

Die Wechselwirkungen zwischen (Endo-)Cannabinoiden und Mechanik bei der Tumorinvasion

DISSERTATION

*zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften Dr. rer. nat*

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Tim Hohmann

Geboren am 28.12.1986 in Quedlinburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Groth
2. Gutachter: Prof. Dr. Faramarz Dehghani
3. Gutachter: Prof. Dr. Volker Spindler

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.07.2018

MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

Abstract

Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften
Institut für Pharmazie

Die Wechselwirkungen zwischen (Endo-)Cannabinoiden und Mechanik bei der Tumorinvasion

von Tim HOHMANN

Biomechanical properties of single cells provide information about the state of the cytoskeleton, which in return gives information about the health state of the cell. In the case of tumour cells it was observed that these are softer than the cells of their healthy counter-part. Whether this behaviour can be used only for the discrimination of tumour and non-tumour cells or if it is a potential prognostic marker remains unclear.

The hypothesis whether transient and non-transient alterations of cytoskeletal and thus biomechanical properties of cells represent a marker for the invasiveness of glioma cells was tested. Five different glioma cell lines were treated with cannabinoids, irradiated or stably transfected with metastasis-associated in colon cancer gene 1 (MACC1) or an isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) Mutation. To address alterations of cytoskeletal properties, changes of mechanical properties of single cells were measured using atomic force microscopy. The invasiveness of cell lines was determined using a co-culture model with organotypical hippocampal slice cultures.

A network analysis revealed a negative correlation between a “generalized stiffness” and the invasiveness for all tested glioma cell lines, treatments and tumour invasion time points. Consequently it was shown for the first time that a “generalized stiffness” is a potential marker for the invasiveness of various glioma cell populations in our model and thus might be of high clinical relevance for drug testing.

MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT HALLE-WITTENBERG

Abstract

Naturwissenschaftliche Fakultät I - Biowissenschaften
Institut für Pharmazie

Die Wechselwirkungen zwischen (Endo-)Cannabinoiden und Mechanik bei der Tumorinvasion

von Tim HOHMANN

Biomechanische Eigenschaften von Einzelzellen enthalten Informationen über den Zustand des Zytoskelettes, welches wiederum Informationen über den Gesundheitszustand der Zelle liefert. Bei Tumorzellen konnte bereits festgestellt werden, dass sie ein geringeres Elastizitätsmodul besitzen, als die Zellen ihres Ursprungsgewebes. Ob diese Änderung der mechanischen Eigenschaften nur für die Unterscheidung von Tumor- und Nicht-Tumorzellen verwendet werden kann oder auch als potentieller prognostischer Marker, ist jedoch gegenwärtig unklar.

Diese Arbeit untersucht die Hypothese, ob transiente oder nicht-transiente Veränderungen biomechanischer Eigenschaften und damit des Zytoskelettes, einen Marker für die Invasivität von Gliomzellen darstellen. Es wurden fünf verschiedene Gliomzelllinien verwendet, die entweder mit Cannabinoiden behandelt, bestrahlt oder das metastasenassoziierte Kolonkarzinom Gen 1 (MACC1) oder eine Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) Mutation besitzen. Veränderungen des Zytoskelettes wurden indirekt, über mechanische Eigenschaften, mittels Atomkraftmikroskopie gemessen. Die Invasivität der genutzten Zellen wurde in einem Co-Kultur Model mit organotypischen hippocampalen Schnittkulturen ermittelt.

Eine Netzwerkanalyse konnte eine negative Korrelation zwischen einer “verallgemeinerten Festigkeit” und der Invasivität der Tumorzellen, für alle Zelllinien, alle Behandlungen und Invasionszeitpunkte, ermitteln. Folglich konnte gezeigt werden, dass die “verallgemeinerten Elastizität” ein potentieller Marker für die Tumorinvasivität ist und daher auch eine mögliche klinische Relevanz für Medikamententests besitzt.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Faramarz Dehghani bedanken, der mir die Möglichkeit gab in seiner Arbeitsgruppe diese Promotionsarbeit anzufertigen und mich währenddessen, sowohl fachlich als auch menschlich, ausgesprochen gut unterstützt hat. Bedanken möchte ich mich ebenfalls dafür, dass du mir die Freiheit und Möglichkeit gegeben hast eigene Projekte zu verfolgen und zu entwickeln, für deine Geduld und konstruktive Kritik.

Herr Prof. Thomas Groth möchte ich für seine Betreuung und den lebhaften Diskussionen bei den Projektbesprechungen danken. Diese Debatten haben ein neues Licht auf viele Aspekte dieser Arbeit geworfen und mir sehr weitergeholfen.

Besonderer Dank gilt ebenfalls der Arbeitsgruppe Dehghani. Besonders hervorheben möchte ich hier Chalid Ghadban, der mir neben der technischen Unterstützung auch zu einem Freund geworden ist. Dr. Urszula Grabciec für ihre private und fachliche Unterstützung, die mir auch meine naivsten Fragen zu Biologie, Cannabinoiden, etc immer geduldig beantwortet hat. Philipp Pieroh und Alexandra Antonietti für all den Kaffee und die interessanten Gespräche. Kerstin Feese, unserem Laborsonnenschein, für ihre ständig gute Laune und die schöne Zeit. Julian Cardinal von Widdern dafür dass er den Alltag bereichert hat. Vielen Dank euch, dafür, dass ihr mich hier unterstützt habt und die schöne Zeit.

Herzlich möchte ich mich auch für die Unterstützung durch meine Freunde und Familie bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	i
Danksagung	iii
Inhaltsverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis	x
Konstanten	xii
Formelzeichen	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Zelle und Zytoskelett	1
1.1.1 Aktin und Aktinstrukturen	2
1.1.1.1 Aktinfilamente	2
1.1.1.2 Profilin	2
1.1.1.3 Verzweigte Aktinnetzwerke	3
1.1.1.4 Quervernetzte Aktinfilamente	3
1.1.1.5 Parallele und anti-parallele Aktinbündel	4
1.1.1.6 ADF/Cofilin induzierte Aktindisassemblierung	5
1.1.1.7 Dynamik und Mechanik von Aktinstrukturen innerhalb der Zelle	6
1.1.2 Mikrotubuli	9
1.1.3 Intermediärfilamente	10
1.1.4 Elastisches Verhalten von Biopolymeren	12
1.1.4.1 Einzelne Aktinfilamente	13
1.1.4.2 Aktinnetzwerke mit steifen, nicht-transienten, passiven Crosslinkern	14
1.1.4.3 Aktinnetzwerke mit weichen, transienten, passiven Cross- linkern	14
1.1.4.4 Aktinnetzwerke mit dem aktiven Crosslinker Myosin	15
1.1.4.5 Mikrotubuli und Mikrotubulinetzwerke	16

1.1.4.6	Intermediärfilamente und Intermediärfilamentnetzwerke . . .	16
1.2	Adhäsion von Zellen	17
1.3	Zytoskelettale Veränderungen bei Tumorerkrankungen	19
1.4	Glioblastoma Multiforme	20
1.5	Einfluss der Bestrahlung auf Zytoskelett und Adhäsion von Glioblastomzellen	21
1.6	Endocannabinoide und Gliome	22
1.6.1	Das Endocannabinoidsystem und Cannabinoidrezeptoren	22
1.6.2	Wirkung von Cannabinoiden auf das Zytoskelett und Gliome	22
1.7	Isocitrat-Dehydrogenase 1 Mutation und metastasen-assoziiertes Kolonkarzinom Gen 1	24
1.8	Tumorinvasion in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen	25
1.9	Fragestellung und Zielsetzung	26
2	Methoden und Theorie	27
2.1	Lebendzellmikroskopie	27
2.2	Analyse von Lebendzellmikroskopieaufnahmen	27
2.2.1	Analyse von Daten mit der Fürth Formel	28
2.3	Rasterkraftmikroskopie	29
2.3.1	Messmodi und Kraft-Abstands-Kurven	30
2.3.2	Kalibrierung	32
2.3.3	Messparameter	33
2.3.4	Mechanische Eigenschaften von biologischen Materialien	34
2.4	Erstellung eines Netzwerkes und Ermittlung von Parameterclustern	36
2.5	Zelllinien und Zellkultur	37
2.5.1	Transfizierte Zelllinien	38
2.6	Behandlung von Zellen	38
2.7	Murine organotypische hippocampale Schnittkulturen	39
2.7.1	Zellkulturmedien für organotypische hippocampale Schnittkulturen	39
2.7.2	Präparation von organotypischen hippocampalen Schnittkulturen	39
2.7.3	Tumorinvasion in Schnittkulturen	40
2.7.4	Analyse der Tumorinvasion in Schnittkulturen	40
2.8	Analyse der Cannabinoidrezeptorexpression auf mRNA-Ebene	41
2.9	Analyse der Cannabinoidrezeptoren mittels Western Blot	42
2.10	Analyse der Cannabinoidrezeptorverteilung	42
2.11	Evaluation der Messgenauigkeiten	43
2.11.1	Größtfehlerabschätzung - AFM	43
2.11.2	Größtfehlerabschätzung - Lebendzellmikroskopie	44
2.12	Statistik	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Endocannabinoid Rezeptoren in Glioblastomzelllinien	46
3.2	Evaluation der Modelle für die Bestimmung der normierten Adhäsionsenergien	47
3.3	Einzelzeleigenschaften von Glioblastomzelllinien unter Cannabinoideinfluss	48

3.3.1	Elastische Eigenschaften von Glioblastomzelllinien unter Cannabinoideinfluss	48
3.3.2	Motile Eigenschaften von Glioblastomzelllinien unter Cannabinoideinfluss	49
3.4	Invasionseigenschaften von Glioblastomzelllinien unter Cannabinoideinfluss	50
3.5	Einzelzeleigenschaften von Glioblastomzelllinien mit MACC1 Expression	52
3.5.1	Elastische Eigenschaften von Glioblastomzelllinien mit MACC1 Expression	52
3.5.2	Motile Eigenschaften von Glioblastomzelllinien mit MACC1 Expression	53
3.6	Invasionseigenschaften von Glioblastomzelllinien mit MACC1 Expression .	53
3.7	Einzelzeleigenschaften von Glioblastomzelllinien nach Bestrahlung	54
3.7.1	Elastische Eigenschaften von Glioblastomzelllinien nach Bestrahlung	54
3.7.2	Motile Eigenschaften von Glioblastomzelllinien nach Bestrahlung .	55
3.8	Invasionseigenschaften von Glioblastomzelllinien nach der Bestrahlung . .	56
3.9	Einzelzeleigenschaften von Glioblastomzelllinien mit IDH1 Mutation . . .	57
3.9.1	Elastische Eigenschaften von Glioblastomzelllinien bei IDH1 Mutation	57
3.10	Netzwerkanalyse der Einzelzeleigenschaften	57
3.11	Evaluation der Messgenauigkeiten	60
3.11.1	Größtfehlerabschätzung - AFM	60
3.11.2	Größtfehlerabschätzung - Lebendzellmikroskopie	62
3.11.3	Fehlerabschätzung Invasionsversuche	62
4	Diskussion	65
4.1	Interpretation der Rasterkraftmikroskopiedaten	65
4.2	Effekte von Cannabinoiden auf Glioblastomzellen	66
4.2.1	Cannabinoiden verändern die Elastizität von Glioblastomzellen	66
4.2.2	Cannabinoiden verändern die Motilität, Kontaktfläche und das Invasionsverhalten von Glioblastomzellen	67
4.2.3	Der CB2 Rezeptor-Agonist JWH 133 zeigt CB2 unabhängige Effekte	70
4.3	Der Effekt einer MACC1 Expression bei Glioblastomzellen	70
4.3.1	MACC1 Effekte auf die Elastizität von Glioblastomzellen	70
4.3.2	MACC1 verändert die Motilität, Kontaktfläche und das Invasionsverhalten von Glioblastomzellen	71
4.4	Der Effekt einer Bestrahlung auf Glioblastomzellen	72
4.4.1	Bestrahlungseffekte auf die Elastizität von Glioblastomzellen	72
4.4.2	Einfluss der Bestrahlung auf Motilität, Kontaktfläche und Invasionsverhalten von Glioblastomzellen	73
4.5	Veränderung elastischer und adhäsiver Eigenschaften durch IDH1 Mutation	74
4.6	Die verallgemeinerte Elastizität als Marker für die Invasivität	75
4.7	Das Young Modul alleine ist kein Marker für die Invasivität	75
4.8	Experimentelle Limitationen	76
4.9	Ausblick	77
A	Messdaten	78

B Chemikalien	81
B.1 Chemikalien	81
Bibliographie	83
Lebenslauf	108
Selbstständigkeitserklärung	112

Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung von Aktinstrukturen und deren mechanische Repräsentation	6
1.2	Aufbau Intermediärfilamente	11
1.3	Schematische Integrin- und Cadherinbindungen	19
1.4	Anatomische Struktur Hippocampus	25
2.1	Bewegung von Einzelzellen	28
2.2	Aufbau eines Rasterkraftmikroskops	30
2.3	Ideale Kraft-Abstands-Kurve	31
2.4	Reale Kraft-Abstands-Kurve	32
2.5	Messparameter am AFM	34
2.6	Schematische Darstellung des Tumorinvasionsexperimentes	41
3.1	Cannabinoid Rezeptoren in Glioblastomzelllinien	47
3.2	AFM Daten Cannabinoide	49
3.3	Lebendzellmikroskopiedaten Cannabinoide	50
3.4	Tumorinvasionsdaten Cannabinoide	51
3.5	AFM Daten MACC1	52
3.6	Lebendzellmikroskopiedaten MACC1	53
3.7	Tumorinvasionsdaten MACC1	54
3.8	AFM Daten Bestrahlung	55
3.9	Lebendzellmikroskopiedaten Bestrahlung	56
3.10	Tumorinvasionsdaten Bestrahlung	56
3.11	Einzelzelldaten IDH1 Mutation	57
3.12	Ergebnisse der Netzwerkanalyse	58
3.13	Verallgemeinerte Elastizität und Tumorinvasion	60
3.14	Verallgemeinerte Elastizität bei IDH1-R132H Mutation	60
3.15	Typischer Zeitverlauf Lebendzellmikroskopie	63

Tabellenverzeichnis

3.1	JKR- und DMT-Modellüberprüfung	48
A.1	Messdaten Youngmodul	78
A.2	Messdaten normierte Adhäsionsenergie	79
A.3	Messdaten Zellgeschwindigkeit	79
A.4	Messdaten Zellkontaktfläche	80
A.5	Messdaten Invasivität 3d	80
A.6	Messdaten Invasivität 4d	80
B.1	Primäre Antikörper	81
B.2	Sekundäre Antikörper	81
B.3	Größenstandards	82
B.4	Primer	82

Abkürzungsverzeichnis

+TIP	Miktortubulin-(+)-Ende bindendes Protein
138-	U138 mit Leervektor transfiziert (Zelllinie)
138+	U138 mit MACC1 transfiziert (Zelllinie)
ADP	A denosin d iphosphat
AEA	N- A rachidonylethanolamid
AFM	A tomic F orce M icroscope (Atom Kraft Mikroskop)
ATP	A denosin t riphosphat
Arp2/3	A ctin- r elated- p rotein 2/3 complex (Aktin-ähnlicher Protein 2/3 Komplex)
ca	circa
CLSM	C onfocal L aser S canning M icroscope (Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop)
CTL	C ontrol (Kontrolle)
DAB	3,3- D iaminobenzidin
DMEM	D ulbecco's M odified E agle M edium (Zellkulturmedium)
DMT Modell	D ejarguin- M uller- T oporov Modell
ECS	E ndocannabinoidsystem
EGF	epidermal g rowth f actor (Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	epidermal g rowth f actor r eceptor (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
FAK	fokale A dhäsionskinase
FBS	F etal B ovine S erum (fötales Kälberserum)
GBM	G lioblastoma m ultiforme
GPR55	G - P rotein gekoppelter R ezeptor 55
GDP	G uanosin d iphosphat
GTP	G uanosin t riphosphat
HBSS	H ank's B alanced S alt S olution (Zellkulturmedium)
HGF	H epatocyte G rowth F actor (Hepatozytenwachstumsfaktor)
IDH1	I socitrat d ihydrogenase 1
JKR Modell	J ohnson- K endall- R oberts Modell

LASER	L ight A mplification by S timulated E mission of R adiation (Lichtverstärkung durch stimulierte Emission von Strahlung)
Leer	L eervektor
Low DMEM	L ow Glucose D ulbecco's M odified E agle M edium (Zellkulturmedium)
MACC1	M etastase A ssociated in C olon C ancer 1 (Metastase assoziiert bei Kolonkrebs 1)
MAP	M ikrotubuli-assoziertes P rotein
MEM	M inimal E ssential M edium (Zellkulturmedium)
met-AEA	metabolisch stabiles N- A rachidonylethanolamid
Mut	M utant
NADPH	N icotinamidadeninukleotid p hosphat
NEAA	N on E ssential A mino A cids (Nicht essentielle Aminosäuren)
NHS	N ormal H orse S erum (Normales Pferdeserum)
OHSC	O rganotypic H ippocampal S lice C ultures (Organotypische hippocampale Schnittkulturen)
P/S	P enicillin S treptomycin
PBS	P hosphate B uffered S aline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	P araformaldehyd
pFAK	phosphorylierte fokale A dhäsions k inase
PI	P ropidium I odide
PI3K	P hosphoinositid-3 K inase
PIP3	P hosphatidylinositol (3,4,5)- t ri p hosphat
PLL	P oly- L - L ysine
RPMI	R oswell P ark M emorial I nstitut (Zellkulturmedium)
SFM	S canning F orce M icroscope (Atom Kraft Mikroskop)
THC	D(9)- T etrahydrocannabinol
TRPV1	transient receptor potential cation subfamily V member 1
WASP	W iskott- A ldrich- S yndrome- P roteine
WT	W ildtyp

Konstanten

Boltzmann-Konstante	k_B	=	$1.380\,648\,8(13) \times 10^{-23} \frac{J}{K}$
Poissonzahl für Zellen	μ	=	0.45
Kreiszahl	π	=	3.141...

Formelzeichen

a	Kontaktradius	m
k	Federkonstante des Cantilevers	N/m
t	Zeit	min, h
v	mittlere Geschwindigkeit	m/s
$\langle x^2 \rangle$	mittlere quadratische Abweichung	m^2
x/y	Positionskordinaten	m
A	Fläche	m^2
Δt	Zeitintervall/-abstand	min
E	Young Modul	Pa
F	Kraft	N
F_S	Separierungskraft	N
K	Reduziertes Young Modul	Pa
M^c	Kompositparameter	<i>dimensionslos</i>
MI	Transinformation (mutual information)	<i>dimensionslos</i>
p	Wahrscheinlichkeit	<i>dimensionslos</i>
Q	Modularität	<i>dimensionslos</i>
R	Probenradius	m
$R(t)$	Trajektorie	m
V	Volumen	m^3
z	z-Score	<i>dimensionslos</i>
β	Persistenzzeit	min, h
γ	Adhäsionsenergie	J/m^2
δ	Indentationstiefe	m
θ	Temperatur	$^{\circ}C$
λ	Wellenlänge	nm
μ	Poissonzahl	<i>dimensionslos</i>
ν^2	mittlere quadratische Geschwindigkeit	$(m/s)^2$
σ	Standardabweichung	<i>dimensionslos</i>

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Zelle und Zytoskelett

Eine der wichtigsten Organisationsstrukturen komplexer Lebewesen ist die Zelle, die in mannigfaltiger Variation vorkommt und sowohl in ihrer Struktur, als auch in Größe und Funktion, an ihre Lokalisation und Aufgaben angepasst ist. Viele Zelltypen besitzen jedoch identische funktionelle Einheiten, die unter anderem für selbsterhaltende Maßnahmen, Zellteilung, Bewegung oder die Reaktionen auf externe Reize notwendig sind. Eine Struktur, die in jeder humanen Zelle vorkommt, ist das Zytoskelett. Beim Zytoskelett handelt es sich um eine, im Zytoplasma befindliche, Netzwerkstruktur, die aus Proteinen besteht. Diese Struktur ist jedoch nicht zeitlich stabil, sondern in einem andauernden Prozess der Restrukturierung befindlich [1]. Die aktuelle Zytoskelettorganisation ist abhängig von Interaktionen mit anderen Proteinen und auch den vorangegangenen Zuständen des Netzwerkes (Hysterese) [2]. Das Zytoskelett sorgt für den mechanischen Widerstand gegenüber externen Kräften und ist damit auch formgebend für die Zelle [1]. Weiterhin ist es für die Migration, Zellteilung oder für intrazelluläre Transportvorgänge von Bedeutung. Durch den Kontakt zur extrazellulären Matrix und anderen Zellen sorgt das Zytoskelett für die Stabilisierung von Geweben [3]. Das Zytoskelett besteht - bei tierischen Lebewesen - aus 3 Hauptkomponenten, den Mikrotubuli, den Intermediärfilamenten und den Aktinfilamenten. Mikrotubuli sind feste, röhrenförmige Polymere, die im Normalfall als einzelne Fasern auftreten und mit dem intrazellulären Transport, Zellteilung und der Positionierung von Organellen assoziiert sind. Unter Intermediärfilamenten versteht man eine heterogene Gruppe von Biopolymeren, die Netzwerkstrukturen formen und die mechanischen Eigenschaften einer Zelle stark beeinflussen. Als Aktinfilamente werden Polymere bezeichnet, die Netzwerk- und Faserstrukturen ausbilden, sowie die Bewegungsfähigkeit und Kraftgenerierung der Zelle maßgeblich bestimmen.

1.1.1 Aktin und Aktinstrukturen

1.1.1.1 Aktinfilamente

Aktinfilamente sind, im Gegensatz zu Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, semi-flexible Polymere, die quervernetzte Netzwerke formen. Semi-flexibel bedeutet, dass ihre Persistenzlänge etwa so groß ist wie die Länge des einzelnen Filamentes. Die Persistenzlänge ist die Längenskala, bei der die Korrelation zwischen zwei Tangenten entlang des Filaments auf $1/e$ abfällt [4]. Wenn die Filamentlänge sehr viel größer ist als die Persistenzlänge, wird ein Polymer als elastisch bezeichnet, also genau dann, wenn die thermischen Fluktuationen zu starken transversalen Fluktuationen des Filamentes führen können, während feste Polymere keine bzw kaum Fluktuationen aufweisen. Aktin ist die dynamischste der 3 Polymergruppen und kann innerhalb kurzer Zeiträume massive strukturelle Veränderungen seines Netzwerkes vollführen und determiniert damit maßgeblich die Form der Zelle und ihre migratorischen Eigenschaften. Ein Aktinfilament besteht aus Aktinmonomeren, sogenanntem globulären Aktin (G-Aktin), das ein Molekulargewicht von $42kDa$ hat. Unter physiologischen Bedingungen polymerisiert G-Aktin zu langgezogenen Helixstrukturen, dem filamentösen Aktin (F-Aktin), das im Mittel $6 - 7\mu m$ lang ist [5]. Die Geschwindigkeit der F-Aktinpolymerisation ist maßgeblich durch die ersten Nukleationsschritte, zu Di- und Trimeren, limitiert [6]. Mit Erreichen der Trimergröße erhöht sich die Filamentwachstumsgeschwindigkeit sehr stark und in Abhängigkeit von der Menge verfügbarer G-Aktin Monomere [7]. Die sich formenden Aktinfilamente besitzen eine rechts-händige Helixstruktur und da G-Aktin polare Enden aufweist, besitzt auch F-Aktin polare Enden, die als (-) und (+) bezeichnet werden, wobei das (+)-Ende eine schnellere Dynamik besitzt und etwa $10x$ so schnell elongiert, wie das (-)-Ende [8, 9].

1.1.1.2 Profilin

Da die Formation von F-Aktin spontan erfolgt, wenn eine kritische Konzentration von $\approx 0.1\mu M$ überschritten wird [10], ist es notwendig, die Entstehung von Aktinfilamenten innerhalb der Zelle zu kontrollieren. Ein solcher Kontrollmechanismus wird durch Profilin gewährleistet, welches ein aktinbindendes Protein ist und die Homöostase von Aktin reguliert [10–14], indem es die spontane Bildung von Aktindi- und -trimeren inhibiert [10]. Aktinmonomere, die an Profilin gebunden sind, können lediglich für die Bildung neuer Aktinfilamente mittels Nukleationsfaktoren genutzt werden. Ein solcher Nukleationsfaktor ist zum Beispiel der Arp2/3 Komplex (actin-related-proteins 2/3 complex), der durch Proteine der WASP/WAVE Familie (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteine) und Formin aktiviert wird [15–17]. Profilin spielt ebenfalls eine Rolle in der Elongation von Aktinfilamenten in Gegenwart von Forminen, die zusammen zu einer $\approx 9x$ schnelleren Elongation, als bei freien Aktinfilamenten, führen können [18–22]. Weiterhin verhindert Profilin die Polymerisation von Aktin am (-)-Ende und führt damit zu einer verstärkten Polarisierung während der Bildung von Aktinfilamenten [23].

1.1.1.3 Verzweigte Aktinnetzwerke

Neben den quasi linearen Aktinfilamenten gibt es verzweigte Aktinnetzwerke, die stark mit der Zellbewegung, Formänderungen und Krafterzeugung assoziiert sind und vom Arp2/3 Komplex gebildet werden [24–31]. Die vom Arp2/3 Komplex gebildeten Aktinnetzwerke befinden sich im Allgemeinen an der Zellfront [32] und formieren sich auf einer kurzen Zeitskala, weshalb der Regulation dieses Netzwerkes eine besondere Bedeutung zukommt [33, 34]. Die Entstehung einer vernetzten Aktinstruktur wird von einem Primer, einem bereits existierendem Aktinfilament, initiiert, dessen Seite an den Arp2/3 Komplex bindet [16, 35, 36], der wiederum durch nukleationsbegünstigende Faktoren der WASP/WAVE Familie aktiviert wird [15–17]. Zur Bildung eines dichten Netzwerkes sind jedoch, neben den Nukleationsfaktoren, noch sogenannte Capping Proteine notwendig, um das Wachstum der (+)-Enden der Filamente zu inhibieren [35, 37–41]. Die Aktinfilamente würden sonst in vielen Fällen parallele Bündel formen, die suboptimal für die Kraftgenerierung wären [35, 37, 39, 42–44] (Abb. 1.1). In Gegenwart von Capping Proteinen ist der Arp2/3 Komplex in der Lage Teilnetzwerke zu generieren, die von verschiedenen Filamenten ausgehen, sich verbinden können und Kräfte nahe der Zellmembran generieren können [35, 39]. Die Zahl der Knoten- bzw Vernetzungspunkte des verzweigten Netzwerkes ist entscheidend für dessen mechanische Eigenschaften und das Elastizitätsmodul skaliert entsprechend mit $1/M^4$, mit der Maschenweite M [45]. Das Arp2/3-Aktinnetzwerk hat visko-elastische Eigenschaften, ist also auf kleinen Zeitskalen ($< 1min$) elastisch und auf langen Zeitskalen viskos, verhält sich also wie eine Flüssigkeit ($> 10min$) [35, 39].

1.1.1.4 Quervernetzte Aktinfilamente

Neben den bereits beschriebenen netzartigen Aktinstrukturen gibt es Aktinstrukturen die mithilfe von Crosslinkern gebildet werden. Crosslinker sind Moleküle, die einzelne Aktinfilamente transient oder nicht-transient aneinander binden und entweder passiv (zum Beispiel Scruin, Fascin, α -Aktinin, Filamin oder Fimbrin) oder aktiv (Myosin) sind. Durch Crosslinker quervernetzte Aktinfilamente kontrollieren maßgeblich Form und mechanische Integrität der Zelle [2, 46–50]. Crosslinker haben jedoch - mit Ausnahme des Arp2/3 Komplexes - wenig bzw keinen Einfluss auf die Aktinassemblierung [50–53]. Crosslinker verbinden Aktinfilamente in verschiedenen Abständen, von $10nm$ für Fimbrin bis zu $160nm$ für Filamin, was die Dichte des resultierenden Aktinbündels determiniert [54–56]. Fimbrin und Fascin haben einen geringen Bindungsabstand und formen somit dichte Aktinbündel, bei denen die einzelnen Filamente parallel, anti-parallel oder in gemischter Orientierung vorkommen können [57, 58]. Größere Crosslinker, wie α -Aktinin oder Filamin, können sowohl in Filamentbündeln als auch in Netzwerken auftreten [46, 53, 59–62] (Abb. 1.1). Welche Crosslinker, in welcher Menge, in welcher Struktur zu finden sind, ist zusätzlich abhängig von der Geschwindigkeit der Filamentgenerierung. So wurde zum Beispiel für α -Aktinin beobachtet, dass eine hohe Filamentwachstumsgeschwindigkeit zu einer geringeren Aktinmobilität führt und dadurch

die Bündelbildung durch α -Aktinin verhindert [51]. Wenn quervernetzte Aktinnetzwerke eine homogene Struktur besitzen, führen Kräfte, die auf langen Zeitskalen wirken, zu einer Reorganisation der Crosslinker und dauerhaften Formänderungen, also einem viskosen Verhalten [63]. Auf kurzen Zeitskalen verhält sich ein solches Netzwerk elastisch und kehrt entsprechend in seine ursprüngliche Form zurück [63]. Im Allgemeinen erhöht die Präsenz von Crosslinkern somit den elastischen Anteil des Netzwerkes und reduziert den viskosen.

1.1.1.5 Parallele und anti-parallele Aktinbündel

Parallele Aktinbündel befinden sich unter anderem in Filopodia [41, 49, 64], wobei das (+)-Ende des Bündels im Allgemeinen in Richtung der Zellmembran orientiert ist [46]. Der Kontakt der Filamente innerhalb des Bündels wird über Crosslinker realisiert und die Aktin-Crosslinker-Bindungen können innerhalb von Sekunden geformt oder gelöst werden [65–67]. Bisher wurden zwei Mechanismen vorgeschlagen, wie parallele Aktinbündel entstehen können. Der erste Mechanismus involviert die Arp2/3 Komplex abhängige Elongation von Aktinfilamenten in Abwesenheit von Capping Proteinen, so dass frei wachsende (+)-Enden der Aktinfilamente - über elektrostatische Wechselwirkungen - einen Übergang vom netzwerkartigen Wachstum zum parallelen Wachstum machen [44]. Geometrische Einschränkungen und der Winkel in dem Filamente aufeinander treffen bestimmen dabei, ob parallele oder anti-parallele Bündel entstehen [44]. Im Falle paralleler Strukturen können die Aktinbündel, mit Hilfe von Crosslinkern wie Fascin, anschließend stabilisiert werden. Der zweite Mechanismus beschreibt eine Formin-abhängige Generierung paralleler Aktinbündel [68, 69]: Dabei fungiert die Formin-Domäne FH1 als eine Ringstruktur, in der Profilin-Aktin Moleküle eingefangen werden können, während die FH2 Domäne mit dem (+)-Ende des Filaments interagiert [70, 71] (Abb. 1.1). Einige Mitglieder der Forminfamilie wandern jedoch vom Ende des Filaments in die Mitte [72], wodurch Formine ebenfalls als Crosslinker für (anti-)parallele Aktinstrukturen fungieren können [72–75]. Da jedoch Formine nicht notwendigerweise Aktinbündel formen [76], ist es wahrscheinlich, dass Formine mit anderen Proteinen, wie zum Beispiel Crosslinkern oder Ena/VASP interagieren. Ena/VASP ist eine Proteinfamilie, die unter anderem eine anti-capping Funktion hat, also den Stopp der Aktinpolymerisation in Gegenwart von Capping-Proteinen verhindern kann und das Wachstum des Aktinfilaments am (+)-Ende begünstigt [77–81]. Frei wachsende parallele Aktinbündel können eine Kraft auf Objekte ausüben [21, 82], die in etwa der Kraft entspricht, die notwendig ist, um das Wachstum eines einzelnen Filamentes zu stoppen [83]. Es ist daher wahrscheinlich, dass während des Bündelwachstums nur einzelne Filamente gleichzeitig in Kontakt mit einem Hindernis kommen [83].

Anti-parallele Aktinbündel sind im Allgemeinen mit dem Crosslinker bzw dem Motorprotein Myosin verbunden, der die anti-parallelen Filamente aktiv gegeneinander verschieben kann. Somit sind anti-parallele Strukturen kontraktile und notwendig für die Funktion der Stressfasern, während der Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsion [58, 84–89]. Wie bei parallelen Aktinbündeln werden anti-parallele Bündel durch Crosslinker stabilisiert, die diese Orientierung bevorzugen, wie zum Beispiel α -Aktinin oder Fimbrin [86, 90, 91]

(Abb. 1.1). Durch die Aktivierung des Motorproteins Myosin stehen Filamentbündel unter mechanischer Spannung, was entweder zu einer Kontraktion des Bündels oder dessen Auflösung führen kann [92–94]. Ohne andere Crosslinker kontrahieren anti-parallele Aktinstrukturen stark bei einer Myosinaktivierung, bevor sie disassemblieren, wohingegen Quervernetzung zu einer reduzierten Kontraktion vor der Auflösung führt [95]. Weiterhin beeinflusst die Länge des Bündels dessen kontraktile Eigenschaften, da mit der Länge auch die Dichte von Myosin variiert und somit die erzeugte Spannung [96].

Die mechanischen Eigenschaften der (anti-)parallelen Aktinbündel hängen von der Art des Crosslinkers ab, also ob sie ein kompaktes oder weniger kompaktes Bündel formen und ob sie eine Verschiebung der einzelnen Filamente gegeneinander zulassen. Für ein paralleles Aktinbündel können die mechanischen Eigenschaften aus der Kraft F , die notwendig ist, um das Bündel zu biegen, bestimmt werden. Für N nicht quervernetzte Aktinfilamente gilt: $F = N * \pi^2 * k_B * T * l_p / L$, mit der thermischen Energie $k_B T$, der Persistenzlänge des Filaments l_p und der Länge des Bündels L . Für quervernetzte Aktinbündel, ohne die Option der Verschiebung der einzelnen Filamente zueinander, skaliert die Kraft mit N^2 . Somit ergibt sich für die Persistenzlänge des nicht quervernetzten Bündels $L_p = N * l_p$ und für das statisch verbundene: $L_p = N^2 * l_p$.

1.1.1.6 ADF/Cofilin induzierte Aktindisassemblierung

ADF/Cofilin ist eine Familie aktinbindender Disassemblierungsfaktoren, die Aktinfilamente teilen und fragmentieren [97, 98], aber nicht die Depolymerisationsrate verändern [99]. Die Effizienz von ADF/Cofilin hängt von dessen Sättigung am Aktinfilament ab, da Filamente mit einer geringen Zahl an ADF/Cofilin schneller fragmentieren, wohingegen Filamente, die vollständig mit ADF/Cofilin gesättigt sind, stabilisiert werden [100–104]. Die Disassemblierung durch ADF/Cofilin wird wahrscheinlich durch eine reduzierte Persistenzlänge einzelner Filamente nach der ADF/Cofilin Bindung verursacht, was zu einer Reduktion der Persistenzlänge auf bis zu 20% führen kann [103]. ADF/Cofilin bindet bevorzugt an ADP-Aktin, welches sich am weniger dynamischen Bereich des (-)-Endes des Filamentes befindet und weniger stark an, im Bereich des (+)-Endes befindlichen, ATP-Aktin [105, 106]. Eine Bindung von ADF/Cofilin an ATP-Aktin beschleunigt dessen Übergang zu ADP-Aktin und somit dessen Dissoziation [105]. Da ADF/Cofilin nicht am (+)-Ende binden kann, ist es nur möglich eine vollständige Sättigung eines Aktinfilamentes zu erreichen, wenn das (+)-Ende vorher mit einem Capping Protein gebunden wurde und somit nicht mehr wachsen kann [104]. Mit Ausnahme von Fascin reduzieren Crosslinker die von ADF/Cofilin induzierte Fragmentierung von Aktinbündeln [52, 82, 107, 108]. In netzartigen, Arp2/3 generierten, Aktinstrukturen teilt ADF/Cofilin sowohl Aktinfilamente, als auch die durch den Arp2/3 generierten Verknüpfungen von Filamenten [109–111]. Da ADF/Cofilin bevorzugt die älteren ADP-Aktinstrukturen bindet, löst es bevorzugt die inaktiven Kompartimente verzweigter Netzwerke auf [97, 98, 112, 113]. Ebenfalls wurde beobachtet, dass zufällige ADF/Cofilin induzierte Disassemblierungen die Aktinumsetzung, durch makroskopische Netzwerkbrüche, bei denen große Teile des Netzwerkes plötzlich kollabieren, erleichtern können [97, 98].

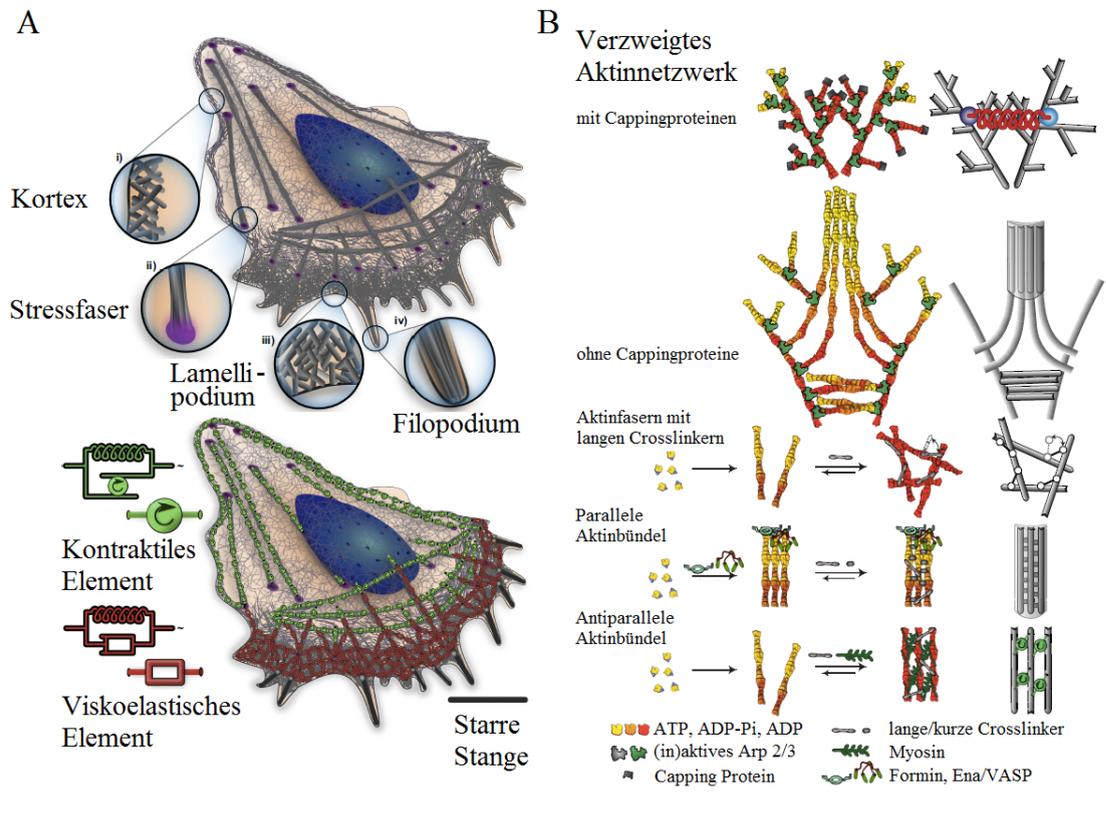


ABB. 1.1: A) zeigt die wichtigsten Aktinstrukturen einer motilen Zelle (oben). Die Vergrößerung der einzelnen Strukturen zeigt deren spezifischen Aufbau. Der untere Bildteil stellt eine mechanische Repräsentation der Zelle dar. Hierbei stellen grüne Elemente, aufgrund der Myosinaktivität, aktive Federn dar, während rote Elemente energiedissipierende Strukturen repräsentieren. B) zeigt einzelne Aktinorganisationsstrukturen (links) und deren mechanische Repräsentationen (rechts). Die durch Arp2/3 geformte und durch Cappingproteine limitierte Struktur, formt ein Netzwerk, dessen mechanische Interaktion als Feder zwischen Baryzentren dargestellt werden kann. In Abwesenheit der Cappingproteine werden lange Aktinbündel geformt, die als feste Stabstrukturen aufgefasst werden können. Aktinfilamente die durch große Crosslinker generiert werden formen Netzwerkstrukturen, wobei die Bindungen, in Abhängigkeit von Aktin- und Crosslinkerkonzentration und Crosslinkerkinetik, die Elastizität des Netzwerkes bestimmen. Kürzere Crosslinker formen dicht gepackte, feste Aktinbündel. Wenn neben den passiven Crosslinkern noch aktive Crosslinker, wie Myosin, hinzukommen, dann können Aktinfilamente antiparallele Bündel formen, die mechanisch als aktive Federn aufgefasst werden können. Die Abbildung wurde modifiziert nach Blanchoin et al [114].

1.1.1.7 Dynamik und Mechanik von Aktinstrukturen innerhalb der Zelle

Beim traditionellen Blick auf die Zellbewegung ist diese ein Ergebnis von Ausstülpungen in Bewegungsrichtung, mit anschließender Adhäsion dieser an das Substrat und gleichzeitigem Verlust der Adhäsion an der entgegengesetzten Seite, sowie einer Kontraktion [115–118]. Aktin ist in all diesen Prozessen involviert, wobei innerhalb der Zelle hauptsächlich das Lamellipodium und Filopodia die Zellmotilität bestimmen, während kontraktile Strukturen, wie Stressfasern oder der Zellkortex die mechanische Integrität der Zelle wahren, sowie eine konstante Bewegung der Zelle ermöglichen. Eine weitere Art

der zellulären Ausstülpung sind Blebs, die die Zellbewegung unabhängig von Filopodia und Lamellipodia steuern können [114].

Das Lamellipodium ist eine quasi zweidimensionale Struktur, die durch die Polymerisation von Aktin an der Zellfront entsteht [14, 32, 119–121] (Abb. 1.1). Der wichtigste Faktor für die Generierung des Lamellipodiums ist der Arp2/3 Komplex, der durch den WAVE Komplex aktiviert wird [122]. Der WAVE Komplex ist intrinsisch inaktiv und wird durch Rac (Mitglied der kleinen GTPasen, der Familie der Rho GTPasen) aktiviert [123, 124]. Die im Lamellipodium befindlichen Filamente sind durch Arp2/3 vernetzt [125]. Eine Analyse der Zellgeschwindigkeit in Relation zur Filamentorientierung im Lamellipodium konnte zeigen, dass die Filamente in schnelleren Zellen schräg zur Bewegungsrichtung orientiert sind und in langsameren Zellen parallel [126]. Für Zellen, die sich in einer dreidimensionalen Matrix bewegten, konnte gezeigt werden, dass N-WASP (und nicht WAVE) der bedeutendste Aktinregulator für die Bewegung ist [127]. Für Rac wurde beobachtet, dass es nicht verstärkt an der Zellfront lokalisiert ist [128]. Ein anderer Faktor, der mit der Dynamik des Lamellipodiums assoziiert ist, ist Ena/VASP, welches an der Zellfront gefunden wurde und mit einer erhöhten Zahl an Protrusionen in Verbindung steht [129–131]. Neben der Aktindynamik wird das Lamellipodium auch durch die Eigenschaften der Zellmembran beeinflusst, so konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Oberflächenspannung der Membran die Aktinorganisation des Lamellipodiums verändert [132, 133]. Eine erhöhte Oberflächenspannung führte zu einer gerichteteren Aktinfilamentpolymerisation [133], während eine geringere Oberflächenspannung zur vermehrten Bildung von Ausstülpungen führte [132]. Neben der Organisation des Aktinzytoskelettes wird auch vermutet, dass die Membranspannung ebenfalls zu einer Verstärkung der Aktindepolymerisation auf der, dem Lamellipodium abgewandten, Seite führt [134]. Bezüglich der Mechanik des Lamellipodiums konnte festgestellt werden, dass Myosin an der Rückseite des Lamellipodiums beobachtet wurde, weshalb das Lamellipodium auf kurzen Zeitskalen elastisch ist, während es auf langen Zeitskalen viskos ist [134, 135]. Die Kraft, die das Lamellipodium aufbringen kann, wurde für Keratozyten mit $3nN/\mu m^2$ bestimmt, was etwa der vom Arp2/3 Komplex durch Aktinnukleation generierten Kraft entspricht [136–138].

Eine weitere mit der Zellmotilität assoziierte Struktur ist Filopodia, eine Struktur bestehend aus parallelen Aktinbündeln, deren (+)-Enden in Richtung der Zellmembran zeigt [41] (Abb. 1.1). Die Ausrichtung der Filopodia wird über Formine und Ena/VASP gewährleistet, die beide in der Lage sind, das Wachstum von Aktinfilamenten aufrecht zu erhalten [64]. Einige Formine, wie FMNL2, können wiederum durch die kleine GTPase Cdc42 aktiviert werden [139]. Die anerkannteste Hypothese zur Entstehung von Filopodia beschreibt die Entstehung paralleler Bündel über Arp2/3, in Abwesenheit von Capping Proteinen, einem anschließendem über Formine und Ena/VASP vermittelten Filamentwachstum und einer Bündelung der Filamente durch den Crosslinker Fascin [140]. Neben ihrer Funktion für die Zellbewegung sind Filopodia in der Lage Zellkontakte zu initiieren, Zell-Zell-Signale zu übertragen und auf die Festigkeit ihrer Umgebung zu reagieren [141]. Filopodia können bei ihrer Disassemblierung Kräfte von bis zu $10pN$ über eine Distanz bis zu $10\mu m$ [142, 143], bei einer Geschwindigkeit von $100nm/s$ [144] erzeugen. Erwähnenswert ist, dass die Myosine II, V, VI nicht für diesen Prozess benötigt

werden [145]. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass die Filopodiodynamik ausschließlich über die Aktin(de)polymerisation und Aktinkortexveränderungen vermittelt wird.

Eine weitere zelluläre Struktur mit starker Aktinbeteiligung sind die kontraktilen Fasern, die weder in Filopodia, noch im Lamellipodium enthalten sind. Diese bestehen aus Bündeln nicht vernetzter Aktinfilamente, die in verschiedener Polarität angeordnet sind und Myosin II enthalten [146, 147] (Abb. 1.1). Die zwei Hauptklassen der kontraktilen Stressfasern sind ventrale und transversale Stressfasern. Ventrale Stressfasern verlaufen parallel zur Bewegungsrichtung und verbinden Adhäsionspunkte der Zelle, während transversale Stressfasern senkrecht zur Bewegungsrichtung verlaufen und nicht an fokalen Adhäsionspunkten verankert sind. Fokale Adhäsionspunkte sind Adhäsionsstellen, an denen Stressfasern fest mit dem Substrat verankert werden. Die Formierung transversaler Stressfasern hängt sowohl von Arp2/3, als auch der Myosinaktivität ab [85]. Transversale Stressfasern werden unter anderem während des Kollapses des verzweigten, von Arp2/3 geformten, Netzwerkes von Myosin gebildet [148], wobei auch das Formin FHOD1, durch seine Fähigkeit Aktin zu bündeln und als Capping Protein zu fungieren, eine Rolle spielt [149]. Eine weitere Entstehungsmöglichkeit transversaler (und ventraler) Stressfasern ist aus dem Kollaps von Filopodia, welche als Keim für die Bildung von Stressfasern fungieren können [150]. Transversale Stressfasern markieren den Übergang vom Lamellipodium zum Rest der Zelle und den Bereich in dem sich fokale Adhäsionen vollständig ausbilden [151–153]. Es wird angenommen, dass transversale Stressfasern die Kontraktilität, in der dem Lamellipodium abgewandten Seite, erhöhen und somit dort die Disassemblierung des Aktinnetzwerkes zu beschleunigen [135, 154, 155]. Ventrale Stressfasern werden vermutlich über eine Interaktion von Forminen mit dem Ena/VASP Komplex gebildet, wobei auch das Arp2/3 Netzwerk eine Rolle zu spielen scheint [89, 156]. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht geklärt. Diese Stressfasern fungieren als Mechanosensoren und spielen eine bedeutende Rolle bei der Zell-Matrix-Adhäsion.

Die letzte hier beschriebene Aktinstruktur ist der Kortex, der, durch die Präsenz von Myosin, eine kontraktile Hülle an der Grenze zur Plasmamembran formt (Abb. 1.1). Der Kortex ist eine mehrere hundert Nanometer dicke Schicht, die aus einer Mischung aus Filamentbündeln und vernetzten Filamenten besteht und eine Maschenweite von etwa 50–200nm hat [157]. Der Kortex ist unter anderem durch ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) Proteine an der Membran verankert und kann so Kräfte, die auf die Membran wirken, weiterleiten [99, 158, 159]. Die Kontraktilität des Kortexes, sowie der interne Zelldruck, sind Determinanten für die Formation von Blebs, Zellaustülpungen die an der Oberfläche entstehen [160, 161]. Blebs entstehen, wenn der Kortex lokal nicht mehr an die Membran gebunden ist, Löcher aufweist oder um den Zellinnendruck gezielt zu reduzieren [158, 162, 163]. In einigen Fällen werden Blebs nach ihrer Formierung mit Aktinfilamenten und Myosin gefüllt, adhäreren an das Substrat und treiben so die Zellbewegung voran [164–166]. An diesen Beispielen lässt sich erkennen, dass eine der wichtigsten Eigenschaften des Kortexes seine Oberflächenspannung ist [167]. Es zeigte sich, dass die Kortexspannung abhängig von der Myosinaktivität ist, eine erhöhte Myosinaktivität also zu einer erhöhten Kortexspannung führte [168]. Ebenso führte eine reduzierte Aktinpolymerisation zu einer erhöhten Kortexspannung [168]. Auf Zeitskalen die kleiner sind als die Remodulierungszeiten des Aktinkortex, verhält dieser sich elastisch [169] und sein

Elastizitätsmodul ist in Fibroblasten in der Größenordnung von $200 - 300 Pa$ [170]. Auf langen Zeitskalen ($> 1 min$) verhält sich der Kortex viskos, da er sich externen Kräften, durch Aktinremodulierung, Dissoziation und Bindung von Crosslinkern, anpassen kann [169].

1.1.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind eine Polymerklasse, die aus α - und β -Tubulin Heterodimeren geformt wird, hochdynamisch ist und ausgeprägte Phasen des Wachstums und schneller Depolymerisation aufweist [171–174]. Das Mikrotubulinetzwerk bildet sich ausgehend von Mikrotubuliorisationszentren, die im Allgemeinen im perinukleären Bereich liegen (häufig am Zentrosom, aber teilweise auch am Golgi-Apparat) [175, 176]. Dieses Organisationszentrum wird vermutlich durch γ -Tubulinringe geformt und bildet das Gerüst für die Bildung von Mikrotubulinfilamenten [177, 178]. Am Mikrotubuliorisationszentrum binden α - und β -Tubulin, wobei das sogenannte (-)-Ende am Organisationszentrum verankert ist und das dynamischere (+)-Ende Richtung Zellperipherie zeigt. Während der Bildung von Mikrotubulifilamenten unterliegen diese einer sogenannten dynamischen Instabilität, also einem Wechsel von langsamen Wachstum, Pausen oder schnellen Depolymerisationsphasen, die sich abwechseln können [179]. Ein möglicher Erklärungsansatz dieses Verhaltens kann aus der Bildung einzelner Filamente abgeleitet werden. Während der Polymerisation wird GTP-gebundenes Tubulin an das (+)-Ende gebunden und mit einer geringen Zeitverzögerung hydrolysiert, wobei auch ältere Filamentabschnitte in geringem Maße GTP-gebundenes Tubulin aufwiesen [180]. Dies führt zu einem möglichen Modell: Da das GTP-Tubulin stabiler ist, kann es durch stochastische Verzögerungen bei der Polymerisation dazu kommen, dass das (+)-Ende kein GTP-Tubulin mehr enthält, somit spontan depolymerisiert und sich an späteren Stellen mit GTP-Tubulin wieder stabilisiert [180]. Neben dieser intrinsischen Regulation der Mikrotubulipolymerisation gibt es noch extrinsische Faktoren, wie Mikrotubulin-assoziierte Proteine (MAP) oder Mikrotubulin-(+)-Ende-bindende Proteine (+TIP), wobei beide Klassen sowohl stabilisierende, als auch destabilisierende Effekte haben können.

Mikrotubuli haben, ebenso wie Aktin, eine Rolle im Bewegungsapparat der Zelle. Die Partizipation der Mikrotubuli lässt sich dabei grundsätzlich in drei Teilaspekte aufteilen: ihr Beitrag über ihre Mechanik, über Signaltransduktion und als Transportstruktur.

Mikrotubuli sind in der Lage, einer hohen externen Spannung standzuhalten und haben somit einen Anteil an der Aufrechterhaltung der Zellform unter physiologischen Bedingungen [181]. Weiterhin kann die Polymerisation von Mikrotubulifilamenten eine Kraft von einigen Piconewton generieren, was vergleichbar mit der erzeugten Kraft von Motorproteinen ist [169, 182]. In einer *in vitro* Untersuchung wurde gezeigt, dass die generierten Kräfte Membranen deformieren können [183]. Für eine direkte Involvierung der Mikrotubuli bei der Kraftgenerierung für die Zellbewegung ist es notwendig, dass Mikrotubuli die Zellfront erreichen. In den meisten Zelltypen sind jedoch nur sehr wenige Mikrotubuli im Lamellipodium vorhanden, so dass die Kraft die notwendig ist um Ausstülpungen zu generieren ($\approx 1000 pN/\mu m$) nicht erreicht wird [184]. In Neuronen

sind Mikrotubuli als Bündel organisiert und können somit eine größere Kraft generieren, um zum Beispiel das Axon zu formen [184]. In den meisten anderen Zelltypen ist dies jedoch nicht der Fall. Da zellbewegungsassoziierte Strukturen, wie das Lamellipodium, einen hohen "Materialverbrauch" haben, ist ein ständiger Nachschub von Nöten, um eine konsistente Zellbewegung zu ermöglichen. Für diesen Transport sind Mikrotubuli von großer Bedeutung [185, 186], da sie, neben dem Transport von Membranbestandteilen, auch an der Beförderung von Signalmolekülen, wie zum Beispiel den kleinen GTPasen Rac und Cdc42 beteiligt sind [187, 188]. Mikrotubuliassoziierte Transporter liefern ebenfalls β -Aktin kodierende mRNA und den ARP2/3 Komplex an die Zellfront und sorgen somit indirekt für eine erhöhte Aktinpolymerisation [189, 190]. Ebenfalls konnte bereits gezeigt werden, dass die Mikrotubulopolymerisation die kleine GTPase Rac aktiviert, die wiederum die Entstehung des Lamellipodiums begünstigt [191].

Eine weitere, indirekte Einflussmöglichkeit der Mikrotubuli auf die Zellbewegung ist über die (De-)Stabilisierung von Zell-Matrix-Adhäsionsverbindungen gegeben, da Mikrotubuli häufig mit Adhäsionskomplexen assoziiert sind [192] und die Dynamik fokaler Adhäsionspunkte mit regulieren [193]. So wird zum Beispiel durch die Mikrotubuli-abhängige Aktivierung von Rac die Generierung neuer fokaler Adhäsionspunkte begünstigt [194]. Weiterhin wachsen Mikrotubulinfilamente aktiv in Richtung von entstehenden fokalen Komplexen an der Zellfront, an denen Mikrotubuli eingefangen und stabilisiert werden [195] und dadurch den Transport von Integrinen, die für die vollständige Ausformung von fokalen Adhäsionen notwendig sind, beschleunigen [196]. Bei Fibroblasten konnte im Zellysat, nach einer extern induzierten Mikrotubulidepolymerisation, festgestellt werden, dass sich die Aktivität der kleinen Rho GTPase Rac1 und die Zellkontraktilität erhöht [191]. Dies liefert einen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Mikrotubulidynamik und der Bildung fokaler Adhäsionen an der Zellfront, über eine modulierte Zellkontraktilität [197]. Neben den adhäsionsbegünstigenden Effekten von Mikrotubuli an der Zellfront, konnten jedoch auch destabilisierende Effekte auf der entgegengesetzten Seite beobachtet werden [195, 198]. So wurde in motilen Fibroblasten festgestellt, dass Mikrotubuli auch vollständig ausgeprägte fokale Adhäsionspunkte aktiv ansteuern und deren Disassemblierung begünstigen [195, 198]. Ein gängiges Modell erklärt dieses Phänomen durch die dynamische Instabilität der Mikrotubuli, die es Mikrotubuli erlaubt, direkt an die Adhäsionspunkte anzustoßen, anschließend zu depolymerisieren und den Vorgang zu wiederholen [199, 200]. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Befundung von Rid et al, die einen Zusammenhang zwischen Mikrotubulistoßzahl und Dissoziation von fokalen Kontakten beobachteten [200].

1.1.3 Intermediärfilamente

Intermediärfilamente sind eine große Proteinklasse, die von mindestens 70 Genen kodiert wird [201]. Alle zytoplasmatischen Intermediärfilamente haben eine vergleichbare Monomerstruktur, die aus einer zentralen α -Helix besteht, an der sich beidseitig eine nicht-helikale Struktur befindet [202]. Zwei Monomere wickeln sich wiederum umeinander, um ein sogenanntes „coiled-coil“ Dimer zu bilden [203]. Die Dimere formen anschließend Tetramere und 8 Tetramere ein zylindrisches Einheitsfilament [204]. Die Einheitsfilamente

aggregieren dann durch beidseitige Bindung weiterer Einheitsfilamente innerhalb einer Zeitskala von Minuten zu Filamenten [205]. Am Ende der Filamentbildung erfolgt ein weiterer Kompaktierungsschritt bei dem der Filamentdurchmesser schrumpft [206–208] (Abb. 1.2).

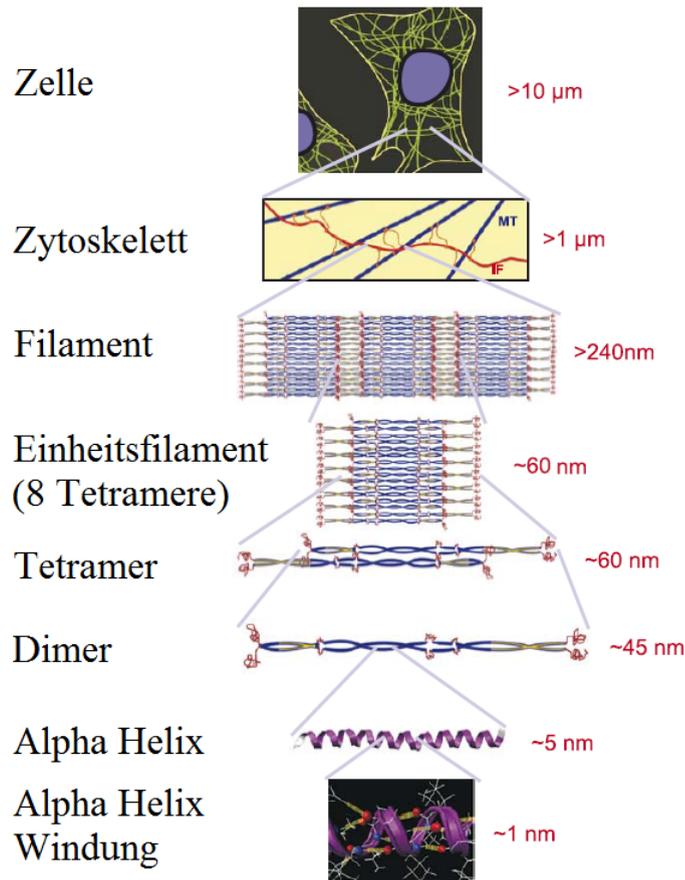


ABB. 1.2: Abbildung einer typischen Intermediärfilamentstruktur und dessen hierarchische Struktur, beginnend bei der α -Helix, die durch Wasserstoffbrücken gebildet wird bis zum Zellskelett. Die Abbildung wurde nach Qin et al [201] modifiziert.

Diese so geformten Intermediärfilamente bilden innerhalb der Zelle ein dichtes Netzwerk, das verstärkt im perinukleären Raum befindlich ist, jedoch auch bis zum Kortex reicht [209]. Im Bereich des Kortexes interagieren Intermediärfilamente mit der Zellmembran an fokalen Adhäsionsstellen, Desmosomen, sowie Hemidesmosomen [210–218]. Durch die Verankerung an Kern- und Zellmembran bilden Intermediärfilamente unter anderem ein Gerüst für Mitochondrien, den Golgi Apparat und weitere Organellen [219]. Aufgrund seiner Netzwerkstruktur und der Fähigkeit Organellen innerhalb der Zelle zu verankern, werden Intermediärfilamente als Puffer bei mechanischer Belastung gesehen [220–223]. Auf Ebene einzelner Filamente konnte bereits gezeigt werden, dass Intermediärfilamente hohen Deformationen bis zu 350% ihrer Ausgangslänge standhalten, ohne zu reißen [224, 225]. Betrachtet man jedoch die Elastizität des einzelnen Filamentes, so können Intermediärfilamente als flexible Polymere, mit einer Persistenzlänge von

$< 1\mu\text{m}$, betrachtet werden [226]. Auf Ebene der Polymernetzwerke konnte gezeigt werden, dass Intermediärfilamentnetzwerke deutlich weicher sind als Aktinnetzwerke [227] und die Quevernetzung der Filamente mit klassischen Crosslinkern nur einen geringen Einfluss auf die Elastizität des Netzwerkes hat [228]. Erstaunlicher Weise zeigen Intermediärfilamentnetzwerke zwar eine geringere initiale Festigkeit bei geringen Deformationen, jedoch ein stark steigendes Elastizitätsmodul bei wachsender Deformation (Strain Hardening) [227]. Messungen und Simulationen einzelner Zellen konnten zeigen, dass Intermediärfilamente einen Anteil an der Gesamtfestigkeit der Zellen haben, dieser jedoch bei niedrigen Spannungen kaum bzw nicht nachweisbar ist, jedoch mit steigender Spannung wächst [220, 229].

Neben der Funktion als „mechanischer Puffer“ [220–223] sind Intermediärfilamente eine hochdynamische Komponente des Zytoskelettes, die mit anderen Elementen des Zytoskelettes interagiert und weitere Funktionen besitzt. Wie bereits erwähnt, verankern Intermediärfilamente Organellen innerhalb des Zytoplasmas und bilden somit ebenfalls eine Leitstruktur für die Übertragung mechanischer Stimuli [219]. Weiterhin können einige Intermediärfilamente, wie zum Beispiel Vimentin oder Keratin, sich direkt am Aktin- und Mikrotubulinnetzwerk ausrichten und zum Beispiel mittels Plakin an diese binden [230–233]. Aktin- und Mikrotubulifilamente bilden dabei das Gerüst an dem kleine Protofilamente, mithilfe der Motorproteine Kinesin und Dynein im Falle der Mikrotubuli bzw Myosin Va im Falle der Aktinfilamente, transportiert werden können [231, 233–242]. Dadurch kann oftmals eine Kolo-kalisation von Aktin bzw Mikrotubuli mit Intermediärfilamenten beobachtet werden [230–232]. Weiterhin beeinflusst die Präsenz und Organisation der anderen Zytoskelettfilamente auch die Dynamik der Intermediärfilamente [241, 243]. Daneben konnte auch ein Zusammenhang zwischen Vimentin und der Bewegung von Fibroblasten ermittelt werden. So werden im Lamellipodium lediglich Vimentinprotofilamente beobachtet, während in der restlichen Zelle ein ausgeprägtes Vimentinnetzwerk vorhanden ist [244]. Ein Übergang der Fibroblasten in einen stationären Zustand führt wiederum zu einem Vorhandensein des Vimentinnetzwerkes in der gesamten Zelle [244]. Eine anschließende lokale Aktivierung von Rac1, einem Mitglied der Familie der Rho GTPasen, führt zu einem lokalen Zusammenbruch des Vimentinnetzwerkes, Bildung des Lamellipodiums und führt zur Entstehung der Protofilamente an dieser Stelle [244]. Ein weiterer Hinweis auf den Einfluss von Intermediärfilamenten auf die Zellmotilität liefert die Entdeckung, dass naszierende Keratinprotofilamente gehäuft in der Nähe von fokalen Adhäsionspunkten entstehen [231, 245]. Somit kann ein Zusammenhang zwischen der Organisationsstruktur der Intermediärfilamente und der Zellmotilität angenommen werden. Ob dieser Zusammenhang kausal oder korrelativ ist, ist jedoch nicht abschließend geklärt.

1.1.4 Elastisches Verhalten von Biopolymeren

In einfachen elastischen Festkörpern resultiert eine konstante Scherung (Ergebnis zweier parallel zueinander, in entgegengesetzter Richtung, wirkender Kräfte) in einer konstanten Verformung, während dies bei newtonischen Flüssigkeiten zu einem konstanten Fluss bzw Änderung der Verformung führt. Zytoskelettkomponenten sind jedoch weder ideale

Festkörper, noch Flüssigkeiten, sondern besitzen sowohl viskose, als auch elastische Eigenschaften und werden daher als viskoelastisch charakterisiert. Dies wird häufig in Form des Elastizitäts- und Verlustmoduls ausgedrückt, welche dem elastischen beziehungsweise viskosen Anteil entsprechen. Bei Messungen der mechanischen Eigenschaften dieser Polymere muss somit die wirkende Kraft bzw die Deformation und die Frequenz der applizierten Verformung berücksichtigt werden. Im Falle von reinen F-Aktinfilamenten konnte so beispielsweise festgestellt werden, dass für Frequenzen $f > 0.1 Hz$ die viskosen Eigenschaften gegenüber den elastischen dominieren, während sich dieses Verhalten für niedrigere Frequenzen umkehrt [47]. Die mechanischen Eigenschaften von Zytoskelettnetzwerken sind ebenfalls nicht linear bezüglich der applizierten mechanischen Spannung und können entweder mit einer Erhöhung oder Verringerung des Elastizitätsmoduls unter hohen Spannungen reagieren [227, 246–249]. Im Falle von reinen F-Aktinfilamenten wurde bei Scherexperimenten eine Kompression des Netzwerkes senkrecht zur Scherrichtung beobachtet, welche durch eine in selbe Richtung gemessene, negative Spannung erklärbar ist [250]. Ebenso kommen jedoch Nichtlinearitäten der einzelnen Aktinfilamente und eine Reorganisation des Netzwerkes als Erklärungen in Frage [47]. Neben der Verfestigung unter mechanischer Spannung konnte auch eine Reduktion der Elastizität bei reinen Mikrotubulinnetzwerken [251] und bei F-Aktinschmelzen ('flüssiger' Aggregatzustand) mit geringer Crosslinkerdichte [246, 252] und verzweigten F-Aktinnetzwerken [253] festgestellt werden.

1.1.4.1 Einzelne Aktinfilamente

Zum Verständnis der Eigenschaften von komplexen F-Aktinnetzwerken ist es notwendig zuerst die Eigenschaften einzelner F-Aktinfilamente zu charakterisieren. Einzelne Aktinfilamente haben ein Young Modul (Widerstand des Filamentes gegen elastische Verformung) von $E \approx 10^9 Pa$ [254], aber nur eine geringe Widerstandsfähigkeit gegen Verbiegung, da gilt $\kappa_0 \propto E * d^4$, mit dem Durchmesser $d \approx 7 nm$ eines Filamentes, woraus sich eine Persistenzlänge von $l_P \approx 8 - 17 \mu m$ ergibt [255, 256]. Die Persistenzlänge in der Größenordnung der Filamentlänge führt dazu, dass ein einzelnes Filament nicht gerade, sondern vielfach gekrümmt ist. Wenn durch eine äußere Kraft das Filament gestreckt werden soll, so muss zusätzliche Arbeit, gegen die entropisch verursachte Filamentkrümmung, verrichtet werden, was zu einer starken Nichtlinearität und einem erhöhten Elastizitätsmodul des Filaments führt [257–259]. Mechanische Eigenschaften von Aktinnetzwerken werden zusätzlich jedoch auch durch Crosslinker, also Filament-Filament-Bindungen, beeinträchtigt. Bei Crosslinkern unterscheidet man, in mechanischer Hinsicht, steife und weiche, aktive und passive, transiente und nicht-transiente Crosslinker, da die Eigenschaften der Crosslinker Einfluss auf die Eigenschaften des deformierten Netzwerkes haben.

1.1.4.2 Aktinnetzwerke mit steifen, nicht-transienten, passiven Crosslinkern

Wenn steife, nicht-transiente Crosslinker in einem F-Aktinnetzwerk vorhanden sind, führt das zu verschiedenen mechanischen Regimes. Im Grenzfall einer hohen Crosslinker- und F-Aktindichte und langer F-Aktinfilamente wird die Deformation des Netzwerkes durch die Dehnung einzelner Filamente dominiert, wobei die resultierende Netzwerkdeformation affin ist [260, 261]. Das bedeutet, sie kann durch eine affine Transformation, also Rotation, Translation, Scherung und lineare Stauchung und Streckung beschrieben werden und die resultierende Netzwerkkonfiguration ist selbstähnlich zur Ausgangskonfiguration. Im Grenzfall niedriger Crosslinker- und F-Aktinkonzentration, sowie geringer F-Aktinfilamentlänge resultiert eine externe Scherung in der Verbiegung einzelner Filamente und nicht-affiner Deformation [260–262]. Generell gilt aber, dass eine erhöhte Crosslinker- und F-Aktinkonzentration zu einem erhöhten Elastizitätsmodul ($G \propto c^x$ mit $x > 1$, der Konzentration c und dem Elastizitätsmodul G) des Netzwerkes führt [246, 248].

Netzwerke mit hoher Crosslinkerdichte zeigen ein nicht-lineares Anwachsen des Elastizitätsmoduls unter steigenden externen Kräften, bis zu einer maximalen Deformation, bei der das Netzwerk kollabiert [263]. Die maximale Deformation, vor dem Netzwerkkollaps, ist proportional zur F-Aktindichte, was darauf hinweist, dass einzelne F-Aktinfilamente reißen [246, 263]. Die Art der nicht-linearen Steigerung des Elastizitätsmoduls des Netzwerkes lässt ebenfalls vermuten, dass diese direkt aus der Elastizitätsmodulerhöhung der einzelnen F-Aktinfilamente unter Spannung hervorgeht [246, 263]. Wenn die Crosslinkerdichte sinkt, schwächt sich der Effekt der Netzwerkversteifung unter großen Spannungen ab [246] und kann sogar zu einem verringerten Elastizitätsmodul bei großen Spannungen führen [246, 260, 261, 264]. Im Gegensatz zu Netzwerken mit hoher Crosslinkerdichte ist der dominierende Modus bei geringen Dichten die Verbiegung einzelner Filamente, sowie das Biegeknicken (eulersches Knicken), wenn eine kritische Kraft auf einzelne Filamente ausgeübt wird [246, 260, 261, 264]. Die Biegeknickung wird als Mechanismus für die verringerte Elastizitätsmodul unter hohen Spannungen verantwortlich gemacht [246, 260, 261, 264].

1.1.4.3 Aktinnetzwerke mit weichen, transienten, passiven Crosslinkern

Da Crosslinker unter physiologischen Bedingungen ein dynamisches Verhalten haben, sind sie in der Lage eine F-Aktinschmelze zu reorganisieren, weshalb diese auf langen Zeitskalen viele Eigenschaften einer Flüssigkeit hat [265]. Im Speziellen wurde der Einfluss der Temperatur auf die zeitliche Dynamik einer F-Aktin- α -Aktinin-Schmelze untersucht, da so die Bindungsaffinität des Crosslinkers zu Aktin reguliert werden kann [252, 266]. Bei einer steigenden Temperatur zeigte das F-Aktin- α -Aktinin-Netzwerk eine Reduktion des elastischen Moduls auf ca 1/10 des Ausgangswertes und einen verstärkten Einfluss der viskosen Komponente [252, 266]. Bei der niedrigsten Temperatur (8°C) konnte ein festes Netzwerk, mit ähnlichen Eigenschaften wie ein Aktinnetzwerk mit steifen, nicht-transienten, passiven Crosslinkern beobachtet werden [252, 266]. Da mit einer

erhöhten Temperatur die Dissoziationsrate des Crosslinkers steigt, hat das resultierende Aktinnetzwerk eine höhere Dynamik und kann Spannung besser dissipieren [47].

Neben der Dynamik des Crosslinkers spielt auch deren eigene Elastizität eine Rolle für die mechanischen Eigenschaften des Polymergels. Ein solcher Crosslinker, bei dem dessen eigene Mechanik eine Rolle spielt, ist Filamin A [247, 267]. Im Gegensatz zu steifen Crosslinkern führt Filamin A nur zu einem 2-3x höheren Elastizitätsmodul, verglichen mit dem Verlustmodul (bei steifen Crosslinkern: 10x höher), welches mit einem schwachen Potenzgesetz über Zeitskalen von $t \approx 10 - 1000s$ zunimmt (bei steifen Crosslinkern: Plateau) [267]. Weiterhin ist das lineare Elastizitätsmodul nur schwach abhängig von der Filamin A Konzentration, während die Konzentration steifer Crosslinker das lineare Elastizitätsmodul um mehrere Größenordnungen erhöhen kann [247, 267]. Durch eine Erhöhung der Crosslinkergröße, durch Verwendung verschiedener Filamin A Isoformen, konnte das Elastizitätsmodul reduziert werden und die Abhängigkeit von der Messfrequenz weiter erhöht werden [50]. Auch die Filamin A Netzwerke zeigen eine starke Erhöhung des Elastizitätsmoduls (zwei Größenordnungen, bis zu $E = 1000Pa$) unter steigender Spannung [247]. Filamin A führt auch zu einer stark erhöhten kritischen Deformation, bei der es zum Zusammenbruch des Netzwerkes kommt [47]. Während der Zusammenbruch bei F-Aktinnetzwerken mit steifen Crosslinkern bei Deformationen von $\gamma \approx 0.3$ geschieht, findet dieser in F-Aktinnetzwerken mit Filamin A erst bei $\gamma \approx 1$ statt [47]. Die Ursache für den Netzwerkkollaps ist noch nicht abschließend geklärt, aber es könnten sowohl das Reißen einzelner Aktinfilamente oder der Abriss der Crosslinkerbindungen ursächlich sein [47].

1.1.4.4 Aktinnetzwerke mit dem aktiven Crosslinker Myosin

Innerhalb einer F-Aktinschmelze mit hoher Myosinaktivität bleibt das Netzwerk isotrop, aber es kommt zu myosininduzierten Aktinverschiebungen, die die mechanische Relaxation beschleunigen und das Netzwerk verflüssigen [268]. Mit sinkender Motoraktivität fungieren die inaktiven Myosinmotoren als Crosslinker und die F-Aktinfilamente kondensieren und formen sternenförmige Strukturen [269]. Bei einer vollständigen Inaktivität der Motoren sind die gebildeten Strukturen stabil und das Elastizitätsmodul des Netzwerkes ist ca 100x höher als bei reinen F-Aktingelen [270]. Der Grad des Anstieges des Elastizitätsmoduls ist dabei abhängig von der Konzentration der Myosinmotoren, was darauf hinweist, dass die nicht-lineare Erhöhung des Elastizitätsmoduls durch Motorproteine ähnlichen Mechanismen folgt wie die durch eine externe Spannung [271]. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Systemen formt Aktin zusammen mit Myosin in hoher Konzentration stabile, kontraktile Fasern, die eine Kraft von bis zu $F \approx 0.5nN$ generieren können [91].

In Aktingelen mit dem passiven Crosslinker Filamin A und dem aktiven Myosin führen diese zu einer Erhöhung des Elastizitätsmodulus des Netzwerkes um den Faktor 100 und einer Reduktion des Verlustmoduls [272]. Dieser Effekt ist jedoch erst ab einer kritischen Myosin- und Filamin A Konzentration sichtbar und die Größe des Effektes ist lediglich durch die Myosinaktivität determiniert [272]. Eine Erhöhung der Myosinkonzentration

erhöhte das lineare Elastizitätsmodul, wobei alle Aktin-Filamin A-Myosin-Netzwerke, unabhängig von der Myosinkonzentration, asymptotisch das Gleiche nicht-lineare Elastizitätsmodul erreichen und das Netzwerk bei gleicher Deformation kollabiert [272]. Der Kollaps des Netzwerkes wird hierbei durch die Dissoziation von Filamin A hervorgerufen und skalierte linear mit der Filamin A Konzentration [272]. Da Myosin zu einer Kontraktion des Netzwerkes führt, reduziert es den Bereich der Deformation in dem ein linear elastisches Verhalten beobachtet wird und die beobachtete nicht-lineare Erhöhung des Elastizitätsmoduls ist identisch zum Effekt einer extern wirkenden Kraft [272].

Da die künstlich generierten Aktinnetzwerke keinerlei bevorzugte Ausrichtung besitzen, Myosin aber kontraktile Strukturen erzeugen kann, muss es zu einer Umorientierung des Netzwerkes durch Myosin kommen. In Simulationen zeigte sich, dass kontraktile Konfigurationen von Aktin-Myosin-Verbindungen favorisiert werden, ohne die Notwendigkeit der Ausrichtung der einzelnen Filamente und Abknicken einzelner Fasern (eulersches Knicken), da die kontraktile Konfiguration energetisch günstiger ist [273].

1.1.4.5 Mikrotubuli und Mikrotubulinetzwerke

Mikrotubuli sind hinsichtlich ihres Widerstands gegen Verbiegung die steifsten der drei Klassen von Zytoskelettfilamenten, mit einer Persistenzlänge von $l_P \approx 1 - 6 \text{ mm}$, besitzen jedoch kein signifikant erhöhtes Young Modul ($E \approx 10^9 \text{ Pa}$) (zusammengefasst in: [274]). In künstlichen Mikrotubulinetzwerken ist die Maschenweite deutlich kleiner als die Persistenzlänge der Filamente, weshalb thermische Fluktuationen vernachlässigbar sind [47]. Reine Mikrotubuligele sind im linear-elastischen Regime dominiert durch ihre elastischen Eigenschaften und ihr Verlustmodul ist deutlich kleiner als das Elastizitätsmodul, wobei das Elastizitätsmodul mit der Mikrotubulikonzentration steigt [251]. Diese Netzwerke zeigen auch nur eine geringe Frequenzabhängigkeit des Elastizitäts- und Verlustmoduls [251]. Mikrotubulinetzwerke mit steifen, nicht-transienten, passiven Crosslinkern zeigten eine Erhöhung des Elastizitätsmoduls in Abhängigkeit von der Crosslinkerkonzentration, wobei ein oberes Limit erreicht wird, wenn der Abstand der Crosslinker etwa so groß ist wie die Maschenweite [251]. Sowohl reine Mikrotubuligele, als auch solche mit Crosslinkern, zeigen ein linear elastisches Verhalten bis zu einer Deformation von 10%, mit einer Verringerung des Elastizitätsmoduls für höhere Deformationen [251].

1.1.4.6 Intermediärfilamente und Intermediärfilamentnetzwerke

Im Gegensatz zu den anderen beiden Filamenttypen sind Intermediärfilamente flexible Polymere, mit einer Persistenzlänge von $l_P \approx 1 \mu\text{m}$ [226], einem Young Modul von $E \approx 0.9 \cdot 10^9 \text{ Pa}$, aber einem Schermodul von nur $E_s \approx 2 \cdot 10^6 \text{ Pa}$ [275]. Das geringe Schermodul impliziert, dass Teile der Intermediärfilamente leicht aneinander entlang gleiten können. Weiterhin widerstehen Intermediärfilamente großen Streckungen, die ein mehrfaches der Eigenlänge des Filaments betragen können [225], wobei sich der Filamentdurchmesser von $d \approx 12 \text{ nm}$ auf bis zu $d \approx 4 \text{ nm}$ reduziert [225, 276]. Ein Mechanismus, der die Verfestigung und die Reduktion des Durchmessers von Intermediärfilamenten

teilweise erklären kann, basiert auf der Struktur der Intermediärfilamente. Während der Streckung kommt es zu einer Elongation bzw zum Abriss der Bindungen zwischen den Windungen der α -Helix, was zur Reduktion des Filamentdurchmessers und einer steigenden Elastizität führt [277–279]. Ein weiterer Aspekt, der die erhöhte Elastizität des Filaments unter Belastung beeinflusst, ist die geringe Persistenzlänge und die damit verbundene Fluktuation des Filamentes. Wie bei einzelnen Aktinfilamenten muss dementsprechend eine äußere Kraft gegen die entropisch verursachte Krümmung des Filamentes wirken, was zu einer starken Nichtlinearität und Verfestigung führt [257–259]. Experimente mit Intermediärfilamentnetzwerken konnten zeigen, dass die Netzwerke ein mit wachsender Konzentration steigendes Elastizitätsmodul aufweisen und unter großen Spannungen einen nicht-linearen Anstieg des Elastizitätsmoduls zeigen und hohen Deformationen standhalten [280]. Die Verhärtung des Netzwerkes und seine hohe Deformierbarkeit sind dabei vermutlich ein Resultat der Einzelfilamenteigenschaften [280]. Insgesamt haben Intermediärfilamentnetzwerke ein geringeres Elastizitätsmodul, eine höhere Deformierbarkeit und eine stärkere Erhöhung des Elastizitätsmoduls unter großen Spannungen, als reine Aktin- oder Mikrotubulinnetzwerke [227, 251]. Nach Zugabe divalenter Ionen, wie zum Beispiel Mg^{2+} , verhalten sich Intermediärfilamentnetzwerke wie Netzwerke aus semiflexiblen Polymeren mit Crosslinkern in geringen Konzentrationen [281] und zeigen eine höhere Belastbarkeit bevor das Netzwerk kollabiert [281]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die zugegebenen Ionen als stabile Crosslinker innerhalb des Netzwerkes fungieren [281, 282].

1.2 Adhäsion von Zellen

Ein Parameter, der maßgeblich an der Zellmotilität und der Zytoskelettorganisation beteiligt ist, ist die Adhäsion. Dabei unterscheidet man die Zell-Zelladhäsion, die einzelne Zellen aneinander bindet und die Zell-Matrixadhäsion, welche Zellen mit der extrazellulären Matrix koppelt. Beide Typen der Adhäsion sind jedoch maßgeblich für die Bewegung einer Zelle, da diese sich über Ausstülpungen, die am Substrat haften müssen, fortbewegen. Gleichzeitig muss jedoch auch die der Bewegungsrichtung abgewandte Seite von ihrem Substrat gelöst werden, um Bewegung zu ermöglichen. Neben den Bewegungsaspekten stabilisieren Adhäsionsverbindungen auch Zellverbände oder sogar ganze Gewebe.

Die Adhäsion wird dabei vermittelt über die Bindung zweier Moleküle. Diese Bindung hält externen Kräften nur effektiv stand, wenn die Wirkungszeit der Kraft kleiner ist als die Dissoziationsrate der Bindung [283], wobei die externe Kraft jedoch auch die Dissoziationsrate beeinflussen kann [283, 284]. Dabei unterscheidet man drei verschiedene Bindungstypen: die ideale Bindung, sogenannte Slip- und Catch-Bindungen [284]. Ideale Bindungen zeichnen sich dadurch aus, dass die Dissoziationsrate unabhängig ist von der applizierten Kraft, während die Bindungszeit von Slip-Bindungen exponentiell mit der wirkenden Kraft fällt [284]. Bei Catch-Bindungen dagegen steigt die Bindungszeit ab einer bestimmten Kraft an. Kombinationen dieser Bindungstypen sind ebenfalls möglich und konnten, für von Zellen geformte Bindungen, beobachtet werden [283].

Die Molekülklasse, die am stärksten mit der Zell-Matrixadhäsion assoziiert ist, sind die Integrine, die sogenannte fokale Adhäsionen formen. Integrine sind eine Molekülgruppe, die aus einer α - und β -Untereinheit bestehen, von denen mindestens 18 α - und 8 β -Untereinheiten im Menschen bekannt sind, die mindestens 24 unterschiedliche Heterodimere formen können, welche Proteine der extrazellulären Matrix und andere Adhäsionsrezeptoren spezifisch binden können [285]. Für die effektive Adhäsion einer Zelle sind jedoch mehr als einzelne Adhäsionsbindungen notwendig. Im Falle der Integrine bilden sich, im Allgemeinen im Lamellipodium, direkt hinter der Zellmembran, zuerst naszierende fokale Adhäsionen, die entweder sehr schnell dissoziieren ($\approx 60s$) oder weiter, zu punktförmigen Adhäsionen, anwachsen [286]. Adhäsionen bilden sich anfangs unabhängig von Myosin, sind jedoch abhängig vom Arp2/3 Komplex und der Wachstumsgeschwindigkeit des Lamellipodiums und enthalten unter anderem Integrine, Talin, Vinculin, α -Aktinin und fokale Adhäsionskinase (FAK) [151, 152, 287].

Wenn Integrine binden, dann generieren sie nicht nur eine mechanische Verbindung, sondern übertragen auch Signale, die unter anderem die Organisation des Zytoskelettes und die Aktinpolymerisation beeinflussen können [288]. Im Gegenzug beeinflussen Zytoskelettstrukturen die Formation von Integrinbindungen [288]. Durch diese bidirektionale Wechselwirkung kann die Adhäsion, die Antwort auf mechanische Stimuli und Organisation des Zytoskelettes reguliert werden, was zu gerichteter, kontinuierlicher Bewegung einer Zelle führen kann [287]. Durch die Bindung der extrazellulären Komponente der Integrine an einen Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung, die im intrazellulären Bereich Bindungsstellen freilegt, die Integrine mit dem Aktinzytoskelett koppeln können [285, 289, 290]. Diese Kopplung erfolgt über eine Vielzahl von Proteinen, wie zum Beispiel Talin, welches an Aktin und Vinculin binden kann, Vinculin, das ebenfalls direkt an Aktin bindet und α -Aktinin, einem Aktincrosslinker [291–293] (Abb. 1.3 A). Neben diesen Proteinen rekrutieren Integrine indirekt ebenfalls FAK, welche wiederum assoziiert ist mit den kleinen Rho GTPasen, die die Zytoarchitektur regulieren [294]. Durch die so induzierten Signale kann die Bildung fokaler Adhäsionen direkt die Organisation des Zytoskelettes und weitere Signalkaskaden beeinflussen (siehe Kapitel 1.1.1).

Eine besonders bedeutende Klasse von Zell-Zell-Adhäsionsmolekülen sind die calciumabhängigen Cadherine, die, im Gegensatz zu Integrinen, hauptsächlich homophile Bindungen eingehen, also an andere Cadherine des gleichen Typs binden. Cadherine sind, ähnlich wie Integrine, ebenfalls mit dem Aktinzytoskelett assoziiert [295]. Um die Kopplung an das Aktinzytoskelett zu generieren bindet β -Catenin an die intrazelluläre Seite der Cadherine und an α -Catenin, welches direkt an Aktin binden kann [295–299] (Abb. 1.3 B). Die Bindung von Cadherinen kann, neben der reinen Verankerung, ebenfalls Signalkaskaden auslösen, die in einer Reorganisation des Aktinzytoskelettes münden [299, 300]. Bei der Bindung von Cadherinen wird Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphat (PIP3) akkumuliert, welches Rac1 lokal aktiviert [301, 302]. Ebenfalls bindet p120-catenin an Cadherine, welches zu einer lokalen Reduktion der RhoA Aktivität führt [303]. Auch hier hat also der Bindungszustand der Adhäsionsmoleküle, durch die Regulation kleiner Rho GTPasen, einen großen Einfluss auf die Organisation des Zytoskelettes (siehe Kapitel 1.1.1). Der Effekt dieser Aktivierung auf Zellmotilität oder Invasivität

bei Tumoren hängt jedoch von der Art des Cadherins und vom Zelltyp ab [304–308]. Während zum Beispiel eine inverse Korrelation für die E-Cadherin Menge in Tumoren und die Überlebensrate gefunden werden konnte [305, 306], erhöhte N-Cadherin die Aggressivität von Tumoren [307, 308].

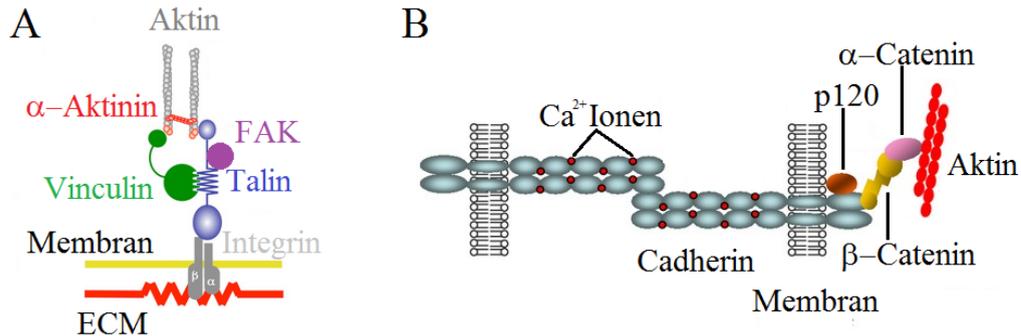


ABB. 1.3: Schematische Darstellung der Bindungskomplexe von Integrinen und Cadherinen. A) zeigt eine schematische, vereinfachte Abbildung des interzellulären Integrinkomplexes. Integrine können direkt von Talin gebunden werden, welches an Vinculin und Aktin binden kann, sowie Vinculin das direkt an Aktin binden kann. Die fokale Adhäsionskinase (FAK) wird ebenfalls in den Integrinkomplex rekrutiert. Die Abbildung ist modifiziert nach <http://www.i2bc.paris-saclay.fr/IMG/jpg/figure3-1.jpg>, abgerufen am 7.7.2017. B) stellt eine homophile Cadherinverbindung, so wie den intrazellulären Cadherinkomplex dar. Cadherine binden dabei direkt an das Catenin p120, sowie an β -Catenin, welches an α -Catenin binden kann. α -Catenin wiederum ist in der Lage Aktin direkt zu binden. Die Abbildung ist modifiziert nach [309].

1.3 Zytoskelettale Veränderungen bei Tumorerkrankungen

Bösartige Geschwülste (maligne Tumore) unterscheiden sich von gutartigen (benignen Tumoren) durch drei Eigenschaften: Infiltration, Destruktion und Metastasenbildung [310, 311]. Dies bedeutet, dass maligne Tumore über Gewebsgrenzen hinweg in andere Gewebe hineinwachsen (Infiltration), umgebendes Gewebe zerstören können (Destruktion) und gezielt weitere Gewebe, durch Lymph- oder Blutgefäße, kolonisieren können (Metastasierung). Maligne Tumore haben sich innerhalb Deutschlands zu einer der häufigsten Krankheiten mit Todesfolge entwickelt [312]. Weltweit betrachtet haben Krebserkrankungen zusammen im Jahr 2008 ca 7,6 Millionen Todesopfer gefordert, während im gleichen Zeitraum ca 12,7 Millionen neue Tumordiagnosen gestellt wurden [313]. Somit zählen Tumorerkrankungen weltweit zu einer der häufigsten Krankheiten mit Todesfolge.

Während der Transformation einer gesunden zu einer malignen Zelle ändert sich unter anderem auch die Zytoarchitektur der Zelle [314–318]. Dies kann die Reduktion der Menge an filamentösen Aktin sein [316, 317], ein Verlust von aktinbindenden Proteinen [315], eine Reorganisation des Zytoskelettes [317], mit einhergehender Veränderung

des Adhäsionsverhaltens zur extrazellulären Matrix [317, 318], etc. Da das Zytoskelett maßgeblich die mechanischen Eigenschaften definiert, konnten bei Tumorzellen, verglichen mit ihren Ursprungszellen, verschiedene mechanische Eigenschaften beobachtet werden [319–333]. Bei diesen Untersuchungen konnte ein deformierbarer Phänotyp für einzelne Zellen von Mammakarzinomen [319, 321, 325, 327], Lungenkarzinomen [321], Zervixkarzinomen [324], Prostatakarzinomen [325, 332], Melanomen [326, 328], oralen Plattenepithelkarzinomen [329] und Chondrosarkomen [331] gefunden werden. Welche Zytoskelettbestandteile zu den gemessenen elastischen Eigenschaften beitragen ist dabei jedoch abhängig von der Größe und Frequenz der applizierten Kraft. Bei kleinen Kräften scheint die Antwort hauptsächlich über Aktinstrukturen vermittelt zu sein [319, 327, 331], während bei hohen Deformationen Intermediärfilamente eine zunehmende Rolle spielen [220, 280, 320]. Sowohl das aktindominierte mechanische Verhalten bei kleinen Deformationen, als auch die Dominanz der Intermediärfilamente bei hohen Deformationen ist qualitativ im Einklang mit den Eigenschaften der einzelnen Filamente, da Aktinnetzwerke bei geringen Deformationen ein deutlich höheres Elastizitätsmodul besitzen und bei Deformationen von $\approx 20\%$ reißen, während Intermediärfilamente eine stark ausgeprägte Versteifung bei Deformation zeigen und um ein vielfaches ihrer Eigenlänge elongiert werden können (siehe Kapitel 1.1.4). Mikrotubuli scheinen für die Zellelastizität nur eine geringe Rolle zu spielen [326, 334], werden aber mit einem Widerstand gegen großflächige Kompression in physiologischen Prozessen assoziiert, da sie lateral durch die anderen Zytoskelettelemente verstärkt werden [334].

Eine Assoziation von Intermediärfilamenten mit bestimmten Tumorerkrankungen konnte ebenfalls bereits beobachtet werden. So konnten Veränderungen der Intermediärfilamentorganisation in Glioblastomen [335], aber auch eine atypische Vimentinexpression in von Epithelzellen abgeleiteten Tumoren, wie Mammakarzinomen, Prostatakarzinomen und weiteren, festgestellt werden [336–340]. Daneben konnte die Vimentinexpression auch zur Bestimmung des Tumorstadiums genutzt werden [341–344].

1.4 Glioblastoma Multiforme

Eine Tumorform, welche besonders schwer zu therapieren ist, ist das von der Weltgesundheitsorganisation als Grad IV eingestufte Glioblastoma multiforme (GBM). Es tritt im statistischen Mittel bei etwa 3.2 von 100000 Menschen auf [345] und die mittlere Überlebenszeit liegt bei 6-15 Monaten nach der erstmaligen Diagnose [346, 347]. GBM entstehen aus Gliazellen, entweder als primäre Tumore de novo oder als sekundäres GBM aus Gliomen niedrigeren Grades [348]. Die so entstehenden Tumore besitzen eine hohe zelluläre Heterogenität [349], sowie eine hohe Invasivität und Proliferationsrate [347], wodurch er schnell das Gehirn infiltrieren kann, wobei es zum abwechselnden Auftreten proliferierender und nekrotischer Segmente kommt [350]. Parallel zur Infiltration schütten GBM angiogenetische Faktoren aus, die zur Bildung von Blutgefäßen für die Versorgung des Tumorgewebes führen können [350]. Die Standardtherapie von GBM umfasst im Allgemeinen eine maximale Resektion, sowie eine anschließende, kombinierte Chemo- und Radiotherapie [347]. Diese Kombinationstherapie ist häufig jedoch nicht

ausreichend, was an der geringen, mittleren Überlebenszeit deutlich wird [346, 347]. Die geringe Überlebenszeit wird unter anderem verursacht durch die Ausbildung von Resistenzmechanismen gegenüber den verwendeten Chemotherapeutika [347] und durch Gliomstammzellen, die zur Resistenz gegenüber der Radiotherapie beitragen und das Wiederauftreten von Gliomen begünstigen [347, 351]. Daraus erschließt sich auch direkt die Notwendigkeit für die Entwicklung verbesserter Therapieoptionen für GBM.

Neben der intratumoralen Heterogenität zeichnen sich GBM auch durch eine hohe intertumorale Variabilität aus. So wurden anhand von 1740 mutierten Genen 4 Typen von GBM unterschieden: pro-neurale, mesenchymale, proliferative und klassische GBM [352]. Diese unterscheiden sich unter anderem auf Basis somatischer Mutationen von TP53, Isocitrat-Dehydrogenase 1 und 2, Kopiezahlvariationen von Chromosomen, verstärkter Expression oder Mutation des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor) [352–357]. Diese Heterogenität spiegelt sich auch auf Ebene der Zelllinien wider. So konnte gezeigt werden, dass die, auch in dieser Arbeit verwendeten, Glioblastomzelllinien LN229, U87MG, U138MG und U251MG eine unterschiedliche Expression des Proteins TP53, sowie der, mit Degradation der extrazellulären Matrix assoziierten Proteine, Matrix-Metalloproteasen 2 und 9, verschiedener pro- und anti-apoptotischer Proteine und mit Zelladhäsion assoziierte Integrinexpression aufzeigen [358, 359]. Daneben unterscheiden sich die Zelllinien, auf zellulärer Ebene, hinsichtlich Invasivität und Migrationsfähigkeit [358].

1.5 Einfluss der Bestrahlung auf Zytoskelett und Adhäsion von Glioblastomzellen

Die Bestrahlung gehört, neben der Chemotherapie, zur Standardtherapie bei GBM. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass eine Bestrahlung von Glioblastomzellen zu einer Deregulation von Genen führt, die mit der Organisation des Zytoskelettes, der Adhäsion der Zelle zur extrazellulären Matrix und der Zell-Zell Adhäsion in Zusammenhang gebracht wurden [360–363]. Dabei wurde zum Teil die Expression von mehreren hundert entsprechenden Genen differentiell reguliert [362]. Unter diesen Genen befanden sich diverse Gene die Proteine kodieren, die für die Aktin- oder Mikrotubuliformation mitverantwortlich sind, wie zum Beispiel ACTB (kodiert β -Aktin), ARPC5 (kodiert eine Untereinheit des Arp 2/3-Komplexes) oder MAP1 (kodiert ein Protein, das zur Familie der Mikrotubuli assoziierten Proteine gehört). Ebenfalls wurden mit Intermediärfilamenten assoziierte Gene wie VIM (kodiert Vimentin) nach der Bestrahlung unterschiedlich reguliert [362, 363]. Weiterhin wurde das Zell-Matrix adhäsionsassoziierte Gen FN1 (kodiert Fibronectin), sowie das Zell-Matrix und Zell-Zell adhäsionsassoziierte Gen VCL, welches Vinculin kodiert, nach der Bestrahlung unterschiedlich reguliert [363]. In einer der Studien wurde ebenfalls die Proteinexpression der beiden Zytoskelettkomponenten β -Aktin und α -Tubulin, sowie der Rho GTPase RhoA, den Adhäsionsmolekülen Integrin α -4 und E-Cadherin untersucht, wobei jedoch keine signifikanten Effekte festgestellt werden konnten [362]. Im Gegensatz dazu konnte eine andere Studie feststellen,

dass die beiden Adhäsionsmoleküle β -1 und β -3 Integrin nach Bestrahlung höher exprimiert werden [364]. Direkte Messungen bezüglich der Änderungen biomechanischer und adhäsiver Eigenschaften von Glioblastomzellen nach der Bestrahlung wurden bisher jedoch nicht durchgeführt.

1.6 Endocannabinoide und Gliome

1.6.1 Das Endocannabinoidsystem und Cannabinoidrezeptoren

Aufgrund der schlechten Prognose vieler Glioblastompatienten [346, 347] besteht ein dringender Bedarf an alternativen Behandlungsmethoden. Das Endocannabinoidsystem (ECS) könnte ein möglicher Ansatzpunkt für eine ergänzende Medikation darstellen, da eine anti-tumorale Wirkung von Cannabinoiden in einer Vielzahl von Tumoren *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden konnte [365–375]. Das ECS ist ein intrinsisches System, das aus den zwei Cannabinoidrezeptoren 1 und 2 (CB1 und CB2), deren Liganden, sowie auf- und abbauenden Enzymen besteht. Das ECS ist unter anderem an diversen Prozessen im zentralen Nervensystem beteiligt, zu denen die Modulation der Plastizität, die Gedächtnisbildung, Lernprozesse, sowie das Schmerz- und Appetitempfinden zählen. Eine regulatorische Rolle hat das ECS im kompletten Metabolismus und innerhalb des Immunsystems [376].

Die beiden am besten charakterisierten Cannabinoidrezeptoren sind CB1 und CB2, die zur Klasse der G-Protein gekoppelten Membranrezeptoren gehören und eine zu 48% homologe Aminosäuresequenz besitzen [377]. CB1 befindet sich im Gehirn besonders häufig in Gebieten, welche mit der Motorik (Basalganglien, Cerebellum), dem Gedächtnis (Cortex, Hippocampus), Appetit (Hypothalamus), Emotionen (Amygdala) und Sinneswahrnehmung (Thalamus) assoziiert sind, aber auch in Augen, Milz und Hoden [378]. CB2 scheint dahingegen hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems (B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen) vorzukommen [378]. Jedoch konnte CB2 auch schon bei Neuronen, sowie in Astrozytomen und Glioblastomen nachgewiesen werden [379–381].

1.6.2 Wirkung von Cannabinoiden auf das Zytoskelett und Gliome

Die Existenz von Cannabinoidrezeptoren in Gliomen konnte bereits nachgewiesen werden [380, 381], wobei jedoch unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Expression vorliegen: De Jesus et al zeigten, dass CB1 niedriger und CB2 höher exprimiert ist [381], wohingegen Wu et al beobachteten, dass sowohl CB1 als auch CB2 in hochgradigen Gliomen höher exprimiert sind als in gesundem Gewebe [380]. Beide Arbeitsgruppen gehen entsprechend von einer positiven Korrelation der CB2 Expression und der Malignität aus [380, 381].

Neben diesen Befunden wurden auch Effekte untersucht, die, in Folge der (De-) Aktivierung der Cannabinoidrezeptoren, beobachtet werden konnten. Dabei konnte eine Vielzahl anti-tumoraler Effekte in Gliomen entdeckt werden. So wurde gezeigt, dass

Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) Apoptose induzieren kann [382]. Über die Akkumulation von Ceramid wurden die Stressproteine p8 und TRB3 (Tribbles Homolog 3) hochreguliert. TRB3 reduzierte anschließend die Bindung von Akt und mTOR (Mammalian Target of Rapamycin Complex 1), was zu Apoptose und Autophagie führte [382]. Ebenfalls konnte ein Zellzyklusarrest in der G1 Phase, nach Cannabinoidgabe, beobachtet werden, wobei veränderte Mengen der Zellzyklusproteine Cyklin A, E2F1 und p16 gemessen wurden [383]. Darüber hinaus wurden reduzierte Mengen VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und Ang1 (Angiopeptin-1) beobachtet, was mit einer Reduktion der Angiogenese (Gefäßneubildung) verknüpft ist [384]. Cannabinoide konnten ebenfalls die Differenzierung von Gliomstammzellen fördern und deren Fähigkeit zur Bildung neuer Tumore inhibieren [385]. Eine klinische Studie an terminalen Glioblastompatienten konnte in einem Teil der Patienten einen anti-proliferativen und proapoptotischen Effekt von THC nachweisen, aber den molekularen Mechanismus nicht aufklären [386].

Neben diesen Effekten auf Angiogenese, Zellzyklus und Apoptose konnten auch Cannabinoideffekte auf invasions- und migrationsassoziierte Signalkaskaden nachgewiesen werden. In Gliomzellen führte THC zu einer reduzierten Invasion, durch eine Verminderung der Matrix-Metalloprotease-2 (MMP2) Expression [387]. MMP2 ist ein proteolytisches Enzym, welches am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt ist. Ein weiteres Derivat der Cannabispflanze, Canabidiol, inhibierte die Migration von Glioblastomzellen, jedoch in einer cannabinoidrezeptorunabhängigen Weise [388]. Eine weitere Studie assoziierte den invasionshemmenden Effekt von Canabidiol mit einer reduzierten Phosphorylierung von p44/42 MAPK [389]. Diese Aspekte machen das ECS zu einem therapeutischen Ansatz für Tumorerkrankungen.

In Neuronen konnte bereits eine Interaktion von CB1 mit dem ersten Mitglied der Wiskott-Aldrich-Syndrom Proteinfamilie (WAVE1)/Scar Komplex aufgezeigt werden [390]. Mitglieder der WAVE Proteinfamilie aktivieren den ARP2/3 Komplex, welcher die Generation von dendritischen F-Aktinnetzwerken reguliert [390]. Weitere Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung des CB1 Rezeptors zelltypabhängig sowohl zu einer reduzierten als auch erhöhten Phosphorylierung von FAK führen kann [375, 391, 392]. Neben diesen Interaktionen konnte eine reduzierte Expression von Aktin und Tubulin nach der Applikation eines CB2 Antagonisten bzw THC beobachtet werden [393–395]. Weitere Studien konnten noch einen Effekt von THC auf die Aktinzytoskelettorganisation nachweisen [396, 397], jedoch konnte in diesen Studien kein molekularer Mechanismus ausfindig gemacht werden. In allen hier zitierten Studien wurden keine quantitativen Untersuchungen im Zusammenhang mit mechanischen oder adhäsiven Eigenschaften einzelner Zellen durchgeführt.

1.7 Isocitrat-Dehydrogenase 1 Mutation und metastasen-assoziiertes Kolonkarzinom Gen 1

Zwei weitere Einflussfaktoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind die Isocitrat-Dehydrogenase 1 Mutation R132H (IDH1-R132H) und das metastasen-assoziierte Kolonkarzinom Gen 1 (MACC1). Beide Marker wurden bereits in vorangegangenen klinischen Studien als prognostische Marker für Tumorerkrankungen identifiziert. Während Patienten mit einer IDH1-R132H Mutation eine bessere Prognose haben [398–400], wird eine erhöhte MACC1 Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert [401–403].

IDH1 ist ein Enzym, welches im Zitratzyklus eine bedeutende Rolle spielt und somit den Energiehaushalt einer Zelle reguliert. IDH1 Mutationen konnten laut Weltgesundheitsorganisation in einem großen Teil nieder-gradiger Gliome, sowie sekundärer, seltener jedoch in primären, GBM nachgewiesen werden [398–400]. Die IDH1 Mutation IDH1-R132H ist eine Punktmutation im IDH1-Gen, bei der am Codon 132 eine Substitution von Histidin durch Arginin erfolgte. Nicht mutiertes IDH1 katalysiert die Reaktion von Isocitrat zu α -Ketoglutarat mit Hilfe von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH+), wobei unter anderem NADPH (reduzierte Form von NADP) entsteht [404, 405]. Mutiertes IDH1 hat eine geringere enzymatische Aktivität gegenüber Isocitrat, dennoch gewinnt das mutierte Enzym die Fähigkeit, die Reaktion von α -Ketoglutarat zu D-2-Hydroxyglutarat zu katalysieren. Diese Reaktion führt zu einer D-2-Hydroxyglutarat Akkumulation und einer Reduktion des α -Ketoglutarat und NADPH Levels [406–409]. Neben dieser veränderten Funktionalität führt eine IDH1 Mutation auch zu veränderter Methylierung einer Vielzahl von Genen, unter anderem durch Inhibierung der Demethylierung [410–412]. Zu diesen Genen gehören auch Gene die mit Zytoskelettkomponenten, wie zum Beispiel Vimentin, assoziiert sind [411].

Die IDH1-R132H Mutation ist im Allgemeinen mit einer besseren klinischen Prognose bei Gliompatienten assoziiert [398–400]. Dieses Ergebnis wird einerseits durch eine geringere Resistenz gegenüber gängigen Therapieformen [413], sowie andererseits durch eine verringerte Aggressivität verursacht [413–415].

MACC1 ist ein Gen, das 2009 erstmalig im Zusammenhang mit Kolonkarzinomen beschrieben wurde [416]. Im Allgemeinen wird eine erhöhte Expression von MACC1 - bei verschiedensten malignen Tumorerkrankungen - mit einer erhöhten Aggressivität, Proliferations- und Migrationsfähigkeit in Verbindung gebracht [417–421]. Weiterhin stellt MACC1 einen Regulator der c-Met-HGF (Hepatozytenwachstumsfaktor) Achse dar [422]. c-Met ist ein Protein, dessen einzig bekannter Ligand HGF ist. Eine erhöhte Aktivität der c-Met-HGF Achse führt in Tumoren zu verstärktem Tumorwachstum, einer erhöhten Angiogenese und Metastasierungsfähigkeit.

1.8 Tumorinvasion in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen

Um die etwaigen Änderungen der Zellelastizität, des Adhäsions- oder Migrationsverhaltens von Tumorzellen mit einem veränderten Invasionsprofil assoziieren zu können, wurde das Modell der organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC) verwendet. Der Hippocampus ist eine zentrale Schaltstation des limbischen Systems und ist stark verknüpft mit dem Kurzzeitgedächtnis und Lernprