

Aus dem Rudolf-Virchow-Zentrum
DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Martin Lohse

und

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

Direktor: Professor Dr. med. Eva-Bettina Bröcker

**Interaktion von malignen Tumorzellen mit extrazellulärer Matrix und
Migration: Rolle von Rac und ROCK**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jasmin Adä

aus Bellenberg

Würzburg, November 2009

Referent: Professor Dr. Dr. P. Friedl

Koreferent: Professor Dr. M. Eilers

Dekan: Professor Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

22. November 2010

Die Promovendin ist Ärztin

1. EINLEITUNG	1
1.1 Molekulare Mechanismen der Tumorzellmigration	3
1.1.1 Bedeutung des Zytoskeletts bei der Tumorzellinvasion	3
1.1.1.1 Struktur und Funktion des Aktin Zytoskeletts	3
1.1.1.2 Kontrolle des Zytoskeletts durch kleine G-Proteine	5
1.1.1.2.1 Rac und Cdc42	6
1.1.1.2.2 Rho und ROCK	7
1.1.2 Zelladhäsionsmoleküle und fokale Kontakte	9
1.1.3 Matrixverdau durch Proteasen	10
1.2 Plastizität der Tumorzellmigration durch molekulare Interferenz	11
1.2.1 Hemmung von Oberflächenproteasen und Integrinen	11
1.2.2 Interferenz mit Rho-GTPasen	12
1.3 Ziel der Studie	13
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Material	15
2.2 Methoden	17
2.2.1. Zelllinien und Zellkultur	17
2.2.2 Inhibitoren und Reagenzien	18
Inhibition von Rac mit lethalem Toxin (<i>Clostridium sordelii</i>)	18
Inhibition von ROCK mit Y-27632	18
Proteaseinhibitoren	18

2.2.3. Transfektion von HT1080-MT1 Zellen mit konstitutiv aktivem ROCK-V14	19
2.2.4 Herstellung von Zellkulturen in 3D Kollagenmatrices	20
2.2.5 Zeitraffervideomikroskopie	21
2.2.6 Analyse der Zellviabilität durch Durchflußzytometrie	21
2.2.7 Computerassistiertes Zelltracking und Analyse von Zellmigration und Zellform	22
2.2.7.1 Analyse der Zellmigration	22
2.2.7.2 Quantifizierung von Pseudopodlängen	23
2.2.8 Kollagenkontraktion	23
2.2.9 Konfokalmikroskopie	24
2.2.10 Analyse der zellulären Proteaseaktivität	25
2.2.11 Zell-Sorting	26
3. ERGEBNISSE	27
3.1. Hemmung der Zelldynamik durch Inhibition von Rac	27
3.1.1. Hemmung der Migration	27
3.1.2. Hemmung der Pseudopodentwicklung	28
3.1.3. Hemmung der Zell-Matrix-Interaktion	29
3.2 Modulation/Plastizität der Zelldynamik durch ROCK-Inhibitor	31
3.2.1. Hemmung der Zellmigration	31
3.2.2. Induktion eines dendritischen Phänotyps	33
3.2.3. Struktur des Aktin-Zytoskeletts nach Inhibition von ROCK	33
3.2.4. Perizelluläre Proteolyse trotz Inhibition von ROCK	35

3.3 Bimodale Inhibitionsstrategien	36
3.3.1 Inhibition von Rac und ROCK	36
3.3.2 Inhibition von ROCK in Protease-inhibierten, amöboiden Zellen	36
3.4 Steigerung der Actomyosin-Kontraktilität durch konstitutiv aktives ROCK	40
3.4.1. Transfektion und Funktionalität von ROCK-V14	40
3.4.2. Hemmung der Migration	41
3.4.3. Heterogenität von Zellform und Zytoskelettfunktion: rundliche und elongierte Phänotypen	42
3.4.4. Abhängigkeit der Antwort auf aktives ROCK vom Expressionsniveau von β 1-Integrin	43
4. DISKUSSION	46
4.1. Dualität der Rac und ROCK Funktion	46
4.1.1. Vermittlung von Pseudopodbildung durch Rac	46
4.1.2. Vermittlung von Kontraktilität bei Einzelzellmigration in 3D-Matrix durch ROCK	47
4.1.3. Notwendigkeit des Zusammenwirkens von ROCK und Rac für mesenchymale Einzelzellmigration	51
4.2. Unabhängigkeit Rac- und ROCK-induzierter Funktionen von MMPs	53
4.3. In vivo Relevanz von kleinen G-Proteinen als therapeutische Zielstrukturen und Tumorthherapie	54
5. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT	56

6. LITERATURVERZEICHNIS	58
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	70
FILMLEGENDE	71
ABKÜRZUNGEN	72

Danksagung

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

1.1 Molekulare Mechanismen der Tumorzellmigration

Die Invasion von Zellen in umliegendes Gewebe ist bei unterschiedlichen physiologischen wie pathologischen Vorgängen von Bedeutung, so z. B. bei der Embryonalentwicklung, Angiogenese, Wundheilung, Immunreaktionen und, in pathologischer Form, der Tumordinvasion und -metastasierung. Hierbei bewegen sich Zellen infolge eines dynamischen Zytoskeletts aktiv durch die extrazelluläre interstitielle Matrix von Geweben und Organen. Im Rahmen einer Tumorerkrankung lösen sich einzelne Zellen oder kleinere Zellverbände aus dem Primärtumor, invadieren durch das umliegende Gewebe, erreichen Blut- und Lymphgefäße und metastasieren in entfernte Organe, was die wichtigste Ursache der Mortalität von Tumorerkrankungen darstellt.

Die Migration einzelner Zellen - und wahrscheinlich auch Tumorzellen - durch die sie umgebende extrazelluläre Matrix läuft nach einem bestimmten Muster ab, das als 5-Schritt-Modell beschrieben wurde (Abb. 1)¹. Durch die Polymerisierung von Aktin wird die Zelle elongiert und polar und es kommt, durch ein Ausstülpen, zur Bildung eines vorderen Pseudopods (Schritt I). Dieser nimmt über Adhäsionsmoleküle, insbesondere Integrine, Kontakt zur umliegenden Matrix auf (Schritt II). Diese Interaktionszonen zwischen Zelle und Gewebe werden fokale Kontakte oder Adhäsionen genannt, welche zusätzlich Transmembranproteasen rekrutieren und proteolytische Funktion gegen umliegende Gewebestrukturen ausüben. Man geht davon aus, dass durch lokale perizelluläre Proteolyse des Bindegewebes die Migration erleichtert wird (Schritt III). Über Quervernetzung und Stabilisierung der Aktinfilamente durch Aktin-bindende Proteine, z. B. Myosin II, erfolgt die Kontraktion des Zellkörpers (Schritt IV), wodurch das Hinterende der Zelle in Migrationsrichtung gezogen wird und die Zelle an Matrixstrukturen entlang gleitet (Schritt V). Durch Wiederholen dieser Phasen wandert die Zelle.

Die Migration der Krebszelle im menschlichen Körper aus dem Primärtumor in Richtung von Gefäßen erfordert die Interaktion mit Gerüstproteinen des Bindegewebes. Das Bindegewebe besteht aus Zellen und sie umgebender extrazellulärer Matrix (ECM). Kollagen, insbesondere Typ I Kollagen, ist das wichtigste Strukturprotein der ECM.^{2, 3}

Es hat eine fibrilläre Struktur, die durch die Zusammenlagerung je drei sogenannter α -Ketten zu einer Tripelhelix und je fünf Tripelhelices zu einer Kollagenmikrofibrille entsteht.⁴⁻⁶ Kollagen wird von zellulären Adhäsionsmolekülen spezifisch gebunden⁷⁻¹⁰ und durch lösliche oder zellgebundene Proteasen (Kollagenasen) gespalten.^{11, 12}

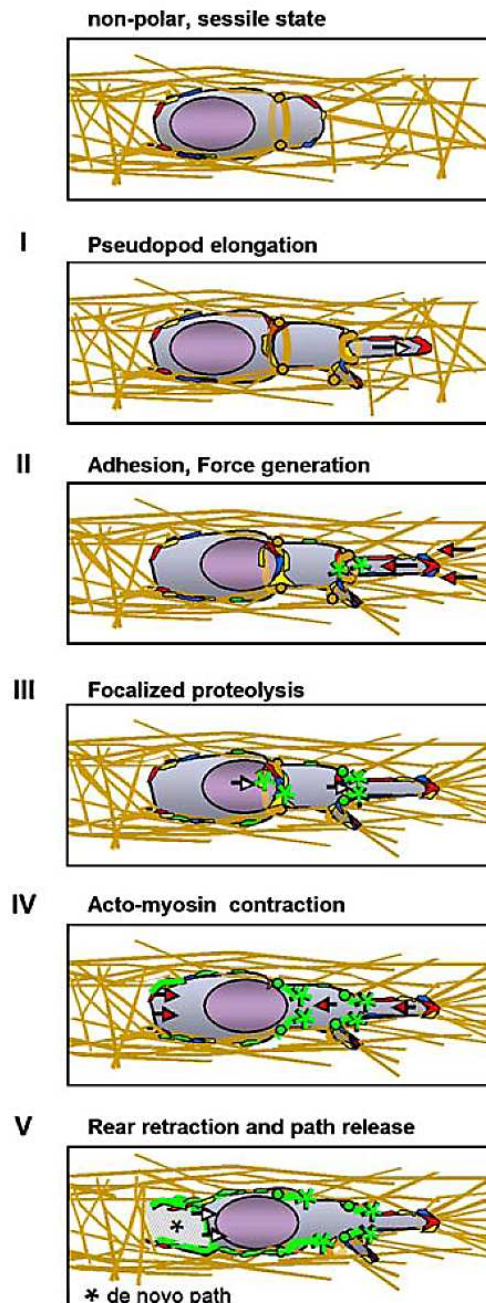


Abb. 1: 5-Schritt-Modell der Einzelzellmigration durch dreidimensionale Matrix. Die Schritte I-V laufen aufeinanderfolgend und zyklisch ab und führen letztendlich zu Zellmigration und strukturellem Umbau der ECM. Weiße Pfeile: Bewegung; rote Pfeile: Krafterzeugung. (aus Friedl und Wolf, 2009¹³)

1.1.1 Bedeutung des Zytoskeletts bei der Tumorzellinvasion

Die für Zellmigration notwendige Polarisierung, mechanische Kraft und Plastizität, d.h. Verformbarkeit der Zelle, werden fast ausschließlich durch das intrazelluläre Zytoskelett vermittelt.

1.1.1.1 Struktur und Funktion des Aktin Zytoskeletts

Das Zytoskelett besteht aus drei Arten von Protein-Filamenten. Intermediärfilamente vermitteln mechanische Stabilität und Widerstandsfähigkeit¹⁴⁻¹⁶, Microtubuli sind für die Verteilung der Zellorganellen und den Umsatz von fokalen Kontakten zuständig¹⁷⁻¹⁹, und Aktin-Filamente (F-Aktin) vermitteln Formveränderung und Fortbewegung der Zelle.^{20, 21}

Wie auch die anderen Filamente besteht das Aktin-Zytoskelett aus Monomeren, die zu länglichen Filamenten oder filamentösen Netzwerken aggregieren. Der erste Schritt zur Entstehung eines Filaments ist die Nukleation, d.h. drei Monomere verbinden sich zu einem Trimer. Sie findet meist in Nähe bzw. knapp unterhalb der Plasmamembran statt (Abb. 2). Als Konsequenz befinden sich die meisten Aktin-Filamente in der Peripherie der Zelle, dem Kortex, und bestimmen so die Gestalt und Bewegung der Zelloberfläche. Die Aktin-Nukleation wird durch Signale von außen oder aus dem Zellinneren über eine Kaskade von Signalmolekülen reguliert. Diese sog. NPFs (Nucleation promoting factors), wie z.B. WASP, N-WASP, Scar/WAVE oder Yeast myosin I, aktivieren alle den ARP2/3-Komplex, der wiederum die Aktin-Nukleation und die Ausbildung von Aktinnetzwerken initiiert.²²⁻²⁶ Formine, wie z.B. mDia, werden von kleinen G-Proteinen aktiviert und unterstützen die Aktin-Nukleation und die Elongation der Filamente.²⁷ Dies ermöglicht der Zelle ihre Form in Abhängigkeit von Änderungen der Umgebung bzw. des intrazellulären Signalniveaus anzupassen.

Die Nukleation ist der Ausgangspunkt für eine Polymerisation, es kommt zur Bildung eines helikalen Aktin-Filaments. Dieser Prozeß ist dynamisch und reversibel, so dass die Aktin-Filamente je nach Bedarf ständig auf-, ab- und umgebaut werden. Der Auf-, Ab- und Umbau von Aktin-Filamenten wird durch zahlreiche Proteine beeinflusst.

Der ARP2/3-Komplex bildet den Beginn eines Aktin-Filaments. Thymosin bindet gelöste Aktin-Monomere und verhindert deren Polymerisation. Profilin bindet kompetitiv mit Thymosin und rekrutiert so Monomere für eine Verlängerung bestehender Aktin-Filamente. An diese kann ein weiteres Protein, Cofilin, binden, das über Depolymerisation zum Umbau von Aktinfilamenten führt.²⁸⁻³⁰

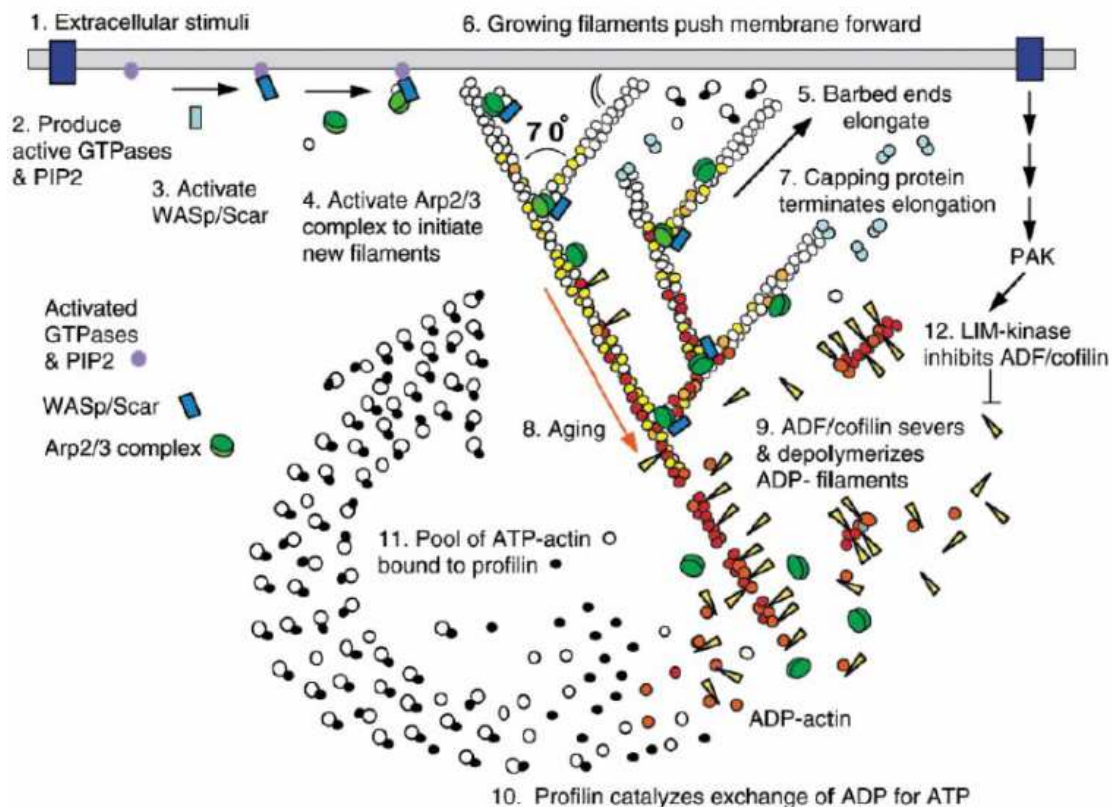


Abb. 2: Aktin-Filament-Polymerisation und Depolymerisation am Vorderende der Zelle. (aus Pollard und Borisy 2003²⁹)

Um Stabilität und Kontraktilität zu vermitteln werden die einzelnen Aktin-Filamente zu größeren Organisationseinheiten verbunden. Wichtige Aktin-kreuzvernetzende Proteine sind Filamin oder ARPs, die Aktinfilamente zu einem gelartigen Netzwerk verknüpfen. Zudem können Aktin-Filamente parallel gebündelt werden. Während durch Bindung an α -Aktinin lose kontraktile Bündel entstehen, bindet Fimbrin die Filamente zu dichten parallelen Bündeln.

Die Vernetzungstypen von Aktin liegen in unterschiedlichen Zellregionen vor und tragen unterschiedliche Funktionen.

Tabelle 1 Aktin-abhängige Strukturen (Auswahl)

Aktin-reiche Strukturen	Aufbau	Lokalisation	Funktion
Lamellipodien	Vernetztes Aktin	Vorderfront der Zelle	Gerichtete Protrusion, Zellmigration ^{31, 32}
Filopodien, Dendriten	Dichte Parallele Aktin-Bündel	Zellkortex	Sensorisches Organ, Adhäsion, Zellmigration ³³
Stressfasern	Aktin-Myosinbündel	Zytoplasma, Zellkontakte	Kontraktilität, Form, Adhäsion, Zellmigration ³⁴

So liegt vernetztes Aktin unterhalb der Zellmembran und bildet stabile wie auch dynamische Regionen des Zellkortex, insbesondere flache Lamellipodien und zylindrische Pseudopodien. Parallele Bündel lassen fingerartige, dünne Zellausläufer, Filopodien oder längere Dendriten entstehen.

Die durch α -Aktinin verbundenen lockeren kontraktile Bündel lassen zwischen den einzelnen Filamenten Platz, so dass sich Myosin II einlagern kann, das die Filamente zunächst fest vernetzt. Durch Spaltung von ATP am Myosinkopf bricht die feste Vernetzung auf, es kommt zum Abknicken der Myosinköpfe und durch Gleiten der Myosinfilamente entlang der Aktinfilamente zur Verkürzung der parallelen Fasern. So entstehen kontraktile Bündel, die sogenannten Stressfasern. Die Entstehung dieser unterschiedlichen Organisationsformen von Aktin mit ihren unterschiedlichen Funktionen unterliegt der Kontrolle von kleinen G-Proteinen.³⁰

1.1.1.2 Kontrolle des Zytoskeletts durch kleine G-Proteine

Die Familie der Rho-GTPasen besteht aus 20 Mitgliedern, die eine Vielzahl von Funktionen reguliert, u.a. die Organisation des Aktin Zytoskeletts und Zellmigration.³⁵ Rho-GTPasen funktionieren wie Schalter. Haben sie GTP gebunden, sind sie aktiv und können an spezifische Effektoren binden, die unterschiedliche Prozesse in Gang setzen. Durch Bindung von GDP werden sie inaktiviert. Ob die GTPasen aktiv oder inaktiv sind, wird durch regulatorische Proteine gesteuert.³⁶ GEFs (Guanin Nucleotide Exchange Factors) katalysieren die Freisetzung von GDP und nachfolgende Bindung

von GTP.^{37, 38} Die Inaktivierung durch Hydrolysierung von GTP zu GDP wird durch GAPs (GTPase activating Proteins) gefördert.³⁹ GDIs (Guanin Nucleotide Dissociation Inhibitors) binden sowohl inaktive als auch aktive GTPasen und verhindern so die Interaktion mit GEFs und Effektorproteinen.⁴⁰

Viele Effektorproteine von Rho-GTPasen sind Serin-Threonin-Kinasen, die nachgeschaltete Proteine phosphorylieren und so Signalkaskaden in Gang setzen.⁴¹

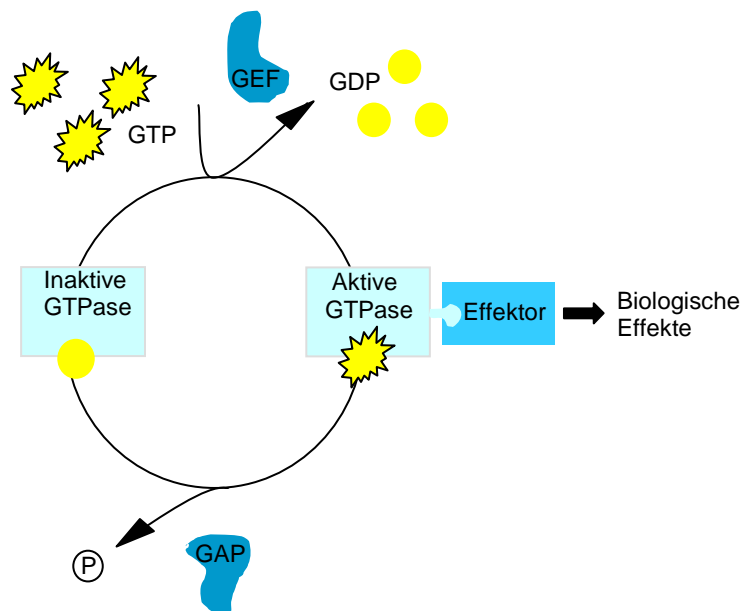


Abb. 3: GTPase Zyklus. (GEF: Guanin Nucleotid Exchange Factors, GAP: GTPase Activating Proteins, P: Phosphat)

1.1.1.2.1 Rac und Cdc42

Zwei wichtige Vertreter der Rho-GTPasen sind Rac und Cdc42. Rac induziert die Bildung von Lamellipodien und anderen Membranausstülpungen („Ruffles“) am Vorderende der Zelle.^{42, 43} Durch die Bildung einer protrusiven Forderfront spielt Rac eine wichtige Rolle bei der Zellmigration. Dies geschieht zu einem Großteil über Stimulation der Aktin-Polymerisation.^{32, 44} Rac aktiviert über PAKs (p21-activated

kinases, Serin-Threonin-Kinasen) und Scar/WAVE, einen NPF, Arp2/3, und führt so durch Aktin-Nukleation und Polymerisation zu Protrusion.⁴⁵⁻⁴⁷ Zugleich führt Rac über den nachgeschalteten Effektor WAVE zu einer Reduktion der Phosphorylierung von MLC (Myosin-Light-Chain) und vermindert somit die Actomyosin-Kontraktilität der Zelle.⁴⁸

