

Aus der Klinik und Poliklinik
für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Universität Würzburg
Direktorin: Prof. Dr. med. Eva-B. Bröcker

**Dynamik, Biomechanik und Plastizität des Aktinzytoskeletts
in migrierenden B16/F1 GFP-Aktin Melanomzellen
in 2D und 3D extrazellulärer Matrix**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Josefine Starke
aus Leipzig

Würzburg, Mai 2007

Referent: Prof. Dr. med. Ph. D. (CDN) Peter Friedl

Korreferent: Prof. Dr. med. Manfred Gessler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der Disputation: [20. Dezember 2007](#)

Die Promovendin ist Ärztin.

Für Prof. Dr. med. habil. Gunter Scheerschmidt

Inhaltsverzeichnis

Widmung	
Inhaltsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung	1
1.1. Das maligne Melanom – ein Beispiel für einen hoch invasiven metastasierenden Tumor	1
1.2. Bedeutung des Aktinzytoskeletts für die Zellmigration	2
1.2.1. Grundlagen der Aktinpolymerisation und Depolymerisation	2
1.2.2. Aktin und Adhäsionskomplexe	5
1.2.3. Organisation des Aktinzytoskeletts in stationären und wandernden Zellen	6
1.3. Die extrazelluläre Matrix	8
1.4. Grundlagen und Konzepte zur Zellmigration	10
1.5. Das Grüne-Fluoreszenz-Protein (GFP) als Marker molekularer Strukturen	12
1.6. Studien zur Kraftübertragung durch Zellen auf die extrazelluläre Umgebung	13
1.7. Ziele der Experimente	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Material	15
2.1.1. Zelllinien	15
2.1.2. Antikörper	15
2.1.3. Inhibitoren des Aktinzytoskeletts	15
2.1.4. Geräte	16
2.1.5. Materialien, Puffer, Reagenzien	16
2.1.6. Software	17
2.2. Methoden	18
2.2.1. Zelllinien und Zellkultur	18
2.2.2. 2D und 3D Migrationsmodelle	18
2.2.3. Blockade des Aktinzytoskeletts mit pharmakologischen Inhibitoren	19
2.2.4. Messung der Viabilität der Zellen	20
2.2.5. Digitale Hellfeld-Zeitraffermikroskopie	21
2.2.6. Zelltracking und Datenanalyse	21
2.2.7. Dynamische und statische Konfokalmikroskopie	22
2.2.7.1. Darstellung des Aktinzytoskeletts, der β 1-Integrine, Fascin und VASP in fixierten Zellen	23
2.2.7.2. Dynamische Darstellung des Aktinzytoskeletts bei B16/F1 GFP-Aktin Zellen	26

2.2.7.3.	Dynamische Darstellung des inhibierten Aktinzytoskeletts bei B16/F1 GFP-Aktin Zellen	26
2.2.8.	Digitale Bildanalyse konfokaler Zeitserien	27
2.2.8.1.	Analyse der Fluoreszenzintensität	28
2.2.8.2.	Analyse des Reflexionsmusters	28
2.2.8.3.	Kolokalisationsanalysen	28
2.2.8.4.	Tracking von Kollagenfasern	29
3.	Ergebnisse	30
3.1.	Physikalische Struktur der Migrationsbedingungen	30
3.2.	Aktinverteilung in lebenden und fixierten Zellen	31
3.3.	Zellmorphologie und Migrationseffizienz unter 2D und 3D Kollagenbedingungen	33
3.3.1.	Monomeres Kollagen auf 2D Oberfläche	33
3.3.2.	Fibrilläres Kollagen auf 2D Oberfläche	34
3.3.3.	3D Kollagenmatrix	36
3.3.4.	Pseudopodien ermöglichen den B16 GFP-Aktin Zellen auf 2D und in 3D fibrillären Kollagenumgebungen zu wandern	37
3.3.5.	Migrationstypus und Effizienz hochinvasiver MV3 Zellen im Vergleich zu den B16/F1 GFP-Aktin Zellen	38
3.4.	Plastizität des Aktinzytoskeletts wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen in Abhängigkeit von der Struktur der extrazellulären Matrix	42
3.4.1.	2D mit monomeren Kollagen beschichtete Oberfläche	42
3.4.2.	Fibrilläres Kollagen als 2D Oberfläche	45
3.4.3.	3D fibrilläre Kollagenmatrix	45
3.4.4.	Lokalisation von Fascin und VASP in Lamellen und Filopodien	48
3.5.	Hemmung der Aktindynamik und Zellmigration durch pharmakologische Inhibitoren	50
3.5.1.	Blockade des Aktinzytoskeletts verhindert die Ausbildung einer polaren Zellform und beeinträchtigt die Wanderung von B16/F1 GFP-Aktin Zellen	50
3.5.2.	Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts während der Blockade durch Aktininhibitoren	52
3.5.3.	Struktur des Aktinzytoskeletts in B16/F1 GFP-Aktin Zellen in Anwesenheit von Aktin-Inhibitoren: Darstellung mit Phalloidin	54
3.5.4.	Hemmung von Zellpolarisierung und Migration hochinvasiver, aggressiver MV3 Melanomzellen durch Aktin-Inhibition	56
3.5.5.	Charakteristische Blockade der Aktinpolymerisation fixierter, Phalloidin gefärbter MV3 Zellen durch die Inhibitoren	58
3.5.6.	Vergleich der Wirkung der pharmakologischen Hemmstoffe des Aktinzytoskeletts auf B16/F1 GFP-Aktin Zellen und auf MV3 Zellen	60
3.6.	Messung der Viabilität der B16 GFP-Aktin Zellen und der MV3 Zellen nach Ablauf eines Versuches sowie unter Inhibitoreinfluss	62

3.7.	Aktinverteilung migrierender MV3 Zellen	62
3.8.	Struktur des Aktinzytoskeletts und Integrinverteilung in wandernden MV3 Zellen	63
3.9.	Kraftübertragung wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf verschiedene Kollagenumgebungen	66
3.9.1.	2D monomere Kollagenoberfläche	66
3.9.2.	2D fibrilläre Kollagenoberfläche	69
3.9.3.	3D fibrilläres Kollagengel	70
3.9.3.1.	Wandernde B16/F1 GFP-Aktin Zellen deformieren die Kollagenfasern an der Vorderfront	72
3.9.3.2.	Aktinreiche Filopodien wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen stehen in einer dynamischen Interaktion mit den Kollagenfasern der Vorderfront und erzeugen die vorwärtstreibende Kraft	74
3.9.3.3.	B16/F1 GFP-Aktin Zellen wandern mit einer optimalen Zelllänge in Extensions- und Retraktionszyklen durch die 3D Kollagenumgebung	77
3.9.3.4.	Der Zug der Filopodien der Vorderfront an den Kollagenfasern bestimmt die elongierte (mesenchymale) Zellform durch 3D Kollagengel wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen	78
3.9.4.	Deformation der Kollagenfasern durch wandernde MV3 Zelle	80
4.	Diskussion	83
4.1.	Unterschiedliche Migrationsformen in 2D und 3D Modellen	83
4.1.1.	In vitro Rekonstruktion unterschiedlicher Kollagenstrukturen	83
4.1.2.	Plastizität von Zellmorphologie und resultierende Migrationseffizienz in Antwort auf die Umgebungsstruktur der ECM	84
4.2.	Dynamik der Biophysik während der Migration	87
4.2.1.	Aktinreiche Filopodien der Vorderfront erzeugen die zur Zellmigration notwendige Kraft durch Bündelung und Zug an Kollagenfasern	88
4.2.2.	Durch passives Nachziehen des Hinterendes entsteht ein Migrationsablauf in Zyklen aus Kollagenfasertraktion, Zellextension und Migration	89
4.3.	Konsequenz der Inhibition des Aktinzytoskeletts	90
4.4.	Ausblick	91
5.	Zusammenfassung	92
6.	Abstract	93
7.	Literaturverzeichnis	94
8.	Anhang	113
8.1.	Abbildungsverzeichnis	113
8.2.	Filmlegende	115
8.3.	Tabellenverzeichnis	116
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AK	Antikörper
Arp	aktin related proteins
BSA	bovines Serumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescence protein
F(ab)	F(ab)-Fragmente der Immunglobuline
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FAK	fokale Adhäsionskinase
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fetales Serumalbumin
G-Aktin	globuläres Aktin
GTP	Guanosintriphosphat
IgG	Immunglobulin G
mAK	monoklonaler Antikörper
Max.	Maximum
MEM	minimal essential eagle's medium
Min.	Minimum
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PI	Propidiumiodid
PIP	Phosphoinositolphosphat
RSP	reflection short pass
VASP	vasodilatatorstimuliertes Phosphoprotein

1. Einleitung

Zellmigration spielt eine bedeutende Rolle bei physiologischen und pathologischen Prozessen wie z.B. Embryogenese, Angiogenese, Wundheilung, Immunantwort und Entzündungserkrankungen. Darüber hinaus erfolgt eine unregulierte, pathologische Form der Zellmigration im Rahmen von Krebserkrankungen. Hier ist die aktive Wanderung von Tumorzellen in das umgebende Gewebe Voraussetzung sowohl für lokale Invasion als auch für die systemische Metastasierung (Sträuli und Haemmerli, 1984; Lauffenburg und Horwitz, 1996). Tumorzellen wandern entweder als Einzelzellen oder als Zellgruppen nach Ablösung vom Primärtumor in das umliegende Gewebe (Friedl et al., 2003).

Obwohl wesentliche molekulare Prozesse der Zellmigration inzwischen gut bekannt sind, ist es bisher nicht zufriedenstellend gelungen, eine selektive Hemmung der Migration von Tumorzellen zu erzielen. Daher ist es notwendig, zu untersuchen, ob die Migration von Tumorzellen besondere Merkmale aufweist, die sie von nicht-neoplastischen Zellen unterscheidet. Ein Teilaspekt ist hierbei, ob es „die“ Tumorzellmigration, d.h. eine standardisierbare Morphologie und Migrationstrategie gibt, die sich als Zielstruktur für die Pharmakotherapie eignen könnte. Diese Fragen wurden im Rahmen dieser Arbeit am Modell der Morphologie und Funktion des Aktinzytoskeletts in malignen Melanomzellen untersucht.

1.1. Das maligne Melanom – Beispiel eines hochinvasiven metastasierenden Tumors

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor mit einer ausgeprägten Neigung zu früher Invasion und Metastasierung. 50 % der malignen Melanome entstehen de Novo auf normaler Haut, 30 % entwickeln sich aus einem atypischen Nävus und 20 % aus einem angeborenen Muttermal (kongenitaler Nävus). Das maligne Melanom wird je nach Wachstumsverhalten, Tumorprogression, Altersgipfel und Lokalisation in 4 Klassen eingeteilt: a) oberflächlich-spreitendes Melanom, b) Lentigo-maligna Melanom, c) noduläres Melanom, d) akral-lentiginöses Melanom. Ihnen allen gemeinsam ist zuerst ein oberflächliches, horizontales, intraepidermales Wachstum, das je nach Melanomtyp unterschiedlich schnell in ein vertikales, invasives Wachstum bis in die tiefe Dermis und Subkutis übergeht. Die Metastasierung erfolgt lymphogen in die

lokoregionären Lymphknoten und hämatogen in entfernte Organe wie Lunge, Leber, Gehirn, Haut und Knochen (Langley et al., 1998).

Für die Prognose sind neben der Lokalisation die Tumordicke und Metastasierungsrate entscheidend. Die Zehn-Jahres-Überlebensrate beträgt im Stadium I bei einer Tumordicke bis 1,5 mm 97 %, im Stadium II bei einer Tumordicke bis 4 mm 30-70 %, im Stadium III mit regionalen Lymphknoten- oder In-Transit-Metastasen 19-28 % und im Stadium IV mit Fernmetastasen 3 % (Fitzpatrick et al., 1997). Die Behandlung erfordert eine frühzeitige chirurgische Exzision des Primärtumors bis zur Muskelfaszie und einem abgestuften lateralen Sicherheitsabstand, Darstellung und Biopsie des Wächterlymphknotens, gegebenenfalls die Entfernung regionaler Lymphknoten sowie Chemo- bzw. Immuntherapie (Interdisziplinäre Leitlinien, Malignes Melanom 2007).

Der metastatischen Dissemination von Tumorzellen liegt eine Ablösung von einzelnen Tumorzellen oder Zellgruppen aus dem primären Gewebeverband zugrunde, die aktiv in das umliegende Gewebe einwandern (Hanahan und Weinberg, 2000; Lauffenburg und Horwitz, 1996; Sträuli und Haemmerli, 1984). Die Migration von Tumorzellen erfordert sowohl proteolytische Eigenschaften (Wolf et al., 2003; Bausbaum et al., 1999) als auch die adhäsive Interaktion der Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix, vermittelt durch ein dynamisches Aktinzytoskelett.

1.2. Bedeutung des Aktinzytoskeletts für die Zellmigration

Das Zytoskelett eukaryontischer Zellen besteht aus Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Das Aktinzytoskelett spielt eine wichtige Rolle für die Formgebung der Zelle und für die Zellmigration (Small et al., 1994 a, 1994 b; Lauffenburg und Horwitz, 1996; Mitchison und Cramer, 1996). Die Dynamik und Kraftentfaltung des Aktinzytoskelett wird hierbei durch einen Zyklus aus Polymerisation zu Aktinfilamenten und deren Depolymerisation aufrechterhalten (Pollard and Higgs, 2001; Pollard and Borisy, 2003).

1.2.1. Grundlagen der Aktinpolymerisation und Depolymerisation

Grundbaustein des Aktinzytoskeletts ist das monomere G-Aktin, das in einer Head-to-Tail-Richtung zu helikalen F-Aktinfilamenten polymerisiert (Wegner et al., 1976; Pollard und Moosejer, 1981; Holmes et al., 1990). Viele Zellen besitzen einen großen

Pool an G-Aktin, der ihnen in Antwort auf Umgebungsreize eine schnelle Reorganisation des Aktinzytoskeletts ermöglicht. G-Aktin liegt zunächst gebunden an Thymosin im Zytosol der Zellen vor. Nach Bindung an Profilin, ein aktinbindendes Transportprotein, werden die G-Aktin-Monomere zum Ort der Polymerisation transportiert. Die Aktinpolymerisation beginnt mit der Aneinanderlagerung und nachfolgender Verbindung dreier Aktinmonomere, katalysiert durch den Arp2/3-Komplex (Arp = actin related proteins), ein membranaher Signalkomplex, der durch Aktivierung von Rezeptoren für Chemokine oder Wachstumsfaktoren aktiviert wird. Weitere Aktinmonomere werden am Plusende der wachsenden Aktinfilamente mit Unterstützung von Arp2/3 und VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein), ein aktinbindendes Adaptorprotein, das Aktinmonomere interkalieren lässt, angelagert, so dass die Filamentlänge zunimmt. Am gegenüberliegenden Minusende findet gleichzeitig eine Depolymerisation, d.h. Ablösung einzelner G-Aktin Monomere und stufenweiser Abbau des Aktinfilaments statt. Die Sequenz auf Polymerisation (an einem Ende) und Depolymerisation (am anderen Ende) wird als „Treadmilling“ bezeichnet. Viele aktinbindende Proteine regulieren diesen Prozess (Tab. 1). Länger bestehende Aktinfilamente werden von Cofilin durch seitliches Zerschneiden depolymerisiert, was die Umsatzrate des Aktins erhöht. Polymerisierte Aktinfilamente formieren sich zu parallelen Bündeln oder als gelartiges Netz durch den Einbau von Aktin-vernetzenden Proteinen. Aktinfilamente werden an ihrer Seite durch α -Actinin zu einem lockeren Verband und durch Fimbrin zu festen parallelen Bündeln und Strängen vernetzt. Durch Fimbrin verbundene Aktinfilamente finden sich insbesondere in kurzen fingerförmigen Zellfortsätzen („Filopodien“). Auf ähnliche Weise vernetzt Fascin parallele Aktinbündel miteinander. Die das gelartige Netz bildenden Aktinfilamente werden paarweise V-förmig durch Filamin verknüpft (Alberts et al., 2004; Pollard und Borisy, 2003). Zwischen mit α -Actinin lose verbundenen Aktinfilamenten schiebt sich das Motorprotein Myosin II, das eine feste Vernetzung und Verkürzung paralleler Fasern und so die Ausbildung kontraktile Bündel ermöglicht, den sogenannten Stressfasern.

Tabelle 1: Biologische Funktion ausgewählter aktinbindender Proteine

aktinbindendes Protein	Funktion
Thymosin	Speicherprotein für monomeres Aktin
Profilin	Transportprotein für monomeres Aktin
Arp2/3-Komplex	Unterstützung der Nukleation von Aktinmonomeren
VASP	Interkalieren von Aktinmonomeren an Aktinfilamente
Fimbrin	feste Verbindung paralleler Aktinfilamente
α -Actinin	lose Verbindung paralleler Aktinfilamente
Filamin	V-förmige Verklammerung zweier Aktinfilamente
Cofilin	Zerschneiden der Aktinfilamente

Die Aktinpolymerisation und Depolymerisation können durch pharmakologische Inhibitoren charakteristisch blockiert werden (Abb. 1). Cytochalasin D bindet an das Plusende polymerisierter Aktinfilamente und verhindert so deren weitere Polymerisation (Ballestrem et al., 1998). Latrunculin B bindet monomere Aktinuntereinheiten und hemmt so die Neubildung von Aktinfilamenten (Morton et al., 2000). Jasplakinolide und Phalloidin lagern sich an der Seite bestehender Aktinfilamente an und stabilisieren diese, wodurch die Polymerisation gefördert und die Depolymerisation unmöglich wird (Bubb et al., 1994; Bubb et al., 2000; Senderowicz et al., 1995; Cooper et al., 1987; Dancker et al., 1975).

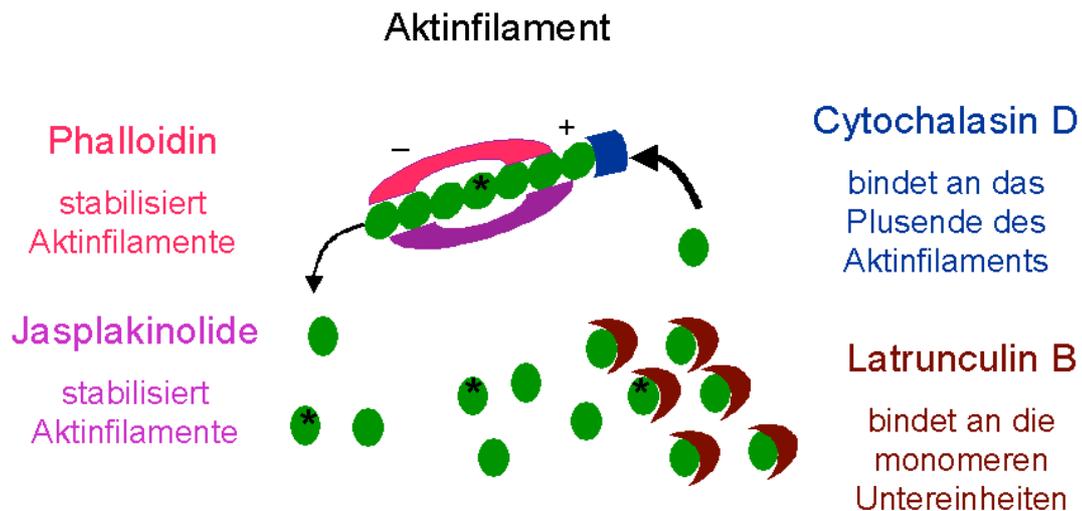


Abbildung 1: Polymerisation und Depolymerisation der Aktinfilamente wird durch Inhibitoren des Aktinzytoskeletts charakteristisch verhindert. +, Plusende; –, Minusende; *, monomere Aktinuntereinheiten.

1.2.2. Aktin und Adhäsionskomplexe

In migrierenden Zellen wird das Aktinzytoskelett über Adapterproteine und Adhäsionsmoleküle der Integrinfamilie punktuell und temporär an die extrazelluläre Umgebung gekoppelt (Shouchun et al., 2000; Wehrle-Haller et al., 2003, Friedl and Wolf, 2003).

Integrine sind transmembranäre Glykoproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen. Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit besitzt eine große globuläre extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre, zytosolische Schwanzregion (Alberts et al., 2004; Arroyo et al., 1992) Bisher sind 9 verschiedene β - und 14 α -Untereinheiten bekannt, die durch Kombination 20 verschiedene Integrinheterodimere bilden können (Alberts et al., 2004). Die Kombination aus α - und β -Kette ist dabei entscheidend, welche Moleküle der extrazellulären Umgebung bevorzugt gebunden werden. So binden z.B. $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin und $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin Fibronectin (Curkierman et al., 2001; Wu et al., 1992), $\alpha 6 \beta 1$ -Integrin und $\alpha 4 \beta 1$ -Laminin (Hangan et al., 1997) und $\alpha 2 \beta 1$ -Integrin fibrilläres Typ I Kollagen (Maaser et al., 1999, Klein et al., 1991).

Neben der Bindung extrazellulärer Liganden vermitteln Integrine die Signaltransduktion zwischen extrazellulärer Umgebung und Zellinnerem in beide Richtungen.

Intrazelluläre Signale, die z.B. durch den Einfluss von Chemokinen oder Wachstumsfaktoren entstehen, bestimmen die Aktivität der Integrinbindung an die extrazellulären Moleküle (Hynes et al., 2000; Wehrle-Haller et al., 2003). Dies wird als „In-Out-Signaling“ bezeichnet. Das „Out-In-Signaling“ dagegen beschreibt die Erzeugung und Transduktion von Signalen in die Zelle nach Bindung der Integrine an die extrazellulären Liganden (Shouchun et al., 2000).

Als Integrin-bindende Adapterproteine vermitteln Signalproteine, wie z.B. fokale Adhäsionskinase (FAK), Phosphoinositolphosphate (PIP), kleine GTPasen (Rac, Cdc42, Rho, Ras) die Signaltransduktion (Friedl und Wolf, 2003) während aktinbindende Proteine, z.B. Vinculin, Paxillin, Talin und α -Actinin den zyttoplasmatischen Teil der Integrin β -Kette mit dem Aktinzytoskelett direkt oder indirekt verbinden, wiederum reguliert durch Signalproteine (Shouhun et al., 2000, Friedl und Wolf, 2003).

1.2.3. Organisation des Aktinzytoskeletts in stationären und wandernden Zellen

Abhängig vom Funktionszustand der Zelle oder umschriebener Zonen innerhalb der Zelle sind Aktinfilamente unterschiedlich und charakteristisch organisiert:

- Netzartig angeordnete Aktinfilamente, paarweise verbunden durch Filamin, bestimmen direkt unter der Zellmembran als kortikales Aktin die Zellform, interagieren mit Integrinen und Signalmolekülen und können schnell umgebaut werden.
- Ruffles sind kurzlebige Membranausstülpungen, die filamentäres Aktin enthalten und an der Vorderfront der Zelle gebildet werden. Sie werden entweder wieder eingezogen oder wachsen aus zu breiten Lamellipodien oder kurzen fingerförmigen Filopodien.
- Lamellipodien sind flache, breite, schleierartige Membranausstülpungen, die polymerisiertes Aktin enthalten und an der Vorderfront einer auf einer 2D planen Oberfläche wandernden Zelle über das Substrat gleiten. Sie sind eine 2D-Variante der in 3D vorkommenden Pseudopodien (Friedl und Wolf, 2003).
- Filopodien sind fingerähnliche langlebige dynamische Aktinausstülpungen mit parallelen Aktinfilamenten, quervernetzt durch Fascin (Pinkus et al., 2002), die z.B. in dendritischen Zellen bis zu 50 μm lang werden können, und auch bei Tumorzellen vorkommen (Friedl und Wolf, 2003; Adams et al. 2001; Adams et al., 2002).
- Pseudopodien sind fingerähnliche, polymerisiertes Aktin enthaltende Membranausstülpungen, die die Zelle ausstreckt und wieder einzieht. Sie sind dicker als

Filopodien. Sie werden als Invadopodien bezeichnet, wenn sie in die sie umgebende, proteolytisch aufgelöste Matrix eindringen (Friedl und Wolf, 2003).

- Fokale Komplexe sind kleine punktförmige temporäre Haftstrukturen der Zelle mit der extrazellulären Matrix, die Integrine, fokale Adhäsionskinase (FAK) und Talin enthalten. Sie interagieren mit dem diffusen filamentösen Aktinnetz, das sich in einer hohen Umsatzrate befindet, können sich innerhalb von Sekunden bis Minuten wieder auflösen oder stabilere fokale Kontakte (Synonym: fokale Adhäsionen) ausbilden.

- Fokale Adhäsionen sind stabile Zell-Substrat-Interaktionen, die über Minuten und Stunden persistieren und Integrine, FAK, Talin, Vinculin, Paxillin und bis zu 50 weitere Proteine enthalten, die mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind. Sie bieten somit Ansatzpunkte für organisierte Aktinfilamente und somit für eine stabile Adhäsion der Zelle an die extrazelluläre Umgebung.

Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts hängen sowohl von der Ausprägung fokaler Adhäsionen als auch von der Umgebungsstruktur ab. Bei immobilen und langsam wandernden Zellen auf 2D Substraten lagern sich Stressfasern aus parallelen Aktinfilamenten zwischen räumlich entfernte fokale Adhäsionen. Sie ziehen durch das Zytoplasma hindurch und bewirken eine weniger dynamische, kontraktile Verankerung der Zelle auf dem Untergrund. Zu Beginn der Zellmigration bildet die Zelle auf 2D Substraten eine breite flache Membranausstülpung, eine Lamelle, die polymerisierte Aktinfilamente enthält. Darin eingelagert finden sich in unterschiedlicher Zahl und Anordnung kleinere Pseudopodien, Filopodien und in einigen Zelltypen Dendriten (Wehrle-Haller et al., 1998; Adams et al., 2001).

In 3D extrazellulärer Matrix zeigt sich eine bipolare, spindelförmige, mesenchymale Zellform, die bisher vorwiegend bei Fibroblasten und Tumorzellen beobachtet wurde (Friedl et al., 1998; Maaser et al., 1999). Bipolare Zellen sind nach Ausbildung eines dicken Pseudopods an der Vorderfront und gleichzeitig am Hinterende stationär (Petroll et al, 2003). Erst nach Übergang in eine Spindelform mit einem dicken Pseudopod in Migrationsrichtung können sie wandern (Friedl und Bröcker, 2000; Friedl und Wolf, 2003). Fibroblasten bilden zusätzlich in einer weitmaschigen 3D extrazellulären Umgebung eine dendritische Zellform aus (Grinnell et al., 2003).

Sowohl der Lamelle auf 2D als auch den Dendriten korrespondiert in kompakten 3D Substraten eine zylindrische fingerähnliche Ausstülpung, die als Pseudopod bezeichnet

wird und sowohl ausgestreckt als auch wieder eingezogen werden kann. Trotz gemeinsamer Mechanismen der Regulation des Aktinzytoskeletts in den Zellen resultiert eine unterschiedliche Zellform in Abhängigkeit von der Dichte der extrazellulären Matrix. Weiterhin scheinen Unterschiede in der Struktur des Aktinzytoskeletts in Abhängigkeit von der 2- bzw. 3-Dimensionalität der Umgebungsstruktur vorzuliegen.

1.3. Die extrazelluläre Matrix

Die Struktur zwischen den Zellen eines multizellulären Organismus wird als extrazelluläre Matrix bezeichnet. Sie ermöglicht als mechanisches Gerüst den Zusammenhalt der Zellen, gibt Geweben und Organen ihre charakteristische Form und Elastizität und dient mit ihren interstitiellen flüssigen Bestandteilen als Transportmedium von Nährstoffen und löslichen Signalmolekülen, wie Hormone und Zytokine. Die Bestandteile der extrazellulären Matrix werden vorwiegend von Bindegewebszellen, den Fibroblasten, aber auch von Zellen des jeweiligen Organs selbst gebildet. Das Strukturprotein Kollagen ist neben Elastin, Proteoglykanen und Fibronectin der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Fibrilläres Kollagen interstitieller Gewebe wird von 5 verschiedenen modifizierten Kollagen-Monomeren gebildet. Typ I-Kollagen ist Bestandteil von Haut, Knochen, Sehnen und Cornea; Typ II-Kollagen bildet Knorpel, Bandscheiben und Glaskörper; Typ III-Kollagen findet sich in fetaler Haut, Herz-Kreislauf-System und Retikulinfasern. Typ V-Kollagen bildet Placenta und Haut. Heute sind 20 verschiedene Kollagene bekannt. Kollagen Typ I, II, III, V und XI bilden Fibrillen (Alberts et al., 2004). Diese Kollagentypen unterscheiden sich durch eine leichte Modifikation der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Polypeptidketten des Tropokollagens sowie in ihrer Kombination zur Bildung des Tropokollagenmoleküls. Die einheitliche Grundstruktur der Kollagenfaser ist jedoch immer das stabförmige Tropokollagenmolekül, das aus 3 umeinander gewundenen helikalen Polypeptidketten besteht. Die Kollagenfasern sind aus gestaffelt angeordneten Tropokollagenmonomeren mit einem Zwischenraum von 40 nm aufgebaut und werden durch Quervernetzung verstärkt. Vorstufe des Tropokollagenmoleküls ist das Prokollagenmolekül, das von Fibroblasten durch Polypeptidsynthese, Hydroxylierung, Glykosylierung und Bildung der Tripelhelix hergestellt und sezerniert wird. Außerhalb der Zelle wird Prokollagen

durch Abtrennung des aminoterminalen Propeptids und des carboxyterminalen Propeptids in Tropokollagen umgewandelt. Durch Zusammenlagerung der Tropokollagenmoleküle und anschließender Quervernetzung entstehen nahe der Zelloberfläche Kollagenfasern.

Diese Kollagenfasern bilden, zufällig angeordnet, ein dreidimensionales Netzwerk mit verschiedenen großen Lücken und bieten den Fibroblasten oder Immunzellen Angriffspunkte bei der Passage der Gewebe und Organe (Friedl et al., 1998; Friedl et al. 2003). Die wandernden Zellen interagieren mit den Kollagenfasern, schlüpfen durch die Maschen hindurch oder deformieren die Matrix durch mechanische Übertragung von Kraft (Petroll et al., 2003) oder proteolytischen Umbau (Friedl und Wolf, 2003).

Weitere, für diese Arbeit nicht direkt relevante, jedoch in anderen Migrationsstudien angewandte ECM-Moleküle sind folgend kurz erwähnt. Elastin ist ein gummiartiges in 2 Dimensionen dehnbares Protein in elastischen Fasern, das in den meisten Bindegeweben zusammen mit Kollagen und Polysacchariden vorkommt. Es ist reichhaltig in Wänden von Blutgefäßen, im Aortenbogen und in Bändern vorhanden.

Die Grundsubstanz des Bindegewebes besteht aus Proteoglykanen, deren Untereinheiten 95% Polysaccharide und 5% Proteine enthalten. Sie sind Polyanionen, binden Wasser und Kationen und ermöglichen die viskoelastischen Eigenschaften von Gelenken, die mechanischer Deformation ausgesetzt sind. Zu den wichtigsten Glykosaminoglykanen, den Seitenketten der Proteoglykane, die als Aminozucker entweder Glucosamin oder Galactosamin enthalten, gehören Hyaluronat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Heparansulfat und Heparin.

Fibronectin und Laminin sind adhäsive Glykoproteine der extrazellulären Matrix. Fibronectin ermöglicht als Zelloberflächenprotein die Wechselwirkungen der Zellen mit der extrazellulären Matrix und fördert durch gleichzeitige Bindung von Integrin mit der Zellbindungsregion und Kollagen mit einer anderen Domäne desselben Fibronectinmoleküls die Wanderung von Zellen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung von Blutgerinnseln nach Reparatur verletzter Gewebe.

Die Mehrheit dieser ECM Proteine werden in monomerer oder polymerisierter Form für Adhäsions- und Migrationsstudien eingesetzt. Auf 2D Glasobjektträgern, die mit Kollagen (Yamada et al., 1990.; Klein et al., 1991; Danen et al., 1993), Laminin (Nakagawa et al., 2003), Hyaluronsäure (Thomas et al., 1992; Goebeler et al., 1996)

oder Fibronectin (Ballestrem et al., 1998) beschichtet sind, wurde die Wanderung verschiedener Tumorzellen untersucht. Mit Komponenten der extrazellulären Matrix beschichtete 2D Oberflächen bieten für in vitro Studien ein gutes Substrat, enthalten jedoch nicht polymerisierte Liganden, so dass die Übertragbarkeit auf in vivo Situationen unklar ist. (Friedl und Bröcker, 2000).

Um die 3D interstitielle Struktur zu berücksichtigen, wurden Kollagenmatrices als Substrat migrierender Lymphozyten (Friedl und Bröcker, 2000; Friedl, Zänker, Bröcker, 1998; Friedl, Noble, Zänker, 1993) und Tumorzellen (Friedl, Zänker, Bröcker, 1998) eingesetzt. Am Beispiel von B16/F1 GFP-Aktin Zellen soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss einer extrazellulären Kollagenumgebung auf Zellmigration, Zellform und der ihr zugrunde liegenden Aktinstruktur untersucht werden.

1.4. Grundlagen und Konzepte zur Zellmigration

Malignität und Invasivität von Tumorzellen im Organismus werden u.a. durch ihre Fähigkeit zur aktiven Zellmigration verursacht und gefördert (Friedl und Wolf, 2003). Einzelne wandernde Tumorzellen wurden in vitro auf 2D beschichteten Oberflächen sowie in 3D Substraten beobachtet und die zugrunde liegenden Mechanismen genauer analysiert. Lauffenburger und Horwitz etablierten 1996 ein 3-Stufen-Modell zur Migration von Tumorzellen auf 2D proteinbeschichteten Oberflächen (Lauffenburger und Horwitz, 1996): (1) Der Integrin-vermittelten Kontaktaufnahme und Adhäsion zum Substrat folgt die Ausbildung fokaler Kontakte und Formierung von Filopodien, Pseudopodien und Lamellen an der Vorderfront; (2) durch Aktin-vermittelte Spannung innerhalb des Zellkörpers entsteht ein Zug zwischen Vorderfront und Hinterende der Zelle, der (3) infolge Retraktion des Hinterendes zu einer örtlichen Auflösung bzw. zu einem langsamen Gleiten fokaler Adhäsionen führt und den Zellkörper vorwärts bewegt (Regen und Horwitz, 1992).

Für eine erfolgreiche Zellmigration ist eine zyklische Wiederholung dieser 3 Stufen erforderlich. Optimale Migrationsraten werden bei einer mittleren Adhäsionsstärke zum Substrat erreicht (Huttenlocher et al., 1995), während hohe oder sehr niedrige Substratkonzentrationen die Migrationseffizienz reduzieren. Dieses haptokinetische Migrationsmodell auf 2D planen Oberflächen betont die Adhäsion als Voraussetzung und als den die Zellmigration limitierenden Faktor (Friedl und Bröcker, 2000). Um die

Zellmigration in 3D Umgebungen besser abzubilden, erweiterten Friedl und Wolf dieses für 2D Oberflächen etablierte Modell zu einem 5-Schritt-Modell (Friedl und Wolf, 2003). Die Migration beginnt mit einer durch intrazelluläre Aktinpolymerisation verursachten Zellpolarisierung (1) mit der Extension von Membran-Ruffles oder Pseudopodien, die die extrazelluläre Matrix berühren und dadurch zur Bindung von Integrinen führen. Der so hergestellte Zell-Matrix-Kontakt bewirkt die Rekrutierung weiterer Adhäsionsmoleküle, zytoplasmatischer Adapter- und Signalproteine, die sich mit dem Aktinzytoskelett verbinden und eine lokale Aktinpolymerisation induzieren (2). An den entstandenen fokalen Zell-Substrat-Interaktionen kommt es nachfolgend zur Ansammlung von Oberflächenproteasen, sogenannten Matrixproteasen, die angrenzende Proteine der extrazellulären Matrix wie z.B. Kollagen proteolytisch spalten und Platz für den Zellkörper schaffen (3). Während und kurz nach der Integrin-Ligand-Bindung verknüpfen sich die Aktinfilamente sowohl mit Adapterproteinen als auch mit quervernetzenden und kontraktile Proteinen wie Myosin II, das die polymerisierten Aktinfilamente stabilisiert und kontrahiert (4). Die Verkürzung der membrangebunden Aktinfilamente erzeugt so eine lokale Zellkontraktion mit Retraktion des Hinterendes und Vorwärtsbewegung des Zellkörpers einschließlich Zellkern in Richtung Vorderfront (5). Dieser Mechanismus läuft bei der Zellmigration wie das haptokinetische Migrationsmodell zyklisch und kontinuierlich ab, wobei auch hier die Adhäsionsstärke der Zelle an den Kollagenfasern und ihre Interaktion mit den Kollagenfasern die Migrationsgeschwindigkeit bestimmen (Friedl und Wolf, 2003). Diese Form der Migration wurde für Fibroblasten und viele Tumorzellen beschrieben. Sie führt zu einer länglichen Zellform, Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix, und wird als „mesenchymale“ Migration bezeichnet. Petroll bestätigte die Schritte 1 und 2 dieses Migrationsmodells bei der Interaktion von Fibroblasten mit den Kollagenfasern, jedoch ohne nachfolgende Zellmigration zu beobachten (Petroll et al., 2003; Petroll et al., 2004).

Alle bisherigen Migrationsmodelle implizieren, dass eine Zelle ein spezifisches Repertoire an Form und Zytoskelettdynamik mit sich bringt. Es ist jedoch unklar in welchem Ausmaß sich die Umgebungsstruktur instruktiv auf Form und Migrationsart auswirkt.

1.5. Das Grüne-Fluoreszenz-Protein (GFP) als Marker molekularer Strukturen

Um molekulare Prozesse, wie Aktin Polymerisation und Depolymerisation in lebenden Zellen direkt zu beobachten, werden seit einigen Jahren fluoreszente Fusionsproteine eingesetzt. Das grüne Fluoreszenzprotein GFP stammt aus der Qualle *Aequoria victoria* und dient wegen seiner Fähigkeit nach Anregung grünes Licht zu emittieren für eine Vielzahl von Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von Proteinen. Mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen wurden z.B. Bestandteile des Zytoskeletts wie Myosin, Coronin, Tubulin und Aktin (Wehrle-Haller et al., 1998) visualisiert, Sekretionswege und Rezeptoren untersucht, z.B. die Sekretion von Vesikeln aus dem Golgi-Apparat.

Mittels Expression eines GFP-Aktin Fusionsproteins wurde die Bewegung von kortikalem Aktin in Hefezellen (Doyle et al., 1996) oder die Aktindynamik bei der Wanderung von *Dictyostelium discoideum* (Westphal et al., 1997) untersucht. 1998 gelang erstmals die Herstellung eines GFP-Aktin-Fusionsproteins, das in Säugetierzellen exprimiert wurde (Ballestrem und Wehrle-Haller, 1998; vgl. 2.2.). Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) wurde mit humanem β -Aktin fusioniert, und die kodierenden DNA- Sequenzen (human β -Aktin promotor, eGFP, Linkersequenz, human β -Aktin) wurden in Form von Plasmiden in B16/F1 Mausmelanomzellen, 3T3 Fibroblasten und in CHO Hamsterovarzellen eingebracht. Dieses Konstrukt, das von Zellen auf physiologischem Niveau exprimiert wurde, ermöglichte die Visualisierung der Dynamik des Aktinzytoskeletts besonders bei der Ausbildung der für die Zellmigration erforderlichen Aktinprotrusionen. Weder Aktinpolymerisation noch Aktindepolymerisation wurden durch das eGFP-Konstrukt beeinträchtigt (Wehrle-Haller et al., 1998).

Ballestrem und Wehrle-Haller führten ihre Aktinstudien vorwiegend auf unphysiologischen, jedoch einfach zu handhabenden zweidimensionalen mit Laminin und Fibronectin beschichteten Oberflächen durch (Wehrle-Haller et al., 1998; Ballestrem et al., 2000). Diese adhäsiven Glykoproteine sind aber nur Minorbestandteile der extrazellulären Matrix *in vivo*, der Hauptbestandteil ist das Kollagen. Um bisherige Erkenntnisse auf *in vivo* Situationen anwenden zu können, sollte daher im Rahmen dieser Arbeit die Struktur des Aktinzytoskeletts in verschiedenen kollagenhaltigen Umgebungen untersucht werden.

1.6. Studien zur Kraftübertragung durch Zellen auf die extrazelluläre Umgebung

Es existieren Studien zu Geschwindigkeit und Mobilität wandernder Tumorzellen auf 2D Substraten bzw. in 3D Umgebungen, analysiert mit Hilfe digitaler Zeitraffer-Videomikroskopie und dem Computer assistierten Zelltracking (Friedl et al., 1993; Friedl und Bröcker, 2004).

Für die Darstellung der extrazellulären Matrix (Friedl und Bröcker, 2001) und der an der Migration beteiligten molekularen Zellstrukturen mit dem Konfokalmikroskop werden der Reflexionskontrast und die Immunfluoreszenz eingesetzt (Ballestrem and Wehrle-Haller, 2000; Friedl et al., 2004).

Vereinzelt existieren Studien zur aktiven Interaktion von lebenden Zellen mit der extrazellulären Umgebung auf 2D planen, mit Silikon oder Kollagen beschichteten Oberflächen (Harris et al., 1980; Petroll et al., 2003) und in 3D Matrices (Petroll et al., 2004; Friedl und Bröcker, 2004). Petroll beschäftigt sich mit dem dynamischen Auf- und Umbau fokaler Adhäsionen bei Fibroblasten im 3D Kollagengel, dargestellt mittels GFP-Zyxin (Petroll et al., 2004). Seine Befunde zeigen, wie lebende Fibroblasten über fokale Adhäsionen aktiv an den Kollagenfasern der extrazellulären Umgebung ziehen und sie strukturell verdichten. Nach Zellyse sowie unter Einsatz von Cytochalasin D kommt es durch Relaxation der Kollagenfasern zur Aufhebung der Krafteinwirkung der Fibroblasten. Nach Darstellung des F-Aktins mit Phalloidin, besonders an fokalen Kontakten, vermutet Petroll eine direkte Beteiligung des Aktinzytoskeletts am Auf- und Umbau fokaler Adhäsionen und am Zug der Fibroblasten an den Kollagenfasern (Petroll et al., 2004). Die Limitierung der Arbeiten von Petroll besteht jedoch darin, dass sie zwar Vektoren zeigen, die aber nicht zeitlich aufgelöst sind und somit keine schrittweise Traktion-Relaxation-Darstellung ermöglichen. Anknüpfend an Petrolls Untersuchungen wurde in dieser Arbeit versucht, die aktive, dynamische Interaktion des Aktinzytoskeletts über matrixabhängige, charakteristische Aktinstrukturen wandernder Tumorzellen auf 2D sowie in 3D Kollagenumgebungen konfokalmikroskopisch, zeitlich aufgelöst darzustellen (vgl. 3.9.) und bildanalytisch zu quantifizieren.

1.7. Ziele der Experimente

Die Invasion und Migration von Tumorzellen erfordert adhäsive Interaktionen mit der extrazellulären Umgebung, die durch das Aktinzytoskelett getragen werden. Mit Hilfe von Zeitraffer-Videomikroskopie und Zeitraffer-Konfokalmikroskopie sollten B16/F1 Mausmelanomzellen, die GFP-Aktin exprimierten, auf Morphologie und Migrationsdynamik sowie die Struktur des Aktinzytoskeletts untersucht werden. Folgende spezifische Fragen sollten dabei geklärt werden:

1. Lässt sich für B16/F1 GFP-Aktin Zellen ein Standard-Aktinzytoskelett beschreiben oder handelt es sich um eine anpassungsfähige, plastische Struktur?
2. Wie beeinflusst die extrazelluläre Umgebung die Struktur des Aktinzytoskeletts und damit Art und Effizienz der Migration?
3. In welchen Zellregionen überträgt das Aktinzytoskelett Kraft auf extrazelluläre Kollagenfasern?

Hierzu sollten unterschiedliche Kollagenumgebungen konstruiert werden, um kontrollierte 2D und 3D Migrationsbedingungen zu schaffen. Mittels dynamischer Bildgebung sollten zeitgleich Struktur des Aktinzytoskeletts und Struktur der extrazellulären Matrix visualisiert werden. Da im Verlauf der Arbeit neue Erkenntnisse der Kraftübertragung von Zell-Matrix-Interaktionen erzielt wurden, sollte ein Verfahren der semiquantitativen digitalen Bildanalyse etabliert werden, das geeignet ist, Zellform, Aktindynamik, Kraftübertragung auf die ECM sowie Migrationseffizienz im Zusammenhang darzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

murine B16/F1 GFP-Aktin Zellen (mäßig invasiv)	Bernhard Wehrle-Haller, Pathologisches Institut, Universität Genf, Schweiz (Ballestrem and Wehrle-Haller, 1998)
humane MV3 Zellen (hochinvasiv)	G. van Muijen, Universität Nijmegen, Niederlande (G. van Muijen et al., 1991)

2.1.2. Antikörper

Maus anti-human β 1-Integrin mAK (IgG1), nicht blockierend, Klon K20	Coulter, Immunotech, Krefeld, Deutschland
Maus anti-human β 1-Integrin mAK (IgG1), blockierend, Klon 4B4	Coulter, Immunotech, Krefeld, Deutschland
Maus anti-human Fascin mAK (IgG1), Klon 55K-2	Dako, Hamburg, Deutschland
Kaninchen anti-Maus VASP mAK (IgG1), Klon IG 731	Immunoglobine, Himmelstadt, Deutschland
Cy3 Ziege anti-Maus F(ab) ²	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy5 Esel anti-Ziege F(ab) ²	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alexa 546 Ziege anti-Maus F(ab) ²	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Phalloidin-Alexa 488	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Phalloidin-Alexa 568	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

2.1.3. Inhibitoren des Aktinzytoskeletts

Cytochalasin D	Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
Jasplakinolide	Molecular Probes, Göttingen, Deutschland
Latrunculin B	Calbiochem, Bad Soden, Schwalbach, Deutschland

2.1.4. Geräte

FACScan	Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland
3D Zeitraffer Konfokal-Laser-Mikroskop	Leica-SP2 System, Leica, Heidelberg, Deutschland
inverse Lichtmikroskope DM-IL	Leica, Heidelberg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Rotlicht	Phillips, Hamburg, Deutschland
Statop 4849 Temperaturmessgerät	Chauvin-Arnoux, Kehl, Deutschland
Tracking-Computer	Mac IIcv und Mac Quadra (Macintosh)
VPC-175 Videokamera	Sony, Berlin, CCD-Kamera
Videokamera digital	Topica TP-505
Zeitraffer-Videorecorder JVC BR S 920 E und SR-970E, Time lapse, Video Kassette	Recorder; JVC, Friedberg, Deutschland
Heraeus Sepatech Zentrifuge	Chemievermittlung, Ebersberg, Deutschland

2.1.5. Materialien, Puffer, Reagenzien

7,5 % Natrium-Bikarbonat-Lösung	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
bovines Typ I Collagen	Vitrogen; Nutacon BV, Leimniden, Niederlande
BSA (Rinderserumalbumin)	Aurion; Immuno Gold Reagents, Wageningen, Niederlande
Collagenase I	Clostridium histolyticum; Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
2 mM EDTA-Lösung	Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
FCS (fetales Serumalbumin)	Biowhittaker, Verwievrs, Belgien
G 418	Genitacin; Oncogene, Deutschland
MEM (minimal essential eagle's medium)	Flow Laboratories, McLean, USA
Methanol	Klinikapotheke, Universitätsklinik Würzburg
Paraffin und Vaseline	Tissue Prep; Fisher, Fair Lawn, NJ, USA

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin, Streptomycin	PAN, Heidenheim, Deutschland
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma, Taufenkirchen Deutschland
PI (Propidiumiodid)	Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
RPMI 1640 Zellkulturmedium	PAN, Heidenheim, Deutschland
Triton-X-100	Sigma, Taufenkirchen, Deutschland
Trypanblau-Lösung	ICN, Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland
Ziegenserum	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.1.6. Software

Adobe Photoshop 6.0	Adobe System 1989-2000, Tasakawa, Japan
digitizing tablet	Summasketch II, Summgrafics, Seymor, USA
Hyper-Card-Programm	Mac Ilcv und Mac Quaddra (Macintosh), USA
Image Grabbing Software, ISCAP-Software	Johannes Vogel, Universität Bremen, Deutschland
Image J 1.30v	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
Leica-Software, Leica-SP2 System	Heidelberg, Deutschland
Microsoft-Office 2000 mit Word, Excel, Powerpoint	Microsoft, Redmond, USA
Quick Time 4.1.2.	Apple, Roland Corporation, Osaka, Japan
Statistika 6.0	StatSoft
Zelltracking-Software	Bernd Niggemann, Institut für Immunologie, Universität Witten-Herdecke, Witten, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Zelllinien und Zellkultur

Murine B16/F1 GFP-Aktin Zellen wurden von Bernhard Wehrle-Haller (Pathologisches Institut, Universität Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die Originalzelllinie heißt B16/F1 und wurde von G. Nicholson (Houston, TX, USA) aus Nacktmäusen gezüchtet. Die Zellen exprimieren ein Fusionsprotein aus humanem β -Aktin und enhanced Green Fluoreszenz Protein (eGFP) unter Kontrolle des β -Aktin Promotors (Ballestam und Wehrle-Haller, 1998). Aktin/eGFP entspricht strukturell und funktionell Wildtyp-Aktin ohne Einschränkungen physiologischer Prozesse (Ballestam und Wehrle-Haller, 1998).

