

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. P. C. Weber

# **Regulation podosomaler Adhäsionen in Makrophagen durch Cofilin-regulatorische Signalwege**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Daniel Walz

aus  
Pforzheim

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Stefan Linder

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. U. Welsch  
Prof. Dr. M. Schleicher

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2005

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

01.06.2005

Daniel Walz

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 2001 bis Mai 2005 am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von PD Dr. Stefan Linder erstellt.

Die Arbeit wurde teilweise im Rahmen des Graduiertenkollegs 438 "Vaskuläre Biologie" und des Sonderforschungsbereiches 413 "Dynamik und Regulation zytoskelettabhängiger Bewegungsvorgänge" durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Tagungsbeiträge mit gedruckten *abstracts*:

**Walz, D.**, Hüfner, K., Aepfelbacher, M., Goyal, P., Linder, S.  
"Podosome regulation through cofilin-regulatory pathways"  
*Adhesion meeting 2005, Munich, April 28 - 30, Germany*

Gringel, S., **Walz, D.**, Kutsche, K., Rosenberger, G., Minden, A., Kopp, P., Linder, S.  
"PAK4 and PIX regulate podosome size and number in macrophages"  
*Adhesion meeting 2005, Munich, April 28 - 30, Germany*

Artikel:

Gringel, S., **Walz, D.**, Kopp, P., Minden, A., Kutsche, K., Rosenberger, G. Linder, S. (2005)  
"A PAK4/PIX complex regulates podosomes size and number in macrophages"  
*in preparation*

Original-Abbildung in:

Linder, S., Aepfelbacher, M. (2003) "Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells."  
*Trends. Cell Biol.* **13**, 376-385

The great tragedy of Science - the slaying of a beautiful hypothesis by an ugly fact.

T.H. Huxley

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	V
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Makrophagen .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Aktin-Zytoskelett .....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Dynamik .....	2
1.2.2 Regulation durch RhoGTPasen .....	4
<b>1.3 Podosomen .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 ADF/Cofilin.....</b>	<b>8</b>
1.4.1 Vorkommen.....	8
1.4.2 Funktion.....	9
1.4.3 Regulation .....	10
1.4.3.1 pH .....	10
1.4.3.2 Phosphoinositole.....	11
1.4.3.3 Phosphorylierung.....	11
1.4.3.3.1 LIM-Kinasen.....	12
1.4.3.3.2 Phosphatasen.....	13
1.4.3.4 Interaktionspartner.....	13
1.4.3.4.1 Tropomyosin .....	14
1.4.3.4.2 Aip1.....	14
1.4.3.4.3 CAP.....	14
1.4.3.4.4 14-3-3-Proteine .....	15
1.4.4 Beteiligung bei Krankheiten.....	15
<b>1.5 Fragestellung .....</b>	<b>17</b>
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Geräte und technische Hilfsmittel .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Sonstige Materialien .....</b>	<b>20</b>
<b>2.3 Chemikalien .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Kit-Systeme.....</b>	<b>21</b>
<b>2.5 Bakterienstamm .....</b>	<b>21</b>
<b>2.6 Zelllinien .....</b>	<b>21</b>
<b>2.7 Enzyme.....</b>	<b>21</b>
<b>2.8 Transfektionsreagenzien .....</b>	<b>21</b>
<b>2.9 Antikörper .....</b>	<b>22</b>
2.9.1 Primäre Antikörper.....	22
2.9.2 Sekundäre Antikörper.....	22
<b>2.10 Stimulatoren und Inhibitoren.....</b>	<b>23</b>

---

<b>2.11</b>	<b>Peptide</b> .....	<b>23</b>
<b>2.12</b>	<b>Plasmide</b> .....	<b>23</b>
2.12.1	Kommerziell erworbene Plasmide .....	23
2.12.2	Konstrukte von Kooperationspartnern .....	24
<b>2.13</b>	<b>Primer</b> .....	<b>25</b>
<b>2.14</b>	<b>Oligonukleotide</b> .....	<b>25</b>
<b>2.15</b>	<b>siRNA</b> .....	<b>25</b>
<b>2.16</b>	<b>Medien und Pufferlösungen</b> .....	<b>25</b>
2.16.1	Zellkulturmedien .....	25
2.16.2	Puffer für Zelllysate.....	26
2.16.3	Puffer für Zellfixierung .....	26
2.16.4	Puffer für Mikroinjektion .....	26
2.16.5	Puffer für DNA-Gelelektrophorese .....	26
2.16.6	Puffer für <i>Western Blot</i> .....	27
2.16.7	Puffer für Expression von GST-Fusionsproteinen .....	27
2.16.8	Puffer für Expression von MBP-Fusionsproteinen .....	28
2.16.9	Puffer für Tris-Tricin-Gel 15% .....	28
2.16.10	Bakterien-Medium.....	28
<b>2.17</b>	<b>Gele</b> .....	<b>29</b>
2.17.1	SDS-Polyacrylamid-Gele .....	29
2.17.2	Tris-Tricin-Gel 15% .....	29
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolierung primärer humaner Makrophagen aus menschlichem Blut</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3</b>	<b>Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung</b> .....	<b>31</b>
3.3.1	<i>Antikörper-Labeling</i> .....	32
<b>3.4</b>	<b>Fluoreszenz- und Konfokal-Mikroskopie</b> .....	<b>33</b>
<b>3.5</b>	<b>Live-cell Imaging</b> .....	<b>33</b>
<b>3.6</b>	<b>Zellstimulation und -polarisation</b> .....	<b>33</b>
<b>3.7</b>	<b>Transfektion von Zellen</b> .....	<b>33</b>
3.7.1	Lipofektion von Zelllinien.....	33
3.7.2	Transfektion primärer humaner Makrophagen mittels <i>Nucleofection</i> <sup>TM</sup> .....	34
<b>3.8</b>	<b>Mikroinjektion</b> .....	<b>34</b>
<b>3.9</b>	<b>DNA-Techniken</b> .....	<b>35</b>
3.9.1	<i>Annealing</i> von Oligonukleotiden.....	35
3.9.2	Phosphorylierung.....	35
3.9.3	DNA-Fällung.....	36
3.9.4	Ligation .....	36
3.9.5	Restriktionsenzym-Verdau .....	37
3.9.6	PCR .....	37

3.9.7	DNA-Gelelektrophorese.....	38
3.9.8	Gelelution .....	38
3.9.9	Plasmid-Isolierung.....	39
3.9.10	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ und BL21 .....	39
3.9.11	Transformation mittels Elektroporation .....	39
3.9.12	Bakterien-PCR.....	39
3.9.13	RNA <i>interference</i> .....	40
3.9.14	DNA-Arrays .....	40
<b>3.10</b>	<b>Zellysate .....</b>	<b>40</b>
<b>3.11</b>	<b>Western Blot .....</b>	<b>41</b>
3.11.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	41
3.11.2	Blotting .....	41
3.11.3	Färbung.....	41
<b>3.12</b>	<b>Proteinexpression und Affinitätschromatographie.....</b>	<b>42</b>
3.12.1	GST-Fusionsproteine.....	42
3.12.1.1	Expression .....	42
3.12.1.2	Bindung .....	42
3.12.1.3	Elution .....	42
3.12.1.4	Spaltung und Isolierung.....	42
3.12.2	Antikörper-Herstellung .....	43
3.12.2.1	Umklonierung.....	43
3.12.2.2	Expression und Bindung.....	43
3.12.2.3	Spaltung und Isolierung.....	43
3.12.3	Protein-Mengenbestimmung .....	43
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Vorbemerkung .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3</b>	<b>Physiologische Relevanz von Podosomen .....</b>	<b>44</b>
<b>4.4</b>	<b>Rolle von Cofilin bei der Podosomen-Regulation .....</b>	<b>46</b>
4.4.1	Lokalisation von Cofilin und Phospho-Cofilin in Podosomen .....	46
4.4.2	Phosphorylierung von Cofilin .....	48
4.4.3	Mikroinjektion eines Cofilin-Peptids .....	48
<b>4.5</b>	<b>Bedeutung von LIM-Kinasen für die Podosomen-Regulation.....</b>	<b>50</b>
4.5.1	Nachweis von LIMK1-mRNA in Monozyten.....	50
4.5.2	Herstellung eines LIMK1-spezifischen Antikörpers.....	50
4.5.3	Mikroinjektion von LIMK1-PK .....	52
4.5.4	Überexpression von LIMK1 und LIMK2 .....	55
<b>4.6</b>	<b>Kein Einfluss der Phosphatasen PP1/PP2A auf Podosomen .....</b>	<b>57</b>
<b>4.7</b>	<b>Beteiligung von Rho-GTPase-Effektoren an der Podosomen-Regulation.....</b>	<b>59</b>
4.7.1	Einfluss von ROCK auf Podosomen .....	59
4.7.2	Einfluss von PAK1 und PAK4 auf Podosomen .....	59

<b>4.8</b>	<b>Rolle von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat und Phospholipase C<math>\beta</math> in der Podosomen-Regulation .....</b>	<b>64</b>
4.8.1	Lokalisation von PIP <sub>2</sub> .....	64
4.8.2	Effekte von PIP <sub>2</sub> -bindenden Konstrukten .....	66
4.8.3	Lokalisation von zellulärer PLC $\beta$ 1/ $\beta$ 2/ $\beta$ 3 .....	68
4.8.4	Überexpression von PLC $\beta$ 2 und PLC $\beta$ 2-Iso1 .....	68
4.8.5	Effekt einer PLC-Inhibition.....	70
<b>4.9</b>	<b>Effekt von Cofilin-RNAi .....</b>	<b>73</b>
<b>4.10</b>	<b>Cofilin-Dynamik im Live Cell Imaging.....</b>	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>77</b>
<b>5.1</b>	<b>Physiologische Relevanz von Podosomen .....</b>	<b>77</b>
<b>5.2</b>	<b>Lokalisation und Funktion von Cofilin bei der Podosomen-Regulation .....</b>	<b>78</b>
<b>5.3</b>	<b>Einfluss der LIM-Kinasen auf die Podosomen-Regulation.....</b>	<b>79</b>
<b>5.4</b>	<b>Einfluss von Protein-Phosphatasen auf die Podosomen-Regulation.....</b>	<b>81</b>
<b>5.5</b>	<b>Einfluss der RhoGTPase-Effektoren ROCK und PAK auf die Podosomen-Regulation .....</b>	<b>82</b>
<b>5.6</b>	<b>Einfluss von PIP<sub>2</sub> und PLC<math>\beta</math> auf die Podosomen-Regulation.....</b>	<b>83</b>
<b>5.7</b>	<b>Modell der Podosomen-Regulation .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>111</b>
<b>9.1</b>	<b>Vektoren.....</b>	<b>111</b>
<b>9.2</b>	<b>Primer-Sequenzen.....</b>	<b>111</b>
<b>9.3</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>112</b>
<b>9.4</b>	<b>DNS-Array Daten.....</b>	<b>112</b>
<b>9.5</b>	<b>Inhalt der Video-CD .....</b>	<b>113</b>
<b>10</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>115</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>116</b>

## Abkürzungen

$\Omega$	Ohm
°C	Grad Celsius
abs.	absolut
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
Brij 58	Polyoxyethylen 20 Cethylen
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EGTA	<i>ethylene-glycol-bis[<math>\beta</math>-aminoethyl ether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
F	Farad
FA	Formaldehyd
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
g	Erdbeschleunigung (9,81m/sec)
GST	Gluatathion-S-Transferase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	doppelt destilliertes Wasser
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid
Hexylenglykol	2-Methyl-2,4-pentandiol
HRP	<i>horseraddish peroxidase</i>
I.E.	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mA	Milliampère
MBP	<i>maltose-binding protein</i>
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mM	millimolar
NGS	<i>normal goat serum</i>
NHS	<i>normal human serum</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

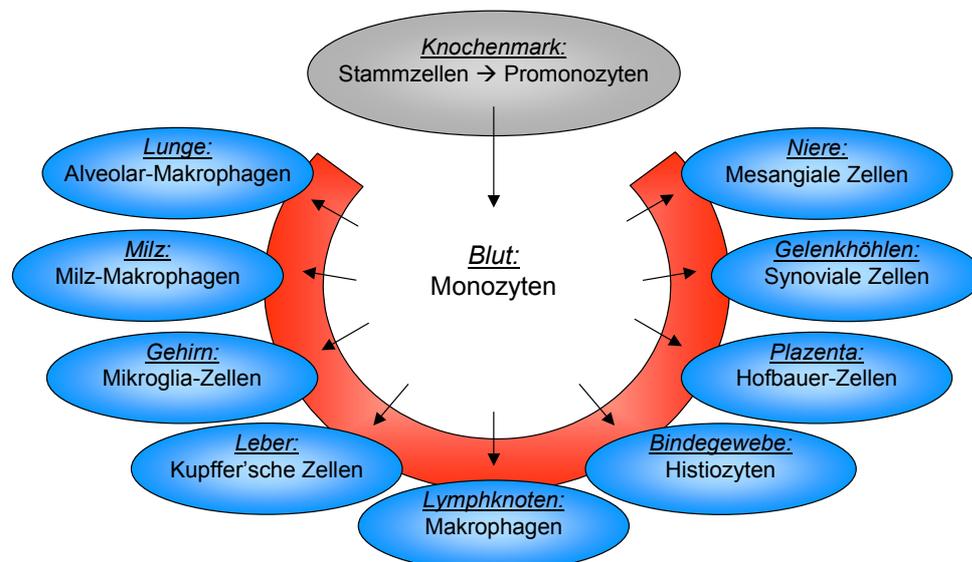
PBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline,</i> Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PBS/BSA	PBS + 0,5% BSA
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PHEM	Akronym für <u>P</u> ipes, <u>H</u> epes, <u>E</u> GT <u>A</u> und <u>M</u> gCl <sub>2</sub>
PIPES	Piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid]
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> , RPMI 1640 ist Standard-Zellkulturmedium
RPMI*	RPMI-Medium mit 100µg/ml Penicillin/Streptavidin
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS + Tween <sup>®</sup> 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-[Tris(Hydroxymethyl)Methyl]Glycin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
V	Volt
W	Watt
µl	Mikroliter

# 1 Einleitung

## 1.1 Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des Immunsystems, denen sowohl bei der spezifischen als auch der unspezifischen Immunantwort eine Schlüsselrolle zukommt. Darüber hinaus haben sie entscheidende Funktionen bei Entzündungsprozessen und Tumorbekämpfung. Sie entwickeln sich aus Monozyten, die im Knochenmark aus Blutstammzellen gebildet werden, für kurze Zeit im Blut zirkulieren und dann in verschiedene Gewebe einwandern. Dort findet die endgültige Differenzierung zu Makrophagen statt, die je nach Gewebe unterschiedlich bezeichnet werden (Abb. 1.1), in ihrer Funktion aber gleichartig sind und als sogenanntes mononukleäres Phagozytensystem zusammengefasst werden.

Monozyten können an aktivierte Endothelzellen adhären und in engem Kontakt zu diesen durch die Interzellularspalten die Gefäßwand verlassen (Johnson-Leger et al., 2000; Muller, 2003). Im Gewebe wandern sie aktiv auf einen Entzündungsherd zu, was durch körpereigene Zytokine oder bakterielle Substanzen wie LPS oder fMLP vermittelt wird (Raetz, 1993; Jones, 2000). Sie können Mikroorganismen sowie geschädigte körpereigene Zellen erkennen und phagozytieren. Darüber hinaus sind sie als antigen-präsentierende Zellen in der Lage, fremdes Material zu prozessieren und Peptidfragmente an den MHC-II-Rezeptor zu binden und auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Auch alte, apoptotische und entartete Zellen werden von ihnen erkannt und ohne Entzündungsreaktion beseitigt, womit sie zur Gewebemöostase beitragen (Platt et al., 1998; Killion et al., 1998).



**Abb. 1.1:** Differenzierung von Monozyten zu Gewebemakrophagen

Genetische Defekte können eine Störung der Monozyten-Funktion bewirken, was sowohl zu schweren Immundefekten als auch zu inadäquaten oder überschießenden Immunantworten führen kann (Fischer, 2001). In der Folge kann es zu Krankheiten wie Asthma, Psoriasis, Arthritis und Multiple Sklerose kommen (Rollins, 1996). Auch bei der Atherosklerose spielen Makrophagen in allen Stadien eine wichtige Rolle (Gerrity, 1981). So kommen sie bereits in atherosklerotischen Frühläsionen in Form von Schaumzellen in der Intima vor, und die von Makrophagen produzierten Matrix-Metalloproteasen scheinen bei der Plaqueruptur eine wichtige Rolle zu spielen (Aqel et al., 1984; Fabunmi et al., 1998; Hegyi et al., 2001).

All die genannten Funktionen - Adhäsion, Migration und Phagozytose - beruhen auf vielgestaltigen Veränderungen der Zellform, welche durch permanenten und genau kontrollierten Umbau des Zytoskelettes vermittelt werden.

## 1.2 Aktin-Zytoskelett

Das Zytoskelett setzt sich aus drei Arten von Fasern zusammen, Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Aktinfilamente. All diese Strukturen sind hochdynamisch und unterliegen einem permanenten, streng regulierten Auf- und Abbau (Worthylake et al., 2001a).

In eukaryotischen Zellen ist Aktin das am häufigsten vorkommende Protein mit einem Anteil von durchschnittlich 5% am Gesamtprotein (Kabsch et al., 1992). Der Großteil der Aktin-Moleküle liegt als Monomer (globulär = G-Aktin) vor, nur ein geringerer Teil ist zu Filamenten und Filament-Netzwerken (F-Aktin) polymerisiert. Das Gleichgewicht zwischen beiden Formen wird durch eine Vielzahl regulatorischer Moleküle sichergestellt (Ayscough, 1998; Dos Remedios et al., 2003).

Aktinfilamente bestehen aus zwei Strängen von Aktin-Polymeren, die gegeneinander verdreht sind (Hanson et al., 1963). Benachbarte Aktin-Moleküle sind dabei um 167° gegeneinander verdreht (Holmes et al., 1990; Abb. 1.5a). Wachsende Aktinfilamente können vermutlich eine Kraft auf die Plasmamembran ausüben und damit eine Ausstülpung bewirken, was zur Ausbildung von Zellfortsätzen oder Zellmigration führt (Tilney et al., 1981; Pollard et al., 2003).

### 1.2.1 Dynamik

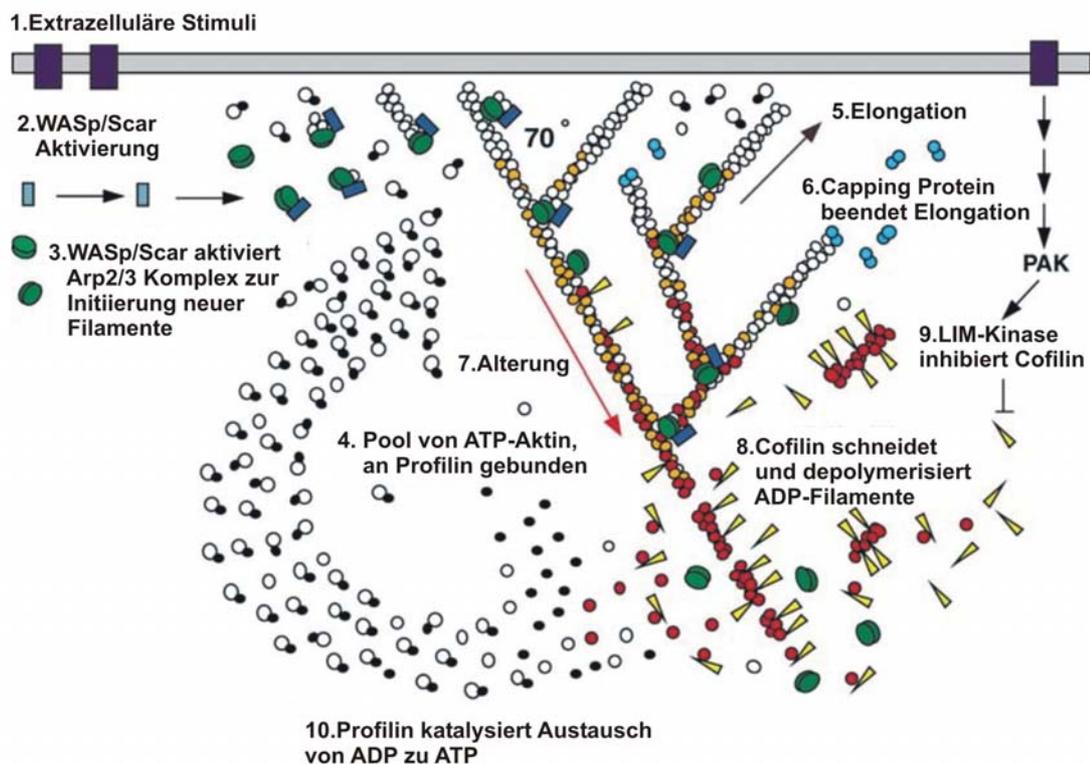
Aufgrund ihrer Struktur weisen Aktinfilamente eine Polarität auf, d.h. sie besitzen ein "spitzes" (*pointed end*) und ein "stumpfes" Ende (*barbed end*). Prinzipiell ist eine Verlängerung der Filamente an beiden Enden möglich, das Wachstum am *barbed end* erfolgt jedoch ca. 10fach schneller als am *pointed end* (Lorenz et al., 2004).

Die spontane Nukleation, also Neubildung von Aktinfilamenten aus Monomeren ist energetisch ungünstig (Pollard et al., 1984) im Vergleich zum Wachstum vorhandener Filamente. Daher werden *in vivo* drei Mechanismen für das Wachstum von Aktinfilamenten in der Zelle als wesentlich erachtet (Higgs et al., 1999b):

1. Das sogenannte *uncapping*: Das Wachstum von Filamenten kann durch Bindung von sogenannten *capping*-Proteinen wie CapZ (Caldwell et al., 1989; Yamashita et al., 2003), Gelsolin (Harris et al., 1984) oder Aip1 (Rodal et al.,

1999; Ono et al., 2004) an die *barbed ends* blockiert werden. Ihre Entfernung ermöglicht neues Filamentwachstum.

2. Die Zerlegung bestehender Filamente in Teilfragmente, das sogenannte *severing*, durch Proteine wie Cofilin (Ichetovkin et al., 2002; Ono, 2003), Severin (Andre et al., 1988), Villin (Glenney, Jr. et al., 1981; Arpin et al., 1988), Actophorin (Maciver et al., 1991), Scinderin (Trifaro et al., 2000) oder auch Gelsolin (Harris et al., 1984; McLaughlin et al., 1993; Burtnick et al., 1997; Kinoshian et al., 1998) generiert neue Filamentenden, an denen weiteres Wachstum erfolgen kann (McGrath et al., 2000).
3. Der vermutlich wichtigste Mechanismus ist die Neubildung aus Aktin-Monomeren mit Hilfe eines molekularen Stimulators, der die energetisch ungünstige Dimer- bzw. Trimerbildung erleichtert und dadurch die Polymerisation auslöst. Der bisher am besten erforschte und effektivste Stimulator, das die Aktin-Nukleation katalysiert, ist der sog. Arp2/3-Komplex. Er besteht aus sieben Untereinheiten, von denen die beiden namensgebenden *actin related proteins* (Arps) Aktin-Monomeren ähneln (Machesky et al., 1994; Machesky et al., 1998). Normalerweise sind diese beiden Proteine nicht in Kontakt. Als Folge einer Aktivierung kann es jedoch zu einer Konformationsänderung des Komplexes kommen, wodurch Arp2 und Arp3 in direkte räumliche Nähe gebracht werden (Rodal et al., 2004). Strukturell sind sie dann einem Aktin-Dimer ähnlich und können nach Bindung an ein Aktin-Monomer als Filament-Keim („Nukleus“) dienen (Mullins et al., 1999; Robinson et al., 2001). Als



**Abb. 1.2:** Modell der dendritischen Aktin-Nukleation und Regulation

(nach Pollard, Blanchoin und Mullins, 2001)

erster derartiger Aktivator von Arp2/3-Komplex wurde das Protein ActA aus *Listeria monocytogenes* identifiziert (Welch et al., 1997). Inzwischen wurden auch etliche eukaryotische Proteine gefunden, die diese Konformationsänderung auslösen können, darunter insbesondere die Proteine der WASp-Familie (Machesky et al., 1998; Millard et al., 2001; Zalevsky et al., 2001; Miki et al., 2003), Cortactin (Urano et al., 2001) und Abp1p (Goode et al., 2001).

Der Arp2/3-Komplex beschleunigt aber nicht nur das Wachstum von Aktinfilamenten am *barbed end*, sondern kann auch an die Seite bereits vorhandener Filamente binden und dort die Aussprossung neuer Filamente initiieren (Mullins et al., 1998b; Carlsson et al., 2004). Dies führt zu einer charakteristischen, Y-förmigen Verzweigung der Filamente im Winkel von 70° und zur Ausbildung von größeren Aktin-Netzwerken (Mullins et al., 1998a). Die Bindung an Aktinfilamente steigert dabei zusätzlich die Aktivität des Arp2/3-Komplexes (Higgs et al., 1999a). Zusammengenommen führten diese Erkenntnisse zum Modell der dendritischen Aktin-Nukleation (Abb. 1.2).

Außer dem Arp2/3-Komplex wurden noch weitere derartiger Stimulatoren der Aktin-Nukleation gefunden, darunter das bereits erwähnte ActA selbst und auch unabhängig von Arp2/3-Komplex (Fradelizi et al., 2001), die Formine (Sagot et al., 2002; Pring et al., 2003) und Zyxin (Fradelizi et al., 2001). Dabei zeigen diese Nukleatoren jeweils verschiedene Mechanismen der Aktin-Polymerisierung: Während Arp2/3-Komplex zur Bildung der beschriebenen verzweigten Aktin-Filamenten führt, beschleunigen die Formine das Wachstum unverzweigter Filamente, die durch Tropomyosin stabilisiert werden (Evangelista et al., 2003). Erst kürzlich wurde mit Spire ein weiterer, bisher unbekannter Aktin-Nukleator beschrieben, der einen völlig neuen Mechanismus der Aktin-Nukleation aufweist (Quinlan et al., 2005).

All diese Mechanismen spielen vermutlich *in vivo* eine Rolle, der katalysierten Nukleation scheint jedoch eine besondere Bedeutung zuzukommen, vor allem bei der hochdynamischen Formänderung wandernder Zellen (Higgs et al., 2001).

## 1.2.2 Regulation durch RhoGTPasen

Zentrale Schaltstellen der Aktin-Regulation sind die sogenannten Rho-GTPasen (Hall, 1998; Etienne-Manneville et al., 2002), die zur Ras-Superfamilie der GTPasen zählen. Sie können zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen, und inaktiven, GDP-gebundenen Zustand hin- und herwechseln und werden deshalb auch als "molekulare Schalter" bezeichnet. Neben der Aktinregulation sind sie an vielen weiteren Signaltransduktionskaskaden beteiligt, die unter anderem auch Transkription, Zellzyklus und *membrane traffic* kontrollieren (Ridley, 2001).

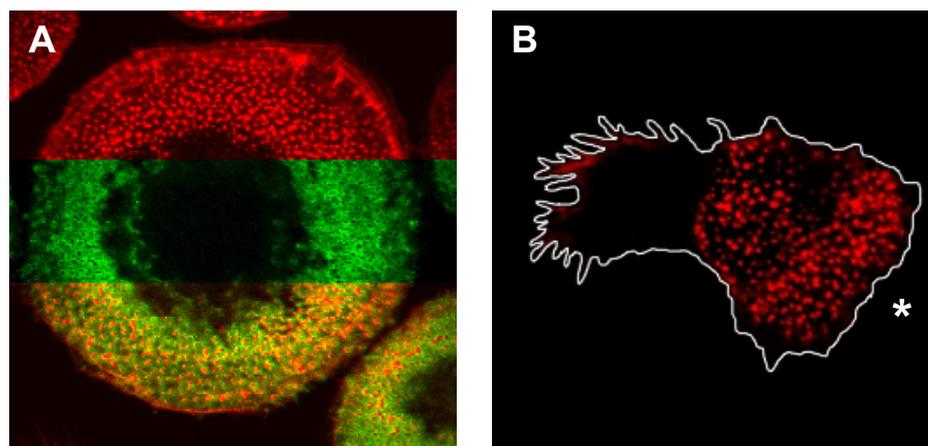
Die am besten charakterisierten Rho-GTPasen sind Rho, Rac und Cdc42 (Bishop et al., 2000). Jede dieser GTPasen besitzt meist mehrere Isoformen, die am besten untersucht sind RhoA/B, Rac1 und Cdc42. Die unterschiedlichen Effekte dieser drei Rho-GTPasen auf das Aktin-Zytoskelett wurden detailliert untersucht (Aspenstrom, 1999). Dabei wurden z.B. Mutanten verwendet, die entweder durch Inaktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität konstitutiv aktiv oder durch reduzierte Affinität zu GTP konstitutiv inaktiv sind (Feig, 1999). Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz von bakteriellen Toxinen, die entweder eine

Stimulation oder eine Inhibition von Mitgliedern der Rho-GTPase-Familie bewirken können (Aktories, 1997; Lerm et al., 2000; Boquet et al., 2003).

So konnte gezeigt werden, dass Aktivierung von RhoA zur Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionen führt (Ridley et al., 1992a), Rac1 die Entstehung von *membrane ruffles* induziert (Ridley et al., 1992b) und Cdc42 Filopodien reguliert (Kozma et al., 1995). Darüber hinaus gibt es aber zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Rho-GTPasen, z.B. kann die Aktivierung von Cdc42 wiederum zur folgenden Aktivierung von sowohl Rho als auch Rac führen. Für die Kontrolle des Zytoskelettes und die Regulation verschiedener Zellprozesse wie Adhäsion und Migration ist also sowohl das Gleichgewicht zwischen den einzelnen Rho-GTPasen als auch die zeitliche Abfolge ihrer Aktivierung entscheidend (Nobes et al., 1995). Verantwortlich für die Beteiligung der Rho-GTPasen an so verschiedenen Prozessen ist ihre Fähigkeit, mit einer Vielzahl von Proteinen Wechselwirkungen einzugehen. Dazu zählen zum einen Proteine, welche die Aktivität der GTPasen selbst regulieren (Kjoller et al., 1999), als auch Effektoren, die durch GTPasen reguliert werden (Bishop et al., 2000), wie z.B. ROCK und PAK.

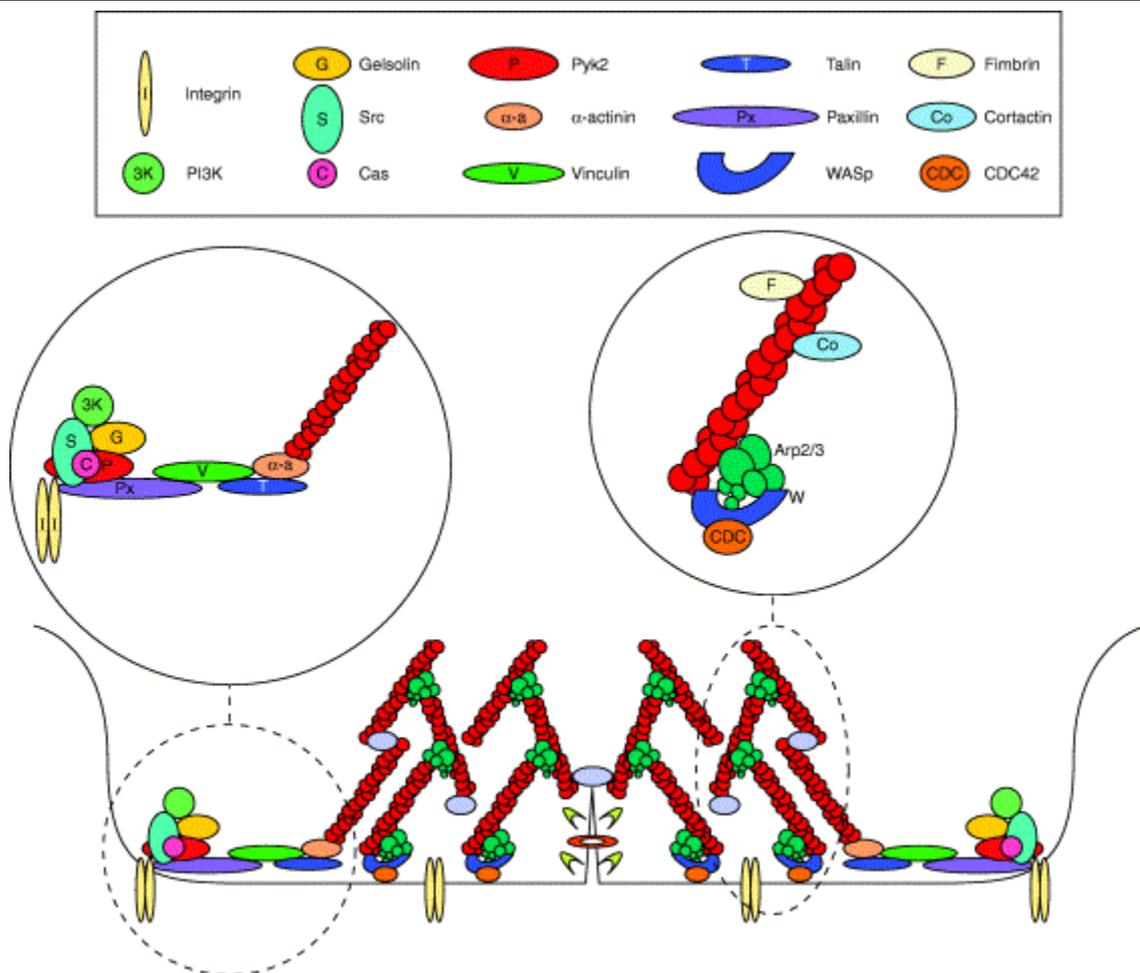
### 1.3 Podosomen

Wie oben beschrieben, unterliegt das Zytoskelett permanenten Veränderungen und Umbauten, wobei es zur Ausbildung charakteristischer Strukturen kommen kann. So zeigen frisch isolierte Blutmonozyten noch eine gleichmäßige, diffuse Verteilung von Aktin und assoziierten Proteinen (Lehto et al., 1982), kurz nach Kontakt mit einer Oberfläche bilden sich jedoch an der Ventralseite der Zelle punktförmige, Aktin-reiche Adhäsionsstrukturen aus, die sogenannten Podosomen (Lehto et al., 1982; Amato et al., 1983). In ruhenden, ausgebreiteten Monozyten lokalisieren diese hauptsächlich in den flachen Randbereichen der Zelle, während der kuppelförmige



**Abb. 1.3:** Konfokale Aufnahmen von primären humanen Makrophagen.

- (A) nicht-stimulierter Makrophage, Bild zusammengesetzt aus zwei Aufnahmen einer doppelgefärbten Zelle: Aktin (oben), Talin (Mitte) und *Overlay* beider Färbungen (unten) (Linder und Aepfelbacher, 2003)
- (B) stimulierter und polarisierter Makrophage, *leading edge* durch \* markiert, f-Aktinfärbung



**Abb. 1.4: Podosomen-Modell**

*Unten*, Übersicht: Podosomen stellen Plasmaausstülpungen dar, an denen Adhäsion und Matrixdegradation stattfindet.

*Links oben*, Detail der Podosomen-Ringstruktur: Die Bindung an die extrazelluläre Matrix wird über Integrine vermittelt, die über Paxillin an einen intrazellulären Proteinkomplex gebunden sind. Dieser Komplex ist über Vinculin, Talin und  $\alpha$ -Actinin mit dem Aktingerüst des Podosomenkerns verknüpft.

*Rechts oben*, Detail des Podosomen-Kerns: Aktinfilamente werden mit Hilfe von Arp2/3 und WASP an der Membran gebildet und durch Cortactin und Fimbrin miteinander verknüpft.

(nach Linder und Aepfelbacher, 2003)

mittlere Bereich den Kern enthält und Podosomen-frei ist. In migrierenden Zellen kommt es zu einer Polarisation der Zellen, wobei sich die Podosomen am vorderen Ende (*leading edge*) der Zellen konzentrieren (Abb. 1.3B).

Podosomen stellen Ausstülpungen der Plasmamembran dar, die einem Durchmesser von ca. 400 nm haben und über Integrine Kontakt zur extrazellulären Matrix oder anderen Zellen aufnehmen (Marchisio et al., 1988a; Gaidano et al., 1990; Muto et al., 1997). Sie bestehen aus einem Kern, der hauptsächlich filamentöses Aktin und assoziierte Proteine enthält, und einem ringförmigen Randbereich, der typische

adhäsionsvermittelnde Proteine wie Vinculin, Talin und Paxillin enthält (Gavazzi et al., 1989; Zambonin-Zallone et al., 1989).

Die Halbwertszeit einzelner Podosomen beträgt 2-12 Minuten, in dieser Zeit findet zudem eine kontinuierliche Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation statt (Destaing et al., 2003). Podosomen sind meist in Gruppen angeordnet, wobei die einzelnen Podosomen nur eine geringe Motilität besitzen. Die Podosomen-Gruppen im ganzen weisen allerdings eine hohe Dynamik auf, welche durch Abbau von Podosomen am rückwärtigen und Neuformation am vorderen Ende entsteht (Destaing et al., 2003).

Podosomen sind typisch für monozytäre Zellen und wurden in Monozyten (Marchisio et al., 1987), Makrophagen (Linder et al., 1999), Osteoklasten (Marchisio et al., 1984) und dendritischen Zellen (Burns et al., 2001) beschrieben. Sie wurden aber auch in Krebszellen (Schuuring et al., 1993), transformierten Fibroblasten (Tarone et al., 1985; Nakamura et al., 1993), Chondrozyten (Nitsch et al., 1989) und erst kürzlich in glatten Muskelzellen (Gimona et al., 2003) und aortalen Endothelzellen (Moreau et al., 2003) gefunden. Durch Verschmelzung einzelner Podosomen können rosettenartige Strukturen entstehen, die ebenfalls in verschiedenen Zellarten gefunden wurden (Vaananen et al., 1995).

Etlche Befunde deuten auf eine entscheidende Bedeutung von Podosomen für die Zell-Adhäsion hin: Sie werden an der Ventral-Seite von Zellen gebildet, sie enthalten verschiedene Integrine und sie bilden engen Kontakt zum Substrat (Linder et al., 2003a). Die Umverteilung von Podosomen zur *leading edge* migrierender Zellen spricht auch für ihre Bedeutung bei Migrationsprozesse, ebenso wie ihr hoher Gehalt an  $\beta$ 2-Integrinen. Darüber hinaus sind Podosomen aber auch Orte lokaler Degradation der extrazellulären Matrix (Chen et al., 1984; Burgstaller et al., 2005; Osiak et al., 2005). In Osteoklasten bildet sich aus Podosomen die sogenannte *sealing zone*, wo die Resorption von Knochensubstanz in den Howshipschen Lakunen stattfindet. Podosomen enthalten Matrix-Metalloproteasen (Blavier et al., 1995; Sato et al., 1997) und werden daher auch mit den invasiven Fähigkeiten monozytärer Zellen und einiger Karzinomzellen in Verbindung gebracht (Worthylake et al., 2001a). Podosomen-defiziente Zellen zeigen dementsprechend eine Störung der Adhäsion, Migration und des Matrix-Verdaus.

Der F-Aktin-reiche Kern scheint essentieller Bestandteil von Podosomen zu sein, denn die Verhinderung der Aktin-Polymerisierung z.B. durch Cytochalasin führt zu einem kompletten Verschwinden der Podosomen (Linder et al., 2000a; Destaing et al., 2003). Der gleiche Effekt lässt sich durch die Blockierung von Tyrosin-Kinasen durch den Src-Kinase-Inhibitor PP2 erreichen (Linder et al., 2000a). Im Gegenzug lässt sich durch die Transformation von Tyrosin-Kinasen (Tarone et al., 1985; Marchisio et al., 1987) oder durch die Blockierung von Tyrosin-Phosphatasen durch Vanadat (Marchisio et al., 1988b; Cory et al., 2002) die Bildung von Podosomen induzieren.

Einer der am besten untersuchten Mechanismen der F-Aktin-Bildung in Podosomen ist die CDC42-vermittelte Aktivierung des Arp2/3-Komplexes mittels WASp/N-WASP (Linder et al., 2000b), alle drei Proteine wurden auch im Podosomen-Kern nachgewiesen (Linder et al., 1999). Die fehlende WASp-abhängige Rekrutierung des Arp2/3-Komplexes zum Ort der Podosomen-Entstehung dürfte auch eine molekulare Grundlage der Immundefizienz beim Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) sein.

Makrophagen von WAS-Patienten haben keine Podosomen und zeigen damit einhergehend eine verminderte Polarisations- und Migrationsfähigkeit (Linder et al., 2000b). Eine Störung der zellulären Funktion bei WAS-Patienten wurde auch für dendritische Zellen (de Noronha et al., 2005), B-Zellen (Westerberg et al., 2005) und Osteoklasten (Calle et al., 2004) gezeigt. Aber auch dendritische Zellen von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) zeigen eine Reduktion oder völliges Fehlen von Podosomen und damit einhergehend eine verminderte Migrationsfähigkeit (Dong et al., 2003).

## 1.4 ADF/Cofilin

Für die hohe Dynamik des Zytoskelett-Umbaus bei den verschiedenen Zellprozessen ist es notwendig, einen schnellen Umsatz an F-Aktin zu gewährleisten, d.h. einen raschen Abbau und Neubildung von Filamenten. Wie oben bereits beschrieben, existieren für die Filamentbildung und -elongation mehrere mögliche Mechanismen, die jeweils durch verschiedene Proteine reguliert werden.

Aktin kann nur in „aktiviertem“, d.h. ATP-gebundenem Zustand, polymerisieren. Das ATP wird dabei über ein divalentes Ion ( $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ ) gebunden, wobei  $\text{Mg}^{2+}$  wohl das physiologisch relevante Ion ist (Valentin-Ranc et al., 1991). Aktinfilamente „altern“, indem ATP zu ADP-P<sub>i</sub> hydrolysiert wird und P<sub>i</sub> dann mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Minuten ( $0,5\text{min}^{-1}$ ) dissoziiert (Pollard, 1986). Dadurch wird die Aktin-Aktin-Bindung destabilisiert und es kommt zur Ablösung von Aktin-Monomeren am *pointed end*.

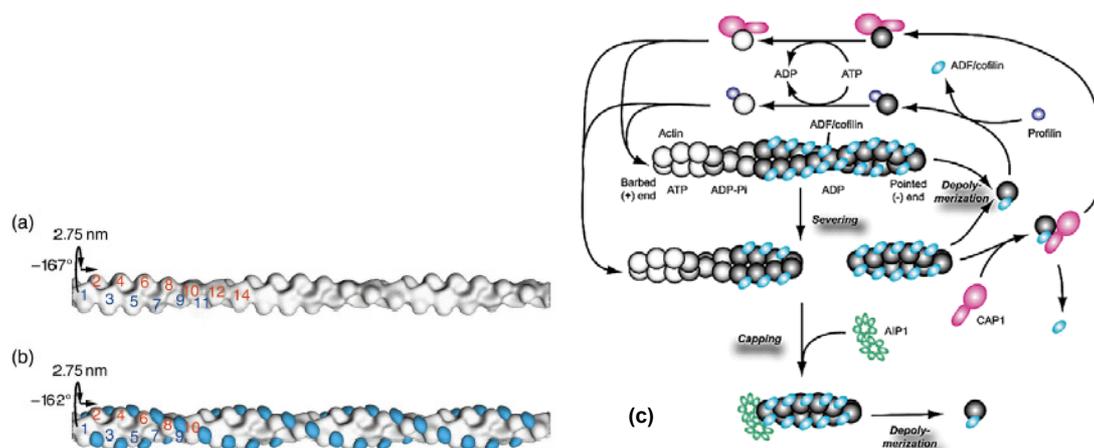
Diese Geschwindigkeit, die sogenannte *off-rate*, stimmt jedoch nicht mit dem *in vivo* beobachteten Filament-Umsatz überein, der um ein Vielfaches höher liegt, nämlich bei ca.  $200\text{s}^{-1}$  (Theriot et al., 1991). Diese drastische Beschleunigung wird durch verschiedene Proteine vermittelt, von denen die Proteine der Gelsolin- und der ADF/Cofilin-Familie am besten erforscht sind. Dabei kommen zwei Mechanismen zum Einsatz, zum einen das sogenannte *severing*, also das Teilen der Filamente in kleinere Stücke, zum anderen eine Beschleunigung der Monomer-Dissoziation am *pointed end* (Cooper et al., 2000). Gelsolin hat hauptsächlich eine *severing*-Funktion und fungiert auch als *capping*-Protein, verhindert also die Elongation. Die Hauptfunktion von ADF/Cofilin dagegen scheint neben dem *severing* in einer Beschleunigung der *off-rate* zu liegen (Carlier et al., 1997).

### 1.4.1 Vorkommen

Proteine der ADF-Cofilin-Familie bzw. Homologe finden sich in allen Eukaryoten (Bamburg, 1999), so z.B. Depactin in Wirbellosen (Nishida et al., 1984), Destrin im Schwein (Moriyama et al., 1990), Actophorin in *Acanthamoeba* (Pollard, 1986), Coactosin in *Dictyostelium* (Bretschneider et al., 2004) und Twinstar in *Drosophila* (Kiehart et al., 2002). Säuger besitzen drei verschiedene Mitglieder der Familie, nämlich ADF (für *actin depolymerizing factor*), muskelspezifisches Cofilin-2 und ubiquitäres Cofilin-1. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in der organspezifischen Lokalisation, sind jedoch in der Funktion analog. Wenn im folgenden Cofilin genannt wird, sind damit prinzipiell alle drei Isoformen gemeint.