Cdc42 induziert die Bildung von Filopodien und fördert die Zellmigration. Es aktiviert PAKs und den NPF WASP, die wiederum Arp2/3 aktivieren. Durch die initiierte Aktin-Polymerisation entstehen schmale Aktinbündel, die Filopodien.⁴⁹⁻⁵¹

Zellen mit einem verminderten Anteil von aktivem Rac und Cdc42 zeigen einen runderen Phänotyp und eine verminderte Migrationsgeschwindigkeit.⁵² Es wurde zudem ein Zusammenhang zwischen elongierter, mesenchymaler Zellform und Level an aktivem Rac gezeigt sowie nach Aktivierung von Rac ein erhöhter Anteil elongierter Zellen.⁴⁸

Für Zellen in dreidimensionaler Matrix ist beschrieben, dass Rac insbesondere für die mesenchymale Form der Migration, d.h. für längliche Zellen die mit Hilfe von ECM-Proteolyse wandern, eine wichtige Rolle spielt.⁵³

1.1.1.2.2 Rho und ROCK

Rho induziert Stressfasern und fokale Kontakte bzw. Adhäsionen, die sich in einer gesteigerten Adhäsion der Zelle an die umgebende Matrix auswirken.⁵⁴

Rho aktiviert u.a. die Serin-Threonin-Kinasen ROCK-1 und ROCK-2 (wegen der hochgradigen Ähnlichkeit ihrer Sequenz werden sie im Folgenden generell als ROCK bezeichnet).⁵⁵ ROCK hemmt die Myosin-Light-Chain(MLC)-Phosphatase und führt so zu einer erhöhten Phosphorylierung der MLC.⁵⁶ Außerdem kann ROCK anstelle der MLC-Kinase die MLC selbst phosphorylieren und so Myosin II aktivieren. Myosin II interkaliert zwischen Aktinbündeln, und es kommt durch Verkürzung der Bündel zu Kontraktion.⁵⁷

Das zweite wichtige Protein, das durch ROCK aktiviert wird, ist die LIM-Kinase. Sie inhibiert Cofilin, das Aktin depolymerisiert, durch Phosphorylierung. Die Hemmung von Cofilin stabilisiert organisiertes F-Aktin wie z.B. Stressfasern oder kortikales Aktin.⁵⁸

Rho vermittelt zudem, wie Rac und Cdc42, Aktin-Polymerisation, wenn auch in geringerem Ausmaß.⁵⁹ Dies wird jedoch nicht über ROCK vermittelt, sondern über das Formin mDia.^{60, 61} In Kombination führen mDia-vermittelte Aktinpolymerisation und ROCK-vermittelte Actomyosinkontraktilität zu einer erhöhten kortikalen Rigidität und Zellspannung. Zellvermittelte Zugspannung führt, ebenso wie von außen durch Dehnung erzeugte Zugspannung, zur Bildung von Stressfasern und einer Verstärkung und Lebenszeitverlängerung fokaler Adhäsionen.⁶²

Für Einzelzellmigration in 3D-Matrices ist gezeigt worden, dass Rho und ROCK die sogenannte amöboide Form der Migration fördern. Bei dieser haben die Zellen eine rundliche Morphologie und wandern unter Bildung von „blebs“, d.h. blasenartigen Ausstülpungen, an der Oberfläche und unter Umständen ohne Matrixdegeneration. Für mesenchymale Migration hingegen scheint Rho/ROCK keine Rolle zu spielen.^{53, 63, 64}

Die kleinen GTPasen beeinflussen ihre Aktivität auch gegenseitig. So aktiviert Cdc42 Rac, d.h. Filopodien sind eng mit Lamellipodia verknüpft und treten häufig gemeinsam auf.⁶⁵ Rac und Rho/ROCK verhalten sich weitgehend antagonistisch. Rac hemmt Rho über die Bildung von ROS (Reactive Oxygen Species) und Aktivierung von p190RhoGAP^{51, 66} sowie durch Inaktivierung des GEFs NET-1⁶⁷. ROCK inhibiert Rac durch Aktivierung des Rac-spezifischen Filamins FilGAP sowie über ARHGAP22.^{48, 68} Es wurde zudem gezeigt, dass konstitutive Aktivierung von ROCK zur Verminderung von Rac-GTP, also aktivem Rac, führt.⁴⁸

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Zellplastizität und Migration das Zusammenspiel unterschiedlicher Signalwege und Regulatoren des Zytoskeletts erfordern. Im Zellinneren werden diese Vorgänge von den kleinen G-Proteinen Rho, Rac, Cdc42, ihren nachgeschalteten Effektoren und Aktin-bindenden Proteinen gesteuert.

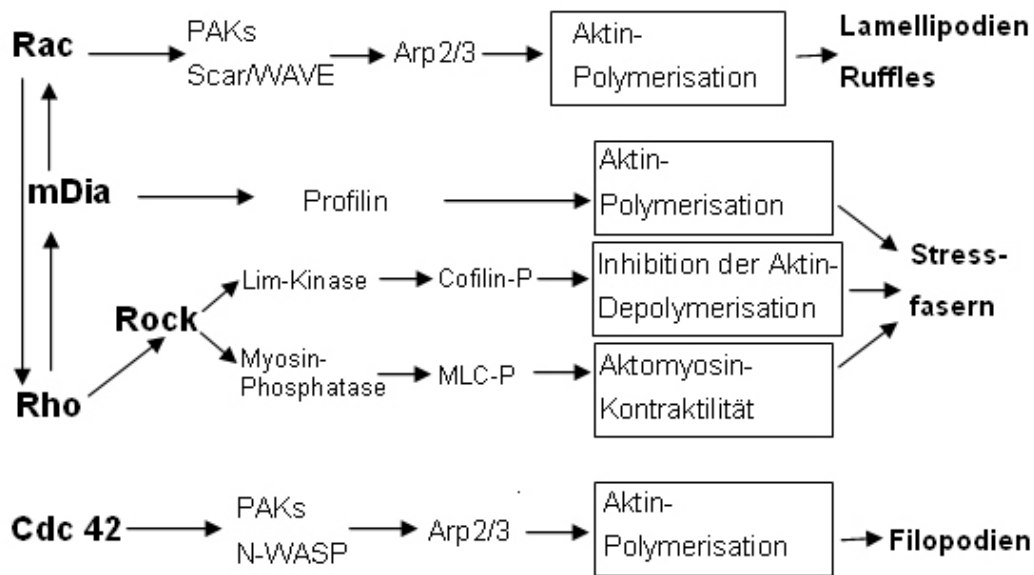


Abb. 4: Steuerung des Zytoskeletts durch Rac, Rho/ROCK und Cdc42.

1.1.2 Zelladhäsionsmoleküle und fokale Kontakte

Tumorzellen wandern innerhalb dreidimensionalen Gewebes. Zelladhäsionsmoleküle, insbesondere Integrine, stellen bei der Zellmigration eine temporäre Verbindung zwischen Zytoskelett und umgebender ECM her. Sie dienen sowohl als Anker als auch zur Signaltransduktion.⁶⁹⁻⁷¹

Integrine sind transmembrane Glycoproteine, die aus einer großen extrazellulären Domäne, einer einzelnen transmembranen Domäne, und einem kurzen zytoplasmatischen Ende bestehen.^{30, 72} Sie sind Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Nach der β -Untereinheit werden Integrin Subfamilien unterschieden.⁷³ Jede $\alpha\beta$ Kombination hat ihre eigene Bindungsspezifität an Komponenten der ECM, so bindet z.B. $\alpha2\beta1$ -Integrin fibrilläres Typ I Kollagen.⁷⁴

Integrine leiten Signale durch die Zellmembran hindurch in zwei Richtungen:

(1) Signale aus der Zelle vermitteln die Bindungskapazität der Integrine gegenüber der ECM („In-Out-Signalling“), (2) von der ECM ausgehende Signale werden mit Hilfe von Integrinen ins Zellinnere transduziert („Out-In-Signalling“).^{71, 75}

Die Signaltransduktion wird durch Integrin-bindende Adapter-Moleküle, wie z.B. die kleinen GTPasen, die Phosphoinositolphosphatase oder die Focal-Adhesion-Kinase

(FAK) vermittelt.^{1, 42} Die Verbindung von Integrinen, genauergesagt dem zytoplasmatischen Teil der β -Untereinheit, und dem Aktin-Zytoskelett erfolgt über aktinbindende Proteine wie z.B. Talin, Vinculin, α -Aktinin oder Paxillin.⁷⁶

Die Bindung der Integrin-Heterodimere an die ECM ist reversibel. Dies ermöglicht schnelle Änderungen der Konformation der Integrine und Cluster-Bildung.

Im Rahmen der Zellmigration löst die Berührung einer Zellprotrusion mit der ECM eine Anhäufung von Integrinen, Signalmolekülen und Elementen des Zytoskeletts aus, es bilden sich sogenannte Fokale Komplexe.⁴² Diese können zu stabileren, langlebigeren fokalen Adhäsionen reifen.⁷⁷ Bei der Zellmigration dissoziieren die fokalen Adhäsionen am Hinterende der wandernden Zellen wieder. Die frei gewordenen Integrine gelangen zum Vorderende der Zelle zurück, und ermöglichen so weitere Migration.⁷¹

Während die durch Integrine vermittelte Adhäsion sehr gut geklärt ist, ist über den Ablauf des „Loslassens“, der Ablösung einer Zelle von der ECM, bisher wenig bekannt. Man weiß, dass für die Auflösung einer fokalen Adhäsion das koordinierte Zusammenspiel von Aktin, Aktin-bindenden Proteinen, Signalmolekülen und Effektor-Enzymen wie Proteasen, Kinasen und Phosphatasen nötig ist. Es wurde weiterhin gezeigt, dass während der Ablösung des Hinterendes im Rahmen der Zellmigration Retraktionsfasern und Risse in der Zellmembran entstehen. Dadurch werden Stückchen von Zellmaterial, die auch Integrine enthalten, zurückgelassen.⁷⁸

1.1.3 Matrixverdau durch Proteasen

Eine Vielzahl von Proteasen, wie z.B. Metallo-, Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen, spielen bei der Interaktion von Zellen und ECM im Rahmen von physiologischen wie pathologischen Zellmigrations- und Gewebeumbauprozessen eine wichtige Rolle. Insbesondere die Familie der Matrix-Metalloproteasen (MMPs) enthält einige der wichtigsten Proteasen, die zum Abbau und Umbau der ECM im Rahmen der Tumorzellmigration beitragen.^{79, 80}

Die Familie der MMPs besteht aus 25 Mitgliedern, die in fünf Gruppen unterteilt werden. Während manche davon von der Zelle sezerniert werden, sind andere über Proteine in der Zellmembran verankert.^{12, 81} Die löslichen MMPs können direkt an Integrine binden.⁸² Die membrane-type MMPs (MT1-MMP – MT5-MMP)

durchspannen die Zellmembran, haben eine kurze, zytoplasmatische Domäne und kolo-
lokalisieren mit Integrinen die an Kollagenfasern adhären.^{83, 84} So reichern sich
MMPs in Regionen des Zellkontakts mit extrazellulären Substraten an, wie z.B. an der
Vorderfront migrierender Zellen und an fokalen Kontakten.⁸⁵

Kollagenasen, eine Gruppe der MMPs, sind neutrale Proteasen, die fibrilläres Kollagen
charakteristisch in $\frac{1}{4}$ und $\frac{3}{4}$ Fragmente spalten. Neben den Kollagenasen gibt es weitere
MMP-Gruppen, z.B. Stromelysine und Gelatinasen, welche sezerniert werden und zum
Abbau denaturierten Kollagens oder auch zur Aktivierung und Sekretion von
Wachstumsfaktoren beitragen. Die MMPs haben überlappende Substratspezifitäten und
zusammen können sie die meisten, wenn nicht alle Komponenten der ECM spalten.¹²

Im Rahmen der Tumorprogression werden viele der ECM-abbauenden Enzyme
hochreguliert und aktiviert, darunter MMPs, aber auch Serin-Proteasen und
Cathepsine.⁸⁶ Da diese Proteasen sowohl Basalmembran als auch fibrilläres Kollagen,
den Hauptbestandteil des Bindegewebes, abbauen, räumt man ihnen eine entscheidende
Rolle bei der Tumorzellinvasion ein.

1.2 Plastizität der Tumorzellmigration durch molekulare Interferenz

Die oben beschriebenen molekularen Mechanismen tragen zur mesenchymalen oder
amöboiden Migration von Zellen, insbesondere von Tumorzellen bei. Neben diesen
beiden Formen der Zellmigration wurden in molekularen Interferenzstudien auch
Übergangszustände dieser Migrationsformen beschrieben.

1.2.1 Hemmung von Oberflächenproteasen und Integrinen

Die fast vollständige Blockade sämtlicher Oberflächenproteasen verhindert nicht die
Migration mesenchymaler Zellen, sondern es wird ein Übergang in amöboide Migration
induziert. Während mesenchymale Tumorzellen länglich-spindelförmig mit Hilfe von
Matrix-Degeneration wandern, zeigen die proteaseinhibierten Zellen einen amöboiden
Phänotyp (mesenchymal-amöboider Übergang). Die nun rundlicheren Zellen migrieren
mit Hilfe morphologischer Adaptation (v.a. durch Bildung von Konstriktionsringen) an
die umgebende ECM ohne diese abzubauen.⁸⁷

Ein weiteres Beispiel für Übergangszustände stellt die Blockade von Integrinen in kollektiv wandernden Tumorzellverbänden dar. Durch Hemmung der Integrine und somit Schwächung der Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte, kommt es zur Loslösung einzelner Zellen und amöboider Einzelzellmigration (kollektiv-amöboider Übergang).^{88,}

89

Um diese Ausweich-Typen der Migration zu ermöglichen, muss sich die Plastizität der Zellen und damit das Zytoskelett anpassen. Es muss also intrazelluläre Mechanismen geben, die hier in Form und Funktion des Zytoskeletts eingreifen.

1.2.2 Interferenz mit Rho-GTPasen

Die Notwendigkeit eines intakten Aktin-Zytoskeletts für die Tumorzellmigration bot die Grundlage für eine Anzahl an Experimenten mit dem Ziel Tumorprogression und Metastasierung zu hemmen. Als aussichtsreiche Inhibitoren werden insbesondere Inhibitoren der kleinen G-Proteine bzw. ihrer Effektoren diskutiert.

Analysen von malignen Tumorzellen bzw. Tumorgewebe aus *in vivo* Modellen zeigen sowohl auf Genomebene⁹⁰ als auch auf Proteinebene^{91, 92}, dass bei invasiven Tumoren die Expression von Rho/ROCK hochreguliert ist. Es scheint also einen Zusammenhang zwischen Invasivität und Signalsteuerung durch Rho/ROCK zu geben.

Ähnliche Hinweise gibt es auch für Rac. *In vitro* Daten zeigen, dass konstitutiv aktives Rac ein gesteigertes metastatisches Potential hervorruft, während konstitutiv negatives Rac zu verminderter Invasivität führt.^{93, 94} Nach Inhibition von Rac wurde die Hemmung des mesenchymalen Phänotyps und mesenchymaler Migration sowie der Übergang in einen rundlichen, amöboid migrierenden Phänotyp beschrieben.⁴⁸

Es wurden zahlreiche Inhibitionsstudien insbesondere des Rho/ROCK Signalwegs durchgeführt.

In 2D Modellen fällt nach Inhibition von ROCK eine phänotypische Veränderung im Sinne der Ausbildung länglicher Protrusionen auf.^{95, 96} Bezüglich der Zellmigration sind die in 2D gewonnenen Daten uneinheitlich, großteils ist die Migration nach ROCK Inhibition gesteigert,⁹⁶⁻⁹⁹ in einzelnen Fällen jedoch inhibiert.^{100, 101}

Im 3D Modell ist eine Veränderung des Phänotyps nach Inhibition von Myosin-II bzw. von ROCK und MRCK (die ebenfalls zur Aktivierung der MLC führt) beschrieben. Die

sogenannte „Collapsed Morphology“ ist durch einen rundlichen Zellkörper und residuelle Fasern gekennzeichnet.⁶³ Diese Zellen zeigen auch eine gehemmte Invasion sowie Migration in einer 3D Matrix. Auch nach Hemmung von ROCK allein ist in 3D *in vitro* wie *in vivo* Invasion sowie Zellmigration deutlich reduziert.¹⁰² Es gibt Arbeiten die zudem den Einfluss einer ROCK-Inhibition auf Tumorzellen und deren Migration in Zusammenhang mit deren nativer Migrationform (rundlich oder länglich) bringen.^{48, 53, 103} Sanz-Moreno et al.⁴⁸ postulieren durch ROCK-Inhibition in rundlichen Melanomzellen die Konversion in einen mesenchymalen Phänotyp der auf 3D Kollagenmatrices elongiert migriert. Eine simultane Hemmung von ROCK und Rac *in vitro* führt zu einer verminderten Invasivität von Melanomzellen im 3D-Invasionsassay.⁴⁸ In *in vivo* Modellen wurde die Inhibition sowohl von ROCK als auch von Oberflächenproteasen als potentielle Therapiemöglichkeit untersucht, mit vielversprechenden ersten Ergebnissen.^{100, 104-106}

Um weitere Erkenntnisse über die Bedeutung von ROCK zu gewinnen, wurden eine Reihe an Studien mit konstitutiv aktivem ROCK durchgeführt. Konstitutive Aktivierung von ROCK resultiert demnach in einem rundlichen Phänotyp mit Verlust der Polarität.^{53, 97, 107} Die Migration ist *in vitro* in 2D sowie 3D Modellen (u.a. Boyden Kammer) vermindert.^{97, 108} Im *in vivo* Modell, in diesem Fall wurden Mäusen subkutan Colonkarzinomzellen injiziert aus denen Tumoren entstanden, resultierte konstitutiv aktives ROCK in aggressiver Tumorzell dissemination.¹⁰⁹

G-Proteine und ihre „Downstream“-Effektoren sind also als Schlüsselmoleküle der Zellplastizität Ziel von Versuchen mehr über Zellplastizität und –migration zu erfahren und werden auch als Ansatz für mögliche neue Therapien gegen Krebs gesehen.

1.3 Ziel der Studie

Nachdem der amöboide Phänotyp nach Proteaseinhibition und die amöboide Migration als mögliche „Ausweich“-Strategie von Tumorzellen nach molekularer Interferenz etabliert worden war⁸⁷, stellte sich die Frage ob durch gezielte Manipulation der kleinen GTPasen bzw. deren Effektoren der Übergang vom mesenchymalen zum amöboiden Phänotyp induzierbar ist. Während Daten zu 2D Modellen sowie 3D Matrigel vorlagen, war weitgehend unklar, wie Rho GTPasen die Migration von Tumorzellen durch

dreidimensionales interstitielles Kollagen modulieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob

- durch Hemmung von Rac ein amöboider Phänotyp induzierbar ist
- die Hemmung von ROCK den amöboiden Phänotyp verhindert
- in Zellen nach Inhibition von ROCK und Rac die Fähigkeit zur Migration und Interaktion mit der ECM erhalten ist.

Zudem sollte geklärt werden, welche Rolle Rac und ROCK für die Einzelzellmigration von Tumorzellen in einer dreidimensionalen Matrix spielen. Uns interessierten die morphologischen Korrelate zu den vorbeschriebenen Effekten in 3D (die meisten Vorarbeiten waren nur 2D) mit Zellplastizität, Verteilung von Aktin und Integrinen sowie die Effekte auf die Einzelzellmigration.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Produkt

Herkunft

Zellmigration und Kontraktionsassay:

DMEM	PAN, Heidenheim
PenStrep	Gibco BRL, Life technologies, Paisly, Schottland
FCS	Biowhittaker, Verviers, Belgien
RPMI	PAN, Heidenheim
G418	Calbiochem, Bad Soden
Hygromycin B	Calbiochem, Bad Soden
PBS	Life Technology, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat 7,5%	Sigma, Taufenkirchen
MEM	ICN, Meckenheim
Vitrogen (dermales bovines Kollagen)	Cohesion, Palo Alto, California
Poly-HEMA	Sigma, Taufenkirchen

FACS-Viabilitätsassay:

Collagenase I	Sigma, Taufenkirchen
Propidiumiodid	Sigma, Taufenkirchen

Transfektion und Transfektionsnachweis:

Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
ROCK-V14 Vektor ^{105, 110}	Y. Nishimura, Kyushu University, Japan
Cytofix/Cytosperm-Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Laemmli-Puffer	Sigma, Taufkirchen

Inhibitoren und Plasmide

Y-27632	Calbiochem, Bad Soden
Letales Toxin (<i>C. sordelii</i>)	H. Barth, Ulm
BB-2516 (Marimastat)	British Biotech, Oxford, UK
Pepstatin A	Sigma, Taufkirchen
Trans-Epoxy succinyl-L-leucyl- amide-(4-guanidino)butane(E 64)	Sigma, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	Molecular Probes, Leiden, NL

Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Primäre:

Phalloidin–Alexa 568	Molecular Probes, Leiden, NL
IgG1 Maus anti-human β 1 Integrin (4B4)	Coulter-Immunotech, Krefeld
IgG2a Maus anti-human β 1 Integrin (K20)	Coulter-Immunotech, Krefeld
COL ³ / ₄	Ibex Pharmaceuticals, Toronto, Canada
Anti-Flag-M2-FITC	Sigma, Taufkirchen

Sekundäre:

Ziege anti-Hase Alexa 488	Molecular Probes, Leiden, NL
Ziege anti-Maus CY5	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege anti-Hase FITC	Invitrogen, Karlsruhe
Calcein	Molecular Probes, Leiden, NL

Zelllinien:

HT1080-MT1	A. Strongin, The Burnham Institute, La Jolla, California
MV3 Humane Fibroblasten	G. van Muijen, Universität Nijmegen, NL Universitäts-Hautklinik, Würzburg

Ausrüstung:

Zentrifuge	Haereus Sepatech
Temperaturmessgeräte	Statop 4849
Rotlicht	Phillips
Mikroskope	DM-IL; Leica, Heidelberg
Kamera	VPC-175; Sony, Berlin
Digitales Aufnahmeprogramm	IsCap
Filmverarbeitung	Quick Time Player
Bildbearbeitung	Adobe Photoshop, Scion Image
Konfokalmikroskop	Leica, Bensheim
BD FACS Canto	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS DiVa	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Software	WinMDI
Zelltrackingprogramm	nach Gunzer et al., 2000 ¹¹

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Für die Experimente wurden verschiedene Zelllinien benutzt, die alle in einer Kollagenmatrix spontan migrieren. Neben invasiven und im Mausmodell metastatischen HT1080-MT1 Fibrosarkomzellen (HT-1080 Zellen, die MT1-MMP überexprimieren) und humanen MV3 Melanomzellen wurden für einige Kontrollversuche auch primäre

humane Vorhautfibroblasten eingesetzt. Die Fibroblasten und MV-3 Zellen wurden in RPMI (mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 1% Penicillin und Streptomycin) kultiviert. Die HT1080-MT1 Zellen, die eine G418-Resistenz tragen, in DMEM (mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 1% Penicillin und Streptomycin mit zusätzlich 0,2mg/ml G418).

