

**Plastizität der Tumorinvasion: Zelluläre und molekulare
Mechanismen der β 1-Integrin unabhängigen Migration von
Melanomzellen und murinen embryonalen Fibroblasten**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**vorgelegt von
Neda Daryab**

Würzburg, Februar 2009

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Herr Professor Dr. J. Schultz

Gutachter: Herr Professor Dr. med. Ph.D. (CDN) P. Friedl

Gutachter: Herr Professor Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 24.06.2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

meinen Eltern

تقديم به پدر و مادر عزیزم

	Inhaltsverzeichnis	i
	Abkürzungsverzeichnis	iv
1.	Einleitung	1
1.1.	Struktur und Funktion von adhäsiven Bestandteilen der Zelloberflächen	1
1.1.1.	<i>Integrine</i>	1
1.1.2.	<i>Integrinstruktur und -funktion</i>	2
1.1.3.	<i>Extrazelluläre Domäne: Bindung an die EZM und ‚outside-in signaling‘</i>	3
1.1.4.	<i>Zytoplasmatische Domäne: Aktivierung und Signaltransduktion (‚inside-out signaling‘)</i>	3
1.1.5.	<i>Regulation der Integrinfunktion</i>	4
1.1.6.	<i>Funktion von EZM bindenden β1- und $\alpha$$\beta$3-Integrinen</i>	5
1.2.	Glycokonjugate: Mediatoren der zellulären Erkennung	5
1.2.1.	<i>Struktur von Glycokonjugaten</i>	6
1.2.2.	<i>Funktion von an Zelloberflächen gebundenen Glycokonjugaten</i>	9
1.3.	Zellmigrationsmechanismen bei der Tumorinvasion	10
1.3.1.	<i>Zwei- und dreidimensionale EZM als Modelle für Migrations-Studien</i>	10
1.3.1.1.	<i>Zweidimensionale Migrationsmodelle</i>	10
1.3.1.2.	<i>Das dreidimensionale Modell</i>	11
1.3.2.	<i>Mechanismen der Zellmigration</i>	11
1.3.3.	<i>Abhängigkeit verschiedener Migrationsmechanismen von der Integrinfunktion</i>	14
1.4.	Beitrag von Adhäsion und alternativen Zell-Matrix-Interaktionen zu Tumorzellinvasion und Metastasierung	16
1.4.1.	<i>Beitrag von Integrinen</i>	16
1.4.2.	<i>Beitrag der Glycokonjugate</i>	17
1.4.3.	<i>Beitrag weiterer EZM bindender Moleküle</i>	19
1.5.	Ziele dieser Arbeit	20
2.	Materialien und Methoden	21
2.1.	Antikörper	21
2.2.	Zelllinien und Kultivierung	21
2.3.	Generierung von β 1-Integrin defizienten MEF	22
2.4.	Die dreidimensionale (3D) Kollagenmatrix	23
2.5.	Inhibitoren	24
2.6.	Messung der Zellviabilität	25
2.7.	Digitale Hellfeld-Zeitraffermikroskopie	25
2.8.	Zelltracking und Datenanalyse	26
2.9.	Durchflusszytometrie	26
2.10.	Zellsortierung	27
2.11.	Kollagenolyse Assay	27
2.12.	Statische und dynamische Konfokalmikroskopie	27
2.13.	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	28
2.14.	Quantitative optische Analyse der Zellpolarität	29
2.15.	Generierung von multizellulären Sphäroiden	29
2.16.	Adhäsionstest	29
2.17.	Kontraktionsassay der Kollagenmatrices	30
2.18.	Enzymatische Spaltung der Glycokonjugaten	30
2.19.	Desulfatierung von Glycokonjugaten	31
2.20.	Molekularbiologische Methoden	32
2.20.1.	<i>Isolation von Plasmid-DNA aus Escherichia coli</i>	32

2.20.2.	<i>PIRES2-EGFP Vektor</i>	32
2.20.3.	<i>Behandlung des Vektors mit Alkalischer Phosphatase</i>	33
2.20.4.	<i>Konstruktion von cDNA</i>	33
2.20.5.	<i>Hybridisierung einzelsträngiger cDNA</i>	35
2.20.6.	<i>Kinasebehandlung des Inserts</i>	35
2.20.7.	<i>Klonierung des Inserts in pIRES2-EGFP Vektor</i>	36
2.20.8.	<i>Herstellung von kompetenten Zellen aus Escherichia coli</i>	36
2.20.9.	<i>Transformation von Escherichia coli mit Plasmid-DNA</i>	36
2.20.10.	<i>Horizontale Agarose-Gelelektrophorese</i>	36
2.20.11.	<i>Sequenzierung mit dem ABI PRISM Sequenzierungs-Kit</i>	37
2.20.12.	<i>RT-PCR</i>	37
2.20.13.	<i>Transfektion von MV3-Zellen</i>	38
2.20.14.	<i>Limiting Dilution Analyse (LDA)</i>	38
2.21.	<i>Antagonistische Peptide</i>	39
2.22.	<i>3D-Konformation von β1-Integrin zytoplasmatischen Domänen</i>	39
2.23.	<i>In vitro Präzipitation</i>	39
2.24.	<i>Gelelektrophorese und Westernblot</i>	40
3.	Ergebnisse	41
3.1.	<i>Untersuchung zur Rolle des Expressionsniveaus von β1-Integrinen für die Migration von MV3-Zellen</i>	41
3.1.1.	<i>Fluoreszenz Aktivierte Zell-Sortierung (FACS)</i>	41
3.1.2.	<i>Unveränderte Migrationgeschwindigkeit und Pfadlänge in MV3-Zellen mit unterschiedlicher β1-Integrin Expressionsstufe</i>	42
3.1.3.	<i>Abhängigkeit der Migrationsstrategie (mesenchymal oder amöboid) von der β1-Integrin-Oberflächenexpression</i>	44
3.1.4.	<i>Verteilung und Matrixinteraktion des Adhäsionsrezeptors β1-Integrin und des fokalen Adhäsionsmarkers Vinculin in sortierten Zellen</i>	44
3.1.5.	<i>Degradation der Kollagenmatrix</i>	45
3.2.	<i>Inhibition der β1-Integrin vermittelten Adhäsion durch den blockierenden Antikörper 4B4</i>	46
3.2.1.	<i>Darstellung der Effizienz der Absättigung von β1-Integrin-Epitopen durch mAk 4B4</i>	46
3.2.2.	<i>Reduktion der Migrationgeschwindigkeit und Änderung der Pfadlänge durch die Blockade von β1-Integrinen mit anti-β1-Integrin mAk 4B4</i>	48
3.2.3.	<i>Übergang von mesenchymaler zu amöboider Migrationsform</i>	49
3.2.4.	<i>Konfokalmikroskopische Charakterisierung von fokalen Kontakten, β1-Integrinverteilung und Struktur des Aktinzytoskeletts</i>	51
3.2.5.	<i>Quantitative Analyse der Fokalisierung von β1-Integrin und F-Aktin</i>	52
3.2.6.	<i>Kontraktion der Kollagenmatrix</i>	53
3.3.	<i>Inhibition der β1-Integrin medierten Adhäsion durch den α2β1-Integrin Inhibitor Rhodocetin</i>	54
3.3.1.	<i>Partielle Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit und Änderung der Pfadlänge durch die Hemmung von α2β1-Integrinen mit Rhodocetin</i>	54
3.3.2.	<i>Übergang von mesenchymaler zu amöboider Migrationstyp mittels Rhodocetin</i>	55
3.3.3.	<i>Konfokalmikroskopische Charakterisierung von fokalen Kontakten, β1-Integrinverteilung und Struktur des Aktinzytoskeletts in Anwesenheit von Rhodocetin</i>	56
3.3.4.	<i>Rhodocetin hemmt die α2β1-Integrin vermittelte Kontraktion der Kollagenmatrix</i>	57
3.4.	<i>Expression von dominant-negativen Peptiden zur konstitutiven Inhibition der β1-Integrin zytoplasmatischen Domäne</i>	58
3.4.1.	<i>Vektorgenerierung und Expression dominant-negativer β1cyt-Peptide</i>	59
3.4.2.	<i>Darstellung der Genexpression mittels RT-PCR</i>	59

3.4.3.	<i>Induktion konstitutiv amöboider Migrationsform durch SP2-E</i>	61
3.4.4.	<i>In Vitro-Immunopräzipitation und massenspektrometrische Analyse</i>	65
3.4.5.	<i>Kontraktion der Kollagenmatrix</i>	66
3.5.	Mechanismen der Migration bei $\alpha 2\beta 1$ -defizienten Zellen	66
3.5.1.	<i>Expression von $\alpha 2\beta 1$-Integrin in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) und embryonalen Stammzellen (ES)</i>	68
3.5.2.	<i>Konstitutive amöboide Migration in $\beta 1^{-/-}$ Zellen</i>	69
3.5.3.	<i>Veränderte Migrationsgeschwindigkeit und Pfadlänge durch inhibierte Expression von $\alpha 2\beta 1$-Integrin in defizienten MEF und ES</i>	70
3.5.4.	<i>Konfokalmikroskopische Charakterisierung von Zell-Matrix Interaktionen und Struktur des Aktinzytoskeletts</i>	72
3.5.5.	<i>Notwendigkeit von $\beta 1$-Integrinen für den Umbau von Kollagenmatrices</i>	73
3.5.6.	<i>Abhängigkeit der Kollagenolyse von der $\beta 1$-Integrin Expression</i>	74
3.6.	Die Rolle der Glycokonjugate bei der $\beta 1$ -Integrin unabhängigen Migration	75
3.6.1.	<i>Funktion von RGD-bindenden Integrinen und Oberflächen-Glycokonjugaten</i>	77
3.6.2.	<i>Hemmung Glycokalyx-vermittelter Zelladhäsion</i>	77
3.6.2.1.	<i>Etablierung der enzymatischen Abspaltung der Oberflächenglycokonjugate mit N- und O-Glycosidasen</i>	78
3.6.2.2.	<i>Darstellung der Entfernung von Glycokalyx-Residuen mittels Elektronenmikroskopie</i>	80
3.6.2.3.	<i>Änderung der Migrationsgeschwindigkeit und der Pfadlänge nach Interferenz mit Oberflächen-GAGs und RGD-abhängigen Integrinen</i>	82
3.6.2.3.1.	<i>MV3-Zellen</i>	82
3.6.2.3.2.	<i>$\beta 1$-Integrin defiziente MEF</i>	84
3.6.3.	<i>Inhibition sulfatierter GAGs</i>	85
3.6.3.1.	<i>Expression von GAGs in sulfatdefizienten MV3-Zellen</i>	86
3.6.4.	<i>Migrationseffizienz sulfatdefizienter MV3-Zellen</i>	87
4.	Diskussion	89
4.1.	Verschiedene Adhäsionsstärken unterstützen mesenchymale oder amöboide Formen der Zellmigration in 3D-Geweben	90
4.2.	Mechanismen der amöboiden Migration	93
4.2.1.	<i>Integrinunabhängige Migrationsechanismen in anderen metazoischen und protistischen Zellen</i>	93
4.2.2.	<i>Funktion der Oberflächenglycokalyx in der amöboiden Migration</i>	95
4.2.2.1.	<i>Mögliche Mechanismen der Restmigration nach Glycanverdau</i>	102
4.2.3.	<i>Implikationen integrinunabhängiger Zellmigration für die Tumorthherapie</i>	103
4.2.3.1.	<i>Ausblick auf anschließende Versuchsmöglichkeiten</i>	103
4.2.3.2.	<i>Glycokonjugate in der Tumorthherapie</i>	104
5.	Zusammenfassung	107
6.	Summary	109
7.	Literaturverzeichnis	111
8.	Abbildungsverzeichnis	129
9.	Tabellenverzeichnis	131
10.	Filmverzeichnis	132
	Danksagung	135
	Liste der Publikationen, Vorträge und Poster	137
	Lebenslauf	139
	Erklärung	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaaren
BM	Basalmembran
BSA	Rinderserumalbumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
cDNA	Komplementär DNA
CS	Chondroitinsulfat
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cRGD	Zyklisches RGD Peptid
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Embryonale Stammzellen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EGF	Epitheliale Wachstumsfaktor
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
F(ab)'/ F(ab)' ₂	Antigen-bindende Fragmente
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung
FAK	Fokale Adhensionkinase
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FN	Fibronektin
GAG	Glycosaminoglycan
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglycan
Ig	Immunoglobulin
IFN- α	Interferon Gamma
ILK	Integrin-Linked-Kinase
KD	Kilodalton
KS	Keratansulfat
LN	Laminin
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAT	Mesenchymal-Amöboider Transition
MEF	Murine Embryonale Fibroblasten

Abkürzungsverzeichnis

MEM	Minimales Essentielles Eagle's Medium
min	Minute
PAPS	3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PG	Proteoglycan
Poly-HEMA	Poly-2-Hydroxyethyl Methacrylat
PI	Propidiumiodid
PIP	Phosphoinositolphosphat
PMN	Polymorphonukläre Leukozyten
ppm	Parts per million (Teile pro Million)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SS	Sialinsäure
SH2-Domäne	Src-homologie Domäne 2
SH3-Domäne	Src-homologie Domäne 3
Std.	Stunde
SV-40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissions Elektronen-Mikroskopie
TGF- β	Tumorstromfaktor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VN	Vitronectin
V	Volt
2D	Zwei-dimensional
3D	Drei-dimensional

1. EINLEITUNG

Der Prozess malignen Tumorwachstums und die Metastasierung beinhalten eine komplexe Kaskade von Ereignissen. Bei Krebszellen ist das Gleichgewicht zwischen Teilung und Absterben im Zellverband gestört. Die meisten Tumore stammen von einer einzigen oder wenigen aberranten Zellen ab, deren Erbgut genetisch verändert ist (Initiation). Die Vermehrung dieser entarteten Zellen geht oftmals einher mit der Selektion und klonalen Entwicklung präneoplastischer Zellpopulationen. Um am Ende Metastasen zu bilden, müssen Krebszellen sich vom Primärtumor ablösen, körpereigene Sperren wie Basalmembranen durchdringen, durch fremdes Gewebe wie die Extrazellulärmatrix (EZM) wandern, in Lymph- oder Blutgefäße ein- bzw. auswandern, sich in anderen Organen ansiedeln und sich dort schließlich vermehren (Hanahan und Weinberg, 2000; Chambers et al., 2002; Fidler, 2003). Viele dieser Schritte werden erst dadurch möglich, dass die Tumorzellen eine veränderte Fähigkeit zur Adhäsion mit Nachbarzellen und der Extrazellulärmatrix (EZM) entwickeln (Albelda, 1993; Felding-Habermann et al., 2001).

Ob ein Tumor als gut- oder bösartig eingestuft wird, hängt von der Neigung dieser entarteten Zellen ab, in gesundes Gewebe einzuwandern und dort Tochtergeschwülste zu bilden. Die Bildung von Metastasen in anderen Organen ist bei 90% aller Tumorpatienten letztlich die Todesursache (Chambers et al., 2002). Das Verständnis der molekularen Mechanismen von Tumorinvasion und Metastasierung, einschließlich der Mechanismen der Interaktion von Tumorzellen mit der EZM, ist deshalb Voraussetzung für die Entwicklung „anti-invasiver“ oder „anti-metastatischer“ Therapieformen. Es wird angenommen, dass die Adhäsionsrezeptoren und Glycokonjugate der Zelloberfläche eine wichtige Rolle bei invasiven Tumoren spielen, weil sie als Kontaktstelle und Kommunikationsbasis zwischen Tumorzelle und ihrer Umgebung dienen (Fuster und Esko, 2005; Park et al., 2006; Sasisekharan et al., 2006; Stupp und Rugg, 2007).

1.1. Struktur und Funktion von adhäsiven Bestandteilen der Zelloberflächen

1.1.1. Integrine

Die Zellinvasion bzw. Zellmigration wird über die Adhäsion an andere Zellen oder EZM durch Zelloberflächenrezeptoren vermittelt (Huttenlocher et al., 1995; Hood und Cheresch, 2002; Danen et al., 2005; Chan et al., 2007). Adhäsionsrezeptoren werden in Cadherine, Selektine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie, Integrine und Proteoglycane unterteilt. Als wichtigste Gruppe von Rezeptoren für die Vermittlung von Zell-EZM-Adhäsionen und der Zellmigration gelten Integrine, die zusammen mit den Oberflächenglycanen die zentralen Untersuchungsobjekte dieser Dissertation darstellen.

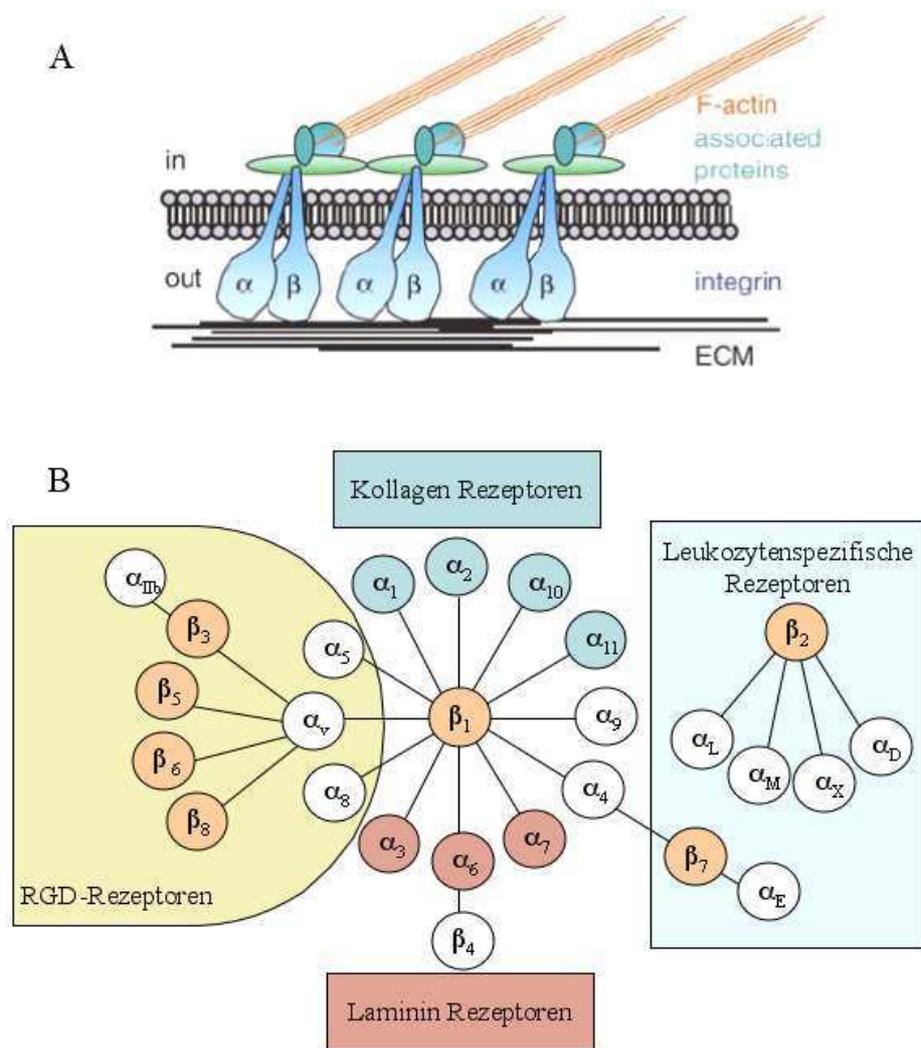


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Zell-Matrix-Interaktion, bei der die Integrine die Matrix mit dem Zytoskelett verbinden (A); Übersicht Integrinfamilie (B), modifiziert nach Hynes, 2002, RGD, Aminosäure-Reihenfolge Arginin-Glycin-Asparaginsäure.

1.1.2. Integrinstruktur und -funktion

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glycoproteine, die jeweils aus nicht kovalent miteinander verknüpften α - und β -Untereinheiten aufgebaut sind (Hynes et al., 1992, Abb. 1A). Aus den bisher beschriebenen 18 α - und 8 β -Ketten setzen sich mindestens 24 verschiedene Integrine mit unterschiedlicher Substratspezifität zusammen (Hynes, 2002) (Abb. 1B). Der globuläre Kopf am N-terminalen Ende des Integrins ragt in den extrazellulären Raum hinaus und kann dort Bindungen, beispielsweise mit der EZM, eingehen. Im Zellinneren am C-terminalen Ende kommt es über Adaptermoleküle zur Bindung an das Aktinzytoskelett bzw. über Signalmoleküle zu Änderungen in der Genexpression. Bindungen am N- oder C-terminalen Ende führen zu Veränderungen in der strukturellen Konformation. Diese Konformationsänderungen werden über die transmembranäre Domäne auf das jeweils

andere Ende des Integrinmoleküls übertragen und sind Teil der ‚inside-out signaling‘- sowie der ‚outside-in-signaling‘-Kaskade (Liu et al. 2000; Hynes, 2002; Arnaout et al., 2007) (diese Signalwege werden ausführlich unter 1.1.3. und 1.1.4. erläutert).

1.1.3. Extrazelluläre Domäne: Bindung an die EZM und ‚outside-in signaling‘

Integrine binden extrazelluläre Liganden mittels ihres globulären Kopfes, der aus jeweils einem Teil der α - und β -Kette besteht (Arnaout, 2002). Die α -Kette vieler Integrine bildet dazu 7 homologe β -Faltblätter aus, die sich in Form einer siebenblättrigen β -Propellerdomäne zusammenlagern. Zwischen dem zweiten und dritten Faltblatt der α -Kette befindet sich in einigen Integrinen eine ca. 180 Aminosäuren lange I-Domäne in sog. Rossmann-Faltung, bei der hydrophile α -Helices ein zentrales hydrophobes β -Faltblatt umlagern (Takagi und Springer, 2002). Substratspezifität und -bindung werden durch die I-Domäne vermittelt. Die I-Domäne enthält Sie weiterhin eine als MIDAS (Metal Ion-Dependent Adhesion Site) bezeichnete Bindungsstelle für divalente Kationen, die sich auf Affinität und Spezifität der Ligandenbindung auswirkt.

Die β -Kette dagegen beinhaltet am N-Terminus eine der I-Domäne nur schwach ähnelnde I-like-Domäne (Shimaoka et al., 2002). Die dreidimensionale Struktur, die aus der I-Domäne der α -Kette und der I-like-Domäne der β -Kette gebildet wird, ist die Bindungsstelle für Liganden (Shimaoka et al., 2002). Die Bindung an EZM-Proteine, z.B. Kollagen, Fibronectin und Vitronectin, wird durch β 1- und β 3-Integrine in Kombination mit verschiedenen α -Ketten vermittelt, während die anderen Integrin-Subtypen weitere Liganden auf Zellen oder in Basalmembranen binden.

Nach der extrazellulären Ligandenbindung werden Signale ins Zellinnere übermittelt, die zur Rekrutierung einer Vielzahl von Signalmolekülen wie Kinasen und Aktin bindenden Adapterproteinen wie Talin, Paxillin, Tensin und α -Actinin an die zytoplasmatische β -Integrin-Domäne führen (outside-in-signaling). Dadurch werden Signale an das Aktingerüst im Zellinneren übermittelt, die neben Genexpression, Proliferation und zellulärer Differenzierung die Reorganisation des Zytoskeletts bewirken (Takagi et al., 2002; Tadokoro et al., 2003; Ginsberg et al., 2005).

1.1.4. Zytoplasmatische Domäne: Aktivierung und Signaltransduktion (‚inside-out signaling‘)

Zur Signalgebung aus der Zelle nach außen (inside-out signaling) binden Adapterproteine wie Talin an das Aktingerüst. Dies hat eine erhöhte Integrin-Ligand-Bindungsaffinität, Integrinaggregation, Zelladhäsion und die Bildung fokaler Kontakte zur Folge (Hynes et al., 2002; Kim et al., 2003; Calderwood, 2004; Ginsberg et al., 2005).

Im inaktiven Zustand sind die membran-proximalen, α -helikalen Bereiche der zytoplasmatischen Domänen der α - und β -Untereinheiten durch hydrophobe und elektrostatische Interaktionen miteinander verbunden. Dies entspricht einem niedrigen Affinitätszustand. Integrine können sowohl mittels eines ‚inside-out‘ als auch eines ‚outside-in‘ Signalflusses Prozesse innerhalb und außerhalb der Zelle beeinflussen. Beide Signaltransduktionsrichtungen beinhalten eine Konformationsänderung, wobei die von innen nach außen wirkende der EZM Informationen über den Zustand der Zelle vermittelt, während die Gegenrichtung in intrazelluläre Signaltransduktionsketten eingebunden ist.

1.1.5. Regulation der Integrinfunktion

Integrine werden über verschiedene Vorgänge in der Zelle aktiviert und deaktiviert. So kann die Stärke der Integrin-vermittelten Zell-EZM-Interaktion sowohl über die Multimerisierung von Integrinen (Steigerung der Avidität) und die Bildung fokaler Kontakte als auch über die Affinitätsregulation einzelner Integrin-Moleküle zu ihren Liganden geändert werden.

Einen wichtigen Lokus zur Regulation des ‚inside-out signaling‘ und damit der Integrinaktivierung ist das konservierte membran-proximale NPXY-Motiv (von 2 NPXY-Motiven pro Untereinheit, Abb. 6 Material und Methode) der zytoplasmatischen Region von β 1-, β 2-, β 3-Integrinen. Zytoplasmatische Proteine wie Talin, FAK und Filamin binden an das NPXY-Motiv (Liddington und Ginsberg, 2002; Tadokoro et al., 2003; Calderwood et al., 2004; Tanentzapf und Nicholas, 2006). Durch die kompetitive Interaktion der FERM-Domäne (4.1-Protein Ezrin, Radixin, Moesin) von Talin mit dem aromatischen Ring des Tyrosins im NPXY-Motiv wird die Salzbrücke zwischen den α - und β -Untereinheiten gelöst und damit in den aktiven Zustand versetzt (Vinogradova et al., 2002; Garcia-Alvarez et al., 2003). Umgekehrt wird durch die Phosphorylierung des Tyrosins im NPXY-Motiv die Bindung von Talin an das β 1-Integrin und dessen Aktivierung verhindert (Garcia-Alvarez et al., 2003; Calderwood, 2004; Czuchra et al., 2006). *In vitro*-Studien zeigen, dass die Zelladhäsion nach Tyrosinphosphorylierung des β 1-Integrins durch Transformation von fibroblastoiden Zellen mit V-Src reduziert wird. Dabei werden Integrine von den fokalen Adhäsionen entfernt, so dass die Migration nachhaltig gestört wird (Sakai et al., 2001).

Ein vollständiger Verlust der Integrinfunktion wird durch Aminosäuresubstitution von Tyrosin zu Alanin in NPXY-Motiven der zytoplasmatischen Domänen des β 1-Integrins erreicht. Alle Interaktionen mit Talin werden dadurch verhindert (Chen et al., 2006; Czuchra et al., 2006). Weitere negative Regulatoren sind ICAP-1 (Integrin Cytoplasmic Domain Associated Protein) und das Signalmolekül PIPKI γ -90, da beide die Interaktion von Talin mit der β -Untereinheit verhindern (Barsukov et al., 2003; Bouvard et al., 2003).

1.1.6. Funktion von EZM bindenden β 1- und α v β 3-Integrinen

Die spezifische Funktion jedes der 24 Integrine wird besonders aus den Phänotypen entsprechender Knock-out-Mäuse deutlich. Das β 1-Integrin, das mit verschiedenen α -Ketten 12 Kombinationen eingeht, spielt eine wichtige Rolle bei der Positionierung von Organvorläuferzellen in Geweben und Organen. β 1-Integrin-knock-out in Mäusen führt zu einem Absterben des Embryos kurz nach der Einnistung in den Uterus (Fässler und Meyer, 1995a; Lei et al., 2008). Spezifische Deletion der β -Untereinheit in Blutstammzellen blockiert ihre Einwanderung in die fötale Leber und das Knochenmark (Potocnik et al., 2000). In der Haut führt die Deletion von β 1-Integrin zum Verlust der Haare, zur Blasenbildung aufgrund von Adhäsionsdefekten der Hautzellen, Proliferationsdefekten der Keratinozyten und zu einer starken dermalen Fibrose (Brakebusch et al., 2000).

β 1-defiziente Mäuse zeigen eine verzögerte Wundheilung. *In vitro*-Experimente mit β 1-defizienten Keratinozyten unter 2D-Kulturbedingungen bestätigten, dass β 1-Integrine bei der Adhäsion, Proliferation und Zellmigration eine wichtige Rolle spielen (Grose et al., 2002).

α v β 3-Integrine regulieren die Vorgänge der Angiogenese und sind an der Metastasierung von Brustkrebszellen in den Knochen beteiligt (Felding-Habermann et al., 2001; Pecheur et al., 2002). Die Blockade von α v β 3-Integrin durch kleine inhibitorische Moleküle oder Antikörper verhindert die Blutgefäßbildung (Neovascularisation) in zahlreichen Tiermodellen (Brooks et al., 1994 a,b; Storgard et al., 1999; Varner et al., 1999; McDonald et al., 2001; Nemeth et al., 2003).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Integrine eine gewebespezifische Funktion ausüben, indem sie Zelladhäsion, Migration, Differenzierung und Überleben vermitteln (Humphries et al., 2006).

1.2. Glykokonjugate: Mediatoren der zellulären Erkennung

Die Oberfläche der Säugetierzellen ist mit komplex aufgebauten Kohlehydrat-Molekülen besetzt, die als Glykokonjugate bezeichnet werden. Sie sind die diversesten aller in der Natur bekannten Polymere (Feizi und Mulloy, 2003; Hakomori, 2004; Brooks et al., 2008; Kesimer und Sheehan, 2008). Glykokonjugate enthalten Oligo- und Polysaccharide (Glycane), die kovalent an Proteine (Glycoprotein) oder an Lipide (Glycolipid) gebunden sind. Die Gesamtheit der freien und gebundenen Saccharide auf der Zelloberfläche macht die Glycokalyx (=Zellmantel) aus, eine 50 bis über 100 nm dicke Schicht (Abb. 2). Darüber hinaus existieren Glykokonjugate sowohl innerhalb der Zellen als auch ausgeschieden als funktionelle Bestandteile der EZM.

Besondere Zucker, insbesondere die Sialyl-Lewis Muster SLe^x und SLe^a und α -1,6-Fucose, dienen als Marker für Tumore (Paganuzzi et al., 2003; Ono und Hakomori, 2004; Mizuguchi et al., 2007; Kudo et al., 2007).

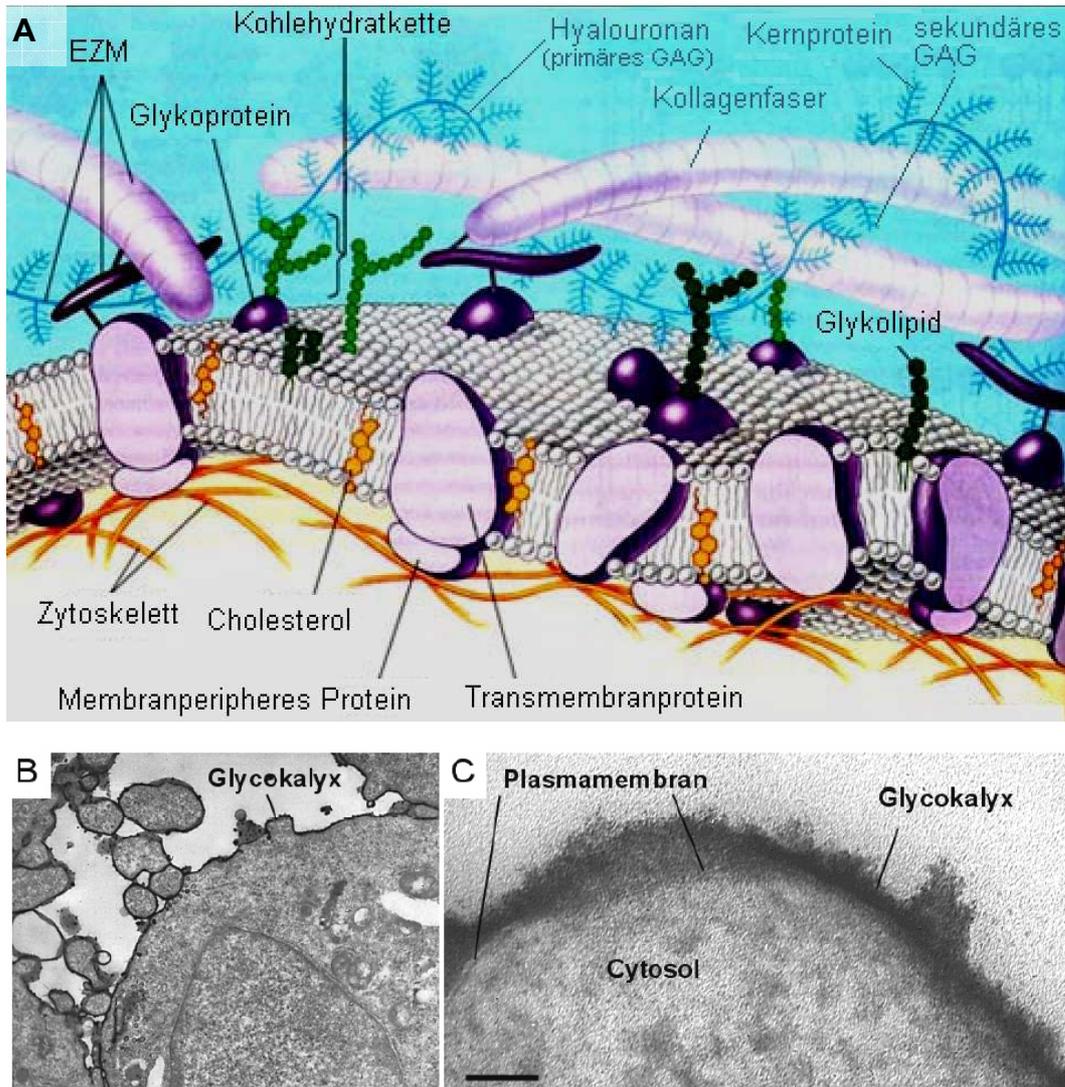


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Zellmembran einer eukaryontischen Zelle

(modifiziert nach telstar.ote.cmu.edu. (Carnegie Mellon University, Cell Biology Program)). (A) Glycoproteine und Glycolipide exponieren ihre Kohlenhydratdomäne auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran, GAG, Glycosaminoglycane. (B, C) Glykokalyx der MV3-Zellen nach Färbung mit Rutheniumrot in 7000-facher- und 140000-facher Vergrößerung, Balken: 100 nm.

1.2.1. Struktur von Glykokonjugaten

Bei Säugetieren finden sich einige Hauptfamilien der Glykokonjugate (nach Wells et al., 2001; Fuster und Esko, 2005):

1. Asparagin-gebundene (N-verknüpfte) Oligosaccharide
2. Serin- oder Threonin-gebundene (O-verknüpfte) Oligosaccharide
3. Glycosaminoglycane (GAG), als freie Polysaccharide (wie Hyaluronan) oder als Bestandteil der Proteoglycane (Heparansulfat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat)
4. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) gebundene Proteine

5. Zellkern- und zytoplasmatische Proteine, welche O-gebundenes N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) an einem Serin tragen
6. Glycolipide (v.a. Glycosphingolipide: Sulfatide, Ganglioside)

Bei Glycoproteinen erfolgt die Verknüpfung des Kohlenhydrat-Anteils entweder O- oder N-glycosidisch an das Protein. N-Glycane sind in der Regel durch eine β -N-glycosidische Bindung zwischen dem anomeren Kohlenstoff eines Zuckers und dem Stickstoff der Amidgruppe eines Asparagins der Polypeptid-Kette verknüpft. In Säugertierzellen ist dieser erste Zuckerbaustein meistens N-Acetylgalactosamin (GlcNAc). N-Glycane werden in drei Primärstrukturen eingeteilt (mannosereicher Typ, komplexer Typ, Hybrid-Typ). Sie besitzen alle den Tri-Mannosyl-Core $\text{Man}\alpha 1-6$ ($\text{Man}\alpha 1-3$), $\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc-Asn}$. O-Glycane sind α -glycosidisch am Serin, Threonin bzw. Hydroxylysin einer Polypeptid-Kette gebunden. In tierischen Zellen werden sie in drei Hauptgruppen eingeteilt, die sich durch das Protein bindende Monosaccharid unterscheiden:

1. mucinartiger Typ (N-Acetylgalactosamin α -O-glycosidisch an Serin oder Threonin gebunden)
2. O-GlcNAc-Typ (N-Acetylglucosamin)
3. Xylose-Typ (Xylose)

Glycosaminoglycane (GAG) sind Zuckerpolymere, die im Wesentlichen aus sich wiederholenden Disaccharidbausteinen bestehen und gewebe- und organismusspezifische Muster von Epimerisierungen und Sulfatierungen aufweisen. Zwei verbreitete Formen der Modifizierung sind die Sialisierung und Fucosilierung. In Glycokonjugaten befindet sich Neuraminsäure (NeuAc), die Grundform der Sialinsäure, immer terminal oder lateral zur Achse des Polymers, die Fucose immer lateral.

Proteoglycane (PG) sind besonders stark glycosylierte und hydratisierte, und dazu zumeist sulfatierte Glycoproteine. Sie sind im Rahmen dieser Arbeit besonders von Interesse, da sie auf Zelloberflächen zahlreich auftreten und eine bedeutende Rolle bei der Interaktion mit der EZM und anderen Zellen spielen. Sulfatierte GAGs werden in vier Gruppen unterteilt: Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Heparansulfat/Heparin. Sie sind meist über Xylose O-glycosidisch mit der Polypeptid-Kette verbunden. Keratansulfate sind O- oder N-glycosidisch gebunden.

Hochmolekulare PGs der EZM wie Aggrecan haben eine fedrige Struktur mit unsulfatiertem Hyaluronan als Kiel (Abb. 2). Die Seitenäste der Feder bestehen aus Linkerprotein-unterstützten Kernproteinen mit kovalent gebundenen, sekundären GAG-Ketten. Membrangebundene Heparansulfat-Proteoglycane (HSPG) werden nach der Homologie und Art ihrer Membranverankerung wiederum in zwei Familien unterteilt: Syndecan-ähnliche integrale Membranproteoglycane und Glypikan-ähnliche Glycosylphosphatidylinositol-verankerte Membranproteoglycane. Letztere zeichnen sich durch die direkte Bindung an

Membranlipide aus (Sharom und Lehto, 2002; Fransson et al., 2004; Tkachenko et al., 2006). Beide HSPG werden an verschiedenen Stellen durch Epimerisierung und Sulfatierung modifiziert. Zu den Liganden der Proteoglycane zählen u. a. Wachstumsfaktoren und Chemokine. HSPG-Liganden enthalten typischerweise die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin, die mit negativ geladenen Sulfatgruppen der Heparansulfate interagieren.

Neben glycosylierten Glycoproteinen kommen auf der Zelloberfläche auch glycosylierte Lipide vor. Der Lipidanteil der Glycolipide, die in die Membran-Doppelschicht eingebettet sind, wird in zwei bedeutende Strukturgruppen eingeteilt: (1) Glycolipide, die auf Ceramid (Glycosphingolipide), und (2) Glycophospholipide, die auf einem Phosphatidylglycerol gebildet werden. Zudem treten auch Phosphatidylinositole, seltener vorkommende Phospholipide auf, bei denen zumeist ein Glycerolipid mit Phosphat und Inositol modifiziert ist (Sharom und Lehto, 2002). Glycosylierte Glycerolipide (z.B. Seminolipide) und Sterole sind weitere membrangebundene Lipide in bestimmten Geweben (Honke et al., 2004). Ähnlich wie die Glycoproteine weisen Glycosphingolipide potenzielle Erkennungsstellen auf, die an der Zell-Zell-Interaktion beteiligt sind. Glycophospholipide verankern bestimmte Proteine (z.B. Syndecane, Acetylcholinesterase und neurale Zelladhäsionsmoleküle (Orlean und Menon, 2007)) an der Zelloberfläche.

Glycosphingolipide werden hauptsächlich in zwei Untergruppen eingeteilt, in Galactosphingolipid und Glucosphingolipid, je nach dem, ob Galactose oder Glucose als erstes Monosaccharid an Sphingosin bindet. Das primäre Galactosphingolipid ist ein einfaches Sulfatidmolekül, bei dem die alleinige Galactose an Position drei sulfatiert ist. Ganglioside sind die komplexesten Glycolipide. Sie enthalten Oligosaccharide mit mehreren Sialinsäure-Resten, die ihnen eine negative Nettoladung verleihen.

Die auf der Zelloberfläche vorhandenen Glycokonjugate werden im Wesentlichen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und ganz besonders im Golgi-Apparat synthetisiert und modifiziert (Polymerisierung der Zucker, Verknüpfung an die Polypeptidkette, Epimerisierung, Sulfatierung) (Abb. 3). Die Glycosylierung wird durch Glycotransferasen, Glycosidasen und andere Glycosylierungsaktivitäten verursacht (Shi und Stanley, 2003; Sansom und Merkman, 2007).

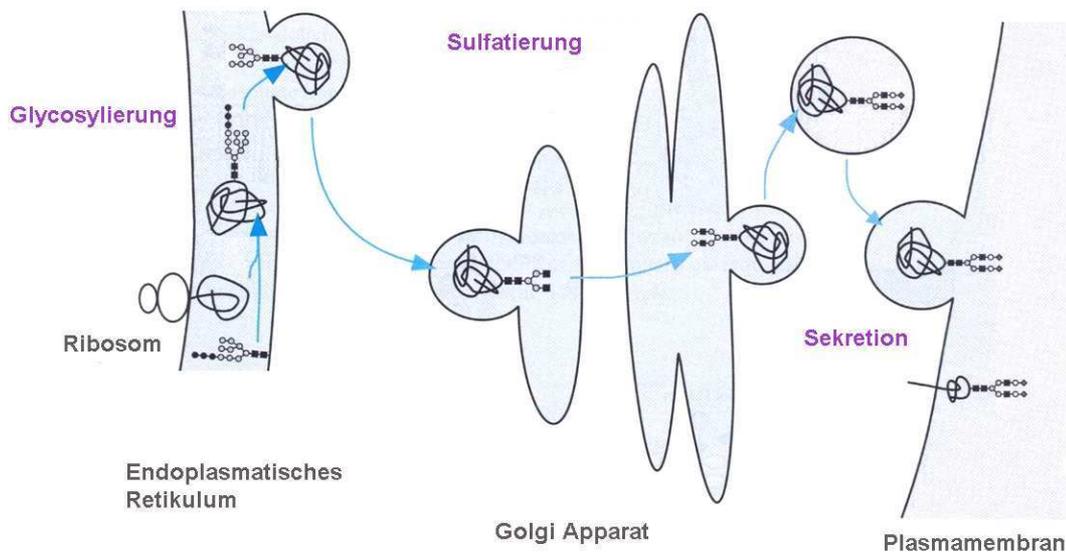


Abbildung 3. Übersicht der Syntheseweges der Glycokonjugate in einer Zelle

Der biochemische Syntheseweg von Glycokonjugaten am Beispiel der N-verknüpften Glycane lässt sich in drei Stufen einteilen: Bildung eines an ein Lipid gebundenen Oligosaccharid-Startmoleküls, Glycosylierung des neusynthetisierten Proteins, und Prozessierung des Oligosaccharids. Die Prozessierung beinhaltet die Entfernung einiger Zuckerresiduen aus dem Startmolekül, gefolgt vom Hinzufügen neuer Zucker am nichtreduzierenden Ende des Glycans sowie die Sulfatierung. Innerhalb einer Zelle findet die Glycoproteinsynthese in räumlich getrennten Schritten statt. Lipidgebundene Startmolekülsynthese, Transfer zum Protein, und erste Trimm-Reaktionen passieren im rauhen ER, die weitere Prozessierung des neuen Glycoproteins erfolgt während des Transportes durch den Golgi Apparat (modifiziert nach Taylor und Drickamer, 2006).

1.2.2. Funktion von an Zelloberflächen gebundenen Glycokonjugaten

Die Oberflächen von Zellen weisen für jedes Entwicklungsstadium der Zelle spezielle und typische Oligosaccharidmuster auf, die wesentlich zu Zelldifferenzierung und -funktion beitragen.

Kohlenhydrate haben mittelbar und unmittelbar Einfluss auf die Faltung und sterische Ausrichtung von Proteinen und das Zusammenbringen verschiedener Proteine in Oligomeren und Komplexen. Sie bewirken einen Schutz vor Proteolyse und anderen chemischen und physikalischen Schädigungen. Plasmamembran-gebundene Glycokonjugate vermitteln essenzielle zelluläre Prozesse, wie z.B. Proliferation, Adhäsion, Migration, Differenzierung, Erkennung von Pathogenen, Apoptose und Sekretion von Zytokinen (Marth, 1999; Collins et al., 2006; Kesimer und Sheehan, 2008; Nadanaka und Kitagawa, 2008) Die initiale Adhäsion von Knorpelzellen wird noch vor der Beteiligung von Integrinen durch Hyaluronan vermittelt (Cohen et al., 2004, 2006). Die durch Hyaluronan vermittelte Kontaktstelle bildet auch das Zentrum einer Paxillinanreicherung, die später zur fokalen Adhäsion ausreift (Cohen et al., 2006).

Syndecane sind die funktionell am häufigsten untersuchten Proteoglycane der Zelloberfläche. Sie dienen als Korezeptor für andere Glycoproteine wie z.B. die Integrine; sie sind an der

EZM-Bindung sowie an der Antwort auf manche extrazelluläre Signalproteine beteiligt. Dort modulieren Syndecane die Integrinfunktion in fokalen Adhäsionen (Bernfield et al., 1999; Couchman et al., 2003; Midwood et al., 2006).

1.3. Zellmigrationsmechanismen bei der Tumorinvasion

Bisher wurden zwei unterschiedliche Modelle zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Zellmigration *in vitro* angewandt.

1.3.1. Zwei- und dreidimensionale EZM als Modelle für Migrations-Studien

Die Bestandteile der EZM sind hauptsächlich:

1. faserförmige Proteine, wie Kollagen, Elastin und Laminin, die sowohl Bindungs- als auch Strukturfunktionen besitzen und
2. Polysaccharide (insbesondere Glycosaminoglycane) sowie mit Proteinen assoziierte Proteoglycane.

Das Kollagen, Hauptbestandteil des Bindegewebes, lagert sich zu Fibrillen zusammen, die sich wiederum zu kabelähnlichen Faserproteinen bündeln. Sie bilden eine biomechanische Barriere und zwingen die Zellen zu Strategien, um den Widerstand zu überwinden.

Ein wichtiges Merkmal nahezu aller extrazellulären Matrixproteine - mit Ausnahme von fibrillärem Kollagen - ist die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD-Sequenz), die von vielen Integrinen erkannt und daher als „universelles“ Zell-Erkennungsmotiv bezeichnet wird. Die Matrixproteine Kollagen, Fibronectin (FN) und Laminin (LN) sind wichtige Liganden für verschiedene Integrinrezeptoren. Kollagen wird aber auch von Syndecanen, DDR1 und DDR2 (Discoidin Domain Receptors) gebunden. Letztere gehören zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), die unabhängig von β 1-Integrinen an Kollagen binden (Shrivastava et al., 1997; Vogel et al., 2000; Leitinger und Hohenester, 2007).

1.3.1.1 Zweidimensionale Migrationsmodelle

Das grundlegende Modell der Zellmigration (Details siehe 1.3.2.) wurde an den Bewegungen verschiedener Zelltypen wie Keratinozyten und Fibroblasten entwickelt, die sich auf planar Oberflächen, d.h. im zweidimensionalen (2D) Raum, bewegen, wie z.B. bei der Epithelbildung während der Morphogenese und der Wundheilung. Variable Bindungsstärken korrelieren mit der Zellpolarität auf 2D-Oberflächen (Giannone und Sheetz, 2006). Bei den Keratinozyten ist die Migration mit der Freisetzung von EZM-Komponenten und dem Umbau der Matrix verbunden (Pilcher et al., 1997; Hudson et al., 1998; Spiekstra et al., 2007). Die Migration über Oberflächen erfordert dabei einen bestimmten Grad des Anhaftens, während

die Migration durch dreidimensionale (3D)-Matrizes hindurch auch ohne Adhäsionen möglich ist, wie z.B. die Migration von Leukozyten (Friedl et al., 1998 a, c).

1.3.1.2 Das dreidimensionale Modell

Im Gegensatz zur 2D-EZM Oberfläche bildet das dreidimensionale adhäsive Substrat der EZM mit seinen multivalent miteinander verknüpften Liganden sowohl eine räumliche als auch eine physikalisch-mechanische Barriere für die Zellmigration (Wolf und Friedl, 2006; Larsen et al., 2006). Die dreidimensionale extrazelluläre Matrix, die z.B. im Bindegewebe vorkommt, ist das typische Substrat für die Zellmigration bei der embryonalen Morphogenese, Immunreaktion, Wundheilung und Tumordinvasion. Sie dient außerdem als Gerüst für die Zelladhäsion, die Proliferation und Differenzierung, sowie als Lagerstätte für Zytokine und Moleküle, die die Zellpolarisierung, Zellform und die Organisation des Gewebes determinieren (Cukierman et al., 2001). In einer 3D-EZM zeigen die Zellen generell eine andere Form als auf 2D-Oberflächen (Debnath und Brugge, 2005). Das dreidimensionale Kollagenmodell, das in dieser Dissertation angewandt wurde, ist der Struktur einer extrazellulären Matrix *in vivo* ähnlich. Es bietet den eingebetteten migrierenden Zellen ähnlich große Matrixlücken wie das *in vivo*-Gewebe von Maus und Mensch (Wolf und Friedl, unveröffentlichte Beobachtungen). Für viele Fragestellungen der Zellmigration, -differenzierung und Regulation des Zellzyklus werden rekonstituierte 3D-Gewebe bevorzugt, da sie die biophysikalisch komplexe Zusammensetzung von Geweben *in vivo* besser reflektieren (Abbott, 2003).

1.3.2. Mechanismen der Zellmigration

Der grundlegende Migrationsmechanismus, der sowohl auf 2D- als auch in 3D-EZM gilt, beruht auf der zyklischen Wiederholung der folgenden wechselseitig voneinander abhängigen Schritte (Lauffenburger und Horwitz, 1996; Palecek et al., 1997; Friedl und Wolf, 2003; Li et al., 2005; Meshel et al., 2005):

1. Zellpolarisierung und Ausstreckung von Membran-Ruffles oder Pseudopodien
2. Integrin-mediierte Anhaftung an die EZM und Aufbau fokaler Komplexe aus Integrinen, Zytoskelett- und Signalproteinen
3. Rekrutierung von Oberflächenproteasen zu EZM-Kontakten und fokalierte Proteolyse
4. Myosin II-vermittelte Zellkontraktion durch Interaktion mit dem Aktinzytoskelett
5. Auflösung der fokalen Kontakte am Zugpunkt und Zurückziehen der Zelle am Hinterende.

In dieser Studie wird ein Schwerpunkt auf Schritt 2 gelegt.

Schritt 1: Zellpolarisierung und Ausstreckung eines Pseudopodiums

Wachsende Aktinfilamente binden an Adapterproteine und drücken die Zellmembran nach außen zu sog. Membran-Ruffles oder Pseudopodien. Dies bewirkt eine Polarisierung der Zelle (Hynes et al., 2002). Die ersten adhäsiven Kontakte mit der EZM sind in der Regel schwach und teilweise kurzlebig und werden über Glycane, insbesondere Hyaluronan, vermittelt (Nagano und Saya, 2004; Cohen et al., 2006).

Schritt 2: Integrinvermittelte Anhaftung an die EZM und Aufbau fokaler Komplexe

Das wachsende Pseudopodium der Zelle bindet mittels Zelloberflächenrezeptoren an Liganden der EZM, insbesondere an β 1- und β 3-Integrine, die Cluster in der Zellmembran bilden (Miyamoto et al., 1995; Hynes et al., 2002). Durch die Fokalisierung und Aktivierung von Integrinen werden mittels ihrer zytoplasmatischen Domänen Adapter- und Signalproteine rekrutiert, wodurch zum einen die Bindung an das Aktinzytoskelett verstärkt und zum anderen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung Signale induziert werden. Talin bindet beispielsweise direkt an die zytoplasmatische Region der Integrine und reguliert ihre Aktivierung (Calderwood et al., 2004; Czuchra et al., 2006). Andere Adapterproteine (Vinculin, Paxillin und α -Actinin) verbinden Integrin-assoziierte Proteine mit dem Aktinzytoskelett.

Die Adapterproteine binden mit ihren SH2, SH3 oder ihren prolinreichen Domänen an das Aktinzytoskelett, um aktinbindende Proteine sowie Regulationsmoleküle (PI3K und Rho-Familie GTPase) zu fokalen Kontakten zu rekrutieren (Zamir und Geiger, 2001; Degani et al., 2002). Vinculin vermittelt eine Verbindung zwischen den entstehenden fokalen Kontakten und dem Aktin/ARP2/3-Komplex (DeMali et al., 2002). Aktive Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase C (PKC) und Rho-GTPase induzieren über ‚inside-out signaling‘ den weiteren Aufbau des fokalen Kontaktes (Hynes, 2002; Degani et al., 2002; Chandhoke et al., 2004). Die fokale Adhäsionskinase (FAK) wiederum ist eine der wichtigsten Strukturproteine, das die integrin-vermittelten Signale (outside-in signaling) für die Zellmigration bereitstellt, indem es SFKs (Src-Familie Kinase) zu fokalen Adhäsionen bringt, wo sie phosphoryliert werden und Migrationsprozesse auslösen (Sieg et al., 2000). Weiterhin wird durch FAK-mediierte Signalwege Rac1 aktiviert, wodurch zur Verlängerung von Lamellipodien führt (Klemke et al., 1998; Pankov et al., 2005). Zytoplasmatische Proteine wie Talin, Vinculin und α -Actinin stabilisieren die fokalen Adhäsionskomplexe innerhalb von Minuten zu fokalen Kontakten (Zamir et al., 2000; Lock et al., 2008). Diese Strukturen gleiten während der Migration langsam am Substrat entlang (Zamir et al., 2000 und 2001). In motilen Zellen werden unterschiedlich stark ausgeprägte Adhäsions- oder Zytoskelettstrukturen gebildet: von stärker ausgereiften fokalen Kontakten mit Stressfasern (mesenchymale adhäsive Migration,

z.B. in Fibroblasten) bis zur diffusen kortikalen Anordnung von Integrinen und Aktin (amöboide, geringe adhäsive Migration, z.B. in Leukozyten) (Friedl, 2004). Die biochemischen Signale und biophysikalischen Eigenschaften fokaler Adhäsionen werden vom Profil an den Proteinen, die in fokale Adhäsionen rekrutiert werden, bestimmt (Li et al., 2005). Die Interaktion von Adhäsionsrezeptoren mit dem darunter liegenden Substrat einerseits und dem Zytoskelett andererseits bestimmen die Zellform, die Anordnung des Substrates, den dynamischen Aufbau der fokalen Kontakte und schließlich die Fortbewegungsart der Zelle (Palecek et al., 1997; Broussard et al., 2008).

Schritt 3: Rekrutierung der Oberflächenproteasen und Proteolyse

Viele Tumorzellen exprimieren Proteasen auf ihrer Zelloberfläche, um EZM-Bestandteile, wie Kollagen, Fibronectin, Laminin zu spalten, bzw. um weitere Proteasen zu aktivieren (Ohuchi et al., 1997; Wolf et al., 2007). MT1-MMP, MMP-1 und andere Kollagenasen spalten z.B. natives Kollagen, das wiederum durch Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) in kleinere Fragmente gespalten wird (Tam et al., 2002; Lee et al., 2007). Um EZM-spaltende Enzyme dicht an ihr Substrat heranzubringen, können β 1- und β 3-Integrine einige Proteasen binden, wie z.B. MMP-2 oder den uPA-bindenden uPA-Rezeptor (Galvez et al., 2002). Auf diese Weise wird EZM lokal abgebaut und neue Integrin-bindende Epitope werden für die Migration generiert, wie z.B. Neoepitope in Typ I Kollagen nach partieller Degradation durch Kollagenasen (Wolf und Friedl, 2005). Der Matrixabbau erleichtert der Zelle ihre Fortbewegung, wobei in der EZM entlang des Migrationspfades ein schlauchförmiger Matrixdefekt entsteht (Wolf et al., 2003a).

Schritt 4: Zellkontraktion durch Myosin II-Aktin-Interaktion

Während der Entwicklung fokaler Kontakte polymerisieren die Aktinfilamente und vernetzen sich mit Zytoplasmaproteinen wie α -Actinin und Myosin II (Byers et al., 1982; Cramer et al., 1999; Butler et al., 2006). Das verzweigte Aktinnetzwerk an der Innenseite der Plasmamembran wird als kortikales F-Aktin bezeichnet, zytoplasmatische Bündel von Aktinfilamenten dagegen als Stressfasern (Byers et al., 1982). Die Kontraktion der Aktinfilamente wird durch Myosin II vermittelt. Die Aktivität von Myosin II wird überwiegend vom kleinen G-Protein Rho und der Rho-assoziierte Serin/Threonin-Kinase (ROCK) gesteuert (Chew et al., 2002; Katoh et al., 2007). Dagegen wird das kortikale Aktinnetzwerk von der MLCK (myosin light chain kinase) und nicht von Rho gesteuert (Kamm et al., 2001; Somlyo et al., 2003), womit die Zelle die kortikale Aktindynamik getrennt von den Kontraktionen in den inneren Regionen regulieren kann. Durch Aktomyosinkontraktion entsteht eine innere Spannung an den fokalen Kontakten, die zu langsamem Gleiten der Adhäsionskontakte am Hinterende der Zelle führt (Verkhovskiy et al., 1995).