## 1.4.2 Funktion

Die genaue Funktionsweise von Cofilin wurde lange Zeit kontrovers diskutiert und ist auch noch nicht abschließend geklärt (Maciver et al., 2002). Cofilin bindet Aktinfilamente äquimolar (Nishida et al., 1984), wobei ADP-Aktin mit ca. 100-fach größerer Affinität gebunden wird als ATP-Aktin (Maciver et al., 1994; Carlier et al., 1997). Dabei interkaliert je ein Cofilin-Molekül zwischen zwei Aktin-Moleküle (Renoult et al., 1999), was eine Veränderung des helikalen Drehwinkels um  $5^\circ$  innerhalb des Aktinfilamentes bewirkt (McGough et al., 1997; Bamberg et al., 1999; Abb. 1.5b). Dies führt zu einer Destabilisierung und beschleunigt die Ablösung von Aktin-Monomeren am *pointed end* um ca. das 30-fache (Carlier et al., 1997; Galkin et al., 2003). Die resultierende *off-rate* von  $9\text{s}^{-1}$  wird im Zusammenspiel mit Profilin sogar auf bis zu  $125\text{s}^{-1}$  erhöht, was zusammen mit einer schwachen *severing*-Funktion die postulierte *off-rate* von  $200\text{s}^{-1}$  erklären könnte (Dos Remedios et al., 2003). Cofilin bleibt an den dissoziierten Aktin-Monomeren gebunden und verhindert den Austausch von ADP gegen ATP (Nishida, 1985; Blanchoin et al., 1998). Dies verhindert die schnelle Wiederverwertung der Aktin-Monomere für die Polymerisation am *barbed end* und somit den raschen *Turnover* von Aktin. Es wird vermutet, dass diese Hürde zum einen durch die Phosphorylierung von Cofilin reguliert wird (siehe weiter unten), zum anderen durch akzessorische Proteine wie Profilin. Profilin katalysiert den Austausch von ADP gegen ATP an Aktin-Monomeren (Mockrin et al., 1980) und erhöht so den Pool an ATP-gebundenem G-Aktin, welches für die Polymerisierung zur Verfügung steht (Tobacman et al., 1983; Abb. 1.5c).



**Abb. 1.5: Funktion von Cofilin**

- (a) Aktinfilament mit einem Drehwinkel von  $-167^\circ$  pro Aktinmolekül
- (b) Die Interkalation von AD/Cofilin in Aktinfilamente bewirkt eine Veränderung der Helixrotation und eine Destabilisierung der Aktin-Aktin-Bindung
- (c) *Treadmilling* von Aktin mit Hilfe von Cofilin, AIP1, CAP1 und Profilin

(Abbildungen aus Bamberg et al., 1999, und Ono, 2003)

Die Charakterisierung von Cofilin als nur Aktin-depolymerisierendes Protein greift jedoch zu kurz, da zum einen die *severing*-Funktion neue, freie *barbed ends* schafft, die Ausgangspunkt für rasche Polymerisierung neuer Filamente sind, und zum anderen die Depolymerisierung Nachschub an Aktin-Monomeren liefert, die - nach Profilin-katalysiertem Nukleotid-Austausch - sofort für die Polymerisierung zur Verfügung stehen. Dieses Modell, nach welchem F-Aktin am *pointed end* depolymerisiert wird und die frei werdenden Aktin-Monomere gleich wieder am *barbed end* polymerisieren, wird auch als *treadmilling* bezeichnet, es ist allerdings nicht unumstritten (Small, 1995; Abb. 1.5c). Die Bedeutung von Cofilin als *treadmilling*-Faktor erhält jedoch Unterstützung durch die Tatsache, dass für Aktin-basierte Motilität *in vitro* die Präsenz von Aktin, Arp2/3-Komplex, *caping protein* und Cofilin ausreicht (Loisel et al., 1999).

Die Bindung von Cofilin an F-Aktin ist kooperativ (Hayden et al., 1993), was vermutlich dadurch erklärt werden kann, dass durch die Interkalierung eines Cofilin-Moleküls und die dadurch verursachte Veränderung des Drehwinkels auf der gegenüberliegenden Seite des Filamentes ebenfalls eine Konformationsänderung erfolgt und eine Lücke entsteht, was die Bindung weiterer Cofilin-Moleküle erleichtert (Carlier et al., 1997; Ressad et al., 1998).

Bereits frühzeitig wurde Cofilin auch im Zellkern gefunden (Nishida et al., 1987), und die Entdeckung einer nukleären Lokalisationssequenz (NLS) (Abe et al., 1993) weist darauf hin, dass der Transport von Cofilin aus dem Zytoplasma in den Zellkern bei zellulärem Stress eine spezifische Funktion haben könnte (Ohta et al., 1989). In T-Lymphozyten wurde eine nukleäre Translokation in Folge einer Dephosphorylierung von Cofilin beschrieben, eine Blockierung der Dephosphorylierung führte dabei zur Apoptose der Zellen (Samstag et al., 1996). Als früher Schritt in der Apoptoseinduktion wurde auch die Translokation von dephosphoryliertem Cofilin in Mitochondrien beschrieben (Chua et al., 2003). Die Bedeutung dieser Translokation ist jedoch noch nicht klar.

### 1.4.3 Regulation

Da Cofilin eine zentrale Rolle beim Aktin-*Turnover* in zahlreichen zellulären Prozessen zu spielen scheint, stellt sich die Frage nach der Regulation dieser Funktion. In der Tat wurde gezeigt, dass die Aktivität von Cofilin durch mehrere Faktoren beeinflusst wird.

#### 1.4.3.1 pH

Die Fähigkeit von Cofilin zur Disassemblierung von F-Aktin ist pH-abhängig, wie *in vitro* (Yonezawa et al., 1985) und *in vivo* (Bernstein et al., 2000) gezeigt werden konnte. In saurem Milieu (pH <6,8) wird F-Aktin durch Cofilin eher stabilisiert, während es in alkalischem Umfeld (pH > 7,3) zur raschen Depolymerisierung kommt. Die physiologische Signifikanz dieser pH-Abhängigkeit ist nicht sicher geklärt, eventuell spielt sie eine Rolle in der Nähe von Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiportern in der Zellmembran, wo es kurzfristig zu starken pH-Schwankungen kommen kann (Bamburg, 1999).

### 1.4.3.2 Phosphoinositole

Phosphoinositole stellen eine wichtige Klasse von intrazellulären Botenstoffen dar, die auch wesentlich an der Regulation des Aktin-Zytoskelettes beteiligt sind (Yin et al., 2003). Sowohl Phosphatidylinositol (PI) als auch Phosphatidylinositol-4-Monophosphat (PIP) und Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) können an Cofilin binden (Yonezawa et al., 1990). Da die Bindungsstelle innerhalb einer Aktin-bindenden Domäne liegt, wird dadurch die Bindung an Aktin verhindert und die Depolymerisation inhibiert (Yonezawa et al., 1991; Kusano et al., 1999). Die physiologische Relevanz dieser Regulation konnte in mehreren Studien gezeigt werden (Nagaoka et al., 1995; Bamburg, 1999). Da PIP<sub>2</sub> durch Phospholipase C hydrolysiert wird, welche wiederum durch Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert werden kann, ist dies möglicherweise ein Mechanismus, durch den Membransignale über Cofilin-Regulation Effekte am Aktin-Zytoskelett verursachen. Eine weitere Regulation könnte über Synaptojanin erfolgen, einer PIP<sub>2</sub>-Phosphatase, deren Überexpression Effekte am Zytoskelett hervorruft, die der Überexpression einer konstitutiv aktiven Cofilin-Mutante sehr ähnlich sind (Nagaoka et al., 1996; Sakisaka et al., 1997). Eine dritte Möglichkeit ist die Phosphorylierung von PIP<sub>2</sub> zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) durch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), die ebenfalls durch Membranrezeptoren aktiviert wird und nachgewiesenermaßen an der Regulation des Zytoskelettes beteiligt ist (Kotani et al., 1994; Wennstrom et al., 1994; Rodriguez-Viciano et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von PI3-Kinase die Dephosphorylierung von Cofilin inhibiert, der genaue Mechanismus ist noch unbekannt (Lee et al., 2000).

### 1.4.3.3 Phosphorylierung

Eine der am besten erforschten Regulationsmöglichkeiten von Cofilin ist die Phosphorylierung eines Serins am N-terminalen Ende, in Säugerzellen am Serin-3 (Moriyama et al., 1996). Phosphoryliertes Cofilin ist nicht mehr in der Lage, Aktin zu binden und zu depolymerisieren (Morgan et al., 1993). Bisher bekannte Kinasen, die spezifisch Cofilin phosphorylieren können, sind LIMK1 (Yang et al., 1998; Arber et al., 1998) und LIMK2 (Sumi et al., 1999), TESK1 (Toshima et al., 2001a) und TESK2 (Toshima et al., 2001b) und NRK/NESK (Nakano et al., 2003).

NRK/NESK gehört zur *germinal center kinase family* (GCK) und wird überwiegend in späten Stadien der murinen Embryogenese in Muskelzellenzellen exprimiert. Die Bedeutung für die Aktin-Regulation via Cofilin ist noch völlig unklar (Nakano et al., 2003).

TESK1 und TESK2 werden beide fast ausschließlich in den Hoden stark exprimiert, wobei TESK1 vor allem im Zytoplasma testikulärer Keimzellen zu finden ist (Toshima et al., 1995), TESK2 hingegen im Nukleus von Sertoli-Zellen und in der Prostata (Rosok et al., 1999). Sie scheinen unterschiedliche Funktionen in der Spermatogenese zu spielen, die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht erforscht (Toshima et al., 2001b).

#### 1.4.3.3.1 LIM-Kinasen

Die zuerst entdeckten und am besten untersuchten Cofilin-Kinasen sind die LIM-Kinasen 1 und 2 (Domänenstruktur siehe Ergebnisse, Abb. 4.10). Für LIMK1 wurde zunächst eine vorwiegend neuronale Expression beschrieben (Bernard et al., 1994), inzwischen wurde sie auch mit verschiedenen Isoformen in allen anderen untersuchten Geweben gefunden (Foletta et al., 2004). LIMK2 wurde ebenfalls ubiquitär nachgewiesen (Mizuno et al., 1994). Cofilin ist bisher das einzig bekannte Substrat der LIM-Kinasen. Die verschiedenen Signalwege, die Cofilin über die LIM-Kinasen beeinflussen, sind inzwischen sehr gut und detailliert erforscht. Die bereits beschriebenen Rho-GTPasen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Es wurde z.B. gezeigt, dass LIMK1 vorwiegend durch Rac reguliert wird (Yang et al., 1998; Arber et al., 1998), während Rho und Cdc42 offensichtlich beide Isoformen beeinflussen können (Sumi et al., 1999; Ohashi et al., 2000; Dan et al., 2001; Amano et al., 2001). Die beteiligten Signalkaskaden wurden mittlerweile eingehend untersucht.

So kann Rho über den Effektor *Rho-associated kinase* (ROCK, für *p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase*) eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von LIMK1 (Ohashi et al., 2000) und LIMK2 (Amano et al., 2001) bewirken. Die dadurch vermittelte Cofilin-Inaktivierung spielt in verschiedenen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle (Lee et al., 2003; Lin et al., 2003) und führt z.B. zur Aktin-Reorganisation und Ausbildung von Stressfasern und Filopodien (Sumi et al., 1999).

Rac und Cdc42 können via PAK1 (Edwards et al., 1999) bzw. PAK4 (Abo et al., 1998) eine Aktivierung von LIMK1 bewirken, was zur Ausbildung von Lamellipodien und Membranfalten, sogenannten *ruffles*, führt (Dan et al., 2001). Ein weiterer möglicher Effektor von Cdc42 könnte *myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha* (MRCK $\alpha$ ) sein, eine entsprechende Phosphorylierung von LIMK wurde beschrieben (Sumi et al., 2001).

Die Aktivierung einer weiteren GTPase, Ras, kann ebenfalls zu einer Dephosphorylierung von Cofilin führen, die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt. Es wurde sowohl die Beteiligung zweier verschiedener Signalwege (Nebl et al., 1993) als auch eine mögliche Funktion der LIM-Domänen (Higuchi et al., 1997) beschrieben.

Eine weitere Möglichkeit der Regulation von LIMK scheint die direkte Interaktion mit Protein Kinase C (PKC) (Kuroda et al., 1996) und Neuregulin (Wang et al., 1998) zu sein, aber auch hier sind die genauen Mechanismen nicht bekannt.

Darüber hinaus wurden alternative Transkriptionsvarianten von LIMK2 beschrieben (Osada et al., 1996; Ikebe et al., 1997). Da LIMK in unphosphoryliertem Zustand eine Autoinhibition durch Interaktion der LIM-Domäne mit der Kinase-Domäne aufweist (Nagata et al., 1999) und die Bindung von LIMK1 sowohl mit anderen LIMK1- als auch LIMK2-Molekülen beschrieben wurde (Hiraoka et al., 1996), können die Transkrip-

tionsvarianten über die Bildung von Heterodimeren vermutlich ebenfalls eine regulatorische Funktion ausüben.

Eine nukleäre Translokation von LIMK wurde beschrieben. Diese scheint u.a. durch Bindung von Kip2 an die LIM-Domäne vermittelt zu werden (Yokoo et al., 2003) und eine Rolle bei der Mitose und Regulation des Zellzyklus zu spielen (Sumi et al., 2002).

#### 1.4.3.3.2 Phosphatasen

Im Gegensatz zur Phosphorylierung von Cofilin durch LIM-Kinasen ist die Regulation der Dephosphorylierung noch in weiten Zügen unbekannt. Experimente mit Phosphatase-Inhibitoren und Zellstimulation brachten teilweise widersprüchliche Ergebnisse, sowohl was die beteiligten Phosphatasen als auch die Signalwege angeht (Baorto et al., 1992; Kanamori et al., 1995; Okada et al., 1996; Takuma et al., 1996; Heyworth et al., 1997; Meberg et al., 1998). Es wurde festgestellt, dass sowohl eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige als auch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Dephosphorylierung existiert, dass je nach Stimulationsart verschiedene Signalwege benutzt werden und dass die Verwendung von Phosphatase-Inhibitoren in niedrigen Konzentrationen die Dephosphorylierung inhibiert, höhere Konzentrationen jedoch zu einer beinahe kompletten Dephosphorylierung führen. Die Dephosphorylierung durch die konventionellen Serin/Threonin-Phosphatasen vom Typ 1, 2A und 2C (PP1, PP2A bzw. PP2C) (Takuma et al., 1996) bzw. PP1 und PP2B (Meberg et al., 1998) konnte *in vitro* gezeigt werden, aber erst 2000 wurde die Assoziation von PP1 bzw. PP2A mit Cofilin und die Dephosphorylierung *in vivo* nachgewiesen (Ambach et al., 2000).

Schon zuvor wurde allerdings postuliert, dass es auch eine spezifische Cofilin-Phosphatase geben müsse, der als funktioneller Gegenspieler ebenso streng reguliert sei wie die LIM-Kinasen (Bamburg, 1999). Erst kürzlich wurde ein Kandidat dafür gefunden, die vermutlich spezifische Cofilin-Phosphatase *Slingshot* (SSH) (Niwa et al., 2002). Es wurde eine Beteiligung bei Mitoseprozessen (Kaji et al., 2003) sowie beim Wachstum von Nervenzellfortsätzen (Endo et al., 2003; Sarmiere et al., 2004) beschrieben sowie eine Abhängigkeit von PI3-Kinase (Nishita et al., 2003), und erst kürzlich wurden zwei neue Isoformen entdeckt (Ohta et al., 2003). Weitere Untersuchungen zur Regulation von *Slingshot*, insbesondere im Hinblick auf die Kontrolle durch Rho-GTPasen, werden voraussichtlich wesentliche Fortschritte im Verständnis der Cofilin-Regulation bringen.

#### 1.4.3.4 Interaktionspartner

Eine weitere Regulationsmöglichkeit der Cofilin-Aktivität ist die kooperative oder kompetitive Interaktion mit anderen Proteinen. Diese kann z.B. die F-Aktin-Bindung und Depolymerisierung, die ADP-Aktin-Bindung oder den Phosphorylierungsstatus beeinflussen. Im folgenden werden einige der inzwischen bekannten Interaktionspartner kurz beschrieben.

#### 1.4.3.4.1 Tropomyosin

Die Bindung von Tropomyosin und Cofilin an ist Aktin kompetitiv, d.h. die Bindung des einen inhibiert die Bindung des anderen Moleküls (Bernstein et al., 1982). Die Ursache dieser wechselseitig exklusiven Bindung ist vermutlich die durch Cofilin hervorgerufene Veränderung im Drehwinkel des Aktin-Filamentes (McGough et al., 1997). Tropomyosin scheint ein physiologischer Gegenspieler von Cofilin zu sein (Ono et al., 2002). Dadurch ist es möglich, innerhalb der Zelle einen stabilen Pool an Tropomyosin-gebundenem Aktin sowie einen dynamischen Pool an Cofilin-gebundenem Aktin zu gewährleisten (Cooper, 2002), was bei Zelldifferenzierung oder -polarisierung bedeutsam ist (DesMarais et al., 2002). Da es zudem mehr als 40 Isoformen von Tropomyosin gibt, die teilweise eine spezifische Verteilung aufweisen, und die Expression der Isoformen wiederum auch von der Aktin-Gen-Expression abhängt (Schevzov et al., 1993), spielt vermutlich das spezifische Expressionsmuster eine entscheidende Rolle für die regulatorische Funktion (Bryce et al., 2003).

#### 1.4.3.4.2 Aip1

Aip1 (*actin interacting protein 1*) wurde erstmals als Aktin-bindendes Protein in Hefe beschrieben (Amberg et al., 1995) und einige Zeit später auch in Pflanzen gefunden (Matsumoto et al., 1998). Die Interaktion mit Cofilin bei der Disassemblierung von Aktin-Filamenten wurde kurz darauf entdeckt (Okada et al., 1999). Dabei wurde zunächst beschrieben, dass Aip1 zusammen mit Cofilin die Depolymerisierungsrate drastisch erhöht (Rodal et al., 1999). Auch beim *severing* von Aktin-Filamenten scheint Aip1 zusammen mit Cofilin eine aktive Rolle zu spielen (Ono et al., 2004; Abb. 1.5c). Die funktionelle Interaktion von Aip1 mit Cofilin und die Bedeutung für die Aktin-Organisation wurde inzwischen mehrfach untersucht (Konzok et al., 1999; Iida et al., 1999; Balcer et al., 2003; Ketelaar et al., 2004) und die Struktur von Aip1 kristallographisch dargestellt (Voegtli et al., 2003). Neueste Untersuchungen konnten auch in humanen Zellen das Vorhandensein von Aip1 und seine Funktion als Kofaktor von Cofilin nachweisen (Fujibuchi et al., 2005).

#### 1.4.3.4.3 CAP

CAP (*cyclase-associated protein*, auch Srv2) wurde zunächst in *S. cerevisiae* entdeckt. Das Protein hat drei Domänen, wobei die C-terminale Domäne an G-Aktin bindet und die Polymerisation verhindert (Freeman et al., 1995). Säuger haben mindestens zwei CAP-Homologe, CAP1 und CAP2, welche ebenfalls beide durch ihre C-terminale Domäne an Aktin binden (Hubberstey et al., 1996). Zur Bedeutung von CAP1 bei der Cofilin-Regulation gibt es erst zwei Berichte. Demnach scheint die Bindung von CAP vor allem den Austausch von Cofilin-gebundenem ADP-Aktin zu Profilin-gebundenem ATP-Aktin zu katalysieren und somit das Recycling von Aktin und Cofilin deutlich zu beschleunigen (Moriyama et al., 2002; Balcer et al., 2003; Abb. 1.5c).

#### 1.4.3.4.4 14-3-3-Proteine

Die Familie der 14-3-3 Proteine umfasst beim Menschen sieben, bei Pflanzen bis zu 15 Isoformen. Sie spielen in verschiedenen Zellprozessen eine Rolle, wie Zellzykluskontrolle, Transkriptionsregulation und Apoptose (Fu et al., 2000; Muslin et al., 2000; Tzivion et al., 2002; Yaffe, 2002). Grundlage dafür ist die Fähigkeit, an eine Vielzahl von Proteinen zu binden, die spezifisch Serin- oder Threonin-phosphoryliert sind.

2002 wurde gezeigt, dass 14-3-3 $\zeta$  auch phosphoryliertes Cofilin bindet und dadurch vor Dephosphorylierung, also Inaktivierung schützt (Gohla et al., 2002). Ein solcher Schutz vor Dephosphorylierung durch PP1 und PP2A wurde bereits für andere Proteine beschrieben (Dent et al., 1995; Thorson et al., 1998; Chiang et al., 2001). 14-3-3 $\zeta$  könnte dadurch kooperativ mit LIMK an der Regulation des Aktin-Zytoskelettes beteiligt sein. Interessanterweise wurde auch ein gegenteiliger Effekt beschrieben, nämlich die Inhibierung von TESK1 durch direkte Bindung von 14-3-3 $\beta$  (Toshima et al., 2001c). Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf unterschiedliche Funktionen von 14-3-3 Isoformen bei der Regulation des Zytoskelettes.

#### 1.4.4 Beteiligung bei Krankheiten

Aufgrund der elementaren Funktionen von Cofilin für das Zytoskelett gehen etliche Krankheiten mit Veränderungen der Cofilin-Produktion, -Regulation oder -Lokalisation einher. Unter zellulärem Stress scheint es zur Bildung von Komplexen mit Aktin zu kommen, welche die Zellfunktionen beeinträchtigen können. So wird Cofilin bei Ischämie in proximalen Tubuluszellen dephosphoryliert (Schwartz et al., 1999) und lokalisiert daraufhin nach apikal, wo es in den Mikrovilli mit Aktin assoziiert (Ashworth et al., 2001). Nach Reperfusion kommt es zum Verlust der apikalen Zellmembran, was zum Verlust von Natrium und zur Bildung von Proteinaggregaten führt, die den proximalen Tubulus verstopfen können (Schwartz et al., 1999). Diese beiden Prozesse sind verantwortlich für die verminderte glomeruläre Filtrationsrate beim akuten Nierenversagen

In Axonen und Neuriten von hippocampalen Neuronen kommt es bei mitochondrialem Stress ebenfalls zu einer schnellen Dephosphorylierung von Cofilin, was eine Reorganisation von Aktin und Cofilin in bündelförmige Strukturen bewirkt (Minamide et al., 2000). Diese können die Neuriten komplett verschließen und die Mikrotubuli zerstören, was die distale Funktion blockiert. Solche bündelförmigen Aktin-Cofilin-Komplexe wurden im frontalen Kortex und Hippocampus von Alzheimer-Patienten in Amyloid-Plaques, die charakteristisch für degenerative Gehirnerkrankungen sind, gefunden. Möglicherweise führt die Blockierung des axonalen Transportes durch diese Komplexe zur intrazellulären Anhäufung von *amyloid precursor protein* (APP) und verstärkt dadurch die Plaquebildung. Auch die sogenannten Hirano-Körperchen, die vor allem im Gehirn dementer Menschen weit verbreitet sind, enthalten Aktin und Cofilin in großen Mengen (Maciver et al., 1995). Ähnliche Aggregate wurden in den Gehirnen von Zwillingen mit juveniler Dystonie gefunden (Gearing et al., 2002). Embryonale Myoblasten exprimieren sowohl ADF als auch beide Cofilin-Isoformen. Wenn diese Myoblasten zu Myotubi fusionieren, wird die Expression

von ADF und nicht-muskelspezifischem Cofilin herunter- und die von muskelspezifischem Cofilin hochreguliert (Abe et al., 1989; Ono et al., 1994). Diese Hochregulation findet sich auch in denervierten und dystrophischen Muskeln (Hayakawa et al., 1993), was vermuten lässt, dass Muskelatrophie und -degeneration möglicherweise einer gestörten Cofilin-Regulation einhergeht.

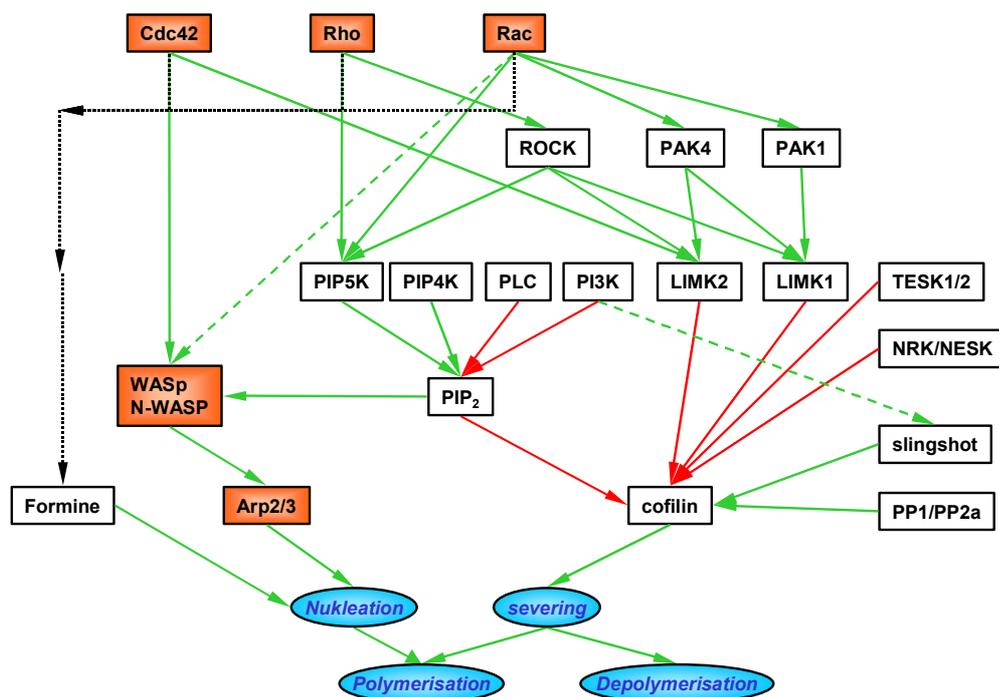
Eine Beteiligung von Cofilin bei mehreren Prozessen der Krebsentstehung und -ausbreitung erscheint ebenfalls wahrscheinlich. Die Transformation adhärenz-fähiger Zellen ist abhängig von Änderungen des Zytoskelettes. So führt z.B. das virale Src-Onkogen zu einer Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase MEK, welche ihrerseits eine Inhibition des Rho-GTPase-Signalweges bewirkt. Die resultierende Dephosphorylierung von Cofilin führt zum Verlust von Stressfasern und fokalen Adhäsionen, was die Voraussetzung für die Ablösung entarteter Zellen aus dem Zellverbund und der damit verbundenen Wachstumskontrolle ist. Auf die essentielle Beteiligung von Cofilin bei der Aktin-Polymerisation, die im Rahmen von Migrationsprozessen wie auch der Metastasierung notwendig ist, wurde bereits hingewiesen. Und auch die Zellteilung bzw. Zellzyklus-Kontrolle ist von der regulierten Cofilin-Aktivität abhängig, was zuerst in *Xenopus laevis*-Eiern gezeigt werden konnte (Abe et al., 1996). Darüber hinaus wurde in letzter Zeit die Zellzyklus-abhängige Aktivität von LIM-Kinase als einem der wichtigsten Cofilin-Regulatoren untersucht (Amano et al., 2002). Insgesamt wurde eine veränderte Cofilin-Regulation in verschiedenen Krebs-Formen nachgewiesen, so zum Beispiel mittels cDNA-Array-Analyse ein erhöhter Level an Cofilin in ovariellen Tumoren (Martoglio et al., 2000).

## 1.5 Fragestellung

Podosomen sind prominente Zellstrukturen, die von adhärierenden humanen Makrophagen ausgebildet werden. Ihre Bedeutung und physiologische Funktion ist jedoch noch nicht umfassend verstanden, auch wenn bereits viele Erkenntnisse über ihren Aufbau gewonnen wurden.

Zu Beginn der Arbeit lagen bereits sehr detaillierte Kenntnisse zur Regulation des Aktin-Zytoskelettes allgemein und spezifischer Aktin-Strukturen - wie Stressfasern, Filopodien und Lamellipodien - im besonderen vor. Über die Regulation von Podosomen als charakteristische Aktin-Strukturen in hämatopoetischen Zellen war jedoch wenig bekannt. Eine Abhängigkeit von intakten Mikrotubuli war gezeigt worden (Linder et al., 2000a) sowie ein Einfluss von Dynamin (Ochoa et al., 2000). Im Detail war jedoch bisher nur die für die Podosomen-Bildung essentielle Cdc42 und WASp-vermittelte Aktivierung von Arp2/3-Komplex analysiert worden (Linder et al., 2000b; Hufner et al., 2001). Der Schwerpunkt der Experimente lag daher nun auf der Untersuchung Podosomen-abbauender Prozesse bzw. der Regulation der Podosomen-Dynamik.

In Abbildung 1.6 sind einige der bekannten Regulationswege, die zu Aktin-Polymerisation bzw. Depolymerisation führen, schematisch aufgezeigt.



**Abb. 1.6:** Signalwege der Aktin-Regulation

Schematische Darstellung einiger ausgewählter bekannter Signalkaskaden mit Schwerpunkt auf der Cofilin-Regulation. In orange Proteine, deren Bedeutung für die Podosomen-Regulation bereits nachgewiesen wurde.

Grüne Pfeile: Aktivierung; rote Pfeile: Inaktivierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher folgende Fragestellungen im Hinblick auf die Podosome-Regulation untersucht:

- Wie ist die physiologische Relevanz von Podosome zu bewerten?
- Ist Cofilin in Podosome lokalisiert?
- Wenn ja: Welche Rolle spielt Cofilin bei der Podosome-Regulation?
- Welche Regulationsmechanismen von Cofilin spielen eine wichtige Rolle, insbesondere:
  - o Welche Bedeutung haben LIM-Kinasen?
  - o Welche Bedeutung haben Phosphatasen?
  - o Welche Bedeutung haben Rho-GTPase-Effektoren?
  - o Welche Bedeutung haben Phosphoinositole und Phospholipasen?

## 2 Material

### 2.1 Geräte und technische Hilfsmittel

Autoklav	Bioclav, Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen, D)
Elektroporator	Gene Pulser II, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen, D)
Gelapparaturen	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
Grobwaage	Sartorius AG (Göttingen, D)
Inkubatoren	CB210, WTB Binder Labortechnik (Tuttlingen, D) Steri-Cult, Modell 3035, Labotect GmbH (Göttingen, D)
Magnetrührer	IKAMAG RET, IKA-Werke GmbH (Staufen i. Br., D) MR 3001K, Heidolph Instruments GmbH (Kehlheim, D)
Mikroinjektionsanlage	Transjektor 5246 und Mikromanipulator 5171, Eppendorf (Hamburg, D)
Netzgeräte	Power Pac 200 und Power Pac 300 Power Supply, Biorad (Hercules, CA, USA)
pH-Meter	Knick, Elektronische Messgeräte GmbH & Co. (Berlin, D)
Pinzetten	NeoLab Migge Laborbedarf-Vertrieb (Heidelberg, D)
Pipetten	Pipetman, Gilson International B.V. (Den Haag, NL) Eppendorf Research, Eppendorf (Hamburg, D)
Schüttelinkubatoren	GFL-3031, Gesellschaft f. Labortechnik (Burgwedel, D) Certomat H und Certomat R, Sartorius AG (Göttingen, D)
Spektrophotometer	Kontron Instruments (Watford, UK)
<i>Speedvac</i>	UniVapo 150 H, UniEquip Laborgerätebau und Vertriebs GmbH (Martinsried, D)
Tischzentrifugen	Biofuge <i>fresco</i> , Heraeus Sepatech (Osterode, D) <i>miniSpin</i> und Centrifuge 5415 C, Eppendorf (Hamburg, D)
Thermocycler	Uno-Thermoblock, Biometra GmbH (Göttingen, D) Mastercycler gradient, Eppendorf (Hamburg, D)
Thermomixer	Thermomixer compact und Thermomixer 5436, Eppendorf (Hamburg, D)
Ultrazentrifuge	Optima™ TK'LX Ultrazentrifuge und L7-55 Ultrazentrifuge, Beckman Coulter (Fullerton, USA)
Vortexer	REAX top, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Kehlheim, D) IKA VF2, IKA-Werke GmbH & CO. KG (Staufen i. Br., D)

Zentrifugen	Centricon H-401; Kontron Instruments (Watford, UK) Omnifuge 2.ORS; Heraeus Sepatech (Osterode, D)
<i>Nucleofector</i>	Nucleofector Device, Amaxa GmbH (Köln, D)
Mikroskope	Fluoreszenzmikroskop: Leica + Spot-Kamera Leica Konfokalmikroskop: Leica DM IRB (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Bensheim; D) <i>Live Cell</i> Mikroskop : UltraView Confocal LCI, PerkinElmer (Wellesley, MA, USA) und Umkehrmikroskop Eclipse TE 300 Invers, Nikon GmbH (Düsseldorf, D)
Wasserbad	Thermostat von JULABO Labortechnik (Seelbach, D)

## 2.2 Sonstige Materialien

Elektroporations-Küvetten	Eurogentec (Seraing, Belgien) Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, D)
<i>Glass Bottom Dishes</i>	Glasschälchen für <i>Live cell</i> -Aufnahmen, MatTek (Ashland, USA)
Femtotips	Injektionskanülen für Mikroinjektion, Eppendorf (Hamburg, D)
Mowiol 4-88	Calbiochem, EMD Biosciences, Merck KGaA (Darmstadt, D)
TRIzol	Invitrogen (San Diego, USA)
RPMI PBS Ficoll	PAA Laboratories GmbH (Cölbe, D)  (Lymphozyten-Separationslösung)

## 2.3 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien hatten *pro analysi*-Qualität und wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, D)
- BioWhittaker Molecular Applications bzw. seit 2002 Cambrex Bio Science Rockland (Rockland, ME, USA)
- Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, D)
- Dianova (Hamburg, D)
- Difco (D)
- Merck (Darmstadt, D)
- Roche Diagnostics GmbH (Grenzach-Wyhlen, D)
- Sigma-Aldrich (München, D)

## 2.4 Kit-Systeme

Nucleobond AX100 Midipräp Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (D)
MiniMACS CD14 Microbeads	Miltenyi Biotech GmbH (D)
Zenon™ Alexa Fluor® 488 Rabbit IgG Labeling Kit	Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA), Vertrieb über Mo Bi Tec GmbH (Göttingen, D)
QIAquick™ PCR Purification Kit QIAquick™ Gel-Extraction Kit QIA® Spin Miniprep Kit Endofree® Plasmid Maxi Kit TAQ PCR Core Kit	Qiagen GmbH (D)

## 2.5 Bakterienstamm

Escherichia coli DH5α	F <sup>-</sup> φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>
-----------------------	--

## 2.6 Zelllinien

J-774	murine Zellen aus einem histiozytischen Sarkom
MDA-231	humane epitheliale Zellen aus einem Patienten mit Adenokarzinom der Brust
U937	humane Lymphoblasten aus dem Blut eines Patienten mit histiozytischem Lymphom

## 2.7 Enzyme

T4-Polynukleotidkinase	Promega GmbH (Mannheim, D)
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics GmbH (Grenzach-Wyhlen, D)
<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI <i>Hind</i> III <i>Sal</i> I <i>Xba</i> <i>Deep Vent</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt, D)

## 2.8 Transfektionsreagenzien

<i>Exgen</i> 500	MBI Fermentas, jetzt Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
<i>Lipofectamine</i> 2000	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)

<i>Metafectene</i>	Biontex Laboratories GmbH (München, D)
<i>Nucleofector Solution 6857</i>	Amamax GmbH (Köln, D)

## 2.9 Antikörper

### 2.9.1 Primäre Antikörper

Die folgenden Antikörper sind kommerziell erhältlich:

Antikörper gegen	aus Spezies	bezogen von
Cofilin	Kaninchen	Cytoskeleton, Inc. (Denver, CO, USA), Vertrieb über tebu-bio GmbH (Offenbach, D)
P-Cofilin LIMK1 LIMK2 Phospho-LIMK1/2	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Inc., Vertrieb über New England Biolabs (Frankfurt, D)
PP2A Catalytic $\alpha$	Maus	BD Transduction Labs. (Lexington, KY, USA)
PIP <sub>2</sub>	Maus	echelon biosciences, Inc. (Salt Lake City, UT, USA)
Vinculin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie (München, D)

Außerdem wurden uns folgende Antikörper freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

Antikörper gegen	aus Spezies	bezogen von
PLC $\beta$ 1 PLC $\beta$ 2 PLC $\beta$ 3	Kaninchen	Prof. P. Gierschik, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm (D)
CAP1 ( $\alpha$ -mouse) Cofilin1 ( $\alpha$ -mouse) ADF ( $\alpha$ -mouse)	Meerschweinchen Kaninchen Huhn	Pekka Lappalainen, PhD, Institute of Biotechnology, University of Helsinki (Finland)

### 2.9.2 Sekundäre Antikörper

Folgende Antikörper wurden für Immunfluoreszenz, *Western Blot* und Mikroinjektion verwendet:

Antikörperbezeichnung	bezogen von
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti-mouse Alexa Fluor <sup>®</sup> 568 goat anti-mouse	Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA)

Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti-rabbit Alexa Fluor <sup>®</sup> 568 goat anti-rabbit	jeweils IgG (H+L)
Cy <sup>™</sup> 5-conj. AffiniPure donkey anti-mouse IgG ChromPure rat IgG	dianova (Hamburg, D)

## 2.10 Stimulatoren und Inhibitoren

Reagenz	bezogen von
fMLP LPS	Sigma-Aldrich Chemie (München, D)
okadaic acid Y-27632 m-3M3FBS	Calbiochem/EMD Biosciences (San Diego, CA, USA)
calyculin PP2	BioSource International (Camarillo, CA, USA)
PP1 Inhibitor 2	BD Transduction Labs. (Lexington, KY, USA)
U-73122	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)

## 2.11 Peptide

Name	bezogen von
PPI-BP (Gelsolin 160-169) Sequenz: QRLFQVKGRR PLC-BS (PLC $\beta$ 2-binding-site, 448-464): Sequenz: CGGLSPEDLRGKILIKNKK	Synpep Corporation (Dublin, CA, USA)

## 2.12 Plasmide

### 2.12.1 Kommerziell erworbene Plasmide

#### a) Bakterielle Expressionsplasmide

pGEX-2T/pGEX-4T-2	Expressionsvektoren für GST-Fusionsproteine, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, D)
pMAL-p2X	Expressionsvektor für MBP ( <i>maltose-binding protein</i> )-Fusionsproteine, New England Biolabs (Frankfurt, D)
pTYB1	Expressionsvektor für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> VMA Intein-Fusionsproteine, New England Biolabs (Frankfurt, D)

b) Eukaryontische Expressionsplasmide

pEGFP-C1 pEGFP-N1	Expressionsvektor für GFP ( <i>green fluorescent protein</i> )-Fusionsproteine, Clontech bzw. BD Biosciences (Heidelberg, D)
----------------------	--

**2.12.2 Konstrukte von Kooperationspartnern**a) Bakterielle Expressionsplasmide

LIMK1-GST LIMK1-LIM-GST	K. Mizuno, Department of Biomolecular Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, Sendai, Japan
----------------------------	--

b) Eukaryontische Expressionsplasmide

LIMK2-pEGFP-C1 LIMK2-PK-pEGFP-C1 LIMK2-T505A-pEGFP-C1 LIMK2-T505EE-pEGFP-C1  Cofilin-dsRedII	Pankaj Goyal MSc, Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität, München
LIMK1-pEGFP-C1 LIMK1-PDZ-pEGFP-C1 LIMK1-PK-pEGFP-C1 LIMK1-LIM-pEGFP-C1 LIMK1-D446E-pEGFP-C1  Cofilin-Myc-pcDNA Cofilin-S3A-Myc-pcDNA	Ora Bernard PhD, Molecular Genetics of Cancer Division, The Walter and Eliza Hall Institute, Victoria, Australien
PAK1-Myc PAK1-K298A-Myc	Melanie H. Cobb, University of Texas Southwestern Medical Center, Department of Pharmacology, Dallas, Texas, USA
PAK4-K350M-Myc PAK4-S445N/S474E-Myc	Audrey Minden, Department of Biological Sciences, Columbia University, New York, USA.
PLC $\beta$ 2-pEGFP-C1 PLC $\beta$ 2-Iso1-pEGFP-C1 PLC $\delta$ 1-PH-pEGFP-C1 PLC $\delta$ 1-PH-R40A-pEGFP-C1	Prof. P. Gierschik, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm
CAP1-pEGFP-N1 (mouse)	Pekka Lappalainen, PhD, Institute of Biotechnology, University of Helsinki (Finland)

## 2.13 Primer

Name	Verwendung	bezogen von
GFP-f / GFP-r Gex-3 / Gex-5 MAL-f / MAL-r STY-1 / STY-2 SMAL-1 / SMAL-2	Sequenzierung	MWG-Biotech AG (München, D)
L1f / L1r LK1-L-MAL-1 LK1-L-MAL-2 LK1-L-TYB-1 LK1-L-TYB-2	Klonierung	MWG-Biotech AG (München, D)

## 2.14 Oligonukleotide

Name	Verwendung	bezogen von
Cof-1 / Cof-2	Klonierung	MWG-Biotech AG (München, D)

Die Sequenzen der verwendeten *Primer* und Oligonukleotide finden sich im Anhang.

## 2.15 siRNA

Die benutzte siRNA wurde uns in Kooperation von EURIT (European Union for RNA Interference Technology) bzw. der deutschen Plattform ZARIT (Zentrum für die Anwendung der RNA-Interferenz-Technologie) am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin zur Verfügung gestellt. Die Sequenz findet sich im Anhang.

## 2.16 Medien und Pufferlösungen

### 2.16.1 Zellkulturmedien

Mono-Medium	RPMI* + 20% autologes Serum
J774-Medium	RPMI + 10% FCS + 2mM L-Glutamin + 100µg/ml Gentamycin
MDA-231-Medium	Leibowitz-Medium + 10% FBS + 5ml Penicillin
RAW 264.1-Medium	RPMI + 10% FCS + 2mM L-Glutamin + 100µg/ml Penicillin/Streptavidin

**2.16.2 Puffer für Zelllysate**

Mono-Puffer	PBS + 5mM EDTA pH 7,4 + 0,5% humanes Serumalbumin
-------------	---

**2.16.3 Puffer für Zellfixierung**

PBS 10x konz.	1l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH 7,3 + 2g KCl + 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 80g NaCl + 14g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
PHEM-Puffer 50%	H <sub>2</sub> O + 25mM HEPES pH 6,1 + 20mM PIPES pH 6,1 + 4mM EGTA + 1mM MgCl <sub>2</sub>
PHEM-Lysepuffer	PHEM-Puffer 50% + 1mM Vanadat + 5% Hexylenglykol + 1% Brij 58

**2.16.4 Puffer für Mikroinjektion**

Mikroinjektionspuffer	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 10mM Tris-HCl pH 7,5 + 150mM NaCl + 2mM MgCl <sub>2</sub> + 0,1mM DTT
-----------------------	--

**2.16.5 Puffer für DNA-Gelelektrophorese**

TBE-Puffer 10x konz.	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 0,89M Tris-HCl pH 8,0 + 0,89M Borsäure + 20mM EDTA
SDS-Proben-Puffer	= 5x Probenpuffer nach Lämmlis: 5ml Tris/HCl 0,5M pH 6,8 2ml Glycerol 0,8g SDS 1ml Bromphenolblau 0,5% 2ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>  Die Lösung wurde sterilfiltriert und zusammen mit 5% Mercaptoenthanol 1:5 auf das gewünschte Endvolumen verdünnt.

