

Untersuchung der mechanobiologisch gesteuerten Brustkrebszellinvasion mittels 3D Zellkulturmodellen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Julian Eschenbruch

aus Dinslaken

Bonn

Juni 2022

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: PD Dr. Bernd Hoffmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höfeld

Tag der Promotion: 14.11.2022

Erscheinungsjahr: 2022

Kurzfassung

Trotz intensiver Forschung weist das humane Mammakarzinom seit Jahren bei Frauen weltweit die höchste Inzidenz und Mortalität auf. Besonders die Bildung von Metastasen resultiert in einer hohen Anzahl an Todesfällen.

Ein erster zentraler Schritt während der Metastasierung ist die lokale Zerstörung der Basalmembran, gefolgt von der Transmigration invasiver Zellen in umliegendes Gewebe. Dieser Prozess ist *in vivo* schwierig zu visualisieren, weshalb die genauen Mechanismen der Invasion von tumorigenen Zellen durch eine Basalmembran noch nicht genau verstanden sind. Besonders der Einfluss von mechanobiologischen, invasionsfördernden Faktoren in der Wechselwirkung mit bekannten biochemischen Einflüssen wurde bisher kaum in *in vivo* relevanten Zell- oder Tiermodellen untersucht.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss zytoskelettaler Veränderungen in 3D Brustsphäroiden auf den Invasionsprozess analysiert. Vergleichbar zu den Strukturen der weiblichen Brust werden Brustsphäroide aus der Zelllinie MCF10A ebenfalls von einer endogen produzierten Basalmembran mit definierter mechanischer Stabilität umgeben, anhand derer die Prozesse, die zu einer Basalmembran-Invasion führen, beobachtet werden können. Durch die pro-invasive Stimulation mittels des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), der häufig überexprimiert in Brusttumoren vorliegt, und einer tumorassoziierten Versteifung der extrazellulären Matrix (EZM) konnte die Invasionsdynamik der eigentlich benignen Brustdrüsen-sphäroide analysiert werden. Unter Anwendung eines Invasionsassays wurde eine Steigerung der Invasion in Folge der tumorassoziierten Stimuli gezeigt, die durch eine Förderung der kontraktilen Zellkräfte und durch eine Erhöhung der Zellfortsätze bzw. der Stressfaserdichte verursacht wurde.

Die aktinbasierten Zellfortsätze als funktionelle Brücke zwischen einem proteolytischen und einem kraftabhängigen Invasionsmechanismus wurden als entscheidender Faktor in diesem Invasionsprozess definiert. Mittels hochauflösender konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie konnten Basalmembran durchspannende und aktinbasierte Mikrospikes identifiziert werden. Diese wurden in Abhängigkeit von EGF und der Versteifung der EZM ausgebildet. Im Zuge der malignen Transition eines gesunden Azinus, der Mikrospikes als Mechanosensoren zur Wahrnehmung (*Mechanosensing*) der EZM-Steifigkeit ausbildet, zu einem invasiven Phänotyp, veränderte sich die Funktionalität der Mikrospikes. Unter dem Einfluss pro-invasiver Stimuli resultierte die verstärkte Ausbildung der Mikrospikes in einem mechanischen Basalmembran-

Stress, der durch die Weitung der Poren in der Basalmembran zur Invasion beitrug. Erst nach der Transmigration ursprünglich azinarer Zellen bildeten invasive Zellen elongierte und proteolytisch aktive Fortsätze aus.

Zusätzlich wurde durch die Anwendung der Lebendzell-Zugkraftmikroskopie die Entstehung von Zugkraft-induziertem Basalmembran-Stress charakterisiert. Die basale Zellschicht prä-invasiver azinarer Zellen bildete an der Kontaktfläche zur umliegenden EZM Mikrospikes aus, die über Fokaladhäsionen mit der EZM verbunden waren. Ausgehend von diesen Mikrospikes konnte ein Wechsel zu kontraktile Aktin-Stressfasern visualisiert werden, die eine Nicht-Muskel-Myosin II vermittelte kraftinduzierte Basalmembran-Zerstörung verursachten. Diese EMT ähnliche zytoskelettale Reorganisation als Antwort auf eine tumorigene Veränderung der Mikroumgebung wurde als kritischer Mechanismus in der Tumorprogression identifiziert.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit ein neuartiges 3D Zellkulturmodell etabliert, um die invasionsfördernde Wirkung von EGF-Rezeptor (EGFR)-Signalwegen zu verstehen. Über die spezifische Aktivierung von onkogenem hRas, einem zentralen Protein in EGFR-Signalkaskaden, konnte eine eindeutige funktionelle Beziehung zwischen einer hRas Überaktivierung und einer erhöhten zellulären Invasion nachgewiesen werden. Trotz hRas bedingter zytoskelettaler Veränderungen basierte die höhere Invasion nicht auf erhöhten Zugkräften, sondern auf einer graduellen Schwächung der Basalmembran. Diese ist höchstwahrscheinlich auf eine fehlregulierte Erneuerung der Basalmembran durch eine gesteigerte Zellproliferation und eine stärkere kohärente Zellbewegung innerhalb des Brustdrüsenphäroids zurückzuführen. Hinzukommend könnte eine erhöhte Mikrospike- und Myosin X-Aktivität die BM-Schwächung fördern.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Wechselwirkung von EGFR-Signalwegen und einer invasionsfördernden Basalmembran-Schwächung in eigentlich nicht invasiven, benignen Brustdrüsenepithelien gezeigt werden. Dementsprechend trägt diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der mechanobiologisch regulierten Zellinvasion im humanen Mammakarzinom bei.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 DAS HUMANE MAMMAKARZINOM – EPIDEMIOLOGIE UND KLASSIFIKATION	1
1.2 ANATOMIE DER WEIBLICHEN BRUST	4
1.3 AUFBAU UND FUNKTION DER BASALMEMBRAN	6
1.4 DAS MCF10A BRUSTDRÜSENEPITHELMODELL.....	8
1.5 DIE MALIGNEN TRANSITION BEI BRUSTDRÜSENSPHÄROIDEN FÜHRT ZUR LOKALEN BM-ZERSTÖRUNG UND ZELLINVASION	11
1.5.1 Die invasionsfördernde Wirkung von EGF-Signalkaskaden und MMP-Aktivierung	13
1.5.2 Die invasionsfördernde Wirkung der EZM-Versteifung auf kontraktile Zellkräfte	15
1.6 AUFBAU DES AKTIN-ZYTOSKELETTS FÜR DIE AKTOMYOSIN VERMITTELTE ZELLKONTRAKTION	16
1.6.1 Die Aktin-Polymerisierung zum Aufbau von kontraktile Stressfasern.....	16
1.6.2 Die Myosin II vermittelte Kontraktion von SF resultiert in zellulären Zugkräften	17
1.7 AUFBAU UND FUNKTION AKTINBASIERTER ZELLFORTSÄTZE	18
1.7.1 Invasionsfördernde Zellfortsätze (Invadopodien)	21
1.8 DAS PROTO-ONKOGEN HRAS IM HUMANEN MAMMAKARZINOM.....	23
1.9 ZIELE DER ARBEIT	27
2 MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 GERÄTE.....	29
2.2 OBJEKTIVE	30
2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	30
2.4 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	31
2.5 MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	33
2.6 ANTIKÖRPER UND FLUORESZIERENDE FARBSTOFFE/ PEPTIDE	34
2.7 PROGRAMME	36
2.8 ZELLKULTURMETHODEN	36
2.8.1 Kultivierung von MCF10A Wt Zellen.....	37
2.8.2 Kultivierung von MCF10A-ER:hRas Zellen.....	38
2.8.3 Zellzahlbestimmung.....	38
2.8.4 3D Kultivierung von MCF10A Zellen	39
2.8.5 Transfer von MCF10A Azini	39
2.8.6 Biochemische Behandlungen.....	40

2.9	SUBSTRATHERSTELLUNG FÜR DIE ZELLKULTIVIERUNG UND FUNKTIONELLE ANALYSEN	40
2.9.1	<i>Herstellung von Elastomeroberflächen zur Invasions- und Zellkraftanalyse</i>	40
2.9.2	<i>Kovalente Kopplung carboxylierter Polystyrol-Beads an eine Elastomeroberfläche.....</i>	41
2.9.3	<i>Substratherstellung zur Zellkultivierung und für Immunfluoreszenz-Färbungen</i>	41
2.10	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN (IF).....	42
2.11	KONFOKALE LASERSCANNING MIKROSKOPIE (LSM)	42
2.11.1	<i>Quantitative Zellfortsatzanalysen</i>	43
2.11.2	<i>IF-Signalintensitätsanalysen für die BM, pERK- und MMP-Expression.....</i>	44
2.12	PROTEINANALYSEN	44
2.12.1	<i>Proteinisolation.....</i>	45
2.12.2	<i>BCA (Bicinchoninsäure) Test.....</i>	45
2.12.3	<i>SDS-Gelelektrophorese</i>	46
2.12.4	<i>Western Blot.....</i>	46
2.12.5	<i>Proteinfärbung.....</i>	46
2.13	ZELL-ZUGKRAFT-ANALYSEN (TFM)	47
2.14	INVASIONSASSAY	49
2.15	STATISTISCHE ANALYSEN	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	PROMOTIONSRELEVANTE VORARBEITEN	51
3.2	ANALYSE INVASIONSRELEVANTER ZYTOSKELETTALER VERÄNDERUNGEN BEI BRUSTSPHÄROIDEN	58
3.2.1	<i>Onkogene EGFR-Signalwege und die EZM-Versteifung induzieren die Bildung BM durchspannender Mikroskipes</i>	58
3.2.2	<i>Der Invasionsprozess verringert die laterale MS-Formation in Brustsphäroiden.....</i>	62
3.2.3	<i>Invasive Azini wechseln von einem nicht proteolytischen zu einem proteolytisch-abhängigem Invasionsmechanismus.....</i>	63
3.3	UNTERSUCHUNG DER AZINUS-INTERAKTION MIT DEM AZINUS-BM-EZM KONTAKTBEREICH	68
3.3.1	<i>Brustazini verändern ihre zytoskelettale Organisation an der EZM-Kontaktfläche</i>	68
3.3.2	<i>Basale Zellen interagieren über Aktin-Mikroskipes und Stressfasern mit der BM</i>	73
3.3.3	<i>Azinare Zellen bilden kraftübertragende Fokaladhäsionen zur BM und der EZM aus</i>	74
3.3.4	<i>Eine kohärente azinare Zellbewegung führt zur Transmigration von Zellen durch die BM.....</i>	79
3.3.5	<i>Die kohärente Zellbewegung verursacht Myosin II vermittelten BM-Stress.....</i>	80
3.3.6	<i>Die tumorassoziierte SF-Bildung verursacht Myosin II vermittelten BM-Stress</i>	81
3.4	CHARAKTERISIERUNG DES MCF10A-ER:hRAS ZELLKULTURMODELLS.....	86
3.4.1	<i>Eine konstante hRas- und pERK-Aktivierung resultiert in einer fehlerhaften Reifung und Polarisation von MCF10A Azini.....</i>	86
3.4.2	<i>Die hRas-Aktivierung verändert die Azinus-Größe</i>	91
3.5	DIE hRAS-AKTIVITÄT STEIGERT DIE INVASION VON BRUSTSPHÄROIDEN.....	94
3.5.1	<i>MCF10A:ER-hRas Azini weisen invasive Veränderungen im Aktin-Zytoskelett auf.....</i>	99
3.5.2	<i>Die hRas-Aktivität verringert die BM-Integrität von Brustsphäroiden.....</i>	104
3.5.3	<i>Myosin X könnte an der Invasion in MCF10A Azini beteiligt sein</i>	105

4	DISKUSSION	107
4.1	DIE FUNKTION VON AKTINBASIERTEN ZELLFORTSÄTZEN IM INVASIONSPROZESS	108
4.2	ZYTOSKELETTALE VERÄNDERUNGEN FÜHREN ZU INVASIONSFÖRDERNDER KONTRAKTILER ZELLKRAFT ...	118
4.3	DAS ONKOGEN HRAS STEIGERT DIE INVASIVITÄT DURCH DIE VERRINGERUNG DER BM-INTEGRITÄT	120
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	128
6	AUSBLICK	130
7	PUBLIKATIONSLISTE.....	132
8	LITERATURVERZEICHNIS	134
9	DANKSAGUNG	151

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Verbreitung des humanen Mammakarzinoms.	1
Abbildung 2: Behandlungsprognosen in Abhängigkeit der intrinsischen Subtypen bei Brustkrebs.	3
Abbildung 3: Anatomie der weiblichen Brust.	5
Abbildung 4: Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte bei epithelialen Brustsphäroiden.	6
Abbildung 5: Aufbau der Basalmembran.	7
Abbildung 6: Kultivierung von MCF10A Zellen in vitro.	9
Abbildung 7: Entwicklung und basoapikale Polarisation von MCF10A Brustsphäroiden in einem EHS Hydrogel. .	11
Abbildung 8: BM-Veränderung während der Zellinvasion bei Brustdrüsenosphäroiden.	13
Abbildung 9: Die MLC regulierte Kontraktion von Myosin II fördert die Zellmigration.	18
Abbildung 10: Bildung von aktinbasierten Zell(fortsatz)strukturen.	20
Abbildung 11: Struktur eines Invadopodiums.	22
Abbildung 12: Ras-Aktivierungszyklus.	23
Abbildung 13: hRAS Signalwege und deren funktionelle Auswirkung auf Zellen.	25
Abbildung 14: Prozessierungsschritte der digitalen Bildverarbeitung der Zugkraftmikroskopie.	49
Abbildung 15: Invasionsassay zur Analyse der kontraktile Zugkraft mittels Zugkraftmikroskopie.	50
Abbildung 16: Die Zelltransmigration eines invasiven Brustdrüsenosphäroids.	52
Abbildung 17: In vitro Kultivierungsbedingungen des Invasionsassays.	52
Abbildung 18: Die Zellinvasion ist abhängig von der EZM-Steifigkeit und der BM-Integrität.	53
Abbildung 19: BM-Stress in Abhängigkeit von der zunehmenden Malignität bei Brustsphäroiden.	55
Abbildung 20: Pro-invasive Veränderungen während der malignen Transition.	56
Abbildung 21: Bildung von BM durchspannenden Zellfortsätzen	57
Abbildung 22: MCF10A Azini bilden dynamische BM durchdringende MS.	59
Abbildung 23: Steigerung der MS-Bildung durch eine tumorassoziierte Steifigkeit und EGF.	61
Abbildung 24: Invasive Azini weisen eine reduzierte Anzahl lateraler MS auf.	63
Abbildung 25: Zelluläre Lokalisierung von Invadopodien-Markern in invasiven Zellen.	64
Abbildung 26: Der Nachweis von Invadopodien-Markerproteinen in Brustsphäroiden.	66
Abbildung 27: Lokalisierung von MMP-Proteinen an der Azinus-BM-EZM Grenzfläche.	67
Abbildung 28: Aktin-Strukturen an der Azinus-BM-EZM Grenzfläche.	69
Abbildung 29: Eine tumorassoziierte Mikroumgebung fördert die Umbildung von Aktin-Strukturen an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche.	71
Abbildung 30: Schematische Zusammenfassung der zytoskelettalen Veränderungen in der basalen Zellschicht.	72
Abbildung 31: Das Aktin-Zytoskelett azinärer Zellen co-lokalisiert mit der BM.	74
Abbildung 32: Migrierende Zellen bilden Fokaladhäsionen an der Migrationsfront.	75
Abbildung 33: SF sind über Fokaladhäsionen an die BM und die EZM gekoppelt.	77
Abbildung 34: MS sind über Fokaladhäsionen an die BM und die EZM gekoppelt.	78
Abbildung 35: MCF10A Azini weisen eine kohärente Zellbewegung auf.	79
Abbildung 36: Die Migration von MCF10A Einzelzellen ist Nicht-Muskel-Myosin II vermittelt.	80
Abbildung 37: Die azinären kontraktile Zellkräfte sind Myosin II vermittelt.	81

Abbildung 38: SF-Zellen verursachen Kraft-Hotspots an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche.	83
Abbildung 39: Die Entstehung von Kraft-Hotspots korreliert mit der Bildung von SF-Zellen.	84
Abbildung 40: Eine Myosin II-Inhibition führt zu einer Blockade der SF-Formation und Zellkräften.....	85
Abbildung 41: Eine konstante hRas-Aktivität stört die basoapikale Polarisation bei Brustsphäroiden	88
Abbildung 42: Die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen von MCF10A Wt und hRas Zellen beeinflussen die Brustdrüsen-Entwicklung nicht.	89
Abbildung 43: Die Aktivierung von hRas resultiert in einer erhöhten pERK-Aktivität.....	91
Abbildung 44: MCF10A Wt und MCF10A-ER:hRas Azini unterscheiden sich in der Größe.	92
Abbildung 45: Eine 16-stündige hRas-Aktivierung hat keinen Einfluss auf die Azinus-Größe.....	93
Abbildung 46: Eine hRas-Aktivierung und die EZM-Versteifung erhöhten die Invasivität von Brustsphäroiden.	95
Abbildung 47: Morphologische Veränderungen von Brustazini durch eine hRas Aktivierung.....	96
Abbildung 48: Die hRas induzierte Invasion ist unabhängig von der Myosin II- und MMP-Aktivität.	97
Abbildung 49: Vergleich der Myosin II vermittelten Zellkraft von invasiven hRas und Wt Azini.	98
Abbildung 50: MCF10A-ER:hRas Azini weisen eine hohe MS-Dichte an der Zell-BM-EZM Grenzfläche auf.....	100
Abbildung 51: Die BM von MCF10A:ER-Ras Azini ist poröser im Vergleich zu Wt Azini.....	101
Abbildung 52: Aktin-MS in hRas Azini co-lokalisieren mit pMLC.	102
Abbildung 53: Zytoskelettale Strukturen von MCF10A-ER:hRas Brustsphäroiden.	103
Abbildung 54: Die hRas-Aktivität resultiert in einer graduellen Schwächung der BM.	105
Abbildung 55: Myosin X ist in den Spitzen lateraler MS lokalisiert.	106

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Geräte</i>	29
<i>Tabelle 2: Verwendete Objektive</i>	30
<i>Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien</i>	30
<i>Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien</i>	31
<i>Tabelle 5: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen</i>	33
<i>Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper</i>	34
<i>Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen</i>	35
<i>Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen</i>	35
<i>Tabelle 9: Verwendete fluoreszierende Farbstoffe/ Peptide</i>	36
<i>Tabelle 10: Verwendete Programme</i>	36
<i>Tabelle 11: Medienzusammensetzung zur Kultivierung von MCF10A Wt Zellen</i>	38

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AKT	Proteinkinase B
AP	Alkalische Phosphatase
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat
BCSC	Brustkrebs-Stammzellen (engl. <i>Breast cancer stem cells</i>)
BM	Basalmembran (engl. <i>basement membrane</i>)
BSA	Bovines Serum Albumin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EGF(R)	epidermaler Wachstumsfaktor(-rezeptor) (engl.: <i>epidermal growth factor</i>)
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
engl.	englisch
ERISM	elastische Resonator-Interferenz-Stress-Mikroskopie (engl.: <i>elastic resonator interference stress microcopy</i>)
ERK	engl. <i>extracellular-signal regulated kinases</i>
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FA	Fokaladhäsion(en)
fJ	Femtojoule
h	Stunden (engl.: <i>hours</i>)
H ₂ O	Wasser
HD	Hemidesmosom(en)
hd-BM	hoch entwickelte Basalmembran (engl.: <i>highly developed BM</i>)
Her	epidermaler Wachstumsfaktor(-rezeptor) (engl.: <i>epidermal growth factor</i>)
hRas	engl. <i>harvey rat sarcoma virus</i>

HS	engl. <i>Hotspot(s)</i>
IF	Immunfluoreszenz
ld-BM	gering entwickelte Basalmembran (engl.: <i>low developed BM</i>)
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LED	engl. <i>light emitting diode</i>
LSM	<i>Laserscanning</i> Mikroskopie
MAPK oder MEK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
MIP	maximale Intensitätsprojektion (engl.: <i>maximum intensity projection</i>)
(p)MLC(K)	(phosphorylierte) Myosin-leichte-Kette(-Kinase) (engl. <i>Myosin light chain kinase</i>)
MMP	Matrix-Metalloprotease(n)
MS	Mikrospike(s)
MT	engl. <i>membrane type</i>
mTor	engl. <i>mammalian target of rapamycin</i>
n.s	nicht signifikant
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz
OHT	4-Hydroxytamoxifen
PDMS	Polydimethylsiloxan
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
Raf	engl. <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RalA	engl. <i>Ras-related protein</i>
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RhoA	engl. <i>Ras homolog family member A</i>
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF	Stressfaser(n)
TFM	Zugkraftmikroskopie (engl.: <i>traction force microscopy</i>)
TKS5	engl. <i>tyrosine kinase substrate with 5 SH3 domains</i>
u.a.	unter anderem
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Das humane Mammakarzinom – Epidemiologie und Klassifikation

Das humane Mammakarzinom ist weltweit die am häufigsten diagnostizierte Krebsart bei Frauen. Im Jahr 2020 wurden insgesamt 9,2 Millionen neue Krebsfälle diagnostiziert, von denen 24,5 % bei Frauen auf das humane Mammakarzinom entfielen [1]. Trotz deutlicher Fortschritte in der frühen Detektion von Brustkrebs, die zu einer Reduktion von ca. 38 % der Todesrate geführt haben [2], starben im Jahr 2020 ca. 682.000 Frauen weltweit an Brustkrebs. Obwohl die Zahlen für die Inzidenz und die Todesraten weltweit deutlichen Schwankungen unterliegen, ist das Mammakarzinom in 159 von 185 untersuchten Ländern die führende Tumorentität in Bezug auf die Häufigkeit und die Sterblichkeit (Abbildung 1) [1].

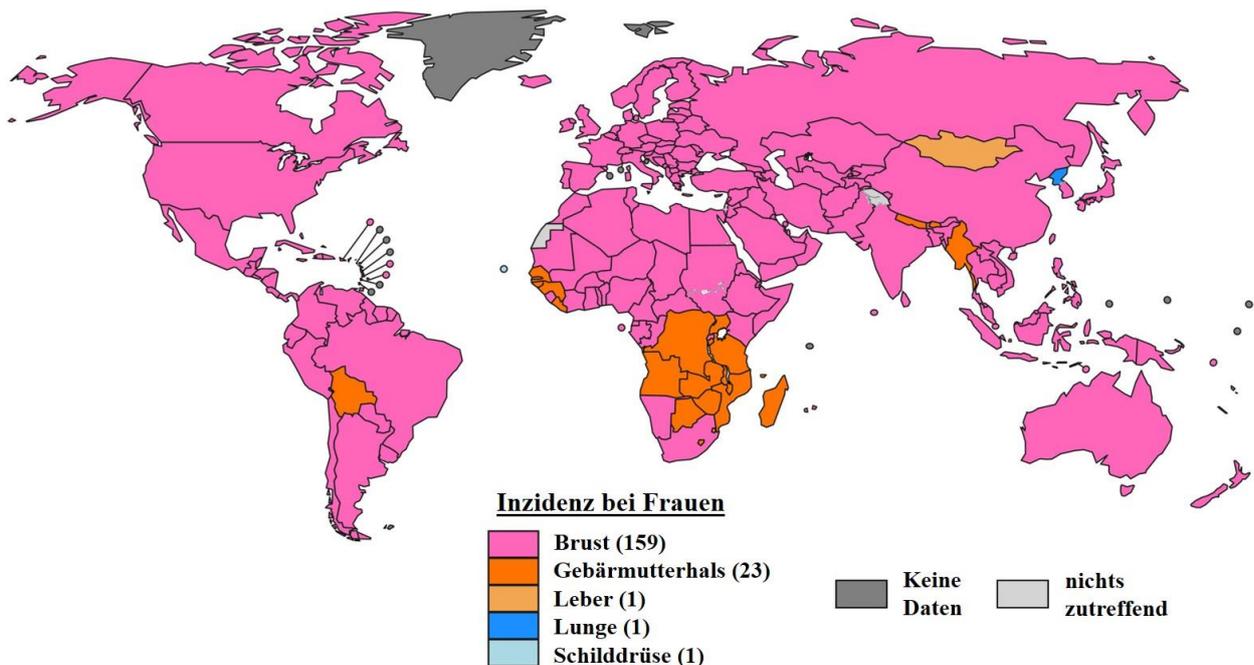


Abbildung 1: Weltweite Verbreitung des humanen Mammakarzinoms. Dargestellt ist die am häufigsten auftretende Tumorentität bei Frauen für 185 analysierte Länder weltweit. Die Inzidenzen für das humane Mammakarzinom sind in 159 Ländern führend (Hautkrebs, führend in Australien und Neuseeland, wurde nicht berücksichtigt). Verändert nach [1], Originaldaten von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und dem GLOBOCAN Report der internationalen Agentur für Krebsforschung, 2020.

Das Risiko von Frauen an Brustkrebs zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter. Die Wahrscheinlichkeit eines Brusttumors bis zu einem Alter von 75 Jahren beträgt ca. 4 - 7 %, wohingegen weltweit die Wahrscheinlichkeit vor dem 40. Lebensalter zu erkranken bei ca. 0,4 %

liegt. [3, 4]. Allerdings steigt das Risiko in einem jüngeren Alter zu erkranken durch den modernen und westlichen Lebenswandel in vielen Teilen der Welt deutlich an. Die höchsten Zahlen liegen in Australien, Westeuropa und Nordamerika vor. Aber auch in ärmeren Ländern stiegen die Inzidenzen und auch die Sterblichkeit zuletzt stark an [1]. Eine schwache medizinische Infrastruktur beispielsweise kann zu deutlich gesteigerten Werten, selbst bei jüngeren Frauen, führen. In Bereichen von Afrika oder dem mittleren Osten liegt der Anteil der unter 40-jährigen Patientinnen bei ca. 20 % [5, 6]. Zum Vergleich, in einem hochentwickelten Land wie Deutschland befindet sich dieser Wert bei ca. 6 % [7].

Allgemein gelten ein langer Zeitraum von Hormonschwankungen, beispielsweise ausgelöst durch eine späte letzte Regeblutung, Kinderlosigkeit oder ein hohes Alter bei der Geburt des ersten Kindes, als Risikofaktoren [8]. Als weitere Risikofaktoren sind Übergewicht, Bewegungsmangel nach den Wechseljahren, Hormontherapien (z.B. zur Schwangerschaftsverhütung) sowie ein erhöhter Alkohol- und Tabakkonsum bekannt [9, 10]. Außerdem können auch genetische Ursachen eine Prädisposition für Brustkrebs begünstigen. Beispielsweise können Keimbahn-Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie *BRCA1* und *BRCA2* (engl. *breast cancer gene 1/2*) auftreten. Allerdings ist die Bedeutung genetischer Ursachen mit 5 - 10 % als auslösender Faktor für die Entstehung eines humanen Mammakarzinoms im Vergleich zu den lebensstilabhängigen äußeren Faktoren mit 90 - 95 % vergleichsweise gering [11].

Trotzdem ist die Betrachtung der genetischen Aspekte beim humanen Mammakarzinom von großer Bedeutung, da zwischen den einzelnen intrinsischen Subtypen (Luminal A bzw. B, Her2 (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) positiv, Basal) eine hohe genetische Heterogenität vorliegt (Abbildung 2). Aus diesem Grund wird Brustkrebs eher als Sammlung von Krankheiten und nicht als Einzelkrankheit betrachtet. Dementsprechend sind auch die Krankheitsverläufe, die Behandlungen und die Prognosen für diese Subtypen sehr unterschiedlich (Abbildung 2) [12].

Ein wichtiger prognostischer Marker ist die Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR), der beispielsweise im Her2 Subtyp (15 – 20 % aller Brustkrebsfälle) überexprimiert wird und über PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) sowie Ras-Protein Signalkaskaden die Zellmigration und das Tumorwachstum fördert [13].

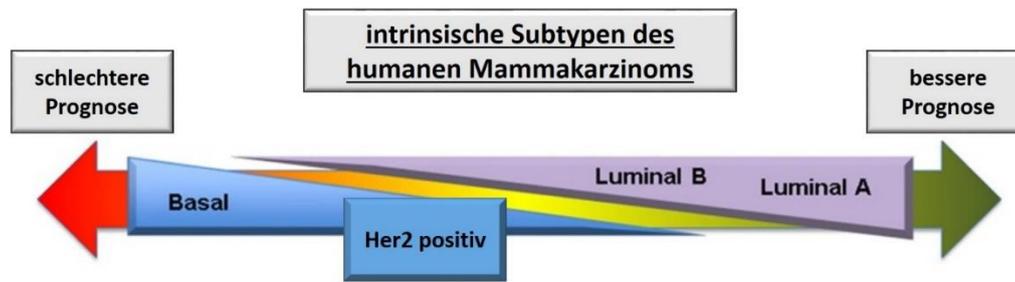


Abbildung 2: Behandlungsprognosen in Abhängigkeit der intrinsischen Subtypen bei Brustkrebs. Visualisierung der intrinsischen Subtypen des humanen Mammakarzinoms und deren Behandlungsprognosen. Die Diagnose eines Karzinoms des Typs Luminal A hat die beste Behandlungschance, während der basale Subtyp mit den schlechtesten Behandlungs- und Überlebenschancen assoziiert ist. Verändert nach [14].

Die Invasion durch die Basalmembran (BM) ist ein zentraler Schritt in allen Subtypen während der Tumorentstehung und Metastasierung, da erst die Bildung von Metastasen als Hauptfaktor für Brustkrebs bedingte Todesfälle gilt. Dementsprechend sind 90 % der Todesfälle auf Metastasen in Folge der Invasion durch die BM zurückzuführen [15]. Die BM-Invasion ist nicht durch die genetische Zusammensetzung gesteuert. Alle Subtypen, unabhängig davon welche molekularen Eigenschaften diese aufweisen, müssen vor der Metastasierung die BM passieren. Ansonsten können sich die Tumorzellen nicht im Körper ausbreiten, was die Überlebenschancen deutlich steigern würde [4]. Infolgedessen gilt der Prozess der BM-Zerstörung als ein typisches Merkmal von malignen Tumoren [16].

Folglich müssen die zellulären Mechanismen und Regelkreise der BM-Zerstörung und BM-Invasion weitergehend untersucht und erforscht werden. Als Grundlage für das Verständnis dieser Prozesse werden im Folgenden zunächst die Anatomie der weiblichen Brust und der Aufbau sowie die Funktion der BM erklärt.

1.2 Anatomie der weiblichen Brust

Die weibliche Brust ist eine komplexe endokrine Drüse zur Produktion von Milch [17]. Im Vergleich zu anderen Organen ist die Entwicklung nicht nach der Embryogenese abgeschlossen, sondern wird postnatal fortgesetzt. Der Abschluss der Entwicklung wird erst im Verlauf einer Schwangerschaft erreicht [18, 19].

Gebildet wird die weibliche Brust aus unterschiedlichen Gewebetypen. Das Drüsengewebe, welches die funktionellen Strukturen zur Milchproduktion beinhaltet, ist eingebettet in subkutanes Fett- und Bindegewebe. Lokalisiert ist die Brust im Bereich der dritten bis zur siebten Rippe und vom Brustbein bis zur Achselhöhle. Zwischen der Rippe und der Brust befindet sich hinter dem Drüsengewebe der Brustmuskel (Abbildung 3A) [20].

Von außen nach innen betrachtet, befindet sich äußerlich sichtbar die Brustwarze (*Papilla mammae*), umgeben von dem Brustwarzenhof (*Aerola Mammae*) und dem Drüsenkörper, eingelassen in eine brustumgebende Hautschicht. Innerhalb des Fettgewebes befinden sich ca. 15 - 20 tubuloalveoläre Einzeldrüsen (*Lobi*) mit jeweils einzelnen Drüsenläppchen (*Lobuli*). Die Einzeldrüsen, bekannt als intralobulärer Bereich, und die daran angeschlossenen Milchgänge (*Ductus lactiferi* und *Sinus lactiferi*), der extralobuläre Bereich, ergeben zusammen die terminale duktulo-lobuläre Einheit (TDLE) (Abbildung 3B und C) [18]. Innerhalb dieser TDLE und eines *Lobulus* befinden sich die kleinsten funktionellen Strukturen der weiblichen Brust, die sogenannten Azini (Abbildung 3B schwarze Box, C Vergrößerung). Dabei handelt es sich um die Milch produzierenden und sekretierenden Einheiten. Diese bestehen aus einem innen gelegenen Drüsenepithel (polarisierte luminale Zellen) und einer Schicht aus kontraktilen Myoepithelzellen. Die epitheliale Zellschicht ist mit der apikalen Seite zum innen befindlichen Lumen gerichtet und die basale Seite zur BM [21]. Beide Zellschichten werden von der BM umgeben, die dem Azinus strukturelle Stabilität verleiht und diesen von den umgebenden Zellen und Gewebe separiert (Abbildung 4A) [22].

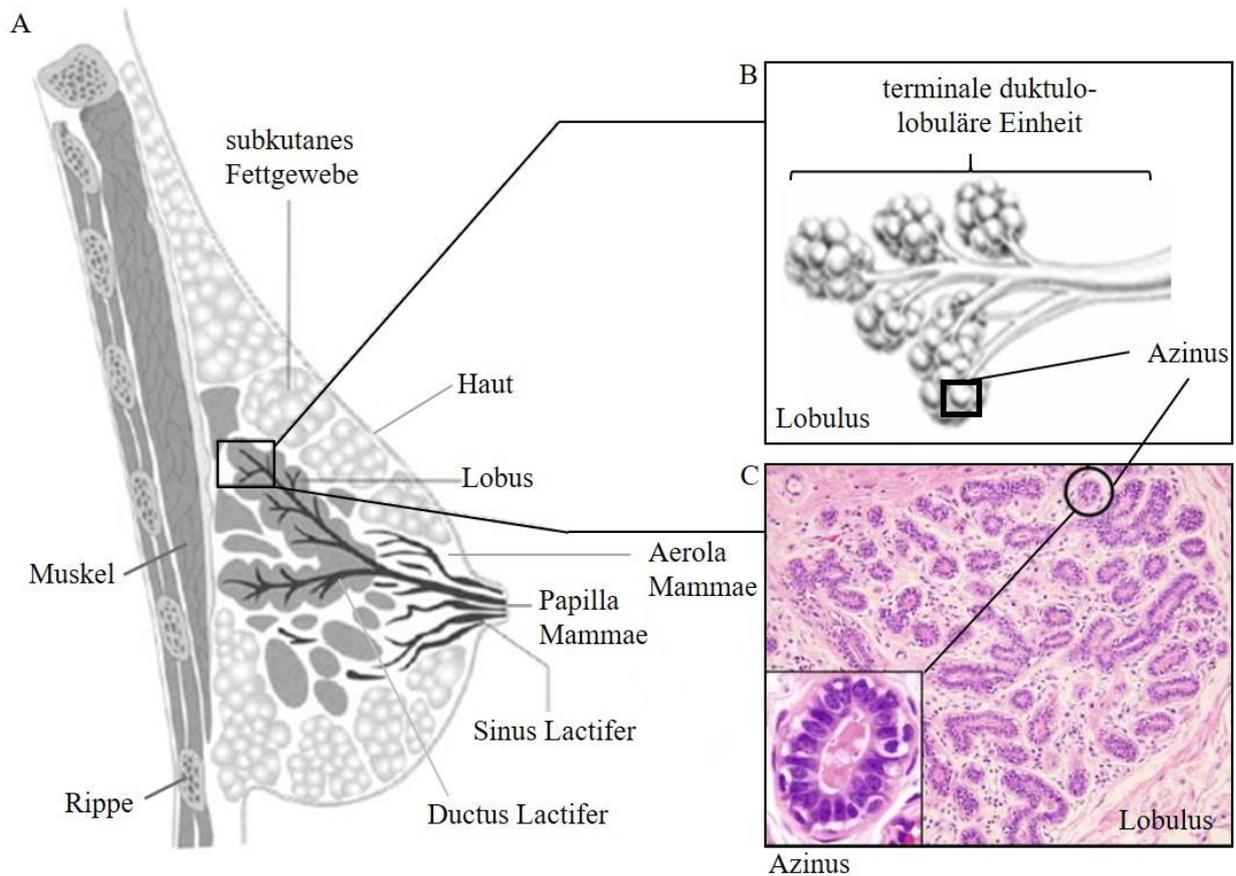


Abbildung 3: Anatomie der weiblichen Brust. (A) Schematische Darstellung der weiblichen Brust. Umgeben von einer Hautschicht und eingebettet in das subkutane Fettgewebe befinden sich die funktionellen und Milch produzierenden Strukturen der Brustdrüse. Von der Papilla Mammariae ausgehend liegen die Sinus Lactiferi und Ductus Lactiferi vor, die in den terminalen duktulo-lobulären Einheiten (TDLE) enden. Diese setzen sich aus einer Vielzahl an Lobuli zusammen, die wiederum einzelne Lobi bilden. (B) Zeichnung einer TDLE, die zusammen einen Lobulus ergibt. Die schwarze Box markiert einen einzelnen Azinus (C) Querschnitt eines Brustlobulus gefärbt mit Hematoxylin und Eosin (Zellkerne erscheinen violett). Der Kreis und die Vergrößerung zeigen einen einzelnen Azinus innerhalb des Lobulus. Verändert nach [21, 23, 24].

Neben der BM verleihen den Brustepithelsphäroiden Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte ihre strukturelle Stabilität (Abbildung 4A und B). Zwischen den Zellen, vor allem bei der basal polarisierten Epithelzellschicht, liegen die *Zonula occludens* (engl. *tight junctions*) sowie die auf Cadherinen und Cateninen basierenden Adhärenzverbindungen vor. Diese sind mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. Zusätzlich sind die Intermediärfilamente der Zellen über Desmosomen miteinander verknüpft [25, 26]. Die äußerste Zellschicht ist an der basalen Zellseite über Hemidesmosomen und Fokaladhäsionen (FA) mit der BM und der umliegenden EZM verbunden. Hemidesmosomen sind intrazellulär an Intermediärfilamente gekoppelt [25]. FA hingegen sind über mechanosensitive Proteine wie Vinculin und Talin an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt [27].

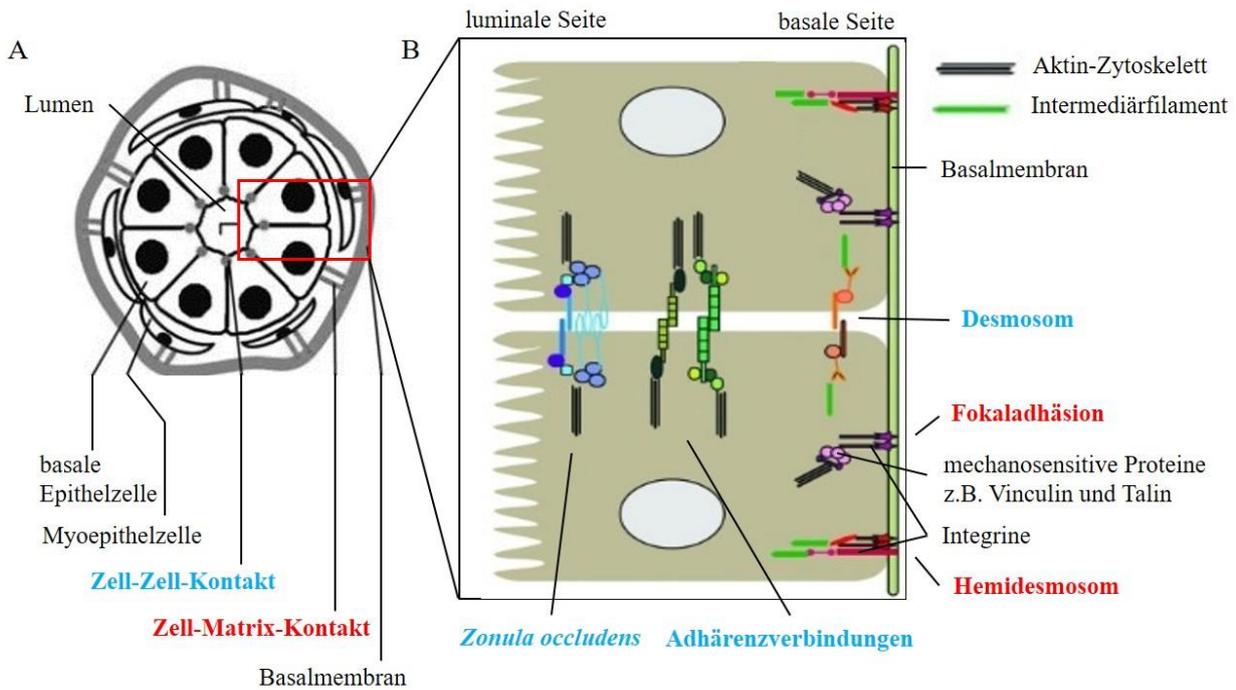


Abbildung 4: Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte bei epithelialen Brustsphäroiden. (A) Schematische Darstellung der kleinsten funktionellen Einheit der Brustdrüse (Azinus). Markiert sind das Lumen, die polarisierte basale Zellschicht, sowie die kontraktile Myoepithelschicht und die umgebende Basalmembran (BM). Zusätzlich sind Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen exemplarisch eingezeichnet. (B) Die detaillierte Betrachtung zweier benachbarter basaler und polarisierter azinärer Zellen zeigt die vorhandenen Zell-Zell- (Adhärenzverbindungen, Desmosomen, *Zonula occludens* (engl. *tight junctions*)) und Zell-Matrix-Kontakte (Fokaladhäsionen, Hemidesmosomen). Die Proteine (bei FA z.B. mechanosensitive Proteine wie Vinculin oder Talin), die an der Bildung dieser Kontaktstrukturen teilhaben, sind entweder mit dem Aktin-Zytoskelett oder Intermediärfilamenten verbunden. Verändert nach [21, 28].

1.3 Aufbau und Funktion der Basalmembran

Die BM besteht hauptsächlich aus Kollagen IV, Lamininen, Nidogen und Heparansulfat-Proteoglykanen (Abbildung 5) [29]. Der prozentual größte Anteil liegt mit ca. 50 % bei Kollagen IV [30]. Insgesamt sind ca. 50 verschiedene Moleküle als Bestandteile der BM beschrieben. Ihre Funktion besteht hauptsächlich in der Trennung der Epithelzellen von der extrazellulären Matrix (EZM) [31]. Die Formation der BM beginnt mit der Sekretion der Komponenten durch Epithel-, Endothel- und Muskelzellen. Diese Komponenten werden anschließend in den extrazellulären Raum transportiert. Dort werden die Bestandteile zu einem Multiproteinnetzwerk zusammengefügt [32].

Laminine, wie z.B. das Laminin-5 (332) [33], befinden sich über die Bindung an Integrine vermehrt an der epithelialen Seite der BM. Über die Bindung der Laminine an Zelloberflächen

wird ein selbstständiger Assemblierungsprozess der BM gestartet, der aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten besteht [34]. Laminine dienen als Bindungsstelle für weitere Proteine wie zum Beispiel Nidogen und Proteoglykan-Proteinen, die als Adapterproteine eine Verbindung zwischen den Lamininen und dem Kollagen IV herstellen [35]. Die strukturelle Stabilität der BM entsteht durch die kovalente Quervernetzung des Kollagen IV mittels Disulfidbrücken [36]. Eine Degradation des Kollagen IV resultiert dementsprechend in einer Zerstörung der BM [33]. Außerdem korreliert die Dicke der Kollagen IV Schicht mit der Widerstandsfähigkeit gegenüber azinaren Kräften [37].

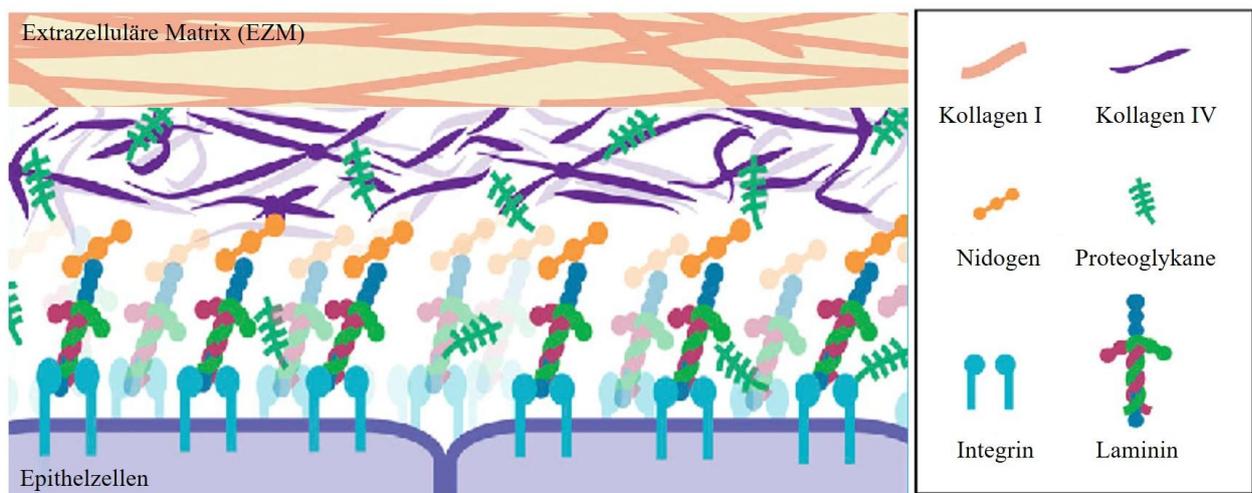


Abbildung 5: Aufbau der Basalmembran. Schematische Darstellung der Komponenten und der Struktur der BM. In der äußeren Epithelschicht sind Integrine verankert, die an Laminine gebunden sind. Die Laminine sind mit weiteren Komponenten der BM verknüpft, wodurch ein stabiles Netzwerk entsteht. Dieses Netzwerk besteht unter anderem aus Nidogen, verschiedenen Proteoglykanen sowie Kollagen IV und trennt die Epithelzellen von der extrazellulären Matrix (EZM). Verändert nach [38].

Insgesamt entsteht so eine ca. 100 – 300 nm dicke spezialisierte EZM, die Organe von Geweben trennt und diese Strukturen stabilisiert [39]. Zusätzlich dient die BM als Diffusionsbarriere. Experimentell wurden bei der BM der Hornhaut des Auges Poren in einer Größe von ca. 50 nm detektiert, sodass nur kleinere Makromoleküle die BM passiv passieren können [40]. Für Brustgewebe wurde mittels des Zellkulturmodells dreidimensionaler MCF10A Azini eine Porengröße von ca. 9 nm ermittelt [37]. Somit ist die BM auch eine natürlich physikalische Barriere für Krebszellen [41].

Abgesehen von der Barrierefunktion ist die BM an vielen elementar wichtigen Prozessen für die Zell- und Gewebemöostase beteiligt. So ist die BM wichtig für das Zellwachstum und die Differenzierung. Während der frühen Morphogenese von Sphäroiden koordiniert die neu sekretierte BM die epitheliale Gewebeorganisation. Dies geschieht über die Organisation von

Proteinen, die für die Polarisation wichtig sind, und über die Lokalisation von Adhäsionsmolekülen entlang der Membran. Außerdem ist die BM in Prozesse wie die Zelladhäsion und -migration involviert. Die BM bietet eine adhäsive Oberfläche für Zellen, die funktionell über Integrine an das Aktin-Zytoskelett angebunden sind. Unter anderem durch die Bindung an das Aktin-Zytoskelett ist die BM über mechanische Interaktionen mit den Zellen und der EZM an der Aktivierung und Weiterleitung von intrazellulären Signalkaskaden bzw. der Signalwahrnehmung beteiligt [16, 29]. Aber auch an der biochemischen Regulation der Signalweiterleitung ist die BM involviert. Die Degradation der BM mit einer daraus folgenden Freisetzung von BM Fragmenten kann Signalwege aktivieren. In Mäusen resultierte die Fragmentierung von Kollagen IV durch MMP9 (Matrix-Metalloprotease 9) in einem beschleunigten Tumorwachstum [42], in embryonischen Stammzellen führten Laminin-111 Fragmente zur epithelialen-mesenchymalen-Transition [43].

Die Bedeutung der BM wird anhand der Betrachtung einer möglichen pathologischen BM-Entwicklung und –Differenzierung deutlich. Beispielsweise kann die Bildung einer funktionellen BM als Folge genetischer Veränderungen (Mutationen) gestört sein, was bereits in einem embryonalen Stadium zum Tode führen kann. Mausembryos mit einer Mutation in der $\gamma 1$ Untereinheit, die in vielen Lamininen vertreten ist, überlebten nicht länger als 5,5 Tage nach dem Koitus [44].

Nicht-lethale Mutationen mit einer fehlerhaften oder einer strukturveränderten BM resultieren in stark beeinträchtigenden Krankheitsbildern durch beispielsweise Defekte im Gehirn, den Augen oder Muskeln [30, 45-47]. Während der Tumorprogression führen unter anderem Veränderungen der BM-Zusammensetzung oder der BM-Struktur sowie eine reduzierte BM-Synthese zur Invasion von Krebszellen durch die BM und ermöglichen die Metastasierung [48]. Um diesen Prozess der Zelltransmigration von Tumorzellen durch die BM besser zu verstehen, werden möglichst *in vivo* ähnliche Modelle für die Analyse des Invasionsvorganges benötigt.

1.4 Das MCF10A Brustdrüsenepithelmodell

Zur Untersuchung der normalen Brustdrüsenmorphogenese hat sich das Zellkulturmodell der Zelllinie MCF10A etabliert [49]. MCF10A Zellen sind eine nicht-transformierte und immortalisierte humane Brustepithel-Zelllinie, die keine malignen oder tumorigenen Eigenschaften aufweist [50]. Über die Anpassung der EZM-Steifigkeit, die Veränderung der BM-

Widerstandsfähigkeit oder über eine onkogene EGF-Stimulation kann eine irreversible BM-Zerstörung mit dadurch induzierter Zellinvasion simuliert werden [33]. Dies ermöglicht die Analyse der Tumorentstehung und des Prozesses der Transmigration von Tumorzellen durch die BM in einem *in vivo* ähnlichen Zellkulturmodell.

Obwohl es eine Vielzahl (>100) verschiedener Brustkrebs- und Brustzelllinien gibt, weisen nur wenige die Eigenschaft auf *in vivo* ähnlich in dreidimensionalen (3D) Strukturen zu wachsen [21, 51]. Die Kultivierung von basoapikal polarisierten Brustsphäroiden mit einer intakten BM ist der Grundstein für die Erforschung der Mechanismen der BM-Invasion. Ein kritischer Schritt der Forschung in 2D-Modellen ist der Transfer von Ergebnissen aus der Kultivierung von Zellmonolagen in komplexere 3D- oder Tiermodelle. Aufgrund der in Monolagen nicht vorhandenen BM und EZM fehlen wichtige Parameter, die die Regulation und die Polarisation der Zellen entscheidend beeinflussen können [52]. So waren 95 % der prä-klinisch effektiven Wirkstoffe unwirksam in der ersten klinischen Testphase [53]. Daher ist die Verwendung von 3D Zellmodellen in der Grundlagenforschung und der klinischen Forschung von großer Bedeutung, um die natürliche Zellumgebung bestmöglich zu imitieren [54].

Erstmalig beschrieben wurde das Modell 2003 von Debnath und Kollegen [55]. In der klassischen Kultivierung auf einem planaren Plastiksubstrat wachsen die Zellen zu einer einschichtigen Zellmonolage zusammen. Dabei bildet diese bei höherer Konfluenz ein typisches kopfsteinpflaster-artiges Wachstumsmuster aus (Abbildung 6A und B) [55].

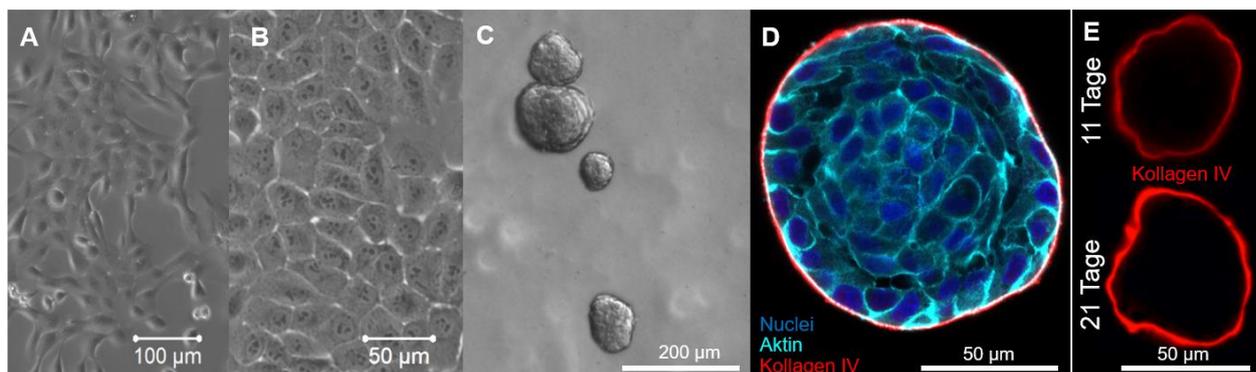


Abbildung 6: Kultivierung von MCF10A Zellen *in vitro*. (A und B) MCF10A Zellen auf einem planaren Zellkulturplastik-Substrat in unterschiedlichen Konfluenzstadien. (A) Im subkonfluenten Zustand liegen die Zellen teilweise noch einzeln und länglich vor, (B) während in einem höheren Konfluenzstadium das typische kopfsteinpflaster-artige Erscheinungsbild entsteht. (C) Unter definierten Kultivierungsbedingungen in einer EHS Matrix bilden sich multizelluläre und *in vivo* ähnliche 3D Strukturen aus (Durchlicht-Aufnahme). (D und E) Die repräsentativen Querschnitte einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Aktin, Kollagen IV und die Zellkerne eines 11 Tage alten Azinus (auf Glas) zeigt die zelluläre Organisation in einem Azinus (D) und die Zunahme der Kollagen IV Schichtdicke mit zunehmender Kultivierungsdauer (E) (konfokale Aufnahmen). E verändert nach [33].

In 3D hingegen bilden die Zellen ausdifferenzierte Azini, die vergleichbar mit den *in vivo* Strukturen der weiblichen Brust sind (Abbildung 7C und D) [37, 55]. Möglich ist dies unter anderem durch die Kultivierung der Zellen in einer Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Matrix. Das EHS Gel stellt eine aufgereinigte, lösliche und basalmembranartige Matrix dar, isoliert und aufgereinigt aus murinen EHS-Tumoren. Enthalten sind viele typische Proteine der BM, wie zum Beispiel Laminine, Kollagen IV und Heperansulfat-Proteoglykane. Unter Standardkulturbedingungen bei 37 °C bildet das gelartige Proteingemisch ein stabiles Hydrogel aus [56]. Dieses Hydrogel entspricht mit einer Vielzahl an typischen BM Proteinen einer natürlichen biologisch aktiven Zellumgebung [57].

Über die Interaktion mit dieser Zellumgebung kann ausgehend von einer einzelnen Zelle ein basoapikal polarisierter Sphäroid mit einer BM entstehen (Abbildung 7). Dazu proliferieren die Einzelzellen zunächst und ab Tag 5-8 entstehen zwei verschiedene Subpopulationen von Zellen innerhalb des Azinus: eine polarisierte basale Zellschicht, die einen direkten Kontakt zur EZM hat, und kaum polarisierte luminale Zellen. Nach der Bildung dieser basoapikal polarisierten basalen Zellschicht und einer konstant umgebenden sekretierten BM entsteht ein Lumen, weil die innenliegenden luminalen Zellen apoptotisch werden [55]. Entscheidend für die Lumenbildung ist die Entfernung von EGF aus dem Medium ab dem neunten Kultivierungstag, um eine fortwährende Proliferation zu unterbinden. Die BM, sekretiert von den basalen Epithelzellen, reift über die Zeit und gewinnt an Stabilität (Abbildung 6E und Abbildung 7) [37]. Die BM-Dicke von Azini mit einer gering entwickelten BM (ld-BM) liegt bei ca. 230 nm, während eine gereifte, hoch entwickelte BM bei ca. 660 nm liegt [58].

Auf Grund der morphologischen Eigenschaften und der Ähnlichkeit zu *in vivo* vorkommenden Azini (vgl. Abbildung 3) eignet sich das Zellmodell der MCF10A Brustdrüsenosphäroide, um die kleinste funktionelle Einheit der Brust unter physiologisch relevanten Bedingungen zu untersuchen. Einzig die myoepitheliale Zellschicht fehlt in diesem Modell. Dennoch ist es möglich die Interaktion der Epithelzellen mit der BM zu analysieren, wodurch dieses Modell in der Brustkrebsforschung von großer Bedeutung ist. Trotz der nicht-tumorigenen Eigenschaften dieser Zelllinie ist es möglich diese biomechanisch und biochemisch so zu regulieren und zu manipulieren, dass MCF10A Azini ein invasives Verhalten entwickeln [59, 60]. So zeigten MCF10A Azini, die zunächst für 14 Tage in einem weichen Hydrogel kultiviert wurden, in einem Hydrogel mit einer tumorähnlichen Steifigkeit eine erhöhte Proliferation und einen invasiven Phänotyp [59]. Klos und Kollegen demonstrierten eine lokale Zerstörung des Laminins-5 durch die Stimulation mit Tetradeconoylphorbol-Acetat (TPA) und die Aktivierung der Rezeptorproteinkinase C, die ebenfalls die Invasion fördert [60].

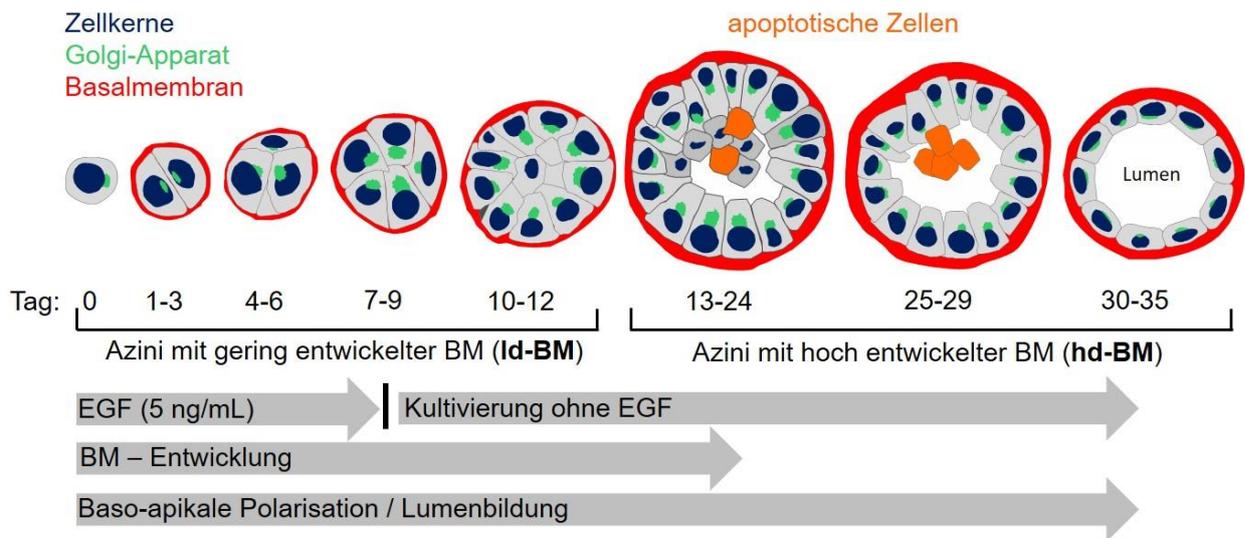


Abbildung 7: Entwicklung und basoapikale Polarisation von MCF10A Brustsphäroiden in einem EHS Hydrogel. Dargestellt ist die dreidimensionale zeitliche Differenzierung in einer EHS-Gelmatrix. Ausgehend von einer Zelle entstehen multizelluläre Strukturen mit einer konstant umgebenden Basalmembran. Zusätzlich angegeben sind die Kultivierungsbedingungen in Bezug auf die Verwendung des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF). Durch die EGF-Depletion entsteht ein Lumen. Die BM wird durch die Sekretion von der basoapikal polarisierten Zellschicht mit zunehmender Zeit dicker. Unterschieden wurde zwischen Azini mit einer gering entwickelten BM (ld-BM Azini, 10/11 Tage alt) und Azini mit einer hoch entwickelten BM (hd-BM, 21 Tage alt). Verändert nach [37].

1.5 Die maligne Transition bei Brustdrüsensphäroiden führt zur lokalen BM-Zerstörung und Zellinvasion

Der Prozess der Zellinvasion durch eine BM ist ein mehrstufiger Prozess mit vielen involvierten Faktoren, die die Tumorprogression bis hin zur Invasion und Metastasierung unterstützen. Während dieses Vorgangs verändert sich auch die BM sowie die umliegende EZM und die intrazellulären Signalkaskaden [61].

Schematisch ist der gesamte Vorgang von einem gesunden Azinus mit einer intakten BM über ein duktales Karzinom in situ (DCIS) bis zu einem invasiven Tumor in der Abbildung 8 dargestellt. Ein Azinus mit intakter BM und Lumen befindet sich in einem physiologischen Zustand (Gewebehomöostase) (Abbildung 8 - Links). Dieses Gleichgewicht wird durch die Entstehung eines Tumors gestört. Ein Tumor kann durch genetische oder epigenetische Faktoren initiiert werden und resultiert in einem unkontrollierten Zellwachstum der Tumorzellen [62]. Obwohl die BM als physikalische Barriere, zu diesem Zeitpunkt der Tumorprogression (DCIS) noch intakt ist,

beginnen pro-invasive Prozesse innerhalb und außerhalb des Azinus. Zum einen führt die zunehmende Tumormasse im Inneren des Azinus (im Lumen, innerhalb der myoepithelialen und der basalen epithelialen Zellschicht) zu einem ansteigenden Druck auf die BM, zum anderen sekretieren die Tumorzellen verschiedene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel EGF, die zu einer autokrinen Aktivierung des umliegenden Gewebes führen [63, 64]. Diese Aktivierung von Fibroblasten führt zu einer Verhärtung der den Azinus umgebenden EZM, da aktivierte Fibroblasten EZM-Bestandteile zur Wundheilung sekretieren [65]. Außerdem wird der Tumor an einer veränderten Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren erkannt, sodass inflammatorische Zellen wie Makrophagen und Lymphozyten rekrutiert werden, die an die tumorassoziierten Antigene binden [66]. Weiterhin resultieren diese Prozesse in einer Strukturveränderung innerhalb der BM (Abbildung 8 - Mitte). Einerseits tritt hierbei eine reduzierte Neusynthese der BM auf, andererseits wird die strukturelle Zusammensetzung der BM verändert. Diese Veränderung gilt als frühe pathologische Signatur humaner Mammakarzinome [48].

Die Verhärtung der EZM, die Veränderungen der BM und die zunehmende Tumormasse innerhalb des Azinus erhöhen die physikalischen Kräfte, die auf den Azinus bzw. die BM wirken. Grundsätzlich sind Zellen in Geweben Kräften wie (hydrostatischen) Drücken, Zugkräften, Scherungen, Kompressionen und Dehnung ausgesetzt (z.B. durch die Laktation oder in einem pathologischen Kontext durch die Tumormasse). Diese Einflüsse sind im humanen Mammakarzinom bereits als erhöht charakterisiert worden. [64, 67].

