

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Universität Würzburg

Direktorin: Professor Dr. med. E.-B. Bröcker

**Pfadbildung durch invasive Melanomzellen:  
Matrixdefekte, Zellfragmente und erleichterte Migration.**

Inaugural – Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christian Mayer

aus Mintraching-Sengkofen

Würzburg, November 2005

Referent: Prof. Dr. med. P. Friedl, Ph. D.

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Müller

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2006

Der Promovend ist Arzt

## Inhaltsverzeichnis

	Einleitung	
1.	Zelluläre und molekulare Mechanismen von Tumorinvasion und Metastasierung .....	1
1.1.	Mechanismen der Tumorzellmigration.....	1
1.2.	Tumorzellinvasion und Matrix-Neuorganisation .....	2
1.3.	Methodik der Analyse des Umbaus der extrazellulären Matrix.....	3
1.4.	Ziel der Studie.....	3
2.	Material und Methoden.....	5
2.1.	Material und Bezugsquellen .....	5
2.1.2.	Geräte und Software .....	6
2.2.	Methoden .....	7
2.2.1.	Zellen und Zellkulturen .....	7
2.2.2.	Zellkultivierung in 3-D Kollagenmatrices.....	7
2.2.3.	Zeitraffervideomikroskopie und Zelltracking.....	8
2.2.4.	Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie.....	8
2.2.4.1.	Markierung mit monoklonalen Antikörpern .....	8
2.2.4.2.	Konfokalmikroskopie .....	9
2.2.4.3.	Rasterelektronenmikroskopie.....	9
2.2.5.	FACS-Analyse und Durchflußzytometrie .....	10
3.	Ergebnisse .....	11
3.1.	Zelluläre Mechanismen von Migration und Matrixumbau durch MV3 Melanomzellen .....	11
3.1.1.	Allgemeine Charakteristika migrierender Einzelzellen: Morphologie, Polarisierung und Migrationsrichtung .....	11
3.1.2.	Migrationsassoziierte Umstrukturierung der Kollagenmatrix durch Migration .....	14

3.1.3.	Freisetzung von Oberflächendeterminanten (CD44, $\beta$ 1-Integrine).....	16
3.1.4.	Untersuchung von migrierenden MV3 Melanomzellen am Rasterelektronenmikroskop .....	16
3.1.4.1.	Matrixveränderungen .....	16
3.1.4.2.	Deposition von Zellfragmenten .....	17
3.2.	Molekulare Charakterisierung freigesetzter Zellbestandteile: Mapping exprimierter membranständiger Proteine und Rezeptoren.....	19
3.2.1.	Shedding von Zellrezeptoren .....	20
3.2.1.1.	Expressionsnachweis mittels FACS-Analyse .....	20
3.2.1.2.	Nachweis der Lokalisation von Oberflächenmolekülen mittels Konfokalmikroskopie .....	23
3.2.2.	Molekulare Charakterisierung der freigesetzten Zellbestandteile während der Migration.....	23
3.2.2.1.	Shedding von Proteinen .....	23
3.2.2.2.	Shedding von Zellfragmenten, Zytoplasma und Zytoskelett und morphologische Charakterisierung freigesetzter Zellbestandteile.....	24
3.3.	Bedeutung des Matrixumbaus für die Migration nachfolgender Zellen .....	27
3.3.1.	Invasion und Migration von MV3 Zellen aus soliden multizellulären Sphäroiden .....	27
3.3.2.	Auswirkungen des Matrixumbaus auf benachbarte Tumorzellen .....	29
3.3.3.	Konfokalmikroskopische Analyse der erleichterten Migration infolge Matrixumbau: Pfadbildende Zellen, Umbauvorgänge, Matrixtubes, Shedding und nachfolgende Zellen .....	31
3.3.4.	Kinetik der Migration sequentieller Zellen entlang desselben Pfades .....	32
4.	Diskussion .....	36
4.1.	Strukturelle und molekulare Merkmale des Matrixumbaus .....	36
4.2.	Bedeutung des Shedding und Verlust kompletter Zellfragmente .....	37
4.3.	Bedeutung des Matrixumbaus für das Invasionsmuster .....	39

5.	Ausblick .....	40
6.	Literaturangaben .....	41
	Zusammenfassung	
	Danksagungen	
	Lebenslauf	

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung    Bedeutung

AK	Antikörper
BSA	Bovine Serum Albumine (engl.) = Rinder Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
Cy5	Carbocyaninfarbstoff Nr. 5
DNA	Desoxyribo Nucleic Acid (engl.) = Desoxyribonukleinsäure
DEPH	Phospholipid Lissamine Rhodamine B
EDTA	Ethylen Diamine Tetra Acetat
Fab	Fragment of antigen binding (engl.) = antigenbindendes Antikörperfragment
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanning (engl.) = Fluoreszenzaktivierte Durchflußzytometrie
FITC	Fluorescein Iso-Thio-Cyanat
FCS	Fetal Calf Serum (engl.) = fetales Kälberserum
FACs	Fluoresence activated cell sorter
FSC	Forward Scatter (engl.) = Vorwärtsstreulicht
MV3	Melanomzelllinie MV3
HT1080	Fibrosarkomzelllinie HT 1080
Hu	human
ICAM	(CD 54) Intercellular Adhesion Molecule
IgG	Immunglobulin G
LRSC	Lissamine Rhodamin B Sulfonyl Chloride
MEM	Minimal essential medium
MHC	Major Histocompatibility Complex (engl.) = Haupthistokompatibilitätskomplex

PE	Phyco-Erythrin
PBS	Phosphate Buffered Saline (engl.) = phosphatgepufferte Salzlösung ohne $\text{Ca}^{++}$ , $\text{Mg}^{++}$
PMA	Phorbol Myristat Acetat
PS	Penicillin / Streptomycin
RPMI	Medium incl. Glutamin
RT	Raumtemperatur
SSC	Side Scatter (engl.) = Seitwärtsstreulicht

## **Einleitung**

### **1. Zelluläre und molekulare Mechanismen von Tumorinvasion und Metastasierung**

Die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen sind komplexe Prozesse, die aus einer Zellentdifferenzierung, Kontaktverlust und Loslösung von Nachbarzellen, Penetration der Basalmembran und Einwanderung in Extrazellulargewebe resultieren. Nach dem Eindringen von Tumorzellen in Lymph- und/oder Blutgefäße erfolgt über hämatogene und lymphogene Verteilung eine metastatische Aussaat in den Körper, Absiedelung in anderen Organen und erneute ortständige Zellproliferation (Hanahan et al., 2001). Voraussetzungen hierfür sind neben einer adäquaten Angiogenese der Tumorzellen die Fähigkeit zur aktiven Bewegung (Friedl et al., 2000). Die Migration durch Bindegewebe erfordert eine komplexe Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung (Horwitz et al., 1996). Das Verstehen dieses Migrationsverhaltens ist daher eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche therapeutische Unterbindung dieses Prozesses und letztlich für das Verständnis der Metastasierung. Die Metastasierung von Tumorzellen aus einem Primärtumor stellt einen entscheidenden Schritt zur Prognoseverschlechterung des Patienten dar.

#### **1.1. Mechanismen der Tumorzellmigration**

Die spontane Tumorzellmigration setzt verschiedene Eigenschaften der Zellen voraus: Stoffwechsel zur Energiebereitstellung, strukturierte Aktivität des Zytoskelettes, daraus resultierende Polarität der Zellen, Interaktion der Zelle mit extrazellulären Strukturen unter Einbeziehung von Adhäsionsmolekülen, die Funktion von Proteasen sowie die Exo- und Endozytose von Zellmembran und Rezeptoren (Regen et al., 1992). Zu wichtigen an der Migration beteiligten zellulären Faktoren gehören



Adhäsionsrezeptoren wie  $\beta$ 1-Integrine und extrazellulär destruierende Enzyme, insbesondere Metalloproteinasen (Friedl et al., 1998). Hierdurch wird eine koordinierte Abfolge mit Zellpolarisierung, dem Aufbau einer temporären Zell-Matrix-Verbindung am vorderen Zellpol, einer Loslösung am hinteren Pol und aktiver Verkürzung des Zellkörpers mit daraus resultierender gerichteter Zellbewegung ermöglicht. Die Dissemination von Tumorzellen durch die extrazelluläre Matrix ist streng an die Motilität der Tumorzellen gekoppelt. Der entscheidende geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Zellmigration ist die Loslösung des Hinterendes der Zellen von der extrazellulären Matrix, das erst die Vorwärtsbewegung des Zellkörpers erlaubt (Regen et al., 1992, Palecek et al., 1997).

## **1.2. Tumorzellinvasion und Matrix-Neuorganisation**

Für die Invasion von Tumorzellen ist die Überwindung von Matrix-Barrieren ein Umbau durch Trennung sowie Neuorganisation von Kollagenstrukturen in der extrazellulären Matrix mittels Proteolyse notwendig (Friedl et al., 2003). Dazu sind zelluläre Proteinasen maßgeblich für den Abbau von extrazellulärer Matrix verantwortlich. Nachgewiesen werden können diese Proteine ebenso wie die Matrixdefekte am Hinterende der Zellen durch Konfokalmikroskopie (Wolf et al., 2003). Endozytose bringt am hinteren Pol Zellmaterial ins Zellinnere und über Transportmechanismen an den vorderen Pol. Adäsionsmoleküle finden sich gehäuft am hinteren, aber auch am vorderen Pol. Dabei können verschiedene Zellbestandteile wie Integrine und CD44 in charakteristischer Weise in der umstrukturierten Matrix gefunden werden (Friedl et al., 1998). Strukturdefekte in der umstrukturierten Matrix könnten weiterhin Bedeutung wie erleichterte Migration für nachfolgende Zellen haben.

### **1.3. Methodik der Analyse des Umbaus der extrazellulären Matrix**

Untersuchungen des Umbaus von extrazellulärer Matrix durch migrierende unfixierte Tumorzellen können über Lichtmikroskopie, Konfokalmikroskopie sowie Elektronenmikroskopie visualisiert werden. Um Zelldynamiken in dreidimensionalen Geweben zu rekonstruieren, werden seit Anfang der 70er Jahre 3D-Kollagenmatrices eingesetzt, die in hohem Maße strukturelle Komplexität wie auch in vivo-ähnliches Zellverhalten ermöglichen (Friedl et al., 2000).

Die Matrixdefekte und die deponierten Oberflächenmoleküle wurden initial an einem dreidimensionalen Kollagen-Modell durch Einbetten von Tumorzellen in eine 3D-Kollagenmatrix in vitro rekonstruiert (Friedl et al., 1997, 1998). Um die Dynamik der Zellen und die molekularen Vorgänge bei konstanten Untersuchungsbedingungen (37°C und definiertes Nährmedium) zu untersuchen, kann die Morphologie der Matrixdefekte durch Videomikroskopie mittels Reflexionskontrast dokumentiert werden (Friedl et al., 1997; Maaser et al., 1999).

### **1.4. Ziel der Studie**

Der strukturierte Umbau der extrazellulären Matrix durch hochmaligne, metastasierende Tumorzellen könnte von Bedeutung für die Migration benachbarter Tumorzellen sein. Die Rolle der Migration von Melanomzellen für

1. die physikalischen Dimensionen wie Länge und Breite der Matrixdefekte,
2. die bei der Loslösung freigesetzten und deponierten Oberflächenrezeptoren und
3. die Effekte umstrukturierter Matrix auf nachfolgende migrierende Zellen

sind bisher nicht bekannt.

Hierzu sollte ein 3D-Kollagen-Modell unter Verwendung von Videomikroskopie, computerunterstütztem Zelltracking und der Konfokalmikroskopie eingesetzt werden (Friedl et al., 1998c). Der Nachweis von deponierten Zellfragmenten, Zellbestandteilen

und Zellspuren während der Migration der Zelle sollte dargestellt und molekular näher charakterisiert werden (Friedl et al., 2000). Besonderes Gewicht wurde auf die Expression und Deposition von verschiedenen, an der Migration oder Metastasierung beteiligte Rezeptoren gelegt.

Weiterhin sollte geklärt werden, welche Auswirkungen die neu entstandenen Matrixdefekte auf

1. die Anzahl nachfolgender Nachbarzellen,
2. deren Richtung und
3. die Migrationsgeschwindigkeit haben.

Zukünftig könnten sich Rückschlüsse auf die Bedeutung des Matrixumbaus für Zellmorphologie, Invasionstyp sowie die in vivo Interaktionen mit Fibroblasten und einsprossenden Gefäßen ergeben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material und Bezugsquellen

Reagenzien - Antikörper und Farbstoffe:

Unselektives fluoreszierendes Phospholipid (DEPH) (Molekular Probes),

Zytoplasmafarbstoff Calcein AM (Molekular Probes),

anti-CD18 (TS1/18) (Dianova)

Phalloidin-konjugiertes F-actin, Maus-anti-Mensch  $\beta$ 1-Integrin (4B4, Coulter),

Maus-anti-MHC 1 AK, FITC-konjugiert (Dianova),

Ziege-anti-uPA und -uPA-R AK (Prof. M. Kramer, Inst. Immunology, Univ. Heidelberg),

Hase-anti-Mensch-MMP-2 AK (Chemicon),

Hase-anti-Mensch-MT-1 AK (Chemicon),

SYTO 16 konjugiert (Molekular Probes),

Anti-MUC18 AK (J. Johnson, Inst. of Immunology, Univ. München): M18 BA4, M18 AD1B4, M18 AD 5D7, GP 89-3, GP 89-11, GP 89-14,

Maus-anti-Mensch-Laminin AK (Clone II, A-Chain, mouse ascites, Biomol)

Maus-anti-Mensch-Fibronectin AK (mouse ascites, Sigma),

Hase-anti-Mensch-Fibronectin AK, polyclonal (Biomol),

Anti-CD44 IgG1 (Hermes 3) (Dr. S. Jalkanen Turky, Finnland),

Anti-Maus Vitronectin AK (PharMingen),

Hase-anti-Mensch-Vitronectin AK (polyclonal, rabbit, Biomol)

Maus-anti-Mensch-Tenascin AK (mouse ascites, clone TN2, IgG1, Biomol),

Maus-anti-MMP-9 AK (Chemicon),

Maus-anti-I-CAM AK (GP 98-3),

Maus-anti-CD63 AK (IgG1, mouse, 149-2-A2 Cl 17),

Ziege-anti-Mensch-Angiogenin AK (IgG, total goat, R&D),

Ziege-anti-Mensch-VEGF AK (polyclonal, specific goat, R&D),  
 Maus-anti-Mensch N-CAM und N-Cadherin AK.  
 FITC-konjugiertes Phalloidin (Sigma)  
 Sekundäre Antikörper FITC-konjugiertes Ziege-anti-Maus Fab-Fragment (Jackson  
 Lab./Dianova)  
 Lissamin-Rhodamin-B (LRSC) und Anti-Hase-Cy5,  
 Trypsin (Gibco),  
 Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Minimal essential medium (MEM, Life-Technologies, Karlsruhe, Deutschland)  
 Bicarbonat (BIC, Life-Technologies, Karlsruhe, Deutschland)  
 Phorbolmyristateacetat (PMA, Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Phosphate buffered saline (PBS, Life-Technologies, Karlsruhe, Deutschland)  
 Maus-anti-Mensch 3q61 Antikörper  
 Vitrogen (Cohesion, Palo Alto, USA)  
 Anti-β1 Integrin AK (K20, Immunotech/Beckmann-Coulter, Krefeld, Deutschland)  
 BBI®GasPak Pouch™ Anaerobic Systems (Becton Dickinson Microbiology Systems)

### **2.2.1. Geräte und Software**

Durchflußzytometer FACScan	Fa. Becton Dickinson
WinMDI-Software vs 2.3.	Analyse von FACS Daten
CellQuest Software	FACS Steuerung
Konfokales Laserscanmikroskop TCS 4D	Fa. Leica, Bensheim
Lichtmikroskope	Fa. Zeiss
Word Software	Textverarbeitung
Excel Software	Tabellenkalkulation
PowerPoint Software	Präsentation
Photoshop Software	Bildbearbeitung

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Zellen und Zellkulturen**

Die Untersuchungen wurden an der hoch aggressiven, metastasierenden Melanom-Zelllinie MV3 (Van Muijen et al., 1991), der Melanomzelllinie Mel JuSo (freundlicherweise von Prof. Dr. J. Johnson, Immunologisches Institut der Ludwig-Maximilian-Universität München zur Verfügung gestellt) und der Fibrosarkomzelllinie HT1080 durchgeführt. Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640 mit 50 U/ml Penicillin und 50  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin und 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) bei 37°C in 5% CO<sub>2</sub> humidifizierter Atmosphäre kultiviert.

### **2.2.2. Zellkultivierung in 3-D Kollagenmatrices**

Die Herstellung von 3D Kollagenmatrices erfolgte nach (Friedl et al, 1997a). Die Zellen wurden mit 2 mMol EDTA in PBS ca. 5 min bei 37°C inkubiert, von der Kulturschale abgelöst und mit Medium gewaschen. Zur Gelherstellung (Gesamtvolumen 675  $\mu\text{l}$ ) wurden 25  $\mu\text{l}$  Bicarbonat, 50  $\mu\text{l}$  Minimal Essential Medium, 375  $\mu\text{l}$  Kollagen und 10000 Zellen in 225  $\mu\text{l}$  Medium (RPMI 1640 + L-Glutamin 500 ml, Penicillin/Streptomycin (P/S) 5 ml, FCS 50 ml) suspendiert.

Die Herstellung einer Gelkammer zur Videomikroskopie erfolgte nach (Friedl et al., 1993): Die Kollagen-Zell-Suspension wurde in die Gelkammer eingebracht und im Inkubator bei 37°C auspolymerisiert. Für die Konfokalmikroskopie wurde die Kollagen-Zell-Suspension zu je 50  $\mu\text{l}$  auf Deckgläser (Stärke 100  $\mu\text{m}$ ) aufgebracht („Tropfengel“) und für ca. 40 Minuten bei 37°C auspolymerisiert. Anschließend wurden die Tropfengele mit Medium überschichtet und bei 37°C und in 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre für 18 - 24 Stunden inkubiert.

Zwei grundsätzlich verschiedene Ansätze wurden gewählt: Zum einen wurden

vereinzelte Melanomzellen in Kollagengewebe auf ihr Migrationsverhalten und deren Matrixumbau untersucht. Zum anderen wurden multizelluläre Sphäroide aus 20-50 zusammenhängenden Zellen eingesetzt.

### **2.2.3. Zeitraffervideomikroskopie und Zelltracking**

Nach der Kollagenpolymerisierung wurden die Zellen thermostategesteuert bei 37°C über 24 Stunden unter dem Lichtmikroskop mit Zeitraffer-Videomikroskopie gefilmt. Die Bewegung einzelner Zellen wurde anhand der Videofilme mittels computerassistiertem Zell-Tracking in Raum und Zeit rekonstruiert. Vor Beginn der Filmauswertung wurden pro Gesichtsfeld in der Regel 40 Zellen zufällig ausgewählt und markiert. Am Bildschirm wurde die Bewegung jeder einzelnen Zelle mit dem Mauszeiger verfolgt. Das Computerprogramm erlaubte die Registrierung der X-Y-Position des Mauszeigers zu festgelegten Zeitpunkten. Dabei entsprachen die Intervalle der Registrierung 15 Minuten Echtzeit. Anhand der Koordinaten wurden Geschwindigkeit, Wegstrecken, Pfadstruktur und Bewegungsrichtung rekonstruiert. Die statistischen Daten wurden mit einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) ermittelt.

### **2.2.4. Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie**

#### **2.2.4.1. Markierung mit monoklonalen Antikörpern**

Die Untersuchung der exprimierten Oberflächendeterminanten, Zytoplasma und Zellmembranen in tumorzellhaltigen Matrixkulturen erfolgte mit vorwiegend monoklonalen Antikörpern. Neben unfixierten Zellen wurden Zellen nach unterschiedlicher Fixierung mit PFA, Methanol oder Aceton für 2 Stunden in einer Konzentration von 10 µg/ml in 20-50 µl Lösung bei 4°C inkubiert und

anschließend dreimal gewaschen (1-2 ml PBS, 5 min). Im nächsten Schritt wurden die Zellsuspensionen unter Lichtausschluß für 1 Stunde mit 20-50  $\mu$ l sekundären konjugierten Antikörpern wie FITC, Cy5 oder LRSC in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml erneut inkubiert. Bei primär fluoreszierenden Reagenzien wie LRB, Calcein, FITC-konjugierten-anti-MHC Klasse I Antikörper, SYTO 16 oder FITC-Phalloidin entfiel der zweite Färbeschritt.

#### **2.2.4.2. Konfokalmikroskopie**

Die konfokale Lasermikroskopie erfolgte an einem inversen Laser Scanning Mikroskop (Leica TCS 4D) unter Verwendung eines 63-fach vergrößernden Ölimmersionsoberktives (NA 1,4). Um die Wechselwirkungen des Zellkörpers mit der umgebenden Matrix darzustellen, wurde das Reflexionssignal von Matrix und Zellkörper aufgenommen. Zur Anwendung wurde Licht der Wellenlänge von 488 nm und 568 nm in die Probe eingestrahlt und das reflektierte Licht derselben Wellenlängen detektiert (Friedl et al., 2001). Das emittierte Signal ließ sich durch Reflexions- und Band-Pass-Filter separieren und detektieren. Die unspezifische Fluoreszenz wurde mit einer Isotypenkontrolle abgeglichen. Eine gleichzeitige Detektion der Fluoreszenz und der Reflexion ermöglichte eine pixelgenaue, ortstgetreue Darstellung von Matrixveränderungen und eine Lokalisation fluoreszierender Zellbestandteile.

#### **2.2.4.3. Rasterelektronenmikroskopie**

Zur ergänzenden Darstellung der Zelle-Matrix-Interaktionen wurden MV3-Zellen in 3-D-Kollagengelen bei hoher Auflösung und guter dreidimensionaler Darstellung rasterelektronen-mikroskopisch untersucht. Dazu wurden jeweils 100  $\mu$ l Gele mit einem Anteil von ca. 50.000 Zellen in einer aufsteigenden Ethanolreihe bei Raumtemperatur entwässert und anschließend in 2,5% Glutaraldehydlösung (5 ml 25%



Glutaraldehyd, 12,5 ml 200mM Cacodylatpuffer, 2,5 ml 1M KCl, 1,25 ml 0,1M MgCl<sub>2</sub> und 28,75 ml H<sub>2</sub>O) fixiert. Nach Inkubation der Proben bei 4°C über Nacht wurden die Bilder an einem Rasterelektronenmikroskop innerhalb von 24 Stunden aufgenommen.

#### **2.2.5. FACS-Analyse und Durchflußzytometrie**

Die Spezifität der Markierung mit Antikörpern zur Erfassung der Expression von Oberflächendeterminanten wurde an suspendierten Zellen mittels Durchflußzytometrie bestimmt. MV3-Zellen wurden mit primärem Antikörper bzw. SYTO 16 (10 µg/ml, 4°C, 1 Stunde) inkubiert und anschließend zentrifugiert. Danach wurde in PBS gewaschen und erneut mit sekundärem Antikörper (FITC, 10 µg/ml, 1 Stunde) inkubiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mittels Durchflußzytometrie (Tabelle 1), die Analyse mit dem Programm WinMDI 2.3.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Zelluläre Mechanismen von Migration und Matrixumbau durch MV3-Melanomzellen**

##### **3.1.1. Allgemeine Charakteristika migrierender Einzelzellen: Morphologie, Polarisierung und Migrationsrichtung**

Die Abbildung 1 a und 1 c zeigen die Befunde in Videozeitraffer-Aufnahme.

Unmittelbar nach Einbettung der Melanomzellen und Polymerisierung des Kollagengewebes lagen die Einzelzellen kugelförmig und unbeweglich in der Matrix vor (Abb. 1 a). Nach wenigen Minuten kam es zu einer unilateralen Polarisierung und darauf zu einer spontanen Migration der Tumorzellen (Abb 1 c). Am vorderen, in Migrationsrichtung zeigenden, häufig schmaleren Pol der Zelle entwickelten sich ein oder multiple Pseudopodien, die Kontakt mit Kollagen und umgebenden Strukturen aufnahmen (Abb. 1 b und d). Der Zellkern befand sich in typischerweise bei migrierenden Zellen im mittleren bis hinteren Drittel der Zelle (im Videobild der Abb. 1 c nicht dargestellt).

Aufgrund der Morphologie wurde auf die zellulären Mechanismen der Migration geschlossen: Am vorderen Zellpol fanden sich in der Zellmembran unter dem Konfokalmikroskop vorwiegend Adhäsionsmoleküle wie  $\beta$ 1-Integrine. Eine weitere Anreicherung von  $\beta$ 1-Integrin war am Hinterende migrierender Zellen lokalisiert (Abb. 1 d, Pfeilspitze). Im extrazellulären Kollagengewebe wurden im Rahmen von Sheddingvorgängen  $\beta$ 1-Integrine nachgewiesen (Abb. 1 d, Pfeil und siehe Abschnitt 3.1.3.).

Durch Zugabe des anti- $\beta$ 1 Integrin Antikörper 4B4 ( $10\mu\text{l/ml}$ ) wurde die Migration von MV3-Zellen gehemmt, obgleich nicht vollständig aufgehoben (Mayer et al., 2004). Sowohl unmittelbar nach Beginn der Inkubation als auch nach 48stündiger

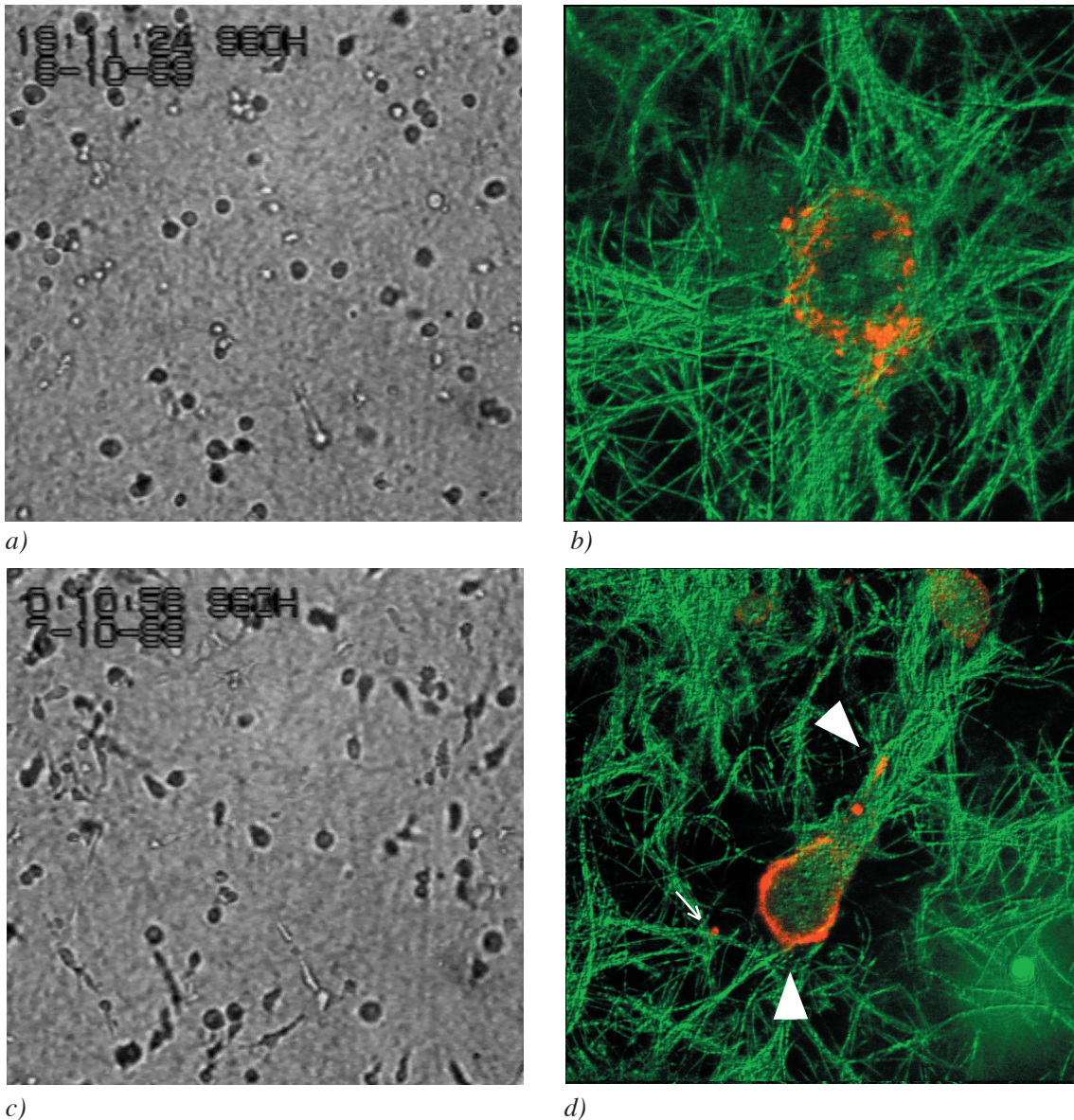


Abb. 1: Polarisierung und Migration von MV3-Melanomzellen.

