hamburg
- **Vortex**; REAX top, Heidolph Instrumente, Schwabach
- **NEON Transfektions System**; Life Technologies, Carlsbad (USA)
- **SDS-Gel-Apparatur**; PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S, Peqlab, VWR, RADNOR, PA (USA)
- **SDS-Gel-Gießstand**; Cast-It S Gelgießstand, Peqlab, VWR, RADNOR, PA (USA)
- **Power Supply**; PeqPOWER E250; Peqlab, VWR, RADNOR, PA (USA)
- **Western Blot-Apparatur**; „iBlot Dry Blotting System“, Life Technologies, Carlsbad, CA (USA)

- **Fotofilmkassette**; Hartenstein, Würzburg
- **Entwicklermaschine**; CURIX 60, AGFA, Greenville, SC (USA)
- **Scanner**; CanoScan 4400F, Canon, Amsterdam (NL)

2.11.1. Mikroskope

Zellkulturmikroskop:

Stand	Nikon Eclipse TS100
Objektive	Plan Fluor 4x / 0.13 PhL LWD 10x / 0.25 Ph1 LWD 20x / 0.4 Ph1 LWD 40x / 0.55 Ph1
Kamera	Nikon D5000 Digitalkamera
Emissionsfilter	Filter set HQ EGFP (grün) / HQ Calcium Crimson, Chroma Technology, Rockingham (USA)
UV-Lampe	Nikon Intensilight 130 W mit Quecksilberlampe
Halogenlampe	30 W

Konfokales Laserscanning Mikroskop (SP2):

Stand	Leica DM IRE2
Objektiv	63x HCX PL APO Lbd. Bl. Oil, NA: 1.4-0.60; u.a.
Detektoren	3x PMT, 1x Trans-PMT
Laserlinien (nm)	Multi-Ar: 458 / 476 / 488 / 496 / 514; HeNe: 543 / 633
Pinhole	variabel (~115 μm)
Spektrale Separation	AOBS + spektrale Detektoren
Fluoreszenzfilter	Filtersystem I 3, Blaue Anregung (BP 450-490, LP515) Filtersystem N 2.1, Grüne Anregung (BP 515-560, LP590) Filtersystem A, UV Anregung (BP 340-380, LP 425)
UV-Lampe	50W HBO Quecksilber
Halogenlampe	100W 12V
CO ₂ Kontrolle	PeCon CTI-Controller 3700 digital
Temperatur Kontrolle	PeCon tempcontrol 37-2 digital
Programm	Leica LCS version 2.61.1537

weitere Komponenten Heiz-Einsatz PPOC; Perfusionskammer; Piezo focus drive

Konfokales Laserscanning Mikroskop (SP5):

Stand	Leica
Objektiv	63x HCX PL APO CS Oil, NA: 1.40-0.60 (iris): u.a.
Detektoren	2x HyD, 2x PMT, 1x Trans-PMT
Laserlinien (nm)	Diode: 405; Multi-Ar: 458 / 476 / 488 / 496 / 514; DPSS: 561; HeNe: 633
Pinhole	variabel
Spektrale Separation	AOBS + spektrale Detektoren
Fluoreszenzfilter	L5 ET (grün; AF488, GFP): BP 480/40 — FP 505 — em. BP 527/30 N3 ET (rot; AF568, mCherry): BP 546/12 — FP 565 — em. 600/40 A (blau; DAPI): BP 340-380 — FP — LP 425 I 3 (grün; AF488, GFP): BP 450-490 — FP — LP 515 N 2.1 (rot; AF568, mCherry): BP 515-560 — FP — LP 590
UV-Lampe	EL 6000 120W (LQHXP 120 LEJ)
Halogenlampe	100W 12V
CO ₂ Kontrolle	BRICK/Ludin
Temperatur Kontrolle	Ludin Cube
Programm	Leica LAS AF
weitere Komponenten	Piezo focus drive: SuperZ Galvo type H (Reichweite: 500 µm; Reproduzierbarkeit: 40 nm) Tandem-Skanner: Variabel: 512x512 @ 5 fps; max. 8192x8192 px; max. 2800 Linien/s; 1x-32x Zoom; Resonant: 512x512 @ 25 fps; max. 1024x1024 px; max. 16.000 Linien/s; 1.7x-32x Zoom; u.a.

Konfokales Spinning-Disk Mikroskop:

Stand	Nikon Eclipse TiE
Objektiv	100x Plan Apo TIRF Oil, NA: 1.45; u.a.
Laserlinien (nm)	405 / 440 / 488 / 515 / 561 / 640
Spinning Disk	Yokogawa CSU X-1 mit dualer Kamera Konfiguration

Emission filter spinning disk (für Laser bezogene Fluoreszenz)	green, 527 (W55); u.a.
Dichroic in spinning disk unit:	405/488/561/640; u.a.
Kameras	2x Hamamatsu EM-CCD C9100-50, 1x Hamamatsu EM-CCD C9100-12
UV-Lampe	EXFO X-Cite 120 Serie, 120W
Fluoreszenzfilter	GFP-B (grün; AF488, GFP): BP 460-500 — DM 505 — BP 510-560; u.a.
Halogenlampe	100W
Inkubationskammer	Tokai Hit INU-F1
Programm	Volocity 6.1.1
weitere Komponenten	Piezo Focus Drive: Prior Scientific NanoScanZ Motorisierte XY stage: Prior Scientific ProScan Auto-Fokus: PerfectFocus system; u.a.

„Structured Illumination“ Mikroskop (SIM-Mikroskop):

Stand	Zeiss Elyra PS1; Structure Illumination (SIM), PALM und Confocal (LSM78) Mikroskop
Objektiv	63x 1.4 oil DIC, Plan Apo u.a.
Detektoren LSM	32 Kanäle GaSP (412-691) Blau PMT (Spektralbereich 371-740) Rot PMT (Spektralbereich 379-758)
Detektoren SIM	EMCCD Kamera Andor iXon DU 885, 1002x1004
Detektoren PALM	EMCCD Kamera Andor iXon DU 897, 512x512
Laserlinien (nm) LSM	405, Argon (458, 488, 514), 561, 633 HeNe
Laserlinien (nm) SIM/PLAM	405, 488, 561, 642
Spektrale Separation	MBS 405, MBS 458, MBS 458/514, MBS 458/561, MBS 488, MBS 488/561, MBS 488/561/633, MBS T80/R20
Fluoreszenzfilter	Fset 77 HE (3 Farben Triple Filter grün, rot, dunkelrot) BP 420-480 + LP 750, blaue Farbstoffe BP 495-575 + LP 750, grüne Farbstoffe

	BP 570-650 + LP 750, rote Farbstoffe
	LP 655, dunkelrote Farbstoffe
Gitter	im Strahlengang; 5 Phasen and 5 Rotationen
Programm	Zeiss Zen 2012

2.12. Programme

- **Adobe Photoshop CS5**; Adobe Systems GmbH, München
- **ImageJ**; National Institutes of Health (NIH), Bethesda (USA)
- **Volocity 6.0**; PerkinElmer Life Sciences, Waltham, Massachusetts (USA)
- **Imaris 7.6.1**; Bitplane AG, Zürich (Schweiz)
- **Powerpoint 2013**; Microsoft, Redmond, WA (USA)
- **Excel 2013**; Microsoft, Redmond, WA (USA)
- **GraphPad Prism 6**; La Jolla, CA (USA)

3. Methoden

Alle Experimente wurden in Laboren der Sicherheitsstufe 2 (S2) durchgeführt.

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Herstellung chemokompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemokompetenter Zellen des *E. coli*-Stammes DH5 α wurde eine 50 ml Übernachtskultur, welche mit einer Einzelkolonie frisch ausgestrichener Bakterien beimpft wurde, in 500 ml LB-Medium 1:100 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 bei 37 °C hochgezogen. Anschließend wurde die Kultur auf Eis heruntergekühlt und in 50 ml Gefäßen bei 4 °C mit 3000 rpm für 5 min zentrifugiert (Sorvall RC-5B, RC28S). Die entstandenen Zellpellets wurden in je 15 ml RFI-Puffer resuspendiert, für 1,5 h auf Eis inkubiert und anschließend in 50 ml Gefäßen vereint. Daraufhin wurde wie zuvor zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Pellets in je 2 ml RFII-Puffer durch sehr vorsichtiges Schwenken im Eiswasserbad resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden anschließend in einem Ethanol-Trockeneisbad aliquotiert (100 μ l) und sofort bei –80 °C gelagert. Die Überprüfung der Kompetenz dieser Bakterien erfolgte durch Transformation einer definierten Menge des „pUC18“-Vektors mit anschließendem Ausplattieren der Bakterien auf antibiotikahaltigen Selektionsagarplatten.

3.1.2. Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Das Einbringen von DNA in kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Es ermöglicht eine Vervielfältigung von Plasmid-DNA in beliebiger Menge. Dazu wurden chemokompetente Bakterien (100 μ l) zusammen mit der einzubringenden DNA (1-100 ng) für 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen anschließenden Hitzeschock für 90 s bei 42 °C konnte die DNA von den Bakterien aufgenommen werden. Daraufhin wurde der Ansatz für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde er in 500 μ l LB-Medium gegeben und für eine

Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler mit 1400 rpm inkubiert. In dieser Zeit konnten die Bakterien die Plasmid-vermittelte Antibiotikaresistenz ausbilden. Schlussendlich wurden die Bakterien über Nacht bei 37 °C auf Selektionsnährböden mit entsprechenden Antibiotika inkubiert.

3.1.3. Plasmidpräparation aus Bakterien

Mit Hilfe des „PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep“ Kits (Life Technologies) wurde nach Herstellerangaben reine, endotoxinfreie Plasmid-DNA aus 100 ml *E. coli*-DH5 α Übernachtskulturen gewonnen. Die nach Präparation in VE-H₂O vorliegende Plasmid-DNA wurde nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei -20 °C gelagert und für die Transfektion primärer humaner Makrophagen verwendet.

3.1.4. Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines NanoDrop ND 1000 Spektrophotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen die Referenzlösung (VE-H₂O) ermittelt. Dazu wurden 1-2 μ l der Probe zur Messung auf den Messsensor gegeben. Mittels der ND 1000 V 3.1.0 Software wurde die Konzentration und die Reinheit der Probe ermittelt. Letzteres setzt sich aus dem Quotienten der beiden Werte OD₂₆₀/OD₂₈₀ zusammen. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Geringere Werte weisen auf eine Proteinverunreinigung hin.

3.2. Zellkulturtechniken

3.2.1. Isolierung und Kultivierung primärer humaner Makrophagen

Primäre Zellen bieten den Vorteil eines physiologisch nahen Modellsystems. Deswegen wurde der aufwendige und relativ teure Prozess der wöchentlichen Monozyten-Isolierung, inklusive deren Differenzierung zu primären humanen Makrophagen, dem Kultivieren immortalisierter Zelllinien vorgezogen. Zudem bilden primäre humane Makrophagen im Gegensatz zu aus Ihnen generierten Zelllinien, welche wenige, unregelmäßig geformte Podosomen zeigen, eine Vielzahl an regelmäßig geformten Podosomen aus. Somit eignen sie sich deutlich besser zu statistischen Analysen bei der Untersuchung von Podosomen.

Primäre humane Makrophagen können über eine Isolierung von CD14⁺ Zellen aus Buffy Coats venöser Blutproben (Nebenprodukt bei der Verarbeitung einer Vollblutspende zu

Erythrozytenkonzentraten und gefrorenen Frischplasmaprodukten) gewonnen werden. Dies geschieht mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugation über einen Saccharose-Gradienten. In der Gegenwart von humanem Serum bzw. Zytokinen, wie dem Monozytenkolonienstimulierenden Faktor (= M-CSF; „Macrophage colony-stimulating factor“), differenzieren die isolierten Monozyten innerhalb von 6-7 Tagen zu Makrophagen.

Die Isolierung wurde mit eiskalten Reagenzien unter einer Sterilwerkbank durchgeführt, wobei alle Zentrifugationsschritte bei 4 °C und 450 x g ohne Bremse durchgeführt wurden. Als Erstes wurden dreimal je 15 ml Lymphozyten Separations Medium (= LSM) mit ca. 20 ml löslichen Buffy-Coat-Bestandteilen (ca. 60 ml aus 500 ml Vollblut) vorsichtig überschichtet. Daran schloss sich ein 30 minütiger Zentrifugationsschritt an. Dabei werden Lymphozyten von Erythrozyten und Plasma getrennt. Die gewünschten mononukleären CD14⁺ Zellen befinden sich in der weißen Interphase zwischen zwei darunter liegenden Schichten (der klaren LSM- und der untersten, roten Erythrozyten-Schicht) und der sich darüber befindenden, gelblichen Plasma-Schicht. Die mononukleären Zellen wurden zu je 10 ml RPMI-1640 in neue 50 ml Gefäße gegeben, welche anschließend mit weiterem RPMI-1640 aufgefüllt wurden. Nach einem 10 minütigen Zentrifugationsschritt wurden die Zellen, nach Verwerfen der Überstände und Resuspendieren der Zell-Pellets in je 10 ml RPMI-1640 und anschließendem erneuten Auffüllen der Gefäße mit RPMI-1640, gewaschen. Dieser Waschschrift wurde noch 2 Mal wiederholt, wobei nach der ersten Wiederholung das Gesamtzellvolumen auf zwei 50 ml Gefäße und nach der zweiten auf ein 50 ml Gefäß vereinigt wurde. Nach einer weiteren 10 minütigen Zentrifugation wurde das Zell-Pellet in 1,5 ml Monozyten-Isolierungspuffer resuspendiert und in ein 2 ml Gefäß überführt. Es wurden 250 µl magnetische anti-CD14 MicroBeads dazugegeben, alles durch dreimaliges Invertieren vorsichtig durchmischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dabei können die magnetischen Antikörper-gekoppelten Beads an den CD14-Oberflächenmarker der Monozyten binden.

In der Zwischenzeit konnte die Separationsapparatur, bestehend aus magnetischem Säulenständer, Separationssäule und Prä-Separations Filter, aufgebaut werden. Der Prä-Separations Filter wurde auf die Separationssäule gesetzt und beides zusammen in den magnetischen Säulenständer platziert. Nachdem die Separationssäule, sowie der Prä-Separations Filter mit 1 ml eiskaltem Monozyten-Isolierungspuffer äquilibriert wurde, konnte die Zell-Bead-Suspension nach der 15 minütigen Inkubationszeit zugegeben werden. Nach komplettem Durchfluss wurden 3 ml Monozyten-Isolierungspuffer zugegeben, die Säule aus dem magnetischen Ständer genommen und über ein 50 ml Gefäß, in welchem sich 10 ml RPMI-1640 befanden, gehalten. Die Elution der CD14⁺ Zellen von der Säule erfolgte, indem die

Flüssigkeit mit einem Stempel aus der Säule gedrückt wurde.

Anschließend wurde das Gefäß bis 30 ml mit RPMI-1640 aufgefüllt und aus einem Aliquot die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Schlussendlich wurden je $1,5 \times 10^5$ Zellen in einem Volumen von 1 ml pro Well in einer 6 Well Platte ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 h in einem Zell-Inkubator in wassergesättigter Atmosphäre und 37°C sowie 5 % CO_2 -Gehalt wurde das RPMI-1640 durch je 1,5 ml vorgewärmtes Makrophagen-Kulturmedium ersetzt. Durch weitere Inkubation der Zellen im Zell-Inkubator konnten sich die Monozyten innerhalb mindestens 6 Tagen zu Makrophagen differenzieren, was durch Wachstumsfaktoren des Kulturmediums hervorgerufen wird.

Alle sich anschließenden Zellkulturarbeiten fanden unter einer Sterilwerkbank statt, wobei ausschließlich sterile Einmal-Plastikwaren verwendet wurden.

3.2.2. Transiente Transfektion primärer humaner Makrophagen

Um primäre Makrophagen mit einer ausreichend hohen Effizienz zu Transfizieren, wurde die Methode der Elektroporation verwendet. Dabei handelt es sich um einen mechanischen Prozess, wobei ein elektrischer Puls temporäre Poren in der Zellmembran hervorruft. Durch diese können DNA oder RNA in die Zelle gelagen.

Zur Elektroporation müssen die Zellen in Suspension vorliegen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 500 μl Alfazyme pro Well für 10 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert, wobei das Ablösen der Zellen beginnt. Makrophagen haften sich durch ihre zahlreichen Adhäsionsstrukturen sehr stark an den Untergrund an. Um die Ausbeute der sich ablösenden Zellen zu erhöhen, wurde nun zusätzlich 1 ml Kulturmedium zugegeben und die Flüssigkeit mit Hilfe einer 1000 μl Pipette mehrmals in verschiedenen Richtungen über das Well gespült. Dieser Vorgang wurde nach Überführen der Zellsuspension in ein 50 ml Gefäß und erneuter Zugabe von 1 ml Kulturmedium zu den noch nicht abgelösten Zellen wiederholt. Nachdem alle abgelösten Zellen in dem 50 ml Gefäß vereinigt wurden, erfolgte eine Zentrifugation bei $450 \times g$ für 5 min bei Raumtemperatur. Der daraus resultierende Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 400-500 μl Kulturmedium resuspendiert. Aus einem Aliquot der Zellsuspension wurde nun die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt, um definierte Zellanzahlen bei der Transfektion einsetzen zu können. Man kann damit rechnen, dass sich ca. $1/3$ der Makrophagen von den Platten ablösen.

Die folgende Transfektion humaner Makrophagen wurde mit Hilfe des Neon Transfektions Systems (Life Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei 2 Pulse mit je

1000 V für 40 ms in R-Puffer angelegt wurden.

Zur Überexpression von EGFP-FHOD1 bzw. EGFP-FHOD1 Δ C wurden je 0,5 μ g DNA pro 1×10^5 Zellen eingesetzt und auf Deckgläschen (12 mm, No.1, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön) für 3,5 h ausgesät. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und zur mikroskopischen Analyse herangezogen.

Knockdowns von FHOD1 wurden mittels eines ON-TARGETplus SMARTpools (GE Healthcare Dharmacon Inc.) erzielt (FHOD1 p siRNA). Für ausgewählte Experimente wurden einzelne siRNAs des Pools separat verwendet (FHOD1 siRNA #1+2). In allen Fällen wurde Non-Targeting siRNA No. 2 (Thermo Fisher Scientific) für Kontrollbedingungen verwendet (Kontroll siRNA) und alle siRNAs in einer Endkonzentration von 1 μ M bei 1×10^5 Zellen/10 μ l eingesetzt.

Zur Ermittlung der Knockdown-Effizienz der verschiedenen FHOD1 siRNAs wurden je 1×10^6 Zellen mit entsprechenden FHOD1 siRNAs bzw. Kontroll siRNA transfiziert und zur weiteren Kultivierung wieder in 6 Well Platten ausgesät. Nach 72 h wurde aus den verschiedenen Proben Gesamtprotein extrahiert. Nach Konzentrationsbestimmung (siehe 3.3.2) wurden diese Proben einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen und die Effizienz der Knockdowns in einem Western Blot überprüft.

Um Podosomenparameter, wie Größe und Anzahl unter Knockdownbedingungen im Vergleich zu Kontrollzellen zu bestimmen, wurden von 3 verschiedenen Donoren je 1×10^5 Zellen nach entsprechender siRNA-Transfektion auf Deckgläschen ausgesät. Nach 72 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, gefärbt und zur mikroskopischen Analyse herangezogen.

Zur Vorbereitung von Podosomenreformationsversuchen mussten pro Knockdown sowie für die Kontrollen je 6 Deckgläschen mit entsprechend jeweils 1×10^5 siRNA-transfizierten Zellen für 72 h kultiviert werden. Es wurden dazu in Zellen aus 3 Donoren Knockdowns mit FHOD1 p siRNA, FHOD1 siRNA #1 und #2 und Kontroll siRNA herbeigeführt.

Für die Bestimmung der Podosomen-Lebenszeit, sowie Podosomenreformationsversuchen im Live Cell Imaging wurden aus 3 verschiedenen Donoren jeweils im ersten Schritt je 1×10^6 Zellen mit FHOD1 p siRNA, bzw. Kontroll siRNA transfiziert und für 2,5 Tage in 6 Well Platten kultiviert. Dann wurden die Zellen erneut abgelöst und je 1×10^5 Zellen einer weiteren siRNA-Transfektion unterzogen, wobei zusätzlich je 0,25 μ g Lifeact-GFP zugegeben wurde. Dies diente der Visualisierung der Podosomen über fluoreszierendes F-Aktin, die nach weiteren 12 h mikroskopisch durchgeführt wurde. Die Zellen wurden dazu nach der zweiten Transfektion auf Live Cell Schälchen ausgesät (12 mm Glasbodenschälchen, WillCo-dish, Amsterdam, NL).

Für Matrixdegradationsexperimente wurden ebenfalls aus 3 verschiedenen Donoren zunächst 1×10^6 Zellen mit FHOD1 p siRNA, bzw. Kontroll siRNA transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen abgelöst und je 1×10^5 Zellen auf Deckgläschen mit Rhodamin-markierter Gelatine ausgesät.

3.2.3. Podosomenreformationsversuch

Dieser Versuch wurde für 3 verschiedene Donoren mit FHOD1 p siRNA, FHOD1 siRNA #1 und #2 und Kontroll siRNA transfizierten Zellen, 72 h nach Transfektion, wie in dem Methodenpaper „Podosome reformation in macrophages: assays and analysis“ [23] beschrieben, durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen zunächst für 2 h unter Serumentzug kultiviert. Dann wurde pro siRNA-Kondition zu je 5 Proben der Src-Kinase Inhibitor PP2 (25 μ M in Serumentzugs-Medium) zugegeben. Eine weitere Kontrollprobe wurde jeweils mit dem gleichen Mengen-Anteil DMSO in Serumentzugs-Medium behandelt. Nach 30 min wurde die Kontrollprobe (= -PP2) sowie eine PP2-behandelte Probe (= +PP2) fixiert und in PBS bis zum Schluss des Experiments aufgehoben. Bei den weiteren 4 Proben wurde die Inhibitor-Lösung nach den 30 min durch Makrophagen-Kulturmedium ausgetauscht (= Auswaschung). Nach je 30, 60, 90 und 120 min wurde je eine der Proben wie zuvor fixiert und in PBS gelagert. Alle Proben wurden zusammen permeabilisiert und mit Phalloidin (\rightarrow Podosomen) und HCS CellMask Red stain (\rightarrow Zytoplasma) markiert. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (SP2).

3.2.4. Matrixdegradation

Zur Messung der Fähigkeit primärer humaner Makrophagen zur Matrixdegradation wurden zunächst Deckgläschen mit Rhodamin gekoppelter Gelatine beschichtet, worauf die Zellen anschließend ausgesät werden konnten. Dazu wurde 1 g/ml Sukrose/PBS auf 37 °C vorgewärmt, zur Quervernetzung der Gelatine 1:50 zu Rhodamin gekoppelter Gelatine (2 mg/ml) gegeben und vorsichtig durchmischt. Je ein Deckgläschen wurde in einem 30 μ l Tropfen dieser Lösung auf Parafilm in einer Feuchtkammer platziert und für 15 min bei RT abgedunkelt inkubiert. Dann wurden die Deckgläschen nach Unterspülen mit PBS mit einer Pinzette entnommen, kurz auf Papier abgetropft, und in je einen 30 μ l Tropfen 0,5 % Glutaraldehyd auf Parafilm in einer Feuchtkammer auf Eis gegeben und für 15 min abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurden sie mit Hilfe von Unterspülen mit PBS entnommen

und in einer sterilen 6 Well Platte 3 Mal mit sterilem PBS gewaschen. Nun wurden die Deckgläschen abgedunkelt für 15 min bei RT in je 1 ml 70 % Ethanol inkubiert, woraufhin zwei weitere 15 minütige Inkubationen in je 1 ml Medium im Inkubator erfolgten.

Mit FHOD1 p siRNA, bzw. Kontroll siRNA behandelte primäre humane Makrophagen aus 3 Donoren wurden je zu 1×10^5 Zellen auf diesen Deckgläschen ausgesät, nach 6 h fixiert und für 4 min in Aceton bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ permeabilisiert. Daran schloss sich eine Färbung mit Alexa Fluor 647 Phalloidin und die konfokalmikroskopische Dokumentation (SP2) an.

3.3. Proteinbiochemische Verfahren

3.3.1. Gesamtprotein-Extraktion aus primären humanen Makrophagen

In 6 Well Platten kultivierte primäre humane Makrophagen wurden zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen entsprechend ihrer Dichte mit bis zu 200 μl Zellysepuffer pro Well mit einem Zellschaber abgelöst und mit einer Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses Lysat wurde unter gelegentlichem Vortexen für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min bei 13.000 g zentrifugiert.

Nach Protein-Konzentrationsbestimmung wurden die verschiedenen Proben in gleichen Konzentrationen einer SDS-Gelelektrophorese und einer finalen Western Blot Analyse unterzogen.

Zur Detektion von FHOD1 im Western Blot ist es wegen hoher Proteolyse-Anfälligkeit besonders wichtig die Lysate sofort zu verwenden und nicht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu lagern.

3.3.2. Protein-Konzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden zum Konzentrationsabgleich verschiedener Gesamtprotein-Extrakte siRNA transfizierter Zellen mit einem NanoDrop ND 1000 Spektrophotometer ermittelt. Dazu wurde das „Pierce BCA Protein Assay“ Kit nach Herstellerangaben verwendet.

3.3.3. Elektrophoretische-Auftrennung von Proteinen in einem Natriumdodecyl-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (= „Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“; SDS-Gelelektrophorese) fand, wie nach Laemmli (1970) beschrieben, in einem diskontinuierlichen System statt. Die Zusammensetzung der Gele entsprach folgenden Angaben:

	Trenngel (7,5 %)	Sammelgel
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,4 ml
VE-H ₂ O	5 ml	2,6 ml
Acrylamid	2,5 ml	1 ml
SDS-Lösung	100 µl	50 µl
Temed	10 µl	7 µl
APS-Lösung	50 µl	25 µl

Die Proteinextrakte wurden mit 5 x SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt, für 2 min bei 96 °C aufgeköcht und auf 7,5 % SDS-Gele aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und 80-150 V im Trenngel.

3.3.4. Western Blot und Immundetektion

Zum Transfer von Proteinen aus einer Polyacrylamidmatrix auf eine Nitrozellulose-Membran wurde das „iBlot Dry Blotting System“ (Life Technologies) nach Herstellerangaben verwendet. Der Proteintransfer wurde bei 23 V für 11 min durchgeführt. Anschließend wurde die Immundetektion direkt auf der Membran durchgeführt.

Vor der Hybridisierung mit den Primärantikörpern wurden unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers durch Inkubation der Membran in Blockierungslösung (3 % BSA in TBST) für 30 min abgesättigt. Die Inkubation des primären bzw. des sekundären Antikörpers erfolgte ebenfalls in Blockierungslösung und zwar für 1-2 h bzw. 45 min bei RT. Nach den einzelnen Inkubationsschritten wurde mit TBST gewaschen. Die schlussendliche Detektion erfolgte mit Hilfe des „SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate“ (Life Technologies) auf Fotofilmen (Super RX, Fujifilm, Tokio, Japan).

3.4. Immunzytochemie

3.4.1. Immunfluoreszenz primärer humaner Makrophagen

Die Immunfärbung der Zellen wurde, neben einer Direktmarkierung von filamentösem Aktin mittels Fluorochrom-gekoppelten Phalloidins, nach der indirekten Methode durchgeführt. Dabei bindet ein primärer Antikörper spezifisch an das Epitop des zu detektierenden Proteins in der fixierten und permeabilisierten Zelle. Anschließend bindet ein sekundärer Antikörper, welcher ein Fluorochrom trägt, an den primären Antikörper. Die Detektion erfolgt über die Anregung des Fluorochroms durch monochromatisches Licht mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Die Zellen wurden hierzu in einer Zellzahl von 1×10^5 auf sterilen Deckgläschen kultiviert. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 10 min in 3,7 % FA/PBS bei RT. Es schloss sich ein 10 minütiger Permeabilisationsschritt in 0,5 % Triton/PBS an. Die Zellen wurden nun zunächst für 30 min mit Blockierlösung inkubiert (5 % NHS und 5 % NGS in 1 % BSA/0,05 % Triton/PBS). Anschließend wurde die Primärantikörper- und Sekundärantikörper-Inkubation (inklusive Alexa Fluor-markiertem Phalloidin) für 45 min, bzw. 30 min in PBS + 1 % BSA + 0,05 % Triton durchgeführt. Überschüssiges Serum sowie ungebundene Antikörper wurden nach diesen Inkubationen jeweils durch Waschen mit 0,05 % Triton/PBS entfernt. Die Präparate wurden anschließend in Mowiol + DABCO auf Objektträgern (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön) eingebettet und bis zur mikroskopischen Untersuchung mindestens über Nacht getrocknet. Bei der Färbung des endogenen FHOD1 wurde Triton in allen Schritten durch 0,2 % Saponin ersetzt. Wurden Zellen ausschließlich mit Alexa Fluor-markiertem Phalloidin gefärbt entfiel die Blockierung und primäre Antikörperinkubation.