Auf die Veränderungen der BM und EZM reagieren die Zellen innerhalb des Azinus. In Folge der Wahrnehmung über mechanosensorische Rezeptoren modifizieren die Zellen ihr Aktin-Zytoskelett und ihre Genregulation [64]. Infolgedessen durchlaufen die Zellen eine epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT), ein Prozess bei dem Zell-Zell-Kontakte und Adhäsionskomplexe zwischen Zellen und der Matrix (z.B. Fokaladhäsionen) abgebaut werden. Dadurch bilden die Zellen einen mesenchymalen Phänotyp aus, der eine erhöhte Zellmotilität und Migrationsfähigkeit begünstigt [68, 69]. Zusätzlich können die Zellen während der EMT-Prozesse vermehrt MMP produzieren, die zur proteolytischen Degradation der BM und EZM beitragen [70]. In Summe führen diese Prozesse zu lokalen BM-Zerstörungen. Durch diese BM-freien Bereiche können Tumorzellen den ursprünglichen Azinus verlassen und benachbartes Gewebe oder die Blutgefäße infiltrieren. Ab dem Moment der Transmigration von Tumorzellen durch die BM handelt es sich um einen invasiven Tumor (Abbildung 8 - Rechts).

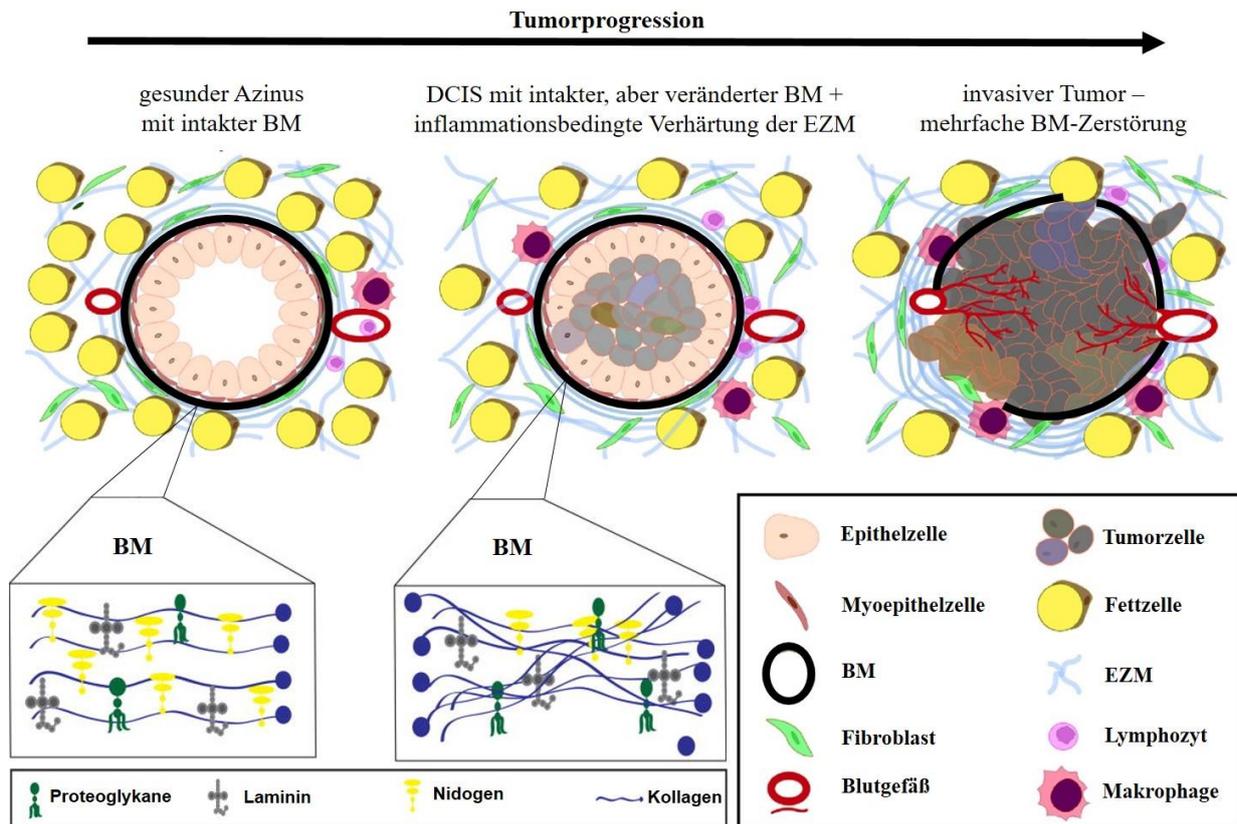


Abbildung 8: BM-Veränderung während der Zellinvasion bei Brustdrüsenosphäroiden. Schematische Darstellung der Transition von einem homöostatischen Azinus hin zu einem invasiven Tumor. Beispielhaft abgebildet ist ein Azinus mit Lumen und ausdifferenziert strukturierter BM (links). Die Entstehung eines DCIS führt zur Hyperproliferation von Tumorzellen innerhalb des Azinus und einer inflammationsbedingten Verhärtung der EZM (Mitte oben). Zusätzliche strukturelle Veränderungen in der BM (Mitte unten) resultieren in lokalen BM-Zerstörungen, sodass die Tumorzellen in das umliegende Gewebe migrieren können. Verändert nach [48, 61].

Zusammenfassend sind sowohl eine gesteigerte Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, die gesteigerte Bildung von MMP, die tumorbedingte Versteifung der EZM, als auch eine unter anderem EMT bedingte erhöhte zytoskeletale Kontraktion als proinvasive Faktoren beschrieben [71]. Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit relevanten invasiven Stimuli detaillierter betrachtet werden.

1.5.1 Die invasionsfördernde Wirkung von EGF-Signalkaskaden und MMP-Aktivierung

Die biochemische Stimulation von Brustdrüsenepithelien ist ein wichtiger Faktor im Invasionsprozess. Besonders hervorzuheben im humanen Mammakarzinom ist hierbei die Wirkung des Wachstumsfaktors EGF (epidermaler Wachstumsfaktor). EGF wird von umliegenden Zellen produziert und sekretiert und bindet an epidermale

Wachstumsfaktorrezeptoren [72]. Zur EGF-Rezeptorfamilie (Tyrosin-Rezeptoren aus der ErbB Klassifikation) gehören die Rezeptoren ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4 [73]. Über diese Rezeptoren werden eine Vielzahl intrazellulärer Signalwege reguliert, die die DNA-Synthese, die Zellproliferation und die Gewebedifferenzierung beeinflussen [74, 75].

Auf Grund der diversen und fundamentalen Wirkung von EGF hat eine Dysregulation dieser Signalwege einen bedeutenden Einfluss auf die zellulären Prozesse. Eine Überexpression von EGF fördert unter anderem die Tumorprogression. Ursachen hierfür sind beispielsweise die Erhöhung der Zellmigration, die vermehrte Zellablösung von der EZM und eine Förderung der Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps (gezeigt für humane Epidermoid-Zellen mit einer EGF-Überexpression) [76]. In 27 % aller Mammakarzinome liegt eine Überexpression der EGF-Rezeptoren vor [72] und ist zudem mit schlechteren Überlebensprognosen assoziiert [76].

Die Bedeutung von EGF zeigt sich ebenfalls für die Differenzierung des vorgestellten MCF10A Azinus. Hier nimmt EGF Einfluss auf die basoapikale Polarisation und die BM-Formation [55] (vgl. Abschnitt 1.4).

Über die Stimulation des ERK/MAPK Signalwegs aktiviert EGF zudem die MMP-Genexpression. Sowohl die membrangebundene MT1-MMP (engl. *membrane type 1-MMP* oder MMP14) als auch die sekretierte MMP9 werden über EGF aktiviert [77]. Grundsätzlich handelt es sich bei MMP um Peptidasen, die eine Vielzahl an Prozessen (z.B. Angiogenese, Remodellierung des normalen Bindegewebes, Wundheilung) regulieren, aber in einem pathologischen Kontext durch die proteolytische Degradation der BM und der EZM als invasionsfördernde Faktoren gelten [78]. Zusätzlich können MMP als Stimulator für den EMT Prozess im humanen Mammakarzinom fungieren. Dies wurde anhand eines Mausmodells für MMP3 über die Erhöhung der Expression von Rac1b für Brustkrebszellen demonstriert [79].

Vergleichend zu EGF ist auch die Expression von vielen MMP in Brustkrebs deutlich erhöht und korreliert je nach Art der MMP mit schlechteren Prognosen des Krankheitsverlaufes [80, 81]. In humanen Tumoren sind viele MMP dereguliert, wie die löslichen MMP1, MMP3, MMP7 und MMP9 sowie die Membran gebundene MT1-MMP [82]. Allerdings ist der therapeutische Nutzen dieses Wissens bisher gering, da MMP-Inhibitoren in klinischen Phasen meist aufgrund von mangelnder Wirkung *in vivo* oder zu hoher Toxizität auf das gesunde Gewebe keine Zulassung erhielten [83].

1.5.2 Die invasionsfördernde Wirkung der EZM-Versteifung auf kontraktile Zellkräfte

Auch mechanische Faktoren in Form physikalischer Kräfte oder die Beschaffenheit des umliegenden Gewebes nehmen konstant Einfluss auf die intrazellulären Mechanismen und können die Invasivität von Brustdrüsenphäroiden regulieren.

Die EZM-Steifigkeit hat einen großen Einfluss auf das zelluläre Verhalten und fördert die Entstehung eines malignen Phänotyps in epithelialen Brustzellen. Jedes Gewebe hat im physiologischen Zustand eine charakteristische Steifigkeit, die zum Teil durch die Komposition und Organisation der EZM bestimmt wird. Das humane Brustgewebe ist mit ca. 170 Pa sehr weich. Diese Steifigkeit kann mittels einer EHS-Matrix, wie es in der 3D Zellkultur von Brustsphäroiden verwendet wird, imitiert werden (ca. 180 Pa) [84]. Im Falle einer malignen Transformation erhöht sich die Steifigkeit in dem entsprechenden Bereich der weiblichen Brust bis zu einer Steifigkeit von ca. 12 kPa [85]. Dementsprechend gilt die pathologische EZM-Versteifung, aber auch natürlich auftretendes dichtes Brustgewebe, als Risikofaktor bei der Tumorentwicklung [86, 87]. Diese EZM-Veränderungen werden von den Zellen wahrgenommen. Dies geschieht über das Prinzip der mechanosensorischen Wahrnehmung (engl. *Mechanosensing*) der EZM [88, 89]. Eine Verhärtung des Gewebes wird über mechanosensorische Proteine in FA, wie beispielsweise Vinculin und Talin, detektiert. FA sind Proteinkomplexe, die einerseits eine Übertragung von Aktomyosin vermittelten Kräften auf die EZM ermöglichen, aber auch eine Verbindung zwischen der EZM und interzellulären Strukturen darstellen. Aus diesem Grund sind FA an der Signalerkennung entscheidend beteiligt [27, 90]. Von FA ausgehend werden externe mechanische Reize in intrazelluläre biochemische Signale umgewandelt (Mechanotransduktion) [91]. Diese Art der Signalweiterleitung eines externen Reizes in intrazelluläre Signale wird im englischen als *outside-in signalling* beschrieben [92]. Daraus resultiert unter anderem eine veränderte Proteinexpression [93]. Eine Vielzahl steifigkeitsinduzierter Effekte wurde von Martino und Kollegen zusammengefasst [94]. Dazu zählen u.a. eine proliferationssteigernde Wirkung, die Beeinflussung der Migration und eine veränderte Lokalisation von Proteinen infolge von EZM-Modifikationen. So werden z.B. Paxillin, YAP (engl. *yes-associated protein*) und β -Catenin bei mechanischem Stress zum Zellkern transportiert. Außerdem führt eine EZM-Verhärtung zu einer Aktivierung von MMP14 bei Bauchspeicheldrüsenkrebs [95].

Zusätzlich kommt es zu zytoskelettalen Veränderungen. Über die Polymerisation von Aktin entstehen Strukturen wie Filopodien und Stressfasern, die die Migration und die Kontraktilität einer Zelle über den Aktomyosin-Komplex beeinflussen [64]. Dadurch entstehen zelluläre Zugkräfte, wobei Zellen auf einem härteren Substrat invasionsfördernde stärkere Kräfte generieren

als in einer weicherer EZM-Umgebung. In diesem Fall werden zelluläre Informationen (z.B. eine Veränderung der Zellaktivität und der Zellspannung) auf die EZM übertragen (engl. *inside-out signalling*). Dies geschieht u.a. durch die Regulierung von Integrinen und die Induktion von Signalwegen, die beispielsweise zu einer erhöhten FA-Bildung und Zellkontraktion führen [92]. Dieser Prozess nimmt Einfluss auf die Zellmigration während der Tumorprogression, da sich Zellen in die Richtung des steifen Substrates bewegen. Dieses als Durotaxis bekanntes Phänomen fördert folglich im pathologischen Kontext die Invasion durch die BM und die Metastasierung, wenn die umliegende EZM tumorbedingt verhärtet [96, 97].

Bevor die zytoskelettalen Veränderungen besonders im Hinblick auf die Zellfortsatzbildung und die Funktion dieser Fortsatzstrukturen in einem gesunden Gewebe und in einer Tumorumgebung detailliert vorgestellt werden, soll die oben erwähnte Aktin-Polymerisierung und Myosin II vermittelte Kontraktion erläutert werden.

1.6 Aufbau des Aktin-Zytoskeletts für die Aktomyosin vermittelte Zellkontraktion

1.6.1 Die Aktin-Polymerisierung zum Aufbau von kontraktile Stressfasern

Aktin ist in jeder eukaryotischen Zelle vorhanden und macht mengenmäßig bis zu 20 % des Gesamtproteinvolumens einer einzelnen Zelle aus. Filamentöses Aktin entsteht durch die Polymerisierung globulären Aktins (G-Aktin). Durch Zusammenlagerung von G-Aktin können sich helikale Aktin-Filamente, sogenanntes F-Aktin, ausbilden [98].

Für die Polymerisierung unter *in vitro* Bedingungen binden initial drei Aktin-Monomere (Nukleation) an dessen Enden weitere ATP-G-Aktin-Moleküle binden können. Hierbei entsteht F-Aktin mit einem Plus-Ende, wo u.a. durch Profilin neue ATP-reiche G-Aktin Moleküle eingebaut werden [99]. Durch den Einbau der Monomere findet eine Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i statt. Hierbei kommt es zu einer Konformationsänderung, die das F-Aktin destabilisiert. Dadurch verringert sich die Bindungsstärke zu benachbarten Aktin-Monomeren und G-Aktin kann wieder dissoziieren. Dieser Vorgang tritt vermehrt am Minus-Ende auf, sodass es dort zur Verkürzung des F-Aktins durch die Depolymerisierung kommt. Bei der Depolymerisierung ist die Dissoziation der ADP-G-Moleküle schneller als die Anlagerung von neuem ATP-G-Molekülen. Die dissoziierten ADP-G-Moleküle können jedoch wieder ATP einbauen und könnten im Zuge der Polymerisierung am Plus-Ende wieder eingebaut werden [100]. Dieser Prozess der

Polymerisierung und Depolymerisierung wird durch eine Vielzahl Aktin bindender Proteine reguliert wie z.B. Profilin, Cofilin, Formin, GTPasen und Aktin-Regulatoren (Ena/Vasp oder Arp 2/3 (engl. *actin related protein 2/3 complex*)) [101, 102]. Dies ermöglicht einen ständigen Auf- und Abbau verschiedenster Aktin-Strukturen für die Zelle. Unter der Plasmamembran der Zellen wird so das kortikale Aktin-Netzwerk ausgebildet, das der Zelle ihre Form gibt und diese stabilisiert. Durch die Bindung von Filamin kann sich ein kortikales Netzwerk ausbilden [103]. Außerdem können durch die Bündelung anti-paralleler Aktin-Filamente Stressfasern gebildet werden, die von α -Actinin kreuzvernetzt und stabilisiert werden. Die Bildung von Stressfasern ist entscheidend für die Zellmigration und die daraus resultierenden Zellkräfte auf das unterliegende Substrat [104].

1.6.2 Die Myosin II vermittelte Kontraktion von SF resultiert in zellulären Zugkräften

Für die Entstehung von Zellkräften wird Myosin II in die Aktin-Stressfasern eingelagert, welches sich entlang der Fasern bewegt und diese verschiebt [105]. Diese Verschiebung entsteht durch die Bindung von Myosin an Aktin und durch die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i . Durch die Hydrolyse von ATP bindet die Kopfdomäne von Myosin II in einem Winkel von 90° an das Aktin. Erst in Folge der Abspaltung des entstandenen P_i kommt es durch die freigesetzte Energie zu einem Kraftschlag, weil das Myosin-Köpfchen in einen 50° Winkel zurückklappt. Durch den Kraftschlag kommt es zur Bewegung der Aktinfasern. Abschließend bindet ein neues ATP und das F-Aktin löst sich vom Myosin II [106].

Die Regulation dieses Prozesses, also die Phosphorylierung von Myosin II, wird über die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) gewährleistet (Abbildung 9A). MLCK phosphoryliert die Aminosäuren Serin und Threonin (Ser-19 und Thr-18) der MLC (Myosin-leichte-Kette). Dies resultiert in einer Änderung der Tertiärstruktur von Myosin II, die den oben beschriebenen Kraftschlag mit folgender Kontraktion und einer Erhöhung der zellulären Spannung verursacht. Zur Relaxation dephosphoryliert die MLC-Phosphatase (MLCP) die MLC [107].

Die MLCP-Aktivität wird zudem von der RhoA GTPase reguliert. Über die Rho-Kinase (Rock) wird die MLCP mittels Phosphorylierung inhibiert. Dadurch liegt eine erhöhte MLC-Phosphorylierung vor, die zu einer dauerhaft hohen zellulären Spannung führt [108].

Über die Verbindung des Aktin-Zytoskeletts mit Fokaladhäsionen und folglich der umliegenden EZM kann diese Kontraktion (Zugkraft), die auf das unterliegende Substrat übertragen wird, detektiert werden. Außerdem führt diese Kontraktion, die aus einem Zusammenspiel aus dem

Abbau von Zell-Matrix-Kontakten (Fokaladhäsionen) an einer Seite der Zelle und dem Neuaufbau von Fokaladhäsionen an der Migrationsfront besteht, zu einer Fortbewegung der Zelle (Abbildung 9B) [109]. Für die Neuausbildung von Fokaladhäsionen sind aktinbasierte Zellfortsätze entscheidend [110].

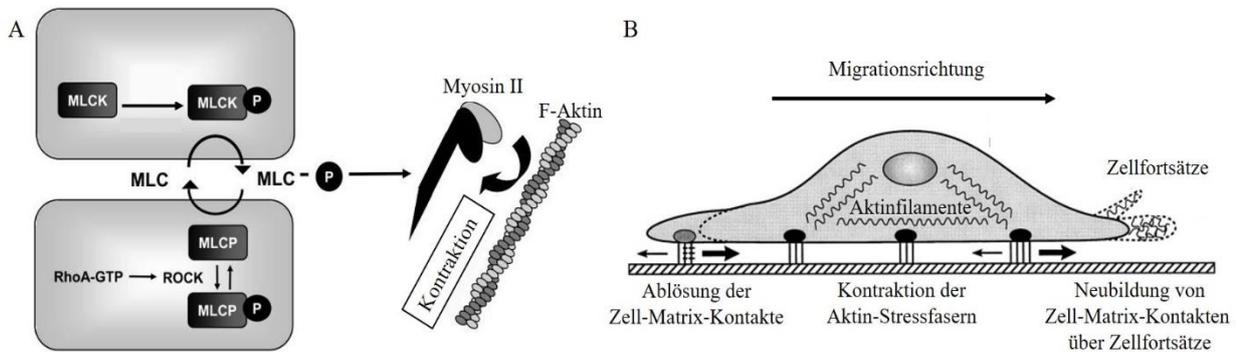


Abbildung 9: Die MLC regulierte Kontraktion von Myosin II fördert die Zellmigration. (A) Schematische Darstellung der MLC regulierten Myosin II-Phosphorylierung. Diese Phosphorylierung resultiert in einer Kontraktion der Aktin-Stressfasern. **(B)** Diese Kontraktion ist notwendig für die Zellmigration, ein Vorgang, der durch den Abbau und die Neubildung von Zell-Matrix-Kontakten bestimmt wird. Verändert nach [107, 109].

Für die Messung der kontraktile Kräfte wird die Zugkraftmikroskopie angewandt, die auch in dieser Arbeit zur Detektion invasionsrelevanter Zellkräfte eingesetzt wurde. Diese Methode basiert auf der Arbeit von Harris und Kollegen und dem Nachweis, dass Fibroblasten das unterliegende Substrat deformieren, wenn die Zelle kontrahiert [111]. Um diese Substratdeformation qualitativ zu beschreiben, werden heutzutage Zellen auf elastischen Substraten geringer Steifigkeit kultiviert und die Oberfläche dieser Substrate beispielsweise mit fluoreszierenden Mikrokügelchen strukturiert. Durch mikroskopische Ansätze lassen sich so die Substratdeformationen verfolgen und quantitativ auswerten [112] (vgl. Abschnitt 2.13).

1.7 Aufbau und Funktion aktinbasierter Zellfortsätze

Zu einem späteren Zeitpunkt der Zellmigration und der Transmigration durch eine BM bilden sich die oben beschriebenen Stressfasern zur Fortbewegung und Kraftübertragung (Abbildung 10). In einem ersten Schritt müssen Zellen zunächst einen Kontakt zu der umgebenden Matrix herstellen. Dazu bildet die Zelle aktinbasierte Zellfortsätze aus, die über Integrine eine initiale Adhäsion schaffen. Über den Transport von Fokaladhäsionsproteinen (z.B. Talin und Paxillin) und die

Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts können ausgereifte Fokaladhäsionen entstehen [113] (Abbildung 10).

Die Zellfortsätze selber entstehen unter der Beteiligung zahlreicher Proteine, die teilweise kontrovers diskutiert werden im Hinblick auf ihre Aktivität in diesem Prozess [113]. Eindeutig beschrieben ist die Funktion von Arp2/3, der an bestehende Aktinfilamente bindet und die Bildung neuer Aktinfilamente in einem Winkel von 70° zum bestehenden Filament initiiert. Dadurch entstehen flächige Zellausläufer, häufig Lamellipodium genannt (Abbildung 10). Dieser Schritt wird unterstützt durch die Bindung von Faktoren wie CapZ (engl. *capping protein*), WASP (engl. *Wiskott–Aldrich syndrome protein*) und den WAVE Komplex. Außerdem fördern Formin, Profilin und VASP die Elongation der Aktinfilamente [114, 115].

In Bezug auf fingerartige Filopodien, die aus dem Aktin-Netzwerk der Lamellipodien entstehen könnten, ist zusätzlich das Formin Dia2 (engl. *diaphanous-related formin-2*) beschrieben. Dia2 ist an der Nukleation unverzweigter Aktin-Filamente beteiligt, sodass die fingerartige Struktur entsteht [113]. Zur Elongation und Stabilisierung des Filopodiums transportiert Myosin X die beschriebenen Proteine als auch Fokaladhäsionsproteine entlang der Aktinfilamente zur Spitze des Fortsatzes [116] (Abbildung 10).

Aufgrund unterschiedlicher Funktionen und diverser morphologischer Erscheinungen gibt es verschiedene Bezeichnungen für diese zellulären Ausstülpungen. Allerdings ist die Nomenklatur in dieser Hinsicht nicht eindeutig und wird in der Literatur unterschiedlich verwendet [117]. Einer Definition von Gould und Courtneidge zufolge lassen sich Zellfortsätze in Podosomen, Invadopodien und Pseudopodien unterteilen. Letztgenannte Pseudopodien sind definiert als fingerartige Filopodien oder flach ausgebreitete Lamellipodien (Abbildung 10) [118]. Während die Begriffe Pseudopodien (meist Filopodien) oder Podosomen oftmals bei gesunden Zellen verwendet werden, wird die Bezeichnung Invadopodien mit Tumorzellen und Invasion assoziiert [119].

Ungeachtet der genauen Definition werden den fingerartigen/ fadenförmigen Podosomen oder Filopodien eine Vielzahl elementarer Funktionen in physiologischen Prozessen zugeschrieben. Filopodien sind entscheidend für die Zellfortbewegung und die Ausbildung von Fokaladhäsionen und Zell-Zell-Kontakten. Außerdem sind Filopodien über den Transport von Integrinen und Rezeptoren an deren Spitze wichtig für die Wahrnehmung der umliegenden EZM (engl. *Sensing*) [120, 121].

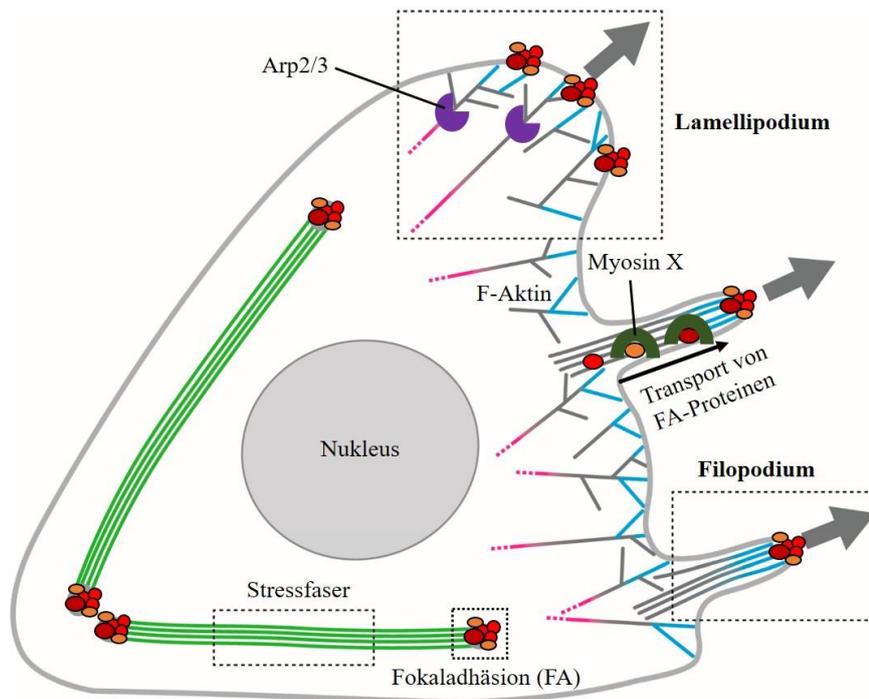


Abbildung 10: Bildung von aktinbasierten Zell(fortsatz)strukturen. Schematische Darstellung einer migrierenden Einzelzelle zur Visualisierung von aktinbasierten Zellstrukturen. Einerseits bilden sich kontraktile Aktin-Stressfasern aus, die über FA an die EZM gebunden sind. Andererseits sind aktinbasierte Zellfortsätze, wie beispielsweise breitgefächerte Lamellipodien oder fingerartige Filopodien, abgebildet. Diese entstehen durch die verzweigte Aktin-Polymerisierung über Arp 2/3 (grau und blau: bestehende und neu gebildete Aktin-Filamente zur Fortsatzelongation und -stabilisation/ pink: deutet die Depolymerisierung der Aktin-Filamente an). Myosin X transportiert Cargo-Proteine wie FA-Proteine zur Spitze des Filopodiums. Verändert nach [122].

Die Zellantwort auf die veränderten EZM-Reize (Topografie, Steifigkeit oder Zellkräfte) wird über die Kontraktion des Aktomyosin-Komplexes reguliert [123]. Stressfasern sind wie oben beschrieben (vgl. Abschnitt 0) durch Myosin II für eine Zellkontraktion und die Entstehung von Zellkräften verantwortlich [124]. Bei gleichzeitigem Kontakt der Zelle über FA an die EZM kann sich die Zelle fortbewegen und überträgt die Zellkräfte auf die EZM. Auch Filopodien selbst üben Kräfte auf die umliegende EZM aus [125]. Diese Prozesse sind die für Gewebeformung und -erneuerung elementar. Außerdem ist die Zellmigration entlang und durch eine EZM bei gesunden Zellen für die Immunantwort wichtig [126]. Im Gegensatz dazu stehen pathologische Prozesse wie die Tumorprogression. Durch eine lokale BM-Zerstörung können invasive Zellen durch die BM transmigrieren und folglich eine Metastasierung auslösen. In diesem tumorassoziierten Kontext werden für die Zellfortsätze oftmals die Begriffe invasive Filopodien, Filopodium-artige Strukturen oder Invadopodien verwendet.

1.7.1 Invasionsfördernde Zellfortsätze (Invadopodien)

Die mit Krebszellen assoziierten Invadopodien sind maßgeblich an dem Prozess der BM oder EZM-Invasion beteiligt. Einerseits sind diese Strukturen, wie für Filopodien beschrieben, an dem *Mechanosensing* der EZM und der Ausbildung von Kontaktstrukturen zur EZM beteiligt, andererseits bauen Invadopodien die EZM auch proteolytisch ab. Durch die Beteiligung von MMP ermöglichen Invadopodien eine lokale Degradation der Matrix und eine folgende Zellmigration. Außerdem produzieren Invadopodien auf die EZM wirkende zelluläre Kräfte. Diese wurden als vertikale Zellkräfte beschrieben, die die EZM durch die Polymerisierung der Aktinstrukturen eindrücken können [127]. Dadurch sind diese Strukturen in zwei wichtige Aspekte, die zur BM- und EZM-Invasion beitragen, involviert: Die biochemisch regulierte proteolytische Degradation und die invasionsfördernde kraftvermittelte Invasion. Im Umkehrschluss wird die Invadopodienbildung durch pro-invasive Einflüsse wie eine zunehmende Matrixsteifigkeit, steigende Zellkräfte und Wachstumsfaktoren wie EGF gesteigert [128, 129]. Auch der Transkriptionsfaktor Twist1, der eigentlich den EMT-Prozesse induziert, kann über die Expression von PDGFR α die Invadopodienbildung fördern [130].

Weiterhin könnte die MMP-Aktivität die Invadopodienbildung stimulieren. In Kopf-Hals-Karzinomen korrelierte eine Überexpression von Kortaktin mit erhöhten MMP2 und 9 Werten, sowie einem verstärkten Transport von MT1-MMP. Die Fragmente der EZM-Degradation durch die MMP fördern die Bildung neuer Invadopodien [131].

Nachgewiesen wurden invadopodiale Strukturen bisher in humanen Krebszelllinien, aber auch *in vivo* z.B. in *C. elegans*, in der Ratte und bei Zebrafischen [132, 133]. Vergleichbar zu Filopodien entstehen Invadopodien ebenfalls durch die Polymerisierung und Elongation von F-Aktin. Im Durchmesser beträgt die Größe 0,05 – 1 μm bei einer Länge von ca. 5 - 10 μm (Filopodien werden mit ca. 5 – 35 μm gefunden) [134, 135].

Invadopodien können sehr heterogen in ihrer Form und Funktion sein. Oftmals enthalten diese membrangebundene Proteasen wie MT1-MMP (MMP14) [136] in Kombination mit typischen Aktin-Regulatoren, die auch bei Filopodien beteiligt sind (vgl. Abschnitt 1.7 Aufbau bei Filopodien). Neben MT1-MMP sind TKS5 und Kortaktin spezifische Marker für Invadopodien (Abbildung 11) [137, 138]. Zu Beginn der Invadopodienbildung lagern sich WASP, Arp2/3 und Cofilin an einen Aktin-Kortaktin Komplex. Dieser Komplex wird durch Tks5 stabilisiert und in der Membran verankert. Zusätzlich kann Mena an den Komplex binden, welches Kortaktin phosphoryliert und so die Bildung von Invadopodien fördert. Im Anschluss kann die Nukleation beginnen, um die Fortsatzstruktur auszubilden. Fascin und Formin stabilisieren die Aktin-

Filamente. Entlang des elongierten Invadopodiums wird MT1-MMP zur Matrixdegradation transportiert [135, 139]. Dieser Prozess wird über RhoA und Cdc42 reguliert. Zusätzlich werden lösliche MMP2 und MMP9 sekretiert [139]. Der Transport dieser Proteine könnte wie bei Filopodien über Myosin X stattfinden. Schoumacher und Kollegen haben Myosin X in Invadopodien von MDA-MB-435 Zellen nachgewiesen [140].

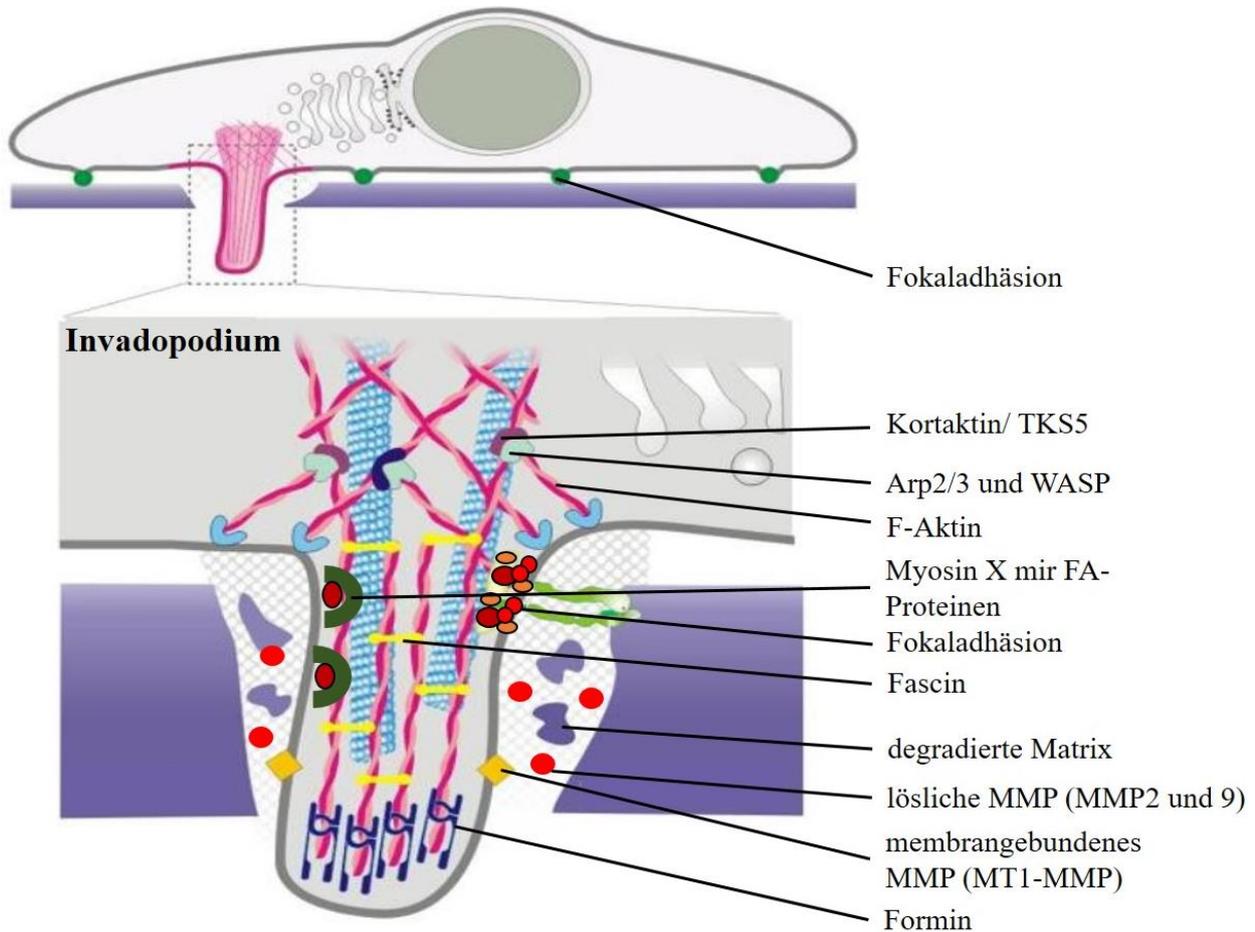


Abbildung 11: Struktur eines Invadopodiums. Schematische Darstellung der Formation eines Invadopodiums. Abgebildet ist eine Zelle, die über FA an eine Matrix gebunden ist und mittels Invadopodium die Matrix durchdringt (oben). Die Vergrößerung des Invadopodiums (unten) zeigt eine Vielzahl an involvierten Proteinen und Strukturen. Abgebildet sind typische Aktin bindende Proteine wie Arp2/3, WASP, Fascin und Formin, die die Invadopodium-Bildung initiieren bzw. elongieren. Zusätzlich sind spezifische Invadopodium-Markerproteine wie Tks5 und Kortaktin, die den initialen Aktin-Komplex stabilisieren, und MT1-MMP angegeben. MT1-MMP und sekretierte MMP degradieren die Matrix. Verändert nach [139].

1.8 Das Proto-Onkogen hRas im humanen Mammakarzinom

Von der nicht-tumorigenen MCF10A Zelllinie wurden verschiedene Zellvarianten hergestellt, um invasionsrelevante Aspekte im humanen Mammakarzinom weitergehend zu untersuchen. In einem ersten Schritt wurde hierfür der Wildtyp der Zelllinie mit dem Proto-Onkogen hRas (engl. *Harvey Rat sarcoma virus*) transformiert, woraus die prä-maligne Variante MCF10AT1 entstand [141]. Durch die Injektion der MCF10AT1 als Xenograft in Mäusen konnten duktale Karzinome *in situ* hergestellt werden, aus denen die Zelllinie MCF10DCIS.com isoliert werden konnte [142]. Außerdem konnten noch invasivere Zelllinien hergestellt werden, wie die MCF10CA1 Zellen, die bei einer Transplantation in immungeschwächte Mäuse zu 100 % Tumore ausbildeten [143]. Eine zentrale Rolle bei der malignen Transformation der MCF10A Zelllinie nimmt dementsprechend das verwendete Onkogen hRas ein. Bei hRas handelt es sich allgemein um eine GTPase. In der Ras Proteinfamilie ist hRas neben nRas und kRas das meist untersuchte Onkogen [144]. Funktionell sind Ras Proteine GTPasen, die an der Weiterleitung extrazellulärer Signale in intrazellulären Signalkaskaden beteiligt sind. Die GTPase fungiert dabei durch den Wechsel zwischen einem aktiven GTP gebundenen Zustand zu einem inaktivem GDP gebundenen Zustand als molekularer Schalter [145]. Dieser Wechsel wird reguliert durch GTPase-Aktivierungsproteine (GEF) und Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren (GAP, engl. *Guanin-nucleotide-exchange*) (Abbildung 12).

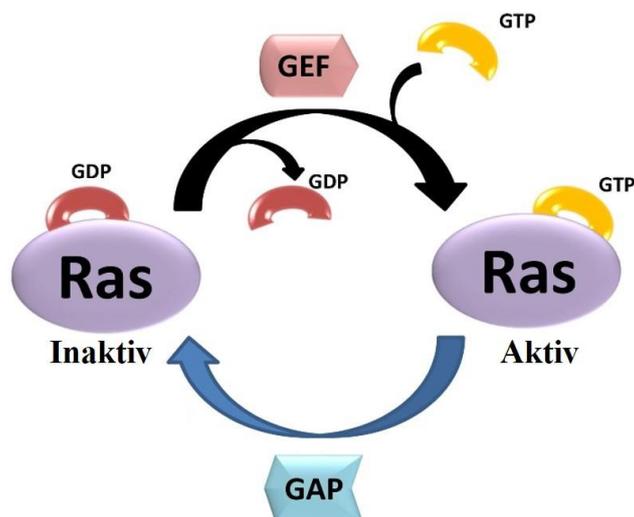


Abbildung 12: Ras-Aktivierungszyklus. Schematische Darstellung der zwei Zustände von GTPasen. In einem inaktiven Zustand hat Ras GDP gebunden. Ein Austausch von GDP zu GTP durch die Guanin-Nucleotid-Austauschfaktoren (GEF) überführt Ras in einen aktiven Zustand. GAP dephosphoryliert Ras-GTP wieder zu Ras-GDP. Verändert nach [146].

Ras-Gene und im speziellen auch hRas sind in vielen Tumoren mutiert [147]. So variiert die Quote für die Frequenz von Ras-Mutationen bei Krebs zwischen 10 und 30 % [148]. Ras-Mutationen im humanen Mammakarzinom sind deutlich seltener, allerdings konnte eine tumorfördernde Ras-Überexpression bzw. -Hyperaktivität in einer Vielzahl an Brusttumoren nachgewiesen werden [149]. Diese Hyperaktivität von Ras kann durch eine Dysregulation der EGF-Sekretion und der daraus folgenden gesteigerten EGFR-Stimulation ausgelöst werden. Gleiches erfolgt durch Mutationen in Tyrosin-Rezeptoren, Ras-GTP-Regulatoren bzw. in Ras nachgeschalteten Signalwegproteinen [150].

Dementsprechend ist die Ras Expression bei Brustkrebstumoren bereits als Marker für die Tumoraggressivität beschrieben [151]. Zudem können Mutationen sowie die Expression von Ras-Proteinen zu einer höheren Resistenz gegenüber Wirkstoffen führen, was für kRas in Lungenkarzinomen und für hRas in Kopf-Hals Tumorzellen gezeigt werden konnte [152, 153]. Da zusätzlich Ras-Proteine lange als nicht adressierbar für gezielte Therapien galten, da keine geeignete Bindungstasche für Wirkstoffe gefunden wurde und Ras eine hohe Affinität zu dem natürlichen Bindungspartner GTP hat, ist die Erforschung dieser Signalwege in Bezug auf invasionsrelevante Aspekte bei Brustkrebs von großer Bedeutung [154]. Zwar gibt es inzwischen einige Wirkstoffe, die direkt gegen hRas oder gegen hRas nachgeschalteten Zielmoleküle gerichtet sind, doch sind diese oft mit großen Nebenwirkungen verbunden, da z.B. auch nicht maligne und physiologisch wichtige Ras-Signalwege attackiert werden [155].

Die Aktivierung von hRas und zwei wichtige Signalkaskaden sind in der Abbildung 13A schematisch dargestellt. Über extrazelluläre Stimuli, wie beispielsweise EGF, wird der Ras – PI3K (engl. *Phosphoinositide 3-kinases*) - AKT (Proteinkinase B) - mTOR (engl. *mechanistic target of rapamycin*) Signalweg aktiviert, der die Proteinsynthese (z.B. von EMT-Proteinen) sowie die Zellproliferation und Migration erhöht. Weiterhin kann aktiviertes hRas über die Bindung an die Raf-Kinase (engl. *rapidly accelerated fibrosarcoma*) die MEK (engl. *mitogen-activated protein kinase*) – ERK (engl. *extracellular signal-regulated kinases*) Signalkaskade starten. Dies verändert die Genregulation im Nukleus und führt zu einer erhöhten Proliferation und der Induktion der EMT. Außerdem wird das Überleben der Zellen durch die Umgehung der Apoptose gesteigert [145]. Aufgrund dieser invasionsfördernden Eigenschaften wird hRas mit einer höheren Aggressivität bei Brusttumoren assoziiert [156, 157].

Neben den beschriebenen Signalkaskaden wirkt sich eine hRas-Aktivierung bzw. Überexpression auch auf die mechanischen Eigenschaften von Zellen aus. Matthews und Kollegen konnten zeigen, dass die hRas-Aktivierung die Zellmorphologie während der Zellteilung beeinflusst und sich

Zellen selbst in einer tumorbedingt eingegrenzten Umgebung besser teilen konnten (Abbildung 13B). Dies lag an einer Versteifung der Zellen während der Mitose, sodass die Zellen sich auch in einer verhärteten EZM zur Zellteilung abrunden konnten. Diese Eigenschaft unterstützt die unkontrollierte Vermehrung und Verbreitung von Tumorzellen. [158].

Weiterhin kann hRas über nachgeschaltete Proteine oder Wechselwirkungen mit anderen Signalkaskaden die Organisation des Aktin-Zytoskeletts verändern und somit auch die Zellmigration fördern. Eines dieser nachgeschalteten Proteine (Rho) wird beispielsweise für die Formation von aktinbasierten Stressfasern benötigt [159]. Rho, welches eigentlich durch andere Signalwege aktiviert wird, wird ebenfalls durch die Ras-Aktivität indirekt reguliert [160]. Auch mit aktinbasierten Zellfortsätzen wurde Ras bereits assoziiert. Die Ras-Aktivität induziert über die Ras bezogene GTPase (RalA (engl. *Ras-related protein*)) die Filopodiumausbildung [161]. In Bezug auf Invadopodien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte kRas Mutationsrate und Aktivität die Invadopodien-Aktivität steigert [135].

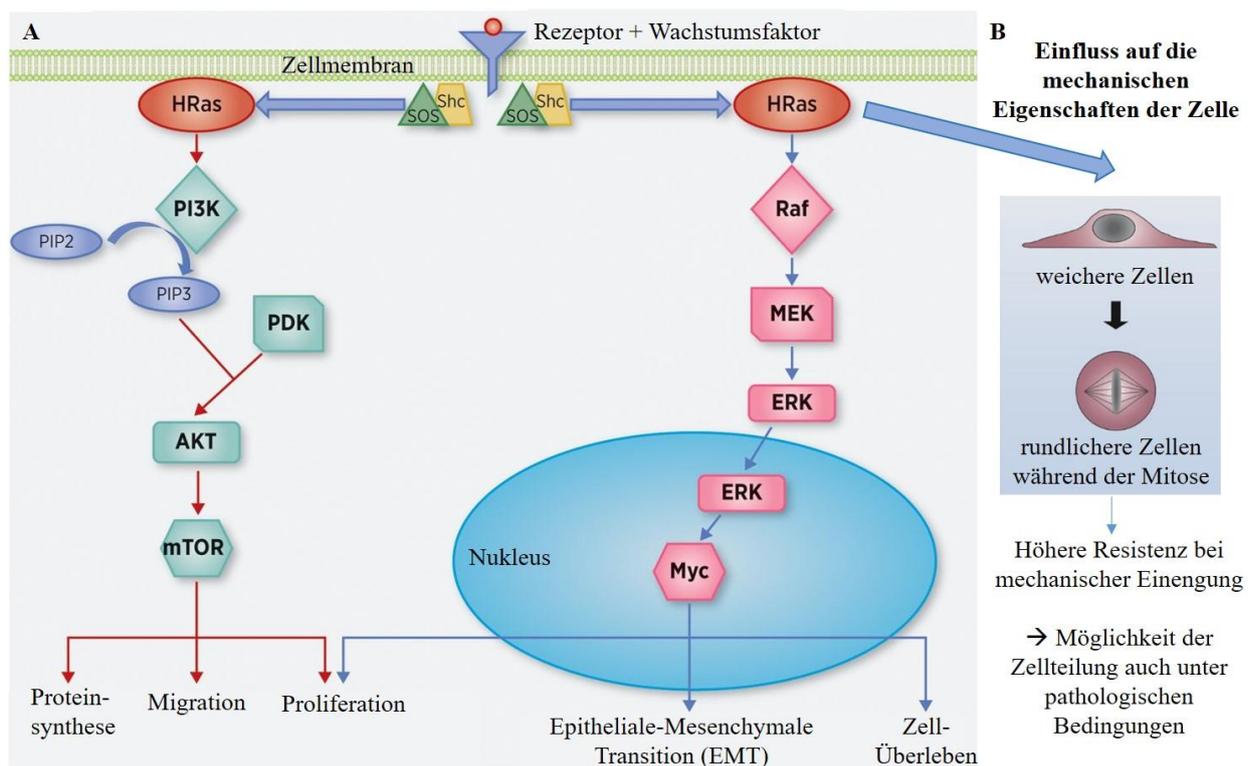


Abbildung 13: hRAS Signalwege und deren funktionelle Auswirkung auf Zellen. (A) Exemplarische Auswahl an intrazellulären Signalkaskaden, die durch die hRas-Aktivierung initiiert werden. Über PI3K oder den Raf-MEK-ERK Signalweg wird z.B. die Proteinsynthese, Migration und Proliferation erhöht sowie die EMT aktiviert. (B) Die Aktivierung von hRas in MCF10A Zellen führte zur mitotischen Zellverhärtung, die die Zellteilung unter räumlicher Begrenzung von Tumorzellen fördert. Verändert nach [158, 162].

Zusammenfassend zeigen eine Vielzahl von Studien wie vielseitig das Proto-Onkogen hRas Einfluss auf die zelluläre Regulation nehmen kann. Durch die Förderung der Tumorprogression erhöht Ras maßgeblich die Invasion. Auf Grund der vielen Verknüpfungspunkte und der Komplexität dieser Signalkaskaden bleiben bei dem aktuellen Stand der Forschung weiterhin viele offene Fragen. Daher bleiben Ras-GTPasen und spezifisch hRas als zentrales Schlüsselprotein ein wichtiges Zielobjekt für die zukünftige Forschung.

1.9 Ziele der Arbeit

Während der Tumorprogression ist die Invasion von Zellen durch die Basalmembran ein entscheidender Schritt für eine beginnende Metastasierung. Die lokale Zerstörung der BM mit nachfolgender Zellinvasion ist der Hauptgrund für eine hohe Mortalität. Zwar sind einige invasionsfördernde Faktoren bereits beschrieben, u.a. EGF- und Onkogen-Signalkaskaden, EZM-Versteifung, (kraftinduzierte) BM-Schwächung, MMP-Aktivität und Invadopodien, doch die zugrundeliegenden Signalwege und Wechselwirkungen sind in weiten Teilen noch unverstanden. Eine spezifische Inhibition dieses Vorgangs findet in der Brustkrebstherapie dementsprechend noch keine Anwendung. Vor allem das geringe Verständnis von mechanobiologisch relevanten zellulären Regelkreisen und Mechanismen sind Gründe hierfür.

Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit die invasionsfördernde Wirkung von EGF, der EZM-Versteifung und onkogener hRas Regelkreise unter mechanobiologischen Gesichtspunkten in einem *in vivo* ähnlichen 3D Zellkulturmodell systematisch untersucht werden. Dazu wird die nicht-transformierte und nicht-tumorigene epitheliale Zelllinie MCF10A verwendet. Diese bildet 3D Azini mit einer konstant umgebenden BM, die mit den zellulären, funktionellen Strukturen der weiblichen Brustdrüse vergleichbar sind. Zudem kann die mechanische Resistenz dieser Sphäroide variiert werden. Über die graduelle Differenzierung und BM-Reifung der Brustsphäroide in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit sowie der möglichen Variation der umgebenden EZM-Steifigkeit kann die maligne Transition *in vitro* nachempfunden werden. Durch die pro-invasive Modulation der EZM und der Kultivierungsbedingungen kann aus einem maturierten Azinus in einem physiologischen Gewebe ein bereits tumorgeschiedigter, invasiver Azinus in einer tumorassoziierten Mikroumgebung entstehen.

Das Ziel ist es ein besseres Verständnis von den Mechanismen des zellulären *Mechanosensings* und dessen Einfluss auf die Tumorentwicklung zu erlangen. Einerseits soll verstanden werden, wie der kraftinduzierte BM-Stress zur Migration durch die BM beiträgt, andererseits soll die Funktion von BM durchspannenden aktinbasierten Zellfortsätzen analysiert werden. Diese Zellfortsätze werden in dieser Arbeit als funktionelle Einheit zwischen der kraftabhängigen und der proteolytisch abhängigen Zerstörung der BM untersucht. Vergleichend sollen die Zellfortsätze hinsichtlich ihrer Funktion mittels Immunfluoreszenzfärbungen und konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie in gesunden und invasiv stimulierten Azini untersucht werden. So soll verstanden werden in welchem Maße Zellfortsätze an der proteolytischen Degradation der BM beteiligt sind

und inwiefern diese in die Entstehung von Zellkräften, die als BM-Stress definiert sind, involviert sind.

In diesem Kontext sollen weiterhin die Veränderungen im Aktin-Zytoskelett hinsichtlich der Entstehung von invasionsfördernden zellulären Zugkräften und EMT typischen Prozessen analysiert werden. Mittels zeitlich und räumlich hochauflösender Lebendzell-Zugkraftmikroskopie soll die maligne Transition im Bereich der Zell-BM-EZM Grenzfläche, wo die Invasion stattfindet, untersucht werden. Dadurch sollen die Fortsatz-Aktivität und die kontraktile Zugkräfte systematisch in Kombination mit der EZM-Versteifung und der EGF-Stimulation hinsichtlich ihres Einflusses auf die BM-Schwächung verstanden werden.

Außerdem sollen involvierte Signalwege und entscheidende Proteine dieser Kaskaden identifiziert werden. Ein Zielprotein, auch für eine Inhibition des Invasionsprozesses, ist das Proto-Onkogen hRas. In dieser Dissertation wird ein 3D Zellkulturmodell etabliert, bei dem eine hRas Überaktivierung in MCF10A Brustdrüsenosphäroiden spezifisch simuliert werden kann. Aufbauend auf einer erstmaligen Charakterisierung dieses Modells in einem 3D Kontext soll der funktionelle Einfluss von hRas auf den Invasionsvorgang untersucht werden. Bei diesen Analysen sollen auch die Wechselwirkungen mit anderen in diesem Modell identifizierten und beschriebenen invasionsfördernden Faktoren beachtet werden.

Zusammenfassend soll diese Arbeit dazu beitragen ein besseres Verständnis der invasionsrelevanten mechanobiologischen Regelkreise und Mechanismen der BM-Zerstörung zu erlangen. Dies kann für die Identifizierung neuer molekularer Ziele für Therapien zur Verhinderung einer Metastasierung sehr wertvoll sein.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Arium Pro Reinstwassersystem	Sartorius, Göttingen
AxioCam MRm Kamera	Carl Zeiss, Jena
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Axio Observer Z1 Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Axio Vert.A1	Carl Zeiss, Jena
Binokular Stemi 2000-CS	Carl Zeiss, Jena
Stemi 508	Carl Zeiss, Jena
Colibri 7 LED-Lichtquelle FR-R[G/Y]BV-UV	Carl Zeiss, Jena
Cryo 1 °C Freezing Container (Mr. Frosty)	Thermo Scientific, Braunschweig
Geldokumentationssystem Doc TM XR+	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Heizblock SBH130D	Stuart/ Cole-Parmer, Stone, VA
Heracell Brutschrank	Thermo Fisher, Waltham, USA (MA)
Inkubator XL	Carl Zeiss, Jena
JB1603-C/FACT Caratwaage	Mettler Toledo, Gießen
<i>Laserscanning</i> Mikroskop 880 + Airy Scan	Carl Zeiss, Jena
MilliQ Gradient A10	Merck, Darmstadt
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Plasmaofen Pico	Diener Electronics, Ebhausen
Quecksilber Dampfampe HXP120	Carl Zeiss, Jena
Rotationsbeschichter Delta 10 TT	Süss MicroTec Lithography GmbH, Garching
Research Plus Pipetten (10, 20, 200 und 1000 µl Volumen)	Eppendorf, Wesseling
Schüttler Rocker 2D	IKA, Bremen
Sigma 3-16L Zentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Sterilwerkbank (Herasafe KS)	Thermo Fisher, Waltham, USA (MA)
Vacusaft Vakuumpumpe	Integra, Biebertal
Vakuum Exsikkator	Duran, Wertheim
Vortex REAX top	Heidolph, Schwabach
Wärmeschrank 60 °C	Memmert, Schwabach

2.2 Objektive

Wasserbad WB22	Memmert, Schwabach
Zellzähler Moxi-Z-mini	Orflo, Ketchum, USA (Idaho)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Wesseling

2.2 Objektive

Tabelle 2: Verwendete Objektive

Objektiv	Hersteller
EC Plan Neofluar 40x/1.3 Öl Ph3	Carl Zeiss, Jena
LD C-Apochromat 40x/1.1 W Autocorr M27	Carl Zeiss, Jena
LD C-Apochromat M27 63x/1.15 W Corr	Carl Zeiss, Jena
Plan-Apochromat 63x/1.4 Öl	Carl Zeiss, Jena

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
4-20% Mini-Protean TGX Protein Gele	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Acrodisc Syringe 25 mm/0,1 µm Filter	Pall Corporation, Dreieich
Deckgläser, #0, #00, #1,5 #1,5 HP	Menzel, Braunschweig
Einweg-Stripetten, 5 ml, 10 ml, 50 ml	VWR, Darmstadt
Falcon-Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
Filterpapier für Western Blots	Bio-Rad, Hercules, USA
Kimtech Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark Professional, Koblenz
Kryoröhrchen	VWR, Darmstadt
Lochschale, ø 35 mm mit ø 18 mm Loch	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Mini-Protean TGX Fertiggele	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Moxi Z Kassetten Typ S	Orflo Technologies, Hailey, Idaho, USA
Petrischalen	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Star Lab, Hamburg
Protein LoBind Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Wesseling

Reaktionsgefäße (0,2; 0,5; 1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Wesseling
Wägeschiffchen (div. Größen)	VWR, Darmstadt
Zellkulturflaschen mit Schräghals, 25 cm ² und 75 cm ²	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien USA

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
-(-)Blebbistatin	Sigma Aldrich, München
(D)-Glukose	Sigma Aldrich, München
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid (EDC)	Sigma Aldrich, München
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma Aldrich, München
4-Hydroxytamoxifen (OHT)	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat (BCIP)	Sigma Aldrich, München
AffiniPure Goat F(ab') ₂ Fragment	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA (Pennsylvania)
Alkalische Phosphatase (AP)	Sigma Aldrich, München
APTES (3-aminopropyl)triethoxysilane)	Sigma Aldrich, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Merck, Darmstadt
Choleratoxin from <i>Vibrio Cholerae</i>	Sigma Aldrich, München
Corning® Cell Recovery Solution	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien USA
Cryo-SFM	PromoCell GmbH, Heidelberg
Dextran von <i>Leuconostoc</i> spp. (Mr 70,000)	Sigma Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, München
Dinatriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12$ H_2O) (Dodecahydrat)	Sigma Aldrich, München
DRAQ5	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Sigma Aldrich, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol (vergällt 97% und absolut)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich, München

2.4 Chemikalien und Reagenzien

FluoSpheres® carboxylate microspheres 0,2 µm (580/605) und (660/680)	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Glutaraldehyd, 25% (EM Grade)	Ted Pella, Inc., Redding, Kalifornien, USA
Glycin	Sigma Aldrich, München
Holzkohle	Sigma Aldrich, München
Hydrokortison	Sigma Aldrich, München
IBIDI Mounting Medium	IBIDI, München
Immersionsöl für Objektive	Carl Zeiss, Jena
Insulin (rekombinant)	Sigma Aldrich, München
Isopropanol	Promochem, Wesel
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma Aldrich, München
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma Aldrich, München
Marimastat	Sigma Aldrich, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumborhydrid (NaBH ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich, München
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, München
N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz (NHS)	Sigma Aldrich, München
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma Aldrich, München
Nitrocellulose-Membran	Sigma Aldrich, München
NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent (DAPI)	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	Sigma Aldrich, München
Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Ponceau S Färbelösung	Sigma Aldrich, München
Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning, Wiesbaden
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris Base)	Sigma Aldrich, München
Triton™ X-100	Sigma Aldrich, München
Trypsin/EDTA Phenolrot 0,05%	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
Tween® 20	Sigma Aldrich, München

2.5 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Medien/Puffer/Lösungen	Hersteller/ Komponenten
1x Laemmli-Puffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS, pH 8,3
Bead-Aktivierungs-Lösung	78,7 % Kupplungspuffer 1 % SDS 0,3 % Fluorospheres 10 % EDC-Lösung 10% Sulfo-NHS-Lösung
Blebbistatin-Inhibitions-Lösung	Stocklösung: 1 mg in 400 µl DMSO (8,55 mM) Versuchslösung: 5,1 µl Stocklösung in 4,995 ml Medium (11 µM)
Blockierungspuffer Immunfluoreszenzfärbung bzw. Western Blot	5 % Milchpulver in CB- bzw. PBS-Puffer
Cryo-SFM	PromoCell, Heidelberg
DMEM/F-12 (1x)	Life Technologies, Darmstadt
DMEM/F-12 (1x)(1:1) GlutaMAX	Life Technologies, Darmstadt
EDC-Lösung	200 mg/ml EDC in Kopplungspuffer
Fixierungslösung für Azini in der Gelmatrix	2 % Formaldehyd 1% Glutaraldehyd in CB-Puffer
Fixierungslösung für transferierte Azini	3,7% Formaldehyd in CB-Puffer
Glycin-Lösung	30 mM Glycin in CB-Puffer
hRas-Induktions-Lösung	Stocklösung: 5 mg OHT in 253 µl Ethanol (51 mM) Versuchslösung: 98 µl aus 1:1000 Verdünnung der Stocklösung in Medium in 4,902 ml Medium (11 µM)
Kopplungspuffer Bead-Kopplung	50 mM MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (pH 6)
Lyse-Puffer zur Proteinisolation	Ripa-Puffer Protease-Inhibitor-Cocktail (1:100) Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (1:100) (jeweils Sigma Aldrich, München)
Marimastat-Inhibitions-Lösung	Stocklösung: 5 mg in 250 µl DMSO (60,35 mM) Versuchslösung: 1,33 µl Stocklösung in 3,9987 ml Medium (20 µM)
NHS-Lösung	200 mg/ml NHS in Kopplungspuffer
Permeabilisierungslösung	0,01 % Triton-X-100 in CB-Puffer

2.6 Antikörper und fluoreszierende Farbstoffe/ Peptide

phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (pH 7,4)	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (pH 7,4)	15,5 mM NaCl 0,105 mM KH ₂ PO ₄ 0,297 mM Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O
Protein-Transfer-Puffer Western Blot	20 % Ethanol 25 mM Tris-Base 192 mM Glycin
Quenching-Lösung	1 % Natriumborhydrid in CB-Puffer
Silanlösung zur Bead-Kopplung	5 % 3-Aminopropyltriethoxysilane in Silanpuffer
Silanpuffer zur Bead-Kopplung	5 % in Ethanol (pH 4,5-5,5 mit Essigsäure)
Verdünnungs-Puffer Immunfluoreszenzfärbungen	1 % Milchpulver in CB-Puffer
Zytoskelett-Puffer (CB-Puffer), pH 6,1	150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA 5 mM Glukose 10 mM MES 1 g/l Streptomycin

2.6 Antikörper und fluoreszierende Farbstoffe/ Peptide

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper

Epitop	Spender	Hersteller	Nummer / Klon oder Bindungsstelle
GM 130	Maus	BD Biosciences, Franklin Lakes New Jersey, USA	BD 610822 / 35-GM130
Kollagen IV	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK	Ab6586
Kortaktin	Maus	Merck, Darmstadt	05-180 / (p80/85) Klon 4F11
MT1-MMP	Maus	Abnova, Taipeh, Taiwan	MAB12762 / Klon 133CT 15.10.5.1

Myosin X	Kaninchen	Novus Biologicals, Littelton, Colarado USA	NBP1-87748
pERK	Kaninchen	Cell Singaling, Danvers, USA	9101S / Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) Thr202/Tyr204
pMLC 2	Kaninchen	Cell Singaling, Danvers, USA	3671
Talin	Maus	Sigma-Aldrich. München	T3287 / 8d4
TKS5	Kaninchen	Santa Cruz, Dallas, Texas	Sc-30122 / Fish M-300
Tubulin	Ratte	Merck, Darmstadt	MAB1864 / Y1/2
Vinculin	Maus	Sigma-Aldrich München	V9131

Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Isotyp	Spender	Farbstoff	Hersteller (Bestellnummer)
Kaninchen	Ziege	Alexa 633	Invitrogen, Karlsruhe (A21071)
Kaninchen	Huhn	Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe (A21441)
Kaninchen	Ziege	Alexa 405	Invitrogen, Karlsruhe (A32556)
Maus	Esel	Alexa 546	Invitrogen, Karlsruhe (A10036)
Maus	Esel	Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe (A21202)

Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen

Antikörper	Herstellung in	Gerichtet gegen	Hersteller (Bestellnummer)
Alkalische Phosphatase Anti-Kaninchen	Ziege	Kaninchen	Sigma Aldrich, München (A3812)
Alkalische Phosphatase Anti-Ratte	Ziege	Ratte	Sigma Aldrich, München (A8483)

Tabelle 9: Verwendete fluoreszierende Farbstoffe/ Peptide

Bezeichnung	Visualisierung von	Hersteller (Bestellnummer)
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Aktin	Sigma-Aldrich, München (49409)
Alexa Fluor 633 Phalloidin	Aktin	Sigma-Aldrich, München (68825)
DRAQ5	Zellkern (DNA)	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA (62251)
NucBlue (4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI))	Zellkern (DNA)	Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA (R37606)

2.7 Programme

Tabelle 10: Verwendete Programme

Programme	Hersteller
Graphpad Prism Version 8.4.2	GraphPad Software, La Jolla, USA (KA)
Corel Draw Version 2019 (21)	Corel, München
Imaris 9.1 Software	Bitplane, Zürich, Schweiz
ImageJ	National Institute of Health, Bethesda, USA (MD)
MatLab 9.0	MathWorks, Natick, USA (MA)
Python	Python Software Foundation, Wilmington, USA (NC)
ZEN 2.3 blue edition	Carl Zeiss, Jena
ZEN black 8.0	Carl Zeiss, Jena

2.8 Zellkulturmethoden

Alle zellbiologischen Methoden wurden unter einer Reinraum-Werkbank mit vertikaler Strömung durchgeführt, um sterile Bedingungen zu gewährleisten. Weiterhin wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen auf die Anwesenheit von Mykoplasmen getestet.

