

Kräfte und Elastizität in der Zelladhäsion

Eine wachsende Zahl von experimentellen Beobachtungen deutet darauf hin, dass physikalische Aspekte der Zelladhäsion, wie Kräfte und Elastizität, eine wichtige Rolle in der zellulären Entscheidungsfindung spielen. Zum Beispiel sammeln adhärierende Zellen Informationen über die mechanischen Eigenschaften ihrer Umgebung, indem sie aktiv an dieser ziehen. Die dabei aufgebaute Kraft wird an sogenannten Fokalkontakten in biochemische Signale umgesetzt, in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Umgebung. Die Emmy-Noether-Nachwuchsgruppe *Modellierung von Kräften und Signaltransduktion in der Zelladhäsion* untersucht diese Vorgänge aus der Sicht der theoretischen Physik und der Physik der weichen Materie. So soll mit Methoden der Elastizitätstheorie und der stochastischen Dynamik die Funktionsweise des Mechanosensors an Fokalkontakten aufgeklärt werden. Des Weiteren werden Modelle entwickelt, die vorhersagen, wie Zellen sich aufgrund der an Fokalkontakten gewonnenen Informationen in elastischen Medien verhalten.

Der menschliche Körper ist aus $\sim 10^{13}$ Zellen aufgebaut, die sich in mehr als 200 verschiedene Zelltypen einteilen lassen. Für seine Funktion ist es wesentlich, dass zwei sich eigentlich widersprechende Prinzipien umgesetzt werden: einerseits müssen die Zellen unseres Körpers aneinander haften, damit dieser nicht einfach auseinander fällt; andererseits müssen die Zellen aber auch die Möglichkeit haben, sich schnell umzuordnen, um zum Beispiel auf Infektionen oder Wunden reagieren zu können. Die Natur hat mehrere Strategien entwickelt, um diese Anforderungen zu bewältigen. Dazu gehört zunächst der Aufbau der *extrazellulären Matrix*. Dies ist ein Proteinnetzwerk zwischen den Zellen, zum Beispiel das Kollagen im Bindegewebe, in dem sich die Zellen später nicht nur wie Kinder in einem Klettergerüst bewegen können, sondern das sie gleichzeitig auch permanent umstrukturieren können. Weiter gehört dazu, dass Zellen keine statischen Kontakte zu ihrer Umwelt aufbauen, sondern diese ständig auf- und abbauen. Zu diesem Zweck werden Bindungen, die für sich alleine Lebenszeiten im Sekundenbereich haben, zu Clustern variabler Größe zusammengefasst, um je nach Bedarf verschieden lange Lebenszeiten zu erreichen. Durch ihren dynamischen Charakter können Zelladhäsionskontakte gleichzeitig aufrechterhalten und optimiert werden.

Wenn eine Zelle an die extrazelluläre Matrix oder an eine andere Zelle adhärert, können im Gegensatz zur Situation in Lösung Kräfte und Verformungen auftreten. Dafür gibt es mehrere Gründe. Zunächst hat die Zelle eine eigene Elastizität, die durch das *Zytoskelett* erzeugt wird, einem Proteinnetzwerk innerhalb der Zelle, das zu einem großen Teil aus Aktinmolekülen besteht, die dynamisch zu Filamenten, Filamentbündeln und Netzwerken verknüpft werden können. Wenn die Zelle auf flächenhaften Substraten durch spezifische Adhäsion eine endliche Kontaktfläche erzielen will, dann muss sie dazu ihr eigenes Zytoskelett verformen, was zu rückstellenden Kräften führt. Darüber hinaus entwickeln aber viele adhärierende Zelltypen von sich aus zusätzliche Kräfte. Stationäre Zellen bilden zum Beispiel bei Adhäsion oft dicke Bündel von Aktinfilamenten, in denen molekulare Motoren mechanische Zugspannung erzeugen und die an besonders großen Adhäsionskontakten zur extrazellulären Matrix enden, den sogenannten *Fokalkontakten*. Wenn die zelluläre Umgebung ausreichend weich ist, was in vielen physiologischen Situationen der Fall ist, dann führen die zellulären Kräfte zu ihrer Verformung. Die wesentlichen Elemente dieser Situation sind in **Abb. 1** gezeigt. Traditionellerweise wird angenommen, dass die zellulären Kräfte mit der