3.4.2. Probenvorbereitung zur „Structured Illumination“ Mikroskopie

Zur optimalen Darstellung der Podosomenkabel mit Hilfe von „Structured Illumination“ Mikroskopie (= SIM) mussten die Zellen nach einem speziellen Protokoll fixiert, permeabilisiert und gefärbt werden. Auf sterilen Deckgläschen kultivierte Zellen wurden für 1 min bei 37 °C mit 0,25 % PFA/0,05 % Triton in Zytoskelettpuffer (10 mM MES, 138 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 2 mM EGTA) vorfixiert. Daran schloss sich die eigentliche Fixierung in 4 % PFA/Zytoskelettpuffer für 30 min bei RT an. Die Permeabilisierung erfolgte für 5 min bei RT in 0,5 % Triton/Zytoskelettpuffer. Die Zellen wurden 1 Mal mit Waschpuffer I

(0,1 M Glyzin/Zytoskelettpuffer) und 2 Mal mit Waschpuffer II (TBST) für jeweils 10 min gewaschen. Die anschließende Inkubation mit Alexa Fluor 488-Phalloidin erfolgte in TBST + 5 % NHS + 5 % NGS für 60 min. Nun wurde 3 Mal 5 min mit TBST und 2 Mal 2 min mit TBS gewaschen, bevor die Deckgläschen in Mowiol + DABCO auf Objekträgern eingebettet wurden. Die mikroskopische Dokumentation erfolgte durch die AG A. Cambi (Radboud Universität, Nijmegen, Niederlande).

3.5. Mikroskopie und mikroskopiebasierte Analysen

Für einen Großteil dieser Arbeit wurden Mikroskopietechniken und Mikroskopdaten-Analysen herangezogen. Zum einen wurden fixierte Proben zu Lokalisationsstudien von FHOD1 an Podosomen, sowie Analysen eines potenziellen Effekts auf die Struktur und Funktion von Podosomen mit konfokalen Laser-Scanning Mikroskopen aufgenommen. Zum anderen war von Interesse, die Lebenszeit und Neubildung von Podosomen in Abhängigkeit von FHOD1 in lebenden Zellen zu beobachten. Dazu wurde zur schnellen Generierung von Daten hauptsächlich ein konfokales Spinning-Disk System benutzt, bzw. auf ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop mit einem extra schnellen Scanner (Resonanz Scanner) (SP5) ausgewichen.

In beiden Fällen handelte es sich bei diesen Mikroskopen um konfokale Fluoreszenzmikroskope, die das Licht einer punktförmigen Lichtquelle auf einen gezielten Punkt des Präparates bündeln und anschließend ausschließlich das reflektierende Licht dieses Punktes detektieren können. Nach Abrastern der Probe werden die (Licht-) Informationen aller einzelnen Punkte am Computer zu einem Bild zusammengesetzt.

Der Vorteil eines konfokalen Spinning-Disk Systems gegenüber einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ist, dass die (Licht-) Informationen mehrerer Punkte durch eine rotierende Lochscheibe (Nipkow-Scheibe) gleichzeitig gesammelt werden können. Dies beschleunigt die Aufnahmegeschwindigkeit. Ein gewisser Anteil der (Licht-) Information geht jedoch an der Scheibe verloren.

Neueste Laser-Scanning Mikroskope sind durch Ausstattung sogenannter Linienscanner maximal in der Lage die (Licht-) Informationen aus einer Linie der Probe gleichzeitig zu detektieren. Die (Licht-) Informationsausbeute ist allerdings höher, als bei einem Spinning-Disk System. Grob zusammengefasst kann man also sagen, dass die Abbildung mit einem Laser-Scanning Mikroskop genauer, mit einem Spinning-Disk System allerdings schneller ist, weswegen es sich für Lebendzellaufnahmen meist besser eignet.

Was beide Systeme zu gleichen Teilen limitiert, ist das maximale Auflösungsvermögen, was dort durch die Wellenlänge des verwendeten Lichts bei ca. 200 nm liegt. Um dies zu erhöhen und somit Strukturen, wie Podosomen und vor allem Podosomenkabel, präziser abbilden zu können, wurde in dieser Arbeit die „Structured Illumination“ Mikroskopietechnik (SIM) verwendet. Durch mathematische Operationen lässt sich im SIM die maximal mögliche Auflösung auf etwa 100 nm in x,y-Richtung und auf 250-300 nm in z-Richtung verdoppeln. Bei der Aufnahme erzeugt ein Beugungsgitter zwischen Anregungslaser und Linse zunächst ein spezifisches Beugungsmuster auf dem Objekt, durch Drehen des Gitters nachfolgend verschiedene Beugungsmuster aus verschiedenen Winkeln. Durch eine Fourier-Transformation lassen sich zusätzliche Informationen aus allen mit Beugungsmustern aufgenommenen Aufnahmen extrahieren, wodurch sich die Auflösung der Aufnahme erhöhen lässt.

3.5.1. Ermittlung der Podosomenparameter: Anzahl, Größe

Die Podosomenparameter Anzahl/Zelle und Größe der Podosomen wurden aus Aufnahmen mit FHOD1 p siRNA und Kontroll siRNA behandelten und Alexa Fluor 488-Phalloidin gefärbten Zellen, die mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (SP5) angefertigt wurden, ermittelt. Dazu wurde das Programm ImageJ mit den folgenden Makros verwendet. Es ist wichtig, dass unter Image > Properties die richtigen Bilddimensionen in μm abgespeichert sind.

Bestimmung der Podosomenanzahl/Zelle:

```

run("8-bit");
run("Smooth");
run("Subtract Background...", "rolling=25");
run("Gamma...", "value=1");
run("Convolve...", "text1=
      [-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 30 -1 -1\n
      n-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 -1 -1 -1\n] normalize");
run("Make Binary");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=0.1-50 circularity=0.80-1.00
      show=Masks display");
roiManager("Show None");
roiManager("Show All");
n = roiManager("count");
for (i=0; i<n; i++) {roiManager("select", i);
run("Find Maxima...", "noise=0 output=Count light");}

```

Die Umrisse der Zellen wurden vor Anwendung dieses Makros manuell in den ROI Manager aufgenommen. D.h. man zeichnet mit dem "freehand selection tool" je den Umriss um die Zellen und speichert diese im ROI Manager (Analyze > Tools > ROI Manager) ab (Add {t}).

Bestimmung der Podosomengröße:

```

run("8-bit");
run("Subtract Background...", "rolling=1.5");
run("Despeckle");
run("Make Binary");
run("Watershed");
run("Set Measurements...", "area redirect=None decimal=3");
run("Analyze Particles...", "size=0.01-50.00
      circularity=0.80-1.00 show=Masks display");

```

Es wurden jeweils individuelle Knockdown-Experimente mit Zellen von 3 unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Für die Anzahl der Podosomen/Zelle wurden jeweils > 50 Zellen pro siRNA Behandlung ausgewertet. Zur Bestimmung der Podosomengröße wurden die Mikros-

kopdaten der selben Knockdown-Experimente verwendet. Es lagen je siRNA Behandlung 10 Aufnahmen unter einem 1,5 fachen Zoom vor. Es wurden alle Podosomengrößen in diesen 10 Aufnahmen ermittelt (> 10.000 Podosomen pro siRNA Behandlung).

Die gewonnenen Daten wurden in Excel weiter ausgewertet und in GraphPad Prism zur graphischen Darstellung verarbeitet.

3.5.2. Ermittlung des Podosomenparameters: Lebenszeit

Die Podosomen-Lebenszeit wurde in FHOD1 p siRNA und Kontroll siRNA behandelten Zellen, in welchen zusätzlich Lifeact-GFP transfiziert wurde, untersucht. Dazu wurden die sich in Live Cell Schälchen befindenden Zellen in eine kleine Inkubationskammer eines konfokalen Spinning-Disk Mikroskops gegeben, um eine ständige Temperatur von 37 °C und CO_2 -Versorgung zu gewährleisten. Dort wurde für 45 min, alle 15 s eine Aufnahme einer einzelnen Zelle gemacht. Ein „Perfect Focus System“ (PFS) sorgte dafür, dass die Zelle die gesamte Zeit im Fokus blieb.

Auf diese Art und Weise wurde jeweils mindestens eine Zelle aus Knockdown-Experimenten 3 unterschiedlicher Donoren aufgenommen.

Unter Zuhilfenahme der Track-Funktion der Programms Imaris wurde durch die Verfolgung der einzelnen Podosomen über die Zeit ihre jeweilige Lifetime ermittelt. Die Länge eines Tracks spiegelt die Lebenszeit wieder. Die gewonnenen Daten wurden in Excel weiter ausgewertet und in GraphPad Prism zur graphischen Darstellung verarbeitet.

3.5.3. Ermittlung der Podosomenanzahl im Podosomenreformationsversuch

Die Podosomenanzahl wurde wie in Cervero et al. [23] beschrieben ermittelt (> 50 Zellen pro siRNA Behandlung für jeden Zeitpunkt). Dabei wurde erneut mit ImageJ-Makros gearbeitet. Es war wieder darauf zu achten, dass unter Image $>$ Properties die richtigen Bilddimensionen in μm abgespeichert sind. Im ersten Schritt wurde ein Makro auf die Zytoplasma-Aufnahme angewandt, um die individuellen Zellen zu markieren.

Identifikation von Zellen:

```
run("8-bit");
run("Smooth");
run("Gamma...", "value=0.40");
run("Median...", "radius=4");
run("Gaussian Blur...", "sigma=4");
run("Make Binary");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=150-Infinity
      circularity=0.30-1.00 show=Masks clear exclude add");
```

Die Umrisse der einzelnen Zellen waren nun als ROIs definiert. Jetzt konnte für die Podosomen-Aufnahme des selben Bildes ein weiteres Makro zur Ermittlung der Podosomenanzahl pro Zelle bzw. ROI verwendet werden.

Bestimmung der Podosomenanzahl/Zelle in Podosomenreformativversuchen:

```
run("8-bit");
run("Smooth");
run("Subtract Background...", "rolling=5");
run("Gamma...", "value=1.30");
run("Convolve...", "text1=[-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 -1 -1 -1\n
      n-1 -1 30 -1 -1\n-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 -1 -1 -1\n] normalize");
run("Make Binary");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=0.10-50 circularity=0.80-1.00
      show=Masks display");
roiManager("Show None");
roiManager("Show All");
n = roiManager("count");
for (i=0; i<n; i++) {roiManager("select", i);
run("Find Maxima...", "noise=0 output=Count light");}
```

Die gewonnenen Daten wurden in Excel weiter ausgewertet und in GraphPad Prism zur graphischen Darstellung verarbeitet.

3.5.4. Ermittlung der Podosomendichte im Podosomenreformativversuch

Zusätzlich wurde die Dichte der Podosomen innerhalb der mit Podosomen bedeckten Fläche in den Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten der Podosomenreformativversuche ana-

lysiert (30 Zellen pro siRNA Behandlung für jeden Zeitpunkt). Dabei wurde, ähnlich wie schon in 3.5.1 beschrieben, in ImageJ mit dem “freehand selection tool” zunächst jeweils die mit Podosomen bedeckte Fläche in jeder Zelle eingezeichnet und im ROI Manager abgelegt. Anschließend wurde die Podosomenanzahl innerhalb dieser Fläche mit Hilfe des in der oben erwähnten Publikation beschriebenen Makros (Bestimmung der Podosomenanzahl/Zelle in Podosomenreformationsversuchen) ermittelt. Die gewonnenen Daten wurden in Excel weiter ausgewertet und in GraphPad Prism zur graphischen Darstellung verarbeitet. Zur Verdeutlichung der Verteilung der verschiedenen Podosomen-Dichten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden zusätzlich die Variationskoeffizienten (= relatives Streuungsmaß) in GraphPad Prism ermittelt und ebenfalls graphisch dargestellt.

3.5.5. Ermittlung der pMLC Intensitäten an Podosomen

Aus Podosomenreformationsversuchen, mit FHOD1 p siRNA bzw. Kontroll siRNA transfizierten Zellen aus 3 Donoren, wurde zusätzlich die pMLC („Phosphorylated Myosin light chain“)-Intensität an Podosomen zu den verschiedenen Zeitpunkten, vor und während der Reformation, ermittelt. Dazu wurden die fixierten und permeabilisierten Proben neben Alexa Fluor 488-Phalloidin auch mit einem pMLC-Antikörper (+ Alexa Fluor 568) gefärbt. Nach der konfokalmikroskopischen Dokumentation dieser Proben (SP5) erfolgte die Intensitätsmessung von pMLC in der mit Podosomen bedeckten Fläche mit Hilfe des Programms Volocity. Zunächst wurde die mit Podosomen bedeckte Fläche durch Einzeichnen von ROIs in jeder Zelle bestimmt. In diesen Rois wurde anschließend die pMLC-Intensität anhand des Fluoreszenzsignal des sekundären Antikörpers gemessen. Die mittleren Fluoreszenzsignale aus je 20 ROIs pro siRNA zu jedem Zeitpunkt wurden in Excel weiter ausgewertet und in GraphPad Prism zur graphischen Darstellung verarbeitet.

3.5.6. Ermittlung der Intensität der Matrixdegradation

Je 30 Zellen pro siRNA Behandlung (FHOD1 p siRNA bzw. Kontroll siRNA) aus 3 Donoren wurden auf das Ausmaß der Matrixdegradation untersucht. Dazu wurde in konfokalmikroskopischen Aufnahmen (SP2) mit ImageJ die mittlere Intensität des Rhodamin-Signals in der abgebauten Region in Bezug auf nicht abgebautes Areal (Hintergrund) bestimmt und als prozentualer Abbau in GraphPad Prism graphisch zusammengefasst.

3.6. Statistik

Statistische Analysen wurden zur Ermittlung möglicher signifikanter Unterschiede in Graph-Pad Prism unter Anwendung des „unpaired Student's t-tests“ durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden mit * - **** und p-Werten gekennzeichnet (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$)

4. Ergebnisse

Der Einfluss bestimmter Proteine auf Podosomen kann mit Hilfe von Knockdown-Experimenten und ausgewählten Inhibitoren untersucht werden. Bei der Auswertung dieser Experimente können verschiedene Parameter herangezogen werden. Neben funktionellen Parametern, wie der Fähigkeit von Podosomen zur Matrixdegradation, lassen sich auch strukturelle Parameter aufführen. Dazu gehören z.B. die Podosomenanzahl pro Zelle und die Podosomengröße. Zudem gibt es dynamische Parameter, wie die Podosomenlebenszeit oder ihre Neubildung. Letzteres wird in sogenannten Podosomenreformationsversuchen untersucht. Dazu bedient man sich zunächst bestimmter Inhibitoren, die ein reversibles Auflösen von Podosomen induzieren. Der Src-Kinase-Inhibitor PP2 beispielsweise ist dazu bestens geeignet, da eine Inhibition der Src-Kinasen zur Auflösung von Podosomen führt [83]. Nach Auswaschen des Inhibitors können sich die Podosomen erneut bilden, was als Podosomenreformation bezeichnet wird. Während eines solchen Versuchs werden Zellen zu verschiedenen Zeiten vor und nach Auswaschen des Inhibitors fixiert und anschließend der weiteren Analyse unterzogen (Abb. 4.1). Bei diesem Ansatz lassen sich jedoch ausschließlich Informationen zu den ausgewählten Zeitpunkten generieren. Um ein vollständigeres Bild über den Prozess und die Dynamik der Podosomenneubildung zu bekommen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Podosomenreformationsversuch im Live Cell Imaging entwickelt, der in der Publikation „Podosome reformation in macrophages: assays and analysis“ genauer beschrieben ist [23].

4.1. Entwicklung eines Live Cell Imaging Assays zur Analyse der Podosomenneubildung

Um detaillierte Einblicke in den gesamten Prozess der Podosomenreformation zu bekommen, wurde ein innovativer Versuchsaufbau etabliert, der die Dokumentation mit einem Live Cell Imaging Mikroskop ermöglicht.

Zur Vorbereitung wurden mit Lifeact-GFP transfizierte Zellen in Live Cell Schälchen aus-

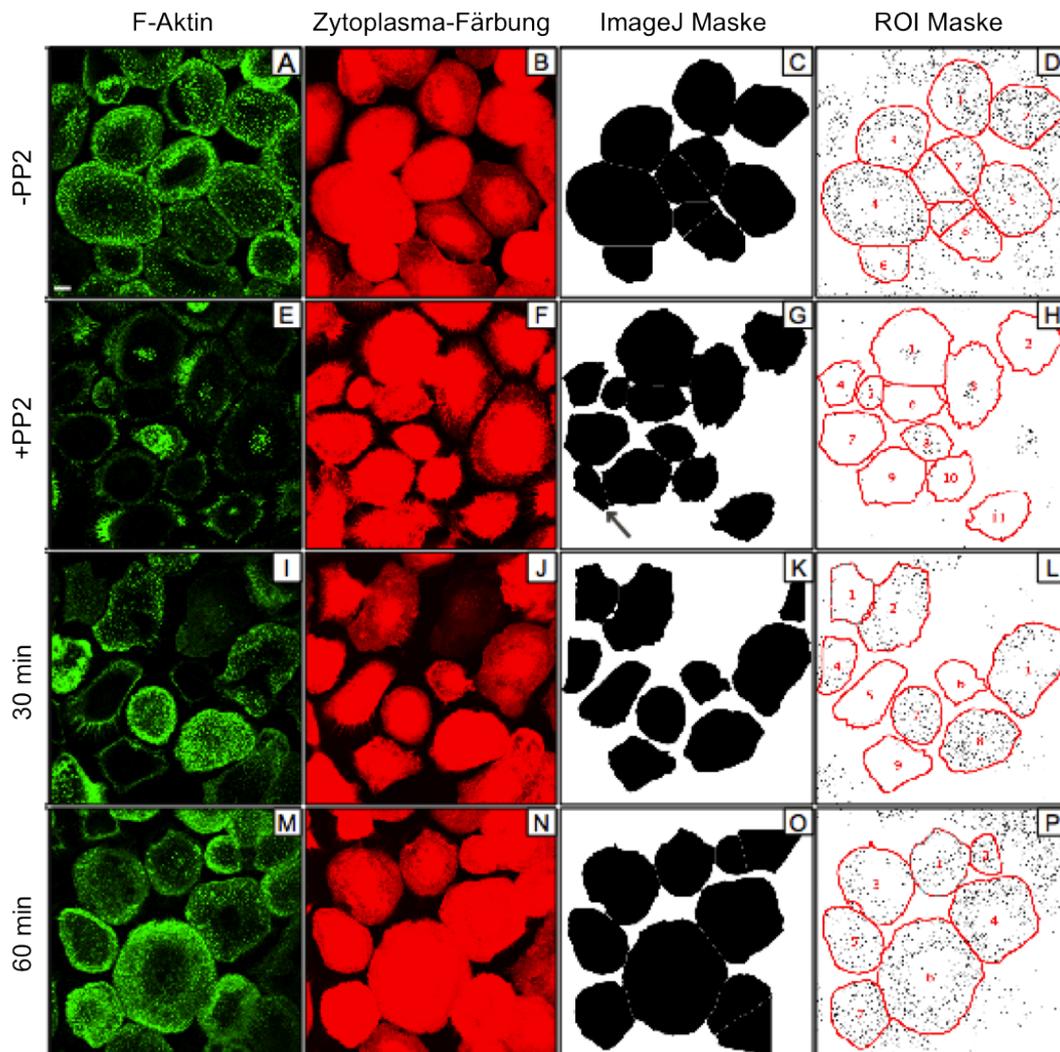


Abbildung 4.1.: Analyse eines Podosomenreformatsversuchs in fixierten Proben

Gezeigt sind primäre humane Makrophagen, die im Zuge eines Podosomenreformatsversuchs zu verschiedenen Zeiten fixiert und permeabilisiert, mit Alexa Fluor 488-Phalloidin (F-Aktin) und HCS CellMask red stain (Zytoplasma-Färbung) gefärbt und mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop dokumentiert wurden. In ImageJ wurden anschließend anhand der Zytoplasma-Färbung (B, F, J, N) die einzelnen Zellen markiert (ImageJ Maske, C, G, K, O) und in Korrelation mit einem weiteren ImageJ-Makro mit Hilfe der F-Aktin-Aufnahmen (A, E, I, M) die Podosomen (schwarze Punkte) in den einzelnen Zellen (rote Kreise mit Nummern in den ROI Masken D, E, L, P) detektiert. Die obere Reihe zeigt unbehandelte Zellen (-PP2). Darunter folgen Zellen nach einer 30 minütigen Inhibitor Behandlung (+PP2), um Podosomen aufzulösen, und solche nach dem Auswaschen des Inhibitors (30 min + 60 min). Maßstabsbalken, 10 μm . [23]

gesät und für mindestens 3 h im Brutschrank inkubiert. Nach 2 h in Serumentzugs-Medium wurden die Zellen in die Inkubationskammer eines Live Cell Imaging Mikroskops platziert. Damit war für die optimalen Kulturbedingungen der Makrophagen bei 37 °C und 5 % CO₂ gesorgt. Zunächst erfolgte alle 15-30 Sekunden für eine Zeitspanne von 5 min eine mikroskopische Aufnahme, wonach der Src-Kinase-Inhibitor PP2 in einer Endkonzentration von 25 µM zugegeben wurde. Anschließend erfolgte die Aufnahme wie zuvor für 30 min. Danach wurde durch zweimaligen Austausch des Mediums mit Makrophagenkultur-Medium der Inhibitor ausgewaschen. Die dadurch eingeleitete Podosomenreformation wurde weiterhin für 1 h wie zuvor dokumentiert. [23]

4.1.1. Semiautomatische Auswertung der Live Cell Imaging Daten eines Podosomenreformationsversuchs

Nach der detaillierten Dokumentation der Podosomenreformation (Abb. 4.2 A) erfolgte die Quantifizierung der Podosomenanzahl im Verlauf des Versuchs. Damit konnten sowohl der Beginn als auch Verlauf/Dynamik der Podosomenreformation ermittelt werden (Abb. 4.2 B).

Aufgrund der sehr hohen Datenmenge (eine Aufnahme alle 15-30 Sekunden für insgesamt ca. 1,5 h) kam dazu nur ein semiautomatischer Ansatz zur Auswertung in Frage. Dieser wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt und wird im Folgenden aufgeführt.

Im ersten Schritt wurde ein ImageJ-Makro entwickelt, um die Bildqualität zur Ermittlung der Podosomenanzahl zu erhöhen. In diesem wird für eine Optimierung des Kontrastes und des Signal zu Hintergrund-Verhältnisses gesorgt. Zudem werden die Aufnahmen in das 8-bit Format umgewandelt.

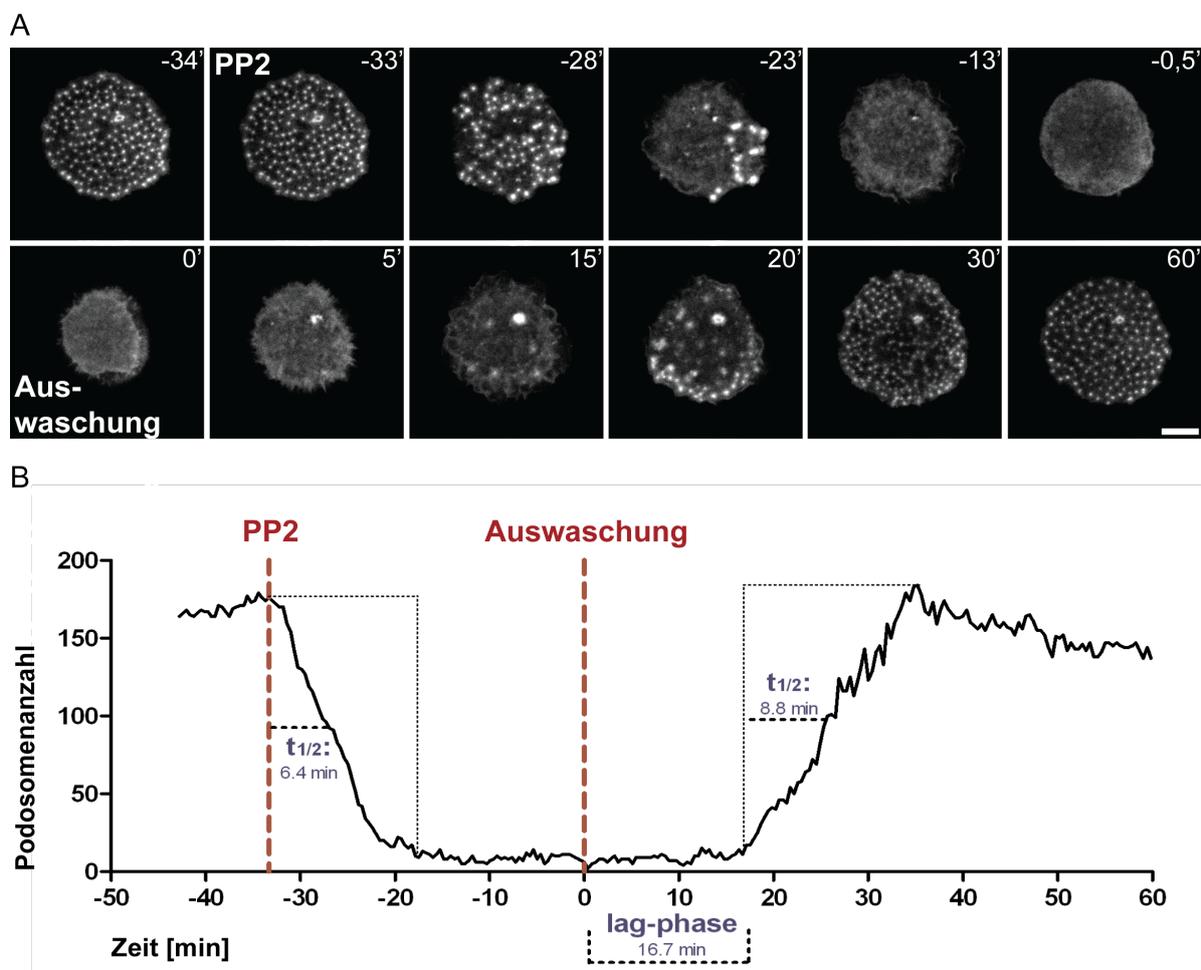


Abbildung 4.2.: Der Podosomenreformatsionsversuch im Live Cell Imaging

Primäre humane Makrophagen wurden mit Lifeact-GFP transfiziert und auf Live Cell Schälchen ausgesät, bevor sie Podosomenreformatsionsversuchen im Live Cell Imaging unterzogen wurden. Gezeigt ist eine Beispiel-Zelle zu verschiedenen Zeiten dieses Prozesses. Die PP2-Zugabe und die Auswaschung, sowie die Zeit vor und nach Auswaschung sind angegeben (A). Maßstabsbalken, 10 μm . Die Podosomenanzahl wurde mit Hilfe von ImageJ-Makros für alle Zeitpunkte der Live Cell Aufnahme bestimmt und mit Graph-Pad Prism graphisch aufgetragen. Zeitpunkte der PP2-Zugabe und Auswaschung sind angegeben, sowie die zusätzlichen Parameter: Zeit des Startes der Podosomenreformation nach der Auswaschung („lag-phase“) und Halbwertszeit ($t_{1/2}$) der Podosomenauflösung sowie -reformation. [23]

Optimierung der Bildqualität:

```
run ("Enhance Contrast", "saturated=0 use");  
run ("Median...", "radius=1 stack");  
run ("Subtract Background...", "rolling=50 stack");  
run ("Gamma...", "value=1.50 stack");  
run ("8-bit");
```

Die Ermittlung der Podosomenanzahl erfolgte im zweiten Schritt mit dem bereits verfügbaren „Find Stack Maxima“ ImageJ-Makro (<http://rsbweb.nih.gov/ij/macros/FindStackMaxima.txt>).