Die MCF10A Wildtyp (Wt) Zelllinie wurde bei der American Type Culture Collection erworben (ATCC, Manassas, Virginia, USA), wohingegen die MCF10A Varianten MCF10A-ER:hRas^{G12V} und MCF10A+constitutive hRas^{G12V} freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Buzz Baum aus dem *University College London* zur Verfügung gestellt wurden [158]. Erstmals beschrieben wurde die verwendete induzierbare Variante 2013 in der Publikation von Molina- [36]

Arcas und Kollegen [163]. Die MCF10A RFP-Life-Act Variante des Wt wurde institutsintern hergestellt (von Dr. Erik Noetzel Reiss, Dr. Lisann Esser und Dr. Aljona Gaiko Shcherbak). Die Kultivierung erfolgte wie in den folgenden Abschnitten beschrieben.

2.8.1 Kultivierung von MCF10A Wt Zellen

Die MCF10A Wt Zelllinie und die MCF10A Zellvariante transduziert mit RFP-LifeAct (Ibidi, München) wurden unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂ (Kohlenstoffdioxid)) in Zellkulturflaschen mit einer Größe von 25 cm² kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurden die entstehenden Monolagen bei einer Konfluenz von ca. 70 - 90 % passagiert. Hierfür wurden die Zellen zweimalig mit 8 ml sterilem PBS gewaschen und anschließend mittels 400 µl einer 0,05 % Trypsin/ EDTA-Lösung durch den Abbau von Zelladhäsionsproteinen von der Oberfläche abgelöst. Die Zugabe des EDTA verhindert durch die Komplexbildung von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen die Anheftung der Zellen, da diese Moleküle einen entscheidenden Faktor beim Adhäsionsprozess darstellen. Nach der Ablösung der Zellen (ca. 10 min) wurde die Reaktion mittels 9,6 ml Wachstumsmedium, das Serum enthält, abgestoppt. Die genaue Zusammensetzung des Wachstumsmediums ist der Tabelle 11 zu entnehmen. Die Zellsuspension wurde abschließend für fünf Minuten bei 180 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet wurde in frischem Wachstumsmedium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen in gewünschter Zellzahl in Zellkulturflaschen überführt oder zur 3D Kultivierung verwendet (vgl. 2.8.4). Zur Sicherstellung der experimentellen Reproduzierbarkeit wurde zur Zellzählung der automatische Zellzähler der Firma Orflo verwendet (vgl. 2.8.3).

Um zufällige genetische Veränderungen der Zelllinien zu vermeiden, wurden die Zellen maximal bis zu einer Passagennummer von 15 verwendet. Zur Weiterführung der Experimente wurden neue Zellen einer niedrigen Passage aufgetaut. Diese lagerten in Einfriermedium (Cryo-SFM) im flüssigen Stickstoff.

Für den Einfrierprozess wurde die oben erwähnte Zellsuspension nach der Trypsinierung und folgender Zentrifugation in Einfriermedium resuspendiert. Diese Suspension wurde mit einem Volumen von 1 ml und einer Zellzahl von 1 x 10⁶ Zellen pro Ansatz in Kryoröhrchen überführt. Im Anschluss wurden die Kryoröhrchen unverzüglich in einem Einfrierbehälter bei -80 °C gelagert und nach 24 Stunden zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Der Einfrierbehälter, gefüllt mit Isopropanol, gewährleistete eine Kühlungsgeschwindigkeit von -1 °C/min. Dies soll das Risiko von Zellschädigungen während des Einfrierprozesses senken.

Tabelle 11: Medienzusammensetzung zur Kultivierung von MCF10A Wt Zellen.

Komponenten	Wachstumsmedium (2D)	Assay-Medium (mit EGF) (3D)	Assay-Medium (ohne EGF) (3D)
Hydrokortison	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	1 %	1 %	1 %
Insulin	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml
EGF	20 ng/ml	5 ng/ml	-
Cholera Toxin	100 ng/ml	1 ng/ml	1 ng/ml
Pferdeserum	5 %	2 %	2 %

2.8.2 Kultivierung von MCF10A-ER:hRas Zellen

Die MCF10A Varianten MCF10A-ER:hRas^{G12V} (induzierbar) und MCF10A+*constitutive* hRas^{G12V} wurden wie im Abschnitt 2.8.1 kultiviert. Einzig in der Medienzusammensetzung wurden die im Folgenden aufgeführten Änderungen vorgenommen.

Als Medium wurde das DMEM/F-12 ohne Phenolrot verwendet und das Pferdeserum wurde vor der Verwendung mit Holzkohlepulver behandelt. Dazu wurde das Pferdeserum (500 ml) unter Rühren mit 0,5 g Holzkohle und 0,05 g Dextran (von *Leuconostoc* spp. (Mr 70,000)) für drei Stunden bei 37 °C versetzt und anschließend steril filtriert. Dadurch wurde die unbeabsichtigte Aktivierung der Östrogen-Kassette und eine folgende hRas-Aktivierung verhindert. Diese hRas-Aktivierung konnte spezifisch durch die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (OHT) induziert werden (vgl. 2.8.6).

2.8.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem automatischen Zellzählgerät Moxi-Z-mini und den dazugehörigen Kassetten des Typs S. Zur Messung wurde die Kassette mit 75 µl der Zellsuspension beladen. Diese Zellsuspension wurde automatisch eingesaugt und über eine Zell erkennende Zone, in der der Anstieg der Spannung proportional zur Partikelgröße gemessen wird, ergab sich die Zellzahl. Zusätzlich konnte über die Stärke der Veränderung des Widerstandes neben der Zellzahl auch die Größe der gemessenen Objekte bestimmt werden. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass Zelltrümmer, Aggregate oder tote Zellen in die Zählung integriert wurden. Das Ergebnis wurde als Zellzahl pro Milliliter angegeben.

2.8.4 3D Kultivierung von MCF10A Zellen

Für die 3D Kultivierung wurden jeweils 500 Zellen pro Glasbodenschale (Durchmesser der Kultivierungsfläche: 18 mm Herstellung: vgl. 2.9.3) auf einer murinen Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Matrix (Geltrex) kultiviert. Das Geltrex wurde bei -80 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde das Geltrex über Nacht bei 4 °C aufgetaut und anschließend aliquotiert. Die Aliquots wurden ebenfalls bei 4 °C gelagert und maximal zwei Wochen lang verwendet.

Bevor die Zellen auf die Oberflächen gegeben wurden, wurden diese mit 100 µl Geltrex beschichtet und für 25 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe der Zellen wurden diese in einem geringen Medium-Volumen für 30 Minuten inkubiert, um eine ausreichende Zelladhäsion zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 ml Medium pro Lochschale. Bis zum neunten Tag wurde das Assay-Medium mit EGF verwendet, nachfolgend das Assay-Medium ohne EGF (vgl. Tabelle 11). Dieses Protokoll basiert auf der Veröffentlichung von Gaiko-Shcherbak und Kollegen [37]. Für die MCF10A-ER:hRas Varianten wurde bereits an Tag Sechs Assay-Medium ohne EGF verwendet. Sowohl das Medium mit EGF als auch das ohne EGF wurden mit 2 % Geltrex versetzt und alle drei bis viert Tage gewechselt. Die Inkubation erfolgte unter identischen Bedingungen wie in Abschnitt 2.8.1 für die 2D-Kultur (zweidimensional).

2.8.5 Transfer von MCF10A Azini

Der Transfer von MCF10A Azini von der Geltrex-Oberfläche auf Glas- oder Elastomeroberflächen diente der Vorbereitung für Analysen mittels konfokaler Mikroskopie oder für die Zugkraftmikroskopie (TFM)

Hierfür wurde das Medium abgesaugt und stattdessen 2 ml *Cell Recovery Solution* (CRS) auf die Azini in der EHS Matrix gegeben (30 min bei 4 °C), um das Geltrex aufzulösen. CRS löst die Quervernetzung der Matrix ohne einen enzymatischen Verdau auf, sodass die BM intakt bleibt, denn das Kollagen IV der BM, der Hauptbestandteil der Basalmembran, ist kovalent über Disulfidbrücken kreuzverlinkt. Die CRS wurde anschließend entfernt und die Lochschalen mit 1 ml eisgekühltem Assay-Medium ohne EGF gewaschen, um das Gel final zu auflösen und die Azini aus der Matrix herauszulösen. Mittels einer 20 µl Pipette wurden die Azini einzeln aufgesaugt und in einem geringen Volumen (10 µl) auf eine Glas- oder PDMS-Oberfläche transferiert. Während des gesamten Vorgangs wurde auf Eis gearbeitet, um ein erneutes Gelieren des Geltrex zu vermeiden. Die Zelloberflächen wurden am Vortag mit Geltrex beschichtet

(20 µg/ml in PBS). Nach einer kurzen Adhäsionsphase von ca. 15-20 Minuten wurde Medium hinzugegeben ohne die Zellen von der Oberfläche zu lösen.

2.8.6 Biochemische Behandlungen

Die EGF-Stimulation der MCF10A Wt Azini bei allen relevanten Versuchen erfolgte mittels des Wachstumsmediums mit einer EGF-Konzentration von 20 ng/ml (Die Kontrollgruppen –EGF erhielten das Assay-Medium ohne EGF) [37] für definierte Zeitspannen von einer, acht und 24 Stunden (h). Bei den MCF10A-ER:hRas Azini wurde OHT in einer Konzentration von 1 µM zur Aktivierung von hRas zu den Zellen und Azini gegeben. Hierfür wurde jeweils vor Versuchsbeginn eine 1:1000 Verdünnung (V1) in AM- aus der OHT Stocklösung angesetzt (Stocklösung; 51 mM). Aus dieser V1-Lösung wurden 98 µl in 4,902 ml in AM- Medium gegeben, welches für die Induktion (Ras-Induktionslösung) benutzt wurde (entspricht einer OHT-Konzentration von 1 µM). Für die Zugkraftanalysen wurde OHT bzw. Ethanol (EtOH) zum Versuchsstart, nach dem Transfer auf das Analysesubstrat, zugegeben. Für die konfokalen Analysen der fixierten Proben wurde entweder 7 oder 16 Stunden vor der Fixierung OHT oder EtOH verabreicht. OHT wurde in EtOH gelöst, sodass die unbehandelten Proben mit der gleichen Konzentration mit EtOH (0,002 %) behandelt wurden.

Für die MMP-Inhibitionsversuche wurde Marimastat in einer Konzentration von 20 µM verwendet und für die Myosin II-Inhibition wurde Blebbistatin in einer Konzentration von 11 µM genutzt. Anfänglich wurde für die Zugkraftanalysen (für die Inhibition des WT) eine Konzentration von 25 µM verwendet. Alle Inhibitoren wurden in DMSO gelöst. Die verwendeten Konzentrationen entsprach jeweils einer DMSO-Konzentration von 0,03 % (für Marimastat) und 0,06 % bzw. 0,15% (für 11 µM bzw. 25 µM Blebbistatin).

2.9 Substratherstellung für die Zellkultivierung und funktionelle Analysen

2.9.1 Herstellung von Elastomeroberflächen zur Invasions- und Zellkraftanalyse

Polydimethylsiloxan (PDMS) ist ein Polymer aus der Gruppe der siliziumorganischen Verbindungen. Durch die Vernetzung mit einem Quervernetzer konnte ein elastischer Silikonkautschuk hergestellt werden. Dazu wurde das Sylgard R184 Silikon Elastomer Kit, bestehend aus zwei Komponenten (Basisöl und Quervernetzer) verwendet. Über das

Mischverhältnis dieser Komponenten können verschiedene Steifigkeiten generiert werden. Es wurden Mischungsverhältnisse von 1:50 und 1:73 (Basisöl:Quervernetzer) verwendet, was einer Steifigkeit von ca. 12 kPa bzw. ca. 0,12 kPa entsprach. Dazu wurde das Basisöl eingewogen und die entsprechende Menge Quervernetzer addiert. Entscheidend waren eine gute Durchmischung der Komponenten (mindestens 5 min) sowie die Entfernung von Luftblasen in einem Vakuum. Anschließend wurde das PDMS auf #0 Deckgläser (ca. 100 µm dick) aufgetragen. Dazu wurde ein Rotationsbeschichter (1800 rpm für 15 Sekunden, Rampe: 1) genutzt, um eine gleichmäßige Dicke (ca. 70 µm) der PDMS Schicht zu erzielen. Die Kreuzvernetzung der Oberflächen zur Erlangung der gewünschten Steifigkeit erfolgte bei 60 °C für 16 Stunden.

2.9.2 Kovalente Kopplung carboxylierter Polystyrol-Beads an eine Elastomeroberfläche

Im Anschluss an die Kreuzvernetzung des Silikonkautschuks erfolgte die kovalente Kopplung carboxylierter und fluoreszierender Mikrokügelchen (engl. *beads*) auf der PDMS-Oberfläche [164]. Dazu wurde zunächst eine Silanisierung der Oberfläche vorgenommen (400 µl Silanlösung pro Glasbodenschale für 90 min), mit EtOH gewaschen und 30 Minuten bei RT in einem Vakuum getrocknet. Anschließend erfolgte die Aktivierung der *Beads* in Kopplungspuffer und SDS, sowie EDC und NHS, welche die Reaktion katalysieren (zusammen: Beadlösung). Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde die Beadlösung für 30 Sekunden auf die silanisierte Oberfläche gegeben. Bis zur Nutzung der Oberflächen wurden diese nach dreimaligem Waschen mit H₂O bei 4 °C in PBS gelagert.

2.9.3 Substratherstellung zur Zellkultivierung und für Immunfluoreszenz-Färbungen

Zur Herstellung von Glasbodenschalen für die 3D Zellkultivierung (vgl. 2.8.4) und Immunfluoreszenz-Färbungen (vgl. 2.10) wurde PDMS als Klebstoff verwendet. Die Herstellung erfolgte wie in Abschnitt 2.9.1 und in vorherigen Publikationen verwendet [165]. Als Mischungsverhältnis wurde 1:10 (Basisöl:Quervernetzer) gewählt. Das PDMS wurde mittels Spritze auf den äußeren Rand der Lochschale aufgetragen und anschließend mit anwendungsentsprechenden Deckgläsern versehen. Zur 3D Kultivierung wurden #1,5 Deckgläser (ca. 170 µm dick) benutzt, für Immunfluoreszenz-Analysen mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie wurden #1,5 HP-Deckgläser verwendet. Die Quervernetzung des PDMS erfolgte wiederum bei 60 °C für 16 Stunden.

Zur Sterilisation der Oberflächen wurden diese im Plasmaofen (Stickstoff-Plasma für mindestens 1 Minute) vorbehandelt. Durch die damit einhergehende Hydrophilisierung der Oberflächen wurde zudem eine ausreichende Verteilung der EHS-Matrix für die 3D Kultivierung gewährleistet.

2.10 Immunfluoreszenzfärbungen (IF)

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen fixiert. Hierfür wurde zunächst mit 2 ml CB-Puffer gewaschen und anschließend durch die Zugabe von 1 ml 3,7 % Formaldehyd (20 min, in 2D nur 10 min) fixiert. Diese und alle weiteren Inkubationen, sofern nicht anders angegeben, erfolgten bei RT und auf einem 2D-Schüttler bei 10 rpm (Waschschritte bei 20 rpm). Bei einer Fixierung der Azini im EHS-Hydrogel wurde eine Fixierungslösung bestehend aus 2 % Formaldehyd und 1 % Glutaraldehyd in CB verwendet. Zusätzlich wurde bei Proben im Gel mittels 1 % Natriumborhydrid-Lösung (5 min) zur Entfernung des reaktiven Glutaraldehyds (engl. *Quenching*-Schritt). Zum Entfernen des Formaldehyds oder des Natriumborhydrids wurde für fünf Minuten mit einer 30 mM Glycin-Lösung gewaschen.

Mittels 0,3 % Triton X-100-Lösung in CB-Puffer wurde die Zellen für 20 Minuten permeabilisiert, um die Membran für weitere Komponenten zugänglich zu machen. Nach einem 20-minütigen Waschschritt mit CB-Puffer erfolgte durch die zweistündige Zugabe von 5 % Milchpulver in CB-Puffer (+ 1 % goat F(ab')₂) die Blockierung von unspezifische Bindungsstellen. Anschließend wurde bei 4 °C 200 µl der Primärantikörperlösung über Nacht hinzugegeben. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde dreimal für 20 Minuten mit CB-Puffer gewaschen, um die Reste des Primärantikörpers zu entfernen. Der Sekundärantikörper wurde für 45 Minuten in dunkler Umgebung auf den Zellen inkubiert, um die lichtempfindlichen Farbstoffe zu schützen. Die Verdünnungen der Sekundärantikörper bzw. der spezifischen Farbstoffe und Peptide erfolgte in 1 % Milchpulver in CB-Puffer (200 µl). Anschließend wurde zweimal mit CB-Puffer gewaschen (jeweils 20 min). Zusätzlich konnten über DRAQ5 oder NucBlue (je 10 min verdünnt in CB-Puffer) die Zellkerne angefärbt werden. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die Proben mit 2 ml CB-Puffer bei 4 °C dunkel gelagert.

2.11 Konfokale *Laserscanning* Mikroskopie (LSM)

Für die Analysen der Immunfluoreszenzfärbungen sowie die Lebendzellmikroskopie der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche wurde ein konfokales Fluoreszenzmikroskop LSM 880 (Carl Zeiss)

verwendet. Als Anregungslaser standen ein Diodenlaser (405 nm), ein Argon-Ionen-Laser (488 nm), ein Dioden-Festkörperlaser (561 nm) und ein Helium-Neon-Laser (633 nm) zur Verfügung.

Mit diesen Lasern konnte die Probe punktuell beleuchtet werden, wodurch einzelne Ebenen (optische Schnittebenen) angeregt und betrachtet werden konnten. Das Emissionssignal konnte durch unterschiedliche Kombinationen aus Band- und Langpass-Filtern spezifisch selektiert und vom Anregungslicht abgetrennt werden. Das Licht wurde anschließend von dem Objektiv gesammelt und über einen Farbteiler auf die Lochblende (engl. *pinhole*) weitergeleitet sowie letztendlich von einem Detektor (engl. *photomultiplier*) erfasst. Die Detektion erfolgte im LSM-Modus über einen Flächendetektor mit 32 Detektorelementen. Für ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis wurde im LSM-Modus ein Durchmesser der Lochblende von einer Airy Einheit gewählt. Im oft verwendeten Fast Arrayscan Modus wird das Signal über einen hexagonalen Flächendetektor mit 16 konzentrisch angeordneten GaAsp Detektorelementen erfasst. Aus den 16 einzelnen Signalen wurde durch Zen ein einzelnes Bild errechnet. Neben der besseren Auflösung ist die Aufnahmegeschwindigkeit im Fast Arrayscan deutlich erhöht. Dies ist möglich durch die Aufspaltung des Anregungslichts zu einer Ellipse und durch die gleichzeitige Anregung von vier Pixelreihen. Außerdem ist die Lochblende in diesem Modus komplett geöffnet, wodurch eine höhere Lichteffizienz erreicht wird. Dadurch wird weniger Anregungslicht benötigt und ein schnelles Ausbleichen der Probe verhindert. Ein großer Vorteil ist die Möglichkeit schnell verschiedene Ebenen aufzunehmen, die eine 3D Rekonstruktion ermöglichen.

Zur Steuerung des Mikroskops wurde die Software Zen Black verwendet, die nachfolgende Bearbeitung und das Prozessieren der Aufnahmen erfolgte mit der Software Zen Black oder Zen Blue.

2.11.1 Quantitative Zellfortsatzanalysen

Die Analysen wurden mit fixierten, gefärbten und mittels LSM 880 aufgenommen Azini durchgeführt. Für die laterale Mikrospike (MS)-Analyse wurden Z-Stacks mit einer Höhe von 1 μm (5 Querschnitte, d.h. jeder Querschnitt hat eine optische Dicke von 247 nm) in einem definierten Bereich verschiedener Azini aufgenommen. Dieser Bereich begann 10 μm über dem Glassubstrat und endete in der Mitte (Äquatorialebene: Querschnitt mit dem größten Radius) des jeweiligen Azinus. Jeder Z-Stapel wurde mittels *Maximum Intensity Projection* (MIP) in einem Bild zusammengefasst. Die einzelnen MIP wurden im Folgenden analysiert. Hierfür wurden Aktin-Strukturen als MS definiert, wenn diese das Kollagen IV der BM durchdrangen und länger

waren als die Dicke der BM. Die Anzahl der MS wurde in ein Verhältnis zu dem Radius jedes einzelnen MIP Querschnitts gesetzt.

Für die Analyse des gesamten Aktin-Zytoskeletts der basalen Zellschicht an der Azinus-EZM Grenzfläche wurden in diesem Bereich Z-Stacks aufgenommen und mittels MIP in einem Bild zusammengeführt. In den MIP-Querschnittsbildern wurden die Zellen manuell in MS und SF (Stressfasern) aufgeteilt. Dazu wurden die Bilder mit einem Bandpass gefiltert: $BP_img = G(I, 0.5) - G(I, 7)$. I ist die MIP und $G(I, X)$ das gefilterte Bild (Gauß Filter mit Filterkerngröße X). Das Bandpass gefilterte Bild wurde anschließend erneut mittels eines Gauß Filters (Filterkerngröße 1) geglättet. Um aus diesem Bild eine binäre Maske für die MS und SF zu erzeugen, wurde das Bild mit dem Otsu Schwellwertverfahren [166] segmentiert. Für jeden Azinus wurde manuell die Zellgrenze für die MS- und SF-Zellen markiert und daraufhin die Zellzahl sowie die Flächen dieser MS- und SF-Zellen bestimmt. Außerdem konnte der Bedeckungsgrad von MS in MS-Zellen errechnet werden. Das Programm zur Bild-Prozessierung und Quantifizierung stammt von Herrn Georg Dreissen (IBI-2).

2.11.2 IF-Signalintensitätsanalysen für die BM, pERK- und MMP-Expression

Zur Auswertung des Signals der Kollagen IV (als BM-Marker), pERK und MT1-MMP Färbung wurde das Bild mittels Otsu Schwellwertverfahren [166] segmentiert. Von allen Pixel oberhalb des Schwellwerts wurde, der Median bestimmt und abgebildet. Die analysierten Bilder wurden in einer Azinusebene 20 µm über dem Substrat aufgenommen. Das Programm zur Bild-Prozessierung und Quantifizierung stammt von Herrn Georg Dreissen (IBI-2).

2.12 Proteinanalysen

Zum Nachweis der pERK-Proteinexpression von Zellmonolagen auf einem planaren Substrat wurde die Western Blot Methode angewandt. Dazu wurden die Proteine zunächst isoliert, abhängig von ihrer molaren Masse aufgetrennt und abschließend zur Visualisierung auf eine Trägermembran übertragen.

2.12.1 Proteinisolation

Zur Proteinisolation wurden 300.000 Zellen in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Die nach zwei Tagen entstehend Zellmonolagen (80 % Konfluenz) wurden wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben gewaschen und mit Trypsin versetzt. Das entstehende Zellpellet wurde zweimalig mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet nach erneuter Zentrifugation mit einem Zellysepuffer (RIPA-Puffer (je 500 μ l/Pellet)) mit einem Protease/ Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (je 1:100 in RIPA-Puffer) behandelt. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis, um einen zusätzlichen und vorzeitigen Abbau der Proteine durch Zellproteasen zu verhindern. Im Anschluss an die Zugabe des Zellysepuffers wurden die Zellen zusätzlich durch mechanische Scherung aufgeschlossen. Dazu wurde die Lösung mehrfach durch eine Spritzenkanüle resuspendiert. Bei der folgenden Zentrifugation für 10 Minuten bei 10.000 g wurden größere Zelltrümmer von den Proteinen getrennt. Die im Überstand befindlichen Proteine (ca. 500 μ l) wurden in ein neues eisgekühltes Reaktionsgefäß übertragen.

Ein Teil dieses Überstandes wurde zur Proteinmengenbestimmung in einer 1:5 (10 μ l) und 1:10 (5 μ l) Verdünnung in Lyse-Puffer (40 bzw. 45 μ l) (vgl. 2.12.2) entnommen, die restliche Menge wurde mit 4x Lämmli-Puffer und β -Mercaptoethanol versetzt. Während der folgenden fünfminütigen Inkubation bei 95 °C wurden die Proteine denaturiert und durch negativ geladenes Lithiumdodecylsulfat (LDS) und Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen. Die Stärke der negativen Ladung ist hierbei proportional zur Größe der Proteine, wodurch diese im Folgenden über eine SDS-Gelelektrophorese getrennt werden konnten (vgl. 2.12.3). Außerdem konnten die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2.12.2 BCA (Bicinchoninsäure) Test

Der BCA-Test wurde angewandt, um quantitativ die Menge der isolierten Proteine zu bestimmen. Für die Messung wurde eine Proteinverdünnungsreihe angesetzt, die mit einer BSA-Verdünnungsreihe als Kontrolle und Richtwert zur Bestimmung der Proteinkonzentration verglichen wurde. Dazu wurden die Verdünnungsreihen der BSA- und der Proteinlösung mit der BCA-Test Lösung versehen. Diese enthielt Kupfersulfat, welches bei entsprechendem pH-Wert an den Peptidbindungen der Proteine reduziert wird. Bei zusätzlicher Bindung von BCA entstand ein Farbstoffkomplex. Durch eine photometrische Messung und anschließende Nutzung einer Standardgerade konnte vom Ergebnis der Farbreaktion auf die Proteinmenge geschlossen werden.

2.12.3 SDS-Gelelektrophorese

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die gleichen Proteinmengen eingesetzt (10 µg). Verwendet wurden 4-20 % Bis-Tris-Gele, deren Taschen vor Benutzung zweimalig mit dem 1x Lämmli-Puffer (Ladepuffer für die Kammer) ausgespült wurden. Zusätzlich wurde ein Längenmarker zur Orientierung und zum Vergleich der Proteinbandengröße verwendet. Zur Auftrennung der Proteine wurde zunächst für 10 Minuten eine Spannung von 100 V (Durchlaufen des Sammelgels) angelegt, im Anschluss wurde die Spannung für weitere 60 Minuten auf 120 V erhöht (Durchlaufen des Trenngels). Die negativ geladenen Proteine wandern entsprechend ihres Molekulargewichtes in Richtung der Anode.

2.12.4 Western Blot

Mittels Western Blot wurden die Proteine zur besseren Visualisierung aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Dazu wurde das SDS-Gel zwischen Schwämmen und Filterpapieren anodenseitig und blasenfrei auf eine Nitrozellulosemembran gepresst. Die Schwämme gewährleisteten eine konstante Versorgung mit dem Protein-Transferpuffer (mit 20% Methanol). Auf Grund des elektrischen Feldes bewegen sich die negativ geladenen Proteine von der Kathode in Richtung der Anode vom Gel auf die Membran. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 4 °C über Nacht.

2.12.5 Proteinfärbung

Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde zunächst eine unspezifische Proteinfärbung mit Panceau S (15 min bei RT, bei 15 rpm) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen roten Azorfarbstoff, der reversibel an positiv geladenen Aminogruppen aller Proteine bindet. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen, um umgebundenen Farbstoff zu entfernen. Die Detektion der Banden erfolgte mit dem System GEL Doc XR+ (Biorad) und der Software Image Lab. Abschließend wurde die Membran mit 0,1 M Natronlauge für 30 Sekunden entfärbt, mit PBS gewaschen und mit 5 % Milchpulver (eine Stunde bei RT, bei 15 rpm) inkubiert.

Nachfolgend konnte eine spezifische Proteinfärbung über Antikörper erfolgen. Dazu wurde der primäre Antikörper gegen pERK und Tubulin YL 1/2 in 1 % Magermilchpulver in PBS verdünnt (1:2000) auf die Membran gegeben (4 °C, über Nacht, bei 15 rpm). Nach drei PBS Waschschr

für je fünf Minuten bei 15 rpm wurde die Membran für eine Stunde bei RT (15 rpm) mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper enthielt eine alkalische Phosphatase (AP). Nach der Inkubation wurde erneut dreimalig mit PBS gewaschen (5 min, RT, bei 15 rpm). Abschließend wurde 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) hinzugegeben, bis sich die Proteinbanden entwickelt hatten. Dies geschah durch die Hydrolyse von BCIP zu 5-Brom-4-Chlorindolyl durch die AP und die darauffolgende Entstehung von zwei Farbstoffen: Zum einen bei der Oxidation von 5-Brom-4-Chlorindolyl zu tiefblauem 5'5'-Dibrom-4,4'-Dichlorindigo und zum anderen bei der Reduktion von NBT zu blauem Di-Formazansalz. Diese Reaktionen wurden durch das Absaugen der Färbelösung und das Waschen mit MilliQ-H₂O beendet. Die Proteinbanden konnten nach dem Trocknen über das Geldokumentationssystem Gel DocTM XR+ (Biorad) aufgenommen werden.

2.13 Zell-Zugkraft-Analysen (TFM)

Die Durchführung der Zugkraftmikroskopie (engl. *traction force microscopy* (TFM)) erfolgte an einem Axio Observer mit dem EC-Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil Ph3 Objektiv unter Zellkulturbedingungen (37 °C und 5 % CO₂). Der Bilderexport wurde mit der Zen Blue 2.3 Software durchgeführt. Als Zeitspanne für die Langzeitanalysen wurden im Intervall von 20 Minuten Bilder über einen Zeitraum von 65 Stunden aufgenommen. Azini wurden mittels Phasenkontrast analysiert, während die fluoreszierenden Mikrokügelchen (engl. *beads*) über Fluoreszenzmikroskopie detektiert wurden (Anregung bei 605 nm, anfänglich erfolgte die Anregung mit einer HXP-120 Lampe, Detektion mittels 64 HE Filter; für die Analysen der MCF10A-ER:hRas Zellen auf 12 kPa erfolgte ein Wechsel zum Colibri-LED System mit entsprechenden Filtern (vgl. Tabelle 2.1)). Der Beadkanal wurde über den gesamten Versuchszeitraum zur Erhaltung der Fokusebene mittels Autofokus als Referenzkanal gewählt. Zur besseren Auflösung der Aktin-Strukturen an der Azinus-BM-EZM Grenzfläche wurden die Analysen mit MCF10A RFP-Life-Act Zellen an einem LSM 880 durchgeführt (vgl. 3.3.6). Hier wurden die Azini über das Immunfluoreszenzsignal von Aktin analysiert. Als Analysezeitraum wurden 18-20 h gewählt und die einzelnen Bilder wurden alle 7 Minuten aufgenommen.

In dieser Arbeit wurden basierend auf dem entwickelten System von Harris et al. die horizontal generierten Kräfte (in X- und Y-Richtung) von Azini aus MCF10A Zellen analysiert [111, 167]. Dazu wurde die lineare Elastizitätstheorie für Punktkräfte verwendet [112]. Zur Analyse wurden mit Matlab erstellte Programme verwendet (entwickelt von Dr. Norbert Kirchgessner und Dr.

Sebastian Houben, weiterentwickelt und an die spezifischen Versuchsanforderungen angepasst von Dr. Ronald Springer (IBI-2, Forschungszentrum Jülich)).

Aus den Einzelbildern über den Analysezeitraum wurden zunächst mittels des *ImageJ*-Makros *MacroStitchingTool2* unabhängige Bildsequenzen (Z-Stapel) generiert [168]. Teilweise wurde zusätzlich ein Raster von 3x3 Einzelbildern aufgenommen, um eine flächenmäßig größere Aufnahme zu erhalten. Diese Bilder wurden mit einer Überlagerung von 10 % aufgenommen und konnten über das gleiche Programm zu einem Bild zusammengesetzt werden. Die numerische Abschätzung der Zell-Zugkräfte erfolgte durch das Programm *CellForceAnalysis2*. Hierzu wurden zunächst die vorhandenen fluoreszierenden *Beads* auf der Oberfläche detektiert. Durch die Markierung eines *Beads* wurde eine synthetische Suchvorlage (elliptisches Paraboloid) generiert (Abbildung 14A und B). Diese Vorlage wurde verwendet, um über lokale Maxima der Kreuz-Korrelation alle anderen *Beads* auf der Oberfläche zu detektieren, sofern der Wert des Kreuz-Korrelations-Koeffizienten an dieser Stelle mindestens 0,7 betrug (Abbildung 14C). Anschließend wurden die Markerbeads der Bilder der folgenden Zeitpunkte detektiert. Im Falle einer Zellkraft bedingten Verschiebung der *Beads* wurde die veränderte Beadposition im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt durch Verschiebungsvektoren angegeben (Abbildung 14E). Die Beadpositionen sind Zentren von quadratischen Musterbildbereichen (engl. *pattern*), die mittels der normierten Kreuzkorrelation in den darauffolgenden Bildern gesucht werden. Aus der Differenz der Positionen (Zentren der Musterbereiche) werden die Verschiebungen bestimmt.

Das erste Bild der *Beads* (der erste Zeitpunkt) wurde als Referenzbild genutzt. Anhand des Vergleiches zum jeweils vorherigen Zeitpunkt fand eine Verschiebungskorrektur (Driftkorrektur) statt (Abbildung 14D). Dazu wurden manuell vier zellfreie Bereiche, die nicht im Zell-Deformationsfeld lagen, ausgewählt. Der Mittelwert der Verschiebung in den festgelegten Bereichen wurde als Drift der Probe zu den jeweiligen Zeitpunkten definiert. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass nicht zellbedingte Verschiebungen der *Beads* in die Kräfteberechnung mit einfließen. Zur Zellkraftberechnung wurde der zu analysierende Bereich definiert. Hierfür wurde ein Kreis um den Azinus gelegt (bei der Analyse der MCF10A RFP-LifeAct Zellen wurde gesamte Bild ausgewertet). Innerhalb des Analysebereichs wurde basierend auf dem Deformationsfeld vektoriell die Verschiebung jedes einzelnen *Beads* im Vergleich zum Referenzbild errechnet (Abbildung 14E). Dazu generierte der Algorithmus zu jedem Zeitpunkt ein künstliches Kraftfeld zur Berechnung der kumulativen Verschiebung des Deformationsfeldes. Mittels einer Optimierungsmethode wird ein äquivalentes Kraftfeld abgeschätzt, welches ein Verschiebungsvektorfeld erzeugt, das möglichst wenig vom gemessenen Verschiebungsvektorfeld abweicht. Daraus konnte die Kraft (Betrag) pro Einheitsfläche in $\text{Nn}/\mu\text{m}^2$ errechnet werden

(Abbildung 14F) [112, 169]. Innerhalb des Analysebereiches errechnete sich die kontraktile Gesamtkraft des Azinus aus der Summe aller (in die Zellmitte) wirkenden Kraftanteile. Im letzten Schritt erfolgte die Umrechnung (alle Berechnungen sind ebenfalls integriert in *CellForceAnalysis2*) in die Formänderungsenergie (engl. *strain energy*) in Femtojoule (fJ) als alternatives, skalares Maß für die Zellkraft [170].

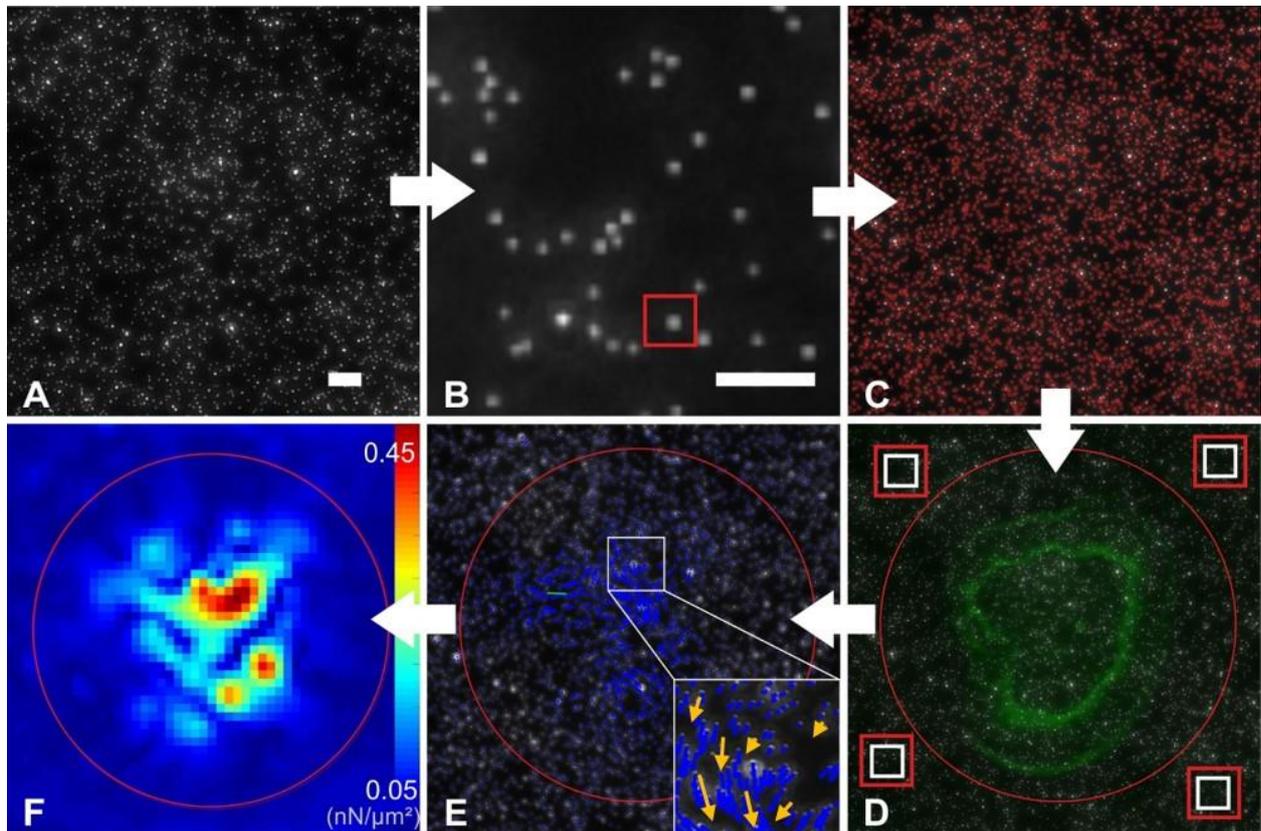


Abbildung 14: Prozessierungsschritte der digitalen Bildverarbeitung der Zugkraftmikroskopie. (A) Übersichtsbild der Verteilung der Mikrokügelchen (*Beads*) zum ersten Zeitpunkt (Referenzbild) sowie (B) die Vergrößerung eines repräsentativ markierten Kügelchens. (C) Darstellung der automatisierten *Bead*-Erfassung. (D) Die Durchlichtaufnahme des Azinus in Kombination mit den Markerbeads zeigt beispielhaft die beschriebene Verschiebungskorrektur durch die Markierung von 4 zellfreien Bereichen. Zusätzlich zeigt der rote Kreis die Analysefläche. (E) Vektorielle Detektion (Verschiebungsvektoren in Blau, einzelne repräsentative Vektoren wurden in Gelb zur besseren Visualisierung nachgezeichnet) der *Bead*verschiebung in Bezug auf das Referenzbild und (F) die daraus kalkulierten Angaben zu der Kraft, die auf das Substrat wirkt. Abschließend erfolgte die Umrechnung in die Formänderungsenergie (fJ) als Maß für die Zellkraft und den BM-Stress. Maßstab = 20 µm.

2.14 Invasionsassay

Der Invasionsassay diente zur Bestimmung der Invasionshäufigkeit von Azini auf 0,12 kPa und 12 kPa steifen PDMS Elastomeroberflächen. Dieser wurden von Frau Dr. Aljona Gaiko-Shcherbak

und Dr. Erik Noetzel-Reiss entworfen. Die Aufnahmen der Azini über 65 Stunden erfolgten wie im Abschnitt zuvor beschrieben über Phasenkontrastaufnahmen (vgl. Abschnitt 2.13). Die Abbildung 15 fasst die Phasen des Invasionsassays schematisch zusammen. Nach dem Transfer auf die Elastomeroberfläche wiesen die Azini die kohärente Zellbewegung auf. Durch lokale BM-zerstörungen konnten invasive Zellen durch die BM migrieren. Azini wurden als invasiv gewertet, sobald die erste Zelle durch die BM transmigriert ist.

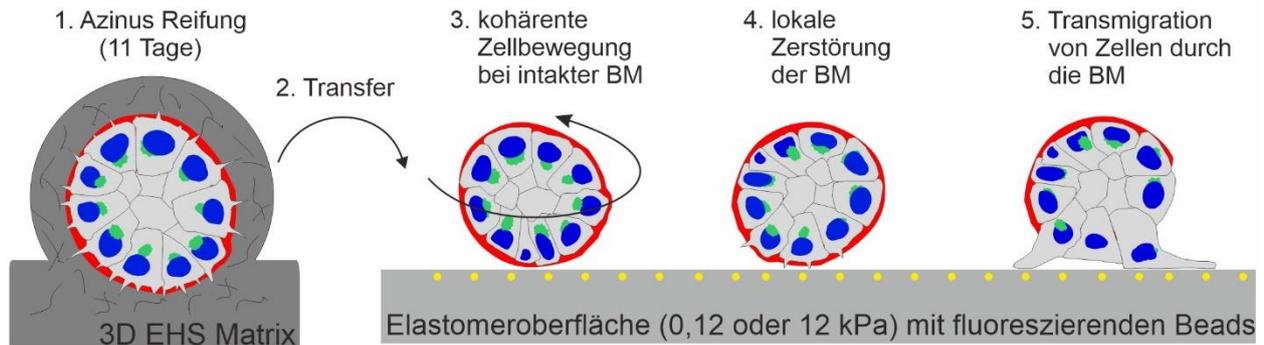


Abbildung 15: Invasionsassay zur Analyse der kontraktilen Zugkraft mittels Zugkraftmikroskopie. Grafische Darstellung der verwendeten Invasionsanalyse zur Visualisierung bzw. Bestimmung der Zellbewegung, der kontraktilen Zellkräfte und des Invasionsprozesses an der Azinus-BM-EZM Grenzfläche. Angegeben sind die Schritte des Assays, den lebende elf Tage alte MCF10A LifeAct Azini durchlaufen. Zur Zellkraftbestimmung wurde die Verschiebung der Fluoreszenzkugeln (engl. *Beads*) detektiert, die an der PDMS Oberfläche gekoppelt sind (gelbe Punkte). Entwickelt von Dr. Gaiko-Shcherbak und Dr. Noetzel-Reiss.

2.15 Statistische Analysen

Alle gemessenen Einzelwerte wurden in den dargestellten Diagrammen abgebildet, d.h. auch bei der Messung von mehreren Positionen innerhalb eines Azinus wurden alle Werte verwendet. Für die statistische Datenanalyse in dem Abschnitt 3.3.1 wurden nur die Mediane jedes gemessenen Azinus genutzt (jeweils in den Abbildungen mit 95 % Konfidenzintervall angegeben). Für die Datenanalyse der Formänderungsenergien wurden die Werte jedes Azinus für jede Kondition ($n = 4$; 60 Werte, in Summe 240 FE-Werte) zufällig nach der *Bootstrap*-Methode (Stichprobenwiederholung (1000 Wiederholungen), ohne Zurücklegen) verwendet. Bei allen Analysen wurde der nicht parametrische Mann-Whitney U-Test angewendet. Als Software für die Darstellung und Berechnung der Statistiken wurde die Graphpad Prism Version 8.4.2 (Graphpad Software, La Jolla, CA USA) genutzt. Die p -Werte wurden folgendermaßen definiert: **** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; ns = nicht signifikant.

3 Ergebnisse

Die lokale Zerstörung der BM ist eines der Schlüsselereignisse während der Brustkrebsinvasion. Für die Analyse der zellulären Mechanismen und der mechanosensorischen Regelkreise dieses Invasionsprozesses wurden in dieser Arbeit MCF10A Brustazini mit einer endogen gebildeten BM verwendet. Dieses Modell ist allgemein anerkannt für Studien zur Brustdrüsenentwicklung und zur Untersuchung invasionsrelevanter Faktoren im humanen Mammakarzinom [49, 171, 172]. Das Zellkulturmodell für die Analysen der ersten drei Abschnitte (vgl. 3.1, 3.2 und 3.3) wurde etabliert von Gaiko-Shcherbak und Kollegen (beschrieben in Abschnitt 1.4) [37]. Die verwendeten Azini wurden entweder von einer tumorassoziierten gering entwickelten BM umgeben (ld-BM, 11 Tage alt) oder von einer mechanisch widerstandsfähigeren und maturierten BM (hd-BM, 21 Tage alt).

3.1 Promotionsrelevante Vorarbeiten

In diesem Abschnitt werden promotionsrelevante Daten präsentiert, die im Rahmen der eigenen Masterarbeit und zu Beginn der Promotionsarbeit entstanden sind. Die Auswertung und Verwertung dieser Ergebnisse erfolgte zu großen Teilen während der Promotion und resultierten in einer gemeinsamen Veröffentlichung mit geteilter Erstautorenschaft mit Frau Dr. Aljona Gaiko-Shcherbak, weshalb diese Daten hier im Ergebnisteil präsentiert werden. Diese Daten stellen die Grundlage der fortgeführten Arbeit (teilweise veröffentlicht in [173]) dieser Dissertation dar und werden zunächst unter Angabe der Literaturquelle [33] zusammengefasst. Von Frau Dr. Aljona Gaiko-Shcherbak erzielte Ergebnisse sind entsprechend gekennzeichnet. Alle nicht explizit gekennzeichneten Daten wurden ausschließlich von mir erhoben und ausgewertet.

Die Vorarbeiten gaben einen Einblick in die mechanisch gesteuerte und EMT induzierte Invasion bei dysregulierten MCF10A Azini. Die Invasion wurde definiert als Prozess, bei dem ursprünglich azinare Zellen durch eine lokal zerstörte BM transmigrieren können (Abbildung 16). Durch diesen Prozess können Zellen umliegendes Gewebe infiltrieren.

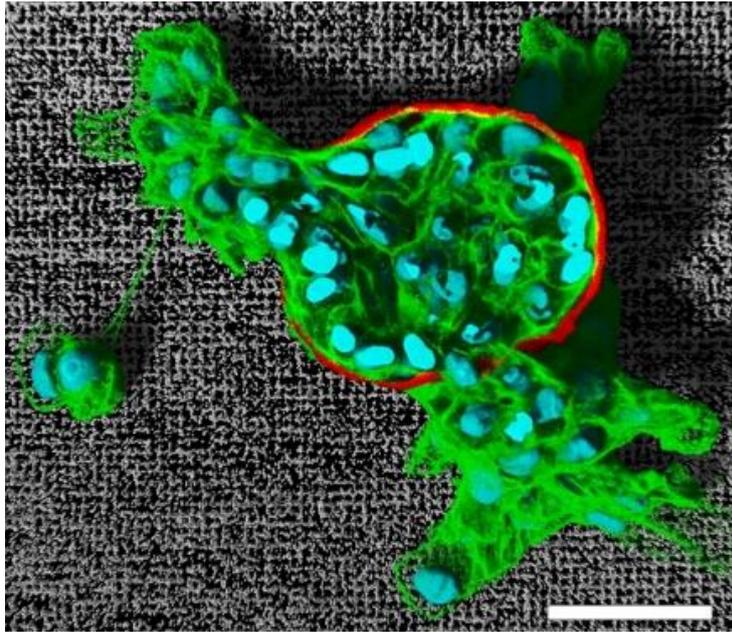


Abbildung 16: Die Zelltransmigration eines invasiven Brustdrüsenphäroids. Dargestellt ist ein invasiver MCF10A Azinus. Aufgrund lokaler BM-Zerstörungen (BM: rot = Kollagen IV Signal) verlassen Zellen (grün = Aktin-Signal) den azinaren Zellverbund. Kerne sind in Cyan dargestellt. Der hd-BM Azinus wurde mittels Immunfluoreszenstechnik angefärbt, konfokal aufgenommen und mit Imaris in 3D rekonstruiert. Maßstab = 50 µm. Das Bild stammt von Dr. Erik Noetzel-Reiss. Verändert nach [33].

Über die Bestimmung des Invasionszeitpunktes konnte ein synergistischer Effekt der EZM-Steifigkeit und der BM-Maturierung bzw. -Stabilität demonstriert werden (für die Unterschiede in der BM-Maturierung vgl. Abbildung 6E). Hierzu wurden ld-BM und hd-BM Azini auf Elastomeroberflächen mit einer definierten Steifigkeit transferiert (0,12 kPa oder 12 kPa) und für 65 Stunden analysiert (für eine detaillierte Vorstellung des Invasionsassays vgl. Abbildung 15). Über die Kombination der zwei Parameter, die BM-Maturierung und die EZM-Steifigkeit, ergaben sich vier Azinifractionen, die im Folgenden untersucht wurden. Diese bilden *in vitro* eine maligne Transition von einem physiologischen Zustand zu einem tumorassoziierten Status ab, der die Invasion von Brustepithelien begünstigt (Abbildung 17).

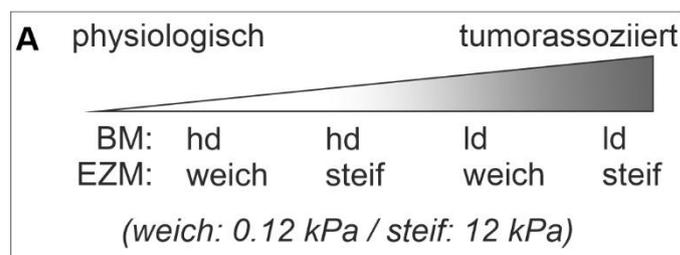


Abbildung 17: *In vitro* Kultivierungsbedingungen des Invasionsassays. Experimentelle Parameter zur Nachahmung der tumorbedingten Veränderungen der BM und EZM zur Untersuchung der Invasionshäufigkeit und von kontraktilen Zellkräften.

Sowohl eine tumorbedingte Versteifung der EZM (12 kPa) als auch eine tumorassoziierte, gering entwickelte BM (ld-BM) erhöhen die Invasionshäufigkeit graduell (Abbildung 18A). Dementsprechend wiesen hd-BM Azini auf einer weichen 0,12 kPa EZM mit 2 % die geringste Invasion auf, während ld-BM-Azini auf einer tumorassoziierten harten EZM (12 kPa) die höchste Anzahl an Invasionsereignissen (28 % zeigten). Neben dem Nachweis einer EZM-Steifigkeit induzierten Invasion, zeigte dieser Fund, dass die Barrierefunktion der BM gegenüber Zellen abhängig von der mechanischen Integrität der BM war. Dieser graduelle Effekt wurde jedoch durch die Stimulation von EGF teilweise überschrieben. Die Invasionshäufigkeit nach 65 Stunden war in allen Gruppen durch EGF signifikant erhöht, ein Unterschied war lediglich in Bezug auf die Steifigkeit der EZM, aber nicht in Bezug auf die BM-Maturierung zu erkennen. Dies bedeutete beispielsweise einen Anstieg der Invasionshäufigkeit von 28 % auf 82 % bei der invasivsten Fraktion (ld-BM, 12 kPa, -EGF) durch die EGF-Behandlung (Abbildung 18B).

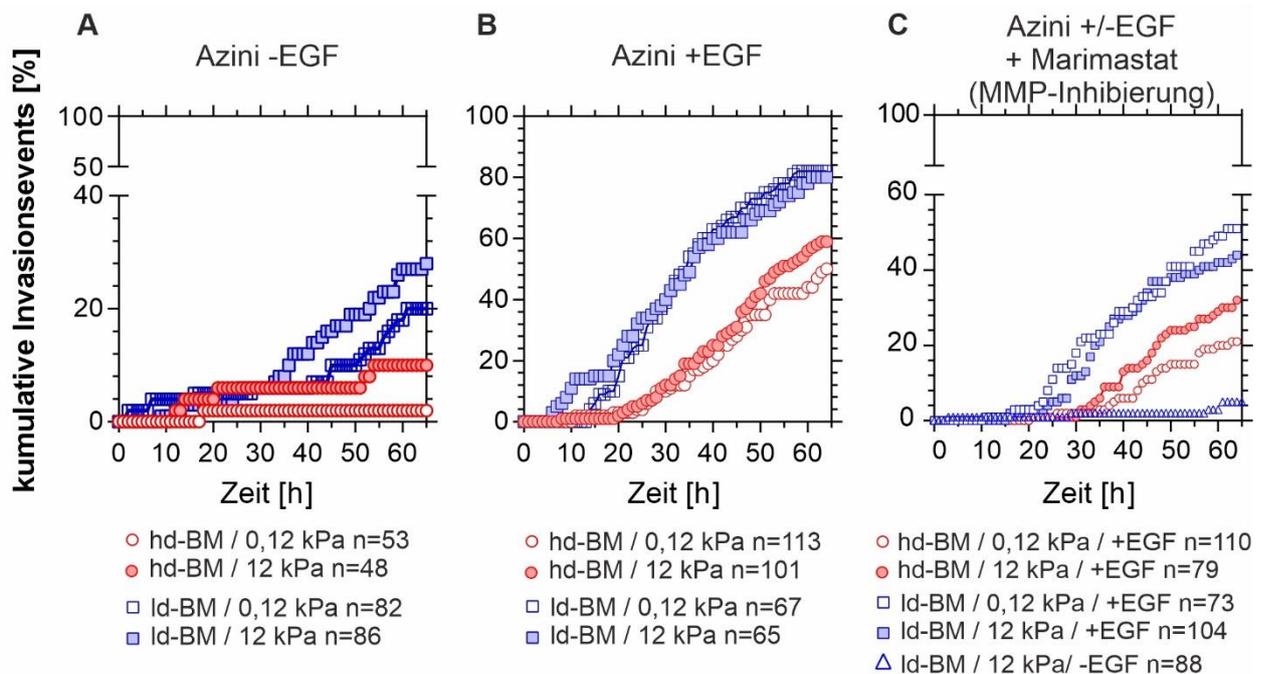


Abbildung 18: Die Zellinvasion ist abhängig von der EZM-Steifigkeit und der BM-Integrität. Abgebildet sind die kumulativen Invasionsereignisse über die Zeit in Abhängigkeit der EZM-Steifigkeit (0,12 oder 12 kPa) und des BM-Status (gering entwickelt oder hoch entwickelt (ld/hd-BM)) (A) Bei EGF unbehandelten Azini liegt ein gradueller Effekt der Steifigkeit und der BM-Maturierung vor. (B) Eine EGF-Behandlung erhöht die Zahl der Invasionsereignisse signifikant in allen Gruppen. (C) Eine MMP Inhibition mittels Marimastat reduziert die Invasionshäufigkeit in allen Gruppen. n = Anzahl an analysierten Azini von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Verändert nach [33]. Die Daten der +EGF Gruppen stammen von Dr. Aljona Gaiko-Shcherbak.

Während EGF als pro-invasiver Faktor die Invasion deutlich steigerte, konnte diese über die Inhibition von MMPs signifikant gesenkt werden. Sowohl die invasiveren Fraktionen mit EGF als auch EGF-unbehandelte Gruppen wiesen eine Reduktion der Invasion auf. Bei EGF behandelten ld-BM Azini konnte die Invasion um 23 % gesenkt werden, bei hd-BM Azini sogar um 44 %. Allerdings verblieben durch die EGF-Stimulation je nach Fraktion weiterhin 20 – 50 % der Azini invasiv. Nur in EGF-unbehandelten Fraktionen konnte die Invasion fast komplett geblockt werden. So konnte die invasivste Gruppe ohne EGF-Stimulation auf 5 % Invasion gesenkt werden (Abbildung 18C). Dies verdeutlichte die Bedeutung von MMP und einer proteolytischen Degradation im Invasionsprozess.

Ebenfalls als invasionsfördernd wurden von den Zellen auf die Umgebung ausgeübte Zellkräfte definiert, die an der Kontaktfläche zu der EZM entstehen. Selbst ohne EGF bzw. auch nach der Inhibition der proteolytischen Degradation der BM wurden Azini invasiv. Daraus wurde geschlossen, dass es neben einer proteolytisch abhängigen Invasion der BM weitere Invasionsmodi in Brustdrüsenepithelien geben muss. In der Veröffentlichung wurden kontraktile Zellkräfte als zusätzlicher invasionsfördernder Mechanismus in Brustsphäroiden identifiziert und analysiert. Die Ergebnisse der Invasionshäufigkeiten korrelierten mit den generierten Zellkräften. So traten bei der invasivsten und tumorähnlichsten Kondition die höchsten Zellkräfte auf, während bei Azini unter gesunden und physiologischen Bedingungen nur geringe Zellkräfte und Invasionswerte zu detektieren waren. Generell nahmen die Zugkräfte graduell mit zunehmender Malignität bei invasiven und nicht-invasiven Azini zu (Abbildung 19). Invasive ld-BM als auch hd-BM Azini generierten auf einer weichen 0,12 kPa EZM nur sehr geringe Zellkräfte (Bereich von 0,01 - 3,25 fJ). Als Messzeitpunkte wurden die Daten fünf und zehn Stunden nach dem Transfer auf die EZM gewählt sowie der Invasionszeitpunkt mit den dazugehörigen Formänderungsenergien fünf und zehn Stunden vor und nach der Invasion. Durch die Versteifung der EZM auf 12 kPa wurde dieser BM-Stress im Median über die beschriebenen Zeitpunkte bei invasiven Azini um das 140-fache gesteigert. Invasive ld-BM Azini (Bereich von 7.5 – 105 fJ, Median: 37 fJ) zeigten auf einer 12 kPa EZM eine 10-fach höhere Formänderungsenergie als hd-BM-Azini. Auch EGF steigerte die gemessenen Formänderungsenergien im Vergleich zu EGF-unbehandelten Azini signifikant. Dies konnte sowohl in ld-BM als auch in hd-BM Azini gezeigt werden.

Außerdem wurden in allen Azinifractionen invasive Azini mit nicht-invasiven Azini verglichen. In allen Gruppen wiesen invasive Azini zum Invasionszeitpunkt einen 1,7 -3,7-fach höheren BM-Stress auf als nicht-invasive Azini im Median über die analysierten 65 Stunden. (Abbildung 19).

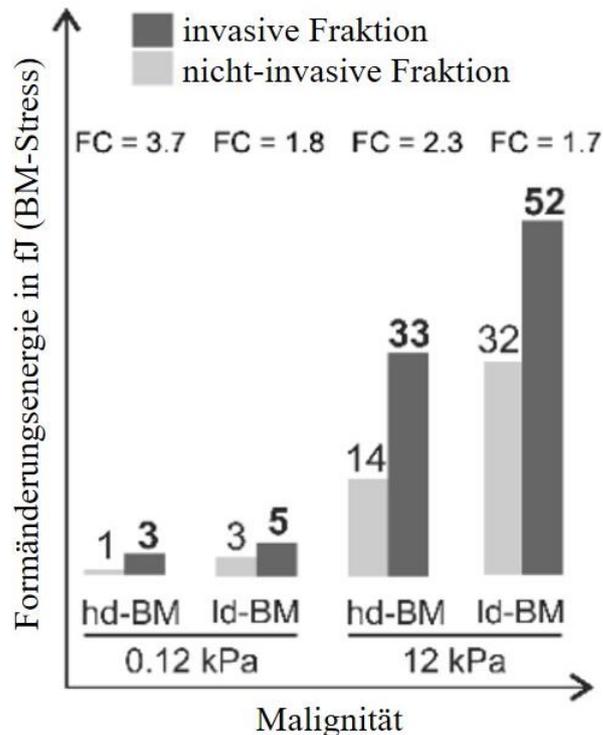


Abbildung 19: BM-Stress in Abhängigkeit von der zunehmenden Malignität bei Brustsphäroiden. Vergleich der Formänderungsenergie (fJ) als Maß für den BM-Stress in Abhängigkeit von der Malignität der analysierten Azinifractionen (ld/hd-BM auf 0,12/12 kPa). Die Azinifractionen wurden unterteilt in invasive (Messung zum Invasionszeitpunkt) und nicht-invasive (Median der Messwerte nach 20, 30, 40, 50, 60 und 65 Stunden) Gruppen. Zusätzlich wurde die x-fache Veränderung (engl. *fold change* (FC)) der Formänderungsenergie zwischen invasiven und nicht-invasiven Azini angegeben. Verändert nach [33].

Basierend auf den präsentierten Daten konnten die kontraktile Zellkräfte als mechanischer BM-Stress mit einer zunehmenden Tumorprogression in Verbindung gebracht werden. Diese Tumorprogression von einem gesunden hin zu einem tumorassoziierten Zustand konnte experimentell durch die Versuchsparameter (EZM-Steifigkeit und BM-Status) imitiert werden (Abbildung 17). Mit Hilfe dieses Modells konnte letztendlich gezeigt werden, dass mit zunehmender EZM-Versteifung, zusätzlicher EGF-Stimulation oder MMP-Aktivität sowie zunehmendem mechanischen BM-Stress durch kontraktile Zellkräfte die Invasion durch die BM gefördert wird. Die BM kontert diese pro-invasiven Faktoren bis zu einem gewissen Grad (Barrierefunktion). Doch mit abnehmender BM-Integrität und sinkender mechanischer Stabilität kann die BM lokal zerstört werden (Abbildung 20 enthält eine Zusammenfassung aller beschriebenen Parameter).

