

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Goebeler

Kollektive Invasion in Melanomexplantaten:
Bedeutung von Zell-Matrix-Interaktionen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Yael Hegerfeldt

aus Essen

Würzburg, Februar 2012

Referent: Prof. Dr. med. Peter Friedl

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Manfred Scharl

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2012

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1.	Zelluläre und molekulare Mechanismen der Zellmigration	1
1.1	Das haptokinetische Modell für die Wanderung von Einzelzellen	1
1.2	Prinzipien kollektiver Zellwanderung	4
2.	Das Melanom als Modell der Tumorinvasion	6
2.1	Pathogenese und Progression des Melanoms: klinische und molekulare Grundlagen	7
2.2	Die Rolle von Integrinen bei der Invasion und Migration von Melanomzellen	8
3.	Ziel der vorliegenden Arbeit	10

Material und Methoden

Material	11	
1.	Gewinnung und Kultivierung von Melanom-Primärgewebe	12
2.	Ansetzen der Explantatkulturen	13
3.	Zeitraffer-Videomikroskopie	14
4.	Funktionsblockade von β 1-Integrinen in Primärkulturen	14
5.	Zelltracking.....	15
6.	Immunfluoreszenzfärbungen.....	16
7.	Konfokalmikroskopie.....	17

Ergebnisse

1.	Charakterisierung verschiedener Invasionsformen von Melanomexplantaten in 3D Kollagengelen	18
2.	Korrelation der Migration von Zellgruppen (Cluster) und histologischer Klassifikation des Primärtumors	20
3.	Identifizierung melanozytärer Zellen in wandernden Clustern	20
4.	Matrixreorganisation durch wandernde Cluster	21
4.1	Morphologie eines Clusters in EZM	21

4.2	Matrixstruktur in der Umgebung eines Clusters	22
5.	$\beta 1$ Integrin-Verteilung in wandernden Melanomclustern	24
6.	Funktion von $\beta 1$ Integrinen für die Migration von Clustern aus Melanomexplantaten	25
6.1	$\beta 1$ Integrine und Migrationseffizienz	25
6.2	Funktion von $\beta 1$ Integrinen für die Polarität von Zell-Matrix-Interaktionen	26
6.3	$\beta 1$ Integrin-Verteilung nach Funktionsblockade	27
7.	Konversion kollektiver Migration zur Migration von Einzelzellen nach Blockade von $\beta 1$ Integrinen	28
7.1	Wanderung von Einzelzellen aus dem Cluster nach Blockade von $\beta 1$ Integrinen	28
7.2	Morphologische Charakteristika von Einzelzellen und Integrinverteilung nach $\beta 1$ Integrin-Blockade	30
Diskussion		
1.	Bewertung der Kultivierung von Primärexplantaten in 3D Matrices als Modell der Tumorinvasion in extrazellulärer Matrix	32
1.1	Dreidimensionalität als wesentlicher Aspekt der Gewebeinvasion.....	32
1.2	Primärexplantate als Modell für die Komplexität von Tumoren	33
2.	Migration von Zellclustern als Wanderungsstrategie maligner Zellen – Bedeutung der extrazellulären Matrix	34
2.1	Nachweis melanozytärer Zellen im Cluster	34
2.2	Multizelluläre Migration als universelles Phänomen der Tumorinvasion ..	36
2.3	Matrixremodelling bei Clustern – Parallelen zur Einzelzellmigration	36
2.4	Die Geschwindigkeit haptokinetischer Zellwanderung von Zellclustern und Einzelzellen	38
2.5	Vermittlung der haptokinetischen Wanderung von Zellclustern durch $\beta 1$ Integrin abhängige Zell-Matrix-Interaktionen	39
3.	Zelluläre Heterogenität in migrierenden Clustern – konzeptionelle Bedeutung für die Invasion von Tumorzellen	41

3.1	Strukturelle Heterogenität	41
3.2	Funktionelle Heterogenität – Beitrag zur Polarität von Zell-Matrix-Interaktionen	42
4.	Der Übergang von kollektiver haptokinetischer zu amöboider Zellwanderung – ein Beispiel für die Plastizität von Zellmigration als Ausweichstrategie maligner Neoplasien	43
5.	Ausblick	45
	Zusammenfassung	47
	Literaturverzeichnis	48
	Abbildungsverzeichnis	56
	Abkürzungsverzeichnis	57
	Anhang	
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Publikationsliste	

Einleitung

1. Zelluläre und molekulare Mechanismen der Zellmigration

Zellmigration ist essentiell für eine Vielzahl biologischer Prozesse in multizellulären Organismen, insbesondere während der Organogenese im Embryonalstadium wie auch im adulten Organismus im Rahmen entzündlicher Gewebeeinfiltration durch Leukozyten, Wundheilung und Angiogenese. In pathologischer Form ist Zellmigration von Bedeutung für die Invasion und Metastasierung von Tumoren. Bis zu 90% aller Krebstodesfälle beruht auf den direkten und indirekten Folgen von Metastasierung (Sethi und Kang, 2011).

Der Prozess der Tumormetastasierung erfolgt über verschiedene sequenzielle zelluläre und molekulare Schritte: Die Zellen müssen sich vom Primärtumor lösen, die Basalmembran invadieren und in den Blutstrom eintreten (Chaffer und Weinberg, 2011). Dort müssen die Zellen überleben, an Endothelzellen anhaften, danach die subendotheliale Basalmembran durchdringen und ins sekundäre Organparenchym invadieren, um dort unter dem Einfluss lokaler Wachstumsfaktoren zu makroskopischen Metastasen auszuwachsen (Nguyen et al., 2009). Somit stellt die Fähigkeit zur Migration die Grundlage für Gewebeeinvasion im Primärorgan wie auch metastatische Disseminierung von Tumorzellen dar.

1.1 Das haptokinetische Modell für die Wanderung von Einzelzellen

Bei der Wanderung von Einzelzellen müssen verschiedene subzelluläre Prozesse innerhalb einer Zelle örtlich und zeitlich koordiniert und zyklisch wiederholt werden. In einem funktionell asymmetrischen Prozess bildet die Zelle am vorderen Ende zunächst Ausstülpungen, die zu stabilisierenden Anhaftungszonen reifen, gefolgt von einer Kontraktion und damit Vorwärtsbewegung des Zellkörpers, während sich die Zelle mit ihrem hinteren Ende vom Substrat löst (Huttenlocher und Horwitz, 2011). Dieses Prinzip der Zellwanderung entlang von Oberflächen wurde für verschiedenste benigne und maligne eukaryote Zellen beschrieben, z.B. Fibroblasten, neutrophile Granulozyten, Melanomzellen und den Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Lauffenburger

und Horwitz, 1996). Bei der Wanderung in dreidimensionalem (3D) Gewebe muss die Zelle zusätzlich Matrixbarrieren überwinden, ohne ihre Verankerung zu verlieren. In diesem Zusammenhang wurde bei mesenchymalen Zellen fokale Proteolyse hinter dem führenden Zellende an Kontaktstellen des Zellkörpers mit Kollagenfasern beschrieben, wodurch in der Matrix tunnelförmige Defekte zurückbleiben (Friedl und Wolf, 2009a).

Das haptokinetische Modell der Zellmigration beschreibt die adhäsionsvermittelte Migration von Zellen über Oberflächen. Hier vermitteln Adhäsionsrezeptoren für die extrazelluläre Matrix (ECM) – allen voran Integrine – Zugkräfte zwischen dem zur Kontraktion fähigen Zytoskelett und dem die Zelle umgebenden Substrat (Truong und Danen, 2009). Integrine sind transmembranöse Glykoproteinrezeptoren mit heterodimerem Aufbau aus jeweils einer α - und einer β -Kette. In Säugetieren wurden 18 α -Ketten und 8 β -Ketten beschrieben, die durch differentielles splicing teilweise mehrere Varianten haben (Hynes, 2002). Dabei können jeweils nur einige α -Ketten mit einer gegebenen β -Kette einen der insgesamt 24 kompletten Rezeptoren ausbilden. Integrine finden sich sowohl in Zell-Matrix- als auch in Zell-Zell-Interaktionen und vermitteln nicht nur über Ankerproteine die für Zellmigration essentielle Adhäsion zwischen Zytoskelett und Umgebung, sondern sind auch an outside-in und inside-out Signalwegen, die Zellteilung, Differenzierung und Apoptose beeinflussen, beteiligt (Campbell und Humphries, 2011; Hynes, 2002).

Schritt 1: In Folge der Zellpolarisierung bilden Membranausstülpungen an der Vorderfront der Zelle kleine, zylindrische Filopodien mit Aktinfilamenten sowie breitere Lamellopodien, in denen weitere Aktinpolymerisation und die Vernetzung der einzelnen Filamente stattfindet. Die Bildung von Aktinfilamenten wird reguliert durch zahlreiche Filament-bindende Proteine, wie Cofilin, Arp2/3, Fascin, Fimbrin, α -Aktinin und Villin, die zur Aktin-Netzwerkbildung führen und mechanische Stabilität fördern (Huttenlocher und Horwitz, 2011). Aktinpolymerisation generiert somit das Momentum für die nach vorn gerichtete Bewegung.

Schritt 2: Es folgt die Bildung von komplex organisierten Anhaftungszonen, bei denen derzeit fokale Komplexe oder Adhäsionen, fibrilläre Adhäsionen, Podosomen und Invadopodien unterschieden werden, die alle Adhäsion an Substrat unterschiedlicher Geometrie vermitteln. Ca. 180 Aktin-bindende und Adapterproteine wurden bisher beschrieben, die die verschiedenen Zelladhäsionsformen in Abhängigkeit von Zelltyp, Aktivitätszustand der Zelle und umgebender Matrix steuern (Geiger und Yamada, 2011). Gemeinsam ist ihnen die Anreicherung von Integrinen, die über weitere strukturelle Proteine wie Talin, Vinculin und Tensin und regulatorische Proteine wie fokale Adhäsionskinase und GTP-bindende Proteine RhoA und Rac mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbunden sind (Geiger und Yamada, 2011).

ECM Liganden sind Kollagen und Laminin für $\alpha 2\beta 1$ Integrine (Chan et al., 1991), Fibronectin und Vitronectin für $\alpha v\beta 3$ und Fibrinogen für Integrin $\alpha IIb\beta 3$ (*syn.* GPIIb/IIIa).

Schritt 3: Während die Zellprotrusion durch Aktinpolymerisation erfolgt, kontrahiert sich das Zytoskelett durch die ATP-verbrauchende und Calcium-abhängige Interaktion von Myosin und Aktin, und der Zellkörper inklusive des Zellkerns gleitet nach vorn (Huttenlocher und Horwitz, 2011).

Das Loslassen der Zelle am hinteren Ende im letzten Schritt, verbunden mit dem Abbau von Adhäsionszonen in diesem Bereich, ist essentiell für die Wanderung und in einigen Zellarten geschwindigkeitsbestimmend (Chen, 1981). Die Bindungen zwischen Integrinen und Zytoskelett sind im hinteren Teil der Zelle weniger stark ausgeprägt, so dass sich bei Kontraktion des Zytoskeletts Integrine vom Substrat lösen oder auch, mit Bildung von Membranfäden bis zu einem Reißen der Membran, an der ECM angehaftet zurückbleiben können (Friedl et al., 1997; Palecek et al., 1998). Als weiterer Mechanismus kann wiederum durch Interaktion mit regulatorischen Proteinen die Affinität der Integrine zu ihren Liganden so stark reduziert werden, dass sich die Bindungen lösen und Integrine über Endozytose internalisiert und recycelt werden oder sich in der Membran nach vorne bewegen (Campbell und Humphries, 2011; Ezratty et al., 2009).

Im haptokinetischen Modell hängt die Migrationsgeschwindigkeit von der Ligandenkonzentration in der ECM, die gleichzeitig Barriere und Anhaftungs-

punkt ist, und von der Zahl und Konzentration der zur Verfügung stehenden Adhäsionsrezeptoren und Zytoskelettkomponenten ab. Dabei sind mittlere Konzentrationen von Integrinen und ihrer Liganden jeweils mit der höchsten Geschwindigkeit assoziiert, wahrscheinlich weil in diesem Bereich ein optimales Gleichgewicht zwischen Adhäsion und Loslassen gewährleistet ist (Palecek et al., 1997).

Neben dem haptokinetischen Modell der Migration stark adhärenter Einzelzellen gibt es das amöboide Modell der Zellwanderung, in dem sich Zellen mit eher schwachen Adhäsionen oder sogar Adhäsionsrezeptor-unabhängig in einer 3D Matrix bewegen. Diesem Migrationstyp folgen Lymphozyten und dendritische Zellen, indem sie am führenden Ende durch Aktinpolymerisation Pseudopodien ausbilden und am hinteren Zellpol den sogenannten Uropod als eine Art Anker. Die umgebende ECM wird dabei nicht lysiert, sondern vielmehr als Leitstruktur benutzt, an der sich die Zelle entlanghangelt und durch Engstellen hindurchzwängt (Friedl und Weigelin, 2008; Lämmermann et al, 2008).

Haptokinetische Zellmigration einerseits und amöboide Wanderung andererseits scheinen dabei die Extremformen eines kontinuierlichen Spektrums von Wanderungsmechanismen darzustellen (Huttenlocher und Horwitz, 2011).

1.2 Prinzipien kollektiver Zellwanderung

Neben der Wanderung von Einzelzellen wird auch eine Wanderung von Zellen in Gruppen beobachtet und in der Literatur mit verschiedenen Begriffen beschrieben, z.B. kollektive Zellwanderung, Wanderung von Zellclustern, Wanderung von einlagigen Zellsheets, Kohortenmigration, Zellmassenbewegung und Tubulogenese (zusammengefasst in Friedl et al., 2004). Kollektive Zellwanderung ist sowohl in 2D als auch 3D Modellen und in vitro und in vivo unter Zuhilfenahme von lichtdurchlässigen metazoischen Embryonen darstellbar. Während der Embryogenese wandern unterschiedlich große Zellgruppen über längere Strecken, wie z.B. die Gastrulation oder Sprossung des Trachealbaums in Hühnerembryonen oder die Migration der sogenannten border cells, eine acht bis zwölf Zellen umfassende Gruppe von Oozyten in *Drosophila melanogaster* (Weijer, 2009).

Die Wanderung isolierter Zellgruppen wird von ähnlichen Prozessen wie bei der Einzelzellwanderung vermittelt, der Anhaftung der Zellen am Vorderpol der Gruppe und die Loslösung von Zell-ECM-Interaktionen am Hinterende – diesmal über mehrere Zellen hinweg in einer konzertierten Aktion (Friedl et al., 1995). Dabei bestimmen vor allem Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Adhäsionen einerseits und die Zellkontraktilität andererseits die Form der einzelnen Zellen und damit die Geometrie der Gruppe – von hexagonalen Zellverbänden innerhalb derer ein Kräftegleichgewicht besteht hin zu elongierten Zellen, die längliche Stränge bilden (Hilgenfeldt et al., 2008). Essentiell für aktive Wanderung ist dabei wie bei der Einzelzellwanderung die Fähigkeit von Zellen am führenden Ende der Gruppe durch Aktinpolymerisation Protrusionen und nachfolgend Zell-Matrix-Kontakte auszubilden (Montell, 2008). Zellen, die selbst keine migratorische Aktivität zeigen, können dabei von ihren beweglichen Nachbarn über die Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten mitgezogen (Theveneau und Mayor, 2011) oder von nachfolgenden Zellen nach vorne gedrückt werden (Gray et al., 2010; auch Friedl und Alexander, 2011).

Erste, zunächst noch indirekte Hinweise auf kollektive Zellwanderung bei der Invasion von gesundem Gewebe durch maligne Tumoren lieferten histologische Schnittserien, in denen sich in der Nähe des Primärtumors nicht nur vereinzelt Tumorzellen sondern auch mit dem Primarius in keiner nachweisbaren Verbindung stehende Tumorzellnester fanden. Die Verteilung dieser benachbarten Tumorzellen wurde manchmal als Beweis von multizentrischer Tumorgenese und auch schon sehr früh als Hinweis auf aktive Invasion und Migration interpretiert (zusammengefasst in Sträuli und Hämmerli, 1984). Erste Versuche mit Melanomprimärexplantaten, gewonnen aus dem Gordon-Kosswig-Melanom-System in Zahnkarpfen, zeigten in einem 2D Kultursystem auf Glas Zellgruppen, die sich vom Explantat lösten und sich mit einer Geschwindigkeit von bis zu 4 $\mu\text{m}/\text{min}$ weitestgehend gradlinig fortbewegten (Kolega, 1981). In einem weiteren in vitro 2D Modell mit humanen kolorektalen Adenokarzinomzelllinien wanderten von den in Kultur gesetzten Zellinseln ausgehend einschichtige Zelllagen ab. Diese als Kohortenmigration bezeichnete Wanderung fand sowohl auf Glas als auch auf Oberflächen statt, die mit Kollagen I und IV, Fibronectin und Laminin beschichtet waren. Dabei war die spontane Migrationsaktivität

gering, konnte jedoch durch hepatocyte growth factor/scatter factor stimuliert werden (Nabeshima et al., 1998).

Eine ähnlich gradlinige Migration wie bei Kolega im 2D System fand sich bei sogenannten Zellclustern, die sich aus Explantaten von humanen Primärtumoren lösten, die in 3D Kollagengelen kultiviert wurden (Friedl et al., 1995).

Bei allen Beispielen von Zellgruppenwanderung, bei denen die Migrationsaktivität durch Zeitraffertechnik untersucht wurde, fällt bei der durch die Multizellularität geringeren Verformbarkeit der Gruppe eine sehr gradlinige kollektive Wanderung mit Wahrung der Zell-Zell-Interaktionen und hoher relativer Ortstreue der Einzelzellen innerhalb der Gruppe auf (Friedl et al., 1995). Dabei wird trotz erheblicher Zugkräfte die Kohäsion innerhalb der Gruppe über Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren, darunter auch $\beta 1$ Integrine, aufrechterhalten (Tusch, 2003).

Somit sind in migrierenden Tumorzellclustern der Morphogenese ähnliche morphologische und wahrscheinlich molekulare Prinzipien der Zellgruppenwanderung wirksam, die durch Zusammenwirken von Zellkontraktilität, Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen die kollektive Migration einer vielgestaltigen Gruppe ermöglichen.

2. Das Melanom als Modell der Tumorinvasion

Melanome entstehen aus den Pigment-produzierenden Melanozyten in der basalen Epidermis. Physiologischerweise ist die Proliferation von Melanozyten streng kontrolliert und findet nur selten statt, jedoch behalten Melanozyten ein lebenslanges Proliferationspotential. Melanozyten entwickeln sich aus Melanoblasten, die von pluripotenten Neuralleistenzellen abstammen. Von der Neuralleiste wandern sie in zahlreiche Organe aus, allen voran die Haut, in der sie sich diffus verteilen (Liu und Herlyn, 2005).

2.1 Pathogenese und Progression des Melanoms: klinische und molekulare Grundlagen

Melanome treten in der Regel an der Haut auf und seltener in anderen Organen mit Melanozytenanteil, einschließlich Uvea, gastrointestinalen Schleimhäuten und Meningen.

In Deutschland erkranken ca. 15.000 Menschen jährlich an einem malignen Melanom. Es macht bei Frauen 4,1% und bei Männern 2,8% aller bösartigen Neubildungen aus und verursacht etwa 1% aller Krebstodesfälle. Bei steigender Inzidenz mit einer Verdreifachung seit den 1980-iger Jahren ist die Mortalität weitgehend gleich geblieben, was für bessere Früherkennung in heilbaren Stadien spricht, mit 5-Jahres-Überlebensraten aller diagnostizierten Melanome von 80-90% dank effizienter Früherkennung. Dagegen liegen die 5-Jahres-Überlebensraten des fortgeschrittenen, metastasierten Melanoms um 5%, entsprechend geringer Ansprechraten für Chemo-, Strahlen- und Immuntherapie (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V. und des Robert Koch-Instituts, 2008).