physiologischen Funktion des jeweiligen Zelltyps zu tun haben. So nimmt man an, dass Fibroblasten, ein mechanisch besonders aktiver Zelltyp, ihre Kräfte verwenden, um das Kollagen im Bindegewebe zu ordnen und um Wunden zu schließen. In den letzten Jahren ist jedoch zunehmend klar geworden, dass die in der Zelladhäsion auftretenden Kräfte und Verformungen auch eine wichtige Rolle in der zellulären Entscheidungsfindung spielen. So wurde zum Beispiel experimentell gefunden, dass Zellen aktiv an ihrer Umgebung ziehen, um deren mechanischen Eigenschaften zu erkunden und darauf ganz gezielt zu reagieren. Tatsächlich ist bei den Medizinern und Bioingenieuren schon lange bekannt, dass zum Beispiel Zellen im Gewebe von Lunge, Knochen und Blutgefäßen sehr speziell auf mechanische Eigenschaften ihrer Umgebung reagieren. In den letzten Jahren hat sich nun auch die Grundlagenforschung an einzelnen Zellen verstärkt diesem Thema zugewandt. Dabei hat sich herausgestellt, dass mechanische Informationen an Fokalkontakten in spezielle biochemische Signale umgesetzt werden.

Das Ziel der Emmy-Noether Nachwuchsgruppe *Modellierung von Kräften und Signaltransduktion in der Zelladhäsion* ist es, diese Phänomene vom Standpunkt der theoretischen Physik und der Physik der weichen Materie aus zu untersuchen. Ein verbessertes Verständnis des Zusammenspiels von strukturellen und biochemischen Aspekten in der Zelladhäsion trägt nicht nur zur Grundlagenforschung an biologischen Systemen bei, sondern lässt sich zudem für viele Anwendungen heranziehen, insbesondere für die Kontrolle von Zellverhalten auf Biochips und in künstlichem Gewebe sowie für die Entwicklung biomimetischer Systeme wie künstlicher Zellen. Im folgenden wird die aktuelle Forschung der Nachwuchsgruppe durch drei Teilprojekte vorgestellt: (1) die Entwicklung einer neuen Methode zur Messung von aktiven zellulären Kräften an einzelnen Fokalkontakten, (2) die stochastische Dynamik von molekularen Bindungen in Adhäsionsclustern und (3) die theoretische Vorhersage von Zellorganisation in elastischen Medien aufgrund der Informationsverarbeitung an Fokalkontakten.

(1) In Zusammenarbeit mit Zellbiologen vom Weizmann-Institut in Israel haben wir eine neue Methode entwickelt, die es ermöglicht, die von der Zelle an einzelnen Fokalkontakten ausgeübten Kräfte zu messen (Balaban et al., *Nature Cell Biology* 3: 466, 2001; Schwarz et al., *Biophysical Journal* 83: 1380, 2002). Mechanisch aktive Zellen wie Fibroblasten und Muskelzellen wurden auf elastischen mikrostrukturierten Substraten kultiviert. Die geringe Steifigkeit der Substrate (Young-Modulus ~ 10 kPa) führt zu ihrer Verformung, die aufgrund der Mikrostrukturierung im Computer rekonstruiert werden kann. Die Fokalkontakte wurden durch ein Fluoreszenz-Konstrukt markiert und ebenfalls im Computer rekonstruiert. Da Verformungen nur in der Nähe von Fokalkontakten beobachtet wurden, konnte die Annahme gemacht werden, dass die zellulären Kräfte nur über diese auf das Substrat übertragen werden. Mit den gewonnenen Computerdaten und mit Hilfe der linearen Elastizitätstheorie war es dann möglich, für jeden Fokalkontakt eine Kraft zu errechnen. In **Abb. 2** wird das errechnete Kraftmuster über dem Fluoreszenz-Bild der Fokalkontakte gezeichnet. Die Tatsache, dass die Fokalkontakte in Richtung der Kräfte zeigen, deutet darauf hin, dass der Wachstumsprozess dieser Proteinaggregate kraftabhängig ist. Außerdem sieht man, dass lateral stark ausgedehnte Fokalkontakte großen Kräften entsprechen. Eine quantitative Auswertung ergab für verschiedene Zelltypen einen linearen Zusammenhang zwischen Kraft und lateraler Ausdehnung, mit einer Steigung ~ 5 nN/ μm^2 . Dieses Ergebnis wurde vor kurzem mit einer anderen Methode eindrucksvoll bestätigt (Tan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1484, 2003). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Kraft und Aggregationszustand wurde von uns ebenfalls für von außen ausgeübte Kräfte gefunden (Rivelino et al., *Journal of Cell Biology* 153: 1175, 2001). Aus diesen Experimenten kann geschlossen werden, dass

Fokalkontakte als *Mechanosensoren* funktionieren, die Kräfte in Protein-Aggregation und damit in biochemische Signale umwandeln.

(2) Es ist seit langem bekannt, dass Adhäsionscluster unter Kraft stark destabilisiert werden, da die Zerfallsrate eines Einzelmoleküls eine exponentielle Funktion der äußeren Kraft ist (Bell, Science 200: 618, 1978). Um physiologische Lebenszeiten zu erreichen, muss der Cluster deshalb durch Rückbindung stabilisiert werden. In einem weiteren Teilprojekt studieren wir theoretisch die stochastische Dynamik eines Adhäsionsclusters unter konstanter Kraft und mit Rückbindung (Erdmann und Schwarz, eingereicht, 2003). Der Begriff *Adhäsionscluster* umfasst dabei nicht nur die oben diskutierten, relativ großen Fokalkontakte, sondern auch kleinere Kontakte wie zum Beispiel Fokalkomplexe, die nahe der vorderen Front einer sich bewegenden Zelle auftreten. In **Abb. 3** zeigen wir typische Ergebnisse unserer Rechnungen für einen Cluster mit 10 Bindungen. Die Lösung der stochastischen Gleichungen ergibt die Funktionen $p_i(t)$, das heißt die Wahrscheinlichkeiten, dass genau i Bindungen zur Zeit t geschlossen sind (in Abb. 3 ist $0 \leq i \leq 10$). $p_0(t)$ ist also die Wahrscheinlichkeit, dass zur Zeit t alle Bindungen gebrochen sind. Da biologische Adhäsionscluster aufgrund elastischer Relaxationsprozesse in der Regel keine Möglichkeit haben, vom Zustand $i=0$ aus zurückzubinden, haben wir dafür in unseren Rechnungen eine absorbierende Randbedingung implementiert. Dies führt dazu, dass die Cluster immer eine endliche Lebensdauer haben, das heißt $p_0(t)$ wird für große Zeiten t immer den maximalen Wert 1 erreichen. Die Zeitskala dafür, das heißt die Lebensdauer des Clusters, hängt jedoch empfindlich von Clustergröße, Rückbindungsrate und äußerer Kraft ab. Unsere Rechnungen zeigen, dass die Clusterlebenszeit exponentiell mit der Rückbindungsrate steigt. Andererseits fällt sie aber auch relativ abrupt ab, wenn die äußere Kraft einen bestimmten Wert überschreitet. Tatsächlich könnten Gesetzmäßigkeiten wie diese hinter dem Mechanismus des Mechanosensors an Fokalkontakten stehen. Wenn zum Beispiel deren mechanische Belastung immer knapp unterhalb der erwähnten Schwelle gehalten würde, dann könnte eine kleine Erhöhung ausreichen, um den Cluster schnell zerfallen zu lassen. Dies würde die Kraft auf die wenigen noch existierenden Bindungen stark erhöhen, was wiederum in biochemischen Signalen resultieren könnte, zum Beispiel durch das mechanische Öffnen von verborgenen Bindungsstellen für regulative Moleküle. Noch gibt es zu wenig experimentelle Daten, um diese Vorschläge zu überprüfen, aber es ist durchaus vorstellbar, dass der von uns in Teilprojekt (1) gemessene Kraftwert von $\sim 5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ einem solchen Schwellenwert für Fokalkontakte entspricht. Tatsächlich entspricht dieser Wert einer Kraft pro Bindung im pN-Bereich, das heißt genau der internen Kraftskala von Biomolekülen, auf der Kraft-induzierte Zerfallsprozesse wirken.

(3) Wir wenden uns schließlich der Frage zu, wie sich die an Fokalkontakten gewonnenen Informationen in Zellverhalten übersetzen. Die komplizierte molekulare Zusammensetzung der Fokalkontakte zeigt, dass die Zelle ein sehr großes Reaktionsrepertoire für biochemischen und mechanischen Input an Fokalkontakten entwickelt hat. Der Hauptgrund dafür dürfte sein, dass eine Zelle in physiologischer Umgebung viele Eingangssignale gleichzeitig verarbeiten muss. Wird die gleiche Zelle dagegen einer kontrollierten Umgebung ausgesetzt, in der im wesentlichen ein Eingangssignal dominiert, dann sollte sie ein deutlich klareres Verhalten zeigen. Genau dies wurde in den letzten Jahren experimentell für den Fall der Umgebungssteifigkeit demonstriert. Durch eine geschickte Verwendung von elastischen Substraten wurde gezeigt, dass Zellen in steiferen Umgebungen ihr Aktin-Zytoskelett stärker aufbauen (Pelham and Wang, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13661, 1997). In einer mechanisch anisotropen Umgebung polarisiert die Zelle sich in die Richtung großer effektiver Steifigkeit, oft gepaart mit Zellbewegung in diese Richtung (Lo et al., Biophysical Journal 79: 144, 2000; Wong et al., Langmuir 19: 1908, 2003). Der Begriff *effektive Steifigkeit* umfasst

dabei sowohl elastische Steifigkeit als auch eine von außen vorgegebene Zugspannung. In einem weiteren Teilprojekt haben wir dieses aktive Zellverhalten als Extremumprinzip in der linearen Elastizitätstheorie formuliert (Bischofs and Schwarz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 9274, 2003). Der Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass eine Präferenz für maximale effektive Steifigkeit auch als Bestreben interpretiert werden kann, eine bestimmte Kraft aufzubauen, dabei aber möglichst wenig Energie in die elastische Verformung der Umgebung zu investieren. Ein möglicher molekularer Mechanismus für dieses effektive Zellverhalten könnte sein, dass Fokalkontakte in die Richtung größerer effektiver Steifigkeit schneller wachsen, weil der Aufbau von Kraft in einer steiferen Umgebung schneller vorangeht. Das Kraftmuster einer polarisierten Zelle wird in unserem Modell als ein kontrahierendes Kraftpaar beschrieben. Auf diese Weise wird es möglich, die Theorie der mechanischen Punktdefekte für unsere Rechnungen heranzuziehen und sich auf die nicht-triviale Rolle der weichen Umgebung zu fokussieren (Schwarz und Safran, Physical Review Letters 88: 048102, 2002). Die entsprechenden elastischen Gleichungen können für einige wichtige Geometrien exakt gelöst werden und führen zu Vorhersagen für Zellorientierung und –positionierung, die mit vielen in der Literatur berichteten experimentellen Beobachtungen übereinstimmen, und zwar sowohl für mechanisch aktive Zellen auf elastischen Substraten als auch in weichen dreidimensionalen Materialien wie Kollagengelen. **Abb. 4** zeigt schematisch unsere Vorhersagen für elastische Substrate: auf einem Gebiet kleiner Steifigkeit, das an ein Gebiet großer Steifigkeit angrenzt, wird sich die Zelle senkrecht zur Grenzlinie anordnen, weil dies die Richtung größter effektiver Steifigkeit ist. Auf der anderen Seite der Grenzlinie ist dies jedoch die Richtung kleinster effektiver Steifigkeit und die Zelle wird sich hier um 90 Grad drehen. Wird die Umgebung einer Zelle unter Zugspannung gesetzt, so erwarten wir eine parallele Ausrichtung mit der Zugrichtung. Dies gilt insbesondere in dem Fall, dass die Verformung von einer anderen Zelle ausgeht; für viele Zellen könnte es dann zu einer kettenförmigen Anordnung kommen. Unser Modell macht viele neuartige Aussagen, die nun in Experimenten überprüft werden sollten, und könnte in Zukunft für die Vorhersage von Zellverhalten auf weichen Biochips und in künstlichem Gewebe angewendet werden.

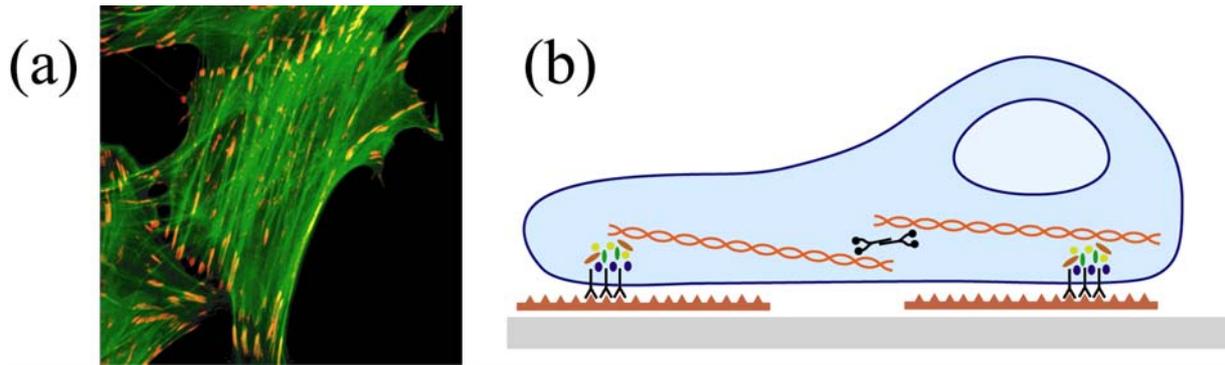


Abb. 1: Zell-Matrix-Adhäsion auf einem flachem Substrat. (a) Aufsicht auf eine fluoreszierend markierte Zelle vom Typ Fibroblast: Bündel von Aktinfilamenten (grün) enden an Fokalkontakten (rot). (b) Schematische Darstellung der gleichen Situation in Seitenansicht: gezeigt sind zwei durch Aktinfilamente verbundene Fokalkontakte. Fokalkontakte sind Cluster von Transmembran-Proteinen, die Proteine der extrazellulären Matrix binden, die vorher auf dem flachen Substrat verteilt wurden. Auf der zytoplasmatischen Seite bildet sich ein großes Aggregat von zusätzlichen Proteinen, der an die Aktinfilamente koppelt. Molekulare Motoren erzeugen darin Kräfte, die über die Fokalkontakte auf die Umgebung übertragen werden.

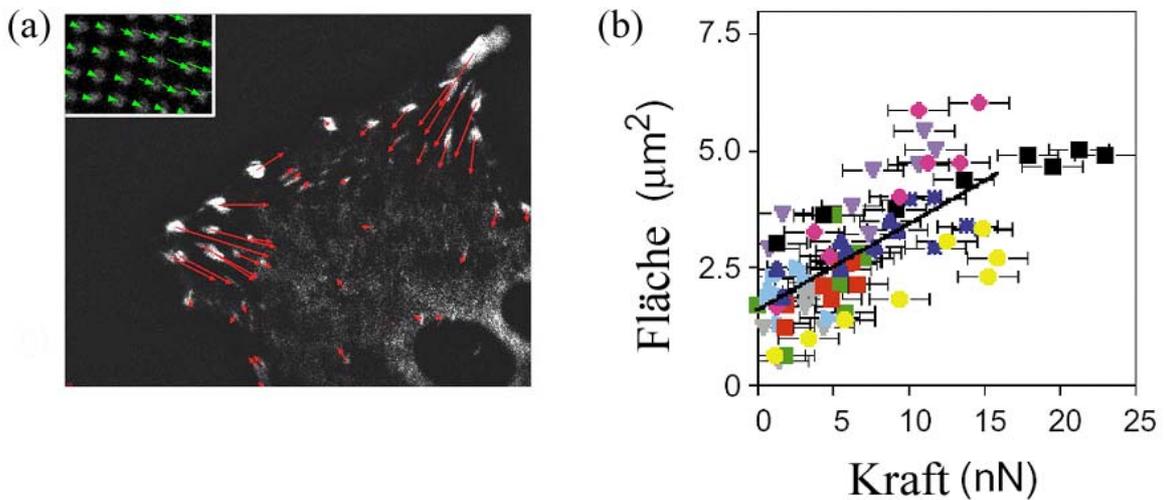


Abb. 2: Messung von Kräften an einzelnen Fokalkontakten auf mikrostrukturierten Substraten. (a) Zu sehen sind fluoreszierend markierte Fokalkontakte (weiss), Verformungen des elastischen Substrats (ingerückt, grün) und die aus den Substratverformungen berechneten Kräfte (rot). (b) Zwischen den Kräften und der lateralen Ausdehnung der Fokalkontakte besteht ein linearer Zusammenhang, mit einer Steigung $\sim 5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$.

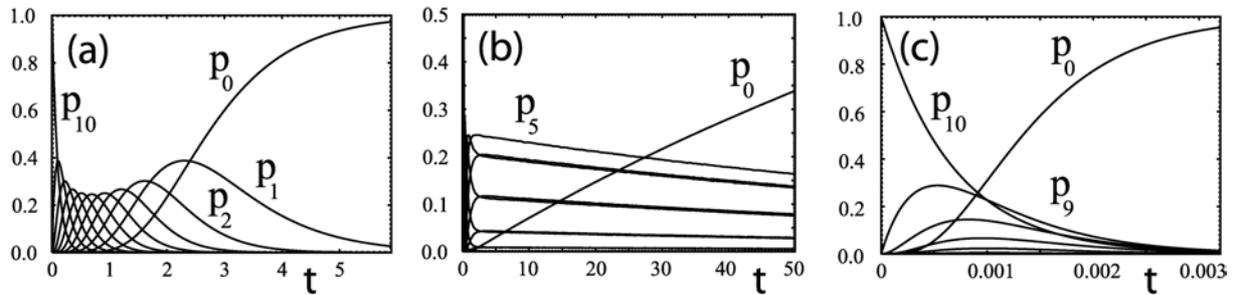


Abb. 3: Theoretischer Zerfall eines Adhäsionsclusters mit 10 Bindungen. $p_i(t)$ ist die Wahrscheinlichkeit, dass zur Zeit t genau i Bindungen geschlossen sind. Die Zeitskala ist typischerweise eine Sekunde. (a) Keine Kraft, keine Rückbindung, die verschiedenen Bindungen zerfallen unabhängig voneinander. (b) Ohne Kraft, aber mit Rückbindung (Rückbindungsrate = Zerfallsrate), allerdings nicht vom Zustand $i=0$. An der Zeitskala sieht man deutlich, wie stark die Rückbindung den Cluster stabilisiert. (c) Ohne Rückbindung, aber mit einer Gesamtkraft von 200 pN (also 20 pN pro Bindung, was groß ist auf der internen Kraftskala von Biomolekülen). An der Zeitskala sieht man, wie stark die Kraft den Cluster destabilisiert.

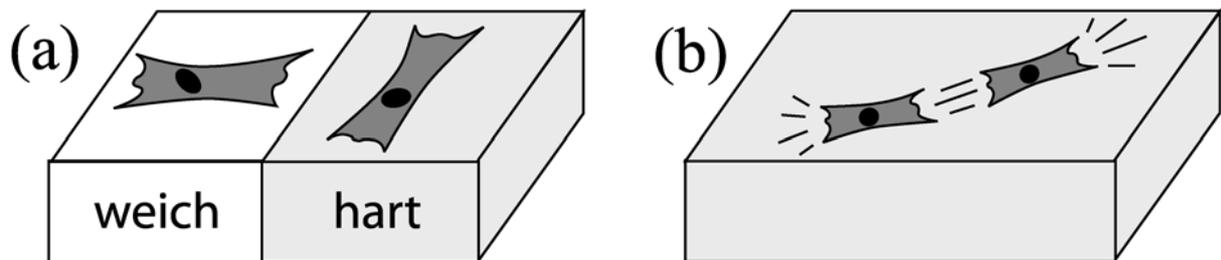


Abb. 3: Vorhergesagte Zellorientierung auf elastischen Substraten. (a) Substrat mit zwei Regionen unterschiedlicher elastischer Steifigkeit. Auf der weichen bzw. harten Seite orientieren sich die Zellen senkrecht bzw. parallel zur Grenzlinie. (b) Homogenes elastisches Substrat. Die zwei Zellen ordnen sich parallel an, da die von der einen Zelle erzeugte Zugspannung im Substrat die parallele Orientierung der anderen Zelle begünstigt.