Dieses Makro wendet den Befehl Process > Binary > Find Maxima auf alle Aufnahmen einer Aufnahmeserie an. Die einzige Einstellung, die dabei vorgenommen werden muss, ist der Wert für die „Noise tolerance“ entsprechend der Bildqualität. Nach Ermittlung dieses Wertes konnte das „Find Stack Maxima“ Makro auf die gesamte Sequenz angewandt werden. Dies resultiert in einer Tabelle, die die Podosomenanzahl in jeder Aufnahme auflistet. Der Graph in Abb. 4.2 B zeigt das Ergebnis einer solchen Auswertung. Es wurde die Anzahl der Podosomen über die Zeit eines Podosomenreformatsversuchs in GraphPad Prism aufgetragen. Es sind sowohl die Zeit nach dem Auswaschen bis zur Podosomenreformation (= „lag-phase“), als auch die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der Podosomenauflösung und -reformation eingezeichnet. [23]

4.1.2. Phasen der Podosomenbildung während der Podosomenreformation

Bisher war über den genauen Ablauf der Entstehung einzelner Podosomen wenig bekannt. Mit der in dieser Arbeit neu entwickelten Methode konnte die frühe Phase der Podosomenreformation genau analysiert werden. Dies führte zur Entdeckung von 2 Phasen der Podosomenbildung (Abb. 4.3). Sehr früh – 1,5 min nach Auswaschen des Inhibitors – startete die Neubildung von Podosomen. Kurze Zeit später – nach weiteren 2,5 min – spalteten sich die ersten Podosomen von zuvor entstandenen ab, wobei weiterhin Podosomen durch Neubildung entstanden. Daß diese beiden Phasen – zunächst Podosomenneubildung und später Podosomenneubildung + Podosomenabspaltung – während der frühen Podosomenreformation ablaufen, konnte in dieser Arbeit durch Etablierung des Podosomenreformatsversuchs im Live Cell Imaging zum ersten Mal gezeigt werden.

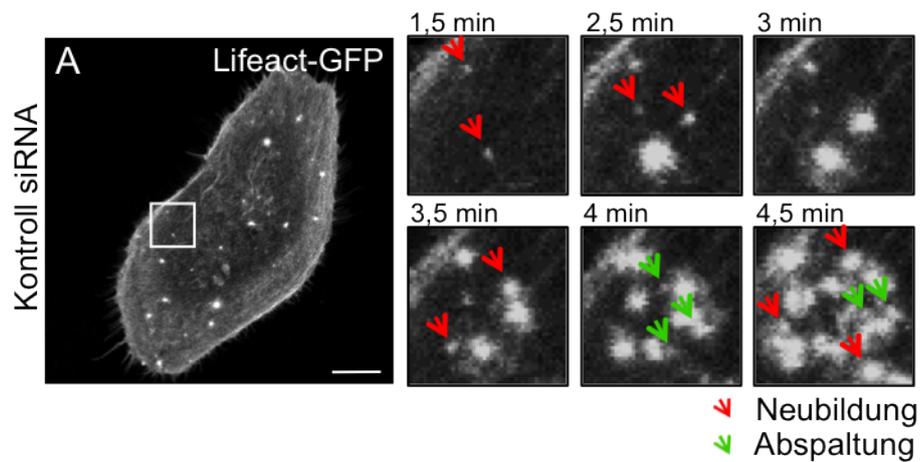


Abbildung 4.3.: Phasen der Podosomenbildung während der Podosomenreformation

Mit Kontroll siRNA transfizierte primäre humane Makrophagen wurden nach 60 h erneut mit entsprechender siRNA und Lifeact-GFP transfiziert und anschließend für weitere 12 h auf Live Cell Schälchen ausgesät bevor sie Podosomenreformationsversuchen im Live Cell Imaging unterzogen wurden. Gezeigt ist eine Beispiel-Zelle bei Einsetzen der Podosomenreformation (A) und die ersten 4,5 min dieses Prozesses in Ausschnitten (A'). Es lassen sich 2 Arten der Podosomenbildung definieren, die Podosomenneubildung (roter Pfeil) und die Podosomenabspaltung (grüner Pfeil), wobei zunächst ausschließlich Podosomenneubildung stattfindet, woran sich Podosomenneubildung mit Podosomenabspaltung anschließen. Maßstab, 10 µm.

4.2. Formine an Podosomen

Podosomen bestehen zu einem großen Teil aus Aktin, welches dort in verschiedenen Varianten vorzufinden ist. Zum einen als Netzwerk-bildende, verzweigte Aktinfilamente, welche den Podosomenkern formen, und zum anderen als parallel angeordnete Aktinfilamente, die die Podosomen untereinander und mit der ventralen Plasmamembran verbinden (= Podosomenkabel). Dass der Podosomenkern durch den Arp2/3-Komplex reguliert wird und dessen Vorhandensein für die Ausbildung von Podosomen essenziell ist, wurde bereits ausgiebig beschrieben [67, 82]. Die Regulation sowie die Funktion der unverzweigten Aktinfilamente sind bisher jedoch nicht klar. Da Formine Regulatoren dieser Aktinfilamente sind, kommen diese als potenzielle Kandidaten in Frage. Ihre Bedeutung für Podosomen und Podosomenkabel wurde in dieser Arbeit untersucht.

4.2.1. Auswirkungen eines Formin-Inhibitors auf Podosomen

Um erste Hinweise auf die mögliche Beteiligung von Forminen auf die Bildung und/oder Struktur von Podosomen zu erhalten, wurden Versuche mit dem Formin-Inhibitor SMIFH2 in primären humen Makrophagen durchgeführt. Dieser inhibiert spezifisch die gesamte Familie der Formine, indem er an ihre hochkonservierte FH2-Domäne bindet. Somit wird die Affinität für die Bindung der Formine an das F-Aktinfilament-+-Ende reduziert. Die Wirkung des Arp2/3-Komplexes sowie weiterer Formin-unabhängiger Aktinnukleatoren werden durch diesen Inhibitor hingegen nicht beeinflusst [126].

Wie in Abb. 4.4 deutlich zu erkennen ist, führte die Zugabe von 20 μ M SMIFH2 nach 2 Stunden, im Vergleich zu mit DMSO behandelten Kontrollzellen, zu einer sehr starken Erhöhung des Anteils der Zellen ohne Podosomen (94 %, Kontrollzellen = 12,6 %, C). Dies wurde nach Fixierung und Alexa Fluor 488-Phalloidin-Färbung der behandelten Zellen mikroskopisch festgehalten (A+B) und im Anschluss durch Quantifizieren der Zellen ohne Podosomen ermittelt.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass Formine eine wichtige Rolle bei der Bildung oder dem Erhalt von Podosomen spielen.

4.2.2. Nachweis spezifischer Formine an Podosomen

Die Familie der Formine besteht aus 15 Mitgliedern. Zur Eingrenzung möglicher interessanter Kandidaten für Podosomen konnte auf frühere massenspektrometrische Untersuchungen

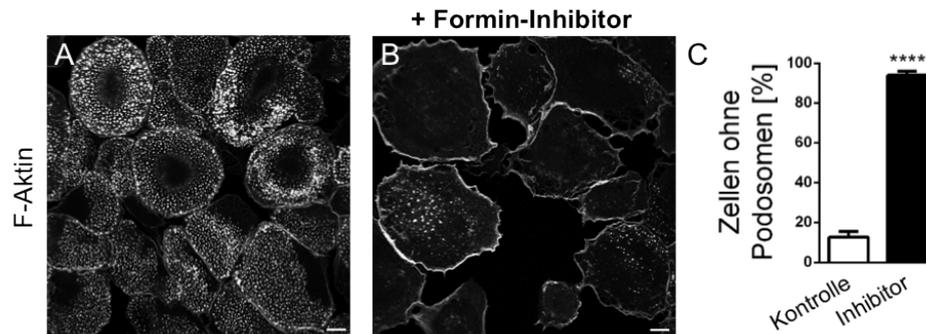


Abbildung 4.4.: Formin abhängige Formation von Podosomen

Primäre humane Makrophagen wurden für 2 h mit 20 μ M des Formin-Inhibitors SMIFH2 oder DMSO (Kontrolle) behandelt, mit 3,7 % FA fixiert und mit 0,5 % Triton/PBS permeabilisiert. Es folgte eine F-Aktin-Färbung (Alexa Fluor 488-Phalloidin) und die Dokumentation mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop. Mit Inhibitor behandelte Zellen (B) zeigten im Vergleich zu Kontrollzellen (A) einen hoch signifikanten Anstieg (****, $p < 0,0001$, $n = 3$) an Zellen ohne Podosomen, was für > 300 Zellen pro Kondition für 3 Donoren quantifiziert wurde (C). Maßstabsbalken, 10 μ m.

mit der adhäsiven Fraktion primärer humaner Makrophagen zurückgegriffen werden [22]. Dies lieferte folgende, potenziell an der Struktur und/oder Funktion von Podosomen mitwirkende Formine:

Dia1, Dia2, FMNL1, FMNL2, DAAM1, INF2 und FHOD1.

Erste Lokalisationsstudien in primären humanen Makrophagen zeigten für die beiden aus einer Familie stammenden Formine Dia1 und Dia2 eine ausschließlich diffuse, zytoplasmatische Lokalisation (Dr. Mirko Himmel, persönliche Kommunikation). Dies machte ein Wirken dieser Formine an Podosomen unwahrscheinlich. Im Gegensatz dazu steht das Formin FMNL1, was bereits durch die Scott D. Blystone-Gruppe (New York) als essenzielle Komponente an Podosomen beschrieben wurde [102]. Die Untersuchung der Bedeutung von FMNL2, DAAM1 und INF2 an Podosomen wurde Gegenstand anderer Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe.

Offen blieb die Untersuchung von FHOD1 in Bezug auf die Struktur und Funktion von Podosomen. Dieses Formin wurde zuvor bereits als Aktin-bündelndes Protein beschrieben [138]. FHOD1 wurde an Stressfasern gefunden, an deren Regulation es beteiligt ist [70]. Außerdem spielt FHOD1 eine Rolle bei der Reifung von Integrin basierten Adhäsionsstrukturen [65]. Zusammen deutet dies auf eine mögliche Aufgabe von FHOD1 an Podosomen und/oder Podosomenkabeln hin. Erste Western Blot Untersuchungen bestätigten das Vorhandensein von FHOD1 in primären humanen Makrophagen (Abb. 4.5). Die potenzielle Anwesenheit von FHOD1 an Podosomen, wurde im Folgenden weiter untersucht.

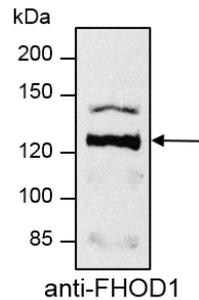


Abbildung 4.5.: Das Formin FHOD1 wird in primären humanen Makrophagen exprimiert. Ein Lysat aus primären humanen Makrophagen wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, woran sich ein Western Blot, in welchem FHOD1 detektiert wurde, anschloss. Der Pfeil zeigt auf das stärkste Signal bei der für FHOD1 (127 kDa) zu erwartenden Größe.

4.3. Das Formin FHOD1 an Podosomen

Um eine mögliche Funktion von FHOD1 an Podosomen primärer humaner Makrophagen auszumachen, wurden zum einen Lokalisationsstudien an Podosomen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Zum anderen sollten verschiedene Knockdown-Experimente Auskunft über die Wichtigkeit von FHOD1 für die Struktur und Funktion von Podosomen geben. Schlussendlich wurden die Auswirkungen des Fehlens von FHOD1 auf Podosomen und Podosomenkabel mit Hilfe hochauflösender Mikroskopie dargestellt.

4.3.1. Lokalisationsstudien

Der erste Schritt in der Funktionsaufklärung eines Proteins ist meist die spezifische Detektion innerhalb der Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dies wurde an Podosomen primärer humaner Makrophagen sowohl für endogenes FHOD1 mit Antikörperfärbungen, als auch mit EGFP-gekoppelten FHOD1-Konstrukten, in Wildtyp und nicht-autoinhibierter-Form (Abb 4.7), durchgeführt. Podosomen lassen sich dabei, wegen der hohen Konzentration an F-Aktin, sehr gut mit an ein Fluorophor-gekoppeltem Phalloidin mikroskopisch sichtbar machen.

4.3.1.1. Endogenes FHOD1 an Podosomen

Anhand der Ergebnisse konfokalmikroskopischer Aufnahmen primärer humaner Makrophagen, welche nach Fixierung mit einem FHOD1-spezifischen Antikörper (+ Alexa Fluor 488) und Alexa Fluor 568-Phalloidin immunzytologisch markiert wurden (Abb. 4.6), konnten erste Aussagen über die Lokalisation von FHOD1 an Podosomen getroffen werden.

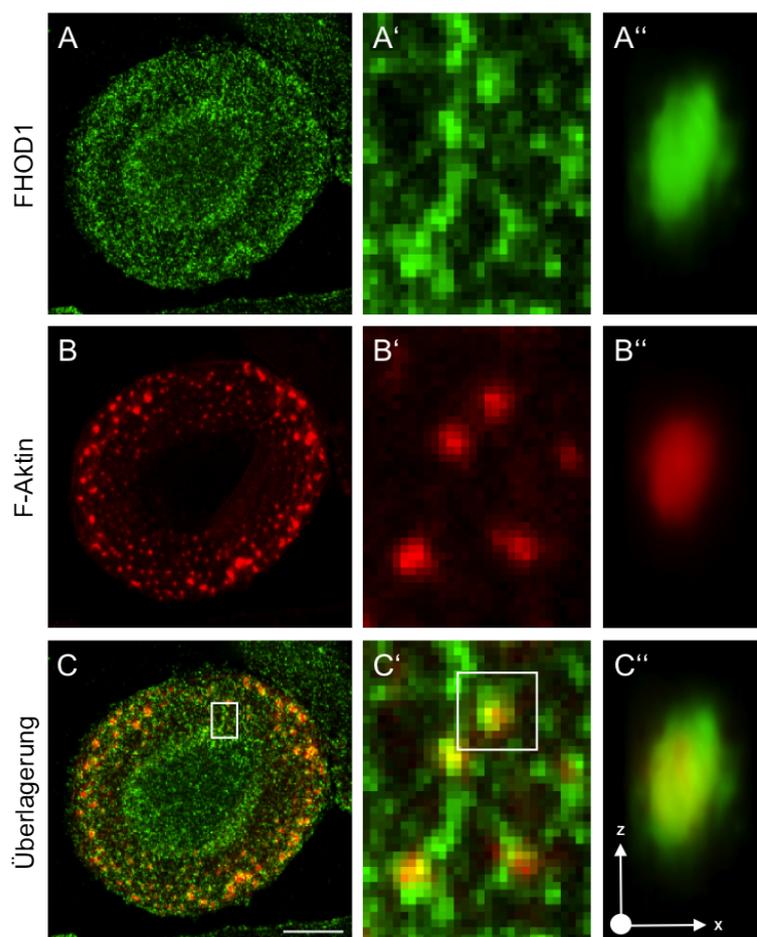


Abbildung 4.6.: FHOD1 lokalisiert am Podosomenkern und an Podosomenkabeln.

Mit 3,7 % FA fixierte und 0,2 % Saponin permeabilisierte primäre humane Makrophagen wurden gegen FHOD1 (+ Alexa Fluor 488) und F-Aktin (Alexa Fluor 568-Phalloidin) gefärbt. Anschließend erfolgte die Dokumentantion mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops. Besonders in den Vergrößerungen (A'-C') ist eine Lokalisation von FHOD1 an Podosomen und Podosomenkabeln zu sehen. Dabei ist FHOD1 gleichmäßig über die gesamte Höhe der Podosomen verteilt zu finden (A''-C''), 3D-Rekonstruktion). Maßstabsbalken, 10 μ m.

Vor allem in vergrößerten Ausschnitten (A'-C') dieser Aufnahmen (A-C) war eine Akkumulation von FHOD1 (A'+C') an Podosomen (B'+C') und Podosomenkabeln zu erkennen. In einer 3D-Rekonstruktion eines einzelnen Podosoms (A''-C'') war die gleichmäßige Lokalisation von FHOD1 über dessen gesamte Höhe zu sehen.

4.3.1.2. Überexprimiertes FHOD1 an Podosomen

Um die Lokalisation von FHOD1 an Podosomen und Podosomenkabeln zu verstärken und somit noch deutlicher hervorheben zu können, wurden EGFP-gekoppelte FHOD1-

Konstrukte in primäre humane Makrophagen transfiziert, nach jeweils optimaler Expressionszeit fixiert, permeabilisiert und vor der mikroskopischen Auswertung zusätzlich mit Alexa Fluor 568-Phalloidin markiert.

Zum einen wurde ein EGFP-FHOD1-Wildtyp-Konstrukt verwendet (Abb. 4.7 A). Dieses Konstrukt liegt in der Zelle zunächst in der für Formine typischen autoinhibierten Konformation vor, die zur vollen Funktion des Proteins aufgehoben werden muss. EGFP-FHOD1 kann in der Zelle also teilweise als autoinhibiertes bzw. nicht-autoinhibiertes Protein vorliegen. Um mit Sicherheit annehmen zu können, dass das eingebrachte FHOD1-Protein nicht autoinhibiert vorliegt, wurde zum anderen ein weiteres EGFP-FHOD1-Konstrukt benutzt, in welchem die C-terminale DAD-Domäne fehlt (EGFP-FHOD1 Δ C, Abb. 4.7 B). Die Ausbildung der autoinhibierten Konformation ist diesem Proteinfragment nicht möglich.

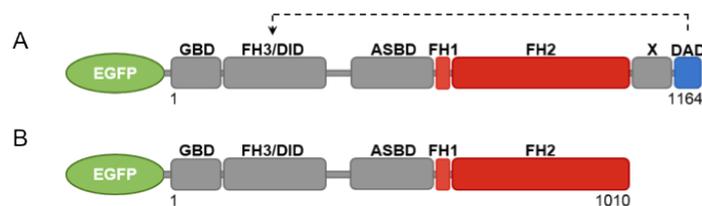


Abbildung 4.7.: Verwendete EGFP-FHOD1-Konstrukte

Zu Lokalisationsstudien wurden EGFP-FHOD1 (A) und EGFP-FHOD1 Δ C, in welchem die DAD-Domäne fehlt und somit die Ausbildung der Autoinhibition unterbunden wird, verwendet.

Für beide Konstrukte wurde mit Hilfe einer Zeitreihe zunächst die optimale Expressionszeit von 3,5 Stunden ermittelt. D.h. die fluoreszenten FHOD1-Fusionsproteine wurden in den transfizierten Zellen zu diesem Zeitpunkt ausreichend stark exprimiert, sodass sie im Mikroskop gut sichtbar waren. Dabei ließen sich keine toxischen Effekte, wie ein Absterben der Zellen, durch die Überexpression verzeichnen. Zu späteren Zeitpunkten war dies durchaus der Fall.

EGFP-FHOD1 zeigte eine ringförmige Lokalisation um die Podosomenkerne. Es war ebenfalls an Podosomenkabeln detektierbar (Abb. 4.8). Eine 3-D-Rekonstruktion eines einzelnen Podosoms ließ, bis auf die leichte Aussparung des obersten Teils, auf eine Verteilung des Proteins über die gesamte Podosomenhöhe schließen. Dies und vor allem die Lokalisation an den Podosomenkabeln fiel für EGFP-FHOD1 Δ C noch deutlicher aus (Abb. 4.9).

Häufig veränderte sich in Anwesenheit von EGFP-FHOD1 Δ C sogar das gesamte Aktinzytoskelett der Makrophagen. Diese Zellen bildeten verstärkt Aktinfasern, an welchen Podosomen, wie Perlen auf einer Schnur aufgereiht, zu erkennen waren. EGFP-FHOD1 Δ C lokalisierte deutlich an den Aktinfasern und Podosomen (Abb. 4.10).

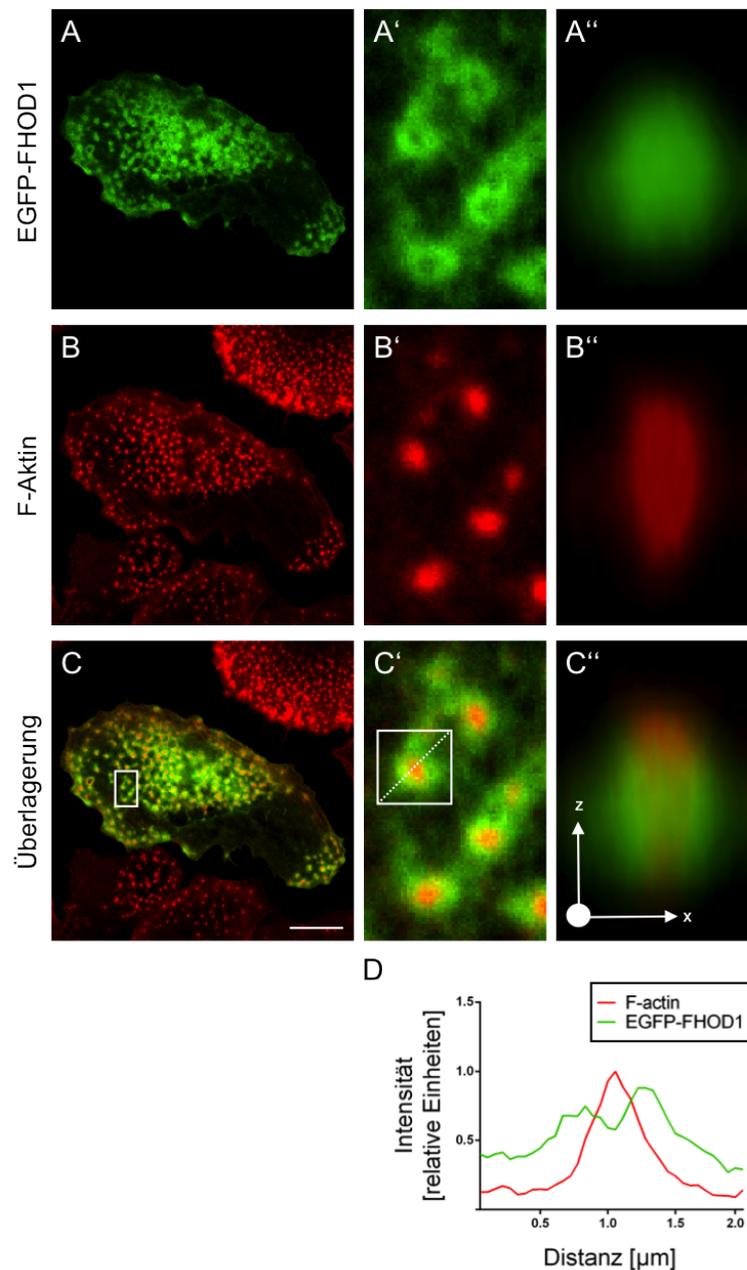


Abbildung 4.8.: EGFP-FHOD1 lokalisiert um den Podosomekern und an Podosomekabeln. Mit EGFP-FHOD1 transfizierte primäre humane Makrophagen wurden 3,5 h nach Transfektion mit 3,7 % FA fixiert und mit 0,5 % Triton/PBS permeabilisiert. Es folgte die Färbung mit Alexa Fluor 568-Phalloidin und die Dokumentation mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop. EGFP-FHOD1 lokalisierte ringförmig um die Podosomekerne (A-C, A'-C'+D), mit leichter Aussparung der Podosomekappe (A''-C'') und an Podosomekabeln (A-C, A'-C'). Maßstabsbalken, 10 μm .

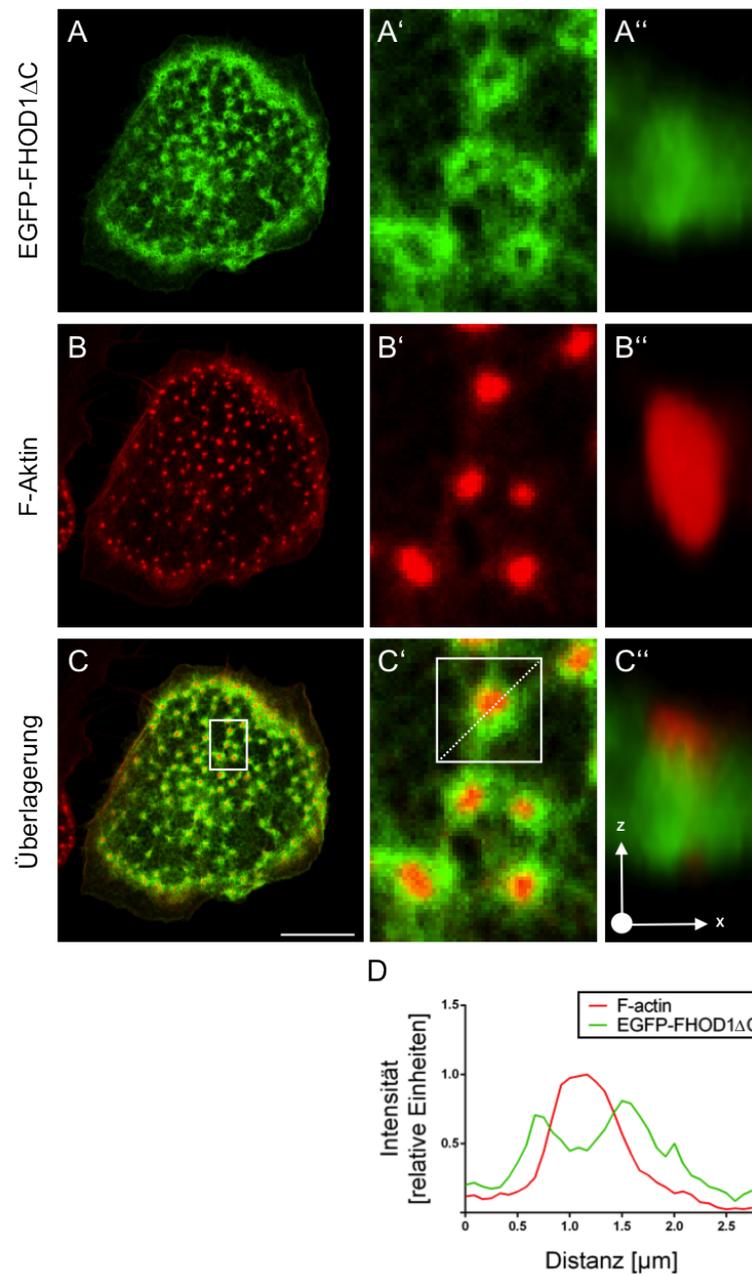


Abbildung 4.9.: EGFP-FHOD1 Δ C lokalisiert um den Podosomenkern und an Podosomenkabeln.

Mit EGFP-FHOD1 Δ C transfizierte primäre humane Makrophagen wurden 3,5 h nach Transfektion mit 3,7 % FA fixiert und mit 0,5 % Triton/PBS permeabilisiert. Es folgte die Färbung mit Alexa Fluor 568-Phalloidin und die Dokumentation mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop. Wie EGFP-FHOD1 lokalisierte auch EGFP-FHOD1 Δ C ringförmig um die Podosomenkerne (A-C, A'-C'+D), mit leichter Ausparung der Podosomenkappe (A''-C'') und an Podosomenkabeln (A-C, A'-C'). Maßstabsbalken, 10 μ m.