Als gesicherte Risikofaktoren gelten ein Melanom in der Vorgeschichte, die Entwicklung dysplastischer Naevi, eine Melanomerkrankung in der Familienanamnese sowie intensive UV-Exposition der Haut, insbesondere traumatische Sonnenbrände in der Kindheit. Neben der Entwicklung auf dem Boden kongenitaler und erworbener Naevi können Melanome auch de novo in klinisch unauffälliger Haut entstehen. Genetisch-molekulare Risikofaktoren sind eine Keimbahnmutation in *CDKN2A* auf Chromosom 9p21, eine aktivierende Spontanmutation in der kleinen GTPase B-Raf und die hereditäre Erkrankung Xeroderma pigmentosum. Als weiterer Riskofaktor steigert systemische Immunsuppression, z.B. im Rahmen einer Organtransplantation, die Melanominzidenz um Faktor 3 (Miller und Mihm, 2006).

Die biologisch-klinische Aggressivität von Melanomen korreliert mit der Tumordicke. Läsionen bis 0,75 mm Tumordicke entsprechen einem T1 Stadium mit klinisch günstiger Prognose, während Melanome mit nur wenigen Millimetern Dicke häufig bereits fortgeschritten sind und mit hohem Metastasierungsrisiko einhergehen. Im Verhältnis zu anderen soliden Tumoren, so z.B. beim

Mammakarzinom, ist die Metastasierungsneigung relativ zum Volumen des Primärtumors beim Melanom besonders hoch (Balch et al., 2009).

Nach Clark läuft die Melanomentwicklung in fünf Stufen ab: Der erste Schritt beinhaltet die Entstehung benigner Naevi durch die Proliferation strukturell normaler Melanozyten, gefolgt von zunehmender zytologischer Dysplasie der Naevuszellen als zweitem Schritt. Bereits in diesem Stadium finden sich häufig *BRAF*-Mutationen (ca. 60% dysplastischer Naevi und Melanome), die Proliferation, Überleben und Invasionsfähigkeit der Zellen fördern (Chapman et al., 2011). Im dritten Schritt, in der sogenannten radialen Wachstumsphase, liegt nach zytomorphologischen Malignitätskriterien bereits ein Melanom vor, das vor allem intradermal, d.h. oberhalb der Basalmembran und entlang der Epidermis wächst, mit eher geringer Tendenz, die papilläre Dermis in Form von Einzelzellen und kleinen Zellnestern zu invadieren. In der darauffolgenden vertikalen Wachstumsphase (Stadium 4) bildet sich ein Tumor mit knotigen Anteilen und deutlicher dermaler Invasion. Dieser Schritt bekommt klinische Relevanz in der Tumordicke nach Breslow, die in der TNM-Klassifikation die prognostisch wichtigste und daher T-Stadium bestimmende Eigenschaft ist (Balch et al., 2009). Mit dem letzten und fünften Schritt erreicht das invasive Melanom Lymph- oder Blutgefäße mit nachfolgender Disseminierung, Extravasation und Proliferation in entfernten Organen zur Ausbildung von klinisch okkulten Mikro- oder makroskopischen Makro-Metastasen (Clark et al., 1984; Miller und Mihm, 2006).

2.2 Die Rolle von Integrinen bei der Invasion und Migration von Melanomzellen

Neben genetisch-determinierten Defekten in Melanozyten wird einer gestörten Homöostase in der Haut zunehmende Bedeutung für die Pathogenese und Progression des Melanoms eingeräumt, insbesondere aktivierende Interaktionen zwischen Melanozyten, Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Immunzellen und der sie umgebenden Matrix. Melanozyten exprimieren Integrine, Cadherine und Zell-Adhäsionsmoleküle der Immunoglobulinsuperfamilie, die während der Melanomentstehung zum Teil fehlreguliert werden (Haass et

al., 2005). An dieser Stelle soll auf die Bedeutung von Integrinen als Progressionsmarker bei Melanomen eingegangen werden, insbesondere ihr Beitrag für die Melanomzellinvasion und möglicherweise -metastasierung.

Eine besonders starke Expressionsregulation wurde für $\beta 3$ Integrine gezeigt, die in fast allen Melanomen in der vertikalen Wachstumsphase und bei metastasierten Tumoren deutlich aufreguliert sind, jedoch in Frühphasen der Tumorentstehung und normalen Melanozyten fehlen (Abelda et al., 1990, Danen et al., 1994). Die Expressionsstärke von $\beta 3$ Integrinen im Primärtumor korreliert stark sowohl mit der Tumordicke nach Breslow als auch mit dem Risiko späterer Metastasierung und Mortalität (Hieken et al., 1996). In Melanomzellen assoziiert die $\beta 3$ Integrinkette mit der αv -Kette zu einem heterodimeren Rezeptor für Vitronektin, Fibronektin, Fibrinogen und Osteopontin (Hynes, 2002; Danen et al., 1994). In Gewebeschnitten benigner und maligner Läsionen ist $\alpha v \beta 3$ Integrin ausschließlich in primären Melanomen und Melanommetastasen, nicht jedoch in normalen Melanozyten oder dysplastischen Naevi exprimiert (Danen et al., 1994). Melanomzelllinien, die keine αv Ketten exprimieren, zeigen nach Aufregulation von $\alpha v \beta 3$ starkes tumorigenes Potential nach Transplantation in athymische Nacktmäuse (Felding-Habermann et al., 1992). Die Expression von $\alpha v \beta 3$ Integrin korreliert mit und fördert die Expression der für Invasion wichtigen aktiven Form von Matrixmetalloproteinase-2 in Melanomen (Hofmann et al., 2000) und steigert die Expression des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2 Proteins (Petitclerc et al., 1999).

Weniger klar ist die funktionelle Rolle von $\alpha 2 \beta 1$ Integrin, einem der wichtigsten Kollagenrezeptoren, dessen Aufregulation ebenfalls mit der Melanomprogression korreliert und zur Invasivität von Melanomzellen in vitro beiträgt. $\alpha 2 \beta 1$ fehlt in normalen Melanozyten sowie in der großen Mehrzahl melanozytärer Naevi, während es in vielen Melanomen ab der vertikalen Wachstumsphase (T2, >1,5mm Breslow-Dicke) stark aufreguliert wird und weiterhin in Fernmetastasen exprimiert bleibt (Bröcker et al., 1985; Klein et al., 1991).

Auch $\alpha 3 \beta 1$ und $\alpha 5 \beta 1$ Integrine gelten als Progressionsmarker des Melanoms. $\alpha 3 \beta 1$ Integrine sind in melanozytären Naevi nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert, jedoch – korrelierend mit der Invasionstiefe – in malignen Läsionen

und der Mehrheit (82%) der Fernmetastasen aufreguliert (Natali et al., 1993; Danen et al., 1994).

Die Bedeutung von $\beta 1$ Integrinen für die invasive Zellmigration zeigen Experimente mit humanen Melanomzelllinien in 2D und 3D Migrationsmodellen, bei denen ein haptokinetischer Migrationstyp auftrat, der von $\alpha 2\beta 1$ Integrinen abhängig war (Klein, 1991; Maaser et al., 1999). $\alpha 2\beta 1$ Integrine vermitteln starke Adhäsion und Mechanotransduktion in invasiven Melanomzellen, und eine Adhäsionsblockade führt zu einer deutlich reduzierten Migrationsaktivität mit Verlust von Zellpolarität und Membranaktivität (Maaser et al., 1999).

Der mechanistische Beitrag von Integrinen zur Melanomprogression und -metastasierung in vivo ist jedoch, mangels stringenter in vivo Modelle, bisher unklar (Friedl und Alexander, 2011).

3. Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Melanom ist ein hochaggressiver Tumor bedingt durch seine sehr frühe Invasion in das umliegende Gewebe und schnelle Metastasierung. Neben der in vitro gut beschriebenen Einzelzellwanderung bei einer Vielzahl von Tumoren, einschließlich des Melanoms, die einem haptokinetischen Migrationstypus entspricht, sind vor allem in histologischen Schnitten mehrzellige Verbände in der mittleren und tiefen Dermis darstellbar, die damit indirekte Hinweise für kollektive Zellinvasion liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels Zellkulturverfahren untersucht werden, ob aus primären Melanomexplantaten, ähnlich wie aus epithelialen und mesenchymalen Tumoren, Zellen im Kollektiv auswandern.

Nachdem in ersten Versuchen mit Explantatkulturen von Primärmelanomen in einem 3D Kollagenmodell kollektive Zellmigration nachweisbar war, sollte die Zell-Matrix-Interaktion bei dieser Migrationsform näher beschrieben werden. Da $\beta 1$ Integrine ein Progressionsmarker für Melanome sind und wesentlich zur Migration von Tumorzellen beitragen, sollte geklärt werden, ob sie die kollektive Migration von Melanomzellen vermitteln.

Material und Methoden

Material

Produkt

Herkunft

Zellkultur

Natriumbikarbonat 7,5%

Gibco BRL, Life technologies, Paisly, Schottland

Penicillin/Streptomycin

Gibco BRL, Life technologies, Paisly, Schottland

(PenStrep)

PBS

Merck, Darmstadt

EDTA

Merck, Darmstadt

RPMI 1640

PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

FCS

PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

MEM

ICN, Eschwege

dermales bovines Kollagen

Collagen Corp., Palo Alto, CA, USA

(Vitrogen 100)

Chemikalien

para-Formaldehyd

Sigma, Deisenhofen

Azeton

Merck, Darmstadt

Protease K

Dako, Hamburg

Antikörper

IgG1 Maus anti-hu β 1 Integrin

4B4

Coulter, Hamburg

IgG2a Maus anti-hu β 1 Integrin

K20

Immunotech, Marseille, Frankreich

IgG1 Maus anti-hu E-Cad mAk

HECD-1

Zymed, Berlin

IgG1 Maus anti-hu gp100 mAk

HMB-45

Dako, Hamburg

LRSC Ziege-Fab anti-Maus IgG

Dianova, Hamburg

Ausrüstung

Zentrifuge

Heareus Sepatech, Osterode

Mikroskope

Leica DMIL, Bensheim

Temperaturmeßgerät

Statop 4849, Chauvin-Arnoux, Frankreich

Wärmelampen	Philips, Amsterdam, Niederlande
Videokamera	Topica TP 505D, CCD-Kamera, Taipei, Taiwan
Videorecorder	JVC BR S 920 E, timelapse video cassette recorder, Yokohama, Japan
Konfokalmikroskop	Leica TCS-4D, Bensheim
Kryostat 1720	Leitz, über Leica, Bensheim
Zelltrackingcomputer	ScreenMachine-Videokarte, Fast Electronics, München, mit Macintosh II Computer

1. Gewinnung und Kultivierung von Melanom-Primärgewebe

Klinisch und dermatoskopisch melanomverdächtige Hautläsionen wurden im Rahmen der klinischen Versorgung an der Universitätshautklinik exzidiert, fotografiert und noch im Operationssaal so vom Pathologen geteilt, dass ein für die Diagnostik entbehrliches Areal für die Primärkultur asserviert wurde. Lebendgewebe wurde unmittelbar nach der Teilung in RPMI Medium auf Eis gelagert und für Primärkulturen verarbeitet. Die Gewebegewinnung erfolgte in anonymer Form nach schriftlicher Einwilligung der Patienten in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki.

Die histologische Diagnosesicherung anhand von Paraffinschnitten im Rahmen der Patientenversorgung umfasste Hämatoxylin-Eosin-Färbungen in Kombination mit immunhistochemischen Färbungen für die Antigene S-100, Gp100 und MART-1. Es wurden die Breslow-Tumordicke sowie der Clark-Level als Staging-Parameter bestimmt.

Um bei möglicher heterogener Zusammensetzung des Primärtumors die Malignität des in Kultur genommenen Tumorareals zu bestätigen, wurde der unmittelbar nachfolgende Schnitt als Gefrierschnitt histologisch-pathologisch analysiert. Somit wurde für alle Primärkulturen die klinische Diagnose eines invasiven, malignen Melanoms im Rahmen der universitären Patientenversorgung gesichert und für die kultivierte Subregion mittels Gefrierschnitt bestätigt.

2. Ansetzen der Explantatkulturen

Die Explantate wurden intraoperativ vom Pathologen aus nicht zentralen Anteilen des Tumors gewonnen, auf einer sterilen mit 0,9% NaCl getränkten Kompresse transportiert und nachfolgend in Medium (RPMI, 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin) zerteilt und kultiviert.

Das Tumorteilstück wurde vorsichtig mit einem Skalpell von Hand in circa 1 mm³ große Stückchen geschnitten und mit Medium abgespült, um Zelldebris zu entfernen.

Das Kollagengel wurde aus bovinem Kollagen Typ I (Vitrogen), Minimal Essential Medium (MEM), Natriumbicarbonat und Medium auf Eis gemischt (Tabelle 1). Anschließend wurden sterile Deckgläser (Stärke 0) in 6-Loch-Platten eingebracht und darauf Tropfengele mit einem Volumen von 100 µl gegossen. Jeweils ein Tumorstückchen wurde mittig in ein Tropfengel eingebettet. Die Tropfengele polymerisierten im Brutschrank bei 37°C für 20 min, wurden anschließend mit 2 ml Medium überschichtet und für die Primärkultur bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit über mehrere Tage kultiviert.

Bei Einbettung passiv im Gel verteiltes Tumormaterial wurde videomikroskopisch festgehalten, um es von später aktiv ausgewandertem Material unterscheiden zu können.

Um die Auswanderung von Einzelzellen, Sheets, Auswüchsen und Clustern zu dokumentieren, wurden die Kulturen einmal täglich mikroskopisch begutachtet. Das Medium wurde bei initialem Umschlag des Farbindikators gewechselt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Kollagengels

Material	Menge	Konzentration
Vitrogen	750 µl	3 mg/ml
MEM	100 µl	
Bicarbonat	50 µl	
Medium	450 µl	
Kollagen-I-Suspension	1350 µl	1,67 mg/ml

3. Zeitraffer-Videomikroskopie

Primärkulturen, die Auswüchse oder bereits Cluster zeigten, wurden mit Zeitraffervideomikroskopie in speziellen Kammern gefilmt. Diese bestanden aus Objektträgern, auf denen als Kammerschmalseiten drei Stege aus Wachs (jeweils ein Teil Vaseline auf einen Teil Paraffin) aufgebracht wurden (Friedl und Bröcker, 2004). Auf diesen Stegen wurde das Deckglas mit Tropfengel mit Wachs befestigt. Die so entstandene ca. 250 μ l große Kammer wurde komplett mit Medium aufgefüllt, zum Äquilibrieren des pH-Wertes für 15 min im Brutschrank inkubiert und anschließend mit Wachs versiegelt.

Die Proben wurden nun auf inversen Zellkulturmikroskopen bei 63-facher Vergrößerung mit einer 320-fachen Zeitraffung gefilmt, d.h. eine Sekunde Videofilm entsprach ca. 5 min Echtzeit. Die Tropfengele wurden von der Deckglassseite her mit der an den Fototubus des Mikroskops angeschlossenen Videokamera gefilmt. Gelegentlich bewegten sich die Cluster aus dem gefilmten Ausschnitt, sodass manuell nachjustiert werden musste. Während des Filmens wurden die Proben mit Hilfe von Wärmelampen, die über einen Regler mit in die Wachsränder der Kammer eingebettetem Temperaturfühler reguliert wurden, bei einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten.

4. Funktionsblockade von β 1 Integrinen in Primärkulturen

Um den Einfluss von β 1 Integrinen auf die Wanderung von Einzelzellen und Zellclustern zu untersuchen, wurden migratorisch aktive Primärkulturen zunächst mit Zeitraffervideomikroskopie für ca. 3 h gefilmt (Spontanmigration der unbehandelten internen Kontrolle), anschließend im wandernden Zustand mit funktionsblockierendem mAk 4B4 (Morimoto et al. 1985) inkubiert und erneut gefilmt.

Dann wurde die Migrationskammer an einer Seite vorsichtig eröffnet und das darin enthaltene Medium mit sterilem Papier abgesaugt. Anschließend wurde mAk 4B4 in Zellkulturmedium mit einer Konzentration von 30 μ g/ml in CO₂ equilibriertem Medium zugegeben, sodass sich nach Vermischung mit dem im Kollagengel selbst enthaltenen Medium eine Endkonzentration von ca. 10 μ g/ml ergab. Die Kammer wurde wieder mit Wachs versiegelt, für bis zu 65 h gefilmt,

und die Lebendmikroskopie wurde nach erneutem Öffnen durch Probenfixierung (4% PFA, 30 min) beendet. Alle Schritte wurden unter Wärmelampen bei 37°C durchgeführt.

5. Zelltracking

Die zeitgerafften Videobänder wurden mit Hilfe von Computer-gestütztem Zelltracking ähnlich der zuvor für das Tracking von Einzelzellen etablierten Methode analysiert und hinsichtlich des Migrationsparameters „speed“ und Pfade der Cluster sowie sich von den Clustern abspaltenden Einzelzellen durch die Matrix ausgewertet (Friedl et al. 1993).

Aus den zeitlich aufgelösten xy-Werten der Position mehrerer Zellen innerhalb desselben Clusters wurde sowohl der Pfad des getrackten Objektes in der gefilmten Ebene rekonstruiert als auch die Migrationsgeschwindigkeit berechnet.

Um den durchschnittlichen Pfad und die durchschnittliche Geschwindigkeit eines Zellclusters in seiner Gesamtheit darzustellen, wurden 4 bis 10 morphologisch eindeutig identifizierbare Zellen in unterschiedlicher Position innerhalb des Clusters getrackt. Aus den sich ergebenden xy-Koordinaten wurde anschließend zu jedem Zeitpunkt Geschwindigkeit und Pfad des gesamten Clusters gemittelt.

Ebenfalls ausgewertet wurde die Migration von Einzelzellen, die sich nach Blockade von $\beta 1$ Integrinen von einem Cluster lösten. Dafür wurden alle sich lösenden Zellen ($n = 20$) ab dem Zeitpunkt der kompletten Loslösung getrackt und die durchschnittliche Geschwindigkeit für Phasen mit mindestens 4 losgelösten, wandernden Zellen berechnet.

Die Berechnung der durchschnittlichen Geschwindigkeit von Einzelzellen erfolgte unter Einbeziehung von Phasen ohne Migrationsaktivität („average

speed“), während die tatsächliche Migrationsgeschwindigkeit dagegen nur für Phasen aktiver Migration ermittelt wurde („steady-state velocity“).

Da in einem wandernden Cluster sich nicht alle Zellen gleichzeitig vorwärts bewegen, was zu Verformungen des Clusters führt, wurde überwiegend die durchschnittliche Geschwindigkeit berechnet und mit der Migrationsgeschwindigkeit der Einzelzellen verglichen.

6. Immunfluoreszenzfärbungen

Proben mit wandernden Clustern wurden zur Identifizierung von potentiell in den Clustern enthaltenden melanozytären Zellen für das zytosolische Gp 100 mit mAk HMB45 (Kapur et al. 1992) gefärbt. Dafür wurde das Kollagengel zunächst mit vierprozentigem PFA für 30 min bei 37°C fixiert. Anschließend wurde das Gewebe mit Aceton für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert und danach mit Protease für 10 min inkubiert, um durch PFA vernetzte Antigenstrukturen für den eingesetzten primären Antikörper aufzudecken. Die Proben wurden für 2 h mit primärem Antikörper HMB45 mit einer Konzentration von 2 µg/ml bei 4°C inkubiert.

Zur Detektion von $\beta 1$ Integrin wurden Proben mit wandernden Clustern nach PFA-Fixierung wie oben mit anti- $\beta 1$ Integrin mAk 4B4 und K20 (Amiot et al. 1986) mit einer Konzentration von jeweils 10 µg/ml für 2 h inkubiert. Durch die Verwendung von Antikörpern gegen zwei verschiedene Epitope auf dem gleichen Zellmembranmolekül sollte ein stärkeres Signal erzeugt werden.

Als sekundärer Antikörper wurden LRSC-markierte Fab-Fragmente (Konzentration 1,3 µg/ml) eingesetzt. Sowohl die wie oben beschriebenen vorbehandelten Proben als auch die Proben aus den Funktionsblockadeversuchen wurden für jeweils 60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit sekundärem Antikörper inkubiert.

Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Proben jeweils 3 mal für 5 min mit 2,5 ml PBS gespült.

7. Konfokalmikroskopie

Die für Immunfluoreszenz präparierten Proben wurden mittels Konfokalmikroskopie für Fluoreszenz und auch Reflexion der umgebenden extrazellulären Matrix sowie reflektierender Zellbestandteile aufgearbeitet. In der Konfokalmikroskopie wird zur Anregung Laserlicht – hier über einen 30/70 oder doppelt dichroitischen Strahlteiler – durch das Objektiv in die Probe gelenkt.

Zellen und Kollagenmatrix wurden in hydriertem Zustand ohne spezielle Anfärbung dargestellt, indem das von Zell- und Matrixstrukturen reflektierte Laserlicht im ersten Photodetektor detektiert wurde.

Im weiteren Strahlengang trennte ein OG 590-Longpass-Filter die kurzwelligere Grün-Fluoreszenz von längerwelliger Rot-Fluoreszenz.

Diese Kombination aus Reflexions- mit Fluoreszenzmikroskopie erlaubte die Verteilungsanalyse von $\beta 1$ Integrinen auch im Hinblick auf mögliche Kollokalisierung mit Kollagenfasern hin.

Um große Objekte wie Zellcluster in der umgebenden Matrix bei möglichst hoher Auflösung aufnehmen zu können, wurde ein 63x NA1,3 Ölimmersionsobjektiv eingesetzt. Zur Darstellung größerer Bildausschnitte wurden mehrere nebeneinanderliegende gering überlappende Felder in x-y-z aufgenommen (z-Abstand 2 μm) und mit der TCS Software (Leica) und mit Adobe Photoshop und Aldus Photostyler digital zusammengesetzt.

Ergebnisse

1. Charakterisierung verschiedener Invasionsformen von Melanom-explantaten in 3D Kollagengelen

Bei der Kultur von Melanomexplantaten in 3D Kollagenmatrices wurden verschiedene Invasionsformen beobachtet. Einzelne spindelförmige Zellen wanderten neben Leukozyten, die als kleine rundliche Zellen imponierten, meistens als erstes vom Tumorexplantat (Abb. 1, weiße Sternchen) in die umgebende Matrix aus (Abb 1, A und F, schwarze Pfeilspitzen). Dabei ließen sich spindelförmige Tumorzellen lichtmikroskopisch nicht von Fibroblasten unterscheiden.

Einige Explantate bildeten größere Lysezonen (Abb. 1B, schwarze Pfeilspitzen) im umgebenden Kollagen (schwarzes Sternchen) aus. Dieses Phänomen zeigte sich nicht bei allen Primärtumoren. Wenn es jedoch auftrat, dann fand es sich in mindestens 25% der voneinander unabhängig kultivierten Proben eines Tumors.

Diese proteolytische Aktivität ließ sich in diesem Modell jedoch keiner bestimmten Zellpopulation aus dem Tumorexplantat zuordnen.

Neben der Invasion durch Einzelzellen trat ebenfalls eine kollektive Invasion durch multizelluläre Verbände auf. Diese konnte verschiedene Ausprägungen haben. Einige Tumore bildeten sogenannte Sheets aus, eine überwiegend einlagige Schicht aus zusammenhängenden Zellen (Abb 1C, schwarze Pfeilspitzen), die über eine breite Basis mit dem Explantat Kontakt hielt und sich an der Interphase zwischen Kollagenmatrix und Boden der Kulturplatte ausbreitete. Einige Kulturen bildeten kompaktere Auswüchse (Abb. 1D, schwarze Pfeilspitzen), aus welchen sich wiederum einzelne Zellen und manchmal Zellverbände, sogenannte „Cluster“, lösten. Als Cluster wurden dabei solche Gruppen definiert, die lichtmikroskopisch erkennbar aus mindestens 3 zusammenhängenden Zellen bestanden. Cluster selbst konnten verschiedene Formen annehmen (Abb. 1E und F, weiße Pfeilspitzen). Einige Cluster waren eher breit und flach geformt (Abb. 1E), andere waren eher stab- bis spindelförmig (Abb. 1F).

Alle Invasionsstrategien wurden bereits ab 12 Stunden Kulturdauer beobachtet, konnten aber auch noch nach bis zu 4 Wochen auftreten.

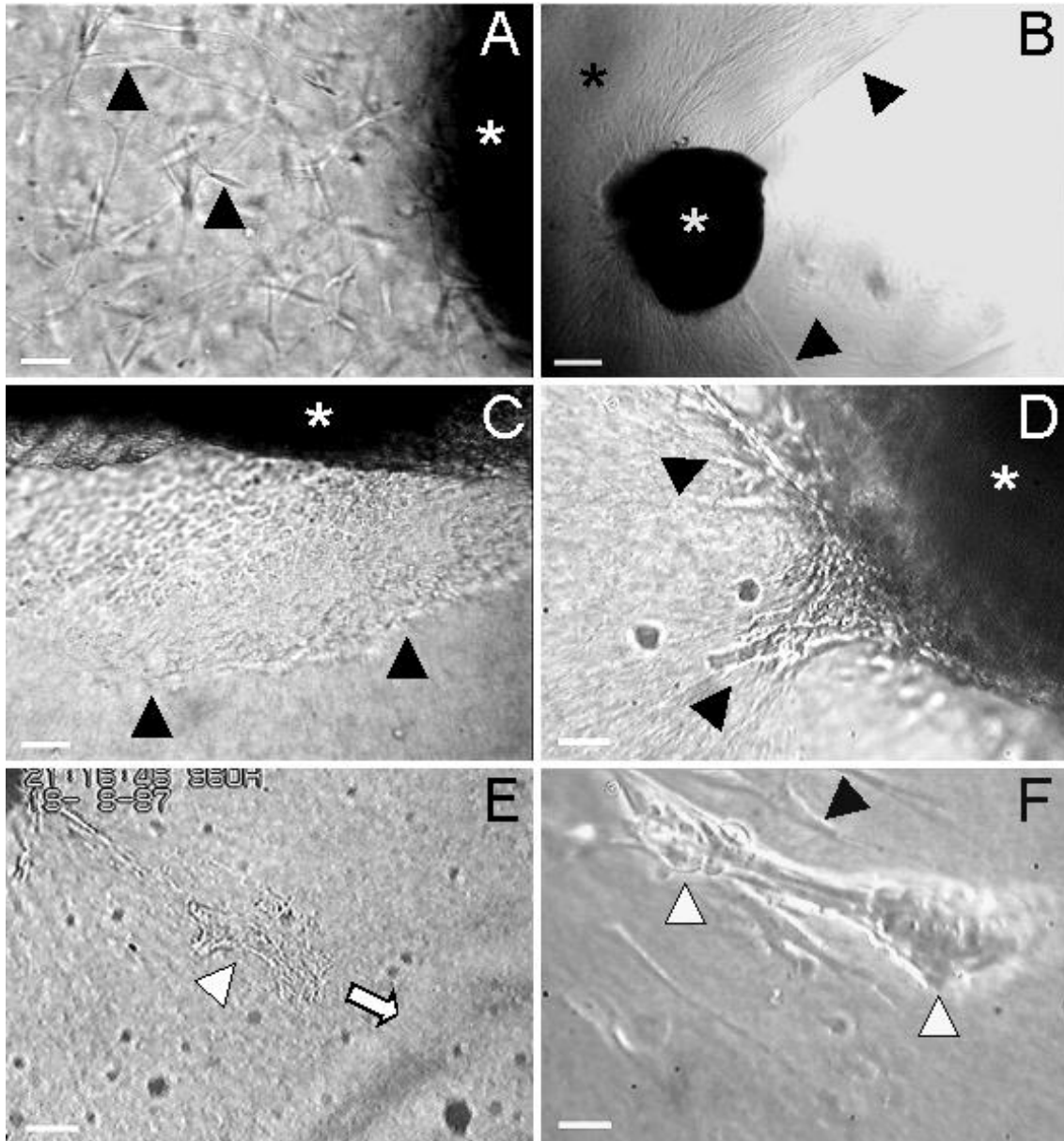


Abbildung 1: Invasionsformen von Melanomexplantaten in 3D Kollagenmatrices. Lichtmikroskopische Aufnahmen Kulturen unterschiedlicher Primärmelanome. Weiße Sternchen: Melanomexplantat. (A) und (F): spindelförmige Einzelzellen (schwarze Pfeilspitzen). (B): Proteolyse des Kollagengels (schwarzes Sternchen), Rand der Lysezone (schwarze Pfeilspitzen). (C): kollektive Invasion durch einlagiges Sheet, äußere Begrenzung (schwarze Pfeilspitzen). Kollektive Invasion durch kompakten Auswuchs (schwarze Pfeilspitzen) mit Verbindung zum Explantat (schwarze Zone). (E): flaches Cluster (weiße Pfeilspitzen), dessen Migrationsrichtung (Pfeil) mit Zeitraffer-Videomikroskopie bestimmt wurde. (F): hantelförmiges Cluster (weiße Pfeilspitzen). Balken in A, C, D, E: 100 µm. Balken in B: 250 µm. Balken in F: 25 µm.

2. Korrelation der Migration von Zellgruppen (Cluster) und histologischer Klassifikation des Primärtumors

Mit der Frage, ob Clusterentwicklung im in-vitro-Modell mit der Aggressivität oder dem Fortschritt der Tumorerkrankung der jeweiligen Patienten korreliert, wurden zwei klassisch-histologische Stagingparameter der Primärtumore herangezogen.

Trotz der geringen Anzahl untersuchter Tumore zeigte sich eine Tendenz häufigerer Clusterbildung in Kulturen von den Primärtumoren, die als Hochrisikomelanome eingestuft wurden (Tabelle 2).

Tab. 2: Clusterbildung bei verschiedenen Melanomtypen

Klassifikation	Anzahl der Primärtumore	Clusterfrequenz, n (%)
<i>Melanomtyp</i> LMM	2	0 / 2 (0)
SSM	7	2 / 7 (29)
ALM	3	3 / 3 (100)
NM	1	1 / 1 (100)
<i>Tumordicke (mm)</i> < 1,69	5	2 / 5 (40)
1,7 – 3,6	6	2 / 6 (33)
> 3,6	2	2 / 2 (100)

3. Identifizierung melanozytärer Zellen in wandernden Clustern

Da sich Melanomgewebe neben malignen Zellen auch aus verschiedenen nicht-malignen Zellen wie z. B. Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen zusammensetzt, wurde untersucht, ob wandernde Cluster Zellen melanozytären Ursprungs enthalten.

Melanozytäre Zellen wurden zum einen lichtmikroskopisch an Hand ihrer Pigmentgranula in multizellulären Invasionszonen identifiziert (Abb. 2A). Zum anderen waren Zellen innerhalb eines Clusters positiv für den melanozytären

Marker GP 100, der mittels Immunfluoreszenz mit mAk HMB 45 detektiert wurde (Abb. 2B).

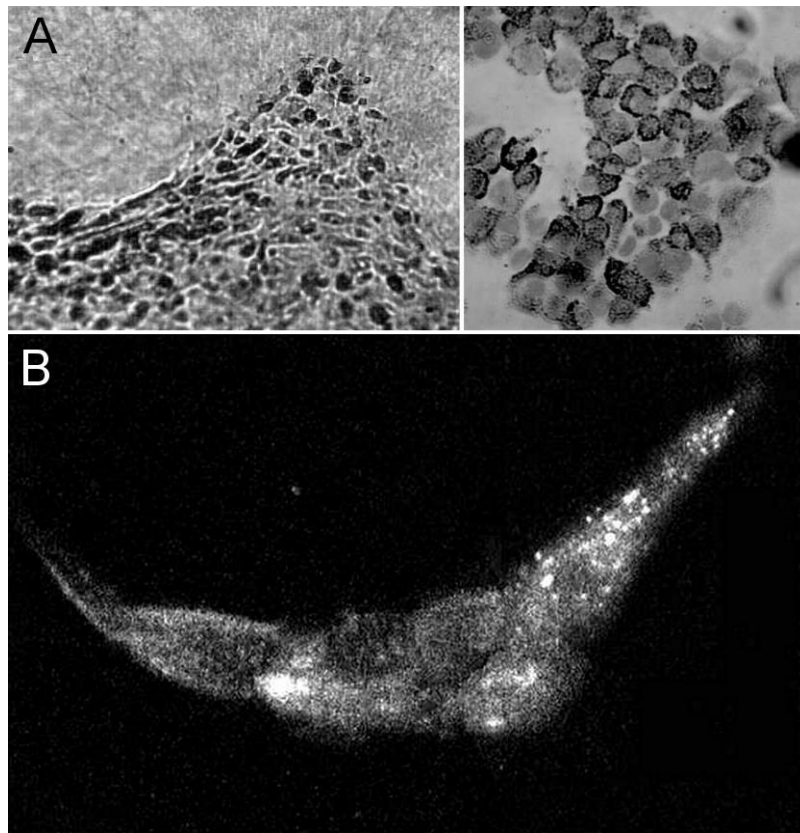


Abbildung 2: Invasive Zellverbände enthalten melanozytäre Zellen. (A): native, lichtmikroskopische Darstellung von Pigmentgranula in multizellulärer Invasionszone, (B): Immunfluoreszenzfärbung eines Clusters mit mAk HMB 45 und sekundären LRSC-konjugierten Fab-Fragmenten (Fixierung mit PFA, Permeabilisierung mit Aceton).

4. Matrixreorganisation durch wandernde Cluster

Die Einbettung eines wandernden Clusters in die umgebende EZM und deren Struktur wurde mit Hilfe eines konfokalen Reflexionsbildes dargestellt. Das Cluster wurde vor und während der Fixierung videomikroskopisch gefilmt und so die Migrationsrichtung bestimmt.

4.1 Morphologie eines Clusters in EZM

Vor der Fixierung entwickelte das Cluster zwei in unterschiedliche Richtungen strebende Enden (Abb. 3, Einsatz, Pfeile). Das größere, aus mehreren Zellen bestehende führende Ende bestimmte die Bewegungsrichtung des gesamten

Clusters (Abb. 3, großer Pfeil). Bei allen Zellen, die direkt mit der Matrix interagierten, zeigten sich Zellmembranausstülpungen (ruffles), die Kontakt mit Kollagenfasern aufwiesen (Abb. 3 schwarze Linie und Abb. 4, schwarz-weiße Linie). Zellen im Mittelteil des Clusters, die keinen direkten Kontakt zu einzelnen Kollagenfasern aufbauten, waren glatt begrenzt ohne jegliche Zellausläufer. Die Zellkörper und auch die Zellkerne (Abb. 3, Sternchen) an den führenden Enden zeigten eine gestreckte, spindelige Form, ausgerichtet jeweils parallel zur Zugrichtung. Die Zellen am rückwärtigen Ende des Clusters waren dagegen rundlich mit ebenfalls runden Zellkernen.

Diese Unterschiede in der Morphologie einzelner Zellen innerhalb des Clusters legten den Schluss nahe, dass die für die Wanderung des gesamten Clusters benötigte Kraft von den Zellen des führenden Endes allein entwickelt wurde, während die Zellen im rückwärtigen Ende ohne eigene Migrationsaktivität passiv mitgezogen wurden. Die Verformung der Zellkerne legte mechanischen Zug (Tension) innerhalb des Clusters nahe.

4.2 Matrixstruktur in der Umgebung eines Clusters

In der Umgebung des Clusters waren einzelne Fasern zu kräftigeren Bündeln zusammengefasst (Abb. 3, Pfeilspitzen und Abb. 4A, b). Diese Bündel wie auch Einzelfasern (Abb. 4A, f) liefen konzentrisch auf die Mitte des führenden als auch des rückwärtigen Endes zu. Mit 17 Bündeln am führenden gegenüber 9 Bündeln am rückwärtigen Ende bei nahezu gleicher Zahl von Einzelfasern war die Matrix im kleinen Bereich des führenden Endes am stärksten verdichtet (Abb. 4B). Die Matrix in der Nähe der Clustermitte dagegen war ähnlich locker texturiert wie native Kollagenmatrix (Abb. 4C). Diese Verdichtung der EZM um das führende Ende herum war ein weiterer Indikator dafür, dass vornehmlich das führende Ende Zugkräfte entwickelte.

Das genaue Ausmaß dieser Zugkräfte wurde nicht ermittelt. Die starke Ausrichtung von Kollagenfasern auf das führende Ende hin auf einer Länge von 150 - 300 μm in Wanderungsrichtung im Gegensatz zu 50 - 100 μm bei einzeln wandernden Melanomzellen deutet jedoch auf mehrfach stärkere Zugkräfte hin (Friedl et al., 1997).

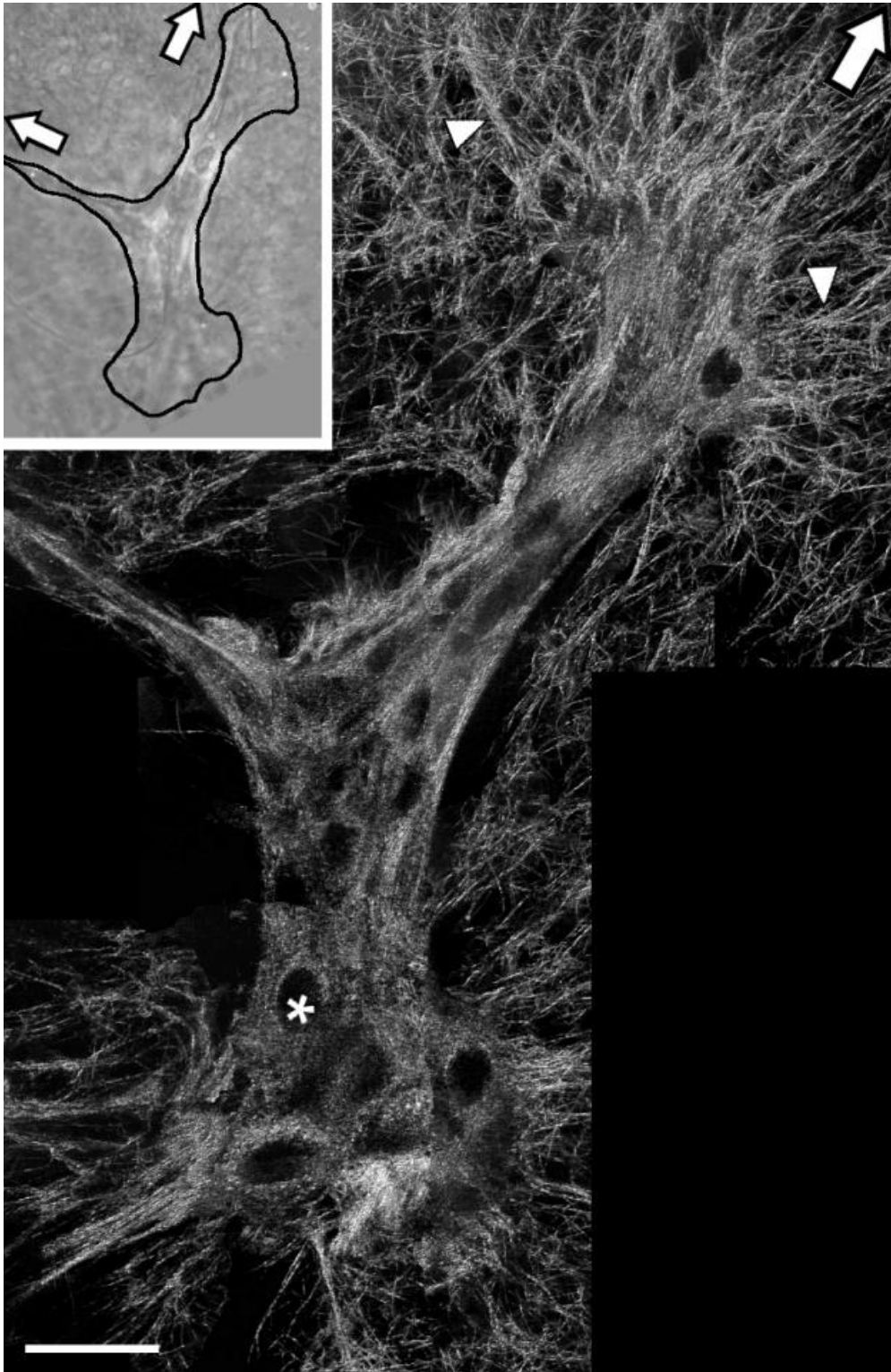


Abbildung 3: Morphologie und Matrixreorganisation eines wandernden Zellcluster. Mit Hilfe von Zeitraffer-Videomikroskopie (Einsatz, schwarze Umrandung der Clustergrenzen) festgehaltene Wanderung (Pfeile zeigen die Wanderungsrichtung an) eines Zellclusters, das sich nach 7 Tagen Kultur in 3D Kollagengel von einem Melanomexplantat (SSM) löste. Großes Bild: Ein konfokales Reflexionsbild desselben Clusters wurde nach Fixierung mit PFA aus verschiedenen Bildausschnitten (in x- und y-Richtung) und mehreren Brennebenen (z-Richtung $\pm 3 \mu\text{m}$) rekonstruiert. Gebündelte Kollagenfasern sind durch weiße Pfeilspitzen, ein reflexionsarmer Zellkern durch Sternchen gekennzeichnet. Balken: $35 \mu\text{m}$.