- a) MV3-Tumorzellen in einer 3D-Kollagenmatrix unmittelbar nach Einbettung und Auspolymerisierung des Kollagens. Alle Zellen erscheinen initial kugelförmig und stationär.
- b) Solitäre MV3-Zelle im Konfokalmikroskop unmittelbar nach Einbettung in ein Kollagengewebe. Dargestellt ist die Fluoreszenz von  $\beta 1$ -Integrin (rot), sowie Reflexion der Kollagenfasern (grün). Beginnender nicht polarisierter Zug mit Ausrichtung von Kollagenfasern auf den Zellkörpern ist erkennbar.
- c) Nach 5 Stunden sind nahezu alle Zellen spontan polarisiert, keulenförmig elongiert und in Migration begriffen (vgl. Abb. 10).
- d) Solitäre MV3-Zelle im Konfokalmikroskop. Dargestellt ist die Fluoreszenz von  $\beta 1$ -Integrin (4B4) zum Zeitpunkt nach 48 Stunden nach der Einbettung in das Gel. Die Zelle ist polarisiert, der Zellkern in das hintere Zelldrittel verlagert und die Matrix in unmittelbarer Umgebung reorganisiert. Das Shedding von  $\beta 1$ -Integrin im Bereich des hinteren Zellpoles ist durch den Pfeil markiert.

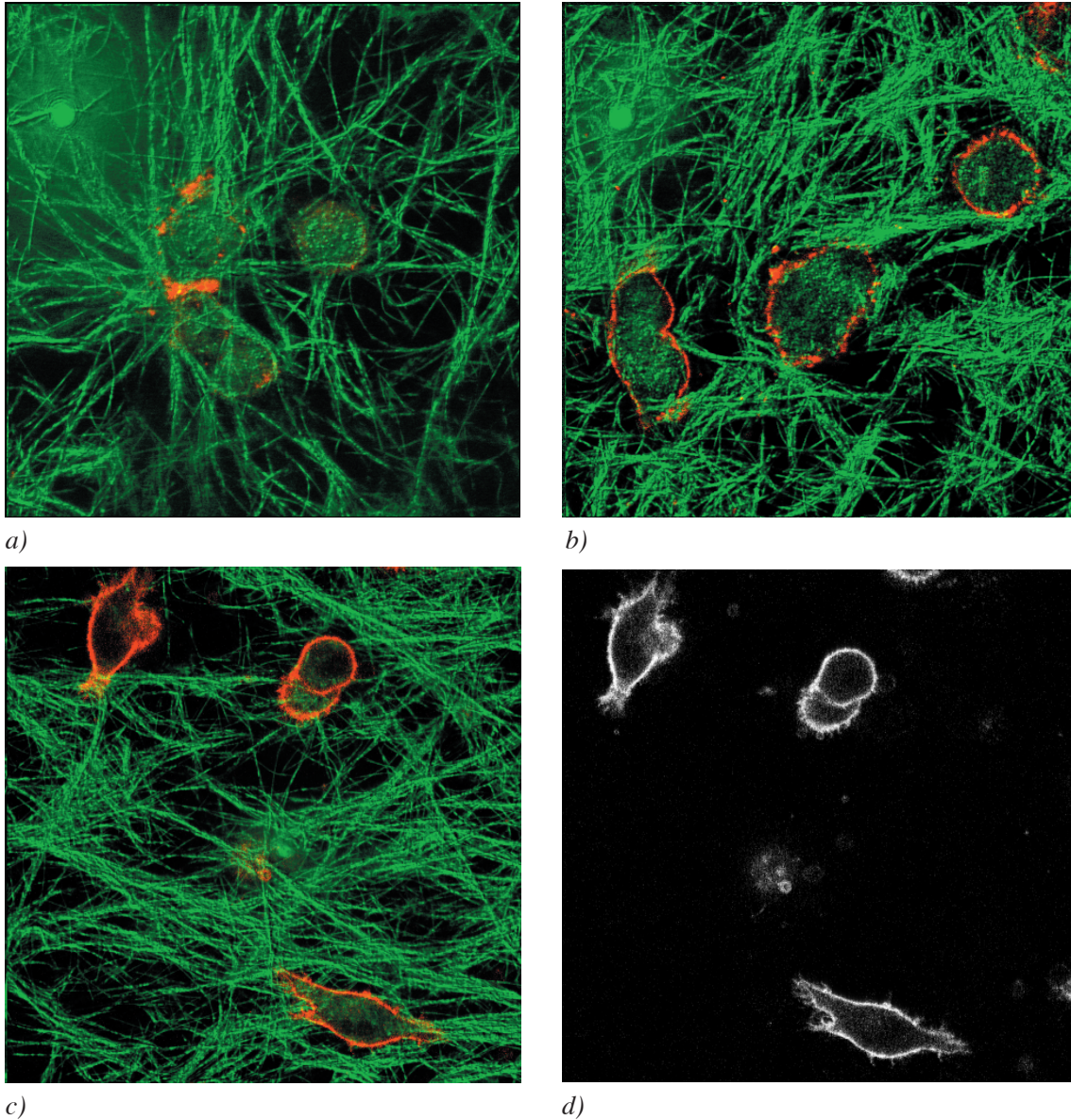


Abb. 2: Konfokalmikroskopische Darstellung von MV3- (a und b) und JuSo-Melanomzellen (c und d) in Kollagengewebe.

a) Migrationshemmung von MV3-Zellen durch mAK 4B4 ( $10\mu\text{l/ml}$ ) bei Beginn der Inkubation. Die Zellen liegen noch in Kugelform vor.

b) MV3-Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit mit 4B4-Antikörper. Die Zellen persistieren in rundlicher Form, bilden vereinzelt kleine Pseudopodien aus und bleiben gering mobil.

c) Mel-JuSo-Melanomzellen nach Inkubation in Kollagengewebe und 24-stündiger Beobachtungszeit. Dargestellt ist das Reflexionsbild mit der Fluoreszenz von CD44.

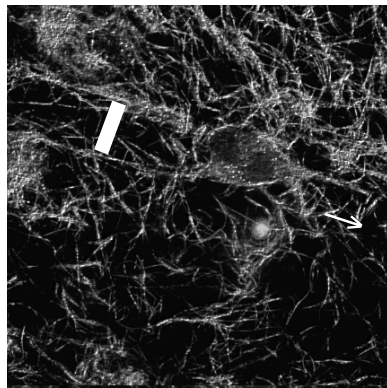
Bei d) wird im gleichen Bildausschnitt nur die Fluoreszenz von CD44 detektiert.

Inkubationszeit wurden rundliche, gering polarisierte, langsam migrierende Zellen beobachtet. Die gleiche Beobachtung wurde bereits früher beschrieben (Maaser et al., 1999). Fluoreszierende Zellbestandteile außerhalb der Zellen konnten nach  $\beta$ 1-Blockade in der Matrix nicht nachgewiesen werden (Abb. 2 a und b).

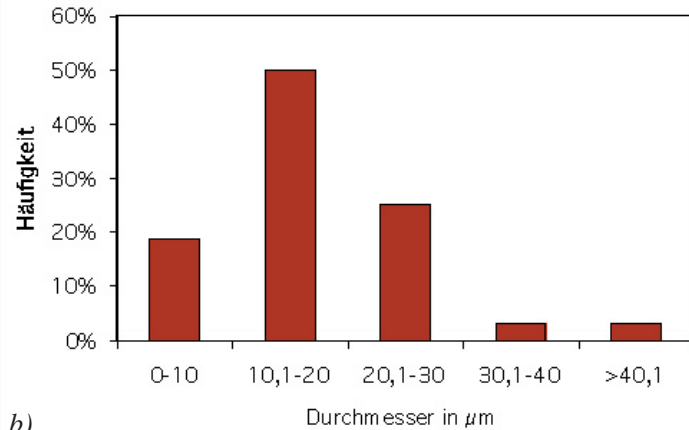
Zur Kontrolle wurden nicht spontan migrierende Zellen der Mel-JuSo-Melanomzelllinie eingesetzt. Diese zeigten nach 24 Stunden keine Polarisation, keine spontane Migration und blieben ortsständig. Nach 48 Stunden weitgehender Immobilität wurden die Mel-JuSo-Melanomzellen durch den Proteinkinase C-Aktivator PMA stimuliert und zeigten weiterhin weder eine Ortsänderung der Zellen noch ein Shedding von Zellfragmenten (nicht gezeigt). Lediglich erkennbar war eine partielle Polarisation. Die Formänderung führte jedoch nicht zu Migration ("Running on the spot", Abb. 2 c).

### **3.1.2. Migrationsassoziierte Umstrukturierung der Kollagenmatrix durch Migration**

Melanomzellen migrierten entlang „Leitstrukturen“, d.h. prominenten Fasern der extrazellulären Matrix unter Anhaftung des vorderen Zellpols. Gleichzeitig kam es zur Loslösung am hinteren Pol, zur Generierung von büschelartigen Fasersträngen und deren topographischer Neuordnung, wie zuvor beschrieben (Friedl et al., 1997). Die dabei entstehenden röhrenförmigen Defekte hinter migrierenden MV3-Zellen wiesen bei konfokalmikroskopischer 3-D Rekonstruktion (Abb. 3) eine mittlere Weite von 10-20  $\mu$ m im Abstand von 10  $\mu$ m hinter dem hinteren Zellpol gemessen auf. Diese Matrixdefekte enthielten über weite Strecken (> 50  $\mu$ m) freigesetzte perlschnurartig an Kollagenfasern anhaftende Zellbestandteile (siehe 3.1.3.). Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung bestätigte die Ausbildung von Kollagensträngen am hinteren Zellpol und der Neustrukturierung der extrazellulären Matrix als Folge der Migration (Abb. 4).



a)



b)

Abb. 3: Größenverteilung der Matrixdefekte hinter migrierenden MV3 Melanomzellen.

a) Die durchschnittliche Weite an 61 untersuchten Matrixdefekten wurde standardisiert

10  $\mu\text{m}$  hinter dem hinteren Zellpol (weißer Balken) gemessen. Die Messung erfolgte im zentralen Schnitt eines Z-Stapels der konfokalmikroskopischen Aufnahmen durch die gesamte Zelle.

b) Die Hälfte der gemessenen Matrixdefekte zeigte eine Weite von 10 - 20  $\mu\text{m}$ . Mehrfach erweiterte sich der Pfad fächerförmig oder kollabierte nach weiteren 10-50  $\mu\text{m}$ .

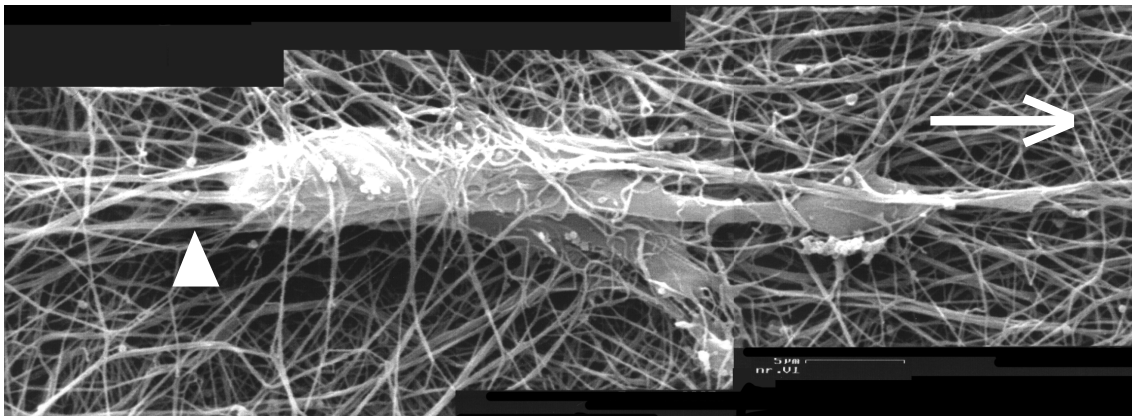


Abb. 4: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung einer MV3-Melanomzelle (Das Bild wurde aus drei Einzelbildern zusammengesetzt).

Solitäre MV3-Zelle bei der Migration nach rechts (weißer Pfeil). Orientierung und Zugwirkung an den Kollagenfasern am vorderen Zellpol, passives Vorbeistreichen an der Zellseite, Hinterlassen von strangförmigen Kollagenbündeln (Dreieck) mit angedeutetem zentralen röhrenförmigen Matrixdefekt.

### **3.1.3. Freisetzung von Oberflächendeterminanten (CD44, $\beta$ 1-Integrine)**

Vom hinteren Zellpol in den Matrixdefekt deponierte Zellbestandteile wurden biochemisch und physikalisch untersucht. Nach 24- bzw. 48-stündiger Migration ließen sich im konfokalmikroskopischen Bild eine deutliche Ansammlung von CD44,  $\beta$ 1-Integrinen und nicht selektiv verteiltem Membranfarbstoff finden (Abb. 2). Abgelöste Zellbestandteile wurden überwiegend nahe des hinteren Zellpols in der extrazellulären Matrix gefunden, eventuell als Folge bereits weiter gewanderter Zellen. Dabei fand sich die Fluoreszenz in unmittelbarer Nachbarschaft zu oder direkt lokalisiert an Kollagenfasern, und zwar in Form von kugelförmigen Strukturen oder streifigen Ausziehungen (Abb. 1 d, Abb. 2). Dagegen wurden bei durch 4B4 Antikörper inhibierte Zellen außer der Membranfluoreszenz keine Deposition von Oberflächenbestandteilen nachgewiesen (Abb. 2 b). Diese Befunde legen nahe, daß die Freisetzung von Oberflächendeterminanten sowie der Umbau der Matrix Folgen der aktiven Migration waren. Damit stand ein 3-D Gewebekulturmodell zur Verfügung, das für die folgenden strukturellen und funktionellen Folgen des migrationsassoziierten Matrixumbaus eingesetzt werden konnte.

### **3.1.4. Untersuchung von migrierenden MV3 Melanomzellen am Rasterelektronenmikroskop**

#### **3.1.4.1. Matrixveränderungen**

Am Rasterelektronenmikroskop stellte sich die native zellfreie Matrix als dicht verflochtenes dreidimensionales, in ungeordneten geraden Kollagensträngen verlaufendes fibrilläres Gewebe dar (Abb. 5 a). Dagegen ließ sich eine gerichtete Strangbildung von Kollagenfasern an Kontaktstellen zu migrierenden MV3-Zellen nachweisen.