Die hochinvasive und metastasierende humane Melanomzelllinie MV3 (Van Muijen et al. 1991) wurde von G. Van Muijen (Universität of Nijmegen, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Nach Transplantation in eine Nacktmaus entwickelten sich Lymphknotenmetastasen. Die MV3-Zellen werden nach der dritten Passage kultiviert (Van Muijen et al., 1991). Sie exprimieren $\alpha 2\beta 1$ - und $\alpha 3\beta 1$ -Integrine für die Interaktion mit Typ I Kollagen (Danen et al., 1993).

Beide adherente Zelllinien wurden in RPMI 1640 Medium, das 50 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin (PAN) und 10 % hitzeinaktiviertes FCS sowie G 418 (1 mg/ml) enthielt, in einer humidifizierten 5 %igen CO₂-Atmosphäre und einer Temperatur von 37°C im Brutschrank kultiviert. Die Zellen erhielten nach 1-2 Tagen neues Medium und wurden bei subkonfluenter Zelldichte nach 2-4 Tagen durch Ablösung mit 2 mM EDTA Lösung passagiert. Für die Zellmigrationsversuche wurden die Zellen mit 2 mM EDTA Lösung bei 37°C für 5 min abgelöst, mit PBS gewaschen, im Medium suspendiert, gezählt und auf eine definierte Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.2.2. 2D und 3D Migrationsmodelle

Für Untersuchungen der Zellmigration wurde Typ I Kollagen in saurer Lösung (pH = 3) durch Neutralisation (pH = 7,4) mit Bikarbonat-Lösung zur Polymerisation gebracht. Für 3D fibrilläre Kollagenmatrices (Endkonzentration: 1,7 mg/ml) wurden 15 Teile Vitrogen, 2 Teile Minimal Essential Eagle's Medium und ein Teil Bikarbonat-Lösung eingesetzt.

Für 2D Migration über monomeres Kollagen wurden sterile Deckgläschen der Stärke 0 (22 x 22 mm) mit 200 µl flüssigem saurem Vitrogen (100 %) überschichtet und für 8 Stunden bei 4°C inkubiert, gewaschen und anschließend mit den Tumorzellen überschichtet (s.u.).

Für Zellmigration über 2D fibrilläres Kollagen wurden Deckgläschen mit 20 µl neutralem Kollagengemisch (pH = 7,4; Endkonzentration: 2,5 mg/ml) bestrichen und für 60 min bei 37°C im Inkubator in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre bis zur Polymerisation inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl Zellsuspension aufgegeben. Anschließend wurden die Deckgläschen auf Objektträgern mit zuvor aufgetragen Paraffinstegen an 3 Seiten fixiert, so dass eine dreidimensionale Kammer entstand, danach mit equilibriertem Medium (vorherige Inkubation für 1 h bei 37°C in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre) aufgefüllt und luftdicht mit Paraffin verschlossen.

Für Migrationsexperimente in 3D fibrillärem Kollagen (Friedl und Bröcker, 2004) wurden 100 µl einer Mischung aus einem Teil Kollagengemisch und 3 Teilen Zellsuspension in eine vorbereitete Migrationskammer (Volumen 200 µl) pipettiert. Nach Kollagenpolymerisation im Inkubator (30 min, 37°C, in einer 5 %igen CO₂-haltigen Atmosphäre) wurde die Kammer mit equilibriertem Medium (s.o.) aufgefüllt und mit Paraffin luftdicht verschlossen.

Für konfokalmikroskopische Untersuchungen von fixierten Zellen in 3D Kollagenmatrices wurden zellhaltige Kollagenlösungen (100 µl) auf Deckgläschen getropft und nach Polymerisation in 6-Loch-Platten im Inkubator (s.o.) mit equilibriertem Medium (s.o.) überschichtet. Diese wurden vor der Fixierung (vgl. 2.2.7.1.) 8-12 h im Inkubator kultiviert.

2.2.3. Blockade des Aktinzytoskeletts mit pharmakologischen Inhibitoren

Zur direkten Blockade des Aktinzytoskeletts wurden die lebenden Zellen ausschließlich in Zellsuspension-Kollagengemisch vor und während der 3D Migrationsversuche mit pharmakologischen Inhibitoren folgender Endkonzentrationen inkubiert.

Diese Endkonzentrationen wurden in Vorversuchen im 3D Kollagengel unter folgenden Kriterien ermittelt:

- Es sollte eine eindeutige Hemmung des Aktinzytoskeletts zu sehen sein, z.B. durch die Änderung der Morphologie der Zellen sowie eine eingeschränkte Migrationfähigkeit;

- Die Zellen durften durch den Inhibitor bzw. durch das Lösungsmittel nicht zur Apoptose gebracht werden. Die Viabilität wurde visuell und durchflusszytometrisch (vgl. 2.2.4.) geprüft. Toxische bzw. funktionsschädigende Effekte der Lösungsmittel wurden visuell anhand der Basismotilität zeitraffermikroskopisch geprüft.

Tabelle 2: Hemmstoffe und Konzentrationen bei Migrationsversuchen

	Stocklösung	Inhibitor für B16/F1 GFP-Aktin Zellen	Lösungsmittel für B16/F1 GFP-Aktin Zellen	Inhibitor MV3 Zellen	Lösungsmittel MV3 Zellen
Cytochalasin D	5 mM in DMSO und PBS	0,5 μ M	0,01 % DMSO	5 μ M	0,1 % DMSO
Latrunculin B	10 mM in DMSO und PBS	1 μ M	0,002 % DMSO	5 μ M	0,01 % DMSO
Jasplakinolide	70 μ M in Methanol und PBS	0,15 μ M	0,021 % Methanol	5 μ M	0,7 % Methanol

2.2.4. Messung der Viabilität der Zellen

Um sicher zu stellen, dass sowohl die etablierten Hemmstoffkonzentrationen als auch die lange Versuchsdauer von mehr als 20 Stunden keine zytotoxischen Effekte auf B16/F1 GFP-Aktin oder auf MV3 Zellen ausüben, wurden routinemäßig Zellmorphologie und Migrationsleistung sowie, einmalig, die Kernfärbung mit Propidiumiodid im Anschluss an einen Migrationsversuch durchgeführt. Dazu wurden 3D Kollagengele in An- und Abwesenheit von Lösungsmittel und Inhibitor für 20 Stunden inkubiert, anschließend in FACS-Röhrchen übergeführt und durch Collagenase I (*Clostridium histolyticum*) für 30 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert.

2.2.5. Digitale Hellfeld-Zeitraffermikroskopie

Die Wanderung der B16/F1 GFP-Aktin Zellen und der MV3 Zellen wurde mittels digitaler Zeitraffer-Durchlicht-Mikroskopie (Friedl und Bröcker et al., 2004) beobachtet.

Dazu wurden die Migrationskammern auf den Objektischen der Lichtmikroskope (inverse Mikroskope) fixiert und über einen Temperaturfühler mit einem Thermostat und einer Rotlichtlampe verbunden. Die Temperatur in den Migrationskammern wurde über die gesamte Versuchsdauer von ca. 20 Stunden bei 37°C gehalten.

Vom Gesichtsfeld (ca. 30-40 Zellen) wurden mit 10x oder 20x Vergrößerung im Abstand von 5 min digitale Durchlichtbilder mit einer CCD Camera fotografiert und mittels Image Grabbing Software gespeichert und zu digitalen Filmen mit Quick Time (vgl. 4.1.2.) umgewandelt. Bei einer Wiedergabe von 10 Bildern/Sekunde entsprach eine Sekunde Film einer Echtzeit von 50 min.

Anhand der Beobachtung der Zellen und Analyse der Filme der jeweiligen Kollagenumgebung wurden typische Zellmorphologien bestimmt: rund, unipolar, bipolar (spindelförmig, mesenchymal), multipolar (dreieckig), dendritisch (sternförmig, spinnenähnlich), und der wandernden bzw. der sessilen Zellgruppe zugeordnet.

2.2.6. Zelltracking und Datenanalyse

Das Filmmaterial wurde mit einem bereits für die Einzelzellwanderung etablierten Zelltrackingprogramm (Friedl et al., 1993) quantitativ ausgewertet. Dazu wurden die digitalen Filme auf Video überspielt und über Hypercard am Bildschirm eines PC sichtbar gemacht. Während des Filmes wurden 20-40 zufällig ausgewählte Zellen einzeln mit einem Mauscursor verfolgt. Das Trackingprogramm erfasste in Zeitabständen von 0,3 sec Film entsprechend, 15 min Echtzeit, die Lage der Einzelzelle in einem zweidimensionalen xy-Koordinatensystem. Die Pixelauflösung betrug bei 10facher Vergrößerung 1,47 µm, bei 20facher Vergrößerung 0,735 µm. Aus der zurückgelegten Strecke (s) und der dafür benötigten Zeit (t) berechnet das Programm nach der Formel $v = s/t$ die Geschwindigkeit (v) der Zellen. Speed ist die Durchschnittsgeschwindigkeit einer Zelle unter Berücksichtigung von Pausen. Velocity ist die absolute Geschwindigkeit der Zelle ohne Pausen. Weiterhin wurden die zurückgelegten Strecken (Distance) in µm für die gesamte Beobachtungszeit erfasst.

Die Verteilung der getrackten Zellen auf die einzelnen Geschwindigkeiten und der Anteil wandernder Zellen wurden mit Statistika 6.0 ermittelt und grafisch dargestellt.

Der prozentuale Anteil wandernder Zellen entspricht dem Anteil der Gesamtpopulation, der eine Translokation von wenigstens 1 Pixel/Analyseintervall zurücklegte. Die Durchschnittsgeschwindigkeit der Zellpopulation zu einem bestimmten Zeitpunkt (speed by time in $\mu\text{m}/\text{min}$) wird durch Berechnung des Mittelwertes (MW) aus der Momentangeschwindigkeit (v) aller getrackter Einzelzellen (n) nach der Formel $\text{MW} = (v_1 + v_2 + \dots + v_n)/n$ erfasst.

Es wurden alle Zellen, die während der Beobachtungszeit im Bild blieben und keiner Zellteilung unterlagen, analysiert. Nicht wandernde Zellen wurden getrackt, indem der Mauscursor bewegungslos über der Zellmitte gehalten wurde.

Für die statistischen Analysen wurden Student's t-Test für die Mittelwerte \pm Standardabweichung und der nicht parametrische Mann-Whitney U-Test für die Einzelzellauswertung verwendet.

2.2.7. Dynamische und statische Konfokalmikroskopie

Sowohl dynamische (lebende Proben) als auch statische (fixierte Proben) konfokalmikroskopische Studien wurden mit einem 3D Zeitraffer-Laser-Konfokalmikroskop (Leica-SP2 System) durchgeführt. Dieses Mikroskop ermöglicht die gleichzeitige Beobachtung von Transmission, konfokaler Reflexion und Fluoreszenz. Simultan detektiert wurden 2 Fluoreszenzkanäle, ein Reflexionskanal und ein Transmissionskanal. Unterschiedliche Fluoreszenzen bei derselben Probe wurden nach Umstellen des anregenden Lasers und des zu passierenden Filters getrennt aufgenommen. Nach 3D Rekonstruktion der Einzelschnitte der z-Ebenen (Projektion der maximalen Intensität) wurden sowohl Reflexion als auch Fluoreszenzen räumlich dargestellt. Durch Aufeinanderlegen der unterschiedlichen Fluoreszenzen und anschließender Kombination mit der Reflexion wurde die Interaktion der fluoreszenzmarkierten Moleküle mit den Kollagenfasern im Raum nach 3D Rekonstruktion bzw. bei Einzelschnitten auf einer Ebene dargestellt (Maaser et al., 1999).

In Tabelle 3 sind die verwendeten Fluoreszenzmarker mit entsprechender Exmissionswellenlänge des Lasers und Emissionsspektrum, sowie die damit dargestellten Moleküle bei B16/F1 GFP-Aktin Zellen und bei MV3 Zellen aufgeführt.

Tabelle 3: Fluoreszente Marker zur Darstellung molekularer Strukturen

Fluoreszenzmarker	Exmission	Emission	sichtbare Struktur	Zellen
EGFP	488 nm	510-550 nm	Aktin, grün	B16/F1 GFP-Aktin
Phalloidin-Alexa 488	488 nm	510-550 nm	Aktin, grün	MV3
Cy3 Ziege anti-Maus F(ab) ²	543 nm	560-590 nm	β1-Integrine, rot	MV3
Phalloidin-Alexa 568	543 nm	560-590 nm	Aktin, rot	B16/F1 GFP-Aktin
Alexa 546 Ziege anti-Maus F(ab) ²	543 nm	560-590 nm	Fascin, rot	B16/F1 GFP-Aktin
Cy5 Esel anti-Ziege F(ab) ²	633 nm	660-710 nm	VASP, blau (infrarot)	B16/F1 GFP-Aktin
Reflexion	488 nm	488 nm	Kollagenfasern	MV3, B16/F1 GFP-Aktin

2.2.7.1. Darstellung des Aktinzytoskeletts, der β1-Integrine, Fascin und VASP in fixierten Zellen

Die Färbung von Zellen fand ausschließlich in fixierten 3D Kollagen-Tropfengelen (vgl. 2.2.2.) in 6-Well-Platten statt. Die Tropfengele wurden nach Polymerisation mit 100 µl Medium versetzt, 12 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend für 20 min mit 4 % PFA bei 37°C (oder für 30 min bei -20°C mit 100 % Methanol für die Darstellung von VASP) fixiert und bis zur weiteren Verarbeitung in PBS/0,1 % BSA bei 4°C gelagert. Das Spülvolumen betrug 2-5 ml, die Konzentration des primären Antikörpers 10 µg/ml, die des sekundären 50 µg/ml. 60 µl der Antikörperlösung bedeckten als Tropfen die Probe.

Färbeprotokoll für die Phalloidin-Aktin-Färbung bei B16/F1 GFP-Aktin Zellen

- Inkubation PFA-fixierter Tropfengele über 12 h bei 4°C in PBS/0,1 % BSA
- Abnahme von PBS/0,1 % BSA
- Überschichtung mit 60 µl verdünnten Phalloidin-Alexa 568 und Inkubation für 60 min bei 4°C
- 6-maliges Waschen mit 4°C kaltem PBS/0,1% BSA über insgesamt 60 min
- Lagerung der Probe bei 4°C in PBS/0,1% BSA

Färbeprotokoll für die β 1-Integrin-Phalloidin-Aktin-Färbung bei MV3 Zellen

- Die Färbung der β 1-Integrine und des Aktin wurde sowohl bei hemmstofffreien als auch bei mit 5 µM Cytochalasin D, 5 µM Latrunculin B und 5 µM Jasplakinolide inkubierten MV3 Zellen durchgeführt.
- Inkubation PFA-fixierter Tropfengele über 12 h bei 4°C in PBS/0,1 % BSA
- Abnahme von PBS/0,1% BSA
- Überschichtung mit 60 µl anti β -Integrin Klon 4B4, Klon K20 im Verhältnis 1:1 und Inkubation 8 h bei 4°C
- 6-maliges Waschen mit 4°C kaltem PBS/0,1 % BSA über insgesamt 60 min
- Überschichtung mit 60 µl verdünnten Cy3 Ziege anti-Maus F(ab)² und Inkubation für 60 min bei 4°C unter Lichtausschluss
- 6-maliges Waschen mit 4°C kaltem PBS/0,1 % BSA über insgesamt 60 min
- Überschichtung mit 60 µl verdünnten Phalloidin-Alexa 488 und Inkubation für 60 min bei 4°C
- 6-maliges Waschen mit 4°C kaltem PBS/0,1 % BSA über insgesamt 60 min
- Lagerung der Probe bei 4°C in PBS/0,1 % BSA

Färbeprotokoll für Fascin-Färbung bei B16/F1 GFP-Aktin Zellen

- Inkubation PFA-fixierter Tropfengele über 12 h bei 4°C in PBS/0,1 % BSA
- Abnahme von PBS/0,1 % BSA
- Permeabilisierung der Zellen mit 2 ml 0,2 %iger Triton-X-100-Lösung bei Raumtemperatur, waschen mit PBS/0,1 % BSA
- Überschichtung mit 200 µl 10 %igem Ziegenserum für 60 min bei Raumtemperatur, waschen mit PBS/0,1 % BSA

- Überschichtung mit 60µl verdünnten Maus anti-human Fascin mAK (IgG1), Klon 55K-2 und Inkubation für 2 h bei 4°C
- 6-maliges Waschen mit 4°C kaltem PBS/0,1 % BSA über insgesamt 60 min
- Überschichtung mit 60 µl verdünntem Alexa 546 Ziege anti-Maus F(ab)² und Inkubation für 60 min bei 4°C unter Lichtausschluss
- 6-maliges Waschen mit 4°C kaltem PBS/0,1 % BSA über insgesamt 60 min
- Lagerung der Probe bei 4°C in PBS/0,1 % BSA

Färbeprotokoll für VASP-Färbung bei B16/F1 GFP-Aktin Zellen

- Inkubation Methanol-fixierter Tropfengele 12 h bei 4°C in PBS/0,1 % BSA
- Abnahme von PBS/0,1 % BSA
- Überschichtung mit 200 µl 10 %igem Ziegenserum für 60 min bei Raumtemperatur, waschen mit PBS/0,1 % BSA
- Überschichten mit 60 µl verdünnten Kaninchen anti-Maus VASP mAK (IgG1), Klon IG 731 und Inkubation für 2 h bei 4°C
- 6-maliges Waschen mit 4°C kaltem PBS/0,1 % BSA über insgesamt 60 min
- Überschichtung mit 60 µl verdünnten Cy5 Esel anti-Ziege F(ab)² für 2 h bei 4°C unter Lichtausschluss
- 6-maliges Waschen mit 4°C kaltem PBS/0,1 % BSA über insgesamt 60 min
- Lagerung der Probe bei 4°C in PBS/0,1 % BSA

Die Deckgläschen mit den fixierten und gefärbten Tropfengelen wurden vor der konfokalmikroskopischen Betrachtung auf Objektträgern auf zuvor aufgetragenen Paraffinstegen fixiert, flüssigkeitsfrei und luftdicht mit Paraffin verschlossen. Ausgehend von dynamischen Sequenzen aus der Videomikroskopie (vgl. 2.2.5. und 2.2.8.) konzentrierte sich die konfokalmikroskopische Analyse auf Zellen in migrationstypischer bzw. für jeweilige Inhibitoren typischer Morphologie. Falls nicht anders angegeben, erfolgte die Analyse mit einem Öl-Immersionsobjektiv mit 40x/NA 1,25. Die Darstellung der Kollagenfasern erfolgte durch die Anregung und Detektion des reflektierten Lichts bei 488 nm. Grüne Fluoreszenz allein wurde von der Reflexion mit einem Reflektion-Short-Pass (RSP) 500 Filter getrennt. Die weiteren Exmissions- und Emissionswellenlängen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Um die Selektivität der

Detektion unterschiedlicher Emissionen zu erreichen, wurden Transmissions-, Reflexions- und bis zu 2 Fluoreszenzbilder sequentieller z-Ebenen im Abstand von 2 μm jeweils selektiv angeregt und getrennt aufgenommen.

2.2.7.2. Dynamische Darstellung des Aktinzytoskeletts bei B16/F1 GFP-Aktin Zellen

Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen wurden auf der 2D monomeren Kollagenoberfläche, auf der 2D fibrillären Kollagenoberfläche sowie in der 3D Kollagenmatrix beobachtet. Einzelzellen mit einer für die jeweilige Kollagenumgebung typischen Migrationsmorphologie (vgl. 2.2.5.) wurden nach 12-stündiger Inkubation bei 37°C mittels konfokaler Zeitraffer-Laser-Mikroskopie gefilmt.

Die Proben wurden auf dem Objektisch fixiert und durch eine Rotlichtlampe über die Versuchsdauer bis zu 5 Stunden bei 37°C temperiert. Laserlicht wurde bei geringst möglicher Intensität eingesetzt, um toxische Effekte zu minimieren.

Für Lebendzellaufnahmen wurden alle Kanäle simultan detektiert, um Positionsartefakte zu vermeiden. Im Zeitabstand von 5 min je Kanal wurde ein Bildstapel aus 5-10 Einzelschnitten mit je 2 μm Abstand in z-Richtung aufgenommen.

Jeder Z-Stapel wurde mittels der Maximum-Intensitätsprojektion übereinander gelegt und in einem Bild dargestellt. Anschließend wurden diese Bilder mit 5 Bildern/Sekunde als Film abgespielt. Mehrkanal-Sequenzen wurden mittels Falschfarbdarstellung rekonstruiert. Sequenzen des Transmissionskanals enthielten nur den zentralen Schnitt des Bildstapels.

2.2.7.3. Dynamische Darstellung des inhibierten Aktinzytoskeletts bei B16/F1 GFP-Aktin Zellen

Die Wirkung der Inhibitoren Cytochalasin D, Latrunculin B und Jasplakinolide auf Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts wurde bei B16/F1 GFP-Aktin Zellen nur im 3D Kollagengel beobachtet. (Probepvorbereitung vgl. 2.2.3., Bildanalyse vgl. 2.2.8.)

2.2.8. Digitale Bildanalyse konfokaler Zeitserien

Mit Hilfe von Bildanalyse-Software wurden einzelne Fluoreszenzkanäle digitaler Bilder in ihrer Intensität für individuelle Pixel mathematisch beschrieben und somit messbar gemacht (Friedl et al., 2004). Um vergleichbare Intensitätskurven zwischen unabhängigen Proben zu erreichen, wurden eine standardisierte Probevorbereitung (vgl. 2.2.2. und 2.2.3.) sowie etablierte Grundeinstellungen (Hardwareparameter, Aufnahmeebene, Laser- und PMT-Einstellungen, Filter RT 30/70, Scan Speed, Beam Expander, Gain, Offset, Scan mode xyz, Pinhole, size wide, size height, size depth, stepp size, zoom, frame average, line average, resolution) am Konfokalmikroskop in einem Bereich von 15-50 μm Eindringtiefe, der eine suffiziente Reflektion zeigte und sicher im 3D Matrixbereich lag, ab Objektträger beibehalten.

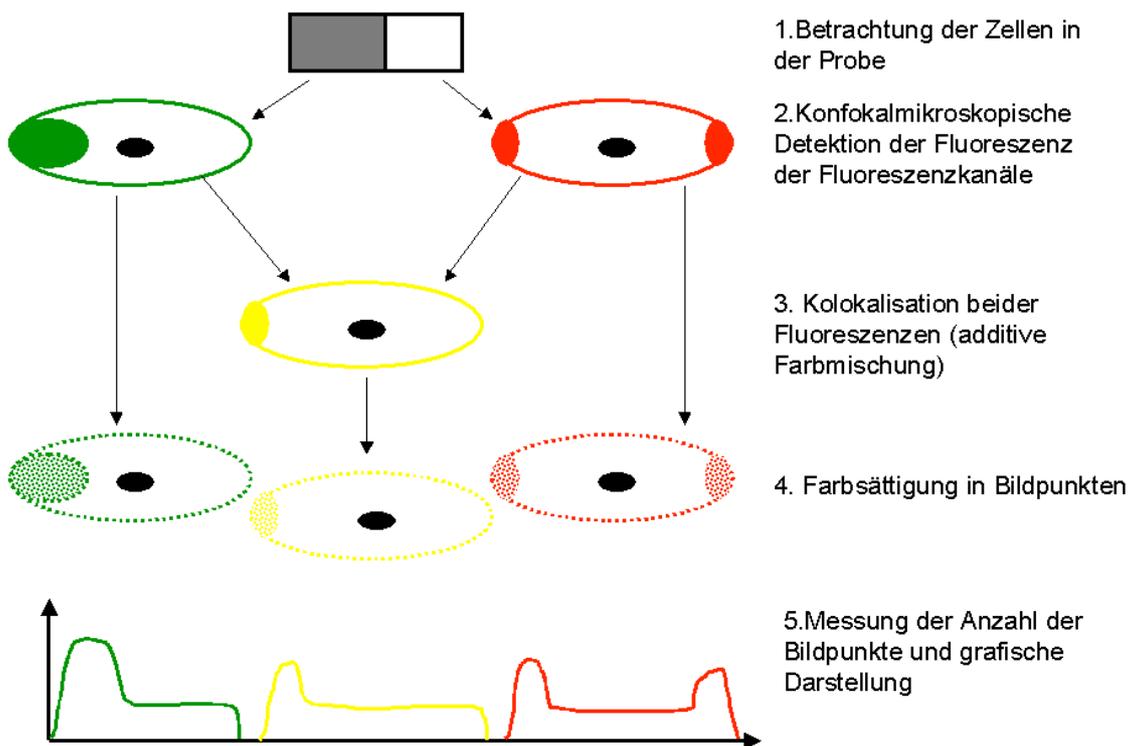


Abbildung 2: Prinzip der Analyse der relativen Fluoreszenzintensität der markierten Moleküle sowie der Bestimmung der Kollokalisierung. Pixelintensität, Grauwert eines Bildpunktes bei 8-Bit Kodierung von 0 (schwarz) bis 255 (weiß); grün, Anzahl Pixel grüne Fluoreszenz; rot, Anzahl Pixel rote Fluoreszenz, gelb, Anzahl kollokalisierte Pixel.

Die Kurvenmuster zwischen Bildern unabhängiger Proben konnten miteinander verglichen werden, da beide Bilder eine für sie spezifische Grundsättigung der jeweiligen Fluoreszenz hatten, die als Ausgangspunkt für die relative Messung diente. Intensitäten der Kolo-kalisation von Rot- und Grünfluoreszenz wurden als gelber Kanal rekonstruiert. Die Sättigung der Mischfarbe wurde durch die Sättigung der beiden Farbkomponenten und damit durch das Vorhandensein der Fluoreszenz der zugrunde liegenden Moleküle bestimmt. Auf diese Weise wurde die Pixelintensität, die Anzahl von Bildpunkten, zu einem semiquantitativen Maß für die Menge des fluoreszenzmarkierten Moleküls bzw. für die Stärke der Kolo-kalisation zweier Strukturen (Abb. 2).

2.2.8.1. Analyse der Fluoreszenzintensität

Die relative Fluoreszenzintensität einzelner Kanäle wurde mit Image J 1.30 gemessen. Die Software ermittelt den Pixelwert der 8-Bitscale von 0 (schwarz) bis 255 (weiß) für jeden Pixel entlang einer Analyselinie bzw. den Mittelwert der Pixel innerhalb eines Analyserechtecks. Die Darstellung der Fluoreszenzverteilung erfolgte als Profil unter Einbezug einer Grundintensität (Baseline).

2.2.8.2. Analyse des Reflexionsmusters

Mit Hilfe der konfokalen Reflexion von polymerem Kollagen wurden die biophysikalische Beschaffenheit (monomer versus fibrillär), die Beschichtungsdicke sowie die Dichte des Kollagenfasernetzes visuell beurteilt. Die Analyse des Reflexionsmusters der 3 Kollagenumgebungen (vgl. 2.2.2.) erfolgte in der Aufsicht als xyz-Projektion und im Querschnitt (xz-Schnitt). Zur Verbesserung der optischen Darstellung wurden die Grautöne der Reflexion mit Adobe Photoshop 6.0 in Goldtöne umgewandelt.

2.2.8.3. Kolo-kalisationsanalysen

Zur Analyse der Kolo-kalisation von Filopodien und Kollagenfasern während der Wanderung der B16/F1 GFP-Aktin Zelle durch das 3D Kollagengel wurde die grüne Fluoreszenz des GFP-Aktins in der Falschfarbe Rot und die Reflexion der Kollagenfasern in der Falschfarbe Grün aufeinander projiziert. An Stellen der

Kolokalisation von Rot und Grün ergab die subtraktive Farbmischung die Farbe Gelb. Die Anzahl kolokalisierter Pixel wurde ermittelt nach Entfernung der Sättigung von Rot und Grün durch Anlegen eines Schwellenwertes von Intensität 160 und über die Zeitachse grafisch dargestellt.

Zur Analyse der Kolokalisation von Filopodien und Kollagenfasern wurden Filopodien ohne, mit fokalem oder mit parallelem Kontakt zu Kollagenfasern anhand der xy-Projektionen manuell ausgezählt und grafisch über der Zeitachse dargestellt.

2.2.8.4. Tracking von Kollagenfasern

Zur Darstellung der Deformierung der extrazellulären Matrix durch migrierende Zellen wurde mittels ImageJ die xy-Positionen einzelner Kollagenfasern zeitaufgelöst rekonstruiert. Mit dem Satz des Pythagoras wurden aus den einzelnen Koordinaten die getrackten Strecken S zwischen den Einzelbildern in μm mit der Formel $S = ((x_2-x_1)^2 + (y_2-y_1)^2)^{1/2}$ berechnet. Um die Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$ der Faserverschiebung zu erhalten, wurde die getrackte Strecke durch die Zeit nach der Formel $V = S/T$ dividiert. Alle Bewegungen der Faserposition auf die Zelle zu (Traktion) wurden mit einem negativen Vorzeichen versehen, die Bewegung weg von der Zelle (Relaxation) mit einem positiven Vorzeichen.

Nach demselben Prinzip des Trackens der Dislokation einzelner Kollagenfasern wurden die Position der Vorderfront und des Hinterendes sowie die Länge der wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle getrennt analysiert.

3. Ergebnisse

3.1. Physikalische Struktur der Migrationsbedingungen

Wie beeinflusst die extrazelluläre Umgebung die Struktur und Funktion des Aktinzytoskeletts einer Tumorzelle und damit Art und Effizienz ihrer Migration? Unter dieser Fragestellung wurden für die Migrationsversuche 3 physikalisch verschiedene in vitro Migrationsbedingungen auf der Basis von Typ-I-Kollagen etabliert: i) eine zweidimensionale Oberfläche beschichtet mit monomerem Kollagen, ii) eine 2D Oberfläche bestehend aus fibrillärem Kollagen und iii) eine 3D Matrix aus fibrillärem Kollagen gleicher Dichte (Abb. 3). Diese standardisierten Bedingungen sollten im Folgenden für Migrationsversuche eingesetzt werden.

Der mit flüssigem monomerem Kollagen beschichtete 2D Objektträger (vgl. 2.2.2.) zeigte eine physikalisch glatte, homogene, kontinuierliche Oberfläche. Fibrilläre Polymere oder sonstige Präzipitate waren mit konfokalem Reflexionskontrast nicht erkennbar. Dieses Substrat ermöglicht den nahezu hindernisfreien und kontinuierlichen Kontakt von Zellen mit dem Kollagensubstrat (Abb. 3 A, D).

Der mit fibrillärem Kollagen beschichtete 2D Objektträger (vgl. 2.2.2.) zeigte eine biophysikalisch diskontinuierliche inhomogene Oberfläche. Mit konfokalem Reflexionskontrast wurde ein Netzwerk aus Kollagenfibrillen und darin enthaltenen Poren dargestellt, das den Zellen ein hindernisarmes, jedoch physikalisch komplexes 2D Substrat bot (Abb. 3 B, E).

Die aus Kollagen hergestellte 3D Matrix (vgl. 2.2.2.) zeigte nach Polymerisation ein Netz aus Kollagenfibrillen, entsprechend einer dreidimensionalen Kollagenfasermatrix mit darin enthaltenen Fasersträngen und Fibrillen sowie Matrixlücken (Poren), (Abb. 3 C, F), (Friedl und Bröcker, 2004).

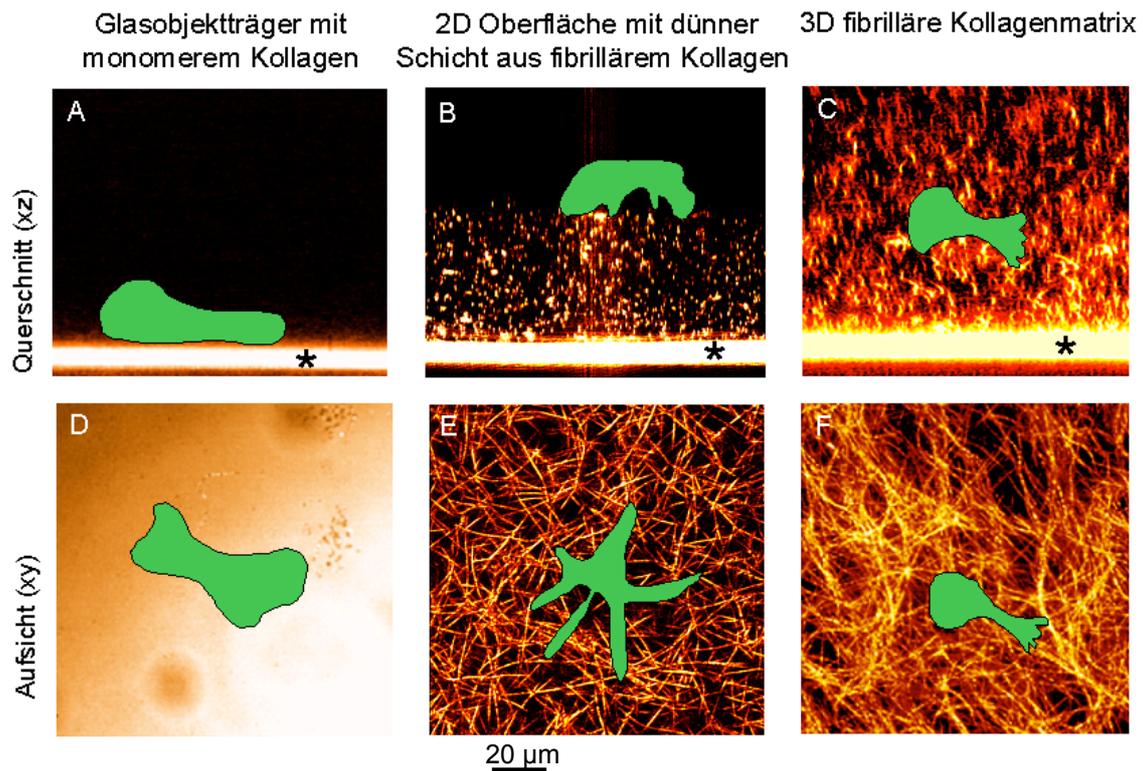


Abbildung 3: 3 physikalisch verschiedene Migrationsbedingungen aus Kollagen. A, D: 2D Glasoberfläche beschichtet mit monomerem, nicht polymerisiertem Kollagen. B, E: 2D fibrilläre Oberfläche einer Kollagenmatrix. C, F: 3D fibrilläre Kollagenmatrix. XY-Aufsicht (A, B, C) und XZ-Schnitte (D, E, F) konfokaler Reflexionsmikroskopie nativer biophysikalisch unterschiedlicher Kollagenumgebungen für nachfolgende Migrationsversuche. Die Position der Zellen (grün) ist modellhaft dargestellt. *, Reflexion des Glasobjektträgers.

3.2. Aktinverteilung in lebenden und fixierten Zellen

Zur Visualisierung von Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts sowie für die Migrationsversuche wurden lebende murine B16/F1 GFP-Aktin Zellen eingesetzt. Um die Fluoreszenzintensität für GFP als Indikator der Aktinpolymerisation zu validieren und die Übertragbarkeit der Aktindarstellung von lebenden auf fixierte Zellen sicher zu stellen, wurden B16/F1 GFP-Aktin Zellen während der Migration in 3D Kollagenmatrices fixiert, konfokalmikroskopisch analysiert und mit dem Fluoreszenzmuster lebender B16/F1 GFP-Aktin Zellen verglichen. Als sensitiver Marker der Aktinfilamente diente Phalloidin, das an polymerisiertes aber nicht an monomeres Aktin bindet (Senderowicz et al., 1994; Cooper et al. 1987).

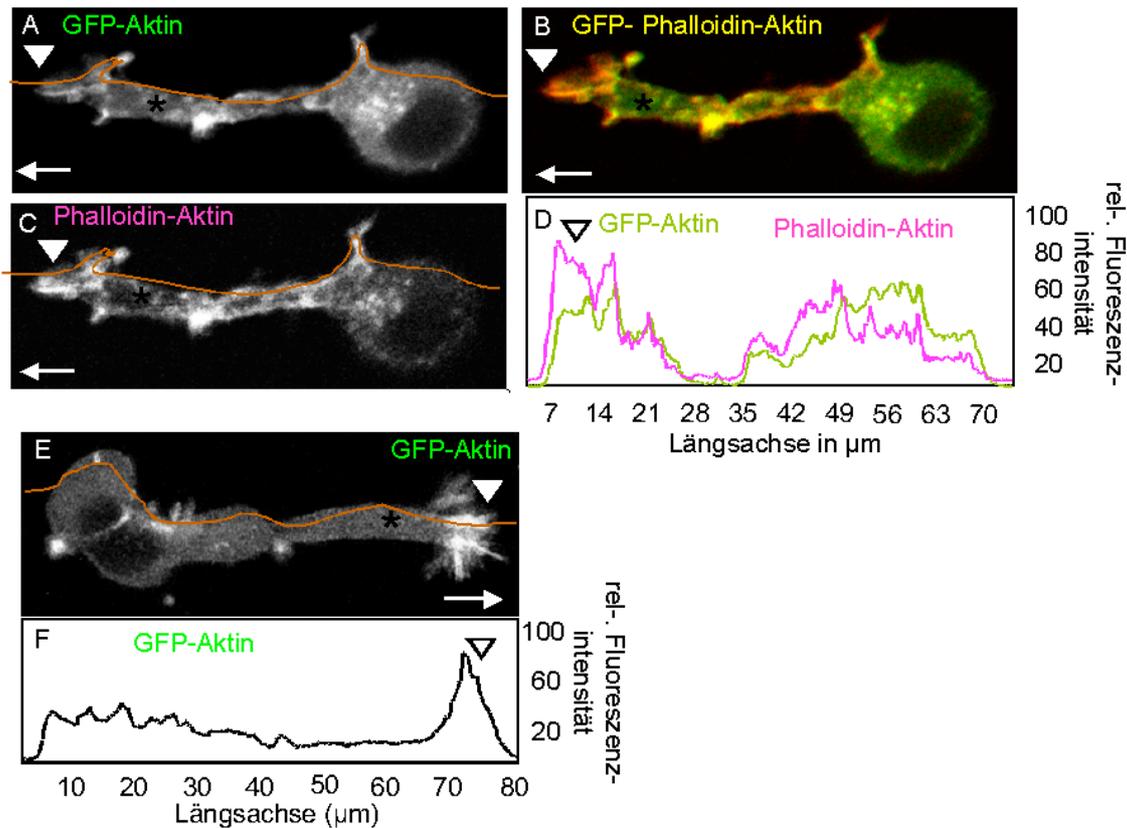


Abbildung 4: Vergleich der Aktinverteilung im 3D Kollagengel. A-C: GFP-Aktin und Phalloidin-Aktin bei fixierter B16/F1 GFP-Aktin Zelle. E, F: GFP-Aktin bei lebender B16/F1 GFP-Aktin Zelle. D, F: Zunahme der GFP-Fluoreszenz an der Spitze des Pseudopods (Pfeilspitzen) im Vergleich zum restlichen Zellkörper. A, C: gleichartige Fluoreszenzbilder und Kurvenmuster der relativen Fluoreszenzintensitäten von GFP-Aktin und Phalloidin-Aktin (D). B: Auftreten gelber Farbtöne an Stellen der Kolo­kalisierung nach Aufeinanderlegen der roten Phalloidin-Fluoreszenz auf die grüne GFP-Fluoreszenz. Pfeil zeigt in Wanderungsrichtung der Zelle. *, Pseudopod. Orange Linie (A, C, E) kennzeichnet Membranseite für die Fluoreszenzanalyse (D, F).

Sowohl in lebenden als auch in fixierten Zellen zeigte sich eine Anreicherung von polymerisiertem Aktin an der Spitze des dicken Pseudopods in Migrationsrichtung sowie in fokalisierter Form entlang des führenden Pseudopods bis zum Übergang in den Zellkörper (Abb. 4 B, E). Die Ortstreue der Fluoreszenzverteilung und die Kongruenz der Intensitätsunterschiede legen nahe, dass GFP-Aktin überwiegend den Polymerisationsgrad anzeigt und in Fluoreszenzstärke und Lokalisation stark mit der Darstellung filamentösen Aktins mit Phalloidin korreliert. Beide Methoden liefern somit übertragbare Befunde. Im Unterschied zur Färbung mit Phalloidin liefert GFP-Aktin

eine höhere Hintergrundfluoreszenz in Regionen ohne Aktinpolymerisation, was auf eine diffuse Verteilung von Aktinmonomeren schließen lässt.

Die Betonung der Aktinpolymerisation an der Vorderfront der Zelle wurde für mehrere unabhängige polarisierte und migrierende Zellen bestätigt (Abb. 4 A, E). Übereinstimmend waren in fixierten und nicht fixierten Zellen weder Stressfasern noch Aktinpolymerisation am Hinterende der Zellen darstellbar (Abb. 4 B, E).

3.3. Zellmorphologie und Migrationseffizienz unter 2D und 3D Kollagenbedingungen

Zur in vitro Beobachtung wandernder Tumorzellen sind 2D Modelle mit unterschiedlicher Beschichtung bekannt (Wehrle-Haller et al., 1998; Adams et al., 2000; Friedl und Bröcker, 2000). Lassen sich Erkenntnisse dieser eher unphysiologischen 2D Modelle auf 3D Matrices und zukünftig auch auf in vivo Bedingungen übertragen oder hat die Art der extrazellulären Umgebung Einfluss auf die Zellmorphologie und Migrationseffizienz wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen? Um das zu überprüfen wurden die B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf bzw. in 3 unterschiedlichen kollagenösen Umgebungen (vgl. 2.2.2.) mittels digitaler Zeitraffer-Videomikroskopie über 30 Stunden gefilmt. Es zeigten sich Unterschiede in der Zellmorphologie und in der Migrationseffizienz.

3.3.1. Monomeres Kollagen auf 2D Oberfläche

Die glatte, kontinuierliche, homogene, mit flüssigen Kollagenmonomeren beschichtete 2D Oberfläche ermöglichte den Zellen 1-2 Stunden nach Versuchsbeginn und nach Bildung fokaler Adhäsionen ein flaches Ausbreiten (spreading) (Abb. 6 C; Film 1) sowie eine nahezu hindernisfreie Zellwanderung (Film 1). Die Zellen zeigten eine sich während der Beobachtungszeit dynamisch ändernde dreieckig, rechteckig, sternähnliche oder ovale Form mit Lamellen (Abb. 5 A), von denen eine der Lamellen mit einsetzender Zellmigration zur Vorderfront wurde (Film 1). Zwischen 70 % und 90 % der B16/F1 GFP-Aktin Zellen wanderten zu jedem Beobachtungszeitpunkt. (Abb. 6 B). Dabei betrug die Migrationsgeschwindigkeit im Schnitt zwischen 0,2-0,3 $\mu\text{m}/\text{min}$. (Abb. 6 A). Die einzelnen Zellen wanderten auf langen gewundenen Pfaden (Abb. 5 A) mit einer Mediangeschwindigkeit von 0,25 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 5 D, E, F). Die Mobilität

betrug dabei zwischen 65 % und 100 % der Beobachtungszeit (Abb. 5 G) mit einem Medianwert von 89 % (Abb. 5 G, H, I).

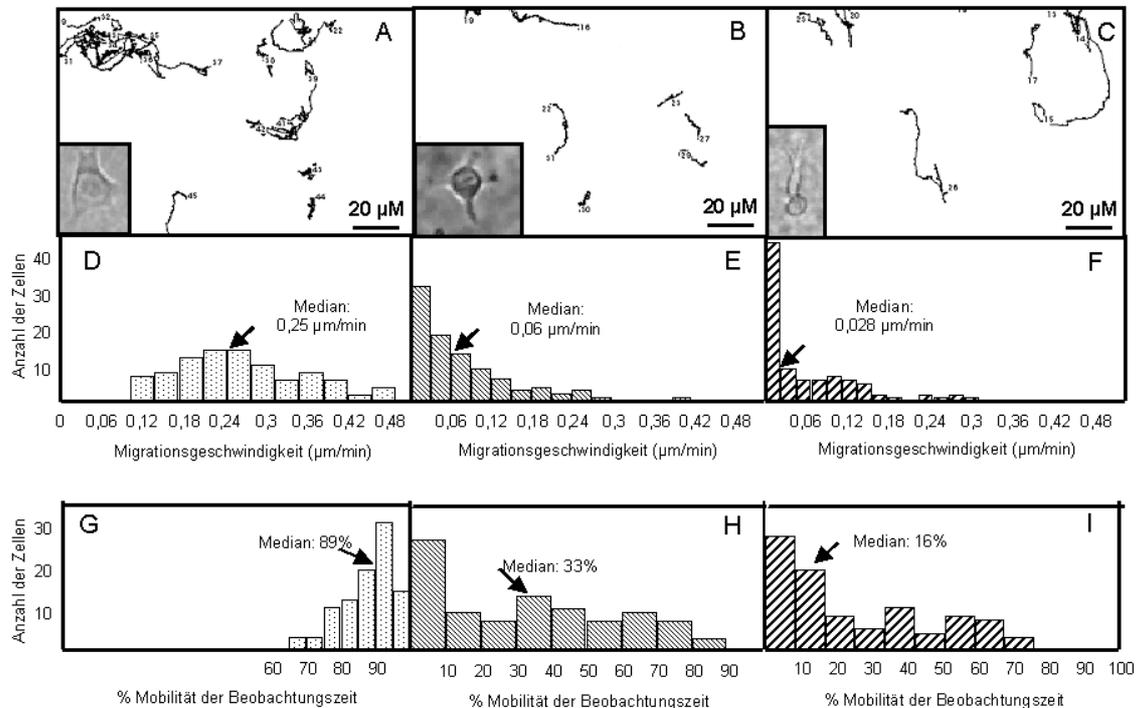


Abbildung 5: Migrationspfade, Zellmorphologie, Geschwindigkeit und Mobilität einzelner B16 GFP-Aktin Zellen. A, B, C: Migrationspfade und typische Morphologie (Inset) wandernder Zellen. D, E, F: Migrationsgeschwindigkeiten der Einzelzellen innerhalb des Beobachtungszeitraums. G, H, I: Mobilität der Einzelzellen in Prozent der Beobachtungszeit. A, D, G: 2D monomeres Kollagen. B, E, H: 2D fibrilläres Kollagen. C, F, I: 3D Kollagen. Vgl. Film 1, Film 2, Film 3.