Alle Zellkulturen wurden bei 37°C in feuchter 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert.

2.2.2 Inhibitoren und Reagenzien

Inhibition von Rac mit lethalem Toxin (*Clostridium sordelii*)

Rac wurde mit lethalem Toxin¹¹² gehemmt. Dieses bewirkt mit UDP-Glukose als Kosubstrat eine spezifische mono-O-Glycosylierung des Threonin-35 von Rac, was die GTPase Aktivität von Rac deutlich vermindert und die Bindung an nachgeschaltete Effektoren, wie z.B. PAKs, hemmt.^{112, 113} Lethales Toxin wurde in gleicher Konzentration (1µg/ml) vor Beginn der Polymerisation zu Kollagengelen und Mediumüberstand zugefügt.

Inhibition von ROCK mit Y-27632

ROCK wurde mit Y-27632 gehemmt. Der Inhibitor wurde, je in einer Konzentration von 20µM) vor Beginn der Migration Kollagengelen sowie Überstand zugefügt. Y-27632 gelangt durch erleichterte Diffusion ins Zellinnere und hemmt dort die GTPase-Aktivität von ROCK selektiv, vermutlich durch Bindung im aktiven Zentrum.⁹⁵

Proteaseinhibitoren

Zur Blockade oberflächlicher MMP-Proteasen wurde ein Inhibitor-Cocktail bestehend aus BB-2516 (=Marimastat) (100µM), Leupeptin (2µM), Pepstatin A (100µM), E-64 (250µM) und Aprotinin (2,2 µM) verwendet (wie beschrieben in Wolf et al., 2003⁸⁷). Der Proteaseinhibitorcocktail wurde vor den jeweiligen Experimenten frisch gemischt und in der jeweiligen Konzentration gleichermaßen vor Beginn der Polymerisation Kollagengelen und Überstand zugefügt.

2.2.3 Transfektion von HT1080-MT1 Zellen mit konstitutiv aktivem ROCK-V14

HT1080-MT1 Zellen wurden mit einem Plasmid, das sowohl konstitutiv aktives ROCK-V14 als auch ein Resistenzgen gegen Hygromycin enthält, transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit dem leeren Plasmidvektor ohne ROCK-V14 transfiziert (MOCK-Zellen).

Am Tag vor der Transfektion wurden HT1080-MT1 Zellen abgelöst und gezählt. Eine 6-Loch-Platte wurde mit 2 ml DMEM/Loch mit 10% FCS (ohne Antibiotikum) bei 37° vorinkubiert, und je $1,5 \times 10^5$ Zellen zugegeben. Die Transfektion erfolgte bei 80-90% Konfluenz mit Lipofectamin. Je 250µl DMEM wurden mit 4µg DNA bzw. 5µl Lipofectamin vermischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend vermischt, und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Lipid/DNA Komplex (500µl) wurde zum Überstand der Zellkulturen hinzugegeben und diese insgesamt 24 h bei 37°C inkubiert. Nach 4h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen abgelöst, mit frischem Medium passagiert und zur Selektion in 100µg/ml Hygromycin sowie 1mg/ml G418 kultiviert.

Die Transfektionseffizienz wurde nun durch Nachweis von ROCK-V14 mittels Durchflusszytometrie und Westernblot überprüft.

Für die durchflusszytometrische Darstellung der Expression transfizierten ROCK-V14 wurden die Zellen fünf Tage nach Transfektion mit EDTA abgelöst, mit BD Cytofix/Cytosperm Solution (1:1) inkubiert (20 min, 4°C) und nach zweimaligem Waschen in 1ml BD Perm/ Wash Solution für 30 Minuten mit 10µg/ml FITC-konjugiertem anti-Flag-M2-AK auf Eis inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden zweimal in 1ml BD Perm/ Wash Solution gewaschen, in 300µl PBS aufgenommen und die FITC Fluoreszenz am FACS gemessen. Als zusätzliche Kontrolle wurden mit BD Cytofix/Cytosperm Kit behandelte Zellen ohne anti-Flag-M2-AK mitgeführt.

Für den Westernblot wurden Zellsuspensionen aus untransfizierten, ROCK-V14 transfizierten und MOCK-Vektor transfizierten Zellen hergestellt, in Laemmli-Puffer lysiert und auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetragen. Als Marker für ROCK-Aktivität wurde phosphorylierte MLC gemessen, wie beschrieben in Itoh et. al 1999.¹⁰⁵

2.2.4 Herstellung von Zellkulturen in 3D Kollagenmatrices

Die 3D Kollagen Matrix Kulturen wurden hergestellt wie beschrieben.¹¹⁴ Das Bicarbonat-gepufferte Gel bestand aus dermalemem bovinem Typ I Kollagen (Vitrogen) und MEM (Minimal Essential Eagle's Medium). Das Kollagen war sensibel für eine Spaltung durch MT1-MMP und resistent gegen Trypsin, was seinen nativen Zustand bestätigt.⁷⁹ Die endgültige Kollagenkonzentration war 1,67mg/ml.

Adhärente, subkonfluente Zellen wurden mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} freiem PBS gewaschen, abgelöst mit EDTA (2 mM) (bzw. die Fibroblasten mit Trypsin/EDTA) für 10 min bei 37°C, in Medium/10% FCS resuspendiert und auf eine Zelldichte von $0,67 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Ein Volumenanteil Zellsuspension wurde dann mit zwei Volumenanteilen Kollagenlösung vermischt. Das Zell-Kollagen-Gemisch wurde dann vor der Polymerisation entweder in eine Migrationskammer (s.u.), oder 24-Loch -Platte gefüllt bzw. als Tropfen auf ein Deckgläschen pipettiert.

Um die Zellmigration in dreidimensionalen Kollagengelen zu beobachten, wurden Migrationskammern hergestellt. Ein Objektträger und ein Deckgläschen (22 x 22 mm) wurden an drei Seiten in einem Abstand von $\sim 500 \mu\text{M}$ mit einem Steg aus einem Gemisch aus Paraffin und Vaseline (1:1) verbunden. So blieb eine Seite offen um Zell-Kollagen Gemisch und Medium in die Kammer zu füllen. Die ungefähre Kammergröße betrug 20 x 20 x 0,5mm, was ein Volumen von $\sim 200 \mu\text{l}$ ergibt.

Je $100 \mu\text{l}$ Kollagen-Zell-Gemisch wurden in einer Migrationskammer für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Restvolumen der Kammer wurde dann mit $\sim 100 \mu\text{l}$ Medium aufgefüllt, 30 Minuten bei 37°C equilibriert, und mit Paraffin/Vaseline verschlossen. Für Inhibitionsversuche wurde der jeweilige Inhibitor (ROCK-Inhibitor Y-27632, Rac-Inhibitor LT, Protease-Inhibitoren) zur Kollagenlösung (vor der Polymerisation) wie auch zum Überstand hinzugefügt.

2.2.5 Zeitraffervideomikroskopie

Die Migration der Zellen in 3D Kollagenmatrices wurden mit inverser Lichtmikroskopie über CCD Kameras digital aufgenommen. Mit den Kameras verbundene PCs steuerten über das Programm Iscap die Aufnahme. Durch ein Infrarot-Heizsystem und Temperaturfühler wurde die Temperatur auf dem Objektisch konstant bei 37°C gehalten. Sowohl die Migrationskammern als auch die Temperaturfühler wurden mit Vaseline-Paraffin-Gemisch am Objektisch fixiert. Nach Fokussierung auf eine mittlere z-Position der Kollagenmatrix erfolgte die Zeitrafferaufnahme für ~20 h. Die Bildrate betrug 2,5 min für HT1080-MT1 Zellen und 5 min für MV 3 Zellen und Fibroblasten. Mit Hilfe des Quick Time Player wurden die Einzelbilder in Filme umgewandelt. Bei diesen werden die Bilder mit einer Frequenz von 10/sec abgespielt, so dass sich für die so entstandenen Filme eine Beschleunigung von 1350fach für die HT1080-MT1 Zellen und von 2700fach für die MV 3 Zellen und Fibroblasten ergibt. Zum Teil werden in der vorliegenden Arbeit auch Filme mit HT-1080-MT1 Zellen mit 2700facher Beschleunigung gezeigt um bestimmte Phänomene der Zelldynamik zu verdeutlichen (siehe Film-Legende, S. 71f).

2.2.6 Analyse der Zellviabilität durch Durchflußzytometrie

Um sicherzugehen, dass das Migrationsverhalten der Zellen nach 20 Stunden im Gel nicht durch Toxizität der Inhibitoren bzw. Schädigung der Zellen verändert wird, wurde regelmässig die Viabilität der Zellen nach einem Videomikroskopie-Versuch überprüft. Hierzu wurden die Kollagengele durch Zugabe von Kollagenase I (*Clostridium histolyticum*) bei 37°C und einer Inkubationszeit von 30 min verdaut. Die so freigesetzten Zellen wurden mit Propidiumjodid gefärbt und mit Flow Zytometrie analysiert, wobei die Viabilität dem Prozentsatz der nicht gefärbten Zellen entspricht.

2.2.7 Computerassistiertes Zelltracking und Analyse von Zellmigration und Zellform

2.2.7.1 Analyse der Zellmigration

Die Wanderungspfade der Zellen wurden mittels Computer-assistiertem Zelltracking¹¹⁴ in Raum und Zeit rekonstruiert. Nach zufälliger Auswahl von 40 Zellen wurde deren Position von Bild zu Bild mit dem Mauscursor verfolgt, d.h. „getrackt“. Die durchschnittliche Geschwindigkeit („Speed“) einer Zellpopulation zu einem Zeitpunkt entspricht der Addition aller Einzelschrittlängen geteilt durch die Anzahl der Zellen. Die durchschnittliche Geschwindigkeit einer Zelle über den Zeitverlauf ergab sich aus der Länge des zurückgelegten Pfades dividiert durch die dafür benötigte Zeit.

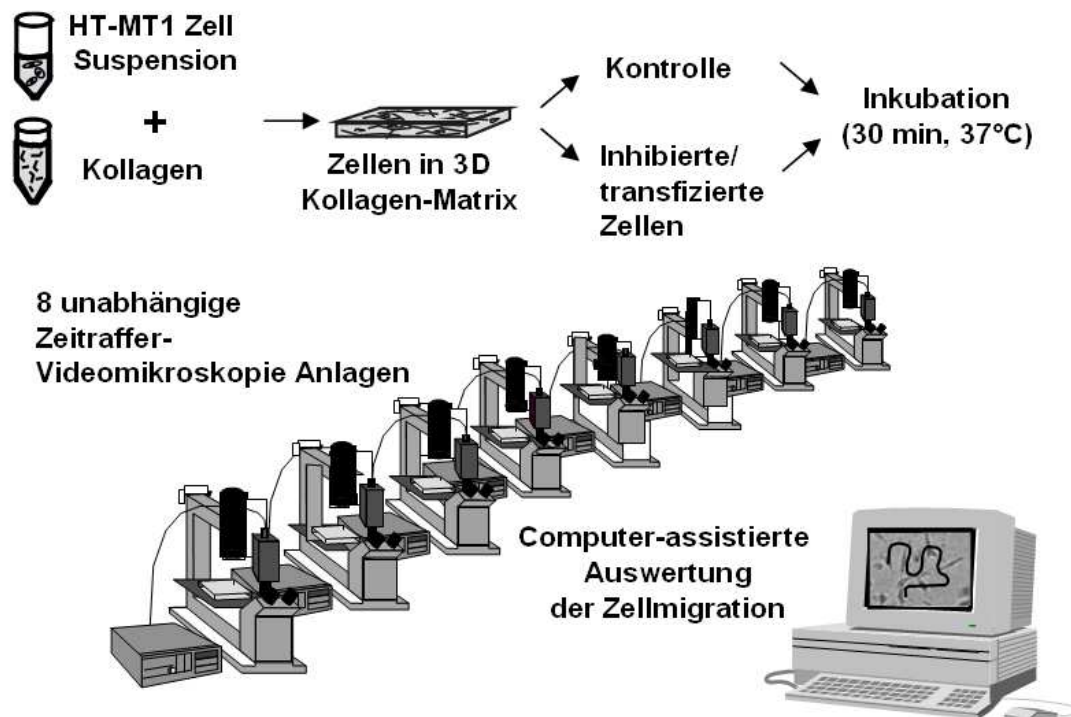


Abb. 5: Herstellung der 3D-Zell-Matrix-Gele, Zeitraffervideomikroskopie und Auswerten der Filme über Zelltracking.

2.2.7.2 Quantifizierung der Pseudopodlänge

Die Länge von Pseudopodien wurde an konfokalmikroskopischen Übersichtsaufnahmen von Calcein-gefärbten HT1080-MT1 Kontrollzellen und ROCK-inhibierten Zellen gemessen. Mit Hilfe des Programms Autocell wurde um die Zellkörper der einzelnen Zelle eine optimierte Ellipse gelegt („Ellipsenfiting“), die die Grenze zwischen Zellkörper und Pseudopod definierte. Die Distanz zwischen Ellipsenkante und Spitze des längsten Pseudopods je Zelle wurde von Hand ausgemessen.

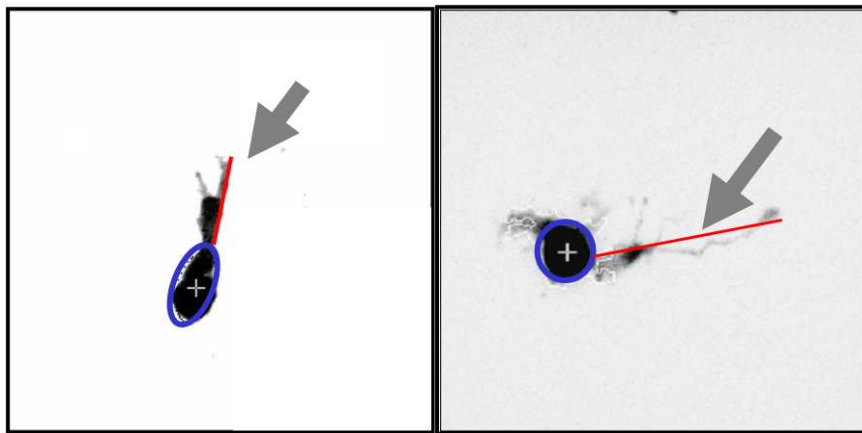


Abb. 6: Messen der Pseudopodlänge. Von der um den Zellkörper gelegten Ellipse (blau) aus wurde der jeweils längste Pseudopod manuell gemessen (rote Linie).

2.2.8 Kollagenkontraktion

Die Fähigkeit der Zellen die Kollagenmatrix zu kontrahieren wurde durch einen Kontraktionsassay quantifiziert. Hierzu wurde ein Zell-Kollagengemisch mit einer Zelldichte von 2,5 Mio/ml (siehe 2.2.4) in die Löcher einer mit Poly-Heme beschichteten 48-Loch-Platte gefüllt (300µl Endvolumen). Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die nun polymerisierten Gele mit je 300µl Medium überschichtet. Inhibitoren lagen im Gel wie auch im Überstand vor. Die Gele wurden jeweils nach ~2h, 6h, 24h und 48h photographiert. Als Maß für die Kontraktion wurden die Gelflächen mit Hilfe von Adobe Photoshop und Scion Image als Pixel gemessen und sind in Prozent der ursprünglichen Gelfläche wiedergegeben.

2.2.9 Konfokalmikroskopie

Fixierung

Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden Kollagen-Matrix-Kulturen wie unter 2.2.4 beschrieben hergestellt. Die Zelldichte betrug 33000/ml. Die Gele in Tropfenform wurden für 6h im Brutschrank inkubiert und anschließend fixiert. Hierfür wurden sie mit frisch hergestelltem vorgewärmtem PBS-gepuffertem Paraformaldehyd (PFA, 37°C, 30 min) inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen, und mit Antikörpern inkubiert.

Färbung der fixierten Kollagengele

Die Färbung von in PFA-fixierten Kollagengelen wurde in 6-Loch-Platten durchgeführt. Das Spülvolumen betrug 2-3 ml. Die Antikörperlösung von 100µl bedeckte als Tropfen die Probe.

Färbeprotokoll:

PFA	30 min	Fixierung
PBS	2 x 30 min	Spülen
COL ¾	120 min	Antigen-detektion bei 4°
PBS	2 x 30 min	Spülen
Ziege anti-Kaninchen-Alexa 488	60 min	fluoreszenzmarkiert bei 4°
PBS	2 x 30 min	Spülen
Phalloidin–Alexa 568	60 min	Antigen-detektion bei 4°, fluoreszenzmarkiert
PBS	2 x 30 min	Spülen
4B4 und K20	120 min	Antigen-detektion bei 4°
PBS	2 x 30 min	Spülen
Ziege anti-Maus CY5	60 min	Antigen-detektion bei 4°
PBS	2 x 30 min	Spülen
Aufbewahrung bei 4°C in PBS		

Darstellung mit Konfokalmikroskopie

Nach der Färbung wurden die Kollagengele auf ein Deckglas der Stärke Null gelegt und überflüssige Flüssigkeit entfernt. Das Deckglas wurde anschließend unter einem Objektträger mit Vaseline/Paraffin befestigt, und die so entstandene Kammer mit PBS/PFA gefüllt und verschlossen.

Die Proben wurden in einem inversen Konfokalmikroskop durch einen Laser angeregt, und drei Fluoreszenzkanäle sowie Transmission und Reflexion detektiert. Die so erhaltenen Einzelbilder wurden dreidimensional rekonstruiert (wie beschrieben in Maaser et al., 1999⁷⁴).

Lebendaufnahme

Neben den fixierten Zellen wurden auch konfokalmikroskopische Lebendaufnahmen von ROCK-inhibierten Zellen gemacht. Hierfür wurden wiederum Tropfengele mit einer Zelldichte von 33000 Zellen/ml hergestellt. Diese wurden mit 100µl Medium einschließlich 20µM Y-27632 und 1µM Calcein überschichtet und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Kollagengele wurden daraufhin in eine vorgewärmte Kammer mit equilibriertem Medium (ebenfalls mit 20µM Y-27632) eingebettet. Die Temperatur von 37°C wurde sowohl für den Transport zum Konfokalmikroskop als auch für die Zeit der Aufnahmen aufrechterhalten. Die Zellen wurden mit Zeitraffer-Laser-Videomikroskopie in 4 z-Ebenen (Volumen 10 – 12 µm) in 2,5 Minuten-Intervallen über eine Stunde aufgenommen. Hierbei wurden simultan Fluoreszenz, Transmission und Reflexion detektiert und als Mehrfarb-Zeitreihe rekonstruiert.

2.2.10 Analyse der zellulären Proteaseaktivität

Die Kollagenolyse dreidimensionaler Kollagenmatrices durch lebende Zellen wurde gemessen nach Wolf et. al 2003⁸⁷. Hierfür wurden 2% DQ FITC-Kollagen Typ 1 Monomere aus Rinderhaut mit Rattenschwanzkollagen co-polymerisiert (Endkonzentration 1,65mg/ml). Zellen in Medium ohne Phenol-Rot (1×10^5 Zellen/0,1 ml Medium/Loch), in die Kollagenmatrices einpolymerisiert und für 40 h darin kultiviert (37°C, 5% CO₂). Nach Zentrifugation der Zell-Kollagengele (15000 g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand, der freigesetztes FITC enthielt, mit

Spektrofluorometrie analysiert und in Bezug zu von Kollagenasen verdauter, zellfreier Kollagen-Matrix (100% Wert) gesetzt.

2.2.11 Zell-Sorting

Die ROCK-V14-transfizierten Zellen sowie die mit dem MOCK-Vektor transfizierten Zellen wurden in 2 Gruppen sortiert, eine mit hoher Expression von β 1-Integrin (β 1^{high}) und eine mit niedriger β 1 Expression (β 1^{low}). Hierfür wurden die HT1080-MT1-ROCK-V14 Zellen und die HT1080-MT1-MOCK Zellen auf 10 Mio/ml in D10 eingestellt und bei 0° C mit K20 (Verdünnung: 1:10) für 30 min gefärbt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und auf 4 Mio/ml eingestellt. Diese Zellen wurden mittels FACS-Sorting (FACS DiVa, Becton Dickinson) nach β 1-Integrin-Expression sortiert (ca. 10% Perzentilen). Die frisch gesorteten Zellen wurden gewaschen und in voräquilibriertem Medium mit G418 und Hygromycin über Nacht kultiviert, in Kollagen-Matrices eingebettet (siehe 2.2.4) und gefilmt (siehe 2.2.5).