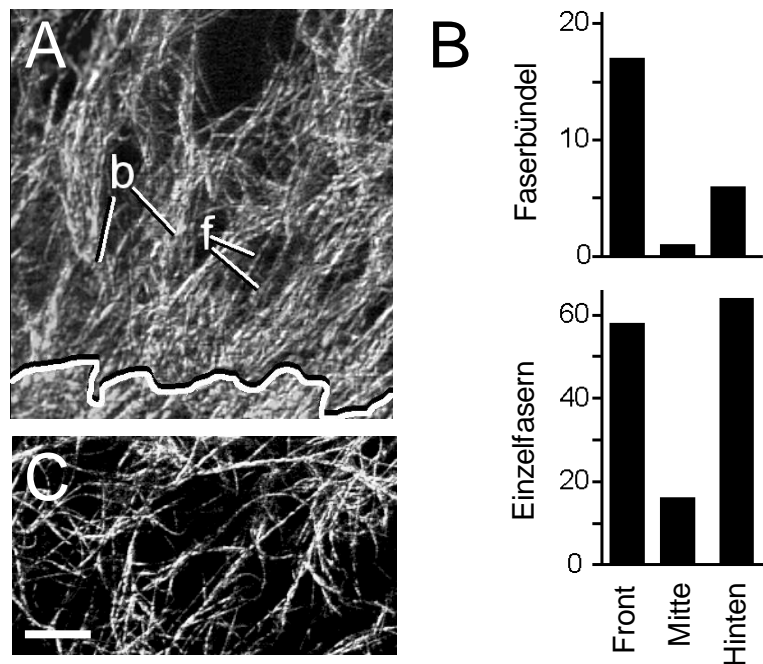


Abbildung 4: Polarisierung der Zell-Matrix-Interaktionen in einem wandernden Zell-cluster. Anzahl der Faserbündel sowie der Einzelfasern, die sich auf das Cluster ausrichten. (A): Ausschnittvergrößerung aus Abb. 3 mit Membranruffling (schwarz-weiße Linie), Faserbündeln (b) und Einzelfasern (f). (B): Anzahl von Faserbündeln (oben) und Einzelfasern (unten) im Kontakt zum vorderen, mittleren und hinteren Teil des Clusters. (C): Native Kollagenmatrix in konfokaler Reflexion. Balken: 10 µm

5. $\beta 1$ Integrin-Verteilung in wandernden Melanomclustern

$\alpha 2\beta 1$ Integrin wird von Melanomzellen exprimiert und gilt als Progressionsmarker (Klein et al., 1991). Darüber hinaus ist das $\alpha 2\beta 1$ Integrin ein wichtiges Adhäsionsmolekül für Kollagen und könnte daher an der Interaktion von Melanomclustern mit Bindegewebskomponenten beteiligt sein. Daher wurde die Expression und Verteilung von $\beta 1$ Integrinen bei Zellclustern, die in einer 3D Kollagenmatrix wandern, mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Bei Clustern, die nach Fixierung für $\beta 1$ Integrine gefärbt wurden, waren diese heterogen innerhalb des Clusters verteilt (Abb. 5). $\beta 1$ Integrine wurden vornehmlich an den führenden Enden insbesondere in kleinen Pseudopodien und weiteren Membransaustülpungen („microspikes“) detektiert (Abb. 5, weiße Pfeilspitzen). Membranabschnitte im Mittelteil des Clusters waren nicht anfärbbar für $\beta 1$ Integrine. Auffällig war auch eine lineare Membranfärbung für $\beta 1$ Integrine in einigen Zell-Zell-Kontakten (Abb. 5, Sternchen) (Tusch, 2003).

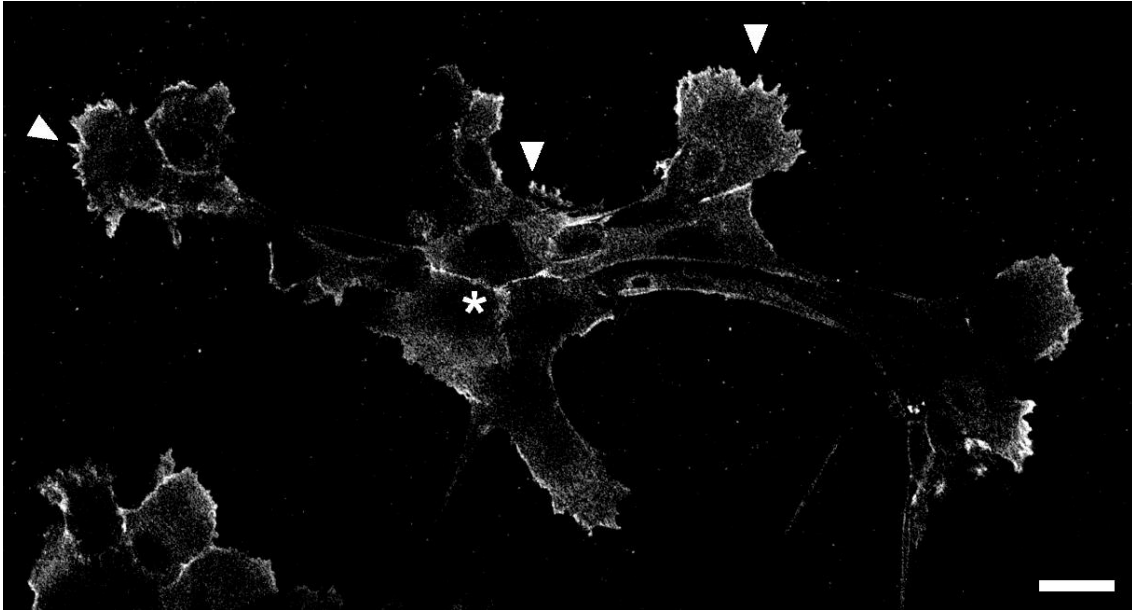


Abbildung 5: $\beta 1$ Integrin-Verteilung bei einem nativ gefärbten Cluster. Dieses Cluster entwickelte sich nach 2 Tagen in der Kultur eines Melanomexplantates (ALM) in 3D Kollagenmatrix. Nach Fixierung mit PFA wurde es mit anti- $\beta 1$ Integrin-mAk 4B4 und K20 und LRSC-konjugierten Fab-Fragmenten gefärbt. Die Fluoreszenz wurde konfokalmikroskopisch detektiert und das Bild aus mehreren Ausschnitten und Ebenen (z-Richtung $\pm 3 \mu\text{m}$) zusammengesetzt. Weiße Pfeilspitzen: $\beta 1$ Integrin angehäuft in microspikes. Sternchen: lineare $\beta 1$ Integrin-Färbung in Zell-Zell-Kontakten. Balken = $25 \mu\text{m}$

6. Funktion von $\beta 1$ Integrinen für die Migration von Clustern aus Melanomexplantaten

6.1 $\beta 1$ Integrine und Migrationseffizienz

Wandernde Zellcluster wurden mit Zeitraffer-Videomikroskopie gefilmt und die Geschwindigkeit mit Hilfe von Computer-assistiertem Zelltracking bestimmt.

Native Cluster wanderten mit einer Geschwindigkeit von mindestens $0,5 \mu\text{m}/\text{min}$ und erreichten Spitzenwerte von $2,6 \mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 6). Dies ist vergleichbar zu Clustern aus oralen Plattenepithelkarzinomen (Friedl et al., 1995; Muradali, 1996).

Die spontane Migration blieb dabei über mehrere Tage auf gleichbleibendem Niveau erhalten. Dies wurde einerseits in einer internen Kontrolle bestimmt, indem ein Cluster vor Blockadeversuch 36 Stunden videomikroskopisch beobachtet wurde (Abb. 6B). Andererseits wurde bei einem Cluster, das mit anti-E-Cadherin mAk HECD-1 (Shimoyama et al., 1989) inkubiert wurde, die

Migration auf gleichbleibendem Niveau über insgesamt 53 Stunden dargestellt (Abb. 6C).

6.2 Funktion von $\beta 1$ Integrinen für die Polarität von Zell-Matrix-Interaktionen

Invasive Zellen der MV3-Melanomlinie wandern in Abhängigkeit von $\beta 1$ Integrinen in 3D Kollagenmatrices (Maaser et al., 1999). Daher wurde die Funktion von $\beta 1$ Integrinen für die Wanderung von Zellclustern in 3D Kollagenmatrices untersucht. Wandernde Cluster wurden vor und während der Inkubation mit mAk 4B4, der die $\beta 1$ Integrin vermittelte Adhäsion blockiert, mit Zeitraffer-Videomikroskopie gefilmt.

In zwei unabhängig voneinander kultivierten Explantaten aus dem gleichen Primärmelanom erlag die Migrationsaktivität nahezu völlig nach der Blockade von $\beta 1$ Integrinen (Abb. 6A, B, und D, Probe 1 und 2). Die erhaltene Restmigration zeigte nur noch eine oszillierende Wanderung auf einer Stelle, so dass keine Netto-Migration, d. h. keine Ortsänderung der Cluster innerhalb der Matrix mehr resultierte. Der Verlust geradliniger Migration zeigte sich auch bei der Berechnung der relativen Winkeländerung sowie der Persistenz, mit der die Wanderungsrichtung beibehalten wurde (vergleiche auch Tusch 2003).

Die zeitliche Verzögerung bis der Effekt von mAk 4B4 in der ersten Probe messbar wurde, ließ sich mit der wesentlich längeren Diffusionsstrecke erklären. Das Cluster in Probe 2 befand sich wesentlich dichter an der Phasengrenze Matrix zu Überstand.

Um auszuschließen, dass allein die Prozedur der Inkubation mit einem Antikörper unter den Bedingungen der Videomikroskopien einen Einfluss auf die Wanderung der Cluster hatte, wurde ein Kontrollversuch mit anti-E-Cadherin-mAk HECD-1 bei einem Cluster aus einem anderen Tumor durchgeführt (Abb. 6C). HECD-1 weist keine Blockade gegenüber Zell-Matrixrezeptoren auf. Über einen Beobachtungszeitraum von über 2 Tagen zeigte sich keinerlei Effekt auf die Migration des Clusters.

Diese Versuche zeigen, dass Cluster aus Melanomexplantaten eine über mehrere Tage anhaltende spontane Migration aufwiesen, die über $\beta 1$ Integrine

vermittelt wurde. Weiterhin scheint E-Cadherin nicht an der Zell-Zell-Adhäsion und der Clusterkohäsion beteiligt zu sein.

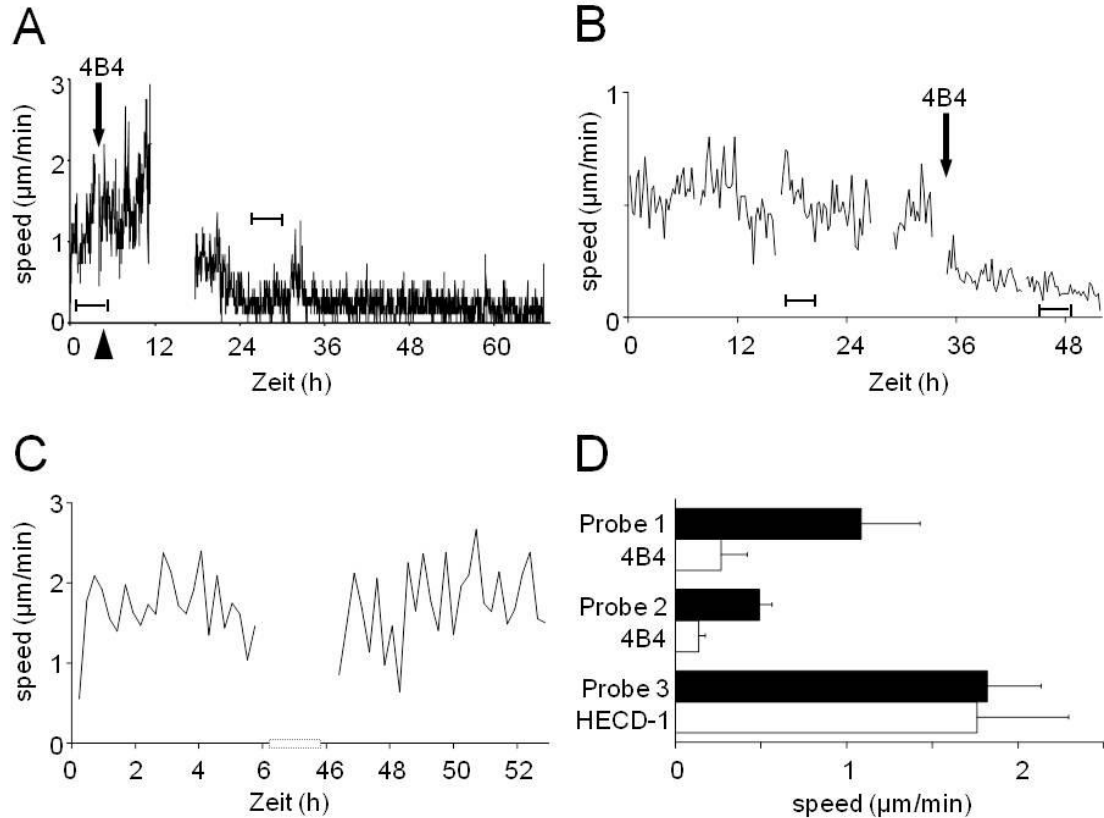


Abbildung 6: Die Migration von Clustern wird durch Blockade von $\beta 1$ Integrinen inhibiert. (A, B): Tracking von sechs Zellen innerhalb der Cluster vor und nach Inkubation mit mAk 4B4. Diese Cluster entstanden nach 18 Tagen in unabhängig voneinander kultivierten Proben desselben Primärtumors (SSM). Die niedrigere Durchschnittsgeschwindigkeit von Probe B/2 resultierte vermutlich daraus, dass dieses Cluster sich die ganze Zeit über noch nicht komplett vom Tumorexplantat gelöst hatte und durch diesen Restkontakt gebremst wurde. (C): Inkubation mit HECD-1. Durch die langen Beobachtungszeiträume wanderten die Cluster teilweise aus den gefilmten Bildausschnitten, was zu Unterbrechungen des Zelltrackings führte. (D): Durchschnittliche Geschwindigkeit \pm Standardabweichung in (C, Probe 3) und gleich lange Zeiträume aus (A, Probe 1) und (B, Probe 2) vor (schwarze Balken) und nach Zugabe des Antikörpers (weiße Balken). Die Analyse in (D) erfolgte für die in (A-C) angegebenen repräsentativen Zeiträume (jeweils 6 h).

6.3 $\beta 1$ Integrin-Verteilung nach Funktionsblockade

Um nach Funktionsblockade die betroffenen Zielzellen darzustellen, wurde ein zuvor mit anti- $\beta 1$ Integrin-mAk inkubiertes Cluster mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen (Abb. 7). $\beta 1$ Integrine fanden sich nahezu ausschließlich am führenden Ende (Abb. 7, Pfeil in Migrationsrichtung) und waren

dort vor allem kolokalisiert mit inserierenden Kollagenfaserbündeln (Abb. 7, schwarze Pfeilspitzen).

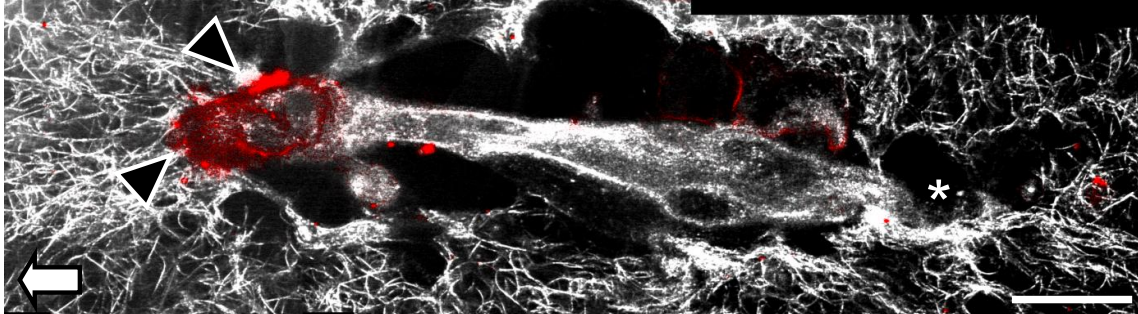


Abbildung 7: Verteilung von $\beta 1$ Integrinen nach Blockade. Dieses Cluster entwickelte sich nach 18 Tagen Kultur eines Melanomexplantates (SSM) in 3D Kollagenmatrix. Während mit Zeitraffer-Videomikroskopie die residuale Bewegung gefilmt wurde (letzte geringe Migration in Richtung Pfeil), wurde die Probe mit $\beta 1$ Integrin-blockierendem mAk 4B4 für 62 Stunden inkubiert. Nach der Fixierung wurde mit LRSC-konjugierten Fab-Fragmenten gefärbt. Fluoreszenz (rot) und Matrixreflexion (grau) wurden simultan konfokal aufgenommen. $\beta 1$ Integrine waren kolokalisiert mit Faseransätzen (schwarze Pfeilspitzen), Matrixdefekt am rückwärtigen Ende (Sternchen), Balken = 25 μm .

7. Konversion kollektiver Migration zur Migration von Einzelzellen nach Blockade von $\beta 1$ Integrinen

7.1 Wanderung von Einzelzellen aus dem Cluster nach Blockade von $\beta 1$ Integrinen

Neben der unter der Blockade von $\beta 1$ Integrinen erhaltenen migratorischen Restaktivität des Clusters behielten bzw. entwickelten einzelne Zellen innerhalb des Clusters migratorische Aktivität. Zellen, die vorher nur passiv vom Verband bewegt wurden, lösten sich aus dem Cluster und wanderten als Einzelzellen durch die Matrix (Abb. 8).