3.3.2. Fibrilläres Kollagen auf 2D Oberfläche

Auf der gitterähnlichen, löchrigen, diskontinuierlichen, fibrillären 2D Kollagenoberfläche blieben die meisten B16/F1 GFP-Aktin Zellen rund und wanderten nicht (Film 2; Abb. 6 D). Einige wenige wurden 4-5 Stunden nach Versuchsbeginn polar und begannen nach 7-8 Stunden zu wandern (nicht gezeigt). Die migrierenden Zellen zeigten eine spinnenähnliche Morphologie mit langen dünnen Ausläufern, Pseudopodien, (Film 2; Abb. 5 B) und bewegten sich auf kurzen geraden Pfaden (Abb. 5 B) über die Kollagenfasern hinweg. Die Einzelzellen erreichten eine

Medianmigrationsgeschwindigkeit von $0,06 \mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 5 E) bei einer Medianmobilität von 33 % der Beobachtungszeit (Abb. 5 H). Zu jedem Zeitpunkt wanderten zwischen 25 % und 45 % der Zellen (Abb. 6 B) mit Geschwindigkeiten zwischen $0,05$ und $0,1 \mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 6 A).

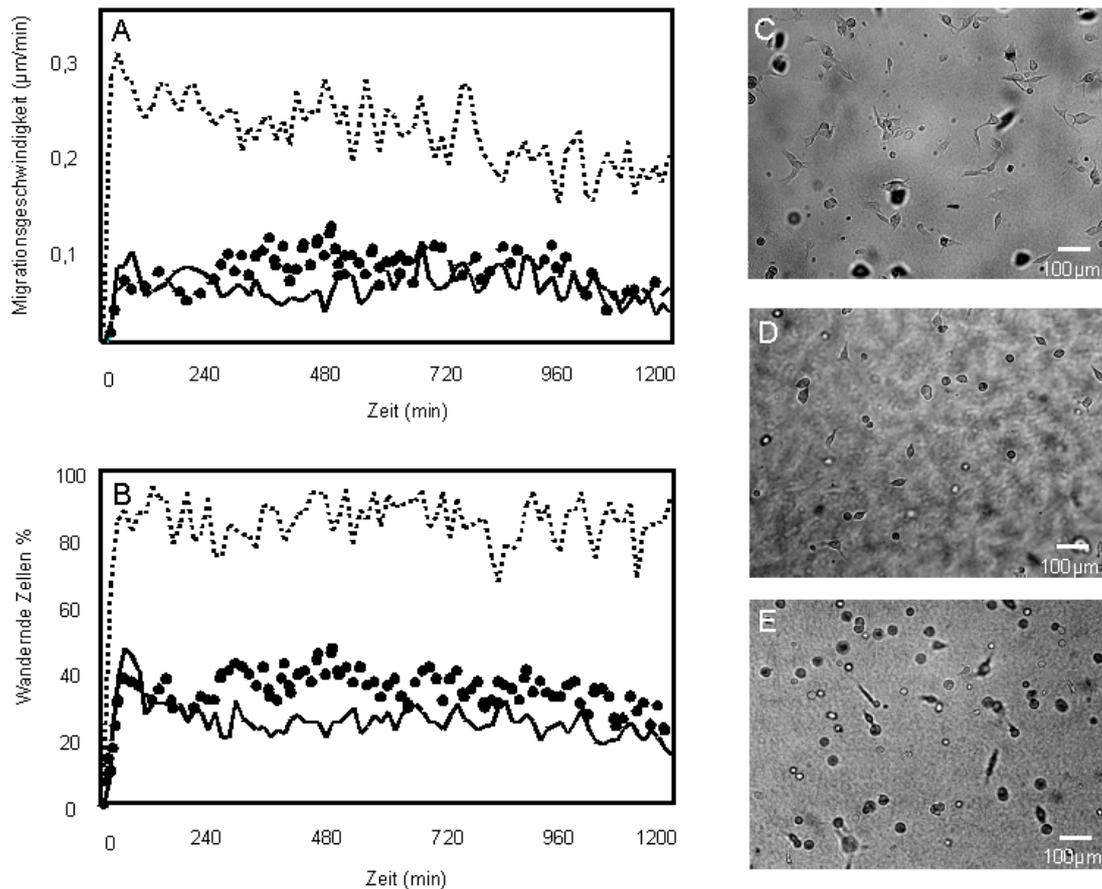


Abbildung. 6: Migrationsgeschwindigkeit, Mobilität und typische Morphologien der B16/F1 GFP-Aktin Zellpopulation zu definierten Zeitpunkten. A: durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit der Zellpopulation. B: prozentualer Anteil wandernder Zellen. C, D, E: Zellmorphologie, Standbilder digitaler Zeitraffervideomikroskopie, nach 9 h auf monomerer Kollagenoberfläche (C), nach 12 h auf 2D fibrillärer Kollagenoberfläche (D), nach 19 h im 3D Kollagengel (E). Diagrammlinien in A, B gestrichelt, monomeres Kollagen; punktiert, 2D fibrilläres Kollagengel; durchgezogen, 3D Kollagengel. Vgl. Film 1, Film 2, Film 3.

3.3.3. 3D Kollagenmatrix

Die B16/F1 GFP-Aktin Zellen im 3D Kollagengel zeigten 2-3 Stunden nach Versuchsbeginn eine spindelförmige (mesenchymale) Morphologie mit einem dicken Pseudopod (Abb. 6 E) und begannen nach 3-4 Stunden auf geraden Pfaden (Abb. 5 C) zu wandern (Film 3). Dabei erreichten die Einzelzellen eine Medianmigrationsgeschwindigkeit von 0,028 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 5 F) bei einer Medianmobilität von 16 % der Beobachtungszeit (Abb. 5 I). Zu jedem Zeitpunkt wanderten zwischen 20 % und 45 % der Zellen (Abb. 6 B) mit einer Migrationsgeschwindigkeit von 0,05-0,1 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 6 A). Tabelle 4 zeigt alle hinsichtlich der Zellmorphologie und Migrationseffizienz analysierten Parameter.

Tabelle 4: Zellmorphologie und Migrationseffizienz wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen

Kollagenumgebung	2D monomere Oberfläche	2D fibrilläre Oberfläche	3D fibrilläre Matrix
Biochemie Kollagen	Typ I Kollagen	Typ I Kollagen	Typ I Kollagen
Biophysik Kollagen	flüssiges monomeres Kollagen	feste Kollagenfibrillen	feste Kollagenfibrillen
analysierte Zellzahl Versuche	90 Zellen aus n=3 Versuchen	90 Zellen aus n=3 Versuchen	90 Zellen aus n=3 Versuchen
Migrationspfade	lang, gewunden	kurz, gerade	lang, gerade
Zellmorphologie-Verhältnis	rund<polar	rund>polar	rund>polar
Zellmorphologie wandernder Zellen	oval, flach ausgebreitet	spinnenähnlich	spindelförmig, mesenchymal
Ausläufer	Lamellen	Pseudopodien	Pseudopodien
Migrationsgeschwindigkeit Einzelzellen: min-max	0,1-0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$	0-0,41 $\mu\text{m}/\text{min}$	0-0,3 $\mu\text{m}/\text{min}$
Mobilität der Einzelzellen % locomotion innerhalb der Beobachtungszeit: min-max	65 %-100 %	0-90 %	0-87 %
Mobilität der Einzelzellen % locomotion innerhalb der Beobachtungszeit: Median	89 %	33 %	16 %
Migrationsgeschwindigkeit an einem bestimmten Zeitpunkt (Durchschnitt)	0,2-0,3 $\mu\text{m}/\text{min}$	0,05-0,15 $\mu\text{m}/\text{min}$	0,05-0,1 $\mu\text{m}/\text{min}$
prozentualer Anteil der mobilen Zellen an einem bestimmten Zeitpunkt	70 %-90 %	25 %-45 %	20 %-45 %

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die fibrillären Kollagenumgebungen hinsichtlich der Migrationseffizienz die ungünstigen Umgebungen bieten und die B16/F1 GFP-Aktin Zellen ihre Morphologie am schnellsten an die 2D monomere Kollagenumgebung anpassen. Deshalb wandern sie auf monomerem Kollagen fünfmal schneller (Abb. 5) als auf bzw. in der fibrillären Umgebung bei viermal höherer Mobilität (Abb. 6).

3.3.4. Pseudopodien ermöglichen den B16 GFP-Aktin Zellen auf 2D und in 3D fibrillären Kollagenumgebungen zu wandern

Im Gegensatz zur breiten Lamelle als Vorderfront, der ovalen Zellform und des schmalen Hinterendes auf 2D monomerer Kollagenoberfläche bildeten die B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf 2D fibrillären und in 3D Kollagenmatrices Pseudopodien aus (Abb. 7 A, B, Stern). Unter der Annahme, dass die Zwei- bzw. Dreidimensionalität die Anzahl der Pseudopodien beeinflusst, wurden sie bei je 12 wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf der 2D fibrillären Kollagenoberfläche sowie im 3D fibrillären Kollagengel mittels digitaler Zeitraffer-Videomikroskopie innerhalb einer Beobachtungszeit von 20 Stunden ermittelt (Abb. 7 C; Film 2; Film 3).

Auf der 2D fibrillären Kollagenoberflächen bildeten die Zellen eine spinnenähnliche, vielgestaltige Form mit multiplen Pseudopodien an Kontaktstellen zu Kollagenfasern, die als 'Hybrid' an die für 2D monomere Oberflächen bekannte breite Lamelle erinnerte. Mindestens 2, maximal 5 Pseudopodien (Median: 3) konnten identifiziert werden.

Im 3D Kollagengel bildeten die Zellen eine spindelförmige, fibroblastenähnliche Zellform (mesenchymal) mit einem dicken Pseudopod in Bewegungsrichtung aus. Wechselte die Zelle bei der Wanderung die Vorderfront und Migrationsrichtung, zeigten sich vorübergehend 2 Pseudopodien durch Bildung des zweiten an der gegenüberliegenden Seite der ursprünglichen Vorderfront, am ursprünglichen Hinterende. Dieser wurde dann zur neuen Vorderfront (Film 3). Mindestens 1, maximal 2 Pseudopodien (Median: 1) konnten unterschieden werden (Abb. 7 C).

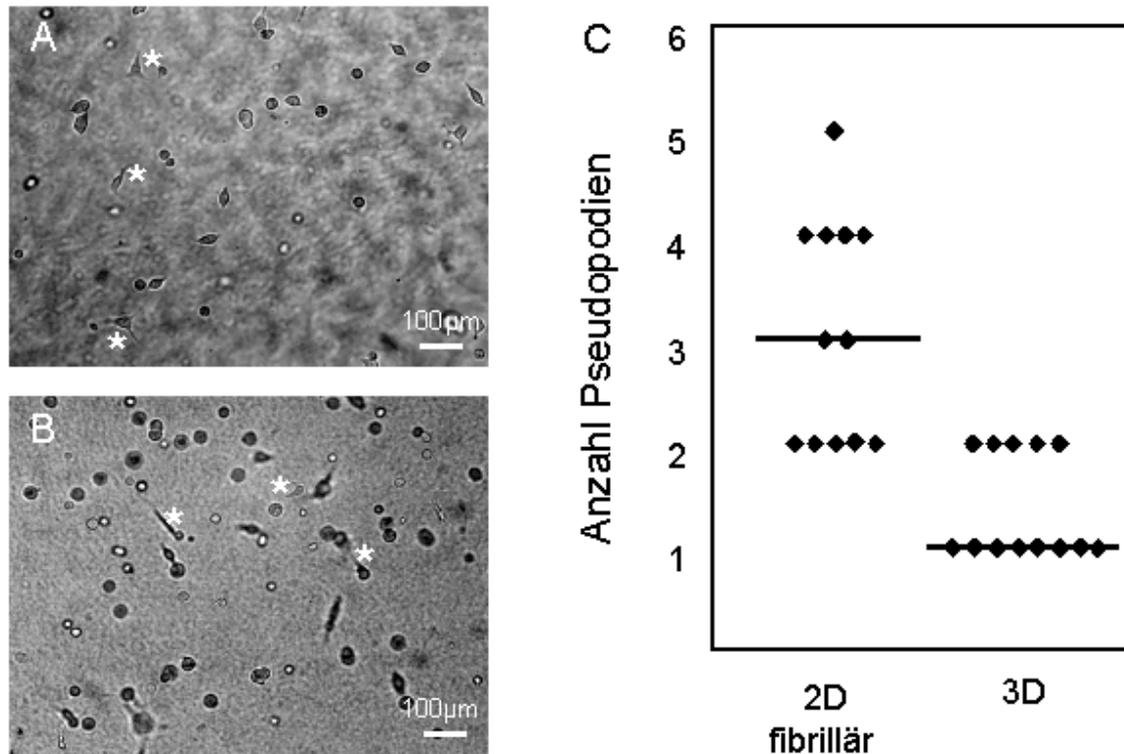


Abbildung 7: Morphologie und Pseudopodienzahl wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf 2D (A) und in 3D (B) fibrillären Kollagenmatrices. A: Morphologie auf 2D fibrillärer Kollagenoberfläche nach 20 Stunden. B: Morphologie in 3D fibrillärem Kollagengel nach 20 Stunden. C: Anzahl der ausgebildeten Pseudopodien wandernder Einzelzellen. Analysen aus mit Zeitraffer-Videomikroskopie erstellten Filmen (vgl. Film 2, Film 3). Runde, d.h. nicht polarisierte und migrierende Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. *, Pseudopodien.

3.3.5. Migrationstypus und Effizienz hochinvasiver MV3 Zellen im Vergleich zu den B16/F1 GFP-Aktin Zellen

MV3 Zellen sind wenig empfindliche maligne und hochinvasive Tumorzellen, die für die Erforschung der molekularen Mechanismen der Tumordinvasion *in vitro* und *in vivo* eingesetzt werden (Danan et al., 1993, Muijen et al., 1991). In dieser Arbeit wurden MV3 Zellen (Film 4) als Vergleichszellen zu B16/F1 GFP-Aktin Zellen verwendet. Untersucht werden sollte, ob Migrationstyp und Effizienz zwischen beiden Zelltypen vergleichbar sind oder ob tumorzellartsspezifische Besonderheiten vorliegen.

MV3 Zellen entwickelten nach 1 h eine spindelförmige (mesenchymale) Morphologie (Abb. 8 B Inset; Abb. 9 B) und nachfolgender Migration auf geraden, manchmal leicht gewundener Pfade (Abb. 8 B). Dabei erreichten die Einzelzellen eine im Vergleich zu

B16/F1 GFP-Aktin Zellen bis zu sechsfach höhere Migrationsgeschwindigkeit (0,18 $\mu\text{m}/\text{min}$; Abb. 8 C, D) und einen sechsfach höheren Anteil wandernder Zellen (80-98%; Abb. 8 E, F). Im Kulturverlauf behielten beide Zelltypen einen konstanten Anteil migrierender Zellen und eine gleich hohe Migrationsgeschwindigkeit bei (Abb. 8 G, H). In beiden Fällen lag eine spindelförmige Morphologie bei jedoch unterschiedlicher Migrationseffizienz vor.

Um zu prüfen, ob die unterschiedliche Migrationseffizienz mit einer unterschiedlichen Anzahl an Pseudopodien assoziiert war, wurden B16/F1 GFP-Aktin (Film 3) und MV3 Zellen (Film 4) nach 20 Stunden Kultur in 3D fibrillären Kollagenmatrices analysiert. B16/F1 GFP-Aktin Zellen bildeten 1-3 Pseudopodien (Median: 2) überwiegend an der Vorderfront aus, MV3 Zellen 1 bis 4 Pseudopodien, Median: 2,5 (Abb. 9 A). Häufig waren Pseudopodien am Vorderende der MV3 Zellen verzweigt. Passend zur Elongation des Zellkörpers waren die Migrationspfade von B16/F1 GFP-Aktin Zellen und MV3 Zellen überwiegend geradlinig mit einzelnen scharfen Richtungswechseln, häufig in gegenläufiger Richtung (Abb.8 B). In Tabelle 5 sind die Parameter zu Zellmorphologie, Migrationseffizienz sowie weiteren Kenngrößen der Migration von B16/F1 GFP-Aktin und MV3 Zellen zusammengefasst.

Somit entsprechen B16/F1GFP-Aktin Zellen einer mesenchymalen Migration mit mittlerer bis niedriger Effizienz, während MV3 Zellen als Modell hochinvasiver mesenchymal wandernder Zellen dienen.

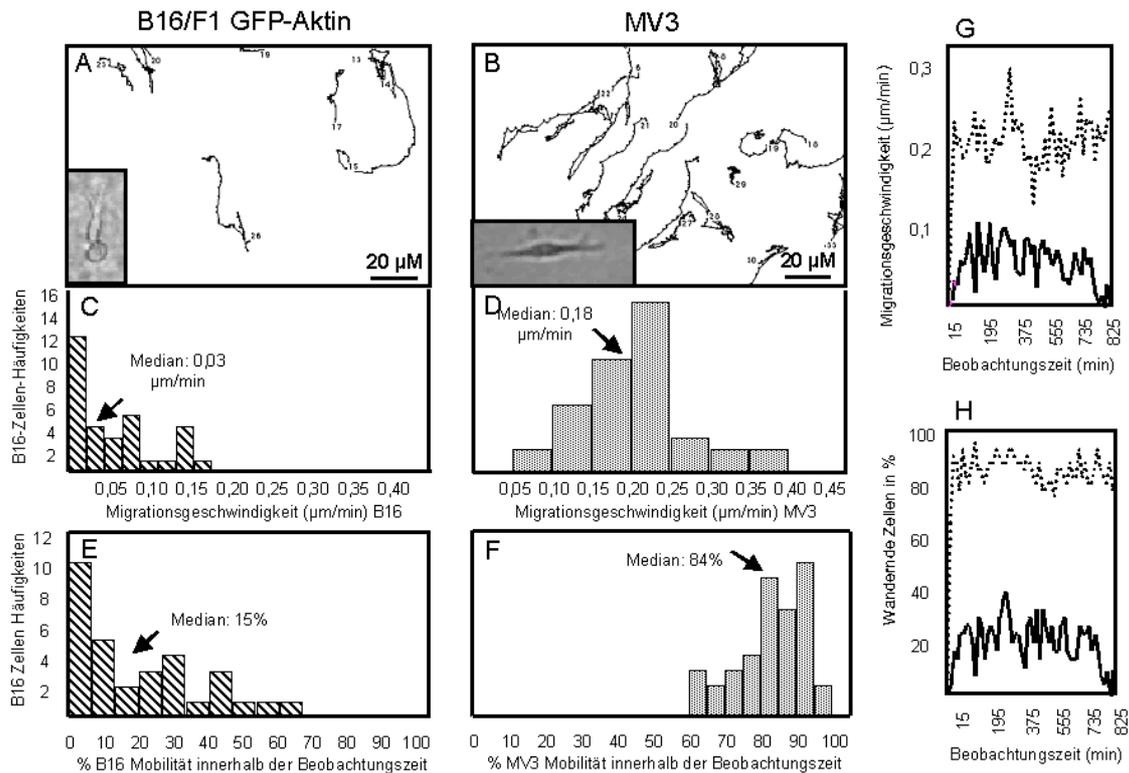


Abbildung 8: Migrationspfade und Morphologie (A, B), Geschwindigkeit (C, D, G) und Anteil spontan wandernder Zellen (E, F, H) in B16/F1 GFP-Aktin und MV3 Melanomzellen im 3D Kollagenmatrices. A, B: Migrationspfade über 20 h und repräsentative Morphologie (Detailbild) von B16/F1 GFP-Aktin Zellen und MV3 Zellen. C, D: Häufigkeit der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeit der Einzelzellen. E, F: Verteilung der mittleren Zeitdauer aktiver Migration von Einzelzellen in Prozent der Beobachtungszeit. G: Durchschnittliche Populationsgeschwindigkeit über die Beobachtungszeit. H: Prozentualer Anteil wandernder Zellen der Gesamtzellpopulation im Verlauf der Beobachtungszeit. Zugrunde gelegt wurden Zellen, die in einem Schrittingintervall wenigstens 1,5 µm (1 Pixel) gewandert waren. Alle Analysen stammen aus mit Zeitraffer-Videomikroskopie erstellten Filmen (vgl. Film 3, Film 4). A, C, E: B16/F1 GFP-Aktin Zellen. B, D, F: MV3 Zellen. Diagramm G, H: punktiert, MV3 Zellen; durchgezogen, B16/F1 GFP-Aktin Zellen.

3.4. Plastizität des Aktinzytoskeletts wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen in Abhängigkeit von der Struktur der extrazellulären Matrix

Um Änderungen der Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts wandernder Tumorzellen zu zeigen, wurden lebende B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf bzw. in den unter 3.1. beschriebenen Kollagenumgebungen konfokalmikroskopisch beobachtet und fluoreszenzanalytisch ausgewertet.

3.4.1. 2D mit monomerem Kollagen beschichtete Oberfläche

Auf mit Kollagenmonomeren beschichteten 2D Oberflächen, die ein homogen glattes und kontinuierliches Substrat bilden, fanden sich 2 Hauptphänotypen für interagierende und ausgebreitete Zellen: ein überwiegend sessiler und ein migrierender Phänotyp. Runde, nicht polarisierte und nicht migrierende Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Der sessile nicht wandernde Phänotyp (Film 5) zeigte eine dreieckige bis polygonale Form (Abb. 10) mit mehreren unabhängigen Vorderfronten in unterschiedliche Richtungen. Die Interaktionen zum Substrat entsprachen fokalen Kontakten nahe äußerer Lamellen und unterhalb des Zellkörpers sowie vereinzelt Stressfasern. Insbesondere der Rand der Vorderfronten enthielt GFP-Aktin in Form kleiner Spikes oder fokaler Anordnung, teils in Kontakt mit kleineren Stressfasern (Abb. 10 A-L, * Stressfasern, Kreis Lamellen).

Der wandernde Phänotyp (Film 6) bildete eine unipolare, kontinuierliche Lamelle als Vorderfront (Abb. 10 N), die eine kontinuierliche Aktinanreicherung entlang der Migrationsfront enthielt, passend zu einem Lamellopod (Abb. 10 M-P).

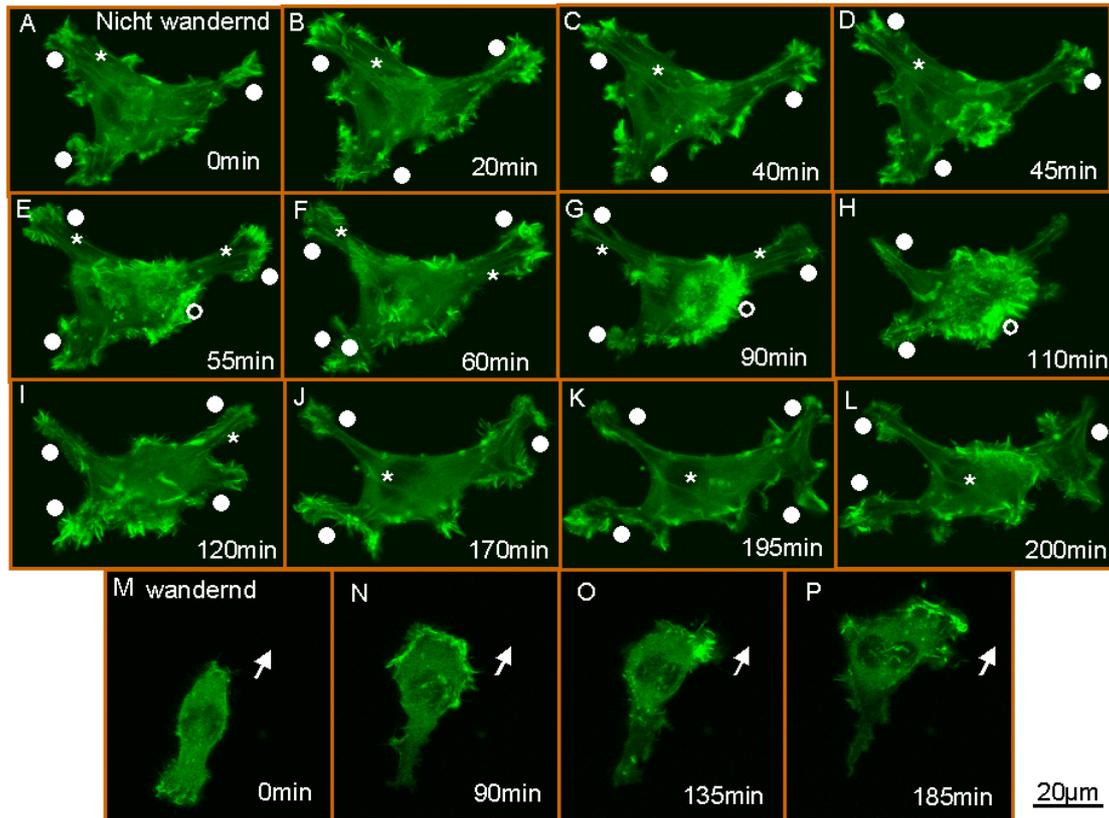


Abbildung 10: B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf 2D monomerer Kollagenoberfläche. A-L: sessiler Phänotyp. M-P: wandernder Phänotyp. Konfokalmikroskopische Sequenz der Fluoreszenz von GFP-Aktin (grün) in lebender B16/F1 GFP-Aktin Zelle nach 5 h Kulturdauer. *, Aktinfilamente und initiale Stressfasern; weißer Punkt, Zellprotrusionen /mögliche Vorderfronten; weißer Kreis, F-Aktin-reiche Lamellen unterhalb des Zellkörpers. Pfeil zeigt in Wanderungsrichtung des migrierenden Phänotyps. Die fluoreszenzarme Region im Zellkörper entspricht dem Zellkern. Vgl. Film 5, Film 6.

Das Hinterende enthielt diffus verteiltes Aktin ohne erhebliche Fokalisierung oder Ruffles (Film 6; Abb. 10 M-P, Pfeil zeigt in Migrationsrichtung). Die semiquantitative Bildanalyse unterstreicht die polarisierte, auf die Vorderfront konzentrierte und kontinuierlich in Querrichtung verlaufende Anreicherung von Aktin (Abb. 12 A-C). Auf monomerem, homogenem 2D Kollagensubstrat wurde somit die Ausbildung flacher und kontinuierlicher Lamellen gefördert, die im Falle unipolarer Ausbildung zu Migration, im Falle oligo/multifokaler Lokalisation einen oszillierenden, jedoch überwiegend sessilen Zustand bewirkten.

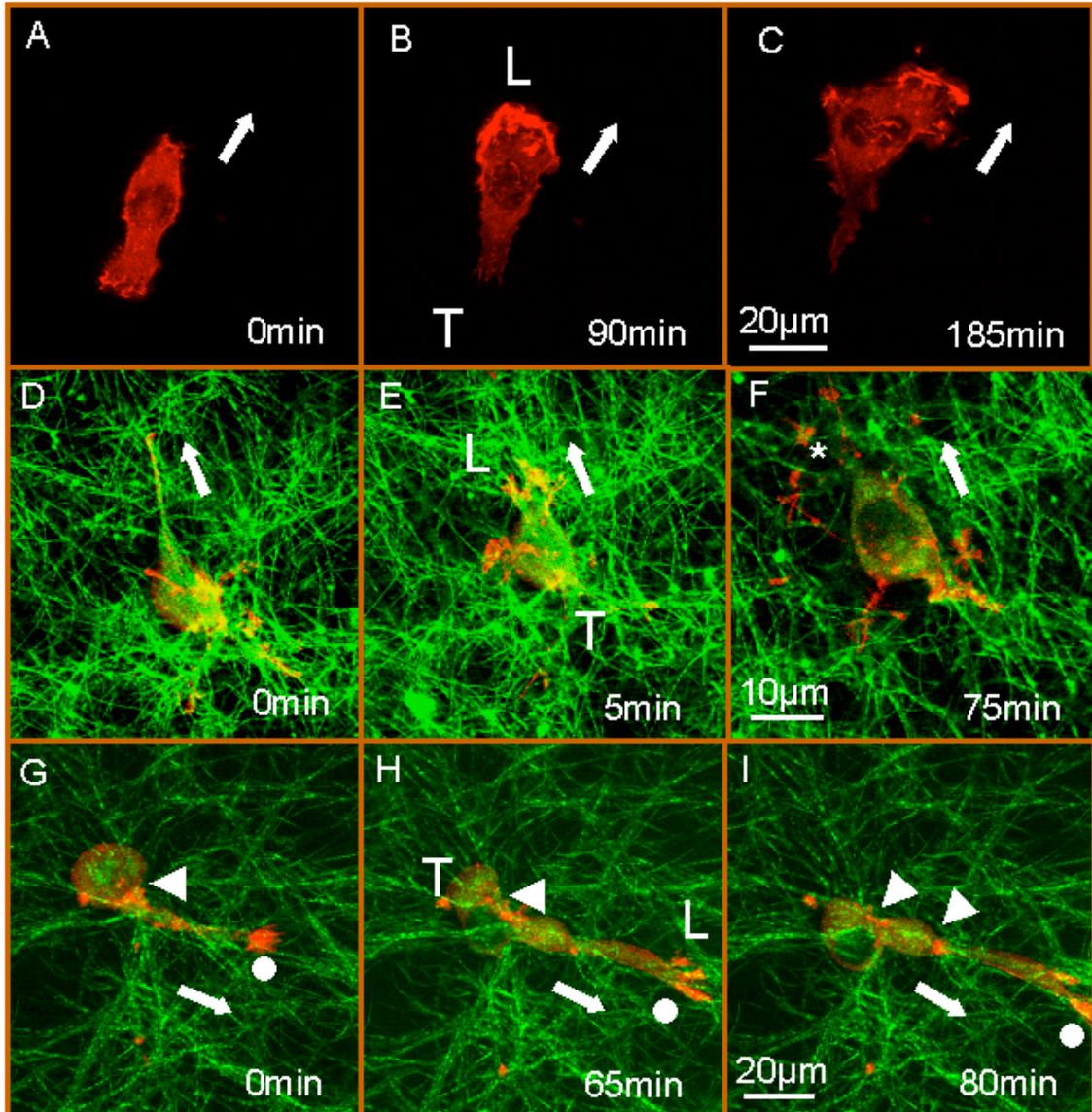


Abbildung 11: Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts in wandernden B16/F1GFP-Aktin Zellen. Wanderung auf 2D versus in 3D fibrillärem Kollagen.
 A-C: Sequenz der Änderung der GFP-Aktin Fluoreszenz (Falschfarbe rot) lebender B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf 2D monomeren Kollagenoberfläche. D-F: Sequenz auf 2D fibrillärer Kollagenoberfläche. G-I: Sequenz nach Einbettung in eine 3D fibrilläre Kollagenmatrix. Die Pfeile kennzeichnen die Migrationsrichtung. L, Vorderfront (leading edge); T, Hinterende (trailing edge); *, Lücke zwischen aktinreichen Pseudopodien der fragmentierten Vorderfront; weißer Punkt, fingerähnlichen aktinreichen Filopodien an der Spitze des dicken Pseudopods; Dreieck, Konstriktionsringe (vgl. Abb. 12). Vgl. Film 6, Film 7, Film 8.

3.4.2. Fibrilläres Kollagen als 2D Oberfläche

Die Migration über 2D fibrilläres Kollagen war mit der Ausbildung mehrerer Pseudopodien assoziiert (vgl. Abb. 5). Bei höherer Auflösung entsprach dies einer „spinnenähnlichen“ Zelle mit oligofokalen Pseudopodien bis zu 15 µm Länge und 1-3 µm Durchmesser, die Interaktionen zur diskontinuierlichen fibrillären Struktur der 2D Kollagenoberfläche aufnahmen (Abb. 11 D-F). Die Spitzen der Pseudopodien waren reich an Aktin in direkter Kollokalisierung mit Kollagenfasern (Film 7; Abb. 11 D-F).

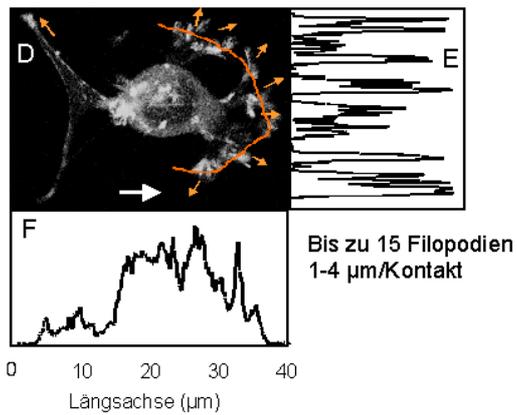
Anstelle einer kontinuierlichen Lamelle war die Vorderfront zergliedert in mehrere kleinere Pseudo- und Filopodien, die individuell mit einzelnen Kollagenfasern interagierten und teils Zug ausübten (Film 7; Abb. 11 F). Die semiquantitative Intensitätsmessungen der Fluoreszenz entlang der Längsachse und quer zur fragmentierten Lamelle zeigten eine Serie einzelner Spitzen unterbrochen von Zonen geringer Intensität (Abb. 12 D, E, F). Somit induzierte das diskontinuierliche Muster des 2D fibrillären Kollagensubstrats eine Zergliederung von Zellausläufern, die sich entlang der vorgegebenen Matrixstruktur bewegten.

3.4.3. 3D fibrilläre Kollagenmatrix

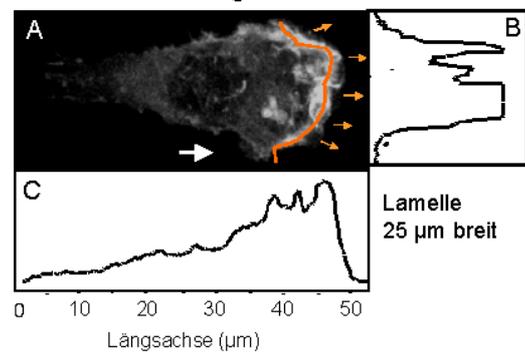
Die Migration innerhalb der 3D fibrillären Kollagenmatrix (Film 8) war assoziiert mit einer spindelförmigen Zellform (vgl. Abb. 5), die bei höherer Auflösung fokal und in hoher Intensität Aktin an der Spitze des führenden Pseudopods enthielt. Die Spitze des Pseudopods bestand aus mehreren aktinreichen fingerähnlichen Filopodien, die mit hoher Dynamik den Kontakt zu den Kollagenfasern bildeten und wieder auflösten (Film 8; Abb. 11 G, H, I). Fluoreszenzmessungen entlang der Längsachse des Zellkörpers ergaben einen in Wanderungsrichtung plötzlich steil ansteigenden Aktingradienten mit dem Maximum an der Pseudopodspitze (Abb. 12 G, H, I). Die Fluoreszenzintensität quer zur Vorderfront zeigte ein diskontinuierliches Muster mit mehreren Maxima, die jeweils den aktinreichen Filopodien entsprachen (Abb. 12 G, H, I). Die Lokalisation und Ausrichtung der Filopodien zu Kollagenfasern ist unter 3.9. weiter ausgeführt. Weiterhin fanden sich fokale Anreicherungen von Aktin entlang des Pseudopods und häufig im Bereich des Übergangs des Pseudopods in den Zellkörper (Abb. 11 G, H, I). An diesen Stellen, sogenannten Kontraktionsringen, wurde die Zelle von den Kollagenfasern eingeschnürt oder komprimiert (Abb. 11 G, H, I).

Plastizität des Aktinzytoskeletts der B16 Melanomzelle: Biophysik der ECM bestimmt die Anatomie der Vorderfront

2D fibrilläre Kollagenoberfläche



2D monomere Kollagenoberfläche



3D fibrilläre Kollagenmatrix

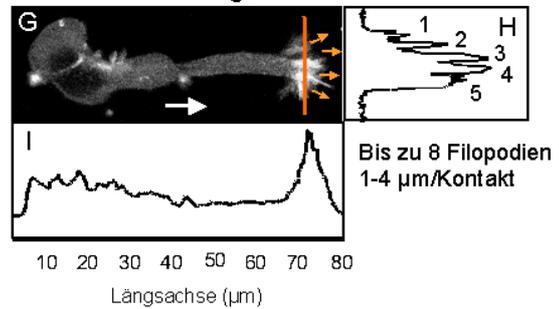


Abbildung 12: Semiquantitative Darstellung der Fluoreszenzintensität von GFP-Aktin in wandernden B16/F1 Zellen auf 2D monomerer (A-C), 2D fibrillärer (D-F) Kollagenoberfläche und in einer 3D Kollagenmatrix (G-I). C, F, I: relative Fluoreszenzintensität entlang der Längsachse der Zelle. B, E, H: relative Fluoreszenzintensität entlang der orangefarbenen Linie. Pfeile, Lokalisation der Interaktion der Vorderfront mit Kollagenfasern.

Tabelle 6: Morphologische Besonderheiten des Aktinzytoskeletts von B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf bzw. in unterschiedlichen Kollagenumgebungen

	2D monomere Kollagenoberfläche		2D fibrilläre Kollagenoberfläche	3D fibrilläre Kollagenmatrix
Zellmigration	sessil	wandernd	wandernd	wandernd
Zellmorphologie	dreieckig bis polygonal	oval, länglich bis rechteckig	Zellkörper oval, multiple kleinkalibrige Pseudopodien (,spinnenähnlich')	elongiert, spindelförmig, ein dominanter großkalibriger Pseudopod (,mesenchymal')
Zellpolarität	multipolar	unipolar	multipolar	unipolar
Anatomie der Vorderfront	kontinuierliche (kleinere) Lamellen	kontinuierliche breite Lamelle	multiple filopodienreiche Pseudopodien (fragmentierte Lamelle)	filopodienreiche Pseudopodspitze
Struktur des Aktinzytoskeletts	flache Lamellen, Ruffles, Spikes/Filopodien, fokale Kontakte, diskrete Stressfasern	kontinuierliche Lamelle, absteigender Aktingradient nach hinten; einzelne fokale Kontakte, keine Stressfasern	Maximum in den Enden von Pseudopodien (Filopodien), keine Stressfasern, keine Anreicherung im rundlichen Zellkörper	wie 2D fibrilläres Kollagen, zusätzlich Konstriktionsringe

Somit unterschieden sich sowohl die Zellmorphologie, das Vorhandensein charakteristischer Aktinstrukturen (Abb. 11) als auch die Anatomie der Vorderfront (Abb. 12) zwischen den 3 verschiedenen kollagenösen Umgebungen. Nur die 2D monomere Kollagenoberfläche fördert eine kontinuierliche Lamelle, fibrilläre Kollagenmatrices begünstigen grundsätzlich die Ausbildung von Pseudopodien mit einzelnen Filopodien. Die spindelförmige mesenchymale Morphologie der Zellen entsteht ausschließlich in 3D Kollagenmatrices.

3.4.4. Lokalisation von Fascin und VASP in Lamellen und Filopodien.

Die Lokalisation von Fascin und VASP sollte als Marker für Lamellen und Filopodien dargestellt werden (Adams et al., 1999; Al-Alwan et al., 2001). Das Färbeprotokoll wurde zunächst für 2D Bedingungen etabliert und anschließend für Zellen in 3D Kollagenmatrices eingesetzt. Fascin quervernetzt parallele Aktinfilamente (Abb. 13 A; Anilkumar et al., 2002; Jawhai et al., 2003; Pinkus et al., 2002; Yamashiro et al., 1998). VASP sitzt auf der Spitze der Aktinfilamente und unterstützt die Aktinnukleation (Abb. 13 F; Bear et al., 2001; Bear et al., 2002; Rottner et al., 1999; Rottner et al., 2001).

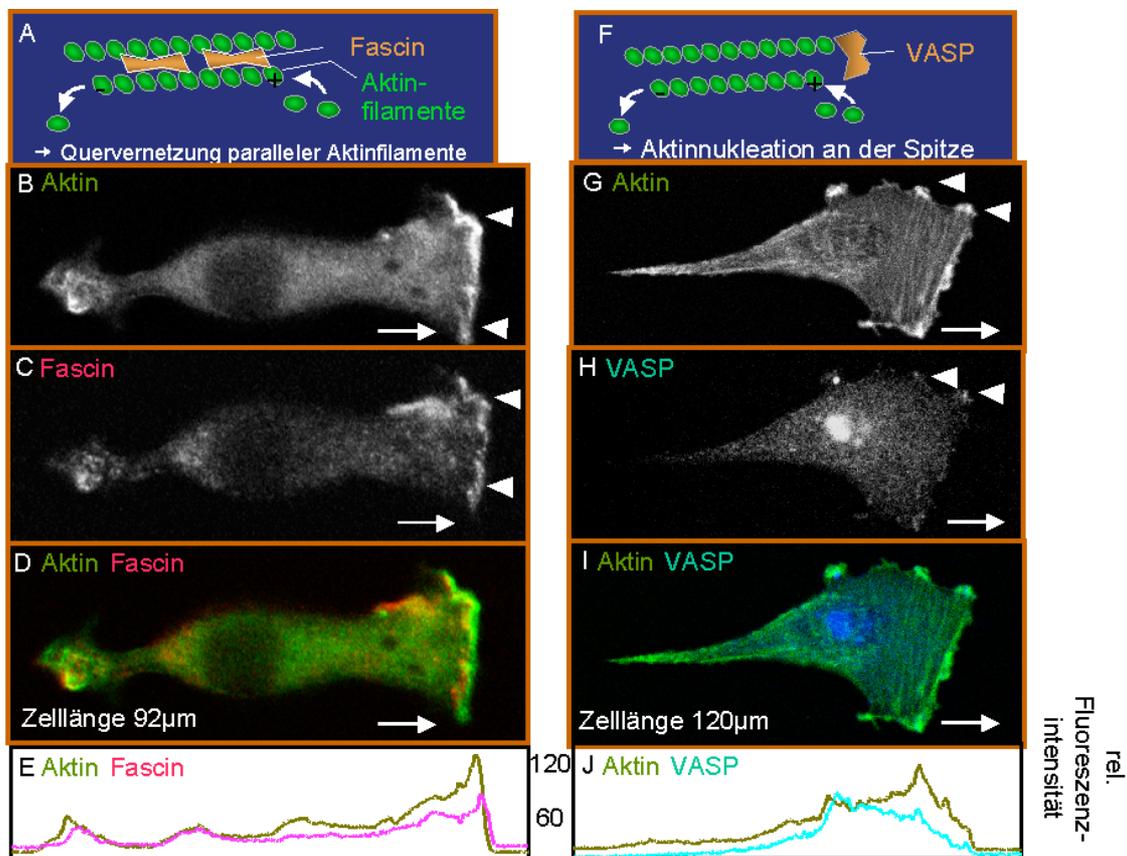


Abbildung 13: Lokalisation von Fascin und VASP in B16/F1 GFP-Aktin Zellen während der Migration über eine 2D mit Kollagenmonomeren beschichteten Oberfläche. A: Stabilisierung von parallelen Aktinfilamenten durch Fascin. F: Lokalisation von VASP innerhalb oder an der Spitze von Aktinfilamenten. Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von Aktin (B, G), Fascin (C), VASP (H); Kolokalisation (D, I) und semiquantitative Analyse der Fluoreszenzintensität (E, J). Pfeil, Wanderungsrichtung.

Auf der 2D monomeren Kollagenoberfläche zeigte die vordere Lamelle eine starke Kolokalisation der Anreicherung für GFP-Aktin (Abb. 13 B) und Fascin (Abb. 13 C). Nach Aufeinanderlegen der roten Fascin-Fluoreszenz und der grünen GFP-Aktin Fluoreszenz erschien diese Lamelle als breites gelbes Band (Abb. 13 D), passend zu einer kontinuierlichen Struktur, in der Aktin und Fascin interagieren. VASP dagegen zeigt eine fokale Verteilung mit Anreicherung in der aktinreichen vorderen Lamelle (Abb. 13 H). Während der Migration durch die 3D Kollagenmatrix war in B16/F1 GFP-Aktin Zellen Fascin mit Aktin in der Spitze des führenden Pseudopods und hier insbesondere in fingerförmigen Filopodien kolokalisiert (Abb. 14 C, D). VASP war überwiegend in fokalisierter Form an der Spitze, seltener in mittleren Regionen der Filopodien lokalisiert (Abb. 14 G, H). Somit lassen sich die fingerförmigen Enden führender Pseudopodien in wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zellen morphologisch, dynamisch-funktionell wie auch molekular als Filopodien charakterisieren.

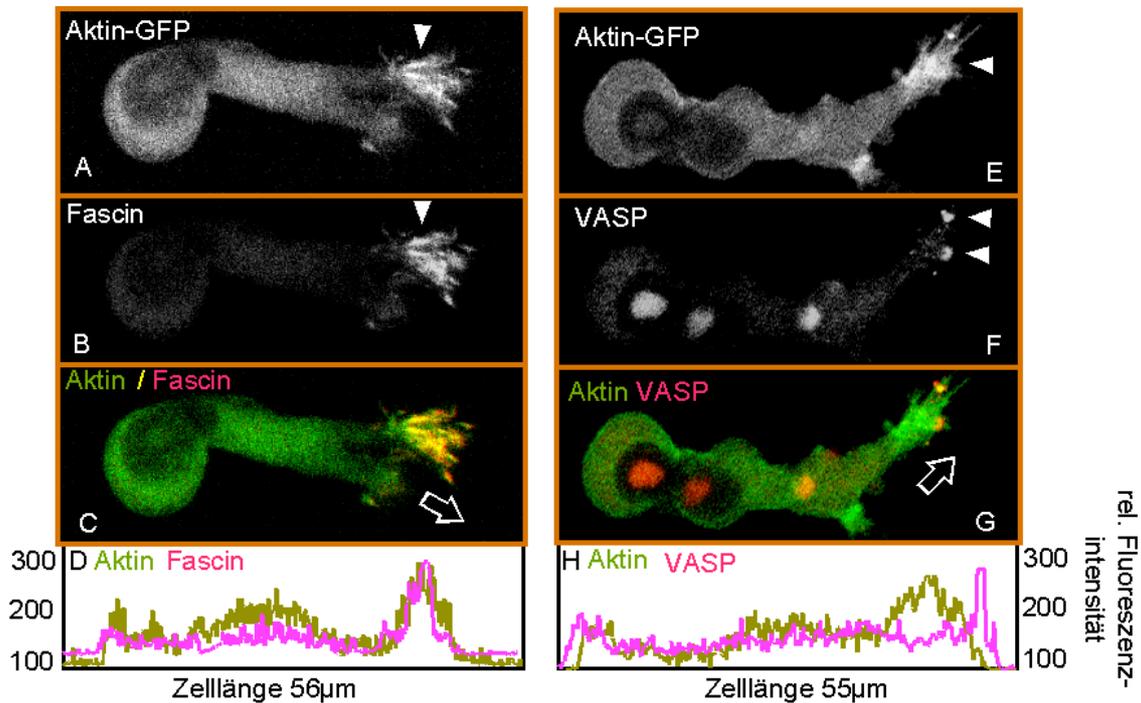


Abbildung 14: Lokalisation von Fascin (A-D) und VASP (E-H) in B16/F1 GFP-Aktin Zellen während der Migration in einer 3D fibrillären Kollagenmatrix. Die Zellen wurden in 3D Kollagenmatrices einpolymerisiert und nach einer Inkubationsdauer von 12 h fixiert, gefärbt und konfokalmikroskopisch analysiert. Die Bilder wurden von z-Stapeln rekonstruiert. Weitere Details siehe Abb. 11.

3.5. Hemmung der Aktindynamik und Zellmigration durch pharmakologische Inhibitoren

Die Invasion und Migration von Tumorzellen sind robuste Prozesse, die sich nur unvollständig durch funktionelle Antagonisten wie Proteaseinhibitoren (Wolf et al., 2003) oder Funktionsblockade von Oberflächenintegrinen (Friedl et al., 2004) inhibieren lassen. Daher sollte geprüft werden, ob es durch Inhibitoren der Aktindynamik zu einer vollständigen Aufhebung der Zellmigration kommt oder ob eine residuelle Dynamik (z.B. durch Mikrotubuli oder Intermediärfilamente) zu einer Zelltranslokation führt. B16/F1 GFP-Aktin Zellen wurden vor und/oder während der Kultur in 3D Kollagenmatrices mit den Aktin-Inhibitoren Cytochalasin D, Latrunculin B oder Jasplakinolide (Bindungseigenschaften s. Abb. 1) inkubiert. Zielgrößen waren Zellmorphologie, Migrationseffizienz, Struktur des Aktinzytoskeletts. Da B16/F1 GFP-Aktin Zellen nur mäßig invasive Tumorzellen repräsentieren, sollten die Befunde vergleichend für stark invasive MV3 Zellen überprüft werden.