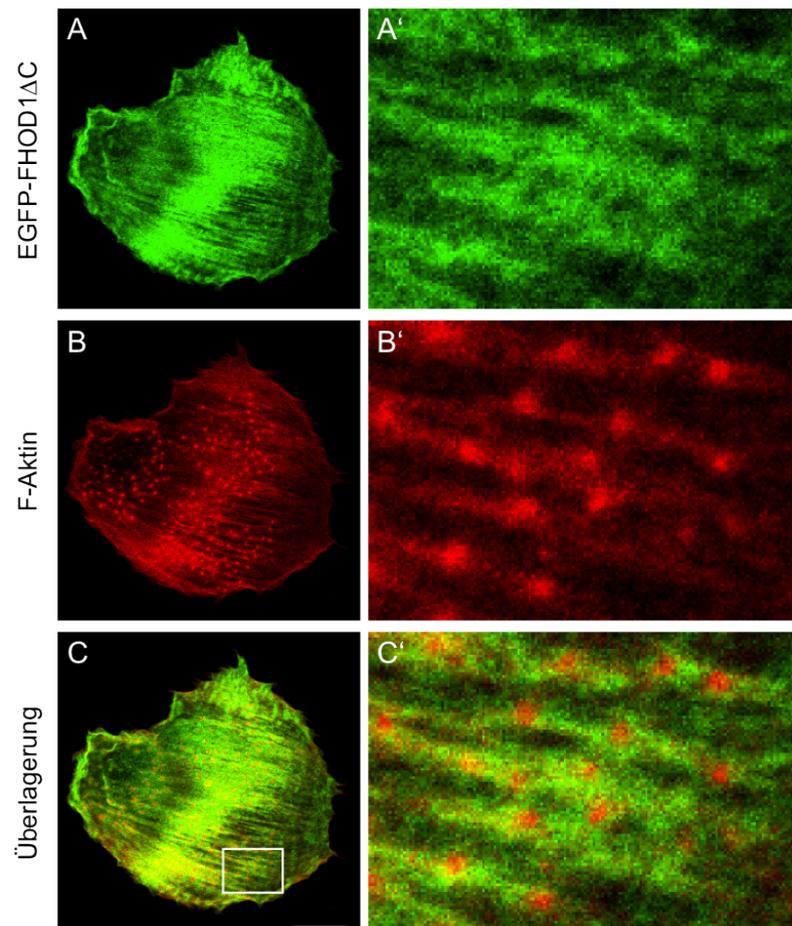


Abbildung 4.10.: EGFP-FHOD1 Δ C lokalisiert an induzierten Aktinfasern und Podosomen. In der Probe aus Abb. 4.9 waren ebenfalls Zellen zu finden, die eine Umorganisation des Aktinzytoskeletts zu massiven, Podosomen „aufreihenden“ Aktinfasern erkennen ließen (B+B'), woran EGFP-FHOD1 Δ C deutlich lokalisierte (A+A', C+C'). Maßstabsbalken, 10 μ m.

4.3.1.3. FHOD1 und Myosin an Podosomen

Da die Lokalisation von FHOD1 an Podosomen und den Podosomenkabeln an die von Myosin IIA erinnert und FHOD1 kürzlich an mehreren kontraktilen F-Aktinstrukturen gefunden wurde [141, 65], wurde im nächsten Schritt die Lokalisation von FHOD1 und Myosin IIA an Podosomen untersucht. Mit EGFP-FHOD1 bzw. EGFP-FHOD1 Δ C transfizierte Zellen wurden nach 3,5 Stunden fixiert, permeabilisiert und mit einem Myosin IIA-Antikörper (+ Alexa Fluor 568), sowie Alexa Fluor 647-Phalloidin immunzytologisch markiert. Daraufhin folgte die mikroskopische Dokumentation mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Abb. 4.11).

EGFP-FHOD1 zeigte die bereits bekannte ringförmige Lokalisation um die Podosomenkerne, mit teilweise erkennbaren Verbindungen zwischen verschiedenen Podosomen (A+A', C+C' unter Berücksichtigung von D+D'). Myosin IIA lokalisierte ebenfalls um die Podosomenkerne herum (B+B' unter Berücksichtigung von D+D'), wobei es sich an die äußeren Randbereiche der EGFP-FHOD1 Lokalisation anzuschließen schien (C+C'). Myosin IIA war außerdem an Fasern, die durch die Zelle liefen, zu finden.

EGFP-FHOD1 Δ C zeigte, wie in Abb. 4.10, auch hier (Abb. 4.11) eine deutliche Lokalisation an Podosomen und Aktinfasern (E+E', G+G' unter Berücksichtigung von H+H'). An den Aktinfasern war ebenfalls Myosin IIA zu finden, genauso wie gelegentlich an Podosomen (F+F' unter Berücksichtigung von H+H').

Zusammenfassend lässt sich aus den Lokalisationsstudien in Abb. 4.11 sagen, dass FHOD1 und Myosin IIA an den gleichen Aktinstrukturen lokalisierten, eine Kolo­kalisierung der beiden Proteine dort hingegen nicht feststellbar war.

4.3.2. FHOD1-Knockdown-Experimente

Nach Identifikation von FHOD1 an Podosomen und Podosomenkabeln wurden Knockdown-Experimente durchgeführt, um Hinweise über mögliche Funktionen von FHOD1 an Podosomen zu erhalten. Somit wurden Einflüsse von FHOD1 auf verschiedene Podosomenparameter wie Anzahl, Größe, Lebenszeit und Podosomenreformation, sowie die Fähigkeit der Matrixdegradation, in primären humanen Makrophagen ermittelt.

Der Knockdown von FHOD1 wurde zunächst mit einem SMARTpool erzielt. Bei einem SMARTpool handelt es sich um einem Mix aus 4 verschiedenen, spezifischen siRNAs gegen die mRNA eines bestimmten Proteins. Der Einsatz eines solchen Mixes erhöht zum einen die Wahrscheinlichkeit des mRNA-Abbaus und zum anderen dessen Spezifität, durch geringere Konzentrationen der einzelnen siRNAs. Es kann allerdings in allen Fällen des siRNA vermittelten Abbaus zu sog. off-target Effekten kommen. Dies bedeutet, dass die eingesetzten siRNAs u.U. unspezifisch mRNAs anderer Proteine binden und somit zu deren Abbau führen können. Um dies zu vermeiden, kann man chemisch modifizierte siRNAs erwerben (ON-TARGETplus, Modifikation des siRNA-sense Stranges), die zu einem verstärkten Einbau des siRNA-antisense-Stranges in den siRNA-mRNA-Abbaukomplex führen. Die ON-TARGETplus-Variante wurde für den FHOD1 SMARTpool (= FHOD1 p siRNA) verwendet. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz und anschließender Vergleich der Effekte unterschiedlicher siRNAs für das gleiche Zielprotein. Somit wurden bestimmte Experimente ebenfalls mit 2 individuellen ON-TARGETplus siRNAs aus dem SMARTpool wiederholt. Wie der Western Blot in Abb. 4.12 zeigt, wurde 72 Stunden nach siRNA-Transfektion in allen Fällen eine Knockdowneffizienz von über 90 % erreicht. Für alle nachfolgenden Knockdown-Experimente wurde die Knockdown-Effizienz in Western Blots untersucht und zeigte ein vergleichbares Level, wie hier dokumentiert.

4.3.2.1. Podosomenanzahl im FHOD1-Knockdown

Um festzustellen, ob FHOD1 an der Regulation der Podosomenanzahl in der Zelle beteiligt ist, wurden primäre humane Makrophagen mit FHOD1 p siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert und nach 72 h fixiert und permeabilisiert. Es folgte eine Färbung mit Alexa Fluor 488-Phalloidin. Nach mikroskopischer Dokumentation wurde die Podosomenanzahl pro Zelle mit Hilfe eines ImageJ-Makros ermittelt. Die resultierenden Daten wurden sowohl als Mittelwert, als auch in Gruppen unterteilt graphisch festgehalten (Abb. 4.13). Der Mittelwert der Podosomenanzahl/Zelle unterschied sich bei FHOD1-Knockdown-Zellen

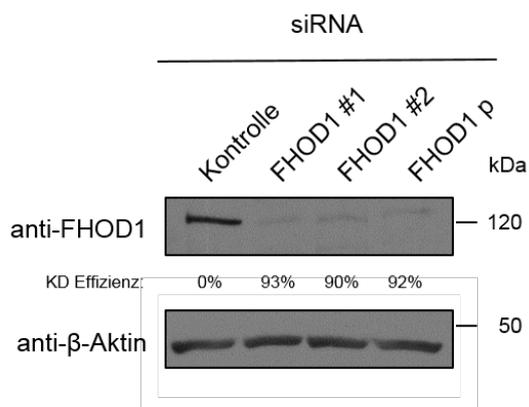


Abbildung 4.12.: SiRNA vermittelter FHOD1-Knockdown

Primäre humane Makrophagen wurden mit verschiedenen FHOD1 siRNAs (#1, #2, p) bzw. Kontroll siRNA transfiziert und nach 72 h lysiert. Die Lysate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, woran sich ein Western Blot, in welchem FHOD1 und Aktin (zur Ladekontrolle) detektiert wurden, anschloss. Die Intensitäten der jeweiligen Signale für FHOD1 wurden auf die Intensitäten der entsprechenden Signale für Aktin normalisiert. Aus den normalisierten Intensitäten wurden die Knockdown-Effizienzen durch Bezug der einzelnen Knockdowns auf die Kontrolle ermittelt.

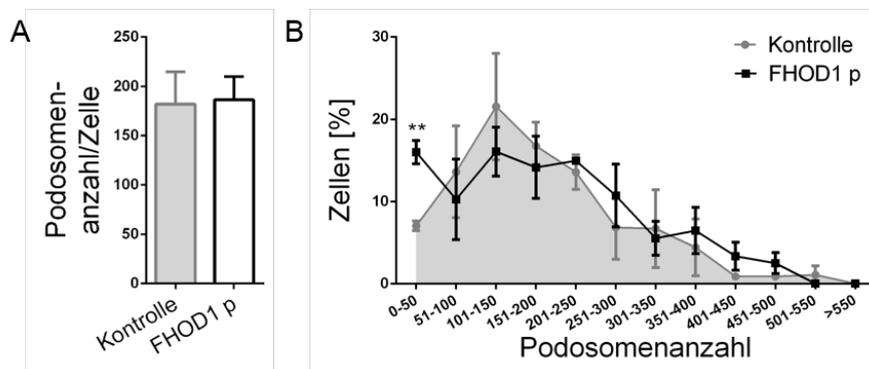


Abbildung 4.13.: Erhöhung des Anteils der Zellen mit wenigen Podosomen im FHOD1-Knockdown

Primäre humane Makrophagen aus 3 Donoren wurden jeweils mit FHOD1 p siRNA bzw. Kontroll siRNA transfiziert und nach 72 h fixiert und permeabilisiert. Nach der Färbung mit Alexa Fluor 488-Phalloidin erfolgte die Dokumentation mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop. Für > 50 Zellen pro Donor wurden mit Hilfe eines ImageJ-Makros die Podosomenanzahlen ermittelt und als Mittelwerte/Donor bzw. in Gruppen unterteilt/Donor in GraphPad Prism graphisch dokumentiert. Im Mittel ließen sich keine Unterschiede feststellen (A), der Anteil der Zellen mit bis zu 50 Podosomen war in FHOD1-Knockdown-Zellen jedoch signifikant erhöht (B). (**, $p = 0,0043$)

nicht von dem für Kontrollzellen (A). Unterteilte man die Zellen jedoch je nach Anzahl der Podosomen in Gruppen, fiel auf, dass der Anteil der Zellen mit bis zu 50 Podosomen in FHOD1-Knockdown-Zellen signifikant erhöht war (B).

4.3.2.2. Podosomengröße im FHOD1-Knockdown

Aus den für die Ermittlung der Podosomenanzahl angefertigten Proben wurde ebenfalls die Podosomengröße mittels eines weiteren ImageJ-Makros ermittelt. Auch diese Daten wurden sowohl als Mittelwert, als auch in Gruppen unterteilt graphisch aufgetragen (Abb. 4.14).

Beides zeigte für die FHOD1-Knockdown-Zellen keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

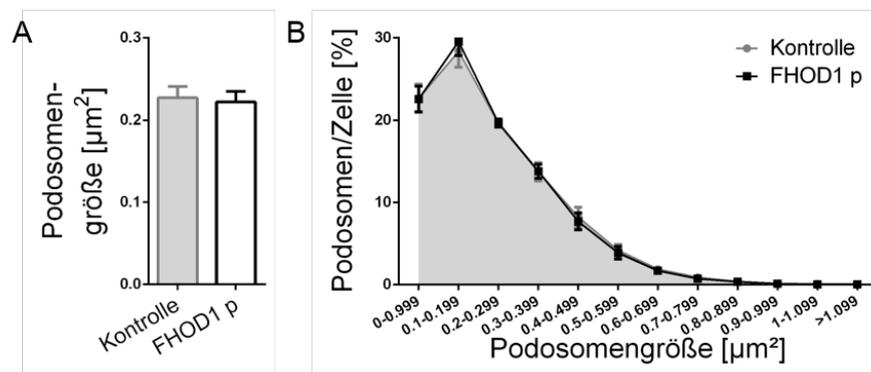


Abbildung 4.14.: Keine Veränderung der Podosomengröße im FHOD1-Knockdown

Die in Abb. 4.13 angesprochenen Proben wurden ebenfalls zur Ermittlung der Podosomengröße benutzt. Dabei wurde ein weiteres ImageJ-Makro verwendet. Die Podosomengrößen wurden als Mittelwerte (A) und in Gruppen unterteilt (B) in GraphPad Prism graphisch dokumentiert. Es waren keine Unterschiede zwischen FHOD1-Knockdown-Zellen und Kontrollzellen zu verzeichnen. (n= 3 mit > 10.000 Podosomen/n)

4.3.2.3. Podosomenlebenszeit im FHOD1-Knockdown

Zur Ermittlung eines potenziellen Einflusses von FHOD1 auf die Lebenszeit von Podosomen wurden 45 minütige Live Cell Aufnahmen von FHOD1-Knockdown- und Kontrollzellen angefertigt (Bildfrequenz = 15 s). Aus diesen wurde mit Hilfe der Tracking-Funktion des Programms Imaris die Lebenszeit der individuellen Podosomen pro Zelle bestimmt. Die graphische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte auch hier durch die Darstellung der Mittelwerte und der Anteile der Podosomen nach Lebenszeit in Gruppen unterteilt (Abb. 4.15).

Im Mittel war die Lebenszeit der Podosomen im FHOD1-Knockdown um ca. 50 % erhöht

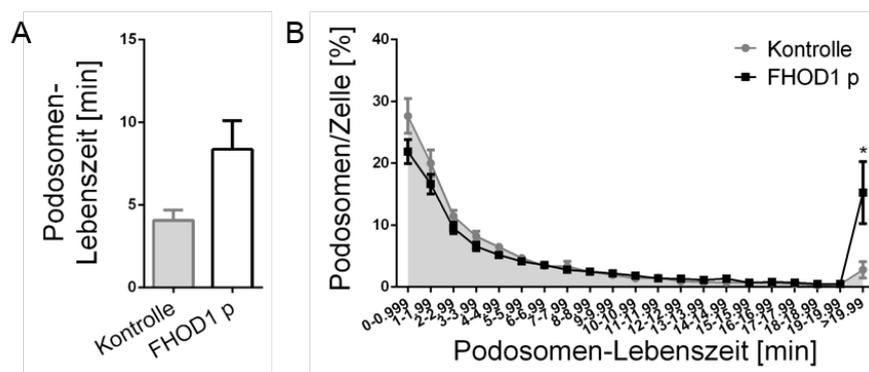


Abbildung 4.15.: Erhöhung der Podosomenlebenszeit im FHOD1-Knockdown

Podosomen wurden mit Imaris in Live Cell Aufnahmen von FHOD1-Knockdown- bzw. Kontrollzellen (2-4 bzw. 1 Zelle aus je 3 Donoren) getrackt, um die Lebenszeit zu ermitteln und graphisch aufzutragen. Der Mittelwert der Podosomenlebenszeit war in FHOD1-Knockdown-Zellen um ca. 50 % erhöht (A). Die Lebenszeit in Gruppen unterteilt zeigte, dass der Anteil der langlebigen Podosomen (> 20 min) signifikant erhöht war (B, *, $p=0,0370$, bei $n=3$).

(A), was in einem signifikanten Anstieg der langlebigen Podosomen (> 20 min) begründet liegen könnte (B).

4.3.2.4. Matrixdegradation im FHOD1-Knockdown

Neben den strukturellen Podosomenparametern wurde mit der Fähigkeit zur Matrixdegradation ebenfalls ein funktioneller Parameter von Podosomen untersucht. Dazu wurden mit FHOD1 p siRNA bzw. Kontroll siRNA transfizierte Zellen nach 72 h auf Rhodamin-markierter Gelatine ausgesät und nach 6 h fixiert und permeabilisiert, woraufhin die Färbung mit Alexa Fluor 647-Phalloidin erfolgte. Das Abbauverhalten wurde im Anschluss mikroskopisch festgehalten und mit ImageJ ausgewertet.

Abb. 4.16 zeigt zum einen je ein exemplarisches Beispiel für einen Matrixabbau durch eine FHOD1-Knockdown- sowie Kontrollzelle (A). Diese zeigen ein vergleichbares Bild. Zum anderen wurde der Abbau aller untersuchten Zellen graphisch aufgetragen (B). Daraus ist zu entnehmen, dass sich im FHOD1-Knockdown keine Unterschiede in der Fähigkeit des Matrixabbaus im Vergleich zu Kontrollzellen feststellen ließen.

4.3.2.5. Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown

Die bisher adressierten Podosomenparameter beziehen sich alle auf ein schon vollständig aufgebautes Podosomen-System im Gleichgewichtszustand. Da die ermittelten Ergebnisse der FHOD1-Knockdowns in den meisten Fällen nur geringe Unterschiede im Vergleich zu

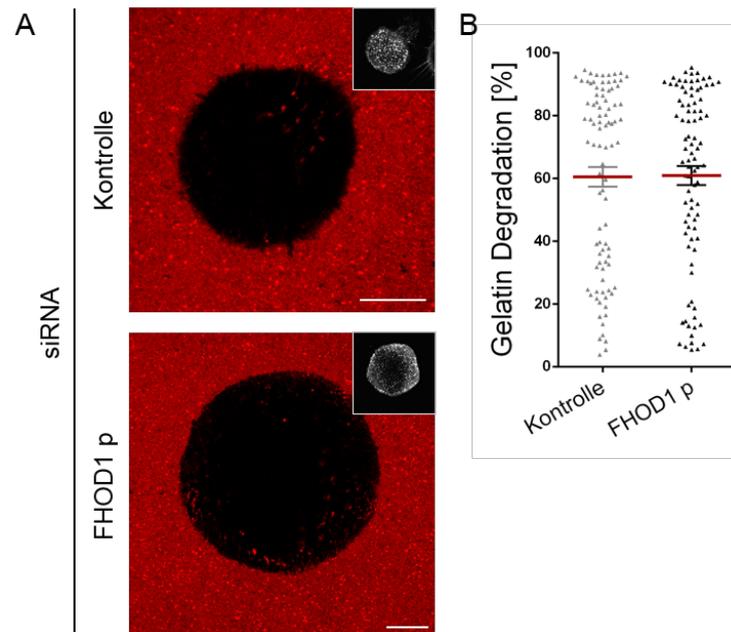


Abbildung 4.16.: Unveränderte Fähigkeit zur Matrixdegradation im FHOD1-Knockdown

Mit FHOD1 p bzw. Kontroll siRNA transfizierte Zellen wurden nach 72 h auf Rhodamin-markierter Gelatine ausgesät. Die Proben wurden nach 6 h fixiert, permeabilisiert und mit Alexa Fluor 647-Phalloidin gefärbt, woran sich die konfokalmikroskopische Dokumentation und Auswertung des Gelatine-Abbaus mit ImageJ anschloss. Sowohl in Beispielaufnahmen (A) als auch der graphischen Darstellung aller untersuchten Zellen (B, je 30 aus 3 Donoren) sind keine Unterschiede zwischen FHOD1-Knockdown und Kontrollzellen zu erkennen. Maßstabsbalken, 10 μm .

Kontrollzellen zeigten, wurde als Nächstes eine mögliche Funktion von FHOD1 bereits bei der Podosomenbildung untersucht. Dazu wurden Podosomenreformationsversuche durchgeführt. Dabei werden durch Zugabe des Src-Kinase-Inhibitors PP2 im ersten Schritt alle Podosomen aufgelöst. Diese können sich nach Auswaschen des Inhibitors im Anschluss wieder neu bilden [83]. Dieser Prozess wurde an zu verschiedenen Zeiten vor und nach Auswaschen des Inhibitors fixierten, Alexa Fluor 488-Phalloidin- plus HCS CellMask red stain-markierten FHOD1-Knockdown- und Kontrollzellen mikroskopisch dokumentiert. Die finale Auswertung der Mikroskopdaten erfolgte durch Ermitteln der Podosomenanzahlen pro Zelle zu den verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe von ImageJ-Makros (Abb. 4.17).

Sowohl mit FHOD1 p siRNA, als auch mit 2 individuellen FHOD1 siRNAs (#1 und #2) transfizierte Zellen zeigten 72 h nach Transfektion in Podosomenreformationsversuchen zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der Podosomenanzahl pro Zelle im Vergleich zu Kontrollzellen.

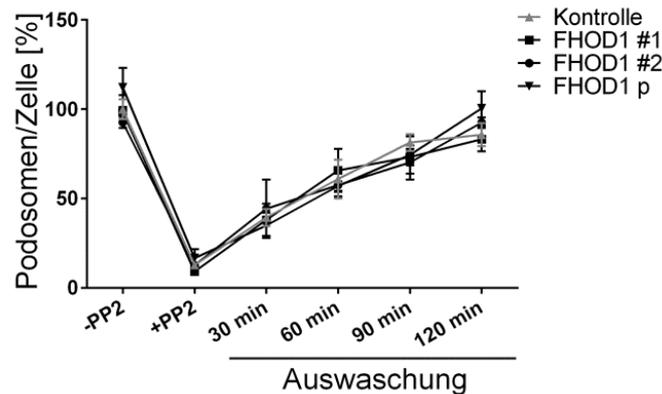


Abbildung 4.17.: Unveränderte Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown

Mit FHOD1 #1, #2, p bzw. Kontroll siRNA transfizierte und anschließend auf Deckgläschen ausgesäte primäre humane Makrophagen aus 3 Donoren wurden jeweils nach 72 h Podosomenreformationsversuchen unterzogen. Es wurden Zellen vor (-PP2), 30 min nach PP2-Zugabe (+PP2), sowie 30, 60, 90 und 120 min nach der Auswaschung des Inhibitors fixiert und permeabilisiert, mit Alexa Fluor 488-Phalloidin plus HCS CellMask red stain gefärbt und zur Ermittlung der Podosomenanzahlen pro Zelle konfokalmikroskopisch dokumentiert. In allen FHOD1-Knockdowns ließen sich keine Unterschiede zu Kontrollzellen feststellen. (> 50 Zellen pro Kondition pro Donor)

4.3.2.6. Podosomendichte während der Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown

Auch wenn in den Podosomenreformationsversuchen keine Unterschiede bei Depletion von FHOD1 in Bezug auf Podosomenanzahlen pro Zelle detektiert werden konnten, ist es denkbar, dass die Ausbildung des Podosomennetzwerks dennoch durch FHOD1 reguliert werden könnte. Da FHOD1 vor allem auch an den Podosomenkabeln zu finden ist, könnte es z.B. während der Bildung des Podosomennetzwerks die Abstände der Podosomen zueinander regulieren. Diese Hypothese wurde durch Messung der Podosomendichte in der Podosomen-bedeckten Fläche aus den für die Podosomenreformationsversuche gewonnenen Daten mit Hilfe von ImageJ-Makros untersucht (Abb. 4.18).

Betrachtet man die graphische Darstellung der Podosomendichten der einzelnen Zellen inklusive der Mittelwerte der Podosomenreformationsversuche (A), fällt auf, dass sich der Mittelwert der Podosomendichten bei Kontrollzellen 30 min nach dem Auswaschen des PP2s verringerte, jedoch bereits nach 60 min wieder den Normalwert, vor PP2-Zugabe, angenommen hatte. Die Mittelwerte der FHOD1-Knockdown-Zellen waren vor Zugabe des Inhibitors vergleichbar mit dem der Kontrollzellen. Während der Podosomenreformation war die mittlere Podosomendichte zumindest bei den mit FHOD1 #2 siRNA behandelten Zellen konsistent erhöht. Ausnahmen zeigten hierbei die mit FHOD1 #1 siRNA transfi-

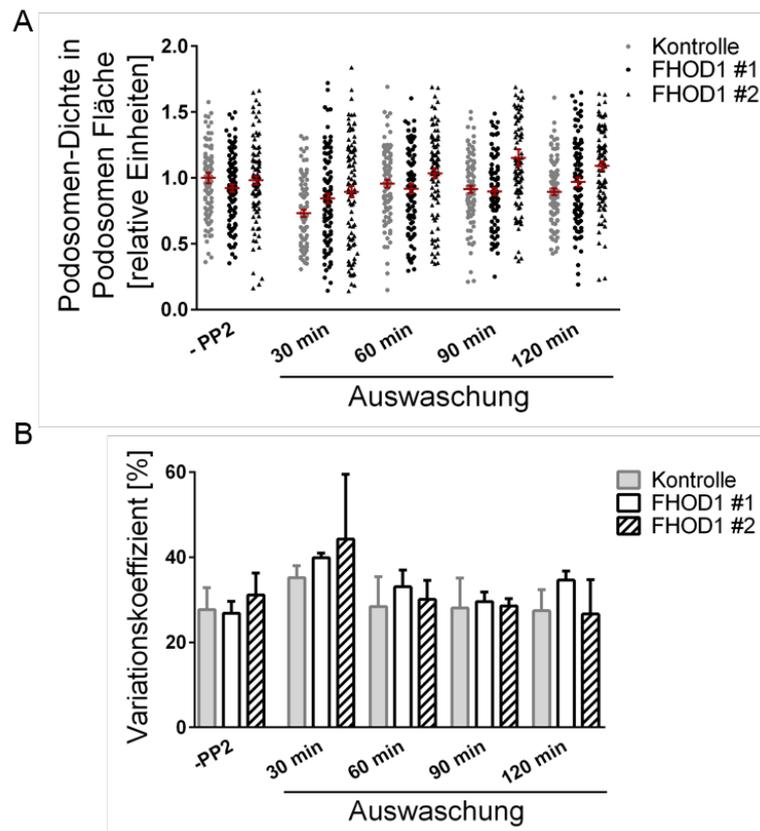


Abbildung 4.18.: Leicht veränderte Podosomalichten während der Podosomalreformation im FHOD1-Knockdown

Die in Abb. 4.17 angesprochenen Proben wurden ebenfalls zur Ermittlung der Podosomalichten in den mit Podosomen bedeckten Flächen der einzelnen Zellen benutzt und in GraphPad Prism unter Hervorheben der Mittelwerte graphisch dargestellt (A). Daraus wurden ebenfalls die Variationskoeffizienten für die verschiedenen Konditionen dargestellt (B). In beiden Fällen ließ sich bei Kontrollzellen 30 min nach der Auswaschung ein Erhöhung der Werte feststellen. Die Level der Knockdown-Zellen waren vor PP2-Zugabe denen der Kontrollzellen sehr ähnlich, wobei diese während der Podosomalreformation meist leicht erhöht, in Ausnahmefällen gleich, waren. (30 Zellen pro Kondition pro Donor)

zierten Zellen 60 und 90 min nach dem Auswaschen des PP2s; die Mittelwerte entsprachen hier ungefähr denen der Kontrollzellen. Ein weiterer Parameter, der sich aus diesen Experimenten ableiten ließ, ist die Streuung der Podosomendichten innerhalb der verschiedenen Konditionen. Dies wurde durch Darstellung der Variationskoeffizienten (= relatives Streuungsmaß) verdeutlicht (B). Auch die Streuung war bei den Kontrollzellen ausschließlich 30 min nach dem Auswaschen des PP2s verändert und zwar leicht erhöht. Genauso war die relative Streuung in den FHOD1-Knockdowns vor PP2-Zugabe mit der von Kontrollzellen vergleichbar. Während der Podosomenreformation zeigte sich bei den FHOD1-Knockdown-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen jedoch auch eine leichte Tendenz zu einer Erhöhung der Streuung.