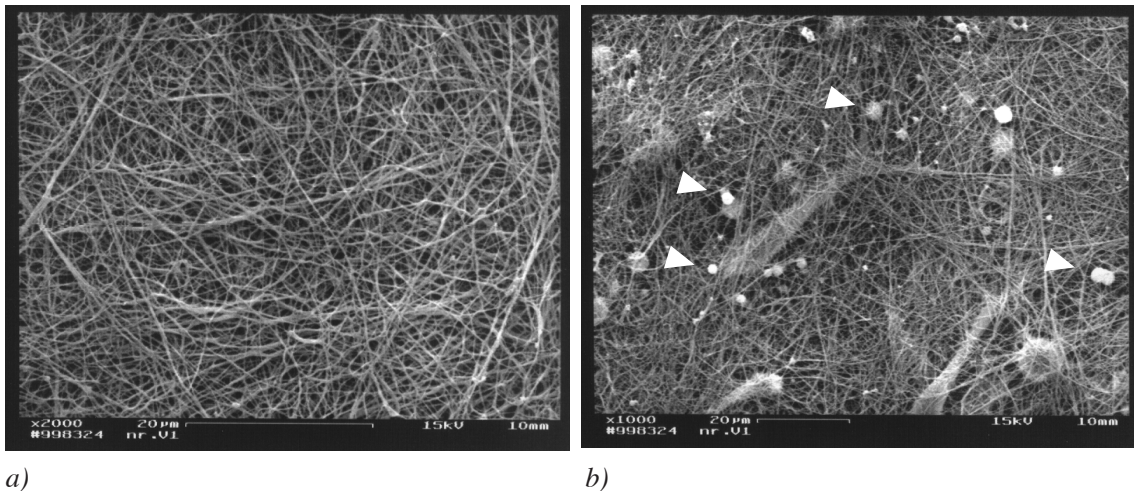


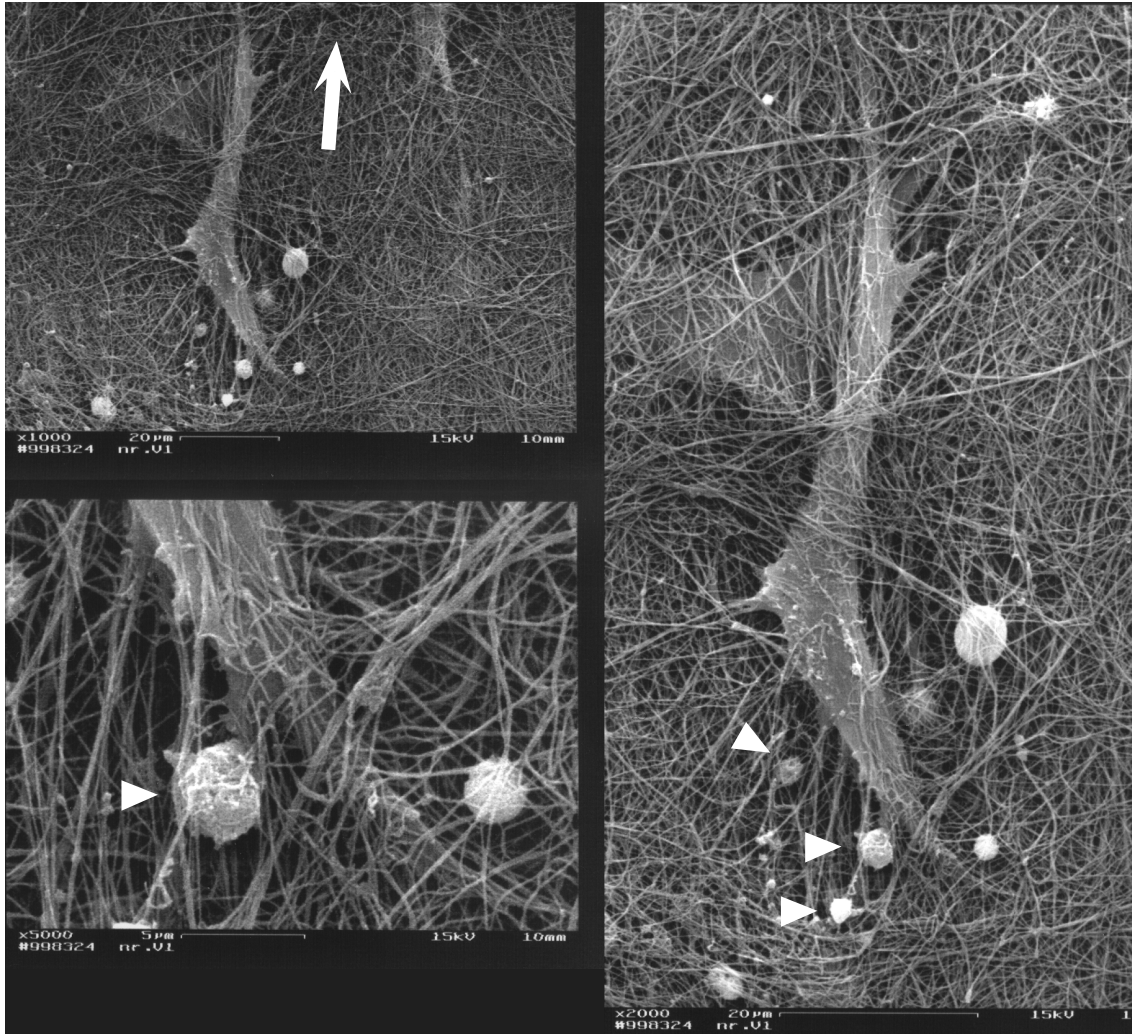
Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Veränderung von Kollagen-  
gewebe unter Einfluß von MV3-Melanomzellen.  
a) Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von zellfreiem Kollagen-  
gewebe zeigte homogen verflochtene Kollagenstränge.  
b) Kollagenewebe mit MV3-Melanomzellen nach 24 Stunden Inkubation.  
In der Kollagenmatrix mit MV3-Melanomzellen fanden sich neben den  
Zellen multiple globuläre Strukturen sowie dicke, zusammenhängende  
Kollagenstränge (Pfeilspitzen), während zellfreie Kollagenewebe keine  
derartigen Veränderungen aufwiesen.

### 3.1.4.2. Deposition von Zellfragmenten

Die Kollagenewebe mit eingebetteten migrierten Zellen wiesen im Gegensatz zur zellfreien Kontrolle unterschiedlich große, kugelförmige Strukturen auf, die vorwiegend am hinteren Zellpol der Zellen auftraten, aber auch bei längerer Migrationszeit im übrigen umstrukturierten Gewebe nachzuweisen waren. In Zusammenschau mit den konfokalmikroskopischen Untersuchungen ist wahrscheinlich, daß es sich dabei um vom Hinterende der MV3-Zelle freigesetzte und an Kollagenfasern deponierte Zellfragmente handelte. Die Zellkörper hatten, wie bereits konfokalmikroskopisch gezeigt, direkten und multiplen Kontakt zu den Fasersträngen, während umschriebene Auflockerung der Kollagenstruktur in Zellnähe vorlag (Abb. 5 e). Eine großräumige Veränderung der Kollagenstruktur war nicht nachweisbar.



c)



d)

e)

Abb. 5: c-e) Deposition rundlicher Zellfragmente vom hinteren Zellpol während der Wanderung.

Rasterelektronenmikroskopische Darstellung einer migrierenden Melanomzelle durch Kollagengewebe in drei verschiedenen Vergrößerungen.

c) Übersicht mit Migrationsrichtung (Pfeil) und

d) Detailaufnahme vom hinteren Zellpol von MV3-Melanomzellen unter dem Rasterelektronenmikroskop.

e) Vorwiegend am hinteren Zellpol fanden sich solide kugelförmige, in die Matrix eingebettete Fragmente, die direkt zwischen den Kollagenfasern angelagert waren (Pfeilspitzen, d und e).

### 3.2. Molekulare Charakterisierung freigesetzter Zellbestandteile: Mapping exprimierter membranständiger Proteine und Rezeptoren

Nachdem klar war, daß migrierende Tumorzellen Zellbestandteile während des Loslösungsprozesses in der Matrix deponierten, sollte konfokalmikroskopisch die Morphologie und Größe dieser Zellfragmente bestimmt werden. Dazu wurden 100 der freigesetzten Zellbestandteile hinsichtlich ihres Durchmessers am digitalisierten Bild und zwar in konfokalmikroskopischen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgemessen (Abb. 6). Tabelle 1 zeigt die Größenverteilung der untersuchten Zellfragmente. Über 70% der Zellfragmente hatten einen Durchmesser bis 2  $\mu\text{m}$ . Nur wenige wiesen Werte über 10  $\mu\text{m}$  auf. Kein Fragment erreichte die Größe einer Melanomzelle. Alle Zellfragmente waren annähernd kugelförmig, nicht polarisiert und wiesen teils multiple Berührungspunkte mit umgebenen Kollagenfasern auf (Abb. 6).

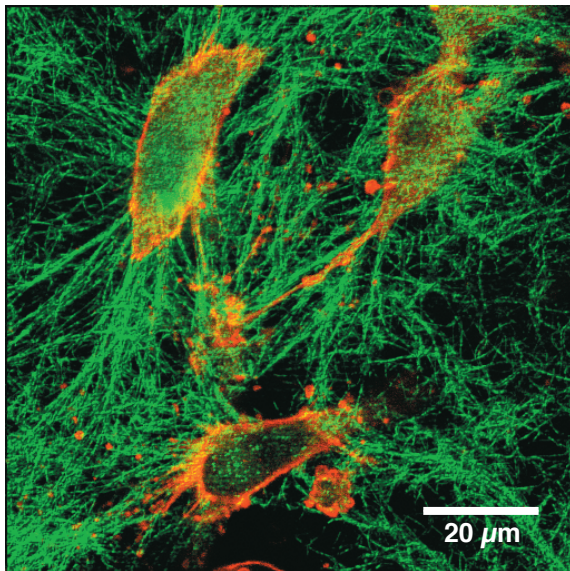
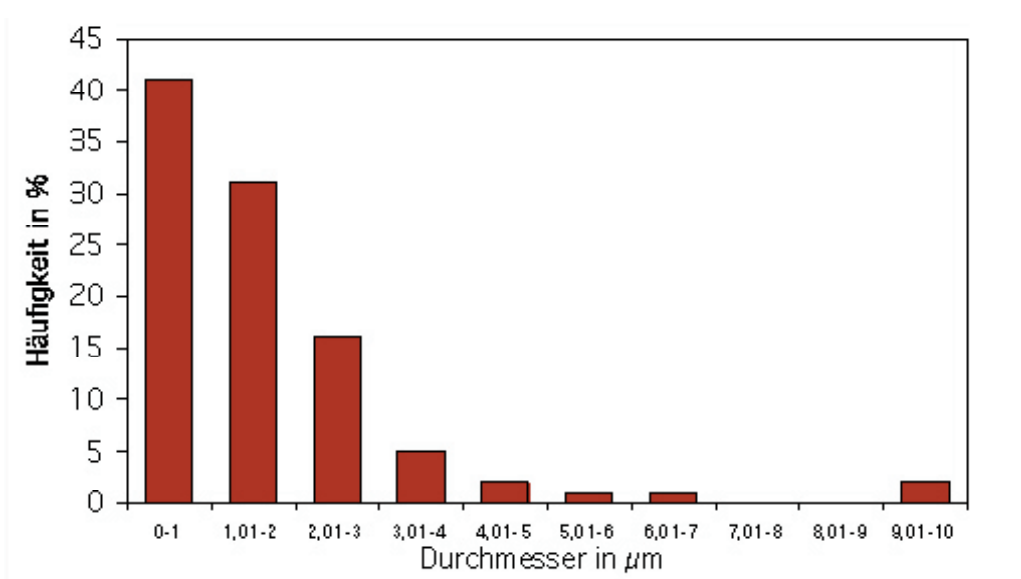


Abb. 6: MV3-Melanomzellen in einer 3D-Kollagenmatrix mit umgebenden Zellfragmenten in einer konfokalmikroskopischen Aufnahme. CD44 (rot) und Reflexion der Kollagenfasern (grün).



Tab. 1: Größenverteilung der von MV3-Zellen freigesetzten Zellbestandteile. Durchmesser der Zellfragmente von 100 migrierenden Melanomzellen im Kollagengewebe. Die Daten stammen aus konfokalen Analysen von Calcein-markierten Zellen und rasterelektronischen Aufnahmen nach Fixierung (zur Methodik vgl. Abb. 7 b).

### 3.2.1. Shedding von Zellrezeptoren

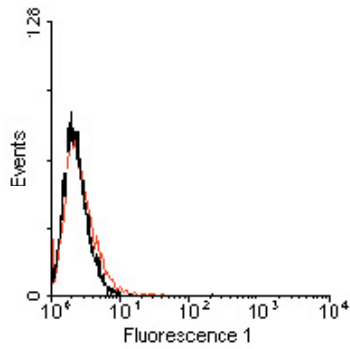
Um weitere auf Zellfragmenten vorhandene Moleküle zu identifizieren, wurde eine Testung der Oberflächenexpression verschiedener Proteine durchgeführt.

#### 3.2.1.1. Expressionsnachweis mittels Durchflußzytometrie-Analyse

Es sollte zunächst durchflußzytometrisch anhand intakter MV3-Zellen gezeigt werden, für welche Moleküle ein für die konfokalmikroskopische in situ Detektion ausreichende Farbeintensität zu erwarten war (Tabelle 2). Positiv bzw. stark positiv nachweisbar waren CD44 (Hermes-1),  $\beta$ 1-Integrin, F-Aktin, CD63, MHC I und Fibronectin. Schwächer detektierbar war unter anderem MMP-9, nicht nachweisbar waren ICAM-1, Vitronectin und N-CAM. Eine Auswahl der entsprechenden Fluoreszenzintensitäten ist in Abb. 8 dargestellt.

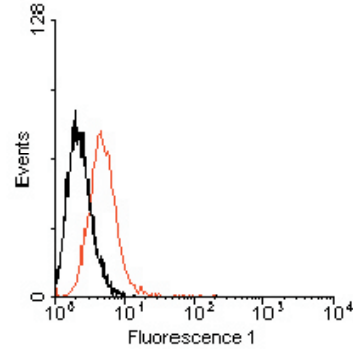
**I-CAM-1**

Mean: 2,64  
Bewertung: 0



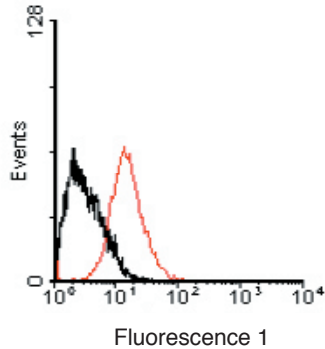
**MMP-9**

Mean: 5,05  
Bewertung: +



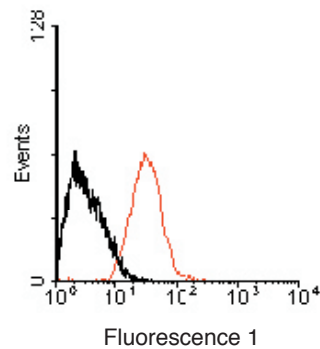
**CD 63**

Mean: 14,87  
Bewertung: ++



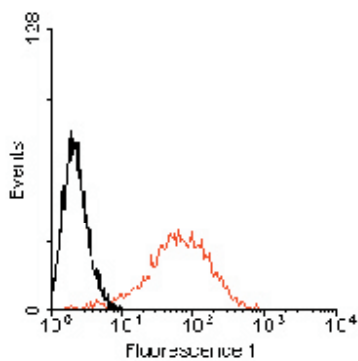
**MHC I**

Mean: 31,39  
Bewertung: ++



**Fibronectin**

Mean: 60,06  
Bewertung: ++



**CD 44**

Mean: 1076  
Bewertung: +++

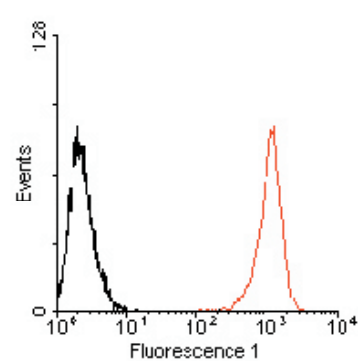


Abb. 8: Klassifikation der Fluoreszenzintensität von Oberflächenmolekülen auf MV3-Zellen.

Die Graphen stellen den Nachweis mit ausgewählten Antikörpern aus Tabelle 2 für die Durchflußzytometrie dar. Wicht die Intensität der Fluoreszenz nicht von der Kontrolle ab, wurde sie als (0) ausgewiesen, bei einer Abweichung bis  $10^1$  als (+), zwischen  $10^1$  und  $10^2$  als (++) und darüber als (+++). Mean bezeichnet die mittlere Fluoreszenzintensität.

Tabelle 2: Nachweis von Oberflächenproteinen und sezernierten Faktoren in MV3-Zellen mit Antikörpern.

Antigen	Konfokalmikroskop			Durchflußzytometrie	
	PFA	Methanol	Aceton	unfixiert	unfixiert
<b>a) positiv nachweisbar</b>					
CD44°	+++	+++	0		+++
β1-Integrin	+++	+++	+++		+++
F-Aktin	+++				
SYTO 16°	+++				+++
CD63°	++			+	++ (PFA ++)
MHC I°	+				++
Fibronectin (monoklonal)°/0		0	0	(+)	++
<b>b) grenzwertig nachweisbar</b>					
MMP-9°	0/0	0	0		+
Tenascin	0	0	0		+
Dako, uPA	+			0	0/+
Angiogenin	+				n.d.
Angiogenin anaerob*	+				n.d.
Syndecan I	(+)	0	0		0
Syndecan II	(+)	0	0		0
Laminin	(+)	0	0		(+)
MMP-2	0/+	0/+	0		0/0
VEGF anaerob*	+				
<b>c) nicht nachweisbar</b>					
Vitronectin	0	0	0		0
ICAM-1°	0				0/0
N-CAM				0	0
Glypican	0	0	0		0
MT1	0	0	0		0
R2, uPA-R	0			0	0
VEGF	0				n.d.
MUC18	0				0
M18 BA 4					0
M18 AD 1B4					+
M18 AD 5D7					+
GP 89-3	0				0
GP 89-11					0
GP 89-14					0

Untersucht wurden die Oberflächenproteine in der Kollagenmatrix mittels Konfokalmikroskopie (links) im Vergleich zum Nachweis mittels Durchflußzytometrie (rechts). Dabei waren die MV3-Zellen bei der Durchflußzytometrie-Methode unfixiert, bei der konfokalmikroskopischen Untersuchung wurden verschiedene Fixierungsprotokolle angewandt.

0 = keine Fluoreszenz nachweisbar, + = geringe Fluoreszenz nachweisbar, ++ = gute Fluoreszenz nachweisbar, +++ = starke Fluoreszenz nachweisbar, ° = in Abb. 8 dargestellt als Durchflußzytometrie-Profil.

\*Beide Wachstumsfaktoren wurden unter anaeroben Bedingungen bestimmt. n.d. = nicht bestimmt.

### **3.2.1.2. Nachweis der Lokalisation von Oberflächenmolekülen mittels Konfokalmikroskopie**

Nach der Durchflußzytometrie-Analyse und der Auswahl geeigneter Oberflächenmoleküle wurden diese unter verschiedenen Fixierungsmethoden und Antikörperkonzentrationen in Kollagenmatrices angewendet. Mittels Konfokalmikroskopie konnten auf migrierenden MV3-Zellen in einem 3D-Kollagengewebe  $\beta$ 1-Integrin, CD44, F-Actin, MMP-2 nachgewiesen werden (Abb. 7 c, d, e, f). Trotz positiver Durchflußzytometrie-Befunde waren Fibronectin und MHC I in fixierten Proben nicht nachweisbar. Deponiertes Material befand sich stets in Kontakt mit reorganisierten Kollagensträngen (Abb. 7 a, Pfeilspitze).

Weiterhin war nachweisbar, daß die Fragmente aus Zytoplasma und umgebender Membran mit darin befindlichen  $\beta$ 1-Integrinen bestanden (Abb. 7 b und Abb. 7 h).

### **3.2.2. Molekulare Charakterisierung der freigesetzten Zellbestandteile während der Migration**

#### **3.2.2.1. Shedding von Proteinen**

Es wurde bereits früher gezeigt, daß durch Loslösung migrierender Fibroblasten verschiedene Oberflächenproteine vom Hinterende der Zellen auf dem Substrat, z.B. Fibronectin, deponiert werden (Schmidt et al., 1993). Zu diesen zählen insbesondere  $\beta$ 1-Integrine. Ebenso wird neben  $\beta$ 1-Integrinen auch CD44 in 3D-Kollagenmatrices von migrierenden Tumorzellen zurückgelassen (Friedl et al., 1997). Bisherige Untersuchungen gehen von einem selektiven Prozeß aus. Danach werden an der Migration beteiligte Rezeptoren gezielt freigesetzt, um den Loslösungsprozeß des Zellhinterendes zu begünstigen. Ablösung von  $\beta$ 1-Integrinen als Folge des Loslösungsprozesses wurde nur unter Migrationsbedingungen gezeigt (Schmidt et al., 1993).

### **3.2.2.2. Shedding von Zellfragmenten, Zytoplasma und Zytoskelett und morphologische Charakterisierung freigesetzter Zellbestandteile**

Während der Migration gaben MV3-Melanomzellen neben  $\beta$ 1-Integrinen weitere Zellbestandteile in die Matrix ab. Vom hinteren Zellpol ausgehend waren membranumschlossene Zytoplasmavesikel bis zu einer Größe von  $10 \mu\text{m}$  Durchmesser (Mittelwert  $1\text{-}2 \mu\text{m}$ ) nachweisbar (Tab. 1). Diese Vesikel enthielten nicht selektiv

1. Zytoplasma, dargestellt mit Calcein AM (Abb. 7 b),
2. in geringem Ausmaß Zytoskelettkomponenten (F-Aktin) (Abb. 7 c),  
umhüllt von
3. intakter Zellmembran (lipophile Lissamin-Rhodamin Membranfärbung) (Abb. 7 a) mit
4. der Membran enthaltenden Oberflächenproteinen (CD44,  $\beta$ 1-Integrine, MMP-2) (Abb. 7 e, f und h).

Bei der Migration werden somit Zellfragmente in der extrazellulären Matrix deponiert, die ortsständig bleiben und Kontakt zu den Kollagenfasern aufweisen.

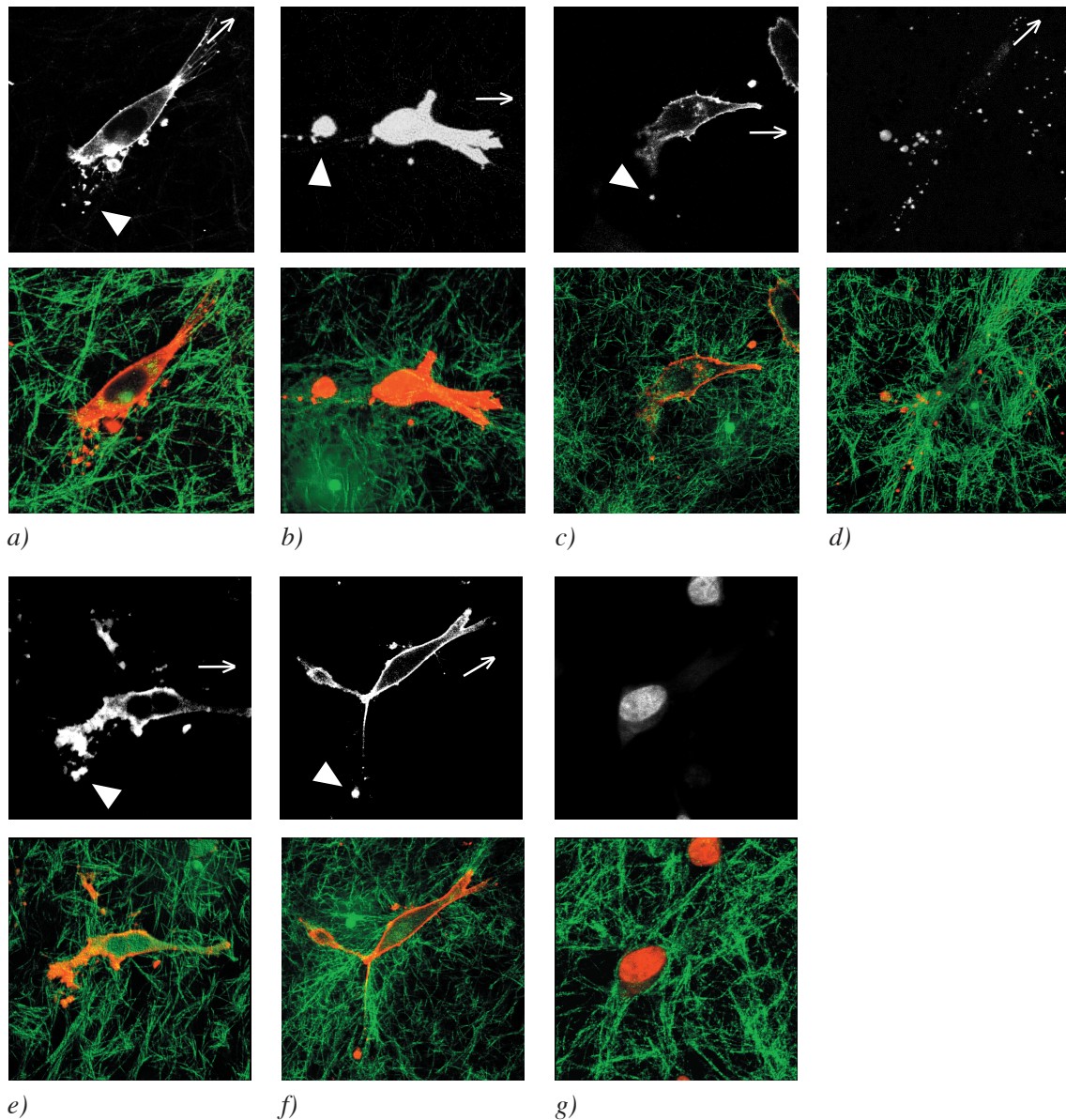
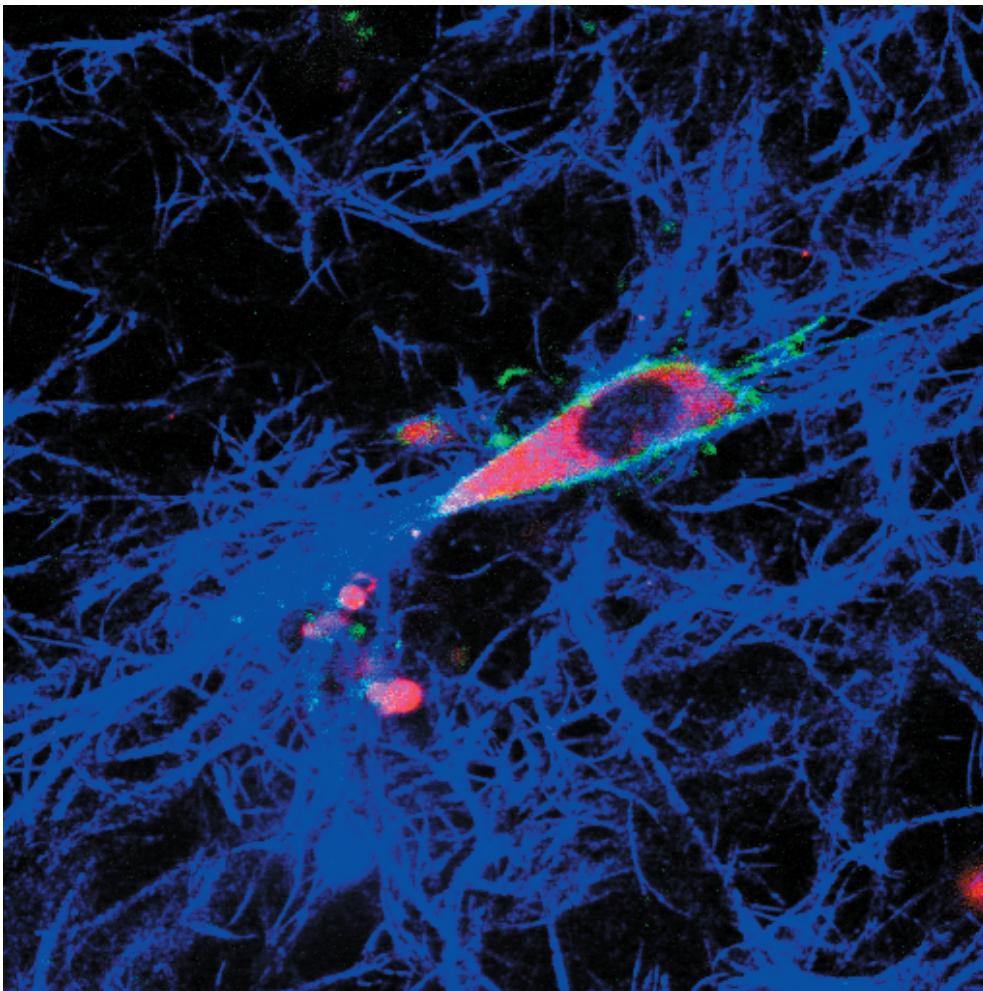
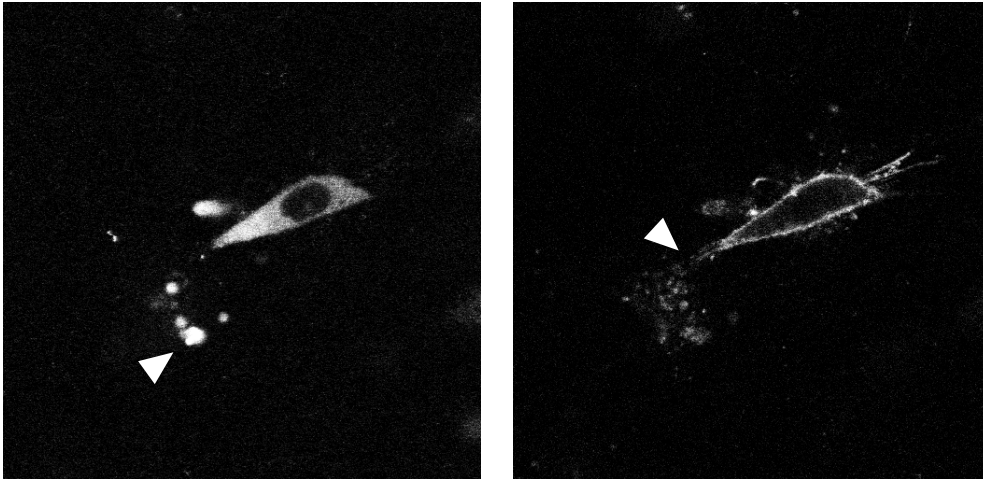


Abb. 7: Migrationsabhängige Freisetzung von Zellfragmenten mit Zytoplasmamembran, Zytoplasma und Zytoskelett, sowie verschiedenen Zelloberflächenproteinen (a-g). Nachweis von Membranfarbstoff DPHA (a), Zytoplasmafarbstoff Calcein AM (b), f-Actin (c), MMP-2 (d),  $\beta$ 1-Integrin (e) und CD44 (f) auf/in migrierenden MV3-Zellen in einem 3D-Kollagengewebe unter Verwendung von Konfokalmikroskopie. Als einzige Ausnahme fand sich kein DNA Farbstoff SYTO 16 (g) zellunabhängig in der extrazellulären Matrix wieder. Deponiertes Material war direkt an reorganisierten Kollagensträngen lokalisiert. Gezeigt sind die Fluoreszenz in der oberen Bildreihe ohne und in der entsprechenden unteren Bildreihe mit Matrixreflexion. Die Migrationsrichtung gibt der Pfeil an.





*h)*

Abb. 7 h: Migrationsabhängige Freisetzung von komplexen Zellfragmenten mit Zytoplasmamembran, Zytoplasma und Zytoskelett, sowie verschiedenen Zelloberflächenproteinen. Nachweis von MMP-2 und Calcein in einer Simultanfärbung auf einer migrierenden MV3-Zelle in einem 3-D-Kollagengewebe (h). Zytoplasmafarbstoff Calcein (rot), MMP-2 (grün) und Reflexion des Kollagengewebes (blau)

### **3.3. Bedeutung des Matrixumbaus für die Migration nachfolgender Zellen**

#### **3.3.1. Invasion und Migration von MV3 Zellen aus soliden multizellulären Sphäroiden**

Um die Auswirkungen des Matrixumbaus und gegebenenfalls freigesetzter Zellfragmente auf die Migration anderer, nachfolgender Melanomzellen zu untersuchen, wurde ein Sphäroidmodell etabliert.

Dazu wurden kleine Konglomerate (Sphäroide) von 30-50 MV3-Zellen in das Kollagengewebe eingebettet und mittels Zeitraffer-Videomikroskopie über 12 Stunden beobachtet (Abb. 9). Anschließend wurden die Pfade migrierender Zellen mittels computerunterstütztem Zelltracking ausgewertet. Bereits in der videomikroskopischen Aufnahme kam es erkennbar zu einem initialen zentrifugalen Auswandern von spindelförmigen Einzelzellen (Abb. 9). In mehreren Zonen folgten weitere Zellen entlang derselben Trasse. Nach spätestens 24 Stunden kam es zu einer Auflösung der Trassen, der eine ungerichtete Einzelzellmigration folgte.

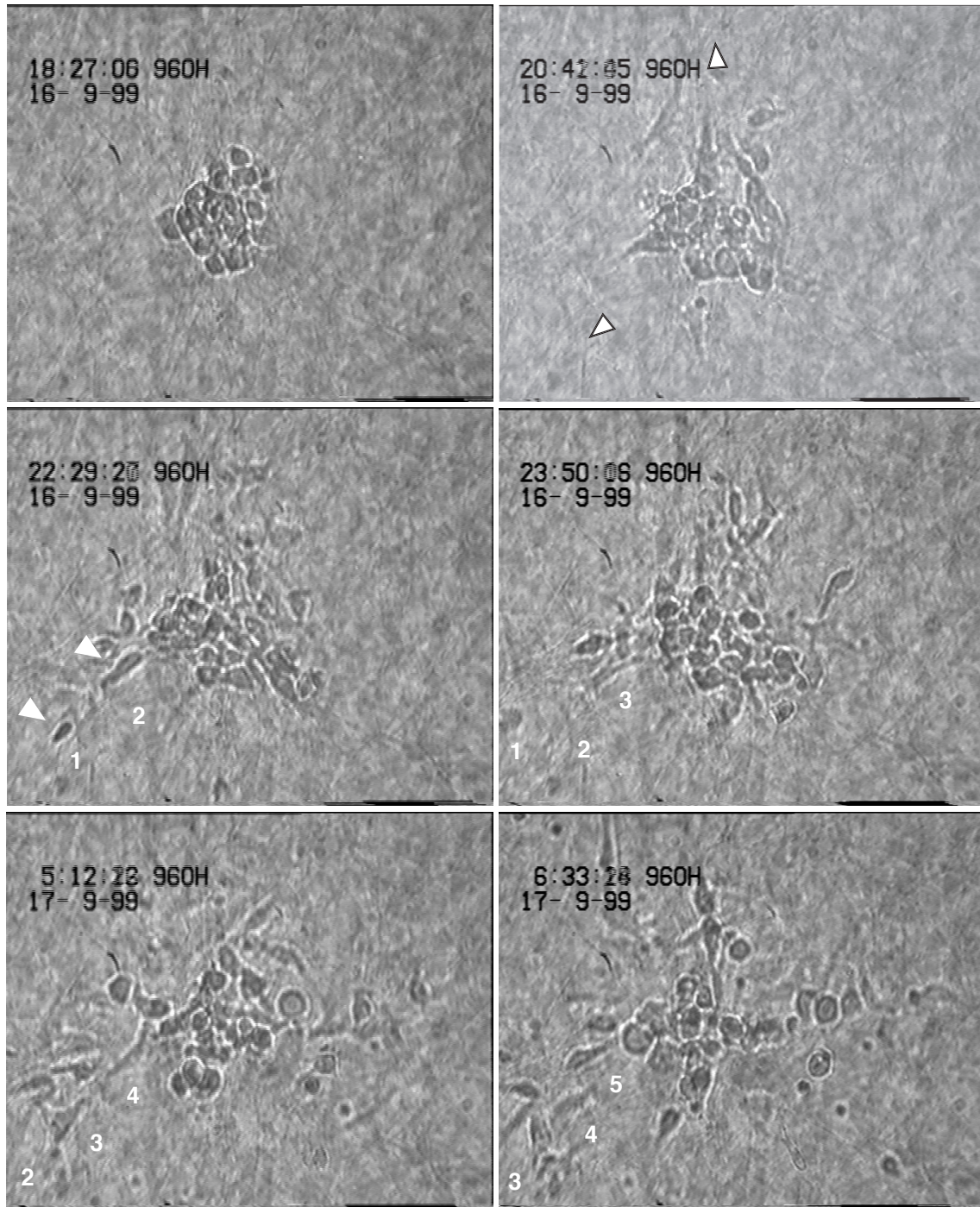


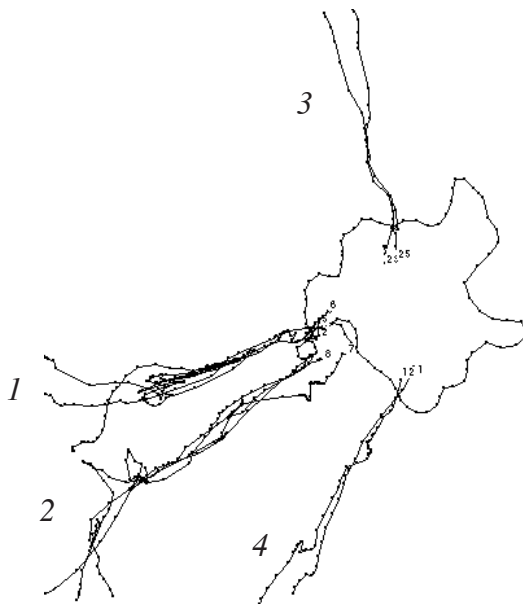
Abb. 9: Kettenmigration von MV3-Melanomzellen aus einem multizellulärem Sphäroid in einer 3D-Kollagenmatrix (Zeitraffer-Videomikroskopie, Zeitdarstellung: h:min:sec). Auswandern der ersten MV3-Zellen aus dem Sphäroid nach 2 Stunden unter Ausbildung mehrerer dominanter Invasionsfronten (Pfeilspitzen). Auswandern aufeinanderfolgender Zellen in derselben Migrationsrichtung (weiße Pfeilspitzen und Zahlen).

### **3.3.2. Auswirkungen des Matrixumbaus auf benachbarte Tumorzellen**

Die Migration von MV3-Zellen aus Sphäroiden heraus war bereits wenige Stunden nach der Inkubation zu beobachten. Zu Beginn der Migration wanderten einzelne Melanomzellen vorwiegend zentrifugal aus. Innerhalb einer etwa 12-stündigen Beobachtungszeit folgten weitere MV3-Zellen aus dem Sphäroid. Strangförmige, radiär ausstrahlende Invasionszonen wurden mittels computerassistiertem Zelltracking dargestellt (Abb. 10). Während die Mehrheit (ca. 80%) der Pfade relativ ungerichtet und individuell sich vom Sphäroid entfernten, war bei ca. 20% der Zellen eine Projektion der Zellpfade aufeinander nachweisbar (Abb. 10 b, 1 bis 4). Bis zu acht Zellen in einem Strang konnten als Zellkette nachgewiesen werden („sequentielle Migration“) (vgl. Abb. 12). Nach mehr als 24 Stunden wurden keine gemeinsam verwendeten Trassen genutzt.



a)



b)

Abb. 10: Pfade wandernder MV3-Melanomzellen aus einem multizellulären Sphäroid. Gleiches Sphäroid wie in Abb. 9. Die Pfeile geben die Richtung der vorherrschenden Invasionszonen an (a). Individuelle Pfade wurden durch Zellmarkierung und Verfolgung einzelner aus dem Sphäroid herausgetretener Zellen digitalisiert (Zelltracking) (b). Die einzelnen Invasionszonen (1-4) von Zellketten entlang gemeinsamer Pfade.

### **3.3.3. Konfokalmikroskopische Analyse der erleichterten Migration infolge Matrixumbau: Pfadbildende Zellen, Umbauvorgänge, Matrixtubes, Shedding, und nachfolgende Zellen**

Die der Migration von Zellketten zugrundeliegenden Zell-Matrix-Interaktionen und Trassenbildung wurden mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Das Wanderungsverhalten von Zellen aus Sphäroiden in Tumorinvasionsfronten zeigte eine besondere Matrixreorganisation, vorgebahnt durch initial ausgewanderte Zellen, die wir daher auch als „pfadbildende Zellen“ bezeichneten. Hinter primären invasiven Zellen entstanden röhrenförmige Matrixdefekte und parallel verlaufende Kollagenstränge (Abb. 12 (Pfeile)). Diese Kollagenstränge bildeten Leitstrukturen für nachfolgende migrierende Zellen (Abb. 12 und Abb. 13). In diesen röhrenförmigen Matrixdefekten ließen sich Zellfragmente und Oberflächenproteine nachweisen (Abb. 13).

Darüberhinaus fanden sich entlang der präformierten Pfade gehäuft weitere Zellen aus dem Sphäroid, die bevorzugt die Migrationsrichtung der ersten invasiven Zellen einhielten. Die Nutzung dieser Matrixdefekte war über mindestens 2 Stunden für die erleichterte Migration benachbarter Tumorzellen nachweisbar.

Die angewandten Untersuchungsmethoden zeigten eine invasive Migration von Tumorzellketten in nativen Kollagenmatrices unter Neubildung röhrenförmiger Matrixdefekte mit Deposition kompletter Zellfragmente. Es konnte gezeigt werden, daß nachfolgende Tumorzellen hinter „pfadbildenden Zellen“ innerhalb der umstrukturierten extrazellulären Matrix migrieren. Die Ausrichtung der Migration in reorganisierter extrazellulären Matrix könnte somit qualitativ und quantitativ zur Melanominvasion beitragen.

### 3.3.4. Kinetik der Migration sequentieller Zellen entlang desselben Pfades

Im Anschluß an die nachgewiesene Zellkettenmigration sollte untersucht werden, ob hinter pfadbildenden Zellen nachfolgende Zellen mit einer höheren Geschwindigkeit migrieren. Die einzelnen Zellen wurden chronologisch für jede Migrationsfront mittels Zelltracking analysiert und ihre Migrationsgeschwindigkeiten ab dem Austritt aus dem Sphäroid bestimmt (Abb. 11).

Zunächst wurden die initial auswandernden Zellen untersucht. Die Messung der Migrationsgeschwindigkeit der jeweils ersten auswandernden Zelle einer Zellkette zeigte über die Zeit ein variables Geschwindigkeitsprofil (Abb. 13). Zu Beginn der Migration war die Geschwindigkeit mit ca. 0,3 bis 0,4  $\mu\text{m}/\text{min}$  relativ langsam, um im weiteren Verlauf bis zum 5-fachen der Anfangsgeschwindigkeit anzusteigen.

Für die nachfolgenden Zellen wäre aufgrund der präformierten Matrixdefekte eine höhere Migrationsgeschwindigkeit zu erwarten gewesen. Aber alle nachfolgenden Zellen wanderten trotz der präformierten Matrixdefekte ohne Unterschied zu den pfadbildenden Zellen mit gleicher oder sogar mit langsamer Migrationsgeschwindigkeit. Teilweise lagen die Migrationsgeschwindigkeiten 50% niedriger als für pfadbildende Zellen. Somit sind die Geschwindigkeiten der Zellen nicht durch die Matrixdefekte gesteigert.

Es erfolgte zwar eine Koordination der Migrationsrichtung innerhalb der Zellketten, nicht jedoch (die erwartete) Beschleunigung der Migrationsgeschwindigkeit.

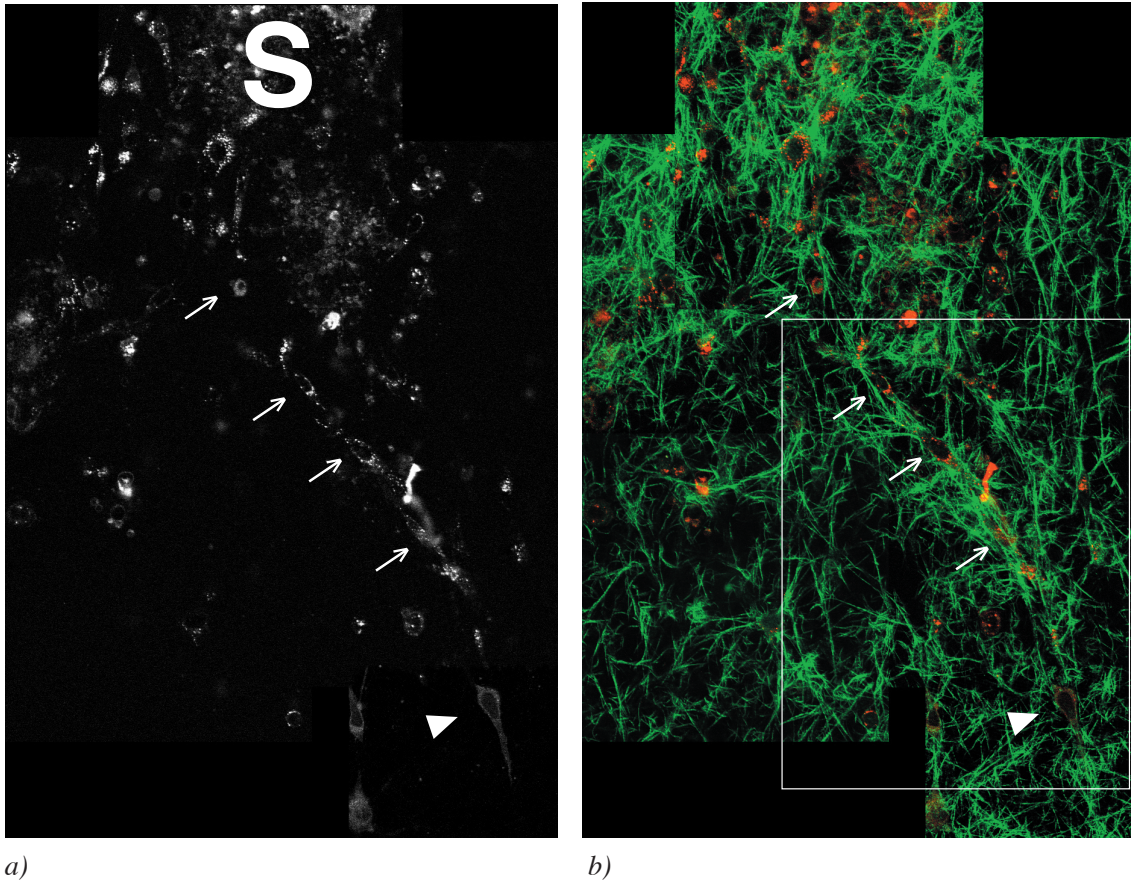


Abb. 11: Reorganisation der Kollagenmatrix durch migrierende MV3 Tumorzellen aus einem multizellulären Sphäroid (S). Kombinierte Detektion der Fluoreszenz mit einem nicht-selektiven Membranfarbstoff (DPHA (a)) und der Matrixstruktur mittels konfokaler Reflektionsmikroskopie (b). Nachfolgende Zellen orientierten sich entlang den reorganisierten Kollagenfasern (Pfeile). (b) zeigt die reorganisierte Extrazellulärmatrix und die Pfadbildung durch eine Pfadbildende Zelle (Pfeilkopf). Die Abb. 11 ist aus sechs Einzelbildern des gleichen Sphäroids und der entsprechenden Invasionsfront zusammengesetzt. Beispiel aus n=3 untersuchten Sphäroiden.



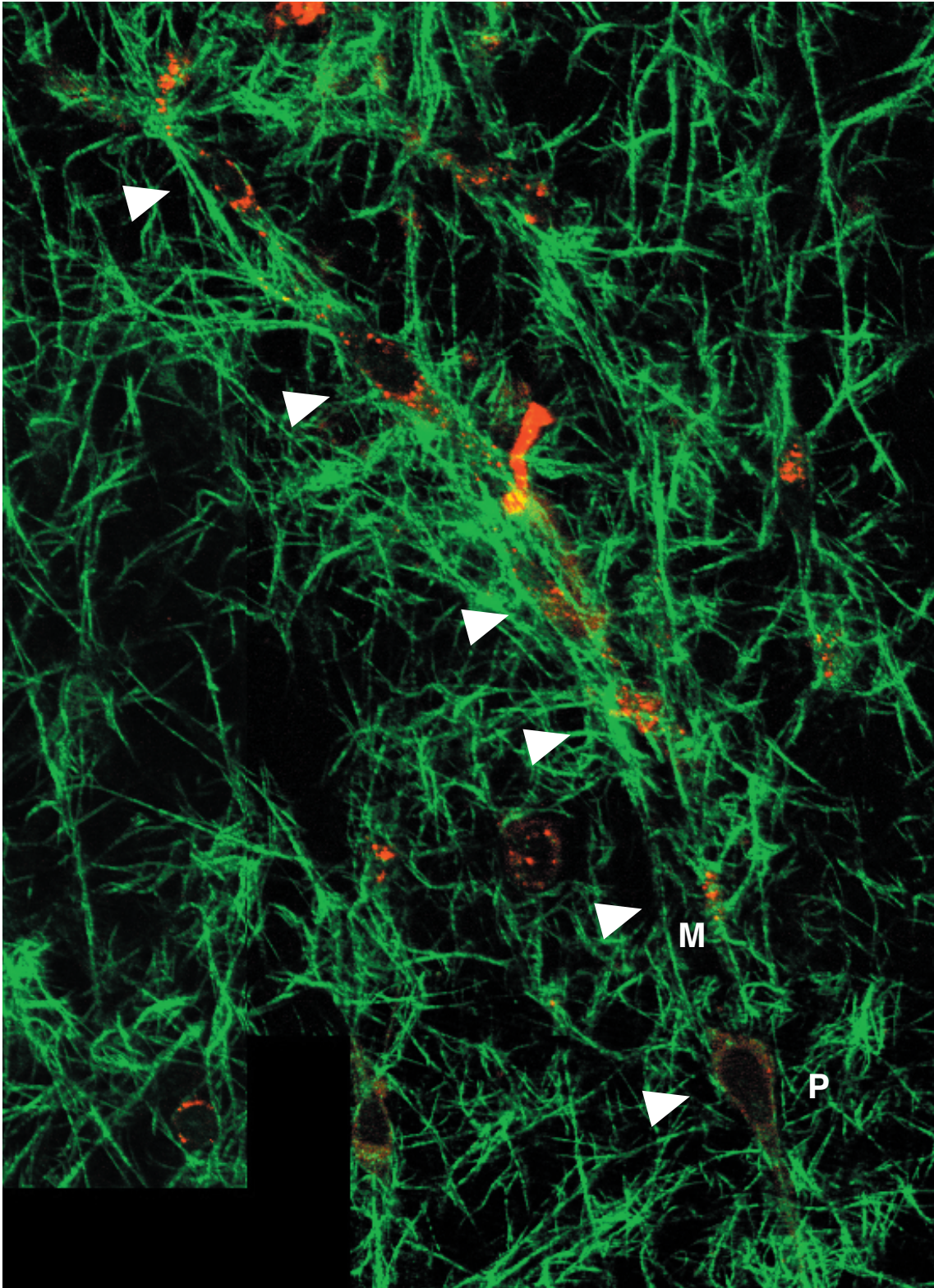
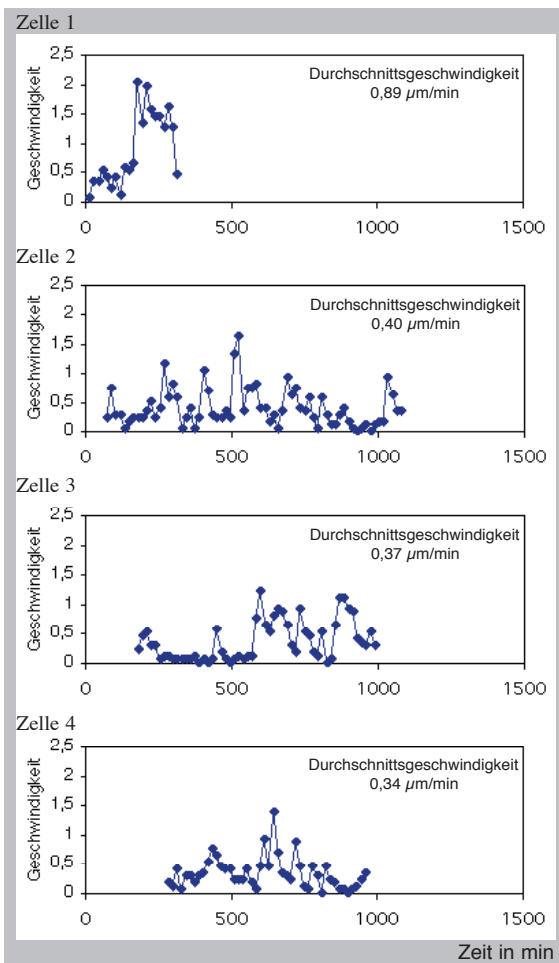
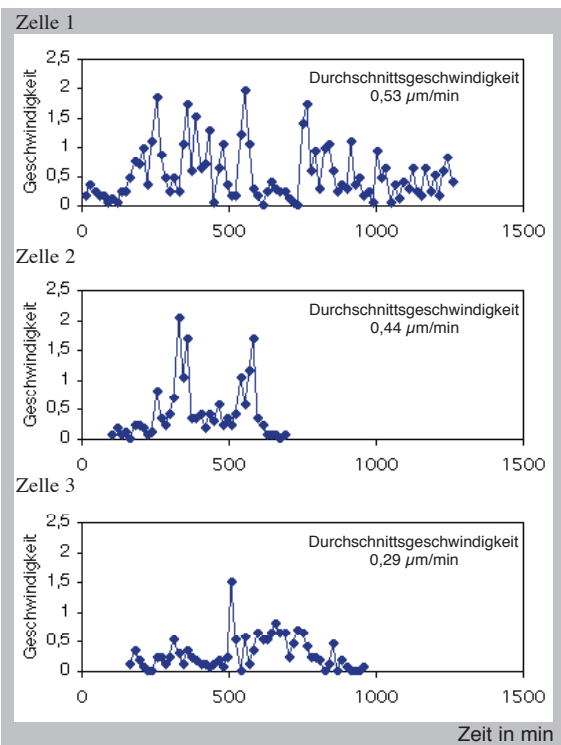


Abb. 12: Ausschnitt aus Abb. 11 b. Deutliche Strangbildung des Kollagen Gewebes nach einer MV3 „Pfadfinderzelle“ (P). Nachfolgende MV3-Tumorzellkette (Pfeilspitzen). Matrixdefekt (M) unmittelbar hinter der Pfadfinderzelle.

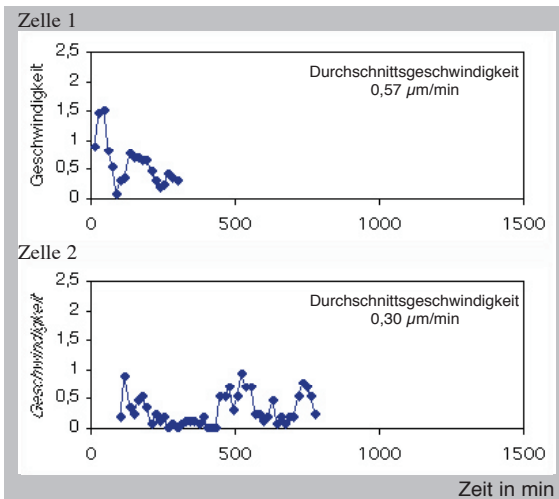
*Front 1*



*Front 2*



*Front 3*



*Front 4*

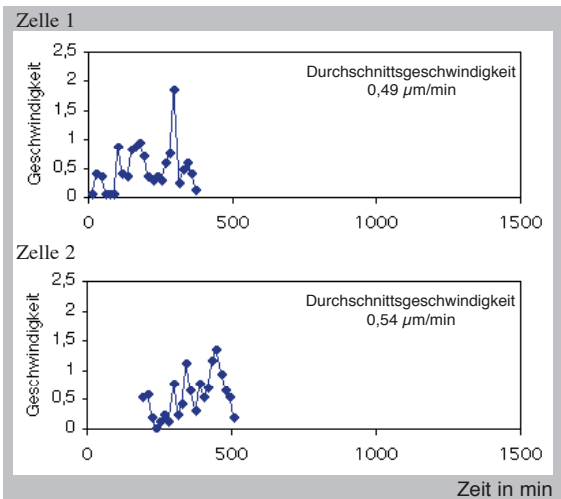


Abb. 13: Analyse der Migrationsgeschwindigkeiten der einzelnen aus dem Sphäroid herausgetretenen Zellen aus Abb. 10 b in Abhängigkeit von der Zeit. Jedes Diagramm repräsentiert eine einzelne Zelle in chronologischer Reihenfolge. Dargestellt ist die Geschwindigkeit der Zellen ab dem Austritt aus dem Sphäroid seit Beginn der Videoaufnahme.

## **4. Diskussion**

Eine Zell-Matrix-Interaktion ist eine Voraussetzung für die Migration und damit Aussaat von Tumorzellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einige Besonderheiten: Eine Matrixreorganisation und, möglicherweise, das Shedding kompletter Zellbestandteile beeinflussen das Invasionsverhalten von Tumorzellen. Die experimentellen Untersuchungen spiegeln dabei viele der tatsächlichen Bedingungen im Organismus wider, passen gut zu morphologischen Befunden der Histologie und ergänzen deren Aussage um eine dynamische Dimension.

### **4.1. Strukturelle und molekulare Merkmale des Matrixumbaus**

Die extrazelluläre Matrix stellt für wandernde Zellen sowohl Struktur für Anhaftung und Kraftübertragung wie auch eine mechanische Barriere dar. Im Zuge der Migration von Tumorzellen und damit folgenden Metastasierung muß dieses Hindernis überwunden werden. Durch aktive Maßnahmen, wie proteolytische Lösung von Kollagenverbindungen (Wolf et al., 2003), Umbau und Verdrängung der extrazellulären Matrix durch mechanische und proteolytische Kräfte findet eine Veränderung der Matrixstruktur während der Migration statt.

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, bauen migrierende Zellen ein ursprünglich natives homogenes Kollagengewebe in kollagenfaserarme Räume, sowie dreidimensional verdichtete Kollagenstränge heterogen um. Infolgedessen entstehen strukturelle Defekte, Röhren und Stränge des Kollagengewebes in der unmittelbaren Umgebung und, vor allem, am Hinterende aktiv wandernder Zellen. Diese neu strukturierten Matrixdefekte bilden Leitstrukturen einerseits von kollagenfreien Gängen, andererseits von festeren und dichter gepackten „Leitschienen“ zum übrigen Extrazellularraum. Bei den Untersuchungen über die Matrixreorganisation zeigten sich neben den Matrixveränderungen auch an den Kollagenfasern anhaftende

Zellbestandteile. Hierbei wurde als neuer Mechanismus neben dem Shedding einzelner Oberflächenrezeptoren und Proteine die Abtrennung von kompletten Zellbestandteilen beschrieben. Auch diese Veränderungen könnten alleine oder in Kombination das Verhalten nachfolgender Zellen beeinflussen. Es stellte sich daher die Frage, ob andere Zellen diese Veränderungen erkennen und möglicherweise darauf reagieren können.

#### **4.2. Bedeutung des Shedding und Verlust kompletter Zellfragmente**

Die aktive Migration einer Zelle bedarf eines zyklischen Prozesses auf vorderer Anhaftung mit Zug und Loslösung des Hinterendes. Nach bisheriger Erkenntnis wird die hintere Loslösung durch das Shedding von an der Migration beteiligten Rezeptoren gefördert (Schmidt et al., 1993; Huttenlocher et al., 1998 und 1998a).

Neben  $\beta$ 1-Integrinen und CD44 wurde in dieser Arbeit darüber hinaus eine unspezifische Abschilferung von Zellteilen, d. h. kompletten Zellfragmenten, beschrieben. Der Grund für den relativ „verschwenderischen“ Umgang mit Zellbestandteilen ist noch nicht geklärt, jedoch lassen sich folgende Hypothesen ableiten:

- a) Der Verlust von Zellfragmenten erleichtert die zelluläre Loslösung im Falle hoher Zugkräfte, sowie eine beschleunigte Migration in der umgebenden extrazellulären Matrix. Eine undifferenzierte Abgabe von Zellbestandteilen mit allen integrierten Oberflächenantigenen spricht für einen unspezifischen, nicht selektiven Prozeß, z. B. im Rahmen stark beschleunigter Migration. Ein niedrigerer Energieaufwand zugunsten einer effizienten Zellmigration wäre die Folge. Daraus könnte eine schnellere Migration durch Gewebe resultieren. Zeit, die zur Reintegration und zum Recycling der Zellbestandteile benötigt würde, hätte zwangsläufig eine langsamere Vorwärtsbewegung zur Folge.

Unklar ist, warum so ein „aufwendiger“, d. h. nicht ressourcensparender

Mechanismus des Loslösens aufrechterhalten wird. Ebenso unklar ist, ob langfristig durch Shedding das Zellvolumen abnimmt oder ob durch Resynthese von Cytoplasma und Membranbestandteilen eine Kompensation herbeigeführt wird.

- b) Die Markierung des Pfades mit deponierten Zellbestandteilen und Sekretion (z. B. durch Chemikalien, Proteine, Wachstumsfaktoren und Matrixkomponenten) könnte neben dem röhrenförmigen Matrixumbau weitere Orientierungspunkte für andere Zellen bilden. So könnten Zellen, die auf solche Veränderungen stoßen, davon beeinflusst werden. Möglicherweise bildet ein bestehender Pfad eine mechanische Erleichterung für die Migration, während eine Spur von Zellbestandteilen chemische Botenstoffe oder zusätzliche Wegweiser darstellen. Beides könnte vor allem die Richtung der Migration beeinflussen. Eventuell werden die Zellbestandteile, sofern sie nicht von Makrophagen phagozytiert werden, z. B. auch von anderen Tumorzellen erkannt und/oder wieder inkorporiert.
- c) Eine (derzeit hypothetische) Folge der Deposition von Tumorzellfragmenten in der extrazellulären Matrix könnte die Irritation und Ablenkung des zellulären Immunsystems nach sich ziehen. Es ist zu erwarten, daß Zellfragmente MHC I exprimieren, somit wäre eine Erkennung durch zytotoxische T-Zellen möglich. Die Zellbestandteile führen möglicherweise Abwehrmechanismen des Immunsystems durch antigengleiche Melanomzellfragmente entlang der „Foot-pads“ in die Irre und lenken von den eigentlichen Tumorzellen ab. Hierzu könnten Untersuchungen beitragen, ob T-Zellen direkt an diese Fragmente binden und ggfs. davon aktiviert werden.

### **4.3. Bedeutung des Matrixumbaus für das Invasionsmuster**

Mit der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, daß Melanomzellen in Zellketten durch extrazelluläre Matrix wandern. Das Kollagenmodell ist trotz seiner Limitierungen auf nur eine extrazelluläre Komponente, auf fehlende chemotaktische Gradienten und fehlende Stromazellen geeignet, eine in vivo-ähnliche Zelltopographie der Tumorinvasion abzubilden. In der Kollagenmatrix erzeugten pfadbildende Zellen einen Kollagensubstanzdefekt, an welchem sich nachfolgende Zellen kettenähnlich orientieren.

Die ursprüngliche Vermutung einer möglicherweise erleichterten, d. h. beschleunigten Migration nachfolgender Zellen durch widerstandsärmere Kollagenfasertunnel stellte sich als nicht zutreffend heraus. Bei der Migration von Zellketten kommt es zwar zu einer Orientierung der Fortbewegung nachfolgender Zellen entlang von Matrixdefekten, ihre Migrationsgeschwindigkeit ist allerdings nicht höher als die der Pfadfinderzellen. Das Fehlen einer Beschleunigung entlang ausgerichteter Faserbündel durch die präformierte Trasse wäre möglicherweise durch gesteigerte Adhäsion an die umgebaute Matrix (z.B. Laminin (Hendrix et al., 2002)) erklärbar.

Unter dem Einfluß migrierender Zellen erfolgt eine directionale Ausrichtung eines Teils der nachfolgenden Zellen („Contact guidance“). So bildet die umstrukturierte Matrix vor allem eine orientierungsgebende Leitstruktur entlang dem ungeordneten Kollagenetz. Bisher nicht untersucht ist, ob neben der nachgewiesenen Migrationserleichterung durch die Kollagenfasertunnel die deponierten Zellfragmente auch eine chemotaktische Einflußgröße für nachfolgende Zellen darstellt.

Migrierende Zellketten mit MV3-Melanomzellen erinnern an eine kürzlich beschriebene Sonderform der Melanominvasion, die an eine rudimentäre Angiogenese oder Vaskulogenese denken läßt („Vasculogenic mimicry“) (Hendrix et al., 2002).

## **5. Ausblick**

Diese Arbeit zeigt die komplexe Interaktion von MV3-Tumorzellen mit einer extrazellulären Kollagenmatrix und die Auswirkungen der Migration einzelner Zellen auf nachfolgende Zellen. Grundsätzlich bietet das 3D-Kollagenmatrix-Modell die Möglichkeit, das Verhalten von Tumorzellen insbesondere auch die Mechanismen der Zell- und Matrixstrukturierung zu komplexeren Arrangements in einem in-vivo-ähnlichem Modell dynamisch und molekular zu untersuchen. Weiterhin ließen sich damit auch Auswirkungen von verschiedenen Pharmaka auf Invasion und Pattering untersuchen, wie z. B. jüngst für MMP und Integrin-Inhibitoren geschehen (Wolf et al., 2003). Weiterhin läßt sich mit diesem Modell die Immunzell-Tumorzell-Interaktion untersuchen.

## 6. Literaturangaben

- Friedl P and Bröcker EB (2000)  
The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix,  
*Cell Mol Life Sci.* 57:41-64.
- Friedl P and Wolf K (2003)  
Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.  
*Nat Rev Cancer.* 3:362-74.
- Friedl P, Borgmann S, Brocker EB. (2001)  
Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the  
*Dictyostelium* paradigm of cell movement.  
*J Leukoc Biol.* 70:491-509.
- Friedl P, Bröcker EB and Zänker KS (1998b)  
Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: Fundamental  
differences in leukocytes and tumor cells.  
*Cell Adhes Commun.* 6:225-36.
- Friedl P, Noble PB and Zanker KS. (1993)  
Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three  
quantitative methods for analysing cell trajectories.  
*J Immunol Methods.* 165:157-65.
- Friedl P, Zanker KS, Brocker EB. (1998)  
Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology,  
cell matrix interactions, and integrin function.  
*Microsc Res Tech.* 43:369-78.
- Friedl P, Maaser K, Klein CE, Niggemann B, Krohne G and Zänker KS. (1997a)  
Migration of highly aggressive MV3 melanoma cells in 3-D collagen lattices  
results in local matrix reorganization and shedding of  $\alpha 2$  and  $\beta 1$  integrins and  
CD44.  
*Cancer Res.* 57:2061-2070.
- Friedl P, Entschladen F, Conrad C, Niggemann B and Zänker KS (1998a)  
T lymphocytes migrating in 3-D collagen lattices lack focal adhesions and utilize  
 $\beta 1$  integrin dependent strategies for polarization, interaction with collagen fibres,  
and migration.  
*Eur. J. Immunol.* 28:2331-2343.



- Gehlsen KR and Hendrix MJ. (1987)  
Invasive characteristics of neural crest cells in vitro.  
Pigment Cell Res. 1:16-21.
- Hanahan D and Weinberg RA. (2000)  
The hallmarks of cancer.  
Cell. 100:57-70.
- Hartmann A, (1999)  
Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma.  
Cancer Research 59:1578-1583.
- Hendrix MJ, Seftor RE, Seftor EA, Gruman LM, Lee LM, Nickoloff BJ, Miele L,  
Sheriff DD and Schattman GC. (2002)  
Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: role of the  
microenvironment in cell-fate determination.  
Cancer Res. 62:665-8.
- Huttenlocher A, Lakonishok M, Kinder M, Wu S, Truong T, Knudsen KA and Horwitz  
AF. (1998)  
Integrin and cadherin synergy regulates contact inhibition of migration and motile  
activity.  
J Cell Biol. 141:515-26.
- Lauffenburger DA and Horwitz AF (1996)  
Cell migration: A physically integrated progress,  
Cell, 84:359-369.
- Maaser K, Wolf K, Klein CE, Niggemann B, Zanker KS, Brocker EB and Friedl P.  
(1999)  
Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin  
alpha2beta1 but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix  
reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices.  
Mol Biol Cell. 10:3067-79.
- Mayer C, Maaser K, Daryab N, Zanker KS, Brocker EB and Friedl P (2004)  
Release of cell fragments by invading melanoma cells,  
Eur J Biol. 83:709-715.
- Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA and Horwitz AF. (1997)  
Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-  
substratum adhesiveness.  
Nature. 385:537-40.
- Regen CM and AF Horwitz. (1992)  
Dynamics of  $\beta 1$  integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts.,  
J Cell Biol. 119:1347-1359.

- Schmidt CE, Horwitz AF, Lauffenburger DA and Sheetz MP. (1993)  
Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic,  
asymmetric, and regulated,  
J Cell Biol. 123:977-991.
- van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL and Ruitter DJ.  
(1991)  
Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which  
is highly metastatic in nude mice.  
Int J Cancer. 48:85-91.
- van Muijen GN, Cornelissen LM, Jansen CF, Figdor CG, Johnson JP, Brocker EB and  
Ruitter DJ. (1991)  
Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells  
xenografted into nude mice.  
Clin Exp Metastasis. 9:259-72.
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY,  
Brocker EB and Friedl P. (2003)  
Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid  
transition after blocking of pericellular proteolysis.  
J Cell Biol. 160:267-77.

## Zusammenfassung

Die metastatische Invasion von Tumorzellen durch die extrazelluläre Matrix von Geweben erfordert aktive Zellmigration sowie häufig auch den Umbau der Gewebestruktur. In dieser Arbeit sollte mittels metastasierender MV3-Melanomzellen in einem 3D-Kollagenmatrixmodell der migrationsassoziierte Matrixumbau zellulär und molekular untersucht werden, insbesondere die physikalische Charakterisierung gebildeter Matrixdefekte, die molekulare Identifikation freigesetzter Zellbestandteile, sowie den Einfluß pfadbildender Zellen auf die Invasion nachfolgender Zellen.

Die Daten zeigen, daß MV3-Melanomzellen während der Migration durch ein 3D-Kollagengewebe komplette Zellfragmente in zurückbleibenden röhrenförmigen Trassen deponieren. Diese beinhalten Zytoplasma und teils Zytoskelett umgeben von intakter Zellmembran mit integrierten Oberflächenrezeptoren wie  $\beta$ 1-Integrinen, nicht jedoch DNA-Material. Der Durchmesser der Fragmente lag überwiegend bei 1-5  $\mu$ m, selten über 10  $\mu$ m, entsprechend unspezifisch freigesetzter Zellfragmente, die während der Migration vom Zellhinterende abgeschilft werden.

In einem Sphäroidmodell ließen sich mehrere Invasionsfronten nachweisen, in denen einer ersten pfadbildenden Zelle entlang neu gebildeter Matrixtrassen weitere Zellen den gleichen präformierten Trassen folgten. Die videomikroskopischen Befunde wurden mittels Konfokalmikroskopie bestätigt. Eine erwartete höhere Migrationsgeschwindigkeit der nachfolgenden Zellen in dem präformierten Pfad bestätigte sich jedoch nicht.

Somit führt die Invasion von MV3-Melanomzellen zur Ausbildung strukturell umgebauter Matrixtrassen, die aus Matrixdefekt freigesetzten Zellfragmenten und angrenzender Extrazellulärmatrix bestehen und nachfolgenden Zellen als Leitstruktur für eine orientierte Form der Invasion dienen (Kettenwanderung). Diese Befunde beleuchten die Dynamik von Zellarrangements ähnlich dem Invasionsmuster in histopathologischen Tumorproben.

## **Danksagungen**

Frau Prof. Bröcker und Prof. Friedl danke ich für die Vorgabe des Themas.

Insbesondere danke ich Prof. Dr. Dr. Peter Friedl, Leiter des Forschungslabors und meinen geistigen und tatkräftigen Mentor für die Hilfestellung, Unterstützung und Umsetzung dieser Arbeit. Dem gesamten Team des Zellmigrations-Forschungslabors der Universitätshautklinik Würzburg möchte ich für die intensive und hervorragende Zusammenarbeit danken. Besonderer Dank geht an Prof. Dr. Van Muijen (Universität Nijmegen) für die MV3-Zelllinie. Ebenso an Prof. Dr. J. Johnson (München) für die Bereitstellung der JuSo-Zelllinie.

## Lebenslauf

Name: Christian Steffen Mayer  
Geburtsdatum: 31. Oktober 1973 in Ellwangen/Jagst  
Konfession: römisch-katholisch  
Familienstand: verheiratet

Schulbildung  
1980 - 1984 Grundschule Sillenbuch, Stuttgart  
1984 - 1990 Geschwister-Scholl-Gymnasium, Stuttgart  
1990 - 1993 Käthe-Kollwitz-Schule, Hannover,  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst  
1993 -1994 Krankenpflege und Verwaltungstechnik in der  
Medizinischen Hochschule Hannover

Hochschulbildung  
1994 - 2000 Studium der Humanmedizin an der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
2000 - 2001 Praktisches Jahr an der Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg  
06/2001 Drittes Staatsexamen  
Seit 07/2001 Assistenzarzt in der Universitäts-Augenklinik  
Regensburg

Dissertation "Pfadbildung durch invasive Melanomzellen:  
Matrixdefekte, Zellfragmente und erleichterte Migration",  
Prof. Dr. Dr. P. Friedl, Klinik für Haut-  
und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg



Christian Mayer