3.5.1. Blockade des Aktinzytoskeletts verhindert die Ausbildung einer polaren Zellform und beeinträchtigt die Wanderung von B16/F1 GFP-Aktin Zellen

Nach Etablierung der Dosiswirkungsfunktion (vgl. 2.2.3.) wurden B16/F1 GFP-Aktin Zellen mit 0,5 μM Cytochalasin D (Film 9), 1 μM Latrunculin B (Film 10) oder 1,5 μM Jasplakinolide (Film 11) vorinkubiert, in Kollagen zusammen mit Inhibitor einpolymerisiert und mittels digitaler Zeitraffervideomikroskopie über 16 Stunden beobachtet. Alle 3 Inhibitoren verhinderten in B16/F1 GFP-Aktin Zellen die Polarisierung, so dass eine runde Morphologie beibehalten wurde (Abb. 16 A, B, C) und die Migration nahezu vollständig gehemmt war (Abb. 15 A, B, C). Stattdessen persistierten im rundlichen Zustand geringe Formveränderungen („Oszillieren auf der Stelle“; Abb. 16; Film 9, Film 10, Film 11), ein Zeichen der erhaltenen Viabilität. In hemmstofffreien Kontrollkulturen polarisierten und wanderten zwischen 30 % und 65 % der Zellen spontan (Abb. 15 G, H, I) bei einer Populationsgeschwindigkeit von 0,04 - 0,15 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 15 D, E, F). Die spindelförmige Zellmorphologie entsprach der in Abb. 6 E dargestellten Form. Einzelzellanalysen zeigten, dass weniger als 5 % der B16/F1 GFP-Aktin Zellen migrierten, eine Maximalgeschwindigkeit bis zu 0,06 $\mu\text{m}/\text{min}$ erreichten und somit vereinzelt partielle oder vollständige Resistenz von

B16/F1 GFP-Aktin Zellen gegenüber den Inhibitoren vorlag. Dieser Befund spricht für eine subtotale Hemmung der B16/F1 GFP-Aktin Zellen bei den etablierten Hemmstoffkonzentrationen. Höhere als die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen induzierten eine vollständige Hemmung der Migration ohne Ausnahme, jedoch zugleich eine deutlich höhere Rate apoptotisch oszillierender Zellen (Blebbing, vgl. 2.2.3.).

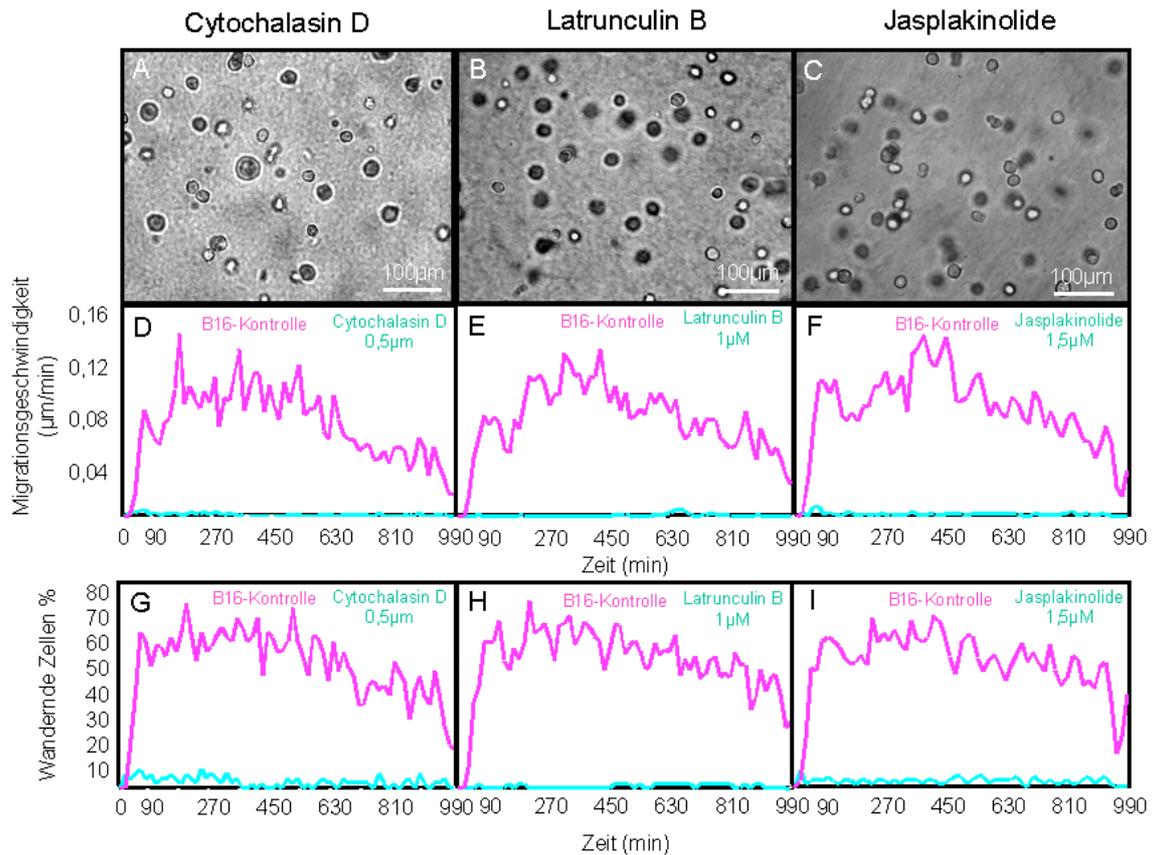


Abbildung 15: Morphologie und Migrationseffizienz der B16/F1 GFP-Aktin Zellen nach Zugabe von Aktin-Inhibitoren. B16/F1 GFP-Aktin Zellen wurden zusammen mit 0,5 μM Cytochalasin D (A, D, G; Film 9), 1 μM Latrunculin B (B, E, H; Film 10) und 1,5 μM Jasplakinolide (C, F, I; Film 11) in 3D Kollagenmatrices einpolymerisiert und über 16 h videomikroskopisch gefilmt. A, B, C: Hellfeldmikroskopie mit Cytochalasin D (A), Latrunculin B (B) und Jasplakinolide (C) nach 10 h Echtzeit. G, H, I: prozentualen Anteils wandernder Zellen. D, E, F: Populationsgeschwindigkeit. rosa, Kontrollzellen; türkise, mit Inhibitor inkubierten Zellen. Die Kontrollpopulation entsprach morphologisch und funktionell der in Abb. 4 E.

Die Zellmigration wird durch die Aktin-Inhibitoren bei einer höheren als der eingesetzten Konzentration vollständig gehemmt, die jedoch mit dem Überleben der Zelle nicht vereinbar ist. Um Artefakte durch Zelltod zu vermeiden, konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen auf subtotal inhibierte jedoch vollständig runde Zellen.

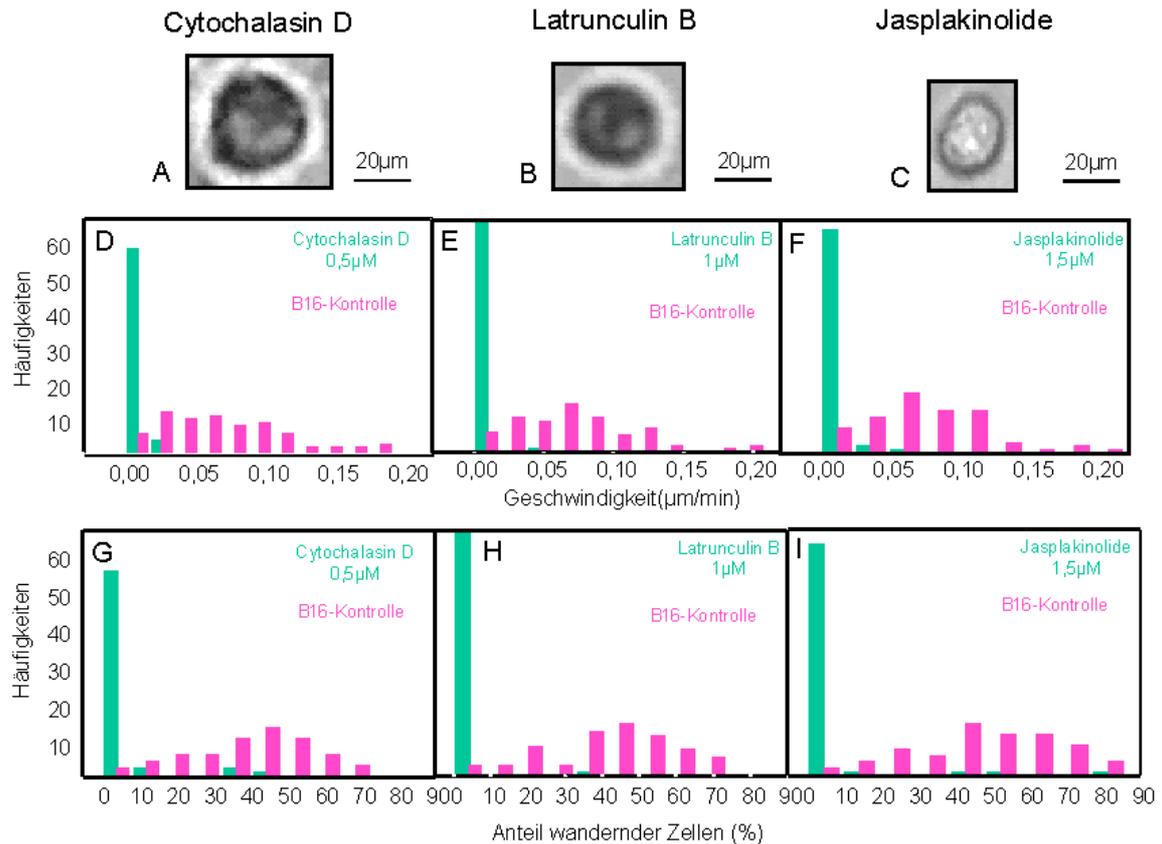


Abbildung 16: Zellmorphologie, Geschwindigkeiten und Mobilität von B16/F1 GFP-Aktin Zellen unter Hemmstoffwirkung. Morphologie von Einzelzellen und Effizienz der Migration während der Inkubation mit Cytochalasin (A), Latrunculin B (B) und Jasplakinolide (C). D, E, F: Häufigkeit der Migrationsgeschwindigkeit. G, H, I: zeitlicher Anteil aktiver Migration der Einzelzellen in An- (türkis) und Abwesenheit (rosa) der Inhibitoren; Spindelförmige Morphologie der wandernden Kontrollzellen vgl. Abb. 6 E. Methodische Details siehe Abb. 15.

3.5.2. Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts während der Blockade durch Aktininhibitoren

Konfokale Lebendaufnahmen der B16/F1 GFP-Aktin Zellen zeigten für Cytochalasin D (Abb. 17 A, D, G; Film 12), für Latrunculin B (Abb. 17 B, E, H; Film 13) und für

Jasplakinolide (Abb. 17 C, F, I; Film 14) runde oszillierende Zellen ohne Translokation, die passiv von umgebenden Kollagenfasern berührt wurden und damit nicht polare, passive Zell-Matrix-Kontakte aufwiesen (Abb. 17 A, B, C). Dynamische, migrationsfördernde Strukturen wie Pseudopodien, Filopodien oder Konstriktionszonen waren nicht nachweisbar. Dabei zeigte das Aktinzytoskelett eine für jeden Hemmstoff charakteristische Struktur.

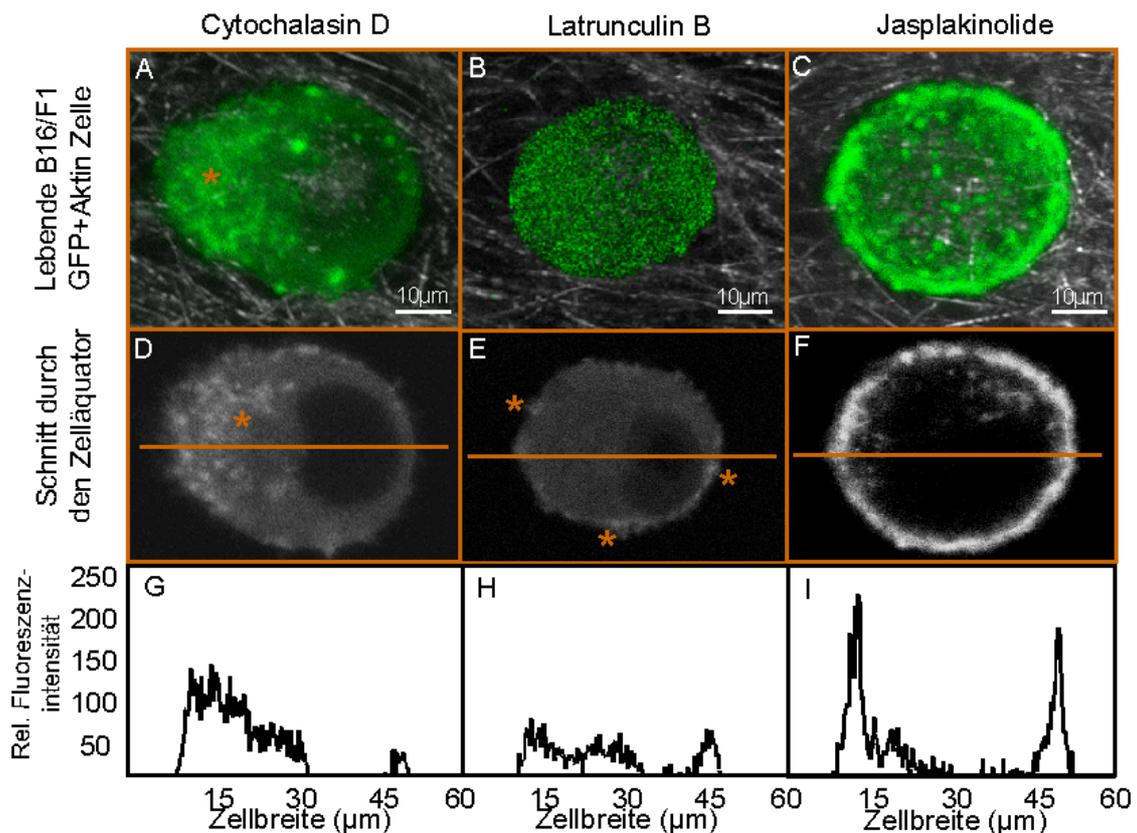


Abbildung 17: Struktur, Matrixkontakte und relative Fluoreszenzintensität des blockierten Aktinzytoskeletts lebender B16/F1 GFP-Aktin Zellen. Inkubation von B16/F1 GFP-Aktin Zellen zusammen mit 0,5 μM Cytochalasin D (A, D, G; Film 12), 1 μM Latrunculin B (B, E, H; Film 13) und 1,5 μM Jasplakinolide (C, F, I; Film 14) über 12 h im 3D Kollagengel bei 37°C und dynamische konfokalmikroskopische Analyse über 3 weitere Stunden. Simultane Aufnahme der Matrixstruktur (A, B, C) und Fluoreszenz (A-F). A, B, C: 3D aus 7 horizontalen Einzelschnitten rekonstruiert und als relative Pixelintensität entlang der orangefarbenen Linie analysiert (G, H, I). *, Aktinaggregate aus polymerisiertem Aktin

Cytochalasin D bindet das Plusende der Aktinfilamente (vgl. 1.2.1.) und verhindert so deren weitere Polymerisation oder die weitere Verzweigung zu Netzwerken (Abb. 1; Cooper, et al., 1987; Godette et al., 1986; Ailenberg et al., 2002; Wakatsuki et al., 2000). In Anwesenheit einer nicht toxischen Konzentration von Cytochalasin D lag Aktin in Form von zytoplasmatischen intensiv fluoreszierenden Aggregaten, meist lokalisiert an einem Zellpol im Zytoplasma vor (Abb. 17 A, D, G).

Latrunculin B bindet monomeres Aktin und verhindert so seine Polymerisation zu Filamenten (vgl. 1.2.1.; Abb. 1; Mortona et al., 2000; Wakatsuki et al., 2000). In lebenden B16/F1 GFP-Aktin Zellen führte Latrunculin B zu diffus verteiltem, niedrigen GFP-Aktin-Signal im Zytoplasma ohne fokale Mehranreicherungen oder Aggregation (Abb. 17 B, E, H; Film 13). Entlang der Zellmembran fanden sich vereinzelte Aktinaggregate, die für eine residuelle Polymerisation nicht besetzter Aktinmonomere sprechen (Abb. 17 E).

Jasplakinolide bindet Aktinfilamente lateral und stabilisiert diese durch Verhinderung der Depolymerisation (vgl. 1.2.1.; Abb. 1; Bubb et al., 1994; Bubb et al., 2000; Odaka et al., 2000; Posey et al., 1999). Unter der Zellmembran fand sich ein ausgeprägter, bis zu 5 μm dicker Aktinring (Abb. 17 C; Film 14) mit einer hohen relativen Fluoreszenzintensität (Abb. 17 F, I).

3.5.3. Struktur des Aktinzytoskeletts in B16/F1 GFP-Aktin Zellen in Anwesenheit von Aktin-Inhibitoren: Darstellung mit Phalloidin

Da GFP-Aktin zwar die Anreicherung, nicht jedoch den Polymerisationsgrad von Aktin darstellt, wurden mit Inhibitor inkubierte B16/ F1 GFP-Aktin Zellen zusätzlich fixiert und mit Phalloidin Alexa-568 auf filamentöse Anteile untersucht. Phalloidin bindet ausschließlich polymeres Aktin (vgl. 1.2.1.; Abb. 1) und kompetiert dabei mit der Bindungsstelle von Jasplakinolide (Senderowicz et al., 1995).

Mit Cytochalasin D (Abb. 18 A) und Latrunculin B (Abb. 18 B) inkubierte Zellen zeigten bei GFP- und Phalloidin-Signalen eine deutliche zytoplasmatische Kolokalisation (Abb. 18 A, B).

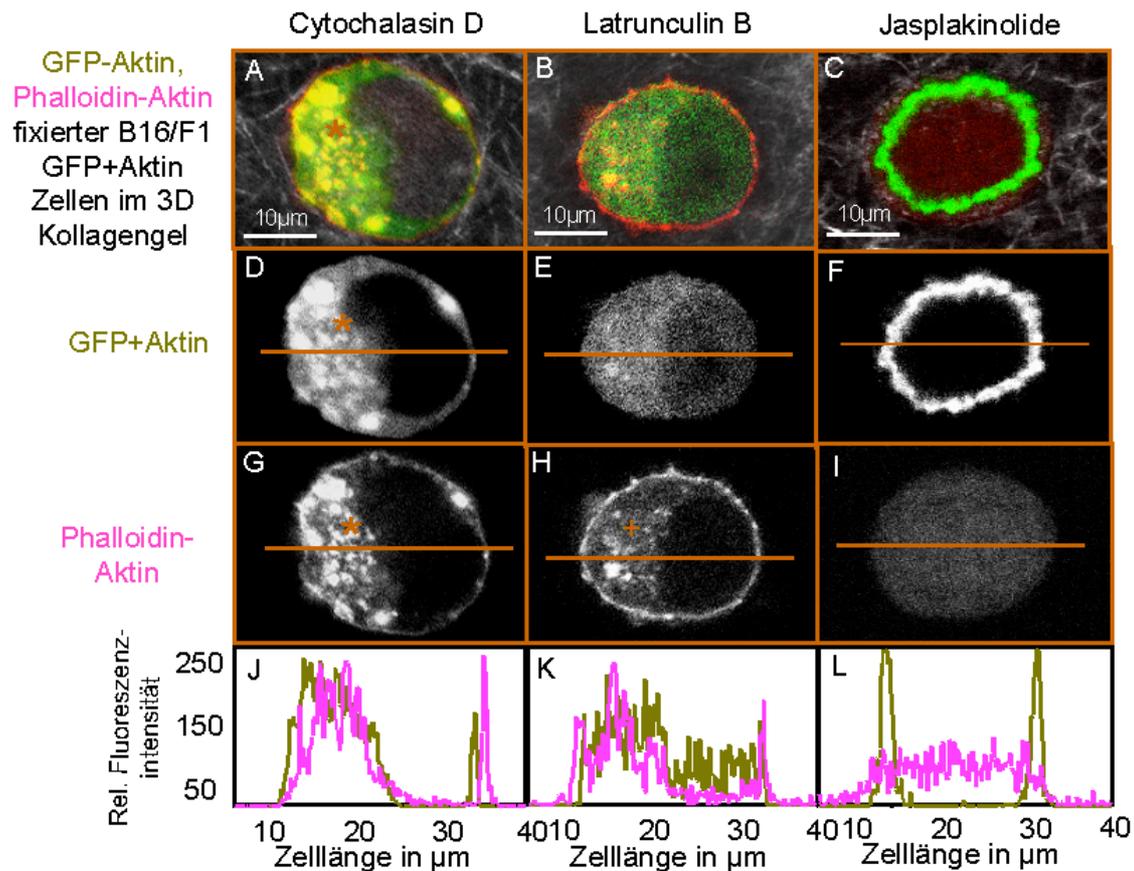


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung des Aktinzytoskeletts durch GFP-Aktin und simultane Färbung mit Phalloidin in B16/F1 GFP-Aktin Zellen. Versuchsbedingungen vgl. Abb. 17. GFP-Aktin (D, E, F), Phalloidin (G, H, I) und Kolo­kalisierung (A, B, C) nach Inkubation GFP-Aktin mit Cytochalasin D (A, D, G), Latrunculin B (B, E, H) und Jasplakinolide (C, F, I). Die Zellen wurden anschließend fixiert und mit Phalloidin-Alexa 568 gefärbt. J, K, L: Relative Fluoreszenzintensität entlang der Linie in (D-I).

Mit Latrunculin B versetzte Zellen zeigten zusätzlich zu diffus im Zytoplasma verteilten GFP-Aktin einen dünnen Ring aus Phalloidin-Aktin unterhalb der Zellmembran (Abb. 18 B, H). Dieser Aktin-Ring ergab 2 scharfe Maxima der relativen Fluoreszenzintensität während das GFP-Signal eine kontinuierliche Fluoreszenzkurve behielt. Dieser Befund legt eine Dissoziation von Aktinverteilung und tatsächlichem Polymerisationsgrad nahe. In Anwesenheit von Cytochalasin D waren das GFP-Aktin- (Abb. 18 D) und das Phalloidin-Signal (Abb. 18 G) überwiegend kolokalisiert mit deutlichen zytoplasmatischen Maxima an einem Zellpol, entsprechend der Ansammlung von Aktinaggregaten (Abb. 18 J). Die starke Kolokalisierung der GFP-Aktin- und Phalloidin-

Signale nach Inhibition der Aktindynamik mit Cytochalasin D und Latrunculin B impliziert, dass hier Aktin überwiegend im polymerisierten Zustand vorlag.

Die Struktur des deutlich verbreiterten kortikalen GFP-Aktin in Anwesenheit von Jasplakinolide war durch Phalloidin nicht zeitgleich darstellbar (Abb. 18 C, F). Dieser Befund ist erklärbar durch die bekannte Konkurrenz zwischen Phalloidin und Jasplakinolide in der lateralen Filamentbindung (Senderowicz et al., 1995). Somit war die Aktinverteilung nach Inhibition der Zellen mit Cytochalasin D und Latrunculin B, nicht jedoch nach Inhibition der Zellen mit Jasplakinolide mittels Phalloidin topografisch korrekt darstellbar.

3.5.4. Hemmung von Zellpolarisierung und Migration hochinvasiver, aggressiver MV3 Melanomzellen durch Aktin-Inhibition

Humane MV3 Zellen wurden jeweils zusammen mit 5 μ M Cytochalasin D, 5 μ M Latrunculin B und 5 μ M Jasplakinolide in Kollagen einpolymerisiert und mittels digitaler Zeitraffervideomikroskopie über 16 Stunden beobachtet. Analog zu den B16/F1 GFP-Aktin Zellen zeigten MV3 Zellen für Cytochalasin D (Abb. 19 A; Film 15), für Latrunculin B (Abb. 19 B; Film 16) und für Jasplakinolide (Abb. 19 C; Film 17) eine runde Morphologie und wurden in ihrer Fähigkeit zu wandern vollständig gehemmt. Stattdessen trat ein „Oszillieren auf der Stelle“ auf (Abb. 19 A, B, C; Film 15, 16, 17), das über den Beobachtungszeitraum hinweg persistierte und als Zeichen der erhaltenen Viabilität beibehalten wurde. Von den hemmstofffreien Kontrollpopulationen (vgl. Abb. 9 B; Film 4) wanderten zu jedem Zeitpunkt zwischen 80 % und 98 % der beobachteten Zellen (Abb. 19 G-I) mit einer Migrationsgeschwindigkeit zwischen 0,25 - 0,35 μ m/min (Abb. 19 D-F). Wandernde Zellen hatte eine spindelförmige Morphologie (Abb. 8 B, Inset).

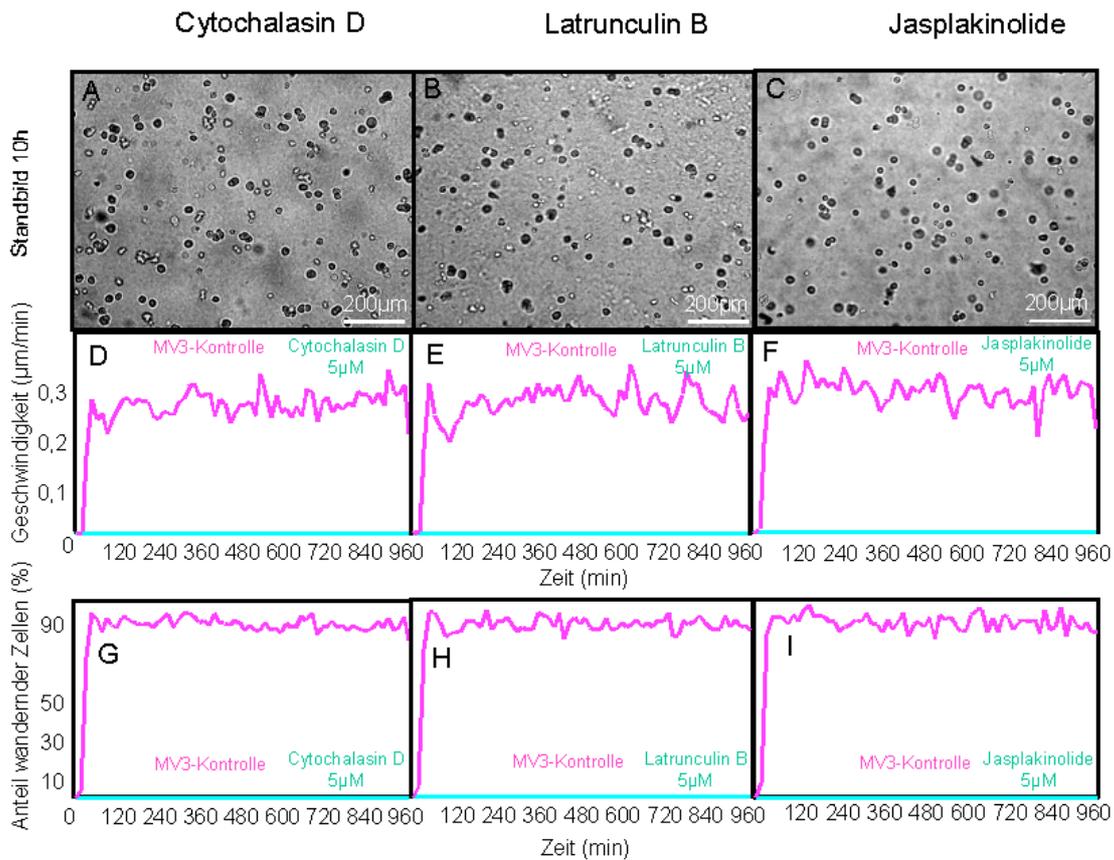


Abbildung 19: Lebende MV3 Zellen unter Inhibitoreinfluss. Nach Einpolymerisation lebender MV3 Zellen zusammen mit 5 μM Cytochalasin D (A, D, G; Film 15), 5 μM Latrunculin B (B, E, H; Film 16) und 5 μM Jasplakinolide (C, F, I; Film 17) wurden diese 16 h videomikroskopisch gefilmt. A-C: Hellfeldmikroskopie mit Cytochalasin D (A), Latrunculin B (B) und Jasplakinolide (C) nach 10 h Echtzeit. G-I: prozentualer Anteil wandernder Zellen. D-F: Migrationsgeschwindigkeit. Rosa, Kontrollzellen; türkis, mit Inhibitor versetzte Zellen. Die Kontrollpopulation entspricht der in Abb. 9 B. Vgl. Film 4.

Einzelzellanalysen ergaben, dass unter Einfluß von Cytochalasin D (Abb. 20 D, G), Latrunculin B (Abb. 20 E, H) und Jasplakinolide (Abb. 20 F, I) bei den etablierten Konzentrationen von 5 μM keine Zelle wanderte. Die hemmstofffreien Kontrolleinzellen erreichten Migrationsgeschwindigkeiten von 0,22 - 0,27 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 20 D-F) bei einer Mobilität von 60 – 98 % innerhalb der Beobachtungszeit (Abb. 20 G-I).

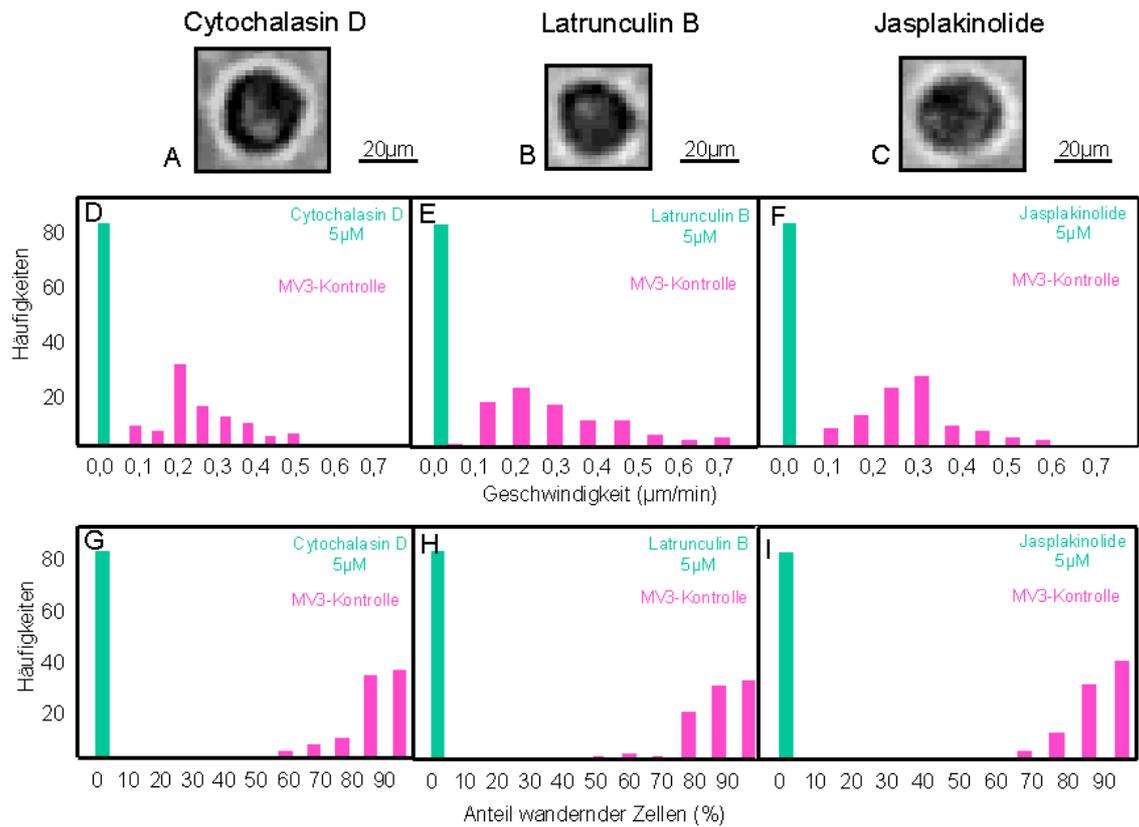


Abbildung 20: Zellmorphologie, Geschwindigkeiten und Mobilität von einzelnen MV3 Zellen unter Hemmstoffwirkung. Morphologie und Effizienz der Migration während der Inkubation mit Cytochalasin D (A; Film 15), Latrunculin B (B; Film 16) und Jasplakinolide (C; Film 17). D-F: Verteilung der Migrationsgeschwindigkeit. G-I: Verteilung der Mobilität. rosa, Kontrollzellen; türkis, inhibierte Zellen; spindelförmige Morphologie der Kontrollzellen vgl. Abb. 9 B, Film 4; Methodik vgl. Abb. 19.

3.5.5. Charakteristische Blockade der Aktinpolymerisation fixierter, Phalloidin gefärbter MV3 Zellen durch die Inhibitoren

Zur Bestätigung der tumorzellartunabhängigen charakteristischen Wirkung der pharmakologischen Inhibitoren Cytochalasin D, Latrunculin B und Jasplakinolide auf das Aktinzytoskelett wurden lebende MV3 Zellen zusammen mit den pharmakologischen Hemmstoffen über 12 Stunden im 3D Kollagengel inkubiert, gewaschen, mit PFA fixiert, mit Phalloidin Alexa 488 gefärbt und konfokalmikroskopisch dargestellt.

Bei mit 5 µM Cytochalasin D inkubierten MV3 Zellen fanden sich Ansammlungen von Aggregaten aus polymerisiertem Phalloidin-Aktin mit einer hohen relativen Fluoreszenzintensität (Abb. 21 D, G) an einem Zellpol im Zytoplasma (Abb. 21 A, D).

MV3 Zellen, die mit 5 μM Latrunculin B oder mit 5 μM Jasplakinolide inkubiert wurden, zeigten einen Phalloidin-Aktin-Ring unterhalb der Zellmembran (Abb. 21 B, C, E, F).

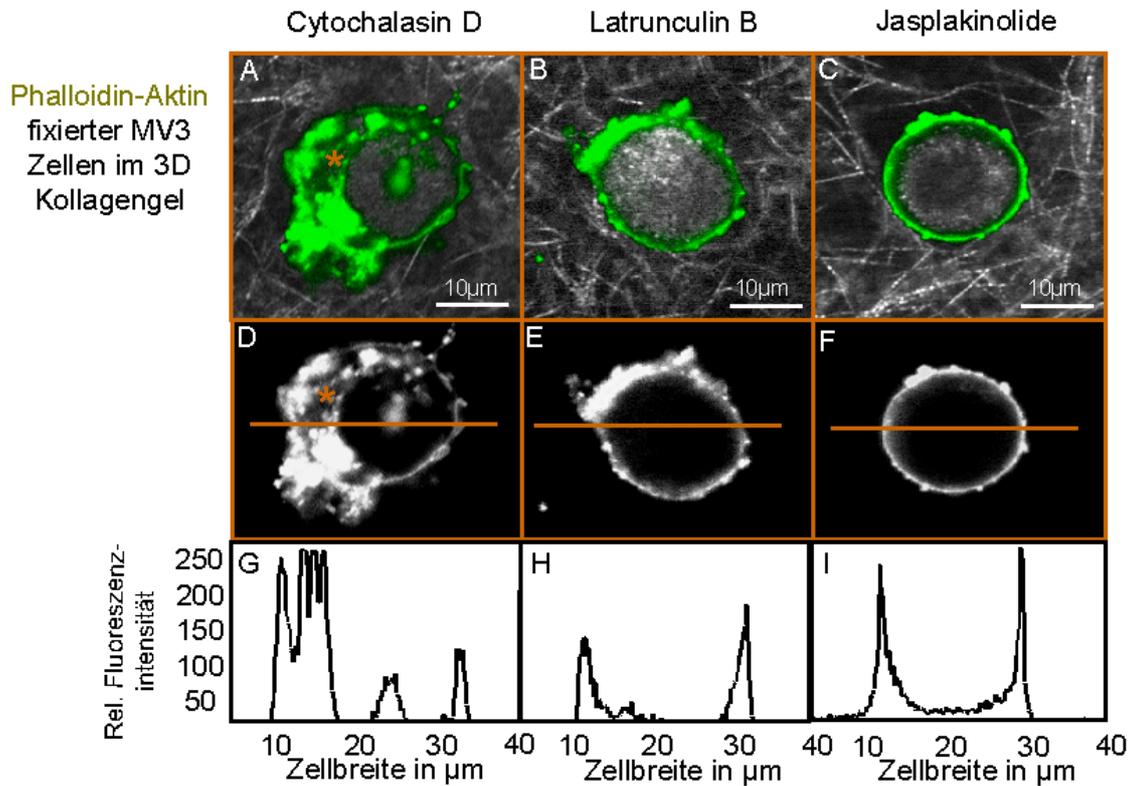


Abbildung 21: Struktur, Matrixkontakte und relative Fluoreszenzintensität des blockierten Aktinzytoskeletts fixierter, Phalloidin gefärbter MV3 Zellen. Inkubation von MV3 Zellen zusammen mit 5 μM Cytochalasin D (A, D, G), 5 μM Latrunculin B (B, E, H) und 5 μM Jasplakinolide (C, F, I). A-C: Matrixstruktur. A-F: Fluoreszenz. G-I: Relative Fluoreszenzintensität entlang der orangefarbenen Linie. Methodik vgl. Abb. 17. Versuchsbedingungen vgl. Abb. 19. *, Aktinaggregate.

Die steht im Widerspruch zu den Ergebnissen bei den B16/F1 GFP-Aktin Zellen (vgl. 3.5.3.; Abb. 18 I) und lässt sich sowohl durch eine konzentrationsabhängige Steigerung der Aktinpolymerisation durch Jasplakinolide (Senderowicz et al., 1995) als auch durch eine kompetitive Hemmung zwischen Jasplakinolide und Phalloidin bei der Bindung an polymerisierte Aktinfilamente (Abb. 1) aufgrund der höheren Inhibitorkonzentrationen erklären (Senderowicz et al., 1995).

3.5.6. Vergleich der Wirkung der pharmakologischen Hemmstoffe des Aktinzytoskeletts auf B16/F1 GFP-Aktin Zellen und auf MV3 Zellen

B16/F1 GFP-Aktin Zellen sind bekannt als mäßig wandernde, weniger metastogene Melanomzellen im Vergleich zu den hoch invasiven, rasch metastasierenden humanen MV3 Melanomzellen (Filder et al., 1975; Fidler und Nicolson, 1976; Fidler und Nicolson, 1978; Poste et al. 1980; Poste et al. 1981; van Muijen et al. 1991; Danen et al., 1993). Während für die B16/F1 GFP-Aktin Zellen eine subtotale Hemmung der Zellmigration unter nicht toxischen Bedingungen bei 0,5 μM Cytochalasin D, 1 μM Latrunculin B und 1,5 μM Jasplakinolide gelang (Tab. 7), waren zur vollständigen Hemmung der Migration von MV3 Zellen bis zu 10fach höhere Konzentrationen notwendig (Tab. 8). Für die B16/F1 GFP-Aktin Zellen wurde ein engerer Toleranzbereich (Tab. 7) gegenüber den Inhibitoren als bei den MV3 Zellen gefunden (Tab. 8). Die Viabilität betrug bei beiden Zelllinien nach 24-stündiger Inkubation mit den Inhibitoren bei Standardkonzentrationen über 80 %, jedoch war für B16/F1 GFP-Aktin Zellen die Viabilität ab Konzentrationen ab 1,5 μM deutlich verringert.

Tabelle 7: Dosiswirkungsbereich der pharmakologischen Aktininhibitoren für B16/F1 GFP-Aktin Zellen

	keine Wirkung	eingesetzte Dosis	toxische Wirkung
Cytochalasin D	0,2 μM	0,5 μM	1,5 μM
Latrunculin B	0,5 μM	1,0 μM	1,5 μM
Jasplakinolide	1,0 μM	1,5 μM	2,0 μM

Tabelle 8: Konzentrationen der pharmakologischen Hemmstoffe des Aktinzytoskeletts für die MV3 Melanomzellen

	keine Wirkung	eingesetzte Dosis	toxische Wirkung
Cytochalasin D	1 μM	5 μM	10 μM
Latrunculin B	2 μM	5 μM	10 μM
Jasplakinolide	1,5 μM	5 μM	10 μM

Zellmorphologie, Migrationseffizienz und Struktur des Aktinzytoskeletts zeigten in beiden Tumorzelllinien nahezu identische Befunde. Ein Unterschied lag in der Darstellbarkeit des im Zytoplasma vorliegenden monomeren GFP-Aktins in Anwesenheit von Latrunculin B und Jasplakinolide. GFP-Aktin zeigte eine diffuse zytoplasmatische Verteilung (Abb. 18 B, E), während Phalloidin ausschließlich kortikale oder fokalisierte Aktinaggregate darstellte (Abb. 18 B, H). Ein zarter Ring aus polymerisiertem Aktin unterhalb der Zellmembran zeigte GFP-Aktin bei mit Jasplakinolide inkubierten B16/F1 GFP-Aktin Zellen (Abb. 18 C, F) und Phalloidin-Aktin bei MV3 Zellen (Abb. 21 C, F). Warum diese Zone polymerisierten Aktins in MV3 Zellen, nicht jedoch in B16/F1 GFP-Aktin Zellen darstellbar ist, ist unklar. Zusammenfassend belegen diese Befunde ein uniformes Muster des Aktinzytoskeletts nach Zugabe der Inhibitoren in beiden Zelltypen. Der wichtigste Unterschied lag in der relativen Resistenz von MV3 Zellen, die 10fach höhere Inhibitorkonzentrationen für gleiche Wirksamkeit erforderte.

In Kontrollversuchen wurden die Inhibitoren in den etablierten Konzentrationen nach einer hemmstofffreien Kulturdauer von 5 Stunden jeweils zu den B16/F1 GFP-Aktin Zellen und zu den MV3 Zellen gegeben. In beiden Kulturen kam es zu einer Abrundung der bereits elongierten und migrierenden Zellen mit nachfolgenden Migrationsstop.

3.6. Messung der Viabilität der B16 GFP-Aktin Zellen und der MV3 Zellen nach Ablauf eines Versuches sowie unter Inhibitoreinfluss

Um sicher zu stellen, dass weder die lange Versuchsdauer bei den Migrationsversuchen noch die eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren des Aktinzytoskeletts einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen während der Kultur in 3D Kollagenmatrices haben, wurde die Viabilität nach Kollagenaseverdau, Färbung mit Propidiumiodid und Durchflusszytometrie (siehe 2.6.) untersucht.

Sowohl die B16/F1 GFP-Aktin Zellen als auch die MV3-Zellen überlebten eine Versuchsdauer von 24 Stunden im dreidimensionalen Kollagengel. Zeitgleich mit Cytochalasin D (0,5 μM), Latrunculin B (1 μM) und Jasplakinolide (1,5 μM) inkubierte B16/F1 GFP-Aktin Zellen zeigten eine Viabilität zwischen 80-90 %, ebenso die MV3 Zellen bei einer Inhibitorkonzentration von 5 μM (80-91 %). Der Einsatz der Inhibitoren in den standardisierten Konzentrationen wirkte somit nur funktionell und nicht zytotoxisch auf die Tumorzelllinien.

3.7. Aktinverteilung migrierender MV3 Zellen

Die Dynamik der Struktur des Aktinzytoskeletts wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen im 3D Kollagen war fluoreszenzoptisch gut darstellbar. Da jedoch B16/F1 GFP-Aktin Zellen im 3D Kollagengel nur mäßig wandern, wurde zusätzlich die Aktinverteilung deutlich stärker invasiver humaner MV3 Zellen vergleichend beurteilt.

MV3 Zellen wandern mit Hilfe von $\beta 1$ -Integrinen, geklustert an Kontaktstellen zu Kollagenfasern, und Matrixproteolyse durch die dreidimensionale Umgebung (Friedl et al., 1997; Maaser et al., 1999). Dabei bilden sie wie die B16/F1 GFP-Aktin Zellen eine elongierte, spindelförmige (mesenchymale) Zellform aus. Die Aktinverteilung fixierter MV3 Zellen zeigte mehrere wesentliche Unterschiede zu B16/F1 GFP-Aktin Zellen.

An der Spitze des führenden Pseudopods, der genau wie bei den B16/F1 GFP-Aktin Zellen als definierte Vorderfront diente und im Kontakt mit den Kollagenfasern der extrazellulären Umgebung stand, fand sich eine Anhäufung von polymerisiertem Aktin (Abb. 22 A, D) mit einer hohen relativen Fluoreszenzintensität (Abb. 22 A, C) im Vergleich zum restlichen Zellkörper. Entlang der Zellmembran zeigte sich ein schmaler Streifen aus F-Aktin mit einem zusätzlichen seitlichen Pseudopod, der durch die Phalloidin färbung gut detektiert werden konnte (Abb. 22 A). Aktinfragmente mit einer

hohen relativen Fluoreszenzintensität (Abb. 22 A, C) wurden am Hinterende der Zelle entlang des Migrationspfades in die extrazelluläre Umgebung abgeworfen (Abb. 22 D). Sowohl B16/F1 GFP-Aktin Zellen als auch MV3 Zellen zeigten eine ähnliche Verteilung des monomeren und polymerisierten Aktins bei der Wanderung durch das dreidimensionale Kollagengel, was für teilweise tumorzellartunabhängige aber dennoch tumorzellspezifische Migrationsstrategien spricht (Friedl et al., 1998). Es waren jedoch Varianten hinsichtlich der Menge des F-Aktins und des Recycling zwischen MV3 und B16/F1 GFP-Aktin Zellen erkennbar. MV3 Zellen haben insgesamt mehr und stärker fokalisiertes F-Aktin. Bei den B16/F1 GFP-Aktin Zellen findet sich kein Shedding. Möglicherweise korrelieren die Menge an F-Aktin innerhalb der Zelle sowie die Fähigkeit zum Abwerfen von Aktin-Zellmembrankomplexen mit der Aggressivität der Tumorzelle.

3.8. Struktur des Aktinzytoskeletts und Integrinverteilung in wandernden MV3 Zellen

MV3 Melanomzellen stellen ein gut definiertes Modell des β 1-Integrin abhängigen mesenchymalen Migrationstyps in 3D Kollagenmatrices dar. Daher sollte für diesen Zelltyp geklärt werden, ob die Fokalisierung von β 1-Integrinen an Kontaktstellen zu Kollagenfasern mit einer Aktinakkumulation oder auch Bildung von Stressfasern einhergeht (Maaser et al., 1997). F-Aktin war in migrierenden MV3 Zellen ausschließlich in Zellprotrusionen in Kontakt mit Kollagenfasern darstellbar, während andere Zellregionen nur Hintergrundfluoreszenz zeigten (Abb. 22 A, Pfeilspitzen). β 1-Integrine zeigten eine gleichmäßige Verteilung entlang der gesamten Zellmembran (Abb. 22 B) mit fokalen Mehranreicherungen in F-Aktin-positiven Zellprotrusionen, speziell an der Vorderfront der Zelle und in seitlichen Regionen (Abb. 21 B, D, Pfeilspitzen). Während die F-Aktinverteilung einen Gradienten zwischen Vorder- und Hinterende aufwies (Abb. 22 A, D), ähnlich zu B16/F1 GFP-Aktin Zellen, war die Fokalisierung der β 1-Integrine unabhängig von der Migrationsrichtung. Das Hinterende der Zelle zeigte selektive Freisetzung von β 1-Integrine, nicht jedoch von F-Aktin (Abb. 22 B, D). Für migrierende MV3 Zellen bestätigte sich somit eine funktionelle Kopplung zwischen β 1-Integrinen im Kontakt zu den Kollagenfasern der extrazellulären Umgebung und dem an diesen Stellen polymerisierten Aktinzytoskelett.