4.3.2.7. pMLC an Podosomen während der Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown

Ein Unterschied in der Podosomendichte kann in einer Änderung der Kontraktilität der Podosomenkabel begründet sein. Da leichte Unterschiede in der Podosomendichte während der Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown festgestellt werden konnten, wurde ebenfalls eine mögliche Änderung der Kontraktilität an Podosomen untersucht. Ein Sensor für Kontraktilität an Aktinkabeln ist die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (pMLC). Myosin liegt in diesem phosphorylierten Zustand aktiv vor, d.h. es übt Kontraktilität an filamentösem Aktin aus [99, 161]. Somit wurden FHOD1-Knockdown- sowie Kontrollzellen im Rahmen von Podosomenreformationsversuchen zu den bereits angesprochenen Zeitpunkten fixiert, permeabilisiert und mit einem pMLC-Antikörper (+ Alexa Fluor 568) und Alexa Fluor 488-Phalloidin immunzytologisch markiert. Nach der mikroskopischen Dokumentation dieser Proben erfolgte eine Intensitätsmessung von pMLC in der mit Podosomen bedeckten Fläche mit Hilfe des Programms Volocity.

Anhand der graphischen Darstellung der Ergebnisse in Abb. 4.19 kann man erkennen, dass sich kein Unterschied der pMLC-Intensität im Grundzustand der FHOD1-Knockdown-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen messen ließ. Allerdings nahm die pMLC-Intensität in Kontrollzellen während der Podosomenreformation stetig zu, was in den FHOD1-Knockdown-Zellen nicht zu beobachten war. Die pMLC-Intensitäten waren mit denen der unbehandelten Zellen (-PP2) vergleichbar. Dies deutet auf eine Veränderung der Myosin Aktivität während der Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown hin und spricht für eine Funktion von FHOD1 bei der Regulation der Kontraktilität an und/oder zwischen Podosomen.

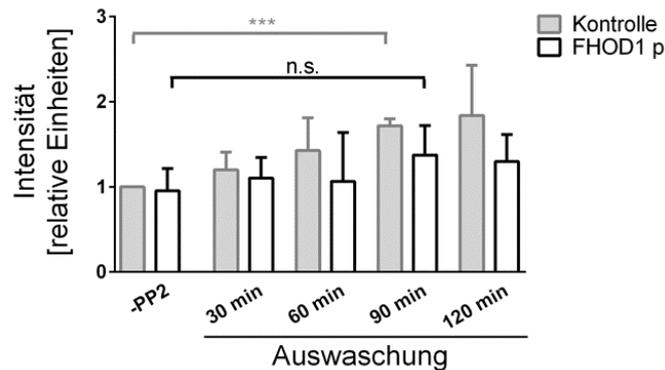


Abbildung 4.19.: Keine Kontraktilitätssteigerung an Podosomen während der Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown

Mit FHOD1 p bzw. Kontroll siRNA transfizierte und anschließend auf Deckgläschen ausgesäte primäre humane Makrophagen aus 3 Donoren wurden je nach 72 h Podosomenreformationsversuchen unterzogen. Es wurden Zellen vor PP2-Zugabe (-PP2), sowie 30, 60, 90 und 120 min nach der Auswaschung fixiert und permeabilisiert, mit Alexa Fluor 488-Phalloidin- und pMLC-Antikörper (+ Alexa Fluor 568) gefärbt und zur Ermittlung der pMLC-Intensitäten an Podosomen (mit Volocity) konfokalmikroskopisch dokumentiert. Die pMLC-Intensitäten an Podosomen waren vor PP2-Zugabe in Knockdown- und Kontrollzellen gleich. In Kontrollzellen stiegen sie während der Podosomenreformation an (***, $p = 0,0001$), blieben in Knockdown-Zellen hingegen gleich (n.s. = nicht signifikant). (20 Zellen pro Kondition pro Donor)

4.3.2.8. Podosomenreformation im Live Cell Imaging im FHOD1-Knockdown

In den bisherigen Podosomenreformationsversuchen wurde die Analyse-Genauigkeit, durch Untersuchung fixierter Zellen zu ausschließlich bestimmten Zeitpunkten, stark eingeschränkt. Es ist also denkbar, dass dadurch besonders sehr frühe Effekte von FHOD1 auf die Podosomenreformation unentdeckt blieben. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Podosomenreformationsversuch im Live Cell Imaging (siehe 4.1) konnte somit an dieser Stelle sehr gut eingesetzt werden.

Abb. 4.20 stellt die Prozesse der Podosomenneubildung, -abspaltung, sowie -auflösung während der frühen Podosomenreformation in Kontroll- und FHOD1-Knockdown-Zellen gegenüber. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis des Auftretens der einzelnen Prozesse zu verzeichnen. Im FHOD1-Knockdown war jedoch eine leichte Tendenz zu verringerter Podosomenneubildung zu erkennen. Dies scheint in einer leichten Erhöhung des Anteils der Podosomenauflösung begründet zu liegen.

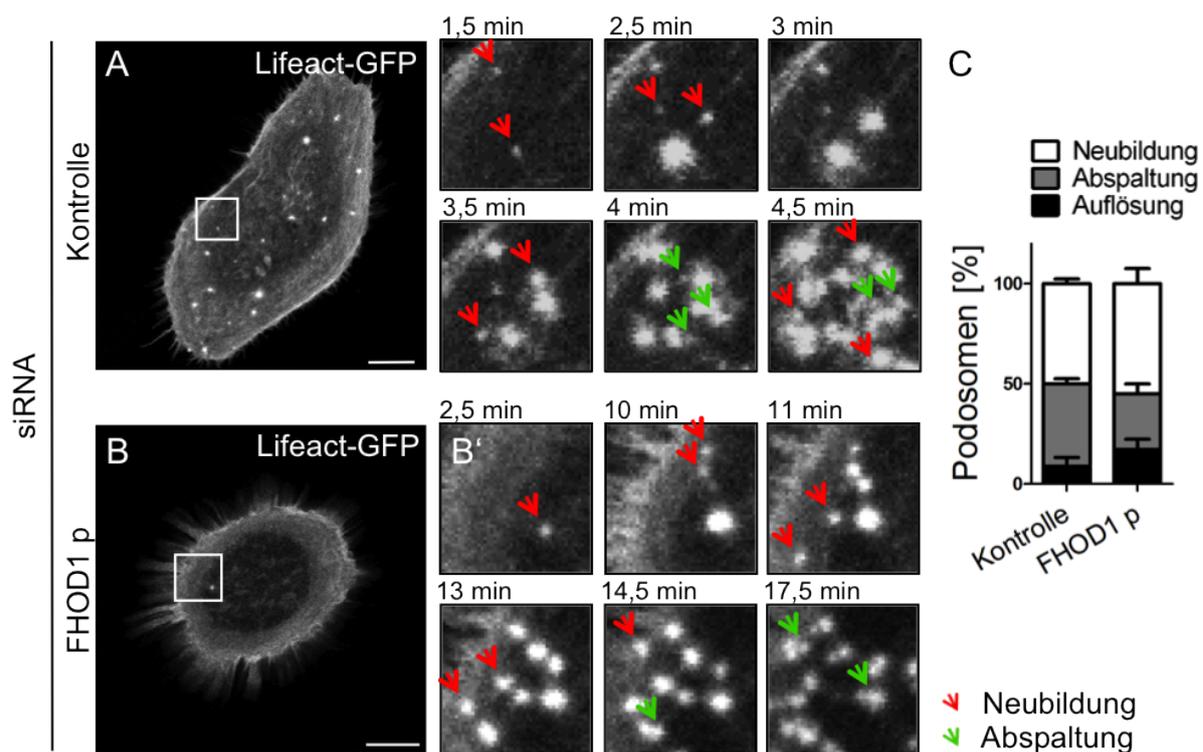


Abbildung 4.20.: Unveränderte Podosomenbildung während der Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown

Mit FHOD1 p bzw. Kontroll siRNA transfizierte primäre humane Makrophagen wurden nach 60 h erneut mit entsprechender siRNA und Lifact-GFP transfiziert und anschließend für weitere 12 h auf Live Cell Schälchen ausgesät bevor sie Podosomenreformationsversuchen im Live Cell Imaging unterzogen wurden. Gezeigt sind eine Kontrollzelle (A) und eine FHOD1-Knockdown-Zelle bei Einsetzen der Podosomenreformation und die erste Phase dieses Prozesses in Ausschnitten (A', die ersten 4,5 min und B', die ersten 17,5 min). Die Podosomenneubildung ist dabei mit einem roten Pfeil und die Podosomenabspaltung durch einen grünen Pfeil gekennzeichnet. Beide Prozesse wurden inklusive Podosomenauflösung für insgesamt 4 Kontrollzellen und 5 FHOD1-Knockdown-Zellen aus 3 verschiedenen Donoren quantifiziert (C). Maßstabsbalken, 10 μ m.

4.3.3. Hochauflösende Mikroskopie - SIM

Alle bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass FHOD1 an Podosomen bzw. Podosomenkabeln eher eine subtile Rolle spielt, die mit den soweit angewandten Techniken schwer zu erfassen ist. Vor allem die verwendete konfokale Fluoreszenzmikroskopie bringt starke Limitationen in der Auflösungsfähigkeit der Podosomenkabel mit sich. Da die bisherigen Ergebnisse auf eine Funktion von FHOD1 an den Podosomenkabeln hindeuten, wurde zur weiteren Untersuchung zu hochauflösender Mikroskopie gegriffen. Es wurden sowohl FHOD1-Knockdown-Zellen, also auch Kontrollzellen nach einem speziellen Fixierungs- und Färbeprotokoll mit Alexa Fluor 488-Phalloidin markiert und SIM (= „Structured Illumination Microscopy“) unterzogen.

4.3.3.1. Podosomenverbindende Kabel im FHOD1-Knockdown

Abb. 4.21 zeigt zunächst jeweils ein repräsentatives Beispiel, inklusive Vergrößerungen, einer mit SIM aufgenommenen FHOD1-Knockdown- bzw. Kontrollzelle, welche zuvor mit Alexa Fluor 488-Phalloidin markiert wurden (A, B und A', B'). Vor allem im Vergleich der Vergrößerungen (A', B') ist das ausgeprägter sichtbare, ungeordneter erscheinende filamentöse Aktin-Netzwerk zwischen den Podosomen für den Fall der FHOD1-Knockdown-Zelle erkennbar. Es wurden im Anschluss je insgesamt 12 Ausschnitte aus jeweils 6 Zellen der mit FHOD1 p siRNA sowie Kontroll siRNA behandelten Zellen in Kategorien klassifiziert. Dabei wurde die Erscheinung der Podosomen und der Podosomenkabel bewertet (+ - + + + +, geordnet - ungeordnet, C). Die Ergebnisse dieser Klassifizierungen sind in D graphisch dargestellt. In Kontrollzellen waren vorwiegend der +- bzw. ++-Typ vorzufinden. D.h. es zeigten sich hauptsächlich klar umgrenzte Podosomen ohne erkennbare Kabel (+), bzw. mit leicht erkennbaren Kabeln (++). Für FHOD1-Knockdown-Zellen änderte sich dieses Bild dahingehend, dass diese beiden Typen nur zu je 25 % vorhanden waren. Zu einem Großteil waren hier leicht deformierte Podosomen mit einer Vielzahl von Podosomen ausgehenden, ungeordneter erscheinenden Kabeln (++++) erkennbar. Dieser +++-Typ nahm bei den Kontrollzellen einen geringeren Anteil ein (20 %). Bei den FHOD1-Knockdown-Zellen ließ sich zum geringsten Anteil der ++++-Typ finden (20 %). Dabei sind die Podosomen und Podosomenkabel nicht mehr klar voneinander unterscheidbar. Dies war bei den Kontrollzellen nicht zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hochauflösende Mikroskopie die Hypothese einer Funktion von FHOD1 in der Regulation von Podosomenkabeln bestätigen konnte.

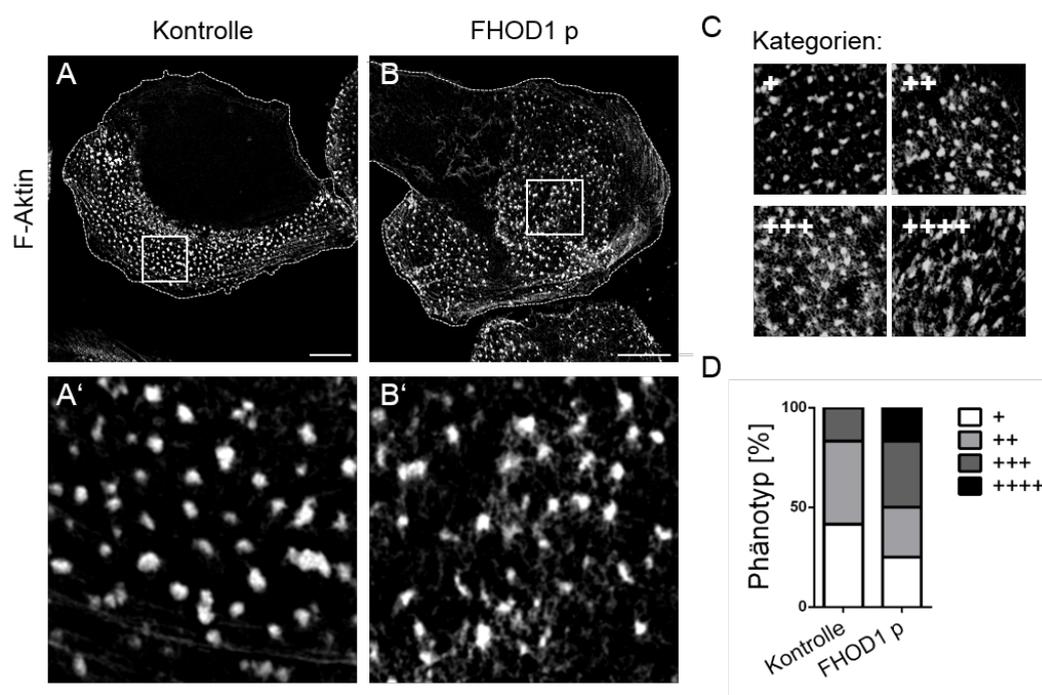


Abbildung 4.21.: Veränderte Podosomen- und Podosomenkabel-Struktur im FHOD1-Knockdown.

Für SIM geeignet fixierte und mit Alexa Fluor 488-Phalloidin gefärbte FHOD1-Knockdown (B) sowie Kontrollzellen (A) wurden mit SIM aufgenommen. Ausschnitte dieser Zellen (A'+B') wurden nach Ihrer Podosomen- und Podosomenkabel-Erscheinung in Gruppen (C) unterteilt (+ - ++++, geordnet - ungeordnet), was in GraphPad Prism graphisch ausgewertet wurde (D). Es ist eine Veränderung der stärksten Gewichtung vom + - +-Typ bei Kontrollzellen zum +++-Typ in FHOD1-Knockdown-Zellen zu erkennen. Maßstabsbalken, 10 μ m.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum einen ein Podosome-reformationsversuch im Live Cell Imaging erfolgreich etabliert werden. Dies ermöglichte die Entdeckung der Abfolge zwei unterschiedlicher Phasen der Podosome-bildung während der frühen Podosome-reformation – Neubildung und Neubildung + Abspaltung – in primären humanen Makrophagen. Zudem fand diese Methode Anwendung in laufenden Forschungsprojekten.

Zum anderen konnte durch immunzytochemische Verfahren das Formin FHOD1 als neuer Bestandteil von Podosome-n und Podosome-nkabeln primärer humaner Makrophagen identifiziert werden. Nach zahlreichen Knockdown-Experimenten zur Funktionsaufklärung von FHOD1 an Podosome-n, lieferte hochauflösende Mikroskopie Hinweise auf eine Funktion von FHOD1 an den Podosome-nkabeln. Im Folgenden soll die Bedeutung dieser potenziellen Funktion neben den weiteren Beobachtungen diskutiert werden.

5.1. Podosome-n primärer humaner Makrophagen als Modellsystem zur Untersuchung von Aktindynamik

Posome-n bestehen zum Hauptteil aus Aktin, welches dort in verschiedenen Formen zu finden ist. Der Podosome-nkern mit verzweigten Aktinfilamenten [82, 67] und die von diesem ausgehenden unverzweigten Aktinfilamente (= Podosome-nkabel), die den Kern mit dem Untergrund und benachbarten Podosome-n verbinden [2, 91]. Makrophagen bilden eine Vielzahl von Podosome-n aus – mehrere 100 pro Zelle – [86, 71], welche somit den Hauptteil ihres Aktinzytoskeletts ausmachen. Podosome-n primärer humaner Makrophagen weisen verschiedene Dynamiken wie Neubildung oder Abspaltung auf [44, 71, 11, 38]. Damit eignen sich Makrophagen hervorragend zu quantitativen Studien an Podosome-n, im Besonderen bezüglich deren Dynamik. Die Analyse der Podosome-n-dynamik kann wichtige Erkenntnisse in der Untersuchung neuer Podosome-nbestandteile bzw. -regulatoren liefern [23].

5.2. Bedeutung des Podosomenreformatsionsversuchs im Live Cell Imaging

Podosomen sind hoch dynamische Strukturen, die in der Zelle einem ständigen „Turnover“ unterliegen [38]. Sie bilden sich nicht nur neu, verschmelzen, teilen sich und lösen sich auf, auch das Aktin des Podosomenkerns wird während der Lebenszeit eines Podosoms 3 Mal umgesetzt [44, 71, 11, 38].

Vor allem ihre Bildung ist bisher nur teilweise aufgeklärt. Es wurden wichtige Regulatoren der Podosomenbildung wie Rho-GTPasen und Src-Kinasen, Effektorproteine von Integrinen [68], identifiziert [175, 152]. Zudem wurde der Aktomyosin-abhängigen Kontraktilität ein wichtiger Beitrag bei der Podosomenbildung zugesprochen [35]. Wie der gesamte Prozess jedoch präzise abläuft, ist bisher nicht gezeigt worden.

Podosomenreformatsionsversuche bieten die Möglichkeit Einblicke in den Prozess der Podosomenbildung zu bekommen und Proteine zu identifizieren, die dabei eine Rolle spielen. Zur Untersuchung der Podosomenreformation wurden bisher zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixierte Zellen analysiert, wodurch aufgrund einer hohen Zellzahl statistisch verlässliche Parameter generiert werden konnten. Allerdings beschränkt sich dabei die Information auf die gewählten Zeitpunkte. Mit der Etablierung des Podosomenreformatsionsversuchs im Live Cell Imaging wurde dieses Problem gelöst. Es ist nun möglich die Podosomenbildung in individuellen Zellen über den gesamten Zeitraum des Experiments zu verfolgen. Damit ergeben sich neben der Anzahl der Podosomen zu den gewählten Zeitpunkten weitere Parameter wie die Halbwertszeiten der Podosomenauflösung und -reformation, sowie der exakte Startpunkt der Reformation. Die einzige zusätzliche Voraussetzung für einen Podosomenreformatsionsversuch im Live Cell Imaging im Vergleich zu einer Analyse von fixierten Zellen ist das Vorhandensein eines Live Cell Mikroskops. Als kleiner Nachteil der neu entwickelten Methode ist die eingeschränkte Anzahl der zu analysierenden Zellen zu nennen. Somit stellt eine Kombination aus der Analyse der Podosomenreformation in fixierten Zellen und der Anwendung des Podosomenreformatsionsversuchs im Live Cell Imaging eine optimale Möglichkeit in der Untersuchung neuer Podosomenbestandteile bzw. -regulatoren dar, da die Stärken und Schwächen der beiden Methoden sich perfekt kompensieren.

5.2.1. Zwei Phasen der Podosomenbildung während der Podosomenreformation

Podosomen sind generell zur Neubildung und Abspaltung fähig [44, 71]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies nun zum ersten Mal für die Podosomenreformation in Live Cell Imaging gezeigt werden. Dass während dieses Prozesses zunächst ausschließlich Podosomenneubildung stattfindet und sich daran Podosomenneubildung und -abspaltung anschließen wurde bisher nicht beschrieben. Dies stellt somit einen weiteren Neuwert dieser Arbeit dar.

Durch die Abspaltung der Podosomen aus bereits bestehenden Podosomen könnte die Ausbildung des regelmäßigen Podosomennetzwerks in primären humanen Makrophagen erklärt werden. Es ist denkbar, dass das Tochterpodosom über Aktinkabel, die sich während der Abspaltung durch Forminaktivität bzw. -regulation verlängern könnten, mit dem Mutterpodosom in Kontakt bleibt. Zusätzlich dazu müssten sekundär Kontakte zu den nächsten Nachbarpodosomen gebildet werden, die unabhängig entstanden sind. Auch dies könnte durch Formine vermittelt werden. Um diese Hypothese zu bestätigen, bedarf es hochauflösender Live Cell Mikroskopie, die eine gute Darstellung der Podosomenkabel erlaubt.

5.3. Formine, essenzielle Bestandteile von Podosomen

Die Aufdeckung der Struktur und Regulation von Podosomen lieferte eine stetig an Komplexität zunehmende Modellvorstellung. Der frühen Entdeckung einer Aktin-reichen Struktur, die zur Adhäsion und zum Abbau der Extrazellulären Matrix fähig ist [152, 30, 29], folgte die Identifizierung eines Rings aus Adapterproteinen wie Vinculin und Talin, sowie Integrinen zur Adhäsion [174]. Jüngste Forschungsergebnisse zeigten, dass die Proteine dieses Rings in Clustern um den Kern organisiert sind [36, 157, 162]. Es wurden zudem unverzweigte Aktinfilamente gefunden (= Podosomenkabel), die den aus verzweigtem, Arp2/3-Komplex reguliertem Aktin bestehenden Podosomenkern [82, 67] umgeben. Diese unverzweigten Aktinfilamente verbinden den Podosomenkern mit dem Untergrund sowie mit anderen Podosomen. Dies verschafft den individuellen Podosomen zusätzliche Haftung und organisiert sie in Gruppen [2, 91]. Die neueste Entdeckung ist die sog. Kappenstruktur auf dem Podosomenkern, in der bisher das Formin FMNL1 und das Aktin-bindende Protein Supravillin gefunden wurden [102, 11]. Diese Kappenstruktur sowie zahlreiche andere Aspekte der Struktur und Regulation von Podosomen bieten ausgiebigen weiteren Forschungsbedarf.

Das Vorhandensein der verschiedenen Populationen an unverzweigten Aktinfilamenten an bzw. zwischen Podosomen [2, 91] machen neben dem Arp2/3-Komplex [82, 67] das Vorhandensein von Regulatoren des unverzweigten Aktinzytoskeletts wahrscheinlich. Diese Hypothese lieferte die Motivation für die Durchführung von Formin-Inhibitor-Versuchen und eines folgenden spezifischeren „Screens“ nach Proteinen der Formin-Familie an Podosomen. Die Tatsache, dass sich Podosomen nach der Formin-Inhibitor Zugabe (SMIFH2) aufgelöst haben, ließ eine wichtige Funktion zumindest ausgewählter Formine an Podosomen vermuten. Von den 15 möglichen Kandidaten wurden in massenspektrometrischen Untersuchungen Dia1, Dia2, FMNL1, FMNL2, DAAM1, INF2 und FHOD1 in der adhäsiven Fraktion primärer humaner Makrophagen gefunden [22]. Dies bestätigte die Hypothese einer potenziell wichtigen Bedeutung von Forminen an Podosomen. Mit ihrer Vielseitigkeit in der Regulation von unverzweigten Aktinfilamenten (Nukleation, Elongation, Bündeln, Schneiden und Depolymerisation) würden sie sehr gut als zusätzliche Regulatoren der divers dynamischen Podosomen (Neubildung, Abspaltung, Verschmelzung, Auflösung, ständiger Aktinaustausch) passen. Die Entdeckung von FMNL1 als essenzielle Komponente an Podosomen durch die Scott D. Blystone-Gruppe (New York) lieferte Bestätigung für die Untersuchung weiterer Formine an Podosomen [102]. Da die verschiedenen Familienmitglieder der Formine sehr unterschiedliche Kapazitäten in den unterschiedlichen Aktin-regulierenden Prozessen besitzen, ist die alleinige Funktion des Formins FMNL1 an Podosomen als eher unwahrscheinlich anzusehen. Vermutlich ist die Zusammenarbeit mehrerer Formine an Podosomen für deren Struktur und Regulation entscheidend. In dieser Arbeit wurde die Charakterisierung des Formins FHOD1 als putativer neuer Regulator an Podosomen vorgenommen.

5.4. FHOD1, ein neuer Bestandteil von Podosomen

Das Formin FHOD1 wurde neben 6 weiteren Mitgliedern seiner Familie im Rahmen massenspektrometrischer Untersuchungen in der adhäsiven Fraktion primärer humaner Makrophagen gefunden [22].

In der Vergangenheit wurde FHOD1 bereits als Aktin-bündelndes Protein beschrieben [138]. Es wurde an Stressfasern gefunden und ist darüber hinaus an deren Regulation beteiligt [70]. Dies legt die Annahme einer Funktion von FHOD1 an den Podosomenkabeln, welche wie Stressfasern aus gebündelten Aktinfilamenten bestehen, äußerst nahe. Außerdem wurde FHOD1 eine Rolle bei der Reifung von Integrin basierten Adhäsionsstrukturen

zugeschrieben [65]. Da diese mit Podosomen nah verwandt sind, unterstützt dies die Hypothese einer möglichen Funktion von FHOD1 an Podosomen.

Den ersten Schritt bei der Charakterisierung eines Proteins an bestimmten Strukturen stellt oftmals die Analyse seiner Lokalisation an diesen Strukturen dar. Somit wurden Lokalisationsstudien von FHOD1 an Podosomen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. FHOD1 konnte in diesen immunzytologischen Versuchen nicht nur an Podosomenkernen, sondern auch an Podosomenkabeln gefunden werden. Dies wurde sowohl für die endogene Form des Proteins, als auch in überexprimierter Situation gezeigt. Die mittels Antikörper-Färbung schwach, doch eindeutig zu identifizierende Lokalisation von FHOD1 an Podosomen und Podosomenkabeln wurde durch Verwendung von EGFP-gekoppelten FHOD1-Konstrukten deutlicher. Dies ist durch eine höhere intrazelluläre Konzentration des FHOD1-Proteins nach Überexpression zu erklären. Zur Überexpression von FHOD1 wurde sowohl ein Wildtyp- (EGFP-FHOD1, autoinhibiert), als auch ein nicht autoinhibiertes Konstrukt (EGFP-FHOD1 Δ C) verwendet. Beim Vergleich der Lokalisation der beiden FHOD1-Varianten, fällt auf, dass die des EGFP-FHOD1 Δ C im Vergleich zu EGFP-FHOD1 stärker an Podosomenkabeln lokalisierte (siehe Abb. 4.8, 4.9). Die Podosomenkabel waren zudem, genauso wie die Zelle durchlaufende Aktinfasern, an welchen Podosomen „aufgereiht“ waren, stärker ausgeprägt (siehe Abb. 4.10). Dies ist mit der Aufhebung der Autoinhibition im EGFP-FHOD1 Δ C-Konstrukt zu erklären. Das gesamte überexprimierte FHOD1 liegt im Falle von EGFP-FHOD1 Δ C bereits aktiviert vor, wohingegen EGFP-FHOD1 erst durch intrazelluläre Regulationsprozesse aktiviert werden muss, bevor es seine Funktion ausübt. EGFP-FHOD1 Δ C sorgt für eine „Überaktivität“ von FHOD1 in der Zelle und verstärkt somit dessen Funktion. Diese scheint sich den bisherigen Ergebnissen nach auf die Podosomenkabel zu konzentrieren.

Mittels immunzytologischer Untersuchungen konnte FHOD1 in dieser Arbeit als neuer Bestandteil von Podosomen und Podosomenkabeln identifiziert werden. Dies, zusammen mit der Beobachtung, dass FHOD1 die Ausprägung von Aktinkabeln beeinflusst, unterstützt die Hypothese einer möglichen Funktion von FHOD1 an Podosomen und im Besonderen an Podosomenkabeln.

5.5. FHOD1, ein neuer Regulator von Podosomenkabeln

Im nächsten Schritt sollte die potenzielle Funktion von FHOD1 an Podosomenkernen und -kabeln adressiert werden. Dazu wurden zunächst Knockdown-Experimente durchgeführt. Der Knockdown von FHOD1 zeigte nur wenige Konsequenzen auf eine Vielzahl getesteter Podosomenparameter. Es wurden die Anzahl der Podosomen, ihre Größe und Lebenszeit, sowie die Fähigkeit zur Matrixdegradation und Podosomenbildung untersucht. Unterschiede in FHOD1-Knockdown- im Vergleich zu Kontrollzellen waren die Erhöhung des Anteils der Zellen mit bis zu 50 Podosomen, genauso wie des Anteils an Podosomen, die länger als 20 min in der Zelle bestehen. Letzteres erhöhte die mittlere Lebenszeit von Podosomen im FHOD1-Knockdown.