3. ERGEBNISSE

Die in den Experimenten vorwiegend verwendeten HT1080-MT1 Fibrosarkomzellen sind ein etabliertes Modell der mesenchymalen Migration.⁸⁷ Im Gegensatz zur einleitend beschriebenen amöboiden Migration sind mesenchymal wandernde Zellen länglich und bewegen sich neben der Ausbildung von Pseudopodien und Kraftentwicklung des Zytoskeletts auch mit Hilfe von Oberflächenproteasen fort, die die umgebende Kollagenmatrix ab- und umbauen und so die Migration erleichtern. Es ist etabliert, dass eine Hemmung von Oberflächenproteasen zum Übergang in einen amöboid, nicht proteolytischen wandernden Phänotyp führt, der nun mit Hilfe diffus organisierter Zell-Matrix-Kontakte mittels Zellverformung durch das 3D Kollagenetzwerk wandert.⁸⁷ Mittels pharmakologischer Interferenz sollte nun versucht werden, welche weiteren Signalwege, insbesondere der Zytoskelettregulation, einen vergleichbaren Übergang von mesenchymal zu amöboid kontrollieren.

3.1 Hemmung der Zelldynamik durch Inhibition von Rac

Rac vermittelt durch Aktin-Polymerisation und Protrusion die Aktivität der Vorderfront der Zelle und Zellelongation. Daher sollte zunächst geklärt werden, ob Hemmung der Rac Aktivität in HT1080-MT1 Zellen zu einer rundlichen Form der Migration führt.

3.1.1 Hemmung der Migration

Die unbehandelnden HT1080-MT1 Kontrollzellen zeigten in den Zeitraffervideofilmen das bekannte, mesenchymale Migrationsmuster (Film 01). Fügt man nun den dreidimensionalen Kollagengelen mit den darin enthaltenen Zellen sowie dem Überstand lethales Toxin (*Clostridium sordelii*) zu, nahm die Migration der Zellen deutlich ab, so dass die Zellen aufgrund verbliebener Zytoskelettaktivität quasi auf der Stelle zappelten (Abb. 7; Film 02). Es zeigte sich eine Reduktion der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit um 90%, verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 7a).

Die Frage war nun, ob die Zellen sich durchschnittlich weniger bewegen, weil die Aktivität von Rac essentiell für eine intakte Migration ist, oder ob die Zellen durch LT absterben. Es wurde daraufhin ein Viabilitätsassay mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Dieser zeigte dass die Viabilität der dem LT ausgesetzten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen unverändert war (Abb. 7b). Dies legt nahe, dass die durch LT verursachte Reduktion der Migration eine direkte Folge der Inhibition der Rac-medierten Protrusion der Vorderfront der Zelle ist.

Es wurde zudem untersucht, ob eine partielle Inhibition von Rac durch niedrigere Dosen von LT noch andere phänotypische Veränderungen bringt. So behandelte HT1080-MT1 Zellen zeigten jedoch den mesenchymalen Phänotyp der Kontrollzellen (Daten nicht gezeigt). Dies lässt annehmen, dass der amöboide Phänotyp nicht das Ergebnis einer alleinigen „Down-Regulation“ von Rac ist.

3.1.2 Hemmung der Pseudopodentwicklung

Verglichen mit Kontrollzellen wiesen die mit LT inhibierten Zellen nicht mehr den typischen mesenchymalen Phänotyp auf, sondern waren rundlich ohne große Ausläufer, und lediglich in konfokalmikroskopischen Aufnahmen waren bei einem Teil der Zellen winzige, schwer erkennbare Pseudopodien vorhanden (Abb. 7c und 8b). Im Vergleich zu mesenchymal wandernden Kontrollzellen war ihre Polarität verloren, so dass Vorder- und Hinterende nicht mehr erkennbar waren. Somit führte LT zum Verlust des vorderen Pseudopods, der den Zug der Vorderfront vermittelt und damit die Marschrichtung der Zelle angibt.⁷⁹ Rac ist also für die Pseudopodienbildung und damit für die Entstehung von Polarität, der Basis für mesenchymale Migration notwendig.

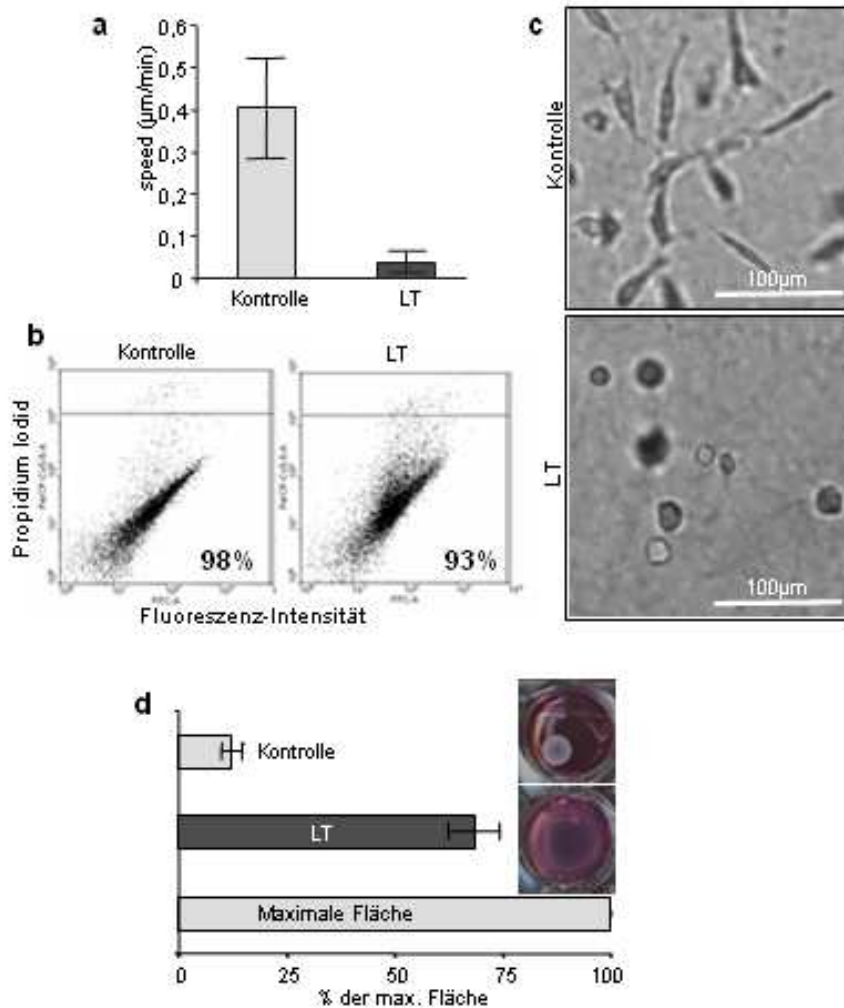


Abb. 7: Hemmung mesenchymaler Migration durch Inhibition von Rac durch lethales Toxin.
a. Durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von Kontroll- und inhibierten Zellen über 20 h. $p < 0.003$ (zweiseitiger t-Test für unabhängige Mittelwerte bezogen auf Unterschied zu unbehandelten Kontrollzellen). **b.** Viabilität der Zellen nach Behandlung mit LT. **c.** Zellmorphologie im Standbild digitaler Zeitraffervideomikroskopie nach 6h. **d.** Kollagenmatrixkontraktion nach 44 h Inkubationszeit. $p < 0.0001$ (zweiseitiger t-Test für unabhängige Mittelwerte bezogen auf Unterschied zu unbehandelten Kontrollzellen). (verwendete Konzentration: LT 1µg/ml)

3.1.3 Hemmung der Zell-Matrix-Interaktion

Mesenchymale Migration beinhaltet neben dem Zusammenspiel des Zytoskeletts in Form der Beweglichkeit der Zelle auch fokalisierte, Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Interaktionen, die über längere Zeit einen Matrixumbau bewirken. Damit einher geht in experimentellen Modellen die Kontraktion von 3D Matrices durch lebende Zellen. Um

den Effekt von Rac auf die Kraftentfaltung von HT1080-MT1 Zellen zu testen, wurden 3D Kollagenkontraktionsassays durchgeführt.

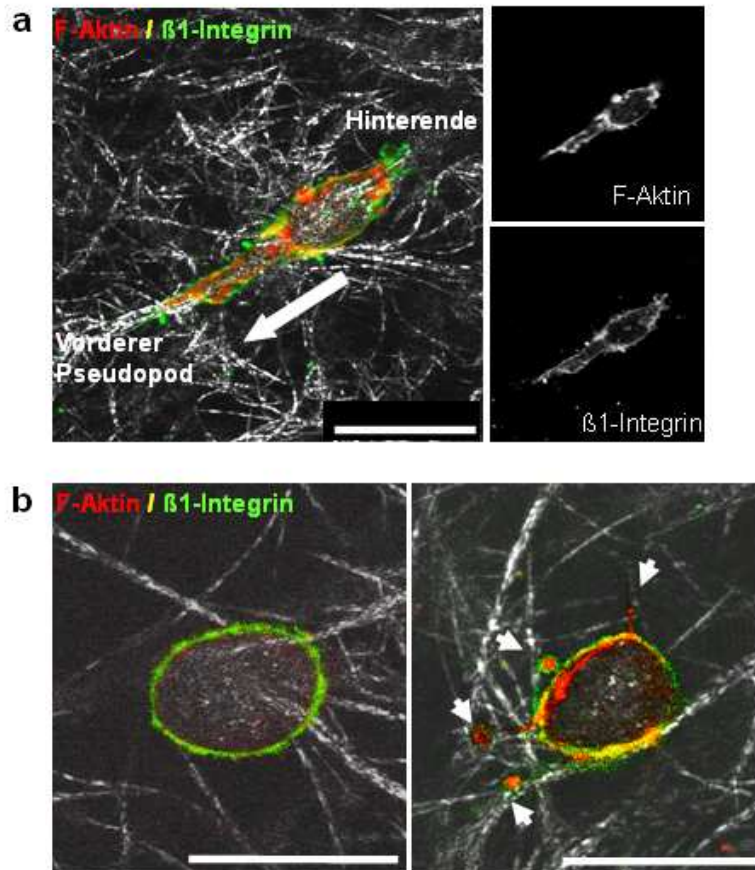


Abb. 8: Unterschiedliche Morphologie, F-Aktin- und β 1-Integrinverteilung in Kontroll- und Rac-inhibierten Zellen. Darstellung der F-Aktin und β -Integrin Verteilung in HT1080-MT1-Zellen in dreidimensionaler Kollagenmatrix. **a.** Unbehandelte Kontrollzellen. **b.** Mit LT (1 μ g/ml) inhibierte Zellen. Fixierung 6h nach Zugabe des Inhibitors. Gezeigt werden jeweils die Projektion 3-4 zentraler Schnitte der F-Aktin (rot) und β 1-Integrin (grün) Fluoreszenz sowie 2 Schnitte der Reflexion (grau). (Balken: 20 μ m)

HT1080-MT1 Kontrollzellen kontrahierten die sie umgebende Kollagen-Matrix auf 12% der ursprünglichen Größe, passend zu mesenchymaler Zell-Matrix-Interaktion und Kontraktilität. LT führte zu einer ausgeprägten Reduktion der Kontraktionskraft. So kontrahierten die Rac-inhibierten Zellen das Gel lediglich auf 69% der Ausgangsgröße, was einer Verminderung der Kontraktionskraft um 65% entspricht (Abb. 7d). Die

residuelle Kontraktionskraft könnte dadurch erklärt werden, dass Rac nicht alleine mesenchymale Migration und Kontraktilität aufrechterhält, sondern dass auch andere Steuermoleküle daran beteiligt sind, wie Rho und Cdc42, und diese ja noch intakt sind.

Um zu klären, wie die Form und molekulare Struktur der Zell-Matrix-Interaktionen durch LT verändert wurden, erfolgten konfokalmikroskopische Aufnahmen.

In Kontrollzellen waren filamentöses Aktin und $\beta 1$ -Integrine vor allem kortikal verteilt, an Interaktionsstellen mit der ECM lagen sie in Clustern vor (Abb. 8a). In LT behandelten Zellen lagen Aktin und Integrin zwar auch kortikal vor, jedoch stark gleichmäßig entlang des Kortex verteilt und ohne Ausbildung von Fokalisierungen trotz Kontakt zu Kollagenfasern. Die Rac inhibierten Zellen zeigten zwei Phänotypen:

(1) runde Zellen ohne Protrusionen, (2) Zellen mit aktin-reichen, abortiven Protrusionen und Kontakten mit Kollagenfasern, jedoch ohne Polarität der Zellen (Abb. 8b).

Die Befunde legen nahe, dass LT über Rac dynamische Protrusionen und Zell-Matrix-Interaktionen inhibiert, so dass die Zellen nunmehr nur geringe Kraft auf sie umgebende Kollagenfasern ausüben können. Andererseits zeigt dies, dass in Tumorzellen in 3D Kollagenmatrices die protrusive Aktivität des Zytoskeletts über Rac gesteuert wird, dieses also eine Voraussetzung für Zellelongation und Kraftvermittlung ist.

3.2 Modulation/Plastizität der Zelldynamik durch ROCK-Inhibitor

Von Rho/ROCK vermittelte Signale fördern sowohl die Kontraktilität der Zelle als auch fokale Adhäsionen, greifen also auf verschiedene Weise in Zell-Matrix-Interaktionen ein. Daher sollte geklärt werden, ob Hemmung bzw. Aktivierung dieses Signalweges die Migrationsform in HT1080-MT1 Zellen verändert.

3.2.1 Hemmung der Zellmigration

HT1080-MT1-Zellen wurden mit Y-27632 (20 μ M) inkubiert, das ROCK, vermutlich durch Bindung im aktiven Zentrum,⁹⁵ kompetitiv inhibiert.

In Vergleich zu Kontrollzellen führte die Behandlung mit Y-27632 zu zwei wesentlichen Veränderungen: (a) während die Migration des Zellkörpers nahezu vollständig gehemmt war, bildeten sich (b) mehrere dünne Pseudopodien aus, die sich

aktiv vom Zellkörper weg bewegten. Mit Y-27632 inhibierte Zellen oszillierten bei einer Geschwindigkeit von $0,08 \mu\text{m}/\text{min}$ auf der Stelle (Abb. 9a), jedoch ohne Einbuße der Viabilität (Abb. 9b).

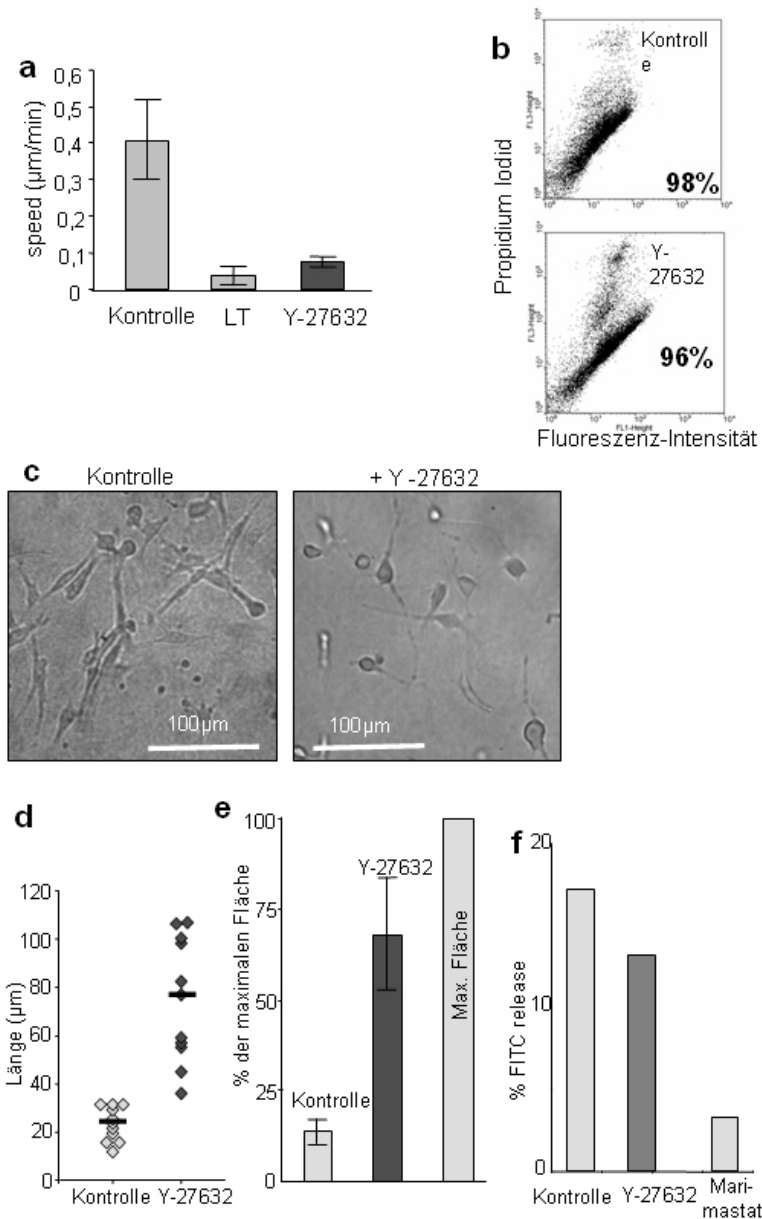


Abb. 9: Entstehung eines sessilen, dendritischen Phänotyps mit erhaltener Proteolysefähigkeit nach Inhibition von ROCK durch Y-27632. a. Durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von Kontroll-, Rac- und ROCK-inhibierten Zellen über 20 h. $p < 0,008$ (zweiseitiger t-Test für unabhängige Mittelwerte bezogen auf Unterschied Y-behandelter zu unbehandelten Kontrollzellen) **b.** Prozentualer Anteil viabler Zellen. **c.** Phänotyp der HT1080-MT1 Zellen im Standbild digitaler Zeitraffervideomikroskopie nach 6h. **d.** Länge des jeweils längsten Pseudopods. $p < 0,0011$ (Mann-Whithney-U-Test) **e.** Kollagenmatrixkontraktion nach 44h Inkubationszeit. $p < 0,0001$ (zweiseitiger t-Test für unabhängige Mittelwerte bezogen auf Unterschied zu unbehandelten Kontrollzellen) **f.** Proteolysefähigkeit der HT1080-MT1 Zellen. (verwendete Konzentrationen: LT: $1\mu\text{g}/\text{ml}$, Y-27632: $20\mu\text{M}$, Marimastat $10\mu\text{M}$)

3.2.2 Induktion eines dendritischen Phänotyps

Die Morphologie der sessilen Zellen zeigte wesentliche Veränderungen im Vergleich zu HT1080-MT1 Kontrollzellen. Ursprünglich länglich-mesenchymale HT1080-MT1 Zellen entwickelten einen runden Zellkörper mit Dendriten-ähnlichen, langen, dünnen Pseudopodien (Abb. 9c, 10a, 10b). Die quantitative Rekonstruktion zeigt, dass die Länge dieser Ausläufer um ein Vielfaches die Werte von HT1080-MT1 Kontrollzellen übersteigt, somit ein anderer, morphologisch dendritischer Phänotyp entstand (Abb. 9d). Zeitraffervideoaufnahmen (Film 03) und konfokalmikroskopische Lebendaufnahmen (Film 04) ließen eine ausgeprägte Dynamik der dendritischen Pseudopodien erkennen. Im Gegensatz zum sessilen, rundlichen Zellkörper bewegten sich die multipolaren Ausläufer zumeist protrusiv nach aussen. Es kam kaum zu Retraktion, so dass sich kein Hinterende bilden bzw. nachgezogen werden konnte und die Zelle folglich keine Richtung einnehmen konnte.

Diese Beobachtungen lassen annehmen, dass durch Inhibition von ROCK die Zelle aufgrund veränderter Signalkaskaden einen neuen, dendritischen Phänotyp annimmt. Trotz zahlreicher hochdynamischer Pseudopodien fehlt die Fähigkeit zur Migration, was sehr wahrscheinlich auf die fehlende Polarität der Zelle zurückzuführen ist.

Die Induktion eines ähnlichen sessilen, dendritischen Phänotyps ließ sich auch für humane Vorhautfibroblasten sowie für die maligne Melanomzelllinie MV3 reproduzieren (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Struktur des Aktin-Zytoskeletts nach Inhibition von ROCK

Nun wurden in mit Y-27632 behandelten Zell-Kollagengelen F-Aktin und β 1-Integrin angefärbt.

Konfokalmikroskopisch zeigte der dendritische Phänotyp wiederum multipolare Ausläufer (Abb. 10b, Pfeile). In der F-Aktin Färbung wurde eine Ungleich-Verteilung des Aktins zugunsten der dendritischen Pseudopodien deutlich. β 1-Integrin war in den ROCK inhibierten Zellen teilweise fokalisiert, ebenso F-Aktin. Die Lokalisation der langen dünnen Pseudopodien verlief teils entlang von Kollagenfasern, teils jedoch auch quer zum Kollagenfaserverlauf (Abb. 10b).

Um die Funktionalität eines ROCK-inhibierten Aktin-Zytoskeletts zu untersuchen, wurde ein Kollagen-Kontraktionsassay durchgeführt. Während die HT1080-MT1 Kontrollzellen ein Kollagengel auf 14% der Ausgangsfläche kontrahierten, führte die ROCK-Inhibition zu einer Kontraktion auf nur 68% (Abb. 9e).