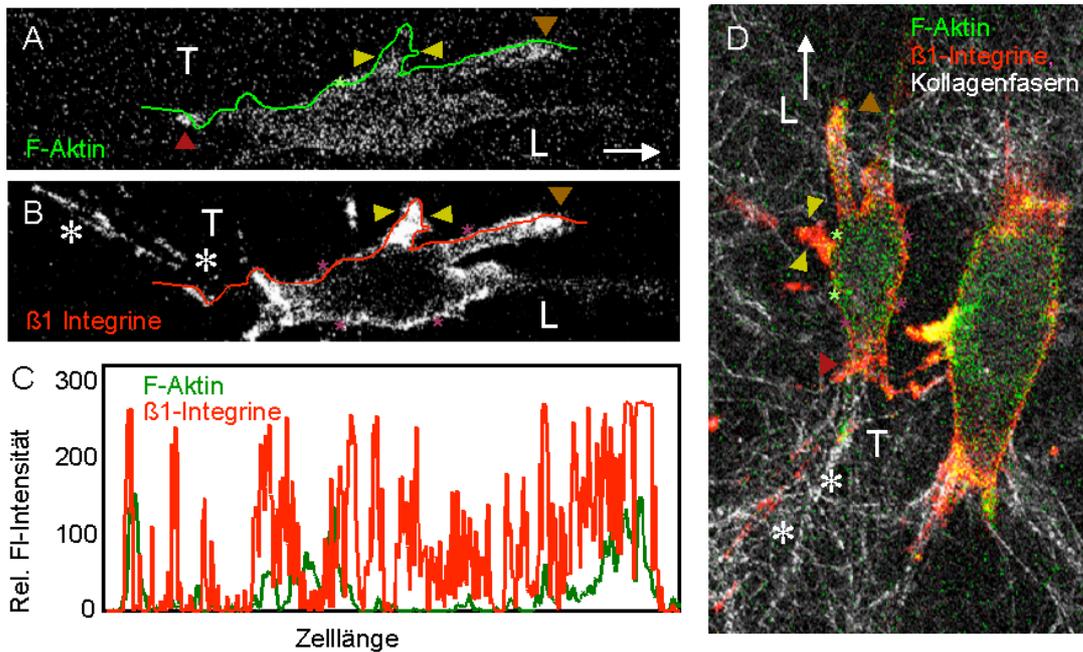


Abbildung 22: Verteilung von F-Aktin und β 1-Integrin in wandernden MV3 Zellen in einem 3D Kollagengel. A: F-Aktin. B: β 1-Integrin. C: semiquantitative Bildanalyse der relativen Fluoreszenzintensität entlang der in A und B eingezeichneten Linien. D: Kolo­kalisierung von Fluoreszenz und Reflektion. MV3 Melanomzellen in einer 3D Kollagenmatrix wurden nach 12 h Kulturdauer mit PFA fixiert, gewaschen, mit Phalloidin-Alexa 488 (grün) und mit anti- β 1 AK K20 und 4B4 (rot) gefärbt. Zur konfokalmikroskopischen Analyse im Migrationszustand wurden Zellen analysiert, die durch Freisetzung von β 1-Integrinen ein eindeutiges Hinterende aufwiesen (B, D, *). L, Vorderfront (leading edge); T, Hinterende (trailing edge); weißer Pfeil, Migrationsrichtung.

Um die Umorganisation des Aktinzytoskeletts durch Aktin-Inhibitoren in B16/F1 GFP-Aktin Zellen für MV3 Zellen zu bestätigen, wurden F-Aktin und β 1-Integrine in MV3 Zellen während der Kultur in Anwesenheit von Cytochalasin D, Latrunculin B und Jasplaklinoide untersucht (Abb. 23). Insbesondere sollte geklärt werden, ob sich durch direkte Blockade des Aktinzytoskeletts dessen Kopplung an die β 1-Integrine aufheben lässt.

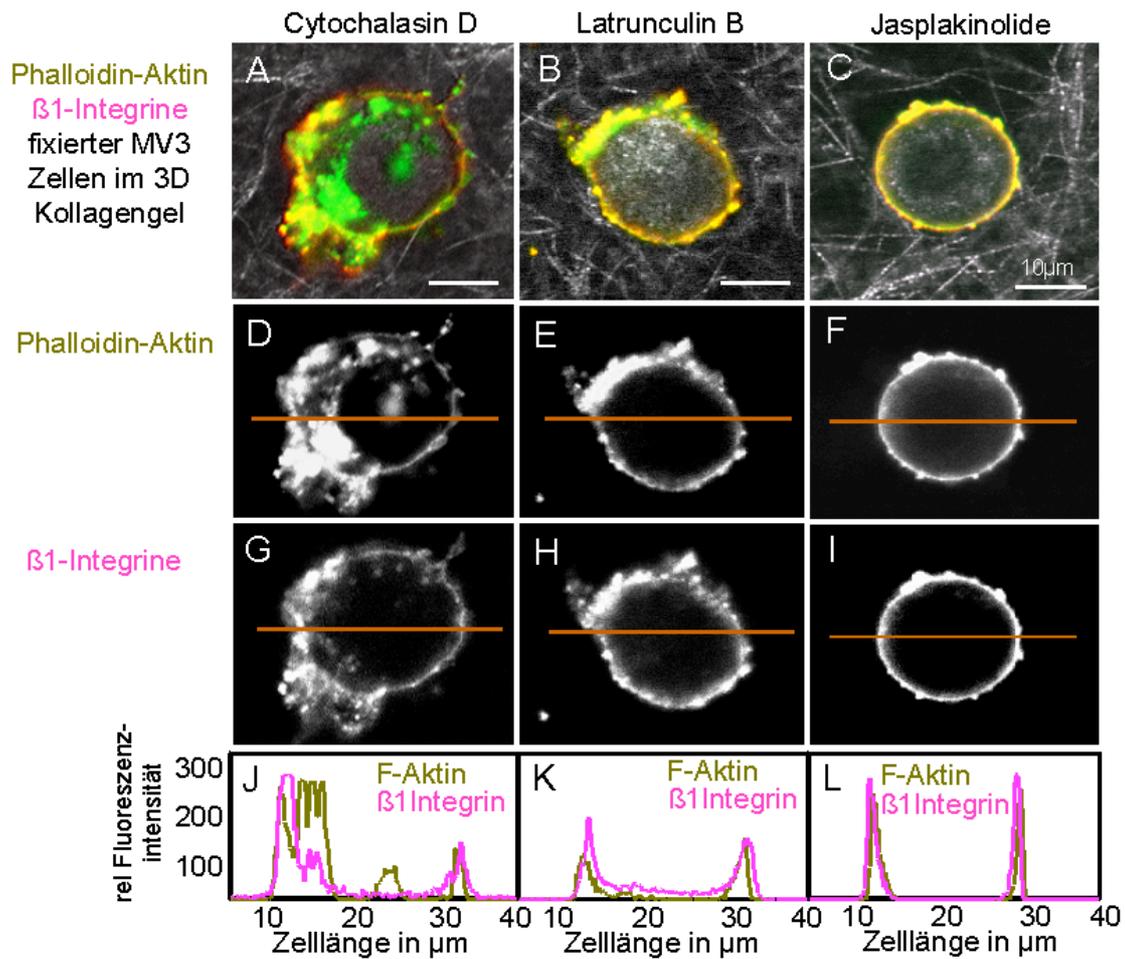


Abbildung 23: Verteilung von Aktin und $\beta 1$ -Integrinen in MV3 Melanomzellen nach Zugabe von Inhibitoren des Aktinzytoskeletts. A, D, G: 5 μ M Cytochalasin. B, E, H: 5 μ M Latrunculin B. C, F, I: 5 μ M Jasplakinolide. A-I: Darstellung zentraler Zellschnitte. gelbe Fluoreszenz, Kollokalisierung von F-Aktin und $\beta 1$. Grauwerte in A-C: Reflexion der Kollagenfasern. J-L: Analyse der relativen Fluoreszenzintensität von F-Aktin und $\beta 1$ -Integrinen entlang der orangefarbenen Linie in D-I. Methodik vgl. Abb. 22.

Cytochalasin D induzierte eine starke homogene Kollokalisierung von Phalloidin-Aktin und $\beta 1$ -Integrinen bei zugleich vollständig aufgehobener Zellpolarisierung (Abb. 22 A). Intrazelluläre membranernahe Aggregate aus F-Aktin kollokalisieren partiell mit Klustern aus $\beta 1$ -Integrinen (Abb. 22 A).

Nach Inhibition mit Latrunculin B (Abb. 22 B) und mit Jasplakinolide (Abb. 22 C) waren F-Aktin und β 1-Integrin homogen entlang der Zellmembran verteilt und kolokalisiert (Abb. 22 K, L).

Die Blockade des Aktinzytoskeletts entkoppelt die Zelle von der umgebenden ECM, bewirkt eine Abrundung und eine je nach eingesetztem Inhibitor charakteristische Verteilung des Aktins in der Zelle. Der Phänotyp ähnelt dem, der nach Blockade von Oberflächenintegrinen auftritt (Friedl und Wolf, 2003). Es ist jedoch unklar, in welchem Bindungszustand Integrine zum Aktinzytoskelett nach Inhibition verbleiben.

3.9. Kraftübertragung wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf verschiedene Kollagenumgebungen

Fibroblasten deformieren die extrazelluläre Matrix auf 2D und in 3D und üben eine Kraft auf sie aus, die mit Hilfe von Vektoren zu quantifizieren versucht wurde (Petroll et al., 2003; Petroll et al., 2004). Limitiert sind diese Untersuchungen jedoch durch das Fehlen der zeitlichen Auflösung der Interaktion der Fibroblasten mit der extrazellulären Matrix (vgl. 1.6.). Anknüpfend an Petrolls Untersuchungen wurde in dieser Arbeit die aktive, dynamische Interaktion des Aktinzytoskeletts über oberflächenabhängige, charakteristische Aktinstrukturen wandernder Tumorzellen auf 2D sowie in 3D Kollagenumgebungen konfokalmikroskopisch, zeitlich aufgelöst dargestellt (Abb. 24) und bildanalytisch quantifiziert.

3.9.1. 2D monomere Kollagenoberfläche

Auf der 2D monomeren Kollagenoberfläche bildeten die B16/F1 GFP-Aktin Zellen nach Adhäsion aktinreiche, kontinuierliche Lamellen aus (vgl. 3.4.1.). 2 funktionell relevante Verteilungsmuster waren darstellbar: a) unipolare Ausbildung und b) multifokale Lamellen. Bei unipolarer Ausbildung kam es zur Zellmigration (Abb. 25 B; Film 6;). Der Zellkörper einschließlich Zellkern wurde in Richtung polar ausgerichteter, „führender“ Lamellen gezogen (Abb. 25 B; Film 6). Bei gleichzeitig vorliegenden Lamellen in entgegengesetzte Richtungen hoben sich die Vektoren auf, so dass keine Netto-Wanderung erfolgte (Abb. 25 A; Film 5).

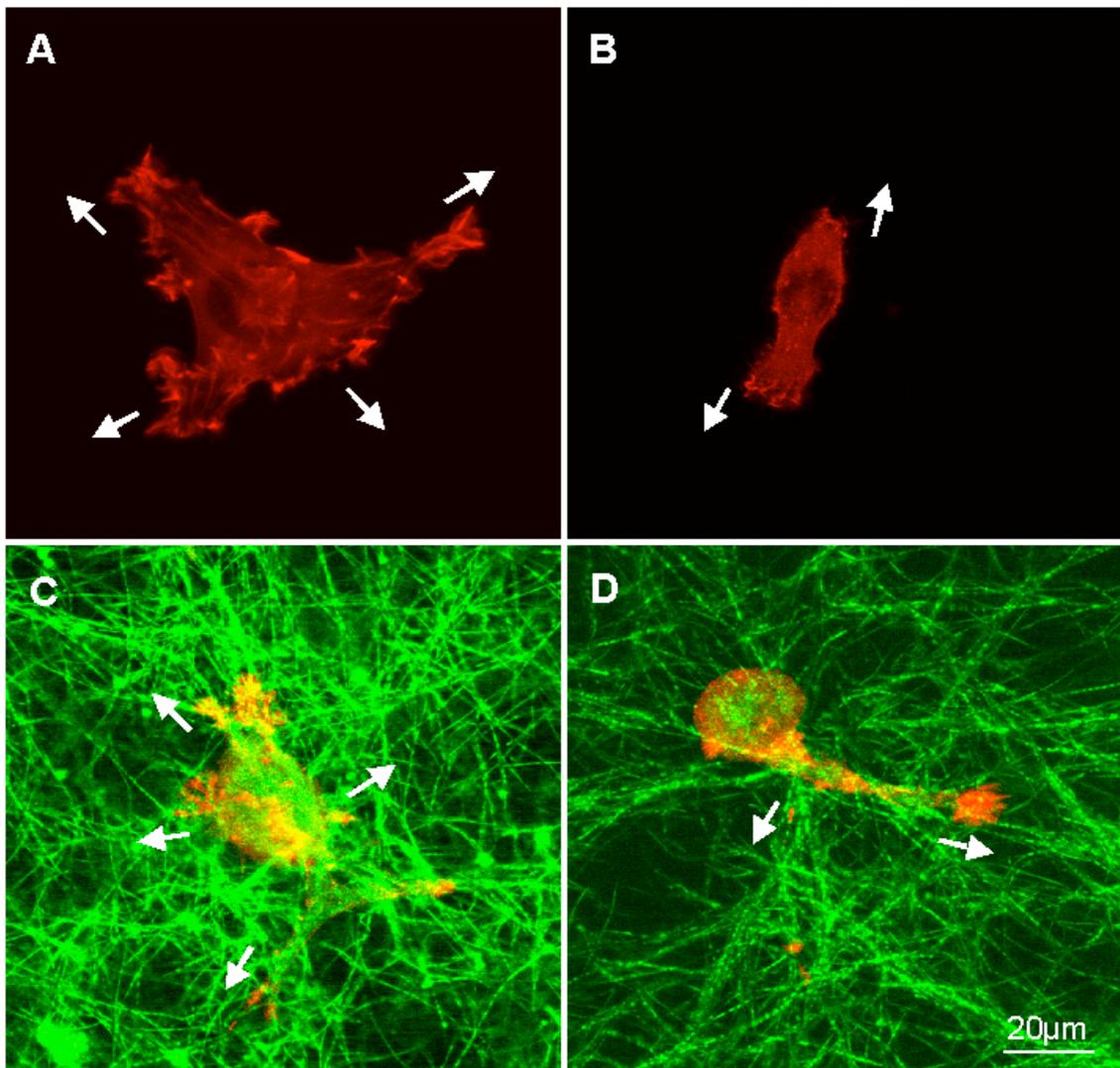


Abbildung 24: Diversität der Zellmorphologie und Ausbildung protrusiver Kompartimente in Abhängigkeit von der Biophysik der Kollagenmatrix. Startbilder einer Filmsequenz wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen. A, B: 2D monomere Kollagenoberfläche (Film 5, Film 6). C: 2D fibrilläre Kollagenoberfläche (Film 7). D: 3D fibrilläre Kollagenmatrix (Film 8). Rot, GFP-Aktin. Grün, Reflexion der Kollagenfasern. Weiße Pfeile, Aktinreiche Vorderfronten unterschiedlicher Morphologie und Richtung (Lamelli-/Pseudopodien).

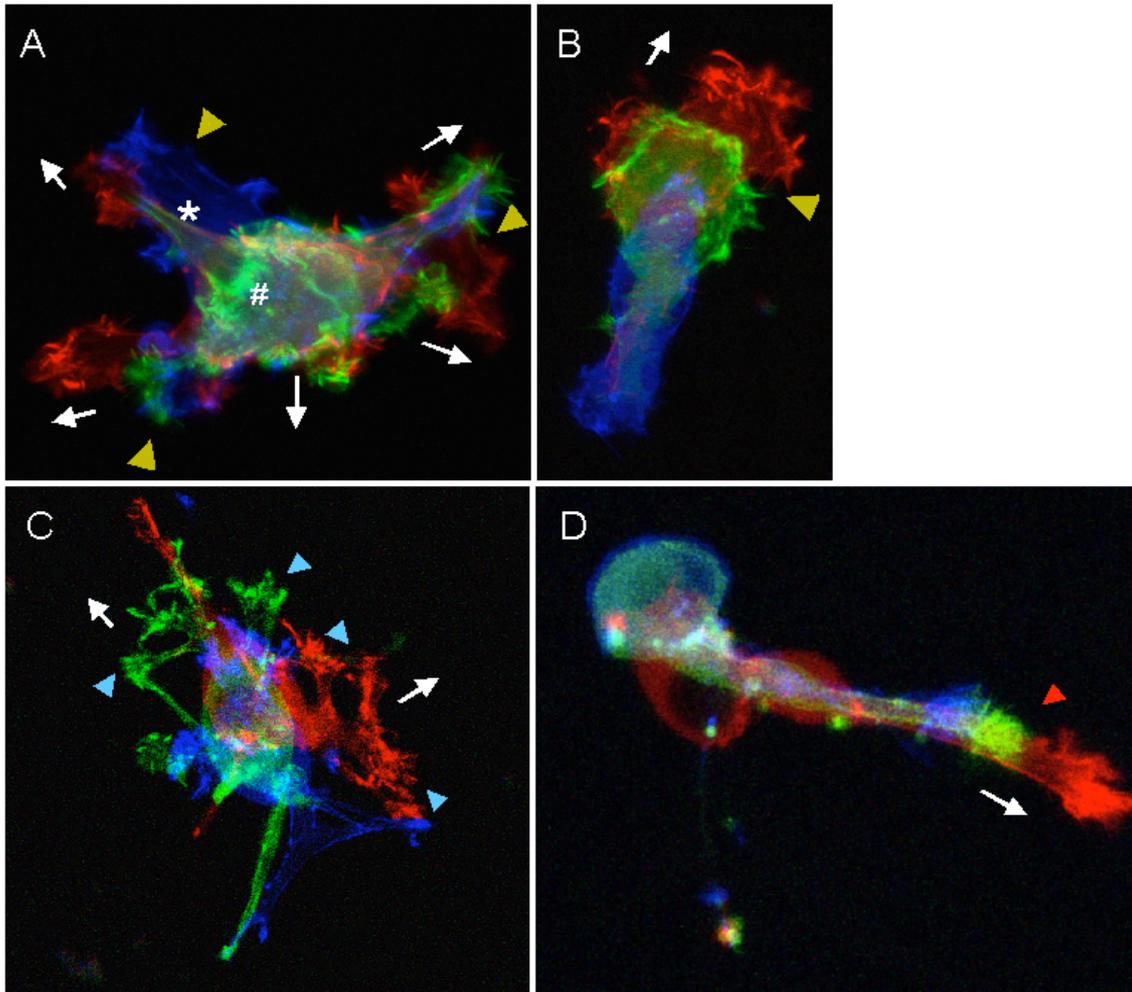


Abbildung 25: Migrationsformen in physikalisch unterschiedlichen Kollagenumgebungen. A-D: Falschfarbendarstellung konfokaler Fluoreszenzbilder des GFP-Aktin-Kanals aus Abb. 24 für 3 aufeinanderfolgende Zeitpunkte t_1 , blau; t_2 , grün; t_3 , rot; weiße Pfeile, aktinreiche Protrusionen (Pseudo-/Lamellipodien); *, Stressfasern; #, Lamelle unterhalb des Zellkörpers; türkisfarbene Pfeilköpfe, Pseudopodien mit terminalen Filopodien einer fragmentierten Lamelle.

Auf 2D monomeren Kollagen führte die glatte, kontinuierlich-hindernisfreie mit Kollagen beschichtete Glasoberfläche zur Ausbildung flacher, kontinuierlicher Lamellen in alle Richtungen (Abb. 25 A, B). Aktive Migration war jedoch überwiegend mit unipolar ausgerichteten Lamellen assoziiert (Abb. 25 B, Film 6). Bei unipolarer Ausbildung führte eine breite kontinuierliche Lamelle zu einer gerichteten Migration in Richtung der Lamelle (Abb. 25 B; Film 6). In Phasen aktiver Migration waren selten in andere Richtungen zeigende Lamellen oder Stressfasern darstellbar (Abb. 25 B). Im

Fälle multipler, teils in unterschiedliche Richtungen zeigende Lamellen folgte trotz starker Ruffling-Aktivität ein wenig motiler, oft sessiler Zustand (Abb. 25 A, Film 5).

3.9.2. 2D fibrilläre Kollagenoberfläche

B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf 2D fibrillären Kollagenoberflächen (vgl. 3.4.2.) bewegten sich auf einem hindernisfreien Substrat, das die Ausbildung von Lamellen in alle Richtungen ermöglichte (Abb. 24 C, Film 7). Aufgrund einer löchrigen, diskontinuierlichen fibrillären Oberflächenbeschaffenheit waren Zellprotrusionen in der Regel schmalbasig fragmentiert und glichen länglichen aktinreichen Pseudopodien mit multiplen terminalen, fingerförmigen Filopodien, die mit den Kollagenfasern interagierten (Abb. 25 C, Film 7). Aktive Migration resultierte, wenn die Mehrheit dieser Pseudopodien polar ausgerichtet war (Abb. 26 A, B türkis oder orange). Die Migrationsrichtung folgte einem mittleren Vektor zwischen den beiden oder mehreren dominanten Fronten (Abb. 26 B, schwarzer Vektor). Eine Richtungsänderung der Migration ergab sich dann infolge Änderung der Balance mehrerer Fronten auf der Basis abnehmender Zahl bzw. Zugkraft von Pseudopodien in die bisherige (Abb. 26, türkise Farbkodierung) und Zunahme in die neu eingeschlagene Richtung (Abb. 26, orange Farbkodierung). Die Geschwindigkeit des Zellkörpers korrelierte dabei nicht mit der absoluten Anzahl an Kollagen bindenden Pseudopodien (Abb. 26 D weiße Kurve). Während der Migration kam es zu einer sichtbaren Deformation der Kollagenfasern, die auf eine Kraftübertragung der Zelle auf das Substrat schließen lässt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die Reorganisation der ECM, die simple Interaktion stationärer Zellen (Petroll et al.; 2003) mit dem Substrat als auch die Zellmigration mit einer Deformation der Kollagenmatrix einhergehen. Petrolls Beobachtungen an Fibroblasten (Petroll et al., 2003) wurden somit für neoplastische Zellen bestätigt.

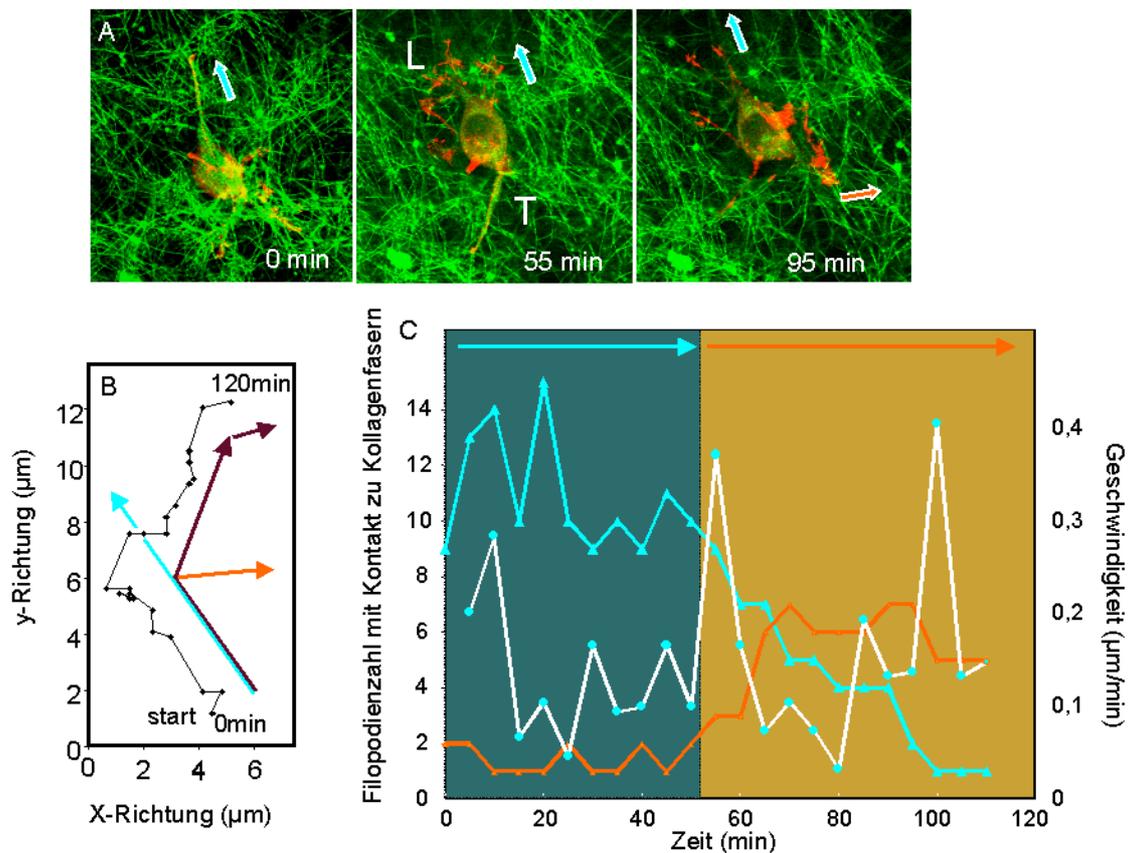


Abbildung 26: Traktionsvektoren, Migrationspfad, Migrationsgeschwindigkeit und Filopodienzahl einer auf 2D fibrillären Kollagenoberfläche wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle. A: Konfokale Zeitserie (rot: GFP-Aktin; grün: Kollagenfasern), Pfeile, Hauptvektoren (vgl. 25 B). B: Migrationspfad (schwarz) und zu Grunde liegende Einzelvektoren (türkis, orange). C: Migrationsgeschwindigkeit (weiß) in Abhängigkeit von der Anzahl einzelner Pseudo-/Filopodien im Bereich der beiden Hauptvektoren (türkis, orange). Vgl. Film 7.

3.9.3. 3D fibrilläres Kollagengel

Im Gegensatz zu den beiden 2D Umgebungen entwickelten sich in 3D Kollagenmatrices ausschließlich spindelförmig migrierende Zellen, die 1 bis maximal 3 größere zylindrische Pseudopodien mit multiplen aktinreichen Interaktionen zu Kollagenfasern ausbildeten (Abb. 11, 27). In wandernden Zellen bildete reproduzierbar ein dominanter Pseudopod in Migrationsrichtung Interaktionen mit Kollagenfibrillen aus und bewegte sich – und den nachfolgenden Zellkörper – entlang dieser Zugrichtung (Abb. 30-32). Die Spitze des führenden Pseudopods interagiert über viele kleine aktinreiche Filopodien mit den Kollagenfasern vor der Vorderfront der Zelle (Film 8).

Diese polare Ausbildung eines dominanten Pseudopods, der durch Zug an den Kollagenfasern den Zellkörper nachzieht, war darstellbar für migrierende B16/F1 GFP-Aktin Zellen (Abb. 24 D; Film 8), MV3 Melanomzellen (Abb. 34 A; Film 18; Maaser et al., 1999) sowie HT-1080 Zellen (Film 19; Wolf et al., 2003). Im Falle der Ausbildung eines zweiten Pseudopods, in der Regel am entgegengesetzten Zellende, war die Migration aufgehoben (Abb. 27 A-F; Film 20). Im 3D fibrillären Kollagengel gab es aufgrund sterischer Faktoren keinen mittlerer Vektor.

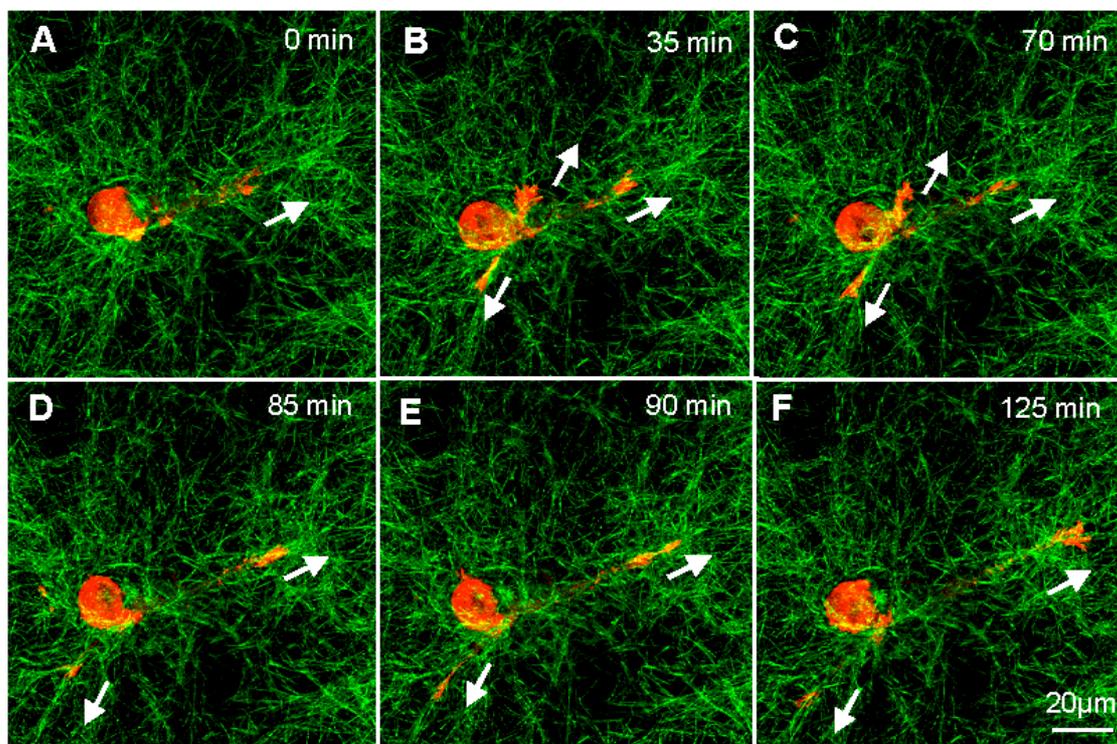


Abbildung 27: Sessiler polarisierter Phänotyp einer B16/F1 GFP-Aktin Zelle im 3D Kollagengel. A-F: Filmsequenz. A: Ausbildung eines Pseudopods in die erwartete Migrationsrichtung. B-F: Ausbildung eines zweiten Pseudopods am entgegengesetzten Zellende. Rot, GFP-Aktin; Grün, Reflexion der Kollagenfasern; weiße Pfeile, Zugrichtung der Pseudopodien anhand der Ausrichtung der Kollagenfasern. Vgl. Film 20.

Die Zusammenhänge zwischen der Interaktion der Filopodien mit Kollagenfasern, der Matrixdeformation bzw. Translokation der einzelnen Kollagenfasern, der Anreicherung von Aktin in der Spitze des führenden Pseudopods und der resultierende sichtbaren

Kraftübertragung sollten im Folgenden semiquantitativ analysiert werden. Dabei handelt es sich um ein nicht standardisiertes semiquantitatives Modell der Kraftmessung, da die Ortsänderung der Kollagenfasern, nicht aber die wirksamen Kräfte gemessen wurden.

3.9.3.1. Wandernde B16/F1 GFP-Aktin Zellen deformieren die Kollagenfasern an der Vorderfront

Die Interaktion wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen mit den Kollagenfasern der Vorderfront (vgl. Film 21) wurde mit Hilfe konfokalmikroskopischer Reflexionssequenzen der Kollagenfasern dargestellt und durch Tracken der Positionsänderung einzelner Kollagenfasern anhand markanter Bildpunkte (Pixel) quantifiziert (vgl. 2.2.8.4.). Es zeigte sich eine deutliche Translokation der getrackten Kollagenfasern assoziiert mit den Positionen des Pseudopods und einzelner Filopodien (Abb. 28). Die Kollagenpixel kv20, kv21, kv22 (Film 22) entlang des Hauptpfads zeigten ein oszillierendes Muster aus Traktion und Relaxation. Individuelle Kollagenfasern erreichten eine maximale Faserverschiebung von 0,18 $\mu\text{m}/\text{min}$ bei Traktion, d.h. Bewegung auf die Zelle zu und 0,2 $\mu\text{m}/\text{min}$ bei Relaxation, d.h. Bewegung von der Zelle weg (Abb. 29 G). Phasen der kontinuierlichen Traktion an den Kollagenfasern (Abb. 29 G, orange Kurve, 0-45 min) wechselten mit Phasen alternierender Zyklen aus Traktion und Relaxation (Abb. 29 F, G, orange Kurve 45-90 min). Die gemittelte Verschiebung für diese 3 Fasern betrug für Traktion 0,12 $\mu\text{m}/\text{min}$, für Relaxation ca. 0,1 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 29 G). Die kontinuierliche Traktion an den Kollagenfasern folgte dem Muster Traktion – Pause – Traktion – Pause, die alternierenden Zyklen dem Muster Traktion – Relaxation – Traktion – Relaxation (Abb. 29 F).

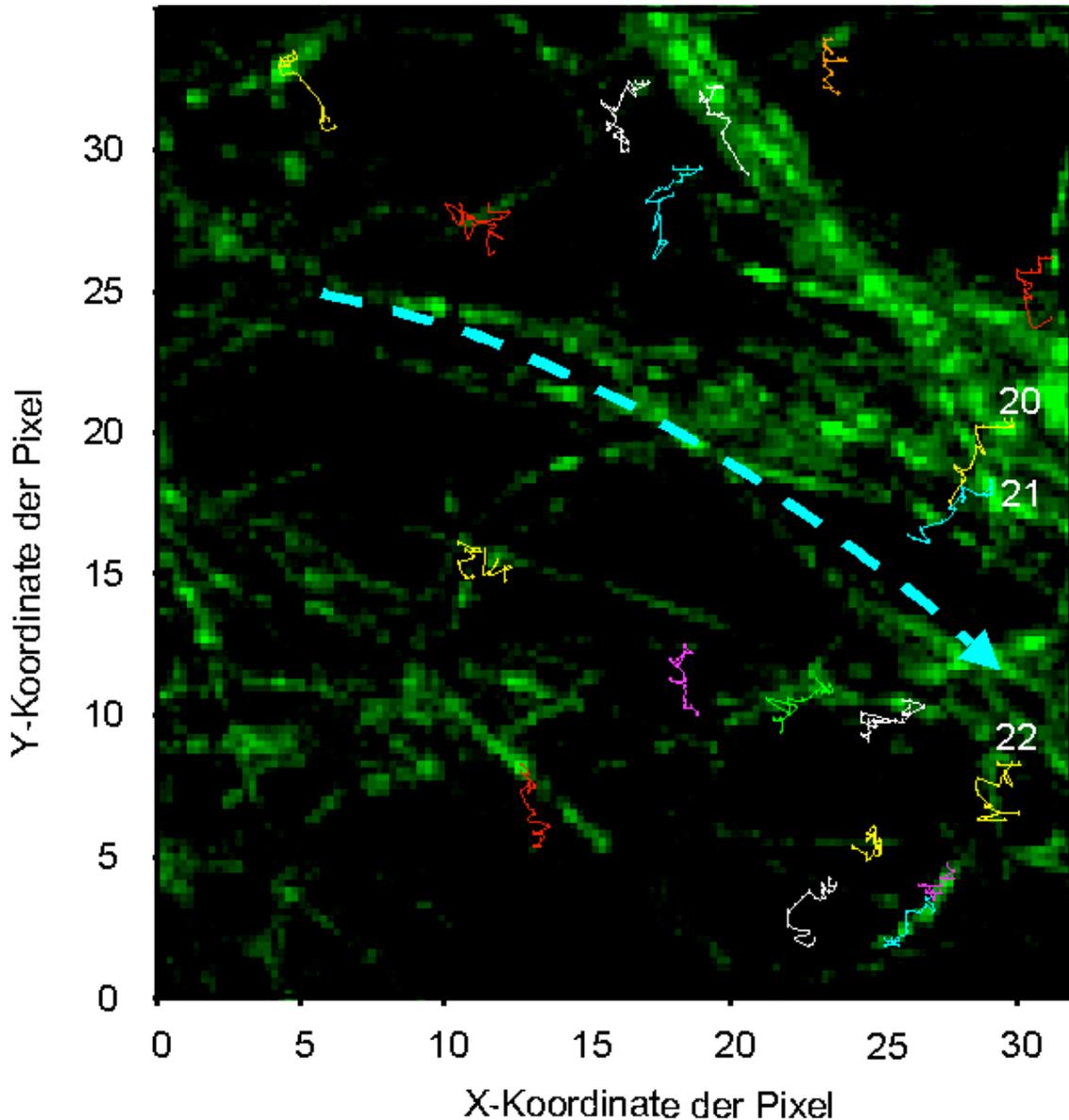


Abbildung 28: xy-Auslenkung einzelner getrackter Kollagenfasern an der Vorderfront einer wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle. Die xy Position einzelner markanter Pixel der Kollagenfasern im Matrixareal vor oder dicht neben der Vorderfront der Zelle wurde mittels digitaler Bildanalyse quantifiziert. Die lineare Verbindung zwischen den Koordinaten wurde als gerichteter Pfad (farbige Vektoren) beschrieben. Überlagerung der Pfade mit einem repräsentativen Reflexionsbild, dem Startbild der Filmsequenz. Analysiert wurden mehrere Kollagenfasern bzw. Faserschnittpunkte. Die 3 direkt entlang der Migrationsrichtung (türkisfarbene gestrichelte Linie) liegenden Kollagenpixel (20, 21, 22) wurden für weitere Analysen ausgewählt. Vgl. Film 22.

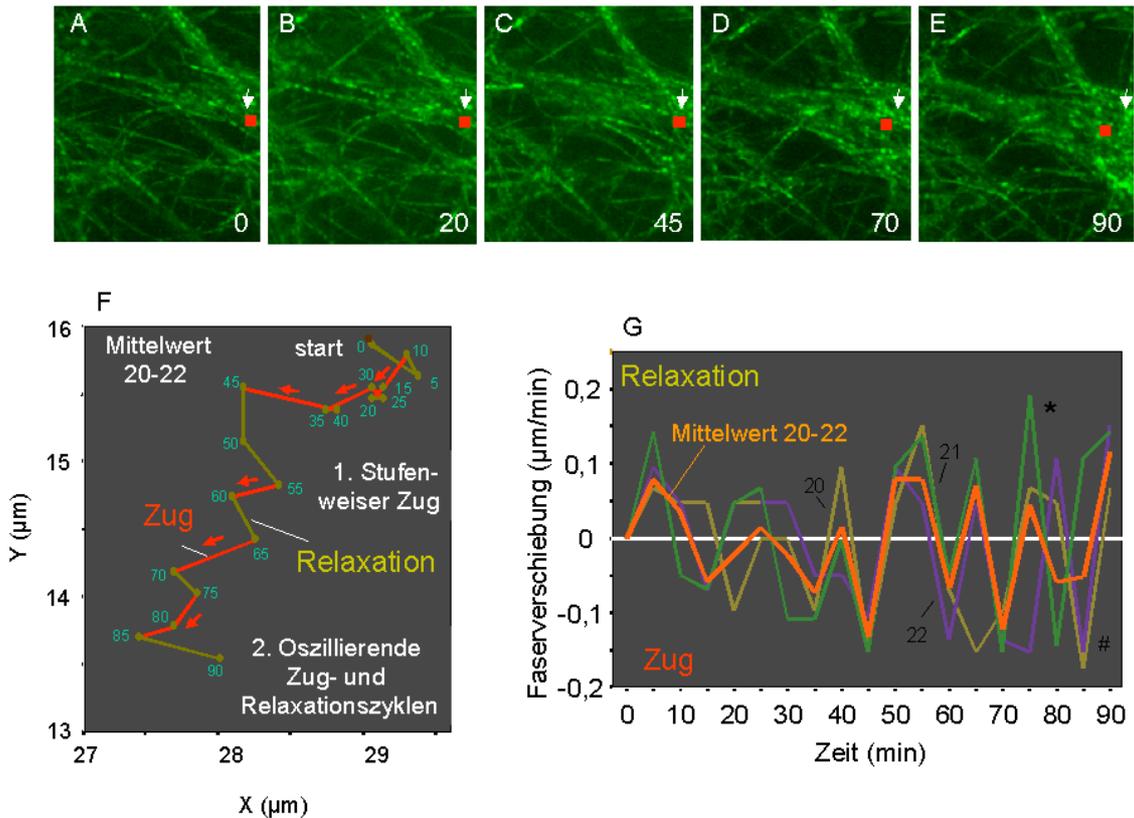


Abbildung 29: Matrixdeformation an der Vorderfront einer wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle. A-E: Beispielhafte Darstellung der Bewegung des Kollagenpixels 21 (rotes Quadrat) im Vergleich zu einem unveränderten Referenzpunkt (weiße Pfeile). F: errechneter Translokationspfad aus dem Mittelwert der Kollagenpixel 20-22 (vgl. Abb. 28). rote Pfeile, Traktion der Zelle an den Kollagenfasern auf den Zellkörper zu; grüne Teilstrecken, Relaxation und Bewegung vom Zellkörper weg; türkisarbene Zahlen, Zeit (min). G: Geschwindigkeit der Positionsänderung der Kollagenpixel 20-22. *, Negative Werte, Traktion; #, positive Werte, Relaxation. Vgl. Film 22.

3.9.3.2. Aktinreiche Filopodien wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen stehen in einer dynamischen Interaktion mit den Kollagenfasern der Vorderfront und erzeugen die vorwärtstreibende Kraft

Die Bildanalyse zeigte nach Subtraktion von Rot und Grün aus der nativen Sequenz (Abb. 30 A; Film 23) ein Zurückbleiben gelber Farbtöne an Stellen der Kollokalisierung von Filpodien (rot) und Kollagenfasern (grün) (Abb. 30 B, C; Film 24). Topographisch und funktionell ließen sich 2 Phasen unterscheiden: während die Fläche der Kollokalisierung von Filpodien und Kollagenfasern während den ersten 40 min der

Beobachtungszeit kontinuierlich zunahm (Abb. 30, Film 25), lag und zwischen der 40. und 90. Minute eine konstant hohe Kolokalisation vor (Abb. 31, Film 26).

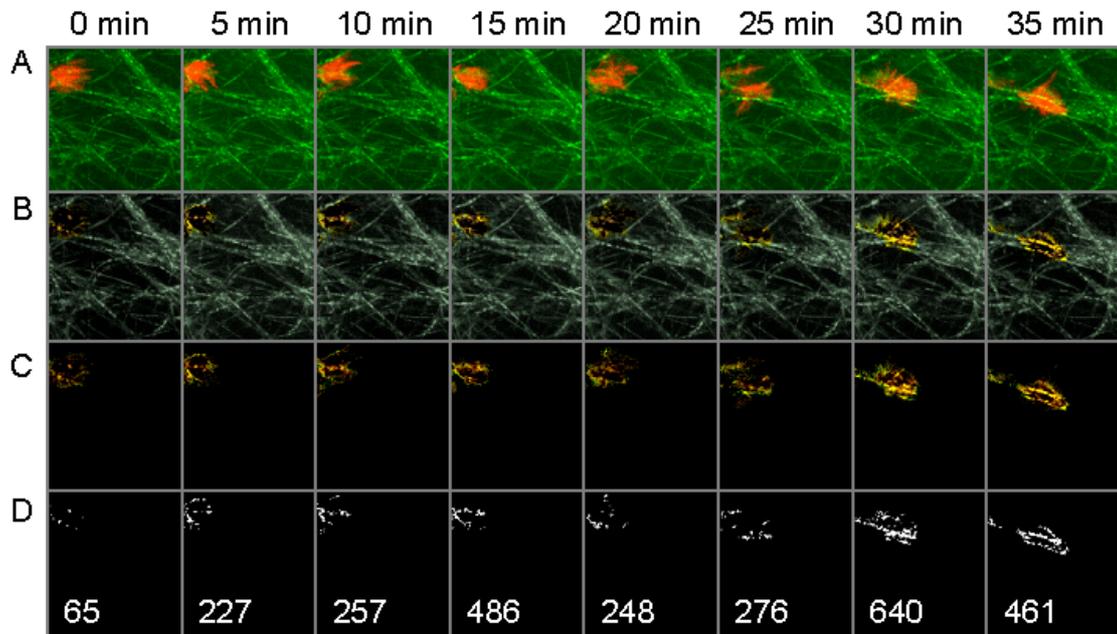


Abbildung 30: Phase 1: Zunahme der Kolokalisation von Aktin und Kollagenfasern an der Vorderfront. A: Originalsequenz (vgl. Film 23) der Filopodienbewegung (rot) und Reflexionsmuster der Kollagenfasern (grün). B: Subtraktion aller Rot- und Grüntöne und Darstellung kolokalisierter Areale in Gelb (Film 24). C: Subtraktion aller Grautöne und selektive Extraktion kolokalisierter Pixel (Film 25). D: Schwellenwertdarstellung aller kolokalisierten Pixel $>$ Pixelwert 160 für die semiquantitative Messung aller kolokalisierten Pixel als Maß für die Intensität und Stärke der Kolokalisation (Film 26). Zahlen, Anzahl kolokalisierter Pixel (vgl. Abb. 31 und 32 B).

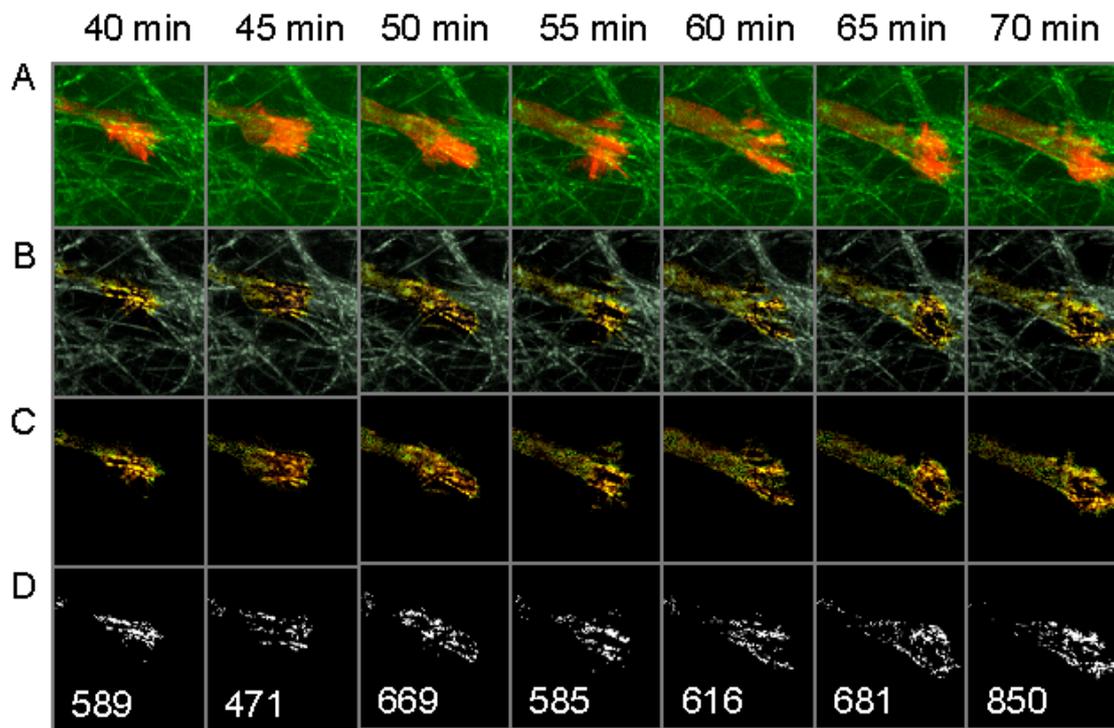


Abbildung 31: Phase 2: Konstante Kolokalisation der aktinreicher Filopodien mit Kollagenfasern an der Vorderfront einer wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle. Die Analyse erfolgte wie unter Abb. 30 beschrieben.