Nach diesen Experimenten lässt sich eindeutig behaupten, dass FHOD1 keine Rolle bei der Funktion der Podosomen zur Matrixdegradation spielt. Außerdem ist FHOD1 kein Regulator der Podosomengröße. Aber es beeinflusst die Anzahl der Podosomen. In FHOD1-Knockdown-Zellen war der Anteil der Zellen mit bis zu 50 Podosomen im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant erhöht (**, $p=0,0043$; siehe Abb. 4.13 B). In der Podosomenbildung kann FHOD1 nach den Ergebnissen der Podosomenreformationsversuche allerdings keine Aufgabe zugesprochen werden. Zudem spielt FHOD1 eine Rolle in der Regulation der Podosomenlebenszeit, wobei es diese beschränkt.

Die bisher untersuchten Parameter adressierten ausschließlich individuelle Podosomen. Durch die Ergebnisse der Lokalisationsstudien dieser Arbeit wurde jedoch bereits eine wahrscheinliche Funktion von FHOD1 an Podosomenkabeln, die individuelle Podosomen mit dem Untergrund und miteinander verbinden, postuliert. Dazu passend wurde FHOD1 in der Literatur als Aktin-bündelndes und regulatorisches Protein in Stressfasern beschrieben [72, 138]. Stressfasern weisen durch das Vorhandensein von unverzweigten Aktinfilamenten Ähnlichkeit zu Podosomenkabeln auf. Zumal den Podosomenkabeln kürzlich ebenfalls Kontraktilität zugeschrieben wurde [11]. Dies platziert sie ideal zur Kraftübertragung zwischen benachbarten Podosomen und damit zum Zusammenhalt von Podosomengruppen [121]. Aus diesen Gründen wurden für weitere Untersuchungen der Funktion von FHOD1 an Podosomen auf die Podosomenkabel fokussiert.

Dabei ließen sich zunächst auffällige Unterschiede in der Myosin Aktivität, welche Kontraktilität ermöglicht [45], an und zwischen Podosomen während der Podosomenreformation feststellen. Dies wurde durch die Messung der Intensität der mit Antikörper markierten

phosphorylierten Myosin „light chain“ (pMLC) in konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ermittelt. PMLC ist ein Sensor für die Kontraktilität an Aktinfilamenten, da die Phosphorylierung der leichten Kette des Myosins (MLC) dieses aktiviert, sodass es Kontraktilität an filamentösen Aktinstrukturen ausüben kann [99, 161]. Kontrollzellen zeigten während der Podosomenreformation einen Anstieg der pMLC-Intensitäten in der mit Podosomen bedeckten Fläche der Zellen. Dies stellt eine neue Entdeckung dar. Als Erklärung dafür lassen sich noch nicht ausgewogene Kräfte zwischen Podosomen in der Entstehung des gleichmäßigen Podosomennetzwerks anfügen. In FHOD1-Knockdown-Zellen konnte der Anstieg der pMLC-Intensitäten nicht beobachtet werden. Die Intensitäten blieben dort ungefähr auf dem Level der unbehandelten Zellen. Dies deutet auf einen Defekt in der Aktomyosin-abhängigen Kontraktilität zur Ausbildung des gleichmäßigen Podosomennetzwerks hin. Dazu lieferten die Untersuchungen der Podosomendichte während der Podosomenreformation zusätzliche Hinweise. Es wurden dabei Abweichungen in der Ausbildung der optimalen Dichte und somit des gleichmäßigen Podosomennetzwerks in FHOD1-Knockdown-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt.

Die bisherigen Ergebnisse, vor allem in Bezug zu der scheinbaren Beeinträchtigung der Myosin Aktivität an und zwischen Podosomen während der Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown, passen gut zu der Feststellung, dass sowohl Myosin IIA als auch FHOD1 vorwiegend an antiparallele Aktinfilamente binden [160, 141]. Damit Myosin IIA Kontraktilität an Aktinbündeln ausüben kann, müssen sich diese aus antiparallelen Aktinfilamenten zusammensetzen [33]. Dass sowohl Myosin IIA als auch FHOD1 an antiparallelen Aktinfilamenten zu finden sind, deutet auf eine gemeinsame Funktion in der Ausübung der Kontraktilität hin. Eine weitere Bestätigung dieser potenziellen gemeinsamen Funktion liefert die Tatsache, dass sowohl Myosin IIA als auch FHOD1 durch die Serin/Threonin Kinase ROCK aktiviert werden [6, 69, 55, 151].

In weiteren Lokalisationsstudien von Myosin IIA und FHOD1 konnte in dieser Arbeit eine gemeinsame Lokalisation an Podosomenkernen und -kabeln beobachtet werden. Vor allem die Überexpression des nicht autoinhibierten EGFP-FHOD1 Δ C, die zur Bildung von zahlreichen starken Aktinkabeln mit FHOD1- und Myosin IIA-Dekoration führte, deutet erneut auf eine gemeinsame Aktivität an diesen Aktinstrukturen hin.

Die Hypothese einer gemeinsamen Funktion von FHOD1 und Myosin IIA bei der Kontraktilität an Podosomenkabeln deckt sich mit der aktuellen Literatur. FHOD1 wird darin in mehreren Zelltypen eine Rolle bei der Bildung von kontraktilen Aktinkabeln zugeschrieben. Somit führt z.B. die Expression einer dominant aktiven Form des *Drosophila*

FHOD1-Homologs *Knittrig* sowohl in Makrophagen, als auch in Endothelzellen zur Bildung von Stressfasern [77]. In einer weiteren Studie, in der die humane Osteosarkomazelllinie U2OS benutzt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Expression des nicht-autoinhibierten EGFP-FHOD1-V228E ebenfalls zur verstärkten Ausbildung von Stressfasen führt [141].

Um die sich zunehmend bestätigende Hypothese einer potenziellen Funktion von FHOD1 an Podosomenkabeln weiter zu untersuchen, wurde an dieser Stelle zu hochauflösender Mikroskopie gegriffen. Dies erlaubte eine bessere Auflösung der mit herkömmlichen konfokalmikroskopischen Techniken schwer darstellbaren Podosomenkabel. In diesen Untersuchungen wurden deutlich fehlorganisierte Podosomenkabel an Podosomen von FHOD1-Knockdown-Zellen entdeckt (siehe Abb. 4.21). Die fehlorganisierten Filamente könnten entweder durch einen Überschuss an interpodosomalem Aktin oder durch leichtere Erreichbarkeit der Aktinfilamente für Phalloidin nach Ausbleiben des Bündelns durch FHOD1 zustande kommen. Beides wäre unter den bisher bekannten biochemischen Aktivitäten von FHOD1 denkbar. In *in vitro* Studien wurde FHOD1 keine Aktin-polymerisierende bzw. -depolymerisierende Fähigkeit zugesprochen. FHOD1 wurde vielmehr als Aktin-bündelndes Protein beschrieben. Es bindet außerdem an das „barbed end“ von Aktinfilamenten und schützt diese somit vor Abbau. [138]. Die fehlorganisierten Podosomenkabel könnten also das Ergebnis des Ausbleibens der Bündelung durch FHOD1 darstellen. Zumal in MEF-Zellen gezeigt wurde, dass die Aktinfilament-Dichte und -Organisation nach FHOD1-Knockdown dort ebenfalls reduziert war [65]. Zusätzlich könnte die Fähigkeit von FHOD1 zur Inhibition des Wachstums von parallelen Aktinfilamenten [141] dafür sorgen, dass zwischen Podosomen ausschließlich antiparallel organisierte Aktinfilamente gebildet werden, die die Kontraktion in Kombination mit Myosin IIA ermöglichen. In der Abwesenheit von FHOD1 könnten also verstärkt parallele Aktinfilamente gebildet werden, die an diesen Stellen nicht organisiert werden können.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass FHOD1 vor allem die Kontraktilität der Podosomenkabel reguliert. Dies könnte durch das Bündeln der antiparallelen Aktinfilamente durch FHOD1 erreicht werden. Dadurch wäre die Basis für die Aktomyosin-abhängige Kontraktilität gegeben, die den Aufbau des regelmäßigen Podosomennetzwerks ermöglicht.

5.6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum einen ein Podosome-reformationsversuch im Live Cell Imaging etabliert. Zum anderen wurde durch immunzytologische Verfahren, Knockdownstudien und hochauflösende Mikroskopie eine Funktion des Formins FHOD1 als neuer Podosomebestandteil in der Regulation von Podosome-kabeln beschrieben.

Mit der Etablierung des Podosome-reformationsversuchs im Live Cell Imaging wurde eine Methode geschaffen, die zukünftig bei der Untersuchung neuer Podosomebestandteile bzw. -regulatoren zwecks Aufklärung deren Bedeutung während der Podosomebildung eingesetzt werden kann.

Diese Methode bietet weiterhin die Möglichkeit die bisher noch nicht aufgeklärte Fragestellung, ob Podosome an ihren vorherigen Orten erneut entstehen, und welche Proteine diese Stelle determinieren, zu beantworten. Man spricht von dem sog. Gedächtnis der Podosome, was ein weiteres Forschungsfeld der AG Linder ist.

Bei der Aufklärung der Funktion von FHOD1 an Podosome und Podosome-kabeln haben sich neue Fragen ergeben.

Somit ist beispielsweise bisher nicht geklärt, wie die Ausbildung der Podosome-kabel an Podosome zustande kommt. Zur Beantwortung dieser Frage wird die Verwendung hochauflösender Mikroskopie benötigt, denn nur diese gewährleistet eine ausreichend gute Darstellung der Podosome-kabel. Neben SIM sind dabei STED- („Stimulated emission depletion“) und STORM-Techniken („Stochastic optical reconstruction microscopy“) denkbar. In den Versuchen dieser Arbeit lag der Fokus allein auf dem Formin FHOD1. Dieses sorgt für eine Verstärkung von Aktinfasern und Podosome-kabeln in primären humanen Makrophagen, potenziell durch stärkere Bündelung. Es scheint die unverzweigten Aktinfilamente der Podosome-kabel jedoch nicht zu initiieren, was zu seinen publizierten Eigenschaften passt (siehe 5.5). Es liegt nahe, dass diese Aufgabe eines der weiteren 7 an Podosome gefundenen Formine übernehmen könnte. Da Experimente mit den Forminen FMNL2, DAAM1 und INF2 (Leona Trübe, persönliche Kommunikation) keine Hinweise auf eine Initiierung der Podosome-kabel ergeben haben, bleiben FMNL1 sowie Dia1 und Dia2 als potentielle Kandidaten übrig. Untersuchungen der Scott D. Blystone Gruppe (New York) geben Hinweise darauf, dass das Formin FMNL1 bei der Ausbildung der Podosome-kabel eine Rolle spielen könnte [102]. Dieses Formin lokalisiert als Kappenbestandteil

auf dem Podosomenkern und kann Aktin sowohl polymerisieren als auch schneiden und bündeln [57], was die Ausbildung und Regulation der Podosomenkabel möglich machen könnte. Desweiteren wäre Dia1 wegen seiner prinzipiellen Fähigkeiten zur Aktinnukleation und -elongation [79, 74] sowie seiner regulatorischen Fähigkeiten an Stressfasern [163, 60] ebenfalls zur Initiierung und Regulation der Podosomenkabel denkbar. Außerdem wird Dia1 über die Rho-GTPase RhoA aktiviert. RhoA phosphoryliert zudem die Kinase ROCK, welche anschließend die Aktivierung von Myosin IIA und FHOD1 herbeiführen kann. Dia2 ist ebenso zur Aktinnukleation und -elongation fähig wie Dia1 [51, 74], wird durch ROCK aktiviert [147] und wurde in Kontexten wie der Zytokinese [165, 166, 164] und Regulation von Filopodien [10, 114, 172, 15, 133] beschrieben. Diese benötigen ebenfalls kontraktile Aktinfasern bzw. sind aus diesen aufgebaut. Zur Beantwortung der Frage nach dem Podosomenkabel-nukleierenden Formin oder Forminen würde ein kombinierter Ansatz aus Knockdown-Experimenten der angesprochenen Formine FMNL1, Dia1 oder Dia2 und hochauflösender Mikroskopie weiterhelfen.

Desweiteren wurde in der vorliegenden Arbeit kein mechanistischer Ansatz zur Aufklärung der Funktionsweise von FHOD1 an Podosomen und Podosomenkabeln gewählt. In diesem Kontext bleiben ebenso die Fragen der Rekrutierung zu und Aktivierung von FHOD1 an diesen Stellen unbeantwortet.

Zur Aufklärung des Mechanismus von FHOD1 in der Regulation der Podosomenkabel ist zum einen die mögliche Interaktion mit bzw. der Einfluss von Myosin IIA zu untersuchen. Für das FHOD1 Protein wurden durch die Arbeitsgruppe P. Nalbant (Institut für Molekulare Zellbiologie, Universität Duisburg Essen) bereits die Aminosäuren 1-339, welche die N-terminale GBD-FH3-Domänen bilden, als essenziell für die generelle Lokalisation von FHOD1 sowie Kolo-kalisation mit Myosin IIA an Stressfasern in U2OS-Zellen beschrieben [141]. Ob dies an Podosomenkabeln primärer humaner Makrophagen ebenfalls der Fall ist, gilt es zu klären. Dazu könnte das entsprechende Fluorophor-gekoppelte Deletionskonstrukt (z.B. EGFP-FHOD1 Δ 1-339) in primären humanen Makrophagen überexprimiert werden. Anschließend müsste überprüft werden, ob die Lokalisation dieses deletierten FHOD1 Proteins an Podosomenkabeln ausbleibt. Im Gegensatz dazu müsste die Überexpression des Minimalkonstrukts EGFP-FHOD1.1-339 zu einer Lokalisation an Podosomen führen. Die Überexpression von EGFP-FHOD1.1-339 in Kombination mit dem Einsatz von Blebbistatin, zur Inaktivierung von Myosin IIA, oder in Myosin IIA Knockdownhintergrund würde zeigen, ob die potentielle Lokalisation von FHOD1 über die Aminosäuren 1-339 von der Myosin IIA-Aktivität bzw. der Anwesenheit von Myosin IIA abhängig

ist. Weitere Immunpräzipitationsversuche mit WT-, Deletions- und Minimalkonstrukten würden klären, ob es zu einer Assoziation von FHOD1 und Myosin IIA kommt und welche Proteindomänen oder möglicherweise weiteren Proteine daran beteiligt sind.

In primären humanen Makrophagen wurde zudem bisher nicht gezeigt, ob die ASBD („Actin side-binding domain“) für die Lokalisation an den Podosomenkabeln bzw. deren Ausbildung entscheidend ist. Auch dies könnte mit dem entsprechenden Deletionskonstrukt geklärt werden. Würde der unwahrscheinliche Fall eintreten, dass ein Deletionskonstrukt aus beiden Domänen (EGFP-FHOD1 Δ GBD-FH3 Δ ASBD) zusammen immer noch zu einer Lokalisation an Podosomenkabeln führt, müsste die für die Lokalisation verantwortliche Stelle des FHOD1 Proteins durch neue Deletionskonstrukte identifiziert werden. Dabei müssten schrittweise vom N- und C-Terminus größere Bereiche deletiert werden, um so auf den für die Lokalisation entscheidenden Bereich zu stoßen. Somit würde am Ende geklärt sein, welche Teile von FHOD1 für die Lokalisation und möglicherweise Funktion an Podosomenkabeln nötig sind und welchen Einfluss Myosin IIA auf diese Lokalisation hat.

Ein ausführlicher Screen nach Interaktionspartnern von FHOD1 in primären humanen Makrophagen könnte ebenfalls zur Aufklärung des Funktionsmechanismus beitragen. Dies könnte mit Hilfe von Immunpräzipitationen mit anschließender massenspektrometrischen Analyse durchgeführt werden. Interessante Kandidaten können im Anschluss näher in Bezug auf die Funktion von FHOD1 an Podosomenkabeln untersucht werden, indem diese in der Zelle durch Knockdown herunterreguliert werden und untersucht wird, ob FHOD1 seine Aufgabe an Podosomenkabeln weiterhin ausführt.

Die Aktivierung von FHOD1 ist weder in Makrophagen noch in anderen Zelltypen vollständig geklärt. Zur Untersuchung des potenziellen, nicht bestätigten Einflusses der Rho-GTPase Rac1 [48, 140], müsste zunächst die konstitutiv aktive Form der GTPase überexprimiert werden, um zu überprüfen, ob dies zu einer Verstärkung des Effekts von FHOD1 führt. Wenn in einem weiteren Schritt, wo die konstitutiv aktive Form der GTPase im FHOD1-Knockdown überexprimiert wird, dieser Effekt ausbleibt, ist die Aktivierung von FHOD1 über die GTPase zur Ausübung des Effekts bewiesen. Zur weiteren Überprüfung könnte die konstitutiv inaktive GTPase Variante überexprimiert und in der Zelle kontrolliert werden, ob FHOD1 seine Funktion weiterhin ausführen kann. Die nicht autoinhibierte Form von FHOD1 dürfte sich dadurch nicht beeinflussen lassen.

In anderen Zellsystemen wurde gezeigt, dass zur Aktivierung von FHOD1 eine Phosphorylierung der Aminosäuren S1131, Ser1137 und Thr1141 durch ROCK stattfinden muss [151, 55]. Auch dies könnte in primären humanen Makrophagen untersucht werden.

Zum einen ist dazu ein ROCK-Inhibitor (Y-27632) erhältlich und zum anderen könnte eine Phosphorylierungs-insensitive Mutante von FHOD1 überexprimiert werden. Dabei ist wiederum der Effekt an den Podosomenkabeln zu überprüfen.

Somit wären neben den nötigen Domänen von FHOD1 und weiteren essenziellen Proteinen auch die Aktivierung des Formins zur Ausübung seiner Funktion in der Regulation der Kontraktilität der Podosomenkabel geklärt.

Abschließend könnten die Konsequenzen der Funktion von FHOD1 an Podosomenkabeln auf das Verhalten der ganzen Zelle beispielsweise bezüglich Migration oder Invasion untersucht werden. Da FHOD1 in Experimenten dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Matrixdegradation hatte, ist ein Mitwirken bei der Invasion zwar nicht auszuschließen, doch eher unwahrscheinlich. Invasions-Experimente mit FHOD1-Knockdownzellen würden Gewissheit liefern. Während der „Epithelial-to-mesenchymal transition“ (EMT) wurde sogar ein Einfluss von FHOD1 auf die Invasion einer Plattenepithelkarzinom-Zelllinie festgestellt, was allerdings auch mit einer verminderten Matrixdegradation in entsprechenden FHOD1-Knockdown-Zellen einher ging [47]. Im Zuge dieser, sowie weiteren, anderen Arbeiten wurde FHOD1 als Regulator der Migration beschrieben [70, 47, 65, 77]. Als Regulator der Podosomenkabel und somit der Ausbildung des koordinierten Podosomennetzwerks, welches eine zielgerichtete Migration ermöglicht, hat FHOD1 in primären humanen Makrophagen möglicherweise eine Auswirkung auf die Zellmigration. Entsprechende Migrations-Experimente sind folglich dringend anzuraten.

Mit der Entdeckung des neuen Podosomenbestandteils FHOD1, welches Podosomenkabel reguliert, wurde ausgiebiges weiteres Forschungspotenzial geschaffen, womit das Feld der Podosomenregulation spannend bleibt.

6. Zusammenfassung

Podosomen sind Aktin-reiche Adhäsions- und Invasionsstrukturen, die während ihrer Lebenszeit von ca. 10 Minuten hohen Dynamiken unterliegen. Dabei ist ihre Bildung bisher nur wenig verstanden. Regulatoren dieses Prozesses können durch Podosomenreformati-
onsversuche identifiziert werden. Bei diesem Ansatz wird das reversible Auflösen der Pod-
osomen durch Zugabe eines Src-Kinase Inhibitors genutzt, um nach dem Auswaschen des
Inhibitors eine erneute Bildung von Podosomen einzuleiten.

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein Podosomenreformati-
onsversuch im Live Cell Imaging
etabliert. Dies ermöglicht die genaue Analyse des gesamten Prozesses der Podosomenrefor-
mation. Dabei wurden zwei verschiedene Phasen der Podosomenbildung – Podosomenneu-
bildung und Podosomenneubildung + -absplaltung – entdeckt.

Podosomen setzen sich aus unterschiedlichen Aktinpopulationen zusammen. Zum einen aus
einem Arp2/3-regulierten Kern mit verzweigtem F-Aktin und zum anderen aus Podosomen-
kabeln, die aus unverzweigten, antiparallel angeordneten Aktinfilamenten bestehen. Die
Podosomenkabel verbinden die Podosomenkerne sowohl mit dem Untergrund als auch un-
tereinander zur Ausbildung eines gleichmäßigen, kontraktilen Podosomennetzwerks. Über
die Regulation der Podosomenkabel war bisher nur wenig bekannt gewesen. Ein Einfluss
von Forminen, Regulatoren des unverzweigten Aktinzytoskeletts, war an dieser Stelle je-
doch sehr gut denkbar.

In dieser Arbeit führte der Einsatz des Formin-Inhibitors SMIFH2 zum Auflösen der Po-
dosomen in primären humanen Makrophagen. Dies identifizierte Formine als essenzielle
Podosomenregulatoren. Insbesondere konnte das Aktin-bündelnde Formin FHOD1 durch
immunzytologische Verfahren als neuer Bestandteil von Podosomen und Podosomenkabeln
nachgewiesen werden. Darauf folgende Knockdown-Experimente zeigten auf, dass FHOD1
die Struktur des Podosomenkerns kaum beeinflusst und auch bei der Podosomenbildung
und Matrixdegradation keine Rolle spielt. Vielmehr konnte die Hypothese einer regulato-
rischen Funktion von FHOD1 bei der Kontraktilität von Podosomenkabeln durch folgende

Beobachtungen bestätigt werden:

1. Die Überexpression einer konstitutiv aktiven Proteinvariante führte zur verstärkten Ausbildung von mit FHOD1- und dem Motorprotein Myosin IIA-dekorierten Aktinkabeln.
2. Die pMLC („Phosphorylated Myosin light chain“)-Intensitäten an und zwischen Podosomen waren während der Podosomenreformation im FHOD1-Knockdown verringert.
3. In Aufnahmen hochauflösender Mikroskopie waren die Aktinkabel zwischen den Podosomenkernen im FHOD1-Knockdown fehlorganisiert.

In dieser Arbeit konnte FHOD1 als Regulator von Podosomenkabeln beschrieben werden. Somit ermöglicht FHOD1 die Aktomyosin-abhängige Kontraktilität und damit den Aufbau des regelmäßigen Podosomennetzwerks.

Abkürzungsverzeichnis

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	„Actin-related protein“
ASBD	„Actin side-binding domain“
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	„Bovine serum albumin“
CC	„Coiled coil“-Domäne
CD14	„Cluster of differentiation“ ¹⁴
Daam	„Dishevelled-associated activator of morphogenesis“
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAD	„Diaphanous autoregulatory domain“
DD	„Dimerization domain“
Dia	„Diaphanous-related formin“
DID	„Diaphanous inhibitory domain“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic acid“
DPBS	„Dulbecco’s phosphate-buffered saline“

DRF	„Diaphanous-related formin“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	„Enhanced green fluorescent protein“
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EMT	„Epithelial-to-mesenchymal transition“
EZM	Extrazelluläre Matrix
F-Aktin	filamentöses Aktin
FA	Formaldehyd
FAK	„Focal adhesion kinase“
FH	„Formin homology domain“
FHOD	„FH1/FH2 domain-containing protein“
FMN	„Formin“
FMNL	„Formin-like protein“
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	„GTPase-activating protein“
GBD	„GTPase-binding domain“
GDI	„Guanin nucleotide dissociation inhibitor“
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	„Guanine nucleotide exchange factor“
GFP	„Green fluorescent protein“
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	„Horseradish peroxidase“
IgG	Immunglobulin G

INF	„Inverted formin“
LB	„Lysogeny broth“
LSM	Lymphozyten Separations Medium
M-CSF	„Macrophage colony-stimulating factor“
MEF	„Mouse embryonic fibroblasts“
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MLC	„Myosin light chain“
MLCK	„Myosin light chain kinase“
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NGS	„Normal goat serum“
NHS	„Normal human serum“
NPF	„Nucleation promoting factor“
OD	Optische Dichte
PBS	„Phosphate-buffered saline“
PFA	Paraformaldehyd
PFS	„Perfect focus system“
PKC	Proteinkinase C
pMLC	„Phosphorylated MLC“
Rho	„Ras homolog“
RNA	„Ribonucleic acid“
ROCK	„Rho-associated protein kinase“
ROI	„Region of interest“
rpm	„rounds per minute“

RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	Raumtemperatur
SDS	„Sodium dodecyl sulfate“
SDS-PAGE	„Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“
SIM	„Structured illumination microscopy“
siRNA	„Small interfering RNA“
SMIFH2	„Small molecule inhibitor of Formin Homology 2 domains“
Src	= c-Src, Akronym aus „cellular“ und „sarcoma“
STED	„Stimulated emission depletion“
STORM	„Stochastic optical reconstruction microscopy“
TBS	„Tris-buffered saline“
TBST	Mix aus „Tris-buffered saline“ und Tween 20
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
WASP	„Wiskott–Aldrich syndrome protein“
WH2	„WASP homology 2“

Literaturverzeichnis

- [1] Rashmi Ahuja, Roser Pinyol, Nicole Reichenbach, Laura Custer, John Klingensmith, Michael M. Kessels, and Britta Qualmann. Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, 131(2):337–350, Oct 2007. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.030. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.030>. 1.3
- [2] Toshitaka Akisaka, Hisaho Yoshida, Reiko Suzuki, and Keiko Takama. Adhesion structures and their cytoskeleton-membrane interactions at podosomes of osteoclasts in culture. *Cell Tissue Res*, 331(3):625–641, Mar 2008. doi: 10.1007/s00441-007-0552-x. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-007-0552-x>. 1.4, 1.4, 5.1, 5.3
- [3] A. S. Alberts. Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem*, 276(4):2824–2830, Jan 2001. doi: 10.1074/jbc.M006205200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M006205200>. 1.3.1
- [4] Bruce Alberts. *Molekularbiologie der Zelle*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2004. 1.3
- [5] Corinne Albiges-Rizo, Olivier Destaing, Bertrand Fourcade, Emmanuelle Planus, and Marc R. Block. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci*, 122(Pt 17):3037–3049, Sep 2009. doi: 10.1242/jcs.052704. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.052704>. 1.2
- [6] M. Amano, M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. Phosphorylation and activation of myosin by rho-associated kinase (rho-kinase). *J Biol Chem*, 271(34):20246–20249, Aug 1996. 5.5
- [7] Jessica Azoury, Karen W. Lee, Virginie Georget, Pascale Rassinier, Benjamin Leader, and Marie-Hélène Verlhac. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr Biol*, 18(19):1514–1519, Oct 2008. doi: 10.1016/j.cub.2008.08.044. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.08.044>. 1.3.1
- [8] Y. Baba, S. Nonoyama, M. Matsushita, T. Yamadori, S. Hashimoto, K. Imai, S. Arai, T. Kunikata, M. Kurimoto, T. Kurosaki, H. D. Ochs, Ji Yata, T. Kishimoto, and S. Tsukada. Involvement of wiskott-aldrich syndrome protein in b-cell cytoplasmic tyrosine kinase pathway. *Blood*, 93(6):2003–2012, Mar 1999. 1.2
- [9] Szilvia Barkó, Beáta Bugyi, Marie-France Carlier, Rita Gombos, Tamás Matusek, József Mihály, and Miklós Nyitrai. Characterization of the biochemical properties and biological function of the