Diese Zellen wanderten mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,2-0,6 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 9). In den Pfaden dieser Einzelzellen wechselten relativ geradlinige Strecken mit gewundenen Segmenten ab, in denen die Zellen abrupt die Richtung änderten (Abb. 10).

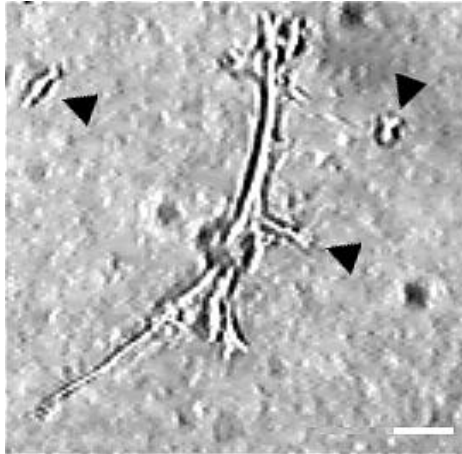


Abbildung 8: Loslösung von Einzelzellen. Videomikroskopisches Bild des Clusters aus Abb. 6A und Abb. 7, 24 Stunden nach Zugabe von 4B4. Pfeilspitzen: Einzelzellen lösen sich vom Cluster. Balken: 50 μm .

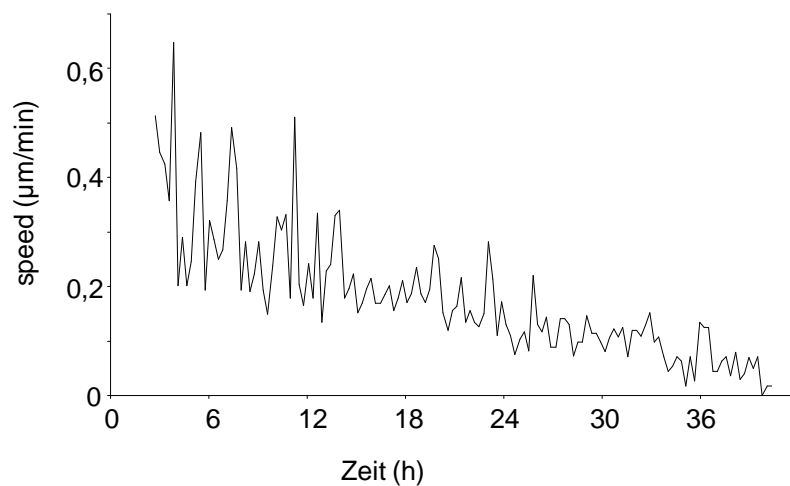


Abbildung 9: Geschwindigkeit der Einzelzellen nach Ablösung vom Cluster. Durchschnittsgeschwindigkeit von insgesamt 20 Einzelzellen nach Ablösung vom Cluster. Dargestellt sind Phasen, die mindestens 4 wandernde Zellen repräsentierten; t_0 entspricht 24 Stunden nach Zugabe von 4B4, der Zeitpunkt der Ablösung der ersten Zellen aus dem Cluster.

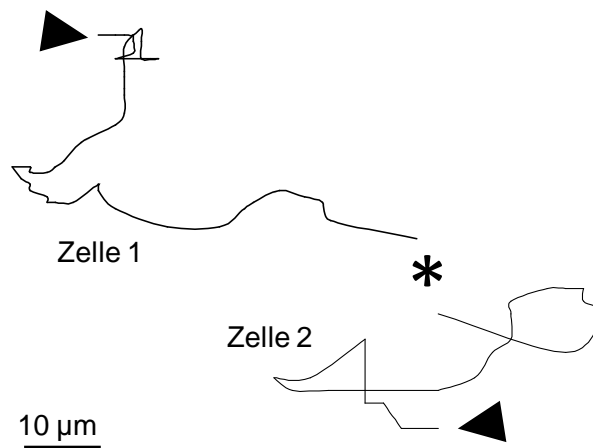


Abbildung 10: Pfade von zwei Zellen nach Ablösung vom Cluster. Sternchen: relative Position des Clusters zu den Startpunkten der beiden Einzelzellen. Pfeilspitzen: Ende der Pfade.

7.2 Morphologische Charakteristika von Einzelzellen und Integrinverteilung nach $\beta 1$ Integrin-Blockade

Um näheren Aufschluss über die Morphologie der wandernden Einzelzellen zu erhalten, wurden sie konfokalmikroskopisch untersucht (Abb. 11).

Die Zellen zeigten eine vorwiegend elliptoide Form, die sich an Matrixstrukturen anpasste (Abb. 11, Sternchen). An besonders engen Stellen innerhalb der Matrix entwickelten die Zellen Einschnürungen (Abb. 11, weiße Pfeilspitze). $\beta 1$ Integrine waren in migrierenden Einzelzellen über die gesamte Zellmembran verteilt. Im Gegensatz zu Clustern fanden sich weder ein starker Faserzug noch die Bündelung von Einzelfasern (Abb. 11, schwarze Pfeilspitzen).

Die Einzelzellen, die sich nach $\beta 1$ Integrin-Blockade vom Cluster gelöst hatten, zeigten keine Matrixreorganisation. Sie wanderten vielmehr in einem Migrationstypus, der der amöboiden Wanderung von z. B. Leukozyten entsprach, an vorgegebenen Matrixstrukturen entlang.

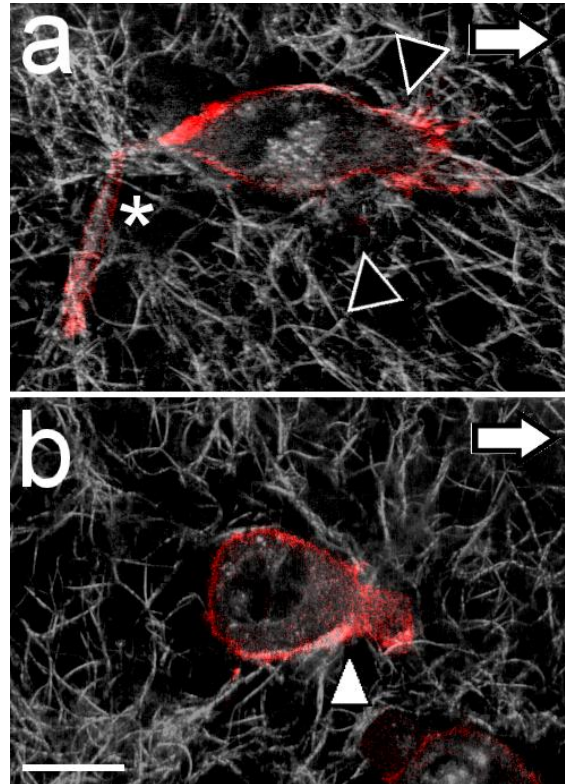


Abbildung 11: Amöboide Zellmorphologie nach Blockade von $\beta 1$ Integrinen.

Zwei Einzelzellen, die sich nach Inkubation mit anti- $\beta 1$ Integrin mAk 4B4 vom Cluster aus Abb 6A und Abb. 7 lösten. Nach Fixierung mit PFA und Färbung mit sekundären LRSC-Fab-Fragmenten wurden die Zellen für konfokale Reflektion (grauer Kanal) und simultan für konfokale Fluoreszenz (roter Kanal) aufgenommen. Pfeil: letzte Migrationsrichtung bestimmt mit Zeitraffer-Videomikroskopie und Computer-assistiertem Zelltracking. Sternchen: Uropod. Weiße Pfeilspitzen: Einschnürungsring. Schwarze Pfeilspitzen: Interaktionen mit Kollagenfasern. Balken: 6 μm .

Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals direkt gezeigt, dass das klinisch invasive Melanom bei Kultivierung im 3D Modell kollektive Zellwanderung entwickelt, die von der Funktion von $\beta 1$ Integrin für die Kraftübertragung abhängt. Unerwartet zeigte sich nach Integrin-Blockade ein funktionell bedeutender Übergang von kollektiver in amöboide Einzelzellmigration (kollektiv-zu-amöboide Transition), ein neuer Mechanismus der Plastizität der Tumorzellmigration. Die Befunde legen eine erstaunliche zelluläre wie auch molekulare Anpassungsfähigkeit der Tumorinvasion nahe, die auch von therapeutischer Bedeutung sein könnte.

Im Folgenden soll die Rolle von Zell-Matrix-Interaktionen bei der kollektiven Wanderung maligner Zellen diskutiert werden sowie die Bedeutung struktureller und funktioneller Heterogenität für diesen Migrationstyp. Weiterhin soll die Möglichkeit eines Strategiewechsels bei der Migration von Tumoren in Abhängigkeit von Änderungen im umgebenden Milieu erörtert werden.

1. Bewertung der Kultivierung von Primärexplantaten in 3D Matrices als Modell der Tumorinvasion in extrazellulärer Matrix

1.1 Dreidimensionalität als wesentlicher Aspekt der Gewebeinvasion

Die Biologie von Zellkulturen in 3D Kultursystemen weicht erheblich von 2D Bedingungen ab. Als Basismodell wurden Melanomexplantate in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix kultiviert, die organotypische Merkmale der Dermis in vivo besser rekapituliert als herkömmliche 2D Zellkulturen.

Im Körper gibt es nur wenige Situationen, bei denen Migration und Invasionsaktivität maligner Zellen auf Oberflächen eine Rolle spielen, so bei der Extravasation und bei der Dissemination in der Peritoneal- und Pleurahöhle. Meistens erfolgt die Tumorinvasion in vivo in interstitielles Gewebe mit komplexem Aufbau aus verschiedenen ECM-Komponenten mit wechselnder Dichtigkeit, teilweise auch durchzogen von Hindernissen, wie z.B. knöchernen Strukturen, aber auch Stellen, die weniger Widerstand bieten, wie Gewebespalten entlang neurovaskulärer Bündel.

Die 3D Gewebsstruktur liefert eingebetteten Zellen nicht nur eine mechanische Struktur, sondern spielt auch bei der Regulation von Zellmorphologie, Proliferation, Differenzierung, Polarität von Epithelien und dem Invasionsverhalten von Tumoren eine wichtige Rolle (Ghajar und Bissell, 2008). So zeigen HER2/neu-positive Brustkrebszellen in 3D eine Aktivierung des intrazellulären RAS-MAPK-Signalwegs im Gegensatz zum AKT-Signalweg unter 2D Bedingungen (Weigelt et al., 2010).

Eine 3D ECM präsentiert den Zellen Barrieren, aber auch Lücken und mehr Ankerpunkte für Zelladhäsionsmoleküle, was Morphologie und Wanderungsverhalten von Zellen entscheidend beeinflusst. So bilden Fibroblasten auf einer Oberfläche Lamellopodien und Stressfasern des Aktinzytoskeletts aus, im Gegensatz zu kleinen Membranausstülpungen und kortikalem Aktin im 3D Kontext (Rhee, 2009). In knock-down Versuchen mit HT1080 Fibrosarkomzellen, in denen einzelne fokale Adhäsionsproteine ausgeschaltet wurden, zeigten sich große Geschwindigkeitsunterschiede, je nachdem ob die Zellen auf Oberflächen oder in ECM-Gelen kultiviert wurden (Fraleley et al., 2010). Kollagen Typ I macht ca. 90% der ECM Proteine aus und eignet sich darum besonders gut als physiologisches Substrat in Migrationsexperimenten (Wolf et al., 2009). Schließlich erfolgte die Erstbeschreibung kollektiver Tumorzellinvasion von menschlichen Primärtumorexplantaten in 3D Kollagenmatrix-Kultur (Friedl et al., 1995).

Durch die hier eingesetzten 3D Kollagengele blieben somit wesentliche Aspekte, die in vivo-ähnliche Invasion und Migration von Tumorzellen fördern, in standardisierter Form in vitro erhalten.

1.2 Primärexplantate als Modell für die Komplexität von Tumoren

In 3D Matrixkulturen lassen sich primäre Melanomexplantate in 3D Matrices über mehrere Tage (bis zu einer Woche) kultivieren, sodass diese dabei ein komplexes Invasionsverhalten entwickeln können.

Ein makroskopischer Tumor besteht infolge klonalen Wachstums, genetischem Drift und lokalen Mikromilieufaktoren aus Tumorzellen mit unterschiedlichen Eigenschaften (intraläsionale Heterogenität). So geht man davon aus, dass nur

ein Bruchteil von Tumorzellen bei einem erkrankten Patienten tatsächlich die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung besitzen (Stetler-Stevenson, 2005). In den letzten Jahren rückte die Bedeutung des Tumorstromas aus ECM, nicht-klonalen Zellen und Blutgefäßen bei der Metastasierung ins Blickfeld (Sethi und Kang, 2011). Die in dieser Arbeit verwendeten Primärexplantate spiegeln dieses komplexe Gewebe deutlich besser wider als Experimente mit Zelllinien, die in der Regel aus einer kleinen Gruppe Zellen – häufig aus einer Metastase – aus einem einzelnen Organismus isoliert und dann unter Laborbedingungen weiter kultiviert wurden. Melanome sind im Initialstadium von Keratinozyten und nach basal von der Basalmembran umgeben woran die Dermis mit ihrem dichten Netz aus Kollagen mit eingestreuten Fibroblasten angrenzt. Neben melanozytären Mutationen spielt eine zumindest lokal gestörte Homöostase innerhalb der Haut bei der Melanomentstehung eine wichtige Rolle (Haass et al., 2005). Als Nachteil des hier verwendeten Systems ist die hohe Ausfallrate von ca. 75% der Einzelkulturen zu nennen, in denen keinerlei Invasionsaktivität messbar war (Daten nicht gezeigt). Somit zeigen wahrscheinlich regional begrenzte kleine Abschnitte des Primärtumors aktives Invasionsverhalten oder die Fähigkeit hierzu, was die geringe Effizienz dieser Kulturstrategie erklären könnte. Als Sekundäreffekt dieser biologischen Heterogenität lassen sich beobachtete Effekte, z.B. bei Blockadeexperimenten, schlechter einer bestimmten Zielstruktur zuordnen. Als weiterer Nachteil sind Primärmaterialien im Gegensatz zu Zelllinien nur in begrenztem Umfang verfügbar, so dass sich Experimente an einem individuellen Tumorexplantat nicht beliebig wiederholen lassen. Trotz der Herausforderungen, die die Arbeit mit Primärexplantaten aufwerfen, werden sie inzwischen auch als zukünftige Modelle bei der Entwicklung von neuen Krebsmedikamenten diskutiert (Cree et al., 2010).

2. Migration von Zellclustern als Wanderungsstrategie maligner Zellen – Bedeutung der extrazellulären Matrix

2.1 Nachweis melanozytärer Zellen im Cluster

Da Tumore ein komplexes Gewebe aus verschiedenen Zelltypen bilden, einschließlich Tumorzellen und nicht maligner Stromazellen, könnten aus

Primärexplantaten auswandernde Zellcluster prinzipiell aus malignen wie auch nicht malignen Zellen bestehen oder ebenso wie der Tumor heterogen zusammengesetzt sein. Bei primären Melanomexplantaten wäre z.B. eine Auswanderung von Keratinozytengruppen denkbar, die in Modellen zur Wundheilung kollektive Zellwanderung in Form von sheets zeigen (Shaw und Martin, 2009).

In Untersuchungen, die dieser Arbeit inhaltlich und technisch vorausgingen, wurden im gleichen 3D Kollagenmodell wie hier für Melanomexplantate auswandernde Zellcluster bei Primärexplantaten von oralen Plattenepithelkarzinomen, einem Rhabdomyosarkom und Mammakarzinomen (Friedl et al. 1995; Muradali, 1996) beobachtet. Bei diesen Arbeiten wurde auf eine nähere Untersuchung der zellulären Zusammensetzung der auswandernden Cluster verzichtet. In der hier vorliegenden Arbeit wurde diese wichtige Frage nach der zellulären Zusammensetzung mit Hilfe von konfokaler Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei wurde postuliert, dass es sich bei Zellen melanozytären Ursprungs, die aus einem Melanomexplantat auswandern, um maligne Zellen handelt. Durch den Nachweis von Gp100 als Marker für melanozytäre Zellen gelang hier zum ersten Mal die Darstellung der melanozytären Herkunft zumindest einiger Zellen innerhalb eines Clusters. Gp100 ist in der großen Mehrzahl von Melanomen zumindest fokal exprimiert und Positivität findet sich auch in fetalen Melanozyten, darstellbar durch Färbung mit mAk HMB45. Dagegen sind normale adulte Melanozyten und zahlreiche Arten von Naevi Gp100 negativ (Gown et al., 1986), so dass Gp100-Positivität in auswandernden Zellclustern einen starken Hinweis auf migrierende Melanomzellen darstellt.

Durch die Einbettung der Primärexplantate in Kollagengele und die geringe Größe der auswandernden Cluster war in diesem Modell eine histologische Aufarbeitung für klassische zytomorphologische Malignitätskriterien nicht möglich. In zukünftigen Studien wäre ein direkter Malignitätsnachweis durch genomische Analyse z.B. für die in ca. 60% der Melanome vorkommenden *BRAF* Mutationen (Chapman et al., 2011) oder auch Subkultivierung ausgewanderter Zellcluster und Etablierung von Zelllinien für funktionelle Untersuchungen vorstellbar.

2.2 Multizelluläre Migration als universelles Phänomen der Tumorinvasion

In vitro findet man kollektive Zellmigration sowohl bei Tumoren epithelialen als auch mesenchymalen Ursprungs (Friedl et al., 1995, Nabeshima et al., 1998; Gaggioli et al., 2007). Melanome stehen mit ihrem neuroektodermalen Ursprung als nicht epitheliale solide Tumoren außerhalb der klassischen Einteilung (Karzinome, Sarkome, Teratome) und bilden daher als sogenannte melanozytäre Tumore eine eigene Kategorie in der WHO Klassifikation von Hauttumoren (LeBoit et al., 2005). Mit dem Nachweis von wandernden Zellclustern beim Melanom ergibt sich ein weiterer Hinweis, dass kollektive Migration ein universelles Phänomen der Tumorinvasion darstellt.

Während der frühesten Embryogenese können die Vorläuferzellen der Melanozyten aus der Neuralleiste zu ihrem peripheren Ort der Differenzierung multizellulär, aber auch im kollektiven Verband auswandern (Trinkaus, 1988; Theveneau und Mayor, 2011). Im Falle epidermaler Melanozyten verteilen sich die Neuralleistenzellen anschließend in der Epidermis als verstreute Einzelzellen. Die beobachteten Cluster bei Melanomprimärexplantaten lassen sich in diesem Zusammenhang als ein Beispiel für die Wiederbelebung eines embryonalen Bewegungsmusters während der Onkogenese interpretieren.