Eine detaillierte morphometrische Analyse der Position der zugrunde liegenden Prozesse zeigte, dass die Kolokalisation überwiegend aus 2 Formen der Interaktion resultierten: a) punktförmiger Kontakt eines Filopods mit einer Faser (Abb. 32 A) oder b) Anlagerung eines Filopods entlang einer Kollagenfaser, d.h. Topologie parallel zur Matrixstruktur. Der zeitliche Verlauf der zunehmend kolokalisierten Pixel korrelierte dabei überwiegend mit der Zunahme und mit einem Plateau der Anzahl der Filopodien mit parallelem Kollagenfaserkontakt (Abb. 32 B; 0-40 min). Die Werte schwankten zwischen 2 bis 5 parallel mit Kollagenfasern interagierenden Filopodien (Abb. 32 B). Das Prinzip der oszillierenden Interaktion wurde für eine migrierende MV3 Zelle bestätigt (vgl. 3.9.4.; Abb. 34, Abb. 35).

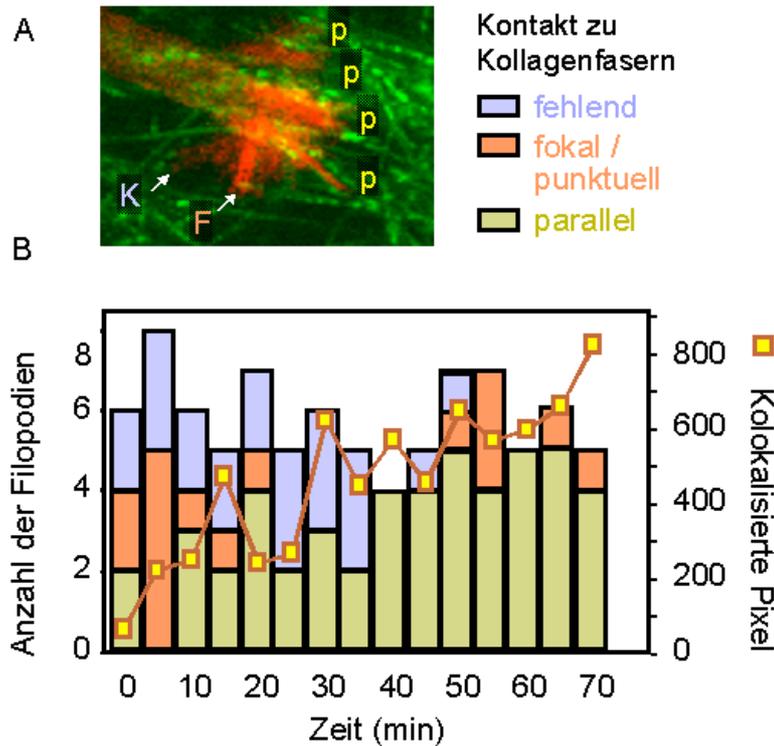


Abbildung 32: Quantifizierung der Kolokalisation aktinreicher Filopodien mit Kollagenfasern. A: Morphologische Klassifikation der Interaktion von Filopodien mit Kollagenfasern als fehlend, fokal/punktuell oder in paralleler Ausrichtung. B: Zunahme parallel zu Kollagenfasern orientierter Filopodien von Schritt zu Schritt und Korrelation mit der Anzahl kolokalisierter Pixel (vgl. Abb. 30 und 31, D).

3.9.3.3. B16/F1 GFP-Aktin Zellen wandern mit einer optimalen Zelllänge in Extensions- und Retraktionszyklen durch die 3D Kollagenumgebung

Die morphologische Analyse der Zelllänge während der Migration der B16/F1 GFP-Aktin Zelle zeigte 2 dynamische Zustände (Film 8; Abb. 33 B): eine Phase der Längenzunahme bzw. der Zelldehnung (Abb. 33 B, 0-40 min) und eine zweite Phase der Migration bei gleichbleibender Zelllänge (Abb. 33 B, 40-90 min).

Während der Längenzunahme bzw. Dehnung wanderte nur die Vorderfront (Film 8, Abb. 33 B grüne Kurve) in Zyklen aus Extension (Bewegung in Migrationsrichtung), Stillstand und teils Retraktion (Wiedereinziehen der ausgestreckten Vorderfront), während Zellkörper und Hinterende keiner Positionsänderung unterlagen. Während der Extension wurden für die Vorwärtsbewegung der Vorderfront (Abb. 33 B, grüne Kurve, positive Werte) Geschwindigkeiten bis zu $0,8 \mu\text{m}/\text{min}$ erreicht, die Retraktion (Abb. 33 B, grüne Kurve, negative Werte) erfolgte mit Geschwindigkeiten bis zu $0,4 \mu\text{m}/\text{min}$.

Die in dieser Phase durch die Vorderfront zurückgelegte Strecke betrug 10 μm . Das Hinterende blieb während der ersten 20 Beobachtungsminuten unbeweglich und folgte dann der Vorfront mit Maximalgeschwindigkeiten von bis zu 0,4 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 33 B, rote Kurve). Dabei legte es eine Strecke von 5 μm zurück. Aufgrund der Differenz der Migrationsstrecke zwischen Vorderfront und Hinterende wuchs die Zelle auf eine Länge von 80 μm , bei der sie von der Extensionsphase in die Migrationsphase überging. Die Zellbewegung anschließend war diskontinuierlich und oszillierend und resultierte aus Extension der Vorderfront (Abb. 33 B, grüne Kurve) zeitlich versetzt gefolgt von der Bewegung des Hinterendes mit Maximalgeschwindigkeiten bis zu 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 33 B, rote Kurve), wobei die Vorderfront pausierte. Die kumulativ von Vorderfront und Hinterende zurückgelegte Strecke betrug ca. 15 μm .

3.9.3.4. Der Zug der Filopodien der Vorderfront an den Kollagenfasern bestimmt die polar elongierte (mesenchymale) Zellform durch 3D Kollagengel wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen

Die Sequenz der Befunde lässt sich in eine zeitliche Abfolge der Wanderung von B16/F1 GFP-Aktin Zellen durch eine 3D Kollagenmatrix bringen (Abb. 36):

(1) Zugabhängige Extension eines Pseudopods und Elongation der Zelle: Kraftgeneration über eine zunehmende Anzahl Filopodien mit parallelem Kontakt zu den Kollagenfasern führt zu einem stufenweisen Zug der Zelle an den Kollagenfasern, teils unterbrochen von kurzen Pausen, jedoch ohne Relaxation, während das Hinterende zunächst immobil bleibt.

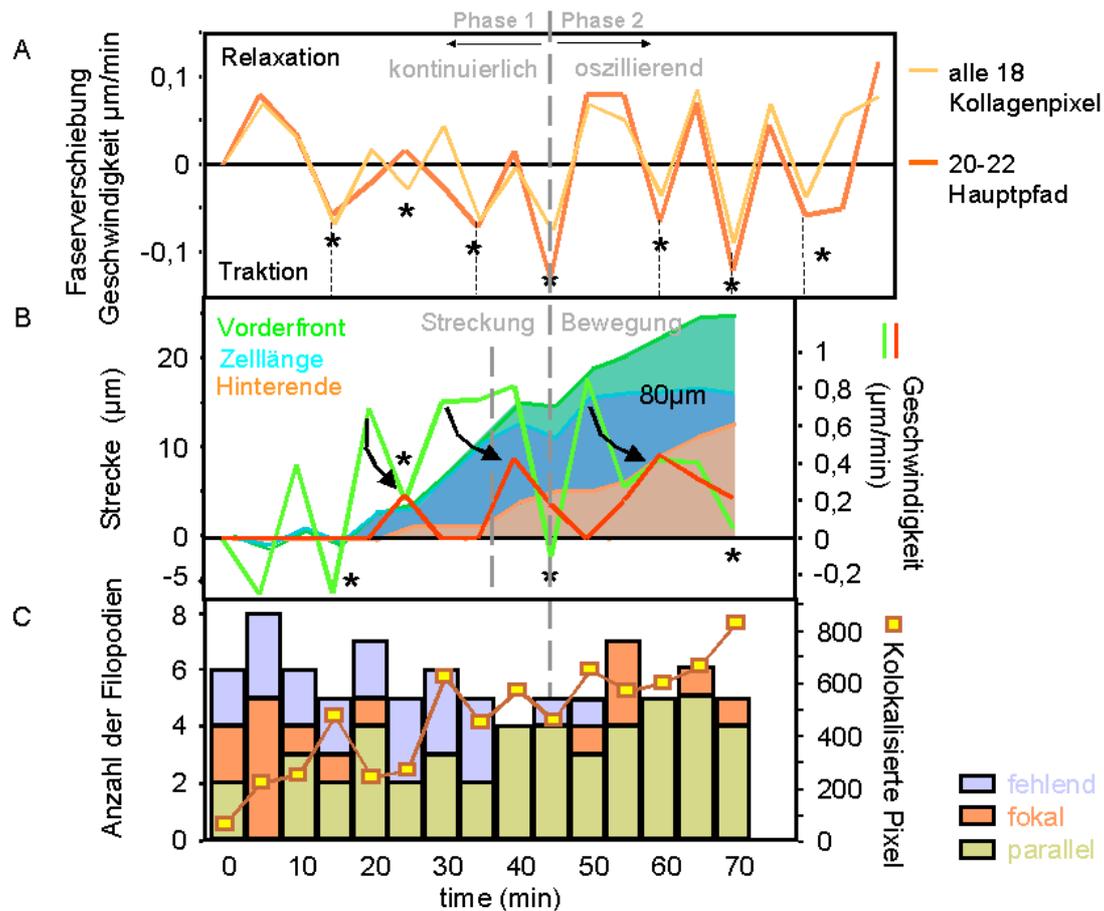


Abbildung 33: Kollagenfaserverschiebung (A), Geschwindigkeit von Vorderfront, Hinterende und assoziierte Zelllänge (B) sowie Anzahl, Positionierung und Kolokalisation aktinreicher Filopodien mit Kollagenfasern (C). A: Dynamik der Kollagenfaserbewegung an der Vorderfront der wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle, Analyse von Traktion und Relaxation (vgl. Abb. 29), Vergleich aller analysierter Kollagenfasern (hellorange) sowie der 3 direkt in Migrationsrichtung liegenden Fasern (20-22, Abb. 28). B: Geschwindigkeit der Vorderfront (hellgrün) mit Phasen der Extension und Retraktion; Geschwindigkeit des Hinterendes (rot); zurück gelegte Strecke der Vorderfront (dunkelgrün); zurückgelegte Distanz des Hinterendes (rosa); resultierende Zelllänge (blau). C: Filopodien mit fokalem (rosa), parallelem (graugrün) und ohne (hellblau) Kontakt zu den Kollagenfasern; kolokalisierte Pixel (Abb. 32); * Pfeile, assoziierte Phasen der Extension der Zellfront und Retraktion des Hinterendes, wodurch Nettobewegung resultiert.

Die Kraftgenerierung an der Vorderfront erfolgt durch eine variable Anzahl von 2-5 Filopodien, die sich parallel zu Kollagenfasern anlagern und über Zug eine reversible Deformation der ECM ausüben.

(2) *Übergangsphase bei maximaler Zelllänge*: Erreichen einer konstanten Zelllänge die im weiteren Verlauf mit beginnender Bewegung des Hinterendes gleichzeitiger Bewegung der Vorderfront beibehalten wird.

(3) *Migration der gesamten Zelle*: fortgesetzter Zug der Vorderfront über 3-5 krafterzeugende Filopodien entsteht durch Extensions- und Relaxationszyklen, gefolgt von einer diskontinuierlichen Retraktion des Hinterendes mit 5-10 min Latenz (Abb. 33 B, Pfeile).

3.9.4. Deformation der Kollagenfasern durch wandernde MV3 Zelle

Um die Übertragbarkeit dieses Prinzips auf andere Tumorzellen zu testen, wurden im Verlauf der Studien diese Parameter für humane MV3 Zellen untersucht (Abb. 34 und 35). Die konfokalmikroskopische Beobachtung einer durch die 3D Kollagenmatrix wandernden MV3 Zelle zeigte eine ähnliche Interaktion der Vorderfront mit den Kollagenfasern wie die durch 3D Kollagenmatrix wandernde B16/F1 GFP-Aktin Zelle (Abb. 34; Film 18). Die MV3 Zelle wurde während der Phase der Migration bei bereits extendierter Morphologie analysiert.

Entlang des Hauptpfads wurden je 2 Kollagenpixel gemessen und als Mittelwerte (1-2; 3-4) dargestellt (Abb. 34; Film 27). Die Verlagerung von Kollagenfasern war reversibel, entsprechend dem Wechsel von Traktion und Relaxation. Die Translokationsgeschwindigkeit einzelner Kollagenfasern (Abb. 34 B-E) lag bei maximal 0,4 $\mu\text{m}/\text{min}$ Traktion und 0,4 $\mu\text{m}/\text{min}$ Relaxation (Abb. 35 C) und somit in einer zu B16/F1 GFP-Aktin Zellen vergleichbaren Größenordnung. Die Pfade der beiden fiktiven Kollagenpixel 1-2 (Abb. 35 A) und 3-4 (Abb. 35 B) zeigten Zyklen stärkerer Auslenkung aus Traktion und Relaxation als die Pfade der Kollagenpixel der B16/F1 GFP-Aktin Zelle (Abb. 29 G). Analysen zur Migration der Vorderfront, des Hinterendes und der Zelldehnung wurden nicht erhoben werden, da die konfokale Aufnahme nur einen zentralen Schnitt durch die leicht diagonal liegende MV3 Zelle und die Kollagenmatrix und somit das Hinterende nicht komplett erfasst war. Eine Verkürzung der MV3 Zelle würde hier fälschlich als Kontraktion missinterpretiert werden.

Die Darstellung des MV3 Zellkörpers erfolgte durch Markierung von CD44, somit waren keine Rückschlüsse auf Interaktion aktinreicher Filopodien mit Kollagenfasern möglich.

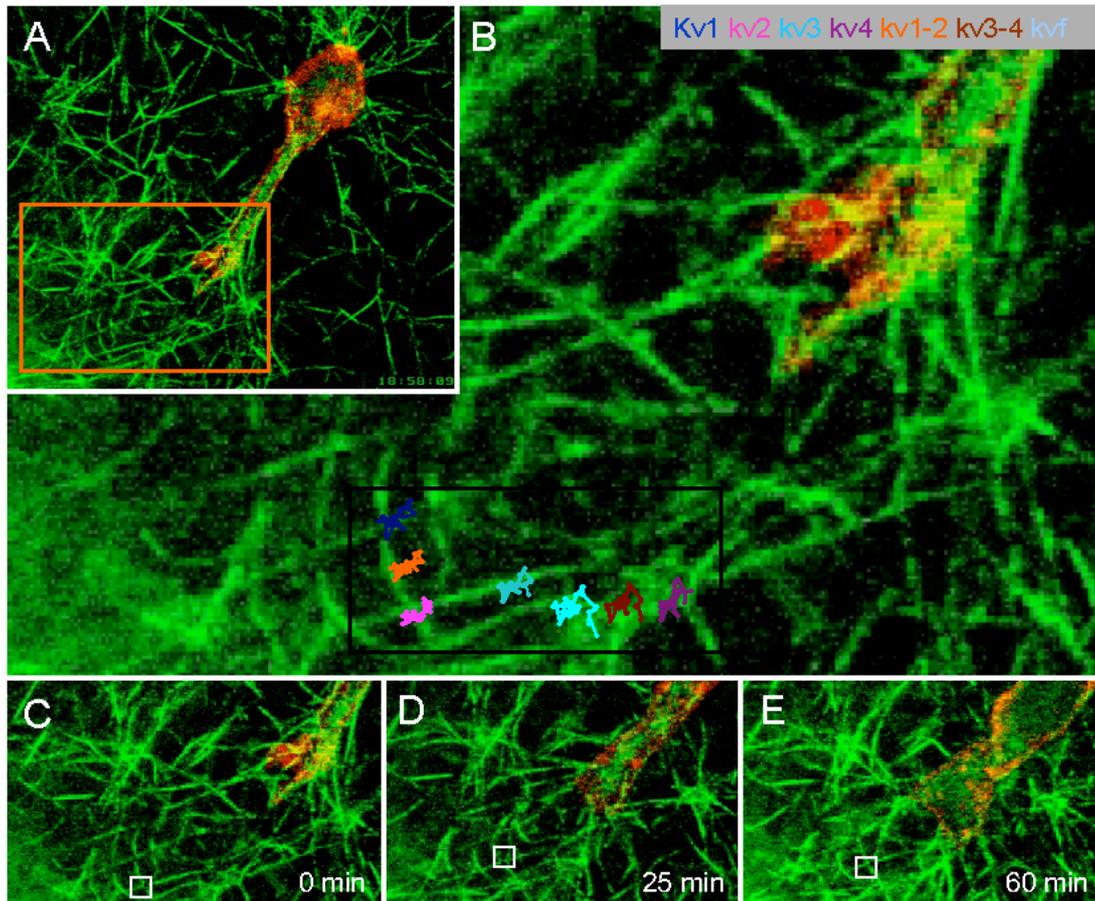


Abbildung 34: Pfade der getrackten Kollagenpixel an der Vorderfront einer wandernden MV3 Zelle. A: Startbild der Sequenz der wandernden MV3 Zelle. B: Pfade der getrackten und fiktiven Kollagenpixel (kv1, kv2, kv3, kv4, kv1-2, kv3-4, kvf). C-E: Sequenz des getrackten Kollagenpixels kv2 (schwarzes Quadrat im Rechteck). Grün, Kollagenfasern; Rot, CD44. Weitere Einzelheiten, siehe Abb. 28. Vgl. Film 18

Zusammenfassend deformieren sowohl murine B16/F1 GFP-Aktin Melanomzellen als auch humane MV3 Melanomzellen mittels Filopodien an der Vorderfront die Kollagenfasern während ihrer Wanderung durch die 3D Matrix infolge von Traktions- und Relaxationszyklen.

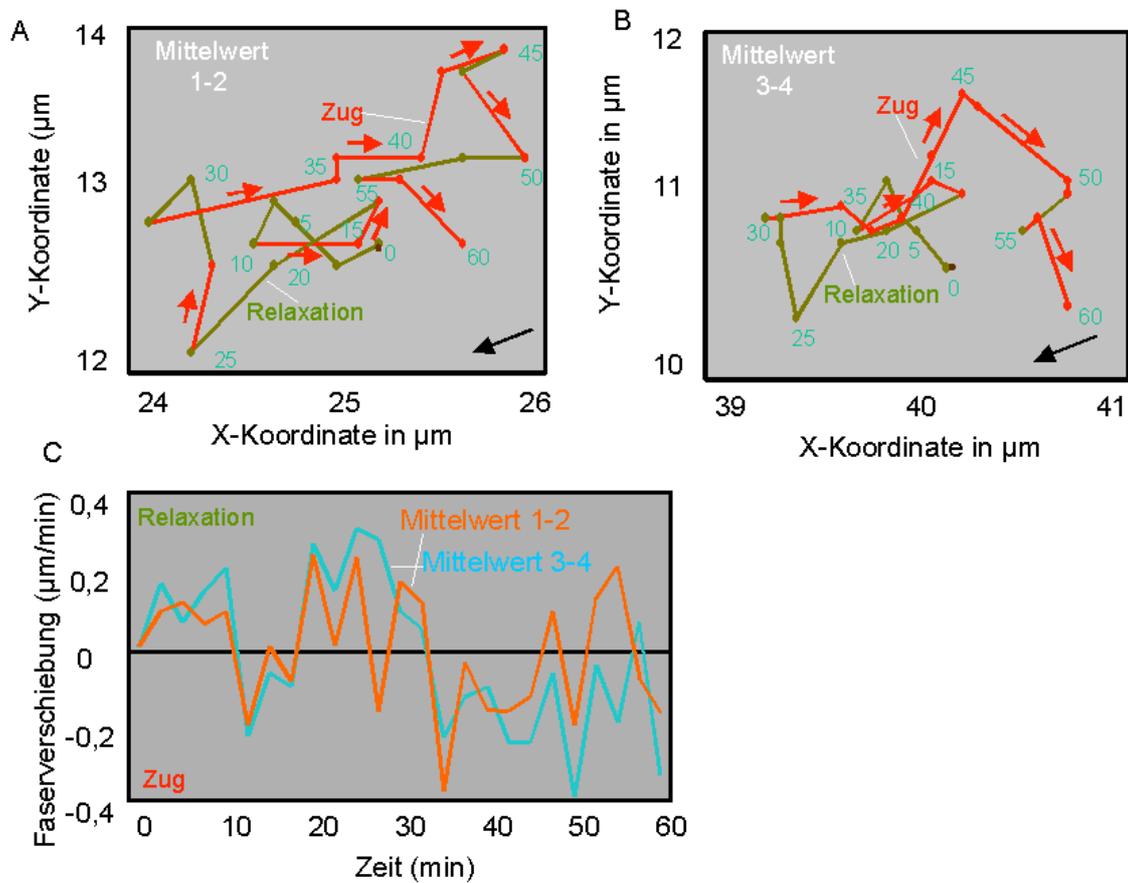


Abbildung 35: Traktion und Relaxation der Kollagenmatrix an der Vorderfront einer wandernden MV3 Zelle. A, B: Translokationspfade als Mittelwert zweier getrackter Kollagenpixel (A, 1+2; B, 3+4); rote Pfeile, Zug der Kollagenfasern auf den Zellkörper zu; grüne Teilstrecken, Relaxation; schwarze Pfeile, Wanderungsrichtung der Zelle; türkisfarbene Zahlen, Zeit (min). C: Faserverschiebung der fiktiven Kollagenpixel kv1-2 und kv3-4; negative Werte, Traktion; positive Werte, Relaxation der Kollagenfasern

4. Diskussion

Zellmigration ist eine wesentliche Voraussetzung für die Dissemination von Tumorzellen und nachfolgende Metastasierung in den Körper (Friedl und Wolf, 2003; Chambers et al., 2002). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich am B16 Melanommodell mit 3 wesentlichen Aspekten der Tumorzellbewegung, (1) die Bedeutung der biophysikalischen Struktur der extrazellulären Matrix auf Migrationsform und -effizienz, (2) die Plastizität des Aktinzytoskeletts in Antwort auf unterschiedliche Matrixumgebung und (3) die Effizienz der Migrationshemmung durch Aktininhibition. Die Befunde legen eine erstaunliche Anpassung der Effizienz und Art der Zellbewegung wie auch der Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts in Antwort auf strukturell verschiedene Umgebungsbedingungen nahe und zeigen darüber hinaus hochaufgelöst neue Aspekte der Biomechanik der Zellmigration in 3D Gewebe.

4.1. Unterschiedliche Migrationsformen in 2D und 3D Modellen

Technisch leicht zu handhabende 2D Migrationsmodelle werden in der Literatur vielfach für Migrations- und für Aktinstudien eingesetzt. Stärker als erwartet haben sowohl die biophysikalische Beschaffenheit der Oberflächenbeschichtung, als auch ihre räumlich Anordnung einen Einfluss auf Zellmorphologie, Zytoskelettstruktur, Art und Effizienz der Zellmigration.

4.1.1. In vitro Rekonstruktion unterschiedlicher Kollagenstrukturen

Zur biophysikalischen Modulation der Struktur von Kollagen, dem wichtigsten Bestandteil extrazellulärer Matrix im interstitiellen Gewebe, wurden unterschiedliche Migrationsbedingungen für B16 Zellen in vitro etabliert:

- 2D monomeres, nicht polymerisiertes Kollagen als relativ unphysiologische, relieflose, glatte Oberfläche auf einem starren Glasträger. Dieses Substrat entspricht dem weit verbreiteten Ansatz der Beschichtung von 2D Oberflächen mit ECM-Komponenten für Adhäsions- und Migrationsstudien.
- 2D fibrilläres Kollagen bestehend aus polymeren Fibrillen, auf welche Zellen gesetzt werden. Es ahmt die Elastizität und lückenhafte Struktur der ECM im lebenden

Organismus nach, bietet nur der Zellunterseite eine Interaktionsmöglichkeit und wenig bis keinen physikalischen Widerstand, solange die Zellen entlang der Oberfläche migrieren.

- 3D fibrilläres Kollagen, in welches Zellen einpolymerisiert werden. Es entspricht in größtem Maße der 3D Architektur des Bindegewebes (Stoitzner, 2001) und vereint Elastizität, multifokalen Anhaftungspunkte und physikalischen Widerstand für migrierende Zellen infolge des dreidimensionalen Netzwerks.

Alle 3 ECM Typen werden in der Literatur für Migrationsstudien eingesetzt (Sahai et al., 2005; Petroll et al, 2003; Ballestrem und Wehrle-Haller, 1998; Grinnell et al., 2003; Cukierman et al., 2001; Petroll et al., 2004), jedoch bisher nicht direkt auf Struktur und Funktion des Aktinzytoskeletts und ihren Einfluß auf die Zellmigration miteinander verglichen.

4.1.2. Plastizität von Zellmorphologie und resultierende Migrationseffizienz in Antwort auf die Umgebungsstruktur der ECM

Bisher geht man davon aus, dass die Zellform Ergebnis des molekularen Repertoires der Zelle ist, sodass molekulare Regulatoren zur Bildung einer „zelltypischen“ Aktinstruktur führen, angepasst an die jeweilige Zelldifferenzierung und -funktion sowie extrazelluläre Signale (Adams et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde anhand von B16 Zellen aus derselben Ausgangskultur gezeigt, dass die biophysikalische Beschaffenheit der ECM einen wesentlichen Einfluss auf die Differenzierung und den (temporären) Endzustand der Zellmorphologie ausübt.

Die Zellen legen sich eng an die vorgegebene Struktur der ECM, erhalten Umgebungsreize durch die jeweilige extrazelluläre Kollagenstruktur und nehmen – fast spiegelbildlich – eine jeweils charakteristische aber unterschiedliche Migrationsform an (Abb. 11). Auf einer glatten 2D Oberfläche breiten sich die Zellen gefördert durch eine Lamelle flach aus, auf 2D oder in 3D fibrillärem Kollagen wachsen stattdessen Filopodien entlang von Kollagenfibrillen. Der Zellkörper gleitet hierbei in allen Umgebungen bevorzugt entlang präformierter Strukturen, etwa oberhalb der 2D monomeren oder 2D fibrillären Oberfläche oder durch größeren Lücken der 3D fibrillären Umgebung hindurch.

Die gleichmäßige Ligandenkonfiguration auf 2D monomerer Kollagenoberfläche ermöglicht offenbar das schnelle Umsetzen fokaler Adhäsionszonen und bietet dem Zellkörper ein hindernisarmes Substrat, wodurch 5fach höhere Migrationsgeschwindigkeiten als auf oder in fibrillärem Kollagen resultieren.

Die 2D fibrilläre Kollagenoberfläche bietet dem Zellkörper ein vergleichbar hindernisarmes Substrat, jedoch verhindert die fibrilläre Anordnung der Kollagenfasern die Ausbildung einer kontinuierlichen Lamelle. Stattdessen bildet eine Vielzahl dynamischer Pseudopodien und Filopodien kleinere und morphologisch längliche Kontaktregionen zu individuellen Fasern aus. Diese zergliederte Vorderfront entspricht möglicherweise einer kontinuierlichen Lamelle, die – substratinduziert - nun eine diskontinuierliche Front mit mehreren Pseudopodien und terminalen Filopodien mit Faserkontakt überging. Die Ausbildung und Koordination dieser streng entlang der Kollagenfasern auseinanderlaufenden Pseudo- und Filopodien resultiert in einer spinnenähnlichen Morphologie und, trotz starker Dynamik jedes einzelnen Pseudopods, insgesamt erheblichen Beeinträchtigung der Migrationseffizienz auf 2D fibrillärer Kollagenoberfläche.

Das 3D fibrilläre Kollagensubstrat bietet zusätzlich zur fibrillären filopodienfördernden Gerüststruktur der Kollagenfasern auch ein dreidimensionales Netzwerk, das dem bewegenden Zellkörper als Hindernis entgegenwirkt. Diese Barriere wird durch genaues Ausfüllen vorhandener Matrixlücken, „schlangenartiges“ Hindurchwinden des Zellkörpers reduziert, so dass eine schlanke, spindelförmige Gestalt resultiert. Häufig parallel entlang einzelner Kollagenfasern entwickeln sich ca. 3-5 endständige oszillierende Filopodien je Pseudopod (wegen Platzmangel) fächerförmig, binden kurzfristig stabil an die Kollagenfasern, vermitteln Zug und Matrixdeformation infolge der Zellkontraktilität, und lassen (gleichsam den Fingern einer Hand) die Fasern wieder los um einen neuen Kontakt aufzubauen. So verringert sich das Hindernis durch Formanpassung und es entsteht zusätzlich Halt und ein Gegenpol für die Migration.

Im Vergleich zu 2D kontinuierlichen Oberflächen war auch in 3D fibrillärer Umgebung die Migrationsgeschwindigkeit 5fach verringert, jedoch auf vergleichbarem Niveau zur 2D fibrillären Kollagenoberfläche. Dies könnte darauf hinweisen, dass Ausbildung von Filopodien entlang von Kollagenfasern im Gegensatz zur Ausbildung von Lamellen ein komplexerer, diskontinuierlicher Prozess als das kontinuierliche Gleiten einer Lamelle

über die Oberfläche. Durch hochaufgelöste Rekonstruktion wurden im Rahmen dieser Arbeit 3 unterschiedliche Zustände der Filopodien identifiziert: frei ohne Substratbindung, punktförmige Berührung einer Kollagenfaser in unterschiedlichem Winkel und parallele Ausrichtung entlang einer Kollagenfaser. Möglicherweise verzögert die biomechanisch komplexe Sequenz der initialen Berührung gefolgt von Anhaftung, Traktionsphase und Lösung des Filopods vom Substrat die Koordination von Pseudopodwachstum und Kontraktilität der Zelle, dass die Vorwärtsbewegung zwar gerichtet aber verlangsamt abläuft, verglichen mit der Migration über kontinuierlich angeordnete Oberflächen desselben Liganden.

Demzufolge beeinflusst die räumliche Anordnung (flach versus fibrillär) sowie die Form und Größe der Kontaktregion die Form und Umsatzrate der zellulären Kontaktfläche und damit Zellform während der Migration und Migrationseffizienz.

Die in vivo Relevanz von Kulturmodellen wird seit Jahren intensiv diskutiert (Friedl und Bröcker, 2000; Abbott et al., 2004). Der hier gezeigte sehr flache, ausgebreitete Migrationstyp auf 2D monomerem Kollagen entspricht dem vieler publizierter Beispiele mit B16, aber auch anderen Zellen (Ballestrem und Wehrle-Haller, 1998; Petroll et al., 2003). In vivo ist diese Morphologie nur typisch für die vordere Front migrierender Keratinozyten über eine Wundmatrix, nicht jedoch für Zellen, die durch 3D Matrix hindurchwandern, so dass hier zur Übertragbarkeit der Befunde 3D Modelle bevorzugt werden sollten.

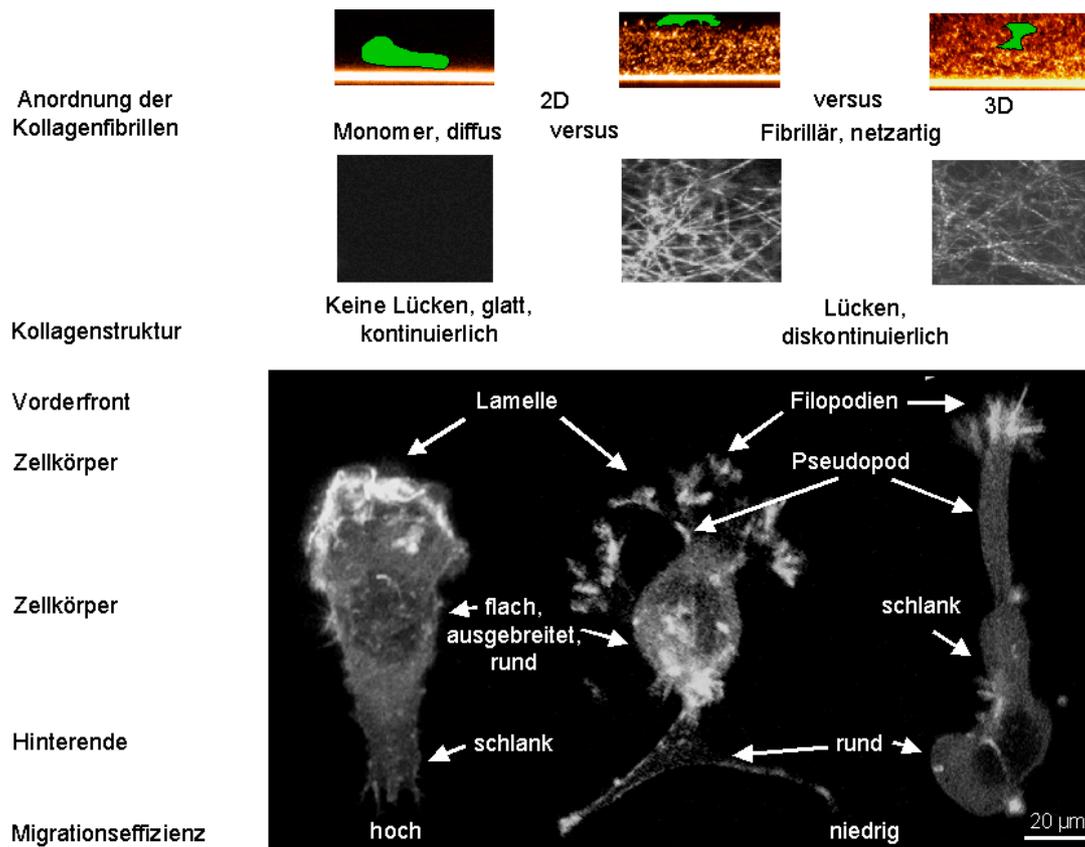


Abbildung 36: Zellmorphologie in Abhängigkeit von der Struktur der extrazellulären Matrix.

4.2. Dynamik der Biophysik während der Migration

Zellmigration erfordert nicht nur dynamische Interaktionen von Lamellen und Filopodien mit der extrazellulären Umgebung bei ruhendem, statischen Zellkörper, sondern vor allem die Umwandlung und Integration dieser dynamischen Interaktionen in einen aktiven Migrationsablauf. Mehrere Techniken erlauben die direkte Messung der Substratformation durch Zellen während der Migration: mit Silikon beschichtete 2D Substrate, welche durch Zug oder Dehnung von Zellen verformt werden (Harris et al., 1980; Lee et al., 1994; Oliver et al., 1995), 2D fibrilläre Kollagenoberflächen (Roy et al., 1997; Petroll et al., 2003) und 3D Kollagenumgebungen (Petroll et al., 2004; Maaser et al., 1999). Für diese Arbeit wurde die Verformung von 3D Kollagenmatrices während der Zellmigration untersucht, da dies die größtmögliche Annäherung an die extrazelluläre Matrix in vivo erlaubt.

4.2.1. Aktinreiche Filopodien der Vorderfront erzeugen die zur Zellmigration notwendige Kraft durch Bündelung und Zug an Kollagenfasern.

Die Migration einer B16/F1 GFP-Aktin Zelle lässt statische und dynamische subzelluläre Zonen und Phasen erkennen.

Dynamische Zonen sind Bereiche des Zellkörpers an denen Zellprotrusionen ausgebildet, morphologisch umgewandelt, eingezogen und bewegt werden bei ruhendem Gesamtzellkörper. Sie entstehen z.B. an der Vorderfront in Vorbereitung auf die Zellmigration. Statische Zonen sind Bereiche des Zellkörpers, die passiv ruhen bzw. in denen keinerlei Aktivität hinsichtlich der Zellmigration stattfindet, z.B. das Hinterende der Zelle. Statische Phasen sind Phasen, in denen der Zellkörper ruht und sowohl statische als auch dynamische Zonen aufweist, z.B. vor Migrationsbeginn.

Dynamische Phasen sind Phasen, in denen der Zellkörper bewegt wird, also Phasen der eigentlichen Zellmigration (Abb. 36). Der für die Zellmigration notwendige Kraftaufbau findet während der statischen Phasen an dynamischen Zonen, z.B. an der Vorderfront vor Migrationsbeginn und im Zellinneren statt. Dabei kommt es zur Translokation der einzelnen Kollagenfasern auf die Zelle zu, wie sie Grinnell 2003 beschreibt (Grinnell et al., 2003). Hierbei sind erhöhter Zug und Anzahl zeitgleich an Kollagenfasern gebundene Filopodien stark korreliert. Eine größere Anzahl zeitgleich gebundener Filopodien gibt die für die Kraftentwicklung notwendige Stabilität.

In der statischen Phase kommt es an der Vorderfront zur Pseudopodextension mit intermittierender Anhaftung von zahlenmäßig zunehmenden Filopodien an Kollagenfasern sowie daraus resultierend zu deren Bündelung bis ein paralleler Filopod-Kollagenfaserkontakt möglich ist (Abb. 37, Phase 1). Durch zeitgleiche Längenzunahme der Zelle wird sowohl Stabilität an Kontaktstellen zur Kollagenmatrix, als auch eine Spannung innerhalb des Zellkörpers erzeugt (Abb. 37, Phase 2), die erst durch Zellkontraktion mit Nachziehen des Hinterendes aufgelöst wird (Abb. 37, Phase 2). Die Befunde von Grinnell und Petroll wurden direkt bestätigt.

4.2.2. Durch passives Nachziehen des Hinterendes entsteht ein Migrationsablauf in Zyklen aus Kollagenfasertraktion, Zellextension und Migration

Zur Aufrechterhaltung der Zellmigration ist die ständige Wiederholung dieses oben beschriebenen Migrationszyklus notwendig (Abb. 37, Phase 3). Dies wird durch die Persistenz einer optimalen Filopodienzahl, die Kollagenfasern bündeln bei optimaler Zellextension in Traktions- und Retraktionszyklen bewirkt.

Dieser Zyklus ist insbesondere auch an der Zelllänge infolge bipolarer Anhaftung und Zellextension erkennbar. So ermöglicht der Aufbau einer Spannung innerhalb des Zellkörpers über eine Retraktion des Hinterendes die Zellmigration bewirkt.

Humane MV3 Melanomzellen und humane Fibrosarkomzellen zeigen zyklische Phasen im Kollagendeformitätsassay, so dass möglicherweise ein grundsätzliches Prinzip für stark adhäsionsbetonte, mesenchymale Zellmigration vorliegt.

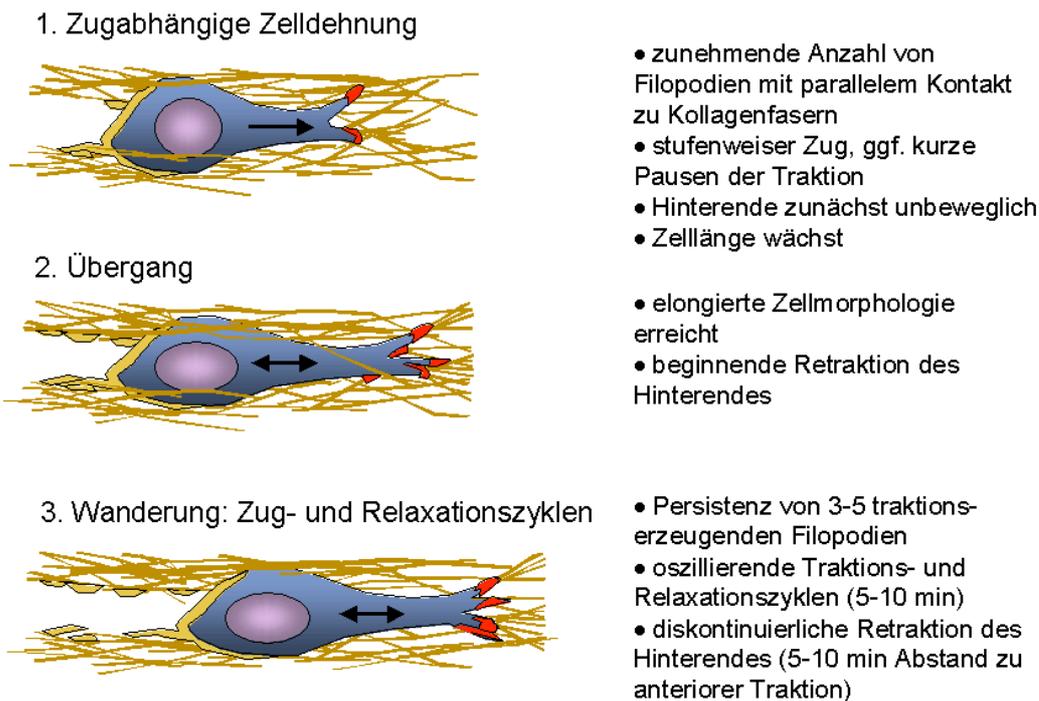


Abbildung 37: Zeitliche Abfolge von Zellextension und Wanderung von B16/F1 GFP-Aktin Zellen und MV3 Zellen in 3D fibrillärer Kollagenmatrix. Interaktion aktinreicher Filopodien (rot) mit den Kollagenfasern (braun); der schwarze Pfeil kennzeichnet die Dynamik der Zellregionen.

4.3. Konsequenz der Inhibition des Aktinzytoskeletts

Die direkte Blockade des Aktinzytoskeletts resultierte in einem Verlust der Zellpolarität mit nachfolgendem Migrationsstop. Ausgebildete Aktinprotrusionen verschwanden. Da die Aktininhibitoren Cytochalasin D, Latrunculin B und Jasplakinolide an 3 verschiedenen Stellen in die Aktinpolymerisation eingreifen, wird deutlich, dass für das Entstehen von Aktinprotrusionen und für die Ausbildung einer polaren Zellform ein funktionsfähiges und dynamisches Aktinzytoskelett notwendig ist. Für den Erhalt der Zellmorphologie und Polarität, der Kontaktaufnahme der Zelle zur extrazellulären Umgebung und der Definition der Vorderfront reicht nicht nur das Vorhandensein von monomerem oder filamentösem Aktin, sondern der ständige Umsatz von Aktin, die ständige Polymerisation und Depolymerisation sind erforderlich. Dies ermöglicht der Zelle sich plastisch und individuell an die Erfordernisse der extrazellulären Matrix anzupassen. Der vollständige Migrationsstop nach Blockade des Aktinzytoskeletts bei B16/F1 GFP-Aktin Zellen und bei MV3 Zellen zeigt, dass auch die Zellmigration ausschließlich durch ein funktionstüchtiges, dynamisches Aktinzytoskelett getragen wird und keine durch Myosin- oder Intermediärfilamente verursachte Restmigration eintritt.

Die sich aufdrängende Frage nach der Eignung von Cytochalasin D, noch Latrunculin B oder Jasplakinolide zur Behandlung von Krebs und Metastasierung *in vivo* muss jedoch verneint werden, da viele physiologische Prozesse wie z.B. Wundheilung, Embryogenese und die Aktivität des Immunsystems von einer aktiven Zellmigration abhängen (Friedl et al., 1995; Friedl et al., 2003) und Funktionen wie z.B. die von Epithelzellen im Darm, in den Bronchien, die Kontraktion der Herzmuskel- und Muskelzellen durch ein dynamisches Aktinzytoskelett getragen werden.

Alle 3 Aktininhibitoren blockieren unspezifisch hinsichtlich der Zellart das Aktinzytoskelett. Es ist anzunehmen, dass sie damit eine Vielzahl vitaler Funktionen im menschlichen Organismus beeinträchtigen und somit unmittelbar oder mittelbar nicht mit dem Leben vereinbar wären. Somit ist unwahrscheinlich, dass sich Cytochalasin D, Latrunculin B, oder Jasplakinolide zur Behandlung von Krebs und Metastasierung *in vivo* eignen könnten.

4.4. Ausblick

Im Mittelpunkt dieser Dissertation steht das Aktinzytoskelett, das in seiner Struktur, Dynamik, Plastizität und Beteiligung an biomechanischen Vorgängen eingehend untersucht wurde. Die dynamische morphologische Anpassungsfähigkeit migrierender Tumorzellen an die Erfordernisse der extrazellulären Umgebung mit Hilfe ihres Aktinzytoskeletts lässt dieses als plastische, formbare Struktur erkennen. Die unterschiedlichen morphologischen Varianten, die zur Migration einer einzigen B16/F1 GFP-Aktin Zelllinie in Abhängigkeit von der biophysikalischen Struktur und der Dimensionalität der extrazellulären Matrix führen, betonen ihren Einfluss auf Art und Effizienz der Migration. Die fokalisierte Lokalisation von polymerisiertem Aktin innerhalb der Zelle an Kontaktstellen zur extrazellulären Matrix, an Orten der für die Migration notwendigen Kraftgenerierung bestätigt seine Rolle bei der Zell-Matrix-Interaktion, Kraftübertragung und resultierender Migration.

Zur Klärung der Frage, wie viel Kraft die Tumorzellen aufbringen, um die extrazelluläre Umgebung zu passieren, wurden in jüngster Zeit zur Quantifizierung Studien mit Hilfe von electromagnetic pulling cytometry (EPC) durchgeführt (Methode in Ingber et al., 2005), die jedoch methodisch aufgrund der schlechten räumlichen Einpolymerisierbarkeit der magnetischen Beads und der exakten Definition der Translokationsrichtung der Kollagenfasern noch Schwierigkeiten bereiteten. Hierzu ist die Entwicklung von Methoden erforderlich, die eine exakte Kraftmessung erlauben, z.B. mit Hilfe einer Mikrofeder, die an den Kollagenfasern fixiert ist.

Ausblickend ist jedoch davon auszugehen, dass zukünftig 3D Matrixmodelle eine größere Rolle für die Identifikation von anti-invasiven oder anti-metastastischen Substanzen einnehmen werden und verstärkt in präklinischen Studien für Pharmakaentwicklung gegen Krebs und die Metastasierung eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

Dynamik, Biomechanik und Plastizität des Aktinzytoskeletts in migrierenden B16/F1 GFP-Aktin Melanomzellen in 2D und 3D extrazellulärer Matrix

Die Anpassung des Aktinzytoskeletts an extrazelluläre Gewebsstrukturen ist Voraussetzung für die Interaktion mit der extrazellulären Matrix und für die Zellbewegung, einschließlich der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Wir untersuchten bei invasiven B16/F1 GFP-Aktin Mausmelanomzellen, ob und wie sich Zellform, Art und Effizienz der Bewegung an physikalisch unterschiedlich beschaffene kollagenöse Umgebungen anpassen: 1) mit Kollagen-Monomeren beschichtete 2D Objektträger, 2) 2D Oberfläche einer fibrillären Kollagenmatrix und 3) Zellen, die in einer 3D Kollagenmatrix eingebettet waren. Zur Darstellung des Aktinzytoskeletts wurden Zellen eingesetzt, die GFP-Aktin Fusionsprotein exprimierten, und mittels Zeitraffer-Videomikroskopie und Konfokalmikroskopie untersucht.

Im direkten Vergleich waren Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts wie auch Zellform und Art der Migration unterschiedlich in den verschiedenen Umgebungen. Auf 2D planer Oberfläche erfolgte eine rasche Adhäsion und Abflachung der Zellen (Spreading) mit nachfolgender Migration mit Bildung fokaler Adhäsionszonen, in die kabelartige Aktinstrukturen (Stress fibers) einstrahlten. Dagegen entwickelte sich in 3D Kollagenmatrices eine spindelförmige, fibroblastenähnliche Zellform (mesenchymal) mit zylindrischen fingerförmigen vorderen Pseudopodien, die Zug der Zelle nach vorne bewirken und hochdynamisches polymeres Aktin, nicht jedoch Stress Fibers enthielten. Eine ähnliche Zellform und Struktur des Zytoskeletts entwickelte sich in Zellen auf 2D fibrillärem Kollagen. Die Kontaktfindung und Migrationseffizienz auf oder in fibrillären Matrices war im Vergleich zu 2D kollagenbeschichteter Oberfläche erschwert, die Migrationseffizienz verringert. In Kontrollversuchen wurden Migration und polarisierte Bildung von Aktindynamik durch Inhibitoren des Aktinzytoskeletts (Cytochalasin D, Latrunculin B, Jasplakinolide) stark gehemmt.