- formin homology domains of drosophila daam. *J Biol Chem*, 285(17):13154–13169, Apr 2010. doi: 10.1074/jbc.M109.093914. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.093914>. 1.3.1
- [10] Petra Beli, Debora Mascheroni, Dalu Xu, and Metello Innocenti. Wave and arp2/3 jointly inhibit filopodium formation by entering into a complex with mdia2. *Nat Cell Biol*, 10(7):849–857, Jul 2008. doi: 10.1038/ncb1745. URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1745>. 5.6
- [11] Ridhirama Bhuwania, Susanne Cornfine, Zhiyou Fang, Marcus Krüger, Elizabeth J. Luna, and Stefan Linder. Supravillin couples myosin-dependent contractility to podosomes and enables their turnover. *J Cell Sci*, 125(Pt 9):2300–2314, May 2012. doi: 10.1242/jcs.100032. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.100032>. 1.2, 1.4, 1.4, 1.4.1, 5.1, 5.2, 5.3, 5.5
- [12] A. L. Bishop and A. Hall. Rho gtpases and their effector proteins. *Biochem J*, 348 Pt 2:241–255, Jun 2000. 1.3
- [13] L. Blanchoin and T. D. Pollard. Mechanism of interaction of acanthamoeba actophorin (adf/cofilin) with actin filaments. *J Biol Chem*, 274(22):15538–15546, May 1999. 1.3
- [14] Laurent Blanchoin and Thomas D. Pollard. Hydrolysis of atp by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry*, 41(2):597–602, Jan 2002. 1.3
- [15] J. Block, T E B. Stradal, J. Hänisch, R. Geffers, S. A. Köstler, E. Urban, J. V. Small, K. Rottner, and J. Faix. Filopodia formation induced by active mdia2/drif3. *J Microsc*, 231(3):506–517, Sep 2008. doi: 10.1111/j.1365-2818.2008.02063.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02063.x>. 5.6
- [16] Jennifer Block, Dennis Breitsprecher, Sonja Kühn, Moritz Winterhoff, Frieda Kage, Robert Geffers, Patrick Duwe, Jennifer L. Rohn, Buzz Baum, Cord Brakebusch, Matthias Geyer, Theresia E B. Stradal, Jan Faix, and Klemens Rottner. Fmnl2 drives actin-based protrusion and migration downstream of cdc42. *Curr Biol*, 22(11):1005–1012, Jun 2012. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.064. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.064>. 1.3.1
- [17] Lindsay R. Boateng and Anna Huttenlocher. Spatiotemporal regulation of src and its substrates at invadosomes. *Eur J Cell Biol*, 91(11-12):878–888, 2012. doi: 10.1016/j.ejcb.2012.06.003. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.06.003>. 1.2
- [18] Dominique T. Brandt, Sabrina Marion, Gareth Griffiths, Takashi Watanabe, Kozo Kaibuchi, and Robert Grosse. Dial and iqgap1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *J Cell Biol*, 178(2):193–200, Jul 2007. doi: 10.1083/jcb.200612071. URL <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200612071>. 1.3.1
- [19] Dennis Breitsprecher and Bruce L. Goode. Formins at a glance. *J Cell Sci*, 126(Pt 1):1–7, Jan 2013. doi: 10.1242/jcs.107250. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.107250>. 1.3.1

-
- [20] S. Burns, A. J. Thrasher, M. P. Blundell, L. Machesky, and G. E. Jones. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by rho gtpases, the was protein, and differentiation. *Blood*, 98(4):1142–1149, Aug 2001. 1.2
- [21] D. H. Castrillon and S. A. Wasserman. Diaphanous is required for cytokinesis in drosophila and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development*, 120(12):3367–3377, Dec 1994. 1.3.1
- [22] Pasquale Cervero, Mirko Himmel, Marcus Krüger, and Stefan Linder. Proteomic analysis of podosome fractions from macrophages reveals similarities to spreading initiation centres. *Eur J Cell Biol*, 91(11-12):908–922, 2012. doi: 10.1016/j.ejcb.2012.05.005. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2012.05.005>. 4.2.2, 5.3, 5.4
- [23] Pasquale Cervero, Linda Panzer, and Stefan Linder. Podosome reformation in macrophages: assays and analysis. *Methods Mol Biol*, 1046:97–121, 2013. doi: 10.1007/978-1-62703-538-5_6. URL http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-538-5_6. 3.2.3, 3.5.3, 4, 4.1, 4.1, 4.2, 4.1.1, 5.1
- [24] Anne Chabadel, Inmaculada Bañon-Rodríguez, David Cluet, Brian B. Rudkin, Bernhard Wehrle-Haller, Elisabeth Genot, Pierre Jurdic, Ines M. Anton, and Frédéric Saltel. Cd44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. *Mol Biol Cell*, 18(12):4899–4910, Dec 2007. doi: 10.1091/mbc.E07-04-0378. URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07-04-0378>. 1.2, 1.4
- [25] F. Chang, D. Drubin, and P. Nurse. cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol*, 137(1):169–182, Apr 1997. 1.3.1
- [26] Ajay Chawla. Control of macrophage activation and function by ppars. *Circ Res*, 106(10):1559–1569, May 2010. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.216523. URL <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.216523>. 1.1
- [27] M. Chellaiah, N. Kizer, M. Silva, U. Alvarez, D. Kwiatkowski, and K. A. Hruska. Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *J Cell Biol*, 148(4):665–678, Feb 2000. 1.4
- [28] Meenakshi A. Chellaiah. Regulation of podosomes by integrin alphavbeta3 and rho gtpase-facilitated phosphoinositide signaling. *Eur J Cell Biol*, 85(3-4):311–317, Apr 2006. doi: 10.1016/j.ejcb.2006.01.008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.01.008>. 1.2
- [29] W. T. Chen. Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells. *J Exp Zool*, 251(2):167–185, Aug 1989. doi: 10.1002/jez.1402510206. URL <http://dx.doi.org/10.1002/jez.1402510206>. 5.3
- [30] W. T. Chen, J. M. Chen, S. J. Parsons, and J. T. Parsons. Local degradation of fibronectin at sites of expression of the transforming gene product pp60src. *Nature*, 316(6024):156–158, 1985. 5.3

-
- [31] Melissa A. Chesarone, Amy Grace DuPage, and Bruce L. Goode. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(1):62–74, Jan 2010. doi: 10.1038/nrm2816. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2816>. 1.3.1
- [32] Ekta Seth Chhabra and Henry N. Higgs. Inf2 is a wasp homology 2 motif-containing formin that severs actin filaments and accelerates both polymerization and depolymerization. *J Biol Chem*, 281(36):26754–26767, Sep 2006. doi: 10.1074/jbc.M604666200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M604666200>. 1.3.1
- [33] Kristopher Clark, Michiel Langeslag, Carl G. Figdor, and Frank N. van Leeuwen. Myosin ii and mechanotransduction: a balancing act. *Trends Cell Biol*, 17(4):178–186, Apr 2007. doi: 10.1016/j.tcb.2007.02.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2007.02.002>. 5.5
- [34] Olivier Collin, Philippe Tracqui, Angélique Stephanou, Yves Usson, Jocelyne Clément-Lacroix, and Emmanuelle Planus. Spatiotemporal dynamics of actin-rich adhesion microdomains: influence of substrate flexibility. *J Cell Sci*, 119(Pt 9):1914–1925, May 2006. doi: 10.1242/jcs.02838. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02838>. 1.2
- [35] Olivier Collin, Sungsoo Na, Farhan Chowdhury, Michael Hong, Myung Eun Shin, Fei Wang, and Ning Wang. Self-organized podosomes are dynamic mechanosensors. *Curr Biol*, 18(17):1288–1294, Sep 2008. doi: 10.1016/j.cub.2008.07.046. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2008.07.046>. 1.2, 1.4, 1.4.1, 5.2
- [36] Susan Cox, Edward Rosten, James Monypenny, Tijana Jovanovic-Talisman, Dylan T. Burnette, Jennifer Lippincott-Schwartz, Gareth E. Jones, and Rainer Heintzmann. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics. *Nat Methods*, 9(2):195–200, Feb 2012. doi: 10.1038/nmeth.1812. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1812>. 1.4, 5.3
- [37] A. Datta, Q. Shi, and D. E. Boettiger. Transformation of chicken embryo fibroblasts by v-src uncouples beta1 integrin-mediated outside-in but not inside-out signaling. *Mol Cell Biol*, 21(21):7295–7306, Nov 2001. doi: 10.1128/MCB.21.21.7295-7306.2001. URL <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.21.21.7295-7306.2001>. 1.2
- [38] Olivier Destaing, Frédéric Saltel, Jean-Christophe Géminard, Pierre Jurdic, and Frédéric Bard. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell*, 14(2):407–416, Feb 2003. doi: 10.1091/mbc.E02-07-0389. URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E02-07-0389>. 1.2, 1.4, 5.1, 5.2
- [39] Olivier Destaing, Marc R. Block, Emmanuelle Planus, and Corinne Albiges-Rizo. Invadosome regulation by adhesion signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 23(5):597–606, Oct 2011. doi: 10.1016/j.ceb.2011.04.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.002>. 1.2
- [40] C. G. dos Remedios, D. Chhabra, M. Kekic, I. V. Dedova, M. Tsubakihara, D. A. Berry, and N. J. Nosworthy. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, 83(2):

- 433–473, Apr 2003. doi: 10.1152/physrev.00026.2002. URL <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00026.2002>. 1.3
- [41] Athanassios Dovas and Dianne Cox. Signaling networks regulating leukocyte podosome dynamics and function. *Cell Signal*, 23(8):1225–1234, Aug 2011. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.02.004. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.02.004>. 1.2
- [42] Athanassios Dovas, Jean-Claude Gevrey, Alberto Grossi, Haein Park, Wassim Abou-Kheir, and Dianne Cox. Regulation of podosome dynamics by wasp phosphorylation: implication in matrix degradation and chemotaxis in macrophages. *J Cell Sci*, 122(Pt 21):3873–3882, Nov 2009. doi: 10.1242/jcs.051755. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.051755>. 1.2
- [43] Osigwe Esue, Elizabeth S. Harris, Henry N. Higgs, and Denis Wirtz. The filamentous actin cross-linking/bundling activity of mammalian formins. *J Mol Biol*, 384(2):324–334, Dec 2008. doi: 10.1016/j.jmb.2008.09.043. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.043>. 1.3.1
- [44] James G. Evans, Ivan Correia, Olga Krasavina, Nicki Watson, and Paul Matsudaira. Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J Cell Biol*, 161(4):697–705, May 2003. doi: 10.1083/jcb.200212037. URL <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200212037>. 1.2, 1.4.1, 5.1, 5.2, 5.2.1
- [45] Sharona Even-Ram, Andrew D. Doyle, Mary Anne Conti, Kazue Matsumoto, Robert S. Adelstein, and Kenneth M. Yamada. Myosin iia regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol*, 9(3):299–309, Mar 2007. doi: 10.1038/ncb1540. URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1540>. 1.4.1, 5.5
- [46] Jan Faix and Robert Grosse. Staying in shape with formins. *Dev Cell*, 10(6):693–706, Jun 2006. doi: 10.1016/j.devcel.2006.05.001. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2006.05.001>. 1.3.1
- [47] Maria Gardberg, Katja Kaipio, Laura Lehtinen, Piia Mikkonen, Vanina D. Heuser, Kati Talvinen, Kristiina Iljin, Caroline Kampf, Mathias Uhlen, Reidar Grénman, Mari Koivisto, and Olli Carpén. Fhod1, a formin upregulated in epithelial-mesenchymal transition, participates in cancer cell migration and invasion. *PLoS One*, 8(9):e74923, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0074923. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074923>. 5.6
- [48] Judith E. Gasteier, Ricardo Madrid, Ellen Krautkrämer, Sebastian Schröder, Walter Muranyi, Serge Benichou, and Oliver T. Fackler. Activation of the rac-binding partner fhod1 induces actin stress fibers via a rock-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 278(40):38902–38912, Oct 2003. doi: 10.1074/jbc.M306229200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M306229200>. 1.3.1, 1.3.2, 5.6
- [49] Judith E. Gasteier, Sebastian Schroeder, Walter Muranyi, Ricardo Madrid, Serge Benichou, and Oliver T. Fackler. Fhod1 coordinates actin filament and microtubule alignment to mediate cell elongation. *Exp Cell Res*, 306(1):192–202, May 2005. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.02.006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.02.006>. 2.6.2

- [50] Mario Gimona, Roberto Buccione, Sara A. Courtneidge, and Stefan Linder. Assembly and biological role of podosomes and invadopodia. *Curr Opin Cell Biol*, 20(2):235–241, Apr 2008. doi: 10.1016/j.ceb.2008.01.005. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.005>. 1.2
- [51] Bruce L. Goode and Michael J. Eck. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*, 76:593–627, 2007. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647>. 1.3.1, 5.6
- [52] Siamon Gordon and Philip R. Taylor. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5(12):953–964, Dec 2005. doi: 10.1038/nri1733. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nri1733>. 1.1
- [53] Christopher J. Gould, Sankar Maiti, Alphée Michelot, Brian R. Graziano, Laurent Blanchoin, and Bruce L. Goode. The formin dad domain plays dual roles in autoinhibition and actin nucleation. *Curr Biol*, 21(5):384–390, Mar 2011. doi: 10.1016/j.cub.2011.01.047. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.01.047>. 1.3.1
- [54] A. Hall. Rho gtpases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279(5350):509–514, Jan 1998. 1.3
- [55] Sebastian Hannemann, Ricardo Madrid, Jana Stastna, Thomas Kitzing, Judith Gasteier, André Schönichen, Jerome Bouchet, Alberto Jimenez, Matthias Geyer, Robert Grosse, Serge Benichou, and Oliver T. Fackler. The diaphanous-related formin fhod1 associates with rock1 and promotes src-dependent plasma membrane blebbing. *J Biol Chem*, 283(41):27891–27903, Oct 2008. doi: 10.1074/jbc.M801800200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M801800200>. 1.3.2, 5.5, 5.6
- [56] Elizabeth S. Harris and Henry N. Higgs. Biochemical analysis of mammalian formin effects on actin dynamics. *Methods Enzymol*, 406:190–214, 2006. doi: 10.1016/S0076-6879(06)06015-0. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)06015-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(06)06015-0). 1.3.1
- [57] Elizabeth S. Harris, Fang Li, and Henry N. Higgs. The mouse formin, frlalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J Biol Chem*, 279(19):20076–20087, May 2004. doi: 10.1074/jbc.M312718200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M312718200>. 1.3.1, 5.6
- [58] Elizabeth S. Harris, Timothy J. Gauvin, Ernest G. Heimsath, and Henry N. Higgs. Assembly of filopodia by the formin frl2 (fmnl3). *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67(12):755–772, Dec 2010. doi: 10.1002/cm.20485. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cm.20485>. 1.3.1
- [59] Andrew W. Holle and Adam J. Engler. More than a feeling: discovering, understanding, and influencing mechanosensing pathways. *Curr Opin Biotechnol*, 22(5):648–654, Oct 2011. doi: 10.1016/j.copbio.2011.04.007. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.007>. 1.2
- [60] Pirta Hotulainen and Pekka Lappalainen. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol*, 173(3):383–394, May 2006. doi: 10.1083/jcb.200511093. URL <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200511093>. 1.3.1, 5.6

-
- [61] C. Huang, Y. Ni, T. Wang, Y. Gao, C. C. Haudenschild, and X. Zhan. Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, 272(21):13911–13915, May 1997. 1.2
- [62] F. Huber, J. Schnauß, S. Rönicke, P. Rauch, K. Müller, C. Fütterer, and J. Käs. Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Adv Phys*, 62(1):1–112, Jan 2013. doi: 10.1080/00018732.2013.771509. URL <http://dx.doi.org/10.1080/00018732.2013.771509>. 1.3
- [63] H. Imamura, K. Tanaka, T. Hihara, M. Umikawa, T. Kamei, K. Takahashi, T. Sasaki, and Y. Takai. Bni1p and bnr1p: downstream targets of the rho family small g-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, 16(10):2745–2755, May 1997. doi: 10.1093/emboj/16.10.2745. URL <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.10.2745>. 1.3.1
- [64] T. Ishizaki, Y. Morishima, M. Okamoto, T. Furuyashiki, T. Kato, and S. Narumiya. Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the rho effector mdia1. *Nat Cell Biol*, 3(1):8–14, Jan 2001. doi: 10.1038/35050598. URL <http://dx.doi.org/10.1038/35050598>. 1.3.1
- [65] Thomas Iskratsch, Cheng-Han Yu, Anurag Mathur, Shuaimin Liu, Virginie Stévenin, Joseph Dwyer, James Hone, Elisabeth Ehler, and Michael Sheetz. Fhod1 is needed for directed forces and adhesion maturation during cell spreading and migration. *Dev Cell*, 27(5):545–559, Dec 2013. doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.003. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.003>. 1.3.2, 4.2.2, 4.3.1.3, 5.4, 5.5, 5.6
- [66] Charles A Janeway, Jr and Ruslan Medzhitov. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20:197–216, 2002. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>. 1.1
- [67] Irina Kaverina, Theresia E B. Stradal, and Mario Gimona. Podosome formation in cultured a7r5 vascular smooth muscle cells requires arp2/3-dependent de-novo actin polymerization at discrete microdomains. *J Cell Sci*, 116(Pt 24):4915–4924, Dec 2003. doi: 10.1242/jcs.00818. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00818>. 1.2, 1.4, 4.2, 5.1, 5.3
- [68] Chungo Kim, Feng Ye, and Mark H. Ginsberg. Regulation of integrin activation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27:321–345, 2011. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104104. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104104>. 1.2, 5.2
- [69] K. Kimura, M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. Regulation of myosin phosphatase by rho and rho-associated kinase (rho-kinase). *Science*, 273(5272):245–248, Jul 1996. 5.5
- [70] Sreenivas Koka, Cheryl L. Neudauer, Xiaodong Li, Robert E. Lewis, James B. McCarthy, and Jennifer J. Westendorf. The formin-homology-domain-containing protein fhod1 enhances cell migration. *J Cell Sci*, 116(Pt 9):1745–1755, May 2003. 4.2.2, 5.4, 5.6

-
- [71] Petra Kopp, Reiner Lammers, Martin Aepfelbacher, Günther Woehlke, Thomas Rudel, Nikolaus Machuy, Walter Steffen, and Stefan Linder. The kinesin kif1c and microtubule plus ends regulate podosome dynamics in macrophages. *Mol Biol Cell*, 17(6):2811–2823, Jun 2006. doi: 10.1091/mbc.E05-11-1010. URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E05-11-1010>. 1.2, 1.4.1, 5.1, 5.2, 5.2.1
- [72] David R. Kovar, Jeffrey R. Kuhn, Andrea L. Tichy, and Thomas D. Pollard. The fission yeast cytokinesis formin cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol*, 161(5):875–887, Jun 2003. doi: 10.1083/jcb.200211078. URL <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200211078>. 1.3.1, 5.5
- [73] David R. Kovar, Jian-Qiu Wu, and Thomas D. Pollard. Profilin-mediated competition between capping protein and formin cdc12p during cytokinesis in fission yeast. *Mol Biol Cell*, 16(5):2313–2324, May 2005. doi: 10.1091/mbc.E04-09-0781. URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E04-09-0781>. 1.3.1
- [74] David R. Kovar, Elizabeth S. Harris, Rachel Mahaffy, Henry N. Higgs, and Thomas D. Pollard. Control of the assembly of atp- and adp-actin by formins and profilin. *Cell*, 124(2):423–435, Jan 2006. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.038. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.038>. 5.6
- [75] Elisabeth C. Krainer, Jessica L. Ouder Kirk, Eric W. Miller, Matthew R. Miller, Akos T. Mersich, and Scott D. Blystone. The multiplicity of human formins: Expression patterns in cells and tissues. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 70(8):424–438, Aug 2013. doi: 10.1002/cm.21113. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cm.21113>. 1.3.2
- [76] Sonja Kühn and Matthias Geyer. Formins as effector proteins of rho gtpases. *Small GTPases*, 5:e29513, 2014. doi: 10.4161/sgtp.29513. URL <http://dx.doi.org/10.4161/sgtp.29513>. 1.3.1, 1.4, 1.5, 1.3.1, 1.6
- [77] Uwe Lammel, Meike Bechtold, Benjamin Risse, Dimitri Berh, Astrid Fleige, Ingrid Bunse, Xiaoyi Jiang, Christian Klämbt, and Sven Bogdan. The drosophila fhod1-like formin knittrig acts through rok to promote stress fiber formation and directed macrophage migration during the cellular immune response. *Development*, 141(6):1366–1380, Mar 2014. doi: 10.1242/dev.101352. URL <http://dx.doi.org/10.1242/dev.101352>. 5.5, 5.6
- [78] Benjamin Leader, Hyunjung Lim, Mary Jo Carabatsos, Anne Harrington, Jeffrey Ecsedy, David Pellman, Richard Maas, and Philip Leder. Formin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the meiotic spindle in mouse oocytes. *Nat Cell Biol*, 4(12):921–928, Dec 2002. doi: 10.1038/ncb880. URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb880>. 1.3.1
- [79] Fang Li and Henry N. Higgs. The mouse formin mdia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol*, 13(15):1335–1340, Aug 2003. 1.3.1, 5.6

-
- [80] Hongbin Li, Fengli Guo, Boris Rubinstein, and Rong Li. Actin-driven chromosomal motility leads to symmetry breaking in mammalian meiotic oocytes. *Nat Cell Biol*, 10(11):1301–1308, Nov 2008. doi: 10.1038/ncb1788. URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1788>. 1.3.1
- [81] S. Linder, D. Nelson, M. Weiss, and M. Aepfelbacher. Wiskott-aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17):9648–9653, Aug 1999. 1.2, 1.4
- [82] S. Linder, H. Higgs, K. Hüfner, K. Schwarz, U. Pannicke, and M. Aepfelbacher. The polarization defect of wiskott-aldrich syndrome macrophages is linked to dislocalization of the arp2/3 complex. *J Immunol*, 165(1):221–225, Jul 2000. 1.4, 4.2, 5.1, 5.3
- [83] S. Linder, K. Hüfner, U. Wintergerst, and M. Aepfelbacher. Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J Cell Sci*, 113 Pt 23:4165–4176, Dec 2000. 1.2, 4, 4.3.2.5
- [84] Stefan Linder. The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol*, 17(3):107–117, Mar 2007. doi: 10.1016/j.tcb.2007.01.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2007.01.002>. 1.2
- [85] Stefan Linder. Invadosomes at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 17):3009–3013, Sep 2009. doi: 10.1242/jcs.032631. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.032631>. 1.2
- [86] Stefan Linder and Martin Aepfelbacher. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol*, 13(7):376–385, Jul 2003. 1.2, 1.4, 5.1
- [87] Stefan Linder and Petra Kopp. Podosomes at a glance. *J Cell Sci*, 118(Pt 10):2079–2082, May 2005. doi: 10.1242/jcs.02390. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02390>. 1.4
- [88] Stefan Linder and Christiane Wiesner. Tools of the trade: podosomes as multipurpose organelles of monocytic cells. *Cell Mol Life Sci*, 72(1):121–135, Jan 2015. doi: 10.1007/s00018-014-1731-z. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-014-1731-z>. 1.1, 1.2, 1.4.1
- [89] Stefan Linder, Christiane Wiesner, and Mirko Himmel. Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27:185–211, 2011. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154216. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154216>. 1.2, 1.7, 1.4, 1.4.1, 1.8
- [90] C. M. Lo, H. B. Wang, M. Dembo, and Y. L. Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79(1):144–152, Jul 2000. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76279-5. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76279-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76279-5). 1.2
- [91] Chen Luxenburg, Dafna Geblinger, Eugenia Klein, Karen Anderson, Dorit Hanein, Benny Geiger, and Lia Addadi. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS One*, 2(1):e179, 2007. doi: 10.1371/journal.pone.0000179. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000179>. 1.4, 1.4, 5.1, 5.3

-
- [92] Chen Luxenburg, Sabina Winograd-Katz, Lia Addadi, and Benjamin Geiger. Involvement of actin polymerization in podosome dynamics. *J Cell Sci*, 125(Pt 7):1666–1672, Apr 2012. doi: 10.1242/jcs.075903. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.075903>. 1.4, 1.4
- [93] Gia Machaidze, Andrea Sokoll, Atsushi Shimada, Ariel Lustig, Antonina Mazur, Alfred Wittinghofer, Ueli Aebi, and Hans Georg Mannherz. Actin filament bundling and different nucleating effects of mouse diaphanous-related formin fh2 domains on actin/adf and actin/cofilin complexes. *J Mol Biol*, 403(4):529–545, Nov 2010. doi: 10.1016/j.jmb.2010.09.017. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.017>. 1.3.1
- [94] L. M. Machesky, S. J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove, and T. D. Pollard. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*, 127(1):107–115, Oct 1994. 1.3
- [95] L. M. Machesky, R. D. Mullins, H. N. Higgs, D. A. Kaiser, L. Blanchoin, R. C. May, M. E. Hall, and T. D. Pollard. Scar, a wasp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):3739–3744, Mar 1999. 1.3
- [96] Sankar Maiti, Alphee Michelot, Christopher Gould, Laurent Blanchoin, Olga Sokolova, and Bruce L. Goode. Structure and activity of full-length formin mdia1. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 69(6):393–405, Jun 2012. doi: 10.1002/cm.21033. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cm.21033>. 1.3.1
- [97] Alberto Mantovani, Silvano Sozzani, Massimo Locati, Paola Allavena, and Antonio Sica. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized m2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23(11):549–555, Nov 2002. 1.1
- [98] Fernando Oneissi Martinez, Antonio Sica, Alberto Mantovani, and Massimo Locati. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, 13:453–461, 2008. 1.1
- [99] Fumio Matsumura. Regulation of myosin ii during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol*, 15(7):371–377, Jul 2005. doi: 10.1016/j.tcb.2005.05.004. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2005.05.004>. 1.4.1, 4.3.2.7, 5.5
- [100] Tamás Matusek, Rita Gombos, Anita Szécsényi, Natalia Sánchez-Soriano, Agnes Czibula, Csilla Pataki, Anita Gedai, Andreas Prokop, István Raskó, and József Mihály. Formin proteins of the daam subfamily play a role during axon growth. *J Neurosci*, 28(49):13310–13319, Dec 2008. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2727-08.2008. URL <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2727-08.2008>. 1.3.1
- [101] R. Melki, S. Fievez, and M. F. Carlier. Continuous monitoring of pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. *Biochemistry*, 35(37):12038–12045, Sep 1996. doi: 10.1021/bi961325o. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi961325o>. 1.3

-
- [102] Akos T. Mersich, Matthew R. Miller, Halina Chkourko, and Scott D. Blystone. The formin frll (fnnl1) is an essential component of macrophage podosomes. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67(9):573–585, Sep 2010. doi: 10.1002/cm.20468. URL <http://dx.doi.org/10.1002/cm.20468>. 1.4, 4.2.2, 5.3, 5.6
- [103] M. Meselson and R. Yuan. Dna restriction enzyme from e. coli. *Nature*, 217(5134):1110–1114, Mar 1968. 2.8
- [104] Alphée Michelot, Christophe Guérin, Shanjin Huang, Mathieu Ingouff, Stéphane Richard, Natalia Rodiuc, Christopher J. Staiger, and Laurent Blanchoin. The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of arabidopsis formin1. *Plant Cell*, 17(8):2296–2313, Aug 2005. doi: 10.1105/tpc.105.030908. URL <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.030908>. 1.3.1
- [105] Violaine Moreau, Florence Tatin, Christine Varon, and Elisabeth Génot. Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by cdc42 and rhoa. *Mol Cell Biol*, 23(19):6809–6822, Oct 2003. 1.2
- [106] James B. Moseley and Bruce L. Goode. Differential activities and regulation of saccharomyces cerevisiae formin proteins bni1 and bnr1 by bud6. *J Biol Chem*, 280(30):28023–28033, Jul 2005. doi: 10.1074/jbc.M503094200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M503094200>. 1.3.1
- [107] R. D. Mullins, J. A. Heuser, and T. D. Pollard. 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, May 1998. 1.3
- [108] Danielle A. Murphy and Sara A. Courtneidge. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(7):413–426, Jul 2011. doi: 10.1038/nrm3141. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3141>. 1.4
- [109] G. C. Ochoa, V. I. Slepnev, L. Neff, N. Ringstad, K. Takei, L. Daniell, W. Kim, H. Cao, M. McNiven, R. Baron, and P. De Camilli. A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J Cell Biol*, 150(2):377–389, Jul 2000. 1.4
- [110] Takanori Otomo, Chinatsu Otomo, Diana R. Tomchick, Mischa Machius, and Michael K. Rosen. Structural basis of rho gtpase-mediated activation of the formin mdia1. *Mol Cell*, 18(3):273–281, Apr 2005. doi: 10.1016/j.molcel.2005.04.002. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2005.04.002>. 1.3.1
- [111] Takanori Otomo, Diana R. Tomchick, Chinatsu Otomo, Mischa Machius, and Michael K. Rosen. Crystal structure of the formin mdia1 in autoinhibited conformation. *PLoS One*, 5(9), 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0012896. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012896>. 1.3.1
- [112] D. Pantaloni, C. Le Clainche, and M. F. Carrier. Mechanism of actin-based motility. *Science*, 292(5521):1502–1506, May 2001. 1.3