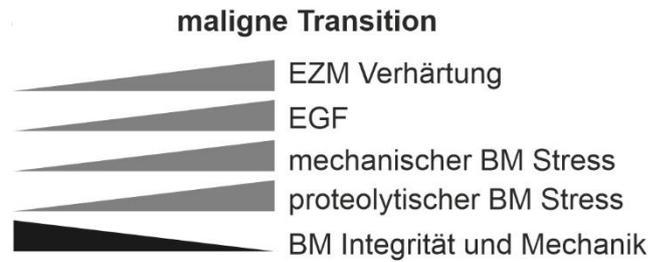


Abbildung 20: Pro-invasive Veränderungen während der malignen Transition. Zusammenfassung der Veränderung invasionsrelevanter Parameter, die zur malignen Transformation und zur BM-Invasion bei Azini beitragen. Verändert nach [33].

Interessanterweise wurden zusätzlich aktinbasierte Zellfortsätze, die durch die BM dringen identifiziert (Abbildung 21A und B). Die Bildung dieser BM durchspannenden Zellfortsätze bei MCF10A Azini war unabhängig von der MMP-Inhibition (Abbildung 21C).

An der Azinus-BM-EZM Grenzfläche wurden ebenfalls BM-durchspannende Mikrospikes detektiert. Diese bildeten sich vertikal in Richtung der unterliegenden EZM aus und waren mit Vinculin co-lokalisiert (Abbildung 21D – F). Mittels elastischer elastische Resonator-Interferenz-Stress-Mikroskopie (ERISM) konnte die mechanische Aktivität dieser Fortsätze nachgewiesen werden. Über die vertikale Substratdeformation wurde ein Ziehen und Drücken dieser aktinbasierten Zellfortsätze identifiziert. Die Aktivität der Zellfortsätze wurde ebenfalls als mechanischer BM-Stress definiert. Auch hier wurde der größte BM-Stress bei der tumorähnlichsten Azinifraktion gemessen.

Zusammenfassend konnten invasionsfördernde kontraktile Zugkräfte und Zellfortsatzkräfte als Mechanismen der BM-Schwächung nachgewiesen werden. Diese Kräfte stiegen in Folge der Versteifung der EZM und einer tumorbedingten Abnahme der BM-Integrität. Neben einer proteolytischen Degradation der BM verursachte auch der kraftinduzierte BM-Stress eine Störung der homöostatischen Brustdrüsen, die in einer Erhöhung der Invasionshäufigkeit resultierte.

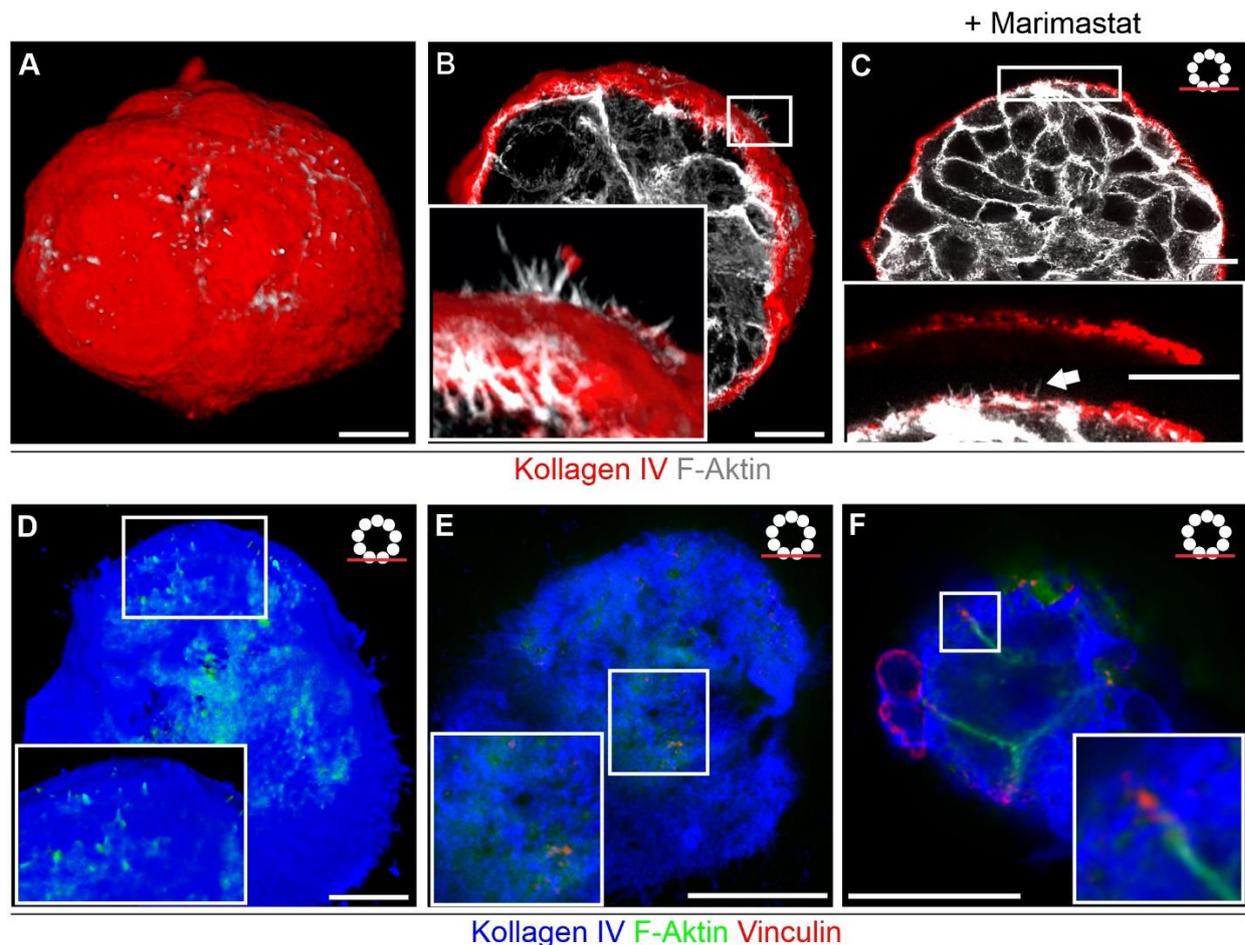


Abbildung 21: Bildung von BM durchspannenden Zellfortsätzen . Die Höhe des konfokal aufgenommenen Querschnitts ist durch die horizontale rote Linie im schematisch angedeuteten Azinus oben rechts angegeben (C-F). (A) MCF10A Azinus, rekonstruiert aus einem konfokalen Z-Bilderstapel, demonstriert die Penetration von einzelnen BM durchspannenden aktinbasierten Zellfortsätzen (grau) in einer physiologischen EHS-Matrix (hd-BM Azinus, 31 Tage alt). (B) Querschnitt und Vergrößerung (weiße Box) einer 3D Rekonstruktion eines MCF10A Azinus zur Visualisierung von Zellfortsätzen (24 h auf Glas, +EGF). (C) Visualisierung der Fortsatzbildung (weißer Pfeil) bei Azini mit Marimastat-Behandlung mittels 2D Querschnitt und der Vergrößerung (weiße Box) eines repräsentativen BM-Ausschnitts. (D) Rekonstruierter 3D Bilderstapel zum Nachweis von BM durchspannenden Zellfortsätzen (grün) an der Zell-BM-EZM Grenzfläche (hd-BM, 48 h auf Glas). Vergrößerung der Zellfortsätze in der weißen Box. (E und F) Vergrößerungen (weiße Box) von Zellfortsätzen an der Grenzfläche zur Visualisierung der Co-Lokalisierung von Vinculin in den Spitzen der Fortsätze. Maßstab = 20 μm . Verändert nach [33]. Die Bilder A und D-F stammen von Dr. Erik Noetzel-Reiss.

3.2 Analyse invasionsrelevanter zytoskelettaler Veränderungen bei Brustsphäroiden

In den Vorarbeiten zur Funktion der BM als physikalische Invasionsbarriere und dem Einfluss von Zellkraft abhängiger BM-Schwächung wurden sowohl kontraktile Kräfte als auch Zellfortsätze als invasionsfördernde Mechanismen beschrieben [33]. Noch nicht untersucht wurde, wie diese Effekte intrazellulär vermittelt werden. So bleibt unklar wie diese kontraktile Zellkräfte und Fortsatzkräfte entstehen und durch welche Regelkreise diese die Invasion fördern.

Obwohl Fortsätze (Filopodien und Invadopodien) mit dem Invasionsprozess in anderen Zellkulturmodellen assoziiert wurden (vgl. Abschnitt 1.7), ist die genaue Funktion dieser aktinbasierten Strukturen in Brustdrüsenepithelien noch nicht verstanden. Daher sollten im ersten Teil der Dissertation Zellfortsätze der MCF10A Azini unter Beachtung der beschriebenen pro-invasiven Stimuli der EGF-Stimulation, der EZM-Versteifung und der BM-Maturierung charakterisiert werden. Darauf aufbauend sollte die Azinus-BM-EZM Grenzfläche im Hinblick auf die zytoskelettalen Veränderungen, die zur Invasion beitragen, analysiert werden.

3.2.1 Onkogene EGFR-Signalwege und die EZM-Versteifung induzieren die Bildung BM durchspannender Mikrospikes

Die Widerstandsfähigkeit der BM von Brustazini gegen mechanische Reize erhöhte sich signifikant während der azinaren Entwicklung in 3D [37, 58]. Unabhängig von der damit korrelierenden Dicke der BM waren aktinbasierte Zellfortsätze sowohl in ld-BM als auch in hd-BM Azini vorhanden. Abbildung 22A demonstriert die Bildung von Zellfortsätzen der basalen Zellschicht in einem hd-BM Azinus, der sich in einer physiologischen EHS-Matrix befindet. Die konfokal aufgenommenen Querschnitte zeigen das Aktin-Zytoskelett umgeben von einer konstant gebildeten BM. Die aktinbasierten Zellfortsätze befanden sich innerhalb des Kollagen IV Signals der BM. Zur besseren Visualisierung und für die folgenden Analysen wurden die Azini auf eine harte Glasoberfläche transferiert und optional mit EGF behandelt. Weiterhin wurden die Filopodien-artigen Zellfortsätze (überwiegend kürzer als 2 μm) in dieser Arbeit als Mikrospikes (MS) definiert. Der Begriff MS wurde gewählt, da die Funktionen dieser kleinen aktinbasierten Strukturen nicht bekannt waren und somit keine Zuordnung zu beispielsweise Filopodien oder Invadopodien getroffen werden konnte (vgl. Abschnitt 1.7).

In Versuchen mit ld-BM Azini wurde die Bildungshäufigkeit von MS und die Verteilung der MS entlang der azinaren Zelloberfläche untersucht. Abbildung 22B verdeutlicht zahlreiche aktinbasierte Strukturen, die in Poren der BM lokalisiert sind. Die vielen Poren innerhalb dieses

kleinen exemplarischen BM-Ausschnittes deuteten höchstwahrscheinlich bereits eine hohe Anzahl an MS an. Mittels eines repräsentativ aufgenommenen Querschnitts eines Azinus konnten viele aktinbasierte MS nachgewiesen werden. Die Verteilung dieser BM durchspannenden MS erstreckte sich heterogen über die gesamte azinare Oberfläche (Abbildung 22C). Zudem konnten einzelne *Hotspots* mit einer lokalen Anreicherung von MS detektiert werden (Abbildung 22D) sowie einzelne längere MS mit einer Länge von bis zu 5 μm (Abbildung 22E).

Die Lebensdauer dieser in den extrazellulären Raum hineinreichenden lateralen MS betrug wenige Minuten. Anhand von Echtzeitaufnahmen lebender Azini konnte beobachtet werden, dass die Formation dieser MS ein dynamischer Prozess war und einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt. Exemplarisch ist in der Abbildung 22F der Lebenszyklus eines einzelnen MS von wenigen Minuten gezeigt.

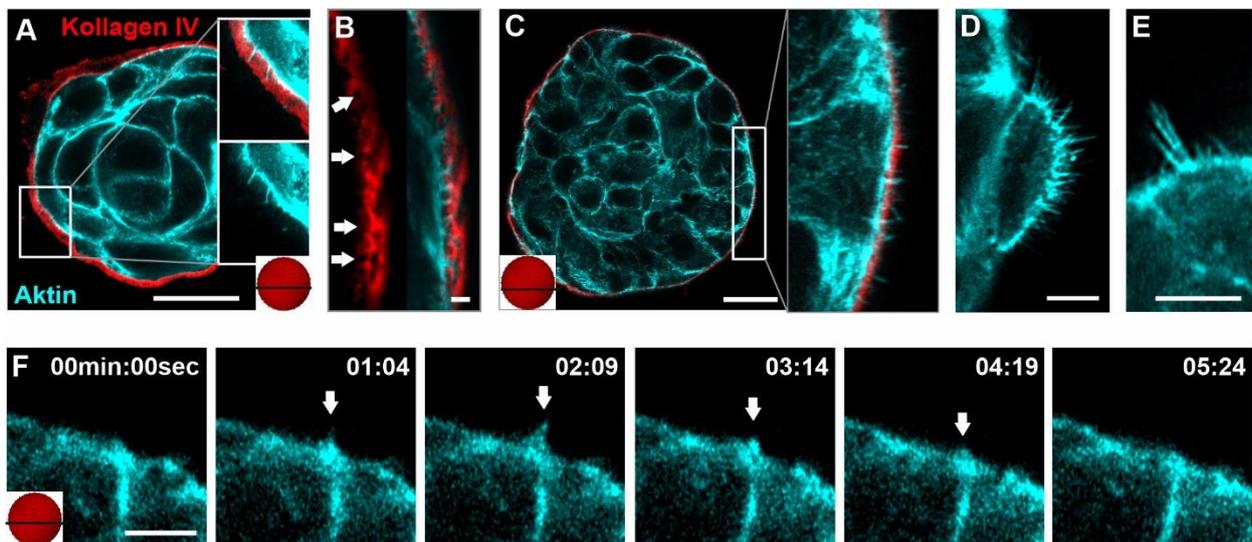


Abbildung 22: MCF10A Azini bilden dynamische BM durchdringende MS. Die Höhe des konfokal aufgenommenen Querschnitts ist durch den horizontalen schwarzen Balken im schematisch rot dargestellten Azinus angegeben (A,C,F). (A) Übersicht eines hd-BM Azinus mit BM durchdringenden Zellfortsätzen, der in einer EHS-Matrix eingebettet, fixiert und mittels IF (Immunfluoreszenz) gefärbt wurde. (B–E) Ld-BM MCF10A Azini wurden pro-invasiv stimuliert (24 h EGF-Behandlung, Glas), fixiert und mittels IF gefärbt. (B) Vergrößerung einer intakten BM zur Visualisierung der BM-Poren (weiße Pfeile) im Kollagen IV Netzwerk. (C) Die Verteilung der lateralen MS ist heterogen. (D) Vereinzelt liegen *Hotspots* mit einer lokalen Anreicherung von MS vor sowie (E) einzelne Bündel mit längeren MS. (F) Die Bilderserie eines MCF10A/RFP-LifeAct Azinus (EGF behandelt) zeigt die Lebensspanne eines lateralen aktinbasierten MS (weiße Pfeile). Rot = Kollagen IV; Cyan = Aktin. Maßstab: (A,C) = 20 μm ; (B,D–F) = 5 μm .

Im nächsten Schritt sollte die MS-Bildung in Abhängigkeit von der BM-Reifung, der EGF-Stimulation und der Adhäsionszeit auf einem tumorassoziierten Substrat quantifiziert werden. Dazu wurde zunächst für den Vergleich der Werte die Analysefläche der Azini definiert. Abbildung 23A stellt schematisch einen gesamten BM umhüllten Azinus mit heterogen verteilten lateralen MS dar. Die MS-Signale wurden über einen definierten Bereich bei jedem individuellen Azinus detektiert (gelbe Fläche, Abbildung 23B). Da die einzelnen Azini sich in Abhängigkeit von der BM-Reifung, der EGF-Stimulation und der Adhäsionszeit auf dem steifen Substrat in der Größe unterscheiden (Abbildung 23C), wurde die MS-Zahl pro BM-Umfang errechnet, um die Werte besser vergleichen zu können.

Diese Quantifizierung ergab einen signifikanten Anstieg der MS-Zahl durch eine EGF-Stimulation und über einen Zeitraum von 1 – 24 Stunden (Abbildung 23D). Hierbei zeigten sich nach einer Stunde (h) nur geringfügige Unterschiede bei der MS-Bildung. Ld-BM Azini wiesen durch die kurze einstündige Stimulation mit EGF einen signifikanten Anstieg der MS Zahl (1,8-fache Steigerung) im Vergleich zu den EGF unbehandelten ld-BM Azini auf. Zusätzlich besaßen EGF stimulierte ld-BM Azini ein höheres MS/BM-Umfang Verhältnis als EGF behandelte hd-BM Azini nach einer Stunde (Abbildung 23D). Eine EGF-Wirkung in Bezug auf die MS-Bildung konnte bei den hd-BM Azini nach einer Stunde nicht detektiert werden.

Dieser Effekt trat nach 24 h auf und wurde bei ld-BM Azini durch die Dauer der Stimulation verstärkt. Nach 24 h war die Anzahl der lateralen MS in ld- und hd-BM Azini im Vergleich zu den Gruppen nach einer Stunde signifikant erhöht (5,3-fache Steigerung). Der maximale MS/BM-Wert lag bei der ld-BM Gruppe (24 h) mit EGF vor: $0,17 \text{ MS}/\mu\text{m}$. Dies entsprach bei dieser Fraktion beispielsweise einem Median von 45 MS pro Schnittebene. Im Vergleich wiesen die oben beschriebenen hd-BM Azini nach einer Stunde auf Glas mit $0,02 \text{ MS}/\mu\text{m}$ und einem Median von vier MS pro Schnittebene den geringsten Wert auf.

Besonders der Vergleich der hd-BM Fraktionen nach 24 h demonstriert, dass EGF die Bildung von MS fördert (Abbildung 23D). Durch die 24-stündige EGF-Stimulation wurde die MS-Zahl bei hd-BM Azini um das 6,3-fache gesteigert. Außerdem hatte auch die Substratsteifigkeit einen Einfluss auf die MS-Bildung, da auch ohne EGF-Stimulation ein signifikanter Anstieg der MS-Formation bei ld-BM Azini vorlag (4,9-fache Steigerung). Im Gegensatz dazu beeinflusste die Substrathärte hd-BM Azini mit einer maturierten BM nicht (Abbildung 23D).

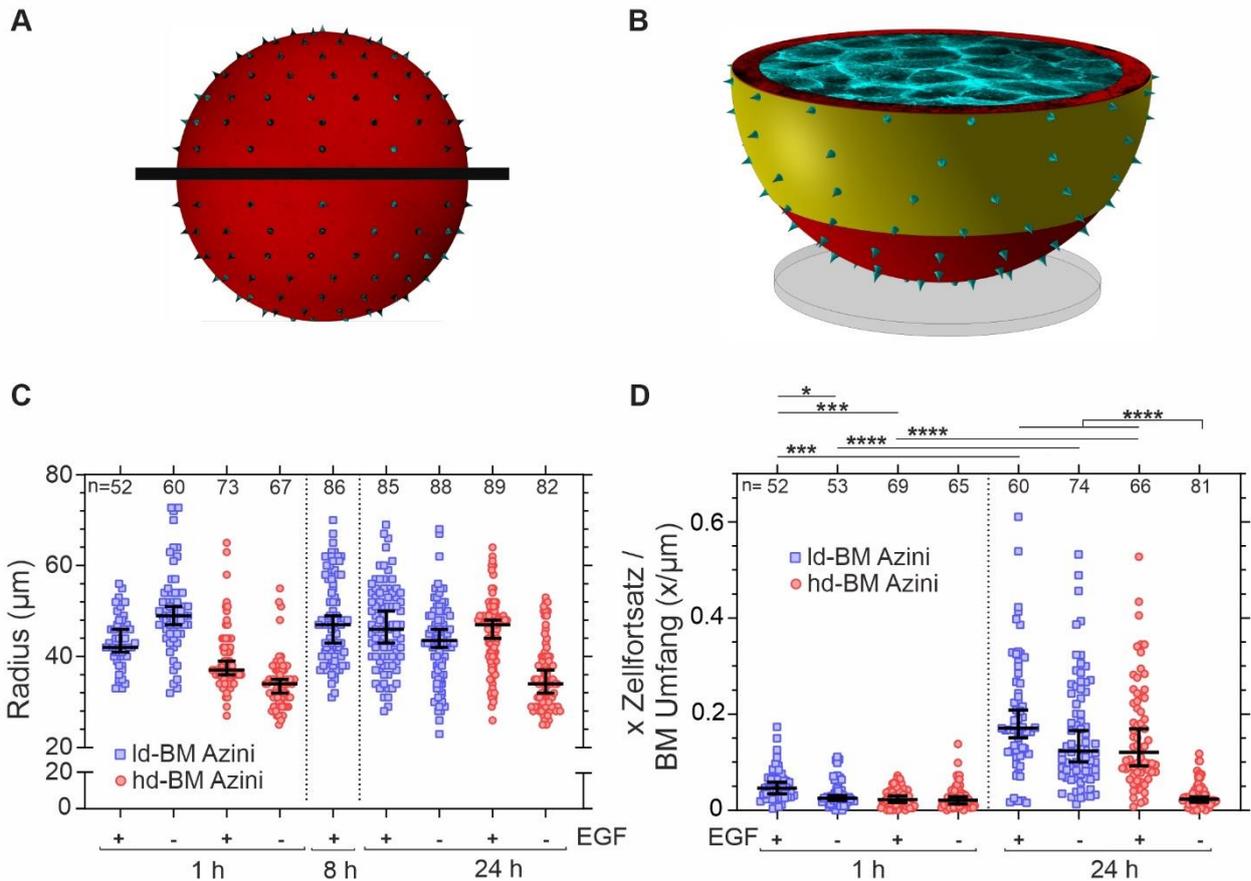


Abbildung 23: Steigerung der MS-Bildung durch eine tumorassoziierte Steifigkeit und EGF. (A,B): Schematische Darstellung eines Azinus mit lateralen MS. (A) Abgebildet ist ein ganzer Azinus mit eingezeichneter Äquatorialebene und (B) ein halber Azinus zur Illustration der Analysefläche für die folgende MS-Quantifizierung (gelbe Fläche). Diese beginnt 10 µm über dem Glas und endet an der äquatorialen Ebene, definiert als Querschnitt mit dem größten Durchmesser des Azinus. (C) Übersicht über die Radien jedes einzelnen konfokal aufgenommenen Azinus-Querschnitts in Abhängigkeit des BM-Status und onkogener EGF-Behandlung im Vergleich zwischen 1 und 24 h auf Glas. (D) Das Diagramm fasst die Anzahl an lateralen MS in Abhängigkeit des BM-Status und onkogener EGF-Behandlung über die Zeit zusammen. Die Anzahl der MS (x) wurde durch den individuellen BM-Umfang jedes einzelnen konfokal aufgenommenen Azinus-Querschnitts geteilt. Für die Quantifizierung (C,D) wurden die Azini fixiert und mittels IF gefärbt: Rot = Kollagen IV; Cyan = Aktin. Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Bilder von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Streudiagramm: Median mit 95% Konfidenzintervall.

3.2.2 Der Invasionsprozess verringert die laterale MS-Formation in Brustsphäroiden

Weiterhin wurde untersucht, ob die MS-Bildung durch die invasive Transition eines Azinus verändert wird. Der Invasionsprozess von MCF10A Azini ist schematisch in der Abbildung 24A dargestellt. Bei Azini, die aus der physiologischen EHS-Matrix auf ein steifes Glassubstrat transferiert und optional mit EGF behandelt werden, trat mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Invasion auf (Abbildung 18B). Eine lokale BM-Zerstörung ermöglichte die kollektive Transmigration invasiver Zellen an der Zell-BM-EZM Grenzfläche (Abbildung 24B). Dieser Prozess fand in der basalen Zellschicht des Azinus statt, die über die BM Kontakt zum Glas hat (schwarze Box in der Abbildung 24A). Invasive Zellen, die den azinaren Zellverbund verlassen hatten, wiesen an der Migrationsfront filopodiale Fortsätze auf, die deutlich länger als die bisher beschriebenen MS waren. Diese Filopodien-artigen Zellfortsätze sind ein charakteristisches Merkmal für epitheliale Zellen, die auf einem planaren Substrat migrieren (Abbildung 24C) [174].

Der direkte Vergleich der lateralen MS-Werte für nicht-invasive Azini (vgl. Abbildung 23D) im Vergleich zur MS-Anzahl zu bereits invasiven Azini zeigte, dass die basale Zellschicht des gesamten invasiven Azinus deutlich weniger laterale MS ausgebildet hat. Dieses Phänomen spiegelte sich in allen invasiven Gruppen unabhängig von der EGF-Behandlung oder dem BM-Maturierungsstatus wider. Im Median über alle Fraktionen wurde die Anzahl aktinbasierter MS bei invasiven Azini um das 2,7-fache reduziert (Abbildung 24D).

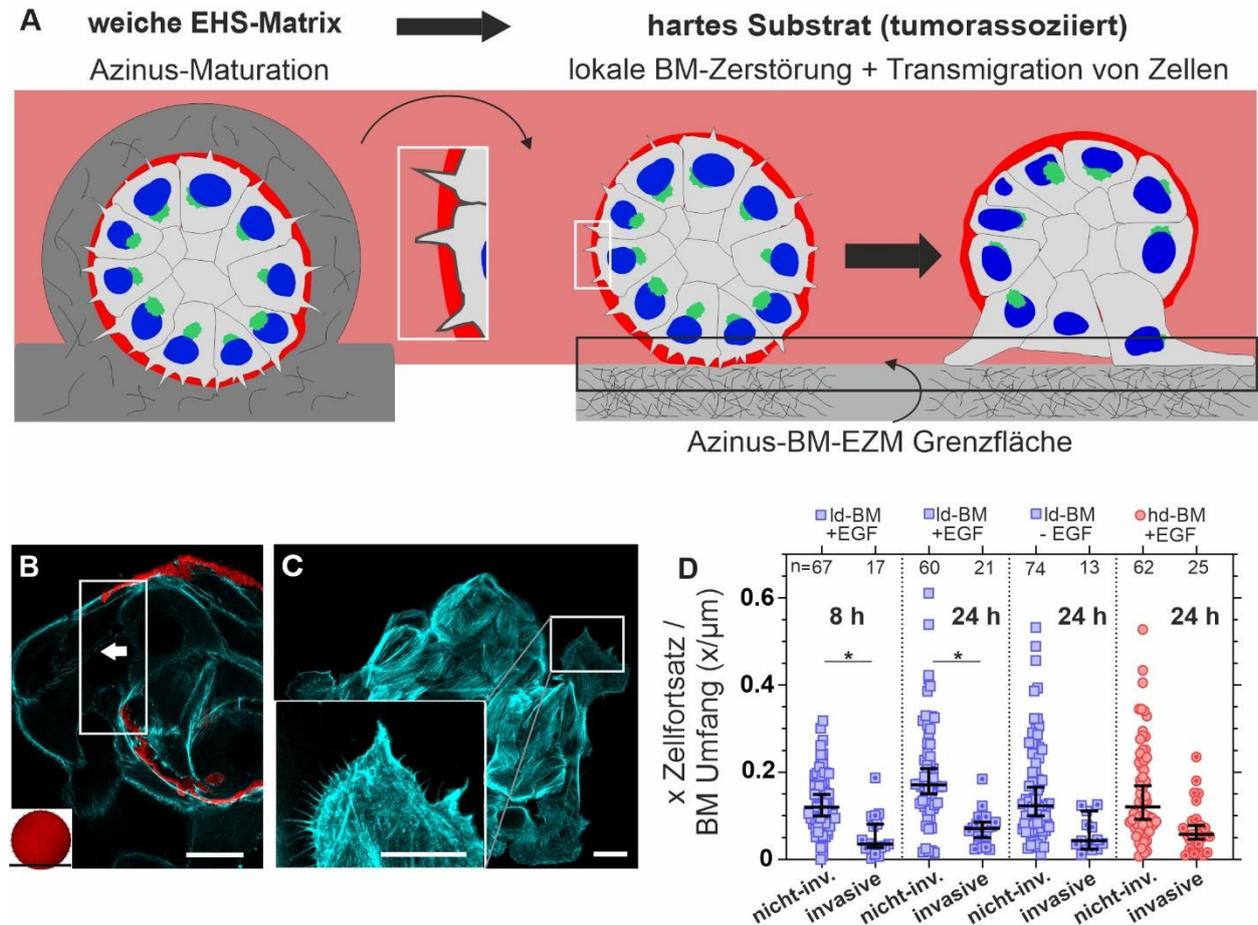


Abbildung 24: Invasive Azini weisen eine reduzierte Anzahl lateraler MS auf. (A) Grafische Darstellung der verwendeten Invasionsanalyse zur Visualisierung der invasiven Transition von gutartigen MCF10A Azini auf einem tumorassoziierten harten Substrat (schwarze Box: Bereich der Invasion an der Azinus-BM-Substrat Grenzfläche). (B) Eine repräsentative konfokale Aufnahme eines invasiven Azinus mit lokaler BM-Zerstörung (weißer Pfeil) und transmigrierenden Zellen (die Pfeilrichtung induziert die Migrationsrichtung der Zellen). Die Höhe des Azinus-Querschnitts ist durch den horizontalen schwarzen Balken im schematisch rot dargestellten Azinus angegeben. (C) Im Kollektiv ausgewachsene Zellen wiesen eine hohe Dichte an Filopodien-artigen Zellfortsätzen an der Migrationsfront auf. (D) Vergleich der lateralen MS-Formation zwischen invasiven und nicht-invasiven Azini Fraktionen (vgl. Abbildung 23), abhängig von pro-invasiven Stimuli (EGF-Behandlung, Glas). Für die Quantifizierung (D) wurden die Azini fixiert und mittels IF gefärbt: Rot = Kollagen IV; Cyan = Aktin. Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Bilder von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Streudiagramm: Median mit 95% Konfidenzintervall. Maßstab = 20 µm.

3.2.3 Invasive Azini wechseln von einem nicht proteolytischen zu einem proteolytisch-abhängigem Invasionsmechanismus

Die vorangegangenen Versuche zeigten, dass die laterale MS-Bildung an der basalen Zellschicht durch pro-invasive Stimuli mit EGF und einer harten tumorähnlichen Substratsteifigkeit induziert werden konnte. Als nächstes wurde untersucht, ob die Aktin-MS den Invasionsprozess durch eine proteolytische BM-Schwächung unterstützen. Dazu wurden Invadopodien-Markerproteine (MT1- [63]

MMP, Kortaktin und Tks5) gefärbt, da Invadopodien mit dem proteolytischen Abbau der BM und der umgebenden EZM assoziiert sind [135]. So sollte verstanden werden, ob Aktin-MS Eigenschaften von Invadopodien aufweisen oder ob sich (Vorläufer)-MS möglicherweise zu Invadopodien entwickeln können.

Im ersten Schritt wurden längere Zellfortsätze untersucht, um eine mögliche Co-Lokalisierung der aktinbasierten Strukturen mit den Invadopodien-Markerproteinen zu identifizieren. Dazu wurden Azini invasiv stimuliert und invasive Zellen mit elongierten Zellfortsätzen untersucht. Diese Zellfortsätze wiesen teilweise eine Länge von bis zu 10 μm auf. Diese Filopodien-artigen elongierten Zellfortsätze in invasiven Zellen wiesen eine deutliche Co-Lokalisierung von Aktin und den drei Markerproteinen auf (Abbildung 25). Kortaktin und Tks5 sind wichtige Proteine für die Initiation der Invadopodienbildung und waren überwiegend homogen in den Filopodien-artigen Fortsätzen vorhanden. MT1-MMP war punktuell auf den Fortsätzen vorhanden.

Basierend auf diesen Ergebnissen für invasive Zellen wurde im Folgenden überprüft, ob die deutlich kürzeren lateralen MS der Brustazini eine ähnliche Co-Lokalisierung aufwiesen.

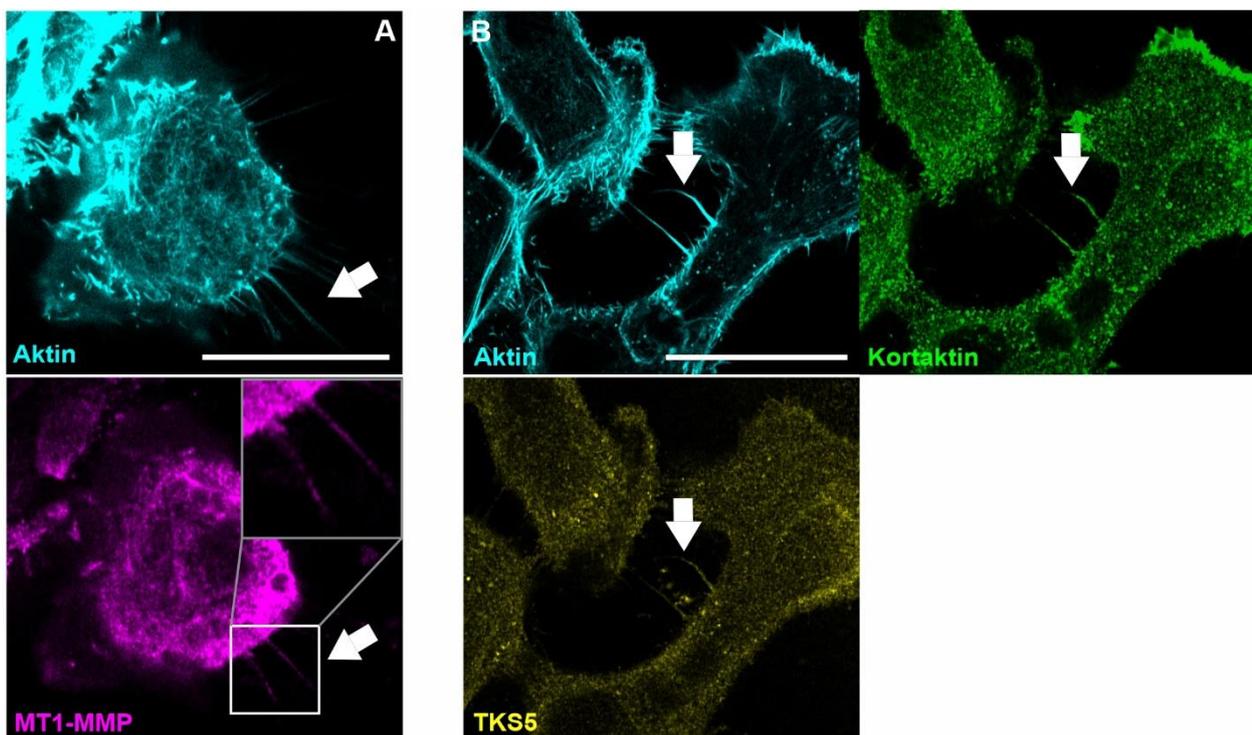


Abbildung 25: Zelluläre Lokalisierung von Invadopodien-Markern in invasiven Zellen. (A,B) MCF10A Azini wurden pro-invasiv stimuliert (24 h EGF-Behandlung, Glas), fixiert und mittels IF gefärbt. Gezeigt sind Einzelzellen, die bereits aus einem Azinus durch die BM migriert sind. (A) Die einzelnen MCF10A Zellen zeigen auf planarem Substrat lange aktinbasierte Filopodien-artige Zellfortsätze, die positiv für MT1-MMP sind sowie (B) für Kortaktin und TKS5 (jeweils weiße Pfeile). Für MT1-MMP ist beispielhaft eine Vergrößerung eines Fortsatzes angegeben. Cyan = Aktin; Grün = Kortaktin; Magenta = MT1-MMP; Gelb = TKS5. Maßstab = 20 μm .

Für die Invadopodienfärbungen bei Brustsphäroiden wurden Azini ausgewählt, die unter den invasivsten Bedingungen behandelt wurden (24 h EGF auf einem steifen Glassubstrat). Grundsätzlich waren alle drei Invadopodien-Markerproteine außen in der basalen Zellschicht lokalisiert. Das Signal für Kortaktin, Tks5 und MT1-MMP war eindeutig in der basalen Zellmembran der basalen Zellschicht an der Zell-BM Grenzfläche zu erkennen (Abbildung 26A und B). Dieses Signal erwies sich als spezifische Invadopodien-Markerfärbung, da eine Kontrolle, bei der nur der verwendete sekundäre Antikörper unter den gleichen Einstellungen verwendet wurde, kein Signal erzeugte (Abbildung 26C).

Abgesehen von dem Signal in der basalen Zellmembran der Azini konnten vereinzelt MS identifiziert werden, die eine Co-Lokalisierung von Aktin mit MT1-MMP (Abbildung 26D), Tks5 (Abbildung 26E) oder Kortaktin (Abbildung 26F) aufwiesen. Trotz invasiver Stimulation lag diese Co-Lokalisierung nur vereinzelt vor. Dies ist beispielhaft anhand der Abbildung 26G für MT1-MMP illustriert. In einem Bereich mit mehreren lateralen aktinbasierten MS war kein MT1-MMP Signal in den MS zu detektieren (Abbildung 26G).

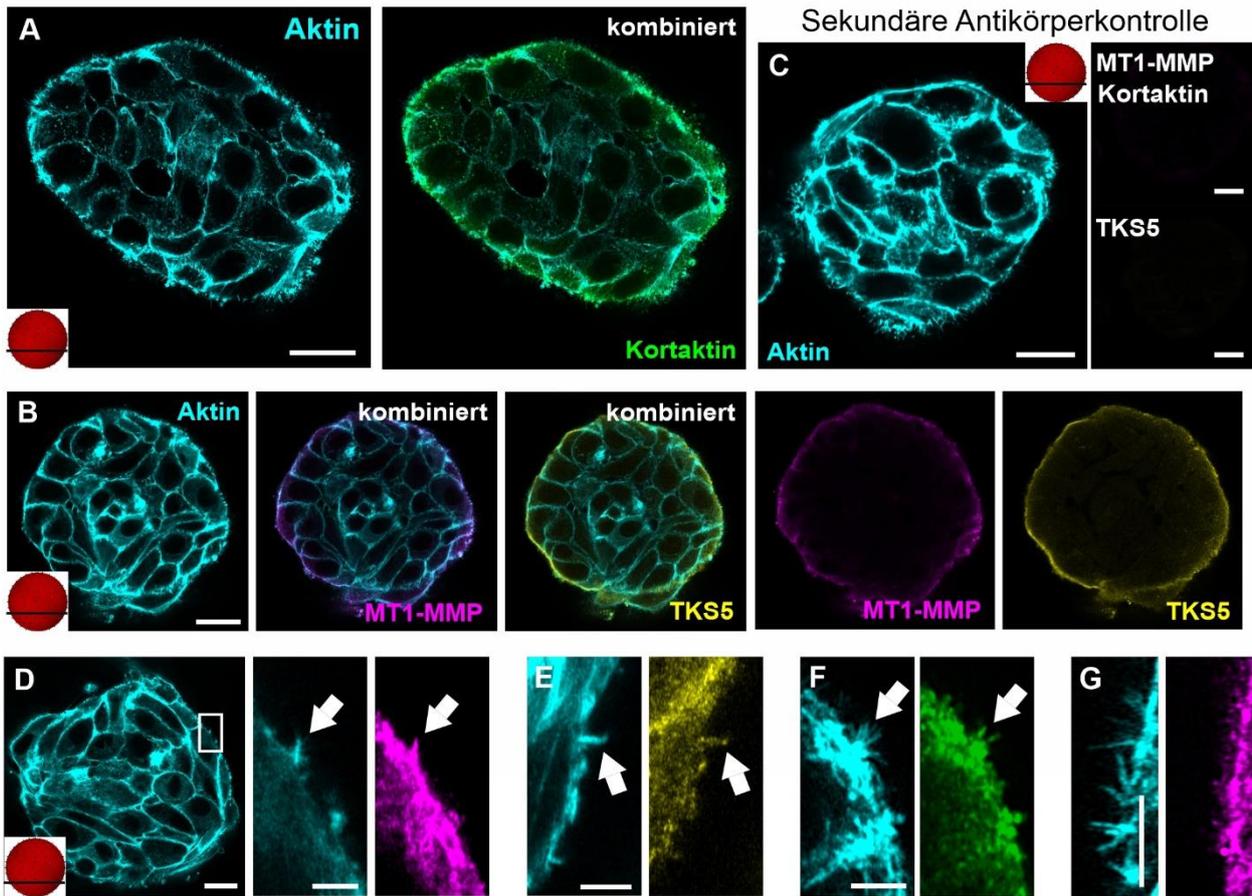


Abbildung 26: Der Nachweis von Invadopodien-Markerproteinen in Brustsphäroiden. Die Höhe des konfokal aufgenommenen Querschnitts ist durch den horizontalen schwarzen Balken im schematisch rot dargestellten Azinus angegeben (A-D). (A–G) MCF10A Azini wurden pro-invasiv stimuliert (24 h EGF-Behandlung, Glas), fixiert und mittels IF gefärbt. (A) Der Aktin-Kortex co-lokalisierte mit den Invadopodien-Markerproteinen Korkaktin, (B) MT1-MMP und TKS5. Die Einzelkanalbilder von MT1-MMP und TKS5 verdeutlichten das kortikale Ringsignal der Marker in Azini. (C) Eine sekundäre Antikörperkontrolle für die Invadopodienfärbung wies kein unspezifisches Signal auf. (D) Visualisierung von einzelnen lateralen MS co-lokalisiert mit MT1-MMP, (E) TKS5 und (F) Korkaktin (jeweils weiße Pfeile). (G). Ein Bereich mit hoher MS-Dichte, aber fehlender Aktin und MT1-MMP Co-Lokalisierung. Cyan = Aktin; Grün = Korkaktin; Magenta = MT1-MMP; Gelb = TKS5. Maßstab: (A-D) = 20 µm; Vergrößerungen in (D) und (E-G) = 5 µm.

Besonders MT1-MMP ist mit der proteolytischen Degradation der BM assoziiert. Folglich wurde analysiert, wie MT1-MMP an der Azinus-BM-Substrat Grenzfläche (der Bereich, in dem die Invasion stattfindet) lokalisiert war, um einen möglichen Bezug zur Invasion herzustellen. Auch im Bereich der Azinus-BM-EZM Grenzfläche zeigte sich das oben beschriebene Signal in der basalen Zellmembran der basalen Zellschicht (Abbildung 27A und B). Einzelne Zellen innerhalb des azinaren Verbundes wiesen hier im Vergleich zu der gesamten Grenzfläche ein stärkeres Signal auf. Teilweise befand sich dieses Signal nicht nur an der basalen Zellmembran, sondern zudem in einzelnen basalen Zellen in kortikalen Regionen im Bereich der Zell-Zell-Kontakte (Abbildung 27B, weiße Pfeile). Im Vergleich zu dem schwachen Signal im basalen Zell-Kortex

wiesen invasive Zellen zudem ein deutlich stärkeres Signal an der Migrationsfront auf. Dies zeigte sich bereits anhand der ersten invasiven Zelle, die durch die BM transmigrierte (Abbildung 27C), aber auch mit fortschreitender Invasion lokalisierte ein starkes Signal von MT1-MMP an der Migrationsfront der kollektiv auswachsenden Zellen (Abbildung 27D).

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass nicht-invasive Brustazini ein geringes basales Level von MT1-MMP und anderen (Tks5, Kortaktin) Invadopodien-Markerproteinen exprimieren, welche nur vereinzelt in den kurzen lateralen Aktin-MS vorhanden waren.

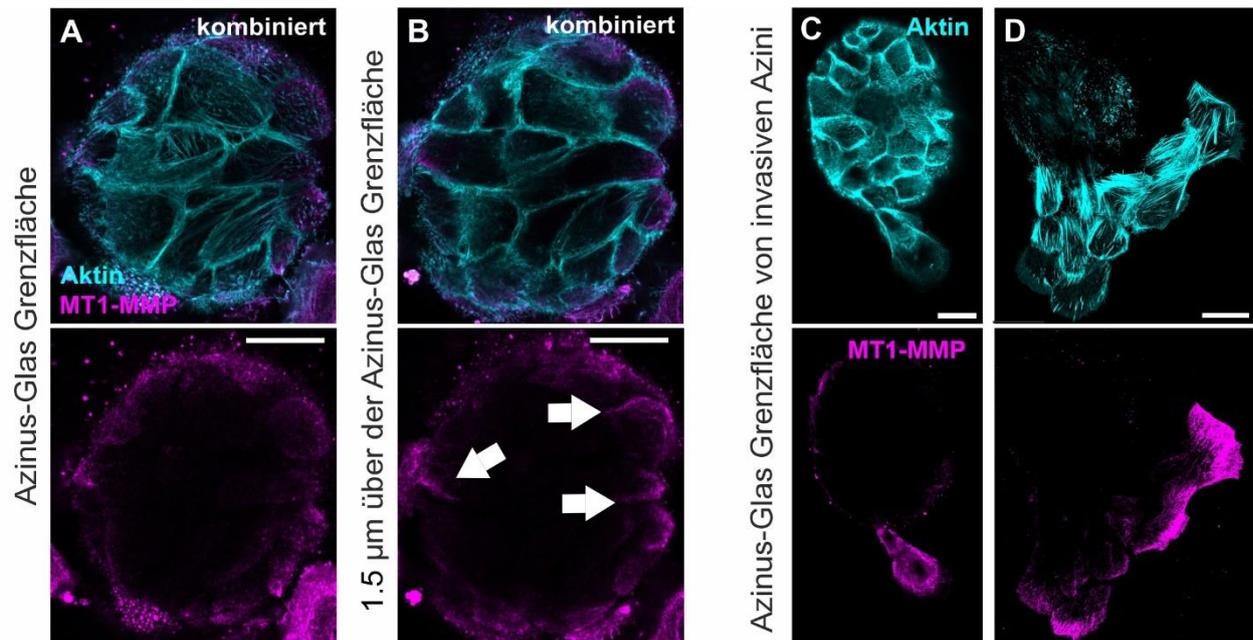


Abbildung 27: Lokalisierung von MMP-Proteinen an der Azinus-BM-EZM Grenzfläche. (A–D) Querschnitte von fixierten MCF10A Azini, die mittels IF gefärbt wurden. (A,B) MT1-MMP Proteinlokalisierung (weiße Pfeile) in azinaren Zellen an den kortikalen Aktin-Strukturen an der Azinus-BM-EZM(Glas) Grenzfläche. (C) Repräsentatives Bild eines invasiven Azinus zeigt MT1-MMP an der Migrationsfront von migrierenden Zellen. (D) Mit fortschreitender Invasion und kollektiv auswachsenden Zellen lokalisiert MT1-MMP hauptsächlich an der Migrationsfront. Cyan = Aktin; Magenta = MT1-MMP. Maßstab = 20 µm.

3.3 Untersuchung der Azinus-Interaktion mit dem Azinus-BM-EZM Kontaktbereich

Eine weitere interessante Beobachtung war die Bildung faserartiger und punktueller Aktin-Strukturen an der Azinus-BM-EZM Grenzfläche (z.B. in Abbildung 27A). Diese Strukturen unterschieden sich eindeutig von dem kortikalen Aktin der Zellen, das nicht an der Kontaktfläche zur EZM lokalisiert war. Daher wurden diese zytoskelettalen Strukturen an der Azinus-BM-EZM Grenzfläche in den folgenden Analysen genauer untersucht. Bei dieser Grenzfläche handelte es sich um den Bereich, in dem die Zellen und die BM Kontakt zum unterliegenden Substrat haben bzw. die Steifigkeit des Substrates mechanobiologisch wahrnehmen. Im Weiteren wurde dieser Bereich, wo zudem die Invasion von Zellen auftrat, als Azinus-BM-EZM Kontaktfläche bezeichnet.

3.3.1 Brustazini verändern ihre zytoskelettale Organisation an der EZM-Kontaktfläche

Bevor untersucht werden konnte, ob die Aktin-Strukturen an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche an der Invasion beteiligt sind, sollten die identifizierten aktinbasierten Strukturen charakterisiert werden. Dazu wurde ein Analysebereich ausgewählt, der die gesamte Kontaktfläche der Azini mit allen Aktin-Strukturen einschließt (gelbe Fläche, Abbildung 28A). Im Gegensatz zu den vorangegangenen Analysen wurden dementsprechend nur Z-Stapel der untersten Azinusebene aufgenommen, um die gesamte Kontaktfläche zu visualisieren. Die beobachteten punktförmigen Aktin-Strukturen wurden nachfolgend ebenfalls als MS definiert (Abbildung 28B). In der Abbildung 28C wurden sowohl die punktförmigen Aktin-Strukturen als auch die faserartigen Strukturen im basalen Kortex der untersten Zellschicht, die Kontakt zur BM und dem Substrat hatte, nachgewiesen. Abseits der Ebene der basalen Zellmembran innerhalb des Azinus wurden nur die Zellgrenzen der azinaren Zellen ersichtlich (Abbildung 28C).

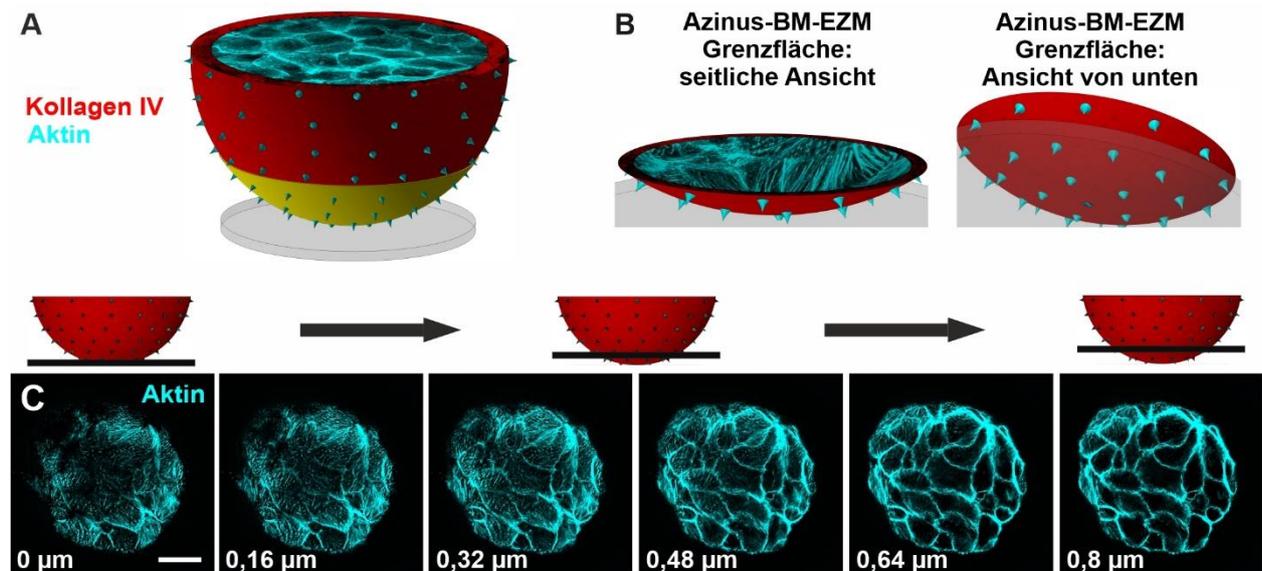


Abbildung 28: Aktin-Strukturen an der Azinus-BM-EZM Grenzfläche. (A) Die schematische Darstellung illustriert die relevante Fläche (gelber Bereich) für die folgenden Analysen. (B) Detaillierte graphische Betrachtung der Azinus-BM-EZM Grenzfläche zur räumlichen Visualisierung von aktinbasierten MS und SF (Stressfasern). (C) Die konfokale Bilderserie zeigt die basale Zellschicht eines Azinus (1 h -EGF, Glas) an der Azinus-BM-EZM Grenzfläche. Cyan = Aktin. Maßstab = 20 µm.

Für diese Arbeit wurden zwei Aktin-Strukturen als verschiedene Zytoskelett-Phänotypen an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche identifiziert: Erstens, Zellen mit Aktin-Mikrospikes (MS-Zellen), die eine Vielzahl an punktförmigen Aktin-Strukturen aufweisen (Abbildung 29A, obere Box). Zweitens, Aktin-Stressfaser-Zellen (SF-Zellen), die ventral angeordneten Fasern parallel zum Substrat aufwiesen (Abbildung 29A, untere Box).

Interessanterweise veränderte sich der Anteil der MS- und SF-Zellen innerhalb der azinaren Kontaktfläche über die Zeit. So dominierten nach einer Stunde Adhäsionszeit auf Glas Zellen mit MS, während nach 24 h überwiegend SF-Zellen an der Kontaktfläche des Azinus vorzufinden waren. Im Detail waren nach einer Stunde im Median 62 % bzw. 68 % MS-Zellen und nach 24 h 68 % bzw. 63 % SF-Zellen vorhanden (jeweils -EGF bzw. +EGF) (Abbildung 29B). Dieser Wechsel von MS- zu SF-Zellen über die Zeit wurde damit nicht signifikant von einer zusätzlichen EGF-Behandlung beeinflusst.

Zusätzlich reduzierte sich bei den analysierten Azini innerhalb von 24 h die Anzahl der Zellen an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche um durchschnittlich 18 %. Nach einer Stunde wurden im Median 20 Zellen (36 untersuchte Azini) an der Kontaktfläche detektiert, wohingegen nach 24 h im Median 14 Zellen (56 untersuchte Azini) vorhanden waren. Gleichzeitig zeigte sich, dass eine Vergrößerung der Zellfläche von SF-Zellen auftrat (Abbildung 29C). Nach einer Stunde war eine

geringe Vergrößerung der SF-Zellen (im Median 1,3-fach) von EGF abhängig. Nach 24 h hingegen zeigte sich der Effekt der Zellflächenvergrößerung auch unabhängig von der EGF-Behandlung. In beiden Fällen stieg die SF-Zellfläche um das ca. 1,7-fache an. Dieser Unterschied in der MS- bzw. SF-Anzahl und der SF-Zellflächenvergrößerung in Abhängigkeit von der pro-invasiven Stimulation nach 24 h wurde exemplarisch in der Abbildung 29D verdeutlicht.

Abgesehen von dem phänotypischen Wechsel von MS- zu SF-Zellen traten auch Veränderungen innerhalb der beiden gefundenen Zellfraktionen auf. So nahm die Dichte der MS innerhalb der MS-Zellen über die Zeit tendenziell zu. Nach einer Stunde waren im Median 11 % bzw. 12 % der Zelle mit MS bedeckt, nach 24 h ohne EGF waren es 14 %. Eine signifikante Verdichtung der MS wurde maßgeblich durch die EGF-Behandlung verursacht, da in dieser Fraktion ein Bedeckungsgrad von 18 % vorlag (Abbildung 29E). EGF behandelte Zellen zeigten außerdem einen erhöhten Bedeckungsgrad mit SF innerhalb der SF-Zellen über die Zeit. Der Bedeckungsgrad durch SF stieg im Median von 15 % auf 20 % (Abbildung 29F).

Zusammenfassend konnte mittels dieser Analysen gezeigt werden, dass sich das Aktin-Zytoskelett unter dem Einfluss von tumorigenen Einflüssen verändert. Durch die Kultivierung auf einem steifen Substrat und die Stimulation mit EGF werden vermehrt SF-Zellen gebildet. Basierend auf den Ergebnissen konnte ein Prozess für die zytoskelettalen Änderungen an der basalen Kontaktfläche der Brustsphäroide erarbeitet werden. Dieser Prozess ist in der Abbildung 30 schematisch illustriert. Diese zeigt die Veränderungen an der gesamten azinaren Kontaktfläche und die Veränderung in einer einzelnen Zelle. Bezogen auf die gesamte Kontaktfläche der basalen Zellschicht wird der Wechsel von MS- zu SF-Zellen verdeutlicht. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme der EZM adhärenen Zellfläche von SF-Zellen und einer gleichzeitigen Reduzierung der Gesamtzellzahl (Abbildung 30).

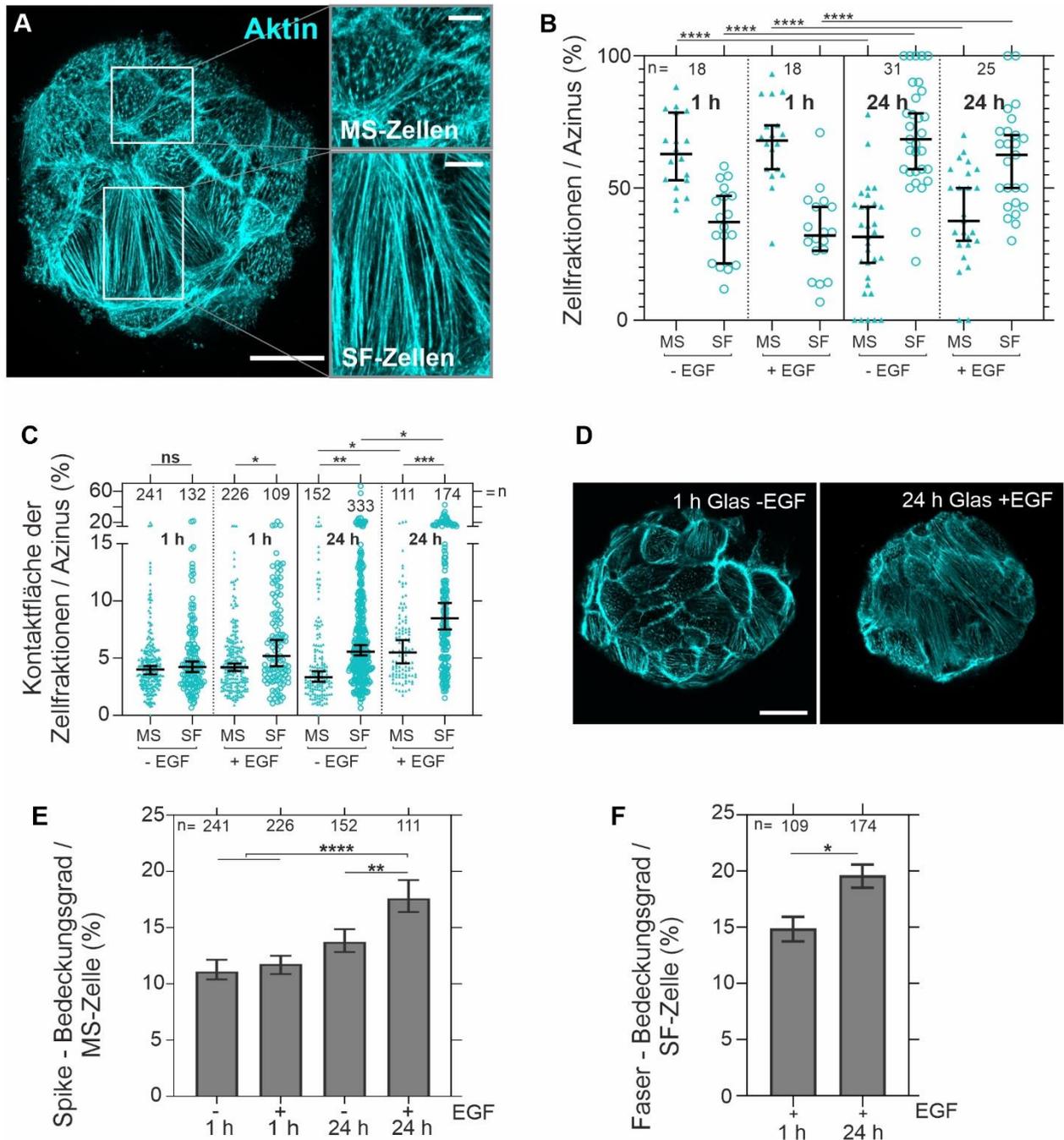


Abbildung 29: Eine tumorassoziierte Mikroumgebung fördert die Umbildung von Aktin-Strukturen an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche. (A) Die repräsentative konfokale Aufnahme eines Azinus (1 h -EGF, Glas) demonstriert unterschiedliche Aktin-Strukturen an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche, Zellen mit MS (oberer weiße Box) und mit SF (untere weiße Box). (B) Quantifizierung der MS- und SF-Zellfraktionen an der gesamten Azinus-BM-EZM Kontaktfläche (basale Zellschicht eines Azinus, gezeigt in A) in Abhängigkeit der Substratsteifigkeit (Glas) und der EGF-Behandlung. Die Zellfraktionen (%) wurden mittels Division der MS- und SF-Zellen durch die Gesamtzellzahl der basalen Zellen jedes einzelnen analysierten Azinus an der Kontaktfläche errechnet (n = Anzahl der Azini). (C) Vergleich der Zellgröße von MS- und SF-Zellen an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche in Abhängigkeit der Substrathärte und der Dauer der EGF-Behandlung (n = Anzahl der analysierten Einzelzellen / Zellfraktionen der untersuchten Azini aus B). (D) Beispielbilder eines Azinus (1 h -EGF, Glas) im Vergleich zu einem pro-invasiv stimulierten Azinus (24 h +EGF, Glas) zur Verdeutlichung des Wechsels von MS- zu SF-Zellen. (E) Das Balkendiagramm zeigt den MS-Bedeckungsgrad in MS-Zellen

3.3 Untersuchung der Azinus-Interaktion mit dem Azinus-BM-EZM Kontaktbereich

sowie (F) den SF-Bedeckungsgrad in SF-Zellen, abhängig von der EGF-Behandlung und Adhäsionsdauer auf Glas). Für die Quantifizierung (B,C,E,F) wurden die Azini fixiert und mittels IF gefärbt: Cyan = Aktin. Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Bilder von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Streu- und Balkendiagramm: Median mit 95% Konfidenzintervall. Maßstab: (A,D) = 20 μm ; Vergrößerungen in (A) = 5 μm .