2.3 Matrixremodelling bei Clustern – Parallelen und Unterschiede zur Einzelzellmigration

Kollektive Zellmigration geht wie die haptokinetische Wanderung von Einzelzellen in 3D Modellen mit einem Umbau der ECM einher. Ähnlich wie als Einzelzellen migrierende Fibroblasten oder mesenchymal wandernde Tumorzellen (Friedl et al., 1997) zeigten Zellen innerhalb migrierender Zellgruppen besonders ausgeprägt am führenden Pol multiple Membranausstülpungen an Kontaktstellen mit einzelnen Kollagenfasern, was zu einer bei Einzelzellen so nicht zu beobachtenden Verdichtung der Fasern zu stärkeren Bündeln führte. Zusammen mit der elongierten Form der Zellen und Zellkerne im führenden Ende der Cluster lässt dies auf die Entwicklung besonders starker Zugkräfte

schließen. Ein weiterer Hinweis auf starke Zugkräfte bei der Kultivierung von Melanomprimärexplantaten war die wiederholt auftretende Kontraktion der Kollagengele zum zentral eingebetteten Tumor hin, sodass sich die Gele teilweise komplett vom gläsernen Untergrund lösten und verdichtet wurden. Es ist vorstellbar, dass in vivo solche starken Zugkräfte für die Bewegung der größeren, kollektiven Zellmasse nötig sind und in der Umgebung eines Tumors auch zur Öffnung von ECM Lücken beitragen, durch die Tumorzellen einzeln oder kollektiv die Umgebung invadieren können. Wie bei der Einzelzellwanderung sind Aktin und Myosin auch bei kollektiver Zellmigration die kraftgenerierenden Komponenten mit einer longitudinalen Organisation des filamentösen Aktins innerhalb von Zellclustern über mehrere Zellgrenzen hinweg (Tusch, 2003). Die Kontraktilität vermittelnde Myosin hingegen findet sich vor allem an den Rändern der Cluster mit Kontakt zur ECM, ist jedoch an Zell-Zell-Grenzen innerhalb der Gruppe herunterreguliert (Hidalgo-Carcedo et al. 2011). Dies legt nahe, dass während der kollektiven Zellmigration die Funktion des Aktin-Zytoskeletts sowohl innerhalb jeder Einzelzelle als auch über mehrere Zellgrenzen hinweg suprazellulär, differenziell organisiert ist.

Neben der hier gezeigten Aktin-vermittelten Zugkräfte erfolgt während der kollektiven Invasion weiterhin ein struktureller Umbau der ECM mittels proteolytischer Aktivität. Im Spheroidinvasionsmodell mit Fibrosarkom- und Brustkrebszelllinien als Ersatz für ein Primärexplantat zeigen beide Zelltypen kollektive Invasion mit Zellsträngen aus bis zu vier Zellen nebeneinander und Matrixdefekte bis zu 80 µm Breite, begrenzt von stark verdichtetem Kollagen („macropatterning“) (Wolf et al., 2007). Dabei wird Membrantyp-1-MMP (MT1-MMP) fokal zusammen mit $\beta 1$ Integrinen und Kollagenfasern exprimiert und eine Hemmung der MMPs durch Proteaseinhibitoren verhindert die Ausbildung von kollektiven Invasionszonen (Wolf et al., 2007). In den hier gezeigten Versuchen an Primärexplantaten wurde aufgrund der geringen Kontrollierbarkeit zwischen verschiedenen Tumorproben auf eine Inhibition von MMPs verzichtet. Die Primärexplantate zeigten jedoch häufig Zonen strukturellen Umbaus, vereinbar mit der Aktivität von MMPs. Denkbare Experimente zu diesem Thema wären z.B. Messungen von MMPs im Überstand von Primärexplantatkulturen mit und ohne Lysehöfe sowie von normaler Haut.

Neben MT1-MMP ist beim Melanom Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) von Interesse, die von MT1-MMP aktiviert wird und deren Expressionsstärke in Primärmelanomen zusammen mit Ki67 mit der Metastasierungstendenz und dem Gesamtüberleben korreliert (Väisänen et al., 2011).

Die in dieser Arbeit verwendete Kollagenmatrix war deutlich weniger dicht und lockerer texturiert, als für humane Dermis zu erwarten wäre (Wolf et al., 2009), sodass kollektive Zellmigration in vivo aufgrund der dichten Gewebsbarrieren wahrscheinlich obligat proteolytisch erfolgt. Neben einem proteolytischen Umbau durch den größere Lücken entstehen, ist auch eine Tumorinvasion entlang Gewebespalten und der lockeren Bindegewebsseide um Gefäßnervenbündel nicht nur durch Proliferationsdruck auf das Gewebe (Gray et al., 2010; Friedl und Alexander, 2011), sondern auch in Form von aktiver kollektiver Zellwanderung denkbar (Gaggioli et al., 2007, Friedl und Gilmour, 2009).

Der morphologisch ähnliche, aber deutlich stärkere Umbau der ECM während kollektiver Zellmigration wird vermutlich ähnlich reguliert wie bei haptokinetisch wandernden Einzelzellen, wobei diese Umbaumechanismen auf bisher ungeklärte Weise über mehrere Zellen hinweg koordiniert werden müssen.

2.4 Die Geschwindigkeit haptokinetischer Zellwanderung von Zellclustern und Einzelzellen

Zahlreiche Experimente zur Zellmigration, z.B. in einer Boyden-Kammer, messen keine Geschwindigkeit, sondern den Anteil von Einzelzellen an einer Gesamtpopulation, der sich über eine gewisse Entfernung bewegt. Mittels Zelltracking konnte für Primärkulturen die Geschwindigkeit von Clusterwanderung untersucht werden, die sowohl vom Zelltyp wie auch der Art des Substrats, Dimensionalität des Modells (2D versus 3D) und Dichte der ECM abhängt. Melanomcluster migrierten mit einer Mindestgeschwindigkeit von 0,5 und Spitzenwerten von $>2 \mu\text{m}/\text{min}$. Dies ist vergleichbar mit Clustern aus oralen Plattenepithelkarzinomen, die bei einem sogenannten polaren Typ – im gleichen Modell wie in dieser Arbeit verwendet – durchschnittlich $0,58 \mu\text{m}/\text{min}$ erreichen (Friedl et al., 1995; Muradali, 1996). Die Größenordnung der Migrationsgeschwindigkeit in Melanomclustern ist vergleichbar mit Zellen in

anderen morphogenetischen oder invasiven Modellen. So wird bei der Wanderung von aus Hühnerembryonen gewonnenen Neuralleistenzellen in 3D Kollagengelen niedriger Dichte eine Geschwindigkeit um 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ und in Gelen höherer Dichte von 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ gemessen (Davis und Trinkaus, 1981). Auch die Geschwindigkeit von einzeln wandernden malignen Zellen wird durch eine erhöhte Kollagenkonzentration reduziert, so z.B. die von HT-1080 Fibrosarkomzellen in einem ansonsten mit dem in dieser Arbeit verwendeten identischen Modell (Wolf et al., 2007).

Die bereits zuvor erwähnte haptokinetisch wandernde Melanomzelllinie MV3 ist wiederum im gleichen Kollagenmodell in ihrer Einzelzellmigration mit 0,19 $\mu\text{m}/\text{min}$ deutlich langsamer (Friedl et al., 1997). Die höhere Geschwindigkeit der Cluster, die auf Grund ihrer Größe weniger Lücken in der ECM nutzen können, überraschte. Denkbar wäre hier eine starke proteolytische Aktivität durch Cluster. Ebenfalls möglich wäre ein spezifischer Effekt bei MV3 Zellen, wie z.B. ein erschwertes Loslassen am hinteren Ende der Zellen.

Inwiefern die Geschwindigkeit kollektiver Zellmigration, neben Matrixdichte und Zytoskelettkontraktilität, auch von der Konzentration membranständiger Adhäsionsrezeptoren abhängt, die bei einem Gleichgewicht aus Adhäsion und Loslösung die höchste Geschwindigkeit erlauben (Palecek et al., 1997), sollte in weiterführenden Studien an definierten Zelllinien untersucht werden.

2.5 Vermittlung der haptokinetischen Wanderung von Zellclustern durch $\beta 1$ Integrin abhängige Zell-Matrix-Interaktionen

Die bereits morphologisch auffallende Ähnlichkeit zum haptokinetischen Migrationstyp von Einzelzellen bei der Migration von Clustern bestätigte sich auf funktioneller Ebene in der hier nachgewiesenen Abhängigkeit der Zell-Matrix-Interaktionen von $\beta 1$ Integrinen.

$\beta 1$ Integrine waren bei nativen Clustern an Pseudopodien am führenden Ende konzentriert und fokalisiert, passend zu fokalen Adhäsionen oder Kontakten; und auch nach Funktionsblockade war eine verringerte, doch persistierende Kolokalisation von $\beta 1$ Integrinen mit Kollagenfasern darstellbar. Wie auch bei oralen Plattenepithelkarzinomen (Muradali, 1996) hemmte eine Blockade von

$\beta 1$ Integrinen die kollektive Zellwanderung von Melanomclustern in einer Typ I Kollagenmatrix vollständig. Die Rolle von Integrinen für die Invasion von Tumoren ist bisher nicht vollständig geklärt. In einem murinen in-vivo Modell der Brustkrebsentstehung hemmt die Blockade von $\beta 1$ Integrinen die Invasion von prämaligen Brustepithelien in eine desmoplastisch veränderte ECM, und forciertes Integrinclustering fördert die Invasion (Levental et al., 2009). Die bei der Wanderung von größeren Zellgruppen auftretenden Scherkräfte könnten über Phosphorylation der Integrine durch fokale Adhäsionskinase und Aktivierung von Src die Affinität der Integrine für ihre Liganden in der ECM im Sinne eines inside-out-signaling stärken (Basson, 2008). Dabei ist die wahrscheinlich von einem intakten Zytoskelett abhängige Arbeitsweise des Integrin-vermittelten Sensing für externe Druck- und Scherkräfte, der den Aktivitätszustand der Kinasen beeinflusst, noch unklar.

Im Modell primärer Melanomexplantate ist die Funktion von $\beta 1$ Integrinen komplex. Neben der Interaktion mit ECM verstärken sie direkt oder indirekt Zell-Zell-Interaktionen und tragen damit erheblich zum Zusammenhalt der Gruppe bei (Tusch, 2003). Nach Blockade von $\beta 1$ Integrinen lösten sich zahlreiche Einzelzellen von Clustern ab und nahmen, anders als haptokinetisch wandernde Einzelzellen, keine spindelige Form mehr an, sondern migrierten als rundliche, amöboide Zellen mit viel geringerer Persistenz vom nunmehr immobilisierten Cluster weg. Ein ähnliches Phänomen zeigt sich bei der Wanderung von MV3 Melanomzellen, bei denen die wandernde Population nach Blockade von $\beta 1$ Integrinen deutlich langsamer wird und die Zellen von der spindeligen in eine abgerundete, amöboide Migrationsform übergehen (Daryab, 2010; Maaser et al., 1999).

Somit sind $\beta 1$ Integrine sowohl für die mesenchymale Einzelzellmigration wie auch die kollektive Migration in 3D Kollagenmatrices essentiell für eine starke Kraftentwicklung. Insbesondere für die kollektive Zellmigration könnte diese Zugkraft erforderlich sein, um eine größere Gruppe, bei der die Zellen im Zentrum kaum mit der ECM interagieren, geschlossen zu bewegen.

3. Zelluläre Heterogenität in migrierenden Clustern – konzeptionelle Bedeutung für die Invasion von Tumorzellen

3.1 Strukturelle Heterogenität

Neben den Tumorzellen selbst tragen Zellen des reaktiven Stromas zur Tumorprogression und Heterogenität der Tumorbiologie bei. (Chaffer und Weinberg, 2011). Neben Endothelzellen, Perizyten, und Fibroblasten sind auch aus dem Knochenmark rekrutierte Stromazellen, unter ihnen Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Mastzellen und mesenchymale Stammzellen für die progressionsfördernde Freisetzung aktivierender Zytokine, den Umbau extrazellulärer Matrix und die vaskuläre Versorgung des Tumors funktionell von Bedeutung (Joyce und Pollard, 2009).

In dieser Arbeit fanden sich Hinweise, dass Cluster aus primären Melanom-explantaten aus verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt sein könnten und neben Zellen des malignen Klons auch nicht-maligne Zellen enthalten könnten. Die fokale Positivität für Gp100 könnte in einem epithelialen oder mesenchymalen Ursprung der Gp100-negativen Zellen begründet sein, so dass eine heterogene Zusammensetzung aus malignen und nicht malignen Zellen nicht auszuschließen ist. Auch die differentielle Expression von $\beta 1$ Integrinen könnte durch zelluläre Heterogenität bedingt sein.

Bei aus verschiedenen Zelltypen zusammengesetzten Clustern ist eine Arbeitsteilung bei der Invasion und Migration denkbar. Ein besonders eindrückliches Beispiel für eine solche Kooperation mit stromalen Zellen sind Versuche zur Invasion einer 3D Matrix durch orale Plattenepithelkarzinomzellen, die sowohl in Einzelzell- als auch in einer Art Gänsemarschformation bis hin zu kollektiver Invasion durch Zellstränge ablaufen kann und von Fibroblastenaktivität abhängt (Gaggioli et al., 2007). Dabei bilden Fibroblasten das führende Ende eines Zellstranges, in dem Plattenepithelkarzinomzellen oft unter Aufrechterhaltung ihrer Zell-Zell-Adhäsionen folgen. Das Remodelling der Matrix mit der Schaffung von Gängen ist von der Expression von $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\beta 1$ Integrinen sowie von MMPs in Fibroblasten abhängig (Gaggioli et al., 2007). Neben Fibroblasten können auch Makrophagen und Endothelzellen durch

parakrine Signalwege eine invasive Nische bilden, die wahrscheinlich zur verstärkten Aktivierung und Disseminierung maligner Zellen beiträgt (Joyce und Pollard, 2009), vergleichbar zur Rolle von Fibroblasten.

In den in dieser Arbeit verwendeten Primärexplantatkulturen wurden neben aus dem Primärtumor auswandernden Zellgruppen auch spindelförmige Einzelzellen gesehen, sodass lichtmikroskopisch nicht eindeutig entschieden werden konnte, ob Tumorzellen und Fibroblasten für die beobachtete kollektive Invasion kooperierten. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie sollte in zukünftigen Experimenten eine Unterscheidung beider Zelltypen durchgeführt werden, um den Beitrag von Stromazellen für die Zellgruppenwanderung im Primärkulturmodell zu vertiefen.

3.2 Funktionelle Heterogenität – Beitrag zur Polarität von Zell-Matrix-Interaktionen

Ein großer Unterschied zwischen der Wanderung von einzelnen Zellen und kollektiver Wanderung liegt in einer migratorisch besonders aktiven Untergruppe am führenden Ende eines Clusters, die zu einer funktionellen Asymmetrie zwischen vorderem und hinterem Gruppenende beiträgt. Allein durch die Lage am vorderen Ende entsteht eine Polarität der führenden Zellen. Sie haben – im Gegensatz zu Zellen in der Mitte und an den Seiten der Gruppe – vorn und je nach Größe der Gruppe auch an den Seiten Kontakt zur ECM und nur begrenzt Kontakt zu anderen Zellen (Rorth, 2009).

Diese funktionelle Polarität kommt in der präferentiellen Expression von für die Zell-Matrix-Interaktion wichtigen Proteinen in führenden Zellen zum Ausdruck. Neben der in dieser Arbeit beschriebenen Expression von $\beta 1$ Integrinen am vorderen Ende zeigt sich bei der Kohortenmigration von kolorektalen Adenokarzinomzellen ein polarisiertes Expressionsmuster von MMP-2 und MMP-14, das auf die Zellen der Vorderfront beschränkt ist (Nabeshima et al., 2000). Bei der kollektiven Wanderung der sogenannten „border cells“ bei der Oogenese in *Drosophila melanogaster* wird frontal die stärkste Expression des „guidance receptor“ PVR (PDGF/VEGF Rezeptor) gefunden; eine membran-

ständige Rezeptortyrosinkinase, die chemotaktische Migration reguliert (Janssens et al., 2010).

Es ist zur Zeit noch unklar, inwieweit Zellen die Führung einer Gruppe übernehmen, weil sie dafür die nötigen Proteine exprimieren, oder ob vielmehr Signale von außen erst zu einer Hochregulation in einmal etablierten „leader cells“ führen. Zumindest in einigen Beispielen von kollektiver Migration während der Embryogenese ist die Führungsfunktion nur ein temporärer Zustand, der bei sich ändernden äußeren Bedingungen auch von andern Zellen in der Gruppe eingenommen werden kann (Rorth, 2009).

4. Der Übergang von kollektiver haptokinetischer zu amöboider Zellwanderung – ein Beispiel für die Plastizität von Zellmigration als Ausweichstrategie maligner Neoplasien

Das älteste etablierte Konzept einer Invasionsstrategie ist die zunächst in der Embryologie beschriebene und dann später auf Tumore übertragene sogenannte epitheliale-zu-mesenchymale Transition (EMT) (Thiery, 2002). Dabei werden Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle, allen voran E-Cadherin herunter- und Integrine, MMPs und weitere promigratorische Proteine aufreguliert (Thiery et al., 2009). Während oder nach EMT lösen sich so aktivierte Zellen aus dem epithelialen Verband, nehmen eine Fibroblasten-ähnliche Form an und wandern haptokinetischen Prinzipien folgend durch die ECM. Dieser Prozess wird nicht als eine Einbahnstraße gesehen, sondern man vermutet eine mesenchymale-zu-epitheliale Transition (MET) der Zellen am Zielort, an dem sie wieder einen epithelialen Verband ausbilden können. Man geht zunehmend davon aus, dass diese Transition nicht nach einem Alles-oder-Nichts-Schaltermmodell ablaufen muss, sondern dass Übergänge existieren (Chaffer und Weinberg, 2011). Im Rahmen einer teilweisen EMT unter Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Adhäsionen könnte kollektive Invasion stattfinden, bei der z.B. besonders replikative epitheliale Zellen „im Schlepptau“ von mesenchymal migrierenden Zellen wandern, ähnlich der von Fibroblasten-geförderten Invasion (Gaggioli et al., 2007). Für die Einzellmigration wurden für Melanomzellen Übergänge zwischen mesenchymaler und Lymphozyten-ähnlicher amöboider Migration beschrieben,

die durch Blockade von $\beta 1$ Integrinen (Maaser et al., 1999) oder knock-down der Aktin-regulierenden Rho-GTPase Rac1 hervorgerufen werden können (Sanz-Moreno und Marshall, 2009). Auch bei epithelialen und mesenchymalen Tumorzelllinien wird eine solche Transition des Migrationstyps nach Exposition mit MMP-Inhibitoren beobachtet und als mesenchymale-zu-amöboide Transition (MAT) bezeichnet (Wolf et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde ein kollektiver Migrationsmodus beschrieben, der wie bei haptokinetischer Migration von Einzelzellen von Zell-Matrix-Interaktionen in Form von $\beta 1$ Integrinen abhing. Nach Blockade dieser Interaktionen wurde ein Übergang auch hier vergleichbar mit der Einzelzellwanderung zu amöboider Migration beobachtet im Sinne einer kollektiv-zu-amöboiden Transition (CAT oder KAT; Abb. 12). Dieses Phänomen wurde auch in einem vergleichbaren Modell für Fibrosarkomzellen und Mammakarzinomzellen in Tumorzellsphäroid-Kulturen nachvollzogen (Wolf et al., 2007). Auch für diese Transition gibt es ein Beispiel in umgekehrter Richtung. Der einzellig migrierende Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* geht bei Nahrungsmangel von der amöboiden in eine multizelluläre Lebensform über, die auch zur Wanderung befähigt ist (Devreotes, 1989).