Schritt 5: Auflösung der fokalen Kontakte und Zurückziehen der Zelle

Verschiedene Mechanismen führen dazu, dass die fokalen Kontakte am Hinterende der Zelle wieder abgebaut werden, so dass sich das Hinterende relativ zum Substrat bewegt und „eingezogen“ werden kann (Ridley et al., 2003). So setzen sich Aktin trennende Proteine (z.B. Gelsolin und Cofilin) auf die Verlängerungsstelle der Aktinfilamente, wodurch die Stränge der Aktinfilamente auseinanderbrechen. Dies fördert den Turnover der Filamente (Pollard und Borisy, 2003). Außerdem spaltet die zytoplasmatische Protease Calpain, Bestandteile der fokalen Kontakte (z.B. Talin oder die zytoplasmatische Domäne von β 1- und β 3-Integrinen) (Critchley und Gingras, 2008). FAK fördert den Abbau fokaler Kontakte durch unbekannte Mechanismen (Zeng et al., 2003). Schließlich trennen sich Integrine vom Substrat ab und werden entweder über endozytotische Vesikel für die Wiederverwertung an die Vorderfront gebracht (Bretscher, 1996), oder in die EZM freigesetzt (Regen und Horwitz, 1992; Friedl et al., 1997). Als Resultat dieser unterschiedlichen Mechanismen zieht sich das Hinterende der Zelle zusammen und der Zellkörper gleitet langsam vorwärts (Smilenov et al., 1999; Ballestrem et al., 2001).

1.3.3. Abhängigkeit verschiedener Migrationsmechanismen von der Integrinfunktion

Zellmigration beruht auf dem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die ursprünglich für die Wanderung auf Oberflächen untersucht wurden. Wichtige Faktoren sind beispielsweise eine optimale Konzentration und der Affinitätszustand von Adhäsionsrezeptoren, die Substratkonzentration (Palacek et al., 1997) und die Integrin-Zytoskelett-Interaktion genauso wie die Zusammensetzung der fokalen Kontakte (Lo et al., 1994). Die daraus resultierende Migrationsgeschwindigkeit hängt davon ab, wie schnell sich eine Zelle an die EZM anhaftet und wieder löst.

Ein Beispiel für Integrin exprimierende Zellen bieten Fibroblasten, jedoch auch entartete Zellen wie Fibrosarkom- oder Melanomzellen. Diese können in einem 3D-Gewebe migrieren, indem sie unter Bildung von fokalen Kontakten an Gewebsfasern adhären, einen langen spindelförmigen Zellkörper ausbilden und sich durch Aktivität des Zytoskeletts und von Proteasen voranziehen. Dieser Migrationstyp wird „mesenchymal“ genannt.

Dagegen erfolgt die Migration von Leukozyten wie T-Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen in 3D-Kollagenmatrices konstitutiv mit niedriger Adhäsionsstärke und ohne Integrinfunktion (Friedl et al., 1998c; Lämmermann, 2008). Die Migration dieser Zellen wird nicht durch fokale Kontakte oder Stressfasern, sondern durch ein kortikales Aktinnetzwerk vermittelt. Leukozyten wandern, indem sie sich entlang präformierter Kollagenfasern und infolge ausgeprägter Anpassung des Zellkörpers durch Matrixlücken hindurchschlängeln, zwängen oder quetschen (Lämmermann, 2008). Diese Art der Zellmigration wird als „konstitutiv amöboide Migration“ bezeichnet (Enterline und Cohen,

1950; Wolf et al., 2003a). Auf sehr niedrigen Bindungsstärken beruhende Migrationsstrategien, wie die niedrigaffine amöboide Wanderung, sind nur in 3D-Kollagenmatrices zuverlässig detektierbar, nicht allerdings in 2D-Migrationsmodellen (Friedl, 2004). Das Spektrum der verschiedenen Migrationsmechanismen und ihrer Integrinabhängigkeit ist in Abb. 4 dargestellt.

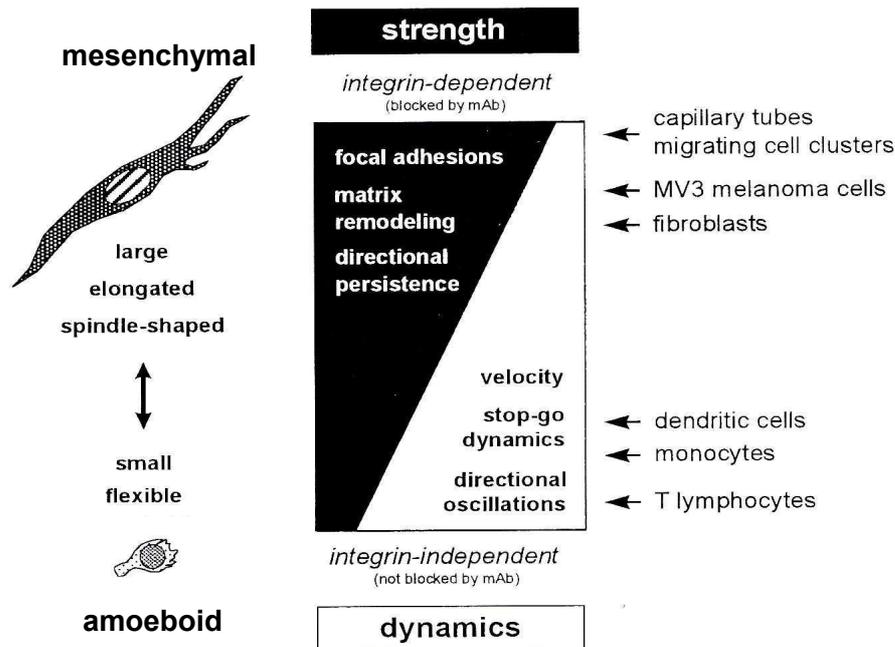


Abbildung 4. Modell für verschiedene Migrationsstrategien, abhängig von der Integrinfunktion in der 3D-Kollagenmatrix

Migration kann durch adhäsive und nicht-adhäsive Mechanismen vermittelt werden und resultiert in einen Integrin-abhängigen (mesenchymalen) und -unabhängigen (amöboiden) Phänotyp (modifiziert nach Friedl et al., 1998a).

In 2D Migrationsmodellen verringert sich die Migrationseffizienz bei sehr hoher oder sehr niedriger Adhäsionsstärke (Lauffenburger et al., 1996; Palecek et al., 1997; Li et al., 2005), während maximale Migrationsraten bei intermediärer Adhäsionsstärke zum Substrat erreicht werden (Huttenlocher et al., 1995; Chan et al., 2007). Migrationsraten sind hier umgekehrt proportional zur Stärke fokaler Kontakte bzw. der Höhe der Integrinexpression. Das Vorliegen deutlicher fokaler Kontakte führt zu einer bis zu 10-fach langsameren Migration als dies ohne fokale Kontakte der Fall wäre, vermutlich infolge verlangsamter Umsatzraten der Zell-Matrix-Kontakte bei hoher Adhäsionsstärke (Friedl et al., 1998c). Damit einhergehend wandern Zellen mit starker Integrinexpression wie Fibroblasten, Fibrosarkom- oder Melanomzellen deutlich langsamer als weniger Integrin exprimierende Leukozyten (Friedl et al., 1998a).

In Zellmigrationsstudien sind die Ergebnisse und Schlussfolgerungen maßgeblich vom Typ der gewählten Migrationsassays abhängig (Friedl et al., 2003). In 2D-Modellen ist die Zellmigration von der Adhäsion abhängig, die hauptsächlich von Integrinen vermittelt wird. Die Inhibition der Zellmigration durch adhäsionsblockierende Antikörper führt hier zum weitgehenden Verlust der Zell-Substrat-Bindung und damit der Migration (Maaser et al., 1999). Werden Integrin exprimierende Zellen dagegen in dreidimensionale fibrilläre Kollagenmatrizen eingebettet, kommt es neben einer hochspezifischen Integrinbindung vermutlich infolge der 3D-Einbettung des Zellkörpers in das umgebende Matrixgeflecht auch zu passiven Zell-Matrix-Interaktionen (Friedl et al., 2001; Lämmermann, 2008). Bei T-Lymphozyten schließlich wird die Migrationsleistung trotz Inhibition der Integrin-vermittelten Adhäsion partiell oder vollständig kompensiert; sie wird durch bisher wenig untersuchte Mechanismen wie Formänderung bzw. -anpassung der Zelle oder aktinreiche Zellausstülpungen vermittelt (Haston et al., 1982; Mandeville et al., 1997; Friedl et al., 1998c; Debnath und Burgge, 2005). Zusammengefasst erlauben 3D-Modelle sowohl von Integrinen abhängige als auch unabhängige Migrationsstrategien in unterschiedlichen Zelltypen.

1.4. Beitrag von Adhäsion und alternativen Zell-Matrix-Interaktionen zu Tumorzellinvasion und Metastasierung

1.4.1. Beitrag von Integrinen

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass sich die Oberflächenexpression und -verteilung der Integrine bei präneoplastischen und neoplastischen Zellen wesentlich voneinander unterscheiden (Mizejewski, 1999; Moschos et al., 2007; Hofmeister et al., 2008). Es wurde bewiesen, dass die Überexpression und -aktivierung der Integrine mit der Progression mancher Tumorzellen zusammenhängen (Janes und Watt, 2006). Zum Beispiel ist die Expression von $\alpha 2\beta 1$ - oder $\alpha 6\beta 1$ -Integrinen im Melanom erhöht (Danan et al., 1993; Ramsay et al., 2007; Marsh et al., 2008).

In manchen Tumoren, insbesondere im Melanom und Gliom, ist eine erhöhte Expression des $\alpha v\beta 3$ -Integrins mit der verstärkten Invasion und Metastasierung verbunden (Felding-Habermann et al., 2001). $\alpha v\beta 3$ -Integrin wird an der invasiven Front der Melanomzellen und in angiogenetischen Blutgefäßen stark exprimiert, aber schwach beim gutartigen Nävi oder bei normalen Melanozyten (Brooks et al., 1994a, b). Eine verstärkte Expression des $\alpha 6\beta 4$ -Integrins auf Thyroid-Karzinomzellen und in Brustkarzinomen korreliert mit zunehmendem Metastasierungspotenzial (Serini et al., 1996; Garzino-Demo et al., 1998; Mercurio et al., 2001; Ramos et al., 2002).

Während die Expression mancher Integrine bei der Tumorentwicklung ansteigt, geht die reduzierte Expression von $\alpha 1$ -, $\beta 1$ - oder $\beta 4$ -Integrin-Untereinheiten mit der Bildung von Neoplasmien im Brustepithelialgewebe einher (Zutter et al., 1995; Mizejewski, 1999).

Das in manchen malignen Tumoren (Leberkarzinome, Mesotheliome) verstärkt exprimierte Syndecan-4 bindet an Fibronectin und Laminin und unterstützt die β 1-Integrinfunktion bei der Invasion (Sanocella et al., 1999; Beauvais et al., 2004a; Midwood et al., 2006). Syndecan-1 wird in manchen humanen Tumoren verstärkt exprimiert, wie in Pankreas-, Magen- und Brustkrebs. Im Brustkarzinom ist Syndecan-1 mit dem α v β 3-Integrin funktionell gekoppelt und trägt zur Migration bei (Beauvais et al., 2004b).

Somit geht in einigen, nicht jedoch in allen Tumoren die Progression mit verstärkter Integrinexpression und -funktion einher, entweder durch direkte Expressionsänderung von Integrinen oder Integrinregulatoren wie Syndecanen.

1.4.2. Beitrag der Glykokonjugate

Eine Vielzahl von Untersuchungen zeigt, dass die maligne Transformation von Zellen und die Metastasierung mit der Veränderung von Glycosylierungsprozessen und -mustern auf der Tumorzelloberfläche einhergehen (Tabelle 1) (Dwek et al., 2001; Kobata et al., 2005; Brooks et al., 2008). Es gibt zwei Ursachen für Veränderungen des Oligosaccharidmusters: die Verstärkung oder Inhibition der Synthese von Kohlenhydratbausteinen oder die *de novo*-Synthese veränderter Glykokonjugate. In vielen malignen Zellen wie z.B. Mamma- und Kolonkarzinomzellen kommt es zu einer Überexpression der N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnTV), die mit einer Zunahme von komplexen N-verzweigten Oligosaccharidstrukturen, insbesondere der Überexpression von β 1,6-verzweigten N-Glycanen einhergeht (Granovsky et al., 2000; Kobata et al., 2005). Die proximale β 1,6-Fucosylierung wurde für Leberkarzinome beschrieben (Kudo et al., 2007; Miyoshi et al., 2008).

Bestimmte Oligosaccharidstrukturen werden nur in embryonalen Geweben und in Tumorzellen exprimiert (onkofetale Antigene), z.B. Glypican-3 (Nakatsura und Nishimura, 2005) und α -Fetoprotein (Sarandakou et al., 2007), die sich als Tumormarker für Diagnostik und Prognose des Verlaufs von Tumorerkrankungen eignen (Varki, 1999; Kobata et al., 2005; Brooks et al., 2008).

Modifizierte Glycosylierung führt über Funktionsmodulierung von Adhäsionsrezeptoren zu einer veränderten Interaktion der Zelle mit ihrer Umgebung. Bekannte Folgen modulierter Oberflächenglycosylierung sind Abwandlungen im Adhäsionsverhalten, die erleichterte Intra- und Extravasation von Tumorzellen und der verstärkte Schutz gegen die Immunabwehr (Fuster und Esko, 2005; Kobata et al., 2005). Die Überexpression des Enzyms GnTV in Tumorzellen verursacht die vermehrte β 1,6-Verzweigung an Mannoseresten in der β 1-Kette der α 5 β 1-Integrine, wodurch die Integrinfunktion und die Bildung fokaler Kontakte auf Tumorzellen reduziert und das Invasionspotential durch EZM und Basalmembran erhöht wird (Guo et al., 2002). Die Aufregulation von β 1,6-verzweigten N-Glycanen an E-Cadherin in Tumorzellen verringert die E-Cadherin-vermittelten homophilen Zell-Zell-Interaktionen und

begünstigt dadurch die metastatische Ablösung von Zellen aus dem Verband (Varki, 1999; Dennis, 2002; Kobata et al., 2005).

Tumor-Antigene mit bekannter Funktion sind Sialyl-LewisX und -LewisA (SLe^x und SLe^a), zwei Tetrasaccharide (NeuAc-Gal-Fuc-GlcNAc) in leicht modifizierter Konfiguration. Sie vermitteln die Selectin-abhängige Adhäsion der Tumorzellen zum Gefäßendothelium (Extravasation) und hämatogene Metastasierung (Julien et al., 2001; Kannagi, 2004; Magnani, 2004). Die Überexpression von sialinsäurehaltigen Glykokonjugaten verleiht eine stark negative Ladung, wobei die Zell-Zell Adhäsionen aufgrund ladungsbedingter Abstoßung geschwächt werden. Polysialysierung ist meistens mit einer Zunahme des invasiven Potentials der Tumorzellen assoziiert und korreliert mit einer schlechten Prognose (Paganuzzi et al., 2003; Seidenfaden et al., 2003; Ono und Hakumori, 2004; Mizuguchi et al., 2007).

Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass die Veränderung des Glycosylierungsmusters eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren einnimmt.

Tabelle 1. Beispiele für Glycanfamilien, die bei der Tumorprogression beteiligt sind
(modifiziert nach Fuster und Esko, 2005). Zitate sind in Fuster und Esko (2005) nachzulesen.

Glycan	Funktion	Therapeutische Zielstrukturen	Neoplasien	Referenzen
Tumorinvasion				
N-Glycane	Veränderung E-Cadherin-abhängigen Tumoradhäsion	Alkaloid-Inhibitoren der N-glycanprozessierung	Brust,Dickdarm	Chou und Hart, 2001
N-Glycane	Tumor-Abstoßung (z.B. Polysialylierung)	Sialyltransferase-Inhibitoren	Neuroblastom, Lunge	Yoshimura et al.,1996 Julien et al.,2001
O-Glycane	Vestärkung der Migration von Tumorzellen durch Inhibition der Zell-Zell Kontakte (z.B. Sialyl Tn der Muzine)	Impfstoffe (z.B.konjugiert mit Sialyl Tn)	Brust,Magen, Eierstock	Seidenfaden et al.,2003
Glycosphingolipide	Tumor-Abstoßung (z.B. GM3)	Glycosphingolipid-Inhibitoren,Ganglosid-zielende Impfstoffe	Melanom,Neuroblastom,Brust	Bestango et al.,2003 Carr et al.,2003 Ragupathi et al.,2003
Heparansulfat Proteoglycane	Matrix zur Speicherung von Wachstumsfaktoren (Heparanase-Substrat)	Heparinfragmente;Sulfotransferase-Inhibitoren;Xylosidasen; Antisense-RNA zu Perlecan	Brust,Dickdarm Leber,Lymphome Melanom	Vlodavsky et al.,1999 Goldshmidt et al.,2002 Adatia et al.,1997
Chondroitinsulfat Proteoglycane	Modulierung der Tumor-Matrix Anhaftung	Xylosidasen	Melanom,Gliom Lunge	Idia et al.,1996 Faassen et al.,1992
Hyaluronan	Steuerung des Tumorzellwachstumsdurch Signale auf das Zytoskelett während der Migration	Bindung an Hyaluronan-Rezeptoren des Tumors z.B. CD44-Gen ausschalten	Brust	Turley et al.,2002

Tumormetastasierung

O-Glycane	Förderung der Tumoradhäsion bei der hämatogenen Metastasierung (SLe ^x , SLe ^A)	Disaccharid-Primer der Glycosylierung (reduziert Tumor SLe ^x)	Dickdarm	Borsig et al.,2002 Fuster et al.,2002 Varki et al.,2002
N- und O-gebundene Glycane	Verstärkung der Tumor-Aggregation (binden Galectin-3)	Galectin-3 Inhibitoren (β-Galaktosidase)	Melanom	Takenaka et al., 2004
Glycosphingolipide	Tumoradhäsion (sulfatierte Selektin-Liganden)	Disaccharid-Primer, Konkurrenz mit Heparin	Dickdarm	Borsig et al.,2002 Varki et al.,2002

Tumorangiogenese

N-Glycane	Verstärkung der Migration von Endothelzellen	Alkaloid-Inhibitoren von N-gebundener Glycosylierung	Prostata	Pili et al.,1995
Heparansulfat-Proteoglycane	Korezeptor für Wachstumsfaktoren und Lagerstätte von Matrixproteinen	Disaccharid-Primer, Konkurrenz mit Heparin	Dickdarm	Iozzo et al.,2001 Jiang et al.,2003

Wachstum und Proliferation

N-Glycane	Verhinderung der Apoptose, Signale von Wachstumsfaktoren	Alkaloid-Inhibitoren der N-glycanprozessierung	Brust, Melanom Ewing-Sarkom	Girnita et al.,2000 Komatsu et al.,2001
O-Glycane	Muzin (MUC4)-vermittelte Aktivierung der ERBB2-Rezeptoren	Immuntherapien mit MUC4 als Zielstruktur	Brust	Komatsu et al.,2001
O-Glycane	Verhinderung der Apoptose (evtl. durch Bindung von Galectin-3 an terminale Galaktose von O-Glycanen)	Galectin-3 Inhibitoren (β-Galaktoside)	Dickdarm Pankreas	Takenaka et al., 2004
Glycosphingolipide	Kontrollierung der Signalgebung durch Lipidrafts	Inhibitoren der Ceramid-Glycosylierung, Impfstoffe gegen Ganglioside	Brust	Nagy et al.,2002
Heparansulfat-Proteoglycane	Korezeptor für Tumorstromwachstumsfaktoren	Heparin-Derivate als Heparansulfat- und Sulfotransferase Inhibitoren	Pankreas, Eierstock, Niere, Leber	Kleeff et al.,1998 Lai et al.,2003
Hyaluronan	Signalvermittlung durch Hyaluronan-Rezeptoren (z.B. CD44)	Hyaluronan-Oligomere, Hyaluronan-bindende Protein-Gene von Adenoviren	Dickdarm Brust	Toole,2004 Misra et al.,2003
O-GlcNAc	Modifizierung der Phosphorylierung von Oncogenen	O-GlcNAc Transferase-Inhibitoren	Pankreas	Chou and Hart, 2001

1.4.3. Beitrag weiterer EZM bindender Moleküle

Neben Integrinen interagieren weitere Adhäsionsrezeptoren mit Bestandteilen der EZM und könnten zur Migration von Tumorzellen beitragen, z.B. CD44 über die Bindung an Hyaluronan (Ropponen et al., 1998; Lessan et al., 1999; Hosono et al., 2007), der Discoidin-Rezeptor DDR über die Bindung an Kollagen (Leitinger und Hohenester, 2007) und CD26 (Dipeptidyl-Peptidase IV, DPPIV) über die Bindung an Kollagen und Fibronectin (Lambeir et al., 2003). Eine große Zahl an Neoplasien epithelialen und mesenchymalen Ursprungs zeigt eine hohe Expression an CD44H (die Standard CD44-Isoform) sowie Isoformen von CD44, vor allem der Variante CD44v6 (Zeng et al., 1998). Bei Ovarialkarzinomen findet man eine große Variation der CD44 Expression als ein häufiges Merkmal und assoziiert dies mit

ungünstiger Prognose (Ricciadelli und Rodgers, 2006). Bei Magenkarzinomzellen wird die Adhäsion an Mesothelzellen über CD44H und β 1-Integrine vermittelt (Nakashio et al., 1997). DDR-1 wird im Prostatakrebs überexprimiert und trägt hier zur Invasion bei (Shimada et al., 2008). DDR-2 wurde kürzlich als diagnostischer Marker für Nasen-Rachenraum-Karzinome vorgeschlagen (Chua et al., 2008).

Die Überexpression von CD26 in Eileiterkrebs unterdrückt die Invasivität von Tumorzellen (Kikkawa et al., 2005) und könnte somit zur Gegenregulation beitragen.

1.5. Ziele dieser Arbeit

Die meisten Untersuchungen zur Zellmigration in 2D-Modellen weisen darauf hin, dass die Zelladhäsion essenziell für die Migration normaler und entarteter Zellen ist. Wenig systematische Arbeiten in 3D-EZM Modellen zeigten darüber hinaus, dass nicht in allen Fällen eine Integrinblockade zu inhibierter Migration führt (Friedl et al., 1998 c; Maaser 1999). Daher sollte in dieser Arbeit geklärt werden, welche alternativen Strategien der Zell-Matrix-Interaktionen noch an der Migration invasiver Zellen beteiligt sind.

Speziell sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie stark kann die Migration von Tumorzellen in 3D-Kollagenmatrizen durch die Inhibition von β 1-Integrinen maximal reduziert werden?
2. Können die Befunde von Tumorzellen auf nicht-neoplastische Fibroblasten übertragen werden?
3. Zeigen unterschiedliche Interferenzstrategien der Integrinfunktion eine vergleichbare Hemmung der Migration?

Aufgrund des im Verlauf dieser Arbeit gezeigten Übergangs Integrin-positiver mesenchymal migrierender Zellen zu einer Integrin-unabhängigen amöboiden Migration sollte im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden, über welche Mechanismen die Integrin-unabhängige amöboide Migration erfolgt. Hierzu sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Welche Zell-Matrixkontakte vermitteln die Interaktion und Migration nach einer Integrinblockade?
2. Welche Rolle spielen alternative Integrine wie z.B. α v β 3, die fibrilläres natives Kollagen nicht spezifisch bzw. mit niedriger Affinität binden?
3. Welche Funktion haben die Glykokonjugate der Zelloberfläche (Glykokalyx) und sulfatierte Glykokonjugate in der Zell-Matrix-Interaktion und Migration?

Zusammengefasst sollten diese Versuche klären, welche Formen und Mechanismen von Zellmigrationen jenseits der Integrinfunktion existieren.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden für die durchflusszytometrische Analyse und die konfokalmikroskopische Darstellung der menschlichen Zellen benutzt:

Maus anti- β 1-Integrin monoklonaler mAk (IgG1) (Coulter, Immunotech, Krefeld, Deutschland), blockierend, Klon 4B4 und Maus anti- β 1-Integrin mAk (IgG1), nicht blockierend, Klon K20 (Coulter), Maus anti-Vinculin mAk (IgG1), Klon VIN-11-5 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), Maus anti- α v β 3-Integrin mAk (IgG1), Klon LM609 (Chemicon, Hofheim, Deutschland), Maus anti-GD3 mAk R24 (IgG3) aus Maus Hybridomzelllinie HB-8445 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), Maus anti-CD166 ALCAM Fc-Fragment (IgG2a), Klon L50 (Sanbio, Beutelsbach, Deutschland), Maus Isotypkontrolle (IgG1) (Dianova, Hamburg, Deutschland), Maus Isotypkontrolle (IgG3), Maus Isotypkontrolle (IgM) (Caltag, Hamburg, Deutschland).

Folgende Antikörper wurden für durchflusszytometrische Analysen der murinen Zellen eingesetzt: Ratte anti- β 1-Integrin mAk (IgG2a), Klon 9EG7 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), armenischer Hamster anti- β 1-Integrin mAk (IgM), Klon Ha2/5 (BD Biosciences), Ratte anti- β 1-Integrin mAk (IgG2a), Klon KMI6 (BD Biosciences), Maus anti-Chondroitin-4-Sulfat mAk (IgM), Klon LY111 (Seikagaku Biobusiness Corp., Tokyo, Japan), Maus anti-Heparansulfat mAk (IgM), Klon F58-10E4 (Seikagaku), Maus Isotypkontrolle (IgG2) (Dianova), anti-HA-Biotin mAk F(ab)-Fragment (HA; Hämmagglutinin), Klon 3F10 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

Folgende Sekundäre Antikörper (Ak) wurden benutzt: Rhodamin-Red-X Ziege anti-Maus F(ab')²-Fragment (Dianova), Fluorescein anti-Maus Ak (IgG+IgM) (KPL, Wedel, Deutschland), Alexa Flour 488 Ziege anti-Maus Ak (IgG) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), Cy3 Ziege anti-Maus Ak (IgG) (Dianova). Phalloidin-Alexa 488 und Phalloidin-Alexa 568 (Molecular Probes). Für Western Blot wurden Maus anti-Talin mAk (IgG1), Klon 8D4 und Sekundär Peroxidase Esel anti-Maus Ak (IgG) (Dianova) benutzt.

2.2. Zelllinien und Kultivierung

Die hochinvasiven und metastasierenden humanen MV3 Melanomzellen (Van Muijen et al., 1991) wurden als Modellzellen in unseren Experimenten benutzt, da sie in der Kollagenmatrix spontan migrieren. MV3-Zellen exprimieren α 2 β 1- und α 3 β 1-Integrine für die Interaktion mit Kollagen Typ I (Danen et al., 1993). Diese Zelllinie wurde von G. Van Muijen zur Verfügung gestellt (Universität Nijmegen, Niederlande). Nach Transplantation in eine Nacktmaus entwickelten sich Lymphknotenmetastasen. MV3-Tiam-Zellen wurden von

R. Ahmadian (MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Beide adhärenen Zelllinien wurden in RPMI-1640 Medium (PAN, Heidenheim, Deutschland), das 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin (PAN) und 10% hitzeinaktiviertes FCS (Biowhittaker, Verviers, Belgien) enthielt, unter einer humidifizierten 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden von A. Messent (Universität Manchester, England), murine embryonale Stammzellen (GD25) und gefloxt Kontrollzellen von C. Brackebush (MPI für Biochemie, Martinsried, Deutschland) zur Verfügung gestellt. MEF und GD25 wurden in DMEM Medium kultiviert (PAN). Alle Zellkulturen wurden bei einer Temperatur von 37°C im Brutschrank kultiviert. MEF wurden zusätzlich in Anwesenheit von INF-γ und bei 33°C kultiviert.

Für die Migrationsversuche wurden die adhärenen Zellen bei subkonfluenter Zelldichte mit 2 mM EDTA (37°C, 5 min) bzw. 0,25% Trypsin in 1 mM EDTA abgelöst (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), mit Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem PBS (Invitrogen) gewaschen, im Medium suspendiert, gezählt und auf eine definierte Zelldichte von 1x10⁶ Zellen/ml eingestellt. Zusätzlich wurden für Studien der spontanen Gruppenzellwanderung folgende Zelllinien getestet: MCF-10 (Mammakarzinom), SCOV (Adenokarzinom), ES-2 (Eierstockkarziom), 3T3 (Mausfibroblasten), IF6 (Melanom) und Hela (Gebärmutterhalskrebs).

2.3. Generierung von β1-Integrin defizienten MEF

Durch Einführung des Onkogens Simian Virus 40 (SV-40) Großes Tumor Antigen (Tag) wurden MEF zu immortalisierten Zellen transformiert (Charles River Laboratories, Wilmington, DE, USA). Immortalisierte MEF verhielten sich weitgehend als eine Zelllinie, die für mehrere Passagen kultivierbar war.

Um β1-Integrin-defiziente und nicht-lethale Mausembryonen zu generieren, wurde das erste Exon von β1-Integrin durch zwei loxP-Seiten flankiert bzw. gefloxt. Die isolierten MEF aus dieser Maus wurden mit Cre-Adenovirus infiziert und dadurch das kodierende Gen für β1-Integrin an LoxP-Seiten deletiert. Die immortalisierte Mauslinie exprimierte eine temperatursensitive Mutante des SV-40 Großen T-Antigens (tsA58) unter Kontrolle des IFN-γ induzierbaren H-2K Promotors. Embryonale Fibroblasten dieser Mäuse wurden durch Kultivierung bei einer Temperatur von 33°C in Anwesenheit von IFN-γ immortalisiert. Bei anschließender Kultur bei 37°C erfolgte eine Revertierung zu begrenzter Passagierbarkeit von ca. 20-30 Passagen (A. Messent, persönliche Mitteilung).

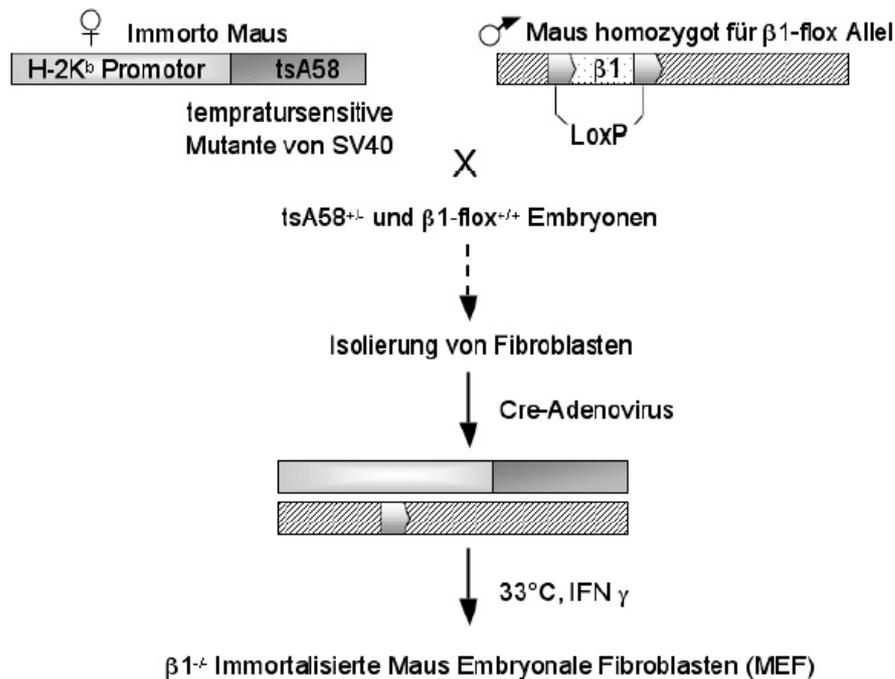


Abbildung 5. Generierung von immortalisierten und $\beta 1^{-/-}$ defizienten Zelllinien transgener Mäuse

Um immortalisierte und $\beta 1$ -Integrin defiziente MEF zu generieren, wurde eine Immorto Maus (Jat et al., 1991) mit einer $\beta 1$ geflochten Maus (Graus-Porta et al., 2001) gekreuzt. Die immorto Mauslinie ist eine temperatursensitive Mutante des SV-40 Großen T-Antigens (tsA58) unter Kontrolle des IFN- γ induzierbaren H-2K Promotors. Daher ist $\beta 1$ -flox Allel ein induzierbares knock-out. Nach mehreren Generationen wurden die homozygoten Embryonen für $\beta 1$ -flox Allel selektiert, die Fibroblasten isoliert und mit Cre -Adenoviren infiziert. In Fibroblasten mit $\beta 1$ -flox Allel war das erste Exon von $\beta 1$ -Integrin mit zwei LoxP Seiten flankiert. Die Cre-Rekombinase von Cre-Adenoviren schneidet an beiden LoxP Seiten. Das Exon von $\beta 1$ -Integrin wurde deletiert und die $\beta 1$ -defizienten MEF generiert. Die $\beta 1$ -Integrin defizienten Fibroblasten wurden bei 33°C und in Anwesenheit von IFN- γ kultiviert, um sie immortal zu halten. Bei 37°C konnte der Promotor ausgeschaltet werden, und die Zellen waren für wenige Passagen lebensfähig. Die $\beta 1$ -Integrin defizienten MEF wurden freundlicherweise von A. Messent und M. Humphries zur Verfügung gestellt.

2.4. Die dreidimensionale (3D) Kollagenmatrix

Für Untersuchungen der Zellmigration wurde Typ I Kollagen in saurer Lösung (pH 3) durch Neutralisation (pH 7,4) mit Bikarbonat-Lösung zur Polymerisation gebracht. Das bovine Typ I Kollagen (Vitrogen, Nutracon BV, Leimuiden, Niederlande) war resistent gegen Trypsin und hielt seinen nativen Zustand bei (C. Overall und E. Tam, unveröffentlicht).

Für 3D fibrilläre Kollagenmatrices (Endkonzentration: 1,7 mg/ml) wurden 15 Teile Vitrogen, 2 Teile Minimal Essential Eagle's Medium (ICN, Meckenheim, Deutschland) und ein Teil Bikarbonat-Lösung eingesetzt (Friedl und Bröcker, 2004). Ein Deckgläschen wurde auf einem Objektträger an drei Seiten mit Paraffinwachs fixiert, so dass eine dreidimensionale Migrationskammer mit einer Größe von ca. 20 x 20 x 0,5 mm und einem Volumen von 200 μ l entstand. Für 3D-Migrationsexperimente wurde ein Teil der Zellsuspension mit zwei Teilen Typ I Kollagen gemischt. Anschließend wurde die Kammer mit 100 μ l Zellsuspension beladen. Nach Kollagenpolymerisation im Inkubator (30 min, 37°C, in einer 5% CO₂-haltigen

Atmosphäre) wurde die Kammer mit Medium aufgefüllt und mit Paraffinwachs luftdicht verschlossen.

Um den Kollagenabbau messen zu können, wurden der Kollagenlösung vor der Polymerisierung 2% ^{DQ}FITC-Kollagen Typ I-Monomere aus Rinderhaut (Molecular Probes) hinzugefügt. Die Endkonzentration des Kollagens betrug 1,67 mg/ml. Die Mischung aus Zellen und Kollagen wurde blasenfrei entweder auf ein Deckglas (22x22 mm) oder in eine Migrationskammer gegeben. Nach der Kollagenpolymerisierung wurde die Migrationskammer mit dem Medium aufgefüllt und luftleer verschlossen. Für die Blockadestudien wurde adhäsionsblockierender anti-β1-Integrin mAk 4B4 oder Rhodocetin der Kollagenmischung und dem Überstand zugegeben.

2.5. Inhibitoren

Der Inhibitor Rhodocetin wurde in einer 50-100 μM Konzentration dem frisch zubereiteten Kollagen-Zellen-Gemisch zugegeben. Nach der Polymerisierung des Kollagens wurde das Verhalten der Zellen gefilmt. Rhodocetin ist ein Protein aus dem Gift der Schlange *Calloselasma rhodostoma* und antagonisiert *in vitro* spezifisch wichtige zelluläre Funktionen wie Zelladhäsion, Migration und Kontraktion der Kollagenmatrix (Eble et al., 2001). Die A-Domäne der α2-Kette der α2β1-Integrine wird von Rhodocetin gebunden, und daher wird die Interaktion von α2β1-Integrin mit dem Kollagen kompetitiv gehemmt, entgegen den meisten bekannten Disintegrine unabhängig von einem RGD-Motiv und mit der gleichen Affinität wie Kollagen Typ I (Rosenow et al., 2008; Eble et al., 2001). Rhodocetin erlaubt schwache Adhäsion, aber keine Ausbreitung der Zellen und keinen Aufbau der fokalen Adhäsionen auf der 2D beschichteten Oberfläche.

Um die rasche Erneuerung glycosylierter Oberflächenproteine nach N- und O-Verdau zu verhindern, nutzten wir einige in der Literatur beschriebene Methoden. Das Nukleosidantibiotika-Gemisch Tunicamycin (Sigma-Aldrich) wurde zur Inhibition der GlcNAc Phosphotransferase (GPT) und damit der Hemmung der N-Glycan-Prozessierung eingesetzt. Die adhären Zellen wurden für 16 Stunden bei 37°C mit 0,25 μg/ml Tunicamycin im Kulturmedium vorinkubiert. Für für die anschließenden Migrationsstudien wurde generell 2,5 μg/ml benutzt.

Zur Hemmung der Proteinsynthese wurde Cycloheximid (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 20 μg/ml eingesetzt, der die Bindungen und Kettenverlängerung der Peptide an eukaryontischen 60S Ribosomen-Untereinheiten unterbindet. Das Laktontanibiotikum Brefeldin A (Sigma-Aldrich) blockiert die *de-novo* Synthese über den Transport von Glycoproteinen von ER zum Golgi-Apparat und wurde in einer Konzentration von 5 μg/ml eingesetzt.

Zur Hemmung der Ligandenbindung des $\alpha v \beta 3$ -Integrins wurde cRGD-Peptid (-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) verwendet. Die Zellmigration wurde in Kollagenmatrices und in Gegenwart von cRGD-Peptid (2 und 10 μ M) und des anti- $\beta 1$ -Integrin 4B4 mAk (10 μ g/ml) untersucht. $\alpha v \beta 3$ -Integrine binden an nicht polymerisiertem Typ I Kollagen und tragen zur Zellmigration bei. cRAD-Peptid (-Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val-) wurde als Kontrolle eingesetzt. Beide zyklischen Peptide wurden in einer Reinheit von über 95% von der Firma Bachem (Weil am Rhein, Deutschland) bezogen.

2.6. Messung der Zellviabilität

Um zytotoxische Effekte auf die MV3-Zellen und MEF sowohl durch die eingesetzten Hemmstoffkonzentrationen (antagonistische Peptide, Adhäsionsblockierende mAk) als auch die lange Versuchsdauer (15-20 Std.) in Kollagen- sowie Flüssigkultur zu vermeiden, wurde routinemäßig die Viabilität der Zellen bestimmt. Dazu wurden 3D-Kollagengele im Anschluss an ein Migrationsexperiment in An- und Abwesenheit von Inhibitor für 20 Stunden inkubiert und durch Collagenase I (*Clostridium histolyticum*; Sigma-Aldrich) für 30 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) (Sigma-Aldrich) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.7. Digitale Hellfeld-Zeitraffermikroskopie

Die Wanderung der Zellen wurde mit digitaler Hellfeld-Zeitraffermikroskopie (Friedl und Bröcker et al., 2004) beobachtet. Dazu wurden die Migrationskammern auf den Objektischen der Lichtmikroskope (inverse Mikroskope DM-IL, Leica, Heidelberg, Deutschland) fixiert und über einen Temperaturfühler mit einem Thermostat (Chauvin-Arnoux, Kehl, Deutschland) und einem Infrarotheizsystem (Phillips, Hamburg, Deutschland) verbunden. Die Temperatur in den Migrationskammern wurde über die gesamte Versuchsdauer von ca. 20 Stunden bei 37°C gehalten.

Vom Gesichtsfeld wurden mit einer CCD-Kamera (Sony, Berlin, Deutschland) im Abstand von 5 min digitale Durchlichtbilder mit 10- oder 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mit ISCAP Image Grabbing Software (Johannes Vogel, Universität Bremen, Deutschland) gespeichert und in digitale Quick-Time Filme 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 wurden folgende typische Zellmorphologien bestimmt: a) unipolar, bipolar (spindelförmig, mesenchymal), b) dendritisch (sternförmig), oder c) rund. Die Zellen wurden entweder der wandernden oder der sessilen Zellgruppe zugeordnet.

2.8. Zelltracking und Datenanalyse

Das Filmmaterial wurde mit einem bereits für die Einzelzellwanderung etablierten Zelltrackingprogramm (Friedl et al., 1993; Friedl und Bröcker, 2004) quantitativ ausgewertet. Dazu wurden die digitalen Filme auf Videoband überspielt und über Hypercard am Bildschirm sichtbar gemacht. In der Regel wurden 40 zufällig ausgewählte Zellen einzeln mit dem Cursor verfolgt. Dabei wurde die Lage der Einzelzelle in einem zweidimensionalen xy-Koordinatensystem vom Trackingprogramm in Zeitabständen von 0,3 sec Film (entsprechend 15 min Echtzeit) erfasst. Geschwindigkeiten (v) einer Zelle wurden aus der zurückgelegten Strecke (s) und dafür benötigten Zeit (t) nach der Formel ($v=s/t$) berechnet, wobei zwischen Speed als Durchschnittsgeschwindigkeit einer Zelle und Velocity als absolute Geschwindigkeit ohne Pausen (Zeitintervalle ohne Ortsveränderung) unterschieden wird. Eine Zelle wird zu jedem beliebigen Messpunkt als wandernd bezeichnet, wenn sie einen Weg von mindestens 1 Pixel/Zeitintervall zurückgelegt hat.

Die durchschnittliche Geschwindigkeit und der prozentuale Anteil wandernder Zellen aus der Population der 40 beobachteten Zellen wurde als Parameter der Motilität der Population errechnet. Der prozentuale Anteil der beweglichen Zellen basiert auf der Zahl motiler Zellen an jedem beliebigen Messpunkt, oder dem Prozentsatz der Messintervalle, zu denen Einzelzellen beweglich waren.

Der Anteil migrierender Zellen und die Verteilung der getrackten Zellen auf die einzelnen Geschwindigkeiten wurden mit Statistika 6.0 (StatSoft) ermittelt und mit dem Prism-Programm (Softwarebox, Schönau, Deutschland) grafisch dargestellt. Zur statistischen Analyse der Mittelwerte (+/-) Standardabweichung wurde Student's t-test verwendet. Für die Einzelauswertung wurde der nichtparametrische Mann-Whitney U-Test benutzt.

2.9. Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrisch untersuchten Zellen wurden in Flüssigkultur oder im 3D Kollagengel für 10-20 Stunden inkubiert. Kollagengele wurden durch hoch aufgereinigte Collagenase I für 30 min bei 37°C verdaut (Friedl et al., 1995). Adhärenz Zellen wurden mit 2 mM EDTA vom Plattenboden abgelöst. Für jeden Ansatz wurden 10^5 Zellen mit dem primären Maus mAk (1 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$) für eine Stunde auf Eis inkubiert, gewaschen und mit Sekundären FITC-markiertem anti-Maus IgG (1 $\mu\text{g/ml}$, 30 min) gefärbt. Für die Detektion der $\beta 1$ -Integrin Expressionsstufe wurden die Zellen mit dem FITC-markierten anti- $\beta 1$ -Integrin mAk K20 gefärbt (10 $\mu\text{g/ml}$, 30 min). Die Expression auf der Zelloberfläche wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (FACSscan, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

In den Kontrollexperimenten wurde nach der Behandlung mit Collagenase I weder in Flüssig- noch in Kollagenkulturen ein Unterschied in Expression von Integrinen (Maaser et al., 1999) oder anderer Adhäsionsrezeptoren (Friedl et al., 1995) festgestellt.

2.10. Zellsortierung

Für die Sortierung der MV3-Zellen nach ihrer $\beta 1$ -Integrin Expressionsstufe wurden die Zellen mit FITC-markiertem anti- $\beta 1$ -Integrin mAk Klon K20 für 20 min auf Eis gefärbt, mit einem Gemisch aus 1%igem FCS in PBS gewaschen und am FACScan sortiert (Institut für Immunologie und Virologie, Universitätsklinikum Würzburg, Deutschland).

2.11. Kollagenolyse Assay

Ein quantitativer Kollagenolyse Assay wurde durch Kopolymerisierung von 2%igen DQ FITC-Kollagen-Typ I-Monomeren von der Rinderhaut (Molecular Probes) mit Rattenschwanzkollagen (Endkonzentration 1,65 mg/ml) (Becton-Dickinson) ermöglicht. Die Zellen wurden in RPMI Medium ohne Phenolrot suspendiert (1×10^5 Zellen/ 0,1 ml Medium/ Kavität). Nach Migration der Zellen für 40 Stunden in FITC-Kollagenmatrices in Ab- oder Anwesenheit von adhäsionsblockierendem 4B4-mAk wurde das Kollagengel mit Zellen abzentrifugiert (15000 g, 10 min, 4°C). Der Überstand mit freigesetzten FITC-Molekülen wurde spektrofluorometrisch analysiert. 100% entspricht der kompletten Verdauung der zellfreien Kollagenmatrices mit Collagenase VII (Sigma-Aldrich). Die Hintergrundfluoreszenz wurde durch Messung des Überstands von pelettierten und nicht-verdauten zellfreien Kollagenmatrices kalkuliert. Autofluoreszenz wurde weder bei Zellen noch Inhibitoren festgestellt. FITC-Freisetzung wurde durch klassische Collagenase sowie Trypsin-ähnliche Aktivität detektiert.

2.12. Statische und dynamische Konfokalmikroskopie

Die Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie fixierter 3D Proben wurde mit einem Leica SP2-System durchgeführt. Nach 6-8 Stunden Inkubation wurden zellenhaltige Kollagenmatrices mit dem 4% Paraformaldehyd bei 37°C für 20 min fixiert und mit PBS gewaschen. Kollagenmatrices wurden mit nicht-markiertem primären Maus anti-human Antikörper inkubiert (10 $\mu\text{g/ml}$; 4°C, über Nacht), mit PBS gewaschen und dann mit Rhodamin-Red-X oder Cy3 Ziege anti-Maus F(ab)² (20 $\mu\text{g/ml}$; 4°C, 45 min) gegengefärbt. Für die doppelte Fluoreszenzfärbung wurden die Zellen nacheinander mit FITC-konjugiertem Primärantikörper (10 $\mu\text{g/ml}$; 4°C, 45 min) oder Fluoreszein-Phalloidin (66 nM; 4°C, 45 min) markiert. Gefärbte Tropfengele wurden in einer vorbereiteten Migrationskammer fixiert und durch Einzelkanal- oder simultane 4-Kanal-Mikroskopie detektiert (Kanäle für zwei Fluoreszenzfärbungen, Reflexion, Transmissionssignal). Die Bilder wurden dreidimensional zusammengelegt und aufgebaut (Maaser et al., 1999). Zur Darstellung von Struktur und Dynamik mit GFP transfizierter Zellen bei der Wanderung wurden dynamische Sequenzen von lebenden Zellen durch 3D Zeitraffer-Konfokalmikroskopie (Leica SP2-System) erhalten. Von den Zellen, die in den Kollagenmatrices 4-6 Stunden gewandert waren, wurde in

Zeitabständen von 5 min ein Bildstapel mit 5-10 Schnitten im Abstand von 2 μm in der Z-Ebene für bis zu 3 Kanäle (Reflexion, FITC, Cy3) aufgenommen. Für die dynamische Rekonstruktion wurden die Fluoreszenz-, Reflexions- und Transmissionssignale gleichzeitig aufgenommen. Filme entstanden aus zeitlich aneinandergereihten Bildern von 3D rekonstruierten Stapeln ausgewählter Z-Ebenen (Schnittebenen). Die Migrationskammer mit den in die Kollagenmatrices eingebetteten Zellen wurde während der konfokalen Lebendaufnahmen über die gesamte Versuchsdauer hinweg durch ein Infrartheizsystem auf einer Temperatur von 37°C gehalten.

2.13. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Glycokalyx besteht hauptsächlich aus sauren Mucopolysacchariden. Zur Darstellung am TEM wurde die Glycokalyx mit dem alkalischen Rutheniumrot-Oxychlorid gefärbt.

Zur Färbung wurden zwei Lösungen frisch angesetzt.

Lösung I:

- 4% Gluteraldehyd (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- 0,2 M Cacodylatpuffer pH 7,3 (Serva)
- 1.500 ppm wässrige Rutheniumrot (Sigma-Aldrich)

Lösung II:

- 5% Osmiumtetroxid (Serva)
- 0,2 M Cacodylatpuffer pH 7,3 (Serva)
- 1.500 ppm Rutheniumrot (Sigma-Aldrich)

Für die Färbung wurden die behandelten und unbehandelten MV3-Zellen mit 2 mM EDTA abgelöst, mit PBS gewaschen und in Lösung I fixiert (1 Std., RT). Die Proben wurden in 0,2 M Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend in Lösung II für 2 Stunden bei RT inkubiert und wiederholt in 0,2 M Cacodylatpuffer gewaschen. Anschließend folgte die Vorbereitung der Proben für die TEM.

Die Proben wurden mit einer Alkoholreihe: 50, 60, 70, 80, 90, 100%igem Ethanol für jeweils 10 min behandelt und in einer Mischung aus Epon und Propylenoxid (Serva) im Verhältnis von 1:1 inkubiert (1 Std., RT). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in reinem Epon über Nacht bei RT inkubiert. Epon wurde ausgetauscht (1 Std., RT), und die Zellpellets wurden in einer Gelatine-Kapsel mit Epon aufgefüllt und verschlossen. Epon (Serva) polymerisierte bei 65°C, 48 Stunde. Die 0,2 μm Schnitte wurden anschließend im TEM beobachtet.

2.14. Quantitative optische Analyse der Zellpolarität

Die Polarität der Zellen wurde als Polarisationsfaktor für jede Zelle (Längsachse geteilt durch Breite) berechnet und in einem Punktdiagramm dargestellt. Zur Quantifizierung der Zellmorphologie wurde 7 Stunden nach der Zugabe des adhäsionsblockierendem mAk 4B4 oder Rhodocetin der Anteil elongierter Zellen (bei mesenchymaler Migration) gegenüber rundlichen und sphärischen Zellen (bei amöboider Migration) durch optische Analyse von 100-130 zufällig ausgesuchten Zellen festgestellt. Zellen wurden kategorisiert in eine mesenchymale Fraktion mit länglicher und polarisierter Zellform und einer relativen Vorwärts- oder Rückwärtsbewegung. Die amöboide Fraktion repräsentierte Zellen mit rundlicher Morphologie und flexibler Pseudopodausstreckung in allen Richtungen, die manchmal eine erhöhte Migration zur Folge hatte. Eine beträchtliche Fraktion der Zellen (20-30%) konnte morphologisch nicht klassifiziert werden, da sie sich im Prozess der Teilung, in sonstigen Übergangszuständen oder in einer immobilen Phase befanden.

2.15. Generierung von multizellulären Sphäroiden

Drei Methoden wurden zur Generierung von mehrzelligen Sphäroiden etabliert.

i) Kulturschalen wurden mit einer Lösung aus Poly-HEMA (Poly-2-Hydroxyethyl Methacrylat 0,33%; Sigma-Aldrich) in 70%igem Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) beschichtet, unter sterilen Bedingungen getrocknet und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden von den subkonfluenten Kulturen mit 2mM EDTA abgelöst, auf Poly-HEMA beschichteten Kulturschalen ($0,8 \times 10^6$ Zellen/8 ml) gegeben und für 48 Stunden bei 37°C und unter 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Multizelluläre Sphäroide entwickelten sich spontan durch Zell-Zell Kontakte, Anhäufung und Proliferation der Zellen. Sphäroide der unterschiedlichen Größen wurden mit einer Mikropipette unter dem Hellfeldmikroskop ausgewählt und in die frisch vorbereitete Typ I Kollagenlösung eingebettet (1,7 µg/ml, pH 7,4; Vitrogen).

ii) Alternativ, adhärente Zellen wurden mit EDTA abgelöst und mit FCS-haltigem Medium für 4 min bei RT inkubiert. Nach dieser kurzen Zeit bildeten sich abgelöste Zellklumpen aus gruppierten Zellen. Diese Sphäroide wurden in Kollagenmatrices einpolymerisiert und unter digitaler Zeitraffermikroskopie aufgenommen.

iii) Eine mechanische Methode zur Herstellung von Sphäroiden war das Ablösen der adhären Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland).

2.16. Adhäsionstest

Die Zellen wurden mit EDTA (2 mM) abgelöst und auf 7×10^5 Zellen/ml eingestellt. Für jeden Ansatz wurden $1,4 \times 10^5$ Zellen (200 µl) in einem Reaktionsgefäß mit oder ohne anti-β1-Integrin 4B4-mAk (10 µg/ml) für 15 min auf Eis inkubiert. Den Zellen wurden

unterschiedliche Konzentrationen des cRGD- bzw. cRAD-Kontrollpeptids angeboten (2,5, 5, 10, 20, 40, 60 und 70 μM) und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend auf eine FCS-beschichtete 96-Wellplatte zupipettiert und für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Überstände wurden vorsichtig entfernt und die adhärenen Zellen mit Kristallviolett (0,5% in 20% Methanol) gefärbt (20 min, RT). Anschließend wurde die Kristallviolett-Lösung entfernt und die Zellen wurden mit doppelt destiliertem Wasser gewaschen und beim RT getrocknet. Durch Zugabe von 10%iger Essigsäure wurde adsorbierte Kristallviolett aus den Zellen freigesetzt und am ELISA-Reader (SLT, Spectra, Tecan, Grailsheim, Deutschland) photometrisch bestimmt.

2.17. Kontraktionsassay der Kollagenmatrices

Kulturplatten wurden mit Poly-HEMA (Poly-2-Hydroxyethyl Methacrylat 0,33%; Sigma-Aldrich) beschichtet, unter sterilen Bedingungen getrocknet und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden von den subkonfluenten Kulturen mit EDTA (2 mM; 5 min bei 37°C) abgelöst, gewaschen, in Typ I Kollagengel inkorporiert und in nicht-polymerisiertem Zustand auf Poly-HEMA beschichteten Kulturgefäßen (2×10^5 Zellen/250 μl Kollagengel) überführt. Adhäsionsblockierenden Inhibitoren (mAk 4B4, Rhodocetin) wurden sowohl in Kollagenmatrices als auch im Überstand zugegeben. Nach der Polymerisation wurde das Kollagengel mit Medium überschichtet und für 24 oder 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Dadurch wurden frei flottierende und nicht-verankerte Kollagengele generiert, die durch die starke Kraftentfaltung der Zellen kontrahierten. Um unter standardisierten Bedingungen zu messen, wie stark die Zugkraft durch anti- $\beta 1$ -Integrin mAk 4B4 beeinflusst wurde, erfolgten Kontraktionsassays an nicht verankerten Kollagenmatrices. Die Kontraktion frei flottierender Kollagengele durch MV3-Zellen wurde in Ab- und Anwesenheit steigender Konzentrationen von mAk 4B4 über 24 Stunden untersucht. Die Kontraktion durch MV3-Kontrollzellen führte zur Verringerung der Gelfläche im Vergleich zur zellfreien Kontrolle.

2.18. Enzymatische Spaltung der Glykokonjugaten

Von den getesteten Enzymen unterschiedlicher Hersteller haben wir uns aufgrund der Effizienz und der niedrigen Zytotoxizität für die N-/O-Glycosidasen der Firma Calbiochem (Darmstadt, Deutschland) entschieden: Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F, Peptid-N4-(N-Acetyl-beta-Glucosaminyl) Asparagin-Amidase, EC-Nummer 3.5.1.52) und Endo- α -N Acetyl-galactosaminidase (O-Glycosidase, EC-Nummer 3.2.1.97). Von den getesteten Enzymen unterschiedlicher Hersteller haben wir uns aufgrund der Effizienz und der niedrigen Zytotoxizität für die N-/O-Glycosidasen der Firma Calbiochem (Darmstadt, Deutschland) entschieden: Peptid-N-Glycosidase F (PNGase F, Peptid-N4-(N-Acetyl-beta-Glucosaminyl)

Asparagin-Amidase, EC-Nummer 3.5.1.52) und Endo- α -N Acetyl-galactosaminidase (O-Glycosidase, EC-Nummer 3.2.1.97).

Tabelle 2. Behandlung der Glycokalyx mit verschiedenen Glycosidasen

Enzym	Zielstruktur	Organismus	Quelle	Endkonzentration (Unit) *
N-Glycosidase F	Asparagin gebundene N-Glycane	<i>Chryseobacterium</i>	Roche Diagnostics	20 U/ml
Endo-α-N-Acetyl-galactosaminidase	Gal β (1-3)GalNAc von O-Glycanen	<i>meningosepticum</i> <i>Diplococcus pneumoniae</i>	Roche Diagnostics	40 mU/ml
N-Glycosidase F	Asparagin gebundene N-Glycane	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Calbiochem	20 U/ml
Endo-α-N-Acetyl-galactosaminidase	Gal β (1-3)GalNAc von O-Glycanen	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Calbiochem	40 mU/ml
Heparitinase I	α -N-Acetyl-D-Glucosaminsäure von Heparansulfate	<i>Flavobacterium heparinum</i> ;	Seikagaku	20 mU/ml

* höchste Konzentration in Zellkultur

1 Mio/ml Zellen (abgelöst mit 0,25% Trypsin in 1 mM EDTA) wurden in RPMI Medium mit 10% FCS gewaschen und danach in einem RPMI Medium mit 2% FCS aufgenommen. Je 100 μ l Zelllösung wurde in 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und durch Zugabe von N-Glycosidase F und O-Glycosidase über 6 Stunden bei 37°C verdaut (pH 7-7,4). Für die Inhibition der Integrine wurden zusätzlich 4B4 mAk (10 μ g/ml) und cRGD-Peptid (10 μ M) zugegeben und die Zellen im Kollagengel einpolymerisiert. Der Erfolg des Verdaus wurde mittels Färbung mit anti-Heparansulfat (10E4) und anti-Chondroitinsulfat (Ly111) am FACS überprüft.