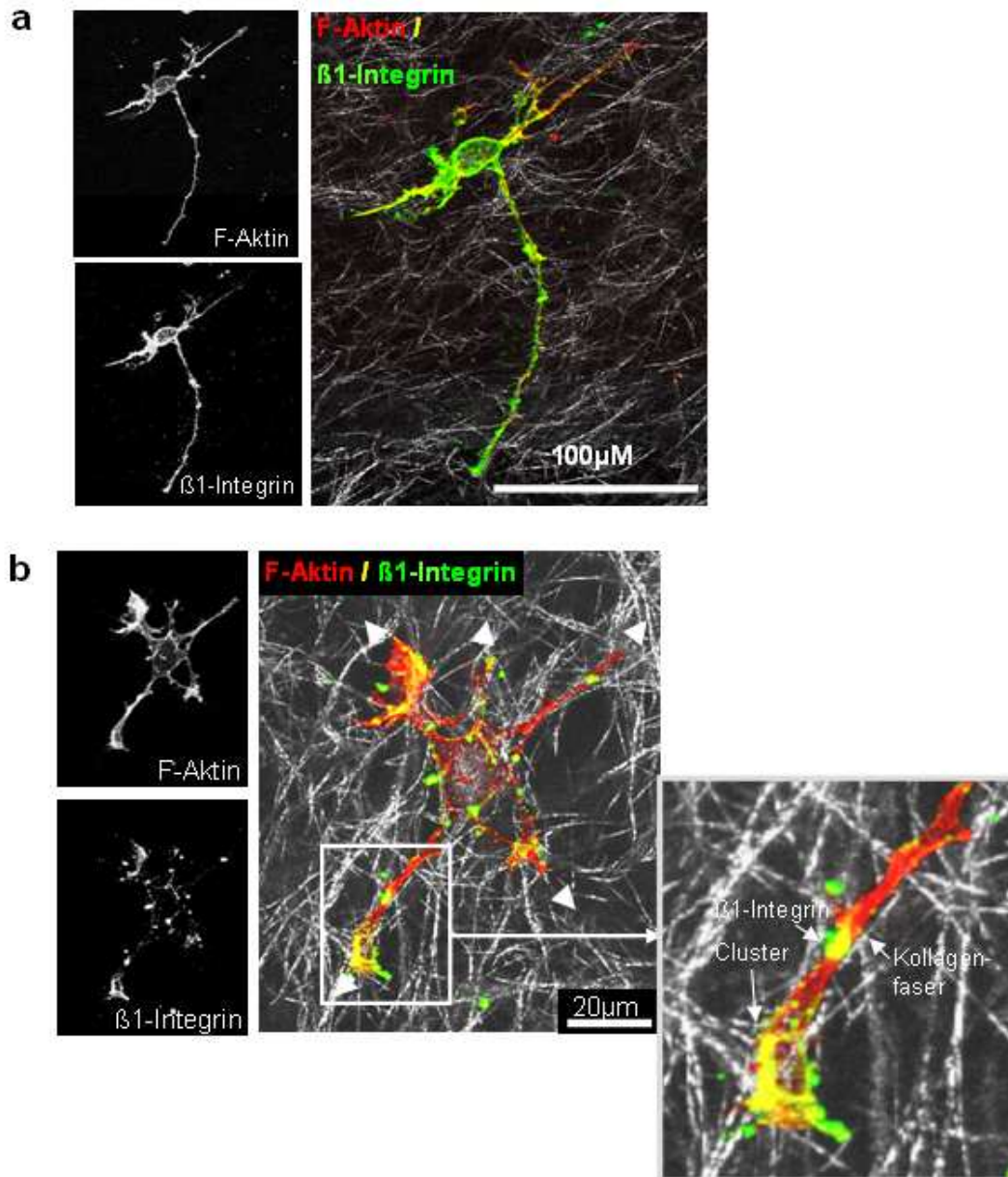


Abb. 10: Veränderte Morphologie, F-Aktin und β 1-Integrin Verteilung in ROCK-inhibierten HT1080-MT1-Zellen. Darstellung der F-Aktin und β -Integrin Verteilung in dreidimensionaler Kollagenmatrix. **a.** Dendritischer Phänotyp mit langen Pseudopodien **b.** Dendritische Zelle mit multipolaren Pseudopodien (Pfeile). Fixierung jeweils 6h nach Zugabe von 20 μ M Y-27632. Gezeigt werden jeweils die Projektion 4-5 zentraler Schnitte der F-Aktin (rot) und β 1-Integrin (grün) Fluoreszenz sowie 2 Schnitte der Reflexion (grau).

Zusammenfassend legen die Befunde nahe, dass durch eine Hemmung von ROCK eine Verminderung der Aktomyosinkontraktilität bei erhaltener Protrusion und Wachstum von Pseudopodien vorliegt. Dies resultiert in einem dendritischen Phänotyp, vergleichbar Zellen die mangels Kontraktilität entlang der Matrix „zerfließen“. Dies führt zu ungenügender Polymerisierung und Kontraktilität für die Migration wie auch geringem Kraftaufbau zur Matrixkontraktion.

3.2.4 Perizelluläre Proteolyse trotz Inhibition von ROCK

Mittels Anfärben von Kollagen-Spaltprodukten (COL $\frac{3}{4}$) wurde zelluläre Proteolyse konfokalmikroskopisch dargestellt. Die Aufnahmen zeigten, dass in den dendritischen Zellen entlang der Pseudopodien Kollagenolyse stattfindet, also Oberflächenproteasen aktiv sind (Abb. 11b). Bei den HT1080-MT1 Kontrollzellen konnte Proteolyse nicht nur an der Oberfläche der Zelle nachgewiesen werden, sondern auch entlang des Migrationspfads am Hinterende der Zelle (Abb. 11a). Im Gegensatz dazu zeigten die Y-27632 behandelnden Zellen Kollagenolyse nur in der unmittelbaren Umgebung der Zelle (Abb. 11b). Dies ist sehr wahrscheinlich auf die fehlende Migration dieser Zellen zurückzuführen.

Die Quantifizierung der Proteolyse von Kontrollzellen und dendritischen Zellen zeigte, dass bei letzteren die Fähigkeit zur Proteolyse nur unwesentlich vermindert ist (Abb. 9f). Im Gegensatz dazu sind die Zellen, wie oben beschrieben, sessil. Dies lässt darauf schließen, dass die ausbleibende Migration der ROCK-inhibierten Zellen nicht auf die mangelnde Fähigkeit der perizellulären Proteolyse zurückzuführen ist.

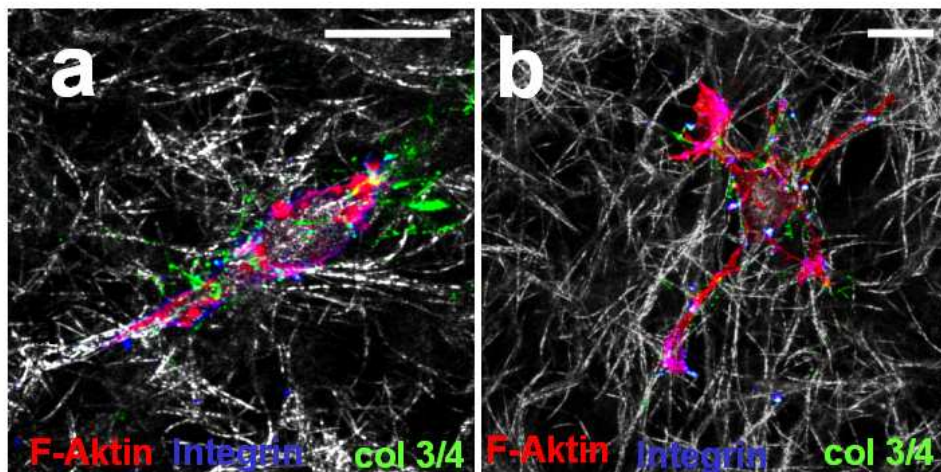


Abb. 11: Darstellung der Kollagenolyse nach Inhibition von ROCK. a. HT1080-MT1 Kontrollzelle, fixiert 6 h nach Inkubation in der Kollagenmatrix. **b.** ROCK-inhibierte Zelle, fixiert 6h nach Inhibition mit 20 μ M Y-27632. Gezeigt werden jeweils die Projektion 3-5 zentraler Schnitte der F-Aktin (rot), β 1-Integrin (blau) sowie COL $\frac{3}{4}$ (grün) Fluoreszenz sowie 2 Schnitte der Reflexion (grau). (Balken: 20 μ m)

3.3 Bimodale Inhibitionsstrategien

3.3.1 Inhibition von Rac und ROCK

Als nächster Schritt wurden Rac und ROCK in HT1080-MT1 Zellen simultan inhibiert. Morphologisch zeigten sich die Zellen in Zeitraffervideoaufnahmen (Film 05) wiederum sessil. Die Migration war erneut fast vollständig gehemmt. Vergleicht man die residuelle durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von simultan inhibierten Zellen (0,01 μ m/min) mit der ROCK- bzw. Rac-inhibierter Zellen (0,08 bzw. 0,04 μ m/min respektive), so scheint sich bei simultaner Inhibition ein additiver Effekt auf die Migrationsgeschwindigkeit zu ergeben (Abb. 12a).

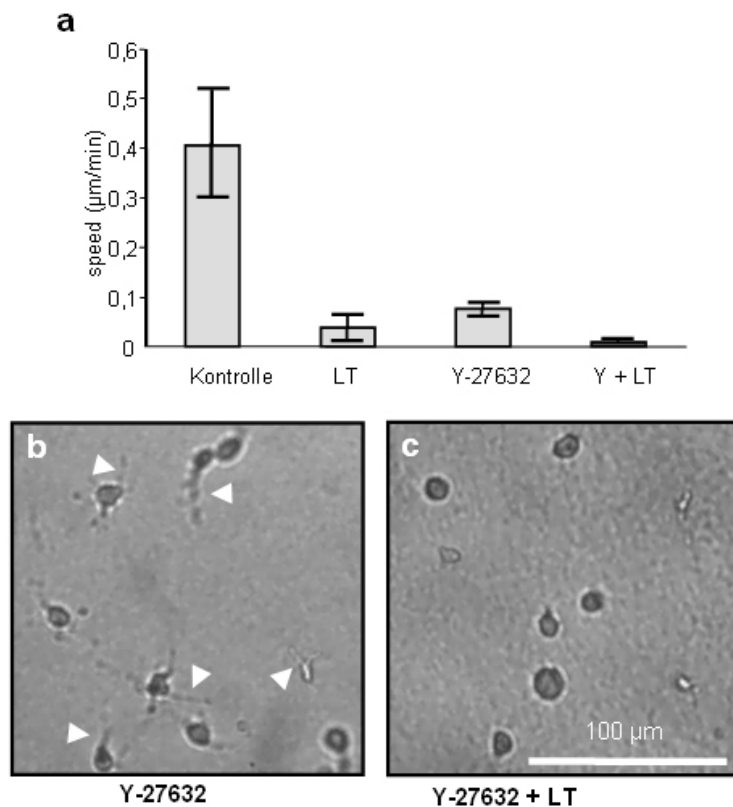


Abb. 12: Additive Hemmung mesenchymaler Migration durch simultane Inhibition von Rac und ROCK. **a.** Durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit der Zellpopulation über 20h. $p < 0.007$ (zweiseitiger t-Test für unabhängige Mittelwerte bezogen auf Unterschied simultan Y-27632 (20µM) und LT-inhibierter (1µg/ml) Zellen zu unbehandelten Kontrollzellen). **b, c.** Standbilder digitaler Zeitraffervideomikroskopie nach 20 h. **b.** ROCK-inhibierte Zellen mit typischen dendritischen Pseudopodien (Pfeile). **c.** Phänotyp nach simultaner Inhibition. Balken 100µm.

Phänotypisch zeigten die bimodal inhibierten Zellen rundliche Zellkörper mit zarten Pseudopodien, die deutlich schwächer ausgeprägt waren als beim dendritischen Phänotyp nach ROCK-Inhibition (Abb. 12b, c). Dies wurde besonders in Zeitraffervideoaufnahmen deutlich (Film 05 und 06). Hier zeigten sich zudem die residuellen Pseudopodien der simultan inhibierten Zellen hochdynamisch (Film 05). Konfokalmikroskopisch war zu erkennen, dass die Residual-Pseudopodien sich weitgehend parallel zu Kollagenfasern orientierten (Abb. 13, Pfeile). F-Aktin zeigte, wie auch bei den ROCK-inhibierten Zellen, eine Umverteilung zugunsten der Pseudopodien gegenüber des rundlichen Zellkörpers. Dieser zeigt jedoch dennoch ein lineares intaktes Zytoskelett. Es ließen sich Integrincluster darstellen, was darauf schließen lässt, dass fokale Substratinteraktionen erhalten waren (Abb. 13).

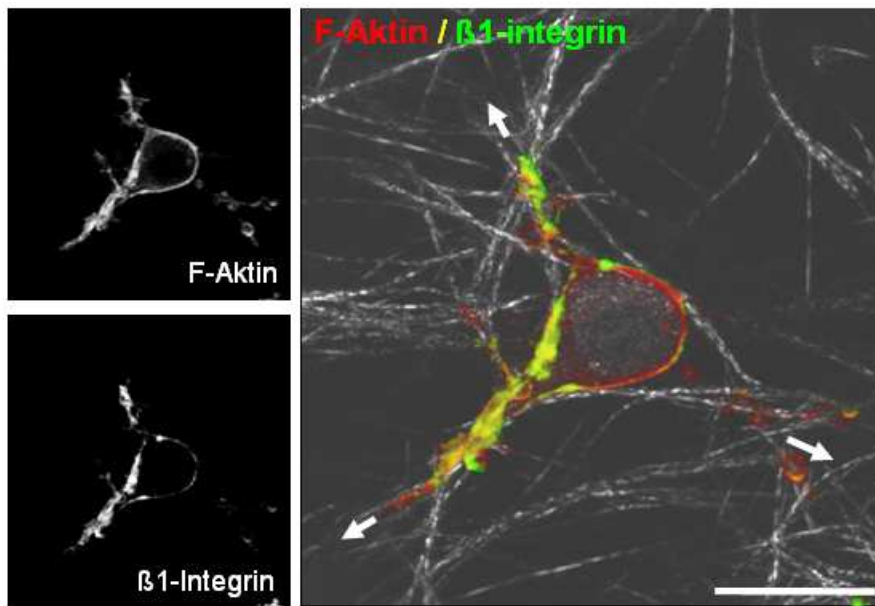


Abb. 13: Abortiver, dendritischer Phänotyp durch simultane Inhibition von ROCK und Rac in HT1080-MT1 Zellen. Darstellung der F-Aktin (rot) und β 1-Integrin (grün) Verteilung in dreidimensionaler Kollagenmatrix. Inhibition mit LT ($1\mu\text{g/ml}$) und Y-27632 ($20\mu\text{M}$). Fixierung 6h nach simultaner Zugabe der Inhibitoren. Gezeigt werden die Projektion 4 zentraler Schnitte der F-Aktin (rot) und β 1-Integrin (grün) Fluoreszenz sowie 2 Schnitte der Reflexion (grau).

Zusammenfassend induziert die simultane Inhibition von Rac und ROCK in HT1080-MT1 Fibrosarkomzellen einen sessilen, abgeschwächt „dendritischen“ Phänotyp.

Die bimodale Hemmung der Zytoskelett-Steermoleküle führt somit funktionell zu einer über-additiven Reduktion der Migration der Fibrosarkomzellen.

3.3.2 Inhibition von ROCK in Protease-inhibierten, amöboiden Zellen

In HT1080-MT1 Zellen wird durch Inhibition von Oberflächenproteasen ein Übergang des mesenchymalen in einen amöboid wandernden Phänotyp induziert.⁸⁷ Es sollte nun untersucht werden, ob eine simultane Inhibition von Oberflächenproteasen und ROCK in HT1080-MT1 Zellen die mesenchymal-amöboide Transition verhindert.

In den Zeitraffervideoaufnahmen war zu erkennen, dass durch Zugabe des Proteaseinhibitor-Cocktails allein der vorbeschriebene amöboide Phänotyp induziert wurde (Film 07). Simultane Inhibition von ROCK führte dagegen zum Verlust des amöboiden Phänotyps, die Zellen zeigten den bekannten dendritischen, sessilen Phänotyp (Film 08).

Konfokalmikroskopisch zeigten die Zellen nach Inhibition von ROCK und Oberflächenproteasen eine Umverteilung des Aktins zugunsten der Pseudopodien und ließen erhaltene Integrincluster erkennen (Abb. 14).

Diese Befunde lassen darauf schließen, dass die Steuerung durch ROCK nicht nur zur Aufrechterhaltung des mesenchymalen Phänotyps sondern auch für den amöboiden Phänotyp und amöboide Migration notwendig ist. Während die Fähigkeit zur Matrixdegradation für die Zellmigration nicht unabdingbar ist, ist die ROCK-vermittelte Actomyosinkontraktilität essentiell.

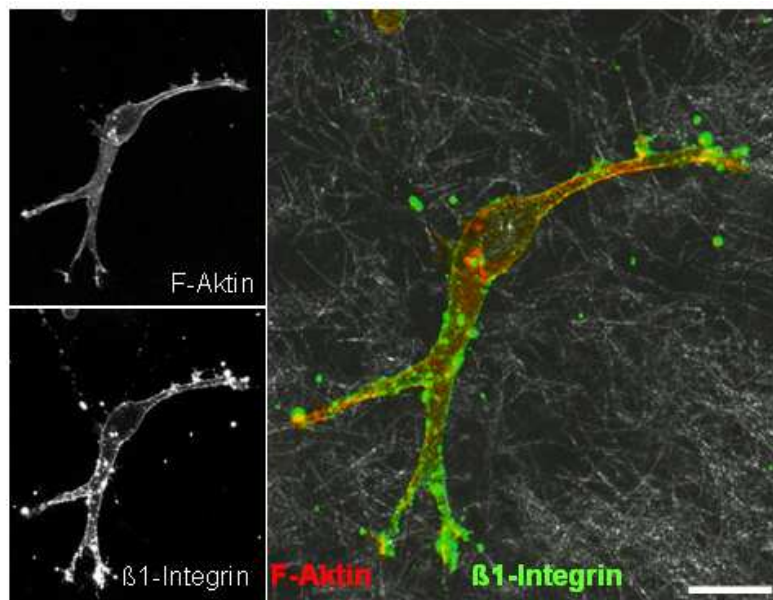


Abb.14 Dendritischer Phänotyp nach simultaner Inhibition von ROCK und Oberflächenproteasen. Fixierung 6 h nach Zugabe des Proteaseinhibitorcocktails und Y-27632 (20 μ M). Gezeigt werden die Projektion 4 zentraler Schnitte der F-Aktin (rot) und β 1-Integrin (grün) Fluoreszenz sowie 2 Schnitte der Reflexion (grau). Balken: 20 μ m

3.4 Steigerung der Actomyosin-Kontraktilität durch konstitutiv aktives ROCK

3.4.1 Transfektion und Funktionalität von ROCK-V14

Nachdem die Inhibition von ROCK ausgeprägte Auswirkungen auf Morphologie und Funktionalität der HT1080-MT1 Fibrosarkomzellen hatte, sollte untersucht werden, welche Effekte durch konstitutiv aktives ROCK entstehen.

Hierzu wurden HT1080-MT1 Zellen mit ROCK-V14^{105, 110, 115} transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels anti-Flag-M2-FITC Antikörper des ROCK-V14-Konstrukts durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb. 15a). Das Expressionsniveau von ROCK nach Transfektion mit ROCK-V14 wurde im Western-Blot anhand phosphorylierter MLC20 (P-MLC20) nachgewiesen. ROCK phosphoryliert selektiv die MLC an Position Serin-20, somit kann über das Niveau von P-MLC20 direkt auf den Aktivierungszustand von ROCK geschlossen werden.¹⁰⁵

Mit ROCK-V14 transfizierte Zellen zeigen eine deutlich stärkeres Signal für P-MLC20 als native HT1080-MT1 oder mit Kontrollplasmid (MOCK-)transfizierte Zellen. Im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollzellen war nach Inhibition von ROCK mit Y-27632 der Anteil an P-MLC stark vermindert (Abb. 15b).

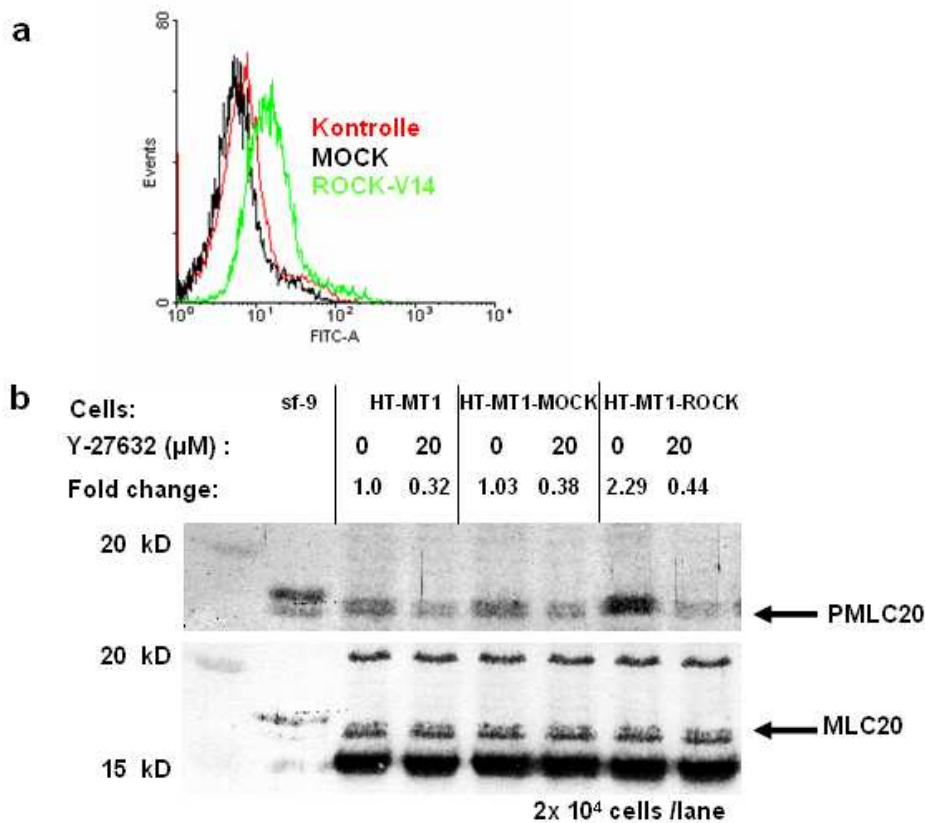


Abb. 15: Nachweis der ROCK-V14 Transfektion in HT1080-MT1 Zellen. a. Mittels FACS-Analyse. b. Nachweis von P-MLC als Indikator für ROCK-Aktivität im Westernblot in Kontroll-, MOCK- und ROCK-V14-Zellen, jeweils nativ und nach Zugabe von Y-27632 (20 μM).