Aufgrund der molekularen Regulation mit sekundärer Plastizität der Zellmigration wurde der Übergang von kollektiver Zellwanderung in amöboide Einzellzellbewegung (CAT) im Multiparameter-Modell integriert (Friedl und Wolf, 2009b). Diese Plastizität in der Tumorzellinvasion und -migration in vitro hat wahrscheinlich Bedeutung in vivo, sowohl für die initiale primäre Invasion wie auch fortgesetzte sekundäre Metastasierung fortgeschrittener Tumoren. So könnte der Übergang in amöboide Migration erklären, warum unter Therapie mit MMP Inhibitoren, in die nach Entdeckung der MMPs große Hoffnungen gesetzt wurden, in klinischen Studien fortgesetzt neue Metastasen auftreten können. Eine mechanistisch anders geartete Anpassungsreaktion wurde für die Anti-Angiogenesetherapie beschrieben. Humane kolorektale Karzinomzelllinien, die durch monatelange Kultivierung in mit dem anti-VEGF mAk Bevacizumab konditioniert worden waren, entwickeln in vitro als auch in Mausmodellen eine größere Migrationsaktivität und Metastasierungstendenz (Fan et al., 2011). Zukünftige Forschung muss klären, welche natürlich vorkommenden Faktoren

die Plastizität in Tumoren kontrollieren, insbesondere Dimensionalität und Textur der ECM, Adhäsionsmoleküle und Zytoskelettaktivität sowie Wachstumsfaktoren und Zytokine. (Friedl und Wolf, 2009b).

Ein tieferes mechanistisches Verständnis der verschiedenen Migrationstypen und ihren Signalwegen bei der Tumorinvasion sowie ihren Ausweichstrategien wird nötig sein, um in Zukunft Metastasierungsprozesse bei Tumorpatienten therapeutisch angehen zu können.

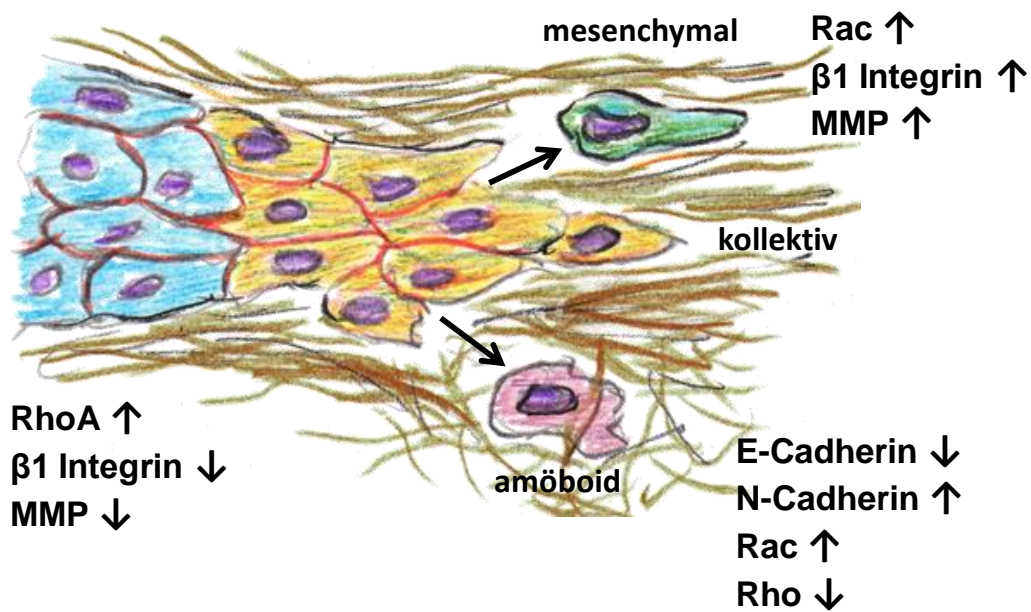


Abbildung 12: Plastizität von Zellmigration: Kollektive-zu-amöboide Transition. Kollektiv wandernde Zellen können ihr Wanderungsverhalten den Umgebungsbedingungen anpassen und nach Lösung von Zell-Zell-Kontakten als Einzelzellen sowohl eine mesenchymale als auch amöboide Migrationsstrategie annehmen (mit freundlicher Genehmigung von Elsevier aus Friedl und Alexander, 2011).

5. Ausblick

Die in dieser Arbeit mittels eines in vitro Kulturmodells dargestellte kollektive Zellwanderung und Plastizität in den Migrationsstrategien wirft wichtige Fragen für zukünftige Untersuchungen zur Kooperation von Tumorzellen und suprazellulären Organisation von Tumoren als eigenständige Gewebe auf (Bidard et al., 2008). Dabei trägt kollektive Zellwanderung möglicherweise nicht nur zur Dissemination primär nicht-invasiver Zellen bei, sondern es ist auch denkbar, dass Zellen in der Mitte einer Gruppe durch adherens und tight junctions vor anflutenden Zytostatika und Attacken der immunologischen

Tumorabwehr geschützt sind (Christiansen und Rajasekaran, 2006; Tusch, 2003). Hierzu sind neben vertiefenden in vitro Untersuchungen vornehmlich auch in vivo Studien in Tiermodellen notwendig. Ein vielversprechender Ansatz hierfür ist die intravitale Multiphotonenmikroskopie im Hautfaltenmodell in Balb/c-Mäusen, in dem erstmals in vivo kollektive Invasion von HT1080 Fibrosarkomzellen gezeigt werden konnte (Alexander et al., 2008). Von großem Interesse ist wie Zell-Matrix-Interaktionen von Tumorzellgruppen reguliert werden, welche Rolle Proteolyse für den kollektiven Invasionsprozess spielt und ob bestimmte Gewebsrouten zu einer bestimmten Invasionsform führen (Friedl und Wolf, 2008). Daneben gilt es, die den Zusammenhalt und mögliche Kommunikation innerhalb der Gruppe vermittelnden Zell-Zell-Kontakte und deren Bedeutung für die Antwort auf Chemo- und Strahlentherapie zu untersuchen. Um die Interaktionen von Tumorzellen, Stromazellen und ECM sowie humorale und metabolische Einflüsse aus dem Organismus während Invasion und Migration eines Tumors zu verstehen, sind neue, systembiologische Ansätze nötig, die die einzelnen zell- und molekularbiologischen Aspekte zu einem Gesamtbild integrieren können (Joyce und Pollard, 2009). Auf solch einer Grundlage könnten neben Proliferation und Angiogenese die Signalwege der Regulation von Migrationsstrategien maligner Tumore in zukünftige Therapiekonzepte Eingang finden.

Zusammenfassung

Zellmigration ist essentiell für die Invasion und Metastasierung maligner Tumore. Neben der Bewegung von Einzelzellen zeigen Tumore sowohl epithelialen als auch mesenchymalen Ursprungs auch kollektive Migration und Invasion multizellulärer Zellverbände, die sich unter Beibehaltung von Zell-Zell-Adhäsionen koordiniert als Gruppe bewegen.

Ziel der Arbeit war, primäre humane Melanomexplantate mittels organotypischer Kultur in 3D Kollagenmatrices einzusetzen, um mittels Zeitrastermikroskopie und experimentellen Blockadestrategien die zellulären und molekularen Grundlagen kollektiver Migration darzustellen, insbesondere die Bedeutung von Zell-Matrix-Interaktionen und Integrinen.

In 3D Explantatkulturen bildeten primäre Melanomexplantate reproduzierbar Invasionszonen und sich ablösende und kollektiv wandernde Zellcluster aus. Diese zeichneten sich durch eine ausgeprägte Polarität mit motiler Vorderfront mit zugartig reorientierten Kollagenfasern und nachgezogenem hinteren Teil der Gruppen aus, vergleichbar der Asymmetrie haptokinetisch migrierender Fibroblasten. $\beta 1$ Integrine zeigten ein heterogenes Verteilungsmuster mit Fokalisierung an Zell-Matrix-Interaktionen vor allem an der Vorderfront und linearer Anordnung entlang der Zell-Zell-Grenzen. Adhäsionsblockierende anti- $\beta 1$ Integrin-Antikörper bewirkten nahezu vollständige Hemmung der kollektiven Migration, mit Verlust der Zellgruppenpolarität und Migrationspersistenz. Nach Integrinblockade zerfielen Zellverbände infolge Loslösung von Einzelzellen, die sich mittels $\beta 1$ Integrin-unabhängiger, amöboider Migration durch die Kollagenmatrix bewegten.

Der Übergang von $\beta 1$ Integrin-abhängiger, kollektiver Migration zu amöboider Einzelzellwanderung (kollektiv-amöboide Transition) ist ein Beispiel für die Plastizität von Tumorzellwanderung, die in Anpassung an das Milieu einen Wechsel der Migrationsstrategie erlaubt. Die Plastizität der Tumorzellmigration muss bei der Entwicklung therapeutischer Konzepte, die auf Hemmung von Tumorinvasion und -metastasierung abzielen, berücksichtigt werden.

Literatur

Abelda, S.M., Mette, A.A., Elder, D.E., Sterwart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., Buck, C.A.: Integrin distribution in malignant melanoma: Association of the $\beta 3$ subunit with tumor progression. *Cancer Res.* 1990; 50: 6757-64

Alexander, S., Koehl, G.E., Hirschberg, M., Geissler, E.G., Friedl, P.: Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model. *Histochem. Cell Biol.* 2008; 130: 1147-54

Amiot, M., Bernard, A., Tran, H.C., Leca, G., Kanellopoulos, J.M., Boumsell, L.: The human cell surface glycoprotein complex (gp 120,200) recognized by monoclonal antibody K20 is a component to phytohaemagglutinin on T cells. *J. Immunol.* 1986; 23: 109-18

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.-J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., Eggermont, A.M., Flaherty, K.T., Gimotty, P.A., Kirkwood, J.M., McMasters, K.M., Mihm Jr., M.C., Morton, D.L., Ross, M.I., Sober, A.J., Sondak, V.K.: Final Version of AJCC Melanoma Staging and Classification. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 6199-206

Basson, M.D.: An Intracellular Signal Pathway That Regulates Cancer Cell Adhesion in Response to Extracellular Forces. *Cancer Res.* 2008; 68: 2-4

Bidard, F., Pierga, J.-Y., Vincent-Salomon, A., Poupon, M.-F.: A "class action" against the microenvironment: do cancer cells cooperate in metastasis? *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27: 5-10

Bröcker, E.-B., Suter, L., Brügger, J., Ruiter, D.J., Macher, E., Sorg, C.: Phenotypic dynamics of tumor progression in human malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 1985; 36: 29-35

Campbell, I.D., Humphries, M.J.: Integrin structure, activation and interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011; 3: a004994

Chaffer, C.L., Weinberg, R.A.: A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* 2011; 331: 1559-64

Chan, B.M.C., Matsuura, N., Takada, Y., Zetter, B.R.: In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression rhabdomyosarcoma cells. *Science* 1991; 251: 1600-2

Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S.J., Sosman, J.A., Kirkwood, J.M., Eggermont, A.M.M., Dreno, B., Nolop, K., Li, J., Nelson, B., Hou, J., Lee, R.J., Flaherty, K.T., McArthur, G.A. for the BRIM-3 Study Group: Improved

Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364: 2507-16

Chen, W.-T.: Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J. Cell Biol.* 1981; 90: 187-200

Christiansen, J.J., Rajasekaran, A.K.: Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastasis. *Cancer Res.* 2006; 66: 8316-26.

Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D. IV, Epstein, M.N., Greene, M.H., Van Horn, M.: A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology* 1984; 15: 1147-65

Cree, I.A., Glaysher, S., Harvey, A.L.: Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010; 10: 375-9.

Danen E.H., Ten Berge, P.J., Van Muijen, G.N., Van't Hof-Grootenboer, A.E., Broecker, E.-B., Ruiter, D.J.: Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology* 1994; 24: 249-56

Daryab, Neda: Plastizität der Tumorinvasion: Zelluläre und molekulare Mechanismen der Beta1-Integrin unabhängigen Migration von Melanomzellen und murinen embryonalen Fibroblasten. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades an der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2009

Davis, E.M., Trinkaus, J.P.: Significance of cell-to-cell contacts for the directional movement of neural crest cells within a hydrated collagen lattice. *J. Embryol. Exp. Morph.* 1981; 63: 29-51

Devreotes, P.: Dictyostelium discoideum: A Model System for Cell-Cell-Interactions in Development. *Science* 1989; 245: 1054-8

Ezratty, E.J., Bertaux, C., Marcantonio, E.E., Gundersen, G.G.: Clathrin mediates Integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J. Cell Biol.* 2009; 187: 733-47

Fan, F., Samuel, S., Lu, J., Dallas, N.A., Xia, L., Bose, D., Ramachandran, V., Ellis, L.M.: Chronic exposure of colorectal cancer cells to bevacizumab promotes compensatory pathways that mediate tumour cell migration. *Br. J. Cancer* 2011; 104: 1270-7

Felding-Habermann, B., Mueller, B.M., Romerdahl, C.A., Cheresch, D.A.: Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J. Clin. Invest.* 1992; 89: 2018-22

Fraley, S.I., Feng, Y., Krishnamurthi, R., Kim, D.-H., Celedon, A., Longmore, G.D., Wirtz, D.: A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nat. Cell Biol.* 2010; 12: 598-605

Friedl, P., Noble, P.B., Zänker, K.S.: Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels – comparison of three quantitative methods for analyzing cell trajectories. *J. Immunol. Meth.* 1993; 165: 157-65

Friedl, P., Noble, P. B., Walton, P. A., Laird, D. W., Chauvin, P. J., Tabah, R. J., Black, M., Zänker, K. S.: Migration of Coordinated Cell Clusters in Mesenchymal and Epithelial Cancer Explants in Vitro. *Cancer Res.* 1995; 55: 4557-60

Friedl, P., Maaser, K., Klein, C.E., Niggemann, B., Krohne, G., Zänker, K.S.: Migration of Highly Aggressive MV3 Melanoma Cells in 3-Dimensional Collagen lattices Results in Local Matrix Reorganization and Shedding of $\alpha 2$ and $\beta 1$ Integrins and CD 44. *Cancer Res.* 1997; 57: 2061-70

Friedl, P., Bröcker, E.-B.: Reconstructing leukocyte migration in 3D extracellular matrix by time-lapse videomicroscopy and computer-assisted tracking. *Methods Mol Biol.* 2004; 239: 77-90

Friedl, P., Hegerfeldt, Y., Tusch, M.: Collective cell movement in morphogenesis and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 2004; 48: 441-9

Friedl, P., Weigelin, B.: Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nature immunology* 2008; 9: 960-9

Friedl, P., Gilmour, D.: Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009; 10: 445-57

Friedl, P., Wolf, K.: Tube Travel: The Role of Proteases in Individual and Collective Cancer Cell Invasion. *Cancer Res.* 2008; 68: 7247-49

Friedl, P., Wolf, K.: Proteolytic cell migration: a five-step process. *Cancer Metastasis Rev* 2009; 28: 129-35 (a)

Friedl, P., Wolf, K.: Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 2009; 188: 11-9 (b)

Friedl, P. und Alexander, S.: Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. *Cell* 2011, 147: 992-1009

Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., Sahai, E.: Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* 2007; 9: 1392-400

Geiger, B., Yamada, K.M.: Molecular Architecture and Function of Matrix Adhesions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011; 3: a005033

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e. V. und des Robert Koch-Instituts (Hrg.): Krebs in Deutschland 2003-2004 – Häufigkeiten und Trends. 6. Auflage, Berlin 2008

Ghajar, C.M., Bissell, M.J.: Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: insights from imaging. *Histochem. Cell Biol.* 2008; 130: 1105-18

Gown, A.M., Vogel, A.M., Hoak, D., Gough, F., McNutt, M.A.: Monoclonal Antibodies Specific for Melanocytic Tumors Distinguish Subpopulations of Melanocytes. *Am. J. Pathol.* 1986; 123: 195-203

Gray, R.A., Cheung, K.J., Ewald, A.J.: Cellular Mechanisms Regulating Epithelial Morphogenesis and Cancer Invasion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010, 22: 640-50

Haass, N.K., Smalley, K.S.M., Li, L., Herlyn, M.: Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 2005; 18; 150–9

Hidalgo-Carcedo, C., Hooper, S., Chaudhry, S.I., Williamson, P., Harrington, K., Leitinger, B., Sahai, E.: Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat. Cell Biol.* 2011; 13: 49-58

Hieken, T.J., Farolan, M., Ronan, S.G., Shilkaitis, A., Wild, L., Das Gupta, T.K.: beta 3 integrin expression in melanoma predicts subsequent metastasis. *J. Surg. Res.* 1996; 63: 169-73

Hilgenfeldt, S., Eriskens, S., Carthew, R.W.: Physical modeling of cell geometric order in an epithelial tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008; 105: 907-11

Hofmann, U.B., Westphal, J.R., Waas, E.T., Becker, J.C., Rüter, D.J., van Muijen, G.N.: Coexpression of integrin alpha(v)beta3 and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 115: 625-32

Huttenlocher, A. und Horwitz, A.R.: Integrins in Cell Migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011; 3(9): a005074

Hynes R.: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-87

Janssens, K., Sung, H., Rorth, P.: Direct detection of guidance receptor activity during border cell migration. *Proc. Natl. Aca. Sci. U. S. A.* 2010; 107: 7323-8

Joyce, J.A., und Pollard, J.W.: Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2009; 9: 239-52

Kapur R.P., Bigler S.A., Skelly M., Gown A.M.: Anti-melanoma monoclonal antibody HMB45 identifies an oncofetal glycoconjugate associated with immature melanosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 1992; 40(2): 207-12

Klein, C. E., Steinmayer, T., Kaufmann, D. Weber, L., Bröcker, E.-B.: Identification of a melanoma progression antigen as integrin VLA-2. *J. Invest. Dermatol.* 1991; 96: 281-4

Kolega, J.: The movement of cell clusters in vitro: morphology and directionality. *J. Cell Sci.* 1981; 49: 15-32

Lauffenburger, D.A., und Horwitz, A.F.: Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* 1996; 84: 359-69

Lämmermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Söldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Förster, R., Critchley, D.R., Fässler, R., Sixt, M.: Rapid leukocyte migration by Integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 2008; 453: 51-5

LeBoit, P.E., Burg, G., Weedon, D., Sarasin, A.(Hg): World Health Organization Classification of Tumours – Pathology and Genetics of Skin Tumours. Lyon: IARC Press, 2005

Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N. Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., Yamauchi, M., Glasser, D.L., Weaver, V.M.: Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell* 2009; 139: 891-906

Liu, Z.-J., Herlyn, M.: Molecular Biology of Cutaneous Melanoma. In: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. (Hg): *Cancer – Principles and Practice of Oncology*, 7th Edition, S. 1745-53. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005

Maaser, K., Wolf, K., Klein, C. E., Niggemann, B., Zänker, K. S., Friedl, P.: Functional Hierarchy of Simultaneously Expressed Adhesion Receptors: Integrin $\alpha2\beta1$ but Not CD44 Mediates MV3 Melanoma Cell Migration and Matrix Reorganization within Three-Dimensional Hyaluronan-containing Collagen Matrices. *Mol. Biol. Cell* 1999; 10: 3067-79

Miller, A.J., Mihm, M.C.: Mechanisms of Disease – Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 51-65.

Montell, D.J.: Morphogenetic Cell Movements: Diversity from Modular Mechanical Properties. *Science* 2008; 322: 1502-5

Morimoto, C., Letvin, N.L., Boyd, A.W., Hagan, M., Brown, H.M., Kornacki, M.M., Schlossmann, S.F.: Isolation and characterization of the human helper inducer T-cell subset. *J. Immunol.* 1985; 184: 3762-70

Muradali, S.: Invasion and Migration of Clusters in Oral Carcinomas within Three-Dimensional Collagen Matrices: The Effects of Blocking $\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Integrin Function. Thesis for the degree of Masters of Science at the Department of Dental Sciences, McGill University, Montreal, Canada 1996

Nabeshima, K., Shimao, Y., Inoue, T., Itoh, H., Kataoka, H., Kono, M.: Hepatocyte growth factor/scatter factor induces not only scattering but also cohort migration of human colorectal-adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer* 1998; 78: 750-9

Nabeshima, K., Inoue, T., Shimao, Y., Okada, Y., Itoh, Y., Seiki, M., Kono, M.: Front-Cell-specific Expression of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase and Gelatinase A during Cohort Migration of Colon Carcinoma Cells Induced by Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor. *Cancer Res* 2000; 60: 3364-9

Natalie, P.G., Nicotra, M.R., Bartolazzi, A., Cavaliere, R., Biggoti, A.: Integrin expression in cutaneous malignant melanoma: Association of the alpha 3/beta 1 heterodimer with tumor progression. *Int.J. cancer* 1993; 54: 68-72

Nguyen, D.X., Bos, P.D., Massague, J.: Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* 2009; 9: 274-84

Palecek, S.P., Loftus, J.C., Ginsberg, M.H., Lauffenburger, D.A., Horwitz, A.F.: Integrin-ligand binding properties govern speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 1997; 385: 537-40

Palecek, S.P., Huttenlocher, A., Horwitz, A.F., Lauffenburger, D.A.: Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J. Cell Sci.* 1998; 111: 929-40

Petitclerc, E., Stromblad, S., von Schalscha, T.L., Mitjans, F., Piulats, J., Montgomery, A.M., Cheresch, D.A., Brooks, P.C.: Integrin $\alpha(v)\beta 3$ promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor survival. *Cancer Res.* 1999; 59: 2724-30

Rhee, S.: Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp. Mol. Med.* 2009; 41: 858-65

Rorth, P.: Collective cell migration. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 2009; 25: 407-29

Sanz-Moreno, V., Marshall, C.J.: Rho-GTPase signaling drives melanoma cell plasticity. *Cell Cycle* 2009; 8: 1484-7

Sethi, N., Kang, Y.: Unravelling the complexity of metastasis – molecular understanding and targeted therapies. *Nat. Rev. Cancer* 2011; 11: 735-48

- Shaw, T.J., Martin, P.: Wound repair at a glance. *J. Cell Sci.* 2009; 122: 3209-13
- Shimoyama, Y., Hirohashi, S., Hirano, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., Takeichi, M., Abe, O.: Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.* 1989; 49: 2128–33
- Stetler-Stevenson, W.G.: Invasion and Metastases. In: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. (Hg): *Cancer – Principles and Practice of Oncology*, 7th Edition, S. 113-127. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005
- Sträuli, P., Hämmerli, G.: Cancer cell locomotion: its occurrence during invasion. In: Mareel, M.M., Calman, K.C. (Hg): *Invasion: Experimental and Clinical Implications*. S.253-74. Oxford University Press, 1984
- Theveneau, E., Mayor, R.: Collective Cell Migration of the Cephalic Neural Crest: The Art of Integrating Information. *Genesis* 2011; 49: 164-76
- Thiery, J.P.: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature* 2002; 2: 442-54
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., Nieto, M.A.: Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 2009; 139: 871-90
- Trinkaus, J.P.: Directional Cell Movement During Early Development of the Teleost *Blennius pholis*: I. Formation of Epithelial Cell Clusters and Their Pattern and Mechanism of Movement. *J. Exp. Zool.* 1988; 245: 157-86
- Truong, H., Danen, E.H.J.: Integrin switching modulates adhesion dynamics and cell migration. *Cell Adh. Migr.* 2009; 3(2): 179-81
- Tusch, M.: Zell-Zell-Adhäsion und Migration von Zellgruppen aus primären Melanomen: Übergang von kollektiver in amöboide Einzelzellbewegung nach Inhibition von $\beta 1$ Integrinen. Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin, Universität Witten/Herdecke 2003
- Väisänen, A., Kuvaja, P., Kallioinen, M., Turpeeniemi-Hujanen, T.: A prognostic index in skin melanoma through the combination of matrix metalloproteinase-2, Ki67, and p53. *Hum. Pathol.* 2011; 42: 1103-11
- Weigelt, B., Lo, A.T., Park, C.C., Gray, J.W., Bissel, M.J.: HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 122: 35–43.
- Weijer, C.J.: Collective cell migration in development. *J. Cell Sci.* 2009; 122: 3215-23

Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U.H., Deryugina, E.I., Strongin, A.Y., Bröcker, E.-B., Friedl, P.: Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal–amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J. Cell Biol.* 2003; 160: 267-77

Wolf, K., Wu, Y.I., Liu, Y., Geiger, J., Tam, E., Overall, C., Stack, M.S., Friedl, P.: Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* 2007; 9: 893-904

Wolf, K., Alexander, S., Schacht, V., Coussens, L.M., von Adrian, U.H., van Rheenen, J., Deryugina, E., Friedl, P.: Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Semin Cell Dev Biol.* 2009; 20: 931-41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	
Invasionsformen von Melanomexplantaten in 3D Kollagenmatrices	S. 19
Abbildung 2:	
Invasive Zellverbände enthalten melanozytäre Zellen	S. 21
Abbildung 3:	
Morphologie und Matrixreorganisation eines wandernden Zellcluster	S. 23
Abbildung 4:	
Polarisierung der Zell-Matrix-Interaktionen in einem wandernden Zellcluster...	S. 24
Abbildung 5:	
$\beta 1$ Integrin-Verteilung bei einem nativ gefärbten Cluster	S. 25
Abbildung 6:	
Die Migration von Clustern wird durch Blockade von $\beta 1$ Integrinen inhibiert	S. 27
Abbildung 7:	
Verteilung von $\beta 1$ Integrinen nach Blockade	S. 28
Abbildung 8:	
Loslösung von Einzelzellen	S. 29
Abbildung 9:	
Geschwindigkeit der Einzelzellen nach Ablösung vom Cluster	S. 29
Abbildung 10:	
Pfade von zwei Zellen nach Ablösung vom Cluster	S. 30
Abbildung 11:	
Amöboide Zellmorphologie nach Blockade von $\beta 1$ Integrinen	S. 31
Abbildung 12:	
Plastizität von Zellmigration: Kollektive-zu-amöboide Transition	S. 45

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
anti-hu	anti-human
ALM	akrolentiginöses Melanom
ATP	Adenosintriphosphat
CAT = KAT	collective-to-ameboid transition/kollektive-zu-amöboide Transition
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
ECM = EZM	extrazelluläre Matrix
EMT	epitheliale-zu-mesenchymale Transition
Fab	fragment antigen-binding, Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers
FCS	fetales Kälberserum, fetal calf serum
GP, gp	Glykoprotein
LMM	Lentigo-maligna Melanom
LRSC	Lissamin-Rhodamin, ein Fluorophor mit Emissionsmaximum 570 nm
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAT	mesenchymale-zu-amöboide Transition
MEM	minimal essential medium
MET	mesenchymale-zu-epitheliale Transition
MMP, MMPs	Matrix Metalloproteinase, Plural
MT1-MMP	Membrantyp-1-Matrix Metalloproteinase
NM	noduläres Melanom
PBS	phosphate buffered saline, gepufferte Kochsalzlösung
PDGF	platelet derived growth factor
PenStrep	Penicillin, Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
RPMI	Zellkulturmedium
Src	Signalkaskadenmolekül

SSM	superfiziell-spreitendes Melanom
UV	ultraviolett
VEGF	vascular endothelial growth factor

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn Prof. Dr. med. Peter Friedl, PhD, ohne dessen individuelle Vermittlung von wissenschaftlichen Arbeitstechniken und tatkräftige Unterstützung diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre. Ihm verdanke ich auch ein Grundverständnis immunologischer Prozesse, von dem ich bis heute in meiner klinischen Arbeit immer wieder profitiere.

Mit Dr. med. Miriam Tusch konnte ich während der experimentellen Phase sehr eng und ausgesprochen fruchtbar zusammen arbeiten. Und wenn die Diskussionen auch noch so hitzig wurden – unsere Freundschaft ist über die gemeinsame Zeit in Würzburg nur noch enger geworden.

Angelika Schäfer gilt mein tiefer Dank für die Motivation und Disziplin, die sie mich in der letzten, schwersten Phase des Schreibens durch das gemeinsame Arbeiten hat finden lassen. Ohne diese Zeit wäre diese Dissertation nicht beendet worden.

Bei Frau Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker möchte ich mich für die sehr freundliche Aufnahme in ihrer Klinik und die gute Unterstützung während dieser Zeit bedanken. Das wissenschaftsfreundliche und auch kollegiale Klima in ihrer Abteilung habe ich als beispielhaft erlebt.

Frau Martina Joßberger danke ich herzlich für die hervorragende Einarbeitung in die Methoden der Zellkultur und des Zelltrackings und die engagierte Unterstützung und gute Organisation des Labors.

Mein Dank gilt auch allen MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe „Zellmigration“ und den KollegInnen aus den Nachbar-Laboren, durch die die Zeit im Labor neben vielen neuen Erfahrungen auch einfach Spaß gebracht hat.

Meiner Familie und meinen FreundInnen danke ich für die Unterstützung auf ganz verschiedenen Ebenen und die Geduld, die sie mit mir während meines schwierigen Schreibprozesses hatten.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums, die es mir ermöglicht hat, mich mit einem so zeitintensiven Projekt zu beschäftigen.

Lebenslauf Yael Hegerfeldt

Zur Person

Geboren am 29. 6. 1973 in Bonn-Bad Godesberg

Derzeitige Position

Seit Dez. 2010 Fachärztin, Innere Medizin – Hämatologie/Onkologie
Weiterbildung „Internistische Intensivmedizin“
Klinik für Knochenmarktransplantation und Zentrum
für Innere Medizin, Universitätsklinikum Essen,
Universität Duisburg-Essen

Facharztausbildung Deutschland

März 2009 – Nov. 2010 Assistentärztin, Hämatologie/Onkologie
Klinik für Knochenmarktransplantation, Universitäts-
klinikum Essen, Universität Duisburg-Essen

Nov. 2010 Facharztprüfung Innere Medizin und Hämatologie
und Onkologie

Facharztausbildung USA

Juli 2005 – Juni 2008 Fellowship, Hematology/Oncology
Case Comprehensive Cancer Center/Case Western
Reserve University, NCI-designated Comprehensive
Cancer Center, Cleveland, OH

Okt. 2008 American Board of Internal Medicine „Hematology“
American Board of Internal Medicine „Medical
Oncology“

Juli 2002 – Juni 2005 Residency, Internal Medicine
Case Western Reserve University / MetroHealth
Medical Center, Cleveland, OH

Aug. 2005 American Board of Internal Medicine „Internal
Medicine“

Studium

- April 1994 – April 2001 Universität Witten/Herdecke, Humanmedizin
- Aug. 1997 – Mai 1998 Universitätshautklinik Würzburg
Freisemester für die experimentelle Arbeit für eine
Promotion in der AG Zellmigration,
Betreuung durch Prof. Dr. Peter Friedl
- Okt. 1993 – März 1994 Universität Bonn, Humanmedizin

Examina

- | | | | |
|------------|----------------------|-----------|----------------------------|
| April 2001 | 3. Staatsexamen | Dez. 2001 | USMLE Step 3 |
| März 1999 | 2. Staatsexamen | Juli 2001 | USMLE Step 2 |
| März 1997 | 1. Staatsexamen | Juli 2001 | Clinical Skills Assessment |
| März 1996 | Ärztliche Vorprüfung | Juni 1997 | USMLE Step 1 |

Weitere Arbeitserfahrung

- Okt. 2001 – März 2002 Universität Witten/Herdecke
wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG Modell-
studiengang, Studien-dekanat, Fakultät für Medizin

Freiwilliges Soziales Jahr

- Okt. 1992 – Okt. 1993 Krankenpflege in der geriatrischen Rehabilitation
Johanniter-Krankenhaus Bonn

Schule

- 1983 – 1992 Gymnasium am Ölberg, Königswinter,
Abitur im Juni 1992
- 1979 – 1983 Gemeinschaftsgrundschule Königswinter-
Heisterbacherrott

Stipendium

- März 1997 – April 2001 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes

Publikationsliste Yael Hegerfeldt

Die Daten dieser Dissertation wurden publiziert in

Friedl P, **Hegerfeldt Y**, Tusch M: Collective cell migration in morphogenesis and cancer. International Journal of Developmental Biology. 2004; 48 (5-6): 441-9.

Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker EB, Friedl P: Collective cell movement from primary melanoma explants: plasticity of cell-cell-interaction, β 1 integrin function, and migration strategy. Cancer Research 2002; 62(7): 2125 – 30.

Abbildung 7 dieser Dissertation wurde nachgedruckt in

Journal of Cell Biology 2002; 157 (4): 547

Tuma RS: Movies of Metastasis Shed Light on How Cells Move in the Body. Journal of the National Cancer Institute 2002; 94(11): 795

Kongressbeiträge im Rahmen dieser Dissertation

Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker EB, Friedl P: Collective cell movement from primary melanoma explants: plasticity of cell-cell-interaction, β 1 integrin function, and migration strategy. 29th Annual Meeting of the “Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung”, Berlin, February 28 – March 2, 2002 (*Poster*)

Hegerfeldt Y, Tusch M, Bröcker EB, Friedl P: Invasion and Migration of Coordinated Cell Clusters from Epithelial and Melanocytic Tumor Explants: – Essential Function of β 1 Integrins in Cell Matrix and Cell Cell Interactions. 10th Symposium of the Division of Experimental Cancer Research (AEK) of the German Cancer Society, Heidelberg, March 24 – 26, 1999; Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Sup. to Vol. 125: 93 (1999) (*Poster*)

Tusch M, **Hegerfeldt Y**, Bröcker EB, Friedl P: Cohesion and polarity of invading cell clusters from primary melanoma explants are mediated by β 1 integrins but not E-cadherin. 26th Annual Meeting of the “Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung”, Bonn, 18.-20. Feb. 1999, Archives of Dermatological Research, 291: 144 (*Poster*)

Friedl P, Maaser K, Tusch M, **Hegerfeldt Y**, Zänker KS, Bröcker EB: Migrationsstrategien von Tumorzellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices. 8th Annual Meeting of the “Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie”, Homburg, 2.-3. Okt. 1998 (*Vortrag Friedl*)

Friedl P, Maaser K, **Hegerfeldt Y**, Tusch M, Muradali S, Zänker KS, Bröcker EB: Locomotion of tumor cells in 3-D collagen lattices. FASEB Summerconference, Wilsonville, Oregon, USA, 19.-24. Juli 1998 (*Vortrag Friedl*)

Tusch M, **Hegerfeldt Y**, Muradali S, Bröcker EB, Friedl P: Invasion and migration of clustered cells from primary tumor explants: differential expression and function of $\beta 1$ integrins. 4th "International Investigative Dermatology" Meeting, Cologne, Germany, 7.-10. Mai 1998, Journal of Investigative Dermatology, 110: 504. (*Vortrag Tusch*).

Hegerfeldt Y, Tusch M, Muradali S, Bröcker EB, Friedl P: Invasion and Migration of Clustered Cells from Primary Melanoma Explants: Differential Expression and Function of $\beta 1$ Integrins. 22nd Annual Meeting of the German Society of Cell Biology, Saarbruecken, March 15 – 19, 1998; European Journal of Cell Biology, Sup. 48, Vol. 75: 58 (1998) (*Poster*)

Weitere Artikel

Kindwall-Keller TL, **Hegerfeldt Y**, Meyerson HJ, Margevicius S, Fu P, van Heeckeren W, Lazarus HM, Cooper BW, Gerson SL, Barr P, Tse WW, Curtis C, Fanning LR, Creger RJ, Carlson-Barko JM, Laughlin MJ: Prospective study of one- vs two-unit umbilical cord blood transplantation following reduced intensity conditioning in adults with hematological malignancies. Bone Marrow Transplant. 2011 Oct 17. doi: 10.1038/bmt.2011.195. [Epub ahead of print]

Koldehoff M, Steckel NK, **Hegerfeldt Y**, Ditschkowski M, Beelen DW, Elmaagacli AH: Clinical course and molecular features in 21 patients with atypical chronic myeloid leukemia. Int J Lab Hematol. 2012 Feb; 34(1): e3-5.

Elmaagacli AH, Steckel NK, Koldehoff M, **Hegerfeldt Y**, Trenscher R, Ditschkowski M, Christoph S, Gromke T, Kordelas L, Ottinger HD, Ross RS, Horn PA, Schnittger S, Beelen DW: Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. Blood. 2011 Aug 4; 118(5): 1402-12.

Elmaagacli AH, Steckel N, Ditschkowski M, **Hegerfeldt Y**, Ottinger H, Trenscher R, Koldehoff M, Beelen DW: Toll-like receptor 9, NOD2 and IL23R gene polymorphisms influenced outcome in AML patients transplanted from HLA-identical sibling donors. Bone Marrow Transplant. 2011 May; 46(5): 702-8.

Elmaagacli AH, Steckel N, Ditschkowski M, **Hegerfeldt Y**, Ottinger H, Trenscher R, Beelen DW: No influence of gene polymorphism of LCT (C13910T) on transplantation outcomes in acute myeloid leukemia patients who received transplantations from HLA-identical sibling donors. Blood. 2010 Apr 29; 115(17): 3644-5

Lesniewski M, Haviernik P, Weitzel RP, Kadereit S, Kozik MM, Fanning LR, Yang YC, **Hegerfeldt Y**, Finney MR, Ratajczak MZ, Greco N, Paul P, Maciejewski J, Laughlin MJ: Regulation of IL-2 expression by transcription factor BACH2 in umbilical cord blood CD4(+) T cells. Leukemia, 2008; 22(12): 2201-2207.

Batts E, Sanchorawala V, **Hegerfeldt Y**, Lazarus HM: Azotemia associated with use of lenalidomide in plasma cell dyscrasias. *Leukemia & Lymphoma* 2008; 49(6): 1108-15.

Fanning LR, **Hegerfeldt Y**, Tary-Lehmann M, Lesniewski M, Maciejewski J, Weitzel RP, Kozik M, Finney M, Lazarus HM, Paul P, Ratajczak MZ, Meyerson HJ, Laughlin MJ: Allogeneic transplantation of multiple umbilical cord blood units in adults: role of pretransplant-mixed lymphocyte reaction to predict host-vs-graft rejection. *Leukemia*. 2008 Sep; 22(9): 1786-90.

Weitere Kongressbeiträge

Kindwall-Keller T, **Hegerfeldt Y**, Fu P, Lazarus HM, Cooper BW, Barr P, Gerson SI, Meyerson M, Erinc S, Creger R, Fanning L, Greco N, Haviernik P, Lesniewski M, Laughlin MJ: Prospective Phase II Study of Biologic Assignment One Vs Two Unit Umbilical Cord Blood Transplant (UCBT) in the Reduced-Intensity Conditioning Setting. 50th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, CA, December 6-9, 2008. Abstract #1960 (*Poster*)

Hegerfeldt Y, Fanning LR, Fu P, Lazarus HM, Cooper B, Tse W, Meyerson H, Gerson SL, Jaroscak J, Fox R, Creger R, Maciejewski J, Tary-Lehmann M, Ratajczak M, Stevens C, Rubinstein P, Hoffman MA, Laughlin MJ: Umbilical Cord Blood (UCB) Graft T-cells Correlate with Myeloid Recovery in Adults with Hematologic Malignancies Treated with Reduced Intensity Conditioning (RIC) and Single Unit Infusion. 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 9-12, 2006. Abstract # 3132 (*Poster*)

Kozik M, Lesniewski ML, **Hegerfeldt Y**, Brewka RR, Fanning LR, Finney MR, Weitzel RP, Sakthivel R, Laughlin MJ: Dysregulation of Nuclear Factor of Activated T-Cells (NFAT1) in Human T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia (T-ALL): Possible Role of Inactivated NFAT1 in Leukemogenesis. 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 9-12, 2006. Abstract #1849 (*Poster*)

Lesniewski ML, Fanning LR, Kozik M, Weitzel RP, **Hegerfeldt Y**, Sakthivel R, Laughlin MJ: Transcription Factor BACH2 Inhibits AP1 Proteins JunB and FosL1 in Umbilical Cord Blood (UCB) CD4+ T-Cells. 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 9-12, 2006. Abstract #1743 (*Poster*)