### 2.16.6 Puffer für Western Blot

TBS	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 20mM Tris-HCl pH 7,4 + 150mM NaCl
TBST	TBS + 0,3% Tween <sup>®</sup> 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate)
Resolving-Puffer	250ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH 8,8 + 1,5M Tris + 1g SDS
Stocking-Puffer	250ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH 6,8 + 0,5M Tris + 1g SDS
Running-Puffer	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 25mM Tris + 192mM Glycin + 0,1% SDS
Blotting-Puffer	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 25mM Tris + 96mM Glycin
Blocking-Puffer	TBST + 5% Milchpulver + 2% BSA
Stripping-Puffer	6ml TRIS pH 7,4 2g SDS 800µl 2-Mercapto-Ethanol ad 100ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>
Coomassie-Färbelösung	500ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 400ml Methanol + 100ml Essigsäure 100% + 1g Coomassie Blue
Destain-Puffer	600ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 300ml Methanol + 100ml Essigsäure 100%

### 2.16.7 Puffer für Expression von GST-Fusionsproteinen

GST-Säulenpuffer	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 50mM Tris-HCl pH 7,4 + 50mM NaCl + 5mM MgCl <sub>2</sub> <u>Proteasen-Inhibitoren:</u> + 1mM DTT + 475µg/ml Aprotinin + 1µg/ml Leupeptin + 1µg/ml Pepstatin + 1µg/ml Pefabloc SC
------------------	--

Thrombinpuffer	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 50mM Tris-HCl pH 8,0 + 150mM NaCl + 5mM MgCl <sub>2</sub> + 1mM DTT
----------------	--

### 2.16.8 Puffer für Expression von MBP-Fusionsproteinen

MBP-Säulenpuffer	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 20mM Tris-HCl pH 7,4 + 200mM NaCl + 1mM EDTA Proteasen-Inhibitoren: + 1mM DTT + 475µg/ml Aprotinin + 1µg/ml Leupeptin + 1µg/ml Pepstatin + 1µg/ml Pefabloc SC
MBP-Dialysepuffer	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 20mM Tris-HCl pH 8,0 + 25mM NaCl

### 2.16.9 Puffer für Tris-Tricin-Gel 15%

Tris-Tricin-Gel-Puffer 3x konz.	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 3M TRIS + 0,5% SDS
<i>Samplebuffer</i>	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 100mM Tris-HCl pH 6,8 + 24% Glycerin + 8% SDS + 0,2M DTT
Kathodenpuffer 5x konz.	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 0,5M Tris-Base + 0,5M Tricin + 0,5% SDS
Anodenpuffer 5x konz.	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 1M Tris-HCl pH 8,9

### 2.16.10 Bakterien-Medium

LB Medium	1l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> + 10g Bactotrypton + 5g Yeast extr. pH 7 + 10g NaCl pH 7 + 200µl NaOH 5M
-----------	--

## 2.17 Gele

### 2.17.1 SDS-Polyacrylamid-Gele

Substanz	Minigel		Großes Gel	
	Trenngel			
	10%	12,5%	10%	12,5%
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	2,09 ml	1,6 ml	20,25 ml	13,45 ml
<i>Resolving</i> -Puffer	1,25 ml	1,25 ml	12,5 ml	10 ml
Acrylamid	1,67 ml	2,08 ml	16,5 ml	16 ml
APS (100ng/ml)	25 µl	25 µl	250 µl	200 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	25 µl	20 µl
Sammelgel				
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1,55 ml		9,4 ml	
<i>Stocking</i> -Puffer	625 µl		3,75 ml	
Acrylamid	325 µl		1,95 ml	
APS (100ng/ml)	12,5 µl		75 µl	
TEMED	2,5 µl		15 µl	

### 2.17.2 Tris-Tricin-Gel 15%

	Trenngel	Sammelgel
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1,07 ml	3,1 ml
Tris-Tricin-Gel-Puffer 3x konz.	6,7 ml	2,0 ml
30% Acrylamid	10,0 ml	0,8 ml
Glycerin	2,67 ml	
10% APS	200 µl	60 µl
TEMED	10,7 µl	6 µl

### 3 Methoden

#### 3.1 Isolierung primärer humaner Makrophagen aus menschlichem Blut

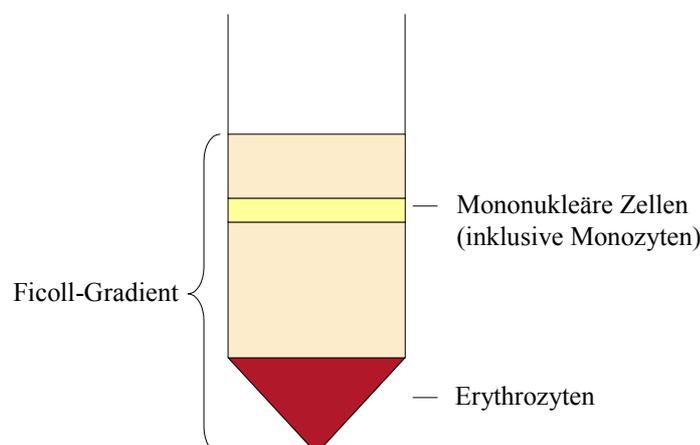
Die Monozyten wurden 1 - 2 x wöchentlich aus frisch abgenommenem, heparinisiertem Blut isoliert. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis bzw. in auf 4°C vorgekühlten Zentrifugen.

Zur Isolierung wurde in 50 ml Falconröhrchen jeweils 15 ml Ficoll-(Lymphozyten-Separations-)Lösung vorgelegt und diese mit jeweils 12,5 ml Blut überschichtet. Die Röhrchen wurden 30 min bei 1500 rpm (Omnifuge) zentrifugiert, wodurch sich ein Gradient ausbildete (Abb. 3.1).

Die Schicht mit den monozytären Zellen wurde abpipettiert, jeweils zwei Samples vereinigt, mit RPMI\* auf 50 ml aufgefüllt und erneut 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Pellets wieder in RPMI\* aufgenommen, jeweils zwei gepoolt und 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis nur noch ein Pellet übrig war.

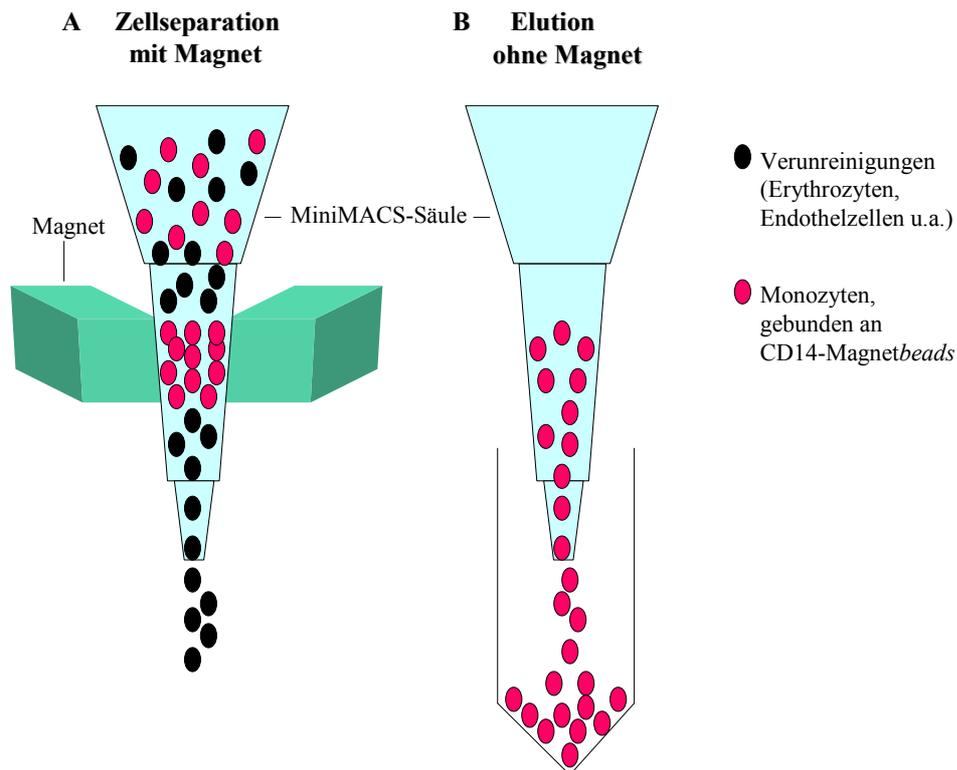
Dieses wurde in 1 ml RPMI\* aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 2 min bei 3000 rpm (Biofuge *fresco*) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl Mono-Puffer resuspendiert. Dann wurden 100 µl anti-CD14-Antikörper-*Beads* (MiniMACS, Abb. 3.2) zugegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und die Suspension 15 min auf Eis inkubiert.

Die MiniMACS-Säule wurde in den Magneten eingelegt und mit 500 µl Mono-Puffer äquilibriert, bevor die Zellsuspension auf die Säule gegeben wurde. Diese wurde einmal mit 500 µl Mono-Puffer gewaschen, danach die Säule aus dem Magneten genommen und die Monozyten mit 1 ml Mono-Puffer in ein 50 ml-Falconröhrchen mit 15 - 20 ml kaltem RPMI\* eluiert. Die Zellen wurden 10 min bei 3000 rpm (Omnifuge) zentrifugiert, das Pellet in 1 - 10 ml (je nach Zelldichte) RPMI\* resuspendiert und in einer Neuenbauer Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Durch Zugabe von RPMI\* wurde eine Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und die Zellen auf *Coverslips* (100 µl bzw.  $5 \times 10^4$  Zellen) oder in 6-well Platten (2 ml bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen) ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach ca. 1 h wurde jeweils 1,5 ml Mono-Medium



**Abb. 3.1:**

**Auftrennung der Blutbestandteile im Ficoll-Gradienten**  
(B. Schell)



**Abb. 3.2:** Abtrennung der Monozyten durch CD14-Magnetbeads

- (A) Monozyten binden über das CD14-Oberflächenmolekül an die beads, während alle anderen Zellen und Verunreinigungen durchfließen.  
 (B) Nach Entfernung des Magneten werden die an die Beads gebundenen Monozyten eluiert.

(B. Schell)

hinzugegeben, in welchem die Differenzierung zu Makrophagen stattfindet. Das Medium wurde alle 3 - 4 Tage gewechselt.

### 3.2 Zellkultur

Da zu Beginn der Experimente noch keine Möglichkeit bestand, primäre humane Makrophagen effizient zu transfizieren, wurde nach einem Modellsystem gesucht. Dazu wurden drei Zelllinien getestet, ob sie konstitutionell oder auf Stimulation hin Podosomen ausbilden und somit zu deren Untersuchung benutzt werden konnten. Es handelte sich hierbei um die zwei Maus-Makrophagen-Linien J774 und RAW 264.1 sowie die humane Brustkrebs-Zelllinie MDA-231. Alle Zellen dieser Zelllinien waren adhären, wurden in Zellkulturflaschen inkubiert und alle 3 - 5 Tage mit Trypsin oder *Cell scraper* gesplittet.

### 3.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Färbung

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Proteinen wurden Fluoreszenz-Färbetechniken verwendet. Mit Hilfe von Kofärbungen und der Konfokal-Mikroskopie ließen sich somit außerdem Koloalationen verschiedener

Proteine in Zellen nachweisen. Die auf Deckgläsern (*Coverslips*) kultivierten Zellen wurden dazu je nach Protein und Antikörper mit verschiedenen Reagenzien fixiert und permeabilisiert.

**a) Fixierung mit Formaldehyd plus Aceton**

Die Zellen wurden zunächst bei RT mindestens 10 min in 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert und anschließend für 5 min in  $-20^{\circ}\text{C}$  kalten Aceton permeabilisiert.

**b) Fixierung mit Methanol**

Durch die Behandlung in  $-20^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-80^{\circ}\text{C}$  kalten Methanol für 10 - 60 s wurden die Zellen in einem Schritt sowohl fixiert als auch permeabilisiert.

**c) Fixierung mit Formaldehyd plus Triton**

Die Zellen wurden bei RT 10 min mit 3,7 % Formaldehyd-Lösung in PBS plus 0,18 % Triton X-100 fixiert und zugleich permeabilisiert. Durch eine zusätzliche Permeabilisierung 5 min in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Aceton konnte bei manchen Proteinen die Färbung noch optimiert werden.

**d) Fixierung mit PHEM-Puffer**

Die Zellen wurden bei RT 1 min in PHEM-Lysepuffer permeabilisiert, 1 min in PHEM-Puffer gewaschen und 10 min in PHEM-Puffer mit 1 % Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden sie 5 min in PBS/BSA gewaschen. Vor der weiteren Färbung wurden die Aldehydgruppen des Glutaraldehyds mit Natrium Borhydrid ( $\text{NaBH}_4$ , eine Spatelspitze in PBS) abgesättigt und die Zellen mehrmals in PBS/BSA gewaschen.

Alle folgenden Inkubationen fanden in einer feuchten Kammer bei RT statt, wobei die *Coverslips* mit der Zellseite nach unten auf die auf Parafilm vorpipettierten Lösungen gelegt wurden.

Die Zellen wurden 5 min. in PBS/BSA gewaschen, danach 15 min. in [PBS/BSA, 5 % NHS, 5 % NGS] inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die Zellen wurden nochmals in PBS/BSA gewaschen und 45 min mit dem primären Antikörper inkubiert. Um nicht-gebundene primäre Antikörpermoleküle zu entfernen, wurden die Zellen dreimal in PBS/BSA gewaschen. Sollten mehrere Proteine angefärbt werden, wurden weitere primäre Antikörper ebenso auf die Zellen gegeben, dazwischen jeweils dreimal mit PBS/BSA gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 30 min mit den sekundären Antikörpern (1 : 150). Filamentöses Aktin wurde meist mit Alexa-488 oder Alexa-568 gekoppeltem Phalloidin (1 : 200) angefärbt, welches zusammen mit eventuellen sekundären Antikörpern auf die Zellen gegeben wurde. Nach drei abschließenden Waschungen mit PBS folgte die Einbettung der fertigen Proben auf Objektträgern mit Mowiol, das DABCO (*Diazabicyclooctane*) als Ausbleichschutz enthält, und die Versiegelung mit Nagellack.

### 3.3.1 Antikörper-Labeling

Sollten mehrere Proteine detektiert werden, für die jedoch nur primäre Antikörper gleichen Typs vorhanden waren (Kaninchen), wurde einer der Antikörper zuvor

mit Hilfe des *Zenon IgG labeling Kits* (siehe Material) nach Angaben des Herstellers mit einem Fluorophor gekoppelt. Der zweite primäre Antikörper wurde sequentiell wie oben beschrieben mittels einer sekundären Antikörpern angefärbt.

### 3.4 Fluoreszenz- und Konfokal-Mikroskopie

Die fluoreszenz-markierten Proben wurden entweder mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops mit angeschlossener digitaler „Spot“ Kamera oder mit Hilfe eines konfokalen *laser scanning* Mikroskops analysiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen „Imaging“ (Microsoft<sup>®</sup>), „Photoshop<sup>®</sup>“ (Adobe<sup>®</sup>) und „Corel Draw<sup>®</sup>“ (Corel<sup>®</sup>).

### 3.5 *Live-cell Imaging*

Für Video-Aufnahmen lebender Zellen wurden diese - nach jeweiliger Vorbehandlung - auf *glass bottom dishes* in einer Dichte von ca.  $5 \times 10^5$  pro Schälchen ausgesät. Die Aufnahmen erfolgten software-gesteuert mit Hilfe des UltraView Confocal LCI über ein Umkehrmikroskop. Die Weiterverarbeitung und Analyse der Filme bzw. Einzelbilder wurde mit ImageJ (NIH) und Photoshop<sup>®</sup> (Adobe<sup>®</sup>) durchgeführt.

### 3.6 Zellstimulation und -polarisation

Makrophagen bilden auf Stimulation hin einen polarisierten Phänotyp aus und beginnen zu migrieren, wodurch sich die Dynamik von Adhäsionsstrukturen gut untersuchen lässt. Zur Stimulation wurde entweder das leukozyten-chemotaktische Peptid fMLP oder LPS verwendet. Durch direkte Zugabe von fMLP oder LPS zu serumfreiem Medium (Endkonzentration jeweils 100 µg/ml) und Inkubation für 1 - 2 h wurde eine zufällige Polarisation der Zellen erreicht. Sollten die Zellen einheitlich polarisiert werden, wurde fMLP in einer Konzentration von 50 µg/ml in 2 % Agarose gemischt und je 200 µl der Mischung in 96-wells pipettiert. Nach Erstarren wurden die Agarose-Zylinder zu 5 - 7 Tagen alten Makrophagen in RPMI\* gegeben, dabei wurde die *Coverslips* mit den Zellen und die Agarose jeweils an gegenüberliegende Seiten von 8-wells gelegt und für 6 - 12 h im Brutschrank inkubiert. Es bildete sich durch Diffusion ein Gradient von fMLP aus, der zu einer gerichteten Polarisation der Makrophagen in Richtung der Agarose-Blöcke führte. Phänotypisch unterschieden sich zufällig oder gerichtet polarisierte Makrophagen nicht.

### 3.7 Transfektion von Zellen

#### 3.7.1 Lipofektion von Zelllinien

Zur Transfektion der Zelllinien wurden verschiedene Transfektionsreagenzien getestet: Metafectene, Lipofectamin und Exgen 500. Es handelt sich jeweils um DNA komplexierende Substanzen, die den Transport der DNA in die Zellen vermitteln. Dazu wurden die Zellen jeweils am Vortag auf Coverslips ausgesät

und die Transfektion nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 24 - 72 h wurde die Expression der transfizierten DNA kontrolliert.

### 3.7.2 Transfektion primärer humaner Makrophagen mittels *Nucleofection*<sup>TM</sup>

*Nucleofection*<sup>TM</sup> ist eine von der Firma *amaxa biosystems* entwickelte Technik zur Transfektion primärer Zellen, die auf der Kombination von Elektroporation und Lipofektion beruht. Das *Nucleofector*<sup>TM</sup>-Reagenz sowie das Programm am *Nucleofector*<sup>TM</sup> müssen zellspezifisch gewählt werden. Da für Monozyten bzw. Makrophagen zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch kein zellspezifisches Kit angeboten wurde, wurden die Versuche mit dem ebenfalls angebotenen Optimierungs-Kit 6857 und dem Programm U-16 durchgeführt, welches Transfektions-Raten bis 50 % (GFP-Leervektor) ermöglichte.

Zur *Nucleofection*<sup>TM</sup> wurden pro Ansatz 1 Mio Zellen verwendet, die 6 - 8 Tage zuvor frisch isoliert und in 6-wells ausgesät wurden. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 37°C warmem PBS gewaschen. 400 µl ebenfalls vorgewärmte Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA) wurden in das 6-well gegeben und die Zellen für 3 - 10 min bei 37°C inkubiert, wobei die Ablösung der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert wurde. Wenn sich der Großteil der Zellen abgelöst hatte, wurde die Trypsinaktivität durch Zugabe von 1,2 ml 37°C warmem Mono-Medium abgestoppt, die Zellen vorsichtig abgespült und in ein 15 ml Falconröhrchen transferiert. Dieses wurde 5 min bei RT und 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Das Pellet wurde in 100 µl *Nucleofector*<sup>TM</sup>-Lösung resuspendiert, 1 - 5 µg DNA in 1 - 5 µl Lösung dazugegeben und die Zellsuspension in die Küvette überführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen sofort in ein Eppendorf-Gefäß mit 500 µl vorgewärmtem Mono-Medium überführt und auf vorbereitete Coverslips (für Immunfluoreszenz) oder *Glass Bottom Dishes* (für *Live cell*-Mikroskopie) ausgesät.

## 3.8 Mikroinjektion

Alle Arbeiten mit Protein erfolgten grundsätzlich bei 4°C, auf Eis und in vorgekühlten Zentrifugen.

Das zu injizierende Protein wurde mit Mikroinjektionspuffer auf die gewünschte Endkonzentration eingestellt, die maximal bei 10 µg/µl lag, da aufgrund der Viskosität sonst die Mikroinjektionskanüle verstopfte. Zur späteren Detektion der injizierten Zellen wurde als inerte Markersubstanz Ratten-IgG (Endkonzentration 200 ng/ml) zugegeben und koinjiziert. Die Injektionslösung wurde für 30 min bei 4°C und 13.000 rpm (Biofuge *fresco*) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, um eventuell vorliegende Aggregate zu entfernen, die später zu einem Verstopfen der Mikroinjektionskanülen führen können.

Die Mikroinjektionsanlage besteht aus einem Mikroskop mit Heizring und angebautem Mikroinjektionsarm, einem Transjektor zur Druckerzeugung sowie einem angeschlossenen Computer. Das Mikroskopbild wird per Kamera auf den

Computerbildschirm übertragen und die Feinjustierung des Mikroskoparmes sowie die Injektion selbst vom Computer aus Software-unterstützt gesteuert.

Zur Injektion wurden 3  $\mu\text{l}$  Injektionslösung mit einer speziellen Pipettenspitze (*Microloader*) in die eigentliche Injektionskanüle (*Femtotip*) transferiert und diese in den Mikroinjektionsarm eingeschraubt. Die Injektion selbst erfolgt durch einen Druckpuls, der vom Transjektor über einen Schlauch an die Kanüle weitergegeben wird. Um einen durch die Kapillarkräfte hervorgerufenen Einstrom von Medium in die Injektionskanüle zu verhindern, muss ein permanenter Kompensationsdruck eingestellt werden. Der Injektionsdruck selbst muss so gewählt werden, dass er sowohl höher als dieser Haltedruck als auch der Innendruck der zu injizierenden Zellen ist.

Der *Coverslip* mit den Zellen wurde in eine Kulturschale mit ca. 2 - 4 ml Kulturmedium gestellt, diese dann in den Heizring des Mikroskops eingesetzt. Die Injektion der Zellen sowie die Bewegung der Mikroskopplattform erfolgte dann Software-gesteuert.

Es wurden pro *Coverslip* 30 - 100 Zellen injiziert, der Vorgang sollte pro *Coverslip* nicht länger als 20 min dauern, da sonst keine exakten Zeitwerte mehr genommen werden konnten. Nach der Injektion wurden die Zellen zwischen 20 min und 2 h bei 37°C nachinkubiert, damit die Zellen sich von unspezifischen, durch die Injektion *per se* hervorgerufenen Effekten erholen und sich spezifische, durch das injizierte Protein bewirkte Effekte manifestieren konnten. Anschließend wurden die Zellen fixiert und fluoreszenzgefärbt, injizierte Zellen wurden mit Hilfe des koinjizierten Markers detektiert.

## 3.9 DNA-Techniken

### 3.9.1 *Annealing* von Oligonukleotiden

Jeweils 500 pmol der synthetisierten DNA-Einzelstränge (*forward* und *revers*) wurden in 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  gegeben und 5 min auf 95°C erhitzt. Danach wurden sie in einem 60°C warmen Wasserbad langsam auf 30°C abgekühlt, wobei die Anlagerung (*Annealing*) der Einzelstränge erfolgte. Die Reaktion ergab somit 10 pmol/ $\mu\text{l}$  hybridisiertes, doppelsträngiges Produkt, das anschließend phosphoryliert wurde.

### 3.9.2 Phosphorylierung

Zur Ligation von DNA-Stücken mit Hilfe von T4-DNA-Ligase müssen beide DNA-Doppelstränge jeweils an beiden 5'-Enden phosphoryliert sein. Bei der Spaltung durch Restriktionsenzyme bleiben die Phosphatgruppen normalerweise erhalten, bei synthetisch erzeugten DNA-Strängen muss eine Phosphorylierungsreaktion der Ligation vorgeschaltet werden.

Dazu wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

Substanz	Menge
DNA ( <i>Annealing</i> -Produkt)	10 $\mu$ l (= 100 pmol)
10 x Kinasepuffer	4 $\mu$ l
Phosphonukleotidkinase	2 $\mu$ l (= 20 U)
ATP, neutralisiert (100 mM)	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	23,5 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>40 <math>\mu</math>l</b>

Dieser wurde 30 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss die DNA wieder ausgefällt.

### 3.9.3 DNA-Fällung

Zur Entfernung von Salzen und Enzymen vor der Weiterverarbeitung wurde die DNA ausgefällt. Das Reaktionsprodukt aus der vorhergehenden Reaktion (Phosphorylierung, Ligation) mit der DNA wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf ein Gesamtvolumen von 100  $\mu$ l aufgefüllt und 10  $\mu$ l NaCl 5 M sowie 250  $\mu$ l Ethanol abs. zugegeben. Die Mischung wurde nach guter Durchmischung 10 min bei –80°C inkubiert, dann bei 4°C und 13.000 rpm 20 min (Biofuge *fresco*) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in Ethanol 70 % aufgenommen und erneut 5 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Ethanols und kurzer Trocknungszeit wurde das Pellet in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen.

### 3.9.4 Ligation

Zur Ligation eines DNA-Fragments (*Insert*) in einen Vektor (Plasmid) hat sich ein *Insert*-Vektor-Mengen(Mol)-Verhältnis von 1,1 : 1 als am günstigsten herausgestellt. Da die DNA in ungünstigen Konformationen vorliegen kann, entspricht dieser theoretisch geforderte Wert nicht immer den tatsächlich verfügbaren DNA-Enden. Wir verwendeten daher in der Praxis zwei Reaktionsansätze, 10 : 1 und 1 : 1, in folgender Zusammensetzung:

Substanz	Menge
Vektor	50 ng
Insert	ca. 2,5 / 25 ng (je nach Größe)
10 x Ligasepuffer	2 $\mu$ l
T4-Ligase	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 20 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

Diese Ansätze wurden jeweils über Nacht bei 16°C inkubiert, danach die DNA ausgefällt.

### 3.9.5 Restriktionsenzym-Verdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden können. Dies macht man sich zum einen analytisch bei der Größenkontrolle von Vektoren oder DNA-Fragmenten zu Nutze, zum anderen bei der Präparation von Vektoren und *Inserts* für eine Ligation. Das Procedere ist gleich, für einen präparativen Verdau wird allerdings eine größere Menge DNA (ca. 10 µg) benötigt als für den analytischen (ca. 100 - 200 ng).

Um eine Gensequenz in einen Vektor einzuklonieren, muss dieser Vektor zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten werden wie das Fragment, um passende ("*sticky*") Enden zu bekommen. Dies geschieht normalerweise in der sogenannten „*Multiple Cloning Site*“ (=MCS), einem kurzen DNA-Stück des Vektors, das Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme enthält. Der Reaktionsansatz hierfür war:

Substanz	Menge
Vektor	10 µg
10 x Reaktionspuffer	5 µl
Restriktionsenzym	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 50 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>

Der Reaktionspuffer ist für das jeweilige Restriktionsenzym optimiert und wurde mitgeliefert, eventuell ist die Zugabe von 0,5 µl BSA notwendig. Falls mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten werden musste, wurde dies normalerweise sequentiell durchgeführt, dazwischen erfolgte eine Umpufferung mit Hilfe des „QIAquick<sup>TM</sup> PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen). Falls beide Enzyme in dem gleichen Restriktionspuffer wirksam sind, ist es jedoch auch möglich, beide Enzyme in einen Reaktionsansatz zu geben.

Der Reaktionsansatz wurde 90 min. bei 37°C inkubiert, danach 10 min. auf 65°C erhitzt, um - sofern möglich - die Enzymaktivität abzustoppen. Die DNA wurde durch Fällung aufgereinigt.

### 3.9.6 PCR

Die PCR (*Polymerase chain reaction*) dient der Vervielfältigung von DNA. Man benötigt dazu einen DNA-Strang als Matrize, *forward*- und *reverse-Primer*, eine DNA-Polymerase und einen für die Polymerase optimierten Puffer mit Nukleotiden im Überschuss.

Unser allgemeiner Reaktionsansatz war wie folgt:

Substanz	Menge
DNA	100 ng
<i>forward-Primer</i>	0,5 µl
<i>reverse-Primer</i>	0,5 µl
Taq-Polymerase	1 µl
10 x Reaktionspuffer	5 µl
Nukleotid-Mix	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	ad 50 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>

Eine Optimierung kann eventuell durch Zugabe von MgCl<sub>2</sub> oder DMSO erreicht werden.

Die DNA wird im *Thermocycler* amplifiziert, wobei zwischen 15 und 30 Zyklen notwendig waren. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

Schritt	Temperatur	Dauer
<i>denaturation</i> (Strangtrennung)	95°C	1 min
<i>annealing</i> (Primeranlagerung)	50 - 55°C	30 sec - 2 min
<i>elongation</i> (DNA-Synthese)	72°C	30 sec - 2 min

Temperatur und Dauer der einzelnen Schritte sowie Wahl der Polymerase (Deep Vent oder Qiagen) waren abhängig von den Primern und Länge der DNA.

### 3.9.7 DNA-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung von geladenen Lösungsbestandteilen in einem elektrischen Feld zu analytischen oder präparativen Zwecken.

Dazu wurde ein 1 % Agarose-Gel (0,4 / 0,7 g Agarose in 40 / 70 ml TBE 0,5 %) mit 2 / 3,5 µl Ethidiumbromid 1 % zur späteren Sichtbarmachung der DNA gegossen. Nach der Polymerisierung der Agarose wurde das Gel vollständig mit TBE 0,5 % bedeckt, je Tasche 20 µl DNA + 4 µl DNA-Marker (Bromphenol-Blau) pipettiert und zur Größenabschätzung in eine Tasche 5 µl standardisierte DNA-Leiter gegeben. Es wurde eine Spannung von 50 - 120 Volt bei 400 - 500 mA angelegt, anschließend wurde das DNA-bindende Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

### 3.9.8 Gelelution

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des „QIAquick™ Gel-Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert. Um die Konzentration zu erhöhen, wurde die DNA gegebenenfalls in der *Speedvac* eingengt.

### 3.9.9 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterien erfolgte je nach Menge entweder mit dem „QIA<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit“ oder dem „Nucleobond AX100 Midipräp Kit“, jeweils nach Angaben des Herstellers.

Endotoxin-freie Plasmid-Isolierungen wurden mit dem „Endofree<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit“ durchgeführt. Dies war notwendig für zur Transfektion verwendete Plasmide, um Endotoxine der Bakterienmembran zu entfernen. Diese können zum einen die Transfektionseffizienz drastisch verringern, zum anderen insbesondere bei den von uns verwendeten Immunzellen zu einer unspezifischen Aktivierung führen.

### 3.9.10 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$ und BL21

100 ml LB-Medium wurden mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm angeimpft und über Nacht kultiviert. 1 ml davon wurde in 1 l LB-Medium gegeben und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 schüttelnd inkubiert, anschließend die Suspension 10 min bei 6000 rpm (Centricon) zentrifugiert. Das Pellet wurde zuerst in 1 l 4°C kaltem H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> resuspendiert und 10 min zentrifugiert, dann in 0,5 l kaltem Wasser und zuletzt in 20 ml Glycerol 10 %. Das verbleibende Pellet wurde in 2 ml Glycerol 10 % aufgenommen, auf Aliquots zu je 50  $\mu$ l in Eppendorf-Gefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 3.9.11 Transformation mittels Elektroporation

Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, 2 - 5  $\mu$ l der zu transformierenden DNA zugegeben und die Suspension in vorgekühlte Küvetten pipettiert, in denen die Elektroporation bei 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F und 2,5 kV erfolgte. Danach wurden die Zellen in ein Eppendorf-Gefäß mit 1 ml LB-Medium + 20 % Glucose transferiert und 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Unterschiedliche Mengen der Suspension wurden auf Selektivagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.9.12 Bakterien-PCR

Die Bakterien-PCR diente dazu, positive Klone schnell zu identifizieren, ohne die Plasmid-DNA vorher isolieren zu müssen. Der Ansatz entspricht dem einer normalen analytischen PCR mit 50  $\mu$ l Ansatz. Es wurden 10 - 20 Bakterien-Kolonien jeweils mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, auf einer *Master*-Platte ausgestrichen und die PCR-Ansätze mit der jeweiligen Spitze kurz auf- und abpipettiert, so dass genügend Bakterien in den Ansatz gelangten. Die Ansätze wurden 5 min bei 99°C aufgeköcht, wodurch die Bakterien zerstört und die DNA freigesetzt wurde, die *Taq*-Polymerase zugegeben und die PCR gestartet. Durch die Wahl selektiver *Primer* wurde nur DNA aus positiven Klonen amplifiziert, was anschließend mittels Gelelektrophorese kontrolliert wurde. Ein positiver Klon wurde am Tag darauf von der *Master*-Platte gepickt und das Plasmid isoliert.

### 3.9.13 RNA interference

RNA interference (RNAi) ist eine Methode zum *knockdown* von Genen auf RNA-Ebene. Es ist ein physiologischer Mechanismus zum posttranskriptionellen *Silencing* von Genen, bei welcher durch kurze, sogenannte *small interfering RNAs* (siRNAs) der Abbau von mRNA und dadurch die (inkomplette) Ausschaltung eines Proteins induziert wird.

Dies lässt sich auch experimentell nachahmen, indem entweder *in vitro* synthetisierte siRNA oder siRNA-kodierende Plasmide eingesetzt werden. Wir benutzten chemisch synthetisierte siRNA, die uns in Kooperation vom ZARIT (Zentrum für die Anwendung der RNA-Interferenz-Technologie) am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie in Berlin zur Verfügung gestellt wurde. Diese wurde entweder mikroinjiziert, wobei Fluorescein-gelabeltes Dextran als Marker verwendet wurde, oder mittels *Nucleofection<sup>TM</sup>* transfiziert, wobei zur Detektion GFP-Leervektor kotransfiziert wurde. Da die Effizienz der GFP-Transfektion aufgrund der notwendigen Kern-Translokation deutlich niedriger anzusetzen ist als die siRNA-Transfektion und die siRNA außerdem in zehnfach höherer Konzentration eingesetzt wurde, konnte man davon ausgehen, dass alle GFP-produzierenden Zellen auch die siRNA enthielten.

Die Vorgehensweise entsprach jeweils dem beschriebenen Protokoll, es musste allerdings streng auf RNase freie Materialien und Arbeitsumgebung geachtet werden, da RNA generell sehr instabil ist.

### 3.9.14 DNA-Arrays

Die DNA-Arrays wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Reinhard Hoffmann, Pettenkofer-Institut, München, durchgeführt. Dazu wurde die gesamte zelluläre RNA von frisch isolierten Monozyten und von sechs Tage alten Makrophagen jeweils mit TRIzol nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA-Konzentration wurde mittels Spektrophotometrie und Gel-Elektrophorese bestimmt. Anschließend wurde die RNA nach Herstellerangaben fluoreszenzmarkiert und hybridisiert mit den *Affymetrix HumanGenome HG U133Plus Arrays*, welche 47000 Transkripte enthalten. Die Fluoreszenzintensität wurde ausgelesen und gemessen mit der Software *Affymetrix MICROARRAYSUITE version 5*. Alle Messungen wurden zweimal durchgeführt.

### 3.10 Zelllysate

Für die Detektion von Proteinen mittels *Western Blot* wurden Zelllysate primärer Makrophagen hergestellt. Dazu wurde 1 Mio. 6 - 8 Tage alte Makrophagen in 6-wells einmal mit PBS gewaschen, dann 100 µl heißer SDS-Proben-Puffer zugegeben, die Zellen mit einem *Cell lifter* abgekratzt und in ein Eppendorf-Gefäß transferiert. Dieses wurde 15 min bei 95°C schüttelnd inkubiert, dann wurde die Probe mehrmals durch eine enge Injektionskanüle gezogen und weiterverarbeitet oder mit Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

## 3.11 **Western Blot**

### 3.11.1 **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE dient - ähnlich der DNA-Gelelektrophorese - der Auftrennung von Proteinen aufgrund des Reibungskoeffizienten und damit letztlich nach ihrer Größe. Alle folgenden Angaben beziehen sich auf ein Minigel, die Werte für ein großes Gel stehen in Klammern (siehe Material).

Die in SDS-Probenpuffer vorliegenden Zellysate wurden 5 min bei 99°C schüttelnd inkubiert, anschließend wurden pro Spur 30 µl (60 µl) Lysat sowie pro Gel eine Spur mit 5 µl (15 µl) *low range prestained* Proteinmarker zur Größenabschätzung geladen. Die Elektrophorese erfolgte konstant bei 100 V (300 V), anschließend wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel in *Blotting*-Puffer äquibriert.

### 3.11.2 **Blotting**

Eine PVDF-Membran und Whatman-Papier wurden passend zum Gel zurechtgeschnitten. Die Membran wurde zum Äquilibrieren kurz in Methanol 100 % getaucht, anschließend 10 min in *Blotting*-Puffer + 20 % Methanol inkubiert und bis zum Gebrauch in *Blotting*-Puffer feucht gehalten. Der Protein-Transfer (*Blotting*) erfolgte 1 h bei 4°C mit konstant 80 V (100 V).

### 3.11.3 **Färbung**

Nach dem *Blotting* wurde die PVDF-Membran in *Blocking*-Puffer für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Membran dreimal je 5 min in TBS-T gewaschen und anschließend 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in TBS-T entfernt und die Membran für 45 min mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen und 15 min bei RT in *Super Signal<sup>®</sup> West Pico Luminol Enhancer + Super Signal<sup>®</sup> Stable Peroxide Solution* (im Verhältnis 1 : 1) inkubiert. Anschließend wurde sie in Folie eingeschweißt, zusammen mit *GLOCOS<sup>TM</sup> II Autorad Markers* je nach Stärke des Signals für unterschiedliche Zeiten auf Film gelegt und dieser danach entwickelt und fixiert.

Sollte ein weiteres Protein detektiert werden, wurde die Membran mit *Stripping*-Puffer 30 min bei 60°C entfärbt, erneut mit *Blocking*-Puffer inkubiert und mit anderen Antikörpern entsprechend geblottet.

## 3.12 Proteinexpression und Affinitätschromatographie

### 3.12.1 GST-Fusionsproteine

#### 3.12.1.1 Expression

100 ml selektives LB-Medium wurde mit Bakterien, die das zu exprimierende Plasmid enthielten, angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Davon wurde 1 ml zu 1 l selektivem LB-Medium gegeben und dieses bei 37°C bis zu einer  $OD_{600} = 0,4$  schüttelnd inkubiert, anschließend 1 mM IPTG zur Stimulation des *lac*-Promotors zugesetzt und weitere 2,5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden 5 min bei 6000 rpm (Centricon) zentrifugiert, die Pellets in 4°C kaltem PBS resuspendiert und in einem 50 ml Falconröhrchen vereinigt. Die Suspension wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und erneut 20 min. bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Pellet anschließend in 10 - 20 ml GST-Säulenpuffer + Protease-Inhibitoren gelöst.

#### 3.12.1.2 Bindung

Die Bakteriensuspension wurde mit 65 W insgesamt sechsmal für 10 sec mit Ultraschall aufgeschlossen und die Zellreste anschließend 30 min bei 35.000 rpm (Optima) abzentrifugiert. 1 - 2 ml GST-Sepharose-*Beads* wurden 3 min bei 4°C in GST-Säulenpuffer äquilibriert und danach 2 min bei 1000 rpm (Omnifuge) und 4°C zentrifugiert. Der Proteinüberstand nach der Ultrazentrifugation wurde auf die *Beads* gegeben und 1 h bei 4°C inkubiert, anschließend fünfmal mit GST-Säulenpuffer und einmal mit Thrombinpuffer gewaschen.

#### 3.12.1.3 Elution

Zur Aufreinigung des Fusionsproteins wurden die *Beads* mit dem gebundenen Fusionsprotein sechs- bis achtmal mit 1 ml Thrombinpuffer + 10 mM Glutathion eluiert. Dazu wurden sie jeweils vier- bis sechsmal mit der Puffer/Glutathion-Lösung gevortext und anschließend 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. Die Überstände wurden gepoolt und dreimal 2 h gegen Mikroinjektionspuffer dialysiert.

#### 3.12.1.4 Spaltung und Isolierung

Wurde das reine Protein ohne GST-Anteil benötigt, wurde dieser mit Thrombin abgespalten. Dazu wurden die *Beads* mit dem gebundenen Fusionsprotein 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit 2 U Thrombin pro ml *Beads* inkubiert. Anschließend wurden die *Beads* viermal 5 min bei 5000 rpm (Omnifuge) abzentrifugiert, jeweils in 2 ml Thrombinpuffer resuspendiert und die Überstände gepoolt. Um das Thrombin zu entfernen, wurden 100 µl p-Aminobenzamidin-*Beads* zu dem Überstand zugegeben und 1 h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die p-Aminobenzamidin-*Beads* mit dem gebundenen Thrombin bei 3000 rpm abzentrifugiert und der Überstand gegen Mikroinjektionspuffer dialysiert.

## 3.12.2 Antikörper-Herstellung

### 3.12.2.1 Umklonierung

Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit kein Immunfluoreszenz-tauglicher LIMK-Antikörper kommerziell erhältlich war, wurde von uns ein eigener Antikörper gegen die LIM-Domänen von LIMK1 generiert.

Es wurde zunächst versucht, die Domäne als GST-Fusionsprotein in *E.coli* zu exprimieren, was jedoch nicht gelang. Deshalb wurde die Domäne in zwei andere Expressionsvektoren umkloniert, pMAL-p2X und pTYB1, wobei sich die Expression des pMAL-Plasmids als am effizientesten herausstellte, so dass wir die Domäne schließlich als MBP-Fusionsprotein exprimieren ließen.

### 3.12.2.2 Expression und Bindung

Diese wurde analog zur Expression von GST-Fusionsproteinen durchgeführt, zur Amylasehemmung wurde zusätzlich Glucose das Bakterienmedium gegeben. Statt der GST-Sepharose-Beads wurde Amylose-Resin verwendet, das in MBP-Säulenpuffer gelöst und gewaschen wurde, die Elution erfolgte mit [MBP-Säulenpuffer, 10 mM Maltose]. Anschließend wurde gegen MBP-Dialysepuffer dialysiert, um die Maltose zu entfernen, das Protein auf eine Konzentration von 5 - 10 µg/µl eingengt und erneut dialysiert, um die Ionenkonzentration auszugleichen.

### 3.12.2.3 Spaltung und Isolierung

Die Abspaltung des MBP-Anteils vom Protein geschah durch 6 h Inkubation mit Faktor Xa (1 µl pro 75 µg Protein). Zur Entfernung des MBP-Anteils und von Faktor Xa wurde die Lösung anschließend auf einem Tricin-Gel aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Mörser zerkleinert. Die Immunisierung der Kaninchen mit der so gewonnen Proteinlösung erfolgte durch die Firma *pab productions* (Hebersthausen, D), die uns anschließend das Serum mit den Antikörpern zurücklieferte.

## 3.12.3 Protein-Mengenbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit dem BIO-RAD Protein *Microassay* durchgeführt. Dazu wurden 200 µl *Dye Reagent Concentrate* zu 800 µl Probe gegeben, als Nullwert wurden 800 µl reiner Puffer eingesetzt. Die Lösungen wurden gevortext, für 5 min bis 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend im Photometer die Absorption bei 595 nm bestimmt. Aus einer Eichkurve mit BSA in den Konzentrationen 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml und 20 µg/ml wurden die Proteinkonzentrationen ermittelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zielsetzung der Arbeit

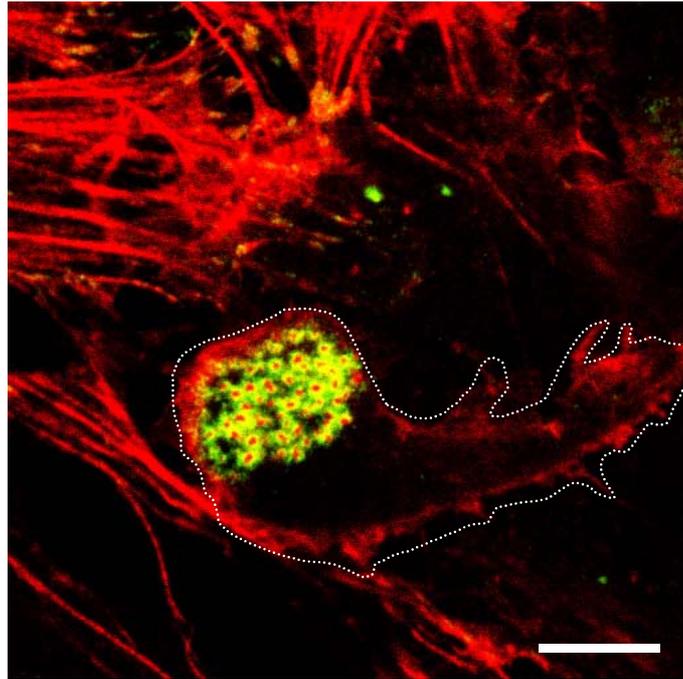
Podosomen sind punktförmige Adhäsionsstrukturen, die aus einem Aktin-reichen Kern und einer umgebenden Ringstruktur bestehen, welche typische adhäsionsvermittelnde Proteine wie Vinculin, Talin und Paxillin enthält (Linder et al., 2003a). Charakteristisch für Podosomen ist eine hohe Dynamik, die eine rasche Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung voraussetzt. Essentiell für die Podosomen-Bildung ist die durch Cdc42 und WASP vermittelte Aktin-Nukleation mittels Arp2/3-Komplex (Linder et al., 2000b). Ziel dieser Arbeit war es, weitere Regulationsmechanismen zu finden, die insbesondere beim Podosomen-Abbau eine Rolle spielen könnten. Dabei war Cofilin als zentraler Regulator der Aktin-Depolymerisation und -Dynamik von besonderem Interesse.

### 4.2 Vorbemerkung

Zu Beginn der Experimente bestand keine Möglichkeit, primäre humane Makrophagen effizient zu transfizieren (Rate < 0,1 %). Dadurch war auch die Möglichkeit zum *live cell imaging* nicht gegeben und die Untersuchung der Podosomen-Dynamik nur eingeschränkt möglich. Zur zellulären Lokalisation von Proteinen wurden hauptsächlich Immunfluoreszenz-Färbungen an fixierten Präparaten benutzt, weshalb unter anderem viel Zeit in die Herstellung eines Immunfluoreszenz-tauglichen Antikörpers gegen LIMK1 investiert wurde. Mit Hilfe der *Nucleofector*<sup>TM</sup>-Technik (siehe Methoden, 3.7.2), die gegen Ende dieser Arbeit eingeführt wurde und erstmals die effektive Transfektion von primären Makrophagen ermöglichte, konnten alte Ergebnisse überprüft, unter neuen Aspekten untersucht und auch ganz neue Erkenntnisse gewonnen werden. Die Ergebnisse der Arbeit werden daher im folgenden nicht chronologisch, sondern im funktionellen Kontext dargestellt.