2.19. Desulfatierung von Glycokonjugaten

MV3-Zellen wurden in RPMI-1640 Medium mit 10% FCS und 50 U/ml Penicillin/50 μ g/ml Streptomycin kultiviert. Dieses Medium wurde nach zwei Tagen durch ein spezielles Medium (DMEM, High Glucose, PAN), ohne Magnesiumsulfat, Methionin und Cystein. Zu diesem Medium wurden 10% FCS und 50 mM Natriumchlorat gegeben (Rapraeger et al., 1994). Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit EDTA (2 mM) abgelöst und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit anti-Heparansulfat (F58-10E4), anti-Chondroitinsulfat (LY 111) bzw anti-Sialinsäure (R24) Antikörper gefärbt, mittels Durchflusszytometrie analysiert und anschließend im Kollagengel für Migrationsstudien einpolymerisiert.

2.20. Molekularbiologische Methoden

Die Überexpression von EGFP und, als separates Transkript infolge einer internen ribosomalen Eintrittssequenz, SP2-Peptid wurde mittels bicistronischem pIRES2-EGFP Vektor etabliert. Nach Klonierung der cDNA der SP2-Region in den pIRES2-EGFP-Vektor und Überprüfung der Nukleotidsequenz durch Sequenzierung wurden MV3-Zellen mit diesem Konstrukt transient transfiziert und auf unterschiedliche GFP-Expression mittels FACS sortiert. Der Nachweis der Genexpression erfolgte mittels RT-PCR. Zwei bis drei Passagen nach der Transfektion und Sortierung wurden funktionelle Analysen zu Migrationstypus und -effizienz sowie konfokalmikroskopische Aufnahmen durchgeführt. Im Folgenden werden die verschiedenen molekularbiologischen Methoden erläutert, die in dieser Arbeit für die Konstruktion von Plasmiden zur Transfektion der Melanomzellen angewandt wurden.

2.20.1. Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem und großem Maßstab wurden kommerzielle Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Zur Isolierung von Plasmid-DNA für Sequenzierungs- und Transfektionszwecke wurde die Plasmid-DNA durch das Concert Plasmid Purification Kit (Invitrogen) isoliert, damit die Viabilität der Zellen bei der Transfektion nicht durch zytotoxische Materialien beeinträchtigt wird.

2.20.2. PIRES2-EGFP Vektor

Der PIRES2-EGFP Vektor (BD Biosciences, Clontech) enthält eine Ribosomenbindungsstelle (Internal Ribosome Entry Site, IRES) von Encephalomyocarditisvirus (ECMV) zwischen der multiplen Klonierungsstelle und der Kodierungssequenz für EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein, Anregung: 488 nm, Emission: 507 nm). PIRES2-EGFP Vektor ist ein bicistronischer Expressionsvektor, der die Translation von dem zu analysierenden Protein zu dem GFP derselben mRNA erlaubt. Die mit diesem Vektor transfizierten Zellen können durch Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie identifiziert werden. Fast alle Zellen, die GFP exprimieren und unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchten, exprimieren erwartungsgemäß das zu analysierende Peptid von β 1-Integrin zytoplasmatischen Domänen. Der Vektor enthält zusätzlich ein Kanamycin-Resistenzgen für die Selektion in Prokaryonten und ein Neomycin-Resistenzgen für die Selektion in eukaryotischen Zellen.

Der pGL-Vektor (Gibco-BRL, Karlsruhe, Deutschland) exprimiert GFP unter Kontrolle eines CMV-Promotors und wurde als Kontrolle für die Migrations- und Transfektionsexperimente eingesetzt. Die transfizierten MV3-Zellen wurden mittels limitierender Verdünnungs-Analyse (LDA) subkloniert.

2.20.3. Behandlung des Vektors mit Alkalischer Phosphatase

Der Vektor wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym *Bam*HI bzw. *Eco*RI (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) geöffnet, nach dem Verdau mit Phenol-Chloroform extrahiert und nach Auftrennung in Agarosegel mit dem Jetsorb-Kit (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) aufgereinigt. Die Religation von mit Restriktionsenzymen gespaltenen Vektoren ist ein häufiges Problem bei der Klonierung. Ohne Phosphatgruppen kann eine Religation des Vektors nicht zustandekommen, da die DNA-Ligase immer 5'-Phosphatreste benötigt, an die sie freie 3'-OH-Gruppen anknüpfen kann. Da nur das Insert Phosphatreste besitzt, ist nur eine Insert/Vektor Ligation möglich. Die Behandlung mit alkalischer Phosphatase (1U/20 μ l, Fermentas) wurde für 40 min bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die alkalische Phosphatase mittels Phenol-Chloroform-Extraktion entfernt und der Vektor erneut über eine Qiagen-Säule aufgereinigt. Der mit alkalischer Phosphatase behandelte Vektor wurde für die Ligation mit dem Insert verwendet.

2.20.4. Konstruktion von cDNA

β 1_{cyt} besteht aus 47 Aminosäuren (siehe Abb. 6A) (Argraves et al., 1987; Retta et al., 1998) und enthält drei konservierte Subregionen in der zytoplasmatischen Domäne (Cyto-1, Cyto-2, Cyto-3), die essentiell für die Lokalisation und Funktion von β 1-Integrinen sind (Reszka et al., 1992). Ihre Funktion sind u.a. die Bindung von Talin, FAK und Filamin und der Aufbau fokaler Kontakte (Tanenzapf und Nicholas, 2006; Calderwood et al., 2004). Die festgelegte Aminosäuresequenz antagonistischer Peptide war identisch mit der Sequenz des humanen β 1-Integrins (cDNA Isoform A, GenBank Accession Number BG153150). Sie wurde durch Aminosäure-Substitution in Cyto-2 und Cyto-3 verändert (Tabelle 2), d.h. im Motiv NPXY wurde Tyrosin 787 bzw. 799 entweder durch Phenylalanin (Y787F, Y799F) oder Glutamat (Y787E, Y799E) ersetzt. Diese Modifikation imitiert im β 1-Integrin den phosphorylierten bzw. nicht-phosphorylierten Zustand dieser Region. Oligonukleotide zur Codierung dieser Peptide wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

In Vorversuchen wurden die MV3-Zellen mit der cDNA dieser Region (SP2-E oder SP2-F) und ohne ein Hämagglutinepitop (HA-tag) transient transfiziert. Die Expression der Peptide in diesen Zellen wurde durch die Expression von EGFP durchflusszytometrisch kontrolliert. Als Kontrollzellen dienten die mit Leervektor transfizierten Zellen. Für die *in vitro* Immunopräparationsstudien durch das Peptid gebundener Adapterproteine wurde ein (HA-tag) am N-terminus der cDNA von SP2E- und Sp2F-Domänen angehängt (Kolodziej und Young, 1991; Chen et al., 1993). Dieses Epitop, das aus dem Influenzavirus stammt, enthält 8 Aminosäuren YPYDVPDYA und wurde spezifisch mit anti-HA-Biotin mAk Klon 3F10 identifiziert (Roche Diagnostics).

Tabelle 3. Aminosäure- und Nukleotid-Sequenzen für die Transfektion der MV3-Melanomzellen

Peptid	Aminosäuresequenz	sense (5'-3' Richtung) antisense (5'-3' Richtung)	bp
HA	MYPYDVPDYA	AATTCGCCACCATGTACCCATACGA TGTTCCAGATTACGCTAAG	45
		GATCCTTAAGCGTAATCTGGAACAT CGTATGGGTACATGGTGGCG	45
HA/SP2-E	MYPYDVPDYAKWDTGENPIEKSA	AATTCGCCACCATGTACCCATACGA TGTTCCAGATTACGCTAAATGGGAC ACGGGTGAAAATCCTATTGAGAAGA GTGCCTAAG	84
		GATCCTTAGGCACTCTTCTCAATAG GATTTTCACCCGTGTCCATTTAGCG TAATCTGGAACATCGTATGGGTACA TGGTGGCG	84
HA/SP2-F	MYPYDVPDYAKWDTGENPIFKSA	AATTCGCCACCATGTACCCATACGA TGTTCCAGATTACGCTAAATGGGAC ACGGGTGAAAATCCTATTTTAAGA GTGCCTAAG	84
		GATCCTTAGGCACTCTTAAAAATAG GATTTTCACCCGTGTCCATTTAGCG TAATCTGGAACATCGTATGGGTACA TGGTGGCG	84
HA/SP3-E	MYPYDVPDYASAVTTVVNPKKEEGK	AATTCGCCACCATGTACCCATACGA TGTTCCAGATTACGCTAGTGCCGTA ACAACGTGGTCAATCCGAAGGAAG AGGGAAAATGAG	87
		GATCCTCATTTTCCCTCTTCCTTCGG ATTGACCACAGTTGTTACGGCACTA GCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT ACATGGTGGCG	87
HA/SP3-F	MYPYDVPDYASAVTTVVNPKFEGK	AATTCGCCACCATGTACCCATACGA TGTTCCAGATTACGCTAGTGCCGTA ACAACGTGGTCAATCCGAAGTTG AGGGAAAATGAG	87
		GATCCTCATTTTCCCTCAAACCTTCGG ATTGACCACAGTTGTTACGGCACTA GCGTAATCTGGAACATCGTATGGGT ACATGGTGGCG	87

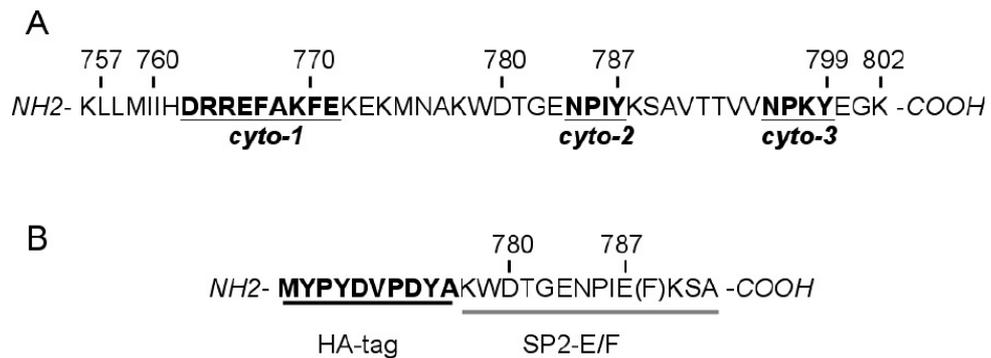


Abbildung 6. Zytoplasmatische Domänen der β 1-Integrin Untereinheit und inhibitorische Peptidsequenzen.

A) Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Region von β 1-Integrin, die an der Bindung von Adapterproteinen wie Talin, FAK, ICAP-1 und Filamin (Tanentzapf und Nicholas, 2006; Calderwood et al., 2004) beteiligt ist, inklusive der drei zytoplasmatischen Domänen cyto-1, cyto-2 und cyto-3. B) Aminosäuresequenz der dominant-negativen Peptids SP2-E/F mit HA-tag. Durch transiente Transfektion mit pIRES2-Vektor wurde SP2-E/F, welches das konservierte membran-proximale NPIY-Motiv cyto-2 umfasst (SP3 Domäne, AS 778-790; Schaller et al., 1995; Otey et al., 1993) in die MV3-Zellen eingebracht. HA; Hämaggglutinin, E; Glutamat, F; Phenylalanin.

Die transiente Transfektion der MV3-Zellen mit unterschiedlichen Plasmiden (pIRES2-EGFP, PGL) wurde quantitativ mit unterschiedlichen Transfektionsmethoden (Lipofectamin, Rotifect, Fugene, Superfect) getestet. Die Transfektion mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen) zeigte bessere Transfektionsraten als andere Methoden. Zwei Tage nach der Transfektion mit Lipofectamin wurde eine Population von 8 bis 10% an GFP-positiven Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und durchflusszytometrisch bestimmt.

2.20.5. Hybridisierung einzelsträngiger cDNA

Einzelsträngige Oligonukleotide (ss) (Tab. 1) wurden mit ihrem komplementären Oligonukleotid zur Bildung doppelsträngiger (ds) DNA hybridisiert.

Bei der Hybridisierung wurden je 100 pmol von ss cDNA und dem komplementären Strang auf 94°C erhitzt. Die Einzelstränge lagerten sich mit ihrem komplementären Strang (6 Std., 37°C) zusammen. Die doppelsträngige cDNA wurde als Insert für Klonierung in den pIRES2-EGFP Vektor eingesetzt.

2.20.6. Kinasebehandlung des Inserts

Nach der Hybridisierungsreaktion der Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA wurde eine Behandlung mit dem Enzym T4-Polynukleotidkinase (Fermentas) (5U/10 μ l Ansatz) bei 37°C für 30 min durchgeführt. Die sog. Kinasierung-Reaktion ist notwendig, um die 5'-Enden der

Fragmente zu phosphorylieren. Anschließend wurde das Enzym bei 65°C für 20 min durch Hitze inaktiviert.

2.20.7. Klonierung des Inserts in pIRES2-EGFP Vektor

Die Ligation ermöglichte das Einbringen von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in einen geeigneten Klonierungs- oder Expressionsvektor. Die Reaktion wurde durch die T4-DNA-Ligase (Fermentas) aus *E. coli* katalysiert. Dieses Enzym fügte stets freie 3'OH-Hydroxylgruppe mit 5'-Phosphatresten von dsDNA-Molekülen unter ATP-Verbrauch zusammen, wobei sowohl kohäsive (sticky) als auch glatte (blunt) Enden miteinander verbunden werden. In dieser Arbeit wurden kohäsive Enden durch Verdau des pIRES2-EGFP-Vektors mit Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI (Fermentas) erzeugt, welche die DNA-Stränge versetzt schneiden. An beiden Enden des Inserts entstanden durch die Sequenz der Oligonukleotide überstehende Enden. Diese Enden sind mit den kohäsiven Enden des Vektors komplementär und lassen sich leicht miteinander ligieren. Der Ligationsansatz wurde über Nacht in einem Wasserbad bei 16°C durchgeführt. Anschließend wurde das gesamte Volumen für eine Transformation eingesetzt.

2.20.8. Herstellung von kompetenten Zellen aus *Escherichia coli*

Um freie DNA aus einer Lösung aufnehmen zu können, müssen sich die Bakterienzellen im sog. Kompetenzzustand befinden. In dieser Arbeit wurden die Zellen von *E. coli* DH5 α durch Behandlung mit eiskalter MgSO₄-Lösung kompetent gemacht (Sambrook und Russell, 2001).

2.20.9. Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Dem Ligationsansatz wurden kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen zugegeben und auf Eis für 30 min inkubiert. Der Ansatz wurde 3 min bei 43°C erwärmt und wieder auf Eis gestellt. Nach 10 min wurde vorgewärmtes Medium ohne Antibiotika zugegeben und bei 37°C unter Schütteln 1 Stunde inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend auf LB-Agarplatten (LB; Luria-Bertani Medium) mit dem entsprechenden Antibiotikum (Kanamycin, Invitrogen) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.20.10. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese eignet sich zur Auftrennung unterschiedlich großer DNA Moleküle sowie PCR-Produkten und Spaltungsprodukten von chromosomaler oder Plasmid-DNA.

2.20.11. Sequenzierung mit dem ABI PRISM Sequenzierungs-Kit

Die PCR erfolgte mit dem Vektor-basierenden Primerpaar UpIRES-523 und LpIRES-843 (MWG Biotech), welches aus einem geschlossenen Leervektor ein PCR-Produkt von 320 bp Länge amplifizieren lässt (Tab. 3), bei Vorhandensein von Inserts entsprechend länger. Als zusätzlicher Nachweis erfolgter Transformation wurden GFP-positive, leuchtende Klone zusätzlich mit PCR auf die Existenz des GFP-Gens untersucht, wobei Primer Ugfp/Lgfp zur Anwendung kamen (Tab. 3). Die folgende Reinigung der PCR-Produkte und das Sequenzieren wurden am Institut für Strahlenkunde der Universität Würzburg unter Verwendung der Sequenzierungsmethode beruhend auf dem Prinzip des Kettenabbruchs durch Dideoxyribonukleotid (ddNTPs) von Sanger et al. (1975) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (ABI PRISM BigDye Terminator Premix, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

Tabelle 4. Primersequenzen eingesetzt für RT-PCR und Sequenzierung, Annealing Temperatur, Zeit und Länge der resultierende PCR-Produkt in Basenpaaren (bp).

Primer	sense (5'-3' Richtung) antisense (5'-3' Richtung)	annealing Temp.(°C)	annealing Zeit (min)	bp	Produktlänge (bp)
Ugfp	GGTGAGCAAGGGCGAGGAG	60	0,5	19	559
Lgfp	GGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTC	60	0,5	22	559
UpIRES-523	AATGGGCGGTAGGCGTGTA	57	0,5	19	373
LpIRES-843	TTGGCGAGAGGGGAAAGAC	57	0,5	19	373

2.20.12. RT-PCR

Die Gesamt-RNA der Zellen aus der Flüssigkultur wurde mit dem RNeasy Kit isoliert (Qiagen). 1 µg der Gesamt-RNA wurde in einer 20 µl Reaktion zu cDNA revers transkribiert (First Strand cDNA Synthesis Kit; Roche Diagnostics), die AMV-Reverse Transkriptase (1000 U/ml), dNTPs (je 1 mM), MgCl₂ (5 mM), Randomprimer p(dN)₆ (80 µg/ml), Gelatine (10 µg/ml), RNase Inhibitor (2500 U/ml) und Reaktionspuffer (10 mM Tris, 50 mM KCl, pH 8,3) enthält. 0,25 µg cDNA wurde durch eine PCR-Reaktion mit bakterieller rekombinanter *Taq* DNA- Polymerase (12,5 U/ml), dNTPs (0,2 mM), MgCl₂ (1,5 mM), sense- and antisense-Primer (je 0,2 µM) (aufgelistet in Tabelle 3), sowie einem Reaktionspuffer (50 mM KCl, 0,08% NP40, 10 mM Tris-HCl, pH 8,8) (Invitrogen) amplifiziert.

PCR-Reaktionen umfassten folgende Schritte: je 30 Zyklen von Denaturierung bei 94°C für 2-3 min, Zusammenlagerung („annealing“) von Primer- und einzelsträngiger DNA bei individueller Temperatur und Zeit (Tabelle 3), Elongation bei 72°C für 1-2 min, und ein abschließender Elongationsschritt (5-10 min). Kontaminationen mit der cDNA wurden durch eine PCR mit dem gesamten Zelllysate (0,25 µg Gesamt-RNA) in Abwesenheit von reverser

Transkriptase ausgeschlossen. Die resultierenden PCR Produkte wurden durch Elektrophorese bei 120 V in einem 2%igen Agarosegel analysiert, mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) gefärbt, fotografiert und eingescannt. Die Spezifität der PCR wurde aufgrund der erwarteten Länge des Produktes, anschließender Sequenzierung und NCBI blastn festgestellt.

2.20.13. Transfektion von MV3-Zellen

Zur Optimierung des Transfektionsverfahrens für das Einbringen des pIRES2-EGFP Vektors in MV3-Zellen wurden verschiedene Reagenzien und Methoden getestet. Für die Transfektion wurden zunächst folgende Methoden eingesetzt: Lipofectin (Invitrogen), Lipofectamin (Gibco BRL), Rotifect (Roth, Karsruhe, Deutschland), Cellfectin (Invitrogen), Lipofectamin 2000 (Invitrogen) DEMRE und Fugene 6 (Roche Dignostics). Wegen der geringen Zytotoxizität und der hohen Transfektionsrate wurde Lipofectamin 2000 letztlich für die Transfektion von MV3-Zellen in RPMI-1640 Medium ohne FCS und Antibiotikum routinemäßig eingesetzt. Die MV3-Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion mit EDTA abgelöst, gewaschen und in einer Zelldichte von $1,2 \times 10^5$ Zellen/Kavität in einer 6-Wellplatte angesetzt. Die Zellen waren am Tag der Transfektion zu 80-90% konfluent. Das optimale Verhältnis zwischen DNA und Lipofectaminreagenz war 1:2. Dabei wurden 2 µg DNA mit 250 µl RPMI Medium gemischt (Lösung I). Die separat angesetzte Lösung II enthielt 4 µl Lipofectamin 2000 in 250 µl RPMI Medium (RT, 5 min). Beide Lösungen (I und II) wurden miteinander gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Der Komplex aus DNA-Lipofectamin wurde anschließend den Zellen zugegeben und bei 37°C für 24 Stunden unter 5% CO₂ inkubiert. Transfizierte Zellen wurden in frischem Medium zu einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Für die Selektion der transfizierten Zellen wurde 600 µg/ml Genetizin (G418 Sulfat, Invitrogen) ins Medium gegeben.

2.20.14. Limiting Dilution Analyse (LDA)

Für die klonale Expansion der stabil transfizierten MV3-Zellen wurde das Limiting Dilution Verfahren eingesetzt. Durch wiederholte Vereinzelung per Verdünnung entstanden Kulturen, die aus einer einzigen Zelle hervorgegangen waren (sog. Klone). Liegt die gewünschte Spezifität (GFP) vor, so wurden diese Klone selektiert und expandiert. Dafür war eine 10-14 tägige *in vitro* Expansion der Zellen notwendig. Die transfizierten MV3-Zellen wurden mit Stimulatorzellen (bestrahlte MV3-Zellen) in Konzentrationen von 0,3-100 Zellen/Kavität in 96-Wellplatten pipettiert. Die bestrahlten MV3-Zellen waren nicht teilungsfähig und stimulierten die transfizierten Zellen, indem sie ihre Zytokin produzierten und in den Überstand freisetzen. Die Reaktivität der ausgewachsenen Zellklone wurde mit dem Floureszenzmikroskop untersucht. So wurden nur Klone berücksichtigt, die GFP exprimierten

und zusätzlich ein Langzeit-Wachstumspotenzial in Anwesenheit von G418 aufweisen (Coulie et al., 1992).

2.21. Antagonistische Peptide

Folgende synthetisch hergestellten Peptide mit einer Reinheit von 95% (Advanced Chem Tech, Louisville, KY, USA) wurden für Migrationsexperimente und konfokal-mikroskopische Darstellung eingesetzt:

1. **Antennapedia-Pro50:** Biotinyl-Ahx-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Pro-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-NH₂
2. **SP2-Phe:** Biothiny-Ahx-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Pro-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Lys-Trp-Asp-Thr-Gly-Glu-Asn-Pro-Ile-Tyr (phosphoryliert)-Lys-Ser-Ala-NH₂ (30 Aminosäure)
3. **SP2-pTyr:** Biothiny-Ahx-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Pro-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Lys-Trp-Asp-Thr-Gly-Glu-Asn-Pro-Ile-Phe-Lys-Ser-Ala-NH₂ (30 Aminosäure)
4. **SP3-pTyr:** Biotinyl-Ahx-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Pro-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Thr-Val-Val-Asn-Pro-Lys-Tyr(phosphoryliert)-Glu-Gly-Lys-NH₂ (31 Aminosäure)
5. **SP3-Phe:** Biotinyl-Ahx-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Pro-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Thr-Val-Val-Asn-Pro-Lys-Phe-Glu-Gly-Lys-NH₂ (31 Aminosäure).

Wegen der toxischen Wirkung oder der undeutlichen Effekten wurde eine weitere Verwendung ausgeschlossen.

2.22. 3D-Konformation von β 1-Integrin zytoplasmatischen Domänen

Die 3D molekulare Struktur und Konformation der antagonistischen Peptiden (HA-SP2-pY, -SP2-F und -SP2-E) in wässriger Umgebung wurde mit dem Programm CS Chem3D (Adept Scientific, Frankfurt, Deutschland) dargestellt. Bei dieser Animation wurde die Konformation der β 3-Integrin zytoplasmatischen Domäne berücksichtigt (Haas et al., 1997).

2.23. *In vitro* Präzipitation

Für die Isolation und Identifizierung von Adapterproteinen durch *in vitro* Präzipitation mit biotinyliertem Antennapedia-Peptiden wurden adhärente Zellen in Flüssigkultur in Anwesenheit von FCS für 24 Stunden kultiviert. MV3-Zellen wurden mit EDTA (2 mM) abgelöst, gezählt und durch Zugabe von NP-40 Lysis-Puffer (1% NP-40; 150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, PH 7,5; 1 mM Na₃VO₄) mit Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail

Tablets, Roche) für 10 min auf Eis lysiert. Zelllysate wurden mit Ultraschall (5x10 sec) behandelt und ihre Konzentration nach der Methode von Bradford bestimmt. Streptavidin-konjugierte Paramagnetbeads (Dynalbeads, $6-7 \times 10^7$ /mg, Invitrogen) wurden mit biotinylierten anti-HA-Antikörpern bzw. biotinylierten Antennapedia-Peptiden bei 4°C für 2 Stunden beladen. Die Magnetbeads wurden mit dem Lysis-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zelllysate (110 µg/Ansatz) zu den Peptid- bzw. Antikörper-Beads gegeben und für 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden mit dem Lysis-Puffer gewaschen, die gebundenen Proteine wurden durch Inkubation in Probenpuffer bei 65°C für 30 min aus den Beads eluiert (Endkonzentration von 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 10% Glycerin; 0,1% Bromphenolblau). Anschließend wurde 5% Mercaptoethanol zur Reduktion der Disulfidbindungen zugegeben. Die eluierten Proben und der Marker für die Silberfärbung (low, high range) wurden mit Probenpuffer versetzt und in 8%- bzw. 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen bei 125 V für ungefähr 100 min nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie- oder Silberfärbung (Amersham, Freiburg, Deutschland) sichtbar gemacht.

2.24. Gelelektrophorese und Westernblot

Für den Nachweis von Adapterproteinen (Talin, FAK) durch Westernblot wurden die Zelllysate wie unter 2.23. beschrieben vorbereitet. Für Westernblot wurde der Kaleidoskop Prestained Marker (Bio-Rad, München, Deutschland) eingesetzt. Die Proben wurden auf dem 8% bzw. 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gel bei 125 V für ungefähr 100 min aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nylonmembran (Amersham) bei 0,5 MA cm² für eine Stunde geblottet. Die Membranen wurden in 3% BSA/TBS-T inkubiert (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 200 mM NaCl; 0,2% Tween 20), um unspezifische Bindungen zu verringern, und mit dem anti-Talin mAk (1 µg/ml) in 3% Rinderserumalbumin (BSA)/TBS-T in 0,5% BSA/TBS-T über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Blots wurden in TBS-T gewaschen und mit Meerrettich Peroxidase-konjugierte anti-Kaninchen Ak (1:15000, 50 ng/ml; Dianova) oder anti-Maus IgG Ak (1:6000; Bio-Rad) in TBS-T, das 3% BSA enthält, bei 20°C für eine Stunde inkubiert. Die Proteinbänder wurden durch eine erhöhte Chemolumineszenz (ECL Kit, Amersham) detektiert.

3. ERGEBNISSE

3.1. Untersuchung zur Rolle des Expressionsniveaus von β 1-Integrinen für die Migration von MV3-Zellen

Publizierte Befunde zur Funktion von β 1-Integrinen für die Invasion und Metastasierung zeigen ein heterogenes Bild mit teils fördernden, teils hemmenden Effekten. Als allgemein anerkanntes Konzept gilt jedoch, dass eine höhere β 1-Integrin Expression positiv mit der Tumorigenese assoziiert ist (Albelda, 1993; Danen et al., 2005). Unsere Versuche zielten darauf hinab, zu erfahren ob diese Befunde auch bei MV3-Zellen zutreffen.

3.1.1. Fluoreszenz Aktivierte Zell-Sortierung (FACS)

Migrierende MV3-Zellen in der Kollagenmatrix stellten sich morphologisch wie auch im Expressionsprofil von β 1-Integrinen als eine heterogene Population heraus. In digitaler Hellfeld-Zeitraffermikroskopie (Film 1) entwickelte die Mehrheit wandernder MV3-Zellen (ca. 80–90%) spontan eine länglich-mesenchymale fibroblastenähnliche Morphologie, während eine Minderheit von 10% eine rundliche Form beibehielt. Um zu testen, ob unterschiedliche β 1-Integrin Expressionsniveaus die rundliche bzw. mesenchymale Morphologie bestimmen, wurden lebende MV3-Zellen nach der Färbung mit einem FITC (Fluorescein Isothiocyanat) markierten anti- β 1-Integrin mAk K20 durch Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS) nach niedrigem bzw. hohem β 1-Integrin Expressionsniveau sortiert (Abb. 7A), für wenige Tage passagiert und auf Effizienz und Art der Migration untersucht. In der Ausgangspopulation schwankte die Oberflächenexpression des β 1-Integrins zwischen 200 und 1000 relativen Fluoreszenzeinheiten, entsprechend einem maximalen Unterschied von Faktor 5. Nach Sortierung betrug der Unterschied zwischen niedriger und hoher Expression ca. 30-40% (Abb. 7A) und die MV3-Zellen mit niedriger bzw. hoher β 1-Integrin Expression hielten über wenigstens drei Passagen (bis 360 Std. in Kultur) ihre unterschiedliche Expression (Abb. 7B) stabil. Nach fünf aufeinanderfolgenden Passagen (Abb. 7B, 560 Std.) näherte sich das Expressionsniveau für β 1-Integrin beider Populationen einander an. Für die folgenden funktionellen Versuche wurden MV3-Zellen nach Sortierung bis zur dritten Passage eingesetzt.

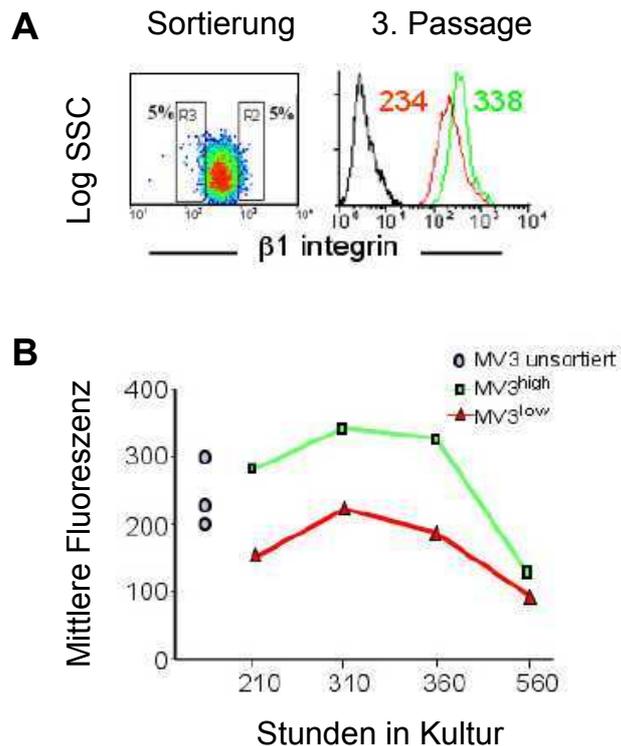


Abbildung 7. β 1-Integrin Expression auf MV3-Zellen vor und nach FACS-Sortierung (A) und im Verlauf mehrerer Passagen (B)

(A) Zellen wurden mit FITC markiertem anti- β 1-Integrin mAk K20 gefärbt. Populationen mit spontan niedrigem oder hohem β 1-Integrin Expressionsniveau (jeweils 5% Populationsanteil) wurden sortiert, auf unterschiedliche Expression untersucht und getrennt für 24 Std. kultiviert. Nach unterschiedlicher Kulturdauer wurden die Zellen mit EDTA geerntet, erneut mit mAk K20 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Inkubation mit FITC-markiertem Maus-IgG1 diente als Isotypkontrolle (schwarze Linie) (B) Die mittlere Fluoreszenzintensität nicht sortierter MV3-Zellen (unsortiert, MV3^{high}, MV3^{low}) ist vergleichend dargestellt (einer von drei durchgeführten Versuchen).

3.1.2. Unveränderte Migrationgeschwindigkeit und Pfadlänge in MV3-Zellen mit unterschiedlicher β 1-Integrin Expressionsstufe

β 1-Integrine spielen als Kollagenrezeptoren eine essentielle Rolle bei Zell-Matrix-Interaktionen (Maaser et al., 1999) und wirken sich bei unterschiedlichen Zelltypen auf die Art der Migration aus (Friedl et al., 1998a; Carragher et al., 2006; Zaman et al., 2006). Durch die Sortierung der Zellen mittels FACS sollte geklärt werden, ob der sich spontan entwickelnde mesenchymale Migrationstyp vom endogen vorhandenen β 1-Integrin Expressionsniveau abhängt. Darüber hinaus sollte die Hypothese überprüft werden, ob innerhalb desselben Zelltyps in der Subpopulation mit niedriger β 1-Integrin-Expression (β 1^{low}) sich ein amöboider Migrationstyp nachweisen lässt.

Die mediane Migrationsgeschwindigkeit (Abb. 8A) der β 1^{low} Zellen (0,3 μ m/min) blieb im Vergleich zu den Zellen mit höherem β 1-Integrin Expressionsniveau (β 1^{high}) und zu nicht sortierten Kontrollzellen unverändert.

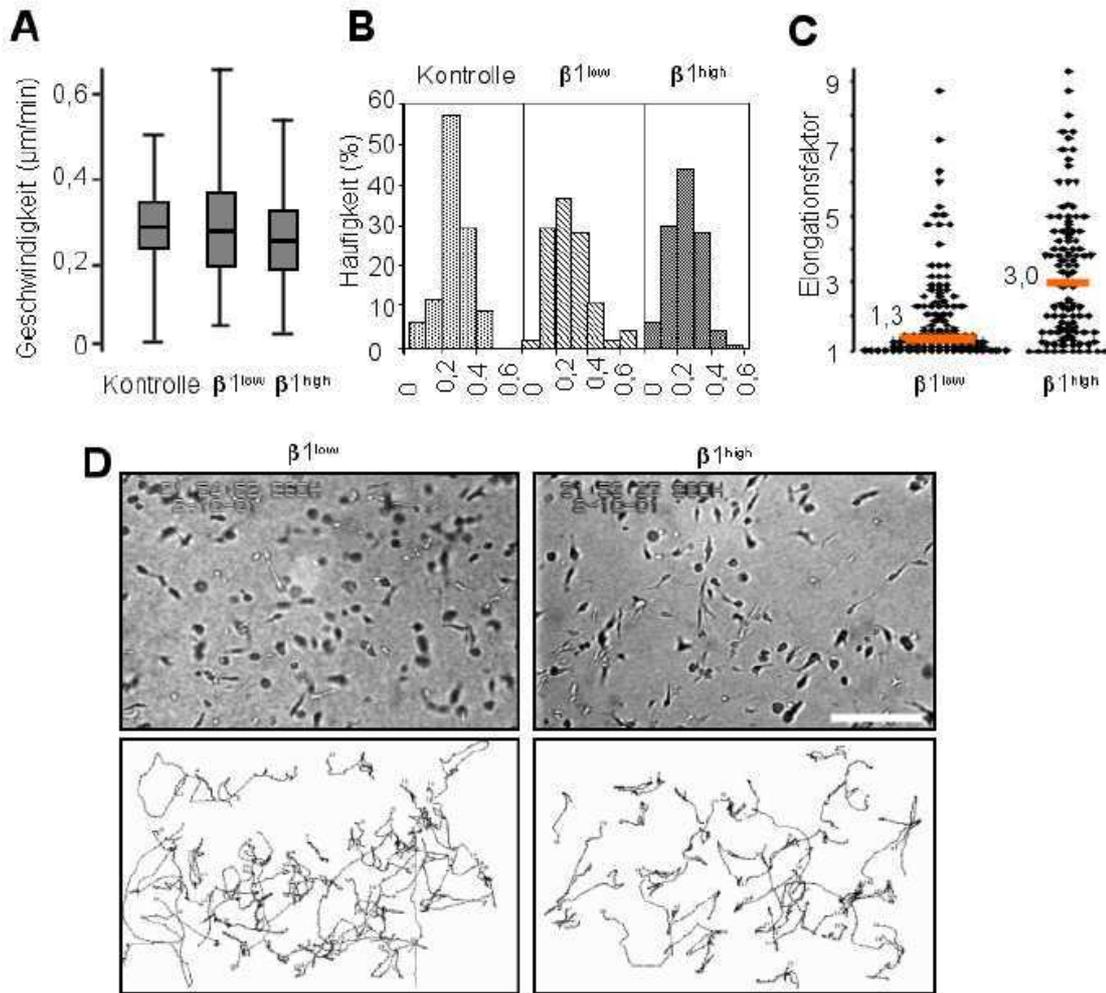


Abbildung 8. Unveränderte Migrationsgeschwindigkeit und Pfadlänge von Zellen mit niedriger $\beta 1$ -Integrinexpression im Kollagenmatrix

$\beta 1^{low}$, $\beta 1^{high}$ und nichtsortierte MV3-Ausgangszellen in 3D-Kollagenmatrix inkorporiert, für 24 Std. mittels Zeitraffermikroskopie gefilmt und durch digitales Zelltracking ausgewertet.

(A) Migrationsgeschwindigkeit der Populationen, (B) Geschwindigkeitsverteilung nach Einzelzellanalyse (C) Abhängigkeit der Zellmorphologie und Polarisierung von der Expression des $\beta 1$ -Integrins. Polarisierter und elongierter Morphologie von $\beta 1^{high}$ mit hoher $\beta 1$ -Integrin Expressionsstufe ($\beta 1^{high}$) im Vergleich zu sphärisch elliptoider Morphologie von $\beta 1^{low}$ während der Migration in 3D-Kollagenmatrix. Die Darstellung erfolgte als Elongationsfaktor (Länge/Breite) nach 10 Stunden. (D) Rekonstruktion der Migrationsspfade von 30 Einzelzellen über 20 Std. ($n = 3$ unabhängige Experimente, 112 Zellen). Der Größenbalken zeigt eine Länge von $50 \mu m$.

Ebenfalls waren die Geschwindigkeitsverteilung, die maximale Geschwindigkeit (Abb. 8B, $0,5 - 0,7 \mu m/min$) sowie die Pfadstruktur (Abb. 8D) in allen Populationen vergleichbar. Diese Daten zeigen, dass die Migrationseffizienz nicht von der endogen variierenden $\beta 1$ -Integrin-Oberflächenexpression abhängt.

3.1.3. Abhängigkeit der Migrationsstrategie (mesenchymal oder amöboid) von der $\beta 1$ -Integrin-Oberflächenexpression

Trotz unveränderter Migrationsgeschwindigkeit zeigten sich deutliche Unterschiede in der Morphologie zwischen $\beta 1^{\text{high}}$ und $\beta 1^{\text{low}}$ MV3-Zellen. MV3-Zellen mit hoher $\beta 1$ -Integrin Expression wiesen während der Migration in Kollagenmatrices elongierte und mesenchymale Zellformen (Abb. 8C, Film 2) auf, vergleichbar mit Mehrheit der Kontrollzellen. Dagegen entwickelten $\beta 1^{\text{low}}$ Zellen überwiegend rundlich-elliptoide Zellformen während der Wanderung (amöboider Phänotyp, Film 3).

3.1.4. Verteilung und Matrixinteraktion des Adhäsionsrezeptors $\beta 1$ -Integrin und des fokalen Adhäsionsmarkers Vinculin in sortierten Zellen

Mittels Konfokalmikroskopie zeigte sich, dass $\beta 1^{\text{high}}$ Zellen längliche Zellform, Fokalisierung von Vinculin und $\beta 1$ -Integrinen an Pseudopodien (Abb. 9a, b), starken Zug und Bündelung von Kollagenfasern entwickelten (Abb. 9c, Pfeilspitzen). Dagegen waren $\beta 1^{\text{low}}$ Zellen überwiegend rundlich und zeigten eine nicht fokalisierte Verteilung von Vinculin und $\beta 1$ -Integrinen (Abb. 9d-f). Somit war die Stringenz der Zell-Matrix-Interaktionen und nachfolgend die elongiert-mesenchymale Zellmorphologie positiv mit dem Expressionsniveau von $\beta 1$ -Integrinen korreliert.

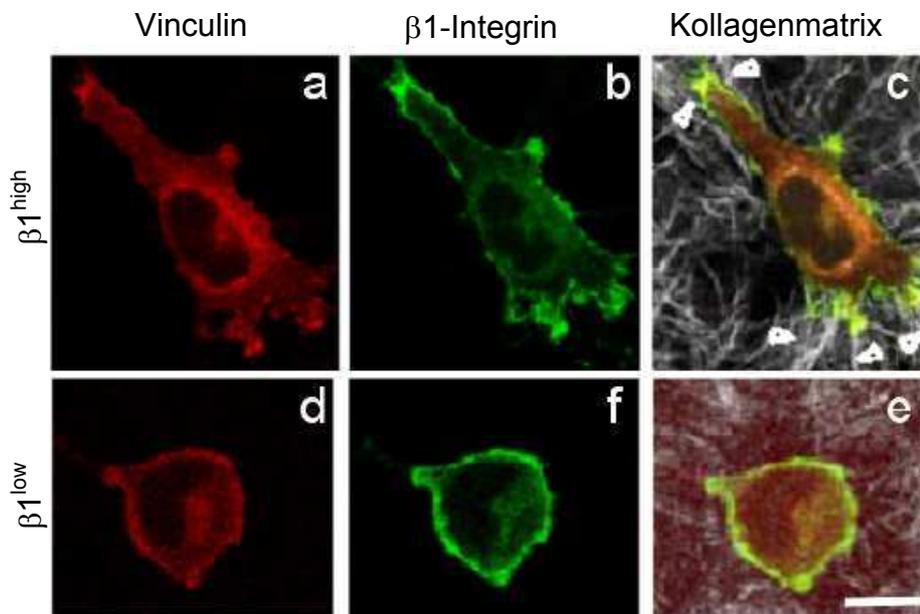


Abbildung 9. Unterschiedliche Fokalisierung von $\beta 1$ -Integrinen und Vinculin an Zell-Matrix-Interaktionen in $\beta 1^{\text{low}}$ und $\beta 1^{\text{high}}$ MV3-Zellen

(a-c) Mesenchymal und elongierte $\beta 1^{\text{high}}$ MV3-Zelle (mesenchymaler Phänotyp) und (d-f) rundliche $\beta 1^{\text{low}}$ Zelle mit kleinem Pseudopod (amöboider Phänotyp). Mittels FACS sortierte Zellen wurden nach max. 3 Passagen in die Kollagenmatrix inkorporiert, nach 6 Std. fixiert und permeabilisiert, und mit FITC konjugierten anti- $\beta 1$ -Integrin mAk K20 und 4B4 sowie anti-Vinculin mAk (Klon VIN-11-5) gefärbt. Pfeile, fokalisierte Zell-Matrix-Interaktionen. Der Größenbalken zeigt eine Länge von 20 μm .

3.1.5. Degradation der Kollagenmatrix

Mesenchymal migrierende Tumorzellen, nicht jedoch amöboid wandernde T-Zellen besitzen die Fähigkeit, während der Migration in 3D-Kollagenmatrix die Kollagenfasern zu reorganisieren und proteolytisch zu degradieren (Wolf et al., 2003a und 2006).

Um zu testen, ob mit verringerter $\beta 1$ -Integrin Oberflächenexpression und Verlust der Fokalisierung von Zell-Matrix-Kontakten auch die proteolytische Aktivität in MV3-Zellen verringert war, wurde die Freisetzung von Kollagenfragmenten anhand der fluorometrischen Fluoreszein-(FITC)-Freisetzung quantitativ untersucht (Wolf et al., 2003a). Nach der Migration in FITC-Kollagenmatrices setzten nicht sortierte MV3-Zellen sowie $\beta 1^{\text{high}}$ Zellen 0,8% des gesamten FITC-Gehalts frei, $\beta 1^{\text{low}}$ Zellen 0,4%, während CD4^+ T-Zellen, wie in Vorbefunden (Wolf et al., 2003b) keine signifikante FITC-Freisetzung oberhalb der Hintergrundfluoreszenz bewirkten (Abb. 10). Sortierte MV3-Zellen mit niedriger $\beta 1$ -Integrin Expression zeigten mit 0,4% FITC-Freisetzung deutlich weniger *in-situ* Kollagenolyse als MV3-Zellen mit höherer $\beta 1$ -Integrin Expression.

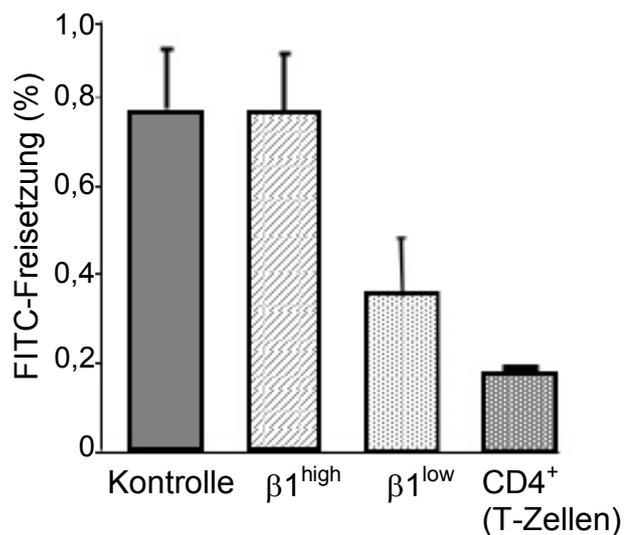


Abbildung 10. Unterschiedliche Freisetzung von Kollagenfragmenten durch $\beta 1^{\text{low}}$ und $\beta 1^{\text{high}}$ MV3-Zellen

Unterschiedliche Kollagenolyse-Aktivität in Abhängigkeit von der $\beta 1$ -Integrin Expression in MV3-Zellen und CD4^+ T-Zellen (Negativkontrolle). Zellen wurden in FITC-markierten Kollagenmatrices inkorporiert. Nach 40 Std. wurden die in den Überstand freigesetzten FITC-Moleküle fluorometrisch gemessen. 100% entspricht dem FITC-Gehalt nach Kollagenase-Verdau zellfreier Matrices, 0% der Hintergrundfluoreszenz zellfreier Matrices nach Zentrifugation. Die Fluoreszenz der T-Zellen wurde in Vorbefunden durch die Kombination von vier Proteaseinhibitoren (Marimastat, Leupeptin, E64, Aprotinin) nicht weiter verringert, so dass von einer geringen unspezifischen Hintergrundfluoreszenz auszugehen ist (Wolf et al., 2003b). Die Daten zeigen die Mittelwerte und Standardabweichung für n= 3 unabhängige Versuche.

Diese intrinsischen Unterschiede in MV3-Zellen zeigen, dass bereits in der Ausgangspopulation eine Heterogenität der Oberflächen-Integrinexpression, der Fokalisierung von Zell-Matrix-Kontakten, und der Degradation von Kollagenfasern und des Migrationstypus vorliegt. Während $\beta 1^{\text{high}}$ Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen weiterhin

mesenchymale, proteolytische Migrationsstrategien aufweisen, führt eine niedrige Expression von β 1-Integrinen zur amöboiden und geringer proteolytischen Migration.

3.2. Inhibition der β 1-Integrin vermittelten Adhäsion durch den blockierenden Antikörper 4B4

Die Adhäsion und Migration von Zellen über oder in Kollagen wird von β 1-Integrinen (Palecek et al., 1997; Cukierman et al., 2001; Hood und Cheresch, 2002) vermittelt, insbesondere α 2 β 1-Integrin (Maaser et al., 1999). Die Effizienz der Migration wird insbesondere durch das Expressionsniveau und die Affinität der Rezeptoren, die Substratkonzentration (Palecek et al., 1997) sowie durch die Stärke der Integrin-Zytoskelett-Bindung (Lo et al., 1994) bestimmt. Daher haben wir versucht, β 1-Integrine durch den spezifischen mAk 4B4 zu blockieren.

3.2.1. Darstellung der Effizienz der Absättigung von β 1-Integrin-Epitopen durch mAk 4B4

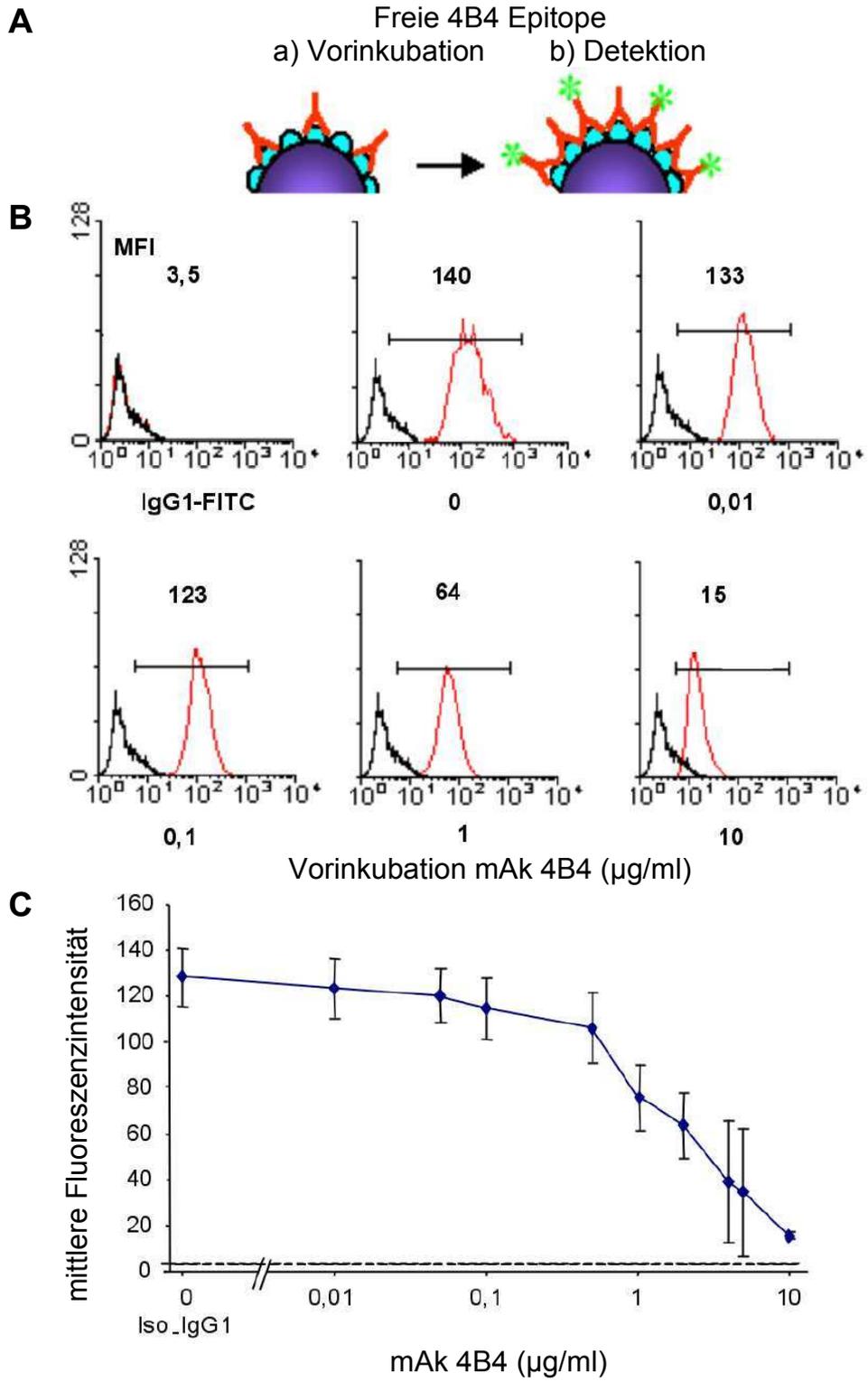
Um die adhäsive Funktion von β 1-Integrinen bei der Wanderung von MV3-Zellen genauer zu untersuchen, wurde der adhäsionsblockierende anti- β 1-Integrin mAk 4B4 eingesetzt. Zur Etablierung der Effizienz der Absättigung von β 1-Integrinen mit mAk 4B4 wurde eine Dosiswirkungskurve für unterschiedliche Konzentrationen an mAk 4B4 erstellt (Abb. 11).

Bei steigender 4B4-Konzentration nahm die detektierbare Fluoreszenz als Indikator der freien Bindungsstellen ab. Verbliebene freie Bindungsstellen auf β 1-Integrinen wurden mittels Durchflusszytometrie anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt (Abb. 11A). Bei niedrigen Konzentrationen des mAk 4B4 (0,01 und 0,1 μ g/ml) betrug die MFI 95 % bzw. 83% des Ausgangswerts unbehandelter Kontrollzellen (Abb. 11B, C).

Bei höheren 4B4-Konzentrationen von 1 und 10 μ g/ml, wie sie auch zur Funktionsblockade eingesetzt werden (Maaser et al., 1999), nahm der Anteil frei verfügbarer Epitope drastisch ab und betrug 38% und 4% (Abb. 11B, C).

Abbildung 11. Reduktion der freien 4B4-Bindungsstellen von β 1-Integrinen nach Vorinkubation von MV3-Zellen mit mAk 4B4

(A) Prinzip der Messung (B) Profile der residuellen 4B4 Bindung (rote Linie) im Vergleich zur Isotypkontrolle (schwarze Linie), MFI: Mittlere Fluoreszenzintensität (C) Dosiswirkungskurve freier 4B4 Epitope in Abhängigkeit von der Vorinkubation mit mAk 4B4. Die Bindung von FITC-markiertem mAk 4B4 auf MV3-Zellen wurde nach Vorinkubation der Zellen mit nicht konjugiertem mAk 4B4 bzw. nicht vorbehandelten MV3-Zellen mittels Durchflusszytometrie detektiert. Zellen wurden zunächst zur Epitopabsättigung mit unkonjugiertem mAk 4B4 inkubiert, gewaschen und anschließend mit FITC-markiertem mAk 4B4 inkubiert. Die Inkubation mit FITC-markiertem Maus-IgG1 diente als Isotypkontrolle (schwarze Linie) (**folgende Seite**).



3.2.2. Reduktion der Migrationgeschwindigkeit und Änderung der Pfadlänge durch die Blockade von $\beta 1$ -Integrinen mit anti- $\beta 1$ -Integrin mAk 4B4

Integrin-medierte Adhäsion ist die Voraussetzung für die Ausstreckung von Pseudopodien entlang von EZM-Substraten, d.h. die Interaktion mit Kollagenfasern und Entwicklung von Zugkraft. Durch die Hemmung der Adhäsion mittels mAk 4B4 wurde untersucht, ob der mesenchymale Migrationstyp von $\beta 1$ -Integrinen abhängt. Dabei sollte auch geklärt werden, ob die Migration der MV3-Zellen vollständig oder nur partiell durch mAk 4B4 hemmbar ist. Mit steigender Konzentration des adhäsionsblockierenden mAk 4B4 nahm die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit der MV3-Zellen ab. Bei Konzentrationen von 1 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ von anti- $\beta 1$ -Integrin mAk 4B4 wurde die Migrationsgeschwindigkeit auf 50% bzw. 60% reduziert, nicht jedoch vollständig gehemmt (Abb. 12A). Eine residuelle Motilität der Zellen verblieb selbst bei einer Konzentration von 10 oder 40 $\mu\text{g/ml}$ von anti- $\beta 1$ -Integrin mAk 4B4. Die den Daten zugrundeliegenden Migrationspfade wurden durch Zelltracking sichtbar gemacht und zeigten für unbehandelte MV3-Zellen eine geradlinige Struktur (Abb. 12B).

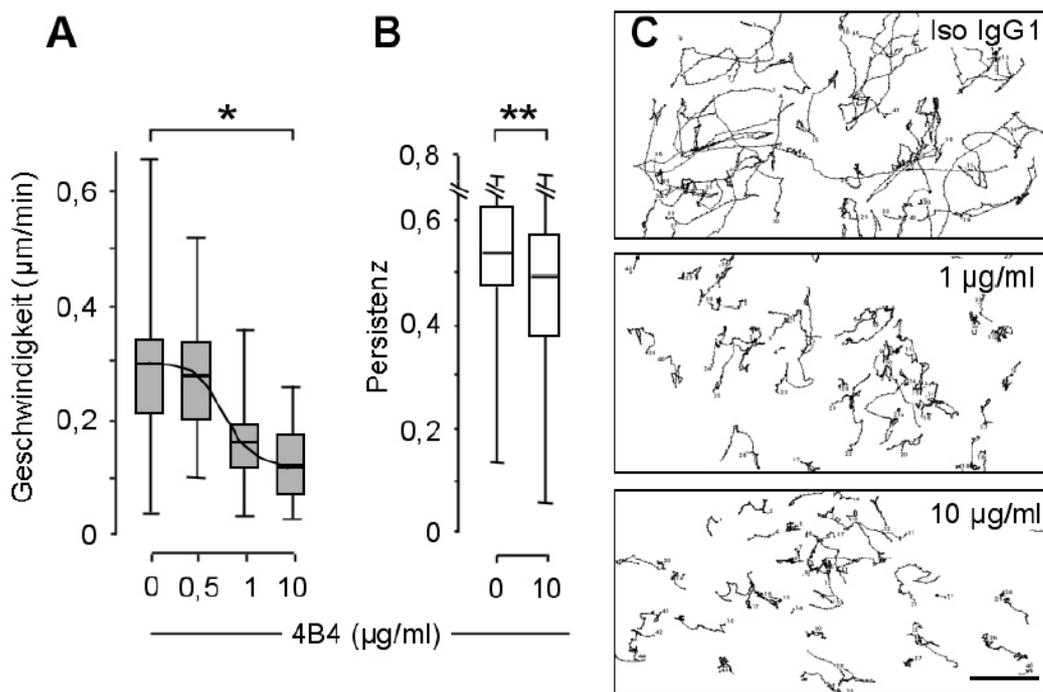


Abbildung 12. Dosisabhängige Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit, Persistenz und Pfadlänge durch anti- $\beta 1$ -Integrin blockierenden mAk 4B4

(A) Durchschnittliche Geschwindigkeit von Einzelzellen, (B) directionale Persistenz von Einzelzellen und (C) orthotope Repräsentation der Migrationspfade. MV3-Zellen wurden im Kollagengel eingebettet, in An- oder Abwesenheit von anti- $\beta 1$ -Integrin mAk 4B4. Die Migration wurde durch Zeitraffermikroskopie über 18 Std. beobachtet und mittels Zelltracking quantifiziert. ($n = 3$ unabhängige Experimente, 120 Zellen). Um zytotoxische Effekte auszuschließen, wurde nach jedem Migrationsexperiment die Viabilität der Zellen mittels Propidiumiodid Färbung durchflusszytometrisch kontrolliert, $P = 0,0001$ (*); $P = 0,0046$ (**). Die Größenbalken zeigt eine Länge von 50 μm .