3.4.2 Hemmung der Migration

Mittels Zeitraffervideomikroskopie wurden ROCK-V14 Zellen mit MOCK-transfizierten Kontrollzellen verglichen und auf Zellmorphologie und Migrationseffizienz hin untersucht. HT1080-MT1 Zellen nach Expression von konstitutiv aktiven ROCK zeigten eine deutliche Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit (0,12 $\mu\text{m}/\text{min}$), verglichen mit MOCK-transfizierten Kontrollzellen (0,34 $\mu\text{m}/\text{min}$) (Abb. 16).

Dieser Befund lässt darauf schließen, dass konstitutiv aktives ROCK die Zellmigration beeinträchtigt.

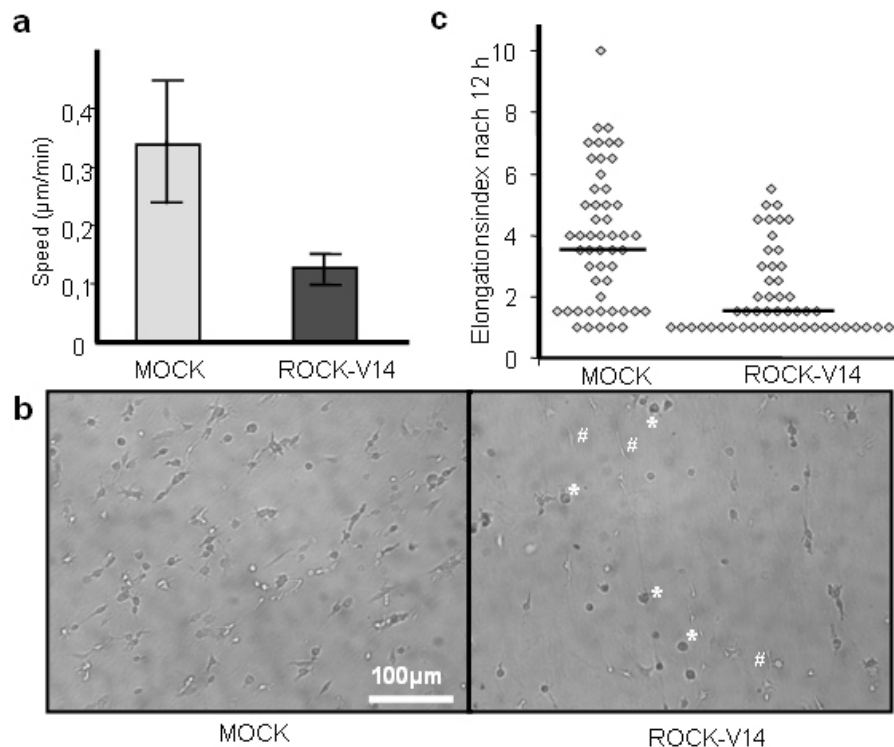


Abb. 16 Veränderung von HT1080-MT1 Zellen nach Transfektion mit konstitutiv aktivem ROCK.
a. Verminderung der Migrationsgeschwindigkeit. $p < 0.018$ (zweiseitiger t-Test für unabhängige Mittelwerte bezogen auf Unterschied zu MOCK-transfizierten Kontrollzellen). **b.** Population mit runden (*) und länglichen (#) Zellen. **c.** Elongationsindex (Länge/Breite) von MOCK- und ROCK-V14 Zellen im Vergleich (Median (ROCK-V14) = 1, Median MOCK = 3,5)

3.4.3 Heterogenität von Zellform und Zytoskelettfunktion: rundliche und elongierte Phänotypen

Zeitraffervideofilme von ROCK-V14-Zellen vermitteln den Eindruck einer zweigeteilten Zellpopulation: (1) amöboid-rundliche, „blebbende“ (d.h. dynamische, blasenartige Ausläufer bildende) Zellen, und (2) langgezogene, mesenchymale Zellen. (Film 09; Abb. 16b). In einem Pilotversuch wurde der Elongationsindex von ROCK-V14-Zellen mit dem von MOCK-Zellen verglichen. ROCK-V14 Zellen waren deutlich runder als MOCK-transfizierte Zellen (Abb.16c). Über die Hälfte der Population hat einen Elongationsindex von 1, ist also rund. Es gibt jedoch bei den ROCK-V14 Zellen auch eine längliche Subpopulation: 26% der ROCK-V14 Zellen weisen einen

Elongationsindex zwischen 4 und 14 auf, sind also eindeutig elongiert. Diese ersten Beobachtungen sind sehr interessant, es bedarf jedoch noch weiterer Experimente um genauere Aussagen treffen zu können.

3.4.4 Abhängigkeit der Antwort auf aktives ROCK vom Expressionsniveau von β 1-Integrin

Ziel war nun Faktoren zu finden, die den rundlichen bzw. länglichen Phänotyp der ROCK-V14 Zellen beeinflussten. Visuelle Analysen von Einzelzellen nach Transfektion mit ROCK-V14 (Film 09) legten nahe, dass die langgezogenen Zellen an der Matrix zu „kleben“ schienen, wahrscheinlich infolge hoher Integrinbindung an Zell-Matrix-Kontakten und verstärkter Rho/ROCK medierter Kontraktilität. Umgekehrt könnte der runde, blebbende Phänotyp Folge einer hohen Kontraktilität bei niedriger Bindungsstärke durch Integrine an Zell-Matrix-Kontakten sein.

Um die Relevanz von Matrix-bindenden Integrinen für die unterschiedlichen Phänotypen nach ROCK-Aktivierung zu erklären, wurden Zellpopulationen mit niedriger und hoher β 1 Integrinexpression isoliert und funktionell getestet. ROCK-V14 Zellen wurden mit nicht blockierendem FITC-gelabeltem anti- β 1-Integrin K20 Antikörper markiert und mittels FACS auf Zellen mit hoher bzw. niedriger Fluoreszenz separiert (obere und untere Dekade).

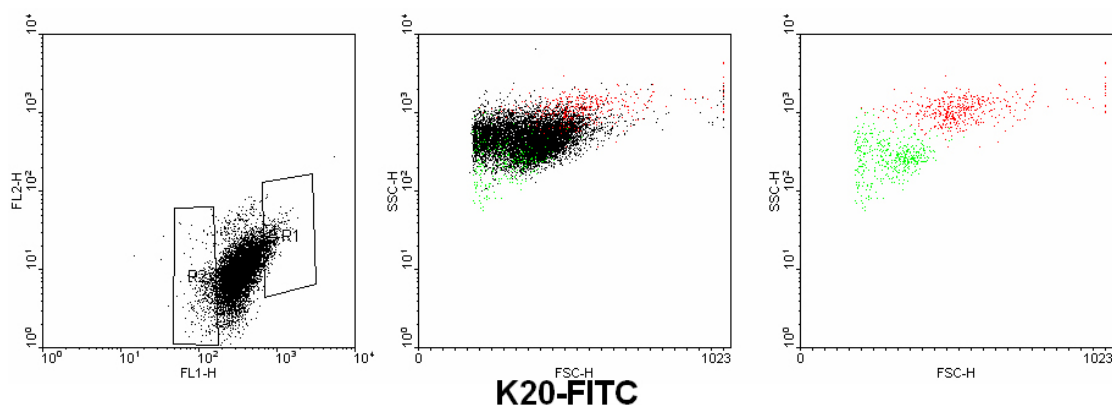


Abb. 17. Sortierung von ROCK-V14-HT1080-MT1 Zellen anhand der Expression von β 1-Integrin. Isolation einer Population mit hoher Integrin Expression (rot) und einer mit niedriger Integrin Expression (grün) mittels FACS nach Markierung mit anti- β 1 AK K20.

Nach Einbettung in 3D Kollagenmatrices waren ROCK-V14 Zellen mit niedriger Integrin-Expression rundlich, aber dynamisch und „blebten“, d.h. bildeten blasenartige dynamische Ausläufer (Film 10). ROCK-V14 Zellen mit hoher Integrin-Expression (Film 11) stellten sich dagegen vornehmlich langgezogen dar. Die unterschiedliche Struktur der Zell-Matrix-Interaktion in $\beta 1^{\text{high}}$ und $\beta 1^{\text{low}}$ Zellen wurde durch konfokalmikroskopische Aufnahmen bestätigt. HT1080-MT1/ROCK-V14 Zellen mit hoher Integrinexpression zeigten an beiden Enden ausgeprägte Aktin- und Integrincluster, was auf starke bipolar ausgerichtete fokale Adhäsionen und hohe Kontraktilität schließen lässt (Abb. 18a).

Dagegen zeigten $\beta 1^{\text{low}}$ Zellen einen weitgehenden Verlust länglicher Zellausläufer. Konfokalmikroskopisch erschienen sie insgesamt rundlich mit einer Vielzahl an blasenartigen Protrusionen, in denen Aktin und Integrin nicht fokalisiert aber teils inhomogen waren (Abb. 18b). Clusterbildung von Aktin oder $\beta 1$ -Integrin an Zell-Matrix Kontakten waren hier nicht mehr vorhanden.

Somit weisen diese vorläufigen Befunde darauf hin, dass konstitutiv aktives ROCK in HT1080-MT1 Zellen in Abhängigkeit von $\beta 1$ -Integrin eine duale Funktion für Zellfunktion und Phänotyp tragen könnte. Es bedarf weiterführenden Experimenten, um diesen Zusammenhang endgültig zu klären.

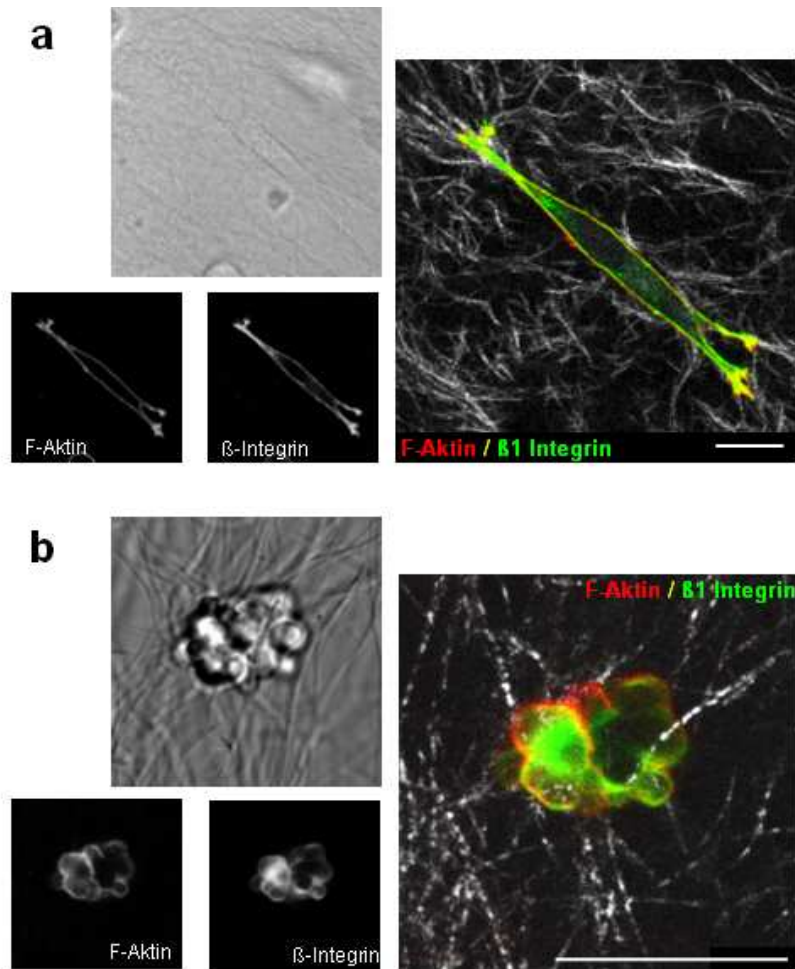


Abb. 18. Konfokalmikroskopische Darstellung elongierter $\beta 1^{\text{high}}$ (a) und rundlicher $\beta 1^{\text{low}}$ Phänotypen (b) nach Integrin-Expression „gesorteter“ Zellen. Gezeigt werden Transmission sowie die Projektion je 3-4 zentraler Schnitte der F-Aktin (rot) und $\beta 1$ -Integrin (blau) Fluoreszenz sowie 2 Schnitte der Reflexion (grau). Fixierung jeweils 6h nach Inkubation im Kollagengel. (Balken: 20 μm)

4. DISKUSSION

Einzelzellmigration ist ein wesentlicher Bestandteil der Dissemination von Tumorzellen und nachfolgender Metastasierung.^{1, 116} Die vorliegende Arbeit sollte klären, wie Rho-GTPasen wesentliche Aspekte von Tumorzellmigration durch dreidimensionales Gewebe modulieren, insbesondere (1) die Zellmorphologie, (2) die zugrunde liegenden Zell-Matrix-Interaktionen (3) und daraus resultierende Migrationseffizienz.

Die Befunde zeigen Tumorzellplastizität in Abhängigkeit von Rac und ROCK und geben neue Hinweise auf eine Abhängigkeit von der Adhäsionsstärke der Zelle.

4.1 Dualität der Rac und ROCK Funktion

4.1.1 Vermittlung von Pseudopodbildung durch Rac

Rac ist entscheidend an der Morphologie, Plastizität und Migrationsfähigkeit verschiedener Zelltypen beteiligt. Über einleitend beschriebene Signalwege vermittelt Rac Aktin-Polymerisation und Protrusion, was sich zellmorphologisch in der Ausbildung von Lamellipodien und Ruffles widerspiegelt.^{65, 117, 118} In verschiedenen 2D und 3D Modellen wurde gezeigt, dass Rac durch extrazelluläre promigratorische Faktoren, wie z.B. PDGF, Chemokine oder experimentell durch Transfektion mit konstitutiv aktivem Rac, zur Stimulation von Lamellipodien und teils dendritischen Pseudopodien führt.¹¹⁹⁻¹²¹ Dies wurde neben Fibroblasten insbesondere für Melanomzellen gezeigt.¹²² Zudem wurde die Assoziation eines erhöhten Levels an aktivem Rac mit dem mesenchymalen Phänotyp bzw. mesenchymaler Migration beschrieben.⁴⁸

Hierzu passend zeigen die Daten dieser Arbeit dass die Inhibition von Rac zum fast vollständigen Verlust von Pseudopodien und Abrundung in mesenchymalen Fibrosarkomzellen führt (Abb. 19a), nicht jedoch, wie in anderen Modellen beschrieben⁴⁸, zum Übergang in amöboide Migration. Diese Veränderung des Phänotyps bestätigt für 3D ECM dass Rac eine zentrale Rolle bei der Steuerung von Aktin-Dynamik, der Bildung von Zellausläufern unterschiedlicher Form und Zellelongation, und somit mesenchymaler Migration, spielt und dass der Verlust von Rac mit der Migration von HT1080-MT1 Zellen nicht vereinbar ist.

Elongation und Protrusion sind bei der Migration benigner wie maligner Zellen essentiell für die Entstehung von Polarität als Ausgangspunkt mesenchymaler Migration.¹ Konsistent dazu zeigen die Rac-inhibierten Fibrosarkomzellen den Verlust von Polarität und sind fast sessil. Die zentrale Rolle von Rac für Polarisierung und Migration wurde u.a. bereits für Fibroblasten und Sarkomzellen in 2D Modellen gezeigt.^{123, 107} Sanz-Moreno et al. beschreiben die Induktion elongierter Zellform durch Aktivierung von Rac bzw. den Verlust von Elongation nach Hemmung von Rac in nativ runden Melanomzellen im 2D sowie 3D Modell und erhärten so den Zusammenhang zwischen mesenchymaler Migration und Rac.⁴⁸

Zudem wurde beschrieben, dass Rac in 2D eine entscheidende Rolle bei der Bildung fokaler Komplexe zwischen Zelle und ECM spielt.^{42, 124, 125} Mesenchymale Tumorzellen in dreidimensionaler, fibrillärer Matrix zeigen eine vornehmlich kortikale Verteilung von Aktin und Integrinen, an Interaktionsstellen mit der ECM liegen diese in Clustern vor. Dagegen entwickeln Rac-inhibierte Fibrosarkomzellen ein gleichmäßig verteiltes kortikales Aktin-Zytoskelett und verlieren nahezu vollständig Integrin-haltige fokale Interaktionen zu Kollagenfasern. Es liegt daher nahe, dass die beobachtete Reduktion der Elongation der Zellen neben der gestörten Steuerung des Zytoskeletts auch auf beeinträchtigten adhäsiven Zell-Matrix Interaktionen beruht.

Rac vermittelt also die Aktivität an der Vorderfront der Zelle, Protrusion, Elongation, ermöglicht die Fokalisierung von Integrinen am ECM-Substrat und bewirkt dadurch zentrifugale Kraftentwicklung und Zellmigration.

4.1.2 Vermittlung von Kontraktilität bei Einzelzellmigration in 3D-Matrix durch ROCK

Rho steuert verschiedene Elemente des Zytoskeletts: (1) In Zellen, die an 2D Substrat anhaften oder langsam darüber migrieren bewirkt Rho über ROCK gesteuerte Aktomyosinaktivierung die Ausbildung von Stressfasern.^{54, 65, 126} (2) Mit Stressfasern einhergehend fördern Rho und ROCK die Bildung fokaler Adhäsionen.^{127, 128} (3) Alternativ fördert Rho ein starkes kortikales Zytoskelett: Zellen mit runder Morphologie haben eine deutlich stärkere Expression von GTP-gebundenem, d.h. aktivem Rho als elongierte Zellen.⁵³

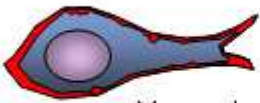

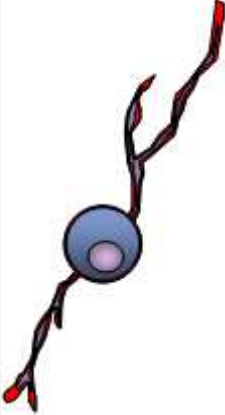


 Mesenchymale Kontrollzelle			
a. Rac-Inhibition	b. ROCK-Inhibition	c. Konstitutive Aktivierung von ROCK	d. Konstitutive Aktivierung von ROCK
		Niedrige Integrin-expression	Hohe Integrin-expression
			
rund	dendritisch	„blebby“	elongiert
sessil	sessil	migriert	migriert

Abb.19: Steuerung des Aktinzytoskeletts, Zellmorphologie und Migrationseffizienz durch Rac and ROCK. Synergismus von Rac und ROCK ermöglicht den mesenchymalen Phäno- und Migrationstyp. Nach Inhibition von Rac bzw. ROCK ergibt sich ein runder bzw. dendritischer Phänotyp, nach konstitutiver Aktivierung von ROCK in Abhängigkeit der Integrinexpression ein „blebby“ bzw. elongierter Phänotyp.

Die Daten dieser Arbeit zeigen in mesenchymalen Fibrosarkomzellen, Fibroblasten und Melanomzellen nach Inhibition von ROCK in dreidimensionaler, fibrillärer Kollagenmatrix den Übergang in einen dendritischen Phänotyp (Abb. 19b). In der Literatur ist die Ausbildung dendritischer Ausläufer nach Inhibition von ROCK bzw.

dessen Effektoren bei malignen wie benignen Zelllinien und sowohl für 2D wie auch 3D Modelle beschrieben.^{63, 104, 122, 129} Es liegt nahe, dass die Protrusion der Ausläufer durch Rac und Cdc42 vermittelt wird, während ROCK für die koordinierte Retraktion von Ausläufern verantwortlich ist. Ähnlich zu den hier gezeigten mesenchymalen Tumorzellen und Fibroblasten vermittelt aktives Rho in Neuronen, die Neuriten und Axone ausbilden, deren Retraktion,¹³⁰ während die pharmakologische Inhibition von ROCK die Regeneration von Axonen stimuliert, beispielsweise nach Verletzung des Rückenmarks *in vivo*.^{131, 132}

Es wurde zudem gezeigt, dass Fibroblasten, die in freischwimmenden 3D Matrices spontan dendritische Ausläufer bilden, durch LPA, das v.a. Rho aktiviert, die Dendriten retrahieren, und dass dieser Effekt durch Inhibition von ROCK mittels Y-27632 aufgehoben wird.¹¹⁹ Somit trägt der Rho-ROCK-Signalweg in Tumorzellen in dreidimensionaler Matrix zu Kontraktilität und Retraktion von Ausstülpungen und somit zum rundlichen Phänotyp und zur Plastizität bei.

In den vorliegenden Experimenten sind mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 inkubierte HT1080-MT1-Zellen in einer dreidimensionalen Matrix nahezu sessil und zeigen keine „vorne-hinten“-Polarität mehr. Obwohl die dendritischen Ausläufer hochdynamisch sind, wird ihre Fähigkeit zur Migration durch Inhibition von ROCK nahezu aufgehoben. Diese Beobachtung wird am besten durch die Hemmung von Kontraktilität und Retraktion erklärt. Die Zelle vermag zwar noch Protrusionen auszustülpen, also den Zellmigrationszyklus zu beginnen, es fehlt jedoch die Kraft den Zellkörper durch die Kollagenmatrix „hinterherzuziehen“.

Dieser Befund steht in möglichem Widerspruch zu Daten aus 2D Zellmigrationsassays ohne umgebende Matrix, die nach Inhibition von ROCK eine erhaltene oder gesteigerte Migration in Fibroblasten, Endothelzellen, Fibrosarkomzellen und Mammakarzinomzellen zeigen.⁹⁶⁻⁹⁹ Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass man von 2D Modellen ohne Matrix nicht auf *in vivo* Prozesse schließen kann. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Befunde in 2D bzw. 3D ist, dass im 2D Modell die Zellen bei der Migration keinen Widerstand in Form eines dreidimensionalen Kollagenfasergewebes haben. Wahrscheinlich reicht nach ROCK-Inhibition die noch erhaltene Zellplastizität für eine Migration ohne „Hindernisse“ aus. Im 3D Modell ist

die sehr schwache Rest-Kontraktilität jedoch für die Migration wahrscheinlich insuffizient.