Diese Befunde zeigen, dass die Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts sowie die Art der Migration in Tumorzellen stärker als bisher angenommen durch die umgebende Kollagenstruktur bestimmt wird. Während 3D Kollagenmatrices in vivo ähnliche bipolare Zytoskelettstruktur fördern, müssen Abflachung der Zellen mit Bildung von Stress Fibers als spezifische Charakteristika von 2D Modellen angesehen werden.

6. Abstract

Dynamic, biomechanics and plasticity of the actin cytoskeleton in migrating B16/F1 GFP-actin mouse melanoma cells in 2D and 3D extracellular matrix

The dynamics and the adaptation of the actin cytoskeleton in response to extracellular matrix structures is the prerequisite for cell polarisation, shape change, and migration, including the invasion and metastasis of tumor cells. In invasive B16-mouse melanoma cells expressing GFP-actin fusion protein we directly imaged cytoskeletal dynamics, adaptation and movement in response to physically different collagen substrata using time-lapse videomicroscopy and confocal microscopy: 1) cells on 2D surfaces coated with monomeric collagen, 2) 2D surfaces composed of fibrillar collagen, and 3) cells which were embedded in 3D collagen matrices.

In directly comparison the structure and dynamic of the actin cytoskeleton, cell shape and migration efficiency were different between the different collagen substrata. On 2D monomeric collagen quick cell adhesion, spreading, and cell flattening were followed by migration driven by focal contacts in which cable like actin structures (stress fibres) inserted. In 3D collagen matrices however, cells developed a spindle like (mesenchymal) shape with cylindrical finger-like pseudopods which generated the forward-driving force towards collagen fibres. These pseudopods contained dynamic polymerized actin yet lacked stress fibres. A similar mesenchymal cell shape and structure of the actin cytoskeleton that lacked stringent focal contacts and stress fibres developed on 2D fibrillar collagen matrices. The migration efficiency in 3D collagen was significantly lower, compared to 2D substrata, suggesting an impact of matrix barriers on the migration velocity. Both, actin polymerization and migration were severely impaired by inhibitors of the actin cytoskeleton (Cytochalasin D, Latrunculin B, Jasplakinolide), causing cell rounding and oscillatory “running on the spot”.

These findings show the dynamics of the actin cytoskeleton in living melanoma cells critically dependent on and respond to the physical structure of the ECM. 3D collagen matrices hence favour in vivo-like cell shape and cytoskeletal organization while flat cell spreading and formation of stress fibres are specific cell characteristics of cells on 2D.

7. Literaturverzeichnis

- Abbott J. J., Amirkhan R. H., Hoang M. P.**
MALIGNANT MELANOMA WITH A RHABDOID PHENOTYPE: HISTOLOGIC, IMMUNOHISTOCHEMICAL, AND ULTRASTRUCTURAL STUDY OF A CASE AND REVIEW OF THE LITERATURE
Archives of Pathology & Laboratory Medicine (2004), **28** (6), 686-688
- Adams J. C.**
CELL-MATRIX CONTACT STRUCTURES
Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS. Mar. (2001) **58**, 371-392
- Adams J. C.**
REGULATION OF PROTRUSIVE AND CONTRACTILE CELL-MATRIX CONTACTS
Journal of Cell Science (2002) **115**, 257-265
- Adams J. C., Clelland J. D., Collett G. D. M., Matsumura F., Yamashiro S., Zhang L.**
CELL-MATRIX ADHESIONS DIFFERENTIALLY REGULATE FASCIN PHOSPHORYLATION
Molecular Biology of the Cell (1999) **10**, 4177-4190
- Ailenberg M., Silverman M.**
CYTOCHALASIN D DISRUPTION OF ACTIN FILAMENTS IN 3T3 CELLS PRODUCES AN ANTI-APOPTOTIC RESPONSE BY ACTIVATING GELATINASE A EXTRACELLULARLY AND INITIATING INTRACELLULAR SURVIVAL SIGNALS
Biochimica and Biophysica Acta (2003) **1593**, 249-258
- Al-Alwan M. M., Rowden G., Lee T. D. G., West K. A.**
FASCIN IS INVOLVED IN THE ANTIGEN PRESENTATION ACTIVITY OF MATURE DENDRITIC CELLS
The Journal of Immunology (2001) **166**, 338-345
- Alberts, J., Lewis, R., Roberts, W.**
MOLEKULARBIOLOGIE DER ZELLE (2004) Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG 2004
- Alfandari D., Cousin H., Gaultier A., Hoffstrom B. G., DeSimone D. W.**
INTEGRIN A5B1 SUPPORTS THE MIGRATION OF XENOPUS CRANIAL CREST ON FIBRONECTIN
Developmental Biology (2003) **260**, 449-464
- Amann K. J., Pollard T. D.**
DIRECT REAL-TIME OBSERVATION OF ACTIN FILAMENT BRANCHING MEDIATED BY ARP2/3 COMPLEX USING TOTAL INTERNAL REFLECTION FLUORESCENCE MICROSCOPY
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (2001) **98**, 15009-15013
- Ampe C., Vandekerckhove J.**
ACTIN-ACTIN BINDING PROTEIN INTERFACES
Seminars in Cell Biology (1994) **5**, 175-182
- Anilkumar N., Annis D. S., Mosher D. F., Adams J. C.**
TRIMERIC ASSEMBLY OF THE C-TERMINAL REGION OF THROMBOSPONDIN-1 OR THROMBOSPONDIN-2 IS NECESSARY FOR CELL SPREADING, FASCIN SPIKE ORGANISATION
Journal of Cell Science (2002) **115**, 2357-2366
- Arroyo A. G., Garcia-Pardo A., Sanchez-Madrid F.**
A HIGH AFFINITY CONFORMATIONAL STATE ON VLA INTEGRIN HETERODIMERS INDUCED BY AN ANTI B1-CHAIN MONOCLONAL ANTIBODY
The Journal of Biological Chemistry (1993) **268**, 9863-9868
- Arroyo A., Sanchez-Mateos P., Campanero M., Martin-Padura I., Dejana E., Sanchez-Madrid F.**
REGULATION OF THE VLA INTEGRIN INTERACTION THROUGH THE B1 SUBUNIT
The Journal of Cell Biology (1992) **117**, 659-670
- Asensi M., Medina I., Ortega A., Carretero J., Bano C. M., Obrador E., Estrela J. M.**
INHIBITION OF CANCER GROWTH BY RESERVATROL IS RELATED TO ITS LOW BIOAVAILABILITY
Free Radical Biology and Medicine (2002) **33**, 387-398
- Baily M., Condeelis J. S., Segall J. E.**
CHEMOATTRACTANT-INDUCED LAMELLIPOD EXTENSION
Microscopy Research and Techniques (1998) **43**, 433-443

- Bakolitsa C., Cohen D. M., Bankston L. A., Bobkov A. A., Vralg S. W., Liddington R. C.**
STRUCTURAL BASIS FOR VINCULIN ACTIVATION AT SITE OF CELL ADHESION
Nature (2004) Jul 29, 430 (6999): 583-6
- Ballestrem C., Wehrle-Haller B., Hinz B., Imhof B. A.**
ACTIN-DEPENDENT LAMELLIPODIA FORMATION AND MICROTUBULE-DEPENDENT TRAIL RETRACTION
CONTROL-DIRECTED CELL MIGRATION
Molecular Biology of the Cell (2000) **11**, 2999-3012
- Ballestrem C., Wehrle-Haller B., Hinz B., Imhof B. A.**
MARCHING AT THE FRONT AND DRAGGING BEHIND: DIFFERENTIAL AVB3-INTEGRIN TURNOVER REGULATES
FOCAL ADHESION BEHAVIOIR
The Journal of Cell Biology (2001) **155**, 1319-1332
- Ballestrem C., Wehrle-Haller B., Imhof B. A.**
ACTIN DYNAMICS IN LIVING MAMMALIAN CELLS
Journal of Cell Science (1998) **111**, 1649-1658
- Bamburg J. R.**
PROTEINS OF THE ADF/COFILIN FAMILY: ESSENTIAL REGULATORS OF ACTIN DYNAMICS
Annual Review of Cell and Developmental Biology (1999) **15**, 185-230
- Bartles J. R.**
PARALLEL ACTIN BUNDLES AND THEIR MULTIPLE ACTIN-BUNDLING PROTEINS
Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 72-78
- Basbaum C. B., Werb Z.**
FOCALIZED PROTEOLYSIS: SPATIAL AND TEMPORAL REGULATION OF EXTRACELLULAR MATRIX
DEGRADATION AT THE CELL SURFACE
Current Opinion in Cell Biology (1996) **8**, 731-738
- Bear J. E., Loureiro J. J., Libova I., Fässler R., Wehland J., Gertler F. B.**
NEGATIVE REGULATION OF FIBROBLASTS MOTILITY BY ENA/VASP PROTEINS
Cell (2001) **101**, 717-728
- Bear J. E., Svitkina T. M., Kraus M., Schafer D. A., Loureiro J. J., Strasser G. A., Maly I. V.,
Chaga O. Y., Cooper J. A., Borisy G. G., Gertler F. B.**
ANTAGONISM BETWEEN ENA/VASP PROTEINS AND ACTIN FILAMENT CAPPING REGULATES FIBROBLASTS
MOTILITY
Cell (2002) **109**, 509-521
- Bishop A. L., Hall A.**
RHO GTPASES AND THEIR EFFECTOR PROTEINS
Biochemical Journal (2000) **348**, 241-255
- Blanchoin L.**
DIRECT OBSERVATION OF DENDRITIC ACTIN FILAMENT NETWORKS NUCLEATED BY ARP 2/3 COMPLEX AND
WASP/SCAR PROTEINS
Nature (2000) **404**, 1007-1011
- Blystone S. D.**
INTEGRATING AN INTEGRIN: A DIRECT ROUTE TO ACTIN
Biochimica et Biophysica Acta (2004) **1692**, 47-54
- Bonomi P.**
MATRIX METALLOPROTEINASES AND MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS IN LUNG CANCER
Seminars in Oncology (2002) **29**, Suppl. 4, 78-86
- Borisy G. G., Svitkina T. M.**
ACTIN MACHINERY: PUSHING THE ENVELOPE
Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 104-112
- Brakebusch C., Bouvard D., Stanchi F., Sakai T., Fässler R.**
INTEGRINS IN INVASIVE GROWTH
The Journal of Clinical Investigation (2002) **109**, 999-1006
- Bretscher M.**
MOVING MEMBRANE UP TO THE FRONT OF MIGRATING CELLS
Cell (1996) **85**, 465-467

- Brightman A. O., Rajwa B. P., Sturgis J. E., McCallister M. E., Robinson J. P., Voytik-Harbin S. L.**
TIME-LAPSE CONFOCAL REFLECTION MICROSCOPY OF COLLAGEN FIBRILLOGENESIS AND EXTRACELLULAR MATRIX ASSEMBLY IN VITRO
Biopolymers (2000) **54**, 222-234
- Bröcker E. B., Suter L., Brügger J., Macher E., Sorg C.**
PHENOTYPIC DYNAMICS OF TUMOR PROGRESSION IN HUMAN MALIGNANT MELANOMA
International Journal of Cancer (1985) **36**, 29-35
- Bubb M. R., Senderowicz A. M. J., Sausvill E. A., Duncan K. L. K., Korn E. D.**
JASPLAKINOLIDE, A CYTOTOXIC NATURAL PRODUCT, INDUCES ACTIN POLYMERIZATION AND COMPETITIVELY INHIBITS THE BINDING OF PHALLOIDIN TO F-ACTIN
The Journal of Biological Chemistry (1994) **269**, 14869-14871
- Bubb M. R., Spector I., Beyer B. B., Fosen K. M.**
EFFECTS OF JASPLAKINOLIDE ON THE KINETICS OF ACTIN POLYMERIZATION
The Journal of Biological Chemistry (2000) **275** (7), 5163-5170
- Burridge K., Chrzanowska-Wodicka M.**
FOCAL ADHESION, CONTRACTILITY AND SIGNALLING
Annual Review of Cell and Developmental Biology (1996) **12**, 463-519
- Byers H. R., Fijwara K.**
STRESS FIBERS IN CELLS IN SITU: IMMUNOFLUORESCENCE VISUALIZATION WITH ANTI-ACTIN, ANTIMYOSIN, AND ANTI-ALPHA-ACTININ
The Journal of Cell Biology (1982) **93**, 804-811
- Calderwood D. A., Shattil S. J., Ginsberg M. H.**
INTEGRINS AND ACTIN FILAMENTS: RECIPROCAL REGULATION OF CELL ADHESION AND SIGNALING
Journal of Biological Chemistry (2000) **275**, 22607-22610
- Cao L. G., Douglas J. F., Wang Y. L.**
LOCALIZATION AND DYNAMICS OF NONFILAMENTOUS ACTIN IN CULTURED CELLS
The Journal of Cell Biology (1993) **123**, 173-181
- Carlier F., Pantaloni D.**
CONTROL OF ACTIN DYNAMICS IN CELL MOTILITY
Journal of molecular Biology (1997) **269**, 459-467
- Carlier M. F., Borisy G. G.**
CYTOSKELETON: MOLECULAR HARDWARE IN ACTION
Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 17-19
- Carlier M. F., Pantaloni D.**
ACTIN ASSEMBLY IN RESPONSE TO EXTRACELLULAR SIGNALS: ROLE OF CAPPING PROTEINS, THYMOSIN β_4 AND PROFILIN
Seminars in Cell Biology (1994), **5**, 183-191
- Carlier M. F., Laurent V., Santolini J., Melki R., Didry D., Xia G. X., Hong Y., Chua N. H., Pantaloni D.**
ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR (ADF/COFILIN) ENHANCES THE RATE OF FILAMENT TURNOVER: IMPLICATION IN ACTIN-BASED MOTILITY
The Journal of Cell Biology (1997), **136**, 1307-1323
- Carlier M. F.**
CONTROL OF ACTIN DYNAMICS
Current Opinion in Cell Biology (1998) **10**, 45-51
- Carragher N. O., Frame M. C.**
FOCAL ADHESION AND ACTIN DYNAMICS: A PLACE WHERE KINASES AND PROTEASES MEET TO PROMOTE INVASION
Trends in Cell Biology (2004) **14**, 241-249
- Carter W. G., Wayner E. A., Bouchard T. S., Kaur P.**
THE ROLE OF INTEGRINS A2B1 AND A3B1 IN CELL-CELL AND CELL-SUBSTRATE ADHESION OF HUMAN EPIDERMAL CELLS
The Journal of Cell Biology (1990) **110**, 1387-1404
- Chambers A. F., Groom A. C., McDonald I. C.**
DISSEMINATION AND GROWTH OF CANCER CELLS IN METASTATIC SITES
Nature Reviews. Cancer (2002) **2**, 563-572

Chernoff J.

CLOSE ENCOUNTERS OF THE LIM-KINASE
Nature Cell Biology (1999) **1**, E115-E117

Chew T. L., Wolf W. A., Gallagher P. J., Matsumura F., Chisholm R. L.

A FLUORESCENT RESONANT TRANSFER-BASED BIOSENSOR REVEALS TRANSIENT AND REGIONAL MYOSIN LIGHT CHAIN KINASE ACTIVATION IN LAMELLA AND CLEAVAGE FURROWS
The Journal of Cell Biology (2002) **156**, 543-553

Chodniewicz D., Klemke R. L.

REGULATION OF INTEGRIN-MEDIATED CELLULAR RESPONSES THROUGH ASSEMBLY OF A CAS/CRK SCAFFOLD
Biochimica et Biophysica (2004) **1692**, 63-76

Clark E. A., Golub T. R., Lander E. S., Hynes R. O.

GENOMIC ANALYSIS OF METASTASIS REVEALS AN ESSENTIAL ROLE FOR RHOC
Nature (2000) **406**, 532-535

Clow P. A., McNally J. G.

IN VIVO OBSERVATIONS OF MYOSIN II DYNAMICS SUPPORT A ROLE IN REAR RETRACTION
Molecular Biology of the Cell (1999) **10**, 1309-1323

Condeelis J.

HOW IS ACTIN POLYMERIZATION NUCLEATED IN VIVO?
Trends in Cell Biology (2001) **11**, 288-293

Condeelis J., Segall J. E.

INTRAVITAL IMAGING OF CELL MOVEMENT IN TUMOURS
Nature Reviews Cancer (2003) **3**, 921-930

Cooper J. A., Schafer D. A.

CONTROL OF ACTIN ASSEMBLY AND DISASSEMBLY AT FILAMENT ENDS
Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 97-103

Cooper J. A.

EFFECTS OF CYTOCHALASIN D AND PHALLOIDIN ON ACTIN
The Journal of Cell Biology (1987) **105**, 1473-1478

Coussens L. M., Fingleton B., Matrisian L. M.

MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS AND CANCER: TRIALS AND TRIBULATIONS
Science (2002) **295**, 2387-2392

Cramer L. P., Sibert M., Mitchison T. J.

IDENTIFICATION OF NOVEL GRADED POLARITY ACTIN FILAMENT BUNDLES IN LOCOMOTING HEART FIBROBLASTS: IMPLICATIONS FOR THE GENERATION OF MOTILE FORCE
The Journal of Cell Biology (1997) **136**, 1287-1305

Critchley D. R.

FOCAL ADHESION – THE CYTOSKELETAL CONNECTION
Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 133-139

Cubitt A. B., Heim R., Adams S. R., Boyd A. E., Gross L. A., Tsien R. Y.

UNDERSTANDING, IMPROVING AND USING GREEN FLUORESCENCE PROTEINS
Techniques TIBS (1995) **20**, 448-455

Cukierman E., Pankov R., Yamada K. M.

CELL INTERACTIONS WITH THREE-DIMENSIONAL MATRICES
Current Opinion in Cell Biology (2002) **14**, 633-639

Cukierman E., Pankov R., Stevens D. R., Yamada K. M.

TAKING CELL-MATRIX ADHESIONS TO THE THIRD DIMENSION
Science (2001) **294**, 1708-1712

Czech M. P.

PIP2 AND PIP3: COMPLEX ROLES AT THE CELL SURFACE
Cell (2000) **100**, 603-606

Dai Z., Luo X., Xie H., Peng B. H.

THE ACTIN-DRIVEN MOVEMENT AND FORMATION OF ACETYLCHOLINE RECEPTOR CLUSTERS
The Journal of Cell Biology (2000) **150**, 1321-1334

Danen E. H. J., Sonnenberg A.

INTEGRINS IN REGULATION OF TISSUE DEVELOPMENT AND FUNCTION
Journal of Pathology (2003) **201**, 632-642

Danen E. H. J., van Muijen G. N. P., van de Wifl van Kemenade E., Jansen K. F. J., Ruitler D. J., Figdor C. G.

REGULATION OF INTEGRIN-MEDIATED ADHESION TO LAMININ AND COLLAGEN IN HUMAN MELANOCYTES AND IN NON-METASTATIC AND HIGHLY METASTATIC HUMAN MELANOMA CELLS

International Journal Cancer (1993) **54**, 315-321

DeHostos E. L.

THE CORONIN FAMILY OF ACTIN ASSOCIATED PROTEINS

Trends in Cell Biology (1999) **9**, 345-350

DeMali K. A., Barlow C. A., Burridge K.

RECRUITMENT OF THE ARP2/3 COMPLEX TO VINCULIN: COUPLING MEMBRANE PROTRUSION TO MATRIX ADHESION

The Journal of Cell Biology (2002) **159**, 377-387

Doyle T., Botstein D.

MOVEMENT OF YEAST CORTICAL ACTIN CYTOSKELETON VISUALIZED IN VIVO

Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (1996) **93**, 3886-3891

Dramsi S., Cossard P.

INTRACELLULAR PATHOGENS AND THE ACTIN CYTOSKELETON

Annual Review of Cell and Developmental Biology (1998) **14**, 137-166

Edwards D. C., Sanders L. C., Bokoch G. M., Gill G. N.

ACTIVATION OF LIM-KINASE BY PAK1 COUPLES RAC/CDC42 GTPASE SIGNALLING TO ACTIN CYTOSKELETAL DYNAMICS

Nature Cell Biology (1999) **1**, 253-259

Eggleston A.

Stung by WASP

Nature Cell Biology (2001) **3**, E95

Ellerbroek S. M., Wu Y. I., Overall C. M., Stack M. S.

FUNCTIONAL INTERPLAY BETWEEN TYPE 1 COLLAGEN AND CELL SURFACE MATRIX METALLOPROTEINASE ACTIVITY

The Journal of Biological Chemistry (2001) **276**, 24833-24842

Fan D., Liaw A., Denkins Y. M., Collins J. H., van Arsdall M., Chang J. L., Chakrabarty S., Nguyen D., Kruzel E., Fidler I. J.

TYPE-1 TRANSFORMING GROWTH FACTOR DIFFERENTIALLY MODULATES TUMORICIDAL ACTIVITY OF MURINE PERITONEAL MACROPHAGES AGAINST METASTATIC VARIANTS OF THE B16 MURINE MELANOMA

Journal of Experimental Therapeutics and Oncology (2002) **2**, 286-297

Farina K. L.

CELL MOTILITY OF TUMOR CELLS VISUALIZED IN LIVING INTACT PRIMARY TUMORS USING GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Cancer Research (1998) **58**, 2528-2532

Fassler R.

THE LACK OF $\beta 1$ INTEGRIN GENE IN EMBRYONIC STEM CELLS AFFECTS MORPHOLOGY, ADHESION, AND MIGRATIONS, BUT NOT INTEGRATION INTO THE INNER CELL MASS OF BLASTOCYSTS

The Journal of Cell Biology (1995) **128**, 979-988

Fidler I. J.

BIOLOGICAL BEHAVIOUR OF MALIGNANT MELANOMA CELLS CORRELATED TO THEIR SURVIVAL IN VIVO

Cancer Research (1975) **35**, 218-224

Fidler I. J., Nicolson G. L.

FATE OF RECIRCULATING B16 MELANOMA METASTATIC VARIANT CELLS IN PARABIOTIC SYNGENEIC RECIPIENTS: BRIEF COMMUNICATION

Journal National Cancer Institute (1977) **58**, 1867-1871

Fidler I. J., Nicolson G. L.

TUMOR CELL AND HOST PROPERTIES AFFECTING THE IMPLANTATION AND SURVIVAL OF BLOOD-BORNE METASTATIC VARIANTS OF B16 MELANOMA

Israel Journal of Medical Sciences (1978) **14**, 38-48

Fidler I. J., Nicolson G. L.

BRIEF COMMUNICATION: ORGAN SELECTIVITY FOR IMPLANTATION SURVIVAL AND GROWTH OF B16 MELANOMA VARIANT TUMOR LINES

Journal National Cancer Institute (1976), **57**, 1199-1976

Firtel R. A., Meili R.

DICTYOSTELIUM: A MODEL FOR REGULATED CELL MOVEMENT DURING MORPHOGENESIS
Current Opinion in Genetics & Development (2000) **10**, 421-427

Fitzpatrick T. B., Johnson R. A., Suurmond D. (Ed.)

COLOR ATLAS AND SYNOPSIS OF CLINICAL DERMATOLOGY (2005) 5th edition McGraw-Hill

Flanagan L. A.

FILAMIN A, THE ARP 2/3 COMPLEX, AND THE MORPHOLOGY AND FUNCTION OF CORTICAL ACTIN FILAMENTS
IN HUMAN MELANOMA CELLS
The Journal of Cell Biology (2001) **155**, 511-517

Friedl P.

CELL MIGRATION IN THREE-DIMENSIONAL COLLAGEN LATTICES – INTEGRINS, CELL-MATRIX-INTERACTIONS
AND MIGRATION STRATEGIES: FUNDAMENTAL DIFFERENCES IN T LYMPHOCYTES AND TUMOR CELLS
Habilitationschrift (1998) Medizinische Fakultät der Universität Witten/Herdecke

Friedl P.

PRESPECIFICATION AND PLASTICITY: SHIFTING MECHANISMS OF CELL MIGRATION
Current Opinion in Cell Biology (2004) **15**, 14-23

Friedl P.

DYNAMIC IMAGING OF CELLULAR INTERACTIONS WITH EXTRACELLULAR MATRIX
Histochemistry and Cell Biology (2004) **122**, 183-190

Friedl P.

IMMUNOLOGICAL TECHNIQUES DYNAMIC IMAGING OF THE IMMUNE SYSTEM
Current Opinion in Immunology (2004) **16**, 389-393

Friedl P., Bröcker E. B.

BIOLOGICAL CONFOCAL REFLECTION MICROSKOPIE: RECONSTRUCTION OF THREE-DIMENSIONAL
EXTRACELLULAR MATRIX, CELL MIGRATION, AND MATRIX REORGANISATION
Second Edition Image Analysis Methods and Applications (2001) Häder, D. P. (Ed.) CRC Press LLC

Friedl P., Bröcker E. B.

TCR TRIGGERING ON THE MOVE: DIVERSITY OF T-CELL INTERACTIONS WITH ANTIGEN-PRESENTING CELLS
Immunological Reviews (2002) **186**, 83-89

Friedl P., Bröcker E. B.

RECONSTRUCTING LEUKOCYTE MIGRATION IN 3D EXTRACELLULAR MATRIX BY TIME LAPSE
VIDEOMICROSCOPY AND COMPUTER-ASSISTED TRACKING
Methods in Molecular Biology (2004) **239**, 77-90

Friedl P., Bröcker E. B.

T CELL MIGRATION IN THREE-DIMENSIONAL EXTRACELLULAR MATRIX: GUIDANCE BY POLARITY AND
SENSATION
Developmental Immunology (2000) **7**, 249-266

Friedl P., Bröcker E. B.

THE BIOLOGY OF CELL LOCOMOTION WITHIN THREE DIMENSIONAL EXTRACELLULAR MATRIX
Cellular and Molecular Life Sciences (2001) **57** (1), 41-64

Friedl P., Wolf K.

TUMOR-CELL INVASION AND MIGRATION: DIVERSITY AND ESCAPE MECHANISMS (REVIEW)
Nature Reviews (2003) **3**, 362-374

Friedl P., Borgman S., Bröcker E. B.

AMOEBOID LEUKOCYTE CRAWLING THROUGH EXTRACELLULAR MATRIX: LESSONS FROM THE
DICTYOSTELIUM PARADIGM OF CELL MOVEMENT
Journal of Leukocyte Biology (2001) **70**, 491-509

Friedl P., Bröcker E. B., Zänker K. S.

INTEGRINS, CELL MATRIX INTERACTIONS AND CELL MIGRATION STRATEGIES: FUNDAMENTAL DIFFERENCES
IN LEUKOCYTES AND TUMOR CELLS
Cell Adhesion and Communication (1998) **6**, 225-236

Friedl P., Bröcker E. B., Zänker K. S.

CELL MIGRATION STRATEGIES IN 3D EXTRACELLULAR MATRIX: DIFFERENCES IN MORPHOLOGY, CELL
MATRIX INTERACTIONS, AND INTEGRIN FUNCTION
Microscopy Research and Techniques (1998) **43**, 369-378

- Friedl P., Entschladen F., Conrad C., Niggemann B., Zänker K. S.**
CD4+ T LYMPHOCYTES MIGRATING IN THREE-DIMENSIONAL COLLAGEN LATTICE LACK FOCAL ADHESION AND UTILIZE $\beta 1$ INTEGRIN-INDEPENDENT STRATEGIES FOR POLARIZATION, INTERACTION WITH COLLAGEN FIBRES
European Journal of Immunology (1998) **28**, 2331-2343
- Friedl P., Hegerfeldt Y., Tusch M.**
COLLECTIVE CELL MIGRATION IN MORPHOGENESIS AND CANCER
The International Journal of Developmental Biology (2004) **48**, 441-449
- Friedl P., Maaser K., Klein E. C., Niggemann B., Krohne G., Zänker K. S.**
MIGRATION OF HIGHLY AGGRESSIVE MV3 MELANOMA CELLS IN 3-DIMENSIONAL COLLAGEN LATTICE RESULTS IN LOCAL MATRIX REORGANIZATION AND SHEDDING OF $\alpha 2$ AND $\beta 1$ INTEGRINS AND CD44
Cancer Research (1997) **57**, 2061-2070
- Friedl P., Maaser K., Klein E. C., Niggemann B., Krohne G., Zänker K. S.**
MIGRATION OF HIGHLY AGGRESSIVE MV3 MELANOMA CELLS IN 3-DIMENSIONAL COLLAGEN LATTICE RESULTS IN LOCAL MATRIX REORGANIZATION AND SHEDDING OF $\alpha 2$ AND $\beta 1$ INTEGRINS AND CD44
Cancer Research (1997) **57**, 2061
- Friedl P., Noble P. B., Zänker K. S.**
LYMPHOCYTE LOCOMOTION IN THREE-DIMENSIONAL COLLAGEN GELS: COMPARISON OF THREE QUANTITATIVE METHODS FOR ANALYSING CELL TRAJECTORIES
Journal of Immunological Methods (1993) **165**, 157-165
- Friedl P., Noble P. B., Zänker K. S.**
T LYMPHOCYTE LOCOMOTION IN A THREE-DIMENSIONAL COLLAGEN MATRIX: EXPRESSION AND FUNCTION OF CELL ADHESION MOLECULES
The Journal of Immunology (1995) **154**, 4973-4985
- Friedl P., Noble P. B., Zänker K. S.**
LYMPHOCYTE LOCOMOTION IN THREE-DIMENSIONAL COLLAGEN GELS: COMPARISON OF THREE QUANTITATIVE METHODS FOR ANALYSING CELL TRAJECTORIES
Journal of Immunological Methods (1993) **165**, 157-165
- Geese M., Schlüter K., Rothkegel M., Jockusch B. M., Wehland J., Sechi A. S.**
ACCUMULATION OF PROFILIN LL AT THE SURFACE OF LISTERIA IS CONCOMITANT WITH THE ONSET OF MOTILITY AND CORRELATES WITH BACTERIAL SPEED
Journal of Cell Sciences (2000) **113**, 1415-1426
- Gerdes H. H., Kaether C.**
GREEN FLUORESCENT PROTEIN: APPLICATIONS IN CELL BIOLOGY
FEBS Letters (1996) **389**, 44-47
- Goddette D. W., Frieden C.**
ACTIN POLYMERISATION: THE MECHANISM OF ACTION OF CYTOCHALASIN D
The Journal of Biological Chemistry (1986) **261**, 15974-15980
- Goddette D. W., Frieden C.**
THE KINETICS OF CYTOCHALASIN D BINDING TO MONOMERIC ACTIN
The Journal of Biological Chemistry (1986) **261**, 15970-15973
- Goddette D. W., Uberbacher E. C., Bunick G. J., Frieden C.**
FORMATION OF ACTIN DIMERS AS STUDIED BY SMALL ANGLE NEUTRON SCATTERING
The Journal of Biological Chemistry (1986) **261**, 2605-2609
- Goebeler M., Kaufmann D., Bröcker E. B., Klein E. C.**
MIGRATION OF HIGHLY AGGRESSIVE MELANOMA CELLS ON HYALURONIC ACID IS ASSOCIATED WITH FUNCTIONAL CHANGES, INCREASED TURNOVER AND SHEDDING OF CD44 RECEPTORS
Journal of Cell Science (1996) **109**, 1957-1964
- Goode B. L., Drubin D. G., Barnes G.**
FUNCTIONAL COOPERATION BETWEEN THE MICROTUBULE AND ACTIN CYTOSKELETONS
Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 63-71
- Greenlee R. T., Hill-Harmon M. B., Murray T., Thun M.**
CANCER STATISTICS 2001
CA: a Cancer Journal for Clinicians (2001) **51**, 15-36
- Grinnell F.**
FIBROBLAST BIOLOGY IN THREE-DIMENSIONAL COLLAGEN MATRICES
Trends in Cell Biology (2003) **13**, 264-269

- Grinnell F., Ho Chin-Han, Tamariz E., Lee D. J., Skuta G.**
DENDRITIC FIBROBLASTS IN THREE-DIMENSIONAL COLLAGEN MATRICES
Molecular Biology of the Cell (2003) **14**, 384-395
- Guild G. M., Connelly P. S., Ruggiero L., Vranich K. A., Tilnex L. G.**
LONG CONTINUOUS ACTIN BUNDLES IN DROSOPHILA BRISTLES ARE CONSTRUCTED BY OVERLAPPING SHORT FILAMENTS
The Journal of Cell Biology (2003) **162**, 1069-1077
- Guilford, W. H., Lanz R. C., Gore R. W.**
LOCOMOTIVE FORCES PRODUCED BY SINGLE LEUCOCYTES IN VITRO AND IN VIVO
The American Journal of Physiology (1995) **268**, C1308-C1312
- Gunzer M., Schäfer A., Borgmann S., Grabber S., Zänker K., Bröcker E. B., Kämpgen E., Friedl P.**
ANTIGEN PRESENTATION IN EXTRACELLULAR MATRIX: INTERACTION OF T CELLS WITH DENDRITIC CELLS ARE DYNAMIC, SHORT LIVED, AND SEQUENTIAL
Immunity (2000) **13**, 323-332
- Gunzer M., Wishaupt C., Hillmer A., Basoglu Y., Friedl P., Dittmar K. E., Kolanus W., Varga G., Grabbe S.**
A SPECTRUM OF BIOPHYSICAL INTERACTION MODES BETWEEN T CELLS AND DIFFERENT ANTIGEN PRESENTING CELLS DURING PRIMING IN 3D COLLAGEN AND IN VIVO
Blood (2004) **104**, 2801-2809
- Hahne P., Sechi A., Benesch S., Small J. V.**
SCAR/WASP IS LOCALISED AT THE TIPS OF PROTRUDING LAMELLIPODIA IN LIVING CELLS
FEBS Lett (2001) **492**, 215-220
- Hall A.**
RHO GTPASE AND THE ACTIN CYTOSKELETON
Science (1998) **279**, 509-514
- Hanahan D., Weinberg R. A.**
THE HALLMARKS OF CANCER
Cell (2000) **100**, 57-70
- Harris A. K., Wild P., Stopak D.**
SILICONE RUBBER SUBSTRATA: A NEW WRINKLE IN THE STUDY OF CELL LOCOMOTION
Science (1980) **208**, 177-179
- Haston W. S., Shields J. M., Wilkinson P. C.**
LYMPHOCYTE LOCOMOTION AND ATTACHMENT ON TWO-DIMENSIONAL SURFACES AND IN THREE DIMENSIONAL MATRICES
The Journal of Cell Biology (1982) **92**, 747-752
- Hay E. D.**
EXTRACELLULAR MATRIX
The Journal of Cell Biology (1981) **91**, 205-223
- Hegerfeldt Y., Tusch M., Bröcker E. B., Friedl P.**
COLLECTIVE CELL MOVEMENT IN PRIMARY MELANOMA EXPLANTS: PLASTICITY OF CELL-CELL INTERACTION, β 1-INTEGRIN FUNCTION, AND MIGRATION STRATEGIES
Cancer Research (2002) **62**, 2125-2130
- Herrmann H., Aebi U.**
INTERMEDIATE FILAMENTS AND THEIR ASSOCIATES: MULTI-TALENTED STRUCTURAL ELEMENTS SPECIFYING CYTOARCHITECTURE AND CYTODYNAMICS
Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 79-90
- Higgs H. N., Pollard T. D.**
REGULATION OF ACTIN FILAMENT NETWORK FORMATION THROUGH ARP 2/3 COMPLEX: ACTIVATION BY A DIVERSE ARRAY OF PROTEINS
Annual Review of Biochemistry (2001) **70**, 649-676
- Hinchliffe K. A.**
CELLULAR SIGNALING: STRESSING THE IMPORTANCE OF PIP (3)
Current Biology (2001) **11**, R371-R372
- Hoffmann, G. R., Cerione, R. A.**
FLIPPING THE SWITCH: THE STRUCTURAL BASIS FOR SIGNALLING THROUGH THE CRIB MOTIF
Cell (2000) **102**, 403-406

- Holmes K. C., Popp D., Gebhard W., Kabsch W.**
 ATOMIC MODEL OF THE ACTIN FILAMENT
Nature (1990) **347**, 44-49
- Hotary K., Allen E., Punturieri A., Yana I., Wiss S. J.**
 REGULATION OF CELL INVASION AND MORPHOGENESIS IN A THREE DIMENSIONAL TYPE I COLLAGEN MATRIX BY MEMBRANE-TYPE MATRIX METALLOPROTEINASES 1,2 AND 3
The Journal of Cell Biology (2000) **149**, 1309-1323
- Howe A. K.**
 REGULATION OF ACTIN-BASED MIGRATION BY CAMP/PKA
Biochimica et Biophysica Acta (2004) **1692**, 159-174
- Hughes P. E., Pfaff M.**
 INTEGRIN AFFINITY MODULATION
Trends in Cell Biology (1998) **8**, 359-364
- Huttenlocher A., Cox E. A.**
 REGULATION OF INTEGRIN-MEDIATED ADHESION DURING CELL MIGRATION
Microscopy Research and Techniques (1998) **43**, 412-419
- Huttenlocher A., Ginsberg M. H., Horwitz A. F.**
 MODULATION OF CELL MIGRATION BY INTEGRIN-MEDIATED CYTOSKELETAL LINKAGES AND LIGAND-BINDING AFFINITY
The Journal of Cell Biology (1996) **134**, 1551, 1996
- Huttenlocher A., Lakonishok M., Kinder M., Wu S., Truong Tho, Knudsen K. A., Horwitz A. F.**
 INTEGRIN AND CADHERIN SYNERGY REGULATES CONTACT INHIBITION OF MIGRATION AND MOTILE ACTIVITY
Journal of Cell Biology (1998) **141**, 515-526
- Huttenlocher A., Sandborg R. R., Horwitz A. F.**
 ADHESION IN CELL MIGRATION
Current Opinion in Cell Biology (1995) **7**, 697-706
- Hynes R. O.**
 INTEGRINS: BI-DIRECTIONAL, ALLOSTERIC SIGNALLING MACHINES
Cell (2002) **110**, 673-687
- Hynes R. O.**
 CELL ADHESION: OLD AND NEW QUESTIONS
TCB (1999) **9**, M33-M37, Millennium Issue
- Hynes R. O., Zhao Q.**
 THE EVOLUTION OF CELL ADHESION
The Journal of Cell Biology (2000) **150**, F89-F95
- Illic D.**
 REDUCED CELL MOTILITY AND ENHANCED FOCAL ADHESION CONTACT FORMATION IN CELLS FROM FAK-DEFICIENT MICE
Nature (1995) **377**, 539-544
- Ingber D. E., Alsberg E., Matthews B. D., Overby D. R.**
 NOVEL DYNAMIC RHEOLOGICAL BEHAVIOR OF INDIVIDUAL FOCAL ADHESION MEASURED WITHIN SINGLE CELLS USING FOCAL ADHESIONS MEASURED WITHIN SINGLE CELLS USING ELECTROMAGNETIC PULLING CYTOMETRY
Acta Biomaterialia (2005) **1**, 295-303
- Ito A., Kataoka T. R., Watanabe M., Nishiyama K., Mazaki Y., Sabe H., Kitamura Y., Njima H.**
 A TRUNCATED ISOFORM OF THE PP2A B56 SUBUNIT PROMOTES CELL MOTILITY THROUGH PAXILLIN PHOSPHORYLATION
The EMBO Journal (2000) **19**, 562-571
- Itoh K.**
 AN ESSENTIAL PART FOR RHO-ASSOCIATED KINASE IN THE TRANSCELLULAR INVASION OF TUMOR CELLS
Nature Medicine (1999) **5**, 221-225
- Jawhai A. U., Buda A., Jenkins M., Shedzad K., Sarraf C., Noda M., Farthing M. J. G., Pignatelli M., Adams J. C.**
 FASCIN, AN ACTIN-BUNDLING PROTEIN, MODULATES COLONIC EPITHELIAL CELL INVASIVENESS AND DIFFERENTIATION IN VITRO
American Journal of Pathology (2003) **162**, 69-80

- Kaibuchi K., Kuroda S., Amano M.**
REGULATION OF THE CYTOSKELETON AND CELL ADHESION BY THE RHO FAMILY GTPASE IN MAMMALIAN CELLS
Annual Review of Biochemistry (1999) **68**, 459-486
- Kamm K. E., Stull J. T.**
DEDICATED MYOSIN LIGHT CHAIN KINASE WITH DIVERS CELLULAR FUNCTIONS
The Journal of Biological Chemistry (2001) **276**, 4527-4530
- Kaneko K., Satoh K., Masamune A., Satoh A., Shimosegawa T.**
MYOSIN LIGHT CHAIN KINASE INHIBITORS CAN BLOCK INVASION AND ADHESION OF HUMAN PANCREATIC CANCER CELL LINES
Pancreas (2002) **24**, 34-41
- Kang I. Ch., Kim D. S., Jang Y., Chung K. H.**
SUPPRESSIVE MECHANISM OF SALMOSIN, A NOVEL DISINTEGRIN IN B16 MELANOMA CELL METASTASIS
Biochemical and Biophysical Research Communications (2000) **275**, 169-173
- Katoh K., Kano Y., Amano M., Onishi H., Kaibuchi K., Fujiwara K.**
RHO-KINASE MEDIATED CONTRACTION OF ISOLATED STRESS FIBERS
The Journal of Cell Biology (2001) **153**, 569-584
- Klein C. E., Dressel D., Steinmayer T., Mauch C., Eckes B., Krieg T., Bankert R. B., Weber L.**
INTEGRIN A2B1 IS UPREGULATED IN FIBROBLASTS AND HIGHLY AGGRESSIVE MELANOMA CELLS IN THREE-DIMENSIONAL COLLAGEN LATTICES AND MEDIATED THE REORGANIZATION OF COLLAGEN I FIBRILS
The Journal of Cell Biology (1991) **115**, 1427-1436
- Klein C. E., Steinmayer T., Kaufmann D., Weber L., Bröcker E. B.**
IDENTIFICATION OF A MELANOMA PROGRESSION ANTIGEN AS INTEGRIN VLA-2
The Journal of Investigative Dermatology (1991) **96**, 281-284
- Kolega J.**
THE MOVEMENT OF CELL CLUSTERS IN VITRO: MORPHOLOGY AND DIRECTIONALITY
Journal of Cell Science (1981) **49**, 15-32
- Krugmann S., Jordens I., Gevaert K., Driessens M., Vandekerckhove J., Hall, A.**
CDC42 INDUCES FILOPODIA BY PROMOTING THE FORMATION OF AN IRSP53: MENA COMPLEX
Current Biology (2001) **11**, 1645-1655
- Kuhn J. R., Pollard T. D.**
REAL-TIME MEASUREMENTS OF ACTIN FILAMENT POLYMERISATION BY TOTAL INTERNAL REFLECTION FLUORESCENCE MICROSCOPY
Biophysical Journal (2005) **88**, 1387-1402
- Lang K., Niggemann B., Zanker K. S., Entschladen F.**
SIGNAL PROCESSING IN MIGRATING T24 HUMAN BLADDER CARCINOMA CELLS: ROLE OF THE AUTOCRIN INTERLEUKIN-8 LOOP
International Journal of Cancer (2002) **99**, 673-680
- Langley R. G. B., Fitzpatrick T. B., Soeber A. J.**
CLINICAL CHARACTERISTICS In: Balch, C.M., Houghton A.N., Soeber A.J., Soong S.-J. (Ed.)
CUTANEOUS MELANOMA (1998) St. Louis: Quality Medical Publishing, 81-102
- Lanier L. M., Gates M. A., Witke W., Menzies A. S., Wehmann A. M., Macklis J. D., Kwiatkowski D., Soriano P., Gertler F. B.**
MENA IS REQUIRED FOR NEURULATION AND COMMISSURE FORMATION
Neuron (1999) **22**, 313-325
- Lappalainen P., Drubin D.**
COFILIN PROMOTES RAPID ACTIN FILAMENT TURNOVER IN VIVO
Nature (1997) **388**, 78-82
- Lauffenburger D. A., Horwitz A. F.**
CELL MIGRATION: A PHYSICALLY INTEGRATED MOLECULAR PROCESS
Cell (1996) **84**, 359-369
- Lee E., Shelden E. A., Knecht D. A.**
FORMATION OF F-ACTIN AGGREGATES IN CELLS TREATED WITH ACTIN STABILIZING DRUGS
Cell Motility and the Cytoskeleton (1998) **39**, 122-133

- Lee J., Ishihara A., Theriot J. A., Jacobson K**
 PRINCIPLES OF LOCOMOTION FOR SIMPLE-SHAPED CELLS
Nature (1993) **362**, 167-171
- Lewis W. H.**
 ON THE LOCOMOTION OF THE POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILES OF THE RAT AUTOPLASMA CULTURES
Bulletin of the Johns Hopkins Hospital (1934) **4**, 273-279
- Liu S., Claderwood D. A., Ginsberg M. H.**
 INTEGRIN CYTOPLASMIC DOMAIN-BINDING PROTEINS
Journal of Cell Science (2000) **113**, 3563-3571
- Lo Su Hao, Janmey P. A., Hartwig J. H., Chen Ben Lan**
 INTERACTIONS OF TENSIN WITH ACTIN AND IDENTIFICATION OF ITS THREE DISTINCT ACTIN-BINDING DOMAINS
The Journal of Cell Biology (1994) **125**, 1067-1975
- Lochter A., Navre M., Werb Z., Bissel M. J.**
 A1 AND A2 INTEGRINS MEDIATE INVASIVE ACTIVITY OF MOUSE MAMMARY CARCINOMA CELLS THROUGH REGULATION OF STROMELYSIN-1 EXPRESSION
Molecular Biology of the Cell (1999) **10**, 271-282
- Ludin B., Matus A.**
 GFP ILLUMINATES THE CYTOSKELETON
Trends in Cell Biology (1998) **8**, 72-77
- Maaser K., Wolf K., Klein E. C., Niggemann B., Zänker K. S., Bröcker E. B., Friedl P.**
 FUNCTIONAL HIERARCHY OF SIMULTANEOUSLY EXPRESSED ADHESION RECEPTORS: INTEGRINS A2B1 BUT NOT CD44 MEDIATES MV3 MELANOMA CELL MIGRATION AND MATRIX REORGANISATION WITHIN THREE-DIMENSIONAL HYALURONAN-CONTAINING COLLAGEN MATRICES
Molecular Biology of the Cell (1999) **10**, 3067-3079
- Machesky L. M., Cooper J. A.**
 CELL MOTILITY: BARE BONES OF THE CYTOSKELETON
Nature (1999) **401**, 542-543
- Malignes Melanom – Interdisziplinäre Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft und der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**
AWMF- Leitlinien- Register (2007) 032/024, Entwicklungsstufe 2k+IDA
- Masur K., Lang K., Niggemann B., Zanker K. S., Entschladen F.**
 HIGH PKC A AND LOW E-CADHERIN EXPRESSION CONTRIBUTE TO HIGH MIGRATORY ACTIVITY OF COLON CARCINOMA CELLS
Molecular Biology of the Cell (2001) **12**, 1973-1982
- Matsudaira P.**
 ACTIN CROSSLINKING PROTEINS AT THE LEADING EDGE
Seminars in Cell Biology (1994) **5**, 165-174
- Miki H., Sasaki T., Takai Y., Takenawa T.**
 INDUCTION OF FILOPODIUM FORMATION BY A WASP-RELATED ACTIN-DEPOLYMERIZING PROTEIN N-WASP
Nature (1998) **391**, 93-96
- Mishima M., Nishida E.**
 CORONIN LOCALIZES TO LEADING EDGES AND IS INVOLVED IN CELL SPREADING AND LAMELLIPODIUM EXTENSION IN VERTEBRATE CELLS
Journal of Cell Science (1999) **112**, 2833-2842
- Mitchison T. J., Cramer L. P.**
 ACTIN-BASED CELL MOTILITY AND CELL LOCOMOTION
Cell (1996) **84**, 371-379
- Miyamoto S.**
 INTEGRIN FUNCTION: MOLECULAR HIERARCHIES OF CYTOSKELETAL AND SIGNALLING MOLECULES
The Journal of Cell Biology (1995) **131**, 791-805
- Morton W. M., Ayscough K. R., McLaughlin P. J.**
 LATRUNCULIN ALTERS THE ACTIN-MONOMER SUBUNIT INTERFACE TO PREVENT POLYMERIZATION
Nature Cell Biology (2000) **2**, 376-378
- Mueller S. C.**
 A NOVEL PROTEASE-DOCKING FUNCTION OF INTEGRIN AT INVAPODIA
The Journal of Biological Chemistry (1999) **274**, 24947-24952

Mullins D. R.