-
- [113] Linda Panzer. Protein-protein-interaktionsstudien mit dem multidomaenenprotein p86dm. Diplomarbeit, 2009. 1.3
- [114] Stéphanie Pellegrin and Harry Mellor. The rho family gtpase rif induces filopodia through mdia2. *Curr Biol*, 15(2):129–133, Jan 2005. doi: 10.1016/j.cub.2005.01.011. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.011>. 1.3.1, 5.6
- [115] M. Pfaff and P. Jurdic. Podosomes in osteoclast-like cells: structural analysis and cooperative roles of paxillin, proline-rich tyrosine kinase 2 (pyk2) and integrin alphavbeta3. *J Cell Sci*, 114(Pt 15): 2775–2786, Aug 2001. 1.4
- [116] Sybille Pfender, Vitaliy Kuznetsov, Sandra Pleiser, Eugen Kerkhoff, and Melina Schuh. Spire-type actin nucleators cooperate with formin-2 to drive asymmetric oocyte division. *Curr Biol*, 21(11): 955–960, Jun 2011. doi: 10.1016/j.cub.2011.04.029. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.029>. 1.3.1
- [117] T. D. Pollard. Rate constants for the reactions of atp- and adp-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2):2747–2754, Dec 1986. 1.3
- [118] T. D. Pollard, I. Goldberg, and W. H. Schwarz. Nucleotide exchange, structure, and mechanical properties of filaments assembled from atp-actin and adp-actin. *J Biol Chem*, 267(28):20339–20345, Oct 1992. 1.3
- [119] T. D. Pollard, L. Blanchoin, and R. D. Mullins. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29:545–576, 2000. doi: 10.1146/annurev.biophys.29.1.545. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.545>. 1.3
- [120] Thomas D. Pollard. Regulation of actin filament assembly by arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36:451–477, 2007. doi: 10.1146/annurev.biophys.35.040405.101936. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biophys.35.040405.101936>. 1.3
- [121] Amsha Proag, Anaïs Bouissou, Thomas Mangeat, Raphaël Voituriez, Patrick Delobelle, Christophe Thibault, Christophe Vieu, Isabelle Maridonneau-Parini, and Renaud Poincloux. Working together: spatial synchrony in the force and actin dynamics of podosome first neighbors. *ACS Nano*, 9(4): 3800–3813, Apr 2015. doi: 10.1021/nn506745r. URL <http://dx.doi.org/10.1021/nn506745r>. 5.5
- [122] David Pruyne, Marie Evangelista, Changsong Yang, Erfei Bi, Sally Zigmond, Anthony Bretscher, and Charles Boone. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*, 297(5581):612–615, Jul 2002. doi: 10.1126/science.1072309. URL <http://dx.doi.org/10.1126/science.1072309>. 1.3, 1.3.1
- [123] Margot E. Quinlan, John E. Heuser, Eugen Kerkhoff, and R Dyche Mullins. Drosophila spire is an actin nucleation factor. *Nature*, 433(7024):382–388, Jan 2005. doi: 10.1038/nature03241. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature03241>. 1.3

- [124] Manuela Quintavalle, Leonardo Elia, Gianluigi Condorelli, and Sara A. Courtneidge. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J Cell Biol*, 189(1): 13–22, Apr 2010. doi: 10.1083/jcb.200912096. URL <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200912096>. 1.4
- [125] Julia Riedl, Alvaro H. Crevenna, Kai Kessenbrock, Jerry Haochen Yu, Dorothee Neukirchen, Michal Bista, Frank Bradke, Dieter Jenne, Tad A. Holak, Zena Werb, Michael Sixt, and Roland Wedlich-Soldner. Lifeact: a versatile marker to visualize f-actin. *Nat Methods*, 5(7):605–607, Jul 2008. doi: 10.1038/nmeth.1220. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1220>. 2.6.2
- [126] Syed A. Rizvi, Erin M. Neidt, Jiayue Cui, Zach Feiger, Colleen T. Skau, Margaret L. Gardel, Sergey A. Kozmin, and David R. Kovar. Identification and characterization of a small molecule inhibitor of formin-mediated actin assembly. *Chem Biol*, 16(11):1158–1168, Nov 2009. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.10.006. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.10.006>. 4.2.1
- [127] R. Rose, M. Weyand, M. Lammers, T. Ishizaki, M. R. Ahmadian, and A. Wittinghofer. Structural and mechanistic insights into the interaction between rho and mammalian dia. *Nature*, 435(7041): 513–518, May 2005. doi: 10.1038/nature03604. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nature03604>. 1.3.1
- [128] Siham Sabri, Adlen Foudi, Siham Boukour, Brigitte Franc, Sabine Charrier, Martine Jandrot-Perrus, Richard W. Farndale, Abdelali Jalil, Mike P. Blundell, Elisabeth M. Cramer, Fawzia Louache, Najet Debili, Adrian J. Thrasher, and William Vainchenker. Deficiency in the wiskott-aldrich protein induces premature proplatelet formation and platelet production in the bone marrow compartment. *Blood*, 108(1):134–140, Jul 2006. doi: 10.1182/blood-2005-03-1219. URL <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2005-03-1219>. 1.2
- [129] Isabelle Sagot, Avital A. Rodal, James Moseley, Bruce L. Goode, and David Pellman. An actin nucleation mechanism mediated by bni1 and profilin. *Nat Cell Biol*, 4(8):626–631, Aug 2002. doi: 10.1038/ncb834. URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb834>. 1.3, 1.3.1
- [130] T. Sakai, R. Jove, R. Fässler, and D. F. Mosher. Role of the cytoplasmic tyrosines of beta 1a integrins in transformation by v-src. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7):3808–3813, Mar 2001. doi: 10.1073/pnas.240456398. URL <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.240456398>. 1.2
- [131] Frédéric Saltel, Olivier Destaing, Frédéric Bard, Diane Eichert, and Pierre Jurdic. Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell*, 15(12):5231–5241, Dec 2004. doi: 10.1091/mbc.E04-06-0522. URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E04-06-0522>. 1.1
- [132] Corina Sarmiento, Weigang Wang, Athanassios Dovas, Hideki Yamaguchi, Mazen Sidani, Mirvat El-Sibai, Vera Desmarais, Holly A. Holman, Susan Kitchen, Jonathan M. Backer, Art Alberts, and John Condeelis. Wasp family members and formin proteins coordinate regulation of cell protrusions in carcinoma cells. *J Cell Biol*, 180(6):1245–1260, Mar 2008. doi: 10.1083/jcb.200708123. URL <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200708123>. 1.3.1

- [133] Akira Sato, Deepak K. Khadka, Wei Liu, Ritu Bharti, Loren W. Runnels, Igor B. Dawid, and Raymond Habas. Profilin is an effector for daam1 in non-canonical wnt signaling and is required for vertebrate gastrulation. *Development*, 133(21):4219–4231, Nov 2006. doi: 10.1242/dev.02590. URL <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02590>. 1.3.1, 5.6
- [134] S. Satoh and T. Tominaga. mdia-interacting protein acts downstream of rho-mdia and modifies src activation and stress fiber formation. *J Biol Chem*, 276(42):39290–39294, Oct 2001. doi: 10.1074/jbc.M107026200. URL <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M107026200>. 1.3.1
- [135] Hannah Schachtner, Simon D J. Calaminus, Amy Sinclair, James Monypenny, Michael P. Blundell, Catherine Leon, Tessa L. Holyoake, Adrian J. Thrasher, Alison M. Michie, Milica Vukovic, Christian Gachet, Gareth E. Jones, Steven G. Thomas, Steve P. Watson, and Laura M. Machesky. Megakaryocytes assemble podosomes that degrade matrix and protrude through basement membrane. *Blood*, 121(13):2542–2552, Mar 2013. doi: 10.1182/blood-2012-07-443457. URL <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-07-443457>. 1.2
- [136] Antje Schirenbeck, Till Bretschneider, Rajesh Arasada, Michael Schleicher, and Jan Faix. The diaphanous-related formin dda2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol*, 7(6):619–625, Jun 2005. doi: 10.1038/ncb1266. URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1266>. 1.3.1
- [137] André Schönichen and Matthias Geyer. Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. *Biochim Biophys Acta*, 1803(2):152–163, Feb 2010. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.014. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.014>. 1.3.1, 1.3.1, 1.6
- [138] André Schönichen, Hans Georg Mannherz, Elmar Behrmann, Antonina J. Mazur, Sonja Kühn, Unai Silván, Cora-Ann Schoenenberger, Oliver T. Fackler, Stefan Raunser, Leif Dehmelt, and Matthias Geyer. Fhod1 is a combined actin filament capping and bundling factor that selectively associates with actin arcs and stress fibers. *J Cell Sci*, 126(Pt 8):1891–1901, Apr 2013. doi: 10.1242/jcs.126706. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.126706>. 1.3.2, 4.2.2, 5.4, 5.5
- [139] Melina Schuh. An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nat Cell Biol*, 13(12):1431–1436, Dec 2011. doi: 10.1038/ncb2353. URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2353>. 1.3.1
- [140] Antje Schulte, Bettina Stolp, André Schönichen, Olena Pylypenko, Alexey Rak, Oliver T. Fackler, and Matthias Geyer. The human formin fhod1 contains a bipartite structure of fh3 and gtpase-binding domains required for activation. *Structure*, 16(9):1313–1323, Sep 2008. doi: 10.1016/j.str.2008.06.008. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2008.06.008>. 5.6
- [141] Nina Schulze, Melanie Graessl, Alexandra Blancke Soares, Matthias Geyer, Leif Dehmelt, and Perihan Nalbant. Fhod1 regulates stress fiber organization by controlling the dynamics of transverse arcs and dorsal fibers. *J Cell Sci*, 127(Pt 7):1379–1393, Apr 2014. doi: 10.1242/jcs.134627. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.134627>. 1.3.2, 4.3.1.3, 5.5, 5.6

- [142] Bonnie J. Scott, Erin M. Neidt, and David R. Kovar. The functionally distinct fission yeast formins have specific actin-assembly properties. *Mol Biol Cell*, 22(20):3826–3839, Oct 2011. doi: 10.1091/mbc.E11-06-0492. URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0492>. 1.3.1
- [143] D. Sept and J. A. McCammon. Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys J*, 81(2):667–674, Aug 2001. doi: 10.1016/S0006-3495(01)75731-1. URL [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75731-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75731-1). 1.3
- [144] Aaron F. Severson, David L. Baillie, and Bruce Bowerman. A formin homology protein and a profilin are required for cytokinesis and arp2/3-independent assembly of cortical microfilaments in *c. elegans*. *Curr Biol*, 12(24):2066–2075, Dec 2002. 1.3.1
- [145] Soon-Tuck Sit and Ed Manser. Rho gtpases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 124(Pt 5):679–683, Mar 2011. doi: 10.1242/jcs.064964. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.064964>. 1.2
- [146] Kristen M. Skillman, Wassim Daher, Christopher I. Ma, Dominique Soldati-Favre, and L David Sibley. *Toxoplasma gondii* profilin acts primarily to sequester g-actin while formins efficiently nucleate actin filament formation in vitro. *Biochemistry*, 51(12):2486–2495, Mar 2012. doi: 10.1021/bi201704y. URL <http://dx.doi.org/10.1021/bi201704y>. 1.3.1
- [147] Dean P. Staus, Joan M. Taylor, and Christopher P. Mack. Enhancement of mdia2 activity by rho-kinase-dependent phosphorylation of the diaphanous autoregulatory domain. *Biochem J*, 439(1):57–65, Oct 2011. doi: 10.1042/BJ20101700. URL <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20101700>. 5.6
- [148] Lynda M. Stuart and R Alan Ezekowitz. Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. *Nat Rev Immunol*, 8(2):131–141, Feb 2008. doi: 10.1038/nri2240. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nri2240>. 1.1
- [149] H. Q. Sun, M. Yamamoto, M. Mejillano, and H. L. Yin. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem*, 274(47):33179–33182, Nov 1999. 1.4
- [150] Ryu Takeya and Hideki Sumimoto. Fhos, a mammalian formin, directly binds to f-actin via a region n-terminal to the fh1 domain and forms a homotypic complex via the fh2 domain to promote actin fiber formation. *J Cell Sci*, 116(Pt 22):4567–4575, Nov 2003. doi: 10.1242/jcs.00769. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00769>. 1.3.1, 1.3.2
- [151] Ryu Takeya, Kenichiro Taniguchi, Shuh Narumiya, and Hideki Sumimoto. The mammalian formin fhod1 is activated through phosphorylation by rock and mediates thrombin-induced stress fibre formation in endothelial cells. *EMBO J*, 27(4):618–628, Feb 2008. doi: 10.1038/emboj.2008.7. URL <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2008.7>. 1.3.2, 5.5, 5.6
- [152] G. Tarone, D. Cirillo, F. G. Giancotti, P. M. Comoglio, and P. C. Marchisio. Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res*, 159(1):141–157, Jul 1985. 1.2, 5.2, 5.3

- [153] A. Teti, M. Grano, A. Carano, S. Colucci, and A. Zambonin Zallone. Immunolocalization of beta 3 subunit of integrins in osteoclast membrane. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 65(11):1031–1037, Nov 1989. 1.4
- [154] G. Totsukawa, Y. Yamakita, S. Yamashiro, D. J. Hartshorne, Y. Sasaki, and F. Matsumura. Distinct roles of rock (rho-kinase) and mlck in spatial regulation of mlc phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3t3 fibroblasts. *J Cell Biol*, 150(4):797–806, Aug 2000. 1.4.1
- [155] David M. Underhill and Helen S. Goodridge. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol*, 12(7):492–502, Jul 2012. doi: 10.1038/nri3244. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nri3244>. 1.1
- [156] Takehito Uruno, Peijun Zhang, Jiali Liu, Jian-Jiang Hao, and Xi Zhan. Haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (hs1) promotes actin-related protein (arp) 2/3 complex-mediated actin polymerization. *Biochem J*, 371(Pt 2):485–493, Apr 2003. doi: 10.1042/BJ20021791. URL <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20021791>. 1.4
- [157] K. van den Dries, S. L. Schwartz, J. Byars, M B M. Meddens, M. Bolomini-Vittori, D. S. Lidke, C. G. Figdor, K. A. Lidke, and A. Cambi. Dual-color superresolution microscopy reveals nanoscale organization of mechanosensory podosomes. *Mol Biol Cell*, 24(13):2112–2123, Jul 2013. doi: 10.1091/mbc.E12-12-0856. URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0856>. 1.4, 5.3
- [158] Koen van den Dries, Suzanne F G. van Helden, Joost te Riet, Ruth Diez-Ahedo, Carlo Manzo, Machteld M. Oud, Frank N. van Leeuwen, Roland Brock, Maria F. Garcia-Parajo, Alessandra Cambi, and Carl G. Figdor. Geometry sensing by dendritic cells dictates spatial organization and pge(2)-induced dissolution of podosomes. *Cell Mol Life Sci*, 69(11):1889–1901, Jun 2012. doi: 10.1007/s00018-011-0908-y. URL <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-011-0908-y>. 1.2
- [159] Suzanne F G. van Helden, Machteld M. Oud, Ben Joosten, Niels Peterse, Carl G. Figdor, and Frank N. van Leeuwen. 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, Apr 2008. doi: 10.1242/jcs.020289. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.020289>. 1.4.1
- [160] A. B. Verkhovsky and G. G. Borisy. Non-sarcomeric mode of myosin ii organization in the fibroblast lamellum. *J Cell Biol*, 123(3):637–652, Nov 1993. 5.5
- [161] Miguel Vicente-Manzanares, Xuefei Ma, Robert S. Adelstein, and Alan Rick Horwitz. Non-muscle myosin ii takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(11):778–790, Nov 2009. doi: 10.1038/nrm2786. URL <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2786>. 1.4.1, 4.3.2.7, 5.5
- [162] Marie Walde, James Monypenny, Rainer Heintzmann, Gareth E. Jones, and Susan Cox. Vinculin binding angle in podosomes revealed by high resolution microscopy. *PLoS One*, 9(2):e88251, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0088251. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088251>. 1.4, 5.3

- [163] N. Watanabe, T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki, and S. Narumiya. Cooperation between mdia1 and rock in rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, 1(3):136–143, Jul 1999. doi: 10.1038/11056. URL <http://dx.doi.org/10.1038/11056>. 5.6
- [164] Sadanori Watanabe, Yoshikazu Ando, Shingo Yasuda, Hiroshi Hosoya, Naoki Watanabe, Toshimasa Ishizaki, and Shuh Narumiya. mdia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in nih 3t3 cells. *Mol Biol Cell*, 19(5):2328–2338, May 2008. doi: 10.1091/mbc.E07-10-1086. URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07-10-1086>. 1.3.1, 5.6
- [165] Sadanori Watanabe, Katsuya Okawa, Takashi Miki, Satoko Sakamoto, Tomoko Morinaga, Kohei Segawa, Takatoshi Arakawa, Makoto Kinoshita, Toshimasa Ishizaki, and Shuh Narumiya. Rho and anillin-dependent control of mdia2 localization and function in cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 21(18):3193–3204, Sep 2010. doi: 10.1091/mbc.E10-04-0324. URL <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E10-04-0324>. 5.6
- [166] Sadanori Watanabe, Tihana De Zan, Toshimasa Ishizaki, Shingo Yasuda, Hiroshi Kamijo, Daisuke Yamada, Tomohiro Aoki, Hiroshi Kiyonari, Hiroshi Kaneko, Ritsuko Shimizu, Masayuki Yamamoto, Gohta Goshima, and Shuh Narumiya. Loss of a rho-regulated actin nucleator, mdia2, impairs cytokinesis during mouse fetal erythropoiesis. *Cell Rep*, 5(4):926–932, Nov 2013. doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.021. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.021>. 5.6
- [167] Donna J. Webb, Karen Donais, Leanna A. Whitmore, Sheila M. Thomas, Christopher E. Turner, J Thomas Parsons, and Alan F. Horwitz. Fak-src signalling through paxillin, erk and mlck regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol*, 6(2):154–161, Feb 2004. doi: 10.1038/ncb1094. URL <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1094>. 1.2
- [168] A. Wegner. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, 108(1):139–150, Nov 1976. 1.3
- [169] Louise Weston, Amanda S. Coutts, and Nicholas B. La Thangue. Actin nucleators in the nucleus: an emerging theme. *J Cell Sci*, 125(Pt 15):3519–3527, Aug 2012. doi: 10.1242/jcs.099523. URL <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.099523>. 1.3
- [170] Yingwu Xu, James B. Moseley, Isabelle Sagot, Florence Poy, David Pellman, Bruce L. Goode, and Michael J. Eck. Crystal structures of a formin homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell*, 116(5):711–723, Mar 2004. 1.3.1
- [171] Hideki Yamaguchi, Fiona Pixley, and John Condeelis. Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol*, 85(3-4):213–218, Apr 2006. doi: 10.1016/j.ejcb.2005.10.004. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.10.004>. 1.2
- [172] Changsong Yang, Lubov Czech, Silke Gerboth, Shin-ichiro Kojima, Giorgio Scita, and Tatyana Svitkina. Novel roles of formin mdia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *PLoS Biol*, 5(11):e317, Nov 2007. doi: 10.1371/journal.pbio.0050317. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0050317>. 1.3.1, 5.6

- [173] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, and J. Messing. Improved m13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the m13mp18 and puc19 vectors. *Gene*, 33(1):103–119, 1985. 2.6.1
- [174] A. Zamboni-Zallone, A. Teti, M. Grano, A. Rubinacci, M. Abbadini, M. Gaboli, and P. C. Marchisio. Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a beta 3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp Cell Res*, 182(2):645–652, Jun 1989. 1.2, 1.4, 5.3
- [175] D. Zhang, N. Udagawa, I. Nakamura, H. Murakami, S. Saito, K. Yamasaki, Y. Shibasaki, N. Morii, S. Narumiya, and N. Takahashi. The small gtp-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J Cell Sci*, 108 (Pt 6):2285–2292, Jun 1995. 5.2
- [176] Sally H. Zigmond. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*, 16(1):99–105, Feb 2004. doi: 10.1016/j.ceb.2003.10.019. URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.019>. 1.3.1

A. Anhang

A.1. Publikationen

Podosome reformation in macrophages: assays and analysis.

Cervero P, Panzer L, Linder S.

Methods Mol Biol. 2013;1046:97-121. doi: 10.1007/978-1-62703-538-5_6

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

Panzer L, Trübe L, Joosten B, Slotman J, Cambi A, Linder S.

Journal of Cell Science; in Revision

A.2. Posterpräsentationen auf Konferenzen

Linda Panzer, Mirko Himmel, Stefan Linder; „**FMNL1 and FHOD1 formins regulate podosome-connecting actin fibers in primary human macrophages**“

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

Linda Panzer, Mirko Himmel, Stefan Linder; „**FMNL1 and FHOD1 formins regulate podosome-connecting actin fibers in primary human macrophages**“

1st UKE Microscopy Symposium, Hamburg 2013

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

5th Invadosome Meeting („Cell Migration and Invasion in Physiology and Pathology“), Nijmegen 2013

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

ASCB Annual Meeting, New Orleans 2013

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

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

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

2nd UKE Microscopy Symposium, Hamburg 2014

Linda Panzer, Leona Trübe, Ben Josten, Alessandra Cambi, Stefan Linder; „**The formins FHOD1 and INF2 regulate inter- and intrastructural contractility at macrophage podosomes**“

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

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf verschiedenste Art und Weise bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle ist hier Herr Prof. Dr. Stefan Linder zu nennen, der es mir durch die Aufnahme in seine traumhafte Arbeitsgruppe ermöglicht hat, an diesem, wenn auch nicht immer leicht händelbaren, doch sehr interessanten Projekt zu arbeiten. In diesem Zuge durfte ich außerdem an zahlreichen motivierenden Veranstaltungen des „DFG Priority Programme SPP 1464: Principles and evolution of actin nucleator complexes“ in toller Atmosphäre teilnehmen. – Ein besonderer Dank zwischendurch gilt der gesamten nationalen und internationalen Regensburg-„community“; übrigens waren es exakt 7 Ausflüge in diese Stadt! „Wo fährst du hin, Linda?“ „Na, nach Regensburg natürlich!“ – Zurück zu Herrn Prof. Dr. Stefan Linder, dem ich ebenfalls seine permanent engagierte Betreuung und Unterstützung bei bester Laune und mit viel Humor während der gesamten Zeit dieser Arbeit sehr hoch anrechne. Seinen „Herein-Schrei“ werde ich definitiv vermissen!

Herrn PD Dr. Andreas Pommerening-Röser danke ich für die freundliche Übernahme der Mitbetreuung sowie des Zweitgutachtens und seinem Interesse an dem Gelingen dieser Arbeit. Außerdem freue ich mich, dass Herr PD Dr. Andreas Pommerening-Röser zusammen mit Frau Prof. Dr. Julia Kehr und Herrn Prof. Dr. Stefan Linder meine Prüfungskommission bilden.

Ein weiterer Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter(inne)n des Instituts für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, der gesamten 2. Etage und der UMIF nicht zu vergessen für die einmalige Arbeitsatmosphäre, der ständigen Hilfsbereitschaft und vielen tollen Mittags- und Kaffeepausen sowie Abend- oder Wochenendgestaltungen. Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Kolleg(inn)en der Arbeitsgruppe Linder bedanken. Kerstin Rehm, nun fehlen mir zum ersten Mal die Worte, danke ich für die ambitionierte Rekrutierung in die AG Linder, wobei ich sie anschließend nicht nur als die beste Kollegin

und „Zusammenarbeiterin“, die ich mir gerade vorstellen kann, sondern auch als unvergesslich tolle Freundin kennenlernen durfte. Ihr gebührt wirklich sehr sehr viel Dank auf jeglichen Ebenen.

„Mutti“ Andrea Mordhorst sei für ihre herzliche Art und unzählbar viele Makrophagen-Isolierungen gedankt.

Ridhirama Bhuwania, mich typisch mit ihrem fröhlichen „Linda, Linda, Linda...“ begrüßend, und meine „Traum-Nachwuchswissenschaftlerin“ Xenia Naj entlockten mir durch ihre sonnigen Gemüter sogar in ihren äußerst amüsanten „Fight-Situationen“ mit Leichtigkeit nahezu täglich ein beglücktes Grinsen bis herzhaftes Lachen. Danke dafür!

„Formin Girl Nr.1 oder 2“, wir haben uns da nie geeinigt, oder?, doch warum auch..., Leona Trübe danke ich für lustiges Regensburg-entdecken mit best-musikalischer „Detour“, farblich perfekter „Figure“-Gestaltung und für die Bedienung des zweiten Ruders im gemeinsamen Boot.

„Frau Wiesner“ Chrissy danke ich für „Alle meine („Aggro“-) Entchen“-Ohrwürmer, akribische Protokolle, tolle Abbildungen und beste Filmbearbeitung.

Den angenehm entspannten „Jungs“ Pasquale Cervero, für beste und schnell erfolgreiche PP2-Zusammenarbeit, und Karim el Azzouzi mit seiner bemerkenswert hoch ausgeprägten Freundlichkeit sei ebenfalls gedankt.

Sehr große Unterstützung haben weiterhin Stefan Veltel, Kerstin Rehm und Karin Schneider im zum Teil mehrmaligen Korrekturlesen geleistet. Mann, Mann, Mann! Mir so angenehme Floskeln wie „So und so, ist die eine Sache, doch...“ sind somit (leider) nur noch hier vertreten. Karin muss ich dabei zudem den Orden in „Blitzgeschwindigkeit inklusive Postweg“ für die Leistung der Diskussions-Bearbeitung in weniger als einem Tag verleihen. Vielleicht sollte die Deutsche Post dabei jedoch auch nicht vergessen werden. Stefan sei ebenfalls besonders für seine unglaubliche Geduld in den Versuchen mir Dinge begreiflich zu machen, die ich nicht wirklich verstehen wollte, gedankt.

Für den stark benötigten Ausgleich neben der Arbeit, sei es beim Klettern, sonstigem Sport, Konzerten, anderen Unternehmungen, Ausflügen, Urlauben, Telefonaten oder nem Kaffee möchte ich mich so zahlreich bei tollen Menschen bedanken, dass ich locker eine weitere Seite füllen könnte. Um es kurz zu machen, fühlt sich bitte, bitte jeder angesprochen, der in die oben genannten Kategorien o.ä. fällt. Dafür ein dickes DANKE!

Ein weiterer Dank gebührt meiner Familie, auf deren individuell spezielle Unterstützung ich mich immer verlassen kann.

Nicht zu vergessen sind meine langjährigen super Freundinnen, Kathi, Karin, Elisabeth und Kati, die einfach immer zur Stelle sind, wenn man sie braucht.

Abschließend möchte ich den wahrscheinlich emotionalsten Dank „boyfriend“ Stefan aussprechen. Einen besseren Begleiter durch so manche „Abgründe“ der Dr. Arbeitszeit und darüber hinaus gibt es denke ich nicht. Sehr vielen Dank für dich!

Eidesstattliche Erklärung

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

Ich erkläre des Weiteren, dass ich einen Flüchtigkeitsfehler in Abb. 4.20 C verbessert habe.

In der zuvor eingereichten Version dieser Arbeit sind die Datenreihen „Neubildung“ und „Abspaltung“ aus Versehen vertauscht worden.

Hamburg, den

(Linda Panzer)