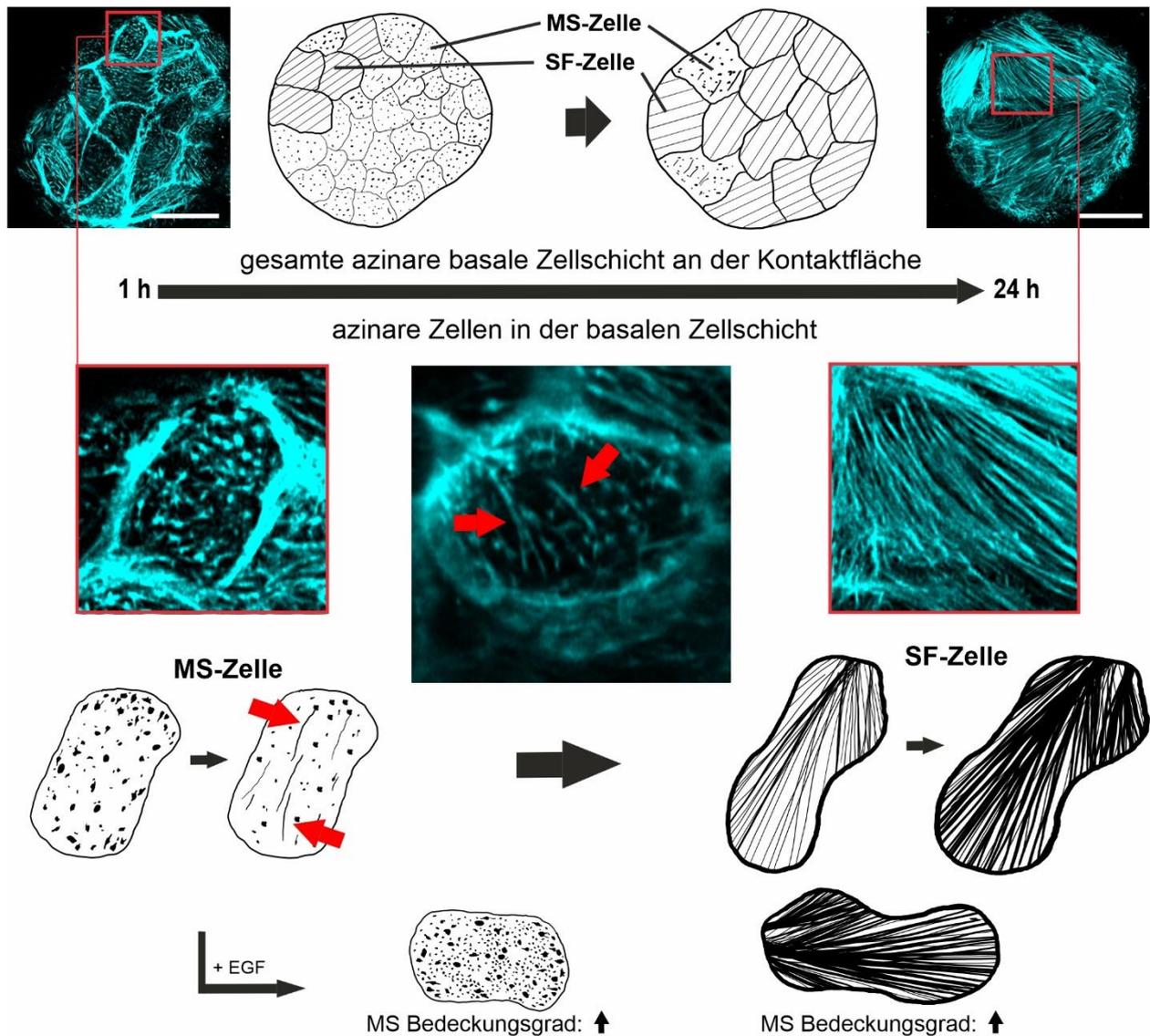


Abbildung 30: Schematische Zusammenfassung der zytoskelettalen Veränderungen in der basalen Zellschicht. Das Schema, in Kombination mit konfokalen Mikroskopie-Aufnahmen, illustriert den Wechsel von MS- zu SF-Zellen an der gesamten basalen Azinus-BM-EZM Kontaktfläche (oben). Detailliert wird dies anhand der Betrachtung einer Zelle verdeutlicht (unten). Dies demonstriert zudem die SF-Bildung (rote Pfeile) und den Einfluss von EGF auf den Bedeckungsgrad der MS und SF. Cyan = Aktin. Maßstab = 20 μm .

3.3.2 Basale Zellen interagieren über Aktin-Mikrospikes und Stressfasern mit der BM

Nach der Identifizierung von MS- und SF-Zellen stellte sich die Frage, inwiefern diese Strukturen mit der BM interagieren, um eine mögliche invasionsfördernde Wirkung dieser Aktin-Strukturen verstehen können. In Bereichen des Azinus, die nicht auf der EZM aufliegen, konnte beobachtet werden, dass MS die BM durchdringen und in den extrazellulären Raum hineinragen. Die Penetration der BM wurde auch für die MS an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche angenommen (vgl. Abschnitt 3.3.1). Über die orthogonale Ansicht auf Querschnitte der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche konnte diese Annahme von BM durchspannenden Aktin-MS bestätigt werden (Abbildung 31A, rechte Box). Innerhalb des Bereiches der rechten Box wurden eine Vielzahl an MS nachgewiesen, die sich innerhalb der Kollagen IV Schicht der BM befinden. Diese MS durchdrangen teilweise das gesamte Kollagen IV Netzwerk und erreichten das unterliegende harte Glassubstrat (Abbildung 31B, weiße Pfeile).

Zusätzlich lagen auch Bereiche vor, in denen das Aktin-Signal klar oberhalb der BM vorzufinden war, scheinbar ohne eine Interkalation von Aktin in der BM (Abbildung 31A, linke Box). Die Aktin-Strukturen befanden sich parallel zum Substrat und der BM ohne diese zu durchdringen.

Auffällig war, dass die BM in den Bereichen von Zellen mit MS (Abbildung 31C, obere Box) deutlich poröser erschien als in den Bereichen wo SF-Zellen detektiert wurden (Abbildung 31C, untere Box). Die Häufigkeit von Poren in der BM war deutlich erhöht in Bereichen von MS-Zellen. Hierzu passend wurden die Areale, in denen die BM kontinuierlich von Aktin penetriert wurde, MS-Zellen zugeordnet. Dazu wurde beispielhaft ein Azinus, der eine Stunde ohne EGF auf Glas kultiviert wurde und somit fast nur MS-Zellen aufwies, detailliert betrachtet (Abbildung 31D). Hier wurden ausschließlich Bereiche gefunden, in denen MS mit der BM interkalierten (Abbildung 31E; vgl. Abbildung 31A, rechte Box). Im Gegensatz dazu lag im Bereich der Aktin-SF bei einem Azinus, der 24 h mit EGF auf Glas kultiviert wurde, keine regelmäßige Penetration der BM vor (Abbildung 31F und G). Dennoch ließ die Co-Lokalisation von Aktin und Kollagen IV (gelbes Signal) vermuten, dass auch SF-Zellen mit der BM interagieren und aufgrund der räumlichen Nähe Wechselwirkungen vorliegen könnten (Abbildung 31H). Eine deutliche BM-Penetration in dem Bereich von SF-Zellen war an den Enden der SF zu erkennen, hier beispielhaft dargestellt in der weißen Box der Abbildung 31H (Ende der SF aus Abbildung 31F).

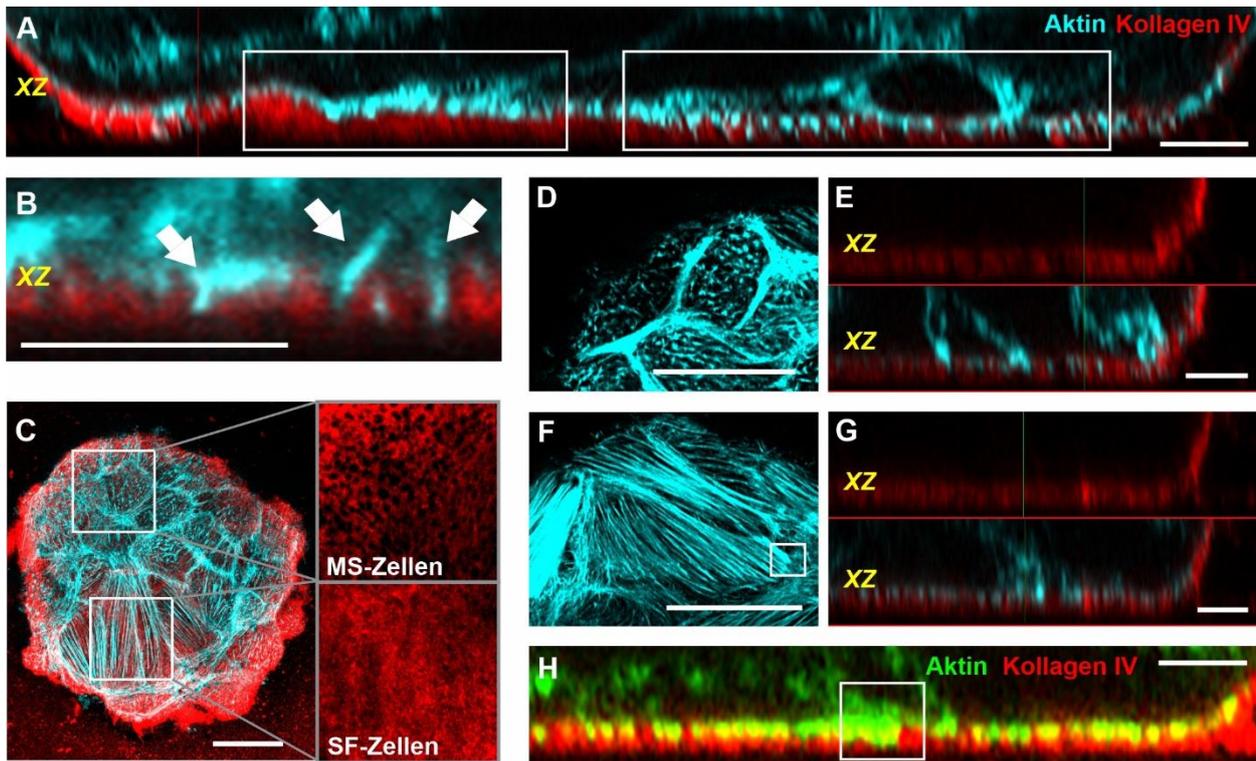


Abbildung 31: Das Aktin-Zytoskelett azinärer Zellen co-lokalisiert mit der BM. (A-H) MCF10A Azini wurden fixiert und mittels IF gefärbt. (A) Die orthogonale Ansicht der basalen Zellschicht an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche zeigt die unterschiedliche Wechselwirkung von Aktin und der BM. Linke Box: F-Aktin ist oberhalb der BM separiert lokalisiert; rechte Box: F-Aktin durchdringt die BM. (B) Die Vergrößerung illustriert BM durchdringende MS (weiße Pfeile) einer MS-Zelle. (C) Das Übersichtsbild der Azinus-BM-EZM Grenzfläche (Aktin-Kanal aus Abbildung 29A) demonstriert eine unterschiedliche BM-Porosität unter MS-Zellen (obere Box) und SF-Zellen (untere Box). (D) Azinus mit MS-Zellen (1 h – EGF, Glas). (E) Die orthogonale Ansicht einer MS-Zelle zeigt die Penetration der BM durch MS. (F) Azinus mit SF-Zellen (24 h + EGF, Glas). Die weiße Box signalisiert das Ende von SF. (G) Die orthogonale Ansicht einer SF-Zelle zeigt das Aktin-Signal der SF oberhalb der BM. (H) Das BM penetrierende Aktin-Signal befindet sich in SF-Zellen nur an den Enden der SF (weiße Box in F). Rot = Kollagen IV; Cyan = Aktin (in H = Grün). Maßstab: (C,D,F) = 20 µm, (A,B,E,G,H) = 5 µm.

3.3.3 Azinare Zellen bilden kraftübertragende Fokaladhäsionen zur BM und der EZM aus

Bisher wurden innerhalb der basalen Zellschicht an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche MS- und SF-Zellen identifiziert, die mit der BM interagierten. Die BM wurde kontinuierlich von Aktin-MS und an den Enden der SF penetriert. Dies könnte sich auch auf die Integrität der BM auswirken. Nachfolgend sollte daher untersucht werden, wie die Interaktion der Aktin-Strukturen mit der BM eine mögliche BM-Schwächung unterstützt und dadurch den Invasionsprozess fördern könnte. Dazu wurde analysiert, ob die Aktin-Strukturen auch funktionell mit der BM oder der umliegenden EZM verbunden sind.

Um eine mögliche mechanosensorische Funktion der zuvor identifizierten FA genauer zu analysieren, wurde in einem ersten Schritt untersucht, wie invasive Zellen an die Oberfläche eines planaren Substrats gebunden sind. Für migrierende Einzelzellen ist die Bildung von FA an den Enden von SF ausführlich beschrieben [175]. Dies wurde ebenfalls für die in dieser Arbeit verwendeten MCF10A Zellen gezeigt. Dazu wurden Azini invasiv stimuliert und nur die invasiven Zellen untersucht. Als FA-Marker wurde Vinculin gewählt. Wie in der Literatur beschrieben, konnten auch in dieser Arbeit FA an der Migrationsfront der migrierenden Zellen nachgewiesen werden. Dies war eindeutig durch Vinculin-*Spots* erkennbar, die zudem typischerweise an Aktin-SF gebunden waren (Abbildung 32). Als FA wurden in dieser Arbeit Aktin-Strukturen definiert, die mit mindestens einem typischen FA-Marker co-lokalisieren. Eine genauere Untersuchung der FA oder ihrer Maturierungsgrade erfolgte in dieser Arbeit nicht.

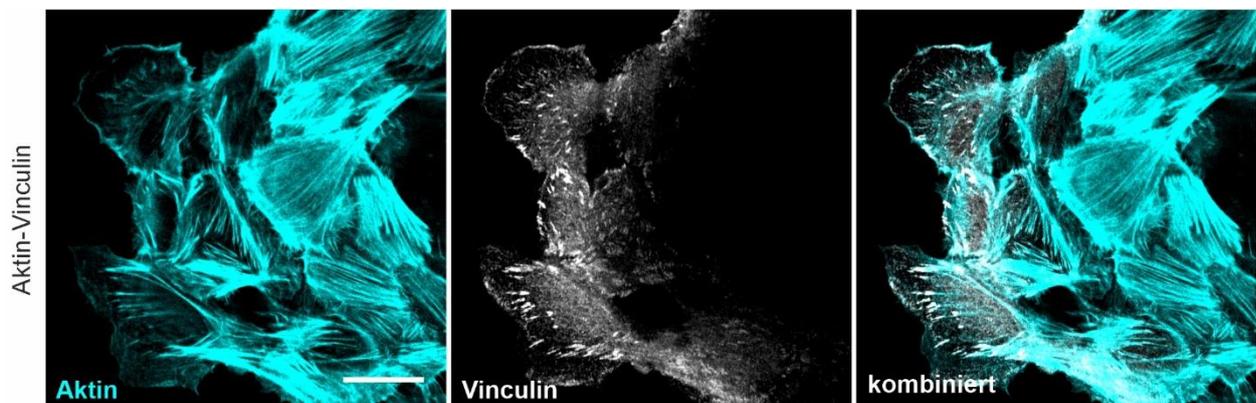


Abbildung 32: Migrierende Zellen bilden Fokaladhäsionen an der Migrationsfront. Dargestellt ist die Migrationsfront eines invasiven Azinus (24 h +EGF, Glas) zum Nachweis von Vinculin-*Spots*, co-lokalisiert mit Aktin an den Enden der SF- und Aktin-*Spots*. Grau = Vinculin; Cyan = Aktin. Maßstab = 20 µm.

Anschließend wurden FA auch in den MCF10A Brustazini nachgewiesen. Dazu wurde neben Vinculin auch das FA-Protein Talin angefärbt. Da FA in invasiven Zellen mit Aktin-SF assoziiert sind, wurde zunächst ein Azinus mit überwiegend SF-Zellen gewählt. Vinculin konnte an den Enden dieser SF gezeigt werden. Zwar waren die Vinculin-*Spots* kleiner und deutlich schwächer in Bezug auf das Fluoreszenzsignal als bei den invasiven Zellen, aber bei diesem Azinus waren die Enden der Aktin-SF eindeutig mit Vinculin co-lokalisiert (Abbildung 33A, weiße Pfeile). Die gleiche Co-Lokalisierung konnte anhand der Vergrößerung einer azinaren Zelle für Talin gezeigt werden. Auch hier war das Signal schwach, aber eindeutig an den Enden der Aktin-SF (Abbildung 33B, weiße Pfeile).

Über die orthogonale Ansicht auf die Querschnitte der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche konnte die Lokalisierung des Vinculin-Signals innerhalb der BM nachgewiesen werden. Vinculin lag in SF-Zellen innerhalb des Kollagen IV Netzwerkes mehrfach vor. Eindeutig konnte es auch an den SF-Enden mittels Co-Lokalisation detektiert werden (Abbildung 33C).

Anschließend sollte überprüft werden, ob auch die Aktin-MS vergleichbare FA aufweisen und mit der BM und EZM funktionell interagieren. In Azini mit überwiegend MS-Zellen konnten Vinculin und Talin ebenfalls nachgewiesen werden. Hier waren die FA-Proteine ebenfalls mit den Aktin-Strukturen co-lokalisiert (Abbildung 34A und B, weiße Pfeile). Auch hier war das Signal relativ schwach und die Co-Lokalisation in der basalen Zellschicht war nicht in jeder Zelle detektierbar. Bei der Analyse der genauen Lokalisation von Vinculin in der BM konnte das FA-Protein, genau in den Bereichen in denen Aktin-MS die BM penetrierten, co-lokalisiert mit Aktin innerhalb des Kollagen IV Netzwerkes nachgewiesen werden (Abbildung 34C).

Zusammen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass sowohl Aktin-MS als auch Aktin-SF über Fokaladhäsionen mit der BM oder direkt mit der EZM verbunden sind. Dadurch ist es grundsätzlich möglich, dass diese aktinbasierten Strukturen Kräfte auf die EZM übertragen können, was in den folgenden Analysen detailliert betrachtet werden sollte.

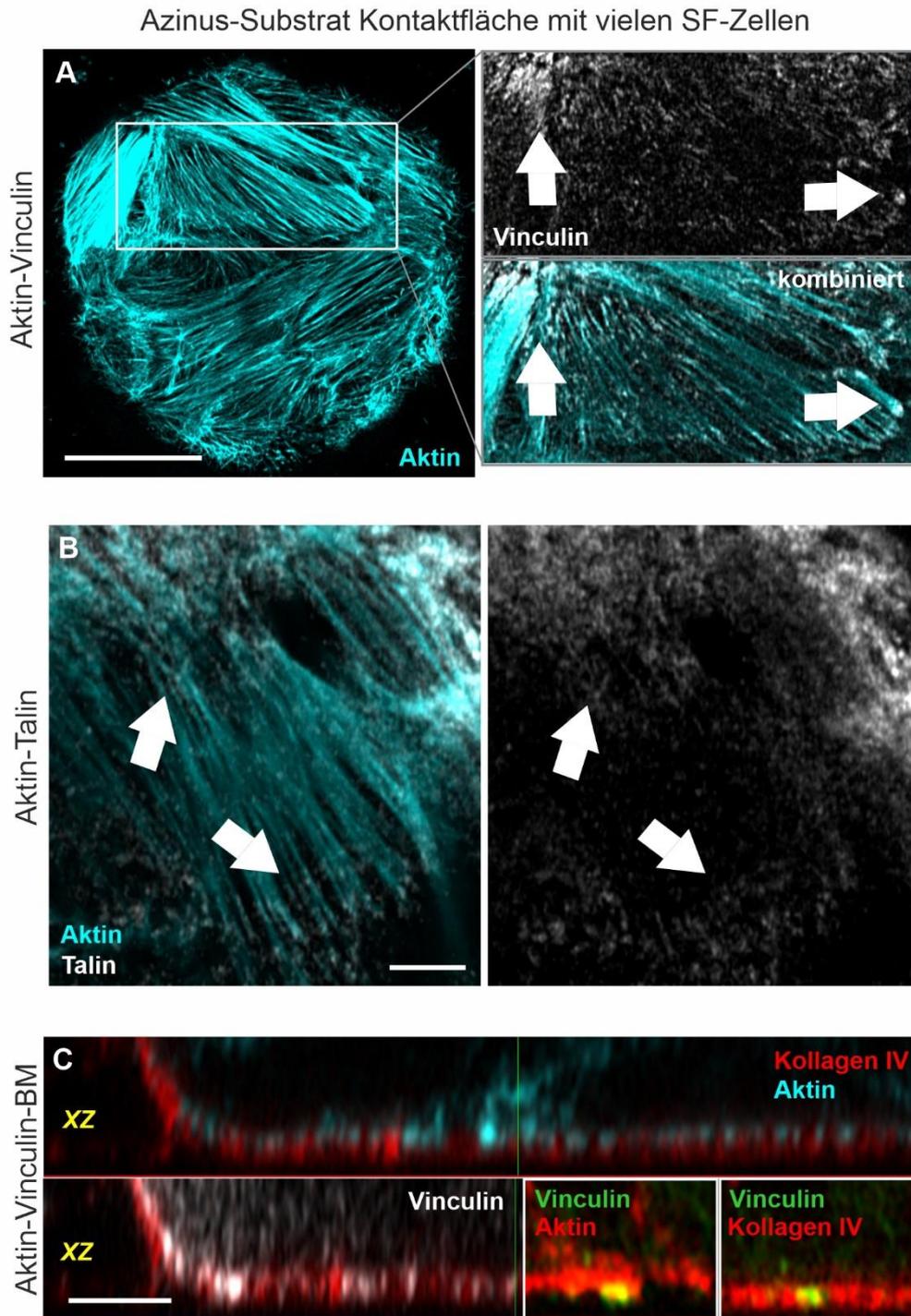


Abbildung 33: SF sind über Fokaladhäsionen an die BM und die EZM gekoppelt. (A-C) Repräsentative und konfokal aufgenommene MCF10A Azini wurden fixiert und mittels IF gefärbt. **(A,B)** Azinare SF-Zellen (24 h +EGF, Glas) weisen an den Enden der SF eine Co-Lokalisierung mit Vinculin und Talin auf (jeweils weiße Pfeile). **(C)** Die orthogonale Ansicht verdeutlicht die Co-Lokalisierung von Vinculin und den Enden der SF innerhalb der BM. Die weiße Box zeigt das Ende der SF (Co-Lokalisierung in Gelb) aus der Abbildung 31H, ebenfalls markiert in Abbildung 33A, rechter Pfeil. Rot = Kollagen IV (in C Aktin); Grau = Vinculin (A,C) bzw. Talin (B) (Vinculin in weißer Box in C = Grün); Cyan = Aktin. Maßstab: (A) = 20 μm , (B,C) = 5 μm .

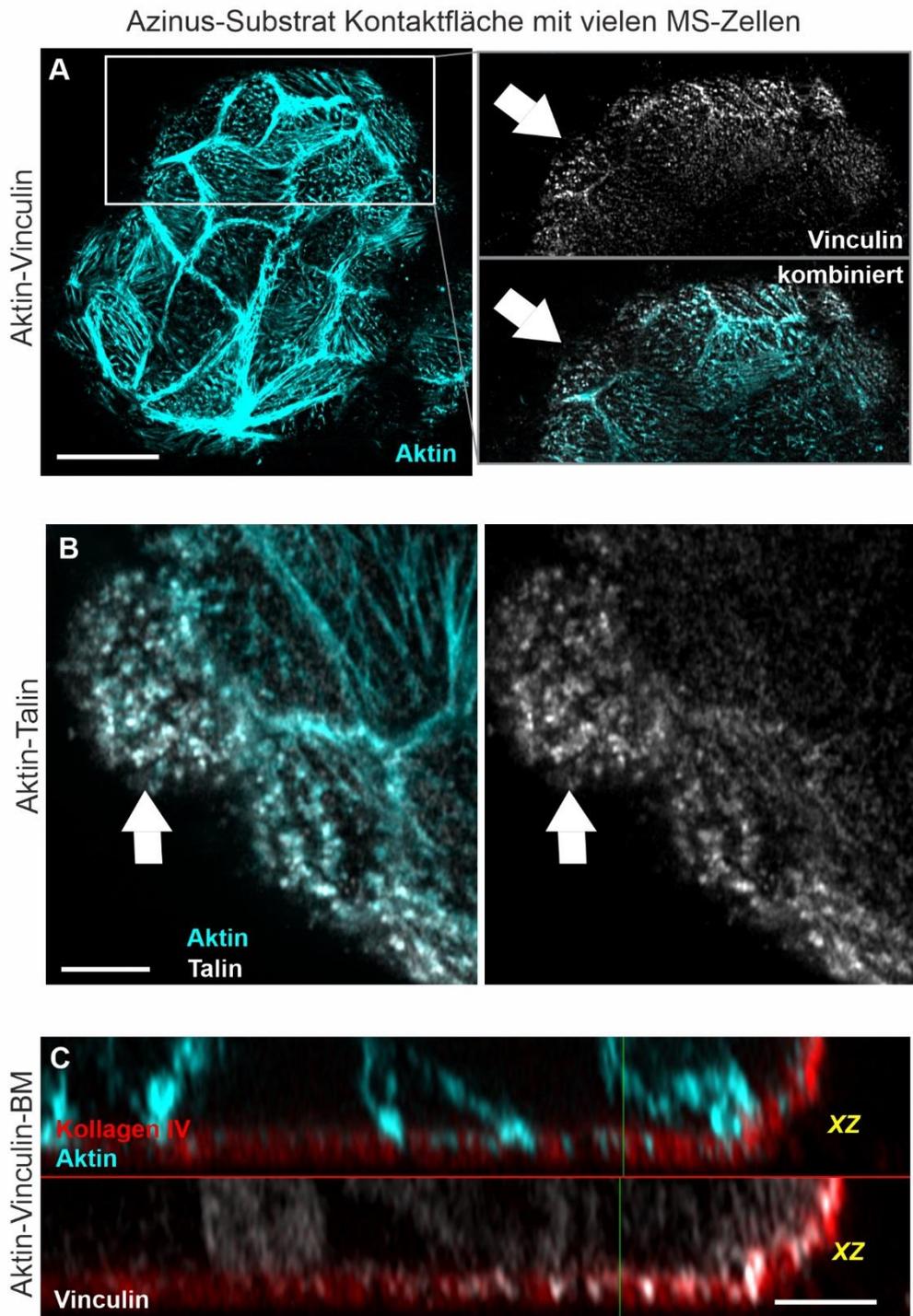


Abbildung 34: MS sind über Fokaladhäsionen an die BM und die EZM gekoppelt. (A-C) Repräsentative und konfokal aufgenommene MCF10A Azini wurden fixiert und mittels IF gefärbt. (A,B) Azinare MS-Zellen (1 h -EGF, Glas) weisen eine Co-Lokalisierung von MS mit Vinculin und Talin auf (jeweils weiße Pfeile) (C) Die orthogonale Ansicht verdeutlicht die Co-Lokalisierung von Vinculin und Aktin-MS innerhalb der BM. Rot = Kollagen IV; Grau = Vinculin (A,C) bzw. Talin (B). Cyan = Aktin. Maßstab: (A) = 20 μ m, (B,C) = 5 μ m.

3.3.4 Eine kohärente azinare Zellbewegung führt zur Transmigration von Zellen durch die BM

Neben den beschriebenen zytoskelettalen Veränderungen und einer möglichen Kraftübertragung auf die EZM muss beachtet werden, dass Azini eine kontinuierliche kohärente Zellbewegung der azinaren Zellen aufweisen. Diese Bewegung wurde bereits für MCF10A Azini in vorausgegangenen Arbeiten als Rotationsbewegung (engl. *rotational motion*) beschrieben [176]. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob diese Zellbewegung auch den Invasionsprozess fördert.

In einem ersten Schritt wurde die kohärente Zellbewegung für die hier verwendeten Azini demonstriert, ohne einzelne Zellen im Detail zu verfolgen (Abbildung 35). Der exemplarisch ausgewählte Azinus in einer EHS-Gelmatrix drehte sich in diesem Beispiel gegen den Uhrzeigersinn um die eigene Achse. Dabei verbleibt der gesamte Azinus trotz der ständigen Drehbewegung an der gleichen Position, da die einzelnen azinaren Zellen ihre Positionen verändern. Diese Bewegung der einzelnen Zellen erzeugte den Eindruck eines sich drehenden Azinus. Dies war jedoch hier im Detail ohne IF gefärbte Zellstrukturen nicht zu erkennen und wurde im weiteren Verlauf noch analysiert.

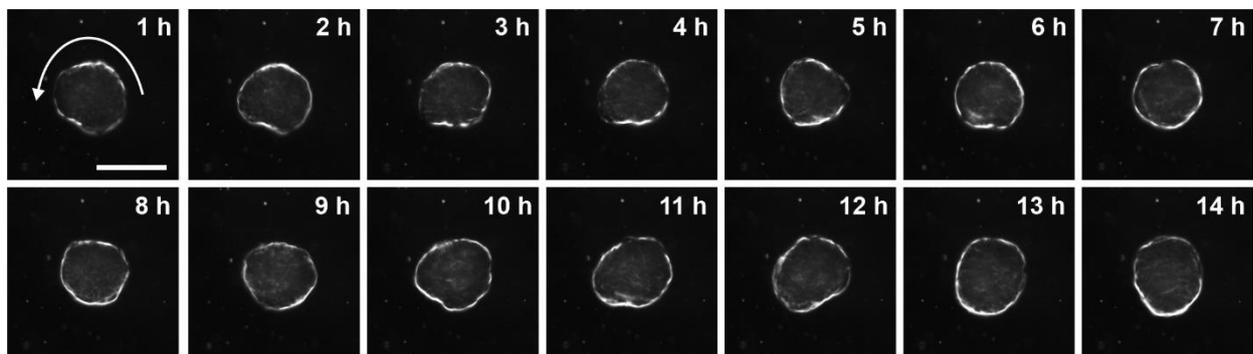


Abbildung 35: MCF10A Azini weisen eine kohärente Zellbewegung auf. Die repräsentativen Durchlichtaufnahmen eines elf Tage alten Azinus (1d-BM, -EGF) innerhalb einer physiologischen EHS-Matrix verdeutlichen die kohärente Zellbewegung des gesamten Azinus. Der Pfeil signalisiert die beobachtete Rotationsrichtung des ausgewählten Azinus. Maßstab = 100 μ m.

Für die Kraftanalysen wurden die Azini zur Durchführung des Invasionsassays aus der Gelmatrix herausgelöst (vgl. Abschnitt 2.8.5 und 2.14). Azini, die auf eine Elastomeroberfläche transferiert wurden, zeigten ebenfalls die kohärente Zellbewegung. Die Zellbewegung fand auch an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche statt. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass diese Bewegung als BM-Stress definiert werden kann. Dieser BM-Stress trägt dazu bei, dass die BM lokal zerstört wird und Zellen durch die BM migrieren können. In dieser Arbeit sollte darauf aufbauend genauer aufgeschlüsselt werden, wie diese kontraktilen Zellkräfte entstehen.

3.3.5 Die kohärente Zellbewegung verursacht Myosin II vermittelten BM-Stress

Bevor die Entstehung der basalen kontraktilen Zellkräfte detaillierter untersucht werden konnte, wurde analysiert wie die an FA gebundenen MS- und SF-Strukturen in die Aktomyosin-vermittelte Kontraktilität involviert sind. Dazu wurde die Lokalisierung von phosphorylierter und aktivierter MLC (pMLC), die die Myosin II vermittelte Kontraktion von Zellen reguliert (vgl. Abschnitt 1.6.2), untersucht. Zur besseren Visualisierung wurden zunächst migrierende Einzelzellen untersucht. Bei migrierenden Zellen auf einem planaren Substrat war eine Co-Lokalisierung von Aktin und pMLC zu erkennen. Sowohl in kortikalen Aktin-Strukturen als auch an Aktin-SF konnte pMLC nachgewiesen werden (Abbildung 36).

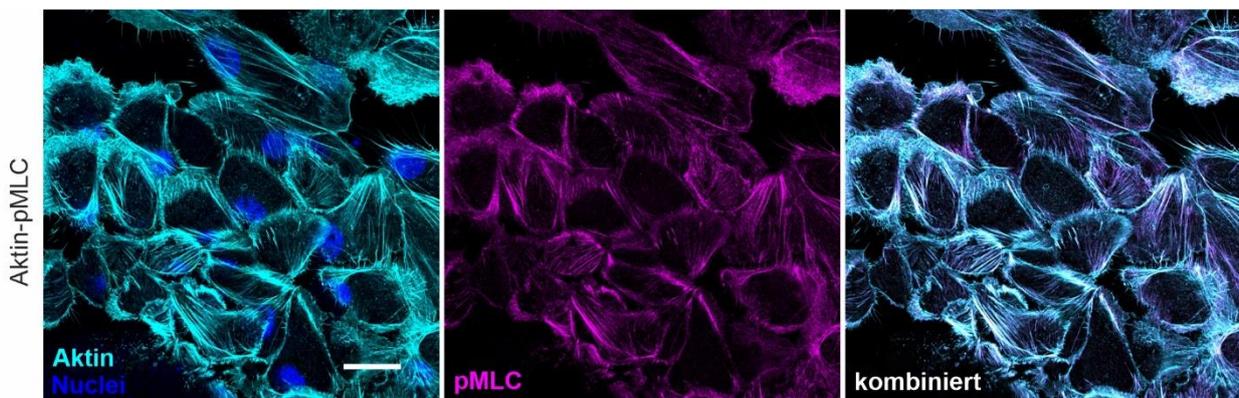


Abbildung 36: Die Migration von MCF10A Einzelzellen ist Nicht-Muskel-Myosin II vermittelt. Detektiert wurde eine Co-Lokalisierung der phosphorylierten MLC (pMLC) und zellulären Aktin-Strukturen (z.B. Aktin-SF) bei migrierenden MCF10A Zellen auf einem Glassubstrat. Magenta = pMLC; Cyan = Aktin. Maßstab = 20 µm.

Anschließend wurde überprüft, ob diese Co-Lokalisation von pMLC mit Aktin-Strukturen ebenfalls an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche in Brustsphäroiden vorhanden ist. In MCF10A Azini, in denen an der Kontaktfläche neben Aktin-Fasern auch MS detektiert wurden, konnte eine Co-Lokalisierung der gesamten Aktin-Strukturen mit pMLC festgestellt werden (Abbildung 37A). In der Vergrößerung waren sowohl die MS in MS-Zellen als auch die SF in SF-Zellen mit pMLC co-lokalisiert (Abbildung 37B und C).

In einer bereits invasiven Zelle konnten zudem die Ergebnisse aus der Färbung der Einzelzellen reproduziert und die eindeutige Co-Lokalisierung mit SF demonstriert werden (Abbildung 37D). Die Spezifität des MLC-Signals wurde mittels einer sekundären Antikörperkontrolle überprüft (Abbildung 37E).

Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass MS und SF nicht nur an die BM und EZM gekoppelt sind (vgl. Abschnitt 3.3.3), sondern auch mechanisch aktiv sind. Die basale Zellschicht bildet kontraktile Aktin-SF aus, die den beschriebenen BM-Stress erklären könnten. Demnach könnte eine Aktomyosin-vermittelte Zellbewegung über FA Kraft auf die EZM und somit auch die dazwischenliegende BM übertragen. Dieser mögliche Kraftübertragungsmechanismus durch Aktin-SF sollte im Folgenden mittels Zugkraftmikroskopie überprüft werden.

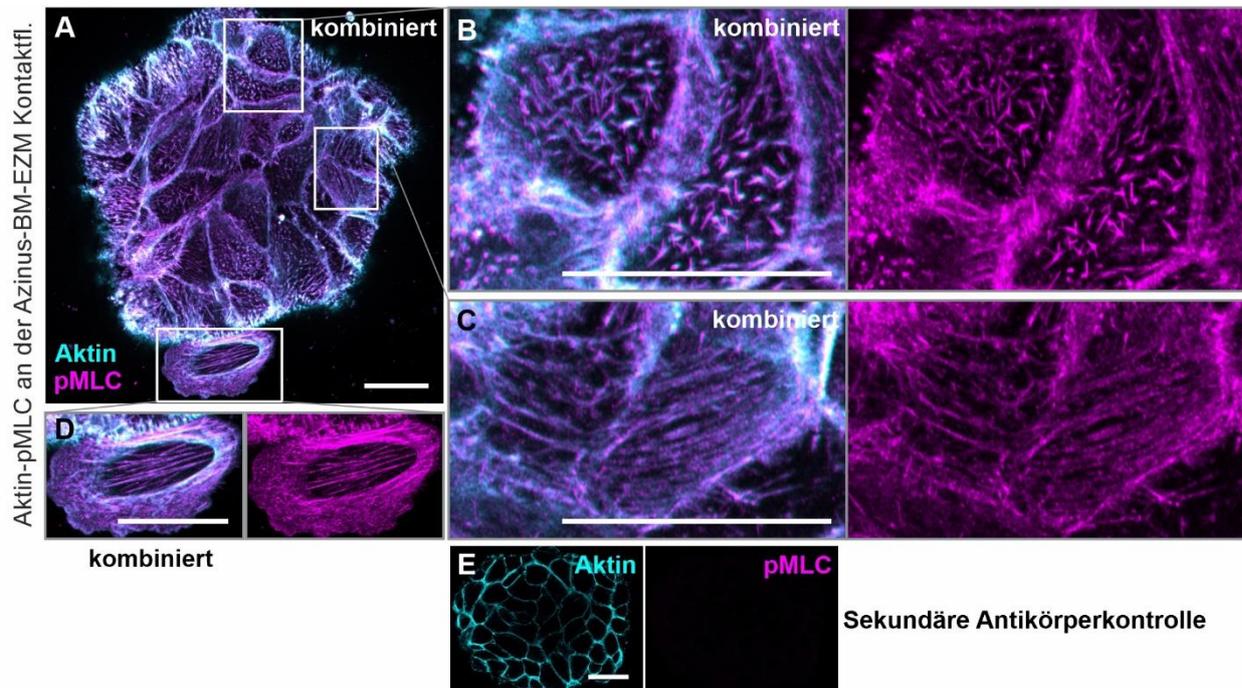


Abbildung 37: Die azinaren kontraktile Zellkräfte sind Myosin II vermittelt. (A) Übersichtsbild einer Azinus-BM-EZM Kontaktfläche zum Nachweis einer pMLC-Aktin Co-Lokalisierung. (B) Die Vergrößerung einer bereits invasiven Zelle zeigt ebenfalls eine pMLC-Aktin Co-Lokalisierung. (C) Detaillierte Ansicht von pMLC gebunden an MS in MS-Zellen und (D) an SF in SF-Zellen. (E) Sekundäre Antikörperkontrolle zum Nachweis des spezifischen Signals für pMLC. Magenta = pMLC; Cyan = Aktin. Maßstab = 20 µm.

3.3.6 Die tumorassoziierte SF-Bildung verursacht Myosin II vermittelten BM-Stress

In diesem Abschnitt wurde die Azinus-BM-EZM Kontaktfläche im Hinblick auf den Wechsel von MS- zu SF-Zellen funktionell untersucht und wie dieser Vorgang die physische BM-Zerstörung fördert. Nach dem Transfer der Azini auf eine tumorassoziierte Elastomeroberfläche (12 kPa) wiesen die Azini, wie bei der Quantifizierung auf Glas (vgl. Abbildung 29), zunächst überwiegend MS-Zellen auf. Nach 24 h Adhäsionszeit wurden bei der Quantifizierung auf Glas bereits überwiegend SF-Zellen detektiert. Daher wurde dieser Wechsel mittels Lebendzellmikroskopie in

den Anfangsstunden genauer betrachtet. Dazu wurden Azini untersucht, die sich in einer prä-invasiven Phase befanden und demzufolge noch von einer intakten BM umgeben wurden.

Die Abbildung 38A und B zeigen die Veränderungen über die Zeit im Aktin-Zytoskelett hin zu Aktin-SF bei zwei repräsentativen Azini. Die Verwendung der Zugkraftmikroskopie (TFM) zeigte die Entstehung von räumlich getrennten und definierten Stressfeldern in einem TFM-Spannungsfeld (Abbildung 38C und D). Die Zellkräfte, die zu der Entstehung der Deformationsfelder und den Stress *Hotspots* (HS) führten, konnten in Form der Formänderungsenergie errechnet werden und lagen nach 8,5 h bei 36 bzw. 48 Femtojoule (fJ). Die Formänderungsenergie ist die Kraft, die eine Zelle aufbringen muss, um das Substrat zu deformieren. Diese diente hier als Messwert für mechanische Aktivität und indirekt als Indikator für den BM-Stress.

Dabei zeigten die repräsentativ ausgewählten Azini zwei prinzipiell unterschiedliche Phänotypen der SF-Organisation. In Beispiel 1 bildete der Azinus große und langgestreckte SF-Zellen, an deren Enden jeweils korrespondierende HS entstanden sind. Dies impliziert eine hohe Kontraktilität entlang der Achse der SF (Abbildung 38A und C). Im Gegensatz dazu entstanden unter MS-Zellen sowie vor der SF-Zellbildung keine HS. Der Phänotyp in Beispiel 2 hingegen wies eine diffusere Verteilung von SF-Zellen innerhalb der azinaren Kontaktfläche auf. Die Anzahl der SF-Zellen nahm über die Zeit zu und die SF hatten teilweise unterschiedliche Orientierungen. In Summe produzierten diese SF-Zellen mit 48 fJ nach 8,5 h aber einen höheren BM-Stress als die SF-Zellen aus Beispiel 1 (Abbildung 38B und D).

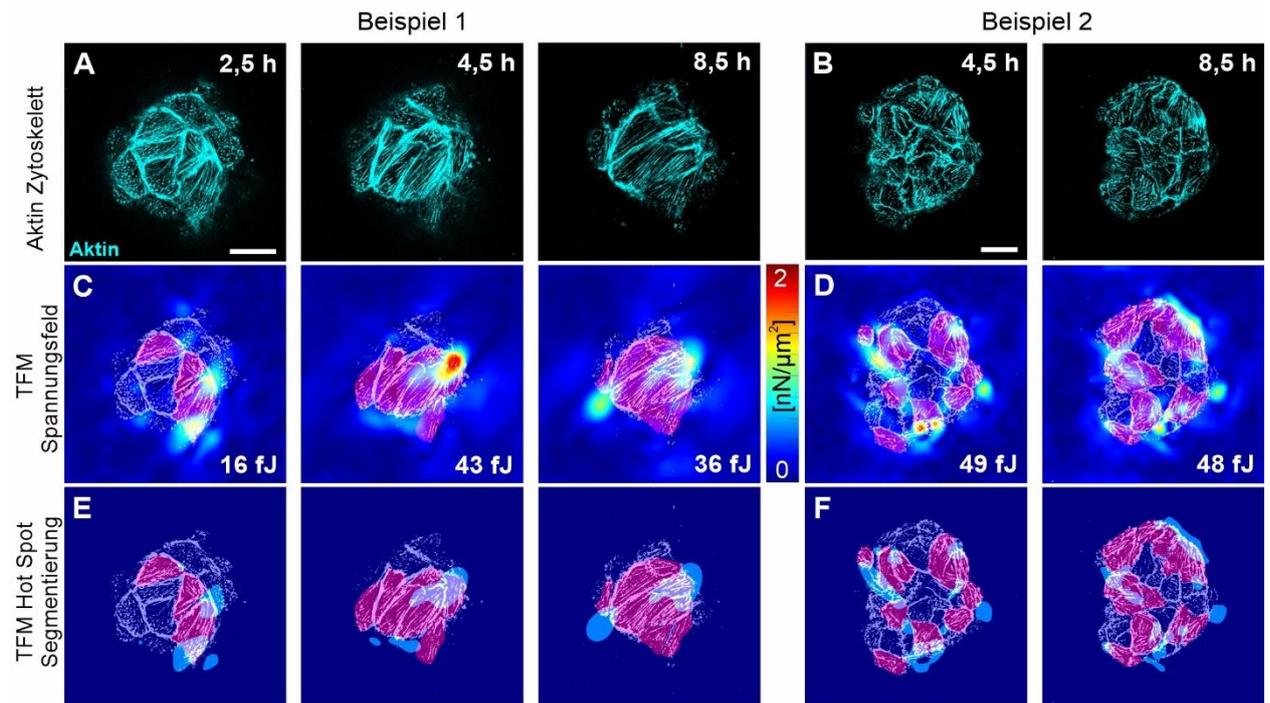


Abbildung 38: SF-Zellen verursachen Kraft-Hotspots an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche. Die TFM(Zugkraftmikroskopie)-Bildersequenzen zeigen mechanischen BM-Stress an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche, ausgeübt von MCF10A LifeAct Azini (1d-BM, -EGF) auf einem 12 kPa steifen Substrat. (A,B) Die repräsentativen konfokal aufgenommenen Azini zeigen das Aktin-Zytoskelett über die Zeit. (C,D) Darstellung der Stressfelder (auf einer Skala von Blau (kein Stress) bis Rot (maximaler Stress) zur Kalkulation der Formänderungsenergie innerhalb des gezeigten Bildausschnitts (in Femtojoule (fJ)). Die SF-Zellen wurden manuell detektiert (Magenta). (E,F) Die Kraft-Hotspots (HS) wurden automatisch aus den Stressfeldern segmentiert (Hellblau). Cyan = Aktin; Magenta = manuell markierte SF-Zellen; Hellblau = automatisch detektierte TFM-HS. Maßstab = 20 μm .

Die Stressfasern bildeten in beiden Beispielen hauptsächlich Kraft-HS in Bereichen von SF-Zellen. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurden sowohl die SF (Magenta) als auch die HS (Hellblau) detektiert, um diese mit den SF-Zellen zu korrelieren (Abbildung 38E und F). Die Abbildung 39 erläutert die Vorgehensweise der Kraft-HS-Zählung und das Ergebnis der Zählung. Demnach wurden generell nur HS ausgewertet, die das Aktin-Zytoskelett überdecken und einer azinaren Zelle zuzuordnen sind (Abbildung 39A). Für die Korrelation zwischen HS und SF-Zellen wurden nur Kraft-HS, die zusätzlich eine SF-Zelle überdecken, gewertet (Abbildung 39B). Die Korrelationsanalyse zwischen HS und SF-Zellen demonstrierte eine eindeutige Co-Lokalisierung zwischen hohen Kraftamplituden und der Bildung von SF-Zellen. Bei allen gemessenen Azini wurden 81 % aller HS durch eine SF-Zelle verursacht (Abbildung 39B).

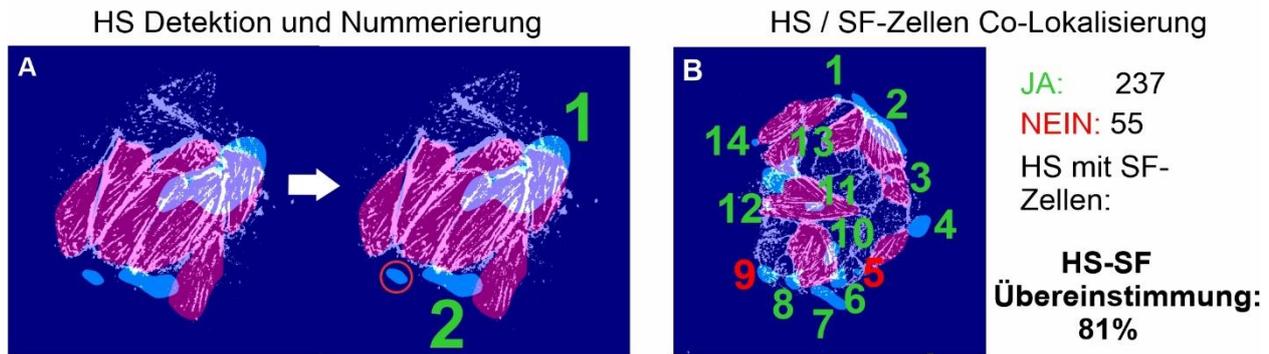


Abbildung 39: Die Entstehung von Kraft-Hotspots korreliert mit der Bildung von SF-Zellen. (A) Das Beispielbild zeigt die manuelle Zählung der segmentierten Kraft-Hotspots (HS) (beschrieben in Abbildung 38E und F). Nur HS (Hellblau), die im Bereich des Aktin-Zytoskeletts (Grau) liegen, wurden gewertet. Außerhalb liegende HS (roter Kreis) wurden nicht gewertet. (B) Das repräsentative Bild zeigt die Zählung der HS in Abhängigkeit von den markierten SF-Zellen (Magenta). Bei einer Co-Lokalisierung von SF-Zelle und Kraft-HS wurde der HS mit JA (Grün) gewertet, ansonsten mit NEIN (Rot). Insgesamt wurden 292 HS bei vier unabhängig untersuchten Azini (30 Einzelbilder) untersucht. Die HS-Segmentation und die SF-Zellzählung wurde alle zwei Stunden über einen Analysezeitraum von 18 bis 20 h durchgeführt. 237 HS korrelierten mit einer SF-Zelle, 55 HS lagen außerhalb des Bereiches einer SF-Zelle (81% Korrelation von HS und SF-Zellen). Magenta = manuell markierte SF-Zellen; Hellblau = automatisch detektierte TFM-HS.

Für den finalen Beweis, dass die SF-Zellformation mit der Kraftentstehung und -übertragung auf die unterliegende EZM sowie der daraus folgenden HS-Entstehung zusammenhängt, wurde die Myosin II-Aktivität in invasiv stimulierten MCF10A Azini pharmakologisch inhibiert. Bei unbehandelten Azini traten hohe Kraftamplituden bereits nach 4,5 h auf, wohingegen die Inhibition von Myosin II dazu führte, dass keine Substratdeformation mehr messbar war. Dieser Effekt blieb über den Versuchszeitraum konstant und wurde exemplarisch anhand eines Zeitpunktes nach 12,5 h demonstriert (Abbildung 40A). Im Einklang mit diesem Ergebnis wurde durch die Myosin II Inhibition auch die Formänderungsenergie signifikant reduziert (Abbildung 40B). Die Ursache für die nicht vorhandene Deformation des Substrates sind die durch die Inhibition fehlenden Aktin-SF, die somit eindeutig für den BM-Stress bei unbehandelten Azini verantwortlich waren.

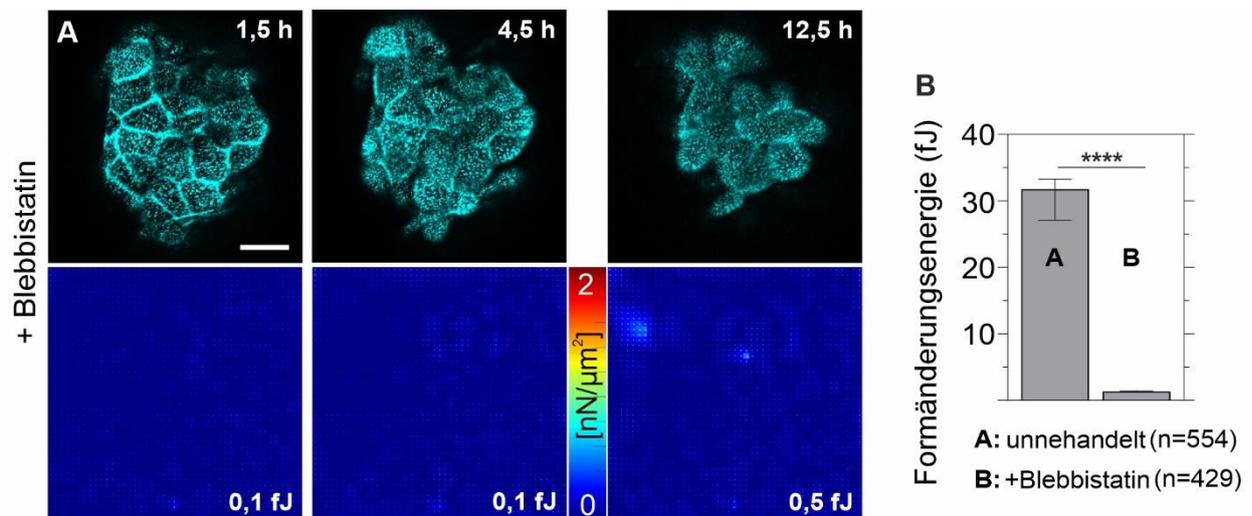


Abbildung 40: Eine Myosin II-Inhibition führt zu einer Blockade der SF-Formation und Zellkräften. (A) Repräsentativer Azinus mit MS-Zellen und behandelt mit Blebbistatin (25 μM). Oben: Aktin-Zytoskelett, unten: Stressfelder zur Kalkulation der Formänderungsenergie innerhalb des gezeigten Bildausschnitts (angezeigt durch die weißen Zahlen in Femtojoule). (B) Vergleich der errechneten FE von Azini mit Blebbistatin und unehandelten Azini. Das Diagramm enthält die über 18 bzw. 20 h gemessenen FE-Werte (Bilder wurden alle sieben Minuten aufgenommen). Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Bilder von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Balkendiagramm: Median mit 95% Konfidenzintervall. Unbehandelte Azini: Median FE = 32 fJ (n = 4, gesamt: 554 Bilder); mit Blebbistatin behandelte Azini: Median FE = 1,4 fJ (n = 4, gesamt: 429 Bilder); DMSO Kontrolle (nicht gezeigt): Median FE = 45 fJ (n = 3, gesamt: 438 Bilder), Cyan = Aktin. Maßstab = 20 μm .

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der ersten beiden Abschnitte (Abschnitt 3.2 und 3.3) die Rolle von aktinbasierten MS-Strukturen in der invasiven Transition von MCF10A Brustazini. MS bilden die funktionelle Brücke zwischen mechanischer EZM-Wahrnehmung und kraftvermittelter sowie proteolytischer BM-Invasion. Die kontinuierliche Wahrnehmung und Anpassung an die Mikroumgebung wird durch die Versteifung der EZM und onkogene EGFR Signalwege beeinflusst und verändert. Daraus resultierte u.a. der induzierte zytoskelettale Wechsel von MS zu SF, der mit Myosin II vermittelter Zellkontraktilität verknüpft wurde. Diese Kontraktilität und dadurch entstehende Zellbewegung verursachte letztendlich BM-Stress an der Kontaktfläche zur EZM, der zur invasiven Transition von ursprünglich benignen Brustazini beiträgt.

Damit wurde eine funktionelle Verknüpfung von tumorassoziierten extrazellulären Parametern (EZM-Versteifung und EGFR-Signalwege) mit einer EMT-typischen Aktin-Zytoskelett Reorganisation hergestellt, die zu Myosin II vermittelter Zellkraft und mechanischem BM-Stress führt.

3.4 Charakterisierung des MCF10A-ER:hRas Zellkulturmodells

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der putative Einfluss des Proto-Onkogens hRas auf den Invasionsprozess bei MCF10A Brustazini untersucht. Dazu wurden als Zellkulturmodelle zwei MCF10A Varianten verwendet. In der ersten Variante wurde onkogenes hRas konstitutiv überexprimiert (MCF10A+ *constitutive* hRas G12V). Bei der zweiten Variante handelte es sich um ein induzierbares System, bei dem über ein Östrogenrezeptor (ER) fusioniertes RasV12 schnell aktiviert werden kann durch die Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen (OHT) (MCF10A-ER:hRas G12V, induzierbar). Diese Aktivierung wurde bisher nur in Einzelzellen und Zellmonolagen gezeigt [158].

Obwohl hRas im humanen Mammakarzinom als Zielprotein bereits identifiziert wurde, sind die Einflüsse von hRas auf mechanobiologische Regelkreise in Brustsphäroiden weitestgehend noch nicht verstanden. Zudem fehlen aussagekräftige Studien in 3D-Zellkulturmodellen. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von hRas auf den Invasionsprozess in *in vivo*-ähnlichen Brustdrüsenphäroiden untersucht. Dazu musste zunächst die Kultivierung der MCF10A-ER:hRas Azini etabliert und charakterisiert werden, bevor anschließend funktionelle Analysen in Bezug auf den Einfluss auf den Invasionsprozess folgen konnten.

3.4.1 Eine konstante hRas- und pERK-Aktivierung resultiert in einer fehlerhaften Reifung und Polarisation von MCF10A Azini

In einem ersten Schritt wurde das Kultivierungsverhalten der MCF10A Varianten in 2D (in Zellkulturflaschen, planares Substrat) und 3D (Azinus-Reifung in einer EHS-Matrix) im Vergleich zu dem uns bekannten MCF10A Wildtyp (Wt) analysiert.

Das Wachstumsverhalten war bei morphologischer Betrachtung nahezu unverändert bei den beiden hRas-Varianten im Vergleich zu den Wt Zellen. Auffällig war, dass die hRas Zellen schneller in Clustern wuchsen, während die Wt Zellen diese erst bei gesteigerter Konfluenz bildeten. Bei der Wachstumsgeschwindigkeit gab es keine Unterschiede. Exemplarisch ist das typische „kopfsteinpflasterartige“ Wachstumsverhalten dieser Zelllinie für die MCF10A-ER:hRas Zellen gezeigt (Abbildung 41A). Das Wachstumsverhalten der konstant hRas überexprimierenden Zelllinie unterschied sich nicht von dem dargestellten Wachstumsverhalten der induzierbaren Zellvariante.

In der Azinus-Bildung und -Differenzierung traten deutliche Unterschiede zwischen den hRas-Varianten auf. Die MCF10A-ER:hRas Zellen (nicht induziert) bildeten über elf Tage

Kultivierungszeit Azini mit einer basalen Polarisation mit einer kontinuierlichen BM aus. Weiterhin war in der basalen Zellschicht teilweise eine nach innen gerichtete Orientierung (erkennbar an der Lokalisation des Golgi-Apparats) zu erkennen (Abbildung 41B).

Im Gegensatz dazu entstanden bei der Zellvariante, die hRas konstant überexprimierte, nach elf Tagen nur kleinere und deformierte Sphäroide, die kaum Anzeichen der typischen basoapikalen Polarisation von MCF10A Azini aufwiesen. Auch die BM war nicht kontinuierlich und wies Lücken auf. Außerdem wirkte das Aktin-Zytoskelett unorganisierter (Abbildung 41C) im Vergleich zum Wt (Abbildung 41D). Während die Zellen der Wt Azini eine gleichmäßige Größe und eindeutige Zellgrenzen aufweisen, war das Signal von Aktin in den konstant hRas überexprimierenden Sphäroiden diffuser und die Zellgrößen waren sehr unterschiedlich.

Basierend auf diesen repräsentativ dargestellten Ergebnissen wiesen nur die noch nicht induzierten Azini der MCF10A-ER:hRas-Variante die typischen Polarisationsmerkmale von Wt Azini auf (Abbildung 41D). Der einzige Unterschied, der auf der Grundlage dieser Bilder ausgemacht werden konnte, war ein Größenunterschied zwischen den induzierbaren hRas Azini und den Wt Azini. Aber auf Grund der sonstigen morphologischen Ähnlichkeiten wurden für die folgenden Analysen nur die MCF10A-ER:hRas Azini verwendet. Der große Vorteil dieser Variante war, dass diese zunächst dem Wt vergleichbare Azini ausbildete und dann eine selektive hRas-Aktivierung möglich war. So sollten in dieser Arbeit spezifische Einflüsse von hRas auf die BM und den Invasionsprozess untersucht werden, ohne dass die basoapikale Polarisation bereits während der frühen Entwicklung und Differenzierung gestört ist. Dass hRas einen negativen Einfluss auf die Azinus-Entwicklung hat, konnte bereits eindeutig an der gestörten Ausbildung der BM bei konstanter hRas-Überexpression gezeigt werden (Abbildung 41C).

Bevor die induzierbare Zellvariante im Vergleich zum Wt charakterisiert und der Einfluss der selektiven Aktivierung von hRas untersucht werden konnte, mussten die Auswirkungen der unterschiedlichen Zellkulturbedingungen in der Azini-Kultivierung betrachtet werden. Wie im Abschnitt 2.8.2 beschrieben, gab es Veränderungen im Kultivierungsmedium, um den Östrogenrezeptor nicht unspezifisch zu aktivieren. Außerdem mussten die Azini für die hRas-Aktivierung mit OHT behandelt werden. Daher wurde im ersten Schritt getestet, ob die Veränderungen in den Medien oder die OHT-Behandlung unspezifische Nebeneffekte beim Wt hervorrufen. Bei OHT handelt es sich um einen Östrogenrezeptormodulator, der zur Behandlung von Brusttumoren eingesetzt wird [177].

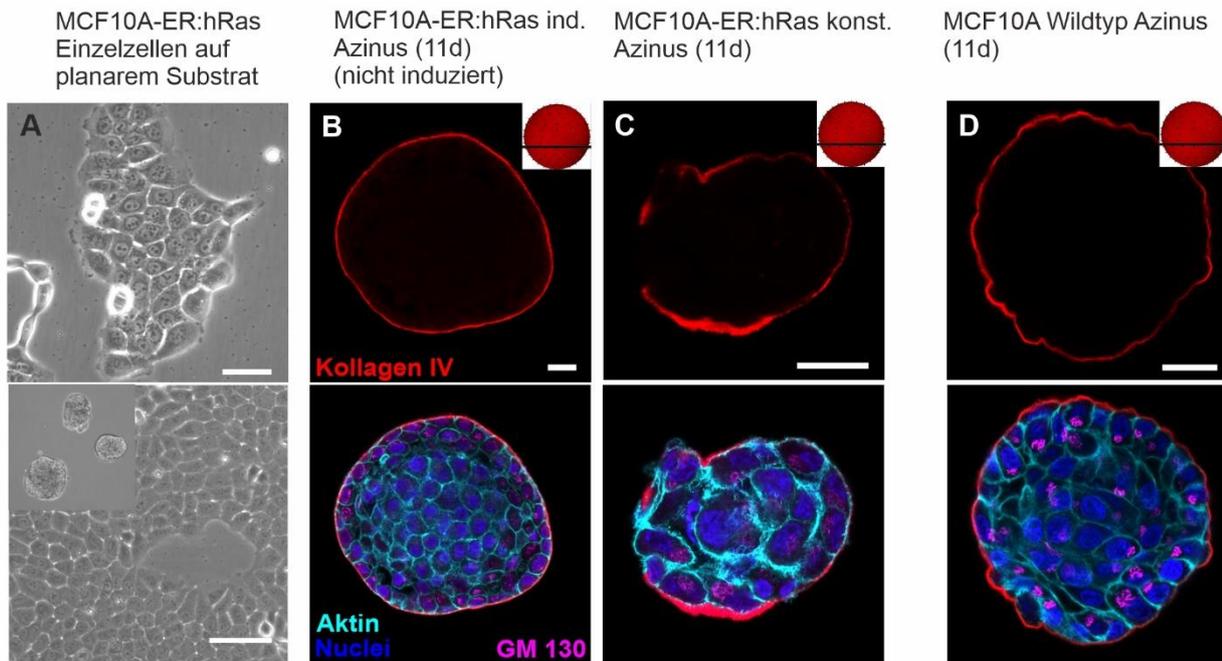


Abbildung 41: Eine konstante hRas-Aktivität stört die basoapikale Polarisation bei Brustsphäroiden
 Repräsentative Bilder von MCF10A Zellmonolagen und Azini. Diese wurden fixiert und mittels IF gefärbt. Die Höhe des konfokal aufgenommenen Querschnitts ist durch den horizontalen schwarzen Balken im schematisch rot dargestellten Azinus angegeben. (A) Die Durchlichtaufnahme von MCF10A-ER:hRas Zellen zeigt das Wachstum von Zellen auf einem planaren Plastiksubstrat. (B-D) Vergleich der Azini-Bildung von 11 Tage alten Azini verschiedener Zelllinien: (B) MCF10A-ER:hRas induzierbar (ind.) (C) MCF10A-ER:hRas (konstant) mit einer konstanten Überexpression von hRas und (D) dem MCF10A Wildtyp (Wt). Rot = Kollagen IV; Cyan = Aktin; Blau = Nuclei; Magenta = GM130. Maßstab: (A oben) = 50 μm , (A unten) = 100 μm , (B-D) = 20 μm .

Zunächst wurden Azini mit OHT (Abbildung 42A) bzw. Ethanol (EtOH) (Abbildung 42B) versetzt. Die Zugabe von OHT und EtOH erfolgte noch innerhalb der Gelmatrix für die letzten 16 bzw. 24 h vor der Fixierung. Die Wt Azini zeigten die beschriebenen Anzeichen der basoapikalen Polarisation, sodass ausgeschlossen werden konnte, dass die Zugabe von OHT über einen Zeitraum von bis zu 16 h unspezifische Effekte auslöst. Das Gleiche galt für die Kontrollen mit EtOH. Die Dauer von 16 h richtete sich nach dem Aktivierungszeitraum für die späteren funktionellen Versuche.