HOW WASP-FAMILY PROTEINS AND THE ARP 2/3 COMPLEX CONVERT INTRACELLULAR SIGNALS INTO CYTOSKELETAL STRUCTURES

Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 91-96

Mulrooney J. P., Hong Tao, Grabel L. B.

PHOSPHORYLATION OF THE $\beta 1$ CYTOPLASMIC DOMAIN MODULATES $\beta 1 A$ -INTEGRIN-DEPENDENT FUNCTIONS

Journal of Cell Science (2001) **114**, 2525-2533

Murphy G., Gavrilovic J.

PROTEOLYSIS AND CELL MIGRATION: CREATING A PATH?

Current Opinion in Cell Biology (1999) **11**, 614-621

Mutsuki A., Kazuyasu Ch., Kazushi K., Yuko F., Nao N., Yoshiharu M., Kozo K.

FORMATION OF ACTIN STRESS FIBERS AND FOCAL ADHESIONS ENHANCED BY RHO-KINASE

Science (1997) **275**, 1308-1311

Nakagawa H., Miki H., Ito M., Ohashi K., Takenawa T., Miyamoto S.

N-WASP, WAVE AND MENA PLAY DIFFERENT ROLES IN THE ORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON IN LAMELLIPODIA

Journal of Cell Science (2001) **114**, 1555-1565

Nakagawa H., Miki H., Nozumi M., Takenawa T., Miyamoto S., Wehland J., Small j. V.

IRSP53 IS COLOCALISED WITH WAVE2 AT THE TIPS OF PROTRUDING LAMELLIPODIA AND FILOPODIA INDEPENDENTLY OF MENA

Journal of Cell Science (2003) **116**, 2577-2583

Nakamura K., Yoshikawa N., Yamaguchi Y., Kagota S., Shinozuka K., Kunitomo M.

CHARACTERIZATION OF MOUSE MELANOMA CELL LINES BY THEIR MORTAL MALIGNANCY USING AN EXPERIMENTAL METASTATIC MODEL

Life Sciences (2002) **70**, 791-798

Nicolson G.

MOLECULAR CELL BIOLOGY AND CANCER METASTASIS

The International Journal of Developmental Biology (2004) **48**, 355-363

Nicolson G. L., Fidler I. J., Poste G.

EFFECTS OF TERTIARY AMINE LOCAL ANAESTHETICS ON THE BLOOD-BORNE IMPLANTATION AND CELL SURFACE PROPERTIES OF METASTATIC MOUSE MELANOMA CELLS

Journal National Cancer Institute (1986) **76**, 511-514

Nobes C. D., Hall A.

RHO, RAC AND CDC42 GTPASES REGULATE THE ASSEMBLY OF MULTIMOLECULAR FOCAL COMPLEXES ASSOCIATED WITH ACTIN STRESS FIBERS, LAMELLIPODIA AND FILOPODIA

Cell (1995) **81**, 53-62

Nobes C. D., Hall A.

RHO GTPASES CONTROL POLARITY, PROTRUSION AND ADHESION DURING CELL MOVEMENT

The Journal of Cell Biology (1999) **144**, 435-442

O'Toole T. E., Katagiri Y., Faull R. J., Peter K., Tamura R., Quaranta V., Loftus J. C., Shattil S. J., Ginsberg M. H.

INTEGRIN CYTOPLASMIC DOMAINS MEDIATE INSIDE-OUT SIGNAL TRANSDUCTION

The Journal of Cell Biology (1994) **124**, 1047-1059

Oda T., Crane Z. D., Dicus C. W., Sufi B. A., Bates R.

DOLASTATIN 11 CONNECTS TWO LONG-PITCH STRANDS IN F-ACTIN TO STABILIZE MICROFILAMENTS

Journal Molecular Biology (2003) **328**, 319-324

Odaka C., Sanders M. L., Crews P.

JASPLAKINOLIDE INDUCES APOPTOSIS IN VARIOUS TRANSFORMED CELL LINES BY A CASPASE-3-LIKE PROTEASE-DEPENDENT PATHWAY

Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology (2000) **7**, 947-952

Ohuchi E.

MEMBRANE TYPE 1 MATRIX METALLOPROTEINASE DIGESTS INTERSTITIAL COLLAGENS AND OTHER EXTRACELLULAR MATRIX MOLECULES

The Journal of Biological Chemistry (1997) **272**, 2446-2451

Oliver T., Lee J., Jacobson K.

FORCE EXERCERTED BY LOCOMOTING CELLS

Seminars in Cell Biology (1994) **5**, 139-147

- Palecek S. P., Horwitz A. F., Lauffenburger D. A.**
KINETIC MODEL FOR INTEGRIN-MEDIATED ADHESION RELEASE DURING CELL MIGRATION
Annual Review of Biomedical Engineering (1999) **27**, 219-235
- Palecek S. P., Huttenlocher A., Horwitz A. F., Lauffenburger D. A.**
PHYSICAL AND BIOCHEMICAL REGULATION OF INTEGRIN RELEASE DURING REAR DETACHMENT OF MIGRATING CELLS
Journal of Cell Science (1998) **111**, 929-940
- Palecek S. P., Loftus J. C., Ginsberg M. H., Lauffenburger D. A., Horwitz A. F.**
INTEGRIN-LIGAND BINDING PROPERTIES GOVERN CELL MIGRATION SPEED THROUGH CELL-SUBSTRATUM ADHESIVENESS
Nature (1997) **385**, 537-540
- Palsson E., Othmer H. G.**
A MODEL FOR INDIVIDUAL AND COLLECTIVE CELL MOVEMENT IN DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (2000) **97**, 10448-10453
- Pantaloni D., Boujema R., Didry D., Gounon P., Carlier M. F.**
THE ARP 2/3 COMPLEX BRANCHES FILAMENT BARBED ENDS: FUNCTIONAL ANTAGONISM WITH CAPPING PROTEINS
Nature Cell Biology (2000) **2**, 385-391
- Patel K., Harding P., Haney L. B., Glass W. F.**
REGULATION OF THE MESANGIAL CELL MYOFIBROBLAST PHENOTYPE BY ACTIN POLYMERIZATION
Journal of Cellular Physiology (2003) **195**, 435-445
- Pelagalli A., Belisario M. A., Squillacioti C., Morte R. D., d'Angelo D., Tafuri S., Lucisano A., Staiano N.**
THE MYCOTOXIN FUMONISIN B1 INHIBITS INTEGRIN-MEDIATED CELL-MATRIX ADHESION
Biochimie (1999) **81**, 1003-1008
- Petroll M. W., Ma L.**
DIRECT, DYNAMIC ASSESSMENT OF CELL-MATRIX INTERACTIONS INSIDE FIBRILLAR COLLAGEN LATTICE
Cell Motility and Cytoskeleton (2003) **55**, 254-264
- Petroll M. W., Cavanagh D. H., Jester J. V.**
DYNAMIC THREE-DIMENSIONAL VISUALIZATION OF COLLAGEN MATRIX REMODELLING AND CYTOSKELETAL ORGANISATION IN LIVING CORNEAL FIBROBLASTS
Scanning (2004) **26**, 1-10
- Petroll M. W., Ma L., Jester J.**
DIRECT CORRELATION OF COLLAGEN MATRIX DEFORMATION WITH FOCAL ADHESION DYNAMICS IN LIVING CORNEAL FIBROBLASTS
Journal of Cell Science (2003) **116**, 1481-1491
- Pines K., Way M., Lafont F.**
CYTOSKELETON WEB ALERT
Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 13-15
- Pinkus G. S., Lones M. A., Matsumura F., Yamashiro S., Said J. W., Pinkus J. L.**
LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS: IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF FASCIN, A DENDRITIC CELL MARKER
American Journal Clinical Pathology (2002) **118**, 335-343
- Pollard T. D., Borisy G. G.**
CELLULAR MOTILITY DRIVEN BY ASSEMBLY AND DISSASSEMBLY OF ACTIN FILAMENTS
Cell (2003) **112**, 453-465
- Pollard T. D., Mooseker M. S.**
DIRECT MEASUREMENT OF ACTIN POLYMERIZATION RATE CONSTANTS BY ELECTRON MICROSCOPY OF ACTIN FILAMENTS BY ISOLATED MICROVILLUS CORES
The Journal of Cell Biology (1981) **88**, 654-659
- Pollard T. D., Blanchoin L., Mullin D. R.**
ACTIN DYNAMICS
The Journal of Cell Biology (2001) **114**, 3
- Posey C. S., Bierer B. E.**
ACTIN STABILIZATION BY JASPLAKINOLIDE ENHANCES APOPTOSIS INDUCED BY CYTOKINE DEPRIVATION
The Journal of Biological Chemistry (1999) **274**, 4259-4265

Poste G., Doll J., Fidler I. J.

INTERACTIONS AMONG CLONAL SUBPOPULATIONS AFFECT STABILITY OF THE METASTATIC PHENOTYPE IN POLYCLONAL POPULATIONS OF B16 MELANOMA CELLS
The Journal of Cell Biology (1981) **78**, 6226-6230

Poste G., Doll J., Hart I. R., Fidler I. J.

IN VITRO SELECTION OF MURINE B16 MELANOMA VARIANTS WITH ENHANCED TISSUE-INVASIVE PROPERTIES
Cancer Research (1980) **40**, 1636-1644

Potter D. A.

CALPAIN REGULATES ACTIN REMODELLING DURING CELL SPREADING
The Journal of Cell Biology (1998) **141**, 1319-1332

Putz E.

PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF CELL LINES DERIVED FROM DISSEMINATED CANCER CELL IN BONE MARROW OF PATIENTS WITH SOLID EPITHELIAL TUMORS: ESTABLISHMENT OF WORKING MODELS FOR HUMAN MICROMETASTASIS
Cancer Research (1999) **59**, 241-248

Raucher D., Stauffer T., Chen W., Shen K., Guo S., York J. D., Sheetz M. P., Meyer T.

PHOSPHATIDYLINOSITOL 4,5-BIPHOSPHAT FUNCTIONS AS A SECOND MESSENGER THAT REGULATES CYTOSKELETON-PLASMA MEMBRANE ADHESION
Cell (2000) **100**, 221-228

Raz A., McLellan W. L., Hart I. R., Bucana C. D., Hoyer L. C., Sela B-A., Dragsten P., Fidler J. I.

CELL SURFACE PROPERTIES OF B16 MELANOMA VARIANTS WITH DIFFERING METASTATIC POTENTIAL
Cancer Research (1980) **40**, 1645-1652

Regen C. M., Horwitz A. F.

DYNAMICS OF B1-INTEGRIN MEDIATED ADHESIVE CONTACTS IN MOTILE FIBROBLASTS
The Journal of Cell Biology (1992) **119**, 1347-1359

Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G. G., Parson T. J., Horwitz A. R.

CELL MIGRATION: INTEGRATING SIGNALS FROM FRONT TO BACK
Journal of Cell Science (2003) **302**, 1704-1709

Rintoul R. C., Sethi T.

THE ROLE OF EXTRACELLULAR MATRIX IN SMALL-CELL LUNG CANCER
The Lancet Oncology (2002) **2**, 437-442

Rogers S. L., Gelfand V. I.

MEMBRANE TRAFFICKING, ORGANELLE TRANSPORT, AND THE CYTOSKELETON
Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 57-62

Rohatgi R.

THE INTERACTION BETWEEN N-WASP AND THE ARP 2/3 COMPLEX LINKS CDC42-DEPENDENT SIGNALS TO ACTIN ASSEMBLY
Cell (1999) **97**, 221-231

Rottner K., Beherendt B., Small J. V., Wehland J.

VASP DYNAMICS DURING LAMELLIPODIA PROTRUSION
Natur Cell Biology (1999) **1**, 321-322

Rottner K., Krause M., Gimona M., Small J. V., Wehland, J.

ZYXIN IS NOT COLOCALIZED WITH VASODILATOR-STIMULATED PHOSPHOPROTEIN (VASP) AT LAMELLIPODIAL TIPS AND EXHIBITS DIFFERENT DYNAMICS TO VINCULIN, PAXILLIN, AND VASP IN FOCAL ADHESION
Molecular Biology of the Cell (2001) **12**, 3103-3113

Roy P., Petrol W. M., Cavangh H. D., Chuong C. J. And Jester J. V.

AN IN VITRO FORCE MEASUREMENT ASSAY TO STUDY THE EARLY MECHANICAL INTERACTION BETWEEN CORNEAL FIBROBLASTS AND COLLAGEN MATRIX
Experimental Cell Research (1997) **232**, 106-117

Sabri S., Jandrot-Perrus M., Bertoglio J., Farndale R. W., Mansat de Mas V., Debili N., Vainchenker W.

DIFFERENTIAL REGULATION OF ACTIN STRESS FIBER ASSEMBLY AND PROPLATELET FORMATION BY ALPHA2BETA1 INTEGRIN AND GPVI IN HUMAN MEGACARYOCYTES
American Society of Hematology (2004) 1-24

Sahai E.

MECHANISMS OF CANCER CELL INVASION

Current Opinion in Genetics and Development (2005) **15**, 1-10

Sahai E., Olson M. F., Marshall C. J.

CROSS-TALK BETWEEN RAS AND RHO SIGNALLING PATHWAYS IN TRANSFORMATION FAVOURS PROLIFERATION AND INCREASED MOTILITY

The EMBO Journal (2001) **20**, 755-766

Sawitzky H., Hanfstingl U., Faulstich H.

GROWTH INHIBITION AND CHANGES IN MORPHOLOGY AND ACTIN DISTRIBUTION IN ACETABULARIA ACETABULUM BY PHALLOIDIN AND PHALLOIDIN DERIVATES

Protoplasma (2003) **220**, 209-218

Schafer P. A., Jennings P. B.

DYNAMICS OF CAPPING PROTEINS AND ACTIN ASSEMBLY IN VITRO: UNCAPPING BARBED ENDS BY INOSITIDES

Natur Cell Biology (1996) **135**, 1769-1799

Schatzman F., Marlow R., Streuli C. H.

INTEGRIN SIGNALING AND MAMMARY CELL FUNCTION

Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia (2003) **8**, 395-408

Schevzov G., Lloyd C., Gunning P.

HIGH LEVEL EXPRESSION OF TRANSFECTED BETA- AND GAMMA-ACTIN GENES DIFFERENTIALLY IMPACTS ON MYOBLAST CYTOARCHITECTURE

The Journal of Cell Biology (1992) **117**, 775-785

Schmidt C. E., Horwitz A. F., Lauffenburger D. A.

INTEGRIN-CYTOSKELETAL INTERACTIONS IN MIGRATING FIBROBLASTS ARE DYNAMIC, ASSYMETRIC AND REGULATED

The Journal of Cell Biology (1998) **123**, 977-991

Schoenwaelder S. M., Burridge K.

BIDIRECTIONAL SIGNALLING BETWEEN THE CYTOSKELETON AND INTEGRINS

Current Opinion in Cell Biology (1999) **11**, 274-386

Schwab A.

FUNCTION AND SPATIAL DISTRIBUTION OF ION CHANNELS AND TRANSPORTERS IN CELL MIGRATION

The American Journal of Physiology (2001) **280**, F739-F747

Schwartz M. A., Shattil S. J.

SIGNALLING NETWORKS LINKING INTEGRINS AND RHO FAMILY GTPASES

Trends in Biochemical Science (2000) **25**, 388-391

Sechi A. S., Wehland J.

THE ACTIN CYTOSKELETON AND PLASMA MEMBRANE CONNECTION: PTDINS(4,5)P(2) INFLUENCES CYTOSKELETAL PROTEIN ACTIVITY AT THE PLASMA MEMBRANE

Journal of Cell Science (2000) **113**, 3685-3695

Seftor E. A.

MOLECULAR DETERMINES OF HUMAN UVEAL MELANOMA INVASION AND METASTASIS

Clinical & Experimental Metastasis (2002) **19**, 233-246

Senderowicz A. M., Kaur G., Sainz E., Laing C., Inman W. D., Rodriguez J., Crews P., Malspeis L., Grever M. R., Sausville E. A., Duncan K. L. K.

JASPLAKINOLIDE'S INHIBITION OF THE GROWTH OF PROSTATE CARCINOMA CELLS IN VITRO WITH DISRUPTION OF THE ACTIN CYTOSKELETON

Journal of the National Cancer Institute (1995) **87**, 46-51

Sheetz M. P., Felsenfeld D. P., Galbraith C. G.

CELL MIGRATION: REGULATION OF FORCE ON EXTRACELLULAR-MATRIX-INTEGRIN COMPLEXES

Trends in Cell Biology (1998) **8**, 51-54

Shets M. P.

CELL MIGRATION BY GRADED ATTACHMENT TO SUBSTRATES AND CONTRACTION

Seminars in Cell Biology (1994) **5**, 149-155

Shibasaki Y., Ishihara H., Kizuki N., Asano T., Oka Y., Yazaki Y.

MASSIVE ACTIN POLYMERISATION INDUCED BY PHOSPHATIDYLINOSITOL-4-PHSOPHAT 5-KINASE

The Journal of Biological Chemistry (1997) **272**, 7578-7581

Small V. J.

INTRODUCTION: ACTIN AND CELL CRAWLING
Seminars in Cell Biology (1994) **5**, 137-138

Small V. J.

LAMELLIPODIA ARCHITECTURE: ACTIN FILAMENT TURNOVER AND THE LATERAL FLOW OF ACTIN FILAMENTS DURING MOTILITY
Seminars in Cell Biology (1994) **5**, 157-163

Small V. J., Herzog M., Anderson K.

ACTIN FILAMENT ORGANIZATION IN THE FISH KERATOCYTE LAMELLIPODIUM
The Journal of Cell Biology (1995) **129**, 1275-1286

Smilenov L. B., Mikhailov A., Pelham R. J., Marcantonio E. E., Gundersen G. G.

FOCAL ADHESION MOTILITY REVEALED IN STATIONARY FIBROBLASTS
Science (1999) **286**, 1172-1174

Snapper S. B., Takeshima F., Antón I., Liu C. H., Thomas S. M., Nguyen D., Dudley D., Fraser H., Purich D., Lopez-Illasaca M., Klein C., Davidson L., Bronson R., Mulligan R. C., Southwick F., Geha R., Goldberg M. B., Rosen F. S., Hartwig J. H., Alt F. W.

N-WASP DEFICIENCY REVEALS DISTINCT PATHWAYS FOR CELL SURFACE PROJECTIONS AND MICROBIAL ACTIN-BASED MOTILITY
Nature Cell Biology (2001) **3**, 897-906

Sood Ay. K.

MOLECULAR DETERMINANTS FOR OVARIAN CANCER PLASTICITY
The American Journal of Pathology (2001) **158**, 1279-1288

Sottile J., Hocking D. C.

FIBRONECTIN POLYMERISATION REGULATES THE COMPOSITION AND STABILITY OF EXTRACELLULAR MATRIX FIBRILS AND CELL-MATRIX ADHESIONS
Molecular Biology of the Cell (2002) **13**, 3546-3559

Stoitzner, P. ; Ratzinger, G., Koch, F., Janke, K., Scholler, T., Kaser, A., Tilg, H., Cruikshank, W. W. ; Fritsch, P., Romani, N.

INTERLEUKIN-16 SUPPORTS THE MIGRATION OF LANGERHANS CELLS, PARTLY IN A CD4-INDEPENDENT WAY
Journal of Investigative Dermatology (2001), **116**(5) 641-649

Storim J.

MOLEKULARE UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DES ANTIGENS L6 IN EPIDERMALLEN KERATINOZYTEN
Dissertation (2001) Universität Würzburg

Sträuli P., Haemmerli G.

THE ROLE OF CANCER CELL MOTILITY IN INVASION
Cancer Metastasis Review (1984) **3**, 127-141

Sun H. Q., Kwiatkowska K., Yin H. L

ACTIN MONOMER BINDING PROTEINS
Current Opinion in Cell Biology (1995) **7**, 102-110

Svitkina T. M., Borisy G. G.

ARP2/3 COMPLEX AND ACTIN DEPOLYMERISATION FACTOR/COFILIN IN DENDRITIC ORGANIZATION AND TREADMILLING OF ACTIN FILAMENT ARRAY IN LAMELLIPODIA
The Journal of Cell Biology (1999) **145**, 1009-1026

Svitkina T. M., Bulanova E. A., Chaga O. Y., Vignjevic D. M., Kojima S. I., Vassilev J. M., Borisy G. G.

MECHANISM OF FILOPODIA INITIATION BY REORGANIZATION OF A DENDRITIC NETWORK
The Journal of Cell Biology (2003) **160**, 409-421

Symons M. H., Mitchinson T. J.

CONTROL OF ACTIN POLYMERIZATION IN LIVE AND PERMEABILIZED FIBROBLASTS
The Journal of Cell Biology (1991) **114**, 503-513

Tamariz E., Grinnell F.

MODULATION OF FIBROBLAST MORPHOLOGY AND ADHESION DURING COLLAGEN MATRIX REMODELLING
Molecular Biology of the Cell (2002) **13**, 3915-3929

Theriot J. A.

REGULATION OF THE ACTIN CYTOSKELETON IN LIVING CELLS
Seminars in Cell Biology (1994) **5**, 193-199

Theriot J. A.

ACCELERATING ON A TREADMILL: ADF/COFILIN PROMOTES RAPID ACTIN FILAMENT TURNOVER IN THE DYNAMIC CYTOSKELETON

The Journal of Cell Biology (1997) **136**, 1165-1168

Theriot J. A., Mitchison T. J.

ACTIN MICROFILAMENT DYNAMICS IN LOCOMOTING CELLS

Nature (1991) **352**, 126-131

Thiery J. P.

EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN TUMOR PROGRESSION

Nature Reviews. Cancer (2002) **2**, 442-454

Thomas L., Byers R. H., Vink J., Stamenkovic I.

CD44H REGULATES TUMOR CELL MIGRATION ON HYALURONATE-COATED SUBSTRATE

The Journal of Cell Biology (1992) **118**, 971-977

Tomasek J. J., Hay E. D., Fujiwara K.

COLLAGEN MODULATES CELL SHAPE AND CYTOSKELETON OF EMBRYONIC CORNEAL AND FIBROMA FIBROBLASTS: DISTRIBUTION OF ACTIN, α -ACTININ AND MYOSIN

Developmental Biology (1982) **92**, 107-122

Totsukawa G.

DISTINCT ROLES OF ROCK (RHO-KINASE) AND MLCK IN SPATIAL REGULATION OF MLC PHOSPHORYLATION FOR ASSEMBLY OF STRESS FIBERS AND FOCAL ADHESION IN 3T3 FIBROBLASTS

The Journal of Cell Biology (2000) **150**, 797-806

Tsutsumi S., Gupta S. K., Hogan V., Collard J. G., Raz A.

ACTIVATION OF SMALL GTPASE RHO IS REQUIRED FOR AUTOCRINE MOTILITY FACTOR SIGNALLING

Cancer Research (2002) **62**, 4484-4490

van Muijen G. N. P., Jansen K. F. J., Cornelissen I. M. H. A., Smeets D. F. C. M., Beck J. L. M., Ruitler D. J.

ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A HUMAN MELANOMA CELL LINE (MV3) WHICH IS HIGHLY METASTATIC IN NUDE MICE

International Journal Cancer (1991) **48**, 85-91

Vanni S., Lagerholm C. B., Otey C., Taylor L., Lanni F.

INTERNET-BASED IMAGE ANALYSIS QUANTIFIES CONTRACTILE BEHAVIOUR OF INDIVIDUAL FIBROBLASTS INSIDE MODEL TISSUE

Biophysical Journal (2003) **84**, 2715-2727

Varner J. A., Cheresh D. A.

INTEGRINS AND CANCER

Current Opinion in Cell Biology (1996) **8**, 724-730

Verkhovsky A. B., Svitkina T. M., Borisy G. G.

MYOSIN II FILAMENT ASSEMBLIES IN THE ACTIVE LAMELLA OF FIBROBLASTS: THEIR MORPHOGENESIS AND ROLE IN THE FORMATION OF ACTIN FILAMENT BUNDLES

The Journal of Cell Biology (1995) **131**, 989-1002

Vignjeyvic D., Yazar D., Welch M. D., Peloquin J., Svitkina T. M., Borisy G. G.

FORMATION OF FILOPODIA-LIKE BUNDLES IN VITRO FROM A DENDRITIC NETWORK

The Journal of Cell Biology (2003) **160**, 951-962

Von Arx P., Bantle S., Soldati T., Perriard J. C.

DOMINANT NEGATIVE EFFECT OF CYTOPLASMIC ACTIN ISOPROTEINS ON CARDIOMYOCYTE CYTOARCHITECTURE AND FUNCTION

The Journal of Cell Biology (1995) **131**, 1759-1773

Wakatsuki T., Schwab B., Thompson N. C., Elson E. L.

EFFECTS OF CYTOCHALASIN D AND LATRUNCULIN B ON MECHANICAL PROPERTIES OF CELLS

Journal of Cell Sciences (2000) **114**, 1025-1036

Walczak C. E.

MICROTUBULE DYNAMICS AND TUBULIN INTERACTING PROTEINS

Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 52-56

Wang Y. L.

REORGANIZATION OF ACTIN FILAMENT BUNDLES IN LIVING FIBROBLASTS

The Journal of Cell Biology (1984) **99**, 1478-1485

Wang Y. L.

EXCHANGE OF ACTIN SUBUNITS AT THE LEADING EDGE OF LIVING FIBROBLASTS: POSSIBLE ROLE OF TREADMILLING

The Journal of Cell Biology (1985) **101**, 597-602

Wehrle-Haller B., Imhof B. A.

THE INNER LIVES OF FOCAL ADHESIONS

Trends in Cell Biology (2002) **12**, 382-389

Wehrle-Haller B., Imhof B. A.

ACTIN, MICROTUBULES AND FOCAL ADHESION DYNAMICS DURING CELL MIGRATION

The International Journal of Biochemistry and Cell Biology (2003) **35**, 39-50

Wehrle-Haller B., Imhof B. A.

INTEGRIN-DEPENDENT PATHOLOGIES

Journal of Pathology (2003) **200**, 481-487

Wei L., Wang L., Carson J. A., Agan J. E., Imanaka-Yoshida K., Schwartz R. J.

$\beta 1$ INTEGRIN AND ORGANIZED ACTIN FILAMENTS FACILITATE CARDIOMYOCYTESPECIFIC RHOA-DEPENDENT ACTIVATION OF THE SKELETAL A-ACTIN PROMOTOR

The FASEB Journal (2001) **15**, 785-796

Welch M. D., DePace A. H., Verma S., Iwamatsu A., Mitchison T.

THE HUMAN ARP2/3 COMPOSED OF EVOLUTIONARILY CONSERVED SUBUNITS AND IS LOCALIZED TO CELLULAR REGIONS OF DYNAMIC ACTIN FILAMENT ASSEMBLY

The Journal of Cell Biology (1997) **138**, 375-384

Welch M. D., Mallavarapu A., Rosenblatt J., Mitchison T. J.

ACTIN DYNAMICS IN VIVO

Current Opinion in Cell Biology (1997) **9**, 54-61

Westphal M., Jungbluth A., Heidecke M., Mühlbauer B., Heizer C., Schwartz J. M., Marriott G., Gerisch G.

MICROFILAMENT DYNAMICS DURING CELL MOVEMENT AND CHEMOTAXIS MONITORED USING A GFP-ACTIN FUSION PROTEIN

Current Biology (1997) **7**, 176-183

Whittard J. D., Akiyama S. K.

ACTIVATION OF $\beta 1$ INTEGRINS INDUCES CELL-CELL ADHESION

Experimental Cell Research (2001) **263**, 65-76

Wickström S., Alitalo K., Keski-Oja J.

ENDOSTATIN ASSOCIATED WITH LIPID RAFTS AND INDUCES REORGANIZATION OF THE ACTIN CYTOSKELETON VIA DOWN-REGULATION OF RHOA ACTIVITY

The Journal of Biological Chemistry (2003) **278**, 37895-37901

Wolf K.

MIGRATION OF TUMOR CELLS AND LEUKOCYTES IN EXTRACELLULAR MATRIX: PROTEOLYTIC AND NONPROTEOLYTIC STRATEGIES FOR OVERCOMING TISSUE BARRIERS

Dissertation (2002) Universität Würzburg

Wolf K., Mazo I., Leung H., Engelke K., von Andrian U. H., Deryugina E. I., Strongin L. Y.,

Bröcker E. B., Friedl P.

COMPENSATION MECHANISM IN TUMOR CELL MIGRATION: MESENCHYMAL-AMOEBOID TRANSITION AFTER BLOCKING OF PERICELLULAR PROTEOLYSIS

Journal of Cell Biology (2003) **160**, 267-277

Wood S. J.

PATHOGENESIS OF METASTASIS FORMATION OBSERVED IN VIVO IN THE RABBIT EAR CHAMBER

A. M. A. archives of pathology (1958) **66**, 550-568

Woods M. L., Shimizu Y.

SIGNALING NETWORKS REGULATING $\beta 1$ INTEGRIN-MEDIATED ADHESION OF T-LYMPHOCYTES TO EXTRACELLULAR MATRIX

Journal of Leukocyte Biology (2001) **69**, 874-880

Wozniak M. A., Modzelewska K., Kwong L., Keely P. J.

FOCAL ADHESION REGULATION OF CELL BEHAVIOR

Biochimica et Biophysica Acta (2004) **1692**, 103-119

- Yamada K. M.**
MONOCLONAL ANTIBODY AND SYNTHETIC PEPTIDE INHIBITORS OF HUMAN TUMOR CELL MIGRATION
Cancer Research (1990) **50**, 4485-4496
- Yamada K. M., Geiger B.**
MOLECULAR INTERACTIONS IN CELL ADHESION COMPLEXES
Current Opinion in Cell Biology (1999) **9**, 97-85
- Yamaguchi H., Miki H., Suetsugu S., Ma L., Kirschner M. W., Takenawa T.**
TWO TANDEM VERPROLIN HOMOLOGY DOMAINS ARE NECESSARY FOR A STRONG ACTIVATION OF ARP 2/3 COMPLEX-INDUCED ACTIN POLYMERIZATION AND INDUCTION OF MICROSPIKE FORMATION BY N-WASP
Proceedings of the National Academy of Sciences of USA (2000) **97**, 12631-12636
- Yamamoto M., Hilgemann D. H., Feng S., Bito H., Ishihara H., Shibasaki Y., Yin H. L.**
PHOSPHATIDYLINOSITOL 4,5-BIPHOSPHATE INDUCES STRESS FIBRE FORMATION AND INHIBITS MEMBRANE RUFFLING IN CV1 CELLS
The Journal of Cell Biology (2001) **152**, 867-876
- Yamashiro S., Yamakita Y., Ono S., Matsumura F.**
FASCIN, AN ACTIN-BUNDLING PROTEIN, INDUCES MEMBRANE PROTRUSIONS AND INCREASES CELL MOTILITY OF EPITHELIAL CELLS
Molecular Biology of the Cell (1998) **9**, 993-1006
- Yanagida T., Kitamura K., Tanaka H., Iwanas A. H., Esaki S.**
SINGLE MOLECULES ANALYSIS OF THE ACTOMYOSIN MOTOR
Current Opinion in Cell Biology (2000) **12**, 20-25
- Yang C., Huang M., DeBaiso J., Pring M., Joyce M., Miki H., Takenawa T., Zigmond S. H.**
PROFILIN ENHANCES CDC42-INDUCED NUCLEATION OF ACTIN POLYMERISATION
The Journal of Cell Biology (2000) **150**, 1001-1012
- Yoshioka K., Nakamori S., Itoh K.**
OVEREXPRESSION OF SMALL GTP-BINDING PROTEIN RHOA PROMOTES INVASION OF TUMOR CELLS
Cancer Research (1999) **59**, 2004-2010
- Yumura S., Mori H., Fukui Y.**
LOCALIZATION OF ACTIN AND MYOSIN FOR THE STUDY OF AMEBOID MOVEMENT IN DICTYOSTELIUM USING IMPROVED IMMUNOFLUORESCENCE
The Journal of Cell Biology (1984) **99**, 894-899
- Yurchenco P. D., Birk D. E., Mecham R. P. (Ed.)**
EXTRACELLULAR MATRIX ASSEMBLY AND STRUCTURE (1994) Academic Press Inc., California
- Zamir E.**
DYNAMICS AND SEGREGATION OF CELL-MATRIX ADHESION IN CULTURED FIBROBLASTS
Nature Cell Biol. (2000) **2**, 191-196
- Zamir G., Geiger B.**
MOLECULAR COMPLEXITY AND DYNAMICS OF CELL-MATRIX ADHESIONS
Journal of Cell The American Journal Science (2001) **114**, 3583-3590
- Zigmond S. H.**
ACTIN CYTOSKELETON: THE ARP 2/3 COMPLEX GETS TO THE POINT
Current Biology (1998) **8**, R654-R657
- Zigmond S. H.**
HOW WASP REGULATES ACTIN POLYMERISATION
The Journal of Cell Biology (2000) **150**, F117-F120
- Zucker S., Cao J., Chen W. T.**
CRITICAL APPRAISAL OF THE USE OF MATRIX METALLOPROTEINASE INHIBITORS IN CANCER TREATMENT
Oncogene (2000) **19**, 6642-6650

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Polymerisation und Depolymerisation der Aktinfilamente wird durch Inhibitoren des Aktinzytoskeletts charakteristisch verhindert	5
Abb. 2:	Prinzip der Analyse der relativen Fluoreszenzintensität der markierten Moleküle sowie der Bestimmung der Kollokalisierung	27
Abb. 3:	3 physikalisch verschiedene Migrationsbedingungen aus Kollagen	31
Abb. 4:	Vergleich der Aktinverteilung im 3D Kollagengel	32
Abb. 5:	Migrationspfade, Zellmorphologie, Geschwindigkeit und Mobilität einzelner B16 GFP-Aktin Zellen	34
Abb. 6:	Migrationsgeschwindigkeit, Mobilität und typische Morphologien der B16/F1 GFP-Aktin Zellpopulation zu definierten Zeitpunkten	35
Abb. 7:	Morphologie und Pseudopodienzahl wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf 2D (A) und in 3D (B) fibrillären Kollagenmatrices	38
Abb. 8:	Migrationspfade und Morphologie, Geschwindigkeit und Anteil spontan wandernder Zellen in B16/F1 GFP-Aktin und MV3 Melanomzellen im 3D Kollagenmatrices	40
Abb. 9:	Morphologie und Pseudopodienzahl wandernder B16/F1 GFP-Aktin und MV3 Zellen im 3D Kollagengel	41
Abb. 10:	B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf 2D monomerer Kollagenoberfläche	43
Abb. 11:	Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts in wandernden B16/F1GFP-Aktin Zellen. Wanderung auf 2D versus in 3D fibrillärem Kollagen	44
Abb. 12:	Semiquantitative Darstellung der Fluoreszenzintensität von GFP-Aktin in wandernden B16/F1 Zellen auf 2D monomerer, 2D fibrillärer Kollagenoberfläche und in einer 3D Kollagenmatrix	46
Abb. 13:	Lokalisation von Fascin und VASP in B16/F1 GFP-Aktin Zellen während der Migration über eine 2D mit Kollagenmonomeren beschichteten Oberfläche	48
Abb. 14:	Lokalisation von Fascin und VASP in B16/F1 GFP-Aktin Zellen während der Migration in einer 3D fibrillären Kollagenmatrix	49
Abb. 15:	Morphologie und Migrationseffizienz der B16/F1 GFP-Aktin Zellen nach Zugabe von Aktin-Inhibitoren	51
Abb. 16:	Zellmorphologie, Geschwindigkeiten und Mobilität von B16/F1 GFP-Aktin Zellen unter Hemmstoffwirkung	52
Abb. 17:	Struktur, Matrixkontakte und relative Fluoreszenzintensität des blockierten Aktinzytoskeletts lebender B16/F1 GFP-Aktin Zellen	53
Abb.18:	Vergleichende Darstellung des Aktinzytoskeletts durch GFP-Aktin und simultane Färbung mit Phalloidin in B16/F1 GFP-Aktin Zellen	55
Abb. 19:	Lebende MV3 Zellen unter Inhibitoreinfluss	57
Abb. 20:	Zellmorphologie, Geschwindigkeiten und Mobilität von einzelnen MV3 Zellen unter Hemmstoffwirkung	58

Abb. 21:	Struktur, Matrixkontakte und relative Fluoreszenzintensität des blockierten Aktinzytoskeletts fixierter, Phalloidin gefärbter MV3 Zellen	59
Abb. 22:	Verteilung von F-Aktin und $\beta 1$ Integrin in wandernden MV3 Zellen in einem 3D Kollagengel	64
Abb. 23:	Verteilung von Aktin und $\beta 1$ -Integrinen in MV3 Melanomzellen nach Zugabe von Inhibitoren des Aktinzytoskeletts	65
Abb. 24:	Diversität der Zellmorphologie und Ausbildung protrusiver Kompartimente in Abhängigkeit von der Biophysik des kollagenösen Substrates	67
Abb. 25:	Migrationsformen in physikalisch unterschiedlichen Kollagenumgebungen	68
Abb. 26:	Traktionsvektoren, Migrationspfad, Migrationsgeschwindigkeit und Filopodienzahl einer auf 2D fibrillären Kollagenoberfläche wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zelle	70
Abb. 27:	Sessiler polarisierter Phänotyp einer B16/F1 GFP-Aktin Zelle im 3D Kollagengel	71
Abb. 28:	Pfade einzelner getrackter Kollagenfasern an der Vorderfront einer wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle	73
Abb. 29:	Matrixdeformation an der Vorderfront einer wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle	74
Abb. 30:	Phase 1: Zunahme der Kolokalisation von Aktin und Kollagenfasern an der Vorderfront	75
Abb. 31:	Phase 2: Konstante Kolokalisation der aktinreicher Filopodien mit Kollagenfasern an der Vorderfront einer wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle	76
Abb. 32:	Quantifizierung der Kolokalisation aktinreicher Filopodien mit Kollagenfasern	77
Abb. 33:	Kollagenfaserverschiebung, Geschwindigkeit von Vorderfront, Hinterende und assoziierte Zelllänge sowie Anzahl, Positionierung und Kolokalisation aktinreicher Filopodien mit Kollagenfasern	79
Abb. 34:	Pfade der getrackten Kollagenpixel an der Vorderfront einer wandernden MV3 Zelle	81
Abb. 35:	Traktion und Relaxation der Kollagenmatrix an der Vorderfront einer wandernden MV3 Zelle	82
Abb. 36:	Zellmorphologie in Abhängigkeit von der Struktur der extrazellulären Matrix	87
Abb. 37:	Zeitliche Abfolge von Zellextension und Wanderung von B16/F1 GFP-Aktin Zellen und MV3 Zellen in 3D fibrillärer Kollagenmatrix	89

8.2. Filmlegende

- Film 1: B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf 2D monomerer Kollagenoberfläche.
Echtzeit: 25 h; zu Abb. 5, Abb. 6
- Film 2: B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf 2D fibrillärer Kollagenoberfläche.
Echtzeit: 25h, zu Abb. 5, Abb. 6; Abb. 7
- Film 3: B16/F1 GFP-Aktin Zellen in 3D fibrillärer Kollagenmatrix.
Echtzeit: 25 h; zu Abb. 5, Abb. 6; Abb. 7; Abb. 9
- Film 4: MV3 Zellen im 3D Kollagengel.
Echtzeit 20 h; zu Abb. 8; Abb. 9
- Film 5: Sessile B16/F1 GFP-Aktin Zelle auf 2D monomerer Kollagenoberfläche.
Echtzeit: 200 min; zu Abb. 10, Abb. 24
- Film 6: Migrierende B16/F1 GFP-Aktin Zelle auf 2D monomerer Kollagenoberfläche.
Echtzeit: 190 min; zu Abb. 10, Abb. 11; Abb. 12, Abb. 24
- Film 7: Migrierende B16/F1 GFP-Aktin Zelle auf 2D fibrillärer Kollagenoberfläche.
Echtzeit: 120 min; Abb. 11, Abb. 12, Abb. 24, Abb. 26
- Film 8: Migrierende B16/F1 GFP-Aktin Zelle im 3D Kollagengel
Echtzeit: 100 min; zu Abb. 11, Abb. 12, Abb. 24
- Film 9: Mit Cytochalasin D im 3D Kollagengel inkubierte B16/F1 GFP-Aktin Zellen.
Echtzeit: 8 h; zu Abb. 15, Abb. 16
- Film 10: Mit Latrunculin B im 3D Kollagengel inkubierte B16/F1 GFP-Aktin Zellen.
Echtzeit: 9 h; zu Abb. 15, Abb. 16
- Film 11: Mit Jasplakinolide im 3D Kollagengel inkubierte B16/F1 GFP-Aktin Zellen.
Echtzeit: 8 h; zu Abb. 15, Abb. 16
- Film 12: Mit Cytochalasin D im 3D Kollagengel inkubierte B16/F1 GFP-Aktin Zelle.
Echtzeit: 160 min; zu Abb. 17
- Film 13: Mit Latrunculin B im 3D Kollagengel inkubierte B16/F1 GFP-Aktin Zelle.
Echtzeit: 160 min; zu Abb. 17
- Film 14: Mit Jasplakinolide im 3D Kollagengel inkubierte B16/F1 GFP-Aktin Zelle.
Echtzeit: 160 min; zu Abb. 17
- Film 15: Mit Cytochalasin D im 3D Kollagengel inkubierte MV3 Zelle.
Echtzeit: 20 h; zu Abb. 19, Abb. 20
- Film 16: Mit Latrunculin B im 3D Kollagengel inkubierte MV3 Zelle.
Echtzeit: 20 h; zu Abb. 19, Abb. 20
- Film 17: Mit Jasplakinolide im 3D Kollagengel inkubierte MV3 Zelle.
Echtzeit: 20 h; zu Abb. 19, Abb. 20
- Film 18: Migrierende MV3 Zelle im 3D Kollagengel.
Echtzeit: 150 min; Aufnahme: Kerstin Maasser 1999; Darstellung von CD44;
zu Abb. 34
- Film 19: Migrierende HT 1080 Zelle im 3D Kollagengel.
Echtzeit: 110 min; zu S. 71
- Film 20: Sessile B16/F1 GFP-Aktin Zelle im 3D Kollagengel
Echtzeit: 125 min; zu Abb. 27

- Film 21: Kollagenfaserdislokation bei der Wanderung einer B16/F1 GFP-Aktin Zelle durch eine 3D Kollagenmatrix
Echtzeit: 100 min; zu S. 72
- Film 22: Kollagenfaserdislokation auf dem Hauptpfad einer durch eine 3D Kollagenmatrix wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle
Echtzeit: 100 min; zu Abb. 28, Abb. 29
- Film 23: Kollagenfaserdislokation an der Vorderfront einer durch eine 3D Kollagenmatrix wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle
Echtzeit: 100 min; native Sequenz; zu Abb. 30; Abb. 31
- Film 24: Kollagenfaserdislokation an der Vorderfront einer durch eine 3D Kollagenmatrix wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle
Echtzeit: 100 min; Extraktion von Rot und Grün; zu Abb. 30; Abb. 31
- Film 25: Kollokalisierung von Kollagen und Aktin an der Vorderfront einer durch eine 3D Kollagenmatrix wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle
Echtzeit: 100 min; Extraktion von Kollagenfasern, Rot und Grün; zu Abb. 30; Abb. 31
- Film 26: Pixeldarstellung der Gelbtöne nach Kollokalisierung von Aktin und Kollagenfasern an der Vorderfront einer durch eine 3D Kollagenmatrix wandernden B16/F1 GFP-Aktin Zelle
Echtzeit: 100 min; zu Abb. 30; Abb. 31
- Film 27: Kollagenfaserdislokation an der Vorderfront einer durch eine 3D Kollagenmatrix wandernden MV3 Zelle
Echtzeit: 150 min; Aufnahme: Kerstin Maasser 1999; Darstellung von CD44 und Kollagenfasern; zu Abb. 34

8.1. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Biologische Funktion ausgewählter aktinbindender Proteine	4
Tab. 2: Hemmstoffe und Konzentrationen bei Migrationsversuchen	20
Tab. 3: Fluoreszente Marker zur Darstellung molekularer Strukturen	23
Tab. 4: Zellmorphologie und Migrationseffizienz wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen	36
Tab. 5: Zellmorphologie und Effizienz wandernder B16/F1 GFP-Aktin Zellen und wandernder MV3 Zellen	41
Tab. 6: Morphologische Besonderheiten des Aktinzytoskeletts von B16/F1 GFP-Aktin Zellen auf bzw. in unterschiedlichen Kollagenumgebungen	47
Tab. 7: Dosiswirkungsbereich der pharmakologischen Aktininhibitoren für B16/F1 GFP-Aktin Zellen	60
Tab. 8: Konzentrationen der pharmakologischen Hemmstoffe des Aktinzytoskeletts für die MV3 Melanomzellen	60

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen Freunden, Verwandten und Bekannten, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Spezieller Dank gebührt der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie und dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Würzburg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsgeräte.

Für immer währende Unterstützung und vielfältige Anregung danke ich insbesondere Andrea, Bernhard, Christiane, Helmut, Ipke, Julian, Katarina, Kerstin, Kurt, Margit, Martina, Neda, Paul, Tatjana, Thomas, Torsten, Uta.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Peter Friedl, der mich zum wissenschaftlichen Arbeiten anleitete, mein Interesse erkannte, mich forderte und förderte und mir die Präsentation meiner Arbeit auf nationalen und internationalen Tagungen und einen Forschungsaufenthalt an der Harvard Universität in Boston ermöglichte.

Josefine Starke

Würzburg, Zeuckritz, Dresden im Mai 2007

Lebenslauf

Name: Josefine Starke
Geburtsdatum: 04.05.1979
Geburtsort: Leipzig

Schulbildung:

09/1985-07/1992 Polytechnische Oberschule Bernhard Bästlein, Leipzig
08/1992-07/1997 Gustav-Theodor-Fechner-Gymnasium, Leipzig
07/1997 Abitur

Berufsausbildung:

09/1997-09/1999 Berufsausbildung zum Tierwirt im Landgut Börln
02/2000 Facharbeiter für Tierproduktion

Studium der Humanmedizin:

04/1999-09/2005 Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/2001 Physikum
08/2002 1. Staatsexamen
08/2005 2. Staatsexamen
10/2005-9/2006 Praktisches Jahr an der Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden
10/2006 3. Staatsexamen

Arbeitsbeginn:

01.11.2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Assistenzärztin in der
Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Dresden
(Direktor Prof. Dr. Michael Meurer)

Promotion:

10/2002-08/2004 Anfertigung der Medizinischen Dissertation bei Prof. Dr. Peter
Friedl an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie der Universität Würzburg
Thematik: *Dynamik, Biomechanik und Plastizität des Aktinzytoskeletts in
migrierenden B16/F1 GFP-Aktin Melanomzellen in 2D und 3D
extrazellulärer Matrix*

Publikationen:

26.-28.02.2004 31. ADF Tagung in Dresden. Poster P205
21.-23.10.2004 14. ADO Tagung in München. Vortrag V07
05.05.2005 Maligni Melanom: Prevence a lecba pigmentovych koznich
nadoru, Praha. Vortrag
15.05.2005 American Gastro Association meeting, Chicago. Poster

Forschungsaufenthalt:

07.07.-30.07.2006 Harvard University Boston USA im Rahmen der Medizinischen
Dissertation bei Prof. Dr. Peter Friedl, Würzburg