Mit anti- β 1-Integrin mAk 4B4 behandelte Zellen entwickelten dosisabhängig kürzere und stärker gewundene Pfadstrukturen. Zwar war die Fläche des durchwanderten Gewebes deutlich reduziert, jedoch lässt sich selbst bei 10 μ g/ml (Abb. 12B) oder 40 μ g/ml mAk 4B4 (nicht gezeigt) eine deutliche Restmotilität der Zellen erkennen.

3.2.3. Übergang von mesenchymaler zu amöboider Migrationsform

Die Zugabe des Adhäsion-blockierenden anti- β 1-Integrin mAk 4B4 reduzierte nicht nur die Migrationsaktivität, sondern änderte auch deutlich Zellform und Art der Migration von MV3-Zellen, wie sich durch Analyse der Zeitraffermikroskopischen Bilder zeigte (Abb. 12A, Film 4) Während spontan migrierende MV3-Zellen eine spindelförmige, längliche Morphologie entwickelten und aufrechterhielten, führte die Adhäsionsblockade zu einer weniger polarisierten, elliptoiden Zellform während der Wanderung. Diese rundliche Zellform hielten 85% der Zellen während der Migration bei (Abb. 12, Film 4), erkennbar an einer signifikanten Reduktion des Elongationsfaktors (Länge/Breite) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 13A). In Anwesenheit von mAk 4B4 zeigten die rundlich wandernden, elliptoiden Zellen eine flexible Formänderung und Vorwärtsantrieb, die durch multiples Vorwärtsstrecken von kleinen Filopodien erfolgte (Film 5). Dagegen zeigten mesenchymal wandernde Kontrollzellen eine polarisierte Zellform, die wandernden Fibroblasten ähnelt, mit einem oder mehreren Pseudopodien an der Vorderfront (Abb. 13A).

Zusammengefasst führte die Anwesenheit des anti- β 1-Integrin mAk 4B4 zu einer Verringerung mesenchymal wandernder Zellen, während der Anteil des rundlichen, amöboiden Phänotyps zunahm (Abb. 13B). Dieser neue Phänotyp migrierte trotz 90-95%-iger Reduktion freier β 1-Integrin Rezeptoren auf der Zelloberfläche und entsprach in Zellform und Migrationstyp den Eigenschaften der Amöbe *Dictyostelium discoideum* (Killich et al., 1993; Yumura et al., 1984) siehe Film 6, von <http://www.dicty.cmb.nwu.edu>). Eine ähnliche, rundlich-oszillatorische Migrationsform zeigen auch Leukozyten, während sie mittels β 1-Integrin unabhängiger Mechanismen durch Lücken der 3D-Kollagenmatrix hindurchwandern (Friedl et al., 1998 c und 2001).

Während die mesenchymale Migrationsform bereits ab einer ca. >50% Reduktion freier 4B4-Epitope (1 μ g/ml mAk 4B4) deutlich abnahm (Abb. 13A), war die Migrationsgeschwindigkeit erst bei einer Konzentration von 10 μ g/ml des mAk 4B4 deutlich verringert. Die niedrige Antikörperkonzentration (1 μ g/ml) induzierte somit eine schnelle amöboide Migration, während eine höhere Antikörperkonzentration (10 bzw. 40 μ g/ml) langsame amöboide Wanderung induzierte.

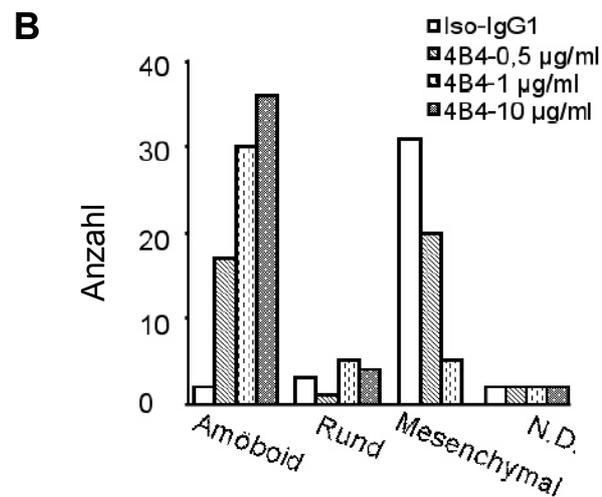
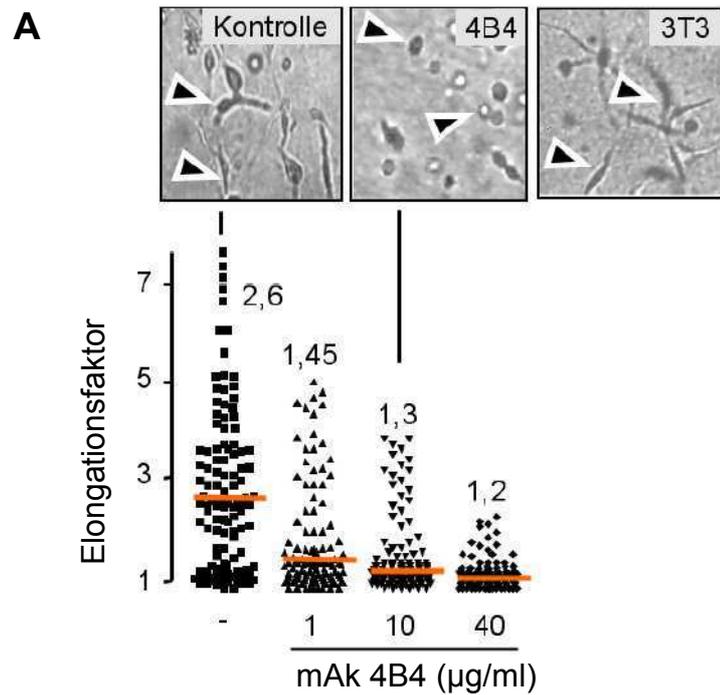


Abbildung 13. Übergang von mesenchymaler, Fibroblasten-ähnlicher Morphologie in elliptoide und amöboide Morphologie nach Inhibition von β 1-Integrinen durch blockierenden mAk 4B4

(A) Zeitraffermikroskopische Darstellung von MV3-Zellen in 3D Kollagenmatrices in Ab- bzw. Anwesenheit von mAk 4B4 nach 8 Std. Kultur. Pfeilspitzen, elongierte Zellen (Kontrolle), rundlich-wandernde Zellen (4B4) sowie elongierte Fibroblasten (3T3) und Elongation von Einzelzellen in An- oder Abwesenheit von anti- β 1-Integrin mAk 4B4 während der Migration in 3D Kollagenmatrices. Die Elongation wurde als Quotient von Länge/Breite für Einzelzellen aus videomikroskopischen Aufnahmen nach 6 Std. Kulturdauer berechnet. (B) Morphologische Analyse der Zellen in Ab- und Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von mAk 4B4 während der Migration in Zeitfenster von 6 Std. ND: nicht definierte Zellformen.

3.2.4. Konfokalmikroskopische Charakterisierung von fokalen Kontakten, β 1-Integrinverteilung und Struktur des Aktinzytoskeletts

Neben der Zellform selbst bestehen zwischen mesenchymalen und amöboiden Zelltypen weitere wesentliche Unterschiede, insbesondere bei der Verteilung und Fokalisierung von Zell-Matrix-Kontakten und des Aktinzytoskeletts (Friedl und Wolf, 2003). Um einen kausalen Zusammenhang zwischen veränderter β 1-Integrinverteilung und Struktur des Aktinzytoskeletts einerseits und unterschiedlicher Morphologie und Pfadstruktur andererseits zu verifizieren, wurden hochauflösende Konfokalmikroskopie und Immunfluoreszenz eingesetzt. Nach Hemmung der β 1-Integrin-vermittelten Adhäsion mit mAk 4B4 wurden die Zellform, Zell-Matrix-Kontakte (Reflexion), Integrin- und F-Aktinverteilung analysiert (Abb. 14). Phalloidin diente dabei als sensitiver Marker der Aktinfilamente, das an polymerisiertes Aktin bindet (Bubb et al., 1994; Senderowicz et al., 1995).

Mesenchymal wandernde, elongierte MV3-Kontrollzellen zeigten eine deutliche Kolokalisation von F-Aktin und β 1-Integrinen an den Interaktionsstellen mit Kollagenfasern (Abb. 14). Dagegen waren β 1-Integrine und F-Aktin auf der Oberfläche der mit mAk behandelten Zellen diffus verteilt und die Migration dieser Zellen erfolgte ohne starke Interaktionen mit den Kollagenfasern (amöboider Phänotyp).

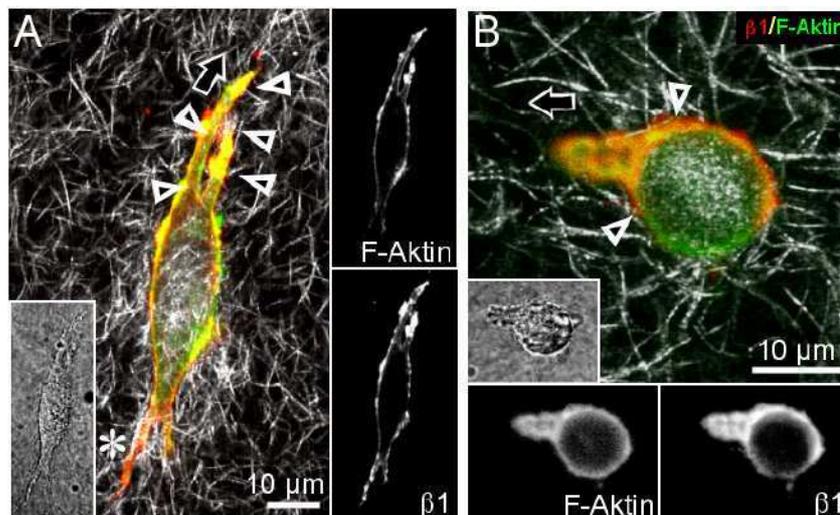


Abbildung 14. Änderung der Verteilung von β 1-Integrinen und der Struktur des filamentösen Aktin-Zytoskeletts (F-Aktin) nach Zugabe von mAk 4B4

(A) Elongierte Kontrollzelle in 3D-Kollagenmatrix mit fokalisiertem β 1-Integrin und F-Aktin an Zell-Matrix-Kontakten (Pfeilspitzen). (B) Rundliche MV3-Zelle mit Pseudopodpolarisierung (Pfeilspitze) ohne fokalierte Zell-Matrix-Kontakte. Zellen wurden mit oder ohne blockierende und unkonjugierte mAk 4B4 im Kollagengel polymerisiert und nach 5 Std. mit PFA fixiert. β 1-Integrine wurden mit anti- β 1-Integrin mAks 4B4 und K20 und sekundären CY3-markierten Antikörper (rot), F-Aktin mit FITC-Phalloidin (grün) gefärbt. β 1-Integrine akkumulierten an Zell-Matrix-Kontakten und kolokalisierten mit F-Aktin (links, Pfeilspitzen) in Kontrollzellen, während mAk 4B4 eine diffuse Verteilung induzierte. Pfeile, Migrationsrichtung, (*) Retraktionsfasern am Hinterende der Zelle.

3.2.5. Quantitative Analyse der Fokalisierung von β 1-Integrin und F-Aktin

Die Verteilung des β 1-Integrins und die Struktur des Aktinzytoskeletts wandernder MV3-Zellen in 3D-Kollagenmatrices war fluoreszenzoptisch gut darstellbar. MV3-Zellen wandern mit Hilfe von β 1-Integrinen, die sich an Kontaktstellen mit Kollagenfasern zusammenlagern. Der proteolytische Abbau der Matrix erleichtert deren Zellmigration durch die dreidimensionale Umgebung (Friedl und Wolf, 2003). Dabei bilden MV3-Zellen eine elongierte, spindelförmige Zellform aus. Sie zeigen laterale fokale Interaktionen und ein starkes kortikales Aktinzytoskelett an diesen Regionen. An der Spitze des führenden Pseudopods, die als definierte Vorderfront diente und im Kontakt mit den Kollagenfasern der extrazellulären Umgebung stand, kam es zu einer Integrin-Anreicherung und Anhäufung von polymerisiertem F-Aktin mit einer relativen hohen Fluoreszenzintensität gegenüber des restlichen Zellkörpers (Abb. 15A). Die Inhibition der Integrine durch blockierenden mAk 4B4 führte zu einer rundlichen Zellform mit einer diffusen Verteilung der F-Aktin und β 1-Integrinen auf der Zelloberfläche (Abb. 15B).

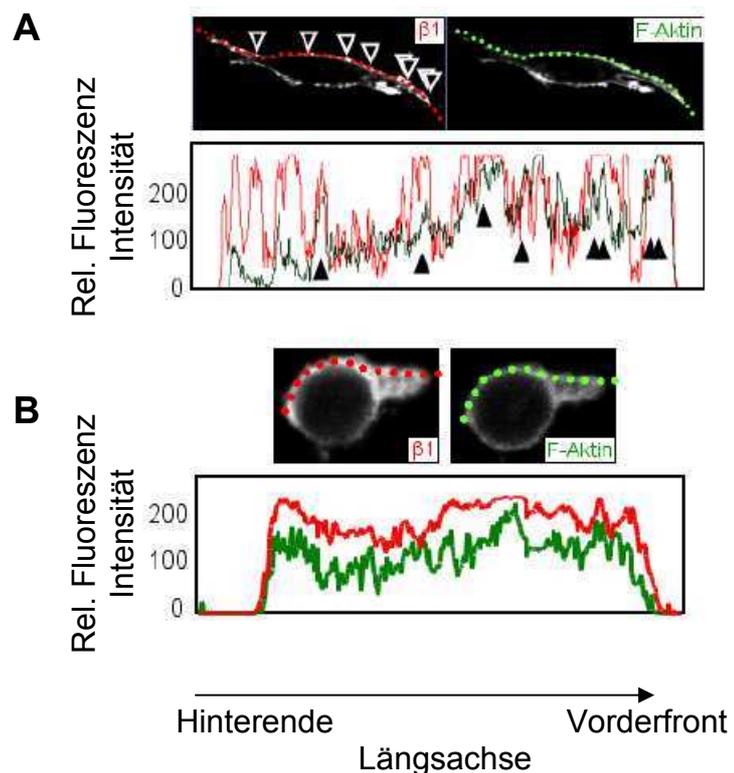


Abbildung 15. Semiquantitative Analyse der Fokalisierung von β 1-Integrin und F-Aktin in mesenchymalen und amöboiden MV3-Zellen

(A) Photographische Darstellung der Kolo-kalisation der Signale von β 1-Integrin (links oben) und F-Aktin (rechts oben) in fokalen Clustern entlang der Längsachse (unten als Graph) einer migrierenden Zelle mit elongierter Zellmorphologie. (B) Diffuse Verteilung auf rundlicher Zelle in Anwesenheit von mAk 4B4 (10 μ g/ml). Die relative Fluoreszenzintensität der beiden Kanäle wurde entlang der Linien (auf Bilder) mittels ImageJ Software quantifiziert. Die Pfeilspitzen in (A) zeigen Regionen mit starker Kolo-kalisation der Signale von β 1-Integrin und F-Aktin. Pfeil: führender Pseudopod.

3.2.6. Kontraktion der Kollagenmatrix

Bei MV3-Zellen wurde eine starke Interaktion zwischen $\beta 1$ -Integrinen und Kollagenfasern beobachtet. Die Zellen stülpen Pseudopodien aus und ziehen stark an den Kollagenfasern. Diese starke Kraftentfaltung führte zur Matrixkontraktion und zum Zusammenschrumpfen der Kollagengele. Durch Messung der Gelgröße in An- oder Abwesenheit von $\beta 1$ -Integrinen wurde festgestellt, wie stark die Zugkraft durch $\beta 1$ -Integrine beeinflusst wurde. Die Kontraktion frei flottierender Kollagengele durch MV3-Zellen wurde in Ab- und Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von mAk 4B4 über 24 Stunden untersucht. Mit steigender Konzentration des blockierenden mAk 4B4 nahm die Zellkontraktilität im unverankerten Kollagengel ab, was zu einer verringerten Kontraktion der Kollagenmatrices führte. Bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ mAk 4B4 war die Kontraktion vollständig gehemmt, verglichen mit der zellfreien Kontrollmatrix. Die Dosiswirkungskurve, welche die unterschiedlich starke Hemmung der Kollagenkontraktion durch verschiedenen hohe Konzentrationen von mAk 4B4 aufzeigt, verlief parallel der Reduktion der mesenchymalen Zellform und des Auftretens des amöboiden Phänotyps (Abb. 16, orange Linie).

Eine Erhöhung der Konzentration von mAk 4B4 auf 40 $\mu\text{g/ml}$ zeigte keinen Unterschied zu 10 $\mu\text{g/ml}$. Zusammengefasst zeigen die Befunde der zunehmenden amöboiden Migrationsform, des Verlusts der fokalisiert Zell-Matrix-Kontakte, und die parallele Hemmung der Kollagenkontraktion, dass mAk 4B4 über verringerte Adhäsion der Zellen die Zugkraft hemmt, die für die mesenchymale Elongation notwendig ist.

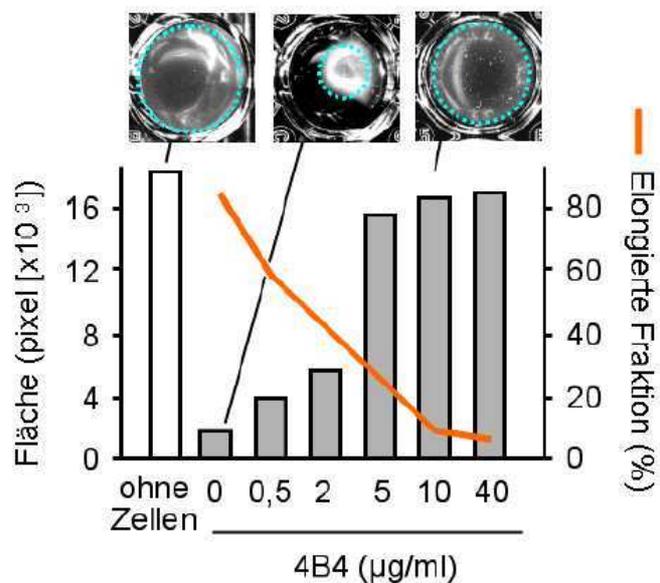


Abbildung 16. Verringerte Kontraktion nicht verankerter Kollagenmatrices durch MV3-Zellen nach Hemmung von $\beta 1$ -Integrinen

Beispiele kontrahierter und nicht kontrahierter Kollagengele in Ab- und Anwesenheit von mAk 4B4, sowie der Quantifizierung der Kontraktion (Balken) und des Anteils amöboider Morphologie in Abwesenheit von mAk 4B4. MV3-Zellen wurden in nicht verankerten 3D Kollagenmatrices in An- bzw. Abwesenheit unterschiedlicher Konzentration von mAk 4B4 über 20 Std. kultiviert. Als Negativkontrolle diente eine zellfreie Kollagenmatrix. Die Fläche der Matrix wurde mittels digitaler Bildanalyse in Pixeln gemessen (Kreise).

3.3. Inhibition der β 1-Integrin medierten Adhäsion durch den α 2 β 1-Integrin Inhibitor Rhodocetin

Ein spezifischer Inhibitor wurde eingesetzt, um die Funktion von α 2 β 1-Integrin als heterodimeren Adhäsionsrezeptor bei der Wanderung von MV3-Zellen und HT1080-Fibrosarkomzellen zu untersuchen. Dazu sollte geklärt werden, ob der mesenchymale Migrationstyp von α 2 β 1-Integrin abhängt und ob die Migration der MV3-Zellen vollständig oder nur partiell blockierbar ist. Die Auswahl von Rhodocetin als Inhibitor erfolgte wegen bestimmter Eigenschaften: 1) es definiert das spezifische Integrin (α 2 β 1-Integrin) innerhalb der β 1-Integrine und 2) anders als Antikörper dimerisiert es β 1-Integrine auf lebende Zellen nicht, und somit werden keine unerwünschten Signalwege induziert.

3.3.1. Partielle Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit und Änderung der Pfadlänge durch die Hemmung von α 2 β 1-Integrinen mit Rhodocetin

Die α 2 β 1-Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Interaktion ist ein wichtiger Schritt für die Elongation von Pseudopodien entlang von EZM Substraten und für die Entwicklung von Zugkraft (Maaser et al., 1999).

Die Wirkung des Rhodocetin auf die Motilität der MV3-Zellen in der 3D-Kollagenmatrix ist in Abb. 17A dargestellt. Die mediane Migrationsgeschwindigkeit der MV3-Kontrollzellen betrug 0,3 μ m/min, wobei die maximale Geschwindigkeit einiger Zellen 0,6 μ m/min erreichte. Bei einer Rhodocetin-Konzentration von 100 nM wurde die mediane Migrationsgeschwindigkeit der MV3-Zellen um 50% des Ausgangswertes reduziert, nicht jedoch vollständig blockiert.

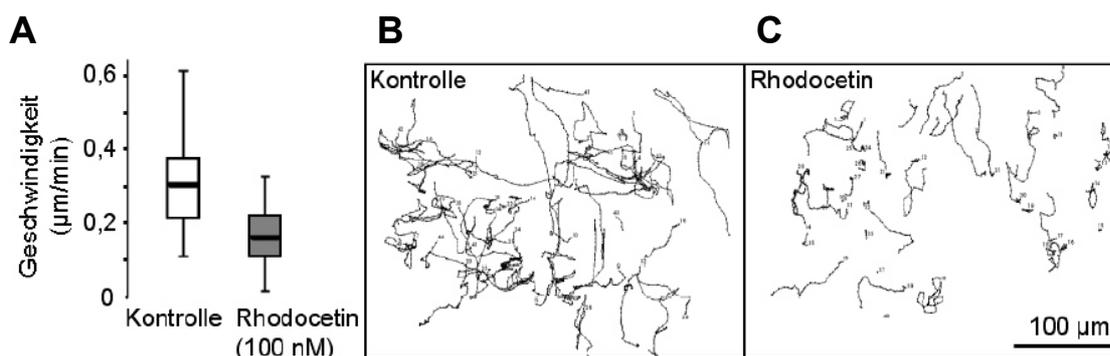


Abbildung 17. Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit und Pfadlänge durch Rhodocetin

(A) Populationsgeschwindigkeit von Einzelzellen und (B, C) orthotope Repräsentation der Migrationspfade. MV3-Zellen wurden im Kollagengel in An- oder Abwesenheit von Rhodocetin kopolymerisiert. Die Migration wurde durch Zeitraffermikroskop über 20 Std. beobachtet und mittels Zelltracking quantifiziert, ($n=3$ unabhängige Experimente, 110 Zellen). Um zytotoxische Effekte von Rhodocetin auszuschließen, wurde nach dem Migrationsexperiment die Zellviabilität mittels Propidiumiodid Färbung durchflusszytometrisch kontrolliert und zeigte keinen Anhalt für Zytotoxizität.

Die maximale Geschwindigkeit einiger Zellen betrug 0,3 $\mu\text{m}/\text{min}$, welche der medianen Geschwindigkeit der Kontrollzellen entsprach. Eine Restmotilität der Zellen wurde in Anwesenheit von Rhodocetin beobachtet (Abb. 17A, Film 7). Diese Daten zeigten, dass Rhodocetin die $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-vermittelte Migration in einer dosisabhängigen Weise reduzierte. Die Persistenz der Wanderungspfade zeigte für unbehandelte MV3-Zellen eine gradlinige Struktur, während mit Rhodocetin (100 nM) behandelte Zellen (dosisabhängig) kürzere und teils stärker gewundene Pfadstrukturen entwickelten (Abb. 17B, C). Obwohl die Fläche des durchwanderten Gewebes deutlich reduziert war, wies die Analyse der Pfadlänge eine deutliche restmigratorische Aktivität der Zellen auf.

3.3.2. Übergang von mesenchymaler zu amöboider Migrationstyp mittels Rhodocetin

Neben der Reduktion der Migrationsaktivität in Anwesenheit von Rhodocetin wurde auch die Zellform und die Art der Migration von MV3-Zellen geändert, wie sich durch Analyse der zeitraffermikroskopischen Bilder zeigte (Abb. 18A, B, Film 7). Während spontan migrierende MV3-Kontrollzellen eine polarisierte und spindelförmige Morphologie entwickelten und aufrechterhielten, führte die antagonistische Wirkung des Rhodocetins auf $\alpha 2\beta 1$ -Integrin zur Entwicklung einer rundlichen und elliptoiden Zellform. Somit führte Rhodocetin, ähnlich wie mAk 4B4, zu einem Übergang vom mesenchymalen zu einem amöboiden Migrationstyp in MV3-Melanomzellen. Dabei entwickelten sich weniger ausgeprägte und wesentlich kürzere schnell oszillierende Pseudopodien an der Vorderfront der Zelle. Der induzierte amöboide Zelltyp konnte sich durch hohe Formanpassung fortbewegen, erkennbar an fokalen Einschnürungen des Zellkörpers (Kompressionsringe) (Film 5). Der Übergang von mesenchymaler (Abb. 18A) zu elliptoider Zellform (Abb. 18B) war hier den MV3-Zellen nach der Hemmung von $\beta 1$ -Integrinen durch mAk 4B4 sehr ähnlich (siehe Abschnitt 3.2.3), begleitet von einer deutlichen Reduktion des Elongationsindex (Länge/Breite) der MV3-Zellen. Eine durch Rhodocetin geänderte Migration und Zellform mit Übergang zu amöboider Migration wurde auch in HT1080-Fibrosarkomzellen induziert (nicht gezeigt).

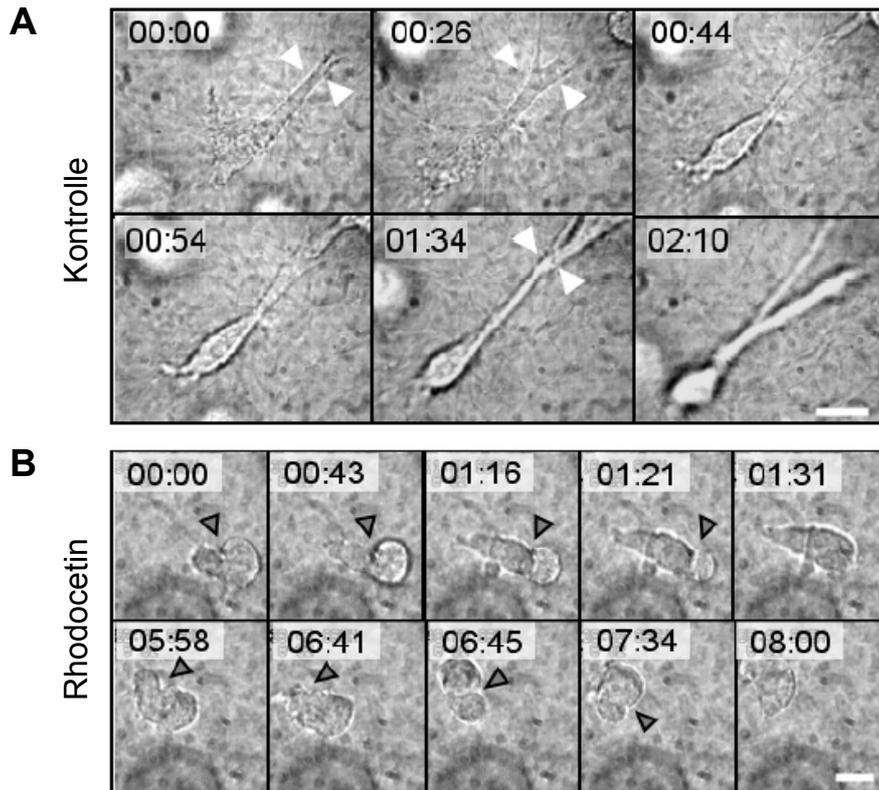


Abbildung 18. Übergang von mesenchymaler, Fibroblasten ähnlicher Morphologie zu elliptoider und amöboider Morphologie nach Inhibition von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin durch Rhodocetin

Hochaufgelöste zeitraffermikroskopische Darstellung von MV3-Zellen in 3D-Kollagenmatrices in Ab-(A) bzw. Anwesenheit (B) von Rhodocetin (100 nM). MV3-Kontrollzelle mit 1-2 dominanten Pseudopodien in Migrationsrichtung (A, weiße Pfeilspitze). Darstellung der amöboiden Migration einer MV3-Zelle durch Kollagenfasern in Anwesenheit von Rhodocetin (B, Pfeilspitzen: Kompressionsringe). Der Größenbalken zeigt eine Länge von 20 μm .

3.3.3. Konfokalmikroskopische Charakterisierung von fokalen Kontakten, $\beta 1$ -Integrinverteilung und Struktur des Aktinzytoskeletts in Anwesenheit von Rhodocetin

Die konfokalmikroskopische Darstellung zeigte die unterschiedlich ausgeprägte Verteilung und Fokalisierung der Zell-Matrix-Kontakte und des Aktinzytoskeletts in mesenchymal bzw. induziert amöboiden Zellen. Der konstitutiv spindelförmige Migrationstyp entwickelte 1-3 dominant lange Pseudopodien von 20-60 μm an der Vorderfront. $\beta 1$ -Integrine lagern sich verstärkt an Kontaktstellen mit den Fasern zusammen, zeigen dabei Anzeichen von Fasertraktion. Außerdem wurden $\beta 1$ -Integrine von wandernden Zellen entlang von Fasern sowie zwischen den Fasern zurückgelassen (Abb. 19A-C). Hingegen waren $\beta 1$ -Integrine auf der Oberfläche der mit Rhodocetin behandelten Zellen diffus verteilt (Abb. 19D-E). Die Darstellung des Aktinzytoskeletts zeigte in beiden Migrationstypen eine kortikale Verteilung, ohne Stressfasern aufzubauen.

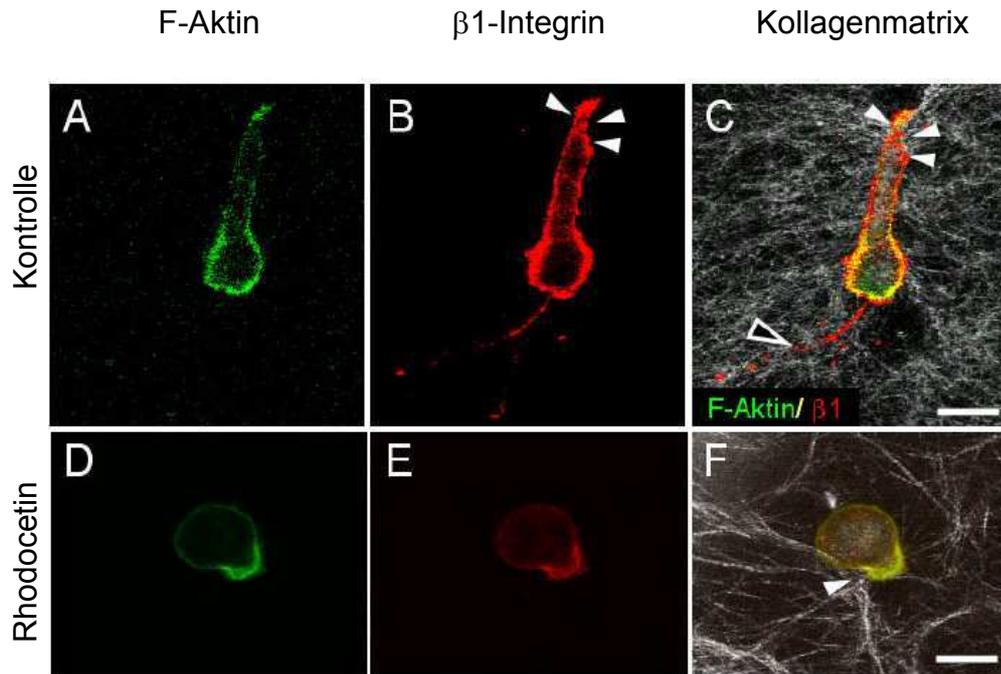


Abbildung 19. Änderung der Verteilung von $\beta 1$ -Integrinen und der Struktur des filamentösen Aktin-Zytoskeletts (F-Aktin) in Ab- und Anwesenheit von Rhodocetin

(A-C) Polarisierte MV3-Kontrollzelle in 3D-Kollagenmatrix mit fokalisiertem $\beta 1$ -Integrin und F-Aktin an Zell-Matrixkontakten. Langgestreckter Pseudopod an der Vorderfront (weiße Pfeilspitzen) und Zug von Kollagenfasern; Freisetzung von $\beta 1$ -Integrinen (Shedding) vom Hinterende der Zelle (schwarze Pfeilspitze). (D-F) Rundliche MV3-Zelle mit einem kleinen Pseudopod (Pfeilspitze) ohne fokalisierte Zell-Matrix-Kontakte. Zellen wurden mit oder ohne Rhodocetin im Kollagengel polymerisiert und nach 5 Std. mit PFA fixiert. $\beta 1$ -Integrine wurden mit anti- $\beta 1$ -Integrin mAk 4B4 und K20 und sekundären CY3-markierten AK (rot), F-Aktin mit FITC-Phalloidin (grün) gefärbt. Diffuse Verteilung von $\beta 1$ -Integrinen mit F-Aktin und kein langer dominanter Pseudopod am Vorderende der Zelle in Anwesenheit von Rhodocetin. Pfeile: Migrationsrichtung, Die Größenbalken zeigt eine Länge von 10 μm .

3.3.4. Rhodocetin hemmt die $\alpha 2\beta 1$ -Integrin vermittelte Kontraktion der Kollagenmatrix

Um zu testen, ob Rhodocetin eine Integrin-vermittelte Kraftentfaltung in Kollagenmatrices inhibieren kann, wurden Kontraktionsassays durchgeführt (Tuckwell et al., 1991; Schiro et al., 1991; Huttenlocher et al., 1995). Rhodocetin antagonisierte die $\alpha 2\beta 1$ -Integrin vermittelte Kraftübertragung auf mechanisch entspannten Kollagengelen. In Rhodocetin-freien Kulturen konnten die MV3-Zellen innerhalb 24 Stunden die Kollagengele bis auf ein Drittel ihrer ursprünglichen Größe kontrahieren (Abb. 20). Bei zunehmenden Konzentrationen von Rhodocetin wurde die Kontraktion der Kollagenmatrices dosisabhängig verringert. Bei einer Konzentration von 100 nM und 200 nM betrug die Fläche des kontrahierten Matrices 77% bzw. 90% des Ausgangswertes ohne Zellen, wie bei subtotaler Hemmung bekannt ist. Somit ist $\alpha 2\beta 1$ -Integrin nahezu allein für die Kontraktion der Kollagenmatrices verantwortlich.

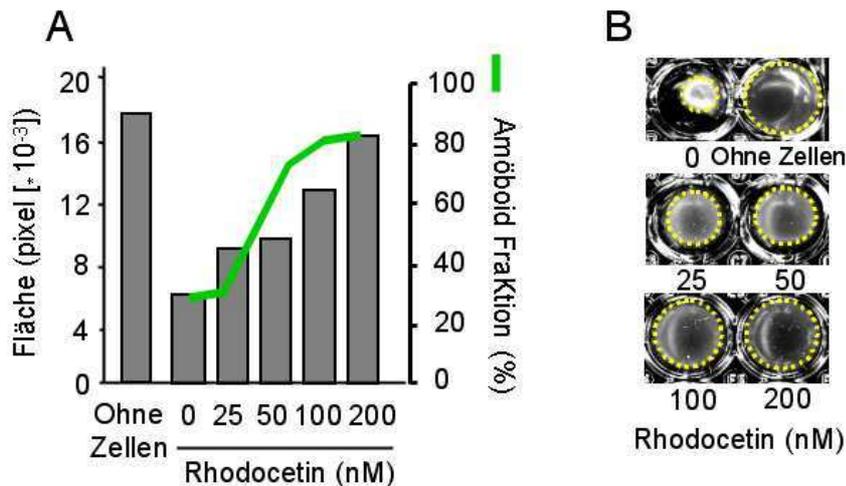


Abbildung 20. Subtotale Hemmung der $\alpha\beta 1$ -Integrin-vermittelten Kollagenkontraktion durch Rhodocetin (A) Analyse der Gelfläche des Matrices (B) Kontraktionsassay. In den Kulturschalen wurden MV3-Zellen in nicht befestigte Kollagenmatrices in Ab- bzw. Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Rhodocetin über 20 Std. kultiviert. Die Gelfläche wurde mittels digitaler Bildanalyse (Kreis) in Pixeln errechnet und mit der Ausgangsfläche der Kontrolle (ohne Zellen) verglichen. Daten aus 3 repräsentativen Experimenten ($n=3$). Als Kontrollen dienten zellhaltiges Kollagengel für maximale Kontraktion sowie zellfreie Matrices ohne Anhalt für Kontraktion, O.Z. = Ohne Zellen.

Die induzierte amöboide Migration der MV3-Zellen mit Rhodocetin verhielt sich ähnlich wie die nach Adhäsionsblockade mit mAk 4B4 (Abb. 16), und zwar mit deutlich verringerter Kapazität der Kollagenkontraktion. Durch den Einsatz von Rhodocetin konnten die Ergebnisse aus den Blockadestudien mit dem Adhäsion-blockierenden anti- $\beta 1$ -Integrin mAk 4B4, (mAk 4B4 hemmt die Funktion von $\beta 1$ -Integrinen) bestätigt werden.

3.4. Expression von dominant-negativen Peptiden zur konstitutiven Inhibition der $\beta 1$ -Integrin zytoplasmatischen Domäne

Die biologische Funktion von Integrinen als transmembrane Rezeptoren ist abhängig von der Anwesenheit und Funktion ihrer zytoplasmatischen Domänen. Um deshalb die $\beta 1$ -Integrinfunktion auch intrazellulär zu untersuchen, wurde versucht die Bindung der $\beta 1$ -Integrin zytoplasmatischen Domäne ($\beta 1_{\text{cyt}}$) an Adapterproteine kompetitiv zu unterbinden. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Strategien eingesetzt: (1) die Zugabe von synthetischen, die Zelle permeierenden Peptiden, die bestimmte Regionen der zytoplasmatischen Domäne gekoppelt an eine Penetratin-Sequenz beinhalten, sowie (2) die Expression von $\beta 1_{\text{cyt}}$ -Domänen nach Zelltransfektion. Die Zugabe von synthetischen, Penetratin-gekoppelten Peptiden führte neben der Verringerung der Migrationseffizienz stets auch zum Zelltod wegen toxischer Effekte. Deshalb wurde stattdessen für funktionelle Untersuchungen die transiente Expression in Kombination mit EGFP als Strategie eingesetzt.

3.4.1. Vektorgenerierung und Expression dominant-negativer β 1cyt-Peptide

GFP-positive MV3-Zellen wurden in Flüssigkultur mittels limitierender Verdünnung in Anwesenheit bestrahlter MV3-Feederzellen und Neomycin (G418) klonal selektiert und expandiert. Zwei bis drei Wochen nach der Transfektion wurden GFP-positive Klone fluoreszenzmikroskopisch identifiziert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 21A) und die Viabilität mittels Propidiumiodid nachgewiesen (Abb. 21B). Die Klone mit höchster GFP-Expression wurden durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) nach ihrem GFP-Expressionsniveau (niedrig, mittel, hoch) sortiert. Die Transfektion mit SP2-F bzw. HA-SP2-F hatte gegenüber den Kontrollzellen keinerlei Auswirkung auf Morphologie und Migrationsverhalten der Zellen.

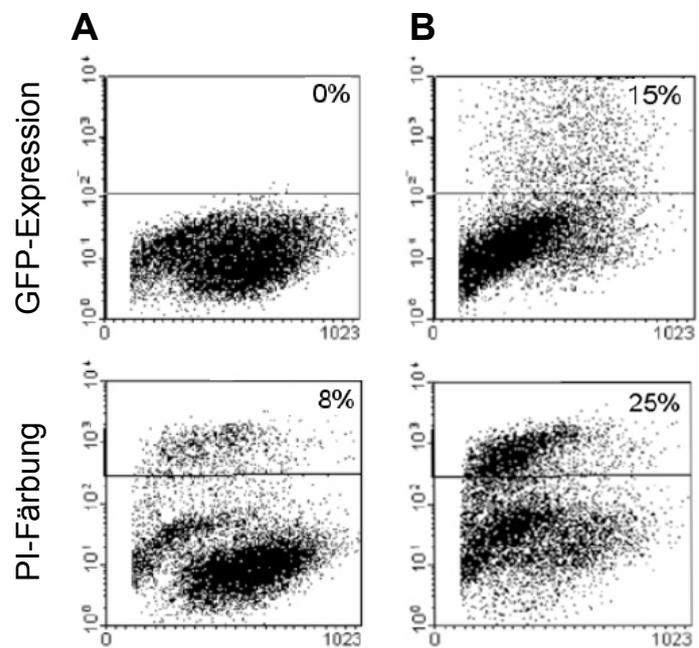


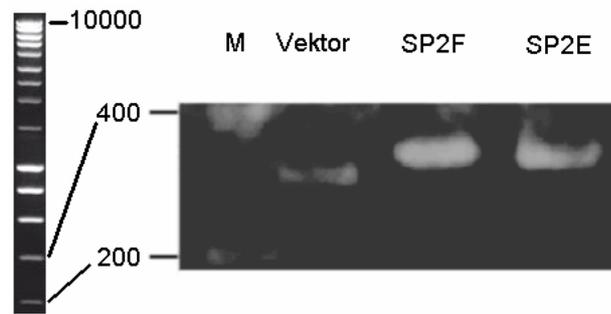
Abbildung 21. GFP-Expression und Viabilität von MV3-Zellen nach Transfektion von SP2-pIRES-EGFP

A) Darstellung der Expression von EGFP mittels Durchflusszytometrie B) Propidiumiodid-Färbung.

3.4.2. Darstellung der Genexpression mittels RT-PCR

Der Nachweis der Expression von dominant negativen Peptiden in GFP-positiven, transfizierten MV3-Zellen erfolgte nach cDNA-Synthese extrahierter totaler RNA mittels PCR mit dem Primerpaar UpIRES-523 und LpIRES-843 (siehe Tabelle 4 Materialien und Methode) (Abb. 22). In MV3-Zellen nach Transfektion mit HA-SP2-E/F-pIRES2/EGFP lag die erwartete Fragmentlänge des Produktes bei 373 bp, was auch tatsächlich mittels PCR nachgewiesen wurde (Abb. 22).

Abbildung 22. mRNA-Expression in MV3-Zellen nach Transfektion mit SP2E-IRES2/EGFP und SP2F-pIRES2/EGFP mittels RT-PCR



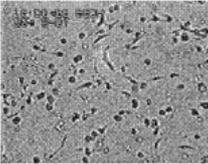
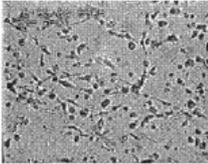
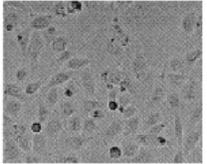
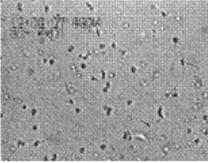
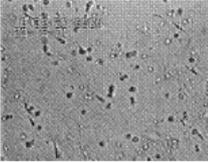
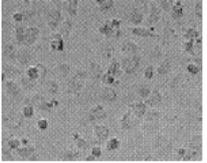
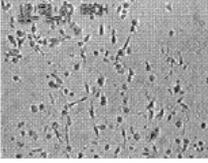
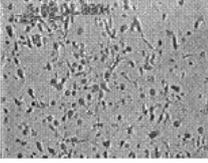
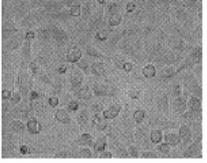
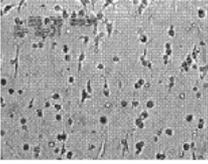
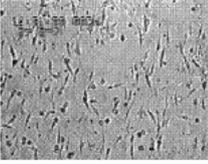
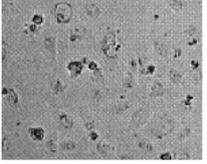
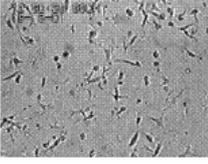
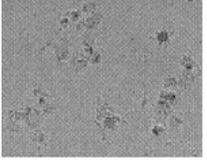
Die erwartete Fragmentlänge betrug 373 bp, im Vergleich zur PCR an unverdaulichem Kontrollvektor (320 bp). Links das Muster des SmartLadder (M= Marker) nach Herstellerprospekt (Eurogentec, Köln, Deutschland).

Insgesamt 60 verschiedene Klone aus mehreren Transfektionsrunden wurden isoliert und auf ihre Morphologie und Migrationsverhalten in Kollagenmatrices untersucht (Abb. 23).

Zwei bis drei repräsentative Klone von SP2-E bzw. SP2-F transfizierten Zellen wurden im weiteren ausgewählt und im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Kontrollzellen funktionell charakterisiert. In diesem Versuchsteil wurde eine umfassende Charakterisierung der Effizienz der Migration, der Art des Migrationstyps (mesenchymal, amöboid, Mischtyp) und der zugrundeliegenden Zell-Matrix-Kontakte und der Zytoskelettstruktur durchgeführt.

Abbildung 23. Beispiel der phänotypischen Charakterisierung von MV3-Zellen nach Transfektion von SP2-pIRES-EGFP und limitierender Verdünnung

Screeningraster der phänotypischen Charakterisierung. 60 verschiedene Subklone wurden sowohl in Flüssigkultur and auch 3D-Kollagenmatrices durch digitale Zeitraffermikroskopie phänotypisch charakterisiert. Dabei wurden verschiedene Merkmale wie Viabilität, Migrationsparameter, Homogenität und Polarität der Subklone untersucht (**folgende Seite**).

Klonname	nach 3 Std. Kultur in der Kollagenmatrix	nach 16 Std. Kultur in der Kollagenmatrix	Flüssigkultur	Charakterisierung
SP2-E- pIRES2/ EGFP (Klon 3)				Viabilität: 93% Migrationstyp: Mesenchymal Geschwindigkeit: schnell Zeitdauer der Polarisierung: 2 Std.
SP2-E- pIRES2/ EGFP (Klon 11)				Viabilität: 80% Migrationstyp: Amöboid Geschwindigkeit: langsam Zeitdauer der Polarisierung: 4 Std.
SP2-E- pIRES2/ EGFP (Klon10)				Viabilität: 97% Migrationstyp: Amöboid Geschwindigkeit: schnell Zeitdauer der Polarisierung: 3 Std.
SP2-F- pIRES2/ EGFP (Klon 1)				Viabilität: 70% Migrationstyp: Mischtyp Geschwindigkeit: langsam Zeitdauer der Polarisierung: 2,5 Std.
SP2-F- pIRES2/ EGFP (Klon 20)				Viabilität: 60% Migrationstyp: Mischtyp Geschwindigkeit: langsam Zeitdauer der Polarisierung: 0,5 Std.

3.4.3. Induktion konstitutiv amöboider Migrationsform durch SP2-E

Die Überexpression des dominant negativen SP2-E Peptids veränderte die Zellform und die Art der Migration von MV3-Zellen in Kollagenmatrices, wie sich durch Analyse der zeitraffermikroskopischen Bilder zeigte. Als Kontrolle dienten mit dem pIRES2-EGFP Vektor transfizierte MV3-Zellen, die nur HA-Epitop exprimierten.

Kontrollzellen und die transfizierten Zellen mit SP2-F entwickelten in Kollagenmatrices eine überwiegend spindelzellig-mesenchymale Morphologie mit 2-3 Pseudopodien an der Vorderfront (Film 8, 9), während die mit SP2-E transfizierten Zellen überwiegend eine rundlich elliptoide Form aufwiesen (Abb. 24, Filme 10, 11).

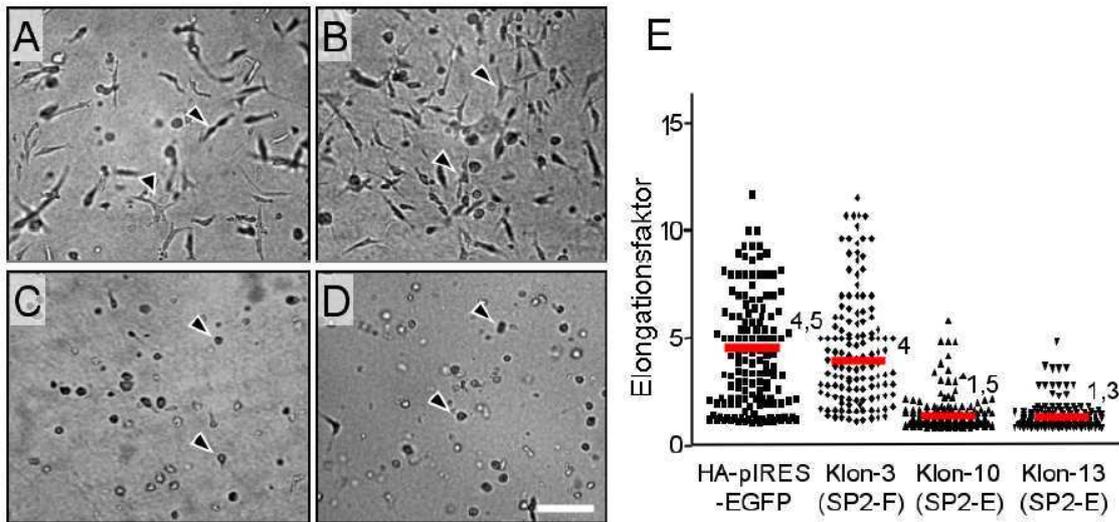


Abbildung 24. Verlust des mesenchymalen, Fibroblasten ähnlichen Phänotyps und *de-novo* Erscheinen einer elliptoiden, amöboiden Morphologie nach Expression von HA-SP2-E, nicht aber HA-SP2-F und HA-Kontrollvektor

Polarisierte und elongierte Kontrollzellen nach Transfektion mit pIRES2-EGFP (A) oder HA-SP2-F (B). Rundlich-wandernde Klone 10 (C) und 13 (D) nach Expression von SP2-E (Pfeilspitzen). Zeitraffermikroskopische Darstellung während der Migration in 3D-Kollagenmatrices nach 8 Stunden Kultur und Elongation von Einzelzellen während der Migration in 3D-Kollagenmatrices. Die Elongation wurde als Quotient von Länge/Breite für Einzelzellen aus zeitraffermikroskopischen Aufnahmen nach 6 Std. Kulturdauer berechnet (E). Der Größenbalken zeigt eine Länge von 100 μm.

Bei höherer Auflösung zeigte sich, dass die rundliche Zellform während der Bewegung beibehalten wurde und kurze dynamische Pseudopodien den Kontakt zu den Kollagenfasern herstellten.

Anstatt langer dominanter Pseudopodien in Kontrollzellen entwickelte sich eine rundliche Vorderfront mit multiplen, schnell oszillierenden Filopodien und kleinen Membranausstülpungen, einhergehend mit deutlichem Elongationsverlust (Abb. 24E).

Die Transfektion mit HA-SP2-E limitierte somit den konstitutiv mesenchymalen Phänotyp und induzierte eine neue, amöboide Migrationsform, die über mehrere Passagen nach Transfektion stabil blieb. Überraschenderweise wurde diese amöboide Migrationsform nicht durch ein verändertes β 1-Integrin-Expressionsniveau hervorgerufen, wie mittels Durchflusszytometrie dargestellt wurde (Abb. 25).

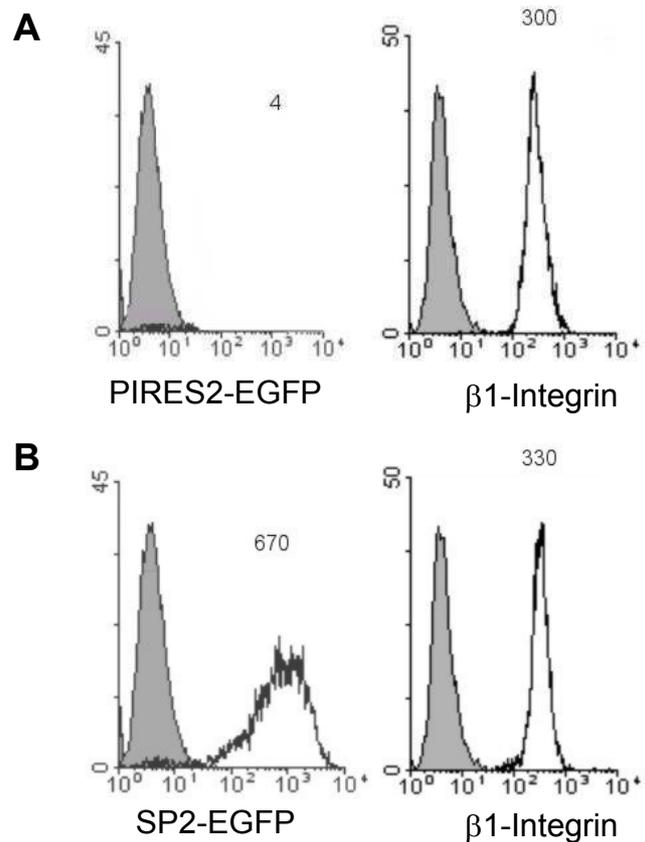


Abbildung 25. Gleichbleibende Expression von β 1-Integrin nach Transfektion mit SP2-E-pIRES2/EGFP

(A) Expression von GFP und β 1-Integrin in MV3-Zellen vor der transienten Transfektion, (B) Oberflächenexpression von GFP-SP2-E (Klon13) und β 1-Integrin nach Färbung mit der mAb 4B4 und K20 (schwarze Linie) im Vergleich zur Isotypkontrolle mittels Maus-IgG1 (grau). MFI= mittlere Fluoreszenzintensität. Zwei unterschiedliche Klone von SP2-E-transfizierten Zellen wurden funktionell näher auf die Integrin-Funktion bei der induzierten amöboiden Migration hin untersucht.

GFP-positive Zellen nach Transfektion mit HA-SP2-E-pIRES2/GFP zeigten unveränderte Oberflächenexpression von β 1-Integrinen im Vergleich zu nicht transfizierten Kontrollzellen (Abb. 25A, B), somit ließen sich die phänotypischen Veränderungen nicht auf eine Modulation verfügbarer Adhäsionsmoleküle zurückführen. Die Transfektion mit SP2-F bzw. HA-SP2-F hatte keinerlei Auswirkung auf Migrationsverhalten der Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 26A).

Einhergehend mit dem Auftreten des rundlichen Phänotyps führte die Transfektion mit HA-SP2-E-pIRES2/EGFP zu einer unterschiedlich stark verringerten Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zu mit HA-SP2-F-pIRES/EGFP transfizierten oder HA-pIRES2/EGFP transfizierten Kontrollzellen (Abb. 26A).

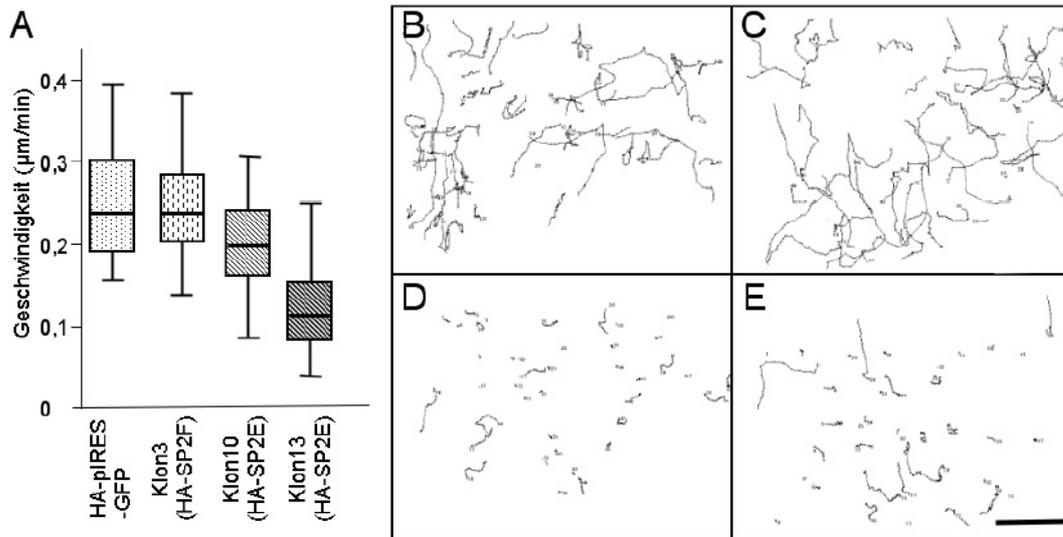


Abbildung 26. Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit und Pfadlänge durch dominant negatives Peptid HA-SP2-E

(A) Durchschnittliche Geschwindigkeit von Einzelzellen repräsentiert als mediane Populationsgeschwindigkeit von MV3-Zellen vor und nach Transfektion mit SP2-F-pIRES2/EGFP (Klon 3) oder SP2-E-pIRES2/EGFP (Klone 10 und 13). (B-E) Orthotope Repräsentation der Migrationspfade von (B) Zellen transfiziert mit HA-pIRES2-EGFP, (C) SP2-F-pIRES2/EGFP, (D) SP2-E-pIRES2/EGFP (Klon 10) und (E) SP2-E-pIRES2/EGFP (Klon 13). MV3-Zellen nach Transfektion und limitierender Dilution wurden im Kollagengel eingebettet, mittels Zeitraffermikroskopie über 20 Std. beobachtet und mittels Zelltracking quantifiziert (n= 3 unabhängige Experimente, 120 Zellen). Um zytotoxische Effekte auszuschließen wurde die Zellviabilität der Zellen nach jedem Migrationslauf und Kollagenaseverdau mittels Propidiumiodid Färbung durchflusszytometrisch kontrolliert. Der Größenbalken zeigt eine Länge von 100 µm.

Während Kontrollzellen durchschnittlich mit 0,26 µm/min migrierten, lag die mediane Populationsgeschwindigkeit von Klon 10 bei 0,2 µm/min (Film 10; schnelle amöboide Migration) und von Klon 13 bei 0,11 µm/min (Film 11; langsame amöboide Migration). Dies entsprach einer Reduktion um 16% (Klon 10) und 46% (Klon 13). Interessanterweise entwickelten einzelne Zellen nach Transfektion mit HA-SP2-E trotz phänotypischem Übergang in amöboide Migration Maximalgeschwindigkeiten über 0,25 µm/min hinaus (Abb. 26A). Die Pfadstruktur der nicht-transfizierten und mit HA-SP2-F transfizierten Zellen war relativ gradlinig, während die der mit HA-SP2-E transfizierten Zellen deutlich verkürzt verlief (Abb. 26B-E). Mit HA-pIRES2-EGFP transfizierte Kontrollzellen zeigten bei hochauflösender Konfokalmikroskopischer Lebendaufnahme eine spindelförmige, längliche Morphologie (Film 12). Die rundlichen, SP2-E exprimierenden MV3-Zellen des Klons 10 wiesen bei der Migration in der Kollagenmatrix kleine Pseudopodien auf, mit denen sie sich langsam amöboide ohne fokalisierte Zellmatrix-Kontakte fortbewegten, wie durch hochauflösende Konfokalmikroskopie beobachtet werden konnte (Abb. 27, Film 13).

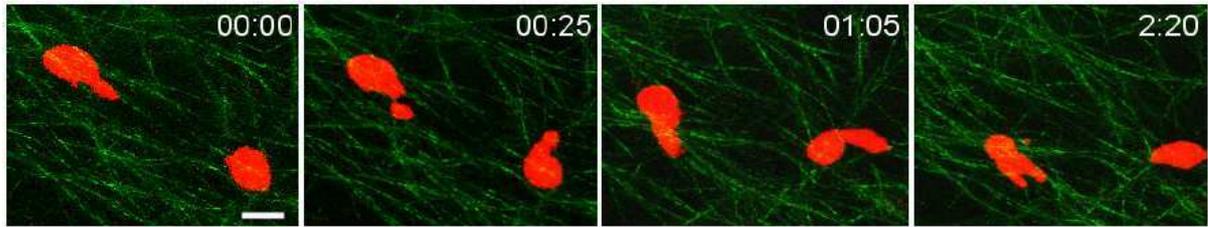


Abbildung 27. Konfokale Lebendaufnahme von MV3-Zellen nach Transfektion mit SP2-E-pIRES2/EGFP
 MV3-Zellen, transfiziert mit β 1-Integrin zytoplasmischer Domäne HA-SP2-E (NPIE), wurden in Kollagenmatrices einpolymerisiert. Die Migration von zwei transfizierten Zellen wurde als Zeitserie (10 Schnitte, 3 Std.) konfokalmikroskopisch dargestellt. Rote Fluoreszenz: Falschfarbendarstellung von EGFP; grünes Signal: Reflektion der Kollagenfasern. Der Größenbalken zeigt eine Länge von 30 μ m.

Außerdem zeigte die Rekonstruktion der 3D-Struktur in wässriger Umgebung, dass HA-Tag am C-Terminus des Peptids (SP2-E, -F, -Y) die Konformation des Peptids nicht sterisch hemmte. Die konservierte Region mit dem NPIX-Motiv nahm dabei eine Typ I β -turn Konformation an (Abb. 28, Film 14) (Haas et al., 1997).

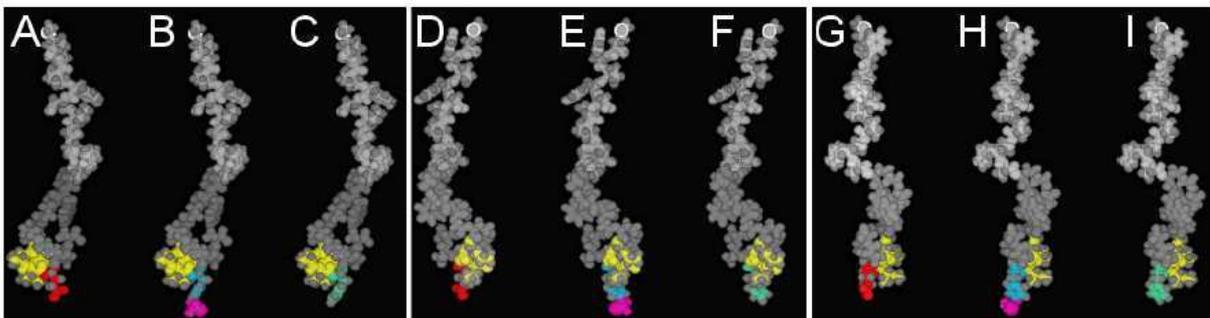


Abbildung 28. Rekonstruktion der 3D-Struktur der dominant negativen Peptide
 Für die konstitutive Inhibition der Funktion der β 1-Integrin zytoplasmatischen Domäne SP2 (AS 778-790) wurde das dominant negative SP2-Peptid mit der Aminosäure-Substitution Y->E788 im NPIY-Motiv eingesetzt (NPIE). Die 3D-Struktur und Konformation dieses Peptids wurde in wässriger Umgebung mit dem Programm CS Chem3D berechnet. Drei aufeinanderfolgende Umdrehungen des Peptids: HA-SP2-E (A, D, G), HA-SP2-pY (B, E, H) und HA-SP2-F (C, F, I); A, D, G sind um 30°, B, E, H um 90° und C, F, H um 150° gedreht.

3.4.4. In Vitro-Immunopräzipitation und massenspektrometrische Analyse

Weiterhin wurde versucht, durch *in vitro* Präzipitation mit dem dominant-negativen Peptid die Zusammensetzung der fokalen Kontakte nach Hemmung der β 1-Integrin zytoplasmatischen Domäne darzustellen. Als Kontrollen dienten mesenchymal migrierende Wildtyp- bzw. mit HA-pIRES2 Vektor transfizierte Zellen. Die präzipitierten Proteinbanden wurden durch massenspektrometrische Analyse in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Stickmann identifiziert.

3.4.5. Kontraktion der Kollagenmatrix

Um zu testen, ob die durch Transfektion mit SP2-E-pIRES2/EGFP induzierte rundliche Morphologie während der Migration mit einer veränderten Zell-Matrix-Interaktion assoziiert war, wurde die Kontraktion nicht verankerter, frei flottierender Kollagenmatrices quantitativ untersucht.

Im Verlauf einer 24 (48) Stunden Kultur führten nicht-transfizierte Kontrollzellen zu einer Verringerung der Gelfläche um ca. 50 % gegenüber der zellfreien Kontrolle (Abb. 29). Dagegen war die Kontraktion durch Klone 10 und 13 deutlich verringert (23 und 6%). Die Zell-Matrix-Interaktionen sind deutlich schwächer und die Kollagenmatrices wurden während der Wanderung nicht reorganisiert.

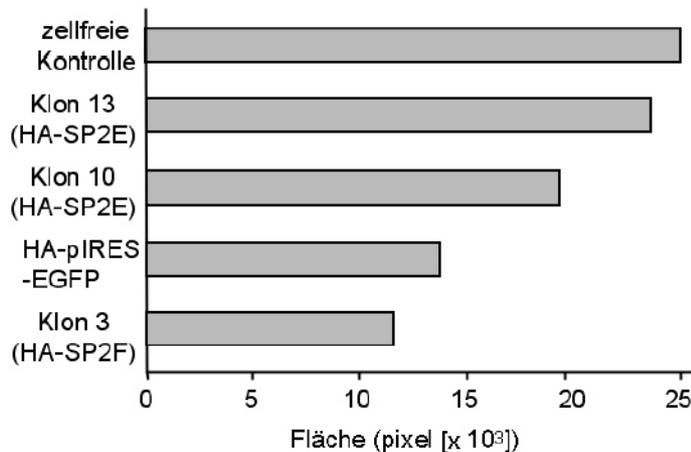


Abbildung 29. Verringerte Kontraktion nicht-verankerter Kollagenmatrices mit untersuchten Klonen

MV3-Zellen nach Transfektion mit SP2E/F-pIRES2/EGFP bzw. HA-pIRES2/EGFP wurden in nicht verankerten 3D-Kollagenmatrices über 20 Std. kultiviert. Als Negativkontrolle diente eine zellfreie Kollagenmatrix. Die Fläche der Matrix wurde mittels digitaler Bildanalyse in Pixeln gemessen. (n= 3).

Diese Befunde der amöboiden, teils verlangsamten Migration mit zeitgleich verringerter Fähigkeit zur Kontraktion von Kollagenmatrices zeigen, dass das SP2-E-Peptid, nicht jedoch SP2-F, die Adhäsion bzw. Zugkraft der Zellen an Kollagenfasern hemmt, die eine mesenchymale Zellform aufrechterhalten.

3.5. Mechanismen der Migration bei $\beta 1$ -defizienten Zellen

Um zu verifizieren, dass die Restmotilität bei der amöboiden Migration tatsächlich von $\beta 1$ -Integrin unabhängig ist, wurden immortalisierte $\beta 1$ -Integrin-defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEF), und in Kontrollversuchen eine murine embryonale Stammzelllinie (GD25) eingesetzt. In den verwendeten Zellen konnte keinerlei $\beta 1$ -Integrin detektiert werden, weder über PCR noch über Proteinnachweis (Abb. 30).

Der Einsatz von $\beta 1$ -Integrin defizienten Zellen war aus zwei Gründen von Bedeutung:

1) durch die bisher angewandte Strategien adhäsions-blockierender anti- $\beta 1$ -Integrin mAk, $\alpha 2\beta 1$ -Integrininhibitor (Rhodocetin) und Sortierung wurde die Migration von MV3-Zellen zwar deutlich reduziert, nicht aber vollständig gehemmt. Dies könnte auf einer Restaktivität nicht inhibierter $\beta 1$ -Integrine beruhen, die in der Größenordnung zwischen 5% (bei 10 $\mu\text{g/ml}$, verglichen mit Abb. 12A) bis 50% (nach Sortierung der Zellen mit niedriger Expression von $\beta 1$ -Integrin, verglichen mit Abb. 8A) lag.

2) Die Bindung des Antikörpers an Integrine führt zur Integrin-Dimerisierung auf lebenden Zellen und Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK). Diese durch Antikörperbindung ausgelösten Effekte sind möglicherweise geringer als entsprechende Ligand-vermittelte Signale (Miyamoto et al., 1995). Daher bedeutet Antikörperbindung verglichen mit Ligandenbindung eine Abschwächung des von $\beta 1$ -Integrinen aufrechterhaltenen Signals in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten und könnte demzufolge eine adhäsionsvermindernde bzw. promigratorische Wirkung auslösen. Zusätzlich kann Antikörperbindung andere Ligand-Rezeptor-Interaktionen sterisch behindern und zu kaum kontrollierbaren sekundären Effekten führen.

Um diese durch Antikörperbindung ausgelösten Signale auszuschliessen, wurden in nächsten Experimenten $\beta 1$ -Integrin-defiziente Zellen eingesetzt. Diese Versuche sollten zeigen, ob in diesem Kollagenmodell grundsätzlich eine Restmotilität unabhängig von $\beta 1$ -Integrinen bestehen kann und ob diese Zellen eine mit den Vorbefunden vergleichbare amöboide Wanderung zeigen.

Durch den Einsatz des Cre/loxP-Systems (Abb. 5 Materialien und Methoden) konnten Zellen mit einer induzierbaren genetischen Deletion erzeugt werden (Jat et al., 1991; Graus-Porta et al., 2001). Die Mauslinie exprimiert eine temperatursensitive Mutante des SV-40 großen T-Antigens (tsA58) unter Kontrolle des H-2K Promotors, das durch IFN- γ induzierbar war. Embryonale Fibroblasten dieser Mäuse wurden in Anwesenheit von IFN- γ bei einer Kultivierungstemperatur von 33°C immortalisiert. Nach Erhöhung der Temperatur auf 37°C verminderte sich die Passagierbarkeit auf ca. 20-30 Passagen (Messent A., persönliche Mitteilung).

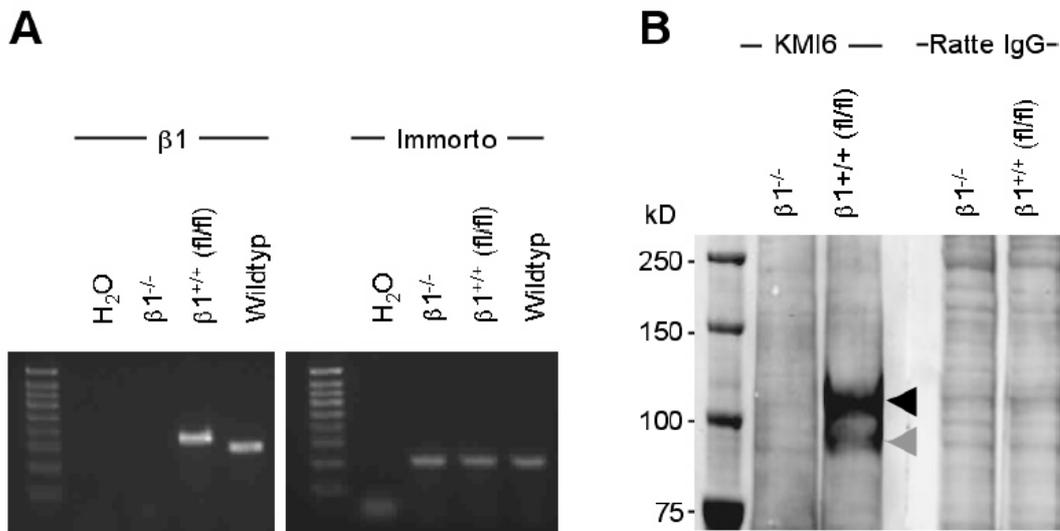


Abbildung 30. Charakterisierung von $\beta 1$ -Integrin defizienten MEF und die Wiederherstellung nach $\beta 1$ -Integrin Einführung

(A) PCR-Analyse der $\beta 1$ -Integrin (fl/fl), $\beta 1^{-/-}$ und Wildtyp MEF (Zelllinie 7929) zum Nachweis von $\beta 1$ -Integrin und Immorto-Allele. $\beta 1^{-/-}$ Zellen hatten kein detektierbares $\beta 1$ -Integrin, während für geflochte- und Wildtyp-MEF den $\beta 1$ -Integrin Locus in Banden von 320 und 285 bp detektiert wurde (links). Alle Zelllinien hatten das Immorto-Allel (rechts).

Die Primer für $\beta 1$ -Integrin waren: GCCGCCACAGCTTTCTGCTGTAGG (sense) und CTGATCAATCCAATCCAGGAAACC (antisense). (B) Lysate von $\beta 1$ (fl/fl) und $\beta 1^{-/-}$ MEF wurden mit anti- $\beta 1$ -Integrin mAk KMI6 oder Ratten IgG hybridisiert durch Western Blot Analyse nachgewiesen. $\beta 1^{-/-}$ Zellen hatten kein detektierbares $\beta 1$ -Integrin. Das geflochte $\beta 1$ -Integrin der parentalen MEF 7929 Zelllinie lief bei ca. 110 kDa (schwarze Pfeilspitze) und das prä- $\beta 1$ -Integrin bei 90 kDa (graue Pfeilspitze) (Daten erhoben von A. Messent).

3.5.1. Expression von $\beta 1$ -Integrin in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) und embryonalen Stammzellen (ES)

Die Effizienz der Deletion von $\beta 1$ -Integrin in MEF nach Exposition der Zellen mit Adeno-Cre bzw. in GD25 ES wurde anhand der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt (Abb. 31a-e). In $\beta 1$ -Integrin-defizienten MEF $\beta 1^{-/-}$ wie auch in GD25 ES war die mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) identisch zur Isotypkontrolle, d.h. keine spezifische Expression nachweisbar, während Kontrollzellen eine deutliche monophasische Expression ohne Nachweis einer $\beta 1$ -negativen Subpopulation zeigten. Ein MEF-Klon mit hoher $\beta 1$ -Integrin Expression ($\beta 1^{\text{high}}$) zeigte eine im Vergleich zu Kontrollzellen erhöhte MFI (1,7-fach) (Abb. 31b). Immortalisierte GD25 ES, die als weitere $\beta 1$ Population eingesetzt wurden, zeigten ebenfalls eine zur Isotypkontrolle identische MFI. Für die folgenden funktionellen Versuche dienten diese Zellen als Modell für fehlende, mittlere und hohe $\beta 1$ -Integrin Expression.

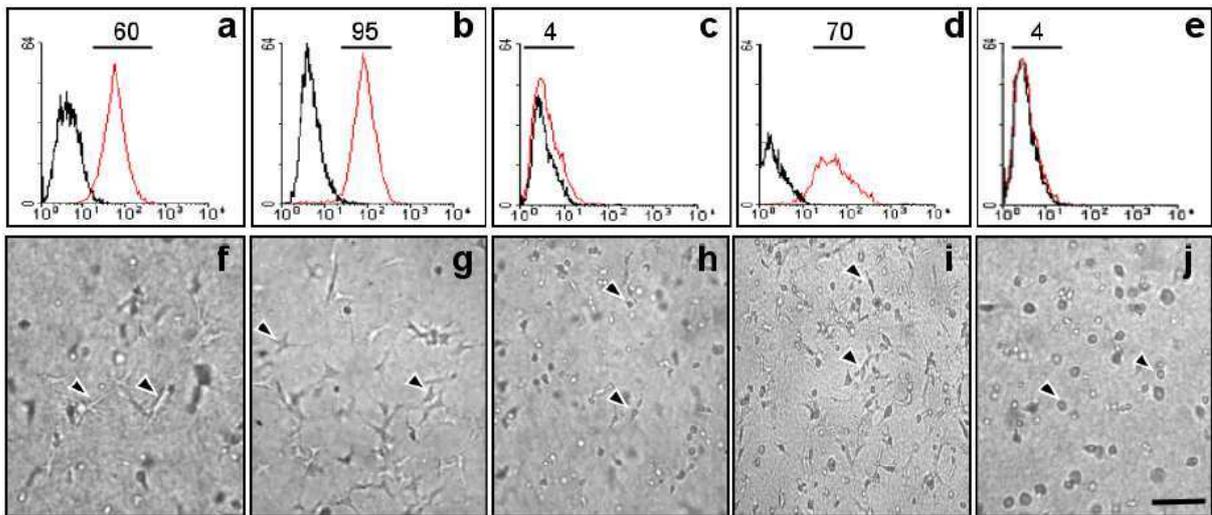


Abbildung 31. Analyse der Oberflächenexpression von $\beta 1$ -Integrin (a-e) und veränderte Morphologie (f-j) von $\beta 1^{-/-}$ Zellen

Die Oberflächenexpression von $\beta 1$ -Integrin in Kontroll-MEF (a), einem Klon mit höherer $\beta 1$ -Integrin Expression ($\beta 1^{\text{high}}$) (b), $\beta 1^{-/-}$ MEF nach Zusatz von Adeno-Cre (c) $\beta 1^{+/+}$ ES-Kontrollzellen (hier ES-Zellen, die ein gefloxtes ILK-Gen tragen) (d) und GD25 $\beta 1^{-/-}$ und SV40-transformierte embryonale Stammzellen (ES) (e) wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden primär mit Maus anti- $\beta 1$ -Integrin mAk 9EG7, und sekundär mit FITC markiertem Ziege anti-Maus F(ab)² gefärbt (rote Linien). Die schwarze Linie zeigt die Isotypkontrolle. Angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Polarisierte und spindelförmige Morphologie der $\beta 1$ -exprimierenden Kontrollzellen $\beta 1^{+/+}$, $\beta 1^{\text{high}}$ MEF und $\beta 1^{+/+}$ ES-Kontrollzellen (f, g, i) im Vergleich zur runden Morphologie von $\beta 1$ -defizienten Zellen (h, j) während der Migration in 3D-Kollagenmatrix (Pfeilspitzen). Alle MEF exprimierten eine temperatursensitive Mutante von SV-40 großen T-Antigen (tsA58) unter der Kontrolle eines IFN- γ -induzierbaren H-2K Promotors. Zellen wurden bei 33°C und in Anwesenheit von IFN- γ kultiviert. Migrationsexperimente wurden bei 37°C durchgeführt und führten nicht zu einer erhöhten Rate absterbender Zellen über eine Beobachtungszeit von mindestens zwei Tagen. Der Größenbalken zeigt eine Länge von 100 μm .

3.5.2. Konstitutive amöboide Migration in $\beta 1^{-/-}$ Zellen

Fehlende $\beta 1$ -Integrin Expression veränderte gegenüber den $\beta 1$ -Integrin exprimierenden Kontrollzellen neben der Migrationsaktivität vor allem die Elongation der Zellen während der Migration, wie sich durch Analyse der zeitraffermikroskopischen Sequenzen zeigte (Abb. 32). Drei unterschiedliche Typen $\beta 1$ -positiver Zellen entwickelten eine stark polarisierte, spindel- bis sternförmige Fibroblasten-Morphologie mit elongierten Pseudopodien an der Vorderfront (Abb. 31f, g, i), während $\beta 1$ -Integrin defiziente MEF und ES eine runde und elliptoide Morphologie mit nur kleinen Protrusionen entwickelten (Abb. 31h, j). Diese Zellform wurde von allen $\beta 1$ -Integrin-defizienten MEF und ES über eine Kulturdauer bis 72 Stunden beibehalten, entsprechend eines konstitutiv-amöboiden Phänotyps. Der Elongationsfaktor $\beta 1$ -defizienter MEF und ES war gegenüber den Kontrollzellen signifikant reduziert, entsprechend einer überwiegend runden bzw. gering polarisierten Morphologie (Abb. 32). Somit war der mesenchymale Phänotyp von der Expression von $\beta 1$ -Integrinen abhängig.

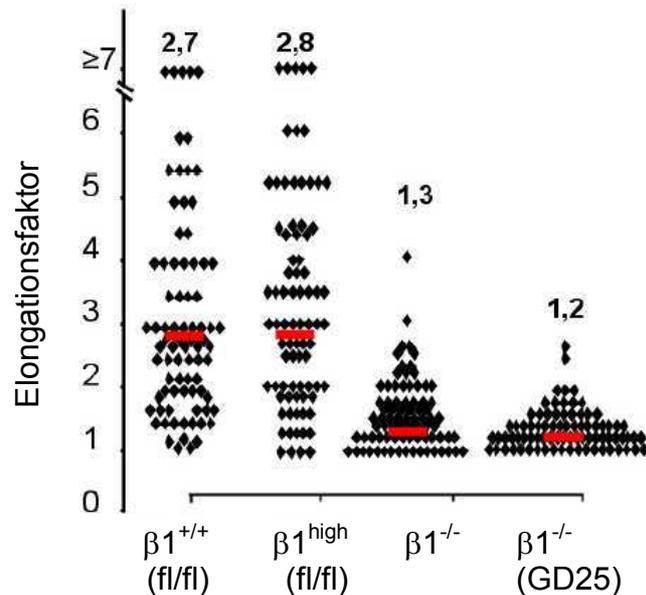


Abbildung 32. Abhängigkeit der Zellmorphologie und Polarisierung von der Expression des $\beta 1$ -Integrins

Polarisierte und elongierte Morphologie von Kontrollzellen ($\beta 1^{+/+}$) und MEF mit hoher $\beta 1$ -Integrin Expressionsstufe ($\beta 1^{\text{high}}$) im Vergleich zu sphärisch elliptoider Morphologie von $\beta 1$ -Integrin defizienten Zellen ($\beta 1^{-/-}$ und GD25 ES während der Migration in 3D Kollagenmatrices dargestellt als Polarisationsindex (Länge/Breite) nach 11 Std., 80 Zellen. Rote Linie = Median.

3.5.3. Veränderte Migrationgeschwindigkeit und Pfadlänge durch inhibierte Expression von $\beta 1$ -Integrin in defizienten MEF und ES

Um zu prüfen, ob der Verlust der Zellpolarisierung in $\beta 1^{-/-}$ Ausdruck insuffizienter Zell-Matrix-Interaktionen mit sekundär beeinträchtigter oder aufgehobener Migration ist, wurden die Migrationspfade anhand zeitraffermikroskopischer Aufnahmen rekonstruiert. Während der überwiegende Anteil der $\beta 1^{+/+}$ MEF eine Migrationsgeschwindigkeit von 0,08 - 0,18 $\mu\text{m}/\text{min}$ und $\beta 1^{\text{high}}$ MEF von 0,07 - 0,1 $\mu\text{m}/\text{min}$ entwickelten (Abb. 33A, Filme 15 und 16), migrierten $\beta 1^{-/-}$ MEF signifikant beschleunigt mit 0,17 - 0,28 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Film 17, „schnelle“ amöboide Migration). Die Migrationsgeschwindigkeit von $\beta 1^{-/-}$ GD25 Zellen war dagegen auf 0,04 - 0,09 $\mu\text{m}/\text{min}$ reduziert, jedoch nicht vollständig angehalten (Film 18, „langsame“ amöboide Migration). Die Migrationspfade der Kontrollzellen $\beta 1^{+/+}$ waren überwiegend geradlinig, während die der $\beta 1^{-/-}$ Zellen häufiger Richtungsänderungen mit geringerer Persistenz zeigten (Abb. 33B-E). Der relative mittlere Winkel der Pfade von einem Schritt zum nächsten blieb jedoch unverändert, da die Schritte mit Richtungsänderung insgesamt seltene Ereignisse waren (Daten nicht gezeigt). Die Pfade von $\beta 1^{\text{high}}$ MEF waren deutlich verkürzt, weil sie aufgrund ihrer starken $\beta 1$ -Integrinexpression partiell sehr fest an Kollagenfasern anhafteten und sich währenddessen nicht fortbewegen konnten (Abb. 33C).

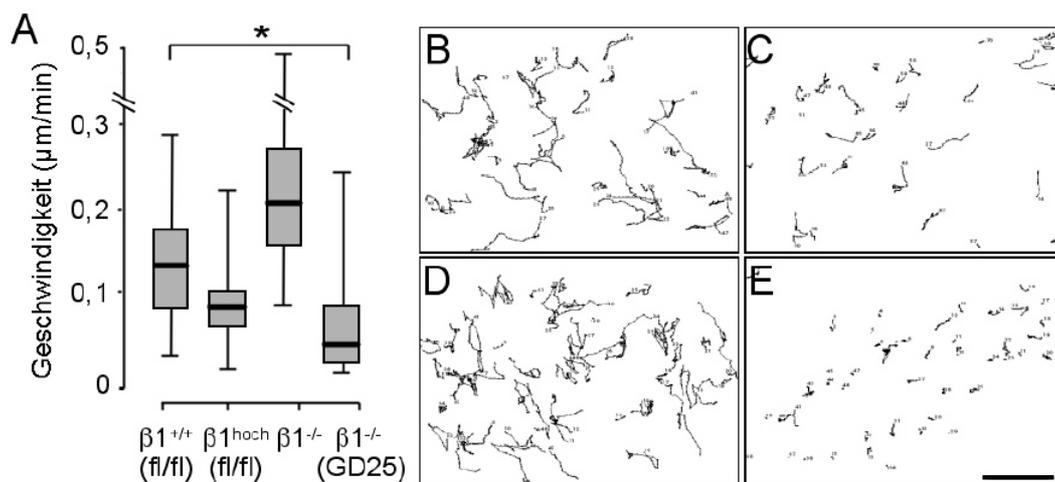


Abbildung 33. Migrationseffizienz und Struktur der Migrationspfade $\beta 1$ -exprimierender und $\beta 1$ -defizienter Zellen

(A) Die Daten repräsentieren die mittlere Geschwindigkeit von zufällig ausgewählten Einzelzellen, die mittels Zeitraffermikroskopie über 20 Std. und digitales Zelltracking von 120 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten rekonstruiert wurde. Immorto-MEF ohne gefloxtes $\beta 1$ -Integrin-Allel zeigen nach Behandlung mit Adeno-Cre zu $\beta 1^{+/+}$ MEF vergleichbare Migration und Morphologie, somit war ein Effekt der Infektion mit Adeno-Cre auf Phänotyp und Migration ausgeschlossen, $P = 0,0005^*$. Die Migrationspfade von (B) $\beta 1^{+/+}$ MEF (ohne Adeno-Cre), (C) $\beta 1^{\text{hoch}}$ MEF (ohne Adeno-Cre), (D) $\beta 1$ -Integrin defiziente MEF (Adeno-Cre) und (E) $\beta 1^{-/-}$ ES (GD25). Die Pfade zufällig ausgewählter Zellen wurden im Zelltracking quantifiziert und orthotop rekonstruiert ($n = 3$ unabhängige Experimente, 120 Zellen). Der mittlere relative Winkel der Pfade von einem Schritt zum nächsten zeigte keine Unterschiede zwischen den untersuchten Zellen (Daten nicht gezeigt). Der Größenbalken zeigt eine Länge von $100 \mu\text{m}$.

Die Inhibition der $\beta 1$ -Integrinfunktion durch den murinen anti- $\beta 1$ -Integrin mAk HA2/5 induzierte in MEF-Kontrollzellen ($\beta 1^{+/+}$) wie 4B4 mAk in MV3-Zellen einen Übergang von mesenchymaler zur amöboiden Migration (Daten nicht gezeigt).

Sowohl effiziente Migration wie auch verringerte direktionale Persistenz in $\beta 1^{-/-}$ MEF wurde mittels Sphäroid-Invasionsassay bestätigt (Abb. 34, Film 19). Somit war in $\beta 1$ -Integrin-defizienten Fibroblasten und embryonalen Stammzellen eine amöboide Migration unterschiedlicher Effizienz nachweisbar, was die Notwendigkeit von $\beta 1$ -Integrin für den mesenchymalen Phänotyp bestätigt.

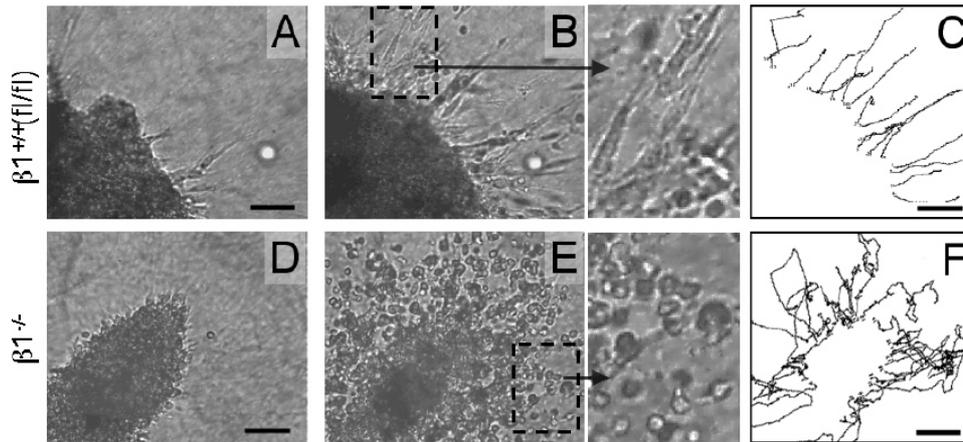


Abbildung 34. Migration von MEF aus Sphäroiden in 3D-Kollagenmatrices

Sphäroide aus $\beta 1^{+/+}$ und $\beta 1$ -Integrin defizienten MEF nach 1 (A, D) und 18 Std. (B, E) nach Inkorporation in Kollagenmatrices. (C, F) Orthotopie Rekonstruktion der Migrationspfade mittels Zeitraffermikroskopie und Zelltracking über 20 Std. Bei GD25-Zellen konnte kein Sphäroid generiert werden, wahrscheinlich wegen sehr schwacher Zell-Zell Interaktionen (Daten nicht gezeigt). Pfeile zeigen richtung Ausschnitt-Vergrößerungen. Der Größenbalken zeigt eine Länge von 100 μm .

3.5.4. Konfokalmikroskopische Charakterisierung von Zell-Matrix Interaktionen und Struktur des Aktinzytoskeletts

Nach dem Verlust von $\beta 1$ -Integrinen zeigte sich in MEF und ES eine rundliche Morphologie mit verkürzten Pseudopodien. Mittels hochauflösender Konfokalmikroskopie und Immunfluoreszenz wurden die Zellform und die zugrundeliegenden Zell-Matrix-Kontakte (Reflexion) und die Struktur des filamentösen Aktins untersucht. anti- $\beta 1$ -Integrin Antikörper (z.B. Klon KMI6) mit fixierten Zellen zeigten in diesem murinen System, im Gegensatz zu humanen Zellen, keine spezifische Fluoreszenz, vermutlich durch Epitopverlust nach Fixierung.

Mesenchymal wandernde, elongierte Kontrollzellen zeigten deutliche Fokalisierung von F-Aktin an Pseudopodienenden, die mit Kollagenfasern interagieren (Abb. 35A Pfeilspitzen). Rundlich-elliptoide $\beta 1^{-/-}$ Zellen zeigten ebenfalls punktuelle Akzentuierung von F-Aktin an, jedoch nur rudimentär entwickelte Pseudopodien (Abb. 35C, Pfeilspitzen). F-Aktin war überwiegend gleichmäßig-kortikal über den gesamten Zellkörper von $\beta 1$ -positiven wie auch $\beta 1$ -negativen Zellen verteilt, während Stressfasern nicht nachweisbar waren (Abb. 35C und D). Im Gegensatz zu $\beta 1^{+/+}$ MEF, die nahezu ausschließlich eine spindelförmige und bipolare Morphologie entwickelten, waren bei $\beta 1^{\text{high}}$ MEF häufig multifokale dendritische Pseudopodien bis 30 μm Länge darstellbar, was zu einer insgesamt spinnenförmigen und wenig motilen Zellform führte (Abb. 35B).

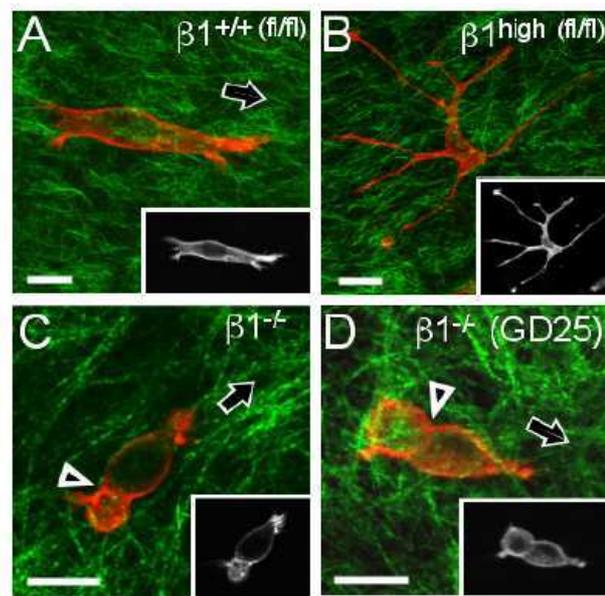


Abbildung 35. Struktur des filamentösen Aktinzytoskeletts (F-Aktin) in $\beta 1$ -Integrin defizienten MEF

(A) MEF (ohne Adeno-Cre), (B) $\beta 1^{\text{high}}$ MEF (ohne Adeno-Cre), (C) $\beta 1$ -defiziente MEF (Adeno-Cre) und (D) $\beta 1$ -defiziente ES(GD25), (Rot, F-Aktin) und (Grün, Kollagenfasern). Zellen wurden in Kollagenmatrices eingebettet, nach 5 Std. mit PFA fixiert, mit Fluoreszin-Phalloidin zur Darstellung des filamentösen Aktinzytoskeletts gefärbt und durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Vorwiegend diffus kortikale Verteilung von F-Aktin mit geringer fokaler Mehranreicherung am Ende von Pseudopodien an Zell-Matrix Interaktionen. $\beta 1$ -Integrin defizienten Zellen wandern durch die Matrixlücken und bilden die sog. Konstruktionsringe (Pfeilspitzen). Die Pfeile zeigen die Migrationsrichtung. Der Größenbalken zeigt eine Länge von 20 μm (A, B) und 5 μm (C, D).

3.5.5. Notwendigkeit von $\beta 1$ -Integrinen für den Umbau von Kollagenmatrices

Um zu prüfen, ob mit dem Verlust des mesenchymalen Phänotyps in $\beta 1$ -defizienten Zellen ebenfalls die Kapazität zum Matrixumbau reduziert war, wurden die Fähigkeit zur Kollagenkontraktion und des proteolytischen Kollagenumbaus untersucht.

Die Kontraktion nicht verankerter Kollagengele durch die Kontrollzellen ($\beta 1^{+/+}$) betrug nach 24 Std. ca. 40-60% der Ausgangsfläche, während für amöboide $\beta 1$ -defiziente Zellen analog zur zellfreien Kontrollmatrix keine Kontraktion nachweisbar war (Abb. 36). Wie auch bei MV3-Zellen (verglichen mit Abb. 16) war demnach die Fähigkeit zur Kollagenkontraktion der $\beta 1^{+/+}$ MEF mit mesenchymaler Zellform verbunden.

Zusammengefasst führte der Verlust von $\beta 1$ -Integrinen in MEF und ES zur amöboiden Migration, zum Verlust stärkerer Pseudopodelongation und zur Hemmung der Kollagenkontraktion. $\beta 1$ -Integrine-Defizienz in MEF und ES korreliert somit mit der Fähigkeit, EZM umzuorganisieren, wie es bereits beim amöboiden Phänotyp in Lymphozyten oder MV3-Zellen nach Inhibition der $\beta 1$ -Integrinfunktion erwiesen wurde.

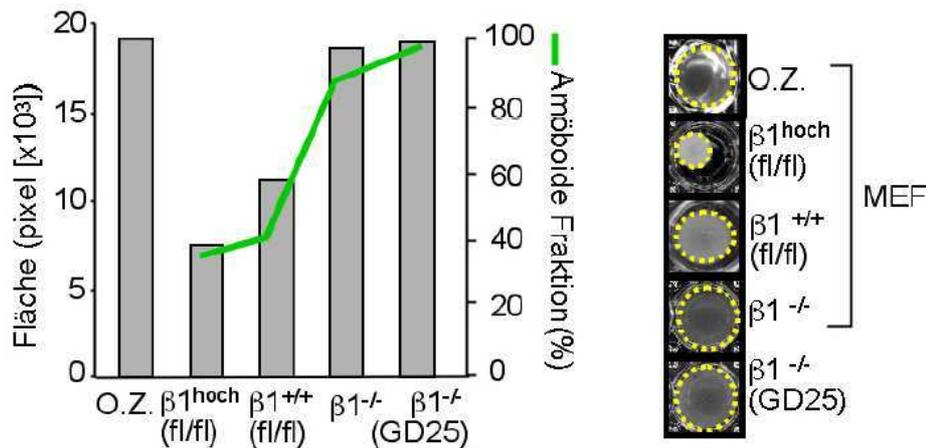


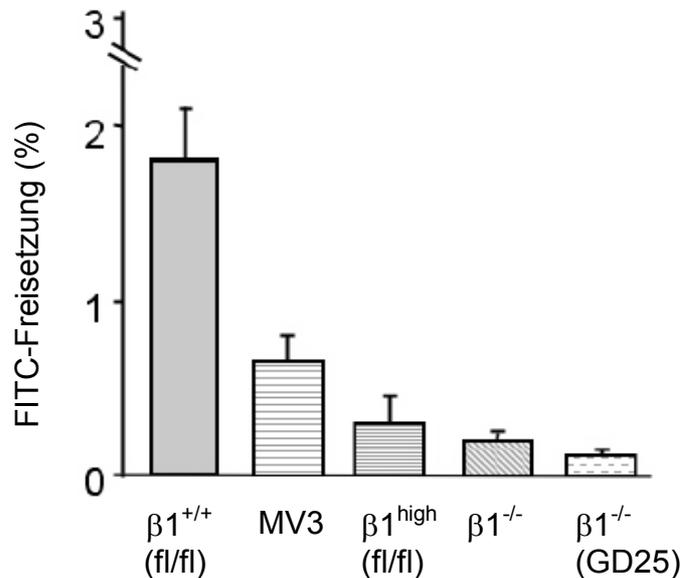
Abbildung 36. Inhibierte Kontraktion nicht verankerter Kollagenmatrices durch $\beta 1$ -defiziente MEF und GD25-Zellen

Kontraktion von nicht verankerten 3D-Kollagenmatrices (Balken) durch MEF mit unterschiedlicher Integrinexpression nach 24 Std. Kulturdauer. Als Negativkontrolle dienten zellfreie Kollagenmatrices. Die Fläche der Matrix wurde mittels digitaler Bildanalyse in Pixeln gemessen. Die hier untersuchten Zellen wiesen einen Elongationsindex < 2 auf (vgl. Abb. 32). Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

3.5.6. Abhängigkeit der Kollagenolyse von der $\beta 1$ -Integrin Expression

Um durch die physikalisch komplexe extrazelluläre Matrix zu wandern, bauen mesenchymale, nicht jedoch amöboide Zellen die Struktur der Kollagenmatrices proteolytisch um (Wolf et al., 2003a und 2007). Wir untersuchten, ob das Merkmal mesenchymaler Migration, die Proteolyse, auch bei $\beta 1$ -Integrin-defizienten amöboid wandernden Zellen nachweisbar ist. Methodisch erfolgte dies über die Detektion von FITC-Freisetzung FITC-markierter Kollagenmatrices. Während $\beta 1^{++}$ MEF eine deutliche FITC-Freisetzung induzierten, zeigten $\beta 1$ -Integrin-defiziente MEF und GD25-Zellen einen Verlust der Kollagendegradation auf Kontrollniveau (Abb. 37). Somit war die mesenchymale, nicht jedoch die amöboide Migration abhängig von der $\beta 1$ -Integrin-Expression und war mit einem Umbau der Kollagenmatrix verbunden. $\beta 1$ -defiziente Zellen migrieren demzufolge über nicht proteolytische Mechanismen, insbesondere durch ausgeprägte Formanpassung an Matrixstrukturen (vgl. Konstruktionsringe in Abb. 35 Pfeilspitzen C, D). Diese Befunde bestätigen $\beta 1$ -Integrine als den wichtigsten Adhäsionsmechanismus mesenchymaler Zellen.

Abbildung 37. Degradation der Kollagenmatrix in Abhängigkeit von der $\beta 1$ -Integrin Expression



Zellen wurden in FITC-Kollagen für 40 Std. inkubiert und der Gehalt an freigesetzten Kollagenfragmenten anhand der FITC-Freisetzung in den Überstand fluorimetrisch bestimmt. Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

3.6. Die Rolle der Glykokonjugate bei der $\beta 1$ -Integrin unabhängigen Migration

Die Reduktion oder Deletion der $\beta 1$ -Integrinfunktion durch $\beta 1$ -Integrin Antagonisten, durch Zellsortierung oder genetische Strategien führte dazu, dass ein Übergang von der konstitutiv vorhandenen mesenchymalen Migration zu einem neuen, langsameren amöboiden Migrationstyp erfolgte.

Im letzten Teil der Arbeit wurde daher untersucht, welche Mechanismen die langsame und niedrigaffine Zell-Matrix Interaktionen bei der $\beta 1$ -Integrin unabhängigen amöboiden Migration der MV3-Zellen vermittelten.

Ein Mittler der Zell-Matrix Interaktionen $\beta 1$ -Integrin defizienter Zellen könnten alternative RGD-bindende Integrine ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$) sein. Sie binden an denaturiertes Kollagen Typ I- und III. Der Einzeller *Dictyostelium discoideum* liefert eine weitere potenzielle Erklärung $\beta 1$ -Integrin unabhängiger Migration. *Dictyostelium* verfügt nicht über $\beta 1$ -Integrine im eigentlichen Sinn (Fey et al., 2002; Eichinger et al., 2005; Cornillon et al., 2006). Bisher in *Dictyostelium* bekannte Adhäsionsmechanismen der Zelloberfläche beinhalten EGF-ähnliche Domänen und Zellulose-ähnliche Kohlenhydratpolymere (Schleim), die die Funktion von Adhäsionsrezeptoren übernehmen würden (Wang et al., 2001; Fey et al., 2002). Deshalb könnten auch bei MV3-Melanomzellen und $\beta 1$ -Integrin defizienten Fibroblasten, Glykokonjugate der Zelloberfläche an der Bindung des Kollagens und Kraftgenerierung beteiligt sein. Wichtige Glykokonjugate der Zelloberfläche (Glycokalyx) sind sulfatierte

Proteoglycane wie Heparansulfat, Glycosaminoglycane (GAG) wie z.B. Hyaluronsäure und weitere Oligosaccharide. Passend zu einer Rolle von Oberflächen-GAG in migrierenden Zellen war Heparansulfat, teils in Kolokalisation mit β 1-Integrinen, fokalisiert an Zellkontakten mit Kollagenfasern darstellbar (Abb. 38).

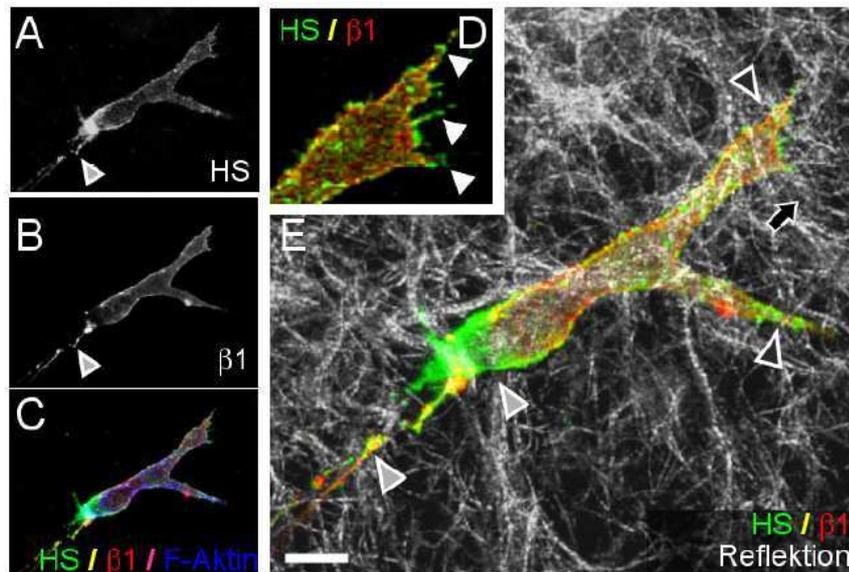


Abbildung 38. Verteilung von Heparansulfat und β 1-Integrin auf der Oberfläche einer MV3-Zelle während der Migration

Eine wandernde elongierte MV3-Zelle mit fokalisiertem Heparansulfat an Zell-Matrix Kontaktstellen (E, Pfeilspitzen). Eine Ansammlung von fokalem Heparansulfat an Pseudopodienspitzen (D, Pfeilspitzen) und am Hinterende der Zelle (E). Entlang der Migrationspfade setzt die Zelle Heparansulfat-haltiges Material zusammen mit β 1-Integrinen frei (E, graue Pfeilspitze). Heparansulfat (HS, A) und β 1-Integrine (B) wurden einzeln, und ihre Kolokalisation mit F-Aktin (C) dargestellt. Die Zelle wurde in Kollagenmatrices eingebettet, und nach 5 Stunden mit PFA fixiert. Heparansulfat wurde mit anti-Heparansulfat, (10E4)- und sekundärem FITC-markiertem Antikörper (grün) gefärbt. β 1-Integrin wurde mit anti- β 1-Integrin mAk 4B4 und K20 und sekundärem CY3-markiertem Antikörper (rot) und F-Aktin mit Alexa Fluor 647-Phalloidin (blau) gefärbt, Pfeile stellen die Migrationsrichtung in den Kollagenmatrices dar. Der Größenbalken zeigt eine Länge von 10 μ m.

Diesen Überlegungen folgend wurde untersucht, ob und welche Glykokonjugate der Glycokalyx für niedrigaffine Zell-Matrix-Interaktionen bei der amöboiden Migration zusätzlich zu den RGD-bindenden Integrinen verantwortlich sein könnten (Kokenyesi, 2001; Koda et al., 1985). Dabei sollte auch geklärt werden, ob die Migration von MV3-Zellen vollständig oder nur partiell durch simultane Inhibition der vorhandenen Kollagenrezeptoren (α v β 3-, α 2 β 1-Integrine) und die Entfernung der N- und O-gebundenen Glycanen aufgehoben wird.

3.6.1. Funktion von RGD-bindenden Integrinen und Oberflächen-Glycokonjugaten

Das zyklische Tripeptid Arginin-Glycin-Asparaginsäure, (cRGD) ist ein spezifischer Kompetitor für RGD-abhängige Integrine ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$, $\alpha \text{IIb}\beta 3$, $\alpha \nu\beta 5$, $\alpha \nu\beta 6$, $\alpha \nu\beta 8$) (Heckmann, 2007). RGD-Sequenz enthaltende Peptide konkurrieren mit extrazellulären Liganden und verhindern dadurch Zelladhäsion und nachfolgende Signaltransduktion (Iwamoto et.al., 1998). Die Viabilität der MV3-Zellen wurde nach 24 Stunden Behandlung nicht wesentlich reduziert (Abb. 39A). MV3-Zellen zeigten auf ihrer Oberfläche moderate Expression von $\alpha \nu\beta 3$ -Integrinen zusätzlich zu $\alpha 2\beta 1$ -Integrine (Abb. 39B).

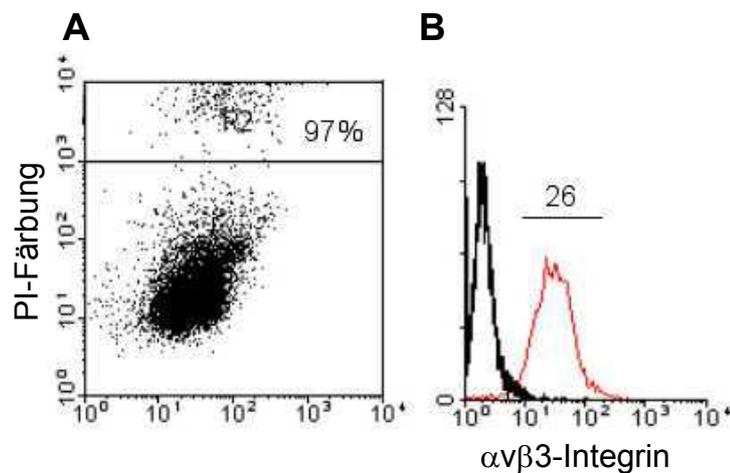


Abbildung 39. Viabilität der Zellen nach Zugabe des cRGD-Peptides und Expression von $\alpha \nu\beta 3$ -Integrin auf der Oberfläche von MV3-Zellen

(A) Viabilität nach Zugabe des cRGD-Peptids. Prozentzahl Propidiumiodid-negativer, lebender Zellen = 97%. (B) MV3-Zellen wurden mit anti-humanem $\alpha \nu\beta 3$ -Integrin AK LM609 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und sekundärem FITC-markiertem anti-Maus IgG Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle diente Maus IgG1 Antikörper. Mittlere Fluoreszenzintensität wurde hier für FITC-markierten Zellen gemessen. Rote Linie: $\alpha \nu\beta 3$ -Integrin, schwarze Linie: Isotypkontrolle.

3.6.2. Hemmung Glycokalyx-vermittelter Zelladhäsion

Zur Darstellung der Funktion der Glycokalyx für die $\beta 1$ -Integrin-unabhängige amöboide Migration wurden N- und O-verknüpfte Glycane enzymatisch und nichtselektiv mit N- und O-Glycosidasen von der Oberfläche der lebenden Zellen entfernt.

N- und O-Glycanen spielen bedeutende Rollen in der Tumorentwicklung, wie in der Einleitung (siehe Tabelle 1) ausgeführt.

Eine intakte Glycokalyx könnte die $\beta 1$ -Integrin unabhängige amöboide Migration der Tumorzellen unterstützen, die zur Invasion und Metastasierung führen kann. Daher war in dieser Arbeit die Untersuchung der Funktion der Oberflächenglycokonjugate bei der $\beta 1$ -Integrin-unabhängigen Migration von wichtiger Bedeutung.

3.6.2.1 Etablierung der enzymatischen Abspaltung der Oberflächenglycokonjugate mit N- und O-Glycosidasen

Um die Funktion der Glycokalyx für die β 1-Integrin unabhängige Migration zu untersuchen, wurden die GAG-Seitenketten durch Behandlung mit N- und O-Glycosidasen enzymatisch gespalten. Für die Etablierung der enzymatischen Reaktion wurden lebende MV3-Zellen mit N- und O-Glycosidasen sowohl einzeln als auch zusammen in zeit- und konzentrationsabhängigen Vorversuchen inkubiert und auf Effizienz der Kohlenhydratabspaltung wie auch Verträglichkeit bzw. Zytotoxizität getestet (siehe Details in Materialien und Methoden, Abschnitt 2.18).

Diese Behandlung führte zur Ablösung der adhärenen MV3-Zellen vom Boden der Kulturschale. Die Zellen zeigten nach Behandlung mit N- und O-Glycosidase im Vergleich zu den Kontrollzellen eine rundlichere Morphologie (Abb. 40). Die maximale Enzymwirksamkeit bei minimaler Zytotoxizität wurde nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C und einem physiologischen pH-Wert von 7-7,4 erreicht. Als Indikatorresiduen wurde die Expression von Heparansulfat, Chondroitinsulfat und sialinsäurehaltigen Glycosphingolipiden (GD3) mittels spezifischer Antikörperdetektion durchflusszytometrisch analysiert.

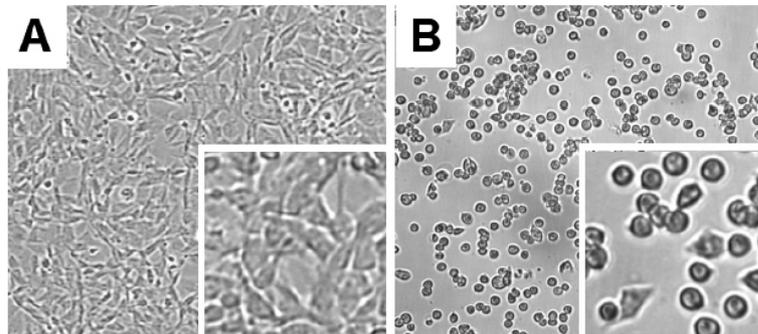


Abbildung 40. Ablösung von MV3-Zellen vom Plattenboden durch Behandlung mit N- und O-Glycosidase
(A) Adhärenen MV3-Kontrollzellen mit elongierter Morphologie. (B) MV3-Zellen nach Behandlung mit N- und O-Glycosidase lösen sich vom Kulturboden ab und entwickeln eine rundliche Morphologie.

MV3-Zellen und MEF zeigten eine starke Oberflächenexpression von Heparansulfat und eine marginale Expression von Chondroitinsulfat und Sialinsäure (Abb. 41 und 42). Durch Inkubation mit Trypsin-EDTA wurde die Expression von HS, CS und SS auf MV3-Zellen um 35 bis 60% im Vergleich zu EDTA-behandelten Kontrollzellen verringert. Durch die darauffolgende Behandlung mit den N- und O-Glycosidasen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von allen GAG-Epitopen um 85% (HS) bis 100% (CS, SS) verringert (Abb. 41). Für alle Versuchsbedingungen war keine verstärkte Anfärbung mit Propidiumiodid und somit keine verstärkte Zytotoxizität nachweisbar (Abb. 41).

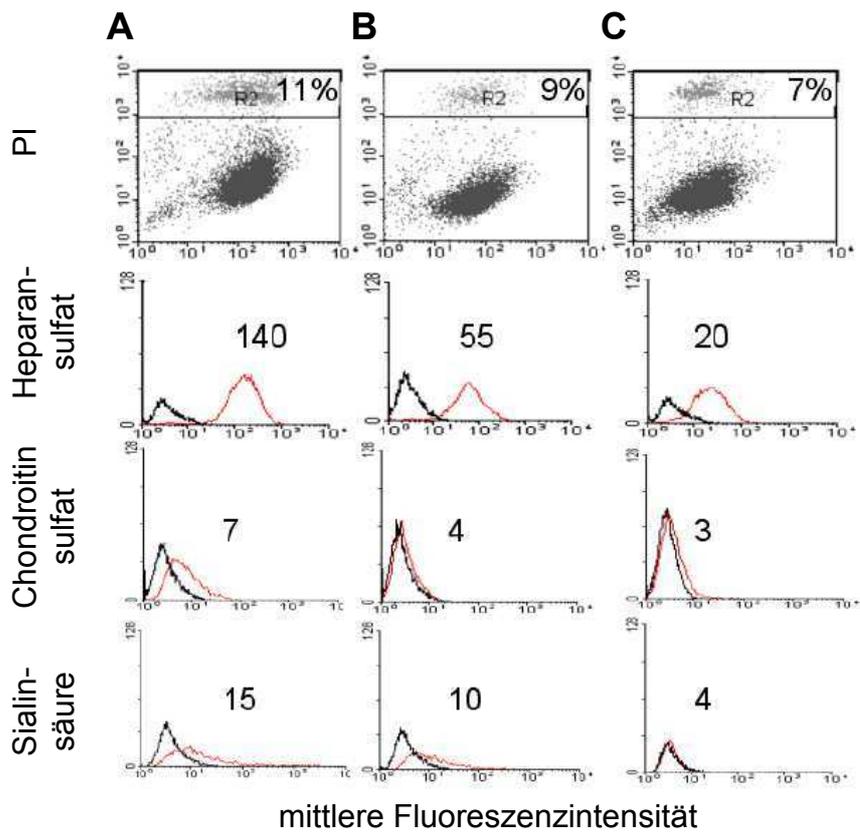


Abbildung 41. Expression von GAGs auf der Oberfläche von MV3-Zellen und Effizienz der enzymatischen Ablösung mit N- und O-Glycosidase

MV3-Zellen wurden mit EDTA (A, Negativkontrolle) oder Trypsin-EDTA (B) von der Kulturschale abgelöst und gewaschen. Mit Trypsin-EDTA abgelöste Zellen wurden mit N-Glycosidase und O-Glycosidase inkubiert. Die Detektion von Indikatorresiduen erfolgte mit Maus-anti-Heparansulfat (10E4), anti-Chondroitinsulfat (Ly111) und anti-Sialinsäure GD3 (R24) Antikörper inkubiert, gewaschen, mit sekundärem FITC-markiertem-anti-Maus IgM/IgG Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (C). Als Isotypkontrolle (schwarze Linie) diente FITC-markierter anti-Maus IgM und IgG3 Antikörper. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Propidiumiodid-Färbung kontrolliert, der Anteil geschädigter Zellen ist angegeben.

In Parallelansätzen wurden β 1-Integrin-defiziente Fibroblasten trypsiniert und mit N- und O-Glycosidase behandelt. Nach N- und O-Glycosidaseverdau war die Oberflächenexpression von HS um 84%, von CS und SS jeweils um 100% reduziert (Abb. 42). Eine Einschränkung der Zellviabilität mittels Propidiumiodid-Färbung wurde nicht detektiert.

Diese Befunde zeigen die enzymatische Oberflächenbehandlung mit Trypsin und N- und O-Glycosidase als schonendes Verfahren zur subtotalen Ablösung von Oberflächen-GAGs in lebenden Zellen.

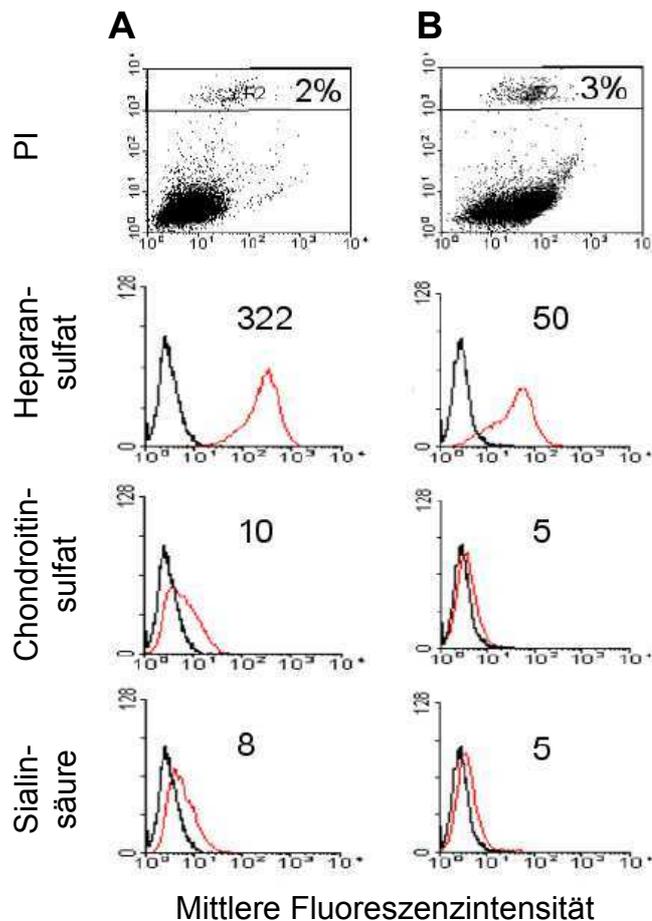


Abbildung 42. Oberflächenexpression von GAGs auf β 1-Integrin defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) und Effizienz der enzymatischen Ablösung mit N- und O-Glycosidase mittels Durchflusszytometrie

Mit EDTA abgelöste MEF dienten als Negativkontrolle (A). Nach dem Ablösen mit Trypsin-EDTA wurden die Zellen mit N- und O-Glycosidase inkubiert (B). Die Detektion von Oberflächen-GAGs erfolgte mit Maus-anti-Heparansulfat (10E4), anti-Chondroitinsulfat (Ly111) und anti-Sialinsäure GD3 (R24) Antikörper und mit sekundärem FITC-konjugierten anti-Maus IgM/IgG Antikörper. Die Viabilität der Zellen wurde mittels Propidiumiodid-Färbung kontrolliert.

3.6.2.2 Darstellung der Entfernung von Glycokalyx-Residuen mittels Elektronenmikroskopie

Zur Bestätigung der durchflusszytometrisch dargestellten Effizienz der enzymatischen Abspaltung von Oberflächenglycokonjugaten wurde die Glycokalyx von MV3-Zellen nicht-selektiv durch Färbung mit Rutheniumrot transmissionselektronenmikroskopisch dargestellt (Abb. 43 A-F). Rutheniumrot detektiert insbesondere sulfatierte GAGs, wie Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Keratansulfat (Pickles et al., 2000; Schwab et al., 2002).

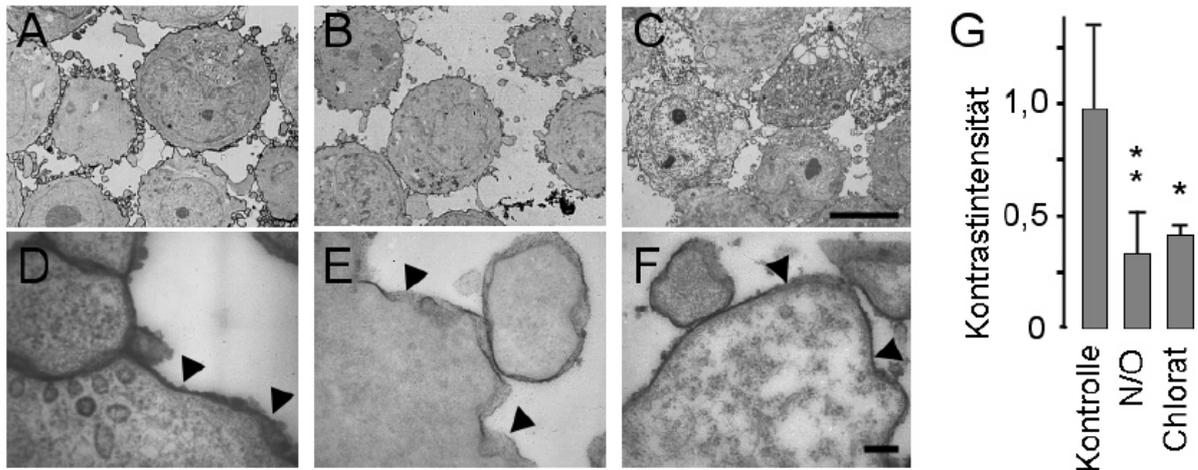


Abbildung 43. Abnahme der Kontrastintensität nach Behandlung der MV3-Zellen mit N- und O-Glycosidasen oder Kultivierung in chlorathaltigem Medium

Kontrollzellen (A, D), Zellen behandelt mit N- und O-Glycosidase (B, E) und Zellen nach Kultur in sulfatfreiem, chlorathaltigen Medium (C, F). MV3-Zellen wurden mit EDTA (2 mM) von der Kulturplatte abgelöst, gewaschen, mit Rutheniumrot gefärbt und nach Einbettung transmissionselektronenmikroskopisch analysiert. Übersicht (A-C) und Detail (D-F). (G) Quantitative Rekonstruktion der Kontrastintensität von vier Regionen und statistische Analyse mittels Student's T-Test. Die Signifikanz zeigt den Unterschied zu nichtbehandelten Kontrollzellen (**) $P=0,0032$, (*) $P=0,02$. Der Größenbalken zeigt eine Länge von 10 μm (A, B, C) und 100 nm (D, E, F).

Die Intensität der Rutheniumrot-Färbung vor und nach Behandlung mit N- und O-Glycosidase wurde mittels digitaler Bildanalyse quantifiziert. In Kontrollzellen zeigte sich die Glycokalyx als homogen dicht kontrastierte, unregelmäßige Schicht entlang der Außenseite der Zelloberfläche mit abfallender Intensität nach außen (Abb. 44 A, B). Nach Behandlung mit Glycosidasen oder Kultivierung in Natriumchlorathaltigem Medium (detaillierte Beschreibung unter Materialien und Methode, Abschnitt 2.19.) war die Kontrastierung signifikant um 50-70% verringert (Abb. 44 C). Die Reduktion war nahezu vollständig in der äußeren Region der Membran, während ein schmales membranahes lokales Maximum persistierte, passend zu Glycolipiden, die von N- und O-Glycosidasen nicht erfasst werden. Diese Befunde verdeutlichen, dass die Behandlung der lebenden Zellen mit N- und O-Glycosidase die Glykokonjugate der Zelloberfläche signifikant reduziert, ohne auf die Zellen toxisch zu wirken.

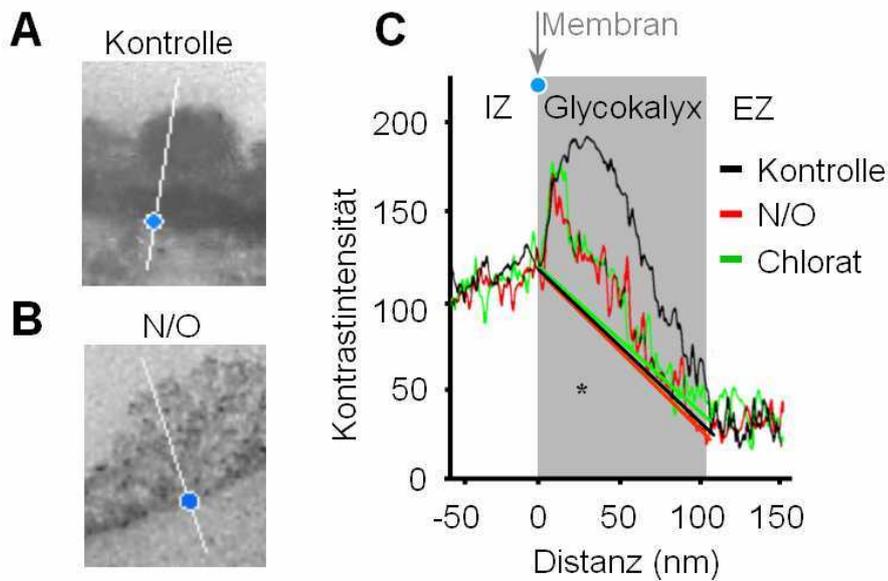


Abbildung 44. Prinzip der Rekonstruktion und semiquantitativen densitometrischen Analyse der Dichte der Glycokalyx in MV3-Zellen vor und nach Inkubation mit N- und O-Glycosidase

Transmissionselektronenmikroskopische Darstellung des Rutheniumrot-Kontrasts in MV3-Kontrollzellen nach Ablösung mit EDTA und MV3-Zellen nach Trypsinierung und Behandlung mit N- und O-Glycosidase (A, B). Der blaue Punkt markiert die eigentliche Plasmamembran im Übergang zur intrazellulären Region. Die relative Kontrastintensität wurde densitometrisch mit dem Programm ImageJ für die intrazelluläre Region, die Glycokalyx/Plasmamembran und den Extrazellulärraum entlang der 200 nm langen Linien in A und B analysiert (C). Erfasst wurde die Pixelsumme (Integral) zwischen der Kontrastintensitätskurve und dem linearen Intensitätsabfall innerhalb der Glycokalyx zwischen Intrazellulär (IZ)- und Extrazellulär- (EZ) region (Stern, durchgezogene Linien). Die Verringerung des Kontrastes war am stärksten in der Mitte der Membran. Die Kontrastintensität wurde normalisiert zur Hintergrundintensität. Die Linien repräsentieren die gemittelte Dichte aus vier verschiedenen Regionen.

3.6.2.3 Änderung der Migrationsgeschwindigkeit und der Pfadlänge nach Interferenz mit Oberflächen-GAGs und RGD-abhängigen Integrinen

Zur Untersuchung der Mechanismen der $\beta 1$ -Integrin-unabhängigen Migration wurde die Zell-Matrix-Interaktion über RGD-abhängige Integrine und Oberflächen-GAGs allein oder in Kombination antagonisiert. RGD-bindende Integrine wurden mit zyklischem RGD-Peptid (Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)) inhibiert, das während des Migrationsversuchs zugesetzt wurde. Oberflächen-GAGs wurden vor dem Migrationsversuch enzymatisch entfernt.

3.6.2.3.1 MV3-Zellen

In Vorversuchen mit MV3-Zellen lag die Re-Expression des Heparansulfats 24 Stunden nach N- und O-Glycosidasebehandlung bei ca. 80% des Ausgangsniveaus. Weiterführende Versuche zur Vermeidung dieser raschen Re-Expression mit Brefeldin A (Inhibitor des Proteinexportes) oder Tunicamycin (Inhibitor der Glycosylierung) zeigten zwar eine deutliche

Reduktion der Re-Expression von GAG auf der Zelloberfläche nach 24 Stunden, führten aber auch direkt zu einer verringerten Migrationsleistung mit spontaner Abrundung der Zellen (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf beide Substanzen verzichtet, und die Migrationsanalyse auf 10-20 Stunden nach der Behandlung mit N- und O-Glycosidase begrenzt.

Die Vorbehandlung der MV3-Zellen mit N- und O-Glycosidasen und die Zugabe von cRGD-Peptid (10 μ M) hatten keinen Einfluß auf die Basismigration von MV3-Zellen (Abb. 45). Auch der mesenchymale Phänotyp blieb unverändert (Film 20). Durch die unvermindert erhaltene Migrationsleistung wurde eine direkte bzw. latente Zytotoxizität der Vorbehandlung der Zellen mit N- und O-Glycosidase ausgeschlossen. In Anwesenheit des Adhäsionsblockierenden anti- β 1-Integrin mAk 4B4 (10 μ g/ml) nahm die mediane Migrationsgeschwindigkeit der MV3-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen um 80% ab (Abb. 45). Diese Migrationseffizienz wurde durch zusätzliche Anwesenheit des cRGD-Peptids nicht signifikant verändert. Durch dreifache Inhibition infolge der Kombination von enzymatischer Entfernung von N- und O-Glycanen, mAk 4B4 und cRGD-Peptid verringerte sich die mediane Migrationsgeschwindigkeit signifikant um 96% auf 0,012 μ m/min (Abb. 45, Film 21).

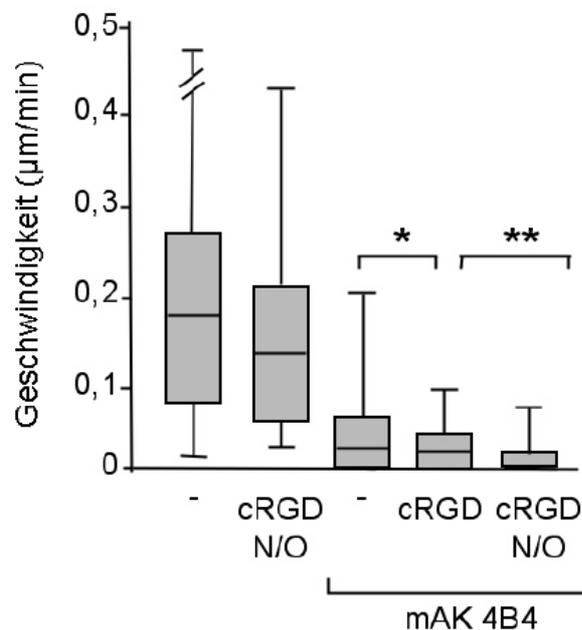


Abbildung 45. Quantitative Analyse der Migrationgeschwindigkeit mittels Zeitraffermikroskopie und Zelltracking

Dargestellt sind die Mediane, 25 und 75% Intervalle sowie Maxima und Minima der mittleren Einzelzellgeschwindigkeit über 10 Std. für drei unabhängige Experimente (120 Zellen). MV3-Zellen wurde in Anwesenheit des adhäsionsblockierenden anti- β 1-Integrin 4B4 mAk und cRGD-Peptid (10 μ M) oder nach enzymatischer Abspaltung der N- und O-Glycane, und in Anwesenheit des anti- β 1-Integrin 4B4 und cRGD-Peptid im Kollagengel einpolymerisiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte sowie mit N- und O-Glycosidasen behandelten Zellen in Anwesenheit des cRGD-Peptids (10 μ M); nicht signifikant (*), $P < 0,0001$ (**).

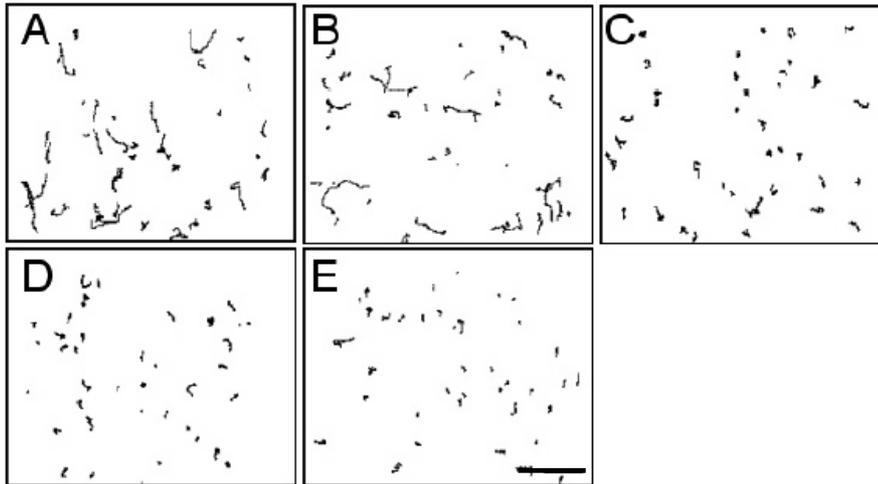


Abbildung 46. Die Pfadstruktur und Migrationseffizienz von MV3-Zellen nach Inhibition der β 1- und β 3-Integrine und enzymatischer Abspaltung von N- und O-Glycanen

Migrationspfade der Kontrollzellen (A) nach enzymatischer Abspaltung von N- und O-Glycanen in Anwesenheit des cRGD-Peptids (10 μ M) (B), 4B4 mAk (10 μ g/ml) (C) 4B4 mAk und cRGD-Peptid (D), simultane Inhibition der β 1- und β 3-Integrinen durch den 4B4 mAk und cRGD-Peptid nach Vorbehandlung der Zellen mit N- und O-Glycosidasen (E). Die Pfade von 40 zufällig ausgewählten Zellen wurde mittels Zelltracking quantifiziert und für die ersten 10 Std. des Experimentes dargestellt. Der Größenbalken zeigt eine Länge von 100 μ m.

Die den Daten zugrunde liegenden Migrationspfade wiesen eine geradlinige Struktur für Kontrollzellen auf, während sich für alle Versuchsbedingungen mit anti- β 1-Integrin mAk 4B4 erheblich kürzere und gewundenere Pfadstrukturen erkennen ließen (Abb. 46).

Erst infolge der Dreifachinterferenz (Abb. 46E) wurde die Migration in der Mehrzahl der Zellen vollständig gestoppt. Stattdessen behielten die Zellen eine auf der Stelle pulsierende, zum Teil kreisende Bewegung (running on the spot) bei (Film 21).

Zusammengefasst wurde gezeigt, dass die Migration der MV3-Zellen durch Inhibition von cRGD-bindenden Integrinen und Entfernung von N- und O-Glycanen allein nur geringfügig reduziert wurde. Erst durch die Blockade von β 1-Integrinen mit anti- β 1-Integrin mAk in Kombination mit der Vorbehandlung der Zellen mit N- und O-Glycosidasen und Zugabe des cRGD-Peptids wurde die Migrationseffizienz über das Ausmaß der alleinigen β 1-Integrin Blockade nahezu vollständig gehemmt.

3.6.2.3.2 β 1-Integrin defiziente MEF

Durch das Entfernen der N- und O-gebundenen Glycanen von der Oberfläche der β 1^{-/-} MEF konnte die amöboide Migration um 90% reduziert werden, während die Zugabe von cRGD allein zu keiner Änderung der Migrationseffizienz im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen führte (Abb. 47A, Film 22, 23). Die verbleibende Zellbewegung war bei den β 1^{-/-} MEF nach Behandlung mit N- und O-Glycosidase und Zugabe von cRGD hochsignifikant verringert, jedoch verglichen mit MV3-Zellen deutlicher ausgeprägt.

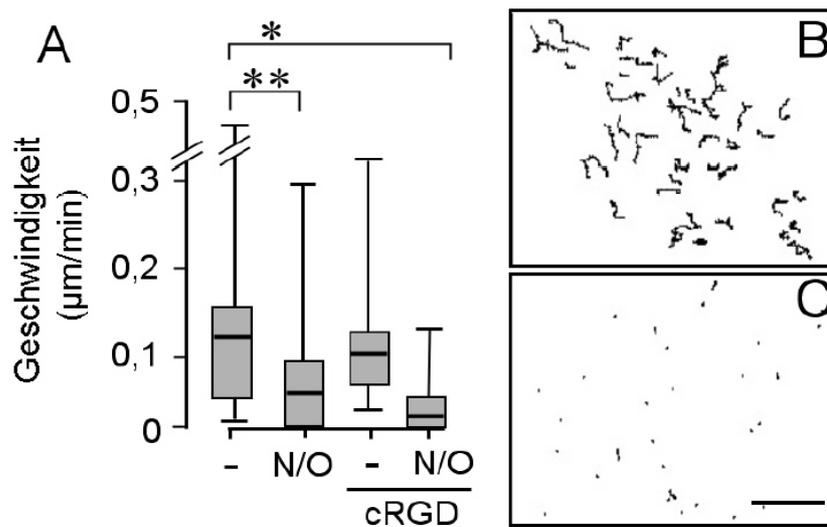


Abbildung 47. Migrationseffizienz β 1-Integrin-defizienter muriner embryonaler Fibroblasten

Migrationsgeschwindigkeit (A), korrespondierende Migrationspfade (B, C) von Kontrollzellen (B) und mit N- und O-Glycosidase und cRGD-Peptid (2 μ M) behandelten Zellen (C). Die Migration wurde durch Zeitraffermikroskopie über 10 Std. beobachtet und mittels Zelltracking quantifiziert (n= 2 unabhängige Experimente, 80 Zellen). Die Pfade 40 zufällig ausgewählter Zellen sind in B und C dargestellt. Balken= 50 μ m. Statistische Analyse für die mediane Migrationsgeschwindigkeit wurde mittels zweiseitigem Wilcoxon-Test und nachfolgender Bonferoni-Korrektur für unabhängige Stichproben durchgeführt, $P > 0,0001$ (***), $P = 0,01$ (**). Der Größenbalken zeigt eine Länge von 100 μ m.

Diese residuale Migration nach enzymatischem Entfernen von N- und O-Glycanen und nach Zugabe des cRGD-Peptids erfolgte durch kurze, periodische Translokation mittels Zellmembranoszillationen, gefolgt von längeren Phasen der Unbeweglichkeit. In einigen wenigen Zellen war die residuelle Zelltranslokation durch Oberflächenblebs mit einer Veränderung der Zellform verbunden (Film 23).

3.6.3. Inhibition sulfatierter GAGs

Vorbefunde anderer Arbeitsgruppen legen nahe, dass Glycosaminoglycane insbesondere durch negativ geladene Carboxyl- bzw. Sulfatgruppen an Kollagen binden können.

Um zu klären, ob die Sulfatierung zur residuellen amöboiden Migration nach Interferenz mit β 1-Integrinen beiträgt, wurde die Sulfatierung durch Zellkultur in Natriumchlorat verhindert, einem kompetitiven Inhibitor von ATP-Sulfurylase (Sulfatadenylyltransferase), die an der Bildung von PAPS (3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfate) beteiligt ist (Humphries und Silbert, 1988; Hemmerich, 2001; Honke et al., 1996, 1997, 2004).

Die Kultur in chlorathaltigem aber sulfatfreiem Medium führt zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Sulfatierung von Glycosaminoglycanen, Glycoproteinen und Glycolipiden (Rapraeger et al, 1994).

3.6.3.1 Expression von GAGs in sulfatdefizienten MV3-Zellen

MV3-Zellen wurden in sulfatfreiem (ohne Cystein und Magnesiumsulfat) Medium mit 50 mM Natriumchlorat für 48 Stunden bei 37°C kultiviert. Weder die Adhärenz der Zellen am Boden der Kulturschale noch die Morphologie der Zellen wurden durch Wachstum in chlorathaltigem Medium verändert (Abb. 48B). Die Expression von Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Sialinsäure als Indikatoren des Experiments wurde anschließend am FACS beobachtet. Hier führte die Kultur in chlorathaltigem Medium zum fast vollständigen Verlust der Indikatorepitope für HS und SS (Abb. 48C), während die Expression von Chondroitinsulfat unverändert blieb.

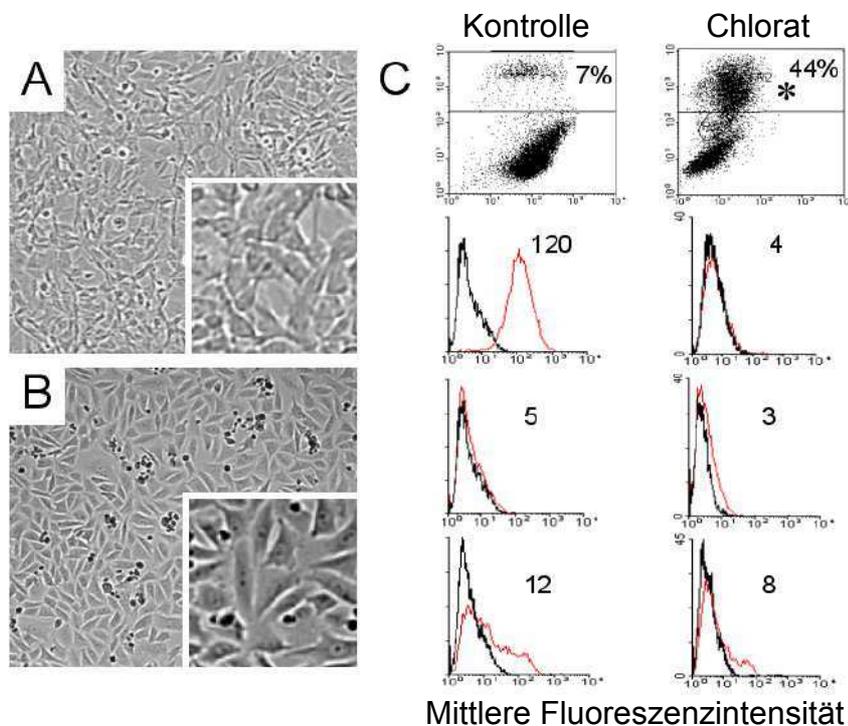


Abbildung 48. Oberflächenexpression von HS, CS und SS nach Kultivierung in sulfatdefizientem Medium
 MV3-Zellen wurden in DMEM (A) oder in natriumchlorathaltigem (30 mM) sulfatfreiem (B) für 48 Std. kultiviert. Nach Ablösen mit Trypsin-EDTA wurden die adhärenente sowie die nicht-adhärenente Zelle mit anti-Heparansulfat AK (10E4), anti-Chondroitinsulfat AK (Ly111) anti-Sialinsäure GD3 (R24) sowie sekundärem FITC-konjugiertem anti-Maus-IgM/IgG Antikörper gefärbt. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Viabilität der Zellen wurde durch Färbung mit Propidiumiodid durchflusszytometrisch kontrolliert. Für die Migrationsexperimente wurden nur die adhärenente Zellen im Kollagengel einpolymerisiert. Rote Linie= Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Sialinsäure, schwarze Linie= Isotypkontrolle.

3.6.4. Migrationseffizienz sulfatdefizienter MV3-Zellen

MV3-Zellen wurden in chlorathaltigem sulfatfreiem Medium kultiviert, mit Trypsin-EDTA abgelöst und im Kollagengel einpolymerisiert. Die mediane Migrationsgeschwindigkeit der sulfatfrei kultivierten Zellen war während der ersten 10 Stunden des Experiments im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen unverändert (Film 24 und 25). Wie in unbehandelten Kontrollzellen nahm in Anwesenheit des blockierenden anti- β 1-Integrin mAk 4B4 (siehe Abb. 12) die mediane Migrationsgeschwindigkeit um 70%, und nach simultaner Inhibition mit dem mAk 4B4 und cRGD-Peptid um 88% ab (Abb. 49, Filme 26 und 27). Die residuelle Migration der im sulfatfreiem Medium kultivierter MV3-Zellen sowie deren Migrationspfade entsprachen MV3-Zellen aus Normalkulturen (Abb. 49), einschließlich kurzstreckiger amöboider Migration und einem Anteil nicht wandernder Zellen (running on the spot) (Abb. 49B-D).

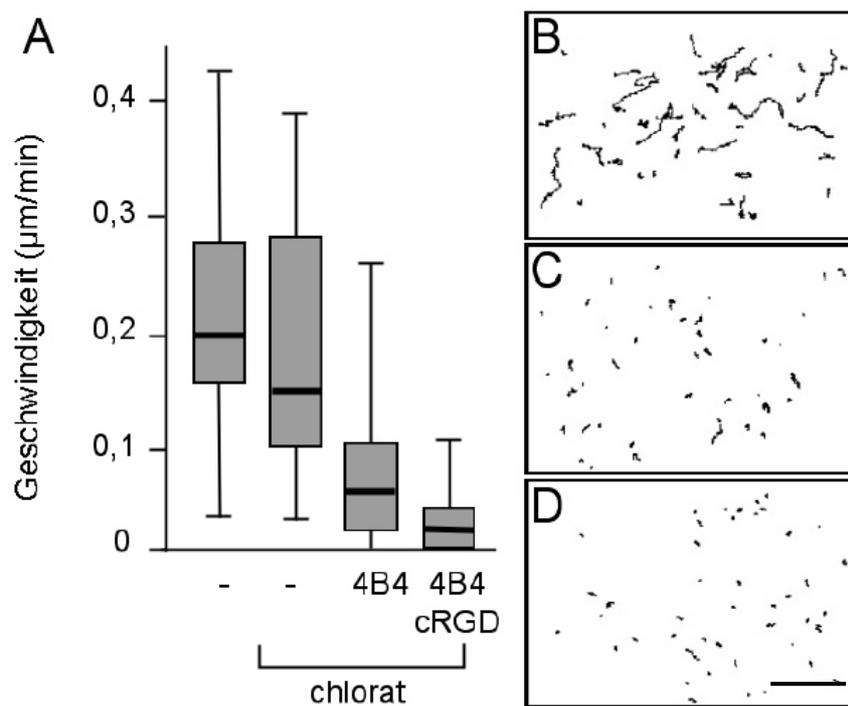


Abbildung 49. Unveränderte Migrationsaktivität sulfatdefizienter MV3-Zellen

(A) Migrationsgeschwindigkeit ($n = 2$ unabhängige Experimente, 80 Zellen) und (B) korrespondierende Migrationspfade von unbehandelten MV3-Zellen nach Kultur in sulfatfreiem, (C) chlorathaltigen Medium und (D) in Anwesenheit von mAk 4B4 und cRGD-Peptid ($10 \mu\text{M}$). Die Pfade von 40 zufällig ausgewählten Zellen wurde mittels Zelltracking für die ersten 10 Std. des Experimentes quantifiziert. Bei Analyse der Migrationseffizienz der langsamsten Zellen wurden diejenigen, die sich innerhalb von 24 Std. weniger als ein Zelldiameter bewegten, als unbeweglich definiert. Der Größenbalken zeigt eine Länge von $50 \mu\text{m}$.

Im direkten Vergleich zu mAk 4B4 allein lag die Subpopulation unbeweglicher Zellen, d.h. Zellen deren Bewegung in 10 Stunden nicht die Hälfte des Zelldurchmessers erreichte, für cRGD wie auch für sulfatfrei kultivierte Zellen auf vergleichbarem Niveau, während die Dreifachinterferenz die Anzahl vollständig immobilisierter Zellen auf 62% der Gesamtpopulation erhöhte (Abb. 50).

In allen Fällen waren immobilisierte Zellen charakterisiert durch fortgesetztes Membranruffling mit geringer Veränderung der Zellform, beides klare Zeichen erhaltener Viabilität.

Diese Daten zeigten, dass erst die simultane Interferenz gegen β 1-Integrine und Oberflächen-Glycokalyx eine weitgehende Dissoziation der Zytoskelettdynamik von der Interaktion zur 3D fibrillären Kollagenmatrix bewirkt, während der Verlust der Oberflächensulfatierung keinen Einfluss auf die Migration der Tumorzellen zeigte.

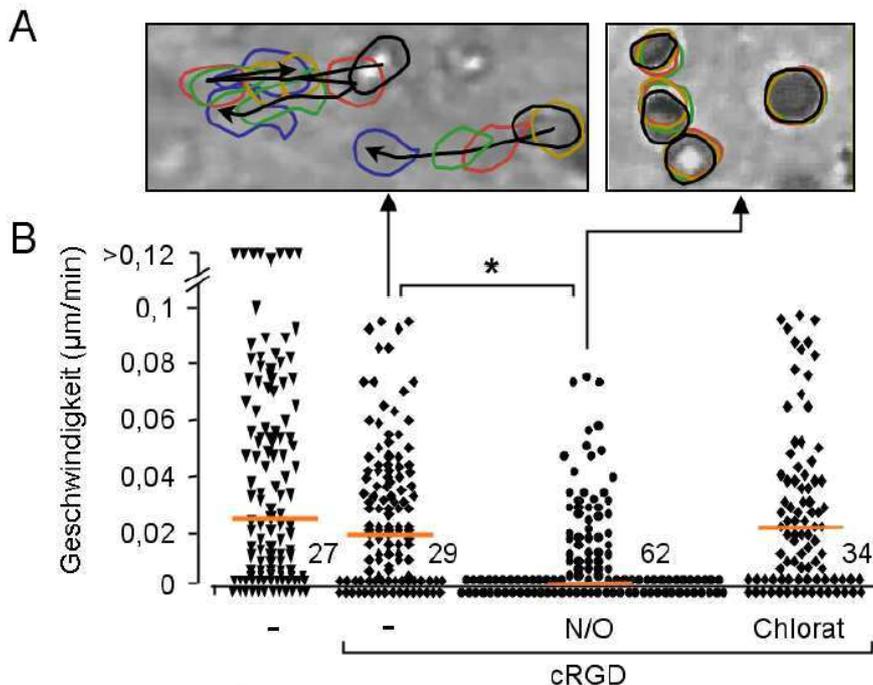


Abbildung 50. Zusammenfassende Zelltracking-Analyse der nichtmigrierenden MV3-Zellen nach unspezifischer Interferenz mit Glykokonjugaten bzw. sulfatierten GAGs

(A) Morphologie und Position zu 5 Zeitpunkten (verschiedenfarbige Zellgrenzen) von MV3-Zellen in Kollagenmatrices, links amöboid migrierend, rechts immobilisiert durch dreifache Behandlung mit Glycosidasen, cRGD, und 4B4 mAk. (B) Migrationsgeschwindigkeiten der Einzelzellen für die ersten 10 Stunden in unterschiedlichen Kulturbedingungen in 3D Kollagenmatrices. Nummern geben den Prozentsatz immobiler Zellen an. Man beachte die relative Häufung vollständig immobiler Zellen bei der dreifachen Behandlung. Die Deglycosylierung verdoppelte ungefähr den Anteil immobiler Zellen gegenüber der Chloratbehandlung. Die Kultivierung im sulfatierungshindernden Chloratmedium verursachte kaum eine Veränderung des Anteils immobiler Zellen verglichen mit alleiniger mAk 4B4 bzw. mAk 4B4 mit cRGD Behandlung, $P < 0,0001$ (*).

4. DISKUSSION

Die Daten zeigen, wie sich die Inhibition der Integrin-vermittelten Zelladhäsion auf die Migration neoplastischer und nicht-neoplastischer Zellen in einem 3D interstitiellen Gewebeäquivalent auswirkt. Die Befunde belegen, dass konstitutiv mesenchymal wandernde Zellen nach Inhibition der Integrinfunktion eine rundlich-amöboide Form annehmen und ein erhebliches Maß an Migration aufrechterhalten. Somit sind Integrine für die mesenchymale Migration bedeutsam, für die amöboide Migrationsform hingegen entbehrlich (Abb. 51A).

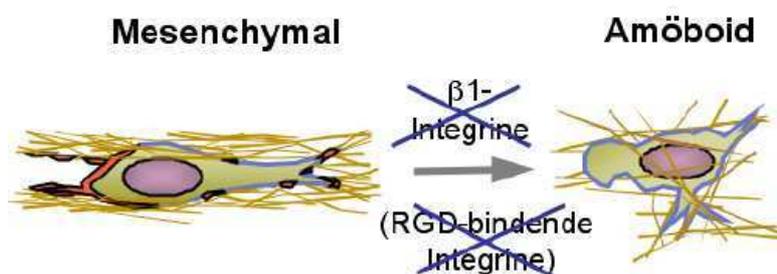


Abbildung 51A. Übergang von mesenchymaler zu amöboider Zellmigration (MAT) nach Hemmung der β 1-Integrinfunktion

Untersuchungen zu den Mechanismen der Restmotilität nach Hemmung der β 1-Integrine zeigen, dass schwache Zell-Matrix-Interaktionen in geringem Umfang von alternativen, RGD-bindenden Integrinen (Abb. 51A), und in größerem Umfang von Oberflächenresiduen der Glycokalyx vermittelt werden (Abb. 51B).

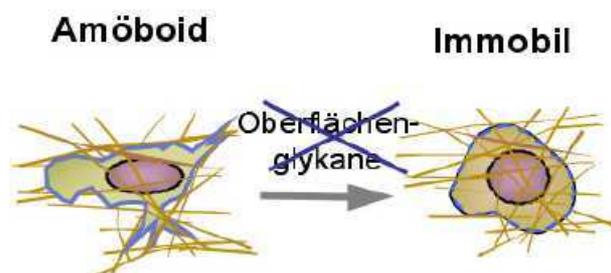


Abbildung 51B. Die gleichzeitige Entfernung von Glycokonjugaten der Zelloberfläche mit Hemmung der β 1- und RGD-bindenden Integrinen immobilisiert die amöboid wandernde neoplastische MV3-Zellen und β 1-Integrin defiziente Fibroblasten in 3D-Kollagenmatrices.

Erst die simultane Hemmung der Adhäsion mittels Integrinen und Glycokalyx führt trotz fortgesetzter Zytoskelettdynamik und passiver Interaktion mit EZM-Fasern zu einer weitgehend von ihrer Gewebsumgebung entkoppelten, immobilisierten Zelle (Abb. 51B). Diese Befunde

zeigen neue Mechanismen der Integrin-unabhängigen Zellmigration in Tumorzellen und Fibroblasten wie auch der Plastizität der Zellmigration.

4.1. Verschiedene Adhäsionsstärken unterstützen mesenchymale oder amöboide Formen der Zellmigration in 3D-Geweben

Das erste Ziel der Arbeit galt der Aufklärung der $\beta 1$ -Integrinfunktion bei der Migration von hochinvasiven MV3-Melanomzellen in einer 3D-Kollagenmatrix.

Wenn auch die Grundlagen der Migration von Fibroblasten und Keratinozyten ursprünglich in 2D-Modellen untersucht wurden, sind die physikalischen Verhältnisse in 3D-Modellen dem lebenden Gewebe ähnlicher. Ein fibrilläres Kollagensubstrat ist ein 3D-Netzwerk, das sowohl den Zellen als ein potenzielles Hindernis entgegenwirkt als auch migrationsfördernde Verankerungspunkte bereitstellt (Friedl et al., 2003). Die diskontinuierliche fibrilläre Struktur der Kollagenfasern bildet die *in vivo* Textur interstitiellen Gewebes realistischer ab als kontinuierlich mit EZM-Komponenten beschichtete Oberflächen. Form und Funktion mesenchymal wandernder Zellen in 3D-Kollagenmatrices rekapituliert in großem Maße mesenchymales Migrationsverhalten *in vivo* (Knight et al., 2000; Wolf et al., 2003a). Somit diente die 3D-Kollagenmatrix als *in vivo*-ähnliche Gewebematrix zur Charakterisierung der zellulären und molekularen Mechanismen der Zellwanderung.

Auf zweidimensionalen Oberflächensubstraten spielen $\beta 1$ -Integrine bei der Zellmigration eine wesentliche Rolle (Palecek et al., 1997; Zamir et al., 2000). Ebenso werden im komplexeren 3D-System die zur Zellwanderung notwendigen Wechselwirkungen zwischen EZM und dem Zytoskelett überwiegend von $\beta 1$ -Integrinen vermittelt (Maaser et al., 1999; Cukierman et al., 2001), jedoch zeigen diese und andere jüngst erschienene Arbeiten, dass im Gegensatz zu 2D-Migrationmodellen die Interferenz mit der $\beta 1$ -Integrinfunktion in 3D-Modellen die Migration nur unvollständig hemmt (Carragher et al., 2006; Zaman et al., 2006).

Integrine bilden vorübergehende Adhäsions- und Signalkomplexe mit dem Aktinskelett, die sowohl die Biomechanik als auch intrazelluläre Signale für die Organisation des Zytoskelettes, der Zellform, der Migration und der Genexpression vermitteln (Palecek et al., 1997; Maaser et al., 1999; Cukierman et al., 2001; Stupack et al., 2001; Hood et al., 2002; Ridley et al., 2003).

Bei der Metastasierung vermitteln die Integrine die Zellinvasion und sind deshalb potenzielle Zielmoleküle für pharmakotherapeutische Interventionen (Keely et al., 1997; Hood et al., 2002; Friedl et al., 2003; Brockbank et al., 2005).

Invasive MV3-Melanomzellen exprimieren ausschließlich $\beta 1$ -Integrine und benutzen überwiegend $\alpha 2\beta 1$ -Integrine für die Migration in der 3D-Kollagenmatrix (Maaser et al., 1999) und den Matrixumbau (Klein et al., 1991). Fibroblasten exprimieren $\beta 1$ - und in geringem

Ausmaß β 3-Integrine, während alle anderen EZM-bindenden Integrine (β 2, β 4 und β 7) fehlen. Somit stellen aufgrund des limitierten Expressionsspektrums beide Zelltypen gute Modelle der mesenchymalen Migration für Interferenzstudien gegen Integrine dar. Während die Hemmung der Integrinfunktion in 2D-Modellen zur Inhibierung der Adhäsion bis hin zur Ablösung der Zellen führt, entwickeln MV3-Zellen und Fibroblasten nach Verringerung oder Blockade der Integrinfunktion in der 3D-Kollagenmatrix typische Merkmale amöboider Migration, insbesondere mit dem Verlust der elongierten, spindelförmigen Morphologie, dem Verlust der Fokalisierung des Aktinzytoskeletts an Zell-Matrix-Kontaktpunkten wie auch der Fähigkeit zur Kollagenkontraktion.

Die detaillierte Analyse der Videofilme zeigte frühzeitig, dass der mesenchymale Phänotyp in MV3-Zellen überwiegt, aber nicht ausschließlich vorlag. Nach Sortierung zeigte die Fraktion mit konstitutiv um ca. 50% niedrigerer β 1-Integrinexpression (β 1^{low}) eine durchweg effiziente amöboide Migration, was β 1-Integrine als entscheidenden „Schalter“ zwischen mesenchymaler bzw. amöboider Wanderung nahelegte. Während die Fokalisierung der Zell-Matrix-Kontakte in β 1^{low}-Zellen im Vergleich zu β 1^{high}-Zellen verringert war, blieb die Migrationsgeschwindigkeit beider Subpopulationen vergleichbar. Dieser Befund wurde durch 50% Saturation der β 1-Epitope mit mAk 4B4 (1 μ g/ml) bestätigt. Somit führt eine moderate Senkung der β 1-Integrin-Oberflächenexpression bereits zu einem Übergang in effiziente amöboide Migration. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich nach Expression eines vermutlich dominant-negativen Peptids der zytoplasmatischen β 1-Integrin-Domäne. Somit führen unterschiedliche Strategien zur Hemmung der Funktion von β 1-Integrinen in invasiven Melanomzellen und Fibroblasten zu einem uniformen Reaktionsmuster der mesenchymal-amöboiden Transition (MAT).

Die optimale Migrationsrate von Zellen auf 2D-Oberflächen hängt von einem Zelltyp-spezifischen mittleren Maß an Adhäsion ab, während die Hemmung der Adhäsion die Migrationseffizienz weitgehend minimiert (DiMilla et al., 1991; Lauffenburger et al., 1996; Cox et al., 1998).

In 3D-Kollagenmatrices dagegen führen verschiedene Strategien der (sub)totalen Inhibition der β 1-Integrinfunktion zu verringerter, jedoch nicht aufgehobener Migration, was einen wesentlichen Unterschied zu etablierten Konzepten zur 2D-Migration ausmacht (Palecek et al., 1997).

Die β 1-Integrinblockade in dieser Arbeit mittels 4B4 mAk (10 μ g/ml) führte zur nahezu vollständigen (95%) Inhibierung der Integrin-vermittelten Adhäsion bei Ausbildung einer elliptoiden Form. Gleichzeitig geht die Fähigkeit zu Kollagenkontraktion und -umbau weitgehend verloren, die Migrationsgeschwindigkeit verringert sich um 50 bis 70%, und es kommt zu Veränderungen der Zytoskelettarchitektur und Integrinverteilung. Dies schließt die

Ausbildung von Konstruktionsringen bei Formanpassung an die Matrixstrukturen ein.

Zur weiteren Charakterisierung der Rolle von $\beta 1$ -Integrinen, insbesondere ob sie für die Zellmigration absolut notwendig sind, verwendeten wir $\beta 1$ -defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEF), denen ein Exon im $\beta 1$ -Integrin-Gen entfernt wurde. Auch hier konnte die Migration in 3D-fibrillärem Kollagen nicht vollständig unterbunden werden. Es erhielt sich eine Restmotilität mit Geschwindigkeiten bis zu $0,2 \mu\text{m}/\text{min}$, vergleichbar dem Niveau der $\beta 1$ -Integrin-positiven Kontrollzellen, ohne dass eine Kontraktion der Matrix erfolgte. Die komplette Ausschaltung des $\beta 1$ -Integrins, die evtl. theoretisch verbleibende Epitope nach Antikörper- oder Rhodocetinbindung generell ausschließt, bestätigt, dass es für die Zellmigration entbehrlich ist. In Parallelversuchen mit ebenfalls $\beta 1$ -Integrin defizienten SV40-transformierten embryonalen Stammzellen (GD25) wurden ähnliche Eigenschaften wie bei obigen MEF beobachtet. Auch die zusätzliche Inhibierung verbleibender EZM-bindender Integrine (αv , $\beta 3$) durch cRGD-Peptid in MV3-Zellen oder $\beta 1$ -defizienten Fibroblasten führte zu keiner relevanten zusätzlichen Hemmung der Migration. Ebenso führte das cRGD-Peptid in MV3-Kontrollzellen zu keiner Beeinträchtigung der mesenchymalen Migration, was eine vernachlässigbare Rolle von $\alpha v\beta 1$ - und $\alpha v\beta 3$ -Integrinen für die mesenchymale wie auch die amöboide Migration nahelegt.

Ähnliche Befunde wurden kürzlich für die EGF-induzierte Migration von Tumorzellen in 3D-Matrigel nach Zugabe von 4B4-Antikörpern dargestellt, jedoch ohne genauere Darstellung der Zell-Matrix-Interaktionen und Konsequenz für Kraftaufbau an der Zellfront (Zaman et al., 2006). Auch hier war die Migrationseffizienz verringert, jedoch nicht vollständig aufgehoben. Die Restmigrationsraten von maximal $0,05 \mu\text{m}/\text{min}$ in Prostatakarzinomzellen ($2,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ mAk 4B4) bzw. $0,4 \mu\text{m}/\text{min}$ in EGFR-überexprimierenden Zellen liegen in der hier beschriebenen Größenordnung, obwohl ein anderes EZM Substrat eingesetzt wurde (Matrigel).

Ein weiterer bekannter Mechanismus der mesenchymal-amöboiden Transition ist die Blockade von Matrixproteasen der mesenchymalen Fibrosarkomzellen, die (bei vermutlich noch intakter Integrinfunktion) nach Übergang in die amöboide Migrationsform bei nahezu unveränderter Geschwindigkeit migrierten (Wolf et al., 2003a).

Proteasen im Allgemeinen sind wichtige Regulatoren bei der Zelladhäsion und beim Zytoskeletumbau (Sternlicht and Werb, 2001 und Ref. dort). Die intrazelluläre Protease Calpain 2 spaltet spezifisch die Bindung von Talin an die zytoplasmatische Domäne der Integrine (Critchley und Gingras, 2008) und bei amöboid migrierenden T-Zellen keine Rolle (Cox et al., 1998). Beim Umsatz der integrin-vermittelten Adhäsion und Ablösung mesenchymal wandernder Zellen von planem 2D-Substrat oder fibrillärer Kollagenmatrix wird die fokale Adhäsion durch Calpain 2 gelöst, wie beschrieben für den MAT in H1080-Fibrosarkomzellen (Carragher et al., 2006).

Die Stärkung des kortikalen Aktinzytoskeletts auf Kosten fokaler Adhäsionen kann ebenfalls zu amöboider Migration führen. Das Protein RhoA zusammen mit der RhoA Effektor Kinase (ROCK) verursachen in einem 3D-Matrigelmodell über einen Anstieg von Myosin II-vermittelter Aktinstabilisierung eine kortikale Aktinpolymerisierung bzw. -kontraktion (Katoh et al., 2007). Dies führt in 3T3-Fibroblasten und HT1080 Fibrosarkomzellen zu einer Mesenchymal-Amöboiden Transition wie auch nunmehr proteaseunabhängiger Wanderung (Tran Quang et al., 2000; Sahai et al., 2003; Carragher et al., 2006). Somit führen mehrere Mechanismen zum Übergang von mesenchymaler in eine amöboide Migrationsform.

Die hier beschriebene β 1-Integrin-unabhängige amöboide Migration weist gewisse Ähnlichkeiten mit migrierenden Leukozyten, zirkulierenden Stammzellen und dem Amöbenstadium von *Dictyostelium discoideum* auf (Alexopoulos et al., 1996; Friedl et al., 1998 und 2001; Lämmermann et al., 2008). Gemeinsam sind ihnen eine elliptoide Zellform mit oszillierenden kleinen Pseudopodien an der Vorderfront, der Übergang des fokalisiertes in ein diffus-kortikales Aktinzytoskelett, die gleichmäßige Verteilung von β 1-Integrinen ohne Fokalisierung und der Verlust der Fähigkeit zur Kollagenkontraktion, was die gemeinsame Klassifikation als „amöboid“ rechtfertigt.

4.2. Mechanismen der amöboiden Migration

Die zellulären und molekularen Mechanismen der amöboiden, integrinunabhängigen Migration in 3D-Geweben sind bisher unvollständig verstanden und ein kontrovers diskutiertes Thema (Friedl und Bröcker, 2004). Mehrere potentielle Mechanismen wurden bisher angenommen. Mechanismen biochemischer Natur sind 1) schwache Protein-Protein- und Kohlenhydrat-Protein Interaktionen an der Zelloberfläche und 2) niedrig-affine Signalkomplexe des Zytoskeletts, welche Zell-EZM Interaktionen regulieren (Zimmerman et al., 2002, Vaynberg et al., 2005, Cohen et al., 2006). Alternative, nicht-adhäsive Mechanismen beinhalten Änderungen der Zellform (Lämmermann et al., 2008).

4.2.1. Integrinunabhängige Migrationmechanismen in anderen metazoischen und protistischen Zellen

Nicht-aktivierte, ruhende T-Lymphozyten haften generell nur schwach an 2D-Kollagensubstraten an und sind daher weitgehend unfähig zur Migration (Übersichtsartikel von Wilkinson et al. 1982). Die schwache Bindung dieser Zellen konnte am besten durch die niedrige Expression der Kollagenbindenden α 1- und α 2-Integrine erklärt werden (Shimizu et al., 1990; Goldman et al., 1992; Friedl, 2001). T-Lymphozyten können im dreidimensionalen Gewebe *in vitro* und *in vivo* sehr schnell wandern (10 μ m/min) (Haston et al., 1979; Mempel et al., 2004; und Woolf et al.,

2007). Wilkinson et al. (1982) vermuteten dabei eine Zellmigration mittels nicht- oder niedrigadhäsiver Mechanismen, was später durch fehlende Effektivität einer Antikörper-basierten Integrinblockade ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ und αv) für die Migration humaner T- Lymphozyten und das Fehlen fokaler Kontakte im 3D-Kollagenmodell (Friedl et al., 1998) bestätigt wurde. Auch konnte *in vitro* und *in vivo* eine intakte Migration nach Deletion von $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ - und $\beta 7$ -Integrinen beobachtet werden (Lämmermann, 2008). Integrinblockade oder Integrindeletion zeigte weder Effekte auf Zellpolarisierung, Integrinverteilung, Kollagenbindung, Migrationspfad und -geschwindigkeit noch auf die Anzahl wandernder T-Lymphozyten (Friedl et al., 1998a, c; Lämmermann, 2008).

Als wahrscheinlich wesentliche Mechanismen der Integrin-unabhängigen Migration werden die von uns und anderen beobachteten Zellformänderungen und die Bildung von Konstriktionsringen (Einschnürungen an EZM-Engstellen), laterale Membranausstülpungen mit kurzfristiger Verankerung in der 3D-EZM sowie Zytoplasmaströmungen diskutiert (Wilkinson et al., 1982; Haston et al., 1982; Mandeville et al., 1997; Friedl et al., 2001; Lämmermann, 2008). Jedoch war bisher ungeklärt, ob neben diesen physikalischen Mechanismen noch weitere, niedrig adhäsive Zell-Matrix-Interaktionen unabhängig von Integrinen für die Zellmigration von Bedeutung sind.

$\alpha v\beta 3$ -Integrin ist bei der 2D-Migration der Neutrophilen auf Fibronectin entscheidend, was durch spezifische Antikörper gehemmt wurde (Rainger et al., 1999). Neutrophile können auf 2D-Substraten nicht ohne $\beta 2$ -Integrine adhären und wandern. Wenn jedoch eine zweite Glasplatte von oben den Zellkörper berührt und der Zwischenraum kleiner als 5 μm war, also passend zum Durchmesser der Neutrophilen (6,5-8 μm), erfolgte die Migration durch Formveränderung, gequetscht und ohne Mithilfe von $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, oder $\beta 3$ -Integrinen (Malawista et al., 1997 und 2000). Die Voraussetzung der Integrinunabhängigkeit war dabei eine bilaterale Interaktion der Zelle mit beiden Glasplatten (Malawista et al., 1997), somit die Minimalversion eines 3D-Migrationsmodells. Eine ähnliche morphodynamische Migrationsform wurde für Neutrophile in Amnionmembranen beschrieben, jedoch ohne Inhibitionsstudien gegen Integrine (Mandeville et al., 1997). In den Versuchen von Lämmermann et al. (2008) mit murinen Leukozyten erwiesen sich Integrine in der 3D-EZM im Gegensatz zu 2D als nicht notwendig. Zusammengefasst setzt die Integrin-unabhängige Migration eine 3D-Umgebung voraus.

„Physikalische“ Mechanismen der Zell-Matrix-Interaktion sind bisher wenig definiert, tragen wahrscheinlich aber zur Migration von Leukozyten wie T-Zellen, Neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen im biophysikalisch komplexen 3D-Gewebe bei. Ähnlich der Amöbe *Dictyostelium* entwickeln sie niedrig-affine oder nicht-adhäsive Kontakte mittels Formanpassung, -änderung, aktinreiche Membranausstülpungen, Zytoplasmaströmungen oder durch Einschnürung an Engstellen der EZM (Konstriktionsringe) (Brown, 1982; Haston et al., 1982; Gunzer et al., 1997; Mandeville et al., 1997; Friedl et al., 2003).

4.2.2. Funktion der Oberflächenglycokalyx in der amöboiden Migration

Aufgrund der Dominanz der Integrine bei der Mechanotransduktion und Migration während der Morphogenese, sowie bei der Regeneration und Tumorinvasion in den meisten Modellsystemen sind zusätzliche, niedrigaffine Mechanismen bislang wenig charakterisiert. Als Basismodell der Untersuchung niedrigaffiner Zell-Matrix-Interaktionen dienten MV3-Zellen und MEF nach Hemmung von β 1- und cRGD-abhängigen Integrinen. Die Befunde zeigen, dass die amöboide Restmigration von schwachen Interaktionen, v.a. über Oberflächen-Glycane aufrechterhalten bleibt, die Zellmigration, nicht aber die Kontraktion der Kollagenmatrix vermitteln.

Um möglichst viele Oberflächen-Glycane nahe der Bindung an die Polypeptidkette selbst in einem Schritt abzuspalten, ohne dabei lebende Zellen zu schädigen, kamen zwei Endoglycosidasen gleichzeitig zur Anwendung. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen bewirkten keine verstärkte Apoptose bzw. Zytotoxizität.

Die benutzte Peptid-N-Glycosidase F (PNGaseF, Peptid-N4-(N-Acetyl-beta-Glucosaminy)l Asparagin-Amidase, EC-Nummer 3.5.1.52) spaltet GlcNAc-Asn-Bindungen und kann so alle Arten N-glycosidisch gebundener Glycanseitenketten entfernen, mit Ausnahme solcher mit modifiziertem Asparagin oder mit α 1,3-Fucosylierungen (Dwek et al., 1993). Endo- α -N-Acetylgalactosaminidase (O-Glycosidase, EC-Nummer 3.2.1.97) entfernt O-verknüpfte Polysaccharidketten durch Hydrolyse der Bindung des Core-Disaccharids Gal β 1-3GalNAc an Serin oder Threonin. O-Glycosylierungen sind bei weitem diverser als N-Glycosylierungen, was deren Analyse weitaus schwieriger gestaltet (Kannicht, 2002) Mit der gleichzeitigen Anwendung von N- und O-Glycosidase werden wesentliche glycosidische Bindungen gespalten, jedoch werden aus biochemisch-sterischen Gründen einige Glycan-Spezifitäten nicht erreicht. Als Indikatoren für die Effizienz des Glycanverbaus wurden endständige Heparansulfat (HS), Chondroitinsulfat (CS) und Sialinsäurereste nachgewiesen, in der Annahme, dass mit dem Epitopverlust die gesamte Glycan-Kettenlänge bis zur Spaltungsstelle entfernt wurde.