Auch in Bezug auf das Zellkulturmedium konnten keine unspezifischen Effekte festgestellt werden, da MCF10A Zellen ebenso in dem für die hRas-Variante veränderten Medium (über den gesamten Kultivierungszeitraum von zehn Tagen verwendet) typische Azini ausgebildet haben (Abbildung 42C). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass eine Aktivierung über den Östrogenrezeptor der Fusionskassette selektiv nur in der MCF10A-ER:hRas Variante funktioniert. Während MCF10A Wt Azini trotz OHT-Zugabe über den gesamten Kultivierungszeitraum von zehn Tagen unverändert typische Azini ausbilden (Abbildung 42D), formierten die selektiv

induzierbaren MCF10A-ER:hRas Zellen bei konstanter OHT-Zugabe keine polarisierten Azini (Abbildung 42E und F). Diese Strukturen waren vergleichbar mit den 3D Strukturen der konstant überexprimierenden hRas-Zelllinie aus der Abbildung 42C, bei der hRas konstant überexprimiert vorlag.

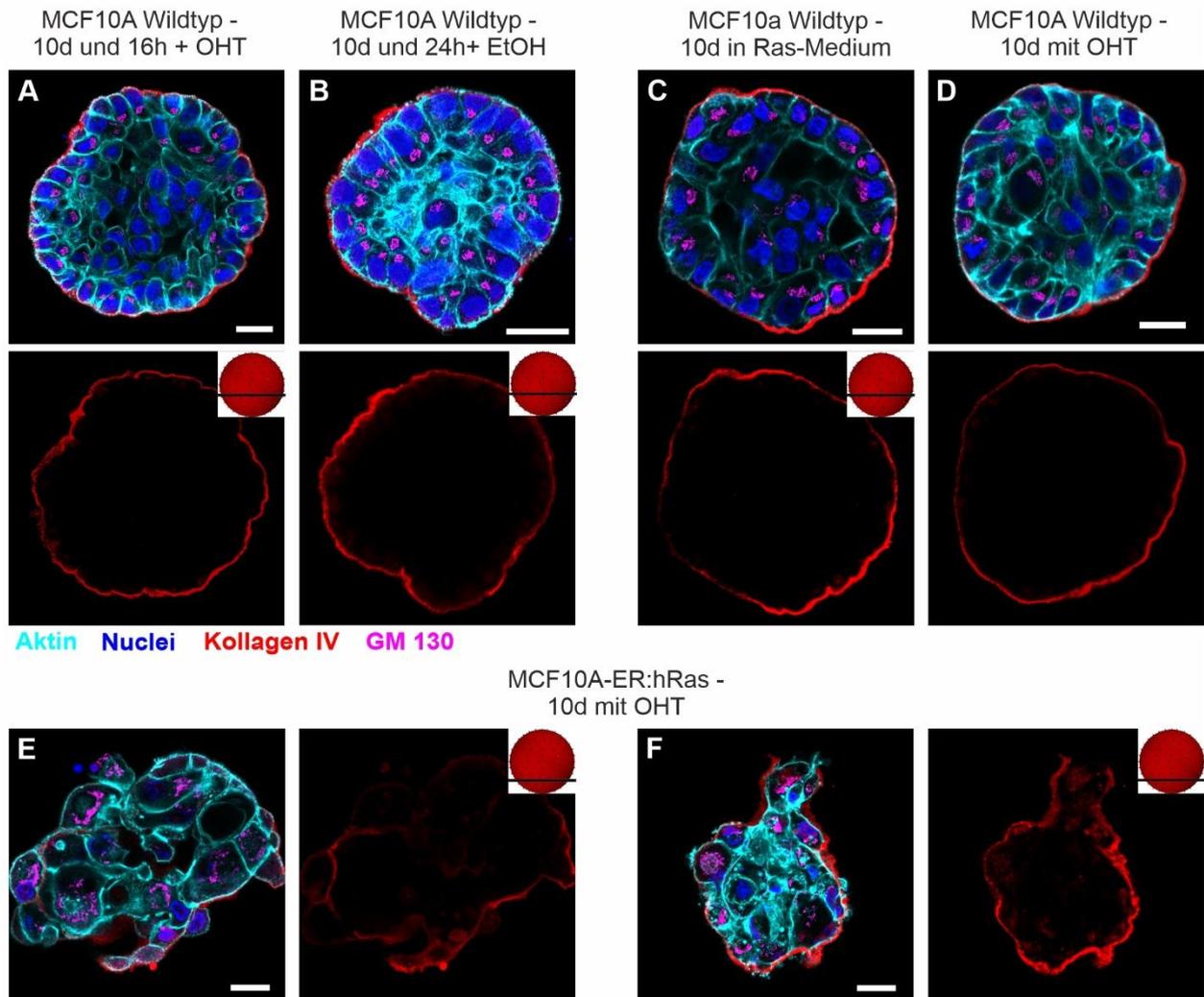


Abbildung 42: Die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen von MCF10A Wt und hRas Zellen beeinflussen die Brustdrüsen-Entwicklung nicht. Repräsentative Bilder von fixierten und mittels IF gefärbten zehn Tage alten MCF10A Azini. Die Höhe des konfokal aufgenommenen Querschnitts ist durch den horizontalen schwarzen Balken im schematisch rot dargestellten Azinus angegeben. (A-D) MCF10A Wt Kontrollfärbungen zum Nachweis, dass die verwendeten Chemikalien und Medien bei der MCF10A-ER:hRas Variante die 3D Entwicklung grundsätzlich nicht beeinflussten. (A) MCF10A Wt Azini wurden vor der Fixierung auf Glas 16 h mit OHT oder (B) 24 h mit Ethanol (EtOH) behandelt. (C) Der MCF10A Wt Azinus wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von zehn Tagen in dem Medium für die hRas-Variante kultiviert bzw. (D) in dem typischen MCF10A Wt Assay-Medium, jedoch unter Zugabe von OHT über den gesamten Zeitraum (zehn Tage) (E/F) Der Einfluss von OHT auf die phänotypische 3D Entwicklung (Wachstum und Polarisation) zeigte sich anhand einer konstanten OHT-Behandlung während des Kultivierungszeitraumes von zehn Tagen. Rot = Kollagen IV; Cyan = Aktin; Blau = Nuclei; Magenta = GM130. Maßstab = 20 µm.

Elementar für die Bestimmung von hRas Effekten war der Nachweis der spezifischen pharmakologischen Aktivierung von hRas in der induzierbaren hRas-Zellkulturvariante. Dazu wurde das phosphorylierte und demnach aktivierte Protein ERK als Ras-Effektor nachgewiesen. Für Zellmonolagen wurde der Nachweis mittels Western-Blot-Analysen erbracht, bevor das Modell in 3D Brustazini validiert wurde. Zusätzlich wurde der Nachweis von pERK um den ansonsten in dieser Arbeit verwendete MCF10A Wt erweitert.

Während der Wt und die Kontrollgruppe (MCF10A-ER:hRas –OHT, mit EtOH) nur ein vergleichbar schwaches Proteinsignal aufwiesen, war die Proteinbande bei der mit OHT induzierten Gruppe stärker (Abbildung 43A). EtOH wurde als Kontrolle verwendet, weil OHT in EtOH gelöst wurde. Für Zellmonolagen lag demnach nach siebenstündiger Induktion eine Steigerung der hRas Proteinmenge im Vergleich zu den unbehandelten Zellen vor. Allerdings wiesen auch die unbehandelten Zellen sowie der MCF10A Wt ein geringes Level einer pERK-Expression auf.

Da in dieser Arbeit hRas in einem 3D Zellkulturmodell analysiert werden sollte, wurde das pERK-Level bei Brustsphäroiden über das Intensitätssignal von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Im Einklang mit den Western-Blot Analysen wiesen Azini des Wt und der unbehandelten hRas-Variante ein vergleichbar geringes Level an pERK auf. Gesteigert wurde dieses Level durch die Zugabe von OHT (16 Stunden) bei den MCF10A-ER:hRas Azini (Abbildung 43B). Das stärkste Signal konnte jeweils in den basalen Zellschichten der Azini detektiert werden. Die Spezifität des pERK-Signals wurde mittels einer sekundären Antikörperkontrolle überprüft (Abbildung 43B).

Die beschriebenen Ergebnisse des pERK-Intensitätslevels in Brustsphäroiden sind in der Abbildung 43C quantifiziert worden und bestätigten den visuellen Eindruck der repräsentativen konfokalen Mikroskopieaufnahmen. Im Mittelwert lag eine signifikante, 1,6-fach höhere pERK-Signalintensität im Vergleich zwischen den MCF10A-ER:hRas mit OHT (Mittelwert: 10) und ohne OHT (Mittelwert: 6,3) vor. Außerdem war die Intensität der OHT behandelten hRas Azini um das 1,9-fache gegenüber dem MCF10A Wt (Mittelwert 5,4) gesteigert.

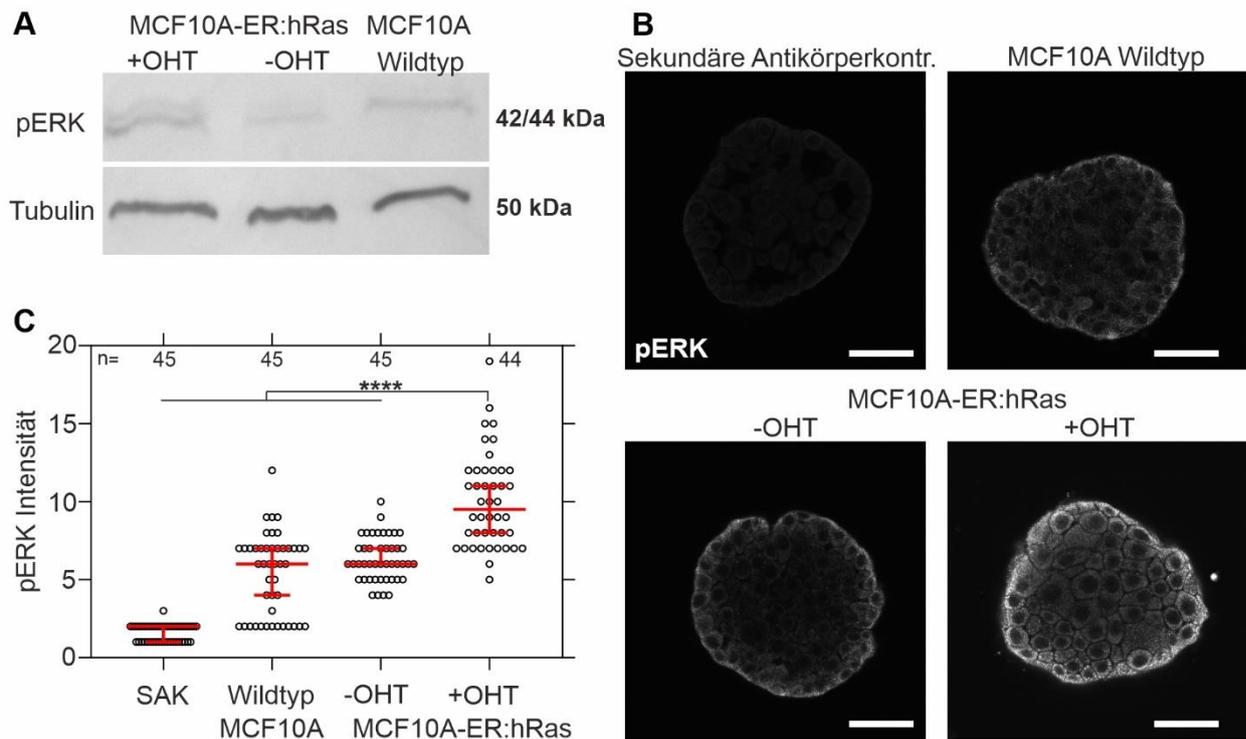


Abbildung 43: Die Aktivierung von hRas resultiert in einer erhöhten pERK-Aktivität. (A) Repräsentative Western Blot Aufnahme für den Vergleich der pERK-Proteinmengen in MCF10A-ER:hRas mit OHT behandelt (7 h OHT (+OHT)), unbehandelt (7 h EtOH (-OHT)) und dem MCF10A Wt. Als Kontrollprotein wurde Tubulin verwendet. (B) Beispielbilder zum Nachweis der pERK-Aktivierung in 3D bei MCF10A-ER-hRas Azini durch die OHT-Behandlung (16 h (+OHT)) im Vergleich zu unbehandelten Azini (16 h (-OHT)) und MCF10A Wt Azini. (C) Quantifizierung des pERK-Fluoreszenzintensitätssignals in Azini. SAK = Sekundäre Antikörperkontrolle. Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Bilder von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Streudiagramm: Median mit 95% Konfidenzintervall. Grau = pERK. Maßstab = 20 μm. Die Versuche zu A wurden von Johannes Dagge (betreuter Bachelorstudent), die Versuche zu B und C teilweise von Yannick Herfs (betreuter Auszubildender) durchgeführt.

3.4.2 Die hRas-Aktivierung verändert die Azinus-Größe

Zur abschließenden Charakterisierung wurde die hRas-Variante einerseits mit dem Wt verglichen, andererseits wurde überprüft, ob die 16-stündige Behandlung mit OHT die Morphologie der Azini im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen verändert hat.

Die Zellzahl in den aufgenommenen Querschnitten ist bei den MCF10A Wt und den MCF10A-ER:hRas Azini vergleichbar und liegt im Median bei 58 bzw. 61 Zellen pro Azinus-Querschnitt (Abbildung 44A). In Relation zur Querschnittsfläche der aufgenommenen Azini wurden beim Wt signifikant mehr Zellen detektiert (Abbildung 44B). Trotz der höheren Zellanzahl pro Querschnittsfläche der Azini waren insgesamt die Azini der hRas-Variante größer, gemessen über die Gesamthöhe der einzelnen Azini. Wt Azini waren im Median 55 μm hoch und hRas Azini

84 μm groß (Abbildung 44C). Ebenfalls signifikant größer bei der hRas-Variante war die aufgenommene Querschnittsfläche (1,4-fach größer) 20 μm über dem Substrat, auf dem der Azinus auflag (Abbildung 44D), und die Fläche pro einzelner azinärer Zelle (Abbildung 44E). So waren Wt Zellen innerhalb des azinären Verbundes im Median 134 μm^2 groß, während die Zellen der MCF10A-ER:hRas Variante eine Fläche von 175,5 μm^2 besaßen.

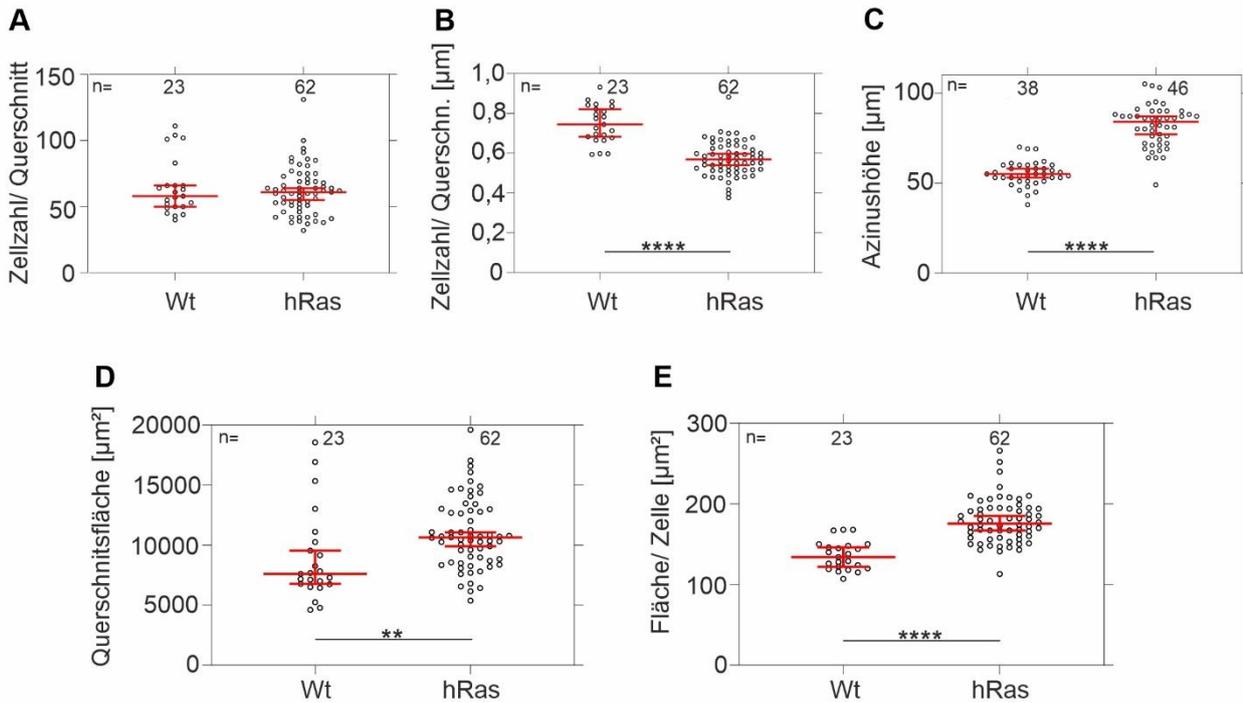


Abbildung 44: MCF10A Wt und MCF10A-ER:hRas Azini unterscheiden sich in der Größe. Vergleich zwischen zehn Tage alten MCF10A Wt und MCF10A-ER:hRas (+ und -OHT) Azini. Die konfokalen Aufnahmen wurden 20 μm über dem Glas aufgenommen. (A) Abgebildet ist die Zellzahl des Querschnitts bei der hRas-Variante und dem Wt sowie (B) das Verhältnis zwischen der Zellzahl und der Querschnittsfläche. (C) Das Diagramm zeigt die Größenunterschiede zwischen dem Wt und der MCF10A-ER:hRas Variante (Die Messung erfolgte durch die Erfassung der untersten und der obersten Azinusebene). (D) Sowohl die Querschnittsfläche, als auch (E) die Fläche pro einzelner azinärer Zelle sind bei den MCF10A-ER:hRas Azini größer als beim MCF10A Wt. Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Bilder von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Streudiagramme: Median mit 95% Konfidenzintervall.

Die Flächenanalysen der Azinus-Querschnitte ergaben einen eindeutigen Größenunterschied zwischen den Zellen und Azini der hRas-Variante und dem verwendeten MCF10A Wt. Um die Charakterisierung und Quantifizierung des neuen Zellkulturmodells abzuschließen, wurde final analysiert, ob eine 16-stündige hRas-Aktivierung die zuvor dargestellten Parameter beeinflusst. Der Vergleich zwischen MCF10A-ER:hRas Azini 16 h mit OHT und 16 h mit EtOH (-OHT) zeigte keine Unterschiede in der Größe der Azini, der einzelnen Zellen oder der aufgenommenen

Querschnitte (Abbildung 45). Dementsprechend hat hRas zumindest innerhalb von 16 Stunden keinen Einfluss auf diese Parameter.

MCF10A-ER:hRas Zellen stellen demzufolge ein ausgezeichnetes Werkzeug dar, um den Einfluss von hRas auf den Invasionsprozess zu untersuchen. Unter normalen Zellkulturbedingungen bildeten diese Zellen Azini aus, bei denen man innerhalb von 16 h nachweislich hRas aktivieren konnte. Einzig in der Größe der azinaren Zellen und demzufolge auch bei der Größe der Azini traten Unterschiede auf.

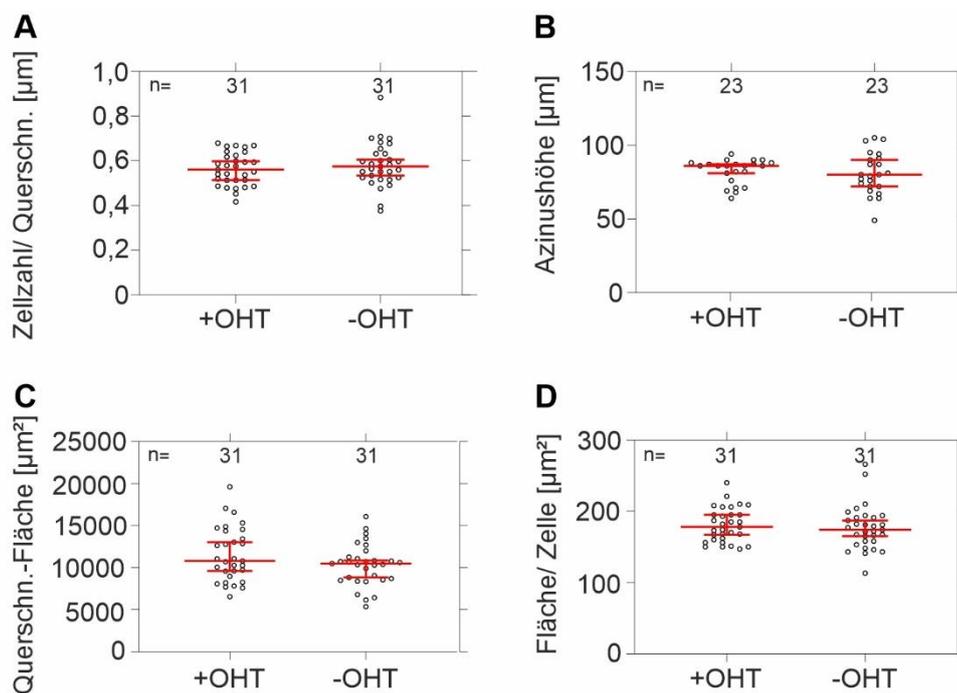


Abbildung 45: Eine 16-stündige hRas-Aktivierung hat keinen Einfluss auf die Azinus-Größe. Vergleich zwischen zehn Tage alten und MCF10A-ER:hRas Azini mit OHT behandelt (16 h OHT (+OHT)), unbehandelt (16 h EtOH (-OHT)). Die konfokalen Aufnahmen wurden 20 μm über dem Glas aufgenommen. Es wurden die Daten der MCF10A-ER:hRas Variante aus Abbildung 44B-E verwertet. Durch die OHT-Behandlung konnten keine Unterschiede in Bezug (A) auf das Verhältnis zwischen der Zellzahl und der Querschnittsfläche, (B) auf die gesamte Azinus-Größe (Die Messung erfolgte durch die Erfassung der untersten und der obersten Azini-Ebene), (C) auf die Querschnittsfläche und (D) auf die Fläche pro einzelner azinarer Zelle festgestellt werden. Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Bilder von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Streudiagramm: Median mit 95% Konfidenzintervall.

3.5 Die hRas-Aktivität steigert die Invasion von Brustsphäroiden

Zur Detektion der Invasionshäufigkeit und des Invasionszeitpunktes von Azini wurde der in Abbildung 15 beschriebene Invasionsassay angewandt. MCF10A-ER:hRas Azini wurden über 65 Stunden aufgenommen und hinsichtlich des Auswachens einzelner Zellen in die Peripherie untersucht. Ein Azinus galt als invasiv, sobald die erste Zelle den Azinus verließ (Abbildung 46A, rechtes Bild - weiße Umrandung). Dieser Moment der Zelltransmigration durch die BM wurde als Invasionszeitpunkt gewertet. Meist deutete sich dieses Event bereits kurz vorher durch Veränderungen in der äußersten Zellschicht und der BM an (Abbildung 46A, mittleres Bild – weißer Pfeil). Die Veränderungen in der Lichtbrechung ließen die Vermutung zu, dass dort lokale Löcher in der BM entstanden sind, die bereits in Vorarbeiten mittels Immunfluoreszenzaufnahmen demonstriert wurden (vgl. Abbildung 16) [33]. Auf einer dem gesunden Brustgewebe entsprechenden Steifigkeit von 0,12 kPa wurde die Anzahl der invasiven Azini durch die Zugabe von OHT deutlich erhöht. Durch die resultierende hRas-Aktivierung stieg die Invasionshäufigkeit von 55 % auf 97 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich demonstrierte der Verlauf der kumulativen Frequenz, dass nicht nur mehr Azini invasiv wurden, sondern die Invasion auch früher auftrat (Abbildung 46B). Nach 20 h waren es durch die OHT-Behandlung bereits 71 % invasive Azini, während ohne OHT Zugabe zu diesem Zeitpunkt erst 15 % invasive Azini nachweisbar waren. Dieser Effekt einer sehr frühen Invasion wurde auch bei Azini auf einer tumorassoziierten Steifigkeit von 12 kPa beobachtet. Die OHT unbehandelten Proben wiesen bereits eine Invasionshäufigkeit von 88 % auf. Diese wurde durch die hRas-Aktivierung nochmals auf 100 % gesteigert. Bereits innerhalb von 25 h waren alle Azini invasiv (Abbildung 46B).

Im Vergleich zu den Invasionsevents der Wt Azini (Abbildung 46C) zeigen die mit OHT behandelten MCF10A-ER:hRas Azini auf einer TumorstEIFigkeit von 12 kPa demnach eine deutlich frühzeitigere Invasion als Wt Azini unter den invasivsten Bedingungen (12 kPa, EGF-Behandlung). Selbst Wt Azini (allerdings hd-BM Azini auf 0,12 kPa), die einer zusätzlichen proteolytischen Degradation der BM durch die Kollagenase IV Behandlung ausgesetzt waren, erreichten erst nach ca. 45 Stunden eine Invasivität von 100 % (Abbildung 46B und C).

Der direkte Vergleich der Invasionshäufigkeit von Wt Azini in einer tumorassoziierten Mikroumgebung (12 kPa, mit und ohne EGF-Behandlung) mit den hRas Azini verdeutlicht eine generell höhere Invasivität der Azini der hRas-Variante. So lag die Invasionshäufigkeit des unbehandelten (d.h. ohne EGF) ld-BM Wt Azini bei 28 %, wohingegen die unbehandelten hRas Azini (Kontrollgruppe) bereits eine Invasivität von 88 % (jeweils auf einem 12 kPa steifen Substrat) aufwiesen. Selbst eine deutliche Steigerung der Invasion auf 82 % durch die EGF-

Behandlung führte nicht zu einer höheren Invasivität als bei den unbehandelten hRas Azini auf einer Tumorsteifigkeit (Abbildung 46B und C).

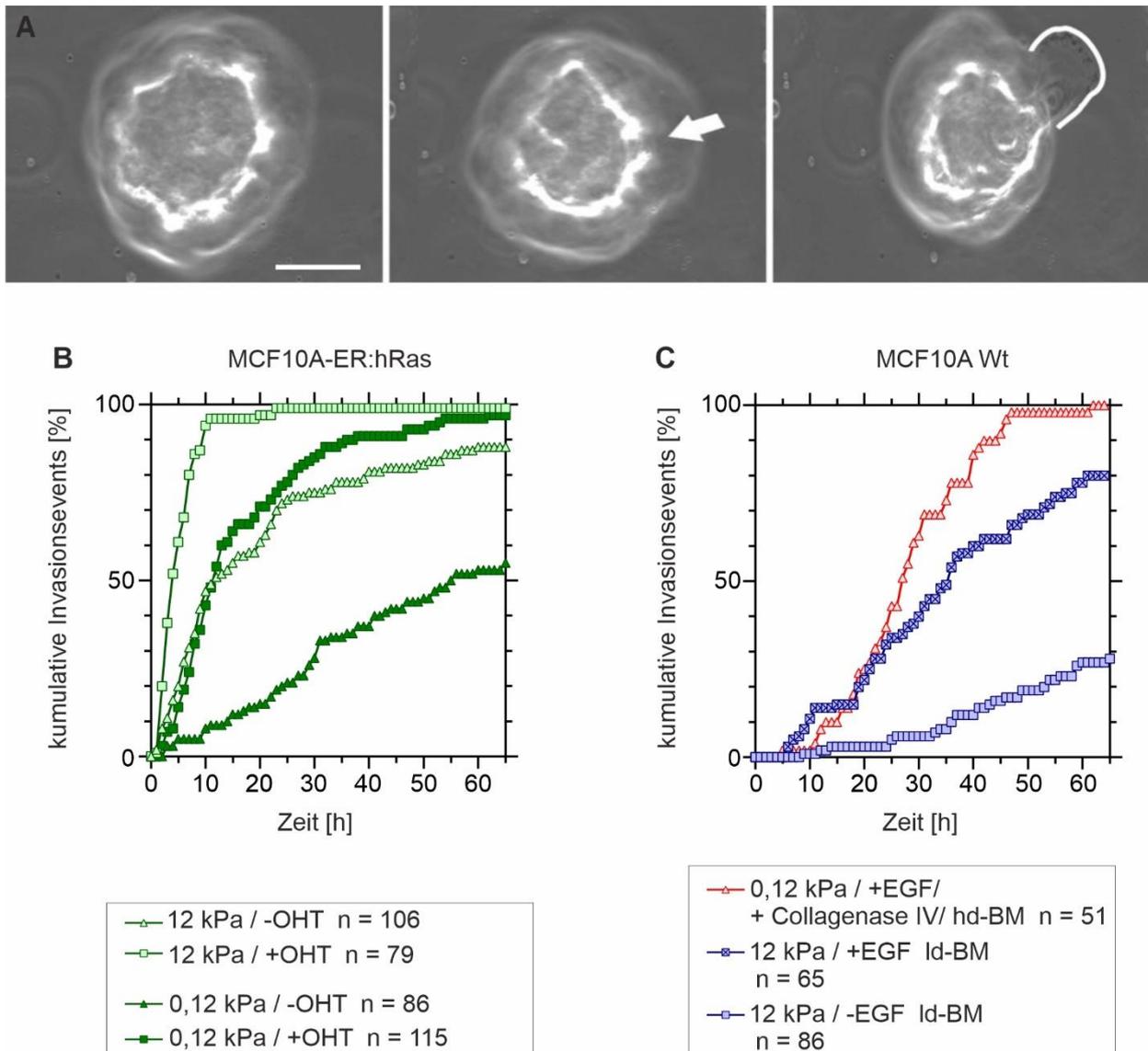


Abbildung 46: Eine hRas-Aktivierung und die EZM-Versteifung erhöhten die Invasivität von Brustsphäroiden. (A) Die Durchlichtaufnahmen zeigen den Invasionsprozess von MCF10A Azini. Während des Invasionsassays (beschrieben in Abbildung 15) wurden lokale Veränderungen in der BM sichtbar (weißer Pfeil) gefolgt von einer ersten Zelle (weiß umrandet), die durch die BM migrierte. Dieser Zeitpunkt wurde als Invasionszeitpunkt definiert. (B) Kumulative Invasionsereignisse der BM-Transmigration über 65 h von MCF10A-ER:hRas Azini in Abhängigkeit von der Substratsteifigkeit (0,12/12 kPa) und der OHT-Behandlung (+/- OHT). (C) Kumulative Invasionsereignisse der BM-Transmigration über 65 h von MCF10A Wt Azini in Abhängigkeit von der Substratsteifigkeit (0,12/12 kPa) und der chemischen Behandlung (+/- EGF, Kollagenase). Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Azini von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Maßstab = 50 μ m. Die Versuche zu B wurden teilweise von Yannick Herfs (betreuter Auszubildender) und Johannes Dagge (betreuter Bachelorstudent) durchgeführt. In Abbildung C: Daten der +EGF-Gruppen von Dr. Aljona Gaiko-Shcherbak.

Eine Steigerung der Invasion durch die Aktivierung von hRas konnte außerdem bereits in der EHS-Matrix beobachtet werden. In je zwei unabhängig durchgeführten Versuchen pro Kondition wurden Azini in der physiologischen EHS-Matrix mit OHT bzw. ohne OHT behandelt. Während bei den -OHT Azini 0 % (0/19) der Azini invasiv geworden sind, wiesen in der +OHT Gruppe insgesamt 41 % eine invasive Transition auf (11/27). Zusätzlich konnte über 65 Stunden beobachtet werden, dass das Zellvolumen der mit OHT behandelten Proben zunahm und die kohärente Zellbewegung vermehrt auftrat (Abbildung 47). Bei den -OHT Azini konnte nur selten eine kohärente Zellbewegung über 65 Stunden festgestellt werden. Dies bestätigte eindeutig den spezifischen Effekt auf die Invasion und die azinare Zellaktivität unabhängig von einem Steifigkeitseinfluss nach der hRas-Aktivierung. Aber auch die beschriebene Invasionsabhängigkeit in Folge der pro-invasiven Stimulation durch die Steifigkeit konnte hiermit bestätigt werden, da im Vergleich zu steifen Substraten deutlich weniger Azini invasiv geworden sind.

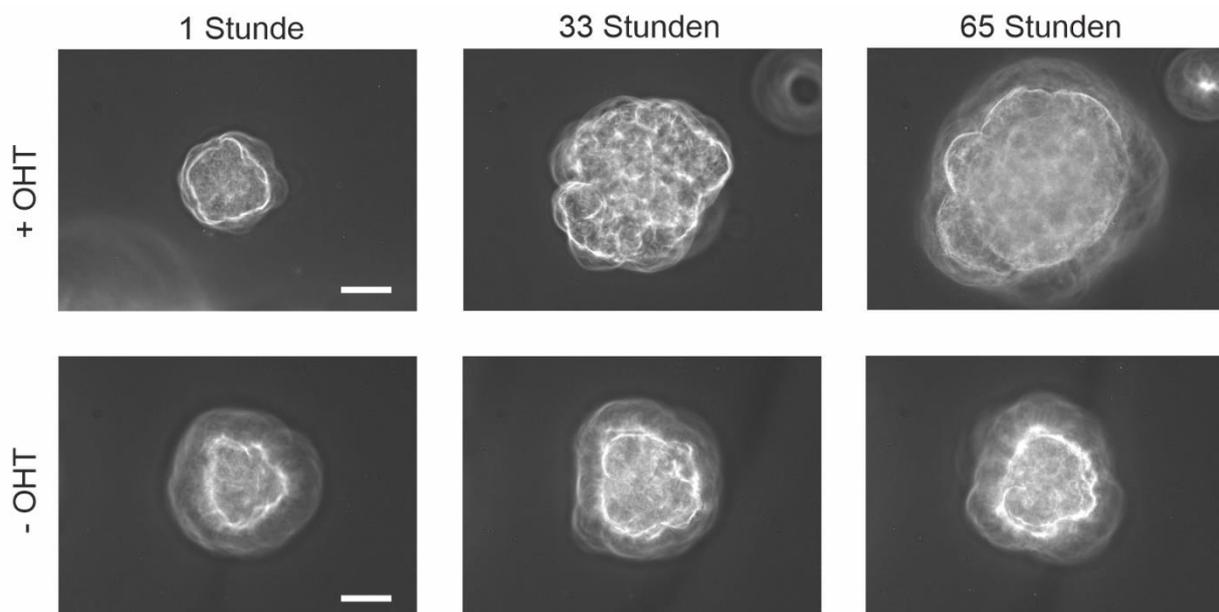


Abbildung 47: Morphologische Veränderungen von Brustazini durch eine hRas Aktivierung. Repräsentative Durchlichtaufnahmen von MCF10A:ER-hRas Azini in einer physiologischen EHS-Gelmatrix nach 1 h, 33 h und 65 h mit OHT (+OHT) und ohne OHT (-OHT). Maßstab = 50 μ m

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die kontraktile Zellkraft als pro-invasiver Faktor im BM-Invasionsprozess definiert (vgl. Abschnitt 3.1). Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die hohe Invasivität der MCF10A-ER-hRas Azini mit einer Erhöhung der zellulären Kräfte und somit einer Steigerung des BM-Stresses einherging.

Wie in Abschnitt 3.3.6 wurde die SF-Formation durch die Inhibition von Myosin II verhindert. Dadurch wurde die Anzahl der Invasionsevents bei der invasivsten Gruppe der MCF10-ER:hRas Azini (12 kPa, +OHT) nicht gesenkt (Abbildung 48A). Dieser Versuch zeigte, dass die Myosin II Inhibition keinen Einfluss auf die Invasionshäufigkeit in hRas induzierten Azini hatte. Die minimale zeitliche Verzögerung wurde nicht als biologisch relevant gewertet. Auch eine zusätzliche Inhibition der Matrix-Metalloproteasen konnte die Invasionsrate nicht reduzieren (Abbildung 48B).

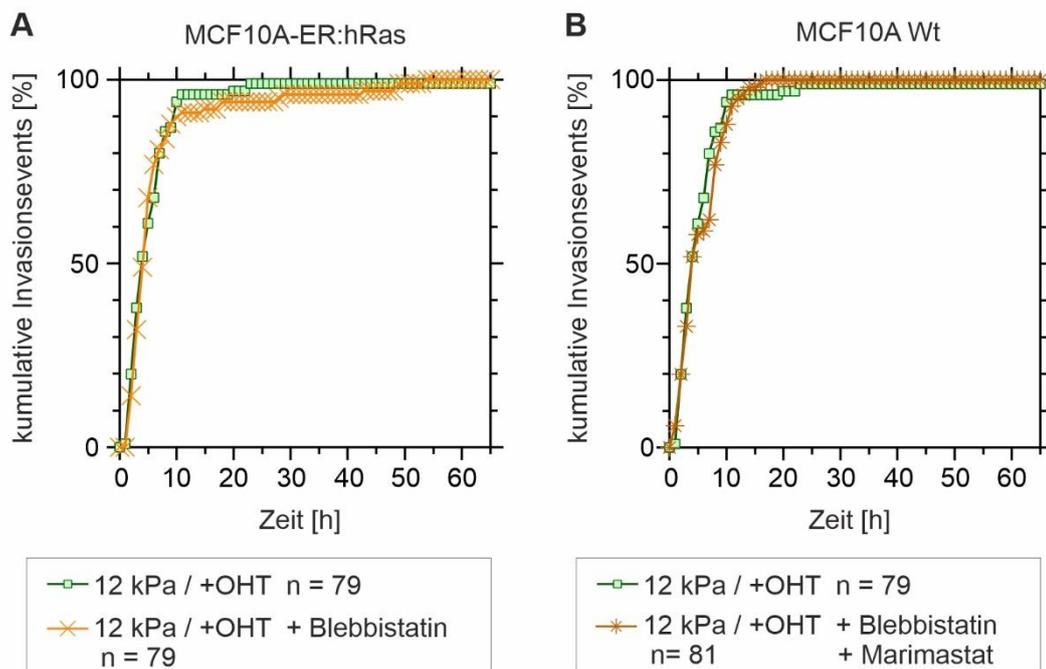


Abbildung 48: Die hRas induzierte Invasion ist unabhängig von der Myosin II- und MMP-Aktivität. Vergleich von MCF10A-ER:hRas Azini mit OHT behandelt auf einem tumorassoziierten 12 kPa Substrat. Kumulative Invasionsevents der BM-Transmigration über 65 h von OHT behandelten Azini (aus Abbildung 46B) im Vergleich zu (A) Azini, die zusätzlich mit Blebbistatin sowie (B) mit Blebbistatin und Marimastat behandelt wurden. Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Azini von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Versuche wurden teilweise von Yannick Herfs (betreuer Auszubildender) durchgeführt.

Eine Inhibition der Myosin II vermittelten Zellkraft hatte keine Reduzierung der Invasionshäufigkeit zur Folge. Zur Überprüfung, ob die spezifische Inhibition von Myosin II gelang, und zur Überprüfung der Ergebnisse der Invasionsanalyse wurde die Zugkraftmikroskopie-Methode angewandt.

In Abschnitt 3.3.6 konnte bereits gezeigt werden, dass die Inhibition von Myosin II dazu führte, dass keine SF gebildet wurden und dementsprechend keine Zellkraft vermittelte Deformation des unterliegenden Substrates auftrat. In der Abbildung 49 wurden Zellkräfte zum Zeitpunkt der

Invasion analysiert. Während die Zellkräfte durch die EGF-Behandlung bei MCF10A Wt Azini gesteigert wurden und somit durch den erhöhten BM-Stress zu einer höheren Invasionsrate beitrugen, waren die Zellkräfte der MCF10A-ER:hRas Azini zum Zeitpunkt der Invasion nicht erhöht durch die Zugabe von OHT (Abbildung 49). EGF steigerte die Myosin II vermittelten Zellkräfte demnach deutlich, eine hRas Induktion hingegen nicht. Die jeweils unbehandelten Azini (-EGF und-OHT) wiesen die gleiche Zellkraft auf. Im Vergleich zu den Wt Azini waren die Kräfte der Azini der hRas-Variante generell nicht erhöht, sodass die Myosin II vermittelten Zellkräfte die generell gesteigerte und OHT induzierte Invasion der MCF10A-ER-hRas Azini nicht erklären konnten.

Trotzdem konnte eindeutig die Inhibition der Zellkräfte nachgewiesen werden. Sowohl im Wt als auch bei der hRas-Variante konnte zum Invasionszeitpunkt eine deutliche Reduktion der Zellkräfte mit einer Blebbistatin-Behandlung detektiert werden (Abbildung 49).

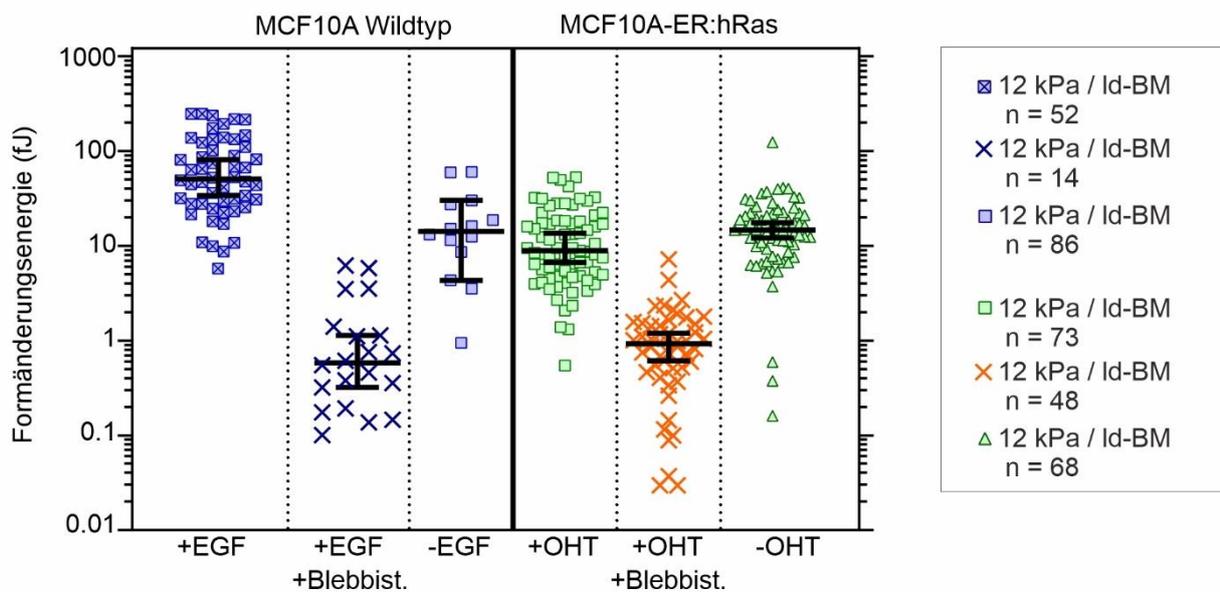


Abbildung 49: Vergleich der Myosin II vermittelten Zellkraft von invasiven hRas und Wt Azini. Übersicht der detektierten Formänderungsenergien zum Zeitpunkt der BM-Invasion bei MCF10A Wt Azini (links) und MCF10A-ER:hRas Azini (rechts) in Abhängigkeit von der chemischen Behandlung (mit EGF, OHT und Blebbistatin). Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Azini von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten (Ausnahme: Wt + EGF + Blebbistatin: 2 unabhängige Versuche). Die Versuche wurden teilweise von Yannick Herfs (betreuter Auszubildender) durchgeführt. Daten der MCF10A Wt Azini (Gruppe +EGF) stammen von Aljona Gaiko-Shcherbak.

3.5.1 MCF10A:ER-hRas Azini weisen invasive Veränderungen im Aktin-Zytoskelett auf

Die Myosin II vermittelten Zellkräfte konnten die drastisch gesteigerte Invasion bei MCF10A-ER:hRas Azini gegenüber Wt Azini und der zusätzlichen Steigerung nach hRas-Aktivierung nicht erklären, Daher sollte im Folgenden analysiert werden, wodurch die hohe Invasivität zustande kam. In einem ersten Schritt wurde die Azinus-BM-EZM Kontaktfläche analysiert, da in diesem Bereich die Invasion stattfindet.

In Anlehnung an die Analysen aus der Abbildung 29, in der die Transition von MS- zu SF-Zellen sowie die zunehmende MS-Dichte in MS-Zellen (Abbildung 50A und B, jeweils Daten der Wt Azini) beschrieben wurden, konnten die Aktin-Strukturen an der Kontaktfläche der hRas-Variante analysiert werden. Eine Kultivierung von 24 h auf Glas war auf Grund der hohen Invasivität für eine Grenzflächen-Analyse nicht möglich. Daher wurden die MCF10A-ER:hRas Azini nur hinsichtlich des Unterschieds einer siebenstündigen OHT- bzw. EtOH-Behandlung analysiert. Nach einer siebenstündigen hRas-Aktivierung war kein Unterschied bei den Aktin-Strukturen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. Im Vergleich zu Wt Azini nach einer Stunde Adhäsionszeit auf Glas zeigten sich an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche viele MS Zellen mit einer höheren MS-Dichte (Abbildung 50A).

Diese Beobachtung konnte über die Bestimmung des Bedeckungsgrads der MS bei MCF10A-ER:hRas Azini bestätigt werden. Bereits nach einer Stunde auf Glas und sieben Stunden +/-OHT-Behandlung lag der MS-Bedeckungsgrad (19,29 bzw. 19,48 % im Median) minimal über einem Level, der beim Wt erst durch die 24 stündige Kultivierung mit EGF auf Glas auftrat (17,59 %). Es wurde demzufolge kein signifikanter Unterschied zwischen der OHT und EtOH behandelten Kontrollgruppe gemessen.

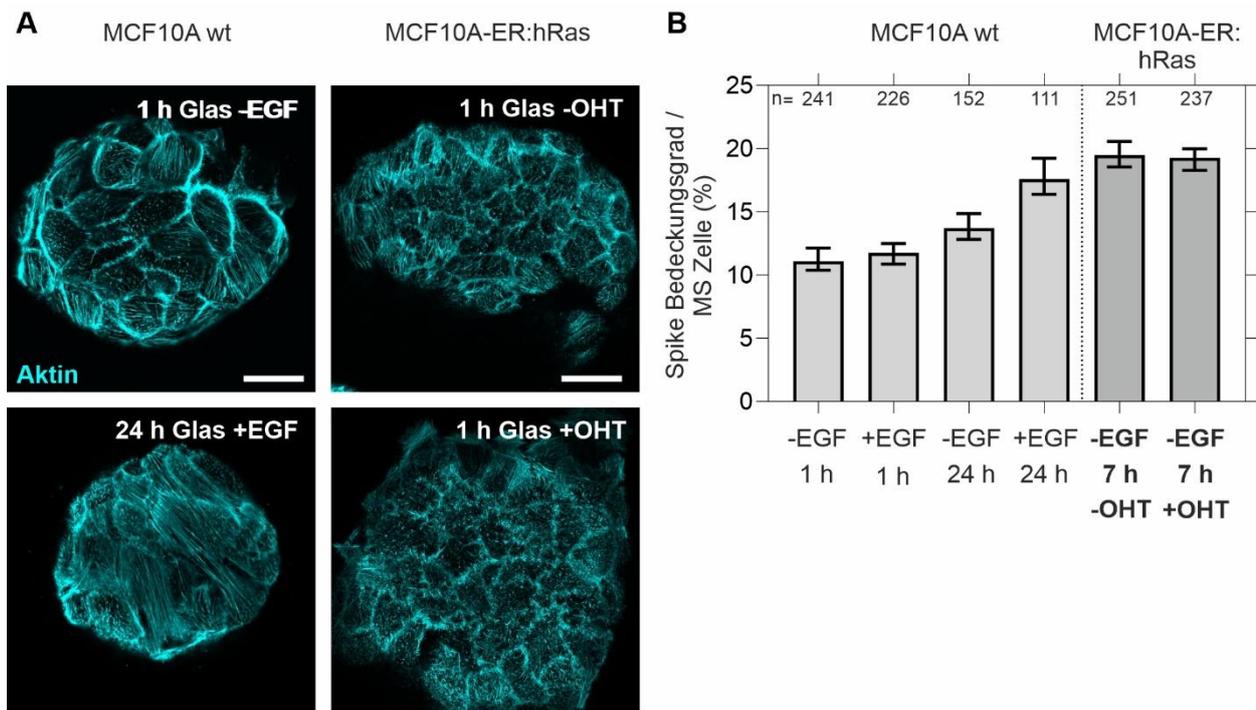


Abbildung 50: MCF10A-ER:hRas Azini weisen eine hohe MS-Dichte an der Zell-BM-EZM Grenzfläche auf. (A) Die konfokalen Aufnahmen zeigen die Dichte von kortikalen Aktin-Strukturen in der basalen Zellschicht von fixierten MCF10A Wt (links ohne und mit EGF-Behandlung) und MCF10A-ER:hRas Azini (rechts ohne und mit OHT-Behandlung) an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche. (B) Das Balkendiagramm zeigt den MS-Bedeckungsgrad in MS-Zellen abhängig von der Mikroumgebung (MCF10A Wt: EGF-Behandlung und Dauer auf Glas; MCF10A-ER hRas: Dauer der OHT-Behandlung, davon eine Stunde auf Glas). MCF10A Wt Bilder (A) und Daten (B) wurden aus der Abbildung 29D wiederverwendet. Cyan = Aktin. Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Bilder von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Balkendiagramm: Median mit 95% Konfidenzintervall. Maßstab = 20 μ m. Die Versuche wurden teilweise von Yannick Herfs (betreuter Auszubildender) durchgeführt.

Bei Betrachtung der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche wurde auch die Struktur der BM in diesem Bereich analysiert. Exemplarisch sind in der Abbildung 51A zwei invasive Zellen abgebildet. Zusätzlich konnten mittels IF-Aufnahmen auch Veränderungen in der BM identifiziert werden. Die BM von hRas Azini war in einem deutlich poröseren Zustand (Abbildung 51A und B). In einem Vergleich zu der BM eines Wt Azini (Abbildung 51C) war das Kollagen IV Signal auch in den MS-Bereichen, in denen die BM-Poren vorlagen, kompakter.

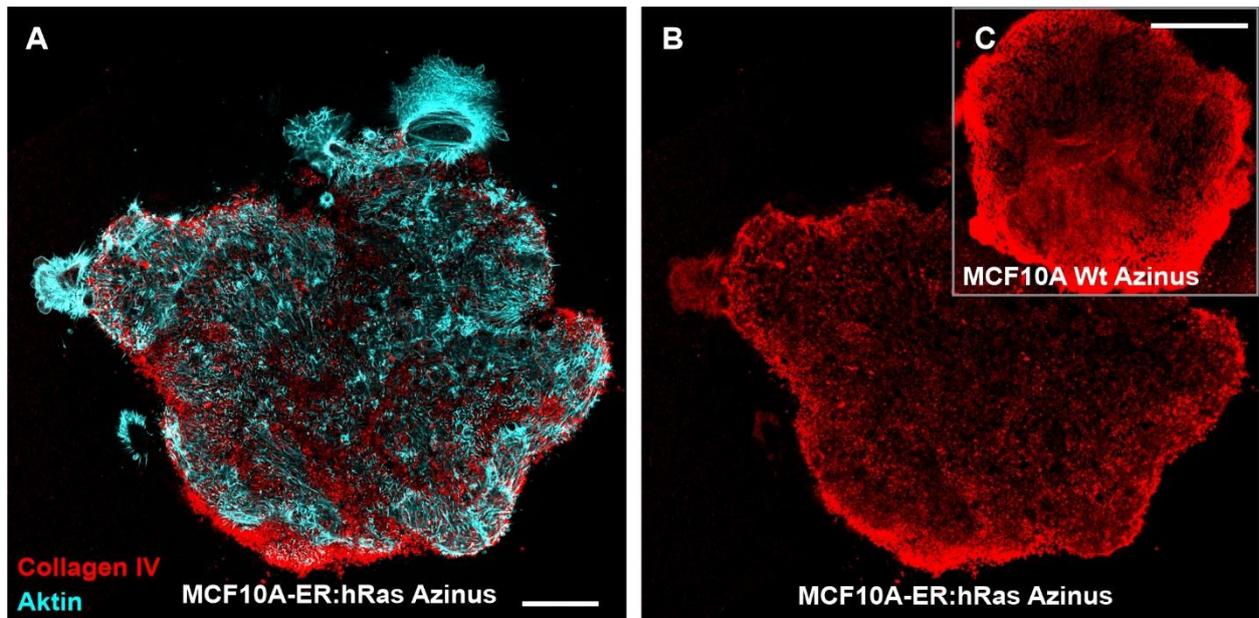


Abbildung 51: Die BM von MCF10A:ER-Ras Azini ist poröser im Vergleich zu Wt Azini. (A und B) Die repräsentative konfokale Aufnahme zeigt die basale Zellschicht mit invasiven Zellen eines fixierten MCF10A-ER:hRas Azinus an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche. Das Kollagen IV Netzwerk der BM ist im Vergleich zu dem (C) MCF10A Wt poröser. Rot = Kollagen IV; Cyan = Aktin. Maßstab = 20 μm . Azini aus C wurde aus

Bevor die BM-Maturierung detaillierter untersucht werden sollte, wurden die Sphäroide nochmals intensiver im Hinblick auf eine mögliche Ursache für eine porösere BM analysiert. Die bis dato gemessenen Myosin II induzierten Zellkräfte waren nicht entscheidend für den Invasionsprozess bzw. konnten nicht die gesteigerte Invasion der MCF10A-ER:hRas Azini erklären. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die MS in hRas Azini auch an einer Kraftübertragung auf die EZM beteiligt sind. Dazu wurde die Co-Lokalisierung der Aktin-MS an der Kontaktfläche mit pMLC nachgewiesen (Abbildung 52). Die in dieser Arbeit durchgeführten Zugkraftanalysen erlaubten die Messung der tangentialen Substratdeformation, verursacht durch die kontraktile Zellkraft der azinaren Zellen. Eine Myosin vermittelte Kraftübertragung über pMLC könnte aber auch vertikal erfolgen (Ziehen und Drücken), wie eigene Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe bewiesen haben [33]. Die Co-Lokalisation der Aktin-MS und pMLC deutete demnach wie bei Wt Azini auf eine Myosin II vermittelte vertikale Kraftausübung der MS von hRas Azini hin.

Zur Messung dieser vertikalen Substratdeformation wurde die elastische Resonator-Interferenz-Stress-Mikroskopie (ERISM) durchgeführt. Die Auswertung der ERISM-Messung lag zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht von unserem Kooperationspartner (AG Malte Gather, Uni Köln) vor. Daher kann hier zusammenfassend nur ein möglicher Zusammenhang zwischen einer erhöhten MS-Dichte und einer poröseren BM vermutet werden.

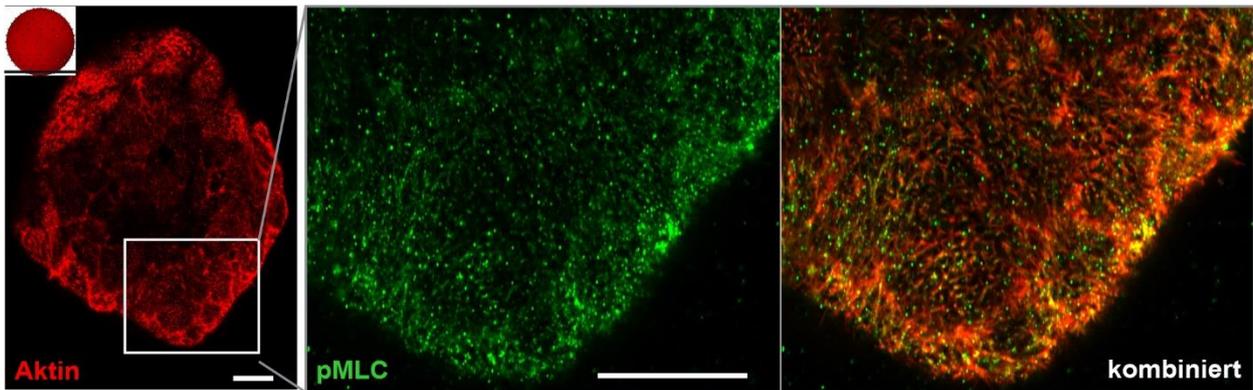


Abbildung 52: Aktin-MS in hRas Azini co-lokalisieren mit pMLC. Die Höhe des konfokal aufgenommenen Querschnitts ist durch den horizontalen schwarzen Balken im schematisch rot dargestellten Azinus angegeben. Die repräsentative konfokale Aufnahme zeigt die Aktin-MS-pMLC Co-Lokalisierung in der basalen Zellschicht von fixierten MCF10A-ER:hRas Azini an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche. Rot = Aktin; Grün = pMLC. Maßstab = 20 µm.

Weiterhin wurden die Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts bei den MCF10A-ER:hRas bereits thematisiert. Bisher beschrieben wurde vor allem die erhöhte MS-Dichte. Zudem waren regelmäßig bereits Zellen mit invasiven Zelleigenschaften (elongierte Fortsätze und Umbau des kortikalen Aktin-Netzwerkes zur Migration) an der Kontaktfläche innerhalb der azinaren Struktur erkennbar (Abbildung 53A). Dieses Ergebnis steht im klaren Gegensatz zu MCF10A Wt Azini, bei denen solche Zellen nur außerhalb des azinaren Zellverbundes detektiert wurden, nachdem diese die BM passiert hatten. Ebenfalls nicht vorhanden in dieser Form bei zehn Tage alten Wt Azini waren zellfreie Bereiche zwischen den Zellen bzw. intrazelluläre Spalten. Während bei MCF10A Wt Azini die Zell-Zell-Grenzen klar aneinandergrenzten, befanden sich bei den MCF10A-ER:hRas Azini minimale Abstände (intrazelluläre Spalten) zwischen den azinaren Zellen. In diesen Spalten bildeten sich zudem MS zwischen den Zellen (Abbildung 53B). Sogar bei eng aneinander liegenden azinaren Zellen bildeten sich MS-artige Strukturen aus. Das Aktin-Signal dieser Strukturen lag teilweise auch noch in der Nachbarzelle vor, sodass der Eindruck einer Penetration in die benachbarte Zelle dieser MS vorlag (Abbildung 53C).

Zusätzlich bildeten sich im Bereich der Äquatorialebene der Azini teilweise zellfreie Bereiche. Die angrenzenden Zellen zeigten auch hier MS, die in den interazinaren zellfreien Bereich hineinragten (Abbildung 53D).

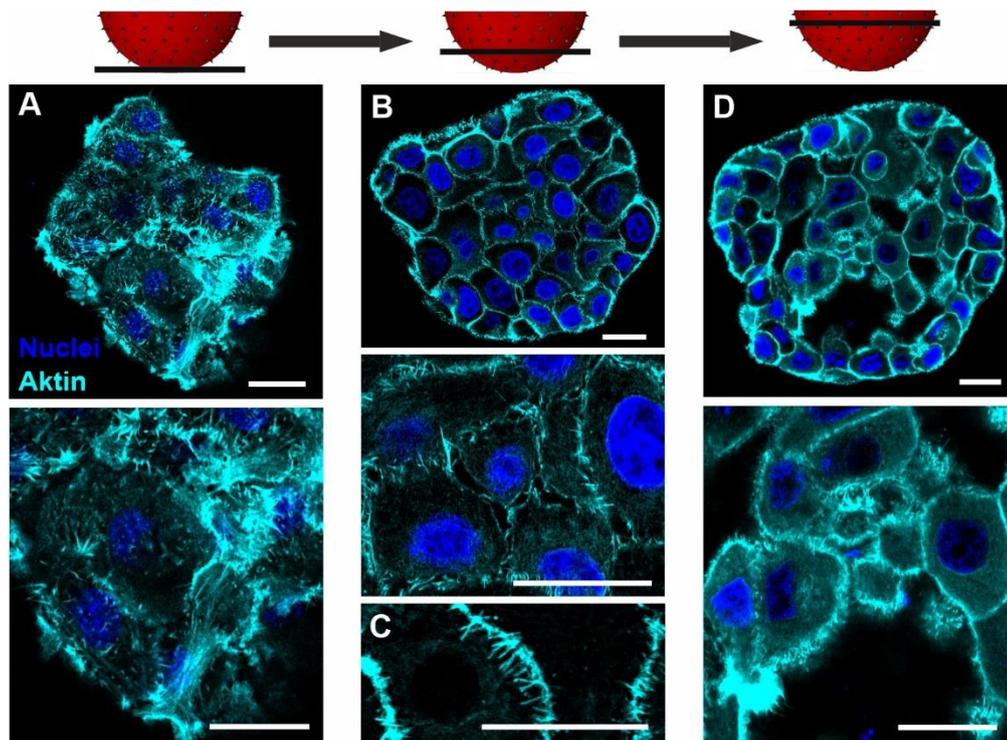


Abbildung 53: Zytoskelettale Strukturen von MCF10A-ER:hRas Brustsphäroiden. Die schematische Darstellung illustriert die Analyseebene der repräsentativ konfokal aufgenommenen Querschnitte (fixierte MCF10A-ER:hRas Azini (-OHT)) (A) Die basale Zellschicht an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche wies innerhalb des azinaren Zellverbundes Zellen mit invasiven Eigenschaften wie elongierten Zellfortsätzen auf (oben: Übersicht, unten: Vergrößerung einzelner invasiver Zellen). (B) Zwischen den azinaren Zellen an den Zell-Zell-Verbindungen entstanden Hohlräume, in denen MS zu beobachten waren (oben: Übersicht, unten: Vergrößerung der Hohlräume). (C) Die Vergrößerung zeigt MS in dem Bereich wo zwei Zellen eng aneinander liegen. (D) Im Bereich der Äquatorialebene des Azinus bildeten sich teilweise größere Hohlräume (oben: Übersicht), in denen lange MS zu erkennen waren (unten: Vergrößerung der MS in Hohlräumen). Cyan = Aktin; Blau = Nuclei. Maßstab = 20 μm .

Zusammen mit dem Ergebnis der poröseren BM an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche und der veränderten Organisation der azinaren Zellen bestätigen diese Ergebnisse den Eindruck eines instabileren Zellverbundes als bei Wt Azini. Bei diesen Ergebnissen konnten jedoch keine hRas induzierten Unterschiede identifiziert werden. Bisher konnten somit nur Unterschiede im Vergleich zu MCF10A Wt Azini gezeigt werden, einen spezifischen OHT induzierten hRas Effekt zur Erklärung der gesteigerten Invasion durch hRas muss noch gefunden werden. Daher wurde die BM-Stabilität, die möglicherweise durch die pMLC abhängige mechanische Aktivität der MS beeinflusst werden könnte, untersucht.

3.5.2 Die hRas-Aktivität verringert die BM-Integrität von Brustsphäroiden

Bisher wurde nachgewiesen, dass die MCF10A-ER:hRas Azini basoapikal polarisierte Azini mit einer kontinuierlichen BM ausbilden. Da jedoch im Hinblick auf die BM an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche deutliche Unterschiede in der Porosität zum Wt nachgewiesen wurden und die Funktion als Invasionsbarriere auf Grund der frühen Invasion gestört zu sein schien, wurde die BM-Maturierung der Azini analysiert. Das Intensitätssignal von Kollagen IV wurde hierfür indirekt als Indikator für die Maturierung und somit die Widerstandsfähigkeit der Invasionsbarriere der BM genommen.