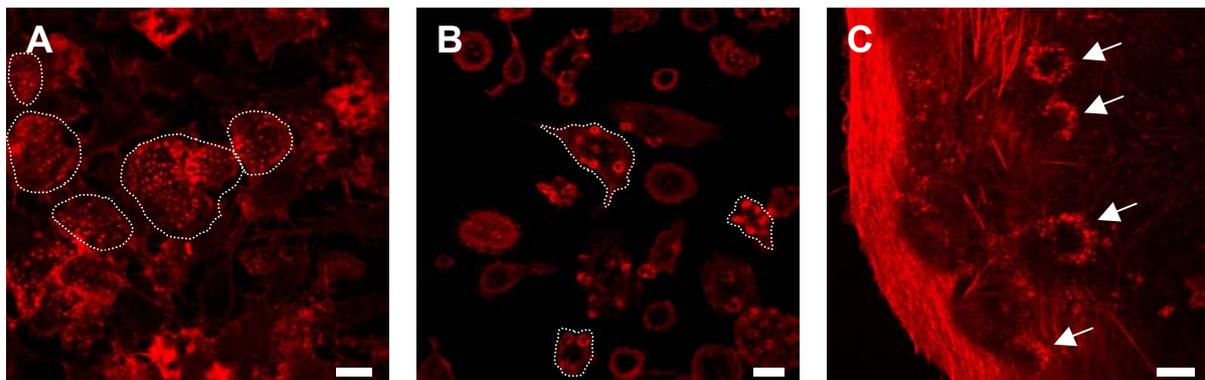
### 4.3 Physiologische Relevanz von Podosomen

Die Eigenschaften des Substrates bzw. des umgebenden Gewebes beeinflussen maßgeblich die Zellform und Adhäsion, und Zellen können auf flexibler Matrix völlig andere Adhäsionsstrukturen ausbilden als auf hartem Untergrund, wie z.B. den künstlichen Oberflächen in Zellkultur (Pelham, Jr. et al., 1998). Es wurde bereits gezeigt, dass Osteoklasten auch auf Knochenlamellen (Zamboni-Zallone et al., 1988) und Natürliche Killerzellen auf Endothelzellen (Allavena et al., 1991), Podosomen ausbilden. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch Makrophagen, die auf einem Monolayer von Endothelzellen ausgesät wurden, Podosomen ausbilden (Abb. 4.1). Diese unterschieden sich morphologisch nicht von den Podosomen der Makrophagen, die auf Glas-Coverslips ausgesät wurden. Sie zeigten ebenfalls die Aktin-reiche Kernstruktur und den Ring aus Vinculin und konzentrierten sich am *leading edge* migrierender Zellen. Dies ist ein wichtiger Hinweis dafür, dass Podosomen tatsächlich physiologisch relevante Strukturen sind und höchstwahrscheinlich auch *in vivo* ausgebildet werden.



**Abb. 4.1: Podosomen sind physiologische Strukturen**

Überlagerung konfokalmikroskopischer Aufnahmen eines Makrophagen, ausgesät auf einem *monolayer* von humanen Endothelzellen (HUVECs) als Gefäßwandmodell; Färbung von F-Aktin (rot) und Vinculin (grün), weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$



**Abb. 4.2: Podosomen-ähnliche Strukturen werden von verschiedenen Zelltypen ausgebildet**

Konfokalmikroskopische Aufnahmen Aktin-gefärbter Zellen, weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$

- |                 |                                      |
|-----------------|--------------------------------------|
| (A) J-774:      | murine Makrophagen                   |
| (B) U-937:      | humane Lymphoblasten                 |
| (C) MDA-MB-231: | humane Brustkrebszellen (Ausschnitt) |

Auf der Suche nach einer Zelllinie, die sich transfizieren und als Modellsystem für die Untersuchung der Podosomen-Dynamik nutzen ließe, konnten auch in weiteren Zelltypen Podosomen-ähnliche Strukturen nachgewiesen werden. So finden sich in J-774-Zellen (murine Makrophagen-Zelllinie) podosomale Strukturen (Abb. 4.2A), die sich bei polarisierten Zellen am *leading edge* konzentrierten, wie das für Podosomen typisch ist. MDA-MB-231-Zellen (epitheliale humane Zellen aus einem Adenokarzinom der Brust) bilden teilweise rosettenförmige Strukturen aus (Abb. 4.2C). Diese weisen große Ähnlichkeit mit den Rosettenstrukturen von transformierten Fibroblasten auf, die ihrerseits aus aggregierenden Podosomen entstehen (Gavazzi et al., 1989). In U937-Zellen (humane Lymphoblasten aus einem Lymphompatienten) ließen sich ringförmige Strukturen nachweisen (Abb. 4.2B), die möglicherweise eine Mittelstellung einnehmen zwischen klassischen Podosomen und Rosetten.

Diese Befunde sind ein Hinweis für die weite Verbreitung podosomaler Strukturen und lassen ebenfalls auf eine physiologische Bedeutung schließen. Für die weitere Untersuchung der Podosomen-Dynamik mit Hilfe von Zelllinien war die Gesamtzahl der Zellen, die jeweils podosomale Strukturen ausbildeten, jedoch zu gering, so dass die weiteren Experimente mit primären humanen Makrophagen durchgeführt wurden. Bei diesen beträgt der Anteil von Podosomen-haltigen Zellen innerhalb einer Kultur mehr als 95 %.

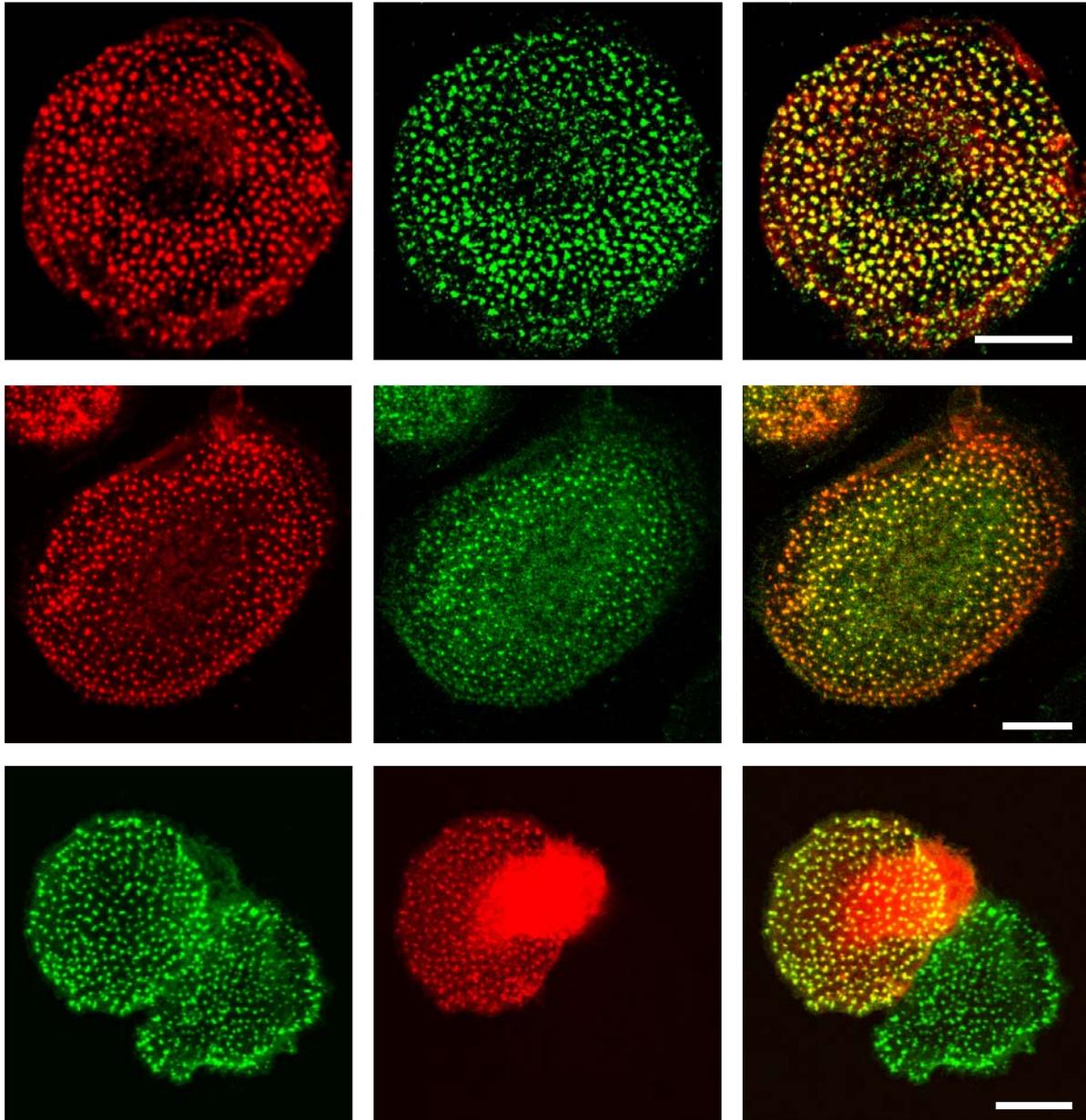
## 4.4 Rolle von Cofilin bei der Podosomen-Regulation

Cofilin ist ein Aktin-bindendes Protein, das die Depolymerisierung von Aktin-Filamenten beschleunigt. Je nach Verteilung und Gleichgewicht mit anderen Proteinen kann dies zu einem Netto-Abbau von Aktin-Filamenten führen oder zu einem erhöhten Umsatz und größerer Dynamik des Aktin-Zytoskelettes (Maciver et al., 1998). Cofilin ist in den meisten Zellen diffus verteilt (Yonezawa et al., 1987), lokalisiert in stimulierten Zellen jedoch bevorzugt zu Orten hoher Aktin-Dynamik. So wurde Cofilin z.B. in Lamellipodien (Dawe et al., 2003), *ruffles* (Arai et al., 2003) und am *leading edge* polarisierter Zellen (Bailly et al., 2003) nachgewiesen.

### 4.4.1 Lokalisation von Cofilin und Phospho-Cofilin in Podosomen

Durch Anfärbung fixierter Zellen mit einem Cofilin- und einem Phospho-Cofilin-spezifischen Antikörper und anschließender Konfokalmikroskopie konnte gezeigt werden, dass nahezu der gesamte Cofilin-Bestand primärer humaner Makrophagen in den Podosomen zu finden ist (Abb. 4.3, obere und mittlere Reihe). Dieser Befund konnte auch durch Transfektion eines fluoreszenzmarkierten Cofilin-*dsRedII*-Fusionskonstruktes bestätigt werden. Dieses wurde mittels *Nucleofection*<sup>TM</sup> in die Zellen eingebracht, die Zellen für 24h inkubiert, anschließend fixiert und eine Aktin-Färbung mit Alexa-488 Phalloidin durchgeführt. Der Großteil des fluoreszierenden Proteins befand sich ebenfalls fast ausschließlich in den Podosomen (Abb. 4.3, untere Reihe).

Diese spezifische Lokalisation weist auf die Beteiligung von Cofilin an der Regulation der Podosomen-Dynamik hin, die im folgenden genauer untersucht wurde.



**Abb. 4.3:** Cofilin und Phospho-Cofilin sind in der Podosomen-Kernstruktur lokalisiert

Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer Makrophagen

Die Überlagerung der Aufnahmen jeweils in der rechten Spalte zeigt in gelb eine Kolokalisation der angefärbten Moleküle; weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$

*obere Reihe:* Färbung von F-Aktin (rot) und Cofilin (grün)

*mittlere Reihe:* Färbung von F-Aktin (rot) und Phospho-Cofilin (grün)

*untere Reihe:* Färbung von F-Aktin (grün) eines mit Cofilin-dsRedII (rot) transfizierten und nach 24 h fixierten Makrophagen

#### 4.4.2 Phosphorylierung von Cofilin

Wie bereits erwähnt, ist die Bildung von Podosomen Tyrosin-Kinasen-abhängig. Durch Blockierung der Tyrosin-Phosphorylierung durch Zugabe des Tyrosin-Kinase-Inhibitors PP2 (25  $\mu\text{M}$ ) für 1h in serumfreies Medium lassen sich die Podosomen von Makrophagen beinahe vollständig zerstören (Abb. 4.4). Der Serum-Entzug alleine hat dabei im beobachteten Zeitraum bis 2h keine Auswirkungen auf die Podosomen-Anzahl. Nach Auswaschen von PP2 kommt es innerhalb von 60 min zur Rekonstitution der Podosomen in ca. 80% der Zellen, bei längerer Inkubation bilden fast alle Zellen wieder Podosomen aus. Somit eignet sich dieses Verfahren gut als Modell zur Untersuchung der Podosomen-Bildung und der dabei beteiligten Regulationsmechanismen (Linder et al., 2000a). Die Blockierung der Tyrosin-Kinasen dient dabei nur als Mittel zur Podosomen-Zerstörung und hat - soweit bekannt - keinen direkten Einfluss auf die Phosphorylierung von Cofilin und dessen Regulatoren. Ein ähnlicher Effekt lässt sich z.B. auch durch Cytochalasin erreichen.

Es konnte damit gezeigt werden, dass die Anzahl von Podosomen in diesem Modell mit dem Grad der Cofilin-Phosphorylierung korreliert. Dazu wurden Zelllysate von sieben Tage alten Makrophagen hergestellt, die entweder unbehandelt waren, eine Stunde mit PP2 (25 $\mu\text{M}$ ) inkubiert wurden oder nach PP2 Behandlung und Auswasch eine Stunde nachinkubiert wurden. Anschließend wurde eine *Western-Blot*-Analyse mit Anti-Phospho-Cofilin-Antikörper durchgeführt. Diese zeigt, dass die Phosphorylierung von Cofilin nach PP2-Behandlung deutlich zurückgeht, nach dem Auswasch und einer Stunde Nachinkubation aber wieder circa auf den Ausgangswert ansteigt (Abb. 4.4, E). Diese Korrelation von phosphoryliertem Cofilin mit der Anzahl an Podosomen ist ein weiterer Hinweis auf die Funktion von Cofilin bei der Podosomen-Regulation.

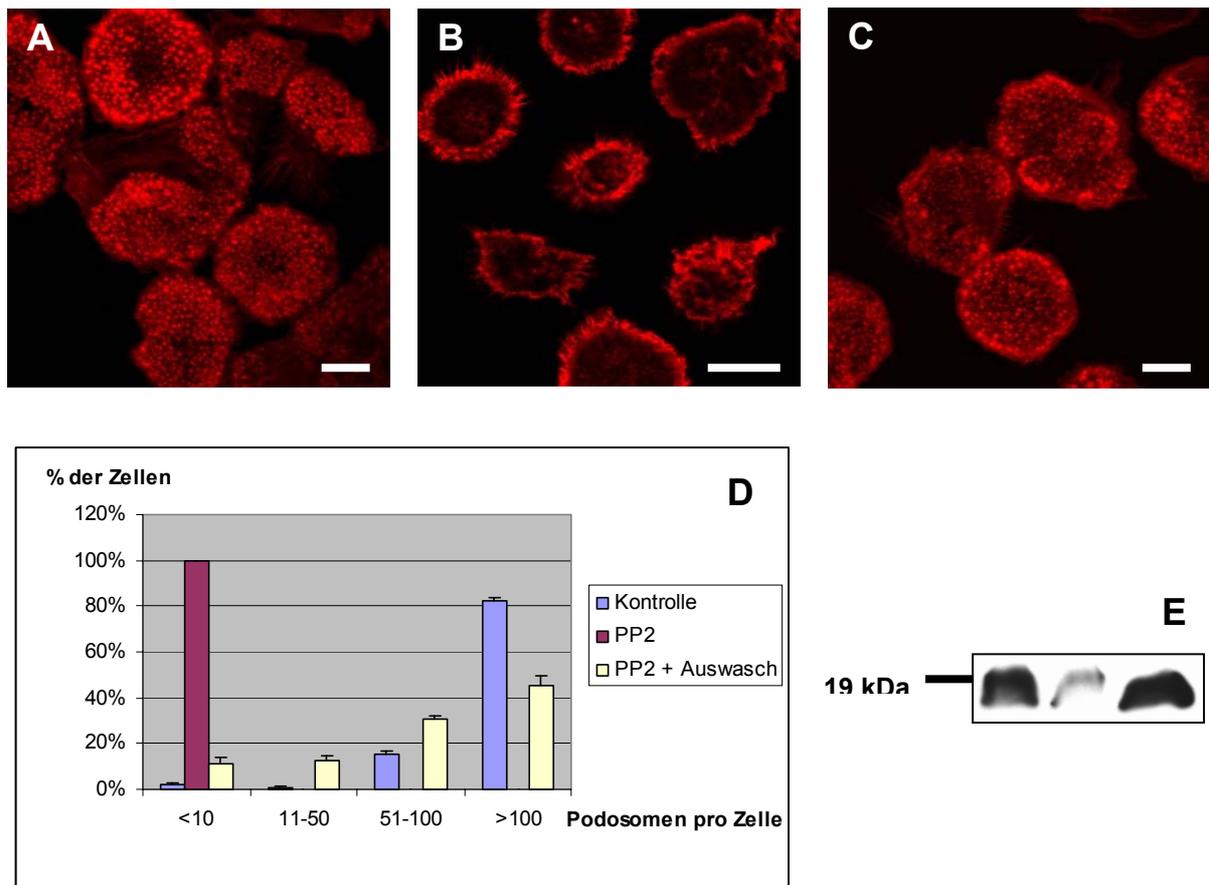
#### 4.4.3 Mikroinjektion eines Cofilin-Peptids

Bei der Mikroinjektion von Makrophagen kommt es bei entsprechend hoch gewählten Injektionsdruck zu einem temporären Verlust der Podosomen. Dieses Artefakt ist innerhalb von ca. 40 min vollständig reversibel und kann darum genutzt werden, die Wirkung von potentiell effektorischen Peptiden oder Proteinen auf die Podosomen-Rekonstitution zu untersuchen. Als Kontrolle dient dabei die Injektion mit reiner Markersubstanz bzw. GST.

Es wurde der Effekt eines kurzes Peptides untersucht, welches aus den N-terminalen 13 Aminosäuren von Cofilin (Cof-S3) besteht und die Kinase-Aktivität von LIMK1 inhibiert (Aizawa et al., 2001; Nishita et al., 2002). Dazu wurden zwei synthetisierte Einzelstrang-Oligonukleotide *annealt* und in den Vektor pGEX-2T kloniert. Das entsprechende GST-Fusionspeptid wurden in *E. coli DH5a* exprimiert und das Protein aufgereinigt (Abb. 4.8B). Um festzustellen, ob das Cof-S3-Peptid in Volllänge von *E. coli* exprimiert wurde, wurde die Größe dieses Konstruktes per Massenspektroskopie kontrolliert (Abb. 4.8C). Das Ergebnis entsprach dem berechneten Molekulargewicht.

Das GST-Fusionsprotein wurde mikroinjiziert, die Zellen nach ca. 40 min fixiert und die Podosomen-Rekonstitution mikroskopisch ausgewertet. Dabei zeigte sich

eine gegenüber GST-Injektion reduzierte Podosomen-Reformation (Abb. 4.9B). Auch dies spricht für eine Beteiligung der Cofilin-Phosphorylierung bei der Podosomen-Bildung.



**Abb. 4.4:** PP2 führt zur reversiblen Podosomen-Zerstörung und verminderter Cofilin-Phosphorylierung

(A) - (C) konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer Makrophagen, (A) unbehandelt, (B) nach 1h Inkubation mit PP2 (25  $\mu$ M) und (C) nach Auswaschen von PP2 und 1h Nachinkubation; (D) Podosomenzahl pro Zelle unbehandelt, nach PP2-Behandlung und nach PP2-Auwasch; (E) Western Blot, Detektion von Phospho-Cofilin in unbehandelten Zellen, nach PP2-Behandlung und nach PP2-Auswasch; weißer Balken: 10  $\mu$ m

## 4.5 Bedeutung von LIM-Kinasen für die Podosomen-Regulation

Die Phosphorylierung von Cofilin wird durch wenige spezifische Kinasen vermittelt. Bekannt sind bisher die sogenannten LIM-Kinasen LIMK1 und LIMK2 und die ausschließlich testikulär vorkommenden Kinasen TESK1 und TESK2 (Mizuno et al., 1994; Toshima et al., 1995; Osada et al., 1996; Rosok et al., 1999). Die Phosphorylierung von Cofilin durch eine weitere Kinase, NRK/NESK, wurde bisher nur einmal in der Literatur beschrieben (Nakano et al., 2003). Nachdem Cofilin und Phospho-Cofilin in Podosomen nachgewiesen worden waren, sollte im folgenden untersucht werden, ob und wie LIM-Kinasen an der Cofilin-abhängigen Podosomen-Regulation beteiligt sind.

### 4.5.1 Nachweis von LIMK1-mRNA in Monozyten

Vor Beginn dieser Arbeiten war in unserer Arbeitsgruppe bereits mittels *Reverse Transcriptase PCR* (RT-PCR) gezeigt worden, dass LIMK1 in Monozyten vorhanden ist (Hufner K. et al, unveröffentlicht). Dazu wurde mRNA aus drei und neun Tage alten Monozyten/Makrophagen isoliert und als Matrize für RT-PCR mit LIMK-spezifischen *Primern* eingesetzt. Es wurden drei Klone gefunden, welche die erwartete Länge aufwiesen (Abb. 4.5). Die anschließende Sequenzierung und ein Datenbankvergleich zeigte, dass es sich in allen drei Fällen um LIMK1-spezifische Sequenzen handelte.

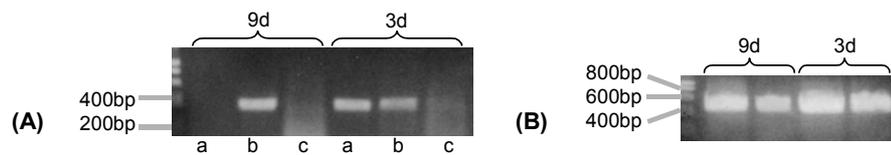
Dies war insofern überraschend, als für LIMK1 bisher eine überwiegend neuronale Expression beschrieben war, während LIMK2 ubiquitär vorhanden ist. Es korreliert jedoch gut mit neueren Befunden, die auch für LIMK1 eine weit verbreitete Expression nachgewiesen haben (Foletta et al., 2004). Bestätigt wurde dieser Befund zusätzlich durch die Ergebnisse eines durchgeführten *DNA-Arrays*, wo ein deutlicher Anstieg der Expression von LIMK1 im Verlauf der Makrophagenreifung zu sehen war (siehe Anhang, 9.6).

### 4.5.2 Herstellung eines LIMK1-spezifischen Antikörpers

Da zu Beginn der Arbeit Monozyten bzw. Makrophagen nicht transfiziert werden konnten und der damals kommerziell erhältliche Antikörper nicht Immunfluoreszenz-tauglich war, wurde beschlossen, einen eigenen Antikörper gegen LIMK1 herzustellen.

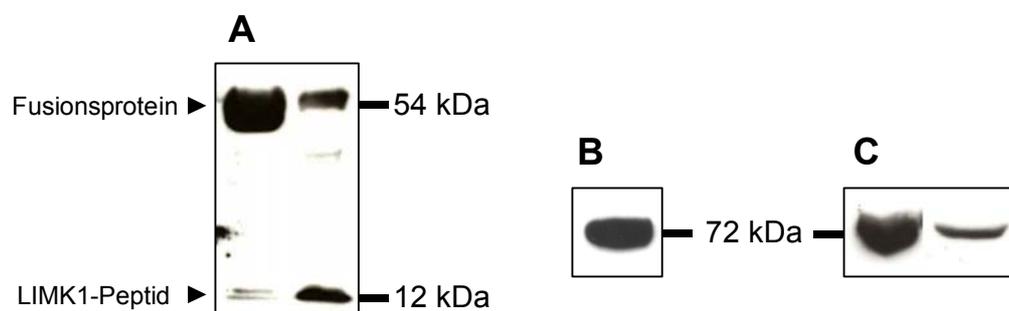
Von Kensaku Mizuno (Tohoku Universität, Sendai, Japan) wurden uns freundlicherweise verschiedene Glutathion-S-Transferase-(GST-) gekoppelte LIMK1-Konstrukte zur Verfügung gestellt. Um eine hohe Spezifität des Antikörpers zu erreichen, wurde zur Antigen-Herstellung ein Konstrukt gewählt, das nur die beiden LIM-Domänen enthielt, da diese Domänen die größten Sequenzunterschiede zwischen LIMK1 und LIMK2 aufweisen.

Dieses wurde in *E. coli DH5a* transfiziert und exprimiert. Die Menge des gewonnenen Volllänge-GST-Fusionsproteins war allerdings extrem gering, zudem wurden in der SDS-PAGE etliche kleinere Banden gesehen, was zur Vermutung führte, dass die Bakterien das Genprodukt abbauten. Die praktische Erfahrung in unserem Labor hat gezeigt, dass ein Wechsel des Expressions-*tags* (z.B.MBP



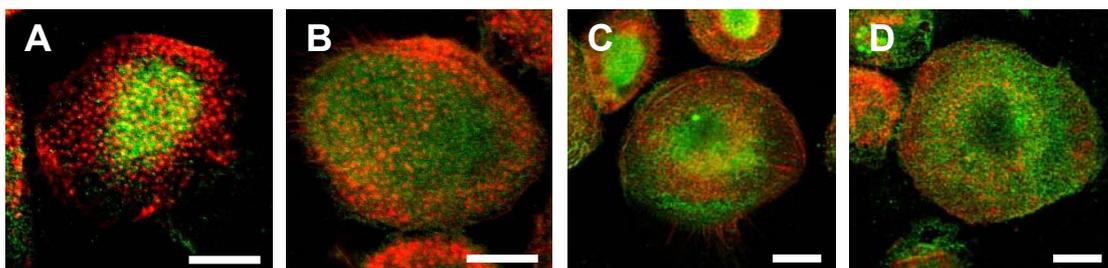
**Abb. 4.5: LIMK1-mRNA ist in Makrophagen vorhanden**

Agarose-Gel nach RT-PCR, mit Ethidiumbromid gefärbt. Primäre humane Monozyten/Makrophagen wurden für 3 bzw. 9 Tage kultiviert. Danach wurde mRNA isoliert und in verschiedenen Konzentrationen (a, b, c) für RT-PCR eingesetzt. Diese wurde entweder mit (A) LIMK1-spezifischen Primern durchgeführt oder (B) als Kontrolle mit Aktin-spezifischen Primern. Die erwartete Produktgröße für LIMK war 385bp, für Aktin 446bp (cDNA) bzw. 652bp (genomische DNA)



**Abb. 4.6: Western Blots mit LIMK-Antikörpern**

- (A) + (B) mit selbst hergestelltem Antikörper gegen LIMK1-LIM-Domänen
- (A) links LIM-MBP-Fusionsprotein, rechts nach Spaltung
- (B) Monozyten-Lysat
- (C) nach Immunpräzipitation von Monozyten-Lysaten mit kommerziellen Antikörpern, spezifisch für LIMK1 (links) bzw. LIMK2 (rechts)



**Abb. 4.7: LIMK1 und LIMK2 zeigen keine Podosomen-Lokalisation**

Konfokalmikroskopische Aufnahmen primärer Makrophagen, jeweils Färbung von LIM-Kinase (grün) und Aktin (rot);  
 (A) selbst hergestellter LIMK1-Antikörper, (B)-(D) kommerzielle Antikörper gegen (B) LIMK1, (C) LIMK2 und (D) Phospho-LIMK; Fixierung und Lyse jeweils mit FA/Aceton, andere Fixierungen (Methanol, FA/Triton, PHEM-Puffer) wurden ebenfalls getestet und zeigten ähnliche Resultate; weißer Balken: 10 μm

statt GST) oftmals zu einer Stabilisierung des Genprodukts führt. Deshalb wurden die LIM-Domänen in den Vektor pMAL-p2X umkloniert, dessen Expression ein an *maltose-binding protein* (MBP) gekoppeltes Protein ergibt. Dieses wurde wiederum in *E. coli* transfiziert und exprimiert. In der SDS-PAGE zeigte sich daraufhin eine deutliche Verringerung des Abbaus, so dass genügend Protein zur weiteren Aufreinigung zur Verfügung stand.

Das Fusionsprotein wurde mit Hilfe des MBP-Anteils isoliert. Da das Peptid zur Immunisierung verwendet werden sollte, musste dieser dann mit Faktor Xa abgespalten werden. Die geringe Größe des Fusionsanteils erschwerte jedoch die genaue Auftrennung der Banden im niedermolekularen Bereich einer SDS-PAGE, weshalb schließlich ein Tricin-Gel benutzt wurde. Nach der Aufreinigung wurde die Peptidlösung an die Firma *pab productions* (Hebertshausen, D) weitergegeben, welche die Immunisierung der Kaninchen übernahm.

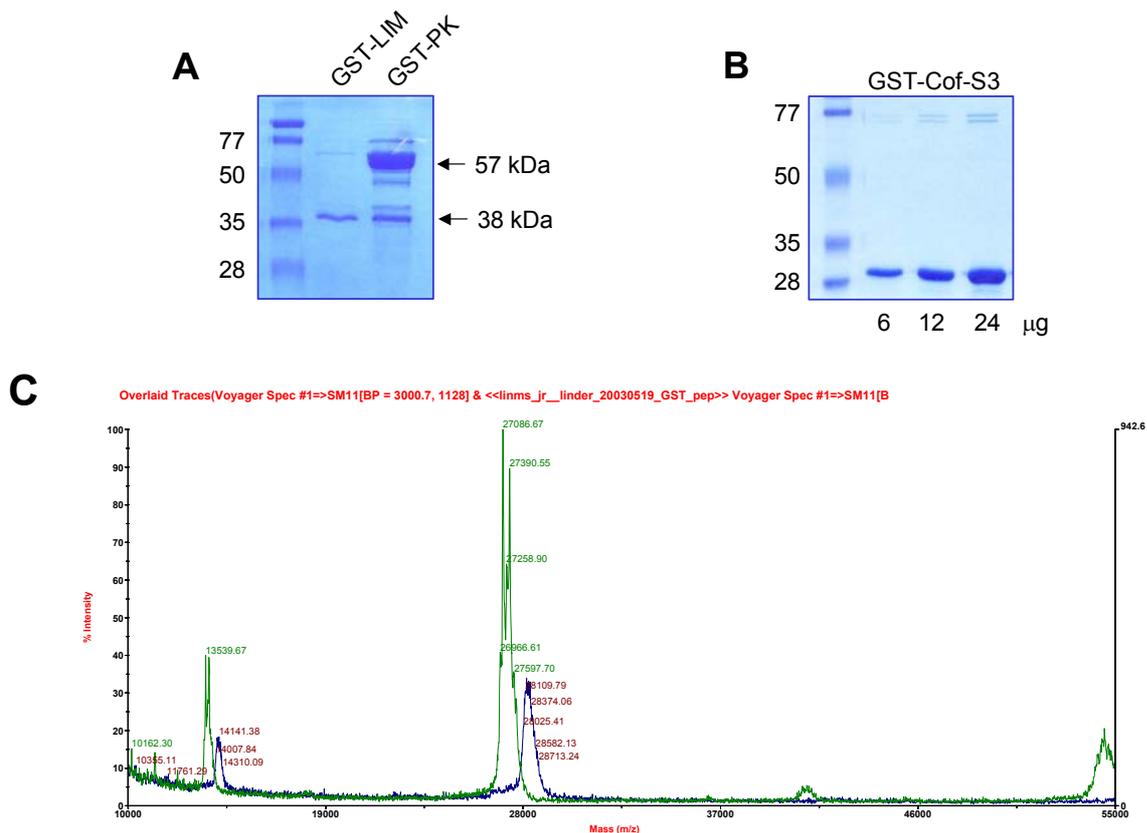
*Western Blot* Versuche zeigten, dass mit dem erhaltenen Serum das Antigen, also die rekombinanten LIM-Domänen von LIMK1, detektiert werden konnte (Abb. 4.6A). Auch in Zelllysaten von Makrophagen wurde ein Protein der erwarteten Größe detektiert (Abb. 4.6B). Eine Differenzierung zwischen LIMK1 und LIMK2 war aber aufgrund des geringen Größenunterschiedes zwischen diesen beiden Isoformen nicht möglich. Mit neuen, inzwischen kommerziell erhältlichen, spezifischen Antikörpern konnte jedoch sowohl LIMK1 als auch LIMK2 gefunden werden, LIMK1 aber in deutlich größerer Menge (Abb. 4.6C). Dies ist - zusammen mit dem Befund aus der RT-PCR und den DNA-Arrays - ein starker Hinweis, dass LIMK1 nicht nur in neuronalen, sondern auch in hämatopoetischen Zellen die dominante Isoform ist.

In Immunfluoreszenz-Färbungen konnte allerdings mit dem eigenen Antikörper auch mit verschiedenen Zell-Fixations-Methoden keine spezifische intrazelluläre Lokalisation von LIMK1 nachgewiesen werden, ebensowenig mit neuen, spezifischen Antikörpern gegen LIMK1, LIMK2 und Phospho-LIMK (Abb. 4.7).

### 4.5.3 Mikroinjektion von LIMK1-PK

Zur Untersuchung des Einflusses der Cofilin-Phosphorylierung mittels LIMK auf die Podosomen-Regulation wurde die konstitutiv aktive Kinase-Domäne von LIMK1 (LIMK1-PK) verwendet (Nishita et al., 2002). LIMK1-PK war uns als GST-Konstrukt von Kensaku Mizuno (Tohoku Universität, Sendai, Japan) freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Das Fusionsprotein wurde in *E. coli DH5a* exprimiert und über eine Säule aufgereinigt (Abb. 4.8A).

Bei der Mikroinjektion wurde wieder das bereits beschriebene Artefakt der temporären Podosomen-Zerstörung durch einen geeigneten Injektionsdruck genutzt, um den Einfluß des injizierten Proteins auf die Podosomen-Reformation zu untersuchen. Dazu wurde das GST-Fusionsprotein mikroinjiziert, die Zellen nach ca. 40 min fixiert und die Podosomen-Rekonstitution mikroskopisch ausgewertet. Dabei zeigte sich eine deutliche Reduktion der Anzahl neu gebildeter Podosomen gegenüber den GST-injizierten Zellen, der Effekt war noch stärker als bei der Injektion des Cof-S3-Peptides. (Abb. 4.9C). Da sowohl die Inhibition durch das injizierte Cof-S3-Peptid als auch die Injektion von LIMK1-PK zu einer Störung der Podosomen-Bildung führt, scheint ein genau austariertes Gleichgewicht der Cofilin-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung notwendig zu sein.

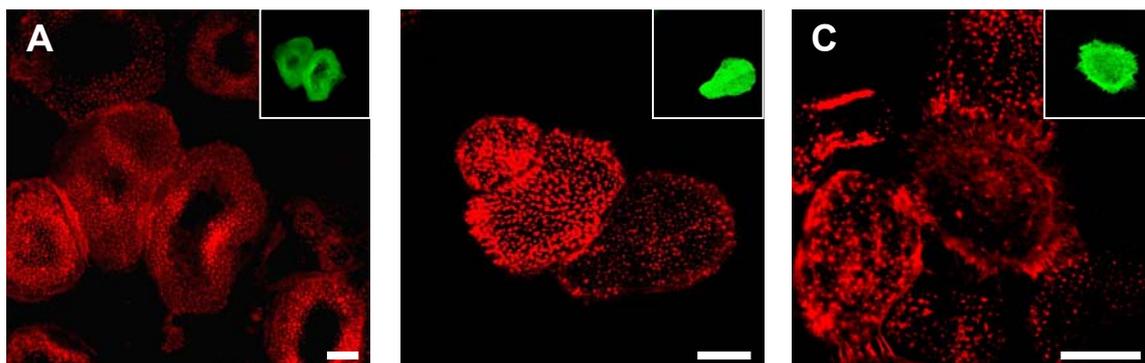


**Abb. 4.8:** Herstellung zweier GST-Fusionskonstrukte zur Mikroinjektion

(A) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit LIMK1-PK-GST

(B) Coomassie-gefärbtes SDS-Gel mit Cof-S3-GST

(C) Massenspektroskopie Cof-S3-GST,  
erwartete Größe für GST-Fusionsprotein: 27684g/mol

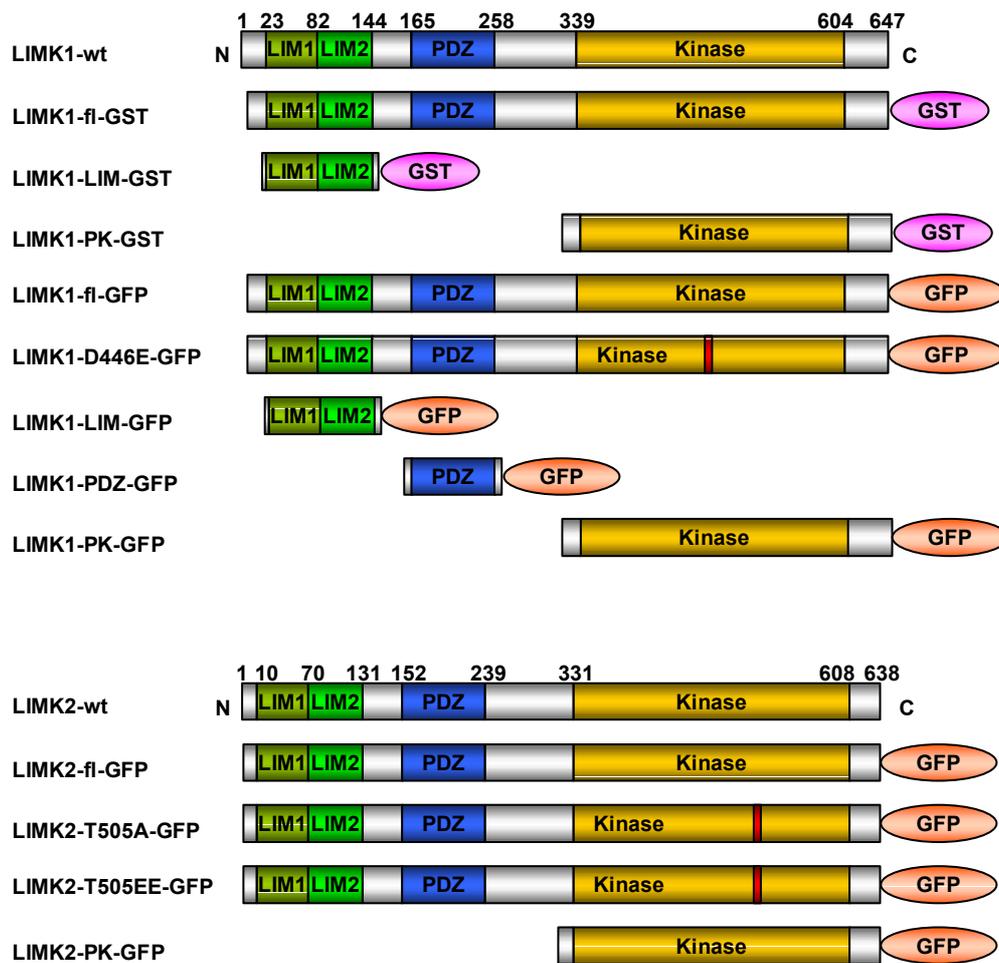


**Abb. 4.9:** Mikroinjektion eines Cofilin-Peptids (Cof-S3) oder einer LIMK1-Domäne (LIMK1-PK) reduziert die Podosomen-Neubildung

konfokalmikroskopische Aufnahmen injizierter Zellen, 40min. nachinkubiert, Färbung von Aktin (rot) und Ratten-IgG (Insets, grün) als Injektionsmarker

(A) GST Kontrolle (B) Cof-S3 (C) LIMK1-PK

weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$



**Abb. 4.10:** Schematische Darstellung der LIM-Kinase-Konstrukte

LIM1/LIM2: "Zinkfinger"-Domäne (Protein-Protein-Interaktion)

PDZ: Protein-Protein-Interaktions-Domäne

PK / Kinase: enthält aktives Zentrum sowie regulatorische Phosphorylierungsstelle

GST: Glutathion-S-Transferase

GFP: *green fluorescent protein*

wt: *wildtype* (Wildtyp)

fl: *full length* (Volllänge)

D446E: Austausch von Asp zu Glu an der Position 446, dem katalytischen Zentrum, inaktiviert die Kinase-Fähigkeit

T505A: Austausch von Thr zu Ala an der Position 505, der regulatorischen Phosphorylierungsstelle, führt zu Inaktivierbarkeit

T505EE: Austausch von Thr zu zwei Glu an der Position 505 imitiert eine Phosphorylierung und führt zu gesteigerter Aktivität

#### 4.5.4 Überexpression von LIMK1 und LIMK2

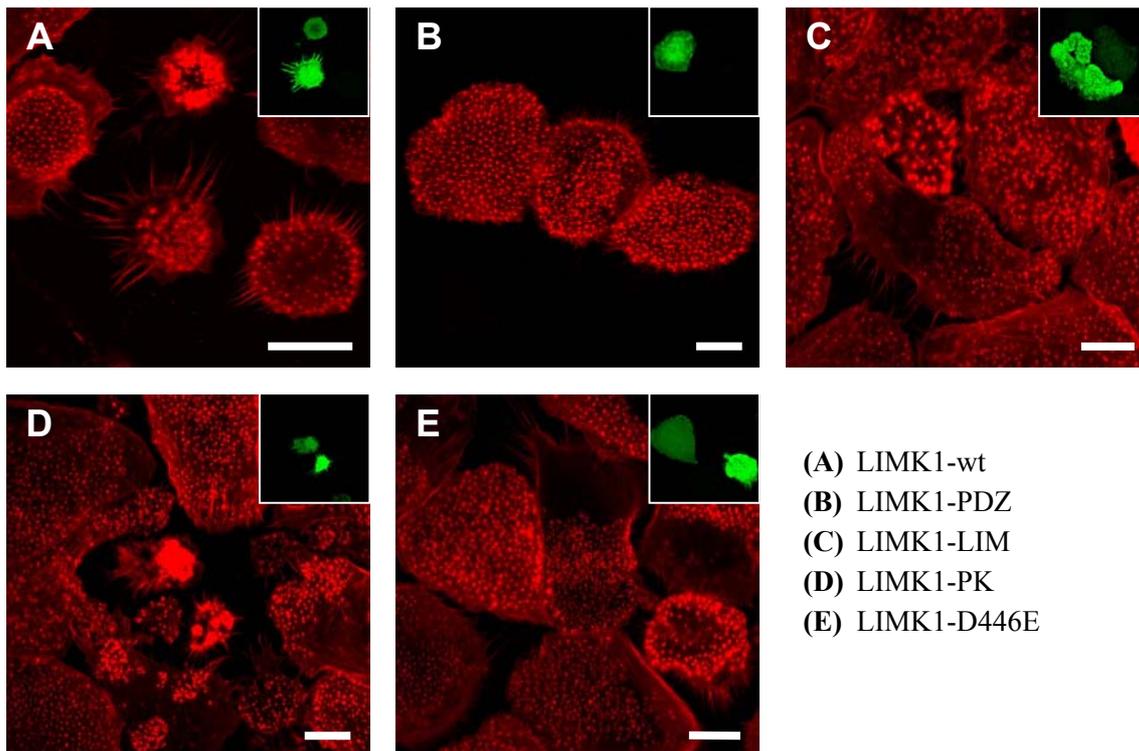
Durch unsere Kooperationspartner Pankaj Goyal (Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, München, D) und Ora Bernard (Molecular Genetics of Cancer Division, The Walter and Eliza Hall Institute, Victoria, Australien) standen uns mehrere GFP-gekoppelte Konstrukte von LIMK1 und LIMK2 zur Verfügung (Tabelle 4.1). In der Literatur sind vielfach Effekte einer Überexpression von LIMK und entsprechenden Teilkonstrukten beschrieben (Edwards et al., 1999; Dan et al., 2001).

Mittels *Nucleofection*<sup>TM</sup> wurden die Konstrukte in Makrophagen transfiziert, nach verschiedenen Zeiten (4, 8 und 24h) fixiert, gegen F-Aktin gefärbt und mikroskopisch untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit GFP-Leervektor transfiziert wurden.

Alle Konstrukte zeigten eine Anreicherung in Gebieten mit Podosomen, die Podosomen selbst waren jedoch immer ausgespart (Abb. 4.11a und b). Insbesondere bei den Konstrukten LIMK2-PK und LIMK1-LIM entstand der Eindruck, als ob sie sich in größeren Ringen um die einzelnen Podosomen konzentrierten, diese Ringe schienen bei Podosomen-Gruppen miteinander zu verschmelzen (Abb. 4.11c).

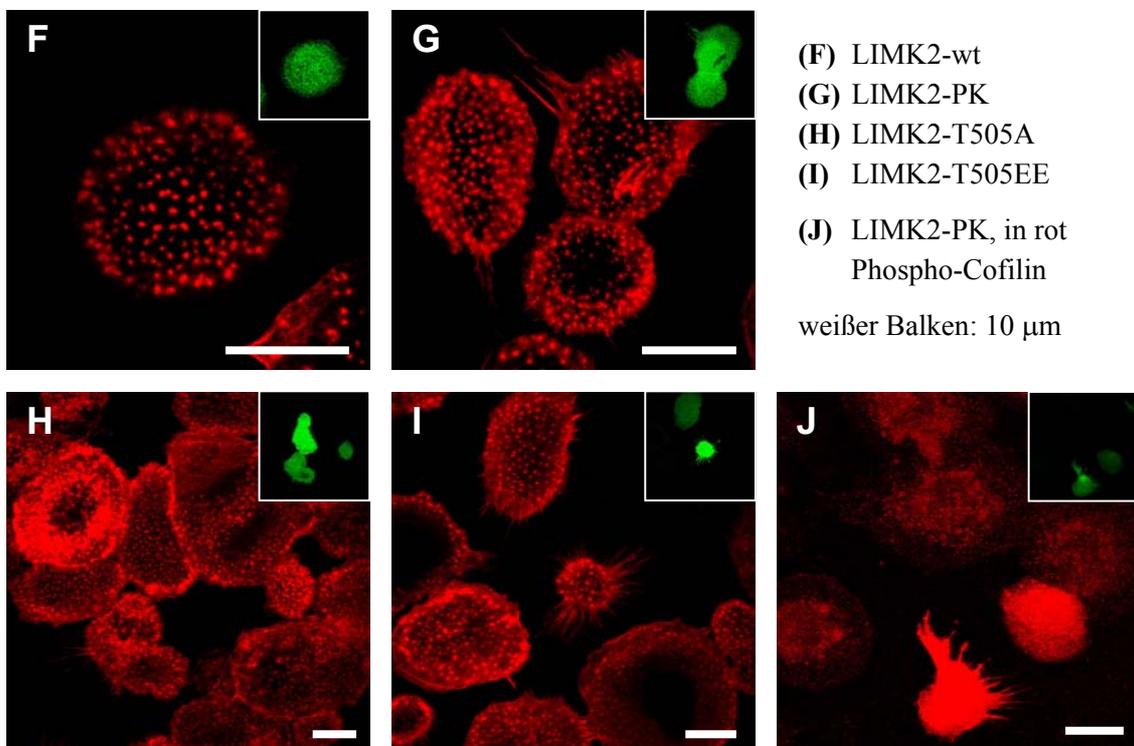
Konstrukt	Beschreibung	Effekt
LIMK2-fl	Volllänge	schwacher Effekt, transfizierte Zellen relativ klein, nach 24h Ablösung
LIMK2-PK	Kinase-Domäne	Anreicherung in Ring-Struktur um Podosomen, transfizierte Zellen krampfen ab 4h, ab 8h Ablösung
LIMK2-T505A	nicht aktivierbar	Transfizierte Zellen klein, krampfen ab 8h, nach 24h Ablösung
LIMK2-T505EE	konstitutiv aktiv	Transfizierte Zellen krampfen nach 4h bereits massiv, nach 8h fast komplette Ablösung
LIMK1-fl	Volllänge	Transfizierte Zellen stark verkrampft, nach 24h Ablösung
LIMK1-PDZ	PDZ-Domäne	Transfizierte Zellen leicht kontrahiert
LIMK1-PK	Kinase-Domäne	Transfizierte Zellen nach 4h stark gekrampft
LIMK1-LIM	LIM-Domäne	Anreicherung in Ringstruktur um Podosomen, F-Aktin-teilweise verklumpt, teilweise reduziert
LIMK1-D446E	Kinase-inaktiv	Wenig Effekt, F-Aktin-teilweise verklumpt, teilweise reduziert

**Tabelle 4.1:** LIMK1- und LIMK2-Konstrukte und Effekte der Überexpression in Makrophagen



**Abb. 4.11a: Transfektion von LIMK1-Konstrukten in primäre humane Makrophagen**

konfokalmikroskopische Aufnahmen transfizierter Zellen, Nachinkubation 4h, jeweils Aktinfärbung in rot, Insets zeigen die transfizierten Zellen (GFP)



**Abb. 4.11b: Transfektion von LIMK2-Konstrukten in primäre humane Makrophagen**

konfokalmikroskopische Aufnahmen transfizierter Zellen, Nachinkubation 4h, in rot (F)-(I) Aktin bzw. (J) Phospho-Cofilin, Insets zeigen die transfizierten Zellen (GFP)

Effekte auf zellulärer Ebene ließen sich bei allen Konstrukten beobachten, auch bei jenen ohne Kinase-Aktivität. Am schwächsten ausgeprägt war er bei der PDZ-Domäne von LIMK1, die Zellen waren nur leicht kontrahiert, sonst aber auch nach 24h nicht von normalen Zellen zu unterscheiden (Abb. 4.11a B). Die LIM-Domäne hingegen hatte auch alleine bereits eine größere Wirkung, die Zellen zeigten entweder einen verminderten Gehalt an F-Aktin oder aber größere Aktin-Verklumpungen (Abb. 4.11a C). Auch die Kinase-inaktive Mutante LIMK1-D446E zeigte diesen Effekt, der somit möglicherweise unabhängig von der Cofilin-Phosphorylierung ist und durch Interaktion einer oder beider LIM-Domänen mit anderen Proteinen vermittelt wird (Abb. 4.11a E).

Bei allen anderen Konstrukten begannen die entsprechend transfizierten Zellen teilweise bereits nach 4h zu krampfen und sich nach 8h-24h vom *Coverslip* zu lösen. Interessanterweise war die sich verringernde Adhäsionsfläche dabei bis zuletzt mit Podosomen bedeckt, die im Verlauf sogar größer und prominenter wurden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der F-Aktin-Abbau durch Cofilin blockiert ist, weil dieses möglicherweise durch die überexprimierte LIM-Kinase inaktiviert wird.

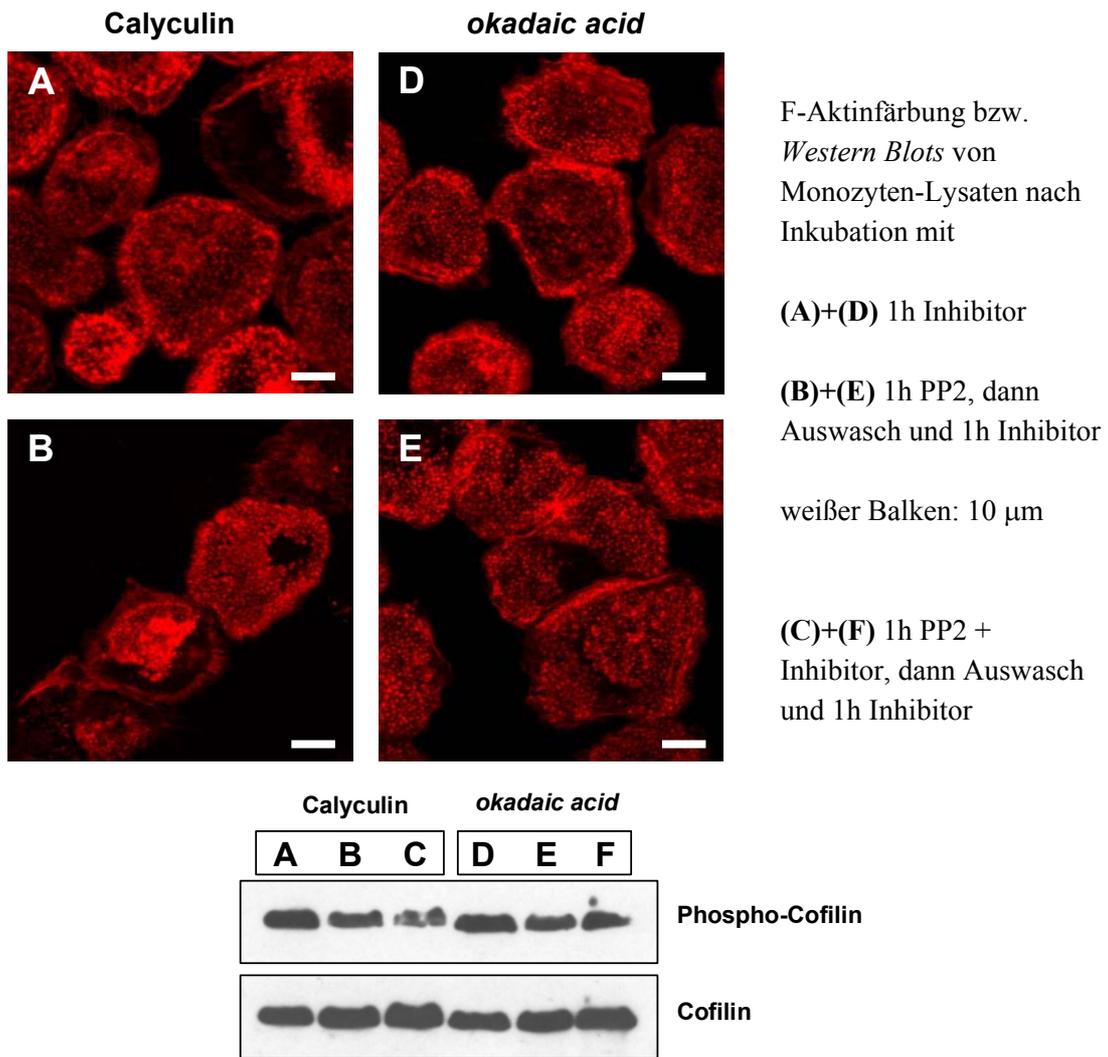
#### 4.6 Kein Einfluss der Phosphatasen PP1/PP2A auf Podosomen

Cofilin ist in phosphoryliertem Zustand inaktiv, kann also durch Dephosphorylierung aktiviert werden. Es wurde gezeigt, dass die Phosphatasen PP1 und PP2A Cofilin dephosphorylieren können (Ambach et al., 2000; Samstag et al., 2003). Diese Phosphatasen können durch diverse Substanzen inhibiert werden, dazu zählen Calyculin und *okadaic acid* (Ishihara et al., 1989). Es sollte nun untersucht, inwieweit durch diese Inhibition eine Wirkung auf die Podosomen-Regulation nachweisbar ist.

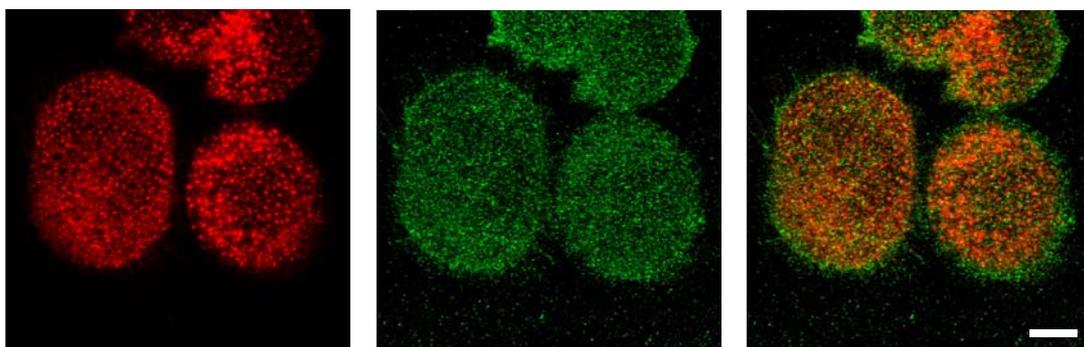
Die Zellen wurden zunächst in serumfreiem Medium für eine Stunde mit *okadaic acid* (750 nM) und Calyculin (4 nM und 10 nM) inkubiert. In beiden Fällen konnte weder mikroskopisch eine signifikante Veränderung der Podosomen-Anzahl noch im *Western Blot* eine Veränderung im Phosphorylierungs-Status von Cofilin gefunden werden (Abb. 4.12a).

In einem weiteren Versuch wurden die Wirkung der Inhibitoren auf die Podosomen-Rekonstitution untersucht. Dazu wurden alle Waschungen und Inkubationen jeweils mit *okadaic acid*- bzw. Calyculin-haltigem Medium durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst für 1h in serumfreiem Medium mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor PP2 (25 nM) inkubiert, was zur Zerstörung der Podosomen führte. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und dann 1h nachinkubiert, wobei die Podosomen neu gebildet werden. Wiederum wurden keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Experimenten ohne Inhibitor gefunden, weder mikroskopisch im Phänotyp noch per *Western Blot* im Phosphorylierungs-Status von Cofilin (Abb. 4.12a).

Außerdem wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen, spezifischen Antikörpers gegen PP2A Immunfluoreszenz-Färbungen an fixierten Präparaten von Makrophagen durchgeführt, wobei vier verschiedene Fixierungs-Methoden getestet wurden. Es konnte teilweise eine Lokalisation von PP2A an die Zellmembran gesehen werden, eine Kolokalisation mit Podosomen war jedoch nicht ersichtlich (Abb. 4.12b).



**Abb. 4.12a:** Inhibierung der Phosphatasen PP1 und PP2A durch Calyculin und *okadaic acid* hat keinen signifikanten Effekt auf Podosomen und Phospho-Cofilin-Level



**Abb. 4.12b:** PP2A zeigt keine spezifische Lokalisation an Podosomen

konfokalmikroskopische Aufnahmen, Färbung von Aktin (rot) und PP2A (grün); Fixierung mit Methanol, andere Fixierungen (FA-AC, Triton, PHEM) erbrachten ähnliche Resultate ohne spezifische Lokalisation; weißer Balken: 10 µm

## 4.7 Beteiligung von Rho-GTPase-Effektoren an der Podosomen-Regulation

Die Bedeutung der Rho-GTPasen als zelluläre Schalter und ihre vielfältigen Effekte auf das Zytoskelett sind sehr gut dokumentiert (Hall, 1998). Auch Effekte auf Podosomen wurden bereits beschrieben, so für die drei am besten charakterisierten Rho-GTPasen Cdc42Hs (Linder et al., 1999), RhoA und Rac1 (Ory et al., 2000; Burns et al., 2001). In anderen Zusammenhängen wurde gezeigt, dass Wirkungen der Rho-GTPasen über eine Aktivierung von LIM-Kinasen und Regulation der Cofilin-Phosphorylierung vermittelt werden (Yang et al., 1998; Sumi et al., 1999; Lin et al., 2003). Es sollte daher untersucht werden, ob diese Signalwege bei der Podosomen-Regulation eine Rolle spielen.

### 4.7.1 Einfluss von ROCK auf Podosomen

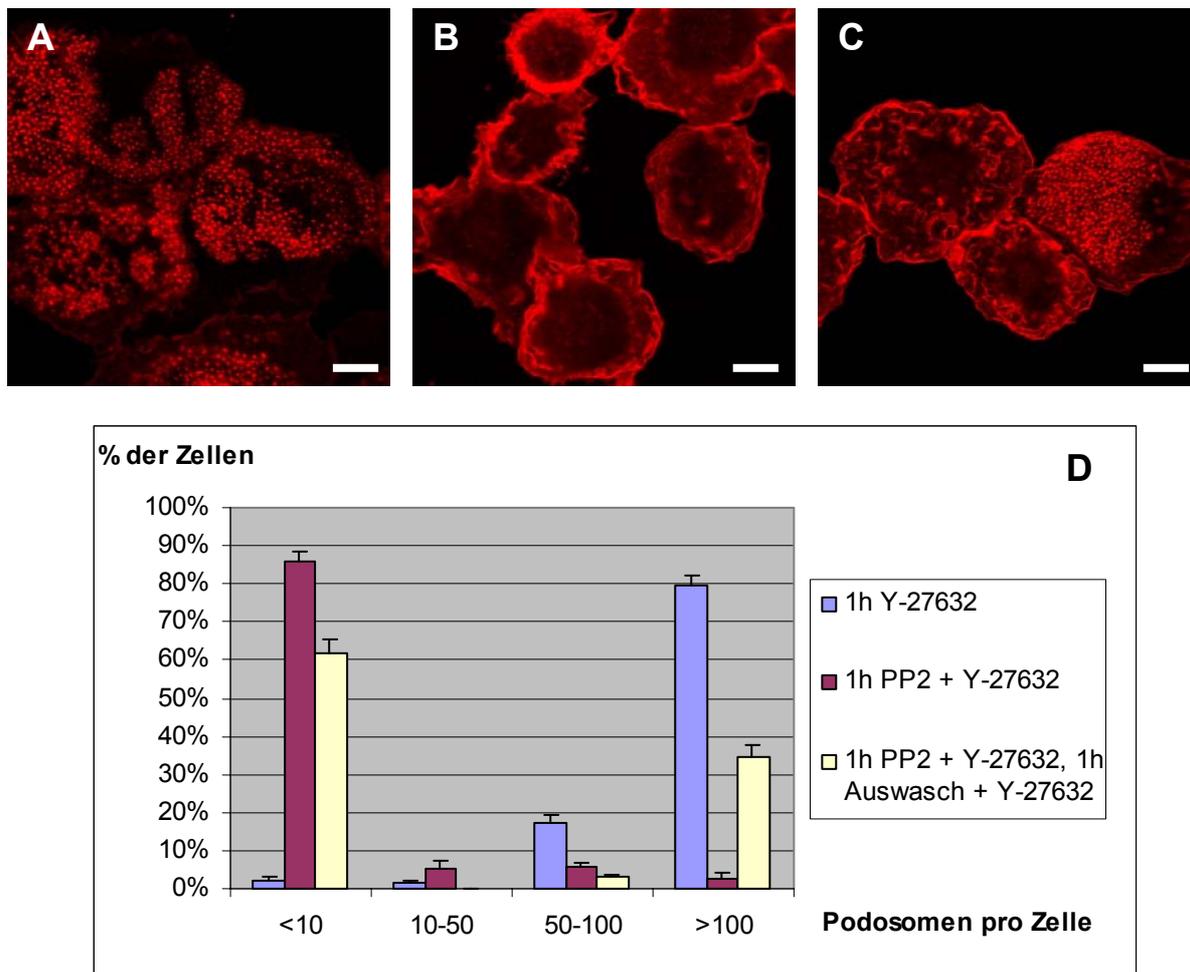
RhoA kann über seinen Effektor ROCK (*p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase*) die LIM-Kinasen LIMK1 und LIMK2 aktivieren, was zur Phosphorylierung und Deaktivierung von Cofilin führt (Lin et al., 2003). Durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 kann diese LIM-Kinase vermittelte Phosphorylierung von Cofilin blockiert werden (Maekawa et al., 1999). Es wurde untersucht, wie sich diese Blockierung auf die Podosomen-Regulation auswirkt.

Zunächst wurden Makrophagen für eine Stunde in serumfreiem Medium inkubiert, das 10 nM Y-27632 enthielt. Die Behandlung änderte nichts an der Podosomen-Anzahl, allerdings war die Podosomen-Verteilung deutlich unregelmäßiger als bei unstimulierten Zellen und ähnelte den frühen Stadien nach Stimulation, bevor es zur Polarisierung der Zellen kommt (Abb. 4.13A).

In einem weiteren Versuch wurde die Podosomen-Bildung in Anwesenheit von Y-27632 untersucht. Dazu wurden die Zellen eine Stunde in serumfreiem Medium mit 10 nM Y-27632 und 25 nM PP2 inkubiert, was die Podosomen zerstörte (Abb. 4.13B), und anschließend mit Y-27632-haltigem, serumfreiem Medium dreimal gewaschen und eine Stunde nachinkubiert. Die normale Podosomen-Rekonstitution wurde dadurch stark inhibiert, nur ca. 35% Zellen bildeten wieder Podosomen aus (Abb. 4.13C und D). Zusätzlich zeigten die restlichen Zellen größtenteils starkes *Ruffling*, was auf eine Aktivierung von Rac hindeutet. ROCK scheint somit sowohl bei der Podosomen-Dynamik als auch bei der Podosomen-Bildung eine Rolle zu spielen.

### 4.7.2 Einfluss von PAK1 und PAK4 auf Podosomen

Auch die GTPasen Rac1 und Cdc42Hs können eine Aktivierung von LIM-Kinasen induzieren, die zu einer Phosphorylierung und Deaktivierung von Cofilin führt. Effektoren von Rac1 und Cdc42Hs, die diese Wirkung vermitteln können, sind die *p21-activated kinases* (PAKs), die mittlerweile aufgrund von Strukturunterschieden in zwei Subgruppen (PAK1-3 und PAK4-6) aufgeteilt werden (Jaffer et al., 2002). Mitglieder beider Gruppen können LIMK1 aktivieren, bisher wurde dies für PAK1 (Edwards et al., 1999) und PAK4 (Dan et al., 2001) gezeigt.



**Abb. 4.13: Inhibition von ROCK durch Y-27632 beeinflusst Podosomen-Bildung und Phospho-Cofilin-Level**

(A-C) konfokalmikroskopische Aufnahmen, F-Aktinfärbung, weißer Balken: 10  $\mu$ m

(A) 1h Inkubation mit Y-27632 (10 nM) in serumfreiem Medium

(B) 1h Inkubation mit PP2 (25 nM) und Y-27632 (10 nM)

(C) Behandlung wie (B), dann 1h Nachinkubation mit Y-27632 (10 nM)

(D) Podosomenzahl der wie in (A-C) beschrieben behandelten Zellen

Durch unsere Kooperationspartner Melanie H. Cobb (Department of Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA) und Audrey Minden (Department of Biological Sciences, Columbia University, New York, USA.) standen uns verschiedene Myc-gekoppelte Konstrukte von PAK1 und PAK4 zur Verfügung (Tabelle 4.2). Diese wurden mittels *Nucleofection*<sup>TM</sup> in Makrophagen transfiziert, nach verschiedenen Zeiten (4, 8 und 24h) fixiert, Aktin-gefärbt und mikroskopisch untersucht.

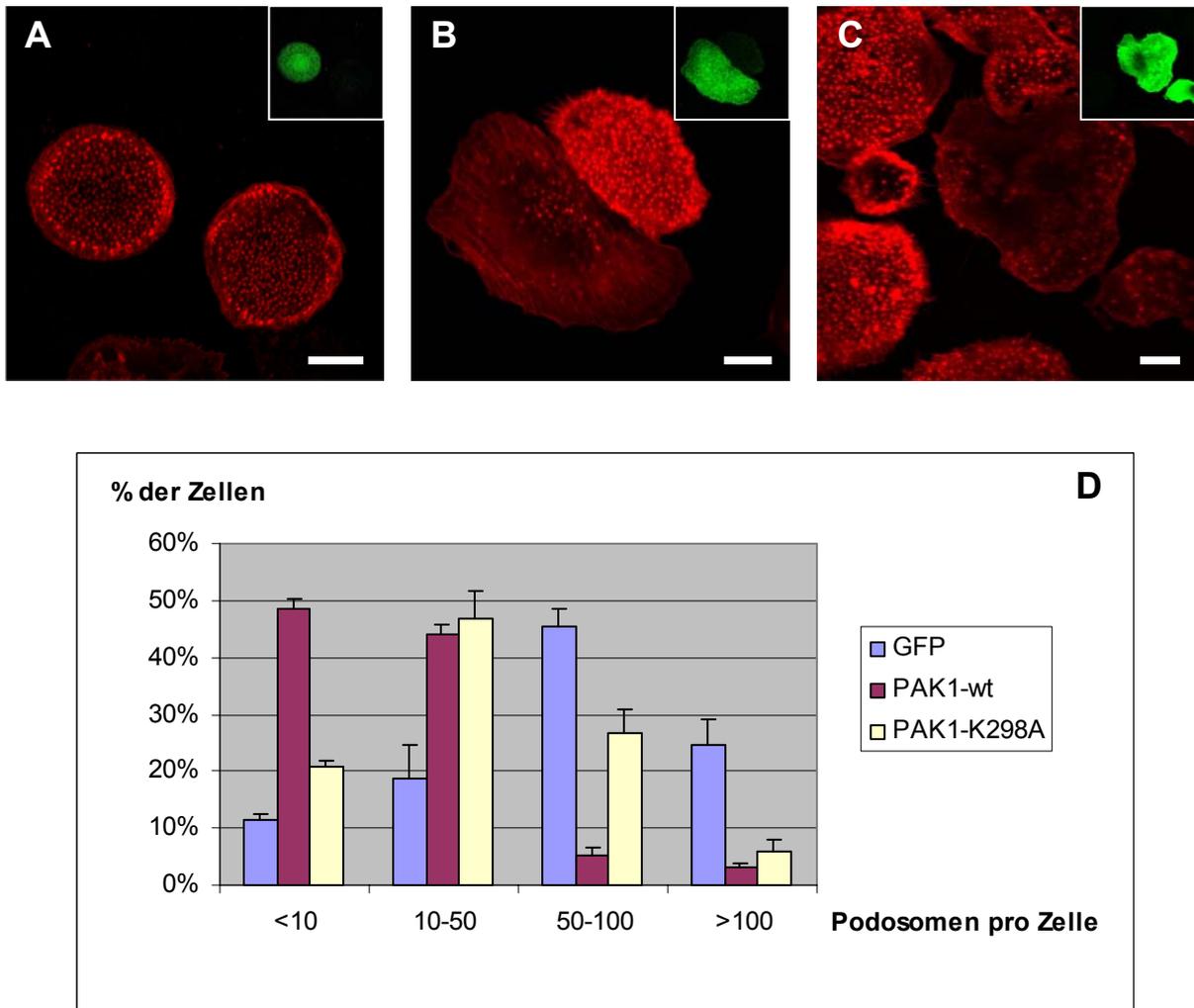
Die Transfektion von PAK1-fl führte bereits nach 4 h zu einer massiven Reduktion der Podosomen-Anzahl, der Effekt blieb auch im weiteren Beobachtungszeitraum bis 24 h bestehen. Interessanterweise kam es nach Transfektion der Kinase-inaktiven Mutante PAK1-K298A ebenfalls zu einer Abnahme der Podosomen-Anzahl, er Effekt war allerdings etwas schwächer ausgeprägt als beim Volllänge-Konstrukt (Abb. 4.14a).

Auch die Transfektion der beiden PAK4-Konstrukte führte jeweils zu einer Abnahme der Podosomen-Anzahl pro Zelle. Die verbleibenden Podosomen waren jedoch nach Transfektion mit der Kinase-inaktiven Mutante PAK4-K350M sehr klein und enthielten wenig F-Aktin, während sie nach Transfektion mit der konstitutiv aktiven Mutante PAK4-S445N/S474E deutlich größer als normale Podosomen waren und auch mehr F-Aktin-Gehalt aufwiesen (Abb. 4.14b). Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die Reduktion der Podosomen-Anzahl ein Kinase-unabhängiger Effekt ist, während der Gehalt an F-Aktin in den einzelnen Podosomen durch PAK4 zumindest mitreguliert wird. Ob dieser Effekt über LIM-Kinase und Cofilin vermittelt wird, muss in weiteren Versuchen untersucht werden. In durchgeführten DNA-Arrays ist im Verlauf der Makrophagen-Reifung eine Reduktion der Expression von PAK1 zu sehen ist, während die Expression von PAK4 eher gleich bleibt (siehe Anhang, 9.4). Weitere Versuche zur Wirkung von PAK4 sind in unserer Arbeitsgruppe bereits durchgeführt worden, dabei konnten die genannten Effekte auch quantifiziert und weitere Ergebnisse gewonnen werden (Gringel et al., eingereicht).

In Tabelle 4.2 sind die transfizierten Konstrukte und die jeweiligen Effekte nochmals zusammengefasst.

Konstrukt	Beschreibung	Effekt
PAK1-fl	Volllänge	Reduktion von F-Aktin und Podosomen-Anzahl
PAK1-K298A	Kinase-inaktiv	Reduktion von F-Aktin und Podosomen-Anzahl, Effekt schwächer als Volllänge
PAK4-K350M	Kinase-inaktiv	Reduktion der Podosomen-Anzahl, Podosomen klein mit wenig F-Aktin
PAK4-S445N/S474E	konstitutiv aktiv	Reduktion der Podosomen-Anzahl, Podosomen aber groß mit viel F-Aktin

**Tabelle 4.2: PAK1 und PAK4-Konstrukte und Effekte der Überexpression in Makrophagen**

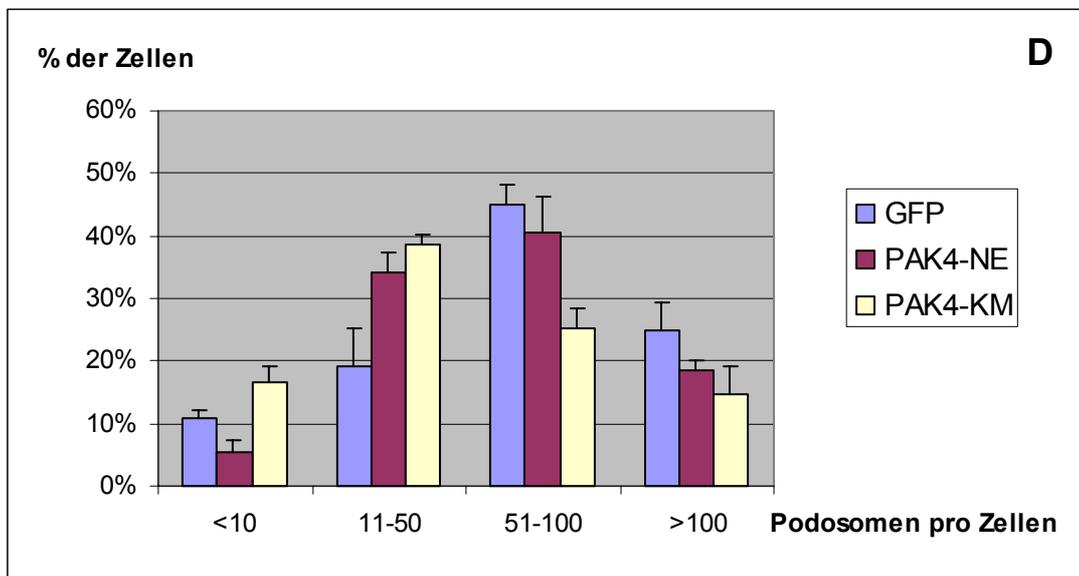
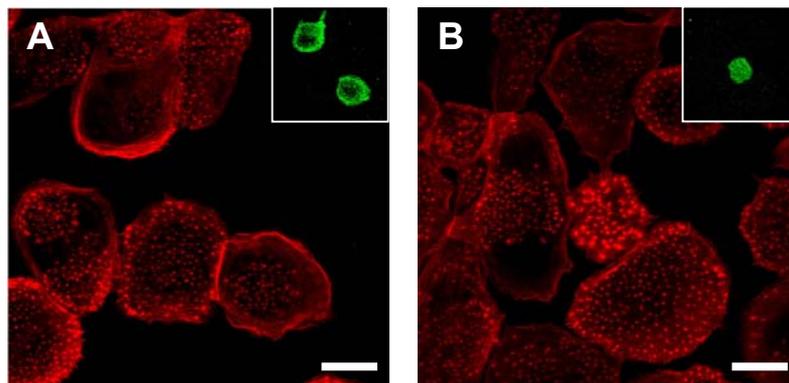


**Abb. 4.14a: Transfektion von PAK1 beeinflusst F-Aktin-Level und Podosomenzahl**

(A-C) konfokalmikroskopische Aufnahmen, Nachinkubation für 4h, jeweils F-Aktinfärbung, Insets zeigen die transfizierten Zellen; weißer Balken: 10  $\mu$ m

(A) GFP-Leervektor (B) PAK1-wt (C) PAK1- K298A

(D) statistische Auswertung der Podosomenzahl pro Zelle



**Abb. 4.14b: Transfektion von PAK4-KM und PAK4-NE beeinflusst F-Aktin-Level und Podosomenzahl**

konfokalmikroskopische Aufnahmen, F-Aktinfärbung, Insets zeigen die transfizierten Zellen (GFP); Nachinkubation nach Transfektion jeweils 8h; weißer Balken: 10  $\mu$ m

(A) Transfektion von PAK4-K350M

(B) Transfektion von PAK4-S445N/S474E

(C) Podosomenzahl nach Transfektion und 8h Nachinkubation

## 4.8 Rolle von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat und Phospholipase C $\beta$ in der Podosomen-Regulation

Phosphatidylinositole (PIs) spielen als *second messenger* bei vielen intrazellulären Prozessen eine wichtige Rolle, so auch bei der Regulation des Zytoskelettes (Yin et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) an Cofilin bindet und dadurch die Bindung an Aktin inhibiert wird (Yonezawa et al., 1991). Wichtige Regulatoren von PIP<sub>2</sub> sind die Phospholipasen C (PLCs), welche PIP<sub>2</sub> zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) spalten. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war PLC $\beta$ 2 die einzige Phospholipase, für die eine Regulation durch die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42Hs nachgewiesen war (Illenberger et al., 1998). Nachdem diese GTPasen auch in die Podosomen-Regulation involviert sind, war PLC $\beta$ 2 für uns von besonderem Interesse.

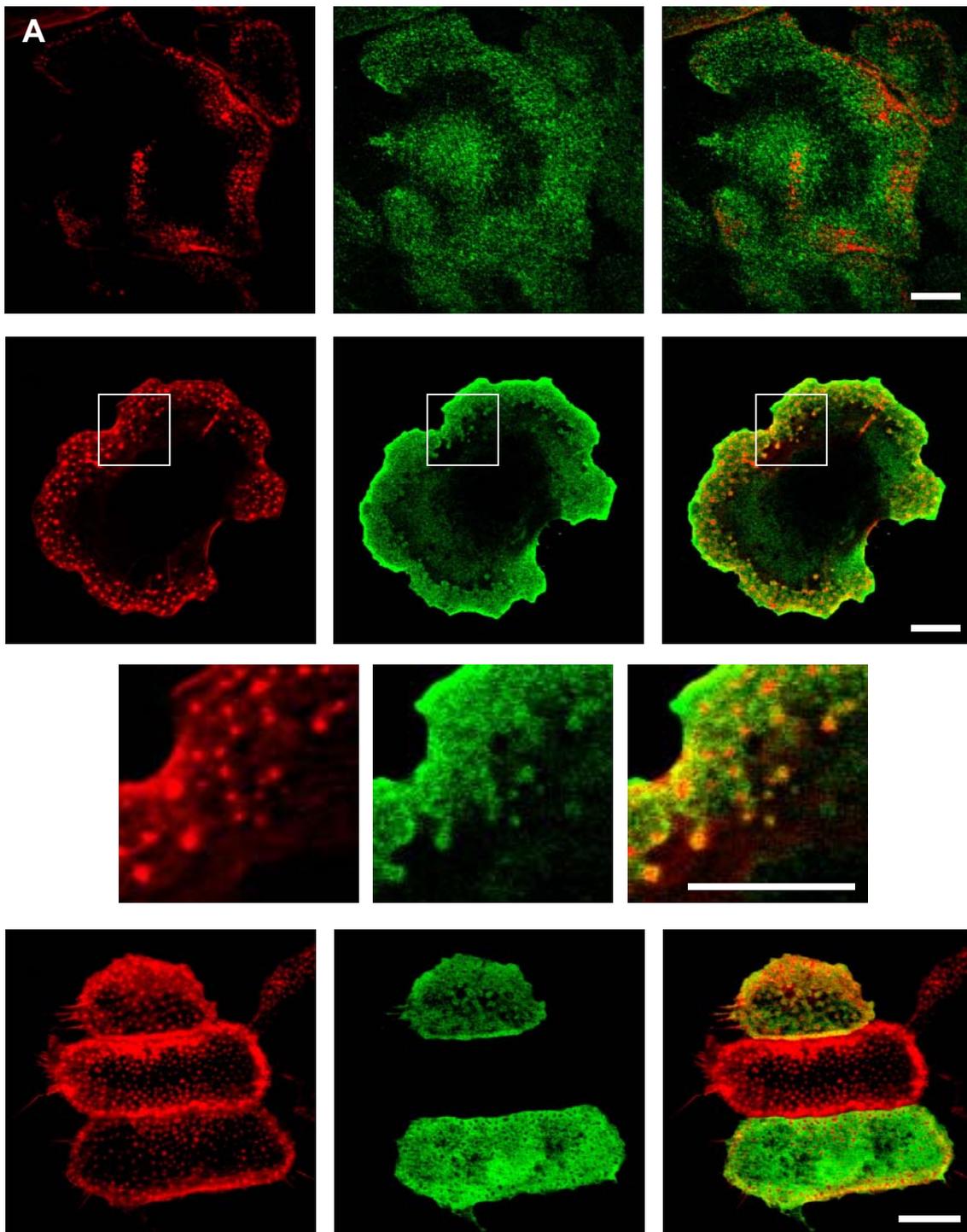
Für die folgenden Untersuchungen wurden uns von unserem Kooperationspartner Prof. P. Gierschik (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm) freundlicherweise mehrere Konstrukte und Antikörper zur Verfügung gestellt (Tabellen 4.3 und 4.4).

### 4.8.1 Lokalisation von PIP<sub>2</sub>

Zunächst wurde untersucht, ob sich eine spezifische Lokalisation von PIP<sub>2</sub> an Podosomen nachweisen lässt. Dazu wurde als erstes ein kommerziell erhältlicher, spezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenz an fixierten Präparaten von Makrophagen benutzt. Diese waren zuvor mit verschiedenen Fixations-Methoden hergestellt worden. Konfokalmikroskopisch konnte bei keiner Fixations-Methode mit dem Antikörper eine Lokalisation nachgewiesen werden (Abb. 4.15A).

In einem weiteren Versuch wurde zur Lokalisation ein Konstrukt benutzt, das die PH-Domäne (*pleckstrin homology*) von PLC $\delta$ 1 als GFP-Fusionsprotein kodierte (Tabelle 4.4). Die PH-Domäne ist für die PIP<sub>2</sub>-Bindung verantwortlich und kann als Sensor für die PIP<sub>2</sub>-Lokalisation benutzt werden (Watt et al., 2002). Dieses Konstrukt wurde mittels *Nucleofection*<sup>TM</sup> in primäre Makrophagen transfiziert, nach 4h Inkubation wurden die Zellen fixiert und Aktin-gefärbt. Konfokalmikroskopisch zeigte sich hier eine deutliche Membran-Lokalisation und eine Anreicherung in Podosomen-haltigen Bereiche, die Podosomen selbst waren jedoch ausgespart (Abb. 4.15B und C). Als Kontrolle diente ein GFP-Konstrukt der PH-Domäne, welche durch Mutation die Bindungsfähigkeit für PIP<sub>2</sub> verloren hat (Yagisawa et al., 1998). Dieses zeigt keine Membran-Lokalisation mehr, sondern eine diffuse Verteilung im Zytosol. Die Aussparung der Podosomen war dadurch sogar noch deutlicher zu sehen (Abb. 4.15D).

Eine Lokalisation in Podosomen war somit nicht nachweisbar. Aufgrund der Beteiligung von PIP<sub>2</sub> als *second messenger* an den verschiedensten intrazellulären Prozessen war eine eher diffuse Verteilung allerdings zu erwarten. Eine negative Aussage über die Beteiligung an podosomalenen Regulationsprozessen erlaubt dies sicherlich nicht. So konnten z.B. auch die GTPasen Rac1 und RhoA, entscheidende Regulatoren des Aktin-Zytoskelettes, noch nie an spezifischen Aktinstrukturen nachgewiesen werden.



**Abb. 4.15:** PIP<sub>2</sub> zeigt teilweise Lokalisation an Podosomen-Ringstruktur

konfokalmikroskopische Aufnahmen, jeweils F-Aktinfärbung (rot) und in rechter Spalte *overlay* (gelb); weißer Balken: 10 μm

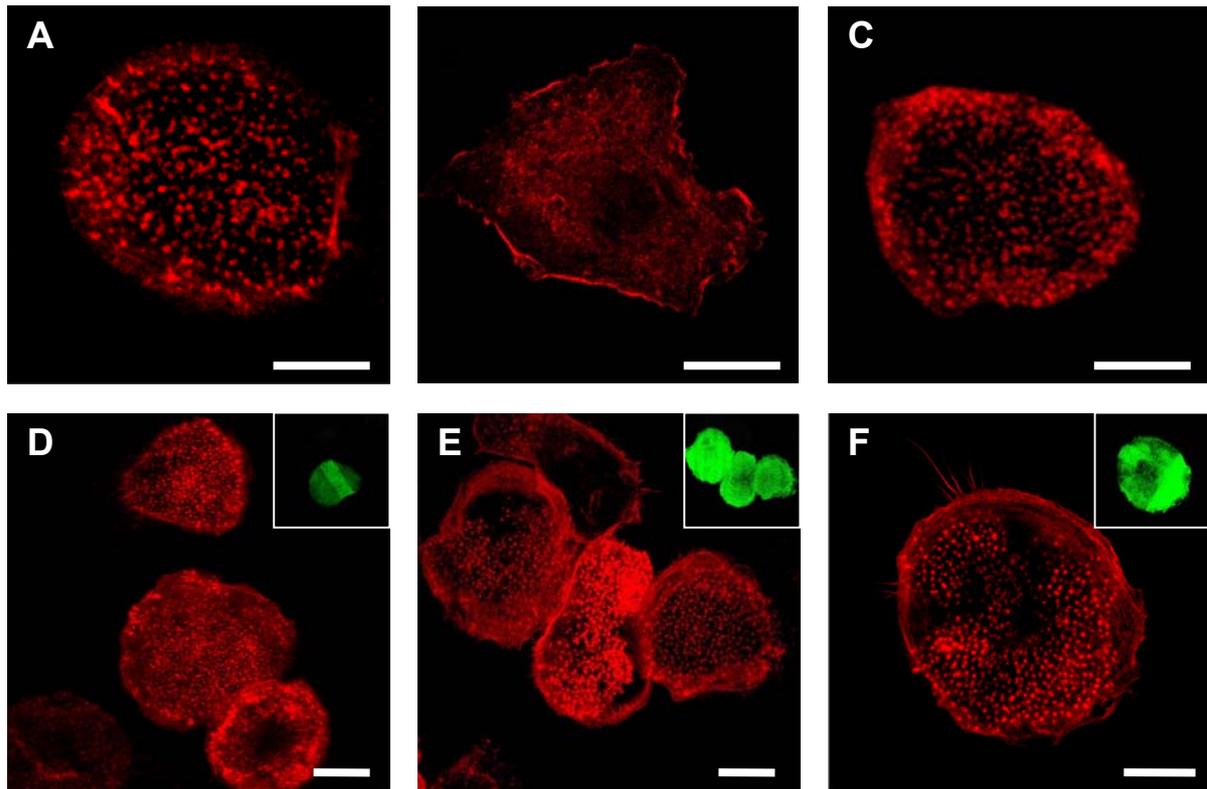
- (A) Immunfluoreszenz mit spezifischem PIP<sub>2</sub>-Antikörper
- (B) Transfektion von GFP-PLCδ1-PH-Domäne
- (C) Ausschnittsvergrößerung aus (B)
- (D) Transfektion von GFP-PLCδ1-PH-Mutante

#### 4.8.2 Effekte von PIP<sub>2</sub>-bindenden Konstrukten

Um einen möglichen Einfluss von PIP<sub>2</sub> auf die Podosomen-Regulation zu untersuchen, wurden Versuche mit PIP<sub>2</sub>-interagierenden Substanzen durchgeführt. Dabei handelte es sich zum einen um ein Peptid (im folgenden PIP-BP genannt) mit der PIP<sub>2</sub>-Bindungssequenz (AS 160-169, QRLFQVKGRR) von Gelsolin, einem Aktin-bindenden Protein. Es wurde gezeigt (Cunningham et al., 2001), dass dieses Peptid sehr gut Zellmembran-permeabel ist und *in vitro* mit Gelsolin um die PIP<sub>2</sub>-Bindung konkurriert. An Rhodamin-B-gekoppelt führt es zur transienten Zerstörung von Aktin-Filamenten, was konsistent ist mit einer Inhibition der PIP<sub>2</sub>-Produktion oder -Interaktion. Außerdem wurde der Einfluss eines weiteren Peptids (im folgenden PLC-BS genannt) mit der vermuteten PIP<sub>2</sub>-Bindungssequenz von PLCβ<sub>2</sub> (AS 448-464, CGGLPSPEDLRGKILIKNKK) untersucht, welches *in vitro* die katalytische Aktivität von PLCβ<sub>2</sub> signifikant steigerte (Simoes et al., 1993), also zu einer Verminderung von PIP<sub>2</sub> führt. Als drittes wurden auch mögliche Effekte des für die Immunfluoreszenz benutzten, kommerziellen PIP<sub>2</sub>-Antikörpers untersucht.

Dazu wurde zunächst Makrophagen für 2h in serumfreiem Medium mit PIP-BP-Peptid (25 μM) inkubiert, anschließend fixiert und Aktin-/Vinculin-gefärbt. Mikroskopisch konnte hierbei kein Effekt auf die Podosomen festgestellt werden (Abb. 4.16A). Deshalb wurden die Zellen im Podosomen-Rekonstitutions-Assay zunächst für 45 min. im serumfreien Medium mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor PP2 (25 μM) inkubiert, wodurch die Podosomen zerstört werden (Abb. 4.16B), danach dreimal gewaschen und für 30 min. bzw. 2h mit PIP-BP-Peptid in der gleichen Konzentration nachinkubiert. Auch hier konnte kein Effekt auf die Podosomen-Reformation festgestellt werden (Abb. 4.16C).

Im einem weiteren Experiment wurden beide Peptide und der Antikörper in verschiedenen Konzentrationen mikroinjiziert, die Zellen ca. 40 min nachinkubiert und dann fixiert. Bei der Mikroinjektion wurde der Effekt genutzt, dass es bei höherem Injektions-Druck zur Zerstörung der Podosomen kommt und man so den Einfluss der injizierten Substanz auf die Podosomen-Reformation untersuchen kann, die normalerweise innerhalb einer dreiviertel Stunde größtenteils abgeschlossen ist. Als Kontrolle dient hierbei die Injektion von reinem Ratten-IgG. Es zeigte sich konfokalmikroskopisch bei keiner der injizierten Substanzen ein Einfluss auf die Anzahl der Podosomen, die Podosomen-Reformation ging ohne Verzögerung vonstatten (Abb. 4.16D-F). Möglicherweise war die Konzentration der injizierten Peptide zu gering, oder aber die Bildung und der Umsatz von PIP<sub>2</sub> ist zu schnell, um auf diese Weise signifikante Effekte auf das Aktin-Zytoskelett hervorrufen zu können.



**Abb. 4.16: Inkubation und Mikroinjektion von PIP<sub>2</sub>-beeinflussenden Peptiden zeigt keinen Effekt auf Podosomen**

konfokalmikroskopische Aufnahmen, F-Aktinfärbung (rot), Insets zeigen die mikroinjizierte Zellen (grün); weißer Balken: 10 µm

(A) 1h Inkubation mit PIP-BP (Peptid mit PIP<sub>2</sub>-Bindungssequenz von Gelsolin)

(B) 1h Inkubation mit PP2

(C) 1h Inkubation mit PP2, danach Auswasch und 1h Inkubation mit PIP-BP

(D) - (E) Mikroinjektion (jeweils 40min. nachinkubiert) von

(D) PIP-BP 5mg/ml

(E) PLC-BS 10mg/ml (Peptid mit PIP<sub>2</sub>-Bindungssequenz von PLCβ2)

(F) PIP-AK 3mg/ml (kommerzieller PIP<sub>2</sub>-Antikörper)

### 4.8.3 Lokalisation von zellulärer PLC $\beta$ 1/ $\beta$ 2/ $\beta$ 3

Im folgenden wurde die intrazelluläre Lokalisation der PIP<sub>2</sub>-regulierenden Phospholipasen PLC $\beta$ 1, PLC $\beta$ 2 und PLC $\beta$ 3 untersucht. Laut Literatur ist PLC $\beta$ 1 die am weitesten verbreitete Isoform, mit besonders hoher Konzentration in bestimmten Gehirnarealen, PLC $\beta$ 2 wurde bisher hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen, aber auch in glatten Muskelzellen nachgewiesen (LaBelle et al., 1996), und PLC $\beta$ 3 ist ebenfalls weitverbreitet (Fukami, 2002).

Nach Testung verschiedener Fixationsmethoden zeigte sich konfokalmikroskopisch bei mit Methanol fixierten Zellen eine deutliche Lokalisation von PLC $\beta$ 1 in der aktinreichen Kernstruktur der Podosomen (Abb. 4.17A und B) und von PLC $\beta$ 2 im Bereich der podosomalen Ringstruktur (Abb. 4.17C und D). Für PLC $\beta$ 3 konnte keine spezifische Lokalisation nachgewiesen werden (Abb. 4.17E). Dies ist unseres Wissens der erste Nachweis einer spezifischen Lokalisation von PLC-Isoformen an Aktin-Strukturen und spricht für eine Beteiligung von PLC $\beta$ 1 und PLC $\beta$ 2 an der Podosomen-Regulation.

Antikörper gegen	Lokalisation
PLC $\beta$ 1	aktinreicher Podosomenkern
PLC $\beta$ 2	äußerer Rand der podosomalen Ringstruktur
PLC $\beta$ 3	diffus im Zytoplasma

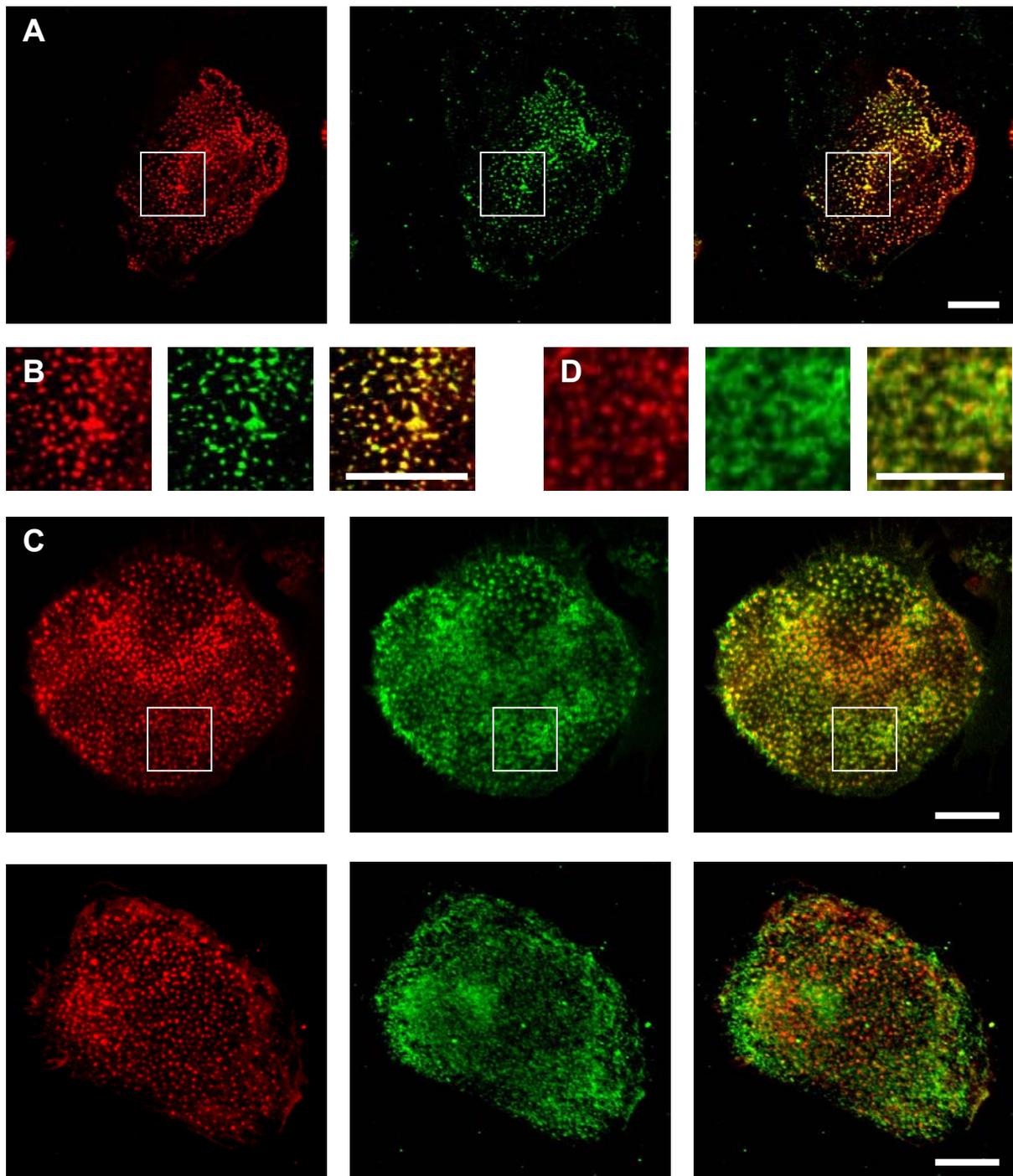
**Tabelle 4.3:** PLC-Isoform-spezifische Antikörper und ihre Lokalisation in Makrophagen

### 4.8.4 Überexpression von PLC $\beta$ 2 und PLC $\beta$ 2-Iso1

Zur Untersuchung der Rolle von PLC $\beta$ 2 und PIP<sub>2</sub> in der Podosomen-Regulation wurden uns von Prof. P. Gierschik (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm) freundlicherweise zwei GFP-gekoppelte Konstrukte zur Verfügung gestellt, zum einen PLC $\beta$ 2-Volllänge und zum anderen eine PLC $\beta$ 2-Spleißvariante (PLC $\beta$ 2-Iso1, siehe auch Tabelle 4.4). Diese kodiert die komplette PH-Domäne, welche für die Bindung an PIP<sub>2</sub> verantwortlich ist.

Beide Konstrukte wurden mittels *Nucleofection*<sup>TM</sup> in Makrophagen transfiziert und für verschiedene Zeiten (PLC $\beta$ 2: 2h/4h/6h/24h/48h; PLC $\beta$ 2-Iso1: 5h/11h/24h) nachinkubiert. Abschließend wurden sie fixiert, Aktin- oder Vinculin gefärbt und konfokalmikroskopisch untersucht. Die Befunde bestätigen die Ergebnisse der Antikörper-Färbungen: PLC $\beta$ 2-GFP zeigt eine ringförmige Anreicherung um die Podosomen (Abb. 4.18, obere Reihe). In einer Kofärbung mit Vinculin, welches in der Podosomen-Ringstruktur zu finden ist, wird zudem ersichtlich, dass PLC $\beta$ 2-GFP noch außerhalb dieses Bereiches liegt (Abb. 4.18, mittlere Reihe).

PLC $\beta$ 2-Iso1-GFP zeigt eine Anreicherung in Podosomen-Bereichen, Podosomen selbst sind aber ebenfalls ausgespart. Eine Membranlokalisation wie bei der PLC $\delta$ 1-PH-Domäne ist zu sehen, allerdings in schwächerer Ausprägung. Um festzustellen, ob sich durch die wahrscheinliche Bindung an PIP<sub>2</sub> eventuell Veränderung in der Signaltransduktion ergeben, die Auswirkungen auf die



**Abb. 4.17: PLC $\beta$ -Isoformen lokalisieren in Podosomen-Kern- bzw. Ringstruktur**  
 konfokalmikroskopische Aufnahmen fixierter Zellen, jeweils Färbung von F-Aktin (rot), PLC-Isoform (grün) und *overlay* (gelb); weißer Balken: 10  $\mu$ m  
 (A) PLC $\beta$ 1      (B) Ausschnittsvergrößerung von (A)  
 (C) PLC $\beta$ 2      (D) Ausschnittsvergrößerung von (C)  
 (E) PLC $\beta$ 3

Podosomen-Dynamik haben, wurde das Podosomen-Rekonstitutions-Assay benutzt. Dazu wurden Zellen zunächst mit PLC $\beta$ 2-Iso1-GFP transfiziert und 5h inkubiert. Dann wurden sie für eine Stunde in serumfreiem Medium mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor PP2 (25  $\mu$ M) behandelt und anschließend entweder gleich fixiert oder dreimal gewaschen und in serumhaltigem Medium nochmals 1h nachinkubiert. Anschließend wurde eine Aktin-Färbung vorgenommen und die Zellen mikroskopisch untersucht. Es fand sich kein Unterschied zu nicht-transfizierten Zellen, nach der PP2-Behandlung waren die Podosomen in fast allen Zellen zerstört, nach einer Stunde Nachinkubation jedoch wieder großteils neu gebildet (Abb. 4.18, untere Reihe).

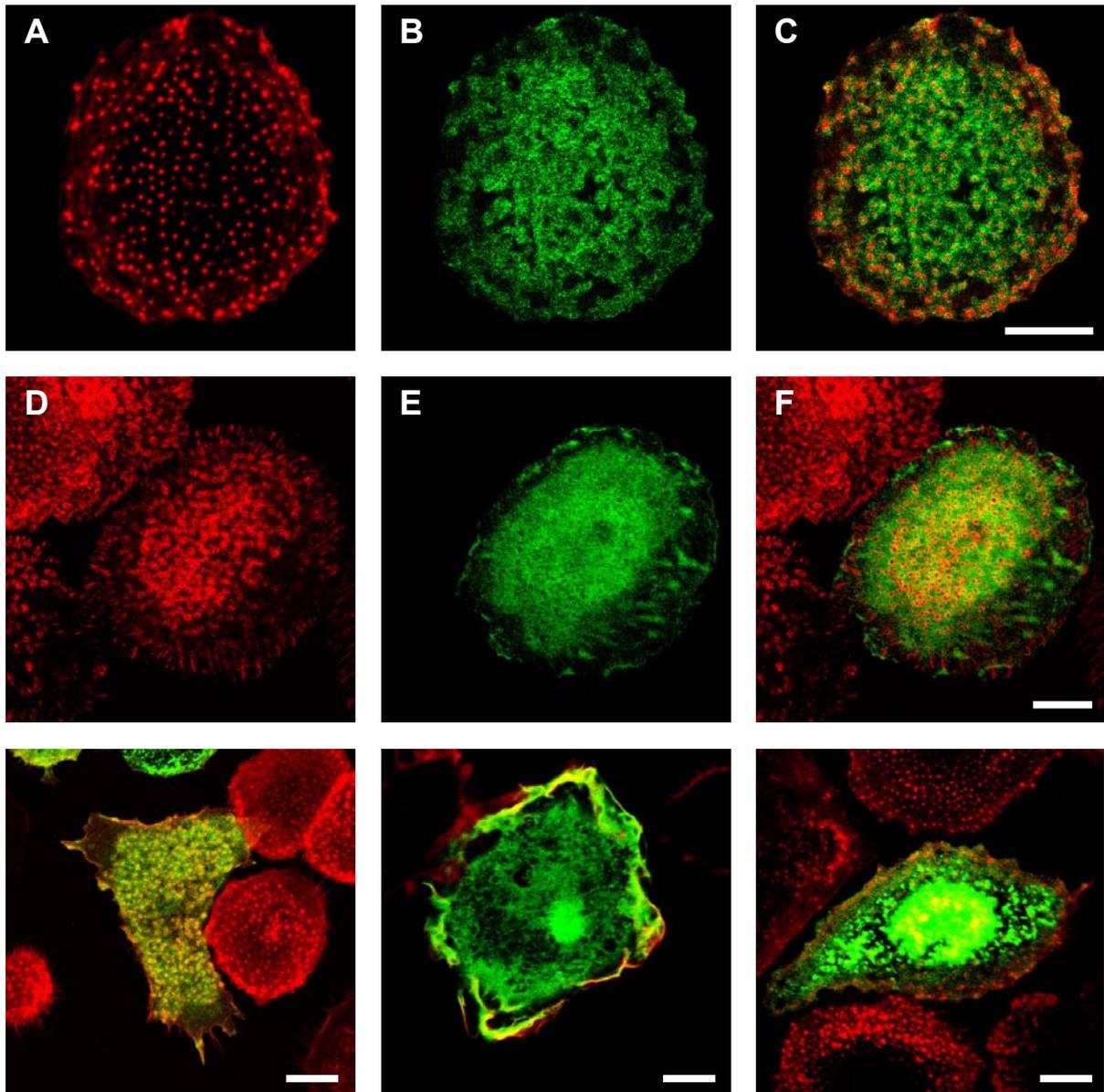
Konstrukt	Beschreibung	Effekt
PLC $\beta$ 2-pEGFP-C1	Volllänge	Anreicherung im äußeren Bereich der podosomalen Ringstruktur, kein Effekt auf Podosomenzahl oder Aktin Gehalt
PLC $\beta$ 2-Iso1-pEGFP-C1	Spleißvariante	Anreicherung in Bereichen mit vielen Podosomen, diese selbst aber ausgespart; kein Effekt auf Podosomen, auch nicht im Rekonstitutionsassay
PLC $\delta$ 1-PH-pEGFP-C1	PH-Domäne	deutliche Anreicherung an der Zellmembran, Podosomen ausgespart
PLC $\delta$ 1-PH-R40A-pEGFP-C1	PH-Domäne mit Mutation	diffuse Verteilung im Zytoplasma, Podosomen ausgespart

**Tabelle 4.4:** PLC-Konstrukte und Effekte der Überexpression in Makrophagen

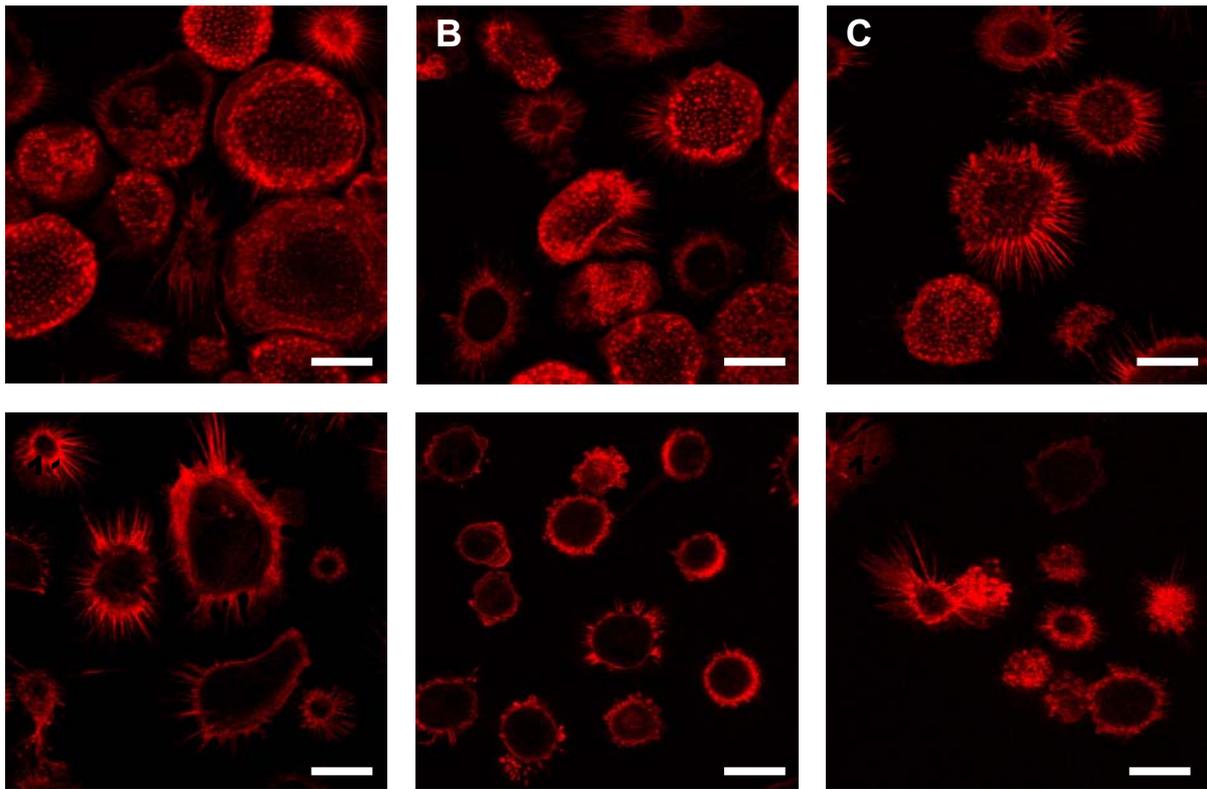
PLC $\beta$ 2 zeigt also eine klare Lokalisation in Bereichen rund um Podosomen, aber nicht in Podosomen selbst. Die Überexpression der Volllänge und einer Spleißvariante hatte im beobachteten Zeitraum bis 24h nach Transfektion keinen Einfluß auf die Podosomen. Auch bei der Podosomen-Bildung nach temporärer Zerstörung durch PP2 wurde in den transfizierten Zellen kein Unterschied zu nicht-transfizierten Zellen gefunden.

#### 4.8.5 Effekt einer PLC-Inhibition

Um einer mögliche Beteiligung der PLC bei der Podosomen-Regulation weiter nachzugehen, wurde ein spezifischer PLC-Inhibitor, U-73122 (Smith et al., 1990), verwendet. Dieser wurde zunächst für 20, 40 und 60 min ins serumfreie Medium gegeben. In einer Konzentration von 10  $\mu$ M bewirkte dies bereits nach 20 min ein deutliches Krampfen der Zellen, im Gegensatz z.B. zur Überexpression der LIM-Kinase-Konstrukte waren die Podosomen von Anfang an komplett verschwunden (Abb. 4.19D-F). Nach einer Stunde hatte sich ein Großteil der Zellen vom *Coverslip* abgelöst. Auch in einer Konzentration von 1  $\mu$ M war der Effekt zu beobachten, allerdings in verminderter Form und erst nach längerer Inkubation (Abb. 4.19A-C). Dies spricht ebenfalls für eine spezifische Rolle der PLC bei der Podosomen-Regulation.



**Abb. 4.18: Transfektion von PLC $\beta$ 2 und PLC $\beta$ 2-Iso1, Lokalisation und Effekte**  
 konfokalmikroskopische Aufnahmen transfizierter Zellen; weißer Balken: 10  $\mu$ m  
 (A) - (F) Transfektion von PLC $\beta$ 2-GFP, Nachinkubation für 6h  
 (A) Aktin            (B) PLC $\beta$ 2-GFP            (C) overlay  
 (D) Vinculin        (E) PLC $\beta$ 2-GFP            (F) overlay  
 (G) - (I) Transfektion von PLC $\beta$ 2-Iso1-GFP (grün), F-Aktin-Färbung (rot)  
 (G) unbehandelt    (H) 1h PP2                (I) 1h PP2 + 1h Auswasch



**Abb. 4.19: Inhibition von PLC führt zur Podosomen-Zerstörung**

konfokalmikroskopische Aufnahmen, F-Aktinfärbung, nach Inkubation in serumfreiem Medium mit U-73122; weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$

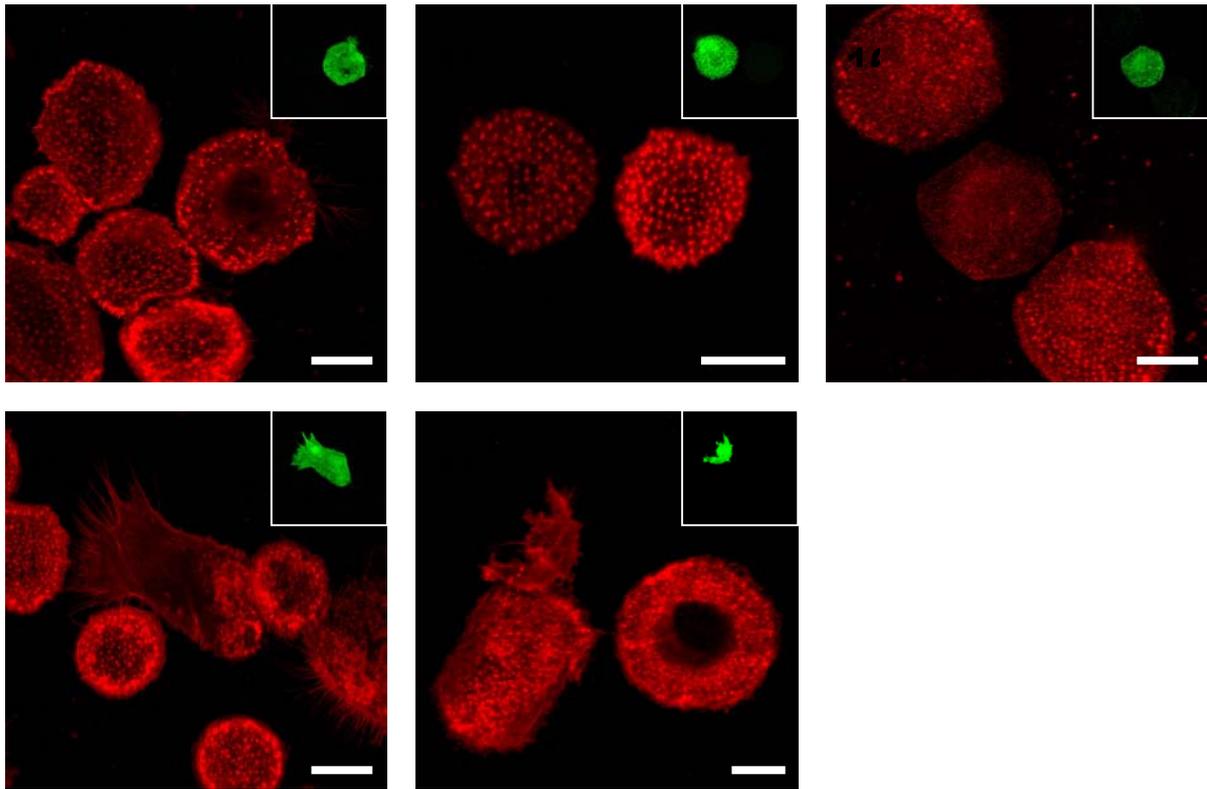
(A) - (C) 1  $\mu\text{M}$  für      (A) 20 min      (B) 40 min      (C) 60 min  
(D) - (F) 10  $\mu\text{M}$  für      (D) 20 min      (E) 40 min      (F) 60 min

## 4.9 Effekt von Cofilin-RNAi

RNAi steht für *RNA interference*, eine in den letzten Jahren zunehmend etablierte Methode zum *knock-down* der Genexpression auf RNA-Ebene mittels kurzer, ca. 20 Basen langer RNA-Fragmente, sogenannter *small interfering RNA* (siRNA). Dadurch lässt sich die intrazelluläre Konzentration eines bestimmten Proteins deutlich reduzieren, und durch die auftretenden Effekte können Rückschlüsse auf die Funktion gezogen werden.

In einer Kooperation mit EURIT (*European Union for RNA Interference Technology*) am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Berlin) wurde uns Cofilin-spezifische siRNA zur Verfügung gestellt. Aufgrund der geringen Transfektionseffizienz der primären Makrophagen war eine Expressionsanalyse mittels *Western Blot* allerdings nicht möglich. Somit konnten nur Effekte auf Einzelzellebene beobachtet werden, weshalb es notwendig war, die transfizierten Zellen einzeln sichtbar zu machen. Eine Möglichkeit, die hier benutzt wurde, ist die Kotransfektion mit einem Marker, in diesem Fall ein GFP-Leervektor. Das Mengenverhältnis GFP-Vektor zu siRNA wurde dabei für die Transfektion so titriert, dass man mit großer Sicherheit davon ausgehen konnte, dass alle GFP-exprimierenden Zellen auch siRNA in genügend hoher Konzentration aufgenommen hatten.

Nach der Transfektion wurden die Zellen für verschiedene Zeiten nachinkubiert, dann fixiert und Aktin- oder Cofilin-gefärbt. Bereits nach einem Tag sah man Zeichen einer Reduktion des F-Aktins insgesamt als auch der Podosomen-Anzahl, die nach zwei und drei Tagen am stärksten ausgeprägt waren. Nach vier oder fünf Tagen waren die transfizierten Zellen entweder stark geschädigt, oder aber hatten wieder mehr F-Aktin und Podosomen gebildet (Abb. 4.20).



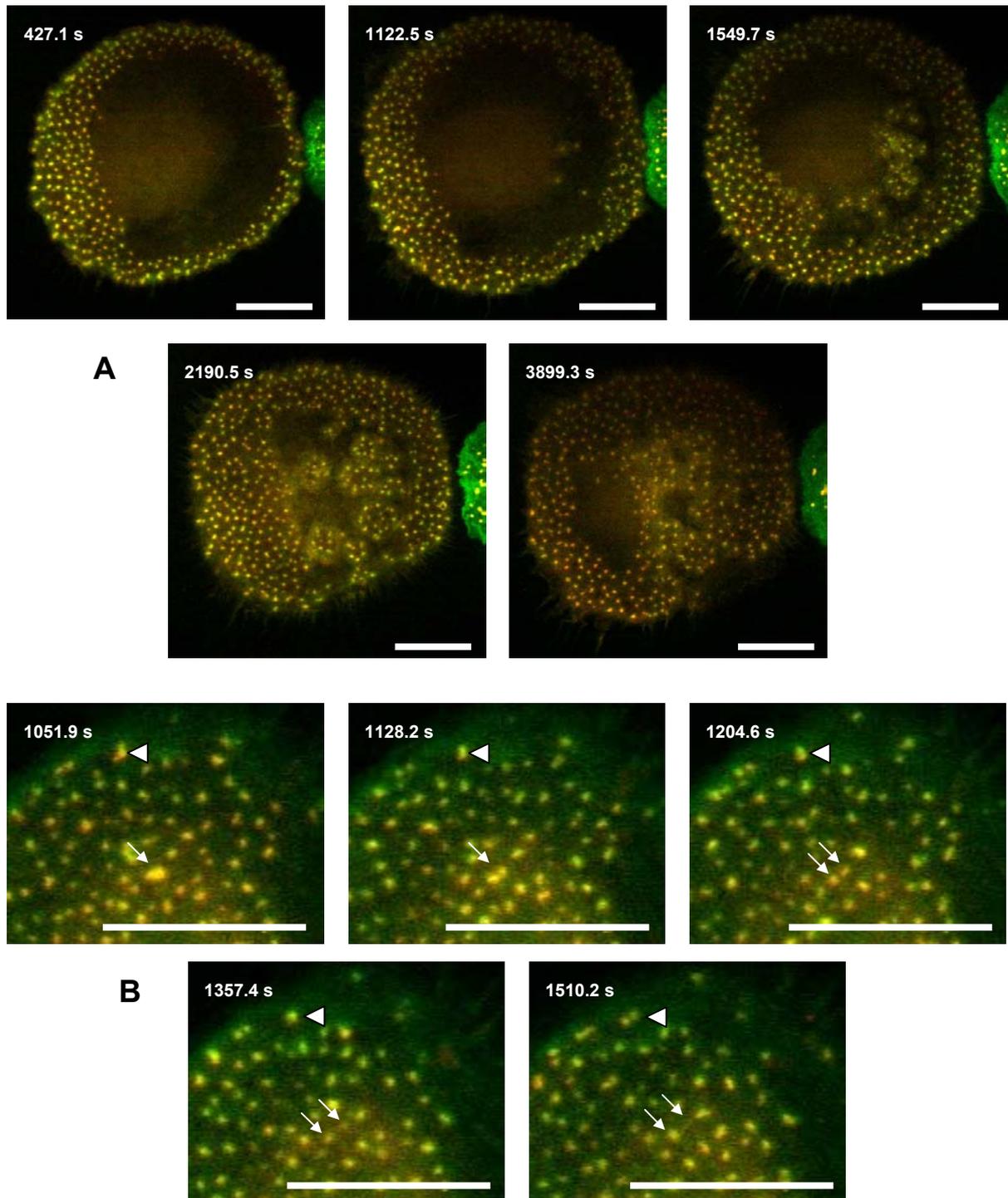
**Abb. 4.20: Transfektion von Cofilin-siRNA führt zu Podosomen-Reduktion**  
konfokalmikroskopische Aufnahmen fixierter Zellen, F-Aktinfärbung (rot),  
Insets zeigen die transfizierten Zellen (GFP); Nachinkubation für  
(A) 1 Tag (B) 2 Tage (C) 3 Tage (D) 4 Tage (E) 5 Tage  
weißer Balken: 10  $\mu\text{m}$

#### 4.10 Cofilin-Dynamik im Live Cell Imaging

Von unserem Kooperationspartner Pankaj Goyal (Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, München) wurde uns freundlicherweise ein Cofilin-dsRedII-Vektor zur Verfügung gestellt. Damit konnte die Cofilin-Verteilung und mögliche Effekte einer Überexpression auch in lebenden Zellen analysiert werden. Diese wurden dazu mit dem Cofilin-Konstrukt und einem Aktin-GFP-Vektor kotransfiziert und mittels *live cell microscopy* untersucht. Durch Falschfarbendarstellung der beiden Kanäle in rot und grün und Überlagerung ließen sich somit Lokalisation und Konzentrationseränderungen beider Proteine synchron auswerten.

Es zeigte sich deutlich die auch in der Immunfluoreszenz an fixierten Zellen beobachtete Lokalisation von Cofilin in der aktinreichen Kernstruktur von Podosomen (Abb. 4.21, siehe auch beiliegende CD, Filme 1-4). Die hohe Podosomen-Dynamik konnte sehr gut beobachtet werden, dabei bestätigte sich die beschriebene Halbwertszeit von Podosomen von 2-12 min. Auch laterale Mobilität, Fusionsprozesse und Aufteilung einzelner Podosomen konnten verfolgt werden, ebenso die Neubildung und der Anstieg der Podosomenzahl als Reaktion auf Stimulation durch fMLP (Linder et al., 2003b). Bei all diesen Prozessen blieb die Kolokalisation von Cofilin mit Aktin bestehen, allerdings handelte es sich dabei nicht um eine vollständige Deckungsgleichheit. In der Einzelbildanalyse und im *Overlay* von Aktin und Cofilin zeigten sich immer wieder Änderungen in der Farbe und Farbintensität, sowohl im Zeitverlauf als auch räumlich innerhalb der Podosomen, als Ausdruck von Konzentrationsänderungen der beiden Konstrukte. Eine eindeutige Aussage, z.B. ob Cofilin bei Podosomen-Bildung und -Abbau vor oder nach dem Aktin akkumuliert und somit bei mobilen Podosomen eher am auf- oder Abbau von F-Aktin beteiligt ist, war mit der uns zur Verfügung stehenden Auflösungsfähigkeit des Objektivs nicht möglich.

Nachdem in der Zwischenzeit ein besseres Objektiv zur Verfügung steht, werden wir die Funktion von Cofilin in der *live cell* Mikroskopie weiter untersuchen. Dabei interessiert uns vor allem das zeitliche Auftreten bei der Bildung und dem Abbau von Podosomen sowie die räumliche Verteilung in mobilen Podosomen oder bei Verschmelzungs und Aufteilungsprozessen. Mit Hilfe eines Cofilin-GFP-Konstruktes sollten die Aggregations-Artefakte dabei deutlich reduziert werden können. Zudem werden wir Zellen nach Transfektion von Cofilin-siRNA untersuchen und erhoffen uns davon weitere Aufschlüsse über die Funktion von Cofilin bei der Podosomen-Regulation.



**Abb. 4.21: Cofilin und Aktin zeigen enge Korrelation in dynamischen Podosomen**  
 konfokalmikroskopische Aufnahmen, Einzelbilder aus (A) Film 1 und (B) Film 4  
 Zellen kotransfiziert mit GFP-Aktin und DsRed-Cofilin;  
 Pfeile markieren sich teilende Podosomen mit asymmetrischer Verteilung von Aktin  
 und Cofilin; weißer Balken: 10 μm

## 5 Diskussion

### 5.1 Physiologische Relevanz von Podosomen

Podosomen sind spezifische Adhäsionsstrukturen, die typisch für monozytäre Zellen sind (Linder et al., 2003a). Sie wurden jedoch auch in transformierten Fibroblasten (Tarone et al., 1985) und Krebszellen (Schuuring et al., 1993) gefunden und kürzlich erst in glatten Muskelzellen (Kaverina et al., 2003) und Endothelzellen (Moreau et al., 2003). Im Rahmen dieser Arbeit konnten podosomale Strukturen z.B. auch in murinen Makrophagen, epithelialen Brustkrebszellen und humanen Lymphoblasten nachgewiesen werden. Auch lassen sich in manchen Zellen durch Zugabe bakterieller Substanzen (zum Beispiel fMLP) oder endogener Chemokine (zum Beispiel VEGF) derartige Strukturen induzieren. Die Ausbildung podosomaler Strukturen scheint demnach eine funktionelle Anpassung verschiedenster Zellen auf distinkte äußere Reize darzustellen, insbesondere in migratorischen Zelltypen.

Die Ausbildung von Adhäsionsstrukturen hängt entscheidend vom Substrat ab, auf dem sich die Zellen befinden (Katz et al., 2000; Yeung et al., 2005). Dabei spielt sowohl die Rigidität des Untergrundes als auch das Vorhandensein von Adhäsionsvermittelnden Molekülen wie Fibronectin eine Rolle. Man kann deshalb vom Phänotyp, den Zellen auf künstlichen Oberflächen wie Glas-Coverslips ausbilden, nur bedingt auf die physiologische Relevanz der ausgebildeten Adhäsionsstrukturen schließen. Andere Adhäsionsstrukturen wie *Focal Adhesions* werden z.B. bevorzugt auf starrem Untergrund ausgebildet, wo sie auch als Mechanosensoren dienen (Riveline et al., 2001). Die Ausbildung von Podosomen auf physiologischen Substraten konnte bisher gezeigt werden für Osteoklasten auf Knochenlamellen (Zambonin-Zallone et al., 1989) und Natürliche Killerzellen auf Endothelzellen (Allavena et al., 1991). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass primäre humane Makrophagen auch dann Podosomen ausbilden, wenn sie auf einem *Monolayer* von Endothelzellen ausgesät werden (Linder et al., 2003). Dies spricht für die physiologische Relevanz von Podosomen.

Podosomen sind nicht nur reine Adhäsionsstrukturen, sondern auch Orte lokaler Matrix-Degradation, ähnlich Invadopodien (Burgstaller et al., 2005; Osiak et al., 2005; Linder et al., 2005). Diese Tatsache, zusammen mit der Entdeckung der weiten Verbreitung Podosomen-ähnlicher Strukturen, weist auf eine Rolle vor allem im Rahmen migratorischer und invasiver Prozesse hin, wie sie z.B. bei der Wanderung von Endothelzellen bei der Wundheilung, der Extravasation und Migration von monozytären Zellen und der Invasion von Krebszellen vorkommen. Makrophagen, die z.B. in Folge eines genetischen Defektes wie beim Wiskott-Aldrich-Syndrom nicht in der Lage sind, Podosomen auszubilden, weisen eine gestörte Polarisierung auf. Die betroffenen Patienten leiden an einer Immundefizienz und häufigen Infekten.

Die genauere Erforschung der Podosomen-Funktion dürfte somit interessante Einblicke sowohl in immunologische Prozesse als auch Tumorzellmigration und Metastasierung geben. Vor allem die Fähigkeit zur Matrix-Degradation bietet interessante Anknüpfungspunkte. Eine der spannendsten und anspruchsvollsten Fragen in Zukunft dürfte sein, wie die Ausbildung und Verteilung von Podosomen in



Aktin-Umsatzes ist jedoch beschrieben (Yonezawa et al., 1987; Chhabra et al., 2002). Die Regulation von Cofilin erfolgt u.a. durch Phosphorylierung des Serins an Position 3, was eine Inaktivierung zur Folge hat. Mittels Immunfluoreszenzfärbung und Transfektion konnte nun in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl Cofilin als auch Phospho-Cofilin mit dem Aktin-reichen Kern von Podosomen kolokalisiert. Dies ist vermutlich Ausdruck der hohen Dynamik innerhalb der Podosomen, wo innerhalb von Minuten eine mehrfache Umwälzung des F-Aktins stattfindet (Destaing et al., 2003). Dazu ist eine kontinuierliche Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation notwendig, wobei Cofilin wahrscheinlich eine zentrale Rolle zukommt.

Einen weiteren Anhaltspunkt für die Bedeutung von Cofilin in der Podosomen-Regulation lieferten *Western Blot* Versuche, in denen gezeigt werden konnte, dass eine Zerstörung der Podosomen auch zu einem verminderten Phospho-Cofilin-Level führt. Da Cofilin eine Depolymerisierung von F-Aktin bewirkt und phosphoryliertes Cofilin inaktiv ist, entspricht dieses Ergebnis der Erwartung bei einem Rückgang des F-Aktin in der Zelle. Es kann daher angenommen werden, dass Cofilin über seine Aktin-regulierende Funktion eine wichtige Rolle in der Podosomen-Dynamik spielt. Es bleibt zu klären, ob Cofilin - wie im *treadmilling*-Modell postuliert - nur den Umsatz an Aktin erhöht und dadurch die Dynamik gewährleistet, oder ob es eine spezifische Rolle bei einzelnen Prozessen spielt, z.B. durch F-Aktin-Depolymerisierung den Abbau von Podosomen begünstigt.

Nach Transfektion von Cofilin-siRNA konnte bereits 24h nach Transfektion eine Verminderung des Aktin-Gehaltes und der Podosomenzahl pro transfizierter Zelle beobachtet werden. Am zweiten und dritten Tag nach Transfektion war diese Reduktion am deutlichsten zu sehen, im weiteren Verlauf ließ der Effekt wieder nach, was wohl in erster Linie auf die Instabilität der siRNA zurückzuführen ist.

In *live-cell*-Versuchen konnte die Kolokalisation von Cofilin und Aktin bei allen Prozessen - d.h. Podosomen-Entstehung, -Teilung, -Verschmelzung, -Wanderung und -Abbau - verfolgt werden. Dabei zeigt sich auf den ersten Blick eine permanente Kolokalisation beider Proteine. In der Einzelbildanalyse ist jedoch zu erkennen, dass keine vollständige Deckungsgleichheit vorliegt, sondern dass es immer wieder Intensitäts- und Farbveränderungen als Ausdruck unterschiedlicher Konzentrationen und Lokalisationen beider Proteine gibt. Dies deutet darauf hin, dass räumliche und zeitliche Konzentrationsunterschiede vorhanden sind, die eine Rolle bei der Podosomen-Regulation spielen könnten. Interessant ist vor allem die Frage, ob der Teilung oder Abbau von Podosomen eine erhöhte lokale Cofilin-Konzentration vorausgeht. Mit der zur Verfügung stehenden Technik war es leider nicht möglich, diese Prozesse besser aufzulösen. Inzwischen wurde die *live cell*-Anlage jedoch ausgebaut, und weitere *live-cell*-Versuche zur genaueren Analyse werden folgen.

### 5.3 Einfluss der LIM-Kinasen auf die Podosomen-Regulation

Die am besten untersuchten Regulatoren von Cofilin sind die sogenannten LIM-Kinasen, die Cofilin phosphorylieren und damit inaktivieren können. Zwei Isoformen sind bisher bekannt: LIMK2 zeigt eine ubiquitäre Gewebeverteilung, während LIMK1 besonders hohe Konzentrationen in neuronalen Geweben aufweist (Nunoue et al., 1995), inzwischen aber auch in anderen Geweben nachgewiesen wurde. Beide Isoformen wurden in dieser Arbeit untersucht.

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe war bereits mittels RT-PCR in primären Makrophagen mRNA von LIMK1 nachgewiesen worden (Hüfner et al., unveröffentlicht). Da zu Beginn der Arbeit keine Möglichkeit der Transfektion von primären Makrophagen bestand und die angebotenen kommerziellen Antikörper nicht Immunfluoreszenz-tauglich waren, wurde ein eigener Antikörper gegen LIMK1 etabliert. Als Antigen wurde ein Fragment von LIMK1 benutzt, welches die beiden LIM-Domänen enthielt. Mit diesem Antikörper konnte LIM-Kinase auch mittels *Western Blot* in Zelllysaten nachgewiesen werden, eine einwandfreie Unterscheidung zwischen LIMK1 und LIMK2 war aufgrund des geringen Wanderungsunterschiedes in der SDS-PAGE allerdings nicht möglich. Mittels neuer kommerzieller, Isoform-spezifischer Antikörper wurden die Versuche inzwischen wiederholt. Dabei wurde im *Western Blot* sowohl LIMK1 als auch LIMK2 gefunden, LIMK1 aber in deutlich höherer Konzentration. Auch die Ergebnisse der DNA-Arrays weisen auf LIMK1 als dominante Isoform hin: Im Verlauf der Makrophagen-Reifung kommt es zu einem Anstieg der Expression von LIMK1, während sich die Expression von LIMK2 nicht ändert. LIMK1 scheint somit nicht nur in neuronalen, sondern auch in hämatopoetischen Zellen die dominante Isoform zu sein. Auch mit dem neu etablierten Antikörper konnte allerdings konfokalmikroskopisch keine spezifische subzelluläre Lokalisation nachgewiesen werden.

In weiteren Versuchen wurden verschiedene GFP-Konstrukte von LIMK1 und LIMK2 (Volllänge und einzelne Domänen) transfiziert und bezüglich Lokalisation und Effekte auf Podosomen konfokalmikroskopisch analysiert. Auch diese Konstrukte zeigten keine podosomale Lokalisation, sondern im Gegenteil meist eine Aussparung der Podosomen bei ansonsten diffuser Verteilung im Zytoplasma. Allerdings sieht man teilweise, am auffälligsten bei den Konstrukten LIMK2-PK-GFP und LIMK1-LIM-GFP, eine Anreicherung der Konstrukte in einem erweiterten Ring rund um die einzelnen Podosomen. Es ist bekannt, dass die podosomale Ringstruktur um den Aktin-reichen Kern unter anderem auch Vinculin und Paxillin enthält. In einem kürzlich erschienen Artikel wurde eine Bindung von LIMK1 mit Paxillin und eine Kolo-kalisation mit Vinculin beschrieben (Foletta et al., 2004), so dass es möglicherweise noch einen erweiterten Ring um Podosomen gibt, in den auch LIM-Kinase lokalisiert. Die im gleichen Artikel beschriebene Kolo-kalisation mit F-Aktin scheint allerdings in Podosomen nicht zu bestehen.

Funktionell konnte in den fixierten Präparaten kein spezifischer Effekt auf die Podosomen gezeigt werden. Je nach Aktivität des Konstruktes kam es meist früher (<4h) oder später (>24h) zur Kontraktion der Zellen und folgender Ablösung. Zuvor war meist eine Akkumulation von F-Aktin zu sehen, in Form von größeren und prominenteren Podosomen, die auch noch bei maximal kontrahierten Zellen vorhanden waren. Da LIMK Cofilin inaktiviert, welches normalerweise F-Aktin depolymerisiert, könnte dieser Befund durchaus darauf hinweisen, dass es durch die Überexpression von LIMK zu einer verstärkten Phosphorylierung und dadurch zu einer verminderten Aktivität von Cofilin kommt. Eine *Western Blot* Analyse von Zelllysaten war aufgrund der niedrigen Transfektionseffizienz der primären Zellen zwar nicht möglich, in Immunfluoreszenzfärbungen wurde aber in den transfizierten Zellen ein deutlich stärkeres Phospho-Cofilin-Signal gesehen, was diese Erklärung plausibel macht. Dies könnte zu einer verminderten Depolymerisierung führen, also zu einer Akkumulation von F-Aktin und einem gestörten Abbau von Podosomen.

Es erscheint unsicher, ob es sich bei den beobachteten Effekten um physiologische Funktionen handelt oder artifizielle Wirkungen der Überexpression. Ebenso bleibt offen, ob die Kontraktion und Ablösung der Zellen alleine durch die Wirkung der LIM-Kinasen auf Cofilin und das Aktin-Zytoskelett verursacht wird oder ob es weitere Effekte von LIM-Kinasen gibt. Auch für Zellzyklus-Regulation, Mitoseprozesse und Zytokinese wurde ein Einfluss von Slingshot (Kaji et al., 2003) und LIMK nachgewiesen (Amano et al., 2002). LIMK1 besitzt eine nukleäre Translokationssequenz, und der Transport in den Kern scheint im Zusammenhang mit der Zellzyklus-Kontrolle zu stehen (Yokoo et al., 2003). Dieser Effekt wird durch eine Suppression von Cyclin D1 vermittelt und ist unabhängig von Cofilin (Roovers et al., 2003). Darüber hinaus können auch Protein-Protein-Interaktionen der LIM-Domänen weitere Effekte haben, z.B. ist eine Assoziation mit Protein Kinase C (PKC) beschrieben (Kuroda et al., 1996). Diese und möglicherweise weitere, noch unbekannt Funktionen der beteiligten Proteine könnten bei der Untersuchung der Podosomen-Regulation Seiteneffekte hervorrufen haben, die eine isolierte Betrachtung der Proteine in der Podosomen-Regulation erschweren. Cofilin scheint ebenfalls bei intranukleären Prozessen (Nishida et al., 1987) und bei der Apoptose-Regulation eine wichtige Rolle zu spielen (Abe et al., 1993; Samstag et al., 1996; Chua et al., 2003). Möglicherweise wurden durch die transfizierten LIM-Kinase-Konstrukte auch solche Prozesse beeinflusst.

Es konnte somit in dieser Arbeit gezeigt werden, dass LIMK1 auch in Makrophagen die dominante Isoform ist. Eine Kolokalisation mit Aktin oder Cofilin in Podosomen konnte weder mit kommerziellen noch mit einem selbst hergestellten Antikörper nachgewiesen werden, evtl. besteht jedoch eine Anreicherung in einem erweiterten Ring um die Podosomen. Indirekte Hinweise deuten darauf hin, dass auch in Makrophagen LIMK eine Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Cofilin bewirkt. Eine spezifische Wirkung verschiedener transfizierter Konstrukte auf die Podosomen war jedoch nicht festzustellen, da Untersuchungen nur immunfluoreszenzmikroskopisch auf Einzelzellebene möglich waren und die Transfektionstechnik primärer humaner Makrophagen nach wie vor eine hohe Toxizität aufweist. Eine Verbesserung der Transfektionseffizienz sowie ein neu beschriebener Antikörper könnten detailliertere Untersuchungen ermöglichen. Im Vordergrund wird dabei die Frage stehen, ob und wie die endogene LIM-Kinase an der physiologischen Cofilin-Regulation beteiligt ist.

#### **5.4 Einfluss von Protein-Phosphatasen auf die Podosomen-Regulation**

2000 wurde beschrieben, dass die Serin/Threonin Phosphatasen vom Typ 1 und Typ 2A (PP1/PP2A) Cofilin binden und dephosphorylieren können (Ambach et al., 2000) und somit funktionelle Gegenspieler der LIM-Kinasen sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss dieser Phosphatasen auf die Podosomen-Regulation mit Hilfe der Inhibitoren Calyculin und *okadaic acid* untersucht. Dabei konnte durch Zugabe diese Substanzen zum Medium - in verschiedenen Konzentrationen und für verschiedenen Zeitspannen - kein mikroskopisch fassbarer Effekt auf den Phänotyp nachgewiesen werden. Auch im Podosomen-Rekonstitutions-Assay wurde kein Einfluss auf die Podosomen-Bildung gefunden. Dieses Ergebnis überrascht insofern, als die Halbwertszeit einzelner

Podosomen 2-12 Minuten beträgt und auch innerhalb dieser Zeit das Aktin mehrfach umgewälzt wird, wobei Cofilin eine wichtige Rolle spielen dürfte. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es zwar zu einer Einschränkung der Dynamik und verlangsamtem Auf- und Abbau kommt, dieser sich aber nicht auf die Gesamtzahl der Podosomen auswirkt. Dieser Effekt wäre somit an fixierten Präparaten nicht feststellbar, sondern nur durch Analyse in der *live cell* Mikroskopie. Entsprechende Experimente unserer Arbeitsgruppe sind geplant.

Möglicherweise sind PP1 und PP2A zwar in der Lage, Cofilin zu dephosphorylieren, aber nicht die physiologischen Regulatoren. Gründe hierfür könnten zum Beispiel verschiedene intrazelluläre Lokalisation oder Kompartimentalisierung sein. Eine weitere Erklärung liefert möglicherweise die Entdeckung einer spezifischen Cofilin-Phosphatase, Slingshot (SSH), welche im Verlauf der vorgestellten Arbeit erstmals beschrieben wurde (Niwa et al., 2002). Slingshot scheint ein sehr vielversprechender Kandidat zu sein, dessen Rolle im weiteren Verlauf der Untersuchungen analysiert werden soll.

## 5.5 Einfluss der RhoGTPase-Effektoren ROCK und PAK auf die Podosomen-Regulation

Die Mitglieder der RhoGTPasen-Familie Rho, Rac und Cdc42 sind entscheidende Schaltstellen in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts, die jeweils an der Regulation charakteristische Zellstrukturen beteiligt sind. So induziert Rho Stressfasern und fokale Adhäsionen, Rac führt zu *membrane ruffling* und Cdc42 reguliert Filopodien (Tapon et al., 1997). Die Überexpression bzw. Mikroinjektion konstitutiv aktiver oder inaktiver Konstrukte der GTPasen führt in Makrophagen zum Verlust oder zur Induktion von Podosomen (Chellaiah et al., 2000; Linder et al., 2000a; Burns et al., 2001; Moreau et al., 2003). Diese Funktionen der GTPasen werden durch verschiedene Effektoren vermittelt (Bishop et al., 2000). Untersucht wurden in der vorliegenden Arbeit der Rho-Effektor ROCK (*p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase*) und die Rac- und Cdc42-Effektoren PAK1 und PAK4 (*p21-activated kinases*). Es ist beschrieben, dass diese Effektoren LIMK1 bzw. LIMK2 phosphorylieren und aktivieren können (Edwards et al., 1999; Sumi et al., 1999; Ohashi et al., 2000; Dan et al., 2001; Amano et al., 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des ROCK-Inhibitors Y-27632 ins Medium zwar nicht zu einer Veränderung der Podosomenzahl, aber der Podosomen-Verteilung führt, vergleichbar einem frühen Stadium der Aktivierung und Zellpolarisation. Im Podosomen-Rekonstitutions-Assay wurde die Podosomen-Bildung massiv gestört, nur ca. 35% der Zellen bildeten wieder regulär Podosomen aus. Dafür zeigte ein Großteil der Zellen starkes *ruffling*, vermutlich als Zeichen der Gleichgewichtsverschiebung zwischen Rho und Rac mit Überwiegen der Rac-Aktivität. Die veränderte Podosomen-Verteilung könnte Hinweis auf die bekannte Beteiligung der Rho-GTPasen bei der Zellpolarisation und Migration sein (Fukata et al., 2003), bei der es ebenfalls zu einer Umverteilung der Podosomen kommt mit Konzentration am *leading edge*. Für ROCK wurde dabei bisher eine Beteiligung an der *tail retraction* von migrierenden Makrophagen nachgewiesen (Worthylake et al., 2001b). Die beobachteten Effekte deuten aber daraufhin, dass ROCK zumindest indirekt auch an der Podosomen-Regulation beteiligt ist.

Effektoren von Rac1 und Cdc42Hs sind die *p21-activated kinases* (PAKs), die in zwei Subgruppen (PAK1-3 und PAK4-6) aufgeteilt werden (Jaffer et al., 2002). Mitglieder beider Gruppen können LIMK1 aktivieren, bisher wurde dies für PAK1 (Edwards et al., 1999) und PAK4 (Dan et al., 2001) gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von PAK1 und PAK4 durch Transfektion und Überexpression verschiedener Konstrukte analysiert. PAK1-Volllänge führte zu einer deutlichen Reduktion sowohl der Podosomenzahl als auch des F-Aktin-Gehaltes der Zelle allgemein. Den gleichen Effekt, allerdings in schwächerer Ausprägung, zeigte auch die Kinase-inaktive Mutante PAK1-K298A.

Für PAK4 stand uns kein Volllänge-Konstrukt zur Verfügung, nur die konstitutiv-aktive Mutante PAK4-S445N/S474E (PAK4NE) und die Kinase-inaktive Mutante PAK4-K350M (PAK4KM). Auch diese beiden führten, wie die PAK1-Konstrukte, jeweils zu einer Abnahme der Podosomen-Zahl. Allerdings hatten sie gegensätzliche Effekte auf die verbliebenen Podosomen: Während diese bei PAK4KM sehr klein waren und wenig F-Aktin enthielten, waren sie bei PAK4NE deutlich größer als normale Podosomen und hatten einen größeren F-Aktin-Gehalt.

Es scheint demnach, dass die Reduktion der Podosomen-Anzahl ein Kinase-unabhängiger Effekt ist. Interessanterweise wurde auch schon beschrieben, dass die Induktion von Lamellipodien und *ruffles* durch PAK1 unabhängig von der katalytischen Aktivität ist und vermutlich über die Interaktion der regulatorischen Domäne von PAK1 mit anderen Proteinen vermittelt wird (Frost et al., 1998). Dies könnte eine Erklärung sein, wieso alle Konstrukte einen ähnlichen Effekt auslösen.

Die gegenteiligen Effekte der beiden PAK4-Konstrukte sind hingegen offensichtlich auf die Kinase-Aktivität zurückzuführen. Dies würde sich mit den bekannten Regulationswegen über LIM-Kinase und Cofilin gut erklären lassen. PAK4 könnte LIM-Kinase aktivieren, welche wiederum Cofilin inaktiviert. Da Cofilin eine Depolymerisierung von Aktin bewirkt, führt eine Inaktivierung von Cofilin zur Erhöhung des F-Aktin-Gehaltes bzw. verhindert zumindest den Abbau, was die großen Podosomen erklärt.

PAK4 wurde und wird in unserer Arbeitsgruppe weiter intensiv untersucht, dabei konnten zum einen die genannten Effekte statistisch signifikant quantifiziert werden, zum anderen zusätzliche Erkenntnisse zur Regulation gewonnen werden. Auch die Ergebnisse der DNA-Arrays sowie die subzelluläre Lokalisation mit spezifischen Antikörpern deuten daraufhin, dass in Makrophagen nicht PAK1, sondern PAK4 der physiologische Regulator ist. Weitere Untersuchungen hierzu werden folgen.

## 5.6 Einfluss von PIP<sub>2</sub> und PLCβ auf die Podosomen-Regulation

Neben der Phosphorylierung ist die PIP<sub>2</sub>-Bindung ein weiterer Regulationsmechanismus von Cofilin (Yonezawa et al., 1990). Die Bindungsstelle von PIP<sub>2</sub> an Cofilin liegt innerhalb der Aktin-bindenden Domäne, wodurch gebundenes PIP<sub>2</sub> die F-Aktin-Depolymerisierung inhibiert (Kusano et al., 1999). PIP<sub>2</sub> ist ein Schlüsseffektor in der Regulation des Aktin-Zytoskelettes (Takenawa et al., 2001) und wird selbst durch verschiedene Proteine kontrolliert (McLaughlin et al., 2002). Die Bildung aus Phosphoinositol (PI) erfolgt durch PIP-4- und PIP-5-Kinase (PIP4K/PIP5K), der Abbau bzw. Umbau durch verschiedene Phosphatasen, Phospholipasen oder Kinasen. In der vorliegenden Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die Phospholipase β<sub>2</sub> (PLCβ<sub>2</sub>) gelegt, da für diese zum Zeitpunkt der

Experimente als bisher einzige eine Regulation durch die Rho-GTPasen Cdc42Hs und Rac1 nachgewiesen war (Illenberger et al., 1998), welche bekanntermaßen an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und speziell von Podosomen beteiligt sind (Linder et al., 1999). Inzwischen wurde auch für PLC $\gamma$ 1 eine Aktivierung durch Cdc42Hs gezeigt (Papakonstanti et al., 2004).

Eine spezifische Lokalisation von PIP $_2$  in oder um Podosomen konnte zwar mit einem kommerziellen Antikörper nicht gefunden werden. Nach Transfektion der PIP $_2$ -bindenden PH-Domäne von PLC $\delta$ 1, die als PIP $_2$ -Sensor benutzt werden kann (Watt et al., 2002), wurde jedoch neben der erwarteten Anreicherung entlang der Plasmamembran auch eine ringförmige Lokalisation um Podosomen beobachtet. In diesem Bereich befinden sich etliche an Adhäsionsvorgängen beteiligte Proteine wie Vinculin und Talin, die durch PIP $_2$  reguliert werden (Chandrasekar et al., 2005).

Um Einsichten in die funktionelle Beteiligung von PIP $_2$  an der Podosomen-Regulation zu erhalten, wurden Mikroinjektionsversuche mit zwei PIP $_2$ -bindenden Proteinen und einem PLC-aktivierenden Peptid durchgeführt. Durch Wahl eines entsprechenden Injektionsdruckes kommt es - unabhängig von der injizierten Substanz - zu einer transienten Zerstörung der Podosomen, welche sich nach etwa 40 min wieder neu formieren. Durch die drei Konstrukte, welche alle den intrazellulären PIP $_2$ -Level bzw. das frei verfügbare PIP $_2$  reduzieren sollten, wurde diese Reformation allerdings nicht beeinflusst, auch sonst war kein Effekt auf den Phänotyp und die Podosomen zu beobachten. Möglicherweise ist der intrazelluläre Pool an PIP $_2$  zu groß bzw. die Bildung und der Umsatz zu schnell, als dass er sich durch die - in der Konzentration technisch begrenzte - Injektion der Proteine beeinflussen lässt.

Die Beteiligung von Phosphoinositolen an der Podosomen-Regulation wurde in Osteoklasten erst vor kurzem nachgewiesen (Biswas et al., 2004). Für eine Beteiligung von PIP $_2$  an der Podosomen-Regulation spricht auch, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals für Proteine der PLC $\beta$ -Familie eine spezifische Lokalisation nachgewiesen werden konnte. Dabei fand sich PLC $\beta$ 1 im Podosomen-Kern und PLC $\beta$ 2 am äußeren Rand der Podosomen-Ringstruktur, während PLC $\beta$ 3 eine diffuse intrazelluläre Verteilung zeigte. Dies spricht für eine distinkte Funktion der Phospholipasen in der Podosomen-Dynamik. Auch transfiziertes PLC $\beta$ 2-GFP zeigte die in den Antikörper-Färbungen gesehene Anreicherung um die Podosomen, allerdings nicht im durch Vinculin gefärbten Podosomen-Ring, sondern noch außerhalb dieser Struktur. Funktionell konnte durch die Transfektion und Überexpression allerdings kein signifikanter Effekt auf die Podosomen gefunden werden, weder in zu verschiedenen Zeitpunkten fixierten Präparaten noch dynamisch in der *live cell* Mikroskopie.

Die Transfektionsversuche wurden auch mit einer Spleißvariante von PLC $\beta$ 2, PLC $\beta$ 2-Iso1, durchgeführt, welche die gesamte PH-Domäne plus einige wenige Aminosäuren enthält. Diese zeigte die gleiche Verteilung wie das Volllänge-Konstrukt und zusätzlich eine Anreicherung entlang der Zellmembran. Diese ist vermutlich, wie bei der PH-Domäne von PLC $\delta$ 1, auf die PIP $_2$ -Bindung zurückzuführen. Mit diesem Konstrukt transfizierte Zellen wurden außerdem auch im Podosomen-Rekonstitutions-Assay untersucht, wo die Podosomen durch PP2-Zugabe zerstört werden und die Neubildung analysiert wird. Es war jedoch kein

Effekt festzustellen, die Podosomen bildeten sich regelrecht wieder, sowohl in der Anzahl als auch der Geschwindigkeit bestand kein Unterschied zu Kontrollzellen.

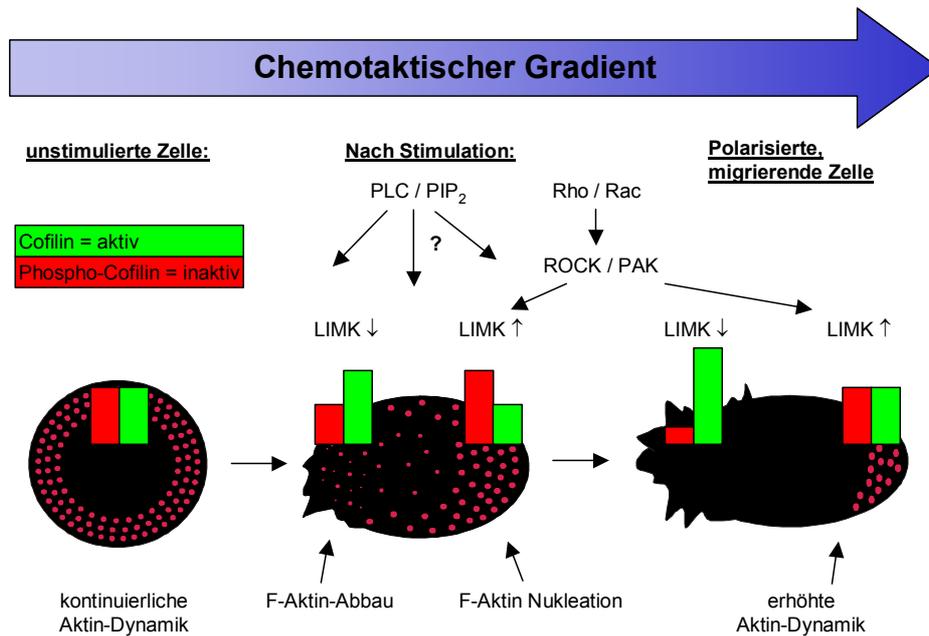
In weiteren Versuchen wurden die Effekte einer Inhibition von PLC untersucht. Die Zugabe des Inhibitors bewirkte nach konzentrationsabhängiger Zeit ein Krampfen und Ablösen der Zellen. Bereits davor kam es jedoch zu einem Verschwinden der Podosomen, im Gegensatz z.B. zur Transfektion von LIM-Kinase-Konstrukten. Dies deutet auf eine Rolle der PLC in der Podosomen-Regulation hin. Eine mögliche Erklärung wäre dabei, dass die Inhibition der PLC zum Verlust der Podosomen, damit zum Verlust der Adhäsion und zur Ablösung der Zellen führt. Das starke Krampfen der Zellen legt allerdings nahe, dass weitere Effekte der blockierten Phospholipasen mit beteiligt sind. Offen ist auch noch der genaue Mechanismus, so dass die Rolle der PLC in der Podosomen-Regulation mit diesen Experimenten nicht sicher aufgeklärt werden konnte.

Insgesamt konnte also eine Lokalisation von PLC $\beta$ 1 im Aktin-reichen Podosomen-Kern, von PLC $\beta$ 2 in der podosomal Ringstruktur und von PIP $_2$  in einem erweiterten Ring um Podosomen gefunden werden. Die Reduktion des intrazellulären PIP $_2$ -Levels durch mikroinjizierte Peptide sowie die Überexpression von PLC $\beta$ 2 hatte keinen Effekt auf die Podosomen, die Inhibition der PLC führte jedoch zu einem Verlust der Adhäsionsfähigkeit mit Ablösung der Zellen. Es bestehen somit deutliche Hinweise auf eine Beteiligung der Phospholipasen C $\beta$ 1 und C $\beta$ 2 an der Podosomen-Regulation. Zur Aufklärung der genauen Mechanismen und Signalwege sind jedoch weitere Versuche notwendig und geplant.

## 5.7 Modell der Podosomen-Regulation

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse hinsichtlich der Podosomen-Regulation durch Cofilin-abhängige Signalwege sind in Abb. 5.2 in einem hypothetischen Modell zusammengefasst.

In unstimulierten Makrophagen besteht demnach ein Gleichgewicht von aktivem und inaktivem (phosphoryliertem) Cofilin, welches die permanente Podosomendynamik mitreguliert. Nach Stimulation durch chemotaktische Substanzen kommt es zur Aktivierung RhoGTPase-abhängiger Signalwege, welche via ROCK und PAK LIM-Kinasen aktivieren können. Im Verlauf der Zellpolarisation kommt es dadurch zu einer Änderung der Balance zwischen Cofilin und Phospho-Cofilin: Aktiviertes Cofilin überwiegt am hinteren Zellende, im vorderen Bereich mit rascher Podosomen-Neubildung findet sich dagegen vorwiegend inaktives Phospho-Cofilin. In komplett polarisierten und migrierenden Zellen kommt es zu einem neuen Gleichgewicht am vorderen Zellende mit schnellem Wechsel zwischen Aktin-auf- und abbauenden Prozessen. Dabei könnten PLC $\beta$ 1- oder PLC $\beta$ 2-abhängige Signalwege beteiligt sein, die möglicherweise über PIP $_2$  ebenfalls an der Regulation der F-Aktin-Cofilin-Interaktion mitwirken.



**Abb. 5.2: Regulation der Podosomen-Dynamik durch Cofilin-regulatorische Signalwege**  
 Schematische (teilweise hypothetische) Darstellung der Cofilin-Aktivität in ruhenden und stimulierten Makrophagen. Rote und grüne Balken zeigen symbolisch das Verhältnis von aktivem zu inaktivem (phosphoryliertem) Cofilin zu verschiedenen Zeiten an.

## 6 Ausblick

Die Beteiligung von Cofilin an der hohen Aktin-Dynamik im Podosomen-Kern kann als gesichert gelten. Mit den neuen Möglichkeiten der *Live Cell*-Mikroskopie kann diese Dynamik sichtbar gemacht. Zukünftig stehen hierfür ein besseres Objektiv und neue Laser zur Verfügung, so dass zum einen die Ortsauflösung erhöht werden kann. Zum anderen treten durch kürzere Belichtungszeiten weniger starke Ausbleicheffekte transfizierter, fluoreszenzmarkierter Konstrukte auf, wodurch entweder längere Beobachtungszeiträume oder - durch häufigere Aufnahmen – eine bessere zeitliche Auflösung der Prozesse möglich wird. Mit neu auf den Markt gekommenen, speziell für Monozyten optimierten Transfektions-Lösungen und den entsprechenden *Nucleofector*<sup>®</sup>-Einstellungen könnte es leichter fallen, zum einen die Transfektionseffizienz zu erhöhen und zum anderen die toxischen Effekte der Transfektion selbst zu minimieren, wodurch wiederum die Beobachtungsdauer verlängert werden kann. Dies ist vor allem wichtig bei weiteren Versuchen mittels RNAi, welche bisher durch die geringe Effizienz und Toxizität der *Nucleofection*<sup>®</sup> sehr limitiert war.

In einem aktuellen Projekt unserer Arbeitsgruppe wird die Rolle von PAK4 näher untersucht. Die gegenteiligen Effekte der untersuchten Konstrukte deuten auf eine spezifische Funktion in der Podosomen-Dynamik hin. Diese Effekte gilt es zunächst zu quantifizieren. Mittels Immunfluoreszenz und geeigneten Antikörpern kann die subzelluläre Lokalisation der zelleigenen PAK-Isoformen sichtbar gemacht werden. Es muss biochemisch oder mittels RT-PCR verifiziert werden, ob PAK4 tatsächlich die dominante Isoform in Makrophagen darstellt. Von großem Interesse wird sodann die Frage sein, über welche Mechanismen PAK4 in die Podosomen-Regulation eingreift. Naheliegend wäre die bekannte und in anderen Zusammenhängen aufgezeigte Signalkaskade über LIM-Kinase und Cofilin. Aber auch andere Interaktionspartner, wie z.B. PIX, könnten dabei eine Rolle spielen. *Upstream* wäre zu prüfen, ob PAK dabei als Rac-Effektor fungiert oder durch andere Proteine aktiviert wird.

Ein weiterer Anknüpfungspunkt ist die Rolle der PLC in der Podosomen-Regulation. Da sowohl PLC $\beta$ 1 als auch PLC $\beta$ 2 in Podosomen lokalisiert werden konnte, kann eine Beteiligung an der Regulation angenommen werden. Zu untersuchen ist, auf welche Weise diese stattfindet. Eine Möglichkeit wäre die Beeinflussung der Cofilin-Aktivität über PIP<sub>2</sub>. Auch hier wäre eine höhere Transfektionseffizienz bei primären humanen Makrophagen sehr hilfreich, um zum einen direkte Bindungspartner der Phospholipasen identifizieren zu können, zum anderen Auswirkungen der Überexpression auf PIP<sub>2</sub>-Level messen zu können. Des Weiteren wird auch hier die *in vivo*-Beobachtung mittels *Live-Cell*-Mikroskopie eine wichtige Rolle spielen, womit sich die Podosomen-Dynamik transfizierter Zellen gegenüber untransfizierten Zellen vergleichen lässt.

## 7 Zusammenfassung

Podosomen sind ein prominenter Teil des Aktinzytoskelettes primärer humaner Makrophagen und wahrscheinlich essentiell für Adhäsion, Matrixverdau und gerichtete Migration. In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation dieser Strukturen untersucht.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass Monozyten Podosomen nicht nur auf starren, künstlichen Oberflächen wie Glas-Deckgläschen ausbilden, sondern auch auf einem Monolayer aus Endothelzellen. Dies unterscheidet sie klar von anderen Adhäsionsstrukturen wie z.B. *focal adhesions*. Auch in verschiedenen Zelllinien, unter anderem in Krebszellen, ließen sich podosomale Strukturen nachweisen bzw. induzieren. Diese Befunde sind Hinweis einerseits auf die physiologische Relevanz von Podosomen und andererseits auf eine wahrscheinlich weite Verbreitung dieser Strukturen in verschiedenen Zelltypen.

Podosomen sind hochdynamische Strukturen mit einer Halbwertszeit von 2-12 Minuten, das heißt, es werden permanent Podosomen abgebaut und neu gebildet. Dazu ist die Polymerisation und Depolymerisation von filamentösem (F-)Aktin notwendig. Regulationsmechanismen F-Aktin-aufbauender Wege sind gut untersucht und bekannt, weshalb in der vorliegenden Arbeit F-Aktin-abbauende Wege untersucht wurden.

Ein wichtiger Regulator des Aktinzytoskelettes ist Cofilin, das die Depolymerisierung von Aktinfilamenten beschleunigt und unter anderem durch Phosphorylierung am Serin-3 inaktiviert werden kann. Folgende Ergebnisse sprechen für eine wichtige Rolle von Cofilin in der Podosomen-Regulation:

Es konnte eine spezifische Lokalisation von Cofilin und phosphoryliertem Cofilin in der Aktin-reichen Podosomen-Kernstruktur nachgewiesen werden. Im *Western Blot* zeigte sich eine Korrelation des Grades der Cofilin-Phosphorylierung mit der Podosomenanzahl. Durch Mikroinjektion eines kurzen Peptids, welches die Cofilin-Phosphorylierung inhibiert, sowie durch Transfektion von Cofilin-siRNA konnte die Podosomenbildung reduziert werden.

Die am besten untersuchten Cofilin-Kinasen sind die LIM-Kinasen 1 und 2. Mittels RT-PCR war in unserer Arbeitsgruppe bereits die Expression von LIMK1 in Makrophagen nachgewiesen worden. Auch Ergebnisse im *Western Blot* sowie in DNA-Arrays weisen auf LIMK1 als dominante Isoform in Makrophagen hin.

In fixierten Präparaten konnte allerdings weder mit kommerziell erhältlichen noch mit einem selbst hergestellten, gegen die LIM-Domänen von LIMK1 gerichteten Antikörper eine spezifische Lokalisation von LIMK1 an Podosomen nachgewiesen werden.

Mittels *Nucleofection*<sup>TM</sup> wurden deshalb verschiedene LIM-Kinase-Konstrukte transfiziert und überexprimiert. Dabei bestätigten sich die Ergebnisse der Antikörperfärbungen, keines der Konstrukte war in Podosomen zu finden. Alle Konstrukte mit Kinase-Aktivität führten zum raschen Krampfen und Ablösen der Zellen, wobei die Adhäsionsfläche bis zuletzt mit Podosomen bedeckt war. Im Gegensatz zu den Befunden aus der Transfektion war durch Mikroinjektion der konstitutiv aktiven Kinase-Domäne von LIMK1 eine deutliche Reduktion der Podosomen-Bildung zu erzielen. Hier können konzentrationsabhängige Effekte eine Rolle spielen.

Als Gegenspieler der LIM-Kinasen wurden die Phosphatasen PP1 und PP2A beschrieben. Eine spezifische Lokalisation von PP2A an Podosomen war jedoch nicht nachzuweisen, zudem hatte eine Inhibition der beiden Phosphatasen keinen Effekt auf die Podosomenbildung oder den Podosomenabbau. Dies spricht gegen eine Beteiligung

von PP1 oder PP2A an der Podosomenregulation. Gegen Ende der vorliegenden Arbeit wurde mit *Slingshot* eine wohl spezifische Cofilin-Phosphatase beschrieben, mit der weitere Versuche geplant sind.

LIM-Kinasen selbst können durch Effektoren der Rho-GTPasen Rho, Rac und Cdc42 reguliert werden. So aktiviert der Rho-Effektor ROCK LIMK1 und LIMK2. Der ROCK-Inhibitor Y-27632 führte zu einer Störung der Podosomen-Verteilung, auch die Podosomen-Neubildung wurde stark inhibiert. Dies spricht für eine Beteiligung von ROCK an der Podosomenregulation.

Auch Rac und Cdc42 können durch die gemeinsamen Effektoren der PAK-Familie eine Aktivierung von LIMK1 bewirken, dabei sind PAK1 und PAK4 die am besten untersuchten Isoformen. Die Transfektion verschiedener PAK1- und PAK4-Konstrukte führte jeweils zu einer Reduktion der Podosomen-Anzahl, unabhängig von der Kinase-Aktivität des Konstruktes. Die Kinase-inaktive PAK4-Mutante führte zu einer Reduktion des F-Aktin mit kleinen Podosomen, während die konstitutiv-aktive PAK4-Mutante große Podosomen mit vermehrtem F-Aktin bewirkte. Weitere Arbeiten zur Untersuchung vor allem von PAK4 in unserer Arbeitsgruppe konnten diese Ergebnisse bestätigen und quantifizieren sowie weitere Interaktionspartner nachweisen.

Eine weitere Regulationsmöglichkeit von Cofilin ist die Bindung des *second messengers* PIP<sub>2</sub>, welcher unter anderem durch Isoformen der Phospholipase C (PLC) hydrolysiert werden kann. Die Mikroinjektion zweier Peptide, die laut Literatur zu einer PIP<sub>2</sub>-Inhibition bzw. einer Steigerung des PIP<sub>2</sub>-Abbaus führen, hatte keinen Einfluss auf Podosomen. Durch Transfektion der PH-Domäne von PLC $\delta$ 1, welche als PIP<sub>2</sub>-Sensor eingesetzt werden kann, konnte jedoch eine teilweise Lokalisation von PIP<sub>2</sub> an Podosomen gefunden werden.

Mit spezifischen Antikörpern konnte zudem eine Lokalisation von PLC $\beta$ 1 im Aktinreichen Podosomenkern und von PLC $\beta$ 2 in der podosomalen Ringstruktur nachgewiesen werden, PLC $\beta$ 3 zeigte keine spezifische Lokalisation. Auch ein PLC $\beta$ 2-Konstrukt reicherte sich nach Transfektion in der podosomalen Ringstruktur an. Der PLC-Inhibitor U-73122 führte zu einem kompletten Verschwinden der Podosomen mit nachfolgender Ablösung der Zellen. Aufgrund dieses Befundes und der spezifischen Lokalisation ist von einer Beteiligung der PLC $\beta$ 1 und PLC $\beta$ 2 in der Podosomen-Regulation auszugehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten somit wichtige Effektoren der podosomalen Aktinregulation identifiziert werden: Cofilin als direkter Interaktionspartner von Aktin, LIMK1 als Cofilin-Regulator sowie ROCK und PAK als *upstream*-Regulatoren in der Signalkaskade. Darüber hinaus scheinen PLC $\beta$ 1 und PLC $\beta$ 2, möglicherweise über PIP<sub>2</sub>, ebenfalls an der Podosomen-Regulation beteiligt zu sein. Dies legt die Grundlage für weitere Untersuchungen über die molekularen Mechanismen der podosomalen Aktinregulation, die zur Zeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt werden.

## 8 Literatur

- Abe, H., Nagaoka, R., Obinata, T.** (1993) Cytoplasmic localization and nuclear transport of cofilin in cultured myotubes. *Exp. Cell Res.* **206**, 1-10
- Abe, H., Obinata, T., Minamide, L.S., Bamburg, J.R.** (1996) *Xenopus laevis* actin-depolymerizing factor/cofilin: a phosphorylation-regulated protein essential for development. *J. Cell Biol.* **132**, 871-885
- Abe, H., Ohshima, S., Obinata, T.** (1989) A cofilin-like protein is involved in the regulation of actin assembly in developing skeletal muscle. *J. Biochem. (Tokyo)* **106**, 696-702
- Abo, A., Qu, J., Cammarano, M.S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B., Minden, A.** (1998) PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J* **17**, 6527-6540
- Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., Yahara, I.** (2001) Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat. Neurosci.* **4**, 367-373
- Aktorics, K.** (1997) Rho proteins: targets for bacterial toxins. *Trends Microbiol.* **5**, 282-288
- Allavena, P., Paganin, C., Martin-Padura, I., Peri, G., Gaboli, M., Dejana, E., Marchisio, P.C., Mantovani, A.** (1991) Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *J. Exp. Med.* **173**, 439-448
- Amano, T., Kaji, N., Ohashi, K., Mizuno, K.** (2002) Mitosis-specific activation of LIM motif-containing protein kinase and roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation in mitosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 22093-22102
- Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S., Mizuno, K.** (2001) LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. *Biochem. J* **354**, 149-159
- Amato, P.A., Unanue, E.R., Taylor, D.L.** (1983) Distribution of actin in spreading macrophages: a comparative study on living and fixed cells. *J Cell Biol.* **96**, 750-761
- Ambach, A., Saunus, J., Konstandin, M., Wesselborg, S., Meuer, S.C., Samstag, Y.** (2000) The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3422-3431
- Amberg, D.C., Basart, E., Botstein, D.** (1995) Defining protein interactions with yeast actin in vivo. *Nat. Struct. Biol.* **2**, 28-35
- Andre, E., Lottspeich, F., Schleicher, M., Noegel, A.** (1988) Severin, gelsolin, and villin share a homologous sequence in regions presumed to contain F-actin severing domains. *J. Biol. Chem.* **263**, 722-727

- Aqel, N.M., Ball, R.Y., Waldmann, H., Mitchinson, M.J.** (1984) Monocytic origin of foam cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* **53**, 265-271
- Arai, H. and Atomi, Y.** (2003) Suppression of cofilin phosphorylation in insulin-stimulated ruffling membrane formation in KB cells. *Cell Struct. Funct.* **28**, 41-48
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O., Caroni, P.** (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* **393**, 805-809
- Arpin, M., Pringault, E., Finidori, J., Garcia, A., Jeltsch, J.M., Vandekerckhove, J., Louvard, D.** (1988) Sequence of human villin: a large duplicated domain homologous with other actin-severing proteins and a unique small carboxy-terminal domain related to villin specificity. *J. Cell Biol.* **107**, 1759-1766
- Ashworth, S.L., Sandoval, R.M., Hosford, M., Bamburg, J.R., Molitoris, B.A.** (2001) Ischemic injury induces ADF relocalization to the apical domain of rat proximal tubule cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol* **280**, F886-F894
- Aspenstrom, P.** (1999) The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res* **246**, 20-25
- Ayscough, K.R.** (1998) In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 102-111
- Bailly, M. and Jones, G.E.** (2003) Polarised migration: cofilin holds the front. *Curr. Biol.* **13**, R128-R130
- Balcer, H.I., Goodman, A.L., Rodal, A.A., Smith, E., Kugler, J., Heuser, J.E., Goode, B.L.** (2003) Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1. *Curr. Biol.* **13**, 2159-2169
- Bamburg, J.R.** (1999) Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 185-230
- Bamburg, J.R., McGough, A., Ono, S.** (1999) Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends. Cell Biol.* **9**, 364-370
- Baorto, D.M., Mellado, W., Shelanski, M.L.** (1992) Astrocyte process growth induction by actin breakdown. *J. Cell Biol.* **117**, 357-367
- Bernard, O., Ganiatsas, S., Kannourakis, G., Dringen, R.** (1994) Kiz-1, a protein with LIM zinc finger and kinase domains, is expressed mainly in neurons. *Cell Growth Differ.* **5**, 1159-1171
- Bernstein, B.W. and Bamburg, J.R.** (1982) Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF). *Cell Motil.* **2**, 1-8

- Bernstein, B.W., Painter, W.B., Chen, H., Minamide, L.S., Abe, H., Bamburg, J.R.** (2000) Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton* **47**, 319-336
- Bishop, A.L. and Hall, A.** (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J* **348 Pt 2**, 241-255
- Biswas, R.S., Baker, D., Hruska, K.A., Chellaiah, M.A.** (2004) Polyphosphoinositides-dependent regulation of the osteoclast actin cytoskeleton and bone resorption. *BMC. Cell Biol.* **5**, 19
- Blanchoin, L. and Pollard, T.D.** (1998) Interaction of actin monomers with Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *J. Biol. Chem.* **273**, 25106-25111
- Blavier, L. and Delaisse, J.M.** (1995) Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *J. Cell Sci.* **108 ( Pt 12)**, 3649-3659
- Boquet, P. and Lemichez, E.** (2003) Bacterial virulence factors targeting Rho GTPases: parasitism or symbiosis? *Trends Cell Biol.* **13**, 238-246
- Bretschneider, T., Diez, S., Anderson, K., Heuser, J., Clarke, M., Muller-Taubenberger, A., Kohler, J., Gerisch, G.** (2004) Dynamic actin patterns and Arp2/3 assembly at the substrate-attached surface of motile cells. *Curr. Biol.* **14**, 1-10
- Bryce, N.S., Schevzov, G., Ferguson, V., Percival, J.M., Lin, J.J., Matsumura, F., Bamburg, J.R., Jeffrey, P.L., Hardeman, E.C., Gunning, P., Weinberger, R.P.** (2003) Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1002-1016
- Burgstaller, G. and Gimona, M.** (2005) Podosome-mediated matrix resorption and cell motility in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **288**, H3001-H3005
- Burns, S., Thrasher, A.J., Blundell, M.P., Machesky, L., Jones, G.E.** (2001) Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* **98**, 1142-1149
- Burtnick, L.D., Koepf, E.K., Grimes, J., Jones, E.Y., Stuart, D.I., McLaughlin, P.J., Robinson, R.C.** (1997) The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. *Cell* **90**, 661-670
- Caldwell, J.E., Heiss, S.G., Mermall, V., Cooper, J.A.** (1989) Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin. *Biochemistry* **28**, 8506-8514
- Calle, Y., Jones, G.E., Jagger, C., Fuller, K., Blundell, M.P., Chow, J., Chambers, T., Thrasher, A.J.** (2004) WASp deficiency in mice results in failure to form osteoclast sealing zones and defects in bone resorption. *Blood* **103**, 3552-3561

- Carrier, M.F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., Pantaloni, D.** (1997) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* **136**, 1307-1322
- Carlsson, A.E., Wear, M.A., Cooper, J.A.** (2004) End versus Side Branching by Arp2/3 Complex. *Biophys. J.* **86**, 1074-1081
- Chandrasekar, I., Stradal, T.E., Holt, M.R., Entschladen, F., Jockusch, B.M., Ziegler, W.H.** (2005) Vinculin acts as a sensor in lipid regulation of adhesion-site turnover. *J. Cell Sci.*
- Chellaiah, M.A., Soga, N., Swanson, S., McAllister, S., Alvarez, U., Wang, D., Dowdy, S.F., Hruska, K.A.** (2000) Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J. Biol. Chem.* **275**, 11993-12002
- Chen, W.T., Olden, K., Bernard, B.A., Chu, F.F.** (1984) Expression of transformation-associated protease(s) that degrade fibronectin at cell contact sites. *J Cell Biol.* **98**, 1546-1555
- Chhabra, D., Bao, S., dos Remedios, C.G.** (2002) The distribution of cofilin and DNase I in vivo. *Cell Res.* **12**, 207-214
- Chiang, C.W., Harris, G., Ellig, C., Masters, S.C., Subramanian, R., Shenolikar, S., Wadzinski, B.E., Yang, E.** (2001) Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood* **97**, 1289-1297
- Chua, B.T., Volbracht, C., Tan, K.O., Li, R., Yu, V.C., Li, P.** (2003) Mitochondrial translocation of cofilin is an early step in apoptosis induction. *Nat. Cell Biol.* **5**, 1083-1089
- Cooper, J.A.** (2002) Actin dynamics: tropomyosin provides stability. *Curr. Biol.* **12**, R523-R525
- Cooper, J.A. and Schafer, D.A.** (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 97-103
- Cory, G.O., Garg, R., Cramer, R., Ridley, A.J.** (2002) Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 45115-45121
- Cunningham, C.C., Vegners, R., Bucki, R., Funaki, M., Korde, N., Hartwig, J.H., Stossel, T.P., Janmey, P.A.** (2001) Cell permeant polyphosphoinositide-binding peptides that block cell motility and actin assembly. *J. Biol. Chem.* **276**, 43390-43399
- Dan, C., Kelly, A., Bernard, O., Minden, A.** (2001) Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol. Chem.* **276**, 32115-32121
- Dawe, H.R., Minamide, L.S., Bamburg, J.R., Cramer, L.P.** (2003) ADF/Cofilin Controls Cell Polarity during Fibroblast Migration. *Curr. Biol.* **13**, 252-257

- de Noronha, S., Hardy, S., Sinclair, J., Blundell, M.P., Strid, J., Schulz, O., Zwirner, J., Jones, G.E., Katz, D.R., Kinnon, C., Thrasher, A.J.** (2005) Impaired dendritic-cell homing in vivo in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Blood* **105**, 1590-1597
- Dent, P., Jelinek, T., Morrison, D.K., Weber, M.J., Sturgill, T.W.** (1995) Reversal of Raf-1 activation by purified and membrane-associated protein phosphatases. *Science* **268**, 1902-1906
- DesMarais, V., Ichetovkin, I., Condeelis, J., Hitchcock-DeGregori, S.E.** (2002) Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge. *J. Cell Sci.* **115**, 4649-4660
- Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J.C., Jurdic, P., Bard, F.** (2003) Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell* **14**, 407-416
- Dong, R., Cwynarski, K., Entwistle, A., Marelli-Berg, F., Dazzi, F., Simpson, E., Goldman, J.M., Melo, J.V., Lechler, R.I., Bellantuono, I., Ridley, A., Lombardi, G.** (2003) Dendritic cells from CML patients have altered actin organization, reduced antigen processing, and impaired migration. *Blood* **101**, 3560-3567
- Dos Remedios, C., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., Nosworthy, N.J.** (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* **83**, 433-473
- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., Gill, G.N.** (1999) Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* **1**, 253-259
- Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K.** (2003) Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J. Neurosci.* **23**, 2527-2537
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A.** (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635
- Evangelista, M., Zigmond, S., Boone, C.** (2003) Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J. Cell Sci.* **116**, 2603-2611
- Fabunmi, R.P., Sukhova, G.K., Sugiyama, S., Libby, P.** (1998) Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability. *Circ. Res.* **83**, 270-278
- Feig, L.A.** (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat. Cell Biol.* **1**, E25-E27
- Fischer, A.** (2001) Primary immunodeficiency diseases: an experimental model for molecular medicine. *Lancet* **357**, 1863-1869

- Foletta, V.C., Moussi, N., Sarmiere, P.D., Bamberg, J.R., Bernard, O.** (2004) LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp. Cell Res.* **294**, 392-405
- Fradelizi, J., Noireaux, V., Plastino, J., Menichi, B., Louvard, D., Sykes, C., Golsteyn, R.M., Friederich, E.** (2001) ActA and human zyxin harbour Arp2/3-independent actin-polymerization activity. *Nat. Cell Biol.* **3**, 699-707
- Freeman, N.L., Chen, Z., Horenstein, J., Weber, A., Field, J.** (1995) An actin monomer binding activity localizes to the carboxyl-terminal half of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclase-associated protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 5680-5685
- Frost, J.A., Khokhlatchev, A., Stippec, S., White, M.A., Cobb, M.H.** (1998) Differential effects of PAK1-activating mutations reveal activity-dependent and -independent effects on cytoskeletal regulation. *J. Biol. Chem.* **273**, 28191-28198
- Fu, H., Subramanian, R.R., Masters, S.C.** (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 617-647
- Fujibuchi, T., Abe, Y., Takeuchi, T., Imai, Y., Kamei, Y., Murase, R., Ueda, N., Shigemoto, K., Yamamoto, H., Kito, K.** (2005) AIP1/WDR1 supports mitotic cell rounding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 268-275
- Fukami, K.** (2002) Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J. Biochem. (Tokyo)* **131**, 293-299
- Fukata, M., Nakagawa, M., Kaibuchi, K.** (2003) Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 590-597
- Gaidano, G., Bergui, L., Schena, M., Gaboli, M., Cremona, O., Marchisio, P.C., Caligaris-Cappio, F.** (1990) Integrin distribution and cytoskeleton organization in normal and malignant monocytes. *Leukemia* **4**, 682-687
- Galkin, V.E., Orlova, A., VanLoock, M.S., Shvetsov, A., Reisler, E., Egelman, E.H.** (2003) ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments. *J. Cell Biol.* **163**, 1057-1066
- Gavazzi, I., Nermut, M.V., Marchisio, P.C.** (1989) Ultrastructure and gold-immunolabelling of cell-substratum adhesions (podosomes) in RSV-transformed BHK cells. *J. Cell Sci.* **94 ( Pt 1)**, 85-99
- Gearing, M., Juncos, J.L., Procaccio, V., Gutekunst, C.A., Marino-Rodriguez, E.M., Gyure, K.A., Ono, S., Santoianni, R., Krawiecki, N.S., Wallace, D.C., Wainer, B.H.** (2002) Aggregation of actin and cofilin in identical twins with juvenile-onset dystonia. *Ann. Neurol.* **52**, 465-476
- Gerrity, R.G.** (1981) The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* **103**, 181-190

- Gimona, M., Kaverina, I., Resch, G.P., Vignal, E., Burgstaller, G.** (2003) Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2482-2491
- Glenney, J.R., Jr. and Weber, K.** (1981) Calcium control of microfilaments: uncoupling of the F-actin-severing and -bundling activity of villin by limited proteolysis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**, 2810-2814
- Gohla, A. and Bokoch, G.M.** (2002) 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Curr. Biol.* **12**, 1704-1710
- Goode, B.L., Rodal, A.A., Barnes, G., Drubin, D.G.** (2001) Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J. Cell Biol.* **153**, 627-634
- Hall, A.** (1998) Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514
- Hanson, J. and Lowy, J.** (1963) The structure of F-Actin and of actin filaments isolated from muscle. *J Mol. Biol.* **6**, 46-60
- Harris, H.E. and Weeds, A.G.** (1984) Plasma gelsolin caps and severs actin filaments. *FEBS Lett.* **177**, 184-188
- Hayakawa, K., Minami, N., Ono, S., Ogasawara, Y., Totsuka, T., Abe, H., Tanaka, T., Obinata, T.** (1993) Increased expression of cofilin in dystrophic chicken and mouse skeletal muscles. *J. Biochem. (Tokyo)* **114**, 582-587
- Hayden, S.M., Miller, P.S., Brauweiler, A., Bamburg, J.R.** (1993) Analysis of the interactions of actin depolymerizing factor with G- and F-actin. *Biochemistry* **32**, 9994-10004
- Hegy, L., Hardwick, S.J., Siow, R.C., Skepper, J.N.** (2001) Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis. *J Hematother. Stem Cell Res.* **10**, 27-42
- Heyworth, P.G., Robinson, J.M., Ding, J., Ellis, B.A., Badwey, J.A.** (1997) Cofilin undergoes rapid dephosphorylation in stimulated neutrophils and translocates to ruffled membranes enriched in products of the NADPH oxidase complex. Evidence for a novel cycle of phosphorylation and dephosphorylation. *Histochem. Cell Biol.* **108**, 221-233
- Higgs, H.N., Blanchoin, L., Pollard, T.D.** (1999a) Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* **38**, 15212-15222
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D.** (1999b) Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 32531-32534
- Higgs, H.N. and Pollard, T.D.** (2001) Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 649-676

- Higuchi, O., Amano, T., Yang, N., Mizuno, K.** (1997) Inhibition of activated Ras-induced neuronal differentiation of PC12 cells by the LIM domain of LIM-kinase 1. *Oncogene* **14**, 1819-1825
- Hiraoka, J., Okano, I., Higuchi, O., Yang, N., Mizuno, K.** (1996) Self-association of LIM-kinase 1 mediated by the interaction between an N-terminal LIM domain and a C-terminal kinase domain. *FEBS Lett.* **399**, 117-121
- Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., Kabsch, W.** (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49
- Hubberstey, A., Yu, G., Loewith, R., Lakusta, C., Young, D.** (1996) Mammalian CAP interacts with CAP, CAP2, and actin. *J. Cell Biochem.* **61**, 459-466
- Hufner, K., Higgs, H.N., Pollard, T.D., Jacobi, C., Aepfelbacher, M., Linder, S.** (2001) The verprolin-like central (vc) region of Wiskott-Aldrich syndrome protein induces Arp2/3 complex-dependent actin nucleation. *J Biol. Chem.* **276**, 35761-35767
- Ichetovkin, I., Grant, W., Condeelis, J.** (2002) Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* **12**, 79-84
- Iida, K. and Yahara, I.** (1999) Cooperation of two actin-binding proteins, cofilin and Aip1, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **4**, 21-32
- Ikebe, C., Ohashi, K., Fujimori, T., Bernard, O., Noda, T., Robertson, E.J., Mizuno, K.** (1997) Mouse LIM-kinase 2 gene: cDNA cloning, genomic organization, and tissue-specific expression of two alternatively initiated transcripts. *Genomics* **46**, 504-508
- Illenberger, D., Schwald, F., Pimmer, D., Binder, W., Maier, G., Dietrich, A., Gierschik, P.** (1998) Stimulation of phospholipase C-beta2 by the Rho GTPases Cdc42Hs and Rac1. *EMBO J.* **17**, 6241-6249
- Ishihara, H., Martin, B.L., Brautigan, D.L., Karaki, H., Ozaki, H., Kato, Y., Fusetani, N., Watabe, S., Hashimoto, K., Uemura, D., .** (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 871-877
- Jaffer, Z.M. and Chernoff, J.** (2002) p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 713-717
- Johnson-Leger, C., Aurrand-Lions, M., Imhof, B.A.** (2000) The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? *J Cell Sci* **113 ( Pt 6)**, 921-933
- Jones, G.E.** (2000) Cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. *J Leukoc. Biol.* **68**, 593-602
- Kabsch, W. and Vandekerckhove, J.** (1992) Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 49-76

- Kaji, N., Ohashi, K., Shuin, M., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K.** (2003) Cell cycle-associated changes in Slingshot phosphatase activity and roles in cytokinesis in animal cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 33450-33455
- Kanamori, T., Hayakawa, T., Suzuki, M., Titani, K.** (1995) Identification of two 17-kDa rat parotid gland phosphoproteins, subjects for dephosphorylation upon beta-adrenergic stimulation, as destrin- and cofilin-like proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 8061-8067
- Katz, B.Z., Zamir, E., Bershadsky, A., Kam, Z., Yamada, K.M., Geiger, B.** (2000) Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1047-1060
- Kaverina, I., Stradal, T.E., Gimona, M.** (2003) Podosome formation in cultured A7r5 vascular smooth muscle cells requires Arp2/3-dependent de-novo actin polymerization at discrete microdomains. *J Cell Sci* **116**, 4915-4924
- Ketelaar, T., Allwood, E.G., Anthony, R., Voigt, B., Menzel, D., Hussey, P.J.** (2004) The actin-interacting protein AIP1 is essential for actin organization and plant development. *Curr. Biol.* **14**, 145-149
- Kiehart, D.P. and Franke, J.D.** (2002) Actin dynamics: the arp2/3 complex branches out. *Curr. Biol.* **12**, R557-R559
- Killion, J.J. and Fidler, I.J.** (1998) Therapy of cancer metastasis by tumoricidal activation of tissue macrophages using liposome-encapsulated immunomodulators. *Pharmacol. Ther.* **78**, 141-154
- Kinosian, H.J., Newman, J., Lincoln, B., Selden, L.A., Gershman, L.C., Estes, J.E.** (1998) Ca<sup>2+</sup> regulation of gelsolin activity: binding and severing of F-actin. *Biophys. J.* **75**, 3101-3109
- Kjoller, L. and Hall, A.** (1999) Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res* **253**, 166-179
- Konzok, A., Weber, I., Simmeth, E., Hacker, U., Maniak, M., Muller-Taubenberger, A.** (1999) DAip1, a Dictyostelium homologue of the yeast actin-interacting protein 1, is involved in endocytosis, cytokinesis, and motility. *J. Cell Biol.* **146**, 453-464
- Kotani, K., Yonezawa, K., Hara, K., Ueda, H., Kitamura, Y., Sakaue, H., Ando, A., Chavanieu, A., Calas, B., Grigorescu, F., .** (1994) Involvement of phosphoinositide 3-kinase in insulin- or IGF-1-induced membrane ruffling. *EMBO J.* **13**, 2313-2321
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., Lim, L.** (1995) The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **15**, 1942-1952
- Kuroda, S., Tokunaga, C., Kiyohara, Y., Higuchi, O., Konishi, H., Mizuno, K., Gill, G.N., Kikkawa, U.** (1996) Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **271**, 31029-31032

- Kusano, K., Abe, H., Obinata, T.** (1999) Detection of a sequence involved in actin-binding and phosphoinositide-binding in the N-terminal side of cofilin. *Mol. Cell Biochem.* **190**, 133-141
- LaBelle, E.F. and Polyak, F.** (1996) Phospholipase C beta 2 in vascular smooth muscle. *J. Cell Physiol* **169**, 358-363
- Lee, K.H., Meuer, S.C., Samstag, Y.** (2000) Cofilin: a missing link between T cell co-stimulation and rearrangement of the actin cytoskeleton. *Eur. J. Immunol.* **30**, 892-899
- Lee, S. and Helfman, D.M.** (2003) Cytoplasmic p21Cip1 is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/Cofilin pathway. *J. Biol. Chem.*
- Lehto, V.P., Hovi, T., Vartio, T., Badley, R.A., Virtanen, I.** (1982) Reorganization of cytoskeletal and contractile elements during transition of human monocytes into adherent macrophages. *Lab Invest* **47**, 391-399
- Lerm, M., Schmidt, G., Aktories, K.** (2000) Bacterial protein toxins targeting rho GTPases. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 1-6
- Lin, T., Zeng, L., Liu, Y., DeFea, K., Schwartz, M.A., Chien, S., Shyy, J.Y.** (2003) Rho-ROCK-LIMK-cofilin pathway regulates shear stress activation of sterol regulatory element binding proteins. *Circ. Res* **92**, 1296-1304
- Linder, S., Nelson, D., Weiss, M., Aepfelbacher, M.** (1999) Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages. *PNAS* **96**, 9648-9653
- Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U., Aepfelbacher, M.** (2000a) Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J Cell Sci* **113**, 4165-4176
- Linder, S., Higgs, H., Hufner, K., Schwarz, K., Pannicke, U., Aepfelbacher, M.** (2000b) The Polarization Defect of Wiskott-Aldrich Syndrome Macrophages Is Linked to Dislocalization of the Arp2/3 Complex. *J Immunol* **165**, 221-225
- Linder, S. and Aepfelbacher, M.** (2003a) Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends. Cell Biol.* **13**, 376-385
- Linder, S., Wintergerst, U., Bender-Gotze, C., Schwarz, K., Pannicke, U., Aepfelbacher, M.** (2003b) Macrophages of patients with X-linked thrombocytopenia display an attenuated Wiskott-Aldrich syndrome phenotype. *Immunol. Cell Biol.* **81**, 130-136
- Linder, S. and Kopp, P.** (2005) Podosomes at a glance. *J. Cell Sci.* **118**, 2079-2082
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., Carlier, M.F.** (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**, 613-616
- Lorenz, M., DesMarais, V., Macaluso, F., Singer, R.H., Condeelis, J.** (2004) Measurement of barbed ends, actin polymerization, and motility in live carcinoma cells after growth factor stimulation. *Cell Motil. Cytoskeleton* **57**, 207-217

- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Pollard, T.D.** (1994) Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol.* **127**, 107-115
- Machesky, L.M. and Insall, R.H.** (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* **8**, 1347-1356
- Maciver, S.K. and Harrington, C.R.** (1995) Two actin binding proteins, actin depolymerizing factor and cofilin, are associated with Hirano bodies. *Neuroreport* **6**, 1985-1988
- Maciver, S.K. and Hussey, P.J.** (2002) The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol.* **3**, reviews3007
- Maciver, S.K., Pope, B.J., Whytock, S., Weeds, A.G.** (1998) The effect of two actin depolymerizing factors (ADF/cofilins) on actin filament turnover: pH sensitivity of F-actin binding by human ADF, but not of *Acanthamoeba* actophorin. *Eur. J. Biochem.* **256**, 388-397
- Maciver, S.K. and Weeds, A.G.** (1994) Actophorin preferentially binds monomeric ADP-actin over ATP-bound actin: consequences for cell locomotion. *FEBS Lett.* **347**, 251-256
- Maciver, S.K., Zot, H.G., Pollard, T.D.** (1991) Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* **115**, 1611-1620
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Narumiya, S.** (1999) Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**, 895-898
- Marchisio, P.C., Bergui, L., Corbascio, G.C., Cremona, O., D'Urso, N., Schena, M., Tesio, L., Caligaris-Cappio, F.** (1988a) Vinculin, talin, and integrins are localized at specific adhesion sites of malignant B lymphocytes. *Blood* **72**, 830-833
- Marchisio, P.C., Cirillo, D., Naldini, L., Primavera, M.V., Teti, A., Zambonin-Zallone, A.** (1984) Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *J. Cell Biol.* **99**, 1696-1705
- Marchisio, P.C., Cirillo, D., Teti, A., Zambonin-Zallone, A., Tarone, G.** (1987) Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts and cells of monocytic origin display a peculiar dot-like organization of cytoskeletal proteins involved in microfilament-membrane interactions. *Exp. Cell Res.* **169**, 202-214
- Marchisio, P.C., D'Urso, N., Comoglio, P.M., Giancotti, F.G., Tarone, G.** (1988b) Vanadate-treated baby hamster kidney fibroblasts show cytoskeleton and adhesion patterns similar to their Rous sarcoma virus-transformed counterparts. *J. Cell Biochem.* **37**, 151-159
- Martoglio, A.M., Tom, B.D., Starkey, M., Corps, A.N., Charnock-Jones, D.S., Smith, S.K.** (2000) Changes in tumorigenesis- and angiogenesis-related gene transcript abundance profiles in ovarian cancer detected by tailored high density cDNA arrays. *Mol. Med.* **6**, 750-765

- Matsumoto, S., Ogawa, M., Kasakura, T., Shimada, Y., Mitsui, M., Maruya, M., Isohata, M., Yahara, I., Murakami-Murofushi, K.** (1998) A novel 66-kDa stress protein, p66, associated with the process of cyst formation of *Physarum polycephalum* is a *Physarum* homologue of a yeast actin-interacting protein, AIP1. *J. Biochem. (Tokyo)* **124**, 326-331
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W., Weeds, A.** (1997) Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* **138**, 771-781
- McGrath, J.L., Osborn, E.A., Tardy, Y.S., Dewey, C.F., Jr., Hartwig, J.H.** (2000) Regulation of the actin cycle in vivo by actin filament severing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 6532-6537
- McLaughlin, P.J., Gooch, J.T., Mannherz, H.G., Weeds, A.G.** (1993) Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* **364**, 685-692
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., Murray, D.** (2002) PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 151-175
- Meberg, P.J., Ono, S., Minamide, L.S., Takahashi, M., Bamburg, J.R.** (1998) Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil. Cytoskeleton* **39**, 172-190
- Miki, H. and Takenawa, T.** (2003) Regulation of Actin Dynamics by WASP Family Proteins. *J. Biochem. (Tokyo.)* **134**, 309-313
- Millard, T.H. and Machesky, L.M.** (2001) The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) family. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 198-199
- Minamide, L.S., Striegl, A.M., Boyle, J.A., Meberg, P.J., Bamburg, J.R.** (2000) Neurodegenerative stimuli induce persistent ADF/cofilin-actin rods that disrupt distal neurite function. *Nat. Cell Biol.* **2**, 628-636
- Mizuno, K., Okano, I., Ohashi, K., Nunoue, K., Kuma, K., Miyata, T., Nakamura, T.** (1994) Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with two repeats of the LIM/double zinc finger motif. *Oncogene* **9**, 1605-1612
- Mockrin, S.C. and Korn, E.D.** (1980) *Acanthamoeba* profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* **19**, 5359-5362
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C., Genot, E.** (2003) Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell Biol.* **23**, 6809-6822
- Morgan, T.E., Lockerbie, R.O., Minamide, L.S., Browning, M.D., Bamburg, J.R.** (1993) Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* **122**, 623-633

- Moriyama, K., Iida, K., Yahara, I.** (1996) Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin. *Genes Cells* **1**, 73-86
- Moriyama, K., Nishida, E., Yonezawa, N., Sakai, H., Matsumoto, S., Iida, K., Yahara, I.** (1990) Destrin, a mammalian actin-depolymerizing protein, is closely related to cofilin. Cloning and expression of porcine brain destrin cDNA. *J. Biol. Chem.* **265**, 5768-5773
- Moriyama, K. and Yahara, I.** (2002) Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover. *J. Cell Sci.* **115**, 1591-1601
- Muller, W.A.** (2003) Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends. Immunol.* **24**, 327-334
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., Pollard, T.D.** (1998a) 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**, 6181-6186
- Mullins, R.D., Kelleher, J.F., Xu, J., Pollard, T.D.** (1998b) Arp2/3 complex from *Acanthamoeba* binds profilin and cross-links actin filaments. *Mol. Biol. Cell* **9**, 841-852
- Mullins, R.D. and Pollard, T.D.** (1999) Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 244-249
- Muslin, A.J. and Xing, H.** (2000) 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal.* **12**, 703-709
- Muto, Y., Nagao, T., Urushidani, T.** (1997) The putative phospholipase C inhibitor U73122 and its negative control, U73343, elicit unexpected effects on the rabbit parietal cell. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **282**, 1379-1388
- Nagaoka, R., Abe, H., Obinata, T.** (1996) Site-directed mutagenesis of the phosphorylation site of cofilin: its role in cofilin-actin interaction and cytoplasmic localization. *Cell Motil. Cytoskeleton* **35**, 200-209
- Nagaoka, R., Kusano, K., Abe, H., Obinata, T.** (1995) Effects of cofilin on actin filamentous structures in cultured muscle cells. Intracellular regulation of cofilin action. *J. Cell Sci.* **108 ( Pt 2)**, 581-593
- Nagata, K., Ohashi, K., Yang, N., Mizuno, K.** (1999) The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1. *Biochem. J* **343 Pt 1**, 99-105
- Nakamura, N., Tanaka, J., Sobue, K.** (1993) Rous sarcoma virus-transformed cells develop peculiar adhesive structures along the cell periphery. *J. Cell Sci.* **106 ( Pt 4)**, 1057-1069
- Nakano, K., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Moriyama, K., Yazaki, K., Hayashi, Y., Kitamura, N.** (2003) Cofilin phosphorylation and actin polymerization by NRK/NESK, a member of the germinal center kinase family. *Exp. Cell Res.* **287**, 219-227

- Nebl, G., Fischer, S., Penzel, R., Samstag, Y.** (1903) Dephosphorylation of cofilin is regulated through Ras and requires the combined activities of the Ras-effectors MEK and PI3K. *Cell Signal.* **16**, 235-243
- Nishida, E.** (1985) Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* **24**, 1160-1164
- Nishida, E., Iida, K., Yonezawa, N., Koyasu, S., Yahara, I., Sakai, H.** (1987) Cofilin is a component of intranuclear and cytoplasmic actin rods induced in cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 5262-5266
- Nishida, E., Maekawa, S., Sakai, H.** (1984) Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry* **23**, 5307-5313
- Nishita, M., Aizawa, H., Mizuno, K.** (2002) Stromal Cell-Derived Factor 1alpha Activates LIM Kinase 1 and Induces Cofilin Phosphorylation for T-Cell Chemotaxis. *Mol. Cell Biol.* **22**, 774-783
- Nishita, M., Wang, Y., Tomizawa, C., Suzuki, A., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K.** (2003) Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. *J Biol. Chem*
- Nitsch, L., Gionti, E., Cancedda, R., Marchisio, P.C.** (1989) The podosomes of Rous sarcoma virus transformed chondrocytes show a peculiar ultrastructural organization. *Cell Biol. Int. Rep.* **13**, 919-926
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., Uemura, T.** (2002) Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* **108**, 233-246
- Nobes, C.D. and Hall, A.** (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62
- Nunoue, K., Ohashi, K., Okano, I., Mizuno, K.** (1995) LIMK-1 and LIMK-2, two members of a LIM motif-containing protein kinase family. *Oncogene* **11**, 701-710
- Ochoa, G.C., Slepnev, V.I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R., De Camilli, P.** (2000) A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J. Cell Biol.* **150**, 377-389
- Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., Mizuno, K.** (2000) Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol. Chem.* **275**, 3577-3582
- Ohta, Y., Kousaka, K., Nagata-Ohashi, K., Ohashi, K., Muramoto, A., Shima, Y., Niwa, R., Uemura, T., Mizuno, K.** (2003) Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells* **8**, 811-824

- Ohta, Y., Nishida, E., Sakai, H., Miyamoto, E.** (1989) Dephosphorylation of cofilin accompanies heat shock-induced nuclear accumulation of cofilin. *J. Biol. Chem.* **264**, 16143-16148
- Okada, K., Obinata, T., Abe, H.** (1999) XAIP1: a *Xenopus* homologue of yeast actin interacting protein 1 (AIP1), which induces disassembly of actin filaments cooperatively with ADF/cofilin family proteins. *J. Cell Sci.* **112 ( Pt 10)**, 1553-1565
- Okada, K., Takano-Ohmuro, H., Obinata, T., Abe, H.** (1996) Dephosphorylation of cofilin in polymorphonuclear leukocytes derived from peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **227**, 116-122
- Ono, S.** (2003) Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry* **42**, 13363-13370
- Ono, S., Minami, N., Abe, H., Obinata, T.** (1994) Characterization of a novel cofilin isoform that is predominantly expressed in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **269**, 15280-15286
- Ono, S., Mohri, K., Ono, K.** (2004) Microscopic evidence that actin-interacting protein 1 actively disassembles actin depolymerizing factor/cofilin-bound actin filaments. *J Biol. Chem*
- Ono, S. and Ono, K.** (2002) Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J. Cell Biol.* **156**, 1065-1076
- Ory, S., Munari-Silem, Y., Fort, P., Jurdic, P.** (2000) Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. *J Cell Sci* **113**, 1177-1188
- Osada, H., Hasada, K., Inazawa, J., Uchida, K., Ueda, R., Takahashi, T., Takahashi, T.** (1996) Subcellular localization and protein interaction of the human LIMK2 gene expressing alternative transcripts with tissue-specific regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 582-589
- Osiak, A.E., Zenner, G., Linder, S.** (2005) Subconfluent endothelial cells form podosomes downstream of cytokine and RhoGTPase signaling. *Exp. Cell Res.*
- Papakonstanti, E.A. and Stournaras, C.** (2004) Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Promotes Survival of Opossum Kidney Cells via Cdc42-induced Phospholipase C- $\gamma$ 1 Activation and Actin Filament Redistribution. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1273-1286
- Pelham, R.J., Jr. and Wang, Y.L.** (1998) Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate. *Biol. Bull.* **194**, 348-349
- Platt, N., da Silva, R.P., Gordon, S.** (1998) Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* **8**, 365-372
- Pollard, T.D.** (1986) Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* **103**, 2747-2754

- Pollard, T.D. and Borisy, G.G.** (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465
- Pollard, T.D. and Cooper, J.A.** (1984) Quantitative analysis of the effect of Acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* **23**, 6631-6641
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., Zigmond, S.H.** (2003) Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* **42**, 486-496
- Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E., Mullins, R.D.** (2005) Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature* **433**, 382-388
- Raetz, C.R.** (1993) Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eucaryotic signal transduction. *J Bacteriol.* **175**, 5745-5753
- Renoult, C., Ternent, D., Maciver, S.K., Fattoum, A., Astier, C., Benyamin, Y., Roustan, C.** (1999) The identification of a second cofilin binding site on actin suggests a novel, intercalated arrangement of F-actin binding. *J. Biol. Chem.* **274**, 28893-28899
- Ressad, F., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., Pantaloni, D., Carlier, M.F.** (1998) Kinetic analysis of the interaction of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin with G- and F-actins. Comparison of plant and human ADFs and effect of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **273**, 20894-20902
- Ridley, A.J.** (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* **11**, 471-477
- Ridley, A.J. and Hall, A.** (1992a) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., Hall, A.** (1992b) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**, 401-410
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., Bershadsky, A.D.** (2001) Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* **153**, 1175-1186
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S., Pollard, T.D.** (2001) Crystal structure of arp2/3 complex. *Science* **294**, 1679-1684
- Rodal, A.A., Sokolova, O., Robins, D.B., Daugherty, K.M., Hippenmeyer, S., Riezman, H., Grigorieff, N., Goode, B.L.** (2004) Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
- Rodal, A.A., Tetreault, J.W., Lappalainen, P., Drubin, D.G., Amberg, D.C.** (1999) Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *J. Cell Biol.* **145**, 1251-1264

- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M.D., Ridley, A., Downward, J.** (1997) Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**, 457-467
- Rollins, B.J.** (1996) Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol. Med. Today* **2**, 198-204
- Roovers, K., Klein, E.A., Castagnino, P., Assoian, R.K.** (2003) Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of cyclin D1 expression. *Dev. Cell* **5**, 273-284
- Rosok, O., Pedeutour, F., Ree, A.H., Aasheim, H.C.** (1999) Identification and characterization of TESK2, a novel member of the LIMK/TESK family of protein kinases, predominantly expressed in testis. *Genomics* **61**, 44-54
- Sagot, I., Klee, S.K., Pellman, D.** (2002) Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* **4**, 42-50
- Sakisaka, T., Itoh, T., Miura, K., Takenawa, T.** (1997) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol. Cell Biol.* **17**, 3841-3849
- Samstag, Y., Dreizler, E.M., Ambach, A., Sczakiel, G., Meuer, S.C.** (1996) Inhibition of constitutive serine phosphatase activity in T lymphoma cells results in phosphorylation of pp19/cofilin and induces apoptosis. *J Immunol* **156**, 4167-4173
- Samstag, Y. and Nebl, G.** (2003) Interaction of cofilin with the serine phosphatases PP1 and PP2A in normal and neoplastic human T lymphocytes. *Adv. Enzyme Regul.* **43**, 197-211
- Sarmiere, P.D. and Bamburg, J.R.** (2004) Regulation of the neuronal actin cytoskeleton by ADF/cofilin. *J. Neurobiol.* **58**, 103-117
- Sato, T., del Carmen, O.M., Hou, P., Heegaard, A.M., Kumegawa, M., Foged, N.T., Delaisse, J.M.** (1997) Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J. Cell Sci.* **110 ( Pt 5)**, 589-596
- Schevzov, G., Lloyd, C., Hailstones, D., Gunning, P.** (1993) Differential regulation of tropomyosin isoform organization and gene expression in response to altered actin gene expression. *J. Cell Biol.* **121**, 811-821
- Schuuring, E., Verhoeven, E., Litvinov, S., Michalides, R.J.** (1993) The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol. Cell Biol.* **13**, 2891-2898
- Schwartz, N., Hosford, M., Sandoval, R.M., Wagner, M.C., Atkinson, S.J., Bamburg, J., Molitoris, B.A.** (1999) Ischemia activates actin depolymerizing factor: role in proximal tubule microvillar actin alterations. *Am. J. Physiol* **276**, F544-F551

- Simoes, A.P., Schnabel, P., Pipkorn, R., Camps, M., Gierschik, P.** (1993) A peptide corresponding to a potential polyphosphoinositide binding site of phospholipase C-beta 2 enhances its catalytic activity. *FEBS Lett.* **331**, 248-251
- Small, J.V.** (1995) Getting the actin filaments straight: nucleation-release or treadmilling? *Trends Cell Biol.* **5**, 52-55
- Smith, R.J., Sam, L.M., Justen, J.M., Bundy, G.L., Bala, G.A., Bleasdale, J.E.** (1990) Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 688-697
- Sumi, T., Matsumoto, K., Nakamura, T.** (2002) Mitosis-Dependent Phosphorylation and Activation of LIM-Kinase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 1315-1320
- Sumi, T., Matsumoto, K., Shibuya, A., Nakamura, T.** (2001) Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *J Biol. Chem.* **276**, 23092-23096
- Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y., Nakamura, T.** (1999) Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* **147**, 1519-1532
- Takenawa, T. and Itoh, T.** (2001) Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1533**, 190-206
- Takuma, T., Ichida, T., Yokoyama, N., Tamura, S., Obinata, T.** (1996) Dephosphorylation of cofilin in parotid acinar cells. *J. Biochem. (Tokyo)* **120**, 35-41
- Tapon, N. and Hall, A.** (1997) Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 86-92
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M., Marchisio, P.C.** (1985) Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res.* **159**, 141-157
- Theriot, J.A. and Mitchison, T.J.** (1991) Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* **352**, 126-131
- Thorson, J.A., Yu, L.W., Hsu, A.L., Shih, N.Y., Graves, P.R., Tanner, J.W., Allen, P.M., Piwnica-Worms, H., Shaw, A.S.** (1998) 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol. Cell Biol.* **18**, 5229-5238
- Tilney, L.G., Bonder, E.M., DeRosier, D.J.** (1981) Actin filaments elongate from their membrane-associated ends. *J Cell Biol.* **90**, 485-494
- Tobacman, L.S., Brenner, S.L., Korn, E.D.** (1983) Effect of Acanthamoeba profilin on the pre-steady state kinetics of actin polymerization and on the concentration of F-actin at steady state. *J. Biol. Chem.* **258**, 8806-8812

- Toshima, J., Ohashi, K., Okano, I., Nunoue, K., Kishioka, M., Kuma, K., Miyata, T., Hirai, M., Baba, T., Mizuno, K.** (1995) Identification and characterization of a novel protein kinase, TESK1, specifically expressed in testicular germ cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 31331-31337
- Toshima, J., Toshima, J.Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S., Mizuno, K.** (2001a) Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1131-1145
- Toshima, J., Toshima, J.Y., Takeuchi, K., Mori, R., Mizuno, K.** (2001b) Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J Biol. Chem.* **276**, 31449-31458
- Toshima, J.Y., Toshima, J., Watanabe, T., Mizuno, K.** (2001c) Binding of 14-3-3beta regulates the kinase activity and subcellular localization of testicular protein kinase 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 43471-43481
- Trifaro, J.M., Rose, S.D., Marcu, M.G.** (2000) Scinderin, a Ca<sup>2+</sup>-dependent actin filament severing protein that controls cortical actin network dynamics during secretion. *Neurochem. Res.* **25**, 133-144
- Tzivion, G. and Avruch, J.** (2002) 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 3061-3064
- Urano, T., Liu, J., Zhang, P., Fan, Y., Egile, C., Li, R., Mueller, S.C., Zhan, X.** (2001) Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat. Cell Biol.* **3**, 259-266
- Vaananen, H.K. and Horton, M.** (1995) The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J. Cell Sci.* **108 ( Pt 8)**, 2729-2732
- Valentin-Ranc, C. and Carlier, M.F.** (1991) Role of ATP-bound divalent metal ion in the conformation and function of actin. Comparison of Mg-ATP, Ca-ATP, and metal ion-free ATP-actin. *J. Biol. Chem.* **266**, 7668-7675
- Voegtli, W.C., Madrona, A.Y., Wilson, D.K.** (2003) The structure of Aip1p, a WD repeat protein that regulates Cofilin-mediated actin depolymerization. *J. Biol. Chem.* **278**, 34373-34379
- Wang, J.Y., Frenzel, K.E., Wen, D., Falls, D.L.** (1998) Transmembrane neuregulins interact with LIM kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *J. Biol. Chem.* **273**, 20525-20534
- Watt, S.A., Kular, G., Fleming, I.N., Downes, C.P., Lucocq, J.M.** (2002) Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem. J.* **363**, 657-666
- Welch, M.D., Iwamatsu, A., Mitchison, T.J.** (1997) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **385**, 265-269

- Wennstrom, S., Hawkins, P., Cooke, F., Hara, K., Yonezawa, K., Kasuga, M., Jackson, T., Claesson-Welsh, L., Stephens, L.** (1994) Activation of phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. *Curr. Biol.* **4**, 385-393
- Westerberg, L., Larsson, M., Hardy, S.J., Fernandez, C., Thrasher, A.J., Severinson, E.** (2005) Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduced B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Blood* **105**, 1144-1152
- Worthylake, R.A. and Burridge, K.** (2001a) Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 569-577
- Worthylake, R.A., Lemoine, S., Watson, J.M., Burridge, K.** (2001b) RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J. Cell Biol.* **154**, 147-160
- Yaffe, M.B.** (2002) How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* **513**, 53-57
- Yagisawa, H., Sakuma, K., Paterson, H.F., Cheung, R., Allen, V., Hirata, H., Watanabe, Y., Hirata, M., Williams, R.L., Katan, M.** (1998) Replacements of single basic amino acids in the pleckstrin homology domain of phospholipase C-delta1 alter the ligand binding, phospholipase activity, and interaction with the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273**, 417-424
- Yamashita, A., Maeda, K., Maeda, Y.** (2003) Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J.* **22**, 1529-1538
- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., Mizuno, K.** (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* **393**, 809-812
- Yeung, T., Georges, P.C., Flanagan, L.A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., Janmey, P.A.** (2005) Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 24-34
- Yin, H.L. and Janmey, P.A.** (2003) Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol* **65**, 761-789
- Yokoo, T., Toyoshima, H., Miura, M., Wang, Y., Tada, I.K., Suzuki, H., Sone, H., Shimano, H., Gotoda, T., Nishimori, S., Tanaka, K., Yamada, N.** (2003) p57Kip2 regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus. *J. Biol. Chem.*
- Yonezawa, N., Homma, Y., Yahara, I., Sakai, H., Nishida, E.** (1991) A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin. *J. Biol. Chem.* **266**, 17218-17221
- Yonezawa, N., Nishida, E., Iida, K., Yahara, I., Sakai, H.** (1990) Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **265**, 8382-8386

**Yonezawa, N., Nishida, E., Koyasu, S., Maekawa, S., Ohta, Y., Yahara, I., Sakai, H.** (1987) Distribution among tissues and intracellular localization of cofilin, a 21kDa actin-binding protein. *Cell Struct. Funct.* **12**, 443-452

**Yonezawa, N., Nishida, E., Sakai, H.** (1985) pH control of actin polymerization by cofilin. *J. Biol. Chem.* **260**, 14410-14412

**Zalevsky, J., Lempert, L., Kranitz, H., Mullins, R.D.** (2001) Different WASP family proteins stimulate different Arp2/3 complex-dependent actin-nucleating activities. *Curr. Biol.* **11**, 1903-1913

**Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Carano, A., Marchisio, P.C.** (1988) The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *J. Bone Miner. Res.* **3**, 517-523

**Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Grano, M., Rubinacci, A., Abbadini, M., Gaboli, M., Marchisio, P.C.** (1989) Immunocytochemical distribution of extracellular matrix receptors in human osteoclasts: a beta 3 integrin is colocalized with vinculin and talin in the podosomes of osteoclastoma giant cells. *Exp. Cell Res.* **182**, 645-652

## 9 Anhang

### 9.1 Vektoren

#### pGEX-2T und pGEX-4T-2

Diese Vektoren werden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, D) vertrieben, Vektorkarten und vollständige Sequenzen findet man auf der Homepage der Firma (<http://www.amershambiosciences.com>).

#### pEGFP-C1

Dieser Vektor wird von der Firma Clontech bzw. BD Biosciences (Heidelberg, D) vertrieben, Vektorkarte und vollständige Sequenz findet man auf der Homepage der Firma (<http://www.clontech.com>)

#### pMAL-p2X und pTYB1

Diese Vektoren werden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt, D) vertrieben, Vektorkarten und vollständige Sequenzen findet man auf der Homepage der Firma (<http://www.neb.com>).

### 9.2 *Primer-Sequenzen*

<b>Name</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>
GFP-f	ATCACTCTCGGCATGGAC
GFP-r	TCTACAAATGTGGTATGGC
Gex-3	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
Gex-5	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
MAL-f	AAGCCCTGAAAGACGCGCAGAC
MAL-r	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCC
L1f	CTGGAATTCTGGTCGACACGCTACTTTG
L1r	CTCGAGCGGTCTAGAATTCACCTTAT
LK1-L-MAL-1	GGTTCCGCGTGGATCCTTGCCCCG
LK1-L-MAL-2	GATATCTGCAAGCTTCTACACAGTC
LK1-L-TYB-1	GGTTCCGCGTGTGCGACTTGCCCCGTG
LK1-L-TYB-2	GATATCTGCAGAATTCTACACAGTC
STY-1	GAGCGGATAACAATTCCCCTC
STY-2	CAATACATTCAATAGACCC
SMAL-1	GAAAGACGCGCAGACTAATTTCG
SMAL-2	CGATTAAGTTGGGTAACGCC

### 9.3 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' → 3'
Cof-1	GATCCATGGCCTCCGGTGTGGCTGTCTCTGATGGTGTCAATCAAG GTGTTCAACTGAG
Cof-2	AATTCTCAGTTGAACACCTTGATGACACCATCAGAGACAGCCAC ACCGGAGGCCATG

### 9.4 DNS-Array Daten

Name	Signal Log Ratio	Change
Cofilin 1 (nicht-muskelspezifisch)	-0,2	NC
Cofilin 1	1,2	NC
Cofilin 1	-0,1	NC
Cofilin 2 (muskelspezifisch)	0,7	NC
Cofilin 2	1,1	I
Cofilin 2	1,5	I
LIMK1	0	NC
LIMK1	1,9	I
LIMK1	1,5	I
LIMK2	-0,6	NC
LIMK2	-0,6	NC
PAK1	-2,7	D
PAK1	-2,8	D
PAK1	-2,3	D
PAK4	0,1	NC
PAK4	-0,9	NC
PAK4	-0,3	NC
ROCK1	0,3	NC
ROCK1	0,5	I
ROCK1	0,7	NC
ROCK1	-1,6	NC
ROCK1	0,2	NC
ROCK1	-0,4	NC
ROCK2	-0,2	NC
ROCK2	0,7	NC
PLCβ1	-2,6	NC
PLCβ1	-2,6	D
PLCβ1	-0,3	NC
PLCβ2	-1,1	D
PLCβ2	0	NC
PLCβ3	-0,4	NC
PLCδ1	0	NC
PLCδ1	-0,1	NC
PLCδ1	-0,1	NC
PLCδ1	-0,1	NC

PLCδ1	-0,7	NC
PLCδ1	-2,0	D
PLCδ1	-3,1	NC

Für die DNA-Arrays wurden Zelllysate von frisch isolierten Blutmonozyten und von 7 Tage alten adhärennten Makrophagen hergestellt. Die gesamte zelluläre RNA wurde mit TRIzol (Invitrogen, San Diego, Calif.) nach Angaben des Herstellers isoliert, die RNA-Konzentration anschließend mit Spektrophotometrie und Gelelektrophorese bestimmt. Die RNA wurde markiert und nach Angaben des Herstellers mit Affymetrix HumanGenome HG U133Plus Arrays (47.000 Transkripte) hybridisiert. Die Fluoreszenzintensitäten wurde mit dem Programm Affymetrix MICROARRAYSUIE Version 5 gemessen, die Messungen wurden zweimal durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeit für unterschiedliche Expression wurde mit dem T-Test für unverbundene Stichproben berechnet.

**Signal Log Ratio:** Änderung der Genexpression im Vergleich von adhärennten Makrophagen gegenüber nicht-adhärennten Monozyten, ausgedrückt als Exponent zur Basis 2

I=Increase D=Decrease NC=No Change

## 9.5 Inhalt der Video-CD

Alle Filme zeigen primäre humane Makrophagen, die mittels *Nucleofection<sup>TM</sup>* mit GFP-Aktin (grün) und Cofilin-DsRedII (rot) transfiziert wurden. Die konfokalen Einzelbilder wurden übereinandergelegt, so dass eine Kolokalisation von Aktin und Cofilin in gelb erscheint.

**FILM 1:** Der Film zeigt zunächst eine nicht aktivierte Zelle mit typischem Podosomen-Saum und Podosomen-freiem Zentrum. Am rechten Bildrand ist eine weitere Zelle angeschnitten, wo Cofilin-dsRedII-Aggregate als Artefakt zu erkennen sind. Nach ca. 10 min wurde fMLP ins Medium gegeben, um eine ungerichtete Aktivierung zu induzieren. Nach kurzer Zeit erkennt man "Wolken" aus Aktin und Cofilin, die sich in den Podosomen-freien Raum bewegen und in denen dabei neue Podosomen entstehen. Gegen Ende des Filmes kommt es zur Rückbildung dieser zentralen Podosomen-Bereiche und erneut zur Ausbildung des Podosomen-Saumes am Rand der Zelle.

Dauer der Films: 44 sec (entspricht in Echtzeit 80 min)

**Film 2:** Der Bild zeigt einen Ausschnitt einer Zelle mit sehr hoher Podosomen-Dynamik. Die Podosomen sind teilweise in Gruppen angeordnet, die sich z.B. am linken, linken oberen und unteren Bildrand innerhalb von 10 min komplett auflösen. Sehr gut zu beobachten ist der hohe Grad an Kolokalisation von Aktin und Cofilin, es sind jedoch auch immer wieder deutliche Konzentrationsänderungen von Aktin und Cofilin innerhalb einzelner Podosomen, erkennbar als Farbverschiebungen von gelb zu grün bzw. rot. Eine detaillierte Analyse dieser Veränderungen steht noch

aus. Gegen Ende des Filmes sieht man rote Punkte am rechten und unteren Bildrand auftauchen, die dsRedII-Aggregaten entsprechen und als Artefakte zu werten sind.

Dauer der Films: 5 sec (entspricht in Echtzeit 10 min)

**Film 3:** Zu erkennen ist eine polarisierte Zelle mit *leading edge* am linken Bildrand. Am rechten Bildrand sind Retraktionsbewegungen zu sehen, in diesem relativ Podosomen-armen Bereich kommt es vereinzelt zu rascher Podosomen-Bildung und –Abbau.

Dauer der Films: 7 sec (entspricht in Echtzeit 16 min)

**Film 4:** Zu sehen ist ein Ausschnitt einer Zelle mit hoher Podosomen-Dichte, anhand dessen man verschiedene Prozesse wie Podosomen-Bildung, -Teilung, -Fusion und Abbau gut beobachten kann (siehe Ausschnitte in Abb. 4.21B). Auch hier ist die Kolo-kalisation von Aktin und Cofilin deutlich zu erkennen, ebenso die Konzentrationsänderungen innerhalb einzelner Podosomen. Gegen Ende bilden sich dsRedII-Aggregate als rote Artefakte.

Dauer der Films: 5 sec (entspricht in Echtzeit 11 min)

## 10 Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit möchte ich mich bei den vielen Menschen, die dazu beigetragen haben, ganz herzlich bedanken.

Herrn **Prof. Dr. P. C. Weber** danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut und die Möglichkeit, hier unter hervorragenden Arbeitsbedingungen zu promovieren.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Nutzung der technischen Einrichtungen des Max-von-Pettenkofer-Institutes, für diese Möglichkeit bin ich Herrn **Prof. Dr. Dr. J. Heesemann** sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Siess** danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 438, die damit verbundene finanzielle Unterstützung und die wissenschaftliche Weiterbildung im Rahmen des Graduiertenprogrammes.

Ich danke unseren Kooperationspartnern O. Bernard, M. H. Cobb, P. Gierschik, P. Goyal, P. Lappalainen, A. Minden, K. Mizuno und D. Pandey, die uns Antikörper und Konstrukte zur Verfügung gestellt haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten sowie des Max-von-Pettenkofer-Institutes danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Den Kollegiaten im Graduiertenkolleg 438 danke ich für die interessanten Seminare.

Ich danke den Mitgliedern unserer Instituts-übergreifenden Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, die anregenden Diskussionen und die konstruktive Kritik.

Besonders bedanke ich mich bei all meinen Mit-Doktorandinnen und Doktoranden aus dem Gartenpavillon **Anna, Barbara, Florian, Katharina, Petra und Sandra**, für die große Hilfsbereitschaft, das äußerst angenehme Arbeitsklima und nicht zuletzt viel Spaß.

Mein ganz herzlicher Dank geht an Frau **Barbara Böhlig**, nicht nur für ihre stets kompetente technische Assistenz und beständige Hilfsbereitschaft, sondern auch für viele interessante Gespräche und psychologische Unterstützung, wenn die Motivation nachzulassen drohte.

Herrn **Christian Johannes** danke ich für die Aufrechterhaltung eines funktionierenden Netzwerkes und unermüdliches Ankämpfen gegen unwillige Computernutzer, vor allem aber für viele gemeinsame Mittagspausen und den Austausch über das aktuelle Münchner Kulturleben.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. Martin Aepfelbacher** für sein stets offenes Ohr, seine konstruktive Kritik und seine anhaltende Unterstützung meiner Arbeit.

Mein größter Dank gilt Herrn **PD Dr. Stefan Linder**, ohne dessen Unterstützung es diese Arbeit nicht gäbe. Ganz besonders danke ich ihm für sein nicht nachlassendes Vertrauen, seine beinahe unendliche Geduld, die ständige Diskussionsbereitschaft und die kontinuierliche Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

## 11 Lebenslauf

**Name:** Daniel Walz

**Adresse:** Westermühlstr. 8  
80469 München

**Geburtsdatum:** 12.08.1976

**Geburtsort:** Pforzheim

**Familienstand:** ledig

**Nationalität:** deutsch

**Ausbildung:**

1983 - 1985	Freie Schule Karlsruhe e.V.
1985 - 1987	Grundschule Unterschleißheim
1987 - 1990	Dom-Gymnasium Freising
1990 - 1996	Viscardi-Gymnasium Fürstenfeldbruck
1996	Abitur
1996 - 1997	Freiwilliges Soziales Jahr
1997 - 2005	Studium Humanmedizin LMU München
2005	Approbation

**Promotion:** 2001 - 2005 "Regulation podosomal Adhäsionen in Makrophagen durch Cofilin-regulatorische Signalwege"  
am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten unter Leitung von PD Dr. Stefan Linder