PNGase F-Behandlung trug zu einer um ca. 60% verringerten Oberflächendetektion sulfatierter Glucosamine oder sulfatierter D-Glucuronsäure-N-Acetylgalactosamine (über spezifische Antikörper) bzw. negativ geladener Zuckerreste in der Rutheniumrot-Färbung bei. Prinzipiell kann PNGase F alle N-glycosidisch gebundene Zuckerketten abbauen, inklusive folgender GAGs:

- a) negativ geladene Zuckerketten der Klasse I im Sinne von Sundblad et al. (1988) und Norgard-Sumnicht et al. (1995)
- b) sulfatierte GAGs der Klasse II (Norgard-Sumnicht et al., 1995, Varki, persönliche Mitteilung)
- c) Keratansulfatketten des Typs I (Funderburgh, 2000)

Optional befinden sich am GlcNAc-Asn laterale α 1,3- und/oder α 1,6- Fucosylierungen (sogenannte Core-Fucosylierung der Mannose₍₃₎-N-Acetylglucosamin₍₂₎ Pentamere). Proximale α 1,3-Fucosylierung behindert die PNGase F (Dwek et al., 1993). Eine solche Fucosylierung ist bei Säuger-Glycoproteinen aber kein Problem, weil die α 1,3-Fucosylierung dort nicht, in Pflanzen jedoch häufig vorkommt (Taylor und Drickamer, 2006), und insbesondere die in Säugern nachgewiesene α 1,6-Fucosylierung (Noronkoski und Mononen, 1997; Kudo et al., 2007) PNGase F nicht inhibiert (D. Bechtloff, Merck Chemicals Ltd., persönliche Mitteilung).

Endo- α -N-Acetylgalaktosaminidase (Umemoto et al., 1977; Fujita et al., 2005) spaltet alle unsubstituierten O-glycosidisch verknüpften Galactosyl- β 1,3-N-Acetyl-D Galaktosamin (Gal β 1,3GalNAc) Disaccharide ab. Dieses Disaccharid tritt als proximales Core 1 Disaccharid der Glycoproteine des Mucin-Typs auf und ist im Allgemeinen mit der Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin verbunden (Taylor und Drickamer, 2006). O-gebundenes N-Acetyl-Glucosamin (Taylor und Drickamer, 2006), oder seltene O-gebundene Mannose, -Glucose, -Fucose, -Xylose, und -Galactose, gekoppelt an Asparagin oder Tyrosin (Taylor und Drickamer, 2006), werden dagegen nicht gespalten. Da HS- und CS-Ketten in Proteoglycanen meist über Xylose O-glycosidisch an Polypeptidketten gebunden sind, sollten sie durch die eingesetzte O-Glycosidase somit nicht erreicht werden. Deshalb ist der scheinbare Verlust eines Großteils an HS als Bestandteil sulfatierter GAGs zunächst überraschend. Weiterhin sind N- und O-Glycosidase ineffektiv gegen Glycolipide und Hyaluronan.

Durch die Behandlung der MV3-Zellen mit N- und O-Glycosidase wurde die Sialinsäure um 85%, die HS und CS Oberflächen-Detektion jeweils um 100% reduziert. Bei MEF lag die Verringerung jeweils bei minus 85%, 50%, und 60% (in gleicher Reihenfolge). Sialinsäuren sind immer terminal oder lateral an N- und O-verknüpften Glycanen gebunden. Der Verlust aller Sialinsäurereste spricht demzufolge für die Effizienz der benutzten Glycosidasen.

Die meisten Studien behandeln Glycokonjugate im denaturierten Zustand, während hier auf lebenden Zellen native Glycokonjugate in einer räumlichen Komplexität vorliegen. Dieser Umstand erschwert wahrscheinlich die Erreichbarkeit durch die Glycosidasen und könnte deren Spezifitäten und Effizienzen ändern. Die bekannten Spezifitäten der benutzten Enzyme sind auf unsere Befunde nicht notwendigerweise direkt übertragbar.

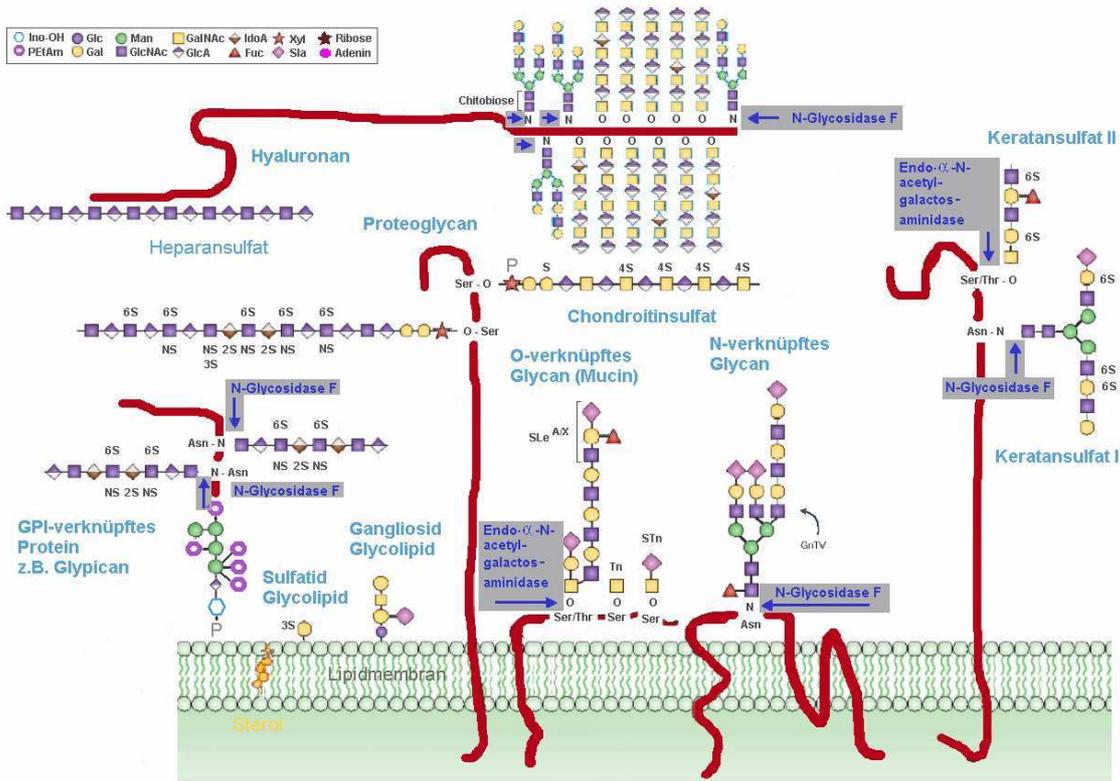


Abbildung 52. Glykokonjugate der Tumorzelloberfläche und spezifische Spaltstellen für N-Glycosidase F und Endo α -N-Acetylgalactosaminidase (modifiziert nach Fuster und Esko, 2005; Taylor und Drickamer, 2006).

Alle nicht abgedauten Glycosylierungen können prinzipiell eine Rolle bei der Vermittlung von Restmotilität spielen. Sulfatierte Glykokonjugate interagierten mit Komponenten der EZM, beispielsweise mit fibrillärem Kollagen (Faassen et al. 1992; Zimmerman et al. 2002; Koda et al. 1985). Somit könnte die nach Verlust oder Hemmung der Integrinfunktion verbliebene Zell-Matrix Interaktion auf sulfatierten Glycanen beruhen. Um bei MV3-Zellen spezifisch die Rolle der Sulfatierung zu zeigen, verwendeten wir eine etablierte Strategie zur Inhibierung der Sulfatierung mittels Vorinkubation in einem sulfatfreien chlorathaltigen Medium (Rapraeger et al., 1994; Humphries und Silbert, 1988; Steer et al., 2004). Um dabei Sulfatquellen weitgehend auszuschließen, benutzten wir ein methionin- und cysteinfreies Medium. Es enthielt 50 mM Natriumchlorat als höchste empfohlene Konzentration (Rapraeger, persönliche Mitteilung). Das Verfahren beruht auf der Eigenschaft des Chlorat-Anions (ClO_3^-) als kompetitivem Hemmer der ATP-Sulfurylase. ClO_3^- konkurriert mit dem Sulfat-Anion (SO_4^{2-}) bei der Synthese von PAPS (3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfate), dem Sulfatdonor bei der Sulfatierung der Zuckerbestandteile von Glykokonjugaten (Proteoglycanen, Glycoproteine, Glycolipide) im

Golgi-Apparat und teilweise ER (Humphries und Silbert, 1988; Honke et al., 1996, 1997, 2004; Hemmerich, 2001). Somit verhindert die Inkubation in einem sulfatfreien chlorathaltigen Medium die *de-novo* Sulfatierung von Glycokonjugaten. Wir gingen davon aus, dass schon auf der Zelloberfläche existierende Glycokonjugate während der 48 stündigen Vorinkubation der Zellen in diesem Spezialmedium abgebaut wurden und mangels *de-novo* Synthese nicht ersetzt wurden. Das verbliebene Signal mittels Rutheniumrot-Detektion (ca. 40%) ist durch weitere verbliebene negativ geladene Gruppen z.B. Carboxyl-Gruppen, (Nagato et al., 1990), frei gebundene Chloratanionen sowie vor allem die für TEM übliche unspezifische Kontrastierung erklärbar.

Der Einsatz von anti-HS mAk (F58-10E4) erlaubt einen Nachweis von HS-Ketten mit sulfatierten N-Glukosaminresten (GlcNS) mittels gekoppelter N-Deacetylase/N-Sulfotransferasereaktion am internem, unsubstituiertem Glucosamin (Herstellerangaben, David et al., 1992). In HS gibt es gewebespezifische und, in geringerem Maße, artspezifische Muster mehr und weniger sulfatierter GAG-Bereiche (W. Booth, AMS Biotechnology, persönliche Mitteilung). Diese wenig definierten Muster, mehr oder weniger ähnlich anzutreffen bei anderen GAGs, sind möglicherweise für eine gewisse Kreuzreaktivität von mAk F58-10E4, beispielsweise mit CS und KS (Produktinformation, Seikagaku), als ursächlich zu betrachten.

Der anti-Chondroitinsulfat-mAk (LY111) bevorzugt Oktasaccharidsequenzen (bzw. minimale Hexasaccharidsequenzen) der Folgen

- a) GlcUA β 1–3GalNAc(6S)–GlcUA β 1–3GalNAc(6S)–GlcUA β 1–3GalNAc(4S)–GlcUA β 1–3GalNAc,
- b) GlcUA β 1–3GalNAc(6S)–GlcUA β 1–3GalNAc(6S)–GlcUA β 1–3GalNAc(4S)–GlcUA β 1–3GalNAc(4S), oder
- c) GlcUA β 1–3GalNAc(6S)–GlcUA β 1–3GalNAc(6S)–GlcUA β 1–3GalNAc(4S)–GlcUA β 1–3GalNAc(6S) (Deepa et al., 2007).

Der anti-CS Antikörper LY111 zeigt keine bekannte Kreuzreaktivität (Produktinformation, Seikagaku).

Sowohl HS- wie auch CS-Epitope waren nach Kultur in sulfatfreiem Medium um 100% reduziert, was spezifischer als Rutheniumrot auf vollständigen Verlust oberflächlicher, also vom Antikörper erreichbarer Sulfatierungen hinweist. Trotz ihrer Stringenz, und obwohl Sulfatierungen an der Interaktion von Zellen mit EZM beteiligt sind (Koda et al., 1985; Faassen et al., 1992; Zimmerman et al., 2002), zeigte die Hemmung der *de novo* Synthese sulfatierter Glycokonjugate keine Hemmung der Integrin-abhängigen mesenchymalen oder β 1-Integrin-unabhängigen amöboiden Migration in MV3-Zellen. Dies schließt eine direkte Beteiligung der Sulfatierungen an der Kraftgenerierung weitgehend aus. Dazu passend lösten sich die MV3-

Zellen nur durch Behandlung mit N- und O-Glycosidasen, nicht aber durch Verhinderung der Sulfatierung, von der Plastikoberfläche der Zellkulturplatten ab. Dies legt nahe, dass Glycane, nicht aber Sulfatreste, die „unspezifische“ Bindung an Plastikoberflächen vermitteln.

Weitere Sulfatierungen der Glycokalyx könnten an Glycolipiden erwartet werden. Die spezifische Zusammensetzung der Glycolipidfraktion der Zelloberflächen in den Zellmodellen wurde hier nicht untersucht. Die im Nervensystem häufigen Sulfoglycolipide (sulfatierte Glycosphingolipide vom Sulfatid-Typ) kommen auch auf bestimmten Tumorzellen vor (Sandhoff et al., 2002; Popovic et al., 2007), z.B. das SM2a Gangliosid-III-Sulfat im Nierenkarzinom (Kobayashi et al., 1993 und 1994). Chlorat sollte auch die Sulfatierung dieser Sulfoglycolipide hemmen, da dies ebenfalls PAPS-abhängig im Golgi Apparat bzw. ER erfolgt (Honke et al., 2004). Aufgrund der räumlichen Lage der Glycolipide wäre zu erwarten, dass die verbliebene Rutheniumrot-Kontrastierung im membrannahen Bereich der Glycokalyx stärker sei als weiter außen. Tatsächlich weist die membrannahe Restkontrastierung mit Rutheniumrot nach Glycanverdau wie auch nach Verhinderung der Sulfatierung auf verbliebene Glycolipide hin, und es ist nicht auszuschließen, dass diese zur Restmigration beigetragen haben könnten. Glycolipid-vermittelte Zell-EZM-Interaktion wäre aber aufgrund der Überlagerung dieser kurzen Glycolipide durch andere Glykokonjugate nur mit Ausübung von Druck durch die EZM ein plausibler Faktor. Der spezifische Nachweis von Sulfoglycolipiden, insofern überhaupt vorhanden, bedarf in Zukunft eines gezielten Nachweises.

Die Abtrennung der MV3-Zellen vom Kulturboden mittels Trypsinierung vor der Glycosidasebehandlung führte zu einem noch stärkeren Rückgang der Messung negativgeladener Glykokonjugate (HS) mit Antikörper (minus 85%) als Trypsinverdau oder N- und O-Glycosidasebehandlung allein (minus 35%). Trypsin spaltet viele Proteine, nicht jedoch Integrine, d.h. auch viele glycosylierte/sulfatierte Zuckerketten. Wegen sterischer Interferenz von geclusterten Molekülen auf der Zelloberfläche erreichen Endoglycosidasen vermutlich nicht alle ihre Zielstrukturen. Partieller Trypsinverdau fördert somit die Effizienz der Glycosidasebehandlung zusätzlich, hat aber keinen Effekt auf die Basismigration bzw. die Integrin-unabhängige amöboide Migration (N. D., unveröffentlichte Beobachtung). Um einen möglichen Effekt der Trypsinierung auf die geringe Restmigration auszuschließen, sind Kontrollversuche mit stringenterem Glycanverdau ohne Einsatz von Trypsin notwendig.

Andere übliche Detektionsmethoden, insbesondere die Isolation der Membrankompartimente wurden ausgeschlossen, da mit dem Glycanverdau Oberflächenmembranen, nicht aber intrazelluläre Vesikel erreicht wurden und somit die Detektion eine isolierte Betrachtung der Oberflächenmembran erfordert. Die gleiche Einschränkung gilt für die Analyse mittels Western Blot oder Massenspektrometrie. Der Versuch, mittels Perjodat-Reaktion Zuckerstrukturen der Zelloberfläche zu markieren war ebenfalls nicht erfolgreich, da die gesamte Zelle durchgefärbt

war (P. Friedl, persönliche Mitteilung). Die Spezifität und die Bindungseigenschaften der Antikörper und des Rutheniumrots erlauben also keine vollständige und topografisch komplett kontrollierte Darstellung verbliebener Oberflächenzucker. Somit schränken technisch bedingte Limitierungen der Handhabung lebender Zellen eine stringente Entfernung der Glycane und damit die Bewertung ihres Beitrags zur Zellmigration ein. Nichtsdestotrotz ergeben sich deutliche Hinweise auf die Bedeutung der Glycokalyx bei der integrin-unabhängigen Migration. Obwohl ein Teil der Oberflächenglycane von der enzymatischen Behandlung nicht erreicht wurde, genügte dieses Restniveau nicht, um die Integrin-unabhängige Migration vollständig aufrecht zu erhalten. Ein Drittel der β 1-Integrin-unabhängig migrierenden Zellen war nach Glycanverdau immobilisiert bzw. zeigte ein „running on the spot“-Verhalten und somit am ehesten entkoppelt von der EZM. Die Restmotilität des verbleibenden Drittels der Zellen war ebenfalls deutlich verringert, verglichen mit nicht-Glycanase-behandelten Kontrollzellen. Somit war der Anteil enzymatisch entfernter N- und O-Glycane hinreichend, um mit der Migrationskapazität zu interferieren. Diese Effekte waren jedoch nicht toxischer Natur, da in Kontrollzellen (ohne zusätzliche Integrinblockade) die Rate migrierender Zellen, ihre Geschwindigkeit sowie mesenchymale Morphologie durch Glycanverdau nicht beeinträchtigt waren.

Der Mechanismus der Kraftvermittlung zwischen Oberflächenglycanen und Kollagenfasern ist unbekannt. Grundsätzlich ist die Interaktion monomerer Kohlenhydrate mit Proteinen, z.B. dem Kollagen, schwach mit Dissoziationskonstanten im millimolaren oder hohen mikromolaren Bereich (Quiocho, 1993). Multivalente Bindungen ergeben sich aus Interaktionen mehrerer ligandenbindenden Regionen auf einem Rezeptormolekül mit Ligand(en) bzw. Arrays von Liganden (Lee und Lee, 1994; Lundquist und Toone, 2002; Houseman und Mrksich, 2002). Jede einzelne Bindung kann dabei niedrigaffin sein, jedoch ergeben diese in Kombination (Multivalenz) eine weit höhere Avidität, ein Phänomen auch bekannt als Clustereffekt. Folglich können multivalente Zuckerketten bis zu 10^6 Mal stärker binden als monovalente Formen (Monsigny et al., 2000; Lee und Lee, 2000).

Dictyostelium discoideum (Mycetozoa) ist ein etabliertes Modell der amöboiden Migration. Im Gegensatz zu Säugetierzellen ist bei *Dictyostelium* kein natürlicher, spezifischer Kollagenrezeptor bekannt (Fey et al., 2002), trotzdem sind *Dictyostelium*-Zellen zu einer effizienten Motilität in 3D-Kollagenmatrices in der Lage (K. Bührle, unpubliziert). Eine Plausibilitätsüberlegung, ausgehend von *Dictyostelium*, führte uns zur Hypothese Glycan-vermittelter Migration. Zellulose, das β -1,4 Polymer unmodifizierter Glucose, ist auf *Dictyostelium* ein wesentliches extrazelluläres Glycan. In der vegetativen Phase migrieren Amöben auf diversen natürlichen Substraten (Alexopoulos et al., 1996; Kessin, 2001), um Bakterien, Pilze, Protisten u.a. zu erreichen und phagozytieren. Die Bindungsmechanismen

zwischen *Dictyostelium* und der Umgebung in der vegetativen Phase sind noch unklar (Wilkins und Williams 1995; Fey et al., 2002).

Wie auch andere Eukaryonten hat *Dictyostelium* konstitutiv N-Glycane, die während der vegetativen amöboiden Phase kaum modifiziert werden (Varki et al., 1999). Eine verstärkte Bildung und Modifikation (Sulfatierung, Fucosylierung) der Glycoproteine findet statt, sobald die Zellen mit der Phase der Fruchtkörperbildung in einen multizellulären Zustand übergehen (Varki et al., 1999). Auch auf der Ebene der Proteine gibt es bekannte Homologien zu Mammalia. Kürzlich wurde eine Familie von fünf entfernt integrinhomologen Genen (*SIB*, Similar to Integrin beta) charakterisiert, wovon zumindest *SibA* auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Cornillon et al., 2006). Des Weiteren ist auch mit *SadA* (Substrate Adhesion-Defizient) ein weiteres die Adhäsion regulierendes Oberflächenprotein bekannt (Fey et al., 2002). Bereits 1995 wurde auch ein Talinhomolog entdeckt (Kreitmeier et al., 1995). Talin-defiziente Amöben zeigen Defekte beim Phagozytieren von Nahrung und bei der Zell-Substrat-Adhäsion (Niewöhner et al., 1997). Da *Dictyostelium* über verschiedene, wenig definierte Substrate migriert, wäre eine hohe Spezifität für bestimmte Liganden oder eine hohe Adhäsionsstärke eher hinderlich. Welche dieser Mechanismen tatsächlich an der Adhäsion und welche nur regulierend eingreifen ist unklar.

Möglicherweise haben sich in der Evolutionsgeschichte Prinzipien der Zell-Substrat und Zell-Zell Interaktionen zunächst ohne Integrinfunktion entwickelt, die erst später mit Entwicklung stabiler multizellulärer Organismen durch spezielle EZM-Proteine und komplementäre zelluläre Rezeptoren ergänzt wurden. Demnach könnten höher entwickelte Säugetierzellen, neben dem phylogenetisch „neueren“ Integrin-System, weiterhin über evolutionär ältere molekulare Motilitätsprogramme verfügen.

Ausgehend von den Daten dieser Arbeit, in Zusammenschau mit *Dictyostelium*, stellt die Glycokalyx der Zelloberflächen den plausibelsten und am wenigsten spezifischen Mechanismus der niedrigaffinen Interaktion mit extrazellulärer Umgebung dar. Die Glycokalyx entspricht einem dichten, wahrscheinlich weichen Oberflächenschleim, der sich physikalisch und über nicht-kovalente Interaktionen an sehr unterschiedliche Substrate anlagern und anschmiegen kann. Die am weitesten aus der Glycokalyx herausragenden Glycokonjugate haben das höchste Potenzial zur Bildung initialer multivalenter Interaktionen. Dabei ragen folgende Glycokonjugate der Glycokalyx wahrscheinlich am weitesten heraus: a) Hyaluronan, Aggrecan und ähnliche Konstrukte, b) Proteoglycane mit GAG-Seitenketten und c) GPI-(Glycolipid) verankerte langkettige Glycoproteine (CD44, CD43). Kurze N- und O-verknüpfte Glycoproteine vom Mucin-Typ (Taylor und Drickamer, 2006) sind von mittlerer und reine Glycolipide von kurzer Länge und damit am membrannähesten. Hierzu passend wird die initiale Adhäsion von Zellen an Fibronectin, noch vor Ausbildung fokaler Kontakte, über (von uns nicht direkt getesteter) Hyaluronsäure vermittelt (Zimmerman et al., 2002; Cohen et al., 2003, 2004 und 2006). Jedoch

ist nicht ausgeschlossen, dass auch kürzere Glycane zur Substratbindung beitragen, insbesondere infolge Druckes von außen, etwa durch Kollagenfasern an mechanisch engen Stellen im Gewebe. Glycosylierung trägt wesentlich zur korrekten Konformation und räumlichen Ausrichtung von Integrinen und anderen Proteinen bei (Taylor und Drickamer, 2006). Somit könnte der Abbau konformationserhaltender Zuckerketten den Proteinkomplex destabilisieren und so Zell-Matrix-Interaktionen beeinträchtigen. Zumindest eine Funktionsbeeinträchtigung Integrin-vermittelter Migration wurde in Kontrollversuchen weitgehend ausgeschlossen, jedoch könnten andere Nicht-Integrinrezeptoren durch Glycanverdau beeinträchtigt sein und ihre promigratorische Funktion verlieren.

4.2.2.1. Mögliche Mechanismen der Restmigration nach Glycanverdau

Inzwischen durchgeführte Messungen mittels Rasterkraftmikroskopie zeigen Bindungsstärken zwischen hochmolekularen Glukosepolymeren mit Kollagenfasern im hohen piko-Newtonbereich (P. Friedl, persönliche Mitteilung). Somit interagieren polymere Zuckerketten mit Kollagenfasern in unerwartet hoher Bindungsstärke. Die hier erhobenen funktionellen Daten zeigen somit, dass Oberflächenglycane als alternative Adhäsionsstrukturen angesehen werden müssen, die nach Integrinverlust die Interaktion mit der EZM und langsame amöboide Migration vermitteln. Die Bindungsstärken an Kollagen sind vergleichbar mit der Interaktion oligomerer β 2-Integrine von Leukozyten mit ICAM als Liganden auf Endothelzellen (Wojcikiewicz et al., 2006). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Glycosylierungen eine bedeutende Rolle mittels multivalenter unspezifischer Bindung spielen können.

Nach Zwei- bzw. Dreifachinterferenz blieb in einer Subpopulation der Zellen weiterhin eine langsame, amöboide Restmigration erhalten, deren Ursache experimentell bisher ungeklärt ist. Mögliche Mechanismen beinhalten nicht verdaute, auf der Zelloberfläche verbliebene Glycane, sowie physikalische Mechanismen wie Actinfluss und Myosin-medierte Kontraktilität (Lämmermann et al., 2008).

Die Mechanismen der amöboiden Migration sind wahrscheinlich vielfältig, und daran sind Oberflächenglycane wahrscheinlich wesentlich beteiligt. Diese Funktion der N- und O-Glycane gilt für Tumorzellen wie auch für nicht-neoplastische Fibroblasten, somit könnte dies ein generelles, Zelltyp-übergreifendes Prinzip sein. Inzwischen durchgeführte Untersuchungen zeigen, dass die Integrin-unabhängige amöboide Migration in MV3-Zellen und MEF auch über polare Filopodien oder Blebs mit Kollagenfasern interagieren (P. Friedl, unveröffentlicht).

Biophysikalische Interaktionen tragen wahrscheinlich eine wesentliche und bisher unterschätzte Funktion für die Migration von Zellen in 3D-Geweben. In 3D-Kollagenmatrices bilden Bläschen (rundlichen Membranausstülpungen, „Blebs“), vordere und laterale Membranausstülpungen

(„Footholds“) zwischen den Kollagenfasern, wodurch sich der Zellkörper physikalisch am umgebenden Gerüst verankert, vorzugsweise an der Zellvorderfront (‘elbowing’) (Mandeville et al., 1997). In *Dictyostelium* führt die Anhäufung des Alarmons cAMP zu rundlichen Blebs und verlängerten Pseudopodien (analog zu Filopodien in Mammalia) (Yoshida und Soldati 2006; Langridge und Kay, 2006).

Unsere Daten bestätigen, dass Einzelzellen zwei verschiedene Migrationsprinzipien annehmen können, abhängig von der Menge verfügbarer β 1-Integrine auf der Zelloberfläche:

(1) Mesenchymale spindelzellige Migration mit Clusterbildung von β 1-Integrinen an Kontaktstellen zu Fasern, polarisierter Adhäsion und Fasertraktion, die zu Matrixumbau und proteolytischen Matrixdefekten und letztlich zu Kollagenkontraktion führt (Maaser et al., 1999).

(2) Amöboide Migration mit rundlicher Zellform und kleinen, kurzen Ausläufern, die mit niedrigen Adhäsionsstärken und ohne Fokalisierung von Integrinen und dem Aktinzytoskelett einhergeht. Amöboide Leukozyten führen diese Form der Migration über Aktomyosinkontraktilität und Formanpassung an Matrixstrukturen aus (‘constriction rings’), nicht jedoch über Integrin-vermittelte Zelladhäsion (Wolf et al., 2003b; Friedl et al., 1998c; Lämmermann et al., 2008).

Die Daten dieser Arbeit zeigen darüber hinaus, dass - abhängig von der Integrinfunktion - diese Migrationsformen ineinander übergehen können. Das Konzept der Plastizität, d.h. Diversität der Zellmigration wurde ursprünglich im Zusammenhang mit der Rolle von Oberflächenproteasen etabliert (Wolf et al., 2003a; Friedl, 2004) und nun auf die Rolle von Adhäsionsmolekülen erweitert.

4.2.3. Implikationen integrinunabhängiger Zellmigration für die Tumorthherapie

4.2.3.1. Ausblick auf anschließende Versuchsmöglichkeiten

Die Rolle der Glycokalyx bei residueller amöboider Migration weist darauf hin, dass Säugetierzellen ihre evolutionär ursprüngliche Substratbindung und die Migrationsmechanismen bewahrt haben könnten (Wang et al., 2001; Eichinger et al., 2005). Der Übergang von mesenchymaler zu amöboider Migration reflektiert vielleicht einen experimentell induzierten Schritt rückwärts in der Evolution zu Systemen, in denen vielleicht primär unspezifische Mechanismen Zell-Matrix-Interaktionen vermittelten.

Zur weiteren, stringenteren Charakterisierung sollten zusätzliche Glycosidasen wie z.B. Fucosidase und Sialidase (vollständige Desialysierung aller Zuckerketten) sowie Hyaluronidase in Verbindung mit N- und O-Glycosidasen eingesetzt werden. Ergänzend sollten Strategien erwogen werden, GPI-verankerte Zucker zu entfernen. Ein Nachweis der tatsächlich

abgespaltenen Zucker nach isolierter Markierung von Oberflächenzuckern und Analytik mittels HPLC, MS, oder Lectinarrays wäre wünschenswert, ist aber wahrscheinlich unrealistisch, weil Membranpräparationen immer auch die von extrazellulären Enzymen nicht erreichten intrazellulären Vesikel enthalten. Von besonderer Bedeutung zur Aufklärung der Mechanismen der Glycan-EZM-Interaktion wird sein, weitere Versuche mit der Rasterkraft-Mikroskopie durchzuführen. Damit könnten z.B. auf Mammalia und *Dictyostelium* bekannte und nach enzymatischem Abbau als bedeutsam erkannte Kohlenhydrate auf ihre Bindungsstärke mit EZM-Bestandteilen untersucht werden. Auch die Ausbildung von Blebs auf MV3-Zellen und MEF als mögliche Migrationsmechanismen bedarf einer detaillierteren Charakterisierung.

4.2.3.2. Glykokonjugate in der Tumorthherapie

Die Zellmigration wird über verschiedene Klassen von extrazellulären, zellmembrangebundenen und intrazellulären Molekülen, über spezifische und unspezifische molekulare Interaktionen, und mittels Formänderungen und damit physikalischen Vorgängen vermittelt. Solche Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen sind wahrscheinlich auch von Bedeutung für Tumorzellmigration bzw. -invasion *in vivo*. Ein detailliertes Verständnis der Diversität von Migrationsformen und der zellulären Plastizität in pathologischen und physiologischen Prozessen ist von Bedeutung für die Entwicklung neuer, effizienter, antimigratorischer Tumorthapien. Jedes der beteiligten Moleküle und Vorgänge bietet sich als ein denkbare therapeutisches Ziel zur Adhäsionshemmung und auch als Marker für Diagnose und Prognose an.

Folgende Therapieansätze in Bezug auf Glykokonjugate sind mit den hier beschriebenen Befunden kompatibel bzw. denkbar:

- a) die topische Inhibition der *de-novo* Synthese von Glykokonjugaten, beispielsweise durch Blockade oder Modifikation beteiligter Enzyme (GnTV-Interferenz, Polyamine, Tunicamycin, artifizielle Strukturanaloga wie Peptidomimetika und fehlleitende Zuckermonomere, RNAi, Antikörper (N.D., unveröffentlicht; Weerapana und Imperiali, 2003, Brown et al., 2003; Fuster und Esko, 2005);
- b) Inhibition der Funktion von Glycanen mittels Antikörper oder antagonistischen Peptiden, beispielweise gegen MUC1-Mucine (Musselli et al, 2002; Hollingsworth und Swanson, 2004; Ramanathan et al., 2005);
- c) kompetitive Inhibition, z.B. mittels systemischer Heparinisierung, wobei Heparin vermutlich als Substrat für Tumorheparanase mit EZM-HSPG konkurriert (Kakkar, 2003; Fuster und Esko, 2005) oder andere, synthetische Heparansulfat-Kompetitoren, die aufgrund der Ähnlichkeit zu HSPG mit diesen konkurrieren (Fuster und Esko, 2005);

d) Modifikation der Sulfatierung, z.B. verringert die Endosulfatase Hsulf-1 die Sulfatierung der HSPGs (Lai et al. 2003);

e) Gentherapie zur Expression hyalouranonbindender Proteine (Misra et al., 2003; Toole, 2004). Wegen Redundanzen und anpassungsfähiger Diversität in komplexen mechanischen Zusammenhängen der Zellmotilität sind einzelne Verfahren wenig erfolgversprechend, die Migration von Tumorzellen unter klinischen Bedingungen vollständig zu unterbinden. Sinnvolle Kombinationen könnten aus Proteaseinhibition (Wolf et al., 2003a), und Integrinblockade und einer Auswahl aus obigen Methoden der Glycokonjugat-Interferenzen bestehen. Der Aspekt der Integrinblockade kann mittels Antikörpern, Schlangengift-proteinen oder RGD-Peptiden (Monk und Harding, 2005; Rosenow et al., 2008) abgedeckt werden. Aufgrund ähnlicher Migration von neoplastischen Zellen (nach Proteaseinhibition und Integrinblockade) und von Leukozyten (Lämmermann et al., 2008) ist es für den Therapieerfolg von großer Bedeutung, dass diese lebensnotwendigen Immunzellen nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Anti-Migrationstherapien könnten vor allem in prä- und perioperativen Phasen sowie in Kombination mit Chemotherapie zusätzliche Wirksamkeit gegen bereits disseminierte Zellen entfalten. Hierzu sind neben 3D-in-vitro-Untersuchungen auch in-vivo Untersuchungen an Tumor-Mausmodellen notwendig. Es ist jedoch denkbar, dass auch bei Tumoren eine anti-Migrationstherapie erfolgreich sein wird, analog zu neuen Verfahren in der Immuntherapie zur Hemmung der entzündlicher Erkrankungen (Friedl und Weigelin, 2008)

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Migration von Tumorzellen im Bindegewebe erfordert adhäsive Zell-Matrix-Interaktionen, die durch Integrine und andere Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche vermittelt werden. In 3D-Kollagenmatrices benötigen hochinvasive MV3-Melanomzellen überwiegend $\alpha2\beta1$ -Integrine zur Elongation, Adhäsion an den Kollagenfasern und zur Faserbündelung, sowie zur Kraftgenerierung und Migration. Wir haben untersucht, ob die Migration von Tumorzellen in 3D-Kollagenmatrices vollständig durch die Blockade der Integrinfunktion inhibierbar ist, oder ob es kompensatorische Mechanismen gibt, die zur Migration beitragen. Die $\beta1$ -Integrinfunktion wurde durch verschiedene Methoden reduziert: a) durchflusszytometrische Sortierung der Zellen in Subgruppen mit niedriger und hoher $\beta1$ -Integrin-Oberflächenexpression; b) Adhäsionsblockade mit monoklonalem anti $\beta1$ -Antikörper 4B4 oder Rhodocetin, einem selektiven $\alpha2\beta1$ -Integrinantagonist; und c) Expression von dominant-negativen Peptiden zur Blockade der Funktion der $\beta1$ -Integrin-zytoplasmatischen Domäne.

Alle $\beta1$ -Integrin-Interferenzstrategien induzierten einen Übergang der konstitutiv vorhandenen mesenchymalen Migration in einen neuen, amöboiden Migrationstyp (Mesenchymal-Amoeboid Transition, MAT), ähnlich der Migrationsweise von Monozyten oder Lymphozyten. Der Übergang zu amöboider Migration ging einher mit dem Verlust der zellvermittelten Kollagenkontraktion und -reorganisation. Subtotale Inhibition der Integrinfunktion (ca. 50%) durch Antikörper 4B4 ergab eine schnelle (0,3-0,4 $\mu\text{m}/\text{min}$) amöboide Migration, während 90-95%ige Absättigung des $\beta1$ -Integrin-Epitops zu langsamer amöboider Migration (0,03-0,2 $\mu\text{m}/\text{min}$) führte. Induzierte amöboide Migration verursachte eine gleichmäßige Verteilung der $\beta1$ -Integrine auf der Zelloberfläche, ein diffuses kortikales Aktin-Zytoskelett, und war mit einer ausgeprägten Formanpassung der Zelle an die Matrixstrukturen verbunden, die von kleinen Filopodien oder Oberflächenblebs getragen wurde.

Die Befunde wurden für $\beta1$ -Integrin-defiziente murine embryonale Fibroblasten (MEF) und murine embryonale Stammzellen (GD25) bestätigt. $\beta1$ -Integrin-defiziente Fibroblasten zeigten eine schnelle, und GD25 ES-Zellen eine langsame amöboide Migration. Somit erfolgte die amöboide Migration ohne $\beta1$ -Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Interaktionen.

Weil keine vollständige Immobilisierung der Zellen erzielt wurde, haben wir alternative Mechanismen von Zell-Matrix-Interaktionen untersucht, die zur Restaktivität der amöboiden Migration beitragen. Als potentielle Kandidaten wurden αv -Integrine, die an denaturiertes Kollagen binden, und Oberflächen-Glycokonjugate getestet. Es wurden keine promigratorischen Funktionen RGD-abhängiger Integrine (αv oder $\beta3$) mittels zyklischer Arginin-Glycin-Asparaginsäure (cRGD) beobachtet.

Um herauszufinden, welche Rolle die Oberflächen-Glycokalyx bei der Zellmigration spielen, wurden verschiedene Methoden angewandt:

- a) Die an die Proteine gebundenen Glycokonjugate wurden mit Hilfe von N- und O-Glycosidasen von der Oberfläche der lebenden Zellen enzymatisch abgespalten;
- b) um die Sulfatierung der Glycokonjugate zu verhindern, wurden die Zellen in sulfatfreiem Medium

kultiviert. Durch beide Methoden wurde die Bindung von Rutheniumrot an die Zelloberfläche (Glycokalyx) um 60% bzw. die von Heparansulfat der Zelloberfläche um 60% bis 100% reduziert. Nicht die Desulfatierung führte zur Ablösung der Zellen vom Kulturflaschenboden, sondern allein die Behandlung mit N- und O-Glycosidasen. Die gleichzeitige Behandlung von MV3-Melanomzellen mit N-, O- Glycosidase mit Inhibition der $\beta 1$ -, $\alpha v \beta 3$ -Integrine führten zur Abrundung der Mehrzahl der Zellen, gefolgt von oszillierender Immobilität („Running on the spot“) bzw. sehr langsamer Restmigration ($< 0,1 \mu\text{m}/\text{min}$). Dagegen war die Migration der MV3-Zellen nach Kultivierung in sulfatfreiem Medium unverändert. Eine ähnliche Hemmung der Migration erfolgte in $\beta 1^{-/-}$ MEFs nach Glycanverdau.

Folglich sind $\beta 1$ -Integrine essentiell für fokalisierte Zell-Matrix-Interaktionen, für die mesenchymale Migration und den Matrixumbau, während amöboide Migration ohne Beteiligung von $\beta 1$ -Integrinen erfolgt, aber durch niedrigaffine, diffuse Zell-Matrix-Interaktionen von Oberflächenglycanen vermittelt wird. Somit ist die Glycokalyx ein alternatives Adhäsionssystem für die integrin-unabhängige Zellmigration.

6. SUMMARY

Cancer cell migration through connective tissue requires adhesive cell matrix interactions mediated by surface integrins and other adhesion molecules. We investigated whether invasive migration in 3D ECM environments is fully abrogated by blocking integrin functions and whether compensation mechanisms might support migratory rescue. Within 3D collagen matrices, highly invasive MV3 melanoma cells preferentially utilize $\alpha2\beta1$ integrins for elongation, adhesion to collagen fibers, fiber bundling, force generation, and migration. $\beta1$ integrin function was reduced by a) flow cytometric sorting for subsets expressing low integrin levels; b) blocking anti $\beta1$ mAb 4B4 at different concentrations or using rhodocetin, a selective $\alpha2\beta1$ integrin inhibitor; and c) expression of dominant-negative peptides to compete with the $\beta1$ integrin cytoplasmatic domain function.

For migration in 3D collagen lattices, all $\beta1$ integrin-lowering strategies uniformly resulted in conversion from constitutive mesenchymal migration to a novel amoeboid type of migration resembling monocytes or lymphocytes. The conversion to amoeboid movement was accompanied by abrogation of cell-mediated collagen contraction and reorganisation. Inhibition of integrin function by blocking antibody by approximately 50% led to fast (0.3-0.4 $\mu\text{m}/\text{min}$) but near-100% amoeboid migration, whereas 90 to 95% epitope saturation led to slow (0.03-0.2 $\mu\text{m}/\text{min}$) amoeboid migration. Induced amoeboid migration was accompanied by cell shape changes supported by small filopodia and/or surface blebs, uniform distribution of surface integrins and the lack of focalization of the cytoskeleton. Results were corroborated in $\beta1$ -deficient murine embryonic fibroblasts (MEFs) and murine embryonic stem cells (GD25). $\beta1^{-/-}$ MEFs displayed a fast, and GD25 ES cells a slow amoeboid migration. Thus, migration could be sustained without $\beta1$ integrin-mediated cell-matrix interactions.

Because no complete immobilization was achieved, alternative cell-matrix interaction mechanisms underlying residual amoeboid migration were investigated.

As candidates, αv integrins binding denatured collagen and the surface glycoconjugates were tested, yet no promigratory role of RGD dependent integrins (αv or $\beta3$) was found using cyclic tripeptide arginine-glycine-aspartic acid (cRGD). To investigate the role of surface glycoconjugates, we a) enzymatically removed protein-bound glycoconjugates of the living cells using N- and O-glycosidases and b) prevented sulphation of glycoconjugates by culturing cells in sulphate-free medium. Both methods reduced surface Ruthenium red binding by 60% and heparan sulphate surface levels by 60 and 100% respectively, however only N- and O-glycosidase treatment but not desulphation caused cell detachment from the culture flask.

Simultaneous treatment of MV3 melanoma cells with N- and O-glycosidase and inhibition of $\beta1$, $\alpha\text{v}\beta3$ integrins resulted in complete loss of polarity, cell rounding of most cells and oscillating immobility (“running on the spot”), or extremely slow residual migration below 0.1 $\mu\text{m}/\text{min}$. Sulphate-depleted medium alone did not yield any migration reduction in MV3 cells. Similar inhibition after N- and O-glycosidase treatment was obtained in $\beta1^{-/-}$ MEFs.

Summary

In conclusion, $\beta 1$ integrins are sufficient to maintain focalized cell-matrix interactions, mesenchymal migration, and matrix remodelling the abrogation of which supports transition to amoeboid migration mediated by low affinity interactions via surface glycans but not sulphated residues. Thus, the surface glycocalyx provides an alternative adhesion system sustaining integrin-independent amoeboid migration, which may approximate the minimal requirements of cell migration in an interstitial 3D tissue.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott A. (2003) Cell culture: Biology's new dimension. *Nature* **424**: 870-872.
- Albelda S.M. (1993) Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* **68**: 4-17.
- Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. (1996) *Introductory Mycology*. Wiley: Vierte Auflage.
- Argaves W.S., Suzuki S., Arai H., Thompson, K., Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. (1987) Amino acid sequence of the human fibronectin receptor. *J Cell Biol.* **105**: 1183-1189.
- Arnaout M.A. (2002) Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr Opin Cell Biol.* **14**: 641-651.
- Arnaout M.A., Goodman S.L., Xiong J.P. (2007) Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* **19**: 495-507.
- Ballestrem C., Hinz B., Imhof B. A., Wehrle-Haller B. (2001) Marching at the front and dragging behind: differential $\alpha\beta 3$ -integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* **155**: 1319-1332.
- Barsukov I.L., Prescott A., Bate N., Patel B.C., Floyd D.N., Bhanji N., Bagshaw C.R., Letinic, K., Di Paolo, G., De Camilli, P., Roberts G.C., Critchley D.R (2003) PIP kinase type 1 γ and $\beta 1$ -integrin cytoplasmic domain bind to the same region in the talin FERM domain. *J Biol Chem.* **278**: 31202-31209.
- Beauvais D.M., Rapraeger A.C. (2004a) Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. *Reprod Biol Endocrinol.* **2**: 3.
- Beauvais D.M., Burbach B.J., Rapraeger A.C. (2004b) The syndecan-1 ectodomain regulates $\alpha\beta 3$ integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J Cell Biol.* **167**: 171-181.
- Bernfield M., Götte M., Park P.W., Reizes O., Fitzgerald M.L., Lincecum J., Zako M.. (1999) Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* **68**: 729-777.
- Bouvard D., Vignoud L., Dupe-Manet S., Abed N., Fournier H.N., Vincent-Monegat C., Retta S.F., Fassler R., Bloc M.R. (2003) Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1a. *J Biol Chem.* **278**: 6567-6574.
- Brakebusch C., Grose R., Quondamatteo F., Ramirez A., Jorcano J.L., Pirro A., Svensson M., Herken R., Sasaki T., Timpl R., Werner S., Fässler R. (2000) Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on $\beta 1$ integrin expression on keratinocytes. *EMBO J.* **19**: 3990-4003.
- Bretscher M.S. (1996) Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells. *Cell* **87**: 601-606.
- Brockbank E.C., Bridges J., Marshall C.J., Sahai E. (2005) Integrin beta1 is required for the invasive behaviour but not proliferation of squamous cell carcinoma cells *in vivo*. *Br J Cancer* **92**: 102-112.
- Brooks P.C. Montgomery A.M., Rosenfeld M., Reisfeld R.A., Hu T., Klier G., Cheresch D.A. (1994a) Integrin $\alpha\beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **79**: 1157-1164.

- Brooks P.C., Clark R.A., Cheresh D.A. (1994b) Requirement of vascular integrin $\alpha v\beta 3$ for angiogenesis. *Science* **264**: 569-571.
- Brooks S.A., Carter T.M., Royle L., Harvey D.J., Fry S.A., Kinch C., Dwek R.A., Rudd P.M. (2008) Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies. *Anticancer Agents Med Chem.* **8**: 2-21.
- Broussard J.A., Webb D.J., Kaverina I. (2008) Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr Opin Cell Biol.* **20**: 85-90.
- Brown A.F. (1982) Neutrophil granulocytes: adhesion and locomotion on collagen substrata and in collagen matrices. *J Cell Sci.* **58**: 455-467.
- Brown J.R., Fuster M.M., Esko J.D. (2003) in Wong C.H. *Carbohydrate based drug discovery*. Wiley VCH: 883-898.
- Bubb M.R., Senderowicz A.M., Sausville E.A., Duncan K.L., Korn E.D. (1994) Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *J Biol Chem.* **269**: 14869-14871.
- Butler B., Gao C., Mersich A.T., Blystone S.D. (2006) Purified integrin adhesion complexes exhibit actin-polymerization activity. *Curr Biol.* **16**: 242-251.
- Byers H.R. and Fujiwara K. (1982) Stress fibers in cells *in situ*: immunofluorescence visualization with antiactin, antimyosin, and anti- α -actinin. *J Cell Biol.* **93**: 804-811.
- Calderwood D.A. (2004) Integrin activation. *J Cell Sci.* **117**: 657-666.
- Carragher N.O., Walker S.M., Scott Carragher L.A., Harris F., Sawyer T.K., Brunton V.G., Ozanne B.W., Frame M.C. (2006) Calpain 2 and Src dependence distinguishes mesenchymal and amoeboid modes of tumour cell invasion: a link to integrin function. *Oncogene* **25**: 5726-5740.
- Chambers A.F., Groom, A.C., MacDonald I.C., (2002) Metastasis: Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites: *Nat Rev Cancer* **2**: 563-572.
- Chan K.T., Cortesio C.L., Huttenlocher A. (2007) Integrins in cell migration. *Methods. Enzymol.* **426**: 47-67.
- Chandhoke S.K., Williams M., Schaefer E., Zorn L., Blystone S.D. (2004) $\beta 3$ integrin phosphorylation is essential for Arp3 organization into leukocyte $\alpha v\beta 3$ -vitronectin adhesion contacts. *J Cell Sci.* **117**: 1431-1441.
- Chen H., Zou Z., Sarratt K.L., Zhou D., Zhang M., Sebzda E., Hammer D.A., Kahn M.L. (2006) *In vivo* $\beta 1$ integrin function requires phosphorylation-independent regulation by cytoplasmic tyrosines. *Genes Dev.* **20**: 1057-1060.
- Chen Y.T., Holcomb C., Moore H.P. (1993) Expression and localization of two low molecular weight GTP-binding proteins, Rab8 and Rab10, by epitope tag. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**: 6508-6512.
- Chew T.L., Wolf W.A., Gallagher P.J., Matsumura F., Chisholm R.L.A (2002) fluorescent resonant energy transfer based biosensor reveals transient and regional myosin light chain kinase activation in lamella and cleavage furrows. *J Cell Biol.* **156**: 543-553.
- Chua H.H., Yeh T.H., Wang Y.P., Huang Y.T., Sheen T.S., Lo Y.C., Chou Y.C., Tsai C.H. (2008) Upregulation of discoidin domain receptor 2 in nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* **30**: 427-436.

- Cohen M., Klein E., Geiger B., Addadi L. (2003) Organization and adhesive properties of the hyaluronan pericellular coat of chondrocytes and epithelial cells. *Biophys J.* **85**: 1996-2005.
- Cohen M., Joester D., Geiger B., Addadi L. (2004) Spatial and temporal sequence of events in cell adhesion: from molecular recognition to focal adhesion assembly. *Chem Biochem.* **5**: 1393-1399.
- Cohen M, Kam Z, Addadi L, Geiger B. (2006) Dynamic study of the transition from hyaluronan- to integrin-mediated adhesion in chondrocytes. *EMBO J.* **25**: 302-311.
- Collins B.E., Blixt O., Han S., Duong B., Li H., Nathan J.K., Bovin N., Paulson J.C. (2006) High-affinity ligand probes of CD22 overcome the threshold set by cis ligands to allow for binding, endocytosis, and killing of B cells. *J Immunol.* **177**: 2994-3003.
- Cornillon S., Gebbie L., Benghezal M., Nair P., Keller S., Wehrle-Haller B., Charette S.J., Brückert F., Letourneur F., Cosson P. (2006) An adhesion molecule in free-living *Dictyostelium* amoebae with integrin features. *EMBO Rep.* **7**: 617-621.
- Couchman J.R. (2003) Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 926-937.
- Coulie P.G., Somville M., Lehmann F., Hainaut P., Brasseur F., Devos R., Boon T. (1992). Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells. *Int J Cancer* **50**: 289-297.
- Cox E.A. and Huttenlocher A. (1998) Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc Res Techn.* **43**: 412-419.
- Cramer L.P. (1999) Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem Soc Symp.* **65**: 173-205.
- Critchley D.R., Gingras A.R. (2008) Talin at a glance. *J Cell Sci.* **121**: 1345-1347.
- Cukierman E., Pankov R., Stevens D.R., Yamada K.M. (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **294**: 1708-1712.
- Czuchra A., Meyer H., Legate K.R., Brakebusch C., Fässler R. (2006) Genetic analysis of $\beta 1$ integrin "activation motifs" in mice. *J Cell Biol.* **174**: 889-899.
- Danen E.H. (2005) Integrins: regulators of tissue function and cancer progression. *Curr Pharm Des.* **11**: 881-891.
- Danen E.H., van Muijen G.N., van de Wiel-van Kemenade E., Jansen K.F., Ruiter D.J., Figdor C.G. (1993) Regulation of integrin-mediated adhesion to laminin and collagen in human melanocytes and in non-metastatic and highly metastatic human melanoma cells. *Int J Cancer* **54**: 315-321.
- David G., Bai X.M., Van der Schueren B., Cassiman J.J., Van den Berghe H. (1992) Developmental changes in heparan sulfate expression: *in situ* detection with mAbs. *J Cell Biol.* **119**: 961-975.
- David G., van der Schueren B., Marynen P., Cassiman J.J., van den Berghe H. (1992) Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells. *J Cell Biol.* **118**: 961-969.
- Debnath J. and Brugge J.S. (2005) Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* **5**: 675-688.

- Deepa S.S., Yamada S., Fukui S., Sugahara K. (2007) Structural determination of novel sulfated octasaccharides isolated from chondroitin sulfate of shark cartilage and their application for characterizing monoclonal antibody epitopes. *Glycobiology* **17**: 631-645.
- Degani S., Balzac F., Brancaccio M., Guazzone S., Retta S.F., Silengo L., Eva A., Tarone G. (2002) The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J Cell Biol.* **156**: 377-387.
- DeMali K.A., Barlow C.A., Burridge K. (2002) Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol.* **159**: 881-891.
- Dennis J.W., Pawling J., Cheung P., Partridge E., Demetriou, M. (2002) UDP-*N*-acetylglucosamine: α -6-Dmannoside β 1, 6 *N*-acetylglucosaminyltransferase V (*Mgat5*) deficient mice. *Biochim Biophys Acta* **1573**: 414-422.
- DiMilla P.A., Barbee K., Lauffenburger D.A. (1991) Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J.* **60**: 15-37.
- Dwek R.A., Edge C.J., Harvey D.J., Wormald M.R., Parekh R.B. (1993) Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* **62**: 65-100.
- Dwek M.V., Ross H.A., Leatham A.J. (2001) Proteome and glycosylation mapping identifies post-translational modifications associated with aggressive breast cancer. *Proteomics* **1**: 756-762.
- Eble J. A., Beermann B., Hinz H.J., Schmidt-Hederich A. (2001) α 2 β 1 integrin is not recognized by rhodocytin but is the specific, high affinity target of rhodocetin, an RGD-independent disintegrin and potent inhibitor of cell adhesion to collagen. *J Biol Chem.* **276**: 12274-12284.
- Eichinger L., Pachebat J.A., Glöckner G., Rajandream M.A., Sugang R., Berriman M., Song J., Olsen R., Szafranski K., Xu Q., Tunggal B., Kummerfeld S., Madera M., Konfortov B.A., Rivero F., Bankier A.T., Lehmann R., Hamlin N., Davies R., Gaudet P., Fey P., Pilcher K., Chen G., Saunders D., Sodergren E., Davis P., Kerhornou A., Nie X., Hall N., Anjard C., Hemphill L., Bason N., Farbrother P., Desany B., Just E., Morio T., Rost R., Churcher C., Cooper J., Haydock S., van Driessche N., Cronin A., Goodhead I., Muzny D., Mourier T., Pain A., Lu M., Harper D., Lindsay R., Hauser H., James K., Quiles M., Madan Babu M., Saito T., Buchrieser C., Wardroper A., Felder M., Thangavelu M., Johnson D., Knights A., Loulseged H., Mungall K., Oliver K., Price C., Quail M.A., Urushihara H., Hernandez J., Rabinowitsch E., Steffen D., Sanders M., Ma J., Kohara Y., Sharp S., Simmonds M., Spiegler S., Tivey A., Sugano S., White B., Walker D., Woodward J., Winckler T., Tanaka Y., Shaulsky G., Schleicher M., Weinstock G., Rosenthal A., Cox E.C., Chisholm R.L., Gibbs R., Loomis W.F., Platzer M., Kay R.R., Williams J., Dear P.H., Noegel A.A., Barrell B., Kuspa A. (2005) The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**: 43-57.
- Enterline H.T. and Cohen D.R. (1950) The ameboid motility of human and animal neoplastic cells. *Cancer* **3**: 1033-1038.
- Felding-Habermann B., O'Toole T.E., Smith J.W., Fransvea E., Ruggeri Z.M., Ginsberg M.H., Hughes P.E., Pampori N., Shattil S.J., Saven A., Mueller B.M. (2001) Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 1853-1858.
- Fey P., Stephens S., Titus M.A., Chisholm R. L. (2002) SadA, a novel adhesion receptor in *Dictyostelium*. *J Cell Biol.* **159**: 1109-1119.
- Fidler I.J. (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453-458.

- Fransson L.A., Belting M., Cheng F., Jönsson M., Mani K., Sandgren S. (2004) Novel aspects of glypican glycobiochemistry. *Cell Mol Life Sci.* **61**: 1016-1024.
- Friedl P., Noble P.B., Zänker K.S. (1993) Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories. *J Immunol Methods* **165**: 157-165.
- Friedl P., Noble P.B., Zänker K.S. (1995) T Lymphocyte locomotion in a three-dimensional collagen matrix. Expression and function of cell adhesion molecules. *J Immunol.* **154**: 4973-4985.
- Friedl P., Bröcker E.B., Zänker K.S. (1998a) Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells. *Cell Adhes Commun.* **6**: 225-368.
- Friedl P., Zänker K.S., Bröcker E.B. (1998b) Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Techn* **43**: 369-378.
- Friedl P., Entschladen F., Conrad C., Niggemann B., Zänker K.S. (1998c) CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize $\beta 1$ integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur J Immunol.* **28**: 2331-2343.
- Friedl P., Borgmann S., Bröcker E.B. (2001) Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the *Dictyostelium* paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol.* **70**: 491-509.
- Friedl P. and Wolf K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**: 362-374.
- Friedl P. (2004) Preshaping and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* **16**: 14-23.
- Friedl P. and Bröcker E.B. (2004) Reconstructing leukocyte migration in 3D extracellular matrix by time-lapse videomicroscopy and computer-assisted tracking. *Methods Mol Biol.* **239**: 77-90.
- Friedl P. and Weigelin B. (2008) Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol.* **9**: 960-969.
- Fujita K., Oura F., Nagamine N., Katayama T., Hiratake J., Sakata K., Kumagai H., Yamamoto K. (2005) Identification and molecular cloning of a novel glycoside hydrolase family of core 1 type O-glycan-specific endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Bifidobacterium longum*. *J Biol Chem.* **280**: 37415-37422.
- Funderburgh J.L. (2000) Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* **10**: 951-958.
- Fuster M.M. and Esko J.D. (2005) The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **5**: 526-542.
- Fässler R., Meyer, M. (1995a) Consequences of lack of $\beta 1$ integrin gene expression in mice. *Genes Dev.* **9**: 1896-1908.
- Faassen A.E., Schrage J.A., Klein D.J., Oegema T.R., Couchman J.R., McCarthy J.B. (1992) A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol.* **116**: 521-531.

- Galvez B.G., Matias-Roman S., Yanez-Mo M., Sanchez-Madrid F., Arroyo A.G. (2002) ECM regulates MT1-MMP localization with $\beta 1$ or $\alpha v \beta 3$ integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells. *J Cell Biol.* **159**: 509-521.
- Garcia-Alvarez B., de Pereda J.M., Calderwood D.A., Ulmer T.S., Crichtley D.R., Campbell I.D., Ginsberg M.H., Liddington R.C. (2003) Structural determinants of integrin recognition by talin. *Mol Cell* **11**: 49-58.
- Garzino-Demo P., Carrozzo M., Trusolino L., Savoia P., Gandolfo S., Marchisio P.C. (1998) Altered expression of $\alpha 6$ integrin subunit in oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant lesions. *Oral Oncol.* **34**: 204-210.
- Giannone G. and Sheetz M.P. (2006) Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends Cell Biol* **16**: 213-223.
- Ginsberg M.H., Partridge A., Shattil S.J. (2005) Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol.* **17**: 509-516.
- Goldman R., Harvey J., Hogg N. (1992) VLA-2 is the integrin used as a collagen receptor by leukocytes. *Eur J Immunol.* **22**: 1109-1114.
- Granovsky M., Fata J., Pawling J., Muller W.J., Khokha R., Dennis J.W. (2000) Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice. *Nat Med.* **6**: 306-312.
- Graus-Porta D., Blaess S., Senften M., Littlewood-Evans A., Damsky C., Huang Z., Orban P., Klein R., Schittny J.C., Müller U. (2001) $\beta 1$ -class integrins regulate the development of laminae and folia in the cerebral and cerebellar cortex. *Neuron* **31**: 367-379.
- Grose R., Hutter C., Bloch W., Thorey I., Watt F.M., Fässler R., Brakebusch C., Werner S. (2002) A crucial role of $\beta 1$ integrins for keratinocyte migration *in vitro* and during cutaneous wound repair. *Development* **129**: 2303-2315.
- Gunzer M., Kämpgen E., Bröcker E.B., Zänker K.S., Friedl P. (1997) Migration of dendritic cells in 3D-collagen lattices. Visualisation of dynamic interactions with the substratum and the distribution of surface structures via a novel confocal reflection imaging technique. *Adv Exp Med Biol.* **417**: 97-103.
- Guo H.B., Lee I., Kamar M., Akiyama S.K., Pierce M. (2002) Aberrant N-glycosylation of $\beta 1$ integrin causes reduced $\alpha 5 \beta 1$ integrin clustering and stimulates cell migration. *Cancer Res.* **62**: 6837-6845.
- Hakomori S. (2004) Carbohydrate-to-carbohydrate interaction in basic cell biology: a brief overview, *Arch Biochem Biophys.* **426**: 173-181.
- Hanahan D. and Weinberg R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Haston W.S. (1979) A study of lymphocyte behavior in cultures of fibroblast-like lymphoreticular cells. *Cell Immunol.* **45**: 74-84.
- Haston W.S, Shields J.M., Wilkinson P.C. (1982) Lymphocyte locomotion and attachment on two-dimensional surfaces and in three-dimensional matrices. *J Cell Biol.* **92**: 747-752.
- Heckmann D. and Kessler H. (2007) Design and chemical synthesis of integrin ligands. *Methods Enzymol.* **426**: 463-503.
- Hemmerich S. (2001) Carbohydrate sulfotransferases: novel therapeutic targets for inflammation, viral infection and cancer. *Drug Discov Today* **6**: 27-35.

- Hofmeister V., Schrama D., Becker J.C. (2008) Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma. *Cancer Immunol Immunother.* **57**: 1-17.
- Hollingsworth M.A. and Swanson, B.J. (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* **4**, 45-60.
- Honke K., Yamane M., Ishii A., Kobayashi T., Makita A. (1996) Purification and characterization of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate: GalCer sulfotransferase from human renal cancer cells. *J Biochem.* **119**: 421-427.
- Honke K., Tsuda M., Hirahara Y., Ishii A., Makita A., Wada Y. (1997) Molecular cloning and expression of cDNA encoding human 3'-phosphoadenylylsulfate:galactosylceramide 3'-sulfotransferase. *J Biol Chem.* **272**: 4864-4868.
- Honke K., Zhang Y., Cheng X., Kotani N., Taniguchi N. (2004) Biological roles of sulfoglycolipids and pathophysiology of their deficiency. *Glycoconj J.* **21**: 59-62.
- Hood J.D. und Cheresch D.A. (2002) Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* **2**: 91-100.
- Hosono K., Nishida Y., Knudson W., Knudson C.B., Naruse T., Suzuki Y., Ishiguro N. (2007) Hyaluronan oligosaccharides inhibit tumorigenicity of osteosarcoma cell lines MG-63 and LM-8 *in vitro* and *in vivo* via perturbation of hyaluronan-rich pericellular matrix of the cells. *Am J Pathol.* **171**: 274-86.
- Houseman B.T. and Mrksich M. (2002) Model systems for studying polyvalent carbohydrate binding interactions. *Topics Current Chemistry* **218**: 1-44.
- Hudson L.G. and McCawley L.J. (1998) Contributions of the epidermal growth factor receptor to keratinocyte motility. *Microsc Res Techn* **43**: 444-455.
- Humphries D.E. and Silbert J.E. (1988) Chlorate: a reversible inhibitor of proteoglycan sulfation. *Biochem Biophys Res Commun.* **154**: 365-371.
- Humphries J.D., Byron A., Humphries M.J. (2006) Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* **119**: 3901-3903.
- Huttenlocher A., Sandborg R.R., Horwitz A.F. (1995) Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* **7**: 697-706.
- Hynes R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- Hynes R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687.
- Haas T.A. and Plow E.F. (1997) Development of a structural model for the cytoplasmic domain of an integrin. *Protein Eng.* **10**: 1395-1405.
- Iwamoto H., Sakai H., Nawata H. (1998) Inhibition of integrin signaling with Arg-Gly-Asp motifs in rat hepatic stellate cells. *J Hepatol.* **29**: 752-759.
- Janes S.M. and Watt F.M. (2006) New roles for integrins in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* **6**: 175-183.
- Jat P.S., Noble M.D., Ataliotis P., Tanaka Y., Yannoutsos N., Larsen L., Kioussis D. (1991) Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2KbtsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**: 5096-5100.

- Julien S., Krzewinski-Recchi M.A., Harduin-Lepers A., Gouyer V., Huet G., Le Bourhis X., Delannoy P. (2001) Expression of sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc α 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I) cDNA. *Glycoconj J.* **18**: 883-893.
- Kakkar A.K. (2003) An expanding role for antithrombotic therapy in cancer patients. *Cancer Treat Rev.* **29**: 23-26.
- Kamm K.E. and Stull J.T. (2001) Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem.* **276**: 4527-4530.
- Kannagi R. (2004) Molecular mechanism for cancer-associated induction of sialyl Lewis X and sialyl Lewis A expression-The Warburg effect revisited. *Glycoconj J.* **20**: 353-364.
- Kannicht C. (2002) *Posttranslational Modification of Proteins: Tools for Functional Proteomics.* Humana Press.
- Katoh K., Kano Y., Ookawara S. (2007) Rho-kinase dependent organization of stress fibers and focal adhesions in cultured fibroblasts. *Genes Cells* **12**: 623-638.
- Keely P.J., Westwick J.K., Whitehead I.P., Der C.J., Parise, L.V. (1997) Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* **390**: 632-636.
- Kesimer M. and Sheehan J.K. (2008) Analyzing the functions of large glycoconjugates through the dissipative properties of their absorbed layers using the gel-forming mucin MUC5B as an example. *Glycobiology* **18**: 463-472.
- Kessin R.H. (2001) *Dictyostelium: Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity.* Cambridge University.
- Kikkawa F., Kajiyama H., Shibata K., Ino K., Nomura S., Mizutani S. (2005) Dipeptidyl peptidase IV in tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* **1751**: 45-51.
- Killich T., Plath P.J., Wei X., Bultmann H., Rensing L., Vicker M.G. (1993) The locomotion, shape and pseudopodial dynamics of unstimulated *Dictyostelium* cells are not random. *J Cell Sci.* **106**: 1005-1013.
- Kim M., Carman C.V., Springer T.A. (2003) Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **301**: 1720-1725.
- Klein C.E., Dressel D., Steinmayer T., Mauch C., Eckes B., Krieg T., Bankert R.B., Weber L. (1991) Integrin α 2 β 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *J. Cell Biol.* **115**: 1427-1436.
- Klemke R.L., Leng J., Molander R., Brooks P.C., Vuori K., Cheres D.A. (1998) CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J Cell Biol.* **140**: 961-972.
- Knight B., Laukaitis C., Akhtar N., Hotchin N.A., Edlund M., Horwitz A.R. (2000) Visualizing muscle cell migration in situ. *Curr Biol.* **10**: 576-585.
- Kobata A. and Amano J. (2005) Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. *Immunol Cell Biol.* **83**: 429-439.
- Kobayashi T., Honke K., Kamio K., Sakakibara N., Gasa S., Miyao N., Tsukamoto T., Ishizuka I., Miyazaki T., Makita A. (1993) Sulfolipids and glycolipid sulfotransferase activities in human renal cell carcinoma cells. *Br J Cancer* **67**: 76-80.

- Kobayashi T., Honke K., Kuramitsu Y., Hosokawa M., Miyazaki T., Murata J., Saiki I., Ishizuka I., Makita A. (1994) Cell-surface sulfoglycolipids are involved in the attachment of renal-cancer cells to laminin. *Int J Cancer* **56**: 281-285.
- Koda J.E., Rapraeger A., Bernfield M. (1985) Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens. *J Biol Chem.* **260**: 8157-8162.
- Kokenyesi R. (2001) Ovarian carcinoma cells synthesize both chondroitin sulfate and heparan sulfate cell surface proteoglycans that mediate cell adhesion to interstitial matrix. *J Cell Biochem.* **83**: 259-270.
- Kolodziej P.A. and Young R.A. (1991) Epitope tagging and protein surveillance. *Methods Enzymol.* **194**: 508-519.
- Kreitmeier M., Gerisch G., Heizer C., Müller-Taubenberger A. (1995) A talin homologue of *Dictyostelium* rapidly assembles at the leading edge of cells in response to chemoattractant. *J Cell Biol.* **129**: 179-188.
- Kudo T., Nakagawa H., Takahashi M., Hamaguchi J., Kamiyama N., Yokoo H., Nakanishi K., Nakagawa T., Kamiyama T., Deguchi K., Nishimura S., Todo S. (2007) N-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer.* **6**: 32.
- Lai J., Chien J., Staub J., Avula R., Greene E.L., Matthews T.A., Smith D.I., Kaufmann S.H., Roberts L.R., Shridhar V. (2003). Loss of HSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer. *J Biol Chem.* **278**: 23107-23117.
- Lambeir A.M., Durinx C., Scharpé S., De Meester I. (2003) Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **40**: 209-94.
- Langridge P.D. and Kay R.R. (2006) Blebbing of *Dictyostelium* cells in response to chemoattractant. *Exp Cell Res.* **312**: 2009-2017.
- Larsen M., Artym V.V., Green J.A., Yamada K.M. (2006) The matrix reorganized: Extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol.* **18**: 463-471.
- Lauffenburger D.A. and Horwitz A.F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**: 359-369.
- Lee H., Sodek K.L., Hwang Q., Brown T.J., Ringuelette M., Sodek J. (2007) Phagocytosis of collagen by fibroblasts and invasive cancer cells is mediated by MT1-MMP. *Biochem Soc Trans.* **35**: 704-706.
- Lee R.T. and Lee Y.C. (2000) Affinity enhancement by multivalent lectin-carbohydrate interaction. *Glycoconj J.* **17**: 543-551.
- Lee Y.C. and Lee R.T. (1994) *Neoglycoconjugates: Preparation and Applications*. Academic Press.
- Lei L., Liu D., Huang Y., Jovin I., Shai S.Y., Kyriakides T., Ross R.S., Giordano F.J. (2008) Endothelial expression of $\beta 1$ integrin is required for embryonic vascular patterning and postnatal vascular remodeling. *Mol Cell Biol.* **28**: 794-802.
- Leitinger B. and Hohenester E. (2007) Mammalian collagen receptors. *Matrix Biology* **26**: 146-155.
- Lessan K., Aguiar D.J., Oegema T., Siebenson L., Skubitz A.P. (1999) CD44 and $\beta 1$ integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells. *Am J Pathol.* **154**: 1525-1537.

- Li S., Guan J.L., Chien S. (2005) Biochemistry and biomechanics of cell motility. *Annu Rev Biomed Eng.* **7**: 105-150.
- Liddington R.C. and Ginsberg M.H. (2002) Integrin activation takes shape. *J Cell Biol.* **158**: 833-839.
- Liu S., Calderwood D.A., Ginsberg M.H. (2000). Integrin cytoplasmic domain binding proteins. *J Cell Sci.* **113**: 3563-3571.
- Lo S.H., Janmey P.A., Hartwig J.H., Chen L.B. (1994) Interactions of tensin with actin and identification of its three distinct actin-binding domains. *J Cell Biol.* **125**: 1067-1075.
- Lock J.G., Wehrle-Haller B., Strömblad S. (2008) Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol.* **18**: 65-76.
- Lundquist J.J. and Toone E.J. (2002) The cluster glycoside effect. *Chem Rev.* **102**: 555-578.
- Lämmermann T., Bader B.L., Monkley S.J., Worbs T., Wedlich-Söldner R., Hirsch K., Keller M., Förster R., Critchley D.R., Fässler R., Sixt M. (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* **453**: 51-55.
- Magnani J.L. (2004) The discovery, biology, and drug development of sialyl Le^a and sialyl Le^x. *Arch Biochem Biophys.* **426**: 122-131.
- Malawista S.E. and de Boisfleury Chevance A. (1997) Random locomotion and chemotaxis of human blood polymorphonuclear leukocytes (PMN) in the presence of EDTA: PMN in close quarters require neither leukocyte integrins nor external divalent cations. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**: 11577-11582.
- Malawista S.E., de Boisfleury Chevance A., Boxer L.A. (2000) Random locomotion and chemotaxis of human blood polymorphonuclear leukocytes from a patient with leukocyte adhesion deficiency-1: normal displacement in close quarters via chimneying. *Cell Motil Cytoskeleton* **46**: 183-189.
- Mandeville J.T., Lawson M.A., Maxfield F.R. (1997) Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. *J Leukoc Biol.* **61**: 188-200.
- Marsh D., Dickinson S., Neill G.W., Marshall J.F., Hart I.R., Thomas G.J. (2008) $\alpha v \beta 6$ Integrin promotes the invasion of morphoic basal cell carcinoma through stromal modulation. *Cancer Res.* **68**: 3295-3303.
- Marth J. (1999) *Glycosylation changes in ontogeny and cell activation. Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press: 515-536.
- McDonald D.M. (2001) Angiogenesis and remodeling of airway vasculature in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* **164**: S39-S45.
- Mempel T.R., Henrickson S.E., Von Andrian U.H. (2004) T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**: 154-159.
- Mercurio A.M., Rabinovitz I., Shaw L.M. (2001) The $\alpha 6 \beta 4$ integrin and epithelial cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* **13**: 541-545.
- Meshel A.S., Wei Q., Adelstein R.S., Sheetz M.P. (2005) Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts. *Nat Cell Biol.* **7**: 157-164.
- Midwood K.S., Mao Y., Hsia H.C., Valenick L.V., Schwarzbauer J.E. (2006) Modulation of cell-fibronectin matrix interactions during tissue repair. *J Invest Dermatol Symp Proc.* **11**: 73-78.

- Misra S., Ghatak S., Zoltan-Jones A., Toole B.P. (2003) Regulation of multidrug resistance in cancer cells by hyaluronan. *J Biol Chem.* **278**: 25285-25288.
- Miyamoto S., Teramoto H., Coso O.A., Gutkind J.S., Burbelo P.D., Akiyama S.K., Yamada K.M. (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol.* **131**: 791-805.
- Miyoshi E., Moriwaki K., Nakagawa T. (2008) Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem.* **143**: 725-729.
- Mizejewski G.J. (1999) Role integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med.* **222**: 124-138.
- Mizuguchi S., Nishiyama N., Iwata T., Nishida T., Izumia N., Tsukioka T., Inoue K., Uenishi T., Wakasa K., Shigefumi S. (2007) Serum Sialyl LewisX and cytokeratin 19 fragment as predictive factors for recurrence in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **58**: 369-375.
- Monk B.C. and Harding D.R. (2005) Peptide motifs for cell-surface intervention: application to anti-infective and biopharmaceutical development. *BioDrugs* **19**: 261-278.
- Monsigny M., Mayer R., Roche A.C. (2000) Sugar-lectin interactions: sugar clusters, lectin multivalency and avidity. *Carbohydr Lett.* **4**: 35-52.
- Moschos S.J., Drogowski L.M., Reppert S.L., Kirkwood J.M. (2007) Integrins and cancer. *Oncology (Williston Park)* **21**: 13-20.
- Musselli C., Ragupathi G., Gilewski T., Panageas K.S., Spinat Y., Livingston P.O. (2002) Reevaluation of the cellular immune response in breast cancer patients vaccinated with MUC1. *Int. J. Cancer* **97**: 660-667.
- Maaser K., Wolf K., Klein C.E., Niggemann B., Zänker K.S., Bröcker E.B., Friedl P. (1999) Functional hierarchy of simultaneously expressed adhesion receptors: integrin $\alpha 2\beta 1$ but not CD44 mediates MV3 melanoma cell migration and matrix reorganization within three-dimensional hyaluronan-containing collagen matrices. *Mol Biol Cell* **10**: 3067-3079.
- Nadanaka S. und Kitagawa H. (2008) Heparan sulfate biosynthesis and disease. *J Biochem.* **144**: 7-14.
- Nagano O. and Saya H. (2004) Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci.* **95**: 930-935.
- Nagato Y., Shimai K., Kushida T., Kushida H. (1990) Staining of intestinal goblet cells with ruthenium red in semithin sections. *J Electron Microsc (Tokyo).* **39**: 115-119.
- Nakashio T., Narita T., Sato M., Akiyama S., Kasai Y., Fujiwara M., Ito K, Takagi H., Kannagi R. (1997) The association of metastasis with the expression of adhesion molecules in cell lines derived from human gastric cancer. *Anticancer Res.* **17**: 293-299.
- Nakatsura T. and Nishimura Y. (2005) Usefulness of the novel oncofetal antigen glypican-3 for diagnosis of hepatocellular carcinoma and melanoma. *BioDrugs* **19**: 71-77.
- Nemeth J.A., Cher M.L., Zhou Z., Mullins C., Bhagat S., Trikha M. (2003) Inhibition of $\alpha(v)\beta 3$ integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis* **20**: 413-420.
- Neuert G., Albrecht C., Gaub H.E. (2007) Predicting the rupture probabilities of molecular bonds in Series. *Biophys J.* **93**: 1215-1223.

- Niewöhner J., Weber I., Maniak M., Müller-Taubenberger A., Gerisch G. (1997) Talin-null cells of *Dictyostelium* are strongly defective in adhesion to particle and substrate surfaces and slightly impaired in cytokinesis. *J Cell Biol.* **138**: 349-361.
- Norgard-Sumnicht K.E., Roux L., Toomre D.K., Manzi A., Freeze H.H., Varki A. (1995) Unusual anionic N-linked oligosaccharides from bovine lung. *J Biol Chem.* **270**: 27634-27645.
- Noronkoski T. and Mononen I. (1997) Influence of L-fucose attached α 1->6 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine on the hydrolysis of the N-glycosidic linkage by human glycosylasparaginase. *Glycobiology* **7**: 217-220.
- Ohuchi, E., Imai K., Fujii Y., Sato H., Seiki M., Okada Y. (1997) Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem.* **272**: 2446-2451.
- Ono M. and Hakomori S. (2004).Glycosylation defining cancer cell motility and invasiveness *Glycoconj J.* **20**: 71-78.
- Orlean P. and Menon A.K. (2007) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *J Lipid Res.* **48**: 993-1011.
- Otey C.A., Vasquez G.B., Burrridge K., Erickson B.W. (1993) Mapping of the α -actinin binding site within the β 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* **268**: 21193-21197.
- Paganuzzi M., Bobbio B., Marroni P., Filiberti R., Secco G.B., Grossi C.E. (2003) Prognostic role of serum sialyl LewisX (CD15s) in colorectal cancer. *Oncology* **65**: 52-59.
- Palecek S.P., Loftus J.C., Ginsberg M.H., Lauffenburger D.A., Horwitz A.F. (1997) Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* **385**: 537-540.
- Pankov R., Endo Y., Even-Ram S., Araki M., Clark K., Cukierman E., Matsumoto K., Yamada K.M. (2005) A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol.* **170**: 793-802.
- Park C.C., Zhang H., Pallavicini M., Gray J.W., Baehner F., Park C.J., Bissell M.J. (2006) β 1 integrin inhibitory antibody induces apoptosis of breast cancer cells, inhibits growth, and distinguishes malignant from normal phenotype in three dimensional cultures and *in vivo*. *Cancer Res.* **66**: 1526-1535.
- Pecheur I., Peyruchaud O., Serre C.M., Guglielmi J., Voland C., Bourre F., Margue C., Cohen-Solal M., Buffet A., Kieffer N. Clézardin P. (2002) Integrin α v β 3 expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *FASEB J.* **16**: 1266-2268.
- Pickles R.J., Fahrner J.A., Petrella J.M., Boucher R.C., Bergelson J.M. (2000) Retargeting the coxsackievirus and adenovirus receptor to the apical surface of polarized epithelial cells reveals the glycocalyx as a barrier to adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol.* **74**: 6050-6057.
- Pilcher B.K., Dumin J.A., Sudbeck B.D., Krane S.M., Welgus H.G., Parks W.C. (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol.* **137**: 1445-1457.
- Pollard T.D. and Borisy G.G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**: 453-465.

- Popovic Z.V., Sandhoff R., Sijmonsma T.P., Kaden S., Jennemann R., Kiss E., Tone E., Autschbach F., Platt N., Malle E., Gröne H.J. (2007) Sulfated glycosphingolipid as mediator of phagocytosis: SM4s enhances apoptotic cell clearance and modulates macrophage activity. *J Immunol.* **179**: 6770-6782.
- Potocnik A.J., Brakebusch C., Fässler R. (2000) Fetal and adult hematopoietic stem cells require $\beta 1$ integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity* **12**: 653-663.
- Quioco F.A. (1993) Probing the atomic interactions between proteins and carbohydrates. *Biochem Soc Trans.* **21**: 442-448.
- Rainger G.E., Buckley C.D., Simmons D.L., Nash G.B. (1999) Neutrophils sense flow-generated stress and direct their migration through $\alpha V\beta 3$ -integrin. *Am J Physiol.* **276**: H858-864.
- Ramanathan R.K., Lee K.M., McKolanis J., Hitbold E., Schraut W., Moser A.J., Warnick E., Whiteside T., Osborne J., Kim H., Day R., Troetschel M., Finn O.J. (2005) Phase I study of a MUC1 vaccine composed of different doses of MUC1 peptide with SB-AS2 adjuvant in resected and locally advanced pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother.* **54**: 254-264.
- Ramos D.M., But M., Regezi J., Schmidt B.L., Atakilit A., Dang D., Ellis D., Jordan R., Li X. (2002) Expression of integrin $\beta 6$ enhances invasive behavior in oral squamous cell carcinoma. *Matrix Biol.* **21**: 297-307.
- Ramsay A.G., Marshall J.F., Hart I.R. (2007) Integrin trafficking and its role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **26**: 567-78.
- Rapraeger A.C., Guimond S., Krufka A., Olwin B.B. (1994) Regulation by heparan sulfate in fibroblast growth factor signaling. *Methods Enzymol.* **245**: 219-240.
- Reszka A.A., Hayashi Y., Horwitz A.F. (1992) Identification of amino acid sequences in the integrin $\beta 1$ cytoplasmic domain implicated in cytoskeletal association. *J Cell Biol.* **117**: 1321-1330.
- Retta S.F., Balzac F., Ferraris P., Belkin A.M., Fässler R., Humphries M.J., De Leo G., Silengo L., Tarone G. (1998) β -integrin cytoplasmic subdomains involved in dominant negative function. *Mol Biol Cell* **9**: 715-731.
- Ridley A.J., Schwartz M.A., Burridge K., Firtel R.A., Ginsberg M.H., Borisy G., Parsons J.T., Horwitz A.R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**: 1704-1709.
- Ropponen K., Tammi M., Parkkinen J., Eskelinen M., Tammi R., Lipponen P., Agren U., Alhava E., Kosma V.M. (1998) Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res.* **58**: 342-347.
- Rosenow F., Ossig R., Thormeyer D., Gasmann P., Schlüter K., Brunner G., Haier J., Eble J.A. (2008) Integrins as antimetastatic targets of RGD-independent snake venom components in liver metastasis. *Neoplasia* **10**: 168-176.
- Sahai E. and Marshall C.J. (2003) Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol.* **5**: 711-719.
- Sakai T., Jove R., Fassler R., Mosher D.F. (2001) Role of the cytoplasmic tyrosines of $\beta 1A$ integrins in transformation by v-src. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 808-813.
- Sambrook J. and Russell D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Dritte Auflage.

- Sandhoff R., Hepbildikler S.T., Jennemann R., Geyer R., Gieselmann V., Proia R.L., Wiegandt H., Grone H.J. (2002) Kidney sulfatides in mouse models of inherited glycosphingolipid disorders: determination by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Biol Chem.* **277**: 20386-20398.
- Sanger F. (1975) The Croonian Lecture. Nucleotide sequences in DNA. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **191**: 317-333.
- Sansom C. and Markman O. (2007) *Glycobiology*. Scion Publishing Ltd.
- Sarandakou A., Protonotariou E., Rizos D. (2007) Tumor markers in biological fluids associated with pregnancy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **44**: 151-178.
- Sasisekharan R., Raman R., Prabhakar V. (2006) Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu Rev Biomed Eng.* **8**: 181-231.
- Schaller M.D., Otey C.A., Hildebrand J.D., Parsons J.T. (1995) Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking β integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol.* **130**: 1181-1187.
- Schiro J.A., Chan B.M.C., Roswit W.T., Kassner P.D., Pentland A., Hemler M.E., Eisen, A.Z., Kupper T.S. (1991) Integrin $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. *Cell* **67**: 403-410.
- Schwab U., Leigh M., Ribeiro C., Yankaskas J., Burns K., Gilligan P., Sokol P., Boucher R. (2002) Patterns of epithelial cell invasion by different species of the *Burkholderia cepacia* complex in well-differentiated human airway epithelia. *Infect Immun.* **70**: 4547-4555.
- Seidenfaden R., Krauter A., Schertzinger F., Gerardy-Schahn R., Hildebrandt H. (2003) Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Mol Cell Biol.* **16**: 5908-5918.
- 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. (1995) Jasplakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells *in vitro* with disruption of the actin cytoskeleton. *J Natl Cancer Inst.* **87**: 46-51
- Sharom F.J. and Lehto M.T. (2002) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Cell Biol.* **80**: 535-549.
- Shi S. and Stanley P. (2003) Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**: 5234-5239.
- Shimada K., Nakamura M., Ishida E., Higuchi T., Yamamoto H., Tsujikawa K., Konishi N. (2008) Prostate cancer antigen-1 contributes to cell survival and invasion through discoidin receptor 1 in human prostate cancer. *Cancer Sci.* **99**: 39-45.
- Shimaoka M., Takagi J., Springer T.A. (2002) Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* **31**: 485-516.
- Shimizu Y., Van Seventer G.A., Horgan K.J., Shaw S. (1990) Regulated expression and binding of three VLA ($\beta 1$) integrin receptors on T cells. *Nature* **345**: 250-253.
- Shrivastava A., Radziejewski C., Campbell E., Kovac L., McGlynn, M., Ryan T.E., Davis S., Goldfarb M.P., Glass D.J., Lemke G., Yancopoulos G.D. (1997) An orphan receptor tyrosine kinase family whose members serve as nonintegrin collagen receptors. *Mol Cell* **1**: 25-34.

- Sieg D.J., Hauck C.R., Ilic D., Klingbeil C.K., Schaefer E., Damsky C.H., Schlaepfer D.D. (2000) FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* **2**: 249-256.
- Smilenov L.B., Mikhailov A., Pelham R.J., Marcantonio E.E. and Gundersen G.G. (1999) Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science* **286**: 1172-1174.
- Somlyo A.V., Phelps C., Dipierro C., Eto M., Read P., Barrett M., Gibson J.J., Burnitz M.C., Myers C., Somlyo A.P. (2003) Rho kinase and matrix metalloproteinase inhibitors cooperate to inhibit angiogenesis and growth of human prostate cancer xenotransplants. *FASEB J.* **17**: 223-234.
- Spiekstra S.W., Breetveld M., Rustemeyer T., Scheper R.J., Gibbs S. (2007) Wound-healing factors secreted by epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts in skin substitutes. *Wound Repair Regen.* **15**: 708-717.
- Steeg P.S. (2006) Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med.* **12**: 895-904.
- Steer D.L., Shah M.M., Bush K.T., Stuart R.O., Sampogna R.V., Meyer T.N., Schwesinger C., Bai X., Esko J.D., Nigam S.K. (2004) Regulation of ureteric bud branching morphogenesis by sulfated proteoglycans in the developing kidney. *Dev Biol.* **272**: 310-327.
- Sternlicht M.D. and Werb Z. (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **17**: 463-516.
- Storgard C.M., Stupack D.G., Jonczyk A., Goodman S.L., Fox R.I., Cheresh D.A. (1999) Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an $\alpha\beta 3$ antagonist. *J Clin Invest.* **103**: 3-4.
- Stupack D.G., Puente X.S., Boutsaboualoy S., Storgard C.M., Cheresh D.A. (2001) Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol.* **155**: 459-470.
- Stupp R. and Rugg C. (2007) Integrin inhibitors reaching the clinic. *J Clin Oncol.* **25**: 1637-1638.
- Sundblad G., Holojda S., Roux L., Varki A., Freeze H.H. (1988) Sulfated N-linked oligosaccharides in mammalian cells. II. Identification of glycosaminoglycan-like chains attached to complex-type glycans. *J Biol Chem.* **263**: 8890-8896.
- Tadokoro S., Shattil S.J., Eto K., Tai V., Liddington R.C., de Pereda J.M., Ginsberg M. H., Calderwood D.A. (2003). Talin binding to integrin β tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**: 103-106.
- Takagi J. and Springer, T.A. (2002) Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev.* **186**: 141-63.
- Takagi J., Petre B.M., Walz T., Springer T.A. (2002) Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **110**: 599-611.
- Tam E.M., Wu Y.I., Butler G.S., Stack M.S., Overall C.M. (2002) Collagen binding properties of the membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) hemopexin C domain. The ectodomain of the 44-kDa autocatalytic product of MT1-MMP inhibits cell invasion by disrupting native type I collagen cleavage. *J Biol Chem.* **277**: 39005-39014.
- Tanentzapf G. and Brown N.H. (2006) An interaction between integrin and the talin FERM domain mediates integrin activation but not linkage to the cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* **8**: 601-606.
- Taylor M.E. and Drickamer K. (2006) *Introduction to Glycobiology*. Oxford University Press.

- Tkachenko E., Elfenbein A., Tirziu D., Simons M. (2006) Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. *Circ Res.* **98**: 1398-1404.
- Toole B.P. (2004) Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* **4**: 528-539.
- Tran Quang C., Gautreau A., Arpin M., Treisman R. (2000) Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the Net and Dbl oncogenes. *EMBO J.* **19**: 4565-4576.
- Tuckwell D.S., Allen M.D., Takigawa M., Humphries M.J. (1991) Novel methods for the study of cell-collagen interactions. *Biochem Soc Trans.* **19**: 370S.
- Umemoto J., Bhavanandan V.P., Davidson E.A. (1977) Purification and properties of an endo- α -N-acetyl-D-galactosaminidase from *Diplococcus pneumoniae*. *J Biol Chem.* **252**: 8609-8614.
- van Muijen G.N., Jansen K.F., Cornelissen I.M., Smeets D.F., Ruiter D.J. (1991) Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. *Int J Cancer* **48**: 85-91.
- Varki A. (1999) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Varner J.A., Nakada M.T., Jordan R.E., Collier B.S. (1999) Inhibition of angiogenesis and tumor growth by murine 7E3, the parent antibody of c7E3 Fab (abciximab; ReoPro) *Angiogenesis* **3**: 53-60.
- Vaynberg J., Fukuda T., Chen K., Vinogradova O., Velyvis A., Tu Y., Ng L., Wu C., Qin J. (2005) Structure of an ultraweak protein-protein complex and its crucial role in regulation of cell morphology and motility. *Mol Cell* **17**: 513-523.
- Verkhovskiy A.B., Svitkina T.M., Borisy G.G. (1995) Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. *J Cell Biol.* **131**: 989-1002.
- Vinogradova O., Velyvis A., Velyviene A., Hu B., Haas T.A., Plow E.F., Qin J.A. (2002) structural mechanism of integrin α IIb β 3 'inside-out' activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* **110**: 587-597.
- Vogel W., Brakebusch C., Fassler R., Alves F., Ruggiero F., Pawson T. (2000) Discoidin domain receptor 1 is activated independently of β 1 integrin. *J Biol Chem.* **275**: 5779-5784.
- Wang Y., Slade M.B., Gooley A.A., Atwell B.J., Williams K.L. (2001) Cellulose-binding modules from extracellular matrix proteins of *Dictyostelium discoideum* stalk and sheath. *Eur J Biochem.* **268**: 4334-4345.
- Wells L., Vosseller K., Hart G.W. (2001) Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* **291**: 2376-2378.
- Wilkins M.R. and Williams K.L. (1995) The extracellular matrix of the *Dictyostelium discoideum* slug. *Experientia* **51**: 1189-1196.
- Wilkinson P.C., Haston W.S., Shields J.M. (1982) Some determinants of the locomotory behaviour of phagocytes and lymphocytes *in vitro*. *Clin Exp Immunol.* **50**: 461-473.
- Wojcikiewicz E.P., Abdulreda M.H., Zhang X., Moy V.T. (2006) Force spectroscopy of LFA-1 and its ligands, ICAM-1 and ICAM-2. *Biomacromolecules* **7**: 3188-3195.

- Wolf K., Mazo I., Leung H., Engelke K., von Andrian U.H., Deryugina E.I., Strongin A.Y., Bröcker E.B., Friedl P. (2003a) Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* **160**: 267-277.
- Wolf K., Müller R., Borgmann S., Bröcker E.B., Friedl P. (2003b) Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood* **102**: 3262-3269.
- Wolf K. and Friedl P. (2005) Functional imaging of pericellular proteolysis in cancer cell invasion. *Biochimie* **87**: 315-320.
- Wolf K. and Friedl P. (2006) Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *Br J Dermatol.* **154** Suppl 1: 11-15.
- Wolf K., Wu Y.I., Liu Y., Geiger J., Tam E., Overall C., Stack M.S., Friedl P. (2007) Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* **9**: 893-904.
- Woolf E., Grigorova I., Sagiv A., Grabovsky V., Feigelson S.W., Shulman Z., Hartmann T., Sixt M., Cyster J.G., Alon R. (2007) Lymph node chemokines promote sustained T lymphocyte motility without triggering stable integrin adhesiveness in the absence of shear forces. *Nat Immunol.* **8**: 1076-1085.
- Yoshida K. and Soldati T. (2006) Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J Cell Sci.* **119**: 3833-3844.
- Yumura S., Mori H., Fukui Y. (1984) Localization of actin and myosin for the study of amoeboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. *J Cell Biol.* **99**: 894-899.
- Zaman M.H., Trapani L.M., Sieminski A.L., Mackellar D., Gong H., Kamm R.D., Wells A., Lauffenburger D.A., Matsudaira P. (2006) Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**: 10889-10894.
- Zamir E., Katz M., Posen Y., Erez N., Yamada K.M., Katz B., Lin S., Lin D.C., Bershadsky A., Kam Z., Geiger B. (2000) Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol.* **2**: 191-196.
- Zamir E. and Geiger B. (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* **114**: 3583-3590.
- Zeng C., Toole B.P., Kinney S.D., Kuo J.W., Stamenkovic I. (1998) Inhibition of tumor growth *in vivo* by hyaluronan oligomers. *Int J Cancer* **77**: 396-401.
- Zeng L., Si X., Yu W.P., Le H.T., Ng K.P., Teng R.M., Ryan K., Wang D.Z., Ponniah S., Pallen C.J. (2003) PTP α regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol.* **160**: 137-146.
- Zimmerman E., Geiger B., Addadi L. (2002) Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J.* **82**: 1848-1857.
- Zutter M.M., Santoro S.A., Staats W.D., Tsung Y.L. (1995) Re-expression of the $\alpha 2\beta 1$ integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 7411-7415.

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1.** Schematische Darstellung der Zell-Matrix-Interaktion, bei der die Integrine die Matrix mit dem Zytoskelett verbinden (A); Übersicht Integrinfamilie (B)
- Abb. 2.** Schematische Darstellung der Zellmembran einer eukaryontischen Zelle
- Abb. 3.** Übersicht der Syntheseweges der Glyconjugate in einer Zelle
- Abb. 4.** Modell für verschiedene Migrationsstrategien abhängig von der Integrinfunktion in der 3D-Kollagenmatrix
- Abb. 5.** Generierung von immortalisierten und $\beta 1^{-/-}$ defizienten Zelllinien transgener Mäusen
- Abb. 6.** Zytoplasmatische Domänen der $\beta 1$ -Integrin Untereinheit und inhibitorische Peptidsequenzen
- Abb. 7.** $\beta 1$ -Integrin Expression auf MV3-Zellen vor und nach FACS-Sortierung (A) und im Verlauf mehrerer Passagen (B)
- Abb. 8.** Unveränderte Migrationsgeschwindigkeit und Pfadlänge von Zellen mit niedriger $\beta 1$ -Integrin Expression in Kollagenmatrices
- Abb. 9.** Unterschiedliche Fokalisierung von $\beta 1$ -Integrinen und Vinculin an Zell-Matrix Interaktionen in $\beta 1^{\text{low}}$ und $\beta 1^{\text{high}}$ MV3-Zellen
- Abb. 10.** Unterschiedliche Freisetzung von Kollagenfragmenten durch $\beta 1^{\text{low}}$ und $\beta 1^{\text{high}}$ MV3-Zellen
- Abb. 11.** Reduktion der freien 4B4-Bindungsstellen von $\beta 1$ -Integrinen nach Vorinkubation von MV3-Zellen mit mAk 4B4
- Abb. 12.** Dosisabhängige Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit, Persistenz und Pfadlänge durch anti $\beta 1$ -Integrin blockierenden mAk 4B4
- Abb. 13.** Übergang von mesenchymaler, Fibroblasten-ähnlicher Morphologie in elliptoide und amöboide Morphologie nach Inhibition von $\beta 1$ -Integrinen durch blockierenden mAk 4B4
- Abb. 14.** Änderung der Verteilung von $\beta 1$ -Integrinen und der Struktur des filamentösen Aktin-Zytoskeletts (F-Aktin) nach Zugabe von mAk 4B4
- Abb. 15.** Semiquantitative Analyse der Fokalisierung von $\beta 1$ -Integrin und F-Aktin in mesenchymalen und amöboiden MV3-Zellen
- Abb. 16.** Verringerte Kontraktion nicht verankerter Kollagenmatrices durch MV3-Zellen nach Hemmung von $\beta 1$ -Integrinen durch mAk 4B4
- Abb. 17.** Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit und Pfadlänge durch Rhodocetin.
- Abb. 18.** Übergang von mesenchymaler, Fibroblasten-ähnlicher Morphologie in elliptoide und amöboide Morphologie nach Inhibition von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin durch Rhodocetin
- Abb. 19.** Änderung der Verteilung von $\beta 1$ -Integrinen und der Struktur des filamentösen Aktin-Zytoskeletts (F-Aktin) in Ab- und Anwesenheit von Rhodocetin
- Abb. 20.** Subtotale Hemmung der $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-vermittelten Kollagenkontraktion durch Rhodocetin
- Abb. 21.** GFP-Expression und Viabilität von MV3-Zellen nach Transfektion von SP2-pIRES-EGFP
- Abb. 22.** mRNA-Expression in MV3-Zellen nach Transfektion mit SP2E-pIRES2/EGFP und SP2F-pIRES2/EGFP mittels RT-PCR
- Abb. 23.** Beispiel der phänotypischen Charakterisierung von MV3-Zellen nach Transfektion von SP2-pIRES-EGFP und limitierender Verdünnung
- Abb. 24.** Verlust des mesenchymalen, Fibroblasten-ähnlichen Phänotyps und *de-novo* Erscheinen einer elliptoiden, amöboiden Morphologie nach Expression von HA-SP2-E, nicht aber HA-SP2-F und HA-Kontrollvektor
- Abb. 25.** Gleichbleibende Expression von $\beta 1$ -Integrin nach Transfektion mit SP2-E-pIRES2/EGFP

- Abb. 26.** Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit und Pfadlänge durch dominant negatives Peptid HA-SP2-E
- Abb. 27.** Konfokale Lebendaufnahme von MV3-Zellen nach Transfektion mit SP2-E-pIRES2/EGFP
- Abb. 28.** Rekonstruktion der 3D-Struktur der dominant negativen Peptide
- Abb. 29.** Verringerte Kontraktion nicht-verankerter Kollagenmatrices mit untersuchten Klonen
- Abb. 30.** Charakterisierung von $\beta 1$ -Integrin defizienten MEF und die Wiederherstellung nach $\beta 1$ -Integrin Einführung
- Abb. 31.** Analyse der Oberflächenexpression von $\beta 1$ -Integrin (a-e) und veränderte Morphologie (f-j) von $\beta 1^{-/-}$ Zellen
- Abb. 32.** Abhängigkeit der Zellmorphologie und Polarisierung von der Expression des $\beta 1$ -Integrins
- Abb. 33.** Migrationseffizienz und Struktur der Migrationspfade $\beta 1$ -exprimierender und $\beta 1$ -defizienter Zellen
- Abb. 34.** Migration von MEF aus Sphäroiden in 3D-Kollagenmatrices
- Abb. 35.** Struktur des filamentösen Aktinzytoskeletts (F-Aktin) in $\beta 1$ -Integrin defizienten MEF
- Abb. 36.** Inhibierte Kontraktion nicht verankerter Kollagenmatrices durch $\beta 1$ -defiziente MEF und GD25-Zellen
- Abb. 37.** Degradation der Kollagenmatrix in Anhängigkeit von der $\beta 1$ -Integrin Expression
- Abb. 38.** Verteilung von Heparansulfat und $\beta 1$ -Integrin auf der Oberfläche einer MV3-Zelle während der Migration
- Abb. 39.** Viabilität der Zellen nach Zugabe des cRGD-Peptides und Expression von $\alpha v\beta 3$ -Integrin auf der Oberfläche von MV3-Zellen
- Abb. 40.** Ablösung von MV3-Zellen vom Plattenboden durch Behandlung mit N- und O-Glycosidase
- Abb. 41.** Expression von GAGs auf der Oberfläche von MV3-Zellen und Effizienz der enzymatischen Ablösung mit N- und O-Glycosidase
- Abb. 42.** Oberflächenexpression von GAGs auf $\beta 1$ -Integrin defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) und Effizienz der enzymatischen Ablösung mit N- und O-Glycosidase mittels Durchflusszytometrie
- Abb. 43.** Abnahme der Kontrastintensität nach Behandlung der MV3-Zellen mit N- und O-Glycosidasen oder Kultivierung in chlorathaltigem Medium.
- Abb. 44.** Prinzip der Rekonstruktion und semiquantitativen densitometrischen Analyse der Dichte der Glycokalyx in MV3-Zellen vor und nach Inkubation mit N- und O-Glycosidase
- Abb. 45.** Quantitative Analyse der Migrationgeschwindigkeit mittels Zeitraffermikroskopie und Zelltracking
- Abb. 46.** Die Pfadstruktur und Migrationseffizienz von MV3-Zellen nach Inhibition der $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Integrine und enzymatischer Abspaltung von N- und O-Glycanen
- Abb. 47.** Migrationseffizienz $\beta 1$ -Integrin-defizienter muriner embryonaler Fibroblasten
- Abb. 48.** Oberflächenexpression von HS, CS und SS nach Kultivierung in sulfatdefizientem Medium
- Abb. 49.** Unveränderte Migrationsaktivität sulfatdefizienter MV3-Zellen
- Abb. 50.** Zusammenfassende Zelltracking-Analyse der nichtmigrierenden MV3-Zellen nach unspezifischer Interferenz mit Glycokonjugaten bzw. sulfatierten GAGs
- Abb. 51.** (A) Übergang von mesenchymal zur amöboiden Zellmigration (MAT) nach Hemmung der $\beta 1$ -Integrinfunktion, (B) Die gleichzeitige Entfernung von Glycokonjugaten der Zelloberfläche mit Hemmung der $\beta 1$ - und RGD-bindenden Integrinen immobilisiert die amöboid wandernde neoplastischen MV3-Zellen und $\beta 1$ -Integrin defizienten Fibroblasten in 3D-Kollagenmatrices.

Abb. 52. Glykokonjugate der Tumorzelloberfläche und die spezifische Spaltstelle der N-Glycosidase F und Endo α -N-Acetylgalactosaminidase (modifiziert nach Fuster und Esko, 2005; Taylor und Drickamer, 2006)

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Beispiele für die Rolle von Glykokonjugaten in der Tumorbiologie (modifiziert nach Fuster und Esko, 2005).	18
Tabelle 2	Behandlung der Glykokalyx mit verschiedenen Glycosidasen.	31
Tabelle 3	Aminosäure- und Nukleotid-Sequenzen für die Transfektion der MV3-Melanomzellen	34
Tabelle 4	Primersequenzen eingesetzt für RT-PCR und Sequenzierung, Annealing Temperatur, Zeit und Länge der resultierende PCR-Produkt in Basenpaaren (bp).	37

10. FILMVERZEICHNIS

- Film 1 Morphologisch heterogene Population migrierender MV3-Zellen in der Kollagenmatrix.** In digitaler Hellfeld-Zeitraffermikroskopie entwickelte die Mehrheit wandernder MV3-Zellen (ca. 80-90%) spontan eine länglich-mesenchymale fibroblastenähnliche Morphologie, während eine Minderheit von 10% eine rundliche Form beibehielt.
- Film 2 MV3-Zellen mit hoher $\beta 1$ -Integrin Expression.** Diese Zellen wiesen während der Migration in Kollagenmatrices elongierte und mesenchymale Zellform auf, vergleichbar zur Mehrheit der Kontrollzellen.
- Film 3 MV3-Zellen mit niedriger $\beta 1$ -Integrin Expression.** Im Gegensatz zu MV3-Zellen mit hoher $\beta 1$ -Integrin Expression entwickelten $\beta 1^{\text{low}}$ Zellen überwiegend rundlich-elliptoide Zellform während der Wanderung (amöboider Phänotyp).
- Film 4 Übergang von elongierter, mesenchymaler Morphodynamik und Migration in die amöboide Migration in Anwesenheit des adhäsionsblockierenden anti $\beta 1$ -Integrin mAk 4B4.** Mesenchymale, fibroblasten-ähnliche Migration von MV3-Melanomzellen in der 3D-Kollagenmatrix. MV3-Zellen in Anwesenheit ansteigender Konzentration des anti $\beta 1$ -Integrin mAk 4B4 in der 3D-Kollagenmatrix. Bei einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ 4B4 sind die Adhäsionsepitope zu 40% abgesättigt und es lag schnelle amöboide Migration bei subtotaler Zellabrundung vor. Bei 10 $\mu\text{g/ml}$ waren Zellen nicht elongiert, jedoch war die Migrationsgeschwindigkeit auf 50-60% der Geschwindigkeit der Kontrollzellen verringert. Die unterschiedliche Helligkeit, Schärfe und Größe der Zellen beruhen auf der z-Position im Kollagengel ober- und unterhalb der scharfgestellten Aufnahmeebene (weiß = oberhalb, dunkel = unterhalb). Zeit: oben links (std:min:sec)
- Film 5 Hochaufgelöste Dynamik mesenchymaler und amöboider Migration von MV3-Zellen.** Konstitutive mesenchymale Migration von MV3-Kontrollzellen (6 Std. Aufnahme), induzierte amöboide Migration einer MV3-Zelle mit Hilfe von Oberflächenblebs in Anwesenheit des 4B4 mAk (10 $\mu\text{g/ml}$) (8 Std.) und induzierte amöboide Migration in Anwesenheit des $\alpha 2\beta 1$ -Integrin inhibitors Rhodocetin (100 nM) (8 Std.) Zeit (std:min:sec)
- Film 6 *Dictyostelium discoideum* Amöbe** von dicty Webseite: <http://www.dicty.cmb.nwu.edu>
- Film 7 Induzierte amöboide Migration** in Anwesenheit des $\alpha 2\beta 1$ -Integrin inhibitors Rhodocetin (100 nM) (16 Std.) Zeit (std:min:sec)
- Film 8 Transfizierte MV3-Zellen mit dem pIRES2-EGFP Vektor.** Diese Zellen exprimierten nur HA-Epitop (Kontrolle). Sie entwickelten eine elongierte und mesenchymale Morphologie in der Kollagenmatrix.
- Film 9 Transfizierte MV3-Zellen mit dem Konstrukt SP2-F-pIRES2-EGFP.** Diese Zellen entwickelten in Kollagenmatrices eine überwiegend spindelzellig-mesenchymale Morphologie mit 2-3 Pseudopodien an der Vorderfront.
- Film 10 Die Überexpression von SP2-E-pIRES2-EGFP in MV3-Zellen** induzierte überwiegend eine rundlich elliptoide Form (Klon 10, schnelle amöboide Migration).
- Film 11 Die Überexpression von SP2-E-pIRES2-EGFP in MV3-Zellen** induzierte eine rundlich elliptoide Morphologie (Klon 13, langsame amöboide Migration).
- Film 12 Konfokalmikroskopische Lebendaufnahme von HA-pIRES2-EGFP transfizierten Kontrollzellen** zeigten eine spindelförmige, längliche Morphologie.
- Film 13 Konfokalmikroskopische Lebendaufnahme von SP2-E-pIRES2-EGFP transfizierten Zellen** zeigte bei höherer Auflösung, dass die rundliche Zellform dieser Zellen während der Migration beibehalten wurde und kurze dynamische Pseudopodien den Kontakt zu Kollagenfasern herstellten. Rote Fluoreszenz: Falschfarbendarstellung von EGFP; grünes Signal: Reflektion der Kollagenfasern.

- Film 14** **Rekonstruktion der 3D-Struktur des SP2-E Domäne des $\beta 1$ -Integrins in wässriger Umgebung.** HA-Tag am C-Terminus des Peptids hemmte die Konformation des Peptids nicht sterisch. Die konservierte Region mit dem NPIX-Motiv nahm dabei eine Typ I β -turn Konformation an.
- Film 15** **Spindelzellig-elongierte Morphologie und mesenchymale Migration von $\beta 1^{+/+}$ MEF in der Kollagenmatrix (20x).**
- Film 16** **Spinnenähnliche Morphologie und langsame Migration der $\beta 1^{\text{hoch}}$ -MEF.** Die $\beta 1^{\text{hoch}}$ -MEF entwickelten bei der Migration in der Kollagenmatrix 5-6 lange Pseudopodien, die aufgrund ihrer starken Adhäsion die Migration verhinderten.
- Film 17** **Elliptoide Morphologie und Filopodiale amöboide Migration von $\beta 1$ -Integrin defizienten MEF in der Kollagenmatrix (20x).**
- Film 18** **Filopodiale amöboide Migration von $\beta 1$ -Integrin defizienten ES (GD25) in der Kollagenmatrix,** entsprechend eines konstitutiv-amöboiden Phänotyps.
- Film 19** **Amöboide Migration von $\beta 1$ -Integrin defizienten MEF in der Kollagenmatrix.** Migration von $\beta 1^{+/+}$ (fl/fl) und $\beta 1$ -defizienten MEFs aus multizellulären Sphäroiden in 3D-Kollagenmatrices (24 sowie 48 Std. im Zeitraffer).
- Film 20** **Intakte mesenchymale Migration von MV3-Zellen nach Glycanentfernung in Anwesenheit des cRGD-Peptids (10 μM).** Sowohl Migrationsgeschwindigkeit als auch die mesenchymale Migrationsform der Zellen nach N-/O-Glycosidasebehandlung unterschieden sich nicht von unbehandelten Kontrollzellen (18 Std. Zeitraffer). Ein unspezifischer negativer Einfluss, z.B. durch latente Zytotoxizität des enzymatischen Verdaus konnte somit ausgeschlossen werden.
- Film 21** **Schrittweise Veränderung der Migrationsform von MV3-Zellen nach Hemmung der $\beta 1$ -Integrine und Entfernung der Zelloberflächenglycane.** Der Verlust der Zellpolarisierung und Ortsveränderung fand trotz bestehender Zytoskelett-Oszillationen ("running on the spot") nach dreifacher Interferenz mit 4B4 mAk, cRGD und N/O-Glycosidasen statt. In immobilisierten Zellen führt eine weitere Zytoskelettdynamik zu unvollständig ausgebildeten Filopodien. Alternativ wurden nichtpolarisierte Oberflächenblebs, aber keine Apoptose beobachtet. In einigen wenigen Zellen war residuelle Zelltranslokation durch Oberflächenblebs verbunden mit einer Änderung der Zellform.
- Film 22** **Immobilisierte Phänotypen bei $\beta 1$ -Integrin defizienten MEF nach Entfernung der Zelloberflächenglycane und in Anwesenheit des cRGD-Peptids (10 μM).** Alternativ wurden nichtpolarisierte Oberflächenblebs, aber keine Apoptose beobachtet. In einigen wenigen Zellen war residuelle Zelltranslokation durch Oberflächenblebs verbunden mit einer Veränderung der Zellform.
- Film 23** **Mesenchymale Migration von unbehandelten sowie chloratbehandelten MV3-Zellen,** sowohl Migrationsgeschwindigkeit als auch die mesenchymale Migrationsform der Zellen nach Chloratbehandlung unterschieden sich nicht von unbehandelten Kontrollzellen. Reduzierte Migrationsaktivität und Übergang von mesenchymaler Migration der chloratbehandelten und sulfatdefizienten Zellen in die amöboide Migration in Anwesenheit des anti $\beta 1$ -Integrin mAk 4B4 und des cRGD-Peptids (10 μM).

DANKSAGUNG

Mein aufrichtigster Dank gilt zuerst meinem engagierten Betreuer Prof. Dr. Peter Friedl für die Vergabe dieses interessanten Themas, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die fortlaufende Unterstützung. Vielen Dank auch dafür, dass ich so viel Neues erlernen und reflektieren konnte. Frau Prof. Dr. E.-B. Bröcker danke ich sehr für die freundliche Aufnahme und die Bereitstellung von Mitteln und Ressourcen.

Bei den Arbeitsgruppen von Dr. Stiew und Dr. Stickmann vom Rudolf-Virchow-Zentrum möchte ich mich für ihre Hilfe bei Zellinfektionsexperimenten, für die nette mehrwöchige Gastfreundschaft in ihrem Zellkulturlabor und für die massenspektrometrische Analyse bedanken.

Dr. R. Ahmadian und seiner Arbeitsgruppe vom MPI Dortmund danke ich für die gute Zusammenarbeit, die eine Publikation im *Journal of Science* im Jahre 2004 ermöglichte. Dr. J. Eble von der Universitätsklinik Frankfurt danke ich für die Bereitstellung von Rhodocetin. Dr. A. J. Messent und Prof. Dr. J. Humphries von der Universität Manchester sowie Dr. C. Brakebusch und Prof. R. Fässler vom MPI München danke ich sehr für die Bereitstellung der $\beta 1$ -Integrin defizienten Zellen.

Mein Dank gilt allen MitarbeiterInnen der Würzburger Arbeitsgruppe „Zellmigration“ für die freundliche Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Besonders hervorheben möchte ich die Unterstützung von Frau Margit Ott, Herrn Dr. Jochen Müller und Frau Ute Eifert. Meine Cousine Katrin Schmiedekampf und Herrn C. Stanke verdienen Dank für das Korrekturlesen.

Der Erna-Graf-Stiftung und dem Rudolf-Virchow-Zentrum danke ich für ihre finanzielle Unterstützung.

Zum Schluss möchte ich den Menschen danken, ohne die ich diesen Weg nie gegangen wäre. Meine Eltern haben mich während meines gesamten Studiums bedingungslos unterstützt und sind mit ihrer Liebe und Gelassenheit mein Fels in der Brandung. Mein Bruder Reza Daryab, meine Tante Maryam Schmiedekampf und mein Onkel Wolfgang Schmiedekampf waren mir immer gute Ratgeber und Unterstützer. Dirk danke ich dafür, dass er mir auch in schwierigen Situationen immer wieder Mut gemacht hat, und für das sorgfältige Lesen, das zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

LISTE DER PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE UND POSTER

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Publikationen erzielt:

Publikationen

Daryab N., Messent A.J., Brakebusch C., Eble J. A., Mayer U., Marlow R., Humphries M., Bröcker E.B., Friedl P. Mesenchymal-amoeboid transition in cancer cells and fibroblasts: A glyocalyx-dependent mode of migration induced by blockade of integrin function (eingereicht).

Uhlenbrock K., Herbrand U., **Daryab N.**, Stege P., Meyer F., Friedl P., Collard J. G., Ahmadian M.R. (2004) The guanine nucleotide exchange factor Tiam1 impacts melanoma adhesion, migration, invasion and proliferation. *J Cell Sci.* **117**: 4863-4871.

Mayer C., Maaser K., **Daryab N.**, Zänker K.S., Bröcker E.B., Friedl P. (2004) Release of cell fragments by invading melanoma cells. *Eur J Cell Biol.* **83**: 709-715.

Tagungsteilnahmen

Daryab N., Messent A.J., Moeller J., Brakebusch C., Humphries M.J., Eble J., Bröcker E.-B., Friedl P. (2006) Plasticity of tumor invasion: mesenchymal-amoeboid transition in melanoma cells after blocking of $\beta 1$ integrins is mediated by the surface glyocalyx. Deutscher Krebskongress, Berlin, Deutschland (Poster und Vortrag).

Daryab N., Moeller J., Brakebusch C., Eble J., Bröcker E.-B., Friedl P. (2004) Plasticity of tumor invasion: mesenchymal-amoeboid transition in melanoma cells after blocking of $\beta 1$ integrins. 95th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, Orlando, FL, USA. (Poster).

Daryab N., Moeller J., Eble J.A., Bröcker E., Friedl P.(2003) Mesenchymal-amoeboid transition in melanoma cells after blocking of $\beta 1$ integrins. 30. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Frankfurt, Deutschland (Poster).

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich:

1. Diese Doktorarbeit wurde von mir allein angefertigt. Ich habe keine anderen Ressourcen, Geräte und Materialien außer den ausdrücklich angegebenen verwendet.
2. Diese Dissertation war weder in dieser noch in ähnlicher Form Gegenstand eines Prüfungsverfahrens.
3. Ich bin bisher weder promoviert noch habe ich zuvor versucht, einen Dokortitel zu erwerben.

Unterschrift