Die Abbildung 54A vergleicht die Kollagen IV Fluoreszenzintensitätssignale von MCF10A Azini des Wt und der hRas-Variante (+/- OHT-Behandlung). In Kombination mit zusätzlich angegebenen repräsentativen IF-Aufnahmen wurde eine graduelle Abnahme des Kollagen IV Intensitätssignal deutlich. Diese verminderte Einlagerung von Kollagen IV korreliert mit der gezeigten Invasivität der Azini (Abbildung 54A). Die invasivsten Azini wiesen auch das geringste Kollagen IV Intensitätssignal auf. Die Wt Azini mit der geringsten Invasivität wiesen ein signifikant höheres (2,6-faches) Intensitätsniveau im Vergleich zu den unbehandelten MCF10A-ER:hRas Azini auf. Die Intensität des BM-Signals bei Azini der hRas-Variante wurde durch die hRas-Aktivierung nochmal signifikant reduziert (1,6-fach weniger im Vergleich von -OHT zu +OHT). Eine sekundäre Antikörperkontrolle wurde mitgeführt, um auszuschließen, dass keine Färbeartefakte ausgewertet wurden (Abbildung 54A).

Zur möglichen Erklärung der graduellen Abnahme des Kollagen IV Intensitätssignals wurde zusätzlich MT1-MMP gefärbt. Die MT1-MMP ist für ihre proteolytische Aktivität bekannt und könnten die BM degradieren. Angelehnt an die Analyse zur Kollagen IV Intensität wurde die MT1-MMP Intensität detektiert, als potenzieller Nachweis für die proteolytische Aktivität der basalen Zellen. Zwischen den untersuchten Azini trat kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das beschriebene Signal (vgl. Wt-Färbung: Abbildung 26) in der basalen Zellmembran von MT1-MMP auf. Die hRas Azini wiesen ein nahezu identisches Intensitätslevel auf, bei WT Azini lag tendenziell ein leicht erhöhtes Level von nachgewiesenem MT1-MMP vor (Abbildung 55C). Die graduelle Schwächung der BM war folglich nicht auf eine direkte Beteiligung der MT1-Matrix-Metalloprotease zurückzuführen.

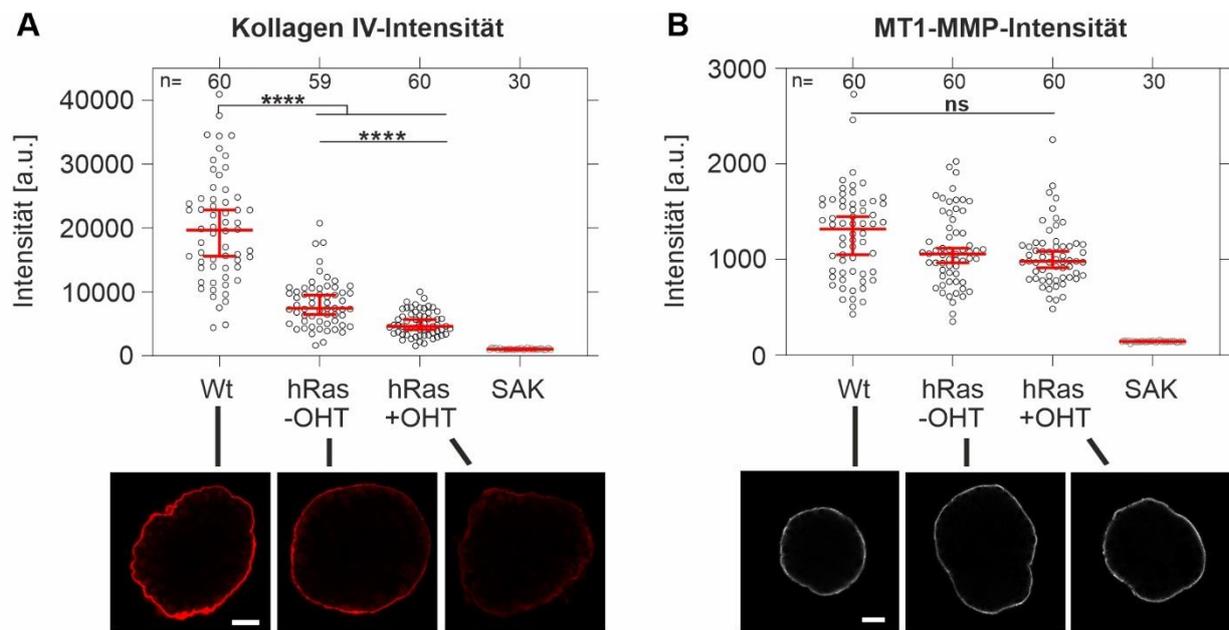


Abbildung 54: Die hRas-Aktivität resultiert in einer graduellen Schwächung der BM. Vergleich zwischen zehn Tage alten MCF10A Wt und MCF10A-ER:hRas (+ und -OHT) Azini. Die konfokalen Aufnahmen wurden 20 μm über dem Glas aufgenommen. **(A)** Quantifizierung des Kollagen IV Fluoreszenzintensitätssignals (SAK = Sekundäre Antikörperkontrolle) mit repräsentativen Bildern zum Nachweis von Kollagen IV in 3D bei MCF10A-ER:hRas Azini mit OHT-Behandlung (16 h (+OHT)) im Vergleich zu unbehandelten Azini (16 h (-OHT)) und MCF10A Wt Azini. **(B)** Quantifizierung des MT1-MMP Fluoreszenzintensitätssignal (SAK = Sekundäre Antikörperkontrolle) mit repräsentativen Bildern zum Nachweis von MT1-MMP in 3D bei MCF10A-ER-hRas Azini mit OHT-Behandlung (16 h (+OHT)) im Vergleich zu unbehandelten Azini (16 h (-OHT)) und MCF10A Wt Azini. Rot = Kollagen IV; Grau = MT1-MMP. Probenanzahl n: Anzahl der analysierten Bilder von mindestens drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Streudiagramm: Median mit 95% Konfidenzintervall. Maßstab = 20 μm . Die Versuche wurden teilweise von Yannick Herfs (betreuter Auszubildender) durchgeführt.

3.5.3 Myosin X könnte an der Invasion in MCF10A Azini beteiligt sein

Myosin X wird mit zytoskelettalen Veränderungen während der Tumorprogression in Verbindung gebracht. Ein Beispiel hierfür ist die Beteiligung an der Bildung von aktinbasierten invasionsfördernden Zellfortsätzen. Daher wurde im Folgenden analysiert, ob Myosin X in den hRas Azini exprimiert wird.

Die Abbildung 55 visualisiert die Lokalisierung von Myosin X in hRas Azini. Bei zehn Tage alten MCF10A-ER:hRas Azini ohne OHT Zugabe war die basale Zellschicht stark positiv für Myosin X (Abbildung 55A). Zusätzlich war Myosin X eindeutig in den Spitzen der lateralen Aktin-MS lokalisiert (Abbildung 55B). Eine vergleichbare Verteilung von Myosin X wurde bei hRas induzierten Azini detektiert (Abbildung 55C und D). Sowohl bei induzierten als auch bei nicht

induzierten hRas Azini konnten viele Aktin-MS detektiert werden, die häufig eine Co-Lokalisation von Myosin X in den Spitzen der Aktin-MS aufwiesen.

Außerdem waren einzelne azinare Zellen positiv für das Motor-Protein Myosin X. Das galt neben den beschriebenen basalen Zellen auch für luminale Zellen. Außerdem konnte Myosin X in den Spitzen der Aktin-MS nachgewiesen werden, die von luminalen Zellen in die intrazellulären Spalten gebildet wurden (Abbildung 55E).

Diese Färbung deutete darauf hin, dass Myosin X an der Fortsatzbildung beteiligt ist und unterstreicht die mögliche invasionsfördernde Wirkung dieser aktinbasierten MS, da Myosin X selbst mit der Invasion verknüpft ist. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich neue Fragestellungen, die im Folgenden in dieser Arbeit diskutiert werden sollen, da aus zeitlichen Gründen keine weiteren Versuche mehr folgen konnten.

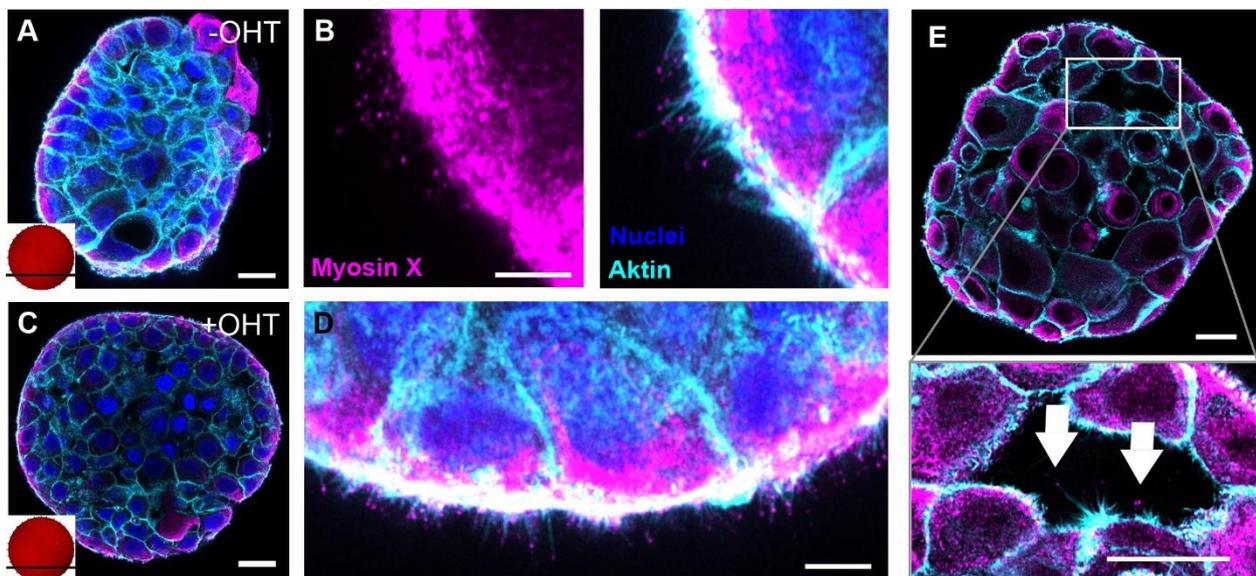


Abbildung 55: Myosin X ist in den Spitzen lateraler MS lokalisiert. MCF10A-ER:hRas Azini (zehn Tage alt) wurden fixiert und mittels IF gefärbt. Die Höhe des konfokal aufgenommenen Querschnitts ist durch den horizontalen schwarzen Balken im schematisch rot dargestellten Azinus angegeben (A,C). (A,C) Übersichtsbilder von Azini (16 h mit EtOH behandelt (-OHT) (A) und 16 h mit OHT behandelt (+OHT) (C)) positiv für Myosin X in der äußeren basalen Zellschicht und (B,D) lokalisiert in den Spitzen der lateralen MS. (E) Übersichtsbild zur Visualisierung der Hohlräume (oben) innerhalb eines Azinus. Luminale Zellen bilden MS aus, die Myosin X in den Spitzen aufweisen (unten). Cyan = Aktin; Magenta= Myosin X; Blau = Nuclei. Maßstab = 20 µm.

4 Diskussion

Die weltweit hohen Brustkrebs-Inzidenzen verdeutlichen die Notwendigkeit der Brustkrebsforschung. Das humane Mammakarzinom ist seit Jahrzehnten eine der meist diagnostiziertesten Tumorentitäten bei Frauen weltweit und dementsprechend in vielen Ländern auch führend in Bezug auf die Mortalität. Obwohl moderne *Screening*-Methoden die Früherkennung und somit die Krankheitsprognosen und -verläufe deutlich verbessert haben, besteht trotz dessen ein großer Bedarf an neuen Therapiemethoden [178].

Von besonderem Interesse ist die Verhinderung der Metastasenbildung. Nicht der Primärtumor, sondern die Invasion der Zellen in benachbartes Gewebe und in die Blutbahn verursachen durch die Bildung von Metastasen den Großteil aller Todesfälle [179, 180]. Während die Behandlung von Primärtumoren vielfach gute Ergebnisse erzielt, ist es klinisch deutlich problematischer einen metastasierten Tumor zu behandeln [181]. Zusätzlich limitiert die große Diversität (vgl. Abschnitt 1.1) die erfolgreiche Entwicklung von Wirkstoffen, die auf eine breite Masse an Patienten anwendbar ist, sodass es teilweise noch keine zugelassenen Therapiemöglichkeiten für spezielle Subtypen gibt [182, 183]. Daher wäre ein besseres Verständnis der frühen Schritte im Metastasierungsprozess von großem Vorteil. Hierzu zählt die Invasion von tumorigenen Zellen durch eine Basalmembran (BM). Die Überwindung dieser physikalischen Barriere ist der Schlüsselschritt einer beginnenden Metastasierung [184]. Dieser Schritt ist vermutlich unabhängig von der molekularen Zusammensetzung des Tumors, sodass eine Inhibition dieses Vorgangs einen großen Einfluss auf die Entwicklung von Brustkrebstherapien haben würde. Zudem stellt die BM-Schwächung und -Zerstörung ein sehr frühes Ereignis in der Tumorprogression dar. Im Gegensatz zu vielen aktuellen Behandlungsmethoden, die nur bei spezifischen Subtypen angewandt werden können, bietet die Betrachtung der BM als Invasionsbarriere einen Therapieansatz, der möglicherweise eine große Patientenmenge ansprechen könnte.

Derzeit sind viele der involvierten Faktoren und deren gegenseitige Wechselwirkungen nicht vollends verstanden. Zum Beispiel scheiterten vielversprechende MMP-Inhibitoren in klinischen Testphasen, sodass zunehmend andere Invasionsmechanismen erforscht und genauer untersucht werden [38]. So hat die Analyse der mechanobiologischen Einflüsse auf den Invasionsvorgang in den letzten Jahren an immer größerer Bedeutung gewonnen und wurde auch in dieser Arbeit anhand von 3D Zellkulturmodellen weitergehend erforscht.

4.1 Die Funktion von aktinbasierten Zellfortsätzen im Invasionsprozess

Zur Erforschung des Invasionsprozesses gewinnen *in vivo* ähnliche Zellkulturmodelle immer mehr an Bedeutung. Zwar genießt die Analyse von Einzelzellen oder Zellmonolagen viele Vorteile auf Grund der einfachen Kultivierung, doch sind die hier gewonnenen Ergebnisse oft nicht auf komplexere 3D- oder *in vivo*-Modelle übertragbar, da vor allem die regulatorischen Einflüsse (z.B. Steifigkeit und Wachstumsfaktoren) einer EZM fehlen [52]. Die Etablierung von dreidimensional wachsenden Brustdrüsenepithelzellen auf einer rekonstituierten Basalmembran-artigen Matrix imitiert eine solche natürliche Zellumgebung. Azini, gebildet aus der nicht-tumorigenen MCF10A Zelllinie, sind nachweislich ein gutes Modell für Brustdrüsen, da diese viele Eigenschaften des normalen Brustgewebes *in vivo* aufweisen und für viele Studien in Bezug auf die Brustdrüsenentwicklung genutzt wurden [55]. Durch die gezielte genetische Modifikation konnte diese Zelllinie auch zur Untersuchung der malignen Transformation oder von onkogenen Signalwegen eingesetzt werden [172].

Eine wichtige Eigenschaft von MCF10A Brustsphäroiden ist die Bildung einer endogenen BM. Dadurch ist es möglich das zelluläre Verhalten und die Entwicklung der BM sowohl in einem gesunden physiologischen Kontext als auch unter pathologischen Einflüssen des umliegenden Gewebes zu untersuchen. In einem gesunden Gewebe trennt die BM ihr Ursprungsgewebe von der umliegenden EZM ab und unterstützt die Gewebestabilität und -homöostase [185]. Während der Tumorprogression verändert sich die BM in Bezug auf die Zusammensetzung, die Integrität und ihre Widerstandsfähigkeit, was letztendlich in einer lokalen BM-Zerstörung resultiert [33, 48]. Diese Ergebnisse aus anderen Studien und aus den hier vorgestellten promotionsrelevanten Vorarbeiten (vgl. Abschnitt 3.1) decken sich mit dem Fund von lokalen Zerstörungen der BM (fragmentierte BM) bei Tumoren [186].

Die während der Tumorprogression stattfindende maligne Transition von einem gesunden Brustgewebe hin zu einem Tumor wird durch mehrere miteinander verknüpfte Prozesse zwischen den Zellen und ihrer Umgebung reguliert und beeinflusst. Dazu zählen beispielsweise genetische Modifikationen, die zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen, aber auch der Verlust von Zell-Zell-Kontakten, die Versteifung der EZM und der invasionsfördernde Einfluss einer Wachstumsfaktor-Stimulation [187]. Mittels des 3D MCF10A Modells kann diese Transition unter bestimmten Kultivierungsbedingungen nachgeahmt werden. Über die Parameter der BM-Reifung und der EZM-Steifigkeit, sowie eine optional mögliche Stimulation mit onkogenem EGF, konnte eine normale physiologische Zellumgebung bis hin zu einer invasionsfördernden tumor-

assoziierten Mikroumgebung geschaffen werden [33]. Ein gesundes Epithelgewebe wurde durch Azini mit einer maturierten BM (hd-BM) repräsentiert, welche die Azini konstant umgibt. Azini mit einer gering entwickelten BM (ld-BM) hingegen imitierten einen tumorassoziierten Status, in dem die BM noch durchgängig vorhanden, aber dünner ist (vgl. Abbildung 20). Dies könnte beispielsweise aus einer schwächeren Quervernetzung der BM resultieren, die eine einfachere Degradation der BM zur Folge haben kann [188]. Mit Hilfe des MCF10A Azini-Modells und der Vergleichbarkeit zu den Prozessen *in vivo* konnten die in dieser Arbeit dargestellten invasionsfördernden Faktoren (EZM-Steifigkeit, BM-Maturierung, EGF/hRas Stimulation) und ihre zugrundeliegenden Signalwege näher analysiert werden.

Die Verhärtung der EZM, Wachstumsfaktorsignalwege und die zytoskelettale Kontraktion sind als Hauptfaktoren für eine Invasion durch eine BM bekannt [71]. Einzeln sind diese Faktoren mehrfach beschrieben, doch besonders ihre Wechselwirkungen und Einflüsse untereinander sind nicht gänzlich verstanden [38, 71, 189, 190]. Außerdem fehlt es an Studien in dreidimensionalen Systemen oder anderen *in vivo* ähnlichen oder relevanten Modellen [191]. So wurden viele Studien beispielsweise nur an Monolagen oder Einzelzellen durchgeführt [192] oder die Invasion durch eine EZM mit unterschiedlicher Steifigkeit wurde mit einer Invasion durch die BM gleichgesetzt [84, 193].

In den gemeinsamen Vorarbeiten (vgl. Abschnitt 3.1) konnte der invasionsfördernde Zusammenhang der EZM-Versteifung, der EGF-Stimulation und eines geringen BM-Maturierungsstatus im Hinblick auf die maligne Transition im humanen Mammakarzinom bewiesen werden. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine erhöhte EZM-Steifigkeit bei Brustdrüsen ausreicht, um bei nicht-transformierten Zellen den Invasionsprozess auszulösen. Die Erkenntnis, dass bei Tumoren die Steifigkeit des Gewebes erhöht und im humanen Mammakarzinom bereits als Risikofaktor assoziiert ist, bestätigt diese Ergebnisse [87, 194]. Die Veränderung der Gewebesteifigkeit *in vivo* mit zunehmendem Alter ist demnach vermutlich einer der Gründe, warum das Risiko einer Brustkrebserkrankung mit fortschreitendem Alter steigt [195]. In Bezug auf die BM-Maturierung konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die mechanischen Eigenschaften und indirekt die Widerstandsfähigkeit der BM gegenüber mechanischem Stress über die Zeit zunahm [37]. Dies verdeutlichte die anti-invasive Eigenschaft der BM in einem gesunden Gewebe gegenüber mechanischen Einflüssen. Die mechanische Stabilität der BM wirkte als Zell-Migrationsbarriere und damit invasionshemmend [33].

Um eine Tumormikroumgebung noch detailgetreuer nachzuahmen, wurde der Einfluss von EGF auf die Invasionshäufigkeit analysiert. Über eine parakrine Aktivierung von EGF gesteuerten

Signalwegen wurde die Invasion nochmals drastisch erhöht. Zudem wurde der anti-invasive Effekt der BM in gesundem Gewebe aufgehoben. [33]. Die Steigerung der Invasion durch die onkogene EGF-Stimulation konnte durch die Aktivierung von Signalkaskaden über EGF-Rezeptoren erklärt werden, da EGF viele intrazelluläre Prozesse reguliert [73]. Eine Möglichkeit ist die Steigerung der Migration durch EGFR-Signalkaskaden. Dies wurde bereits für MCF10A Zellen nachwiesen [196]. In infantilen Rattenzellen konnte zudem ein Einfluss von EGF auf die SF-Bildung und FA-Formation gezeigt werden [197]. In dem Zusammenhang einer gesteigerten Migration sind zudem zwei weitere wichtige Faktoren zu nennen, die über eine EGF-Stimulation beeinflusst werden können. Erstens sind beispielsweise aktinbasierte Zellfortsätze, welche durch die EGF induzierte Mobilisierung des Hemidesmosom (HD)-Integrinkomplexes $\alpha6\beta4$ vermehrt gebildet werden können, für die Migration essentiell [198]. In einem gesunden Gewebe verbinden HD über das Integrin Heterodimer $\alpha6\beta4$ die basale Zellschicht mit der BM und stabilisieren so den Azinus [84]. Eine EGF-Stimulation wird beschrieben als Auslöser für eine schnelle Auflösung von HD [198]. Dies resultiert einerseits in einer Schwächung der Gewebestabilität, andererseits wurde dieser Prozess als Startpunkt der Aktivierung einer $\alpha6\beta4$ Integrin vermittelten Zellmigration beschrieben [199]. Zweitens wurde EGF bereits mit der Formation von invasionsfördernden Invadopodien in MCF10A Zellen in Verbindung gebracht, die in diesem Kontext auch zu einer Hochregulation von MT1-MMP und folglich einer erhöhten Matrixdegradation führte [200]. Ein weiterer Einfluss von EGF war die Steigerung der Zellproliferation. Im Gegensatz zu hd-BM Azini zeigten ld-BM Azini eine deutlich stärkere proliferative Aktivität [33]. Dies könnte indirekt auf eine EGF-Wirkung zurückzuführen sein, da EGF bei ld-BM Azini erst zwei Tage vor der Analyse aus dem Medium entfernt wurde, die BM und die EZM jedoch für ihre Reservoir-Wirkung in Bezug auf Wachstumsfaktoren bekannt sind [201, 202]. Daher wurde bei den hRas Azini EGF frühzeitiger entfernt, da EGF neben den beschriebenen Funktionen auch den Östrogenrezeptor binden könnte, der eine hRas-Aktivierung zur Folge hatte. Bei Wt Azini könnte demzufolge noch ausreichend EGF vorhanden sein, sodass die Proliferationsmechanismen auch zwei Tage nach der EGF Depletion weiterhin stimuliert wurden. Dies kann, vergleichbar zu einem unkontrolliertem Zellwachstum bei Tumoren, in einem erhöhten Aufkommen von invasionsförderndem BM-Stress resultieren [128], denn in Tumoren ist EGF für den Wechsel von einer kontaktinhibierten zu einer kontaktunabhängigen Proliferation verantwortlich [192].

Der EGF induzierte Einfluss auf die Proliferation ist für den Abschnitt der Diskussion über die hRas-Aktivität von Bedeutung. Zunächst wurden in dieser Arbeit im Folgenden die (u.a. EGF induzierten) aktinbasierten Zellfortsätze detaillierter bezüglich ihrer Funktion in der malignen Transition im humanen Mammakarzinom untersucht. Der erstmalige Nachweis dieser Strukturen

in nicht-transformierten Brustdrüsenepithelien führte zu der Frage, welche Funktionen diese Fortsätze besitzen und welche zusätzlichen zytoskelettalen Adaptionen in Brustsphäroiden zu einer BM-Zerstörung beitragen. Außerdem fehlte das Verständnis der mechanobiologischen Regelkreise und Mechanismen für die gezeigten kraftinduzierten invasionssteigernden Effekte.

MS – die funktionelle Brücke zwischen proteolytischer und kraftinduzierter Invasion

Auf Grund der nicht eindeutigen Namensgebung und der nicht einheitlichen Verwendung wurde zur Vereinfachung der Name Mikrospike (MS) für Zellfortsätze verwendet. Dieser Begriff wurde gewählt, da den Aktin-Fortsatzstrukturen zunächst keine der beschriebenen Funktionen von Filopodien, Filopodien-artigen Strukturen oder Invadopodien zugeordnet werden konnten (vgl. Abschnitt 1.7). Ebenfalls ist der Begriff neutral in Bezug auf eine mögliche Beteiligung an der Invasion oder anderen spezifischen Funktionen. Verwendet wurde der Begriff MS zum Beispiel für kleine finger-ähnliche Aktin-Strukturen in der Publikation von Li und Kollegen [203].

Sowohl zytoskelettale Zellkräfte (Fortsatzkräfte) als auch die proteolytische Degradation der BM wurden bereits als invasionsfördernde Faktoren beschrieben. Aktinbasierte MS sind mit beiden Prozessen assoziiert [127, 136]. Daher wurden in dieser Arbeit MS hinsichtlich ihrer funktionellen Verbindung dieser zwei Faktoren (proteolytische und mechanische Aktivität) untersucht. Zum einen sind MS über MMP mit der proteolytischen Degradation der BM assoziiert. Während der Entstehung eines Aktin-MS, beschrieben für Filopodien und Invadopodien, wird membrangebundenes MT1-MMP entlang der Aktin-Bündel zur Spitze des MS transportiert. Zusätzlich können weitere lösliche MMP sekretiert werden. MT1-MMP ist beispielsweise an der Aktivierung von MMP2 beteiligt [135, 139]. Zum anderen wurden bei Brustkrebszellen (MD-MB-231) invadopodiale Fortsatzkräfte auf die EZM nachgewiesen [127].

Dennoch waren MS nicht nur in einem pathologischen Kontext zu betrachten. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass MS auch in einem gesunden Brustdrüsenepithel gebildet wurden. Sowohl in einer physiologischen EHS-Matrix als auch bei Azini mit einer ausgereiften BM (hd-BM Azini) auf einer dem Normalgewebe entsprechenden EZM-Steifigkeit konnten BM durchspannende MS detektiert werden. Im Einklang mit demonstrierten Funktionen von Zellfortsätzen bei Einzelzellinteraktionen ist es höchstwahrscheinlich, dass die MS zur Wahrnehmung (engl. *Sensing*) der EZM gebildet wurden. Dieser Prozess ist für Filopodien bereits ausführlich beschrieben [204, 205]. Die Lebensdauer und Kinetik azinärer MS ist vergleichbar zu mechanosensorischen Aktin-Fortsätzen, die in MCF10A Einzelzellen zur Wahrnehmung der Substratsteifigkeit gefunden

wurden [175]. Die große Anzahl an sehr kleinen und kurzen MS, sowie ein schnellerer Abbau der MS ist darauf zurückzuführen, dass sich die Azini nur auf einer flachen EZM befanden und nicht über die gesamte Oberfläche von einer EZM umgeben wurden. Ohne die Möglichkeit einer Zell-Matrix-Verbindung konnten sich MS nicht funktionell an eine EZM binden, um beispielsweise die Migration in eine bestimmte Richtung zu regulieren [206]. Daraus wurde geschlossen, dass laterale MS wegen der fehlenden EZM auch direkt wieder abgebaut wurden.

Weiterhin konnte in diese Arbeit gezeigt werden, dass sich MS auch nach einer MMP-Inhibition (u.a. MMP2, MMP9 und MT1-MMP) ausbilden. Während diese MMP-Inhibition die Invasion nachweislich signifikant reduziert hat, schien kein Einfluss auf die Fortsatzbildung vorhanden zu sein, da hier noch eine Vielzahl an MS beobachtet werden konnte. Eine Quantifizierung der MS bei einer MMP-Inhibition müsste allerdings zur Bestätigung noch durchgeführt werden. Außerdem ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt, ob die MS überhaupt proteolytisch aktiv sind und ein Zusammenhang von Aktin-MS und einer MMP-Inhibition auftreten kann.

Daher wurde versucht Invadopodien-Markerproteine nachzuweisen, da Invadopodien als proteolytisch aktive Fortsätze beschrieben sind [135]. Die überwiegende Abwesenheit von Invadopodien-Markern in den Aktin-MS bestärkt die Hypothese, dass die Ausbildung von MS in Azini zunächst kein Charakteristikum von invasiven Zellen ist. Denn obwohl ein Signal in der basalen Zellmembran der beschriebenen Invadopodien-Marker (TKS5 [207], Korkaktin [208] und MT1-MMP [209]) detektiert werden konnte, waren diese Marker in MS der gleichen Zellen nur vereinzelt zu finden. Mit Bezug auf MT1-MMP bedeutet dies, dass die MS keine degradierende Wirkung auf die EZM aufweisen. Zudem ist MT1-MMP an der Aktivierung von sekretiertem MMP2 und MMP13 beteiligt [210], sodass auch diese Art von MMP vermutlich nicht aktiviert sind.

Konträr zu vorherigen Ergebnissen von MCF10A Einzelzellen [211], wiesen die azinaren Zellen an der Kontaktfläche zur EZM aktinbasierte MS ohne proteolytische Aktivität auf. Auch hier lag nur das beschriebene Signal in der basalen Zellmembran vor, jedoch keine Co-Lokalisierung mit den Aktin-MS-Strukturen. Das vorhandene basale Signal trug wahrscheinlich dazu bei die BM zu remodellieren. Die BM-Remodellierung (d.h. eine BM-Erneuerung) ist ein konstant ablaufender, elementarer Prozess zur Differenzierung und Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität in Brustepithelien [32, 176].

Die Penetration der BM ohne proteolytische Aktivität ist möglich durch Poren in dem Kollagen IV Netzwerk der BM. In dieser Arbeit wurden diese Poren mittels IF erstmalig in Kombination mit BM durchspannenden MS demonstriert. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die Porengröße bereits definiert und liegt ca. zwischen 9 und 100 μm [37]. Während sich ganze

Brustkrebszellen mit proteolytischer Aktivität durch eine Porengröße von ca. 3 bis 7 μm^2 zwingen können [212, 213], ist davon auszugehen, dass deutlich kleinere fingerartige MS zur Wahrnehmung der EZM relativ einfach und ohne proteolytische oder mechanische Hilfe die BM-Poren durchdringen können.

Die Bildung von aktinbasierten MS ist *in vivo* ähnlichen Brustsphäroiden basierend auf den bisher diskutierten Daten grundsätzlich nicht als invasiver Prozess zu betrachten. Im Gegensatz dazu stehen jedoch die eingangs erwähnten Beteiligungen an invasiven Prozessen, sodass eine fehlerhafte MS-Regulation hypothetisch einen negativen Einfluss auf die Tumorprogression haben kann.

Auf Grund der Verbindung von onkogener EGFR-Aktivierung und tumorassoziierter EZM-Verhärtung mit einer invasiven Transition bei gutartigen und ursprünglich nicht-invasiven Brustsphäroiden wurde die Funktion von MS im Prozess der Zellinvasion bei Brustsphäroiden untersucht. Die Analyse zeigte eine erhöhte Bildung von MS in Abhängigkeit von EGF und einer steifen EZM. Zum Nachweis kleinster Strukturen und der Aufnahme von hochaufgelösten Bildern wurden diese Analysen auf Glas durchgeführt. Zwar ist Glas mit 10^8 kPa nochmals deutlich härter als die verwendete tumorassoziierte Substratsteifigkeit von 12 kPa [214], aber in der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass beide Oberflächen die Invasion induzieren. Ein beschriebener Effekt der EZM-Versteifung, die Vergrößerung der Zellfläche [215], konnte auch anhand der azinaren Zellen auf Glas gezeigt werden. Zudem war kein Unterschied zwischen Azini auf einer tumorassozierten Steifigkeit und einer Glasoberfläche zu sehen, sodass davon ausgegangen wurde, dass die Zelle auf eine zusätzliche Verhärtung der EZM nicht anders reagiert. Der Einfluss von EGF und der EZM-Versteifung auf die MS-Bildung war eindeutig. Sowohl nach einer Stunde als auch nach 24 Stunden hatte EGF einen starken Einfluss auf die Anzahl der BM durchspannenden MS. Unter der Annahme, dass es sich dabei um Mechanosensoren handelte, bedeutete die erhöhte Anzahl der MS auch eine gesteigerte mechanische EZM-*Sensing*-Aktivität. Die höchste Anzahl an Aktin-MS und demzufolge auch die höchste *Sensing*-Aktivität wurde bei der invasivsten Fraktion gefunden. Das waren Brustsphäroide mit einer gering maturaerten BM auf einer tumorassozierten steifen EZM. Der Einfluss der Steifigkeit auf die Formation von MS im Sinne einer Steigerung der MS-Dichte unter zunehmender Verhärtung der EZM ist bereits bekannt [216]. Erstmals konnte in dieser Arbeit die Anzahl von MS unter pro-invasiven Einflüssen in Brustsphäroiden mit einer endogenen BM hochauflösend analysiert werden. Dadurch konnten auch kleinste fingerartige Strukturen, die die BM durchspannten, analysiert werden. Andere Studien in Bezug auf die MS-Häufigkeit arbeiteten noch in 2D Zellsystemen und

waren aufgrund der automatisierten Detektion in der Größe der nachzuweisenden Strukturen limitiert. Zudem wurde in diesen Untersuchungen die BM vernachlässigt [217, 218].

Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl die EZM-Versteifung als auch die onkogene EGF-Stimulation in einer gesteigerten Bildung von lateralen Zellfortsätzen auf der gesamten Azinus-Oberfläche der basalen Zellschicht resultierten. Diese gesteigerte Fortsatzbildung war gleichermaßen an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche vorhanden. Während EGF mittels Diffusion über das Medium zunächst eher die basale Zellschicht erreichte, befanden sich nur die Zellen an der Kontaktfläche in einem direkten Kontakt mit der tumorassoziierten EZM. In beiden Fällen waren die Steigerungseffekte jedoch sowohl anhand der lateralen MS-Dichte als auch an der MS-Dichte an der Kontaktfläche zu erkennen. Die daraus resultierende Hypothese einer möglichen Zell-Zell-Kommunikation wurde zusätzlich durch einen massiven Rückgang der lateralen MS nach der Invasion von Azini bestärkt. Obwohl die Invasion im Bereich der Kontaktfläche des Azinus zur EZM stattfand, hat sich die *Sensing*-Aktivität von Zellen, die nicht in einem direkten Kontakt zu den invasiven Zellen stehen, verringert. Zukünftige Arbeiten sollten sich mit dieser Theorie beschäftigen, um mögliche mechanosensitive oder biochemische Signalprozesse zu erforschen, die innerhalb eines Azinus vorhanden sein könnten. Neben diversen biochemischen Signaltransmittern wie z.B. Zytokinen könnten in diesem Modell in Bezug auf die beobachteten zytoskelettalen Veränderungen kontaktabhängige (z.B. Zell-Zell-Kontakte oder Zell-Matrix-Kontakte) Kommunikationswege entscheidend sein. Diese könnten beispielsweise direkt über den mechanischen Stress und die zelluläre Spannung reguliert werden [219]. Das Aktin-Zytoskelett selbst ist als Signalüberträger während der Mechanotransduktion extrazellulärer Stimuli beschrieben [94]. In dieser Arbeit und im weiteren Verlauf der Diskussion wurde der Fokus auf die Funktion der mechanischen EZM-*Sensing*-Aktivität gelegt.

Die Analyse und der Nachweis von MS an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche, co-lokalisiert mit mechanosensorischen Proteinen wie Vinculin und Talin, deutete auf mechanisch aktive MS hin, die Stress auf die BM verursachten. Diese mechanische Aktivität konnte in den Vorarbeiten mittels ERISM nachgewiesen werden. In Zusammenarbeit mit unserem Kooperationspartner (Uni Köln, AG von Prof. Dr. Malte Gather) konnten wir zeigen, dass MS eine gesteigerte mechanische Aktivität (Ziehen und Drücken) auf die EZM und BM ausübten [33]. Da aus den Adhäsionskomplexen von Zellfortsätzen Fokaladhäsionen entstehen können [220], sind Fortsätze indirekt an der Ausbildung von Zell-Matrix-Verbindungen sowie an der Zellmigration beteiligt

und folglich auch an der Entstehung und Übertragung von Zellkräften auf die umliegende BM und EZM [221].

Diese erhöhte mechanische MS-Aktivität korrelierte allerdings auch mit einer erhöhten Invasivität [33]. Im Einklang mit diesem Ergebnis wurden in *C. elegans* ATP-reiche Filopodien bei gleichzeitiger Inhibition von MMP als Auslöser für die kraftinduzierte Invasion durch eine BM beschrieben [222]. Außerdem wurde die Annahme eines invasionsfördernden Einflusses einer hohen MS-Dichte durch die Arbeit von Jacquemet und Kollegen untermauert. Die Zunahme der MS-Dichte korrelierte hier mit einer Zunahme der Invasivität von MCF10A Varianten (MCF10ADCIS und MCF10AT) [217].

Da die in dieser Arbeit beschriebenen pro-invasiven Stimuli (EGF und die EZM-Versteifung) die MS-Anzahl/ EZM-*Sensing*-Aktivität steigerten und auch die Invasionshäufigkeit erhöhten, könnte die hohe *Sensing*-Aktivität der basalen Zellschicht infolge der pro-invasiven Stimuli bereits ein erstes Anzeichen einer (pathologischen) Zelladaptation sein. Auch wenn nachweislich keine proteolytisch aktiven MS in prä-invasiven Brustsphäroiden nachgewiesen werden konnten, könnte die mechanische Aktivität die Integrität und Stabilität der BM verringern.

Eine solche invasionsfördernde Schwächung durch mechanisch aktive MS könnte über die MLC und Myosin reguliert werden. Dies steht im Einklang mit dem Nachweis von kraftübertragenden Fokaladhäsionen an den MS-Strukturen, die co-lokalisiert mit der MLC waren. Außerdem konnte die Aktivität der Aktin-MS mittels ERISM nachgewiesen werden [33]. Mit dem Wissen, dass bereits bei Invadopodien von Tumorzellen ein Ziehen und Drücken gegen die EZM gezeigt wurde [127], ist es sehr wahrscheinlich, dass dieser MLC und Myosin II vermittelte BM-Stress ebenfalls zu einer Schwächung der BM führte und somit die maligne Transition von Brustdrüsenepithelien fördern konnte.

Bei der Betrachtung der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche bestätigte sich ein möglicher Zusammenhang zwischen der MS-Dichte und einer potenziell instabileren BM. Während Bereiche unter MS-Zellen mit vielen MS auch viele Poren enthielten, waren unter SF-Zellen, die weniger EZM- und BM-Bindungsstellen aufwiesen, kaum Poren vorhanden. Dies deutete darauf hin, dass der Prozess der BM-Erneuerung und damit die Schließung der Poren innerhalb weniger Stunden stattfinden konnte, da die Porendichte unter den neu gebildeten SF Zellen wieder deutlich abnahm. Zwar wird allgemein angenommen, dass eine BM einen Reparatur-Mechanismus besitzt, doch wie genau dieser Prozess abläuft und ob sich dieser von der normalen BM-Synthese unterscheidet, ist weitestgehend unbekannt. Anhand der BM von *Drosophila* Larven konnte jedoch gezeigt werden, dass BM-Wunden innerhalb von 24 Stunden verheilen konnten [223]. Demzufolge könnten

deutlich kleinere Poren bei einer epithelialen BM auch innerhalb weniger Stunden bereits zuwachsen. Andererseits konnte geschlussfolgert werden, dass eine hohe MS-Dichte einen Einfluss auf die Dichte des Kollagen IV Netzwerkes hat. Ein BM schwächender Einfluss der *Sensing*-Aktivität wurde bis dato nicht in der Literatur beschrieben, allerdings wurde gezeigt, dass EZM-Poren nicht nur durch proteolytische Aktivität, sondern auch durch zelluläre Kräfte verformbar sind [224]. Die gesteigerte Zahl der Aktin-MS könnte drauf hindeuten, dass auch mehr BM-Poren vorliegen. Das würde bedeuten, dass die vielen Aktin-MS die BM-Poren mechanisch erzeugen oder zumindest vorhandene Poren vergrößern könnten. Eine Vergrößerung der EZM-Poren wurde bereits für MMP inhibierte Brustkrebszellen in einer Kollagen I Matrix gezeigt [225]. Diese mechanische Porenvergrößerung könnte übertragen auf das in dieser Arbeit verwendete Brustdrüsenepithel-Modell mit einer BM, die überwiegend aus Kollagen IV besteht, auch möglich sein.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine gesteigerte Aktin-MS vermittelte EZM-*Sensing*-Aktivität der basalen Zellschicht die Porosität des Kollagen IV Netzwerkes der BM vergrößert. Dadurch könnte die Integrität der BM anfangs gemindert werden, was folglich die gesteigerte Invasivität mit zunehmender MS-Dichte erklären würde. Diese Hypothese und ein möglicher Wechsel des Invasionsmodus in Abhängigkeit der Zeit und der Stimulation mit pro-invasiven Faktoren müsste in folgenden Arbeiten überprüft werden, da wie beschrieben auch Azini invasiv wurden, bei denen die Poren unter entstehenden SF zunächst wieder geschlossen wurden.

Die anfangs als MS betitelten Aktin-Zellfortsätze wurden basierend auf den bisher diskutierten Ergebnissen funktionell genauer beschrieben. Durch die funktionelle Verknüpfung der *Sensing*-Aktivität mit invasionsfördernden Eigenschaften konnte die Annahme getroffen werden, dass es sich bei den Aktin-MS um Vorläufer für Filopodien oder Invadopodien handelte. Diese aktinbasierten Strukturen wurden über die Verringerung der BM-Integrität mit der Zellinvasion durch die BM in Verbindung gebracht. Da der Nachweis von Invadopodien-Markern in azinaren Fortsatzstrukturen überwiegend negativ war, wurden die Aktin-MS im Folgenden nicht als Invadopodien, sondern als Filopodien bezeichnet, bzw. haben sich aus den Aktin-MS gebildet.

Filopodien sind für ihre Aktivität als Mechanosensoren bekannt. Damit tragen diese Strukturen auch zur Aufrechterhaltung der basoapikalen Polarisation und zur Gewebemöostase in Brustdrüsenepithelien bei. Weiterhin wurde bereits nachgewiesen, dass Filopodien Fortsatzkräfte auf eine EZM übertragen können (vgl. Abschnitt 1.7). Außerdem wurden Filopodien bereits mit invasiven Zellen in Verbindung gebracht. *In vivo* wurden Filopodien in Sphäroiden von transformierten MCF10ADCIS.com LifeAct Zellen gezeigt, die in Zebrafischen neue Sphäroide

mit Filopodien gebildet haben [217]. Diese Filopodien glichen den identifizierten Filopodien in dieser Dissertation. Ein solcher Nachweis ist von großer Bedeutung, um auszuschließen, dass es sich bei Fortsätzen um ein Zellkulturartefakt handelte. Studien zu Filopodien oder Invadopodien fanden meist an Einzelzellen statt, da der Invasionsprozess sehr dynamisch, schwer vorhersehbar und vor allem schwer aufzunehmen ist [133]. Weitere Verbindungen von Filopodien mit invasiven Zellen wurden von Jacquemet und Kollegen in ihrer Übersichtsstudie zusammengefasst. So waren beispielsweise einige filopodiale Proteine in Tumoren hochreguliert [121].

Diese Studie von Jacquemet und Kollegen verdeutlicht auch die Schwierigkeiten in der Benennung der Fortsatzstrukturen, da teilweise auch die Begriffe Filopodien-artig oder Invadopodium verwendet wurden. Obwohl in dieser Arbeit im Folgenden der Begriff Filopodium für die Fortsätze gewählt wurde, könnte der Nachweis einzelner Invadopodien-Marker in einzelnen MS auch ein Hinweis auf einen möglichen funktionellen Wechsel von Zellfortsätzen sein. Bei invasiven Zellen, die durch die BM transmigriert sind, zeigten die elongierten aktinbasierten Fortsätze dieser migrierenden Zellen typische Invadopodien-Markerproteine. So ist MT1-MMP in den deutlich längeren MS, in dieser Arbeit als Filopodien-artige Strukturen beschrieben, in den migrierenden Zellen vorhanden. Filopodien an der Kontaktfläche zeigten diese Co-Lokalisierung von Aktin und MT1-MMP nicht, sodass sich der Invasionsmechanismus von migrierenden Einzelzellen und azinaren Zellen vermutlich unterscheidet. Technische Limitationen konnten weitestgehend ausgeschlossen werden, da der Nachweis der Invadopodien-Marker spezifisch war.

Damit ist ein möglicher Wechsel von Zellfortsätzen oder ein funktioneller Wechsel von aktinbasierten Fortsätzen möglich. Dies wurde in der Literatur auch bereits diskutiert. Demnach besteht die Möglichkeit, dass es in einer natürlichen Zellumgebung verschiedene Arten von Zellfortsätzen geben könnte, die unterschiedliche Funktionen aufweisen [121]. Möglich wäre also, dass MS-Strukturen nur Vorläufer sind, die sich zu Filopodien oder Invadopodien entwickeln oder dass ein Wechsel von mechanosensorischen Filopodien zu invasiv-assoziierten und proteolytisch aktiven Invadopodien auftritt [226].

Unabhängig von einem möglichen funktionellen Wechsel oder einem Wechsel der Bezeichnung für die Fortsatzstrukturen konnte eindeutig eine Beteiligung der Fortsätze an dem invasionsfördernden Prozess der BM-Schwächung identifiziert werden. Durch eine Erhöhung der BM-Porosität konnten Filopodien die Invasion steigern.

Weiterhin nicht verstanden ist die Entstehung der kontraktilen Zellkräfte, da bisher nur die möglichen Fortsatzkräfte diskutiert wurden. Aus diesem Grund wird im nächsten Abschnitt die

Veränderung an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche thematisiert, um die mechanobiologischen Regelkreise besser zu verstehen, die zellkraftassoziierte BM-Zerstörung verursachen.

4.2 Zytoskelettale Veränderungen führen zu invasionsfördernder kontraktile Zellkraft

Zu Beginn der Promotion konnte in der gemeinsamen Arbeit mit Frau Dr. Gaiko-Shcherbak eine Verbindung zwischen zunehmender Invasivität und der Steigerung der kontraktile Zellkräfte gezeigt werden. Diese Zellkräfte waren abhängig von dem BM-Status, der EZM oder der EGF-Stimulation und wurden als BM-Stress definiert. Zellkraftabhängige Invasionsmechanismen sind demzufolge bereits beschrieben worden, beispielsweise während der Mausembryogenese oder der Brustkrebsinvasion [32, 33, 184]. Noch unverstanden sind in Brustsphäroiden die genauen Mechanismen an der Kontaktfläche zur EZM. Hier bildet die BM ein funktionell verknüpftes Kontinuum mit der darunterliegenden EZM, welches die Zellen über mechanosensorische Strukturen wahrnehmen. Daher wurde untersucht, welche Veränderungen an der Kontaktfläche die dort stattfindende Invasion begünstigen oder auslösen.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden Lebendzell-Zugkraftanalysen zum Nachweis der kontraktile Zellkraft der Azini durchgeführt. Gleichzeitig konnte die Transition von MS- zu SF-Zellen beobachtet werden. Bei den Zugkraftanalysen korrelierten Kraft-*Hotspots* hoher zellulärer Zugkraft mit der Entstehung von Aktin-SF. Diese Zugkraft wurde über die Formänderungsenergie gemessen und diente als Maß für den BM-Stress. Dementsprechend war der zur Invasion führende BM-Stress eindeutig auf die Bildung und Kraftübertragung von SF-Zellen zurückzuführen. Auch eine Inhibition der SF-Bildung bestätigte diesen Zusammenhang, da keine Zellkräfte mehr auftraten. So konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Kontraktilität von azinaren Zellen bei Brustdrüsenepithelien von Myosin II abhängig war. Dieser Zusammenhang konnte auch durch den Nachweis der MLC bestätigt werden, die das Nicht-Muskel-Myosin II phosphoryliert und aktiviert, wodurch es zur Zellkontraktion kommen konnte. Diese Kinase war somit essenziell für die Entstehung der kontraktile Zellkraft in Brustsphäroiden, was ebenfalls in Fibroblasten beschrieben wurde [227].

Zusätzlich kann diese kontraktile Zellkraft nur entstehen, wenn SF über Fokaladhäsionen in der BM und EZM verankert sind [228]. Dies konnte auch in dieser Dissertation für azinare Zellen gezeigt werden. Die SF waren über mechanosensorische Fokaladhäsionskomplexe an die BM und EZM gekoppelt.

Die Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts an der Azinus-Kontaktfläche bedeuteten einen Rückgang der kortikalen Aktin-MS bei gleichzeitiger Bildung der SF. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass das gesamte kortikale Aktin eines humanen Brustsphäroids an der Kontaktfläche durch pro-invasive Stimuli verändert wurde. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen in Leberzellen von Ratten, wo ein EGF induzierter EMT-Prozess ebenfalls zu einem Verlust von kortikalem Aktin und einer vermehrten Bildung von SF führte [229]. Auch in dieser Dissertation konnten typische Merkmale eines EMT-Prozesses identifiziert werden. Sowohl eine zytoskelettale Remodellierung als auch der invasionsbedingte Verlust azinärer Zell-Zell-Kontakte und der basoapikalen Polarisation im Verlauf der Zellinvasion sind typische Kennzeichen einer EMT [230].

In dieser Arbeit konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass dieser SF-Bildungsprozess zusätzlich durch pro-invasive Stimuli wie EGF und die EZM-Steifigkeit verstärkt wurde (Erhöhung der SF-Dichte). Dies könnte an einer Förderung der SF-Bildung über die EGF induzierte Bildung von FA über Tensin und RhoA liegen, die in MCF10A Zellen nachgewiesen wurde und in einer Steigerung der Migration resultierte [231]. Diese Verbindung zu pro-invasiven Stimuli unterstützte die Aussage, dass es sich bei der Umwandlung von MS zu SF höchstwahrscheinlich um einen weiteren wichtigen Schritt in der malignen Transition handelte.

Die in diesem Abschnitt diskutierten EMT-ähnlichen Veränderungen im Aktin-Zytoskelett deuten auf unterschiedliche Phasen in einer malignen Transition von Brustdrüsenepithelien hin. Beginnend mit einer bereits BM schwächenden und Myosin II vermittelten erhöhten Filopodien-Aktivität wirkten sich pro-invasive Stimuli bereits in einem prä-invasiven Zustand negativ auf die Gewebe- und BM-Homöostase aus. Folglich entstand durch die Bildung von SF eine Myosin II induzierte Zellkontraktilität und zusätzlicher BM-Stress, der in Kombination mit den anderen Invasionsfaktoren wie der EZM-Steifigkeit oder der onkogenen EGF-Stimulation eine Invasion durch die BM bedingt.

4.3 Das Onkogen hRAS steigert die Invasivität durch die Verringerung der BM-Integrität

Neben der EZM-Steifigkeit, der BM-Maturierung und der EGF-Stimulation wurde in dieser Dissertation zudem erstmalig hRas in Brustdrüsenepithelien hinsichtlich seines Einflusses auf den Invasionsprozess analysiert. Das proto-Onkogen hRas ist ein interessantes Zielprotein, das eine Vielzahl nachgeschalteter invasionsrelevanter Signalwege reguliert. Viele dieser Signalwege sind in Brusttumoren hochreguliert und mit einer höheren Tumoraggressivität assoziiert [151, 232]. Meist genannt in diesem Zusammenhang ist der MAP Kinase Signalweg über ERK oder der PI3K Signalweg [147]. Diese Signalkaskaden regulieren u.a. die Zellmigration und fördern die epitheliale-mesenchymal-Transition [162]. Die PI3-Kinase kann zudem Filopodien induzieren [233]. Damit ist hRas höchstwahrscheinlich in einige in den ersten Abschnitten diskutierte mechanobiologisch regulierte Prozesse involviert. In dieser Dissertation sollte untersucht und verstanden werden, wie hRas sich auf die identifizierten Prozesse auswirkt und mit den beschriebenen pro-invasiven Faktoren wechselwirkt.

Der zentrale hRas gesteuerte MAPK (engl. *Mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg ist der am häufigsten mutierte Signalweg bei Tumoren [144]. Bei einer näheren Betrachtung dieses Signalweges gilt aktiviertes ERK als Schlüsselkinase dieser Signalkaskade, da es eine Vielzahl an Kinasen bis hin zu Transkriptionsfaktoren reguliert (phosphoryliert mehr als 100 Substrate) und damit Einfluss auf viele zelluläre Prozesse nimmt [144, 234]. Aus diesem Grund wurde phosphoryliertes ERK (pERK) in dieser Arbeit als Nachweis für die Aktivierung von hRas gewählt. Dieser Nachweis war zunächst notwendig, um das verwendete Zellkulturmodell zu validieren. Dieses Modell wurde bisher nur bei Einzelzellen oder Zellmonolagen zur Untersuchung von mechanischen Eigenschaften verwendet [158]. Erstmals in dieser Dissertation wurden Brustsphäroide kultiviert, bei denen hRas dauerhaft überexprimiert wurde oder spezifisch induziert werden konnte.

Hauptsächlich wurde das über OHT induzierbare hRas System verwendet, welches sich auf einer Östrogen-Fusionskassette befand, die eine schnelle und spezifische hRas-Aktivierung ermöglichte [158, 163]. Das zweite anfangs verwendete System, MCF10A Zellen, die hRas konstant überexprimierten [158], zeigte direkt einen negativen Einfluss von hRas auf die sphäroidale Differenzierung. Im Vergleich zu den Wt Sphäroiden war nur eine schwache Polarisation der Brustsphäroide zu erkennen. Dies bedeutete, dass keine konstante BM gebildet wurde.

Diese Ergebnisse aus dem konstant überexprimierenden hRas Modell zeigten bereits den massiven Einfluss von hRas auf zelluläre Prozesse. Vergleichbar zu diesen neuen Ergebnissen in Brustdrüsenosphäroiden, wurde hRas in anderen Epithelzellen mit dem Verlust der Zellplastizität

und der Förderung der Metastasierung in Verbindung gebracht. Zu Grunde lag hier die hRas induzierte Induktion der EMT und die Reduktion von Zell-Zell-Kontakten [235]. Der Verlust von E-Cadherin durch eine hRas Überexpression, ein typisches Merkmal der EMT, wurde ebenfalls für MCF10A Zellmonolagen auf Proteinebene bereits beschrieben [158]. Ohne die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten konnte dementsprechend auch kein organisiertes basoapikal polarisiertes Brustdrüsenepithel entstehen.

Im Gegensatz zu dem konstant überexprimierenden hRas-Modell bildeten sich bei der Kultivierung des induzierbaren hRas Modells (ohne hRas-Aktivierung) Wt-ähnliche und basoapikal polarisierte Azini. Erstmals konnten also MCF10A Azini kultiviert werden, in denen hRas spezifisch aktiviert werden konnte. Diese Aktivierung konnte vergleichbar zu Ergebnissen aus vorangegangenen Publikationen [158, 163] auch in dieser Arbeit reproduziert werden. In diesen Studien wurde mittels Western-Blot Analysen die Aktivierung in Zellmonolagen gezeigt. Da in dieser Arbeit mit den Brustsphäroiden gearbeitet werden sollte, wurde eine Aktivierungs-Nachweismethode in 3D angewandt. Da für Western-Blot Analysen eine sehr hohe Proteinmenge benötigt wird, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gemacht gegen pERK. So konnte in dieser Dissertation erstmalig eine induzierte hRas-Aktivität in Brustsphäroide nachgewiesen werden. Der Vorteil dieser Methode war, dass gleichzeitig die zelluläre Lokalisation von pERK beschrieben werden konnte.

Trotz der Vergleichbarkeit der Azini gab es morphologische Unterschiede zwischen der induzierbaren hRas-Variante und dem in dieser Arbeit verwendeten Wt. Eindeutig waren Azini der induzierbaren hRas-Variante größer, was auf eine unspezifische Aktivierung des Östrogenrezeptors zurückzuführen sein konnte. Medienbestandteile (Proteine) können den Östrogenrezeptor auf der Fusionskassette binden und hRas aktivieren. Daher wurde das Medium vorbehandelt, um möglichst viele Proteine zu entfernen. Außerdem liegen Studien über die Wechselwirkungen von EGFR und Östrogenrezeptoren vor [236], sodass EGF noch frühzeitiger aus dem Kultivierungsmedium entfernt wurde, um eine EGF-Bindung an den Östrogenrezeptor zu vermeiden. Trotz dieser Maßnahmen ließ sich eine geringe Induktion der hRas-Aktivität vermutlich nicht vermeiden. Die gemessene pERK-Aktivität zwischen dem Wt und der nicht induzierten hRas-Variante zeigte keine signifikanten Unterschiede, doch es ist nicht auszuschließen, dass hier ein kleiner gradueller Effekt vorliegen könnte. Das IF-Intensitätssignal war generell sehr gering, sodass die Methode zum Nachweis geringer Unterschiede möglicherweise nicht sensitiv genug war. Eindeutig war jedoch eine deutliche Steigerung des pERK-Signals durch die biochemische hRas-Aktivierung, sodass sich das Modell für die

funktionellen Untersuchungen eines spezifischen hRas induzierten Einflusses auf den Invasionsprozess eignete.

Nach der erstmaligen Beschreibung und Validierung des MCF10A hRas Modells wurde folglich das Invasionsverhalten bei einer hRas-Aktivierung untersucht. Der große Vorteil dieses Systems ist die Möglichkeit Brustsphäroide unter gleichen Bedingungen zu kultivieren, um dann selektiv pathologische Veränderungen in der Mikroumgebung in Bezug auf die hRas-Aktivität zu untersuchen. Neben der EZM-Steifigkeit konnte eine pathologische und tumorassoziierte Überaktivierung von hRas als invasionsfördernder Parameter verwendet werden [232].

Die Ergebnisse der Invasionsanalyse beim Vergleich von induzierten und nicht-induzierten Azini auf unterschiedlichen EZM-Steifigkeiten konnte zunächst die Steigerung der Invasionsevents bei MCF10A Wt Azini durch eine Versteifung der EZM bestätigen. Aber auch die spezifische Induktion von hRas erhöhte die Invasion deutlich. Dementsprechend hatten beide Faktoren einen eindeutigen invasionssteigernden Einfluss. Gleichzeitig verringerte die pro-invasive Stimulation den Invasionszeitpunkt. Besonders eine Tumormikroumgebung, bestehend aus erhöhter hRas-Aktivität und einer harten EZM, förderte die Invasion deutlich, sodass alle Azini invasiv wurden und dies überwiegend bereits in den ersten Stunden.

Die induzierten hRas Brustsphäroide wurden während der Invasionsanalysen auf einer tumorassoziierten EZM frühzeitig invasiv als hd-BM Azini des Wt, die mit Kollagenase IV behandelt wurden [33]. Diese Behandlung hatte eine Auflösung der BM zur Folge, die in einer 100-prozentigen Invasion resultierte. Diese Gruppe befand sich auf einer physiologischen EZM und wies eine vollständig maturierte BM (hd-BM) auf. Dadurch konnte die Barriere gegenüber invasiv stimulierten Zellen anfangs länger intakt bleiben. Erst die proteolytische Auflösung der BM und die Zerstörung der BM-Integrität verursachte bei nicht transformierten Brustdrüsenosphäroiden eine Invasionsrate von 100 %. Diese hohe Invasionsrate trat bei induzierten hRas Azini auch ohne die Kollagenase-Behandlung auf. Die BM-Integrität bei diesen hRas induzierten Azini schien bereits deutlich vermindert zu sein, sodass die BM bei zehn Tage alten hRas Azini nur eine geringe Widerstandsfähigkeit aufwies. Im Vergleich zu den Wt Azini waren die hRas Azini generell invasiver, unabhängig von der hRas-Aktivierung. Dies deutete auf generelle Veränderungen der hRas Azini hin, welche zukünftig genauer untersucht werden müssen, um das Zellkulturmodell besser zu verstehen und zu verifizieren. Möglicherweise hat die Östrogenkassette Einfluss auf das zelluläre Verhalten der transformierten MCF10A Zellen.

Auch wenn die allgemein höhere Invasivität nicht eindeutig erklärt werden konnte, lag ein deutlicher hRas Effekt nach der spezifischen Aktivierung vor. Das heißt, dass die spezifische

hRas-Aktivierung einerseits nachweisbar war und andererseits zu einer deutlichen Steigerung der Invasion führte. Daher kann im Folgenden diskutiert werden, wodurch die signifikant höhere Invasion nach der hRas-Aktivierung zustande kommt.

Eine Möglichkeit, die höhere und frühzeitigere Invasion zu erklären, ist die proteolytische Aktivität von MMP, die die BM degradieren könnten. Eine Überexpression von u.a. MMP2 und MMP9 ist im humanen Mammakarzinom als Risikofaktor für schlechtere Krankheitsverläufe beschrieben [237]. Außerdem sind auch hRas Signalwege mit der Entstehung von MMP assoziiert. Dies wurde anhand von Leberzellen aus Ratten und für humane Epithelzellen gezeigt [238, 239]. Vergleichend zum Wt wurde durch die Aktivierung von hRas und den folgenden Signalkaskaden kein vermehrtes Aufkommen von gebundenem MT1-MMP in den Brustsphäroiden detektiert, sodass zunächst davon ausgegangen werden musste, dass die Invasion der Brustsphäroide auch nach der hRas-Aktivierung nicht von einer proteolytischen Degradation der BM abhängig ist. Allerdings wurde bei der Analyse nicht die Menge an sekretierten löslichen MMP berücksichtigt, was zum Ausschluss einer deregulierten MMP-Beteiligung notwendig wäre.

Über ein breites Spektrum möglicher regulatorischer Einflüsse kann eine hRas-Aktivität die Motilität und den Invasionsprozess steigern. Alle diese Prozesse beinhalten eine Adaption des Aktin-Zytoskeletts, beschrieben über den PI3K-Signalweg oder den Einfluss auf die Kinase p38 und die F-Aktin-Polymerisierung. [240]. So interagierte hRas direkt mit PI3K oder indirekt über die Wechselwirkung mit der Rho Kinase Rac, was in beiden Fällen zu einer Aktivierung von p38 führte. Diese Signalkaskade resultierte in glatten Muskelzellen in einer Phosphorylierung des Hitzeschockproteins 27, welches die F-Aktin Polymerisation und die zytoskelettale Remodellierung reguliert [241]. Ein weiteres Beispiel für den Einfluss von Ras auf aktinbasierte Strukturen über Rac ist die Regulation der Formation von Lamellipodien. In neuronalen Zellen wurde über die Aktivierung von Rac durch PI3K die Lamellipodien-Bildung gesteigert [242]. Daher wurde in dieser Arbeit erstmalig die invasionsfördernde Auswirkung der hRas-Aktivierung auf die beschriebenen Adaptionen im Aktin-Zytoskelett in Brustdrüsenepithelien untersucht.

Eine zentrale invasionsfördernde Adaption bei nicht transformierten Brustsphäroiden war die Entstehung von SF und die daraus resultierenden kontraktilen Zellkräfte. Diese Zellkräfte waren bei hRas Brustsphäroiden keine eindeutige Erklärung für die hohe und vor allem deutlich frühzeitigere Invasion. Weder im Vergleich zu Wt Brustdrüsen noch nach der Induktion der hRas-Aktivität waren die Werte der kontraktilen Zugkräfte auf einer tumorassoziierten Steifigkeit erhöht. Auch eine Inhibition der Myosin II vermittelten Zellkraft und MMP wirkte sich nicht auf die

Invasionshäufigkeit aus. Im Einklang mit diesem Ergebnis standen die hohe MS-Dichte und die kaum vorhandenen SF an der Kontaktfläche zur EZM. Durch die frühzeitige Invasion konnten kaum SF an der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche entstehen, wodurch kein signifikant erhöhter tangentialer BM-Stress entstehen konnte.

Es bestand jedoch die Möglichkeit, dass die Brustsphäroide bereits so stark pro-invasiv stimuliert wurden und eine hohe mechanische Instabilität (geringe BM-Integrität) aufwiesen, dass keine größeren Kräfte notwendig waren, um die BM lokal zu zerstören. In Wt-Azini konnte deutlich gezeigt werden, dass die BM als Barriere eine invasionsverzögernde Pufferwirkung hat, die abhängig von der Maturierung des Kollagen IV Netzwerkes und der damit verbundenen Widerstandsfähigkeit war [33].

Ein Faktor, der die Integrität der BM höchstwahrscheinlich negativ beeinflusst, ist die bereits erwähnte hohe Anzahl an Aktin-MS. Die hohe Dichte an MS, die ebenfalls über MLC reguliert wurden, könnte ein Indiz für eine erhöhte vertikale Fortsatzkraft (Ziehen und Drücken) sein. Diese hohe mechanische Aktivität konnte, wie beim Wt bereits geschlussfolgert, ein Grund für die Schwächung der BM sein. Dementsprechend wies die BM der hRas Azini auch wegen der hohen MS-Dichte viele Poren auf, sodass das Kollagen IV Netzwerk an der Kontaktfläche instabiler wirkte. Dies verifizierte die Annahme eines pathologischen Einflusses einer erhöhten *Sensing*-Aktivität und einer frühen Schwächung der BM, bevor die invasionsfördernden kontraktile Stressfasern entstehen konnten.

Um diese Ergebnisse abschließend zu verifizieren, müsste mittels ERISM bestätigt werden, ob die mechanische Aktivität der Filopodien durch die hRas-Aktivierung gesteigert wird. Die Dichte der MS bei der hRas-Variante befindet sich im Vergleich zum Wt dauerhaft auf dem Level der invasivsten Fraktion nicht transformierter Brustsphäroide. Allerdings lag keine Steigerung der MS-Dichte nach einer hRas Induktion vor. Möglicherweise war jedoch ein Maximum der MS-Formation erreicht und die gebildeten MS unterschieden sich in der mechanischen Aktivität. Einen Hinweis auf Unterschiede in der mechanischen Aktivität gaben Lebendzellaufnahmen von Azini in der physiologischen Gelmatrix über 65 Stunden. Die Aktivierung von hRas resultierte in einer deutlich erkennbaren kohärenten Zellbewegung des ganzen Azinus und der Zunahme der Azinus-Größe, während bei unbehandelten Azini kaum Bewegung bei den azinaren Zellen auftrat. Diese höhere zelluläre Motilität könnte indirekt auch ein Maß für eine generell erhöhte mechanische Aktivität der Azini oder der MS an der Kontaktfläche sein und eine nochmals gesteigerte Invasion durch eine gesteigerte BM-Schwächung nach der hRas-Aktivierung erklären. Auch im Wt zeigten die mechanisch aktivsten und invasivsten Azini, gemessen mittels der Zugkraft- und

Invasionsanalysen, die meisten Filopodien. Die entsprechenden Versuche mittels ERISM-Technologie zum Nachweis des Ziehens und Drückens von MS an der Kontaktfläche wurden bereits durchgeführt, doch die Auswertungen des Kooperationspartners lagen zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit noch nicht vor.

Eine erhöhte mechanische Aktivität könnte auch in Zusammenhang mit einer gesteigerten Proliferation stehen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hRas Brustsphäroide größer sind als Wt Sphäroide, weil die einzelnen azinaren Zellen größer sind. Zum einen wurde dieser Effekt durch die Eigenschaft gefördert, dass hRas induzierte Zellen sich selbst in tumorbedingten eingegengten Zellverbänden abrunden und teilen können [158]. Zum anderen könnte auch eine erhöhte Proliferation und eine gesteigerte Zellzahl die Vergrößerung der Sphäroide verursachen. Zwar konnte nach 16 Stunden hRas Induktion noch kein Unterschied in Bezug auf die Proliferation festgestellt werden, doch die Lebendzell-Aufnahmen über 65 Stunden deuteten auf einen proliferativen Unterschied hin, der erst nach den 16 Stunden auftrat. Dieser Effekt trug dazu bei, dass hRas aktivierte Azini größer wurden. Ein proliferationssteigernder Einfluss von hRas wurde in anderen Studien bereits gezeigt [243, 244]

Im Einklang mit der beobachteten höheren Zellaktivität im Kontext der BM-Schwächung durch erhöhte mechanische Einflüsse stehen Studien, die ein vermehrtes Proliferationsaufkommen mit Invasion verknüpfen. Während der Proliferation bei Tumorzellen akkumulieren die teilenden Zellen ihre Biomasse und vergrößern somit ihr Volumen [245, 246]. Die hier wirkenden proliferativen Kräfte durch die Vergrößerung der Zellen und des Azinus könnten die BM weiter schwächen und folglich zerstören.

Neben möglichem proliferativen BM-Stress durch die wachsende Zellmasse und einer frühen MS induzierten BM-Schwächung waren die Beobachtungen eines instabileren Zellverbundes im gesamten Azinus bei der hRas-Variante ein Indiz für frühe invasive Veränderungen. Basierend auf den bisherigen Daten und den Beobachtungen von Veränderungen im Aktin-Zytoskelett an den Zell-Zell-Grenzen lag der Verdacht nahe, dass hRas EMT-ähnliche Prozesse in Brustsphäroiden förderte. An der Azinus-BM-EZM Kontaktfläche traten bereits mesenchymale Zellen mit elongierten Filopodien in nicht-invasiven Azini auf. Auch eine Vielzahl an Filopodien zwischen den Zell-Zell-Kontakten und Filopodien, die in die zellfreien Bereiche innerhalb des Azinus hineinragten, unterstützten diese Aussage. Dies konnte in nicht-transformierten Azini nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass SF vermittelter BM-Stress vermutlich einen deutlich geringeren Einfluss auf die Invasion bei Brustdrüsenepithelien mit aktivierten hRas Signalwegen als bei nicht-transformierten Brustsphäroiden hat. Brustsphäroide mit aktiviertem hRas wurden bereits invasiv, bevor sich vermehrt SF bilden konnten. Möglicherweise reichten diese geringen Kräfte in Kombination mit proliferativem Stress auf die BM bereits aus. Vielmehr nahmen jedoch vermutlich andere Faktoren einen größeren Einfluss auf die Invasion. Die hRas bedingten zytoskelettalen Veränderungen, insbesondere die hohe Dichte an MS, möglicherweise einhergehend mit einer höheren mechanischen Aktivität und eine verstärkte Induktion der EMT Prozesse, sind höchstwahrscheinlich die Hauptfaktoren einer grundsätzlich gesteigerten Invasion bei hRas Azini.

Weiterhin konnten diese Veränderungen der hRas Azini nur die generell höhere Invasion im Vergleich zu Wt Azini erklären. Diese Effekte zu verstehen war ein wichtiger Schritt in der Etablierung und Charakterisierung des Modells. Abschließend wird ein interessanter Effekt, der auf die hRas-Aktivierung zurückzuführen war, diskutiert.

Anfangs wurden die BM-Maturierung und die EZM-Steifigkeit als wichtige Parameter für die Invasionshäufigkeit beschrieben. Die EZM-Steifigkeit wurde bereits untersucht und hat auch bei hRas Azini die Invasion erhöht. Abschließend wurde die BM-Maturierung als Indikator für die Widerstandsfähigkeit untersucht. Die Ergebnisse einer detaillierten Untersuchung des Kollagen IV Netzwerkes verdeutlichten die große Bedeutung der BM im Invasionsprozess. Eingangs wurde bereits eine potenzielle Schwächung der BM bei hRas Sphäroiden vermutet, die durch die erhöhte MS-Dichte an der Kontaktfläche der BM entstanden sein könnte. Diese Schwächung der BM wurde anhand der Intensität von Kollagen IV gemessen. Das BM-Netzwerk wurde graduell mit einer zunehmenden hRas-Aktivierung reduziert. Eine Reduktion des Kollagen IV Intensitätssignals wurde mit einer geringen BM-Integrität und einer schwach widerstandsfähigen BM gleichgesetzt. Bereits nicht induzierte hRas Azini hatten eine deutlich schwächere BM als nicht transformierte Brustsphäroide, doch war das Kollagen IV Netzwerk der BM nochmals signifikant schwächer nach einer Aktivierung von hRas Signalwegen. Dies bedeutete, dass die BM zwar nachweislich konstant vorhanden war, aber die anti-invasive Wirksamkeit der BM als physikalische Barriere durch eine hRas-Aktivität abnahm. Dieser Effekt konnte im Umkehrschluss unter der Annahme, dass auch in nicht induzierten hRas Zellen eine leicht erhöhte hRas-Aktivierung vorlag, den graduellen Anstieg in der Invasionshäufigkeit erklären. Eine bereits geschwächte BM könnte von invasiv stimulierten Zellen durch eine

gesteigerte MS-Aktivität, proliferativen Stress und relativ geringe SF induzierte Zellkräfte verhältnismäßig leicht durchbrochen werden.

Um diesen Invasionsprozess spezifisch zu verhindern, müsste verstanden werden, warum die BM durch die hRas-Aktivität geschwächt wurde. Neben der gesteigerten MS-Dichte und -Aktivität könnten weitere Ursachen für ein gestörtes *BM-Remodelling* vorliegen, die die BM-Maturierung negativ beeinflussen. Die kohärente Zellbewegung wurde als wichtiger Regulationsmechanismus für die Gewebepolarisation beschrieben und somit auch für die Ausbildung der BM [176]. Eine in dieser Dissertation beschriebene hRas induzierte erhöhte Zellbewegung könnte die Gewebemöostase beeinträchtigen und den ständigen BM-Erneuerungsprozess stören.

Neben den bisher genannten mechanischen Faktoren, die die BM-Erneuerung und -Widerstandsfähigkeit beeinflussen können, wurde Myosin X untersucht. Während der SF und MS induzierte BM-Stress Myosin II vermittelt war, wurde in den Spitzen der MS azinärer hRas Zellen Myosin X detektiert. Ein erster Vergleich zu Wt Azini deutete darauf hin, dass Myosin X im Wt seltener in den MS lokalisiert war. Eine Quantifizierung der MS und möglicher Unterschiede zwischen hRas induzierten und nicht induzierten Azini steht noch aus.

Myosin X könnte ein interessantes Molekül in Bezug auf eine frühe MS induzierte BM-Schwächung sein, da es sowohl an der Entstehung von Filopodien beteiligt ist als auch das Bündeln von Aktin-Fasern unterstützt, um längere Filopodien auszubilden [247]. In einem physiologischen Kontext ist Myosin X also für die Ausbildung mechanosensitiver Aktin-Fortsätze entscheidend, in polarisierten Epithelzellen ist Myosin X an der Formation von Zell-Zell-Verbindungen beteiligt. So führte eine Inaktivierung von Myosin X in Nierenzellen zu einer verzögerten Bildung von Zellverbindungen und störte die Formation eines Lumens [248]. Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind die diskutierten möglichen Einflüsse von Myosin X in der Tumorprogression. Es wird vermutet, dass Myosin X über die Einflüsse auf die Reorganisation von zytoskelettalen Aktin-Strukturen die Tumorprogression fördern kann. Über die vermehrte Bildung und Aktivität von MS könnte die Zellmigration und folglich auch die Invasion unterstützt werden [249].

In Brustkrebs wurde eine Myosin X Überexpression in einigen Krebszelllinien nachgewiesen [250]. Eine Dysregulation von Myosin X könnte also sowohl einen instabileren Zellverband durch die fehlerhafte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten als auch eine gesteigerte invasionsfördernde MS-Aktivität erklären. Ob und inwiefern Myosin X in Brustsphäroiden entscheidend zu einer erhöhten Invasion beiträgt und in welchem Maße dies über hRas reguliert wird, muss in zukünftigen Arbeiten weitergehend untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Für ein besseres Verständnis von mechanobiologisch relevanten Regelkreisen konnte im Rahmen dieser Arbeit zu Beginn der Promotion die kraftinduzierte BM-Schwächung in Brustsphäroiden nachgewiesen werden. Zugkräfte wurden eindeutig als Auslöser für lokalen BM-Stress definiert, der die Zellinvasion und eine Metastasierung fördert. Die BM wurde als physikalische Barriere definiert, die die Tumorzellen an einer Transmigration in die Zellumgebung hindert. Tumorassoziierte Faktoren wie die Versteifung der EZM, die zellulären Zugkräfte und eine tumorassoziierte EGF-Überexpression führen zu einer malignen Transition bei Brustdrüsenepithelien, die die Widerstandsfähigkeit der BM reduziert. Darauf aufbauend wurden erstmalig in dieser Arbeit aktinbasierte Zellfortsätze charakterisiert, die mechanisch aktiv und mutmaßlich auch im Invasionsprozess beteiligt sind.

Die Bildung dieser mechanosensorischen MS waren in einem physiologischen Kontext wichtig für die *Sensing*-Aktivität der EZM. Während einer malignen Transition der Brustdrüsen korrelierte die MS-Steigerung mit zunehmender Malignität, wodurch die Widerstandsfähigkeit der BM vermindert wurde. Mit fortschreitender Tumorprogression veränderten Brustsphäroide ihr gesamtes Aktin-Zytoskelett als Antwort auf die pro-invasiven Einflüsse. Anstelle der zunächst nicht proteolytisch wirkenden MS bildeten sich über mechanosensorische Fokaladhäsionskomplexe kontraktile SF. Dieser SF induzierte und Myosin II vermittelte BM-Stress konnte als neuer Mechanismus zur Erklärung der kraftinduzierten Invasion durch die Zugkraftanalysen identifiziert werden. Infolgedessen veränderten sich die gebildeten MS. Aus mechanisch aktiven kurzen MS entstanden längere und proteolytisch aktive invadopodiale Fortsätze in bereits invasiven Zellen. Damit wurden aktinbasierte MS oder Filopodien als funktionelle Brücke zwischen der mechanobiologisch relevanten kraftinduzierten und der proteolytisch abhängigen Invasion bestätigt.

Zusätzlich konnte das verwendete hRas-Brustdrüsenmodell erstmalig zur Untersuchung des Einflusses des proto-Onkogens während der malignen Transition in einem 3D Kontext validiert und quantifiziert werden. Onkogenes hRas führte zu einer nochmals gesteigerten Invasivität, höchstwahrscheinlich durch die Ausbildung eines instabileren azinaren Zellverbundes und einer BM mit geringer struktureller Integrität. Eine hRas bedingte Störung der BM-Remodellierung resultierte folglich in einer frühzeitigen BM-Zerstörung durch mechanisch aktive MS.

Diese dysregulierte BM-Remodellierung könnte durch den zusätzlichen proliferativen Stress, einen möglichen gestörten Kollagen IV Transport und eine Beteiligung von invasionsassoziiertem Myosin X ausgelöst werden.

Diese Arbeit trägt somit zu einem besseren Verständnis der biomechanisch regulierten BM-Invasion bei. Erstmals wurden die Parameter einer tumorassoziierten EZM-Versteifung, der BM-Entwicklung bzw. -Remodellierung und onkogenen hRas Signalwegen in Brustdrüsenepithelien mit fundamentalen EMT-ähnlichen zytoskelettalen Veränderungen verknüpft. Über die Identifizierung der Mechanismen der kontraktilen Zellkraft als auch durch den Nachweis von mechanisch aktiven und invasionsfördernden MS konnten wichtige Aspekte des Invasionsprozesses im humanen Mammakarzinom erforscht werden.

6 Ausblick

Trotz der Erforschung einiger invasionsrelevanter Parameter und deren Wechselwirkungen in einem *in vivo* ähnlichen Zellkulturmodell, sind viele involvierte Faktoren und zelluläre Wechselwirkungen weitestgehend unbekannt. Daher besteht weiterhin großer Forschungsbedarf, um das Wissen aus der Forschung anzuwenden und diesen Invasionsprozess spezifisch zu inhibieren. Auch in dieser Arbeit konnte die Invasion nie gänzlich gesenkt werden, obwohl einzelne invasionsrelevante Faktoren inhibiert wurden. Daher müssen die komplexen Wechselwirkungen dieses gesamten Invasionsvorgangs, bei dem intrazelluläre und externe Stimuli Einfluss nehmen, besser verstanden werden.

Besonders die Verifizierung der hier gewonnenen Daten und die weiterführende Erforschung des Invasionsprozesses der Brustdrüsenepithelien in anderen *in vivo* ähnlichen Zellkultursystemen oder Tiermodellen sollte von großem Interesse sein. Eine Möglichkeit könnten Brustkrebs-Stammzellen (BCSC, engl. *breast cancer stem cells*; zur Verfügung gestellt von der AG Molekulare Gynäkologie, Uniklinikum Aachen, Dr. Jochen Maurer) darstellen. Diese Zellen haben einen hohen Anteil an Krebs-Stammzellen, die aus basalen Brusttumoren isoliert wurden, und können *in vitro* wieder 3D Tumorsphäroide bilden. Obwohl morphologisch sehr divers konnten in fast allen BCSC Sphäroiden lange BM-durchspannende Filopodien in ersten IF-Färbungen nachgewiesen werden. Auf Grund einer nur geringfügigen basoapikalen Polarisation mit einer schwach maturierten BM und bereits frühzeitig invasiven Zellen mit dicken, elongierten Filopodien an der Sphäroid-BM-EZM Kontaktfläche glichen diese dem induzierten hRas Phänotyp. Zukünftig wäre es hier sehr interessant diese BCSC Linien weiter im Hinblick auf ihr Invasionsverhalten und die Rolle von hRas zu analysieren.

Bezugnehmend auf das induzierbare hRas-Zellkultursystem müssen zukünftig weitere Versuche durchgeführt werden, die zu einem besseren Verständnis des Modells und der hRas-Wirkung beitragen. Konkret sollte die pERK-Aktivierung im Detail analysiert werden. Um die funktionellen Auswirkungen besser zu erklären, wäre es von Vorteil zu verstehen wie schnell eine hRas-Aktivierung zu einer pERK-Aktivität führt und welche nachgeschalteten Zielproteine aktiviert werden, die die gesteigerte Invasivität erklären könnten. Möglich wäre hier ein Einfluss auf Myosin X. Die gezeigte erste Myosin X Färbung war vielversprechend in Bezug auf eine mögliche Beteiligung an der hRas induzierten früheren und höheren BM-Invasion. Hier müsste neben der MS-Dynamik zwischen induzierten und nicht induzierten hRas Azini vor allem eine Quantifizierung des Myosin X Signals vorgenommen werden.

Weiterhin wäre es von großem Interesse die Ursachen für die nachgewiesene frühe BM-Schwächung zu untersuchen. Aufschlussreich könnten die Untersuchungen zur mechanischen Aktivität der MS mittels ERISM sein. Eine erste vorläufige Sichtung einzelner Azini könnte darauf hindeuten, dass eine hRas Induktion die Fortsatz-Aktivität (Ziehen und Drücken) in einer prä-malignen Phase deutlich steigert. Diese vorläufige Interpretation muss jedoch mit einer größeren Versuchsanzahl bestätigt und wiederholt werden. In diesem Zusammenhang wäre eine Visualisierung der zytoskelettalen Dynamik spannend, um mögliche hRas induzierte Unterschiede zu identifizieren. Dazu müsste ebenfalls eine RFP-LifeAct Variante für die hRas Zellen hergestellt werden.

7 Publikationsliste

Erstautorenschaften mit Bezug auf das Promotionsthema:

- Eschenbruch J, Dreissen G, Springer R, Konrad J, Merkel R, Hoffmann B, Noetzel E. From Microspikes to Stress Fibers: Actin Remodeling in Breast Acini Drives Myosin II-Mediated Basement Membrane Invasion. *Cells*. **2021** Aug 4;10(8):1979. doi: 10.3390/cells10081979. PMID: 34440749; PMCID: PMC8394122.
- Gaiko-Shcherbak A, Eschenbruch J, Kronenberg NM, Teske M, Wolters B, Springer R, Gather MC, Merkel R, Hoffmann B, Noetzel E. Cell Force-Driven Basement Membrane Disruption Fuels EGF- and Stiffness-Induced Invasive Cell Dissemination from Benign Breast Gland Acini. *Int J Mol Sci*. **2021** Apr 12;22(8):3962. doi: 10.3390/ijms22083962. PMID: 33921304; PMCID: PMC8070162.

Weitere Publikationen:

- Rose M, Noetzel E, Kistermann J, Eschenbruch J, Rushrush S, Gan L, Knüchel R, Gaisa NT, Dahl E. The ECM Modulator ITIH5 Affects Cell Adhesion, Motility and Chemotherapeutic Response of Basal/Squamous-Like (BASQ) Bladder Cancer Cells. *Cells*. **2021** Apr 28;10(5):1038. doi: 10.3390/cells10051038. PMID: 33924987; PMCID: PMC8146567.
- Mijnes J, Tiedemann J, Eschenbruch J, Gasthaus J, Bringezu S, Bauerschlag D, Maass N, Arnold N, Weimer J, Anzeneder T, Fasching PA, Rübner M, Bruno B, Heindricks U, Freres J, Schulz H, Hilgers RD, Ortiz-Brüchle N, von Serenyi S, Knüchel R, Kloten V, Dahl E. SNiPER: a novel hypermethylation biomarker panel for liquid biopsy based early breast cancer detection. *Oncotarget*. 2019 Nov 5;10(60):6494-6508. doi: 10.18632/oncotarget.27303. Erratum in: *Oncotarget*. **2020** Jul 28;11(30):2958. PMID: 31741713; PMCID: PMC6849652.
- Schlenzog M, Magnus L, Heide T, Eschenbruch J, Steib F, Tator M, Kloten V, Rose M, Noetzel E, Gaisa NT, Knüchel R, Dahl E. Epigenetic loss of putative tumor suppressor SFRP3 correlates with poor prognosis of lung adenocarcinoma patients. *Epigenetics*.

2018;13(3):214-227. doi: 10.1080/15592294.2016.1229730. Epub **2018** Apr 18. PMID: 27623992; PMCID: PMC5997146.

- Klotten V, Rüchel N, Bröchle NO, Gasthaus J, Freudenmacher N, Steib F, Mijnes J, Eschenbruch J, Binnebösel M, Knüchel R, Dahl E. Liquid biopsy in colon cancer: comparison of different circulating DNA extraction systems following absolute quantification of KRAS mutations using Intplex allele-specific PCR. *Oncotarget*. **2017** Sep 21;8(49):86253-86263. doi: 10.18632/oncotarget.21134. PMID: 29156792; PMCID: PMC5689682.
- Klotten V, Schlensog M, Eschenbruch J, Gasthaus J, Tiedemann J, Mijnes J, Heide T, Braunschweig T, Knüchel R, Dahl E. Abundant NDRG2 Expression Is Associated with Aggressiveness and Unfavorable Patients' Outcome in Basal-Like Breast Cancer. *PLoS One*. **2016** Jul 11;11(7):e0159073. doi: 10.1371/journal.pone.0159073. PMID: 27400234; PMCID: PMC4939972.

8 Literaturverzeichnis

1. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
2. Emens, L.A., *Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes*. Clin Cancer Res, 2018. **24**(3): p. 511-520.
3. Sopik, V., *International variation in breast cancer incidence and mortality in young women*. Breast Cancer Res Treat, 2021. **186**(2): p. 497-507.
4. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
5. Akarolo-Anthony, S.N., T.O. Ogundiran, and C.A. Adebamowo, *Emerging breast cancer epidemic: evidence from Africa*. Breast Cancer Res, 2010. **12 Suppl 4**: p. S8.
6. El Saghir, N.S., et al., *Trends in epidemiology and management of breast cancer in developing Arab countries: a literature and registry analysis*. Int J Surg, 2007. **5**(4): p. 225-33.
7. Brinton, L.A., et al., *Recent trends in breast cancer among younger women in the United States*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(22): p. 1643-8.
8. Billari, F.C., A.C. Liefbroer, and D. Philipov, *The Postponement of Childbearing in Europe: Driving Forces and Implications* Austrian Academy of Sciences Press, 2006. **4**(Vienna Yearbook of Population Research): p. 1-17.
9. MacMahon, B., *Epidemiology and the causes of breast cancer*. Int J Cancer, 2006. **118**(10): p. 2373-8.
10. Winters, S., et al., *Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. **151**: p. 1-32.
11. Mehrgou, A. and M. Akouchekian, *The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development*. Med J Islam Repub Iran, 2016. **30**: p. 369.
12. Martini, R., L. Newman, and M. Davis, *Breast cancer disparities in outcomes; unmasking biological determinants associated with racial and genetic diversity*. Clin Exp Metastasis, 2021.
13. Loibl, S. and L. Gianni, *HER2-positive breast cancer*. Lancet, 2017. **389**(10087): p. 2415-2429.
14. Dai, X., et al., *Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends*. Am J Cancer Res, 2015. **5**(10): p. 2929-43.

15. Perret, G.Y. and M. Crepin, *New pharmacological strategies against metastatic spread*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2008. **22**(5): p. 465-92.
16. Sekiguchi, R. and K.M. Yamada, *Basement Membranes in Development and Disease*. *Curr Top Dev Biol*, 2018. **130**: p. 143-191.
17. Inman, J.L., et al., *Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment*. *Development*, 2015. **142**(6): p. 1028-42.
18. Hassiotou, F. and D. Geddes, *Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge*. *Clin Anat*, 2013. **26**(1): p. 29-48.
19. Russo, J. and I.H. Russo, *Development of the human breast*. *Maturitas*, 2004. **49**(1): p. 2-15.
20. Jutte, J., et al., *In vivo assessment of number of milk duct orifices in lactating women and association with parameters in the mother and the infant*. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2014. **14**: p. 124.
21. Vidi, P.A., M.J. Bissell, and S.A. Lelievre, *Three-dimensional culture of human breast epithelial cells: the how and the why*. *Methods Mol Biol*, 2013. **945**: p. 193-219.
22. Khalilgharibi, N. and Y. Mao, *To form and function: on the role of basement membrane mechanics in tissue development, homeostasis and disease*. *Open Biol*, 2021. **11**(2): p. 200360.
23. Diedrich, et al., *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 2007, Springer medizin Verlag.
24. Mannello, F., G.A. Tonti, and F. Canestrari, *Nutrients and nipple aspirate fluid composition: the breast microenvironment regulates protein expression and cancer aetiology*. *Genes Nutr*, 2008. **3**(2): p. 77-85.
25. Schwarz, M.A., et al., *Desmosomes and hemidesmosomes: constitutive molecular components*. *Annu Rev Cell Biol*, 1990. **6**: p. 461-91.
26. Fu, R., et al., *Junctional complexes in epithelial cells: sentinels for extracellular insults and intracellular homeostasis*. *FEBS J*, 2021.
27. Geiger, B., J.P. Spatz, and A.D. Bershadsky, *Environmental sensing through focal adhesions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(1): p. 21-33.
28. Epifano, C. and M. Perez-Moreno, *Crossroads of integrins and cadherins in epithelia and stroma remodeling*. *Cell Adh Migr*, 2012. **6**(3): p. 261-73.
29. Pozzi, A., P.D. Yurchenco, and R.V. Iozzo, *The nature and biology of basement membranes*. *Matrix Biol*, 2017. **57-58**: p. 1-11.
30. Halfter, W., et al., *Protein composition and biomechanical properties of in vivo-derived basement membranes*. *Cell Adh Migr*, 2013. **7**(1): p. 64-71.

31. LeBleu, V.S., B. Macdonald, and R. Kalluri, *Structure and function of basement membranes*. Exp Biol Med (Maywood), 2007. **232**(9): p. 1121-9.
32. Kelley, L.C., et al., *Traversing the basement membrane in vivo: a diversity of strategies*. J Cell Biol, 2014. **204**(3): p. 291-302.
33. Gaiko-Shcherbak, A., et al., *Cell Force-Driven Basement Membrane Disruption Fuels EGF- and Stiffness-Induced Invasive Cell Dissemination from Benign Breast Gland Acini*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(8).
34. Li, S., et al., *Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts*. J Cell Biol, 2005. **169**(1): p. 179-89.
35. Jayadev, R. and D.R. Sherwood, *Basement membranes*. Curr Biol, 2017. **27**(6): p. R207-R211.
36. Khoshnoodi, J., V. Pedchenko, and B.G. Hudson, *Mammalian collagen IV*. Microsc Res Tech, 2008. **71**(5): p. 357-70.
37. Gaiko-Shcherbak, A., et al., *The Acinar Cage: Basement Membranes Determine Molecule Exchange and Mechanical Stability of Human Breast Cell Acini*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145174.
38. Chang, J. and O. Chaudhuri, *Beyond proteases: Basement membrane mechanics and cancer invasion*. J Cell Biol, 2019. **218**(8): p. 2456-2469.
39. Kefalides, N.A., *Structure and biosynthesis of basement membranes*. Int Rev Connect Tissue Res, 1973. **6**: p. 63-104.
40. Abrams, G.A., et al., *Nanoscale topography of the corneal epithelial basement membrane and Descemet's membrane of the human*. Cornea, 2000. **19**(1): p. 57-64.
41. Hagedorn, E.J. and D.R. Sherwood, *Cell invasion through basement membrane: the anchor cell breaches the barrier*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(5): p. 589-96.
42. Hamano, Y., et al., *Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin*. Cancer Cell, 2003. **3**(6): p. 589-601.
43. Horejs, C.M., et al., *Biologically-active laminin-111 fragment that modulates the epithelial-to-mesenchymal transition in embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(16): p. 5908-13.
44. Smyth, N., et al., *Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation*. J Cell Biol, 1999. **144**(1): p. 151-60.

45. Gautam, M., et al., *Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice*. Cell, 1996. **85**(4): p. 525-35.
46. Sertie, A.L., et al., *Collagen XVIII, containing an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, plays a critical role in the maintenance of retinal structure and in neural tube closure (Knobloch syndrome)*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(13): p. 2051-8.
47. Willem, M., et al., *Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma1 chain interferes with kidney and lung development*. Development, 2002. **129**(11): p. 2711-22.
48. Tanner, K., *Regulation of the basement membrane by epithelia generated forces*. Phys Biol, 2012. **9**(6): p. 065003.
49. Hebner, C., V.M. Weaver, and J. Debnath, *Modeling morphogenesis and oncogenesis in three-dimensional breast epithelial cultures*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 313-39.
50. Qu, Y., et al., *Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0131285.
51. Lacroix, M. and G. Leclercq, *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **83**(3): p. 249-89.
52. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H. Stelzer, *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 839-45.
53. Unger, C., et al., *Modeling human carcinomas: physiologically relevant 3D models to improve anti-cancer drug development*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **79-80**: p. 50-67.
54. Nath, S. and G.R. Devi, *Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model*. Pharmacol Ther, 2016. **163**: p. 94-108.
55. Debnath, J., S.K. Muthuswamy, and J.S. Brugge, *Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures*. Methods, 2003. **30**(3): p. 256-68.
56. Benton, G., et al., *Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells*. Int J Cancer, 2011. **128**(8): p. 1751-7.
57. Kleinman, H.K. and G.R. Martin, *Matrigel: basement membrane matrix with biological activity*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 378-86.
58. Fabris, G., et al., *Nanoscale Topography and Poroelastic Properties of Model Tissue Breast Gland Basement Membranes*. Biophys J, 2018. **115**(9): p. 1770-1782.
59. Stowers, R.S., et al., *Extracellular Matrix Stiffening Induces a Malignant Phenotypic Transition in Breast Epithelial Cells*. Cell Mol Bioeng, 2017. **10**(1): p. 114-123.

60. Klos, K.S., et al., *Building bridges toward invasion: tumor promoter treatment induces a novel protein kinase C-dependent phenotype in MCF10A mammary cell acini*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90722.
61. Bahcecioglu, G., et al., *Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment*. Acta Biomater, 2020. **106**: p. 1-21.
62. Byler, S., et al., *Genetic and epigenetic aspects of breast cancer progression and therapy*. Anticancer Res, 2014. **34**(3): p. 1071-7.
63. Paszek, M.J. and V.M. Weaver, *The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2004. **9**(4): p. 325-42.
64. Butcher, D.T., T. Alliston, and V.M. Weaver, *A tense situation: forcing tumour progression*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(2): p. 108-22.
65. Li, B. and J.H. Wang, *Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement*. J Tissue Viability, 2011. **20**(4): p. 108-20.
66. DeNardo, D.G. and L.M. Coussens, *Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression*. Breast Cancer Res, 2007. **9**(4): p. 212.
67. Kopanska, K.S., et al., *Tensile Forces Originating from Cancer Spheroids Facilitate Tumor Invasion*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0156442.
68. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 740-6.
69. Le Bras, G.F., K.J. Taubenslag, and C.D. Andl, *The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression*. Cell Adh Migr, 2012. **6**(4): p. 365-73.
70. Gilles, C., et al. *Matrix Metalloproteases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Implications for Carcinoma Metastasis*. Madame Curie Bioscience Database 2000 - 2013 Austin (TX): Landes Bioscience; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6387/>.
71. Chang, T.T., D. Thakar, and V.M. Weaver, *Force-dependent breaching of the basement membrane*. Matrix Biol, 2017. **57-58**: p. 178-189.
72. Gonzalez-Conchas, G.A., et al., *Epidermal growth factor receptor overexpression and outcomes in early breast cancer: A systematic review and a meta-analysis*. Cancer Treat Rev, 2018. **62**: p. 1-8.
73. Ali, R. and M.K. Wendt, *The paradoxical functions of EGFR during breast cancer progression*. Signal Transduct Target Ther, 2017. **2**.

74. Yamaoka, T., M. Ohba, and T. Ohmori, *Molecular-Targeted Therapies for Epidermal Growth Factor Receptor and Its Resistance Mechanisms*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(11).
75. Masuda, H., et al., *Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2012. **136**(2): p. 331-45.
76. Lu, Z., et al., *Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(12): p. 4016-31.
77. Vincenti, M.P. and C.E. Brinckerhoff, *Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you?* J Cell Physiol, 2007. **213**(2): p. 355-64.
78. Cox, T.R. and J.T. Erler, *Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer*. Dis Model Mech, 2011. **4**(2): p. 165-78.
79. Radisky, E.S. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 201-12.
80. Kohrmann, A., et al., *Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 188.
81. Li, H., et al., *The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis*. Oncol Lett, 2017. **14**(5): p. 5865-5870.
82. Cathcart, J., A. Pulkoski-Gross, and J. Cao, *Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas*. Genes Dis, 2015. **2**(1): p. 26-34.
83. Coussens, L.M., B. Fingleton, and L.M. Matrisian, *Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2387-92.
84. Paszek, M.J., et al., *Tensional homeostasis and the malignant phenotype*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 241-54.
85. Samani, A., J. Zubovits, and D. Plewes, *Elastic moduli of normal and pathological human breast tissues: an inversion-technique-based investigation of 169 samples*. Phys Med Biol, 2007. **52**(6): p. 1565-76.
86. Provenzano, P.P., et al., *Matrix density-induced mechanoregulation of breast cell phenotype, signaling and gene expression through a FAK-ERK linkage*. Oncogene, 2009. **28**(49): p. 4326-43.
87. Boyd, N.F., et al., *Evidence that breast tissue stiffness is associated with risk of breast cancer*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e100937.

88. Borau, C., R.D. Kamm, and J.M. Garcia-Aznar, *Mechano-sensing and cell migration: a 3D model approach*. Phys Biol, 2011. **8**(6): p. 066008.
89. Ingber, D.E., *Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 8): p. 1397-408.
90. Gieni, R.S. and M.J. Hendzel, *Mechanotransduction from the ECM to the genome: are the pieces now in place?* J Cell Biochem, 2008. **104**(6): p. 1964-87.
91. DuFort, C.C., M.J. Paszek, and V.M. Weaver, *Balancing forces: architectural control of mechanotransduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(5): p. 308-19.
92. Longhurst, C.M. and L.K. Jennings, *Integrin-mediated signal transduction*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(6): p. 514-26.
93. Wang, N., *Review of Cellular Mechanotransduction*. J Phys D Appl Phys, 2017. **50**(23).
94. Martino, F., et al., *Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 824.
95. Haage, A. and I.C. Schneider, *Cellular contractility and extracellular matrix stiffness regulate matrix metalloproteinase activity in pancreatic cancer cells*. FASEB J, 2014. **28**(8): p. 3589-99.
96. Kostic, A., C.D. Lynch, and M.P. Sheetz, *Differential matrix rigidity response in breast cancer cell lines correlates with the tissue tropism*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6361.
97. Sunyer, R. and X. Trepate, *Durotaxis*. Curr Biol, 2020. **30**(9): p. R383-R387.
98. Korn, E.D., *Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells*. Physiol Rev, 1982. **62**(2): p. 672-737.
99. Pring, M., A. Weber, and M.R. Bubb, *Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end*. Biochemistry, 1992. **31**(6): p. 1827-36.
100. Atkinson, S.J., M.A. Hosford, and B.A. Molitoris, *Mechanism of actin polymerization in cellular ATP depletion*. J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5194-9.
101. Gupton, S.L. and F.B. Gertler, *Filopodia: the fingers that do the walking*. Sci STKE, 2007. **2007**(400): p. re5.
102. Arjonen, A., R. Kaukonen, and J. Ivaska, *Filopodia and adhesion in cancer cell motility*. Cell Adh Migr, 2011. **5**(5): p. 421-30.
103. Salbreux, G., G. Charras, and E. Paluch, *Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(10): p. 536-45.
104. Svitkina, T., *The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(1).

105. Brito, C. and S. Sousa, *Non-Muscle Myosin 2A (NM2A): Structure, Regulation and Function*. Cells, 2020. **9**(7).
106. Houdusse, A. and H.L. Sweeney, *How Myosin Generates Force on Actin Filaments*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(12): p. 989-997.
107. Shen, Q., et al., *Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function*. Cardiovasc Res, 2010. **87**(2): p. 272-80.
108. Totsukawa, G., et al., *Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts*. J Cell Biol, 2000. **150**(4): p. 797-806.
109. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
110. Bischoff, M.C. and S. Bogdan, *Collective cell migration driven by filopodia-New insights from the social behavior of myotubes*. Bioessays, 2021. **43**(11): p. e2100124.
111. Harris, A.K., P. Wild, and D. Stopak, *Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion*. Science, 1980. **208**(4440): p. 177-9.
112. Merkel, R., et al., *Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness*. Biophys J, 2007. **93**(9): p. 3314-23.
113. Mattila, P.K. and P. Lappalainen, *Filopodia: molecular architecture and cellular functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(6): p. 446-54.
114. Ridley, A.J., *Life at the leading edge*. Cell, 2011. **145**(7): p. 1012-22.
115. Yamashita, A., K. Maeda, and Y. Maeda, *Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping*. EMBO J, 2003. **22**(7): p. 1529-38.
116. Tokuo, H., K. Mabuchi, and M. Ikebe, *The motor activity of myosin-X promotes actin fiber convergence at the cell periphery to initiate filopodia formation*. J Cell Biol, 2007. **179**(2): p. 229-38.
117. Murphy, D.A. and S.A. Courtneidge, *The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(7): p. 413-26.
118. Gould, C.M. and S.A. Courtneidge, *Regulation of invadopodia by the tumor microenvironment*. Cell Adh Migr, 2014. **8**(3): p. 226-35.
119. Machesky, L.M. and A. Li, *Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis*. Commun Integr Biol, 2010. **3**(3): p. 263-70.
120. Vasioukhin, V., et al., *Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion*. Cell, 2000. **100**(2): p. 209-19.

121. Jacquemet, G., H. Hamidi, and J. Ivaska, *Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion*. *Curr Opin Cell Biol*, 2015. **36**: p. 23-31.
122. Tokuraku, K., M. Kuragano, and T.Q.P. Uyeda, *Long-Range and Directional Allostery of Actin Filaments Plays Important Roles in Various Cellular Activities*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(9).
123. De Pascalis, C. and S. Etienne-Manneville, *Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions*. *Mol Biol Cell*, 2017. **28**(14): p. 1833-1846.
124. Abdelkarim, M., et al., *Invading basement membrane matrix is sufficient for MDA-MB-231 breast cancer cells to develop a stable in vivo metastatic phenotype*. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23334.
125. Cojoc, D., et al., *Properties of the force exerted by filopodia and lamellipodia and the involvement of cytoskeletal components*. *PLoS One*, 2007. **2**(10): p. e1072.
126. Wolf, K., et al., *Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force*. *J Cell Biol*, 2013. **201**(7): p. 1069-84.
127. Dalaka, E., et al., *Direct measurement of vertical forces shows correlation between mechanical activity and proteolytic ability of invadopodia*. *Sci Adv*, 2020. **6**(11): p. eaax6912.
128. Northcott, J.M., et al., *Feeling Stress: The Mechanics of Cancer Progression and Aggression*. *Front Cell Dev Biol*, 2018. **6**: p. 17.
129. Jerrell, R.J. and A. Parekh, *Cellular traction stresses mediate extracellular matrix degradation by invadopodia*. *Acta Biomater*, 2014. **10**(5): p. 1886-96.
130. Eckert, M.A., et al., *Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(3): p. 372-86.
131. Clark, E.S., et al., *Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extracellular matrix degradation in invadopodia*. *Cancer Res*, 2007. **67**(9): p. 4227-35.
132. Williams, K.C., et al., *Invadopodia are chemosensing protrusions that guide cancer cell extravasation to promote brain tropism in metastasis*. *Oncogene*, 2019. **38**(19): p. 3598-3615.
133. Lohmer, L.L., et al., *Invadopodia and basement membrane invasion in vivo*. *Cell Adh Migr*, 2014. **8**(3): p. 246-55.
134. Jacinto, A. and L. Wolpert, *Filopodia*. *Curr Biol*, 2001. **11**(16): p. R634.

135. Eddy, R.J., et al., *Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis*. Trends Cell Biol, 2017. **27**(8): p. 595-607.
136. Artym, V.V., et al., *Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function*. Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 3034-43.
137. Seals, D.F., et al., *The adaptor protein Tks5/Fish is required for podosome formation and function, and for the protease-driven invasion of cancer cells*. Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 155-65.
138. Bowden, E.T., et al., *An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKC μ associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation*. Oncogene, 1999. **18**(31): p. 4440-9.
139. Spuul, P., et al., *Importance of RhoGTPases in formation, characteristics, and functions of invadosomes*. Small GTPases, 2014. **5**: p. e28195.
140. Schoumacher, M., et al., *Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia*. J Cell Biol, 2010. **189**(3): p. 541-56.
141. Dawson, P.J., et al., *MCF10AT: a model for the evolution of cancer from proliferative breast disease*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 313-9.
142. Miller, F.R., et al., *MCF10DCIS.com xenograft model of human comedo ductal carcinoma in situ*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(14): p. 1185-6.
143. Imbalzano, K.M., et al., *Increasingly transformed MCF-10A cells have a progressively tumor-like phenotype in three-dimensional basement membrane culture*. Cancer Cell Int, 2009. **9**: p. 7.
144. Liu, F., et al., *Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy*. Acta Pharm Sin B, 2018. **8**(4): p. 552-562.
145. Eckert, L.B., et al., *Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis*. Cancer Res, 2004. **64**(13): p. 4585-92.
146. Qu, L., et al., *The Ras Superfamily of Small GTPases in Non-neoplastic Cerebral Diseases*. Front Mol Neurosci, 2019. **12**: p. 121.
147. Karnoub, A.E. and R.A. Weinberg, *Ras oncogenes: split personalities*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(7): p. 517-31.
148. Prior, I.A., F.E. Hood, and J.L. Hartley, *The Frequency of Ras Mutations in Cancer*. Cancer Res, 2020. **80**(14): p. 2969-2974.
149. von Lintig, F.C., et al., *Ras activation in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2000. **62**(1): p. 51-62.

150. Wright, K.L., et al., *Ras Signaling Is a Key Determinant for Metastatic Dissemination and Poor Survival of Luminal Breast Cancer Patients*. *Cancer Res*, 2015. **75**(22): p. 4960-72.
151. Yong, H.Y., et al., *Identification of H-Ras-specific motif for the activation of invasive signaling program in human breast epithelial cells*. *Neoplasia*, 2011. **13**(2): p. 98-107.
152. Pao, W., et al., *KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib*. *PLoS Med*, 2005. **2**(1): p. e17.
153. Hah, J.H., et al., *HRAS mutations and resistance to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor erlotinib in head and neck squamous cell carcinoma cells*. *Head Neck*, 2014. **36**(11): p. 1547-54.
154. Sugita, S., et al., *HRAS as a potential therapeutic target of salirasib RAS inhibitor in bladder cancer*. *Int J Oncol*, 2018. **53**(2): p. 725-736.
155. Cox, A.D., et al., *Drugging the undruggable RAS: Mission possible?* *Nat Rev Drug Discov*, 2014. **13**(11): p. 828-51.
156. Clair, T., W.R. Miller, and Y.S. Cho-Chung, *Prognostic significance of the expression of a ras protein with a molecular weight of 21,000 by human breast cancer*. *Cancer Res*, 1987. **47**(20): p. 5290-3.
157. Clark, G.J. and C.J. Der, *Aberrant function of the Ras signal transduction pathway in human breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 1995. **35**(1): p. 133-44.
158. Matthews, H.K., et al., *Oncogenic Signaling Alters Cell Shape and Mechanics to Facilitate Cell Division under Confinement*. *Dev Cell*, 2020. **52**(5): p. 563-573 e3.
159. Boguski, M.S. and F. McCormick, *Proteins regulating Ras and its relatives*. *Nature*, 1993. **366**(6456): p. 643-54.
160. Sahai, E., M.F. Olson, and C.J. Marshall, *Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility*. *EMBO J*, 2001. **20**(4): p. 755-66.
161. Ohta, Y., et al., *The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2122-8.
162. Shu, L., et al., *A Historic Perspective and Overview of H-Ras Structure, Oncogenicity, and Targeting*. *Mol Cancer Ther*, 2020. **19**(4): p. 999-1007.
163. Molina-Arcas, M., et al., *Coordinate direct input of both KRAS and IGF1 receptor to activation of PI3 kinase in KRAS-mutant lung cancer*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(5): p. 548-63.
164. Ahrens, D., et al., *A Combined AFM and Lateral Stretch Device Enables Microindentation Analyses of Living Cells at High Strains*. *Methods Protoc*, 2019. **2**(2).

165. Hersch, N., et al., *The constant beat: cardiomyocytes adapt their forces by equal contraction upon environmental stiffening*. Biol Open, 2013. **2**(3): p. 351-61.
166. Otsu, N., *A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms*. IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, 1979. **9**(1): p. 62-66.
167. Koch, T.M., et al., *3D Traction forces in cancer cell invasion*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33476.
168. Preibisch, S., S. Saalfeld, and P. Tomancak, *Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions*. Bioinformatics, 2009. **25**(11): p. 1463-5.
169. S. Houben, N.K., R. Merkel, *Estimating Force Fields of Living Cells – Comparison of Several Regularization Schemes Combined with Automatic Parameter Choice*. Pattern Recognition, 2010: p. 71-80.
170. Butler, J.P., et al., *Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(3): p. C595-605.
171. Puleo, J. and K. Polyak, *The MCF10 Model of Breast Tumor Progression*. Cancer Res, 2021. **81**(16): p. 4183-4185.
172. Pal, A. and C.G. Kleer, *Three dimensional cultures: a tool to study normal acinar architecture vs. malignant transformation of breast cells*. J Vis Exp, 2014(86).
173. Eschenbruch, J., et al., *From Microspikes to Stress Fibers: Actin Remodeling in Breast Acini Drives Myosin II-Mediated Basement Membrane Invasion*. Cells, 2021. **10**(8).
174. Xue, F., D.M. Janzen, and D.A. Knecht, *Contribution of Filopodia to Cell Migration: A Mechanical Link between Protrusion and Contraction*. Int J Cell Biol, 2010. **2010**: p. 507821.
175. Gagliardi, P.A., et al., *Real-time monitoring of cell protrusion dynamics by impedance responses*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 10206.
176. Wang, H., et al., *Rotational motion during three-dimensional morphogenesis of mammary epithelial acini relates to laminin matrix assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(1): p. 163-8.
177. Vendrell, J.A., et al., *Molecular changes associated with the agonist activity of hydroxy-tamoxifen and the hyper-response to estradiol in hydroxy-tamoxifen-resistant breast cancer cell lines*. Endocr Relat Cancer, 2005. **12**(1): p. 75-92.
178. Sancho-Garnier, H. and M. Colonna, *[Breast cancer epidemiology]*. Presse Med, 2019. **48**(10): p. 1076-1084.
179. Kim, M.Y., *Breast Cancer Metastasis*. Adv Exp Med Biol, 2021. **1187**: p. 183-204.

180. Weigelt, B., J.L. Peterse, and L.J. van 't Veer, *Breast cancer metastasis: markers and models*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(8): p. 591-602.
181. Insua-Rodriguez, J. and T. Oskarsson, *The extracellular matrix in breast cancer*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: p. 41-55.
182. Collignon, J., et al., *Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions*. Breast Cancer (Dove Med Press), 2016. **8**: p. 93-107.
183. Ahn, S.G., et al., *Molecular Classification of Triple-Negative Breast Cancer*. J Breast Cancer, 2016. **19**(3): p. 223-230.
184. Caceres, R., et al., *Forces drive basement membrane invasion in Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(45): p. 11537-11542.
185. Wiradjaja, F., T. DiTommaso, and I. Smyth, *Basement membranes in development and disease*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2010. **90**(1): p. 8-31.
186. Bosnian, F.T., M. Havenith, and J.P.M. Cleutjens, *Basement Membranes in Cancer*. Ultrastructural Pathology, 1985. **8**(4): p. 291-304.
187. McSherry, E.A., et al., *Molecular basis of invasion in breast cancer*. Cell Mol Life Sci, 2007. **64**(24): p. 3201-18.
188. Guzman, A., et al., *A novel 3D in vitro metastasis model elucidates differential invasive strategies during and after breaching basement membrane*. Biomaterials, 2017. **115**: p. 19-29.
189. Boyd, N.F., et al., *Mammographic density and breast cancer risk: current understanding and future prospects*. Breast Cancer Res, 2011. **13**(6): p. 223.
190. Linder, S., C. Wiesner, and M. Himmel, *Degrading devices: invadosomes in proteolytic cell invasion*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011. **27**: p. 185-211.
191. Huerta-Reyes, M. and A. Aguilar-Rojas, *Threedimensional models to study breast cancer (Review)*. Int J Oncol, 2021. **58**(3): p. 331-343.
192. Kim, J.-H. and A.R. Asthagiri, *Matrix stiffening sensitizes epithelial cells to EGF and enables the loss of contact inhibition of proliferation*. Journal of Cell Science, 2011. **124**(8): p. 1280-1287.
193. Chaudhuri, O., et al., *Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium*. Nat Mater, 2014. **13**(10): p. 970-8.
194. Mah, E.J., et al., *Collagen density modulates triple-negative breast cancer cell metabolism through adhesion-mediated contractility*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 17094.

195. Mason, B.N., J.P. Califano, and C.A. Reinhart-King, *Matrix Stiffness: A Regulator of Cellular Behavior and Tissue Formation*, in *Engineering Biomaterials for Regenerative Medicine: Novel Technologies for Clinical Applications*, S.K. Bhatia, Editor. 2012, Springer New York: New York, NY. p. 19-37.
196. Seton-Rogers, S.E., et al., *Cooperation of the ErbB2 receptor and transforming growth factor beta in induction of migration and invasion in mammary epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1257-62.
197. Toral, C., et al., *Epidermal growth factor induces an increase in cell adhesion and an arrangement of actin skeleton in stress fibres in pituitary cultured cells from infantile rats but not adult rats*. J Cell Physiol, 2003. **195**(1): p. 80-91.
198. Mercurio, A.M., I. Rabinovitz, and L.M. Shaw, *The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 541-5.
199. Mainiero, F., et al., *The intracellular functions of alpha6beta4 integrin are regulated by EGF*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 241-53.
200. Grass, G.D., et al., *CD147, CD44, and the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway cooperate to regulate breast epithelial cell invasiveness*. J Biol Chem, 2013. **288**(36): p. 26089-26104.
201. Iozzo, R.V., J.J. Zoeller, and A. Nystrom, *Basement membrane proteoglycans: modulators Par Excellence of cancer growth and angiogenesis*. Mol Cells, 2009. **27**(5): p. 503-13.
202. Bonnans, C., J. Chou, and Z. Werb, *Remodelling the extracellular matrix in development and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(12): p. 786-801.
203. Li, J.X.H., et al., *Cadherin puncta are interdigitated dynamic actin protrusions necessary for stable cadherin adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(24).
204. Heckman, C.A. and H.K. Plummer, 3rd, *Filopodia as sensors*. Cell Signal, 2013. **25**(11): p. 2298-311.
205. Albuschies, J. and V. Vogel, *The role of filopodia in the recognition of nanotopographies*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1658.
206. Bischoff, M.C., et al., *Filopodia-based contact stimulation of cell migration drives tissue morphogenesis*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 791.
207. Baik, M., et al., *Identification of invadopodia by TKS5 staining in human cancer lines and patient tumor samples*. MethodsX, 2019. **6**: p. 718-726.
208. Jeannot, P. and A. Besson, *Cortactin function in invadopodia*. Small GTPases, 2020. **11**(4): p. 256-270.

209. Li, Y.Y., C.X. Zhou, and Y. Gao, *Podoplanin promotes the invasion of oral squamous cell carcinoma in coordination with MT1-MMP and Rho GTPases*. *Am J Cancer Res*, 2015. **5**(2): p. 514-29.
210. Itoh, Y. and M. Seiki, *MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment*. *J Cell Physiol*, 2006. **206**(1): p. 1-8.
211. Pignatelli, J., et al., *Hic-5 promotes invadopodia formation and invasion during TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition*. *J Cell Biol*, 2012. **197**(3): p. 421-37.
212. Spagnolo, B., et al., *Three-dimensional cage-like microscaffolds for cell invasion studies*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 10531.
213. Denais, C.M., et al., *Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration*. *Science*, 2016. **352**(6283): p. 353-8.
214. Fekete, N., et al., *Bags versus flasks: a comparison of cell culture systems for the production of dendritic cell-based immunotherapies*. *Transfusion*, 2018. **58**(7): p. 1800-1813.
215. Wells, R.G., *The role of matrix stiffness in regulating cell behavior*. *Hepatology*, 2008. **47**(4): p. 1394-400.
216. Paz, H., N. Pathak, and J. Yang, *Invading one step at a time: the role of invadopodia in tumor metastasis*. *Oncogene*, 2014. **33**(33): p. 4193-202.
217. Jacquemet, G., et al., *FiloQuant reveals increased filopodia density during breast cancer progression*. *J Cell Biol*, 2017. **216**(10): p. 3387-3403.
218. Nilufar, S., et al., *FiloDetect: automatic detection of filopodia from fluorescence microscopy images*. *BMC Syst Biol*, 2013. **7**: p. 66.
219. Yang, B.A., et al., *Engineered Tools to Study Intercellular Communication*. *Adv Sci (Weinh)*, 2021. **8**(3): p. 2002825.
220. Fischer, R.S., et al., *Filopodia and focal adhesions: An integrated system driving branching morphogenesis in neuronal pathfinding and angiogenesis*. *Dev Biol*, 2019. **451**(1): p. 86-95.
221. Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz, *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(9): p. 633-43.
222. Kelley, L.C., et al., *Adaptive F-Actin Polymerization and Localized ATP Production Drive Basement Membrane Invasion in the Absence of MMPs*. *Dev Cell*, 2019. **48**(3): p. 313-328 e8.
223. Ramos-Lewis, W., K.S. LaFever, and A. Page-McCaw, *A scar-like lesion is apparent in basement membrane after wound repair in vivo*. *Matrix Biol*, 2018. **74**: p. 101-120.

224. Wisdom, K.M., et al., *Matrix mechanical plasticity regulates cancer cell migration through confining microenvironments*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 4144.
225. Ferrari, R., et al., *MT1-MMP directs force-producing proteolytic contacts that drive tumor cell invasion*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 4886.
226. Li, A., et al., *The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion*. Curr Biol, 2010. **20**(4): p. 339-45.
227. Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge, *Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions*. J Cell Biol, 1996. **133**(6): p. 1403-15.
228. Hotulainen, P. and P. Lappalainen, *Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells*. J Cell Biol, 2006. **173**(3): p. 383-94.
229. Zhitnyak, I.Y., et al., *Early Events in Actin Cytoskeleton Dynamics and E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion during Epithelial-Mesenchymal Transition*. Cells, 2020. **9**(3).
230. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
231. Cao, X., et al., *Differential regulation of the activity of deleted in liver cancer 1 (DLC1) by tensins controls cell migration and transformation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(5): p. 1455-60.
232. Galie, M., *RAS as Supporting Actor in Breast Cancer*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 1199.
233. Jimenez, C., et al., *Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration*. J Cell Biol, 2000. **151**(2): p. 249-62.
234. Ramos, J.W., *The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(12): p. 2707-19.
235. Janda, E., et al., *Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways*. J Cell Biol, 2002. **156**(2): p. 299-313.
236. Levin, E.R., *Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(3): p. 309-17.
237. Ren, F., et al., *Overexpression of MMP Family Members Functions as Prognostic Biomarker for Breast Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0135544.
238. Lee, K.W., et al., *H-Ras selectively up-regulates MMP-9 and COX-2 through activation of ERK1/2 and NF-kappaB: an implication for invasive phenotype in rat liver epithelial cells*. Int J Cancer, 2006. **119**(8): p. 1767-75.

239. Moon, A., et al., *H-ras, but not N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: a role for MMP-2 in the H-ras-induced invasive phenotype*. Int J Cancer, 2000. **85**(2): p. 176-81.
240. Shin, I., et al., *H-Ras-specific activation of Rac-MKK3/6-p38 pathway: its critical role in invasion and migration of breast epithelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 14675-83.
241. Hedges, J.C., et al., *A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24211-9.
242. Fukuda, T., K. Kiuchi, and M. Takahashi, *Novel mechanism of regulation of Rac activity and lamellipodia formation by RET tyrosine kinase*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 19114-21.
243. Cordova-Alarcon, E., et al., *Effects of HRAS oncogene on cell cycle progression in a cervical cancer-derived cell line*. Arch Med Res, 2005. **36**(4): p. 311-6.
244. Rosseland, C.M., et al., *Distinct functions of H-Ras and K-Ras in proliferation and survival of primary hepatocytes due to selective activation of ERK and PI3K*. J Cell Physiol, 2008. **215**(3): p. 818-26.
245. Son, S., et al., *Resonant microchannel volume and mass measurements show that suspended cells swell during mitosis*. J Cell Biol, 2015. **211**(4): p. 757-63.
246. Zlotek-Zlotkiewicz, E., et al., *Optical volume and mass measurements show that mammalian cells swell during mitosis*. J Cell Biol, 2015. **211**(4): p. 765-74.
247. Tokuo, H., *Myosin X*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 1239. 2020: Springer.
248. Liu, K.C., et al., *Myosin-X functions in polarized epithelial cells*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(9): p. 1675-87.
249. Ikebe, M., O. Sato, and T. Sakai, *Myosin X and Cytoskeletal Reorganization*. Applied Microscopy, 2018. **48**: p. pp. 33–42.
250. Arjonen, A., et al., *Mutant p53-associated myosin-X upregulation promotes breast cancer invasion and metastasis*. J Clin Invest, 2014. **124**(3): p. 1069-82.

9 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Rudolf Merkel für die Möglichkeit meine Promotion am IBI-2 durchführen zu können. Vielen Dank für Ihre persönliche und wissenschaftliche Unterstützung. Danke für die vielen sehr hilfreichen Diskussionen zu meinem Projekt, vor allem Ihre physikalische Expertise.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Doktorvater Dr. Bernd Hoffmann bedanken. Ein großes Dankeschön für deine Betreuung und die stets offene Tür zu allen wichtigen Punkten, ob wissenschaftlich, persönlich oder zum Thema Rennrad. Deine Ratschläge und Ideen haben mir sehr geholfen. Danke für dein Vertrauen in mich!

Ein ebenso großer Dank gebührt meinem Betreuer Dr. Erik Noetzel-Reiss. Ich danke dir für deine fantastische und intensive Betreuung und die vielen hilfreichen Gespräche und Ratschläge. Danke, dass du meine Promotion sowohl wissenschaftlich als auch persönlich begleitet hast! Damit hast du einen großen Beitrag dazu geleistet, dass ich mich in Jülich stets sehr wohl gefühlt habe.

Bei Herrn Prof. Dr. Höfeld bedanke ich mich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens. Danke für Ihre Bereitschaft und Ihre Zeit.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinen Kolleg/-innen des IBI-2 bedanken. Zunächst ein großer Dank an alle, die im Folgenden nicht extra aufgeführt werden. Obwohl die Covid-Zeit sicherlich nicht die einfachste war, habe ich mich zu jeder Zeit wohl gefühlt im Institut. Vielen Dank an euch für das nette und kollegiale Umfeld!

Vielen Dank an Christina Hoffmann, Sven Gerlach und Laura Wagner für die Unterstützung im Labor. Ebenfalls ein riesen Dankeschön an Nils Hersch für deine Hilfe im Labor und den Spaß im Arbeitsalltag.

Besonders hervorheben möchte ich Georg Dreissen. Ein riesiges Dankeschön für deine Unterstützung in allen IT-Fragen und Auswertungsprogrammen. Vielen Dank für deine Zeit, ob im Büro, beim Laufen oder auf dem Rad.

Für alle Programme und die Unterstützung bei der Auswertung der Zugkraftmikroskopie möchte ich Dr. Ronald Springer danken.

Vielen Dank an Aljona Gaiko-Shcherbak für deine gute Einarbeitung.

Ebenfalls besonders hervorheben und danken möchte ich Yannick Herfs. Danke für deine super Arbeit und die Unterstützung im Labor in der Endphase meiner Promotion.

Danke an Johannes Dagge für die Durchführung einiger Experimente im Zuge seiner Bachelorarbeit.

Ein großer Dank gebührt meinem Bürokollegen Jens Konrad. Trotz musikalischer Differenzen werde ich die Zeit und Radio Novum in guter Erinnerung halten. Danke für deine technische und auch private Unterstützung!

Natürlich möchte ich mich auch bei Lukas Lövenich und Robin Püllen von ganzem Herzen bedanken. Danke für eure tolle Unterstützung während und neben der Arbeit. Der Austausch mit euch war extrem wertvoll!

Abschließend möchte ich mich noch bei meinem privaten Umfeld bedanken. Vielen Dank an Freunde und Familie, die mich nicht nur in den letzten Jahren begleitet haben. Danke an Valentin Kossack für die permanente Motivation.

Der allergrößte Dank gilt meinen Eltern und meiner Freundin. Ihr habt mir ermöglicht diesen Weg einzuschlagen und standet immer an meiner Seite. Ohne euch wäre ich nun nicht da wo ich jetzt bin. Dafür werde ich euch immer dankbar sein! Ein Dankeschön am Ende dieser Arbeit reicht eigentlich nicht aus, aber es ist ein Anfang...