Passend hierzu zeigen Experimente mit Tumorzellen in 3D Invasionsassays, aber auch im 3D *in vivo* Tiermodell eine verminderte Invasivität bzw. Migration nach Inhibition von ROCK.^{92, 102, 133} Sahai et al.⁵³ schlagen vor, dass der Einfluß von ROCK auf die Zellmigration abhängig vom nativen Migrationstyp ist, so dass nach ROCK-Inhibition die Migration zwar von amöboid, nicht aber von mesenchymal wandernden Tumorzellen gehemmt ist. Konsistent hiermit beschreiben Carragher et al.¹⁰³ eine intakte Migration von HT-1080 Fibrosarkomzellen auf fibrillärem Kollagen nach Inhibition von ROCK und folgern Unabhängigkeit mesenchymaler Migration von ROCK. In Sanz-Moreno et al. wird nach ROCK-Inhibition durch Y-27632 in nativ runden Melanomzellen die Induktion eines mesenchymalen Phänotyps mit erhaltener Migration beschrieben und wiederum die Unabhängigkeit mesenchymaler Migration von ROCK postuliert.⁴⁸ Die vorliegende Arbeit zeigt andere Plastizitätswege in HT1080-MT1 Zellen, die trotz mesenchymaler Basismigration in fibrillärer 3D Matrix nach Inhibition von ROCK in einen dendritischen Phänotyp übergehen, bei zugleich drastisch reduzierter Migrationsleistung. Dies legt nahe, dass ROCK neben der amöboiden Migration auch für mesenchymale Migration von Tumorzellen essentiell ist, wahrscheinlich durch Verhinderung autonomer, „ektoper“ Pseudopodienaktivität.

Für Einzelzellmigration ist nicht nur die intakte ROCK-Funktion essentiell, sondern auch die Koordination von ROCK mit Rac. Beide Signalmoleküle müssen aufeinander abgestimmt zeitgleich in verschiedenen Regionen oder oszillierend in derselben Region aktiv sein um eine effektive Migration zu ermöglichen, z.B. indem die Pseudopodienbildung durch Rac zeitgleich durch ROCK moduliert wird, wodurch die überschießende Ausbildung lateraler und hinterer Protrusionen verhindert wird.

Rho und ROCK sind essentiell für Zell-vermittelte Zugspannung auf die sie umgebende Matrix, und diese Fähigkeit ist nach Inhibition von ROCK stark eingeschränkt.¹⁰² Mit den durchgeführten Kollagen-Kontraktionsassays bestätigen wir den Einfluß von ROCK auf die Fähigkeit von Tumorzellen zur Matrixdeformierung.

Die Rolle von ROCK für die Tumorzellmorphologie, Migration und Funktion kann durch Actomyosin-vermittelte zentripetale Kraftentwicklung in der Zelle erklärt werden. Ohne ROCK „zerfließt“ die Zelle folglich infolge unkontrollierter

Pseudopodprotrusionen entlang der Matrix, was zur Entstehung des dendritischen Phänotyps führt, mit Verlust von Polarität, Migrationsleistung und Fähigkeit zur Matrixkontraktion.

Ein gewisses Niveau an ROCK-Aktivität ist somit essentiell für intakte Einzelzellmigration von mesenchymalen Tumorzellen in einer Bindegewebe-ähnlichen Matrix, da die Zellen die ROCK-vermittelte Hemmung multipolarer Protrusionen benötigen. Die Rolle eines zweiten bekannten Rho-vermittelten Effekts, die Retraktion des Zellhinterendes¹³⁴, ließ sich in diesem Ansatz aufgrund der multiplen Dendritenbildung und nachfolgender Migrationshemmung nicht testen.

4.1.3 Notwendigkeit des Zusammenwirkens von ROCK und Rac für mesenchymale Einzelzellmigration

Der Befund, dass ROCK für die Polarisierung der Pseudopodprotrusionen und retrahierende („zentripetale“) Kraftentwicklung von Zellen verantwortlich ist, während Rac die protrusive („zentrifugale“) Kraft steuert, wirft die Frage nach ihrem Zusammenspiel, insbesondere im Hinblick auf die Bedeutung bei der Einzelzellmigration als Modell für die Tumormetastasierung, auf.

Bei bimodal inhibierten Zellen ist zugleich die durch Rac gesteuerte Protrusion als auch die durch ROCK gesteuerte Zellkontraktilität und Begrenzung ektoper Pseudopodienbildung gehemmt. Dies resultiert in unseren Experimenten in einem abortiven dendritischen Phänotyp. Die residuellen, zarten Pseudopodien könnten Ausdruck einer Restaktivität von Rac wie auch der noch intakten Funktion von Cdc42 sein. Cdc42 vermittelt ebenfalls Protrusion, insbesondere Pseudopodien und Filopodien.^{50, 51} Die simultan inhibierten Zellen zeigen eine additive Hemmung der Migration, was bestätigt, dass die gleichzeitige Inhibition von Rac und ROCK mit der Einzelzellmigration nicht vereinbar ist. Für 3D Invasionsassays ist bereits eine Reduktion der Invasivität von Melanomzellen nach simultaner Inhibition von Rac und ROCK beschrieben.⁴⁸

Wie verhält es sich nun, wenn das Gleichgewicht durch konstitutive Aktivierung zugunsten von ROCK verschoben wird? Nach Expression von konstitutiv aktivem

ROCK zeigen mesenchymale Fibrosarkomzellen in fibrillärer Kollagenmatrix eine reduzierte Migrationsleistung bei uneinheitlicher Veränderung des Phänotyps. Es ist vorbeschrieben, dass Zellen mit konstitutiv aktivem ROCK einen rundlichen Phänotyp mit Blebs annehmen, der aber weiterhin polar ist und migriert.^{48, 53, 97, 107} In der vorliegenden Arbeit stellen sich die ROCK-V14 Zellen in einer zweigeteilten Population dar. Neben kaum migrierenden, rundlich „blebbenden“, unpolaren Zellen zeigt ein zweiter Phänotyp eine besonders langegezogene mesenchymale Morphologie.

Konsistent mit unseren Daten wurde für konstitutiv aktives ROCK eine Hemmung der Migration *in vitro* beschrieben.^{97, 108} Es gibt jedoch eine Arbeit, in der eine gesteigerte Tumordissemination *in vivo* beobachtet wurde.¹⁰⁹ Dies könnte durch alternative, nicht direkt migrationsassoziierte Mechanismen ROCK medierter Metastasierung *in vivo* erklärt werden, wie z.B. robustere Zellmechanik, die Scherkräften besser widersteht und das Überleben der Tumorzellen im Gefäß fördert, oder verbesserte Signalgebung über fokale Adhäsionen.

Ist ROCK konstitutiv aktiv, so ist das Zusammenspiel von protrusiven und retrahierenden Kräften in der Zelle ebenfalls gestört, was in einer kontraktionsverstärkten, zweigeteilten Population resultiert.

Es ist weiterhin bekannt, dass nach Blockade von Integrinen mesenchymale Tumorzellen einen rundlichen Phänotyp aufweisen.¹³⁵ Zudem weisen nach Proteaseinhibition amöboid wandernde Zellen reduzierte Oberflächenexpression von $\alpha 2\beta 1$ -Integrinen auf, wohingegen nach ROCK-Inhibition die Zahl der Integrine wieder gesteigert wird.¹⁰³ Somit könnte ROCK einen dualen Effekt auf die Ausprägung der Phänotypen mesenchymal/länglich versus amöboid/rundlich bewirken, in Abhängigkeit von der Integrin-Expression. Erste Befunde nach ROCK Aktivierung legen nahe, dass Zellen mit hoher Integrinexpression eine eher längliche (Abb. 19d), solche mit niedriger Integrinexpression eher rundliche Morphologie annehmen und Oberflächenblebs bilden (Abb 19c), ohne zu sterben. Diese Befunde lassen sich dadurch erklären, dass in Zellen mit konstitutiv aktivem ROCK generell die Kontraktilität gegenüber der Protrusion überwiegt. Zellen mit hoher Integrinexpression adhären stark an der Matrix, und bleiben länglich, während bei niedriger Integrinfunktion diese Ankerfunktion fehlt und die Zelle rundlich wird. Nach unseren ersten Versuchen bedarf es weiterer Experimente um diese Annahme zu bestätigen.

In Zusammenschau dieser für fibrilläres Kollagen erhobenen Daten mit anderen Arbeiten können wir das etablierte Einzelzellmigrationmodell mit Rac-, ROCK- und Integrinfunktionen in Zusammenhang bringen: Die Zelle stülpt, gesteuert von Rac, eine F-Aktin reiche Protrusion aus (Schritt I). Vermittelt durch Integrine kommt es zur Bildung von Zell-Matrixkontakten, die zur Verankerung der Protrusion dienen (Schritt II). ROCK wird durch diesen initialen Vorgang aktiviert, es kommt zur verstärkten Phosphorylierung der MLC, dadurch zu Actomyosin-Interaktion an der initialen Kontaktstelle mit Verstärkung der Integrin-Fokalisierung am Zell-Matrix-Kontakt, die zugleich der beschleunigten Protrusion entgegenwirkt. In lateralen und hinteren Regionen der Zelle dagegen bildet sich unter Rho/ROCK Einfluss ein dichtes kortikales Aktin-Netzwerk, das die Bildung weiterer Protrusion verhindert und die Zellkontraktion bewirkt (Schritt III). Durch ROCK-vermittelte Verkürzung der Zelllänge kommt es zur Bewegung der ganzen Zelle einschließlich Zellkern vom Hinterende her¹³⁶ (Schritt IV).

4.2 Unabhängigkeit Rac- und ROCK-induzierter Funktionen von MMPs

Es ist etabliert, dass die Einzelzellmigration von Tumorzellen in lockeren fibrillären 3D Kollagenmatrices nach Hemmung der Oberflächenproteasen nicht inhibiert ist.^{53, 87} Vielmehr zeigen diese Zellen einen amöboiden Phänotyp, der mittels Adaptation an die umliegende ECM die Fähigkeit zur Migration erhält.⁸⁷

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Induktion eines amöboiden Phänotyps nach Inhibition von Oberflächenproteasen. Zudem wird gezeigt, dass nach simultaner Inhibition von Oberflächenproteasen und ROCK der bekannte dendritische, sessile Phänotyp entsteht. Dies legt nahe, dass ROCK sowohl bei der mesenchymalen als auch der amöboiden Zellmigration essentiell ist.

Es gibt Arbeiten, die nach Inhibition von Oberflächenproteasen eine verminderte Invasion *in vitro* sowie *in vivo* beschreiben.^{53, 100, 137} Diese Beobachtungen könnten dadurch erklärt werden, dass die Invasion für eine Zellpopulation mit intakten Proteasen erleichtert ist, da durch migrierende Einzelzellen Mikropfade in der ECM entstehen, auf denen nachfolgende Zellen leichter nachfolgen.⁷⁹

4.3 In vivo Relevanz von kleinen G-Proteinen als therapeutische Zielstrukturen und Tumortherapie

Es ist lange bekannt, dass die Motilität von Zellen mit deren metastatischem Potential korreliert.¹³⁸ Da Rac und Rho/ROCK eine essentielle Rolle bei Tumorzellmigration, Invasion und Metastasierung spielen, werden sie als potentielle therapeutische Zielstrukturen der Tumortherapie diskutiert.^{100, 104, 139, 140}

Wie einleitend erwähnt zeigen verschiedene Tumorzellen/Tumorgewebe, insbesondere Mammakarzinom-, Melanom- und Sarkomzellen, eine erhöhte Expression von Rho/ROCK.⁹⁰⁻⁹² Eine erhöhte Expression von Rho/ROCK könnte mehrere Metastasierungs- und Überlebensvorteile für Krebszellen *in vivo* bringen: (1) Rho/ROCK vermitteln Adhäsion. Bei Hochregulation könnte so die Kontaktaufnahme zur zu invadierenden ECM erleichtert sein. (2) Rho/Rock geben der Zelle Stabilität. Dies könnte zu robusteren Zellen in Blut- und Lymphgefäßen führen und somit zu einer Verbesserung des Tumorzellüberlebens. (3) Im Zusammenspiel mit Rac sind Rho und ROCK essentiell für die Migration von Tumorzellen in interstitieller extrazellulärer Matrix, wie in dieser Arbeit gezeigt.

Das in den vorliegenden Experimenten verwendete Kollagenmodell ist als Matrix nachgewiesenermaßen mit *in vivo* Bedingungen vergleichbar.⁸⁷ Unsere Befunde sprechen also dafür, dass mittels molekularer Interferenz mit Rac und ROCK eine Hemmung von Einzelzellmigration und somit ggf. von Metastasierung *in vivo* möglich sein könnte.

Unsere Daten bezüglich Inhibition von Rac mit LT sind im Hinblick auf Hemmung von Tumorzellmigration interessant, jedoch ist LT ein bakterielles Toxin und nicht selektiv für Rac und kommt somit als Medikament kaum in Frage. Mit EHT 1864 ist inzwischen ein „small-molecule“-Inhibitor für Rac entwickelt worden, dessen Relevanz im Hinblick auf mögliche Hemmung von Tumorzellmigration- und Metastasierung noch offen ist.¹⁴¹ Es gibt jedoch bereits Daten, die eine Inhibition von Invasion von malignen Zelllinien nach Inhibition von Rac durch siRNA zeigen.⁹³ Auf der anderen Seite gibt es Experimente, die zeigen, dass nach Rac-Inhibition Krebszellen ROCK vermittelt *in vivo* früher pulmonal metastasieren⁴⁸, so dass sich derzeit insgesamt ein uneinheitliches Bild ergibt, und man weitere Daten abwarten muss.

Für die Inhibition von ROCK mit Y-27632 oder Wf-536 gibt es eine bessere Datenlage anhand von *in vivo* Experimenten, teilweise auch in Kombination mit Proteaseinhibition oder Paclitaxel. Bei diesen wurden jeweils Xenotransplantate humaner Zelllinien (Prostata- und Hepatozelluläres Karzinom Zelllinien) in ein Mausmodell subkutan oder intraperitoneal implantiert, und es ergaben sich nach ROCK Inhibition verminderte Tumorzell dissemination, Reduktion des Tumorzellvolumens sowie z.T. ein Überlebensvorteil.^{100, 104-106}

Ein Problem bei diesen Ansätzen ist natürlich, dass die Zellen zwar in ihrer Migration, also Metastasierung gehemmt werden, jedoch die Viabilität kaum beeinträchtigt ist; somit sollte die therapeutische Inhibition von Rac oder Rho/ROCK sinnvollerweise mit zytotoxischen Substanzen kombiniert werden.

Weitere Studien sind auch nötig zur Klärung, inwieweit die Inhibitoren die benignen Zellen des Körpers beeinträchtigen. Im besonderen ist hier an Leukozyten zu denken, die im Rahmen der Immunantwort amöboid migrieren und für die Rezirkulation und Zell-Zell-Interaktion auf Rac und ROCK angewiesen sind.^{142, 143} Mögliche Ansätze um diese Probleme anzugehen sind z.B. die Anwendung als (perioperative) Kurzzeitintervention oder im Rahmen einer zyklischen Polychemotherapie.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Auf dem Weg vom Primärtumor zur systemischen Metastasierung, der Haupttodesursache von Krebserkrankungen, ist die Einzelzellmigration von Tumorzellen durch dreidimensionales Bindegewebe ein entscheidender Schritt.

Die vorliegende Arbeit zeigt Untersuchungen zur Tumorzellmigration und –plastizität in einem 3D-Migrationsmodell. Kleine G-Proteine kontrollieren Zytoskelettfunktionen, insbesondere Aktinpolymerisation und die Bildung von Zellprotrusionen durch Rac sowie Actomyosinkontraktion durch Rho. Durch pharmakologische Inhibitoren von Rac und dem Rho-Effektor ROCK soll deren Bedeutung für Einzelzellmigration in einem dreidimensionalen Modell und vor allem der Effekt auf Morphologie, Plastizität und Migration von Tumorzellen geklärt werden.

Nach Inhibition von ROCK zeigen hochinvasive HT1080 Fibrosarkomzellen einen multipolar-dendritischen und sessilen Phänotyp. Nach Hemmung von Rac wird hingegen ein rundlicher, aber ebenfalls apolarer und sessiler Phänotyp induziert. Bei simultaner Inhibition von Rac und ROCK entstehen rundliche, apolare, sessile Zellen mit abortiven Pseudopodien. Wird das Gleichgewicht von Rac und ROCK durch konstitutive Aktivierung von ROCK gestört, so entsteht eine zweigeteilte Population, bestehend aus rundlichen Zellen, die Blebs bilden, und langgezogenen Zellen. Nach Sortierung nach ihrem $\beta 1$ -Integrinexpressionsniveau zeigten Zellen mit niedriger Integrin-Expression einen rundlichen Migrationstyp mit blasenartigen dynamischen Protrusionen, während Zellen mit hoher Integrin-Expression langgezogen-mesenchymal migrierten.

Somit steuern ROCK und Rac gemeinsam und zeitgleich die mesenchymale Einzelzellmigration. Während Rac Protrusion vermittelt, ist ROCK für Kontraktilität und Retraktion verantwortlich. Erst durch Koordination von Rac und Rho/ROCK entsteht somit Polarität und 3D mesenchymale Migration.

ABSTRACT

In the development from a primary tumor to metastatic dissemination, which is the main cause of death from cancer, single cell migration through three-dimensional tumor stroma is an essential step.

This work presents data concerning tumor cell migration and plasticity in a three-dimensional migration model. Small G-proteins control cytoskeletal functions, especially actin polymerisation and the formation of cell protrusions through Rac as well as actomyosin contractility through Rho. Using pharmacological inhibitors of Rac and the Rho effector ROCK their impact on single-cell-migration in a three-dimensional model and particularly on morphology and plasticity of migration of tumor cells should be clarified.

After inhibition of ROCK highly invasive HT1080 fibrosarcoma cells show a multipolar-dendritic and sessile phenotype. Inhibition of Rac however induced a rounded phenotype which was also apolar and sessile. Simultaneous inhibition of ROCK and Rac resulted in rounded, apolar, sessile cells with abortive pseudopods. After disturbing the balance of ROCK and Rac by constitutive activation of ROCK, a divided population of cells developed, consisting of rounded, blebby cells and elongated cells. After sorting the cells according to their level of $\beta 1$ -integrin expression, cells with low expression of integrins adopted a rounded type of migration with blebby dynamic protrusions, whereas cells with high integrin expression migrated in a elongated-mesenchymal way.

Thus ROCK and Rac control together and simultaneously mesenchymal single cell migration. While Rac mediates protrusion, ROCK is responsible for contractility and retraction. Consequently only by coordination of Rho/ROCK and Rac polarity and mesenchymal 3D migration becomes possible.

6. Literaturverzeichnis

1. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3(5):362-74.
2. Scott JE. Extracellular matrix, supramolecular organisation and shape. *J Anat* 1995;187 (Pt 2):259-69.
3. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *Faseb J* 1991;5(13):2814-23.
4. Rich A, Crick FH. The molecular structure of collagen. *J Mol Biol* 1961;3:483-506.
5. Bella J, Eaton M, Brodsky B, Berman HM. Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* 1994;266(5182):75-81.
6. Orgel JP, Irving TC, Miller A, Wess TJ. Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(24):9001-5.
7. Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, et al. An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* 1997;1(1):25-34.
8. Schon M, Schon MP, Kuhrober A, Schirmbeck R, Kaufmann R, Klein CE. Expression of the human alpha2 integrin subunit in mouse melanoma cells confers the ability to undergo collagen-directed adhesion, migration and matrix reorganization. *J Invest Dermatol* 1996;106(6):1175-81.
9. Kagami S, Urushihara M, Kondo S, et al. Requirement for tyrosine kinase-ERK1/2 signaling in alpha 1 beta 1 integrin-mediated collagen matrix remodeling by rat mesangial cells. *Exp Cell Res* 2001;268(2):274-83.
10. Tulla M, Pentikainen OT, Viitasalo T, et al. Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J Biol Chem* 2001;276(51):48206-12.
11. Madsen DH, Engelholm LH, Ingvarsen S, et al. Extracellular collagenases and the endocytic receptor, urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/Endo180, cooperate in fibroblast-mediated collagen degradation. *J Biol Chem* 2007;282(37):27037-45.
12. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.

13. Friedl P, Wolf K. Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28(1-2):129-35.
14. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 1980;283(5744):249-56.
15. Goldman RD, Khuon S, Chou YH, Opal P, Steinert PM. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* 1996;134(4):971-83.
16. Herrmann H, Bar H, Kreplak L, Strelkov SV, Aebi U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(7):562-73.
17. Krylyshkina O, Kaverina I, Kranewitter W, et al. Modulation of substrate adhesion dynamics via microtubule targeting requires kinesin-1. *J Cell Biol* 2002;156(2):349-59.
18. Goulimari P, Knieling H, Engel U, Grosse R. LARG and mDia1 Link G α _{12/13} to Cell Polarity and Microtubule Dynamics. *Mol Biol Cell* 2008;19(1):30-40.
19. Nogales E, Wang HW. Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Curr Opin Cell Biol* 2006;18(2):179-84.
20. Theriot JA, Mitchison TJ. Comparison of actin and cell surface dynamics in motile fibroblasts. *J Cell Biol* 1992;119(2):367-77.
21. Watanabe N, Mitchison TJ. Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* 2002;295(5557):1083-6.
22. Winter D, Lechler T, Li R. Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Curr Biol* 1999;9(9):501-4.
23. Rohatgi R, Ma L, Miki H, et al. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 1999;97(2):221-31.
24. Evangelista M, Klebl BM, Tong AH, et al. A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 2000;148(2):353-62.
25. Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, et al. Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(7):3739-44.

26. Pollard TD. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2007;36:451-77.
27. Goode BL, Eck MJ. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* 2007;76:593-627.
28. Rouiller I, Xu XP, Amann KJ, et al. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 2008;180(5):887-95.
29. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003;112(4):453-65.
30. Alberts B. JA, Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2008.
31. Lai FP, Szczodrak M, Block J, et al. Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *Embo J* 2008;27(7):982-92.
32. Small JV, Stradal T, Vignat E, Rottner K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 2002;12(3):112-20.
33. Medalia O, Beck M, Ecke M, et al. Organization of actin networks in intact filopodia. *Curr Biol* 2007;17(1):79-84.
34. Kaunas R, Nguyen P, Usami S, Chien S. Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(44):15895-900.
35. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004;116(2):167-79.
36. Symons M, Settleman J. Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* 2000;10(10):415-9.
37. Lu M, Kinchen JM, Rossman KL, et al. A Steric-inhibition model for regulation of nucleotide exchange via the Dock180 family of GEFs. *Curr Biol* 2005;15(4):371-7.
38. Cote JF, Vuori K. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol* 2007;17(8):383-93.
39. Tcherkezian J, Lamarche-Vane N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell* 2007;99(2):67-86.
40. DerMardirossian C, Bokoch GM. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 2005;15(7):356-63.

41. Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjeno IM. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 2007;29(4):356-70.
42. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995;81(1):53-62.
43. Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* 2002;22(18):6582-91.
44. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003;302(5651):1704-9.
45. Vadlamudi RK, Li F, Barnes CJ, Bagheri-Yarmand R, Kumar R. p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Rep* 2004;5(2):154-60.
46. Kunda P, Craig G, Dominguez V, Baum B. Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol* 2003;13(21):1867-75.
47. Ten Klooster JP, Evers EE, Janssen L, et al. Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization. *Biochem J* 2006;397(1):39-45.
48. Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, et al. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 2008;135(3):510-23.
49. Machesky LM, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* 1998;8(25):1347-56.
50. El-Sibai M, Nalbant P, Pang H, et al. Cdc42 is required for EGF-stimulated protrusion and motility in MTLn3 carcinoma cells. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 19):3465-74.
51. Ellenbroek SI, Collard JG. Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* 2007;24(8):657-72.
52. Smith TK, Hager HA, Francis R, Kilkenny DM, Lo CW, Bader DM. Bves directly interacts with GEFT, and controls cell shape and movement through regulation of Rac1/Cdc42 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(24):8298-303.

53. Sahai E, Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* 2003;5(8):711-9.
54. Amano M, Chihara K, Kimura K, et al. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 1997;275(5304):1308-11.
55. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(6):446-56.
56. Kimura K, Ito M, Amano M, et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996;273(5272):245-8.
57. Amano M, Ito M, Kimura K, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 1996;271(34):20246-9.
58. Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, et al. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 1999;285(5429):895-8.
59. Machesky LM, Hall A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol* 1997;138(4):913-26.
60. Li F, Higgs HN. The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol* 2003;13(15):1335-40.
61. Higashida C, Miyoshi T, Fujita A, et al. Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science* 2004;303(5666):2007-10.
62. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, et al. 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* 2001;153(6):1175-86.
63. Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol* 2005;7(3):255-61.
64. Gadea G, de Toledo M, Anguille C, Roux P. Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J Cell Biol* 2007;178(1):23-30.

65. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279(5350):509-14.
66. Nimnual AS, Taylor LJ, Bar-Sagi D. Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol* 2003;5(3):236-41.
67. Alberts AS, Qin H, Carr HS, Frost JA. PAK1 negatively regulates the activity of the Rho exchange factor NET1. *J Biol Chem* 2005;280(13):12152-61.
68. Ohta Y, Hartwig JH, Stossel TP. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol* 2006;8(8):803-14.
69. Zamir E, Katz M, Posen Y, et al. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2000;2(4):191-6.
70. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110(6):673-87.
71. Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19(5):495-507.
72. Arroyo AG, Sanchez-Mateos P, Campanero MR, Martin-Padura I, Dejana E, Sanchez-Madrid F. Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the beta 1 subunit. *J Cell Biol* 1992;117(3):659-70.
73. Aota S, Yamada KM. Integrin functions and signal transduction. *Adv Exp Med Biol* 1997;400B:669-82.
74. Maaser K, Wolf K, Klein CE, et al. 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* 1999;10(10):3067-79.
75. Geiger B. Cell biology. Encounters in space. *Science* 2001;294(5547):1661-3.
76. Hu K, Ji L, Applegate KT, Danuser G, Waterman-Storer CM. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science* 2007;315(5808):1111-5.
77. Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 22):4605-13.
78. Mayer C, Maaser K, Daryab N, Zanker KS, Brocker EB, Friedl P. Release of cell fragments by invading melanoma cells. *Eur J Cell Biol* 2004;83(11-12):709-15.

79. Wolf K, Wu YI, Liu Y, et al. Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2007;9(8):893-904.
80. Wolf K, Friedl P. Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces. *Clin Exp Metastasis* 2008.
81. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274(31):21491-4.
82. Mueller SC, Gherzi G, Akiyama SK, et al. A novel protease-docking function of integrin at invadopodia. *J Biol Chem* 1999;274(35):24947-52.
83. Ellerbroek SM, Wu YI, Overall CM, Stack MS. Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity. *J Biol Chem* 2001;276(27):24833-42.
84. Kim IY, Jeong SJ, Kim ES, Kim SH, Moon A. Type I collagen-induced pro-MMP-2 activation is differentially regulated by H-Ras and N-Ras in human breast epithelial cells. *J Biochem Mol Biol* 2007;40(5):825-31.
85. Lehti K, Valtanen H, Wickstrom SA, Lohi J, Keski-Oja J. Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 2000;275(20):15006-13.
86. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7(5):728-35.
87. Wolf K, Mazo I, Leung H, et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003;160(2):267-77.
88. Hegerfeldt Y, Tusch M, Brocker EB, Friedl P. Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res* 2002;62(7):2125-30.
89. Wolf K, Friedl P. Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br J Dermatol* 2006;154 Suppl 1:11-5.
90. Clark EA, Golub TR, Lander ES, Hynes RO. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* 2000;406(6795):532-5.

91. Rosel D, Brabek J, Tolde O, et al. Up-regulation of Rho/ROCK signaling in sarcoma cells drives invasion and increased generation of protrusive forces. *Mol Cancer Res* 2008;6(9):1410-20.
92. Lane J, Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. *Int J Oncol* 2008;33(3):585-93.
93. Chan AY, Coniglio SJ, Chuang YY, et al. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene* 2005;24(53):7821-9.
94. Baugher PJ, Krishnamoorthy L, Price JE, Dharmawardhane SF. Rac1 and Rac3 isoform activation is involved in the invasive and metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005;7(6):R965-74.
95. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* 2000;57(5):976-83.
96. Niggli V, Schmid M, Nievergelt A. Differential roles of Rho-kinase and myosin light chain kinase in regulating shape, adhesion, and migration of HT1080 fibrosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343(2):602-8.
97. Chen BH, Tzen JT, Bresnick AR, Chen HC. Roles of Rho-associated kinase and myosin light chain kinase in morphological and migratory defects of focal adhesion kinase-null cells. *J Biol Chem* 2002;277(37):33857-63.
98. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. *J Cell Biol* 2003;161(2):429-39.
99. Torika R, Thuma F, Herzog V, Kirfel G. ROCK signaling mediates the adoption of different modes of migration and invasion in human mammary epithelial tumor cells. *Exp Cell Res* 2006;312(19):3857-71.
100. Somlyo AV, Phelps C, Dipierro C, et al. Rho kinase and matrix metalloproteinase inhibitors cooperate to inhibit angiogenesis and growth of human prostate cancer xenotransplants. *Faseb J* 2003;17(2):223-34.
101. Wang DS, Dou KF, Li KZ, Song ZS. Enhancement of migration and invasion of hepatoma cells via a Rho GTPase signaling pathway. *World J Gastroenterol* 2004;10(2):299-302.

102. Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS, Sahai E. ROCK- and myosin-dependent matrix deformation enables protease-independent tumor-cell invasion in vivo. *Curr Biol* 2006;16(15):1515-23.
103. Carragher NO, Walker SM, Scott Carragher LA, et al. Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* 2006;25(42):5726-40.
104. Somlyo AV, Bradshaw D, Ramos S, Murphy C, Myers CE, Somlyo AP. Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269(3):652-9.
105. Itoh K, Yoshioka K, Akedo H, Uehata M, Ishizaki T, Narumiya S. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med* 1999;5(2):221-5.
106. Xue F, Zhang JJ, Qiu F, et al. Rho signaling inhibitor, Y-27632, inhibits invasiveness of metastatic hepatocellular carcinoma in a mouse model. *Chin Med J (Engl)* 2007;120(24):2304-7.
107. Gutjahr MC, Rossy J, Niggli V. Role of Rho, Rac, and Rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of Walker 256 carcinosarcoma cells. *Exp Cell Res* 2005;308(2):422-38.
108. Salhia B, Rutten F, Nakada M, et al. Inhibition of Rho-kinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of Rac1. *Cancer Res* 2005;65(19):8792-800.
109. Croft DR, Sahai E, Mavria G, et al. Conditional ROCK activation in vivo induces tumor cell dissemination and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64(24):8994-9001.
110. Nishimura Y, Itoh K, Yoshioka K, Tokuda K, Himeno M. Overexpression of ROCK in human breast cancer cells: evidence that ROCK activity mediates intracellular membrane traffic of lysosomes. *Pathol Oncol Res* 2003;9(2):83-95.
111. Gunzer M, Friedl P, Niggemann B, Brocker EB, Kampgen E, Zanker KS. Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol* 2000;67(5):622-9.

112. Schirmer J, Aktories K. Large clostridial cytotoxins: cellular biology of Rho/Ras-glucosylating toxins. *Biochim Biophys Acta* 2004;1673(1-2):66-74.
113. Hofmann C, Shepelev M, Chernoff J. The genetics of Pak. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 19):4343-54.
114. Friedl P, Noble PB, Zanker KS. Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories. *J Immunol Methods* 1993;165(2):157-65.
115. Yoshioka K, Foletta V, Bernard O, Itoh K. A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(12):7247-52.
116. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2(8):563-72.
117. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70(3):401-10.
118. Heo WD, Meyer T. Switch-of-function mutants based on morphology classification of Ras superfamily small GTPases. *Cell* 2003;113(3):315-28.
119. Grinnell F, Ho CH, Tamariz E, Lee DJ, Skuta G. Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Mol Biol Cell* 2003;14(2):384-95.
120. Petroll WM, Ma L, Kim A, Ly L, Vishwanath M. Dynamic assessment of fibroblast mechanical activity during Rac-induced cell spreading in 3-D culture. *J Cell Physiol* 2008.
121. Joyce PL, Cox AD. Rac1 and Rac3 are targets for geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of signaling, transformation, and membrane ruffling. *Cancer Res* 2003;63(22):7959-67.
122. Scott G, Leopardi S. The cAMP signaling pathway has opposing effects on Rac and Rho in B16F10 cells: implications for dendrite formation in melanocytic cells. *Pigment Cell Res* 2003;16(2):139-48.
123. Nobes CD, Hall A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 1999;144(6):1235-44.
124. Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34(7):746-61.

125. Guo F, Debidda M, Yang L, Williams DA, Zheng Y. Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *J Biol Chem* 2006;281(27):18652-9.
126. Pellegrin S, Mellor H. Actin stress fibres. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 20):3491-9.
127. Sawada K, Morishige K, Tahara M, et al. Lysophosphatidic acid induces focal adhesion assembly through Rho/Rho-associated kinase pathway in human ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2002;87(3):252-9.
128. Joshi B, Strugnell SS, Goetz JG, et al. Phosphorylated caveolin-1 regulates Rho/ROCK-dependent focal adhesion dynamics and tumor cell migration and invasion. *Cancer Res* 2008;68(20):8210-20.
129. Scaife RM, Job D, Langdon WY. Rapid microtubule-dependent induction of neurite-like extensions in NIH 3T3 fibroblasts by inhibition of ROCK and Cbl. *Mol Biol Cell* 2003;14(11):4605-17.
130. Wang L, Yang L, Luo Y, Zheng Y. A novel strategy for specifically down-regulating individual Rho GTPase activity in tumor cells. *J Biol Chem* 2003;278(45):44617-25.
131. Chan CC, Khodarahmi K, Liu J, et al. Dose-dependent beneficial and detrimental effects of ROCK inhibitor Y27632 on axonal sprouting and functional recovery after rat spinal cord injury. *Exp Neurol* 2005;196(2):352-64.
132. Kubo T, Yamaguchi A, Iwata N, Yamashita T. The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders. *Ther Clin Risk Manag* 2008;4(3):605-15.
133. Xue F, Takahara T, Yata Y, et al. Blockade of Rho/Rho-associated coiled coil-forming kinase signaling can prevent progression of hepatocellular carcinoma in matrix metalloproteinase-dependent manner. *Hepatol Res* 2008;38(8):810-7.
134. Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, et al. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 2008;453(7191):51-5.
135. Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, et al. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(29):10889-94.
136. Lammermann T, Sixt M. The microanatomy of T-cell responses. *Immunol Rev* 2008;221:26-43.

137. Pulukuri SM, Rao JS. Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor growth and metastasis. *Int J Oncol* 2008;32(4):757-65.
138. Partin AW, Schoeniger JS, Mohler JL, Coffey DS. Fourier analysis of cell motility: correlation of motility with metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(4):1254-8.
139. Tang Y, Olufemi L, Wang MT, Nie D. Role of Rho GTPases in breast cancer. *Front Biosci* 2008;13:759-76.
140. Shutes A, Onesto C, Picard V, Leblond B, Schweighoffer F, Der CJ. Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *J Biol Chem* 2007;282(49):35666-78.
141. Onesto C, Shutes A, Picard V, Schweighoffer F, Der CJ. Characterization of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases. *Methods Enzymol* 2008;439:111-29.
142. Srinivasan S, Wang F, Glavas S, et al. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* 2003;160(3):375-85.
143. Alblas J, Ulfman L, Hordijk P, Koenderman L. Activation of Rhoa and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol Biol Cell* 2001;12(7):2137-45.

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 5-Schritt-Modell der Einzelzellmigration durch dreidimensionale Matrix.
- Abb. 2 Aktin-Filament-Polymerisation und Depolymerisation am Vorderende der Zelle.
- Abb. 3 GTPase Zyklus.
- Abb. 4 Steuerung des Aktin-Zytoskeletts durch Rac, Rho/ROCK und Cdc42.
- Abb. 5 Herstellung der 3D-Zell-Matrix-Gele, Zeitraffervideomikroskopie und Auswerten der Filme über Zelltracking.
- Abb. 6 Messen der Pseudopodlänge.
- Abb. 7 Hemmung mesenchymaler Migration durch Inhibition von Rac durch lethales Toxin.
- Abb. 8 Unterschiedliche Morphologie, F-Aktin- und $\beta 1$ -Integrinverteilung in Kontroll- und Rac-inhibierten Zellen.
- Abb. 9 Entstehung eines sessilen, dendritischen Phänotyps mit erhaltener Proteolysefähigkeit nach Inhibition von ROCK durch Y-27632.
- Abb. 10 Veränderte Morphologie, F-Aktin und $\beta 1$ -Integrin-Verteilung in ROCK-inhibierten HT1080-MT1-Zellen.
- Abb. 11 Darstellung der Kollagenolyse nach Inhibition von ROCK.
- Abb. 12 Additive Hemmung mesenchymaler Migration durch simultane Inhibition von Rac und ROCK.
- Abb. 13 Abortiver, dendritischer Phänotyp durch simultane Inhibition von ROCK und Rac in HT1080-MT1 Zellen.
- Abb. 14 Dendritischer Phänotyp nach simultaner Inhibition von ROCK und Oberflächenproteasen.
- Abb. 15 Nachweis der ROCK-V14 Transfektion in HT1080-MT1 Zellen.
- Abb. 16 Veränderung von HT1080-MT1 Zellen nach Transfektion mit konstitutiv aktivem ROCK.
- Abb. 17 Sortierung von ROCK-V14-HT1080-MT1 Zellen anhand der Expression von $\beta 1$ -Integrin.
- Abb. 18 Konfokalmikroskopische Darstellung elongierter $\beta 1^{\text{high}}$ und rundlicher $\beta 1^{\text{low}}$ Phänotypen nach Integrin-Expression „gesorteter“ Zellen.

Abb.19 Steuerung des Aktinzytoskeletts, Zellmorphologie und Migrationseffizienz durch Rac and ROCK.

Film – Legende

Film 01	Mesenchymale Migration von HT1080-MT1 Zellen durch dreidimensionale Kollagenmatrix. 20 Stunden, 1350fache Geschwindigkeit, 10er Objektiv
Film 02	Nach Inhibition von Rac mit 1 µg/ml LT runden sich die HT1080-MT1 Zellen ab und migrieren kaum mehr. 20 Stunden, 1350fache Geschwindigkeit, 10er Objektiv
Film 03	Dendritischer, sessiler Phänotyp in HT1080-MT1 Zellen, induziert durch Inhibition von ROCK mit Y-27632 (20µM). 20 Stunden, 1350fache Geschwindigkeit, 20er Objektiv
Film 04	Konfokalmikroskopische Lebendaufnahme einer HT1080-MT1 Zelle. Nach Inhibition von ROCK zeigt sich eine sessile Zelle mit hochdynamischen Pseudopodien. 6 Stunden
Film 05	Sessiler Phänotyp mit verkümmerten Pseudopodien nach simultaner Inhibition von ROCK und Rac. 2700fache Geschwindigkeit, 10er Objektiv
Film 06	Im Vergleich zur simultanen ROCK und Rac Inhibition zeigen die nur ROCK inhibierten HT1080-MT1 Zellen deutlich stärker ausgebildete Pseudopodien. 2700fache Geschwindigkeit, 10er Objektiv
Film 07	Mit Protease-Inhibitor-Cocktail behandelte HT1080-MT1 Zellen zeigen einen amöboiden Phänotyp. 2700fache Geschwindigkeit, 10er Objektiv
Film 08	HT1080-MT1 Zellen in denen ROCK und Oberflächenproteasen simultan inhibiert sind zeigen den bekannten dendritischen Phänotyp mit dynamischen Pseudopodien. 2700fache Geschwindigkeit, 10er Objektiv.

Film 09	ROCK-V14 transfizierte HT1080-MT1-Zellen. Man sieht eine geteilte Zellpopulation mit zum einen rundlichen, blebbenden und zum anderen langgezogenen Zellen. 2700fache Geschwindigkeit, 20er Objektiv.
Film 10	ROCK-V14-HT1080-MT1 Zellen mit niedriger Integrin-Expression nach Zell-Sorting. Man sieht rundliche, hochdynamische Zellen mit blebs. 1350fache Geschwindigkeit, 40er Objektiv.
Film 11	ROCK-V14-HT1080-MT1 Zellen mit hoher Integrin-Expression nach Zell-Sorting. Die Zellen sind langgestreckt und „ziehen“ an der Matrix. 1350fache Geschwindigkeit, 40er Objektiv.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Arp2/3	Aktin-related-Protein-Komplex 2/3
ARP	Actin related Protein
°C	Grad Celsius
Cdc42	Zellteilungzyklus Protein 42 (cell division cycle 42)
COL ^{3/4}	Antikörper gegen gespaltene Kollagen ^{3/4} Fragmente
Cy5	Indodicarbocyanine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetylsäure
F-Aktin	Aktinfilamente
FACS	Fluorescence activated Cell sorter
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein
G-Protein	Guaninnukleotidbindendes Protein

G 418	Gentamicin verwandtes Aminoglycosid
GAP	GTPase activating Protein
GDI	Guanin Nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin Nucleotide Exchange Factor
Ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
Ig	Immunglobulin
LIM-Kinase	konserviertes Interaktionsmotiv von Zinkfinger-Proteinen, abgeleitet von Lin11, Isl-1 und Mec-3
LPA	Lysophosphatic Acid
LT	Lethales Toxin (<i>Clostridium sordelii</i>)
max.	maximal
mDia	mammalian Homolog of Diaphanous
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	Myosin-Light-Chain
MLCK	Myosin-Light-Chain-Kinase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRCK	Myotonic Dystrophy Kinase-related Cdc42-binding Kinase
N-WASP	neurales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
NPFs	Nucleation promoting Factors
P-MLC	phosphorylierte MLC
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	puffer based saline
PDGF	Platelet derived Growth Faktor
PenStrep	Penicillin und Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
Rac	Ras-related C3-botulinumtoxin substrate
Rho	Ras-Homolog
ROCK	Rho-Kinase

ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute – Medium
s	Sekunde
Scar/WAVE	Suppressor of cAR/WASP familiy verprolin homologous
sog.	sogenannt
tPA	Tissue-Type Plaminogen Aktivator
u.a.	unter anderem
uPA	Urokinase-Type Plasminogen Aktivator
v. a.	vor allem
WASP	Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein
WAVE	WASP familiy verprolin homologous
Y-27632	Rock-Inhibitor
z.B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
µl	Mikroliter
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Peter Friedl und meiner Betreuerin Dr. Katharina Wolf für freundschaftliche wie hervorragende Betreuung. Beide haben mich sehr gefördert und stetig motiviert.

Ebenso gilt mein Dank Yukio Nishimura, Ph.D., Kyushu University, Japan, für die Bereitstellung der ROCK-V14 Plasmide und die Durchführung der Westernblots zum Nachweis der konstitutiven Aktivierung nach Transfektion in unseren Zellen.

Ferner danke ich Prof. Dr. Holger Barth, Universität Ulm, für die Bereitstellung von *lethalem Toxin* für die Inhibitionsstudien von Rac.

Meiner Schwester Iris danke ich für die Unterstützung bei mathematischen Fragestellungen und Computerproblemen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Labor Friedl in Würzburg, insbesondere Margit Ott, Andrea Staudigl und Martina Jossberger für hervorragende technische Assistenz und freundschaftliche Unterstützung.

Lebenslauf

Name Jasmin Adä
Geburtsdatum/-ort 30.01.1980 in Neu-Ulm

Schulische Ausbildung

1986-1990 Grundschule Bellenberg
1990-1999 Kolleg der Schulbrüder Illertissen

Studium

10/1999-05/2006 Medizinstudium an der Universität Würzburg
08/2001 Physikum
08/2002 1. Staatsexamen
03/2005 2. Staatsexamen
05/2006 3. Staatsexamen
03/2000-08/2005 Studienelement Lusitanicum am Institut für Romanische
Philologie und ZSM der Universität Würzburg
05/2006 Approbation als Ärztin

Berufstätigkeit

Seit 07/2006 Tätigkeit als Assistenzärztin an der Universitäts-Frauenklinik
Würzburg

Würzburg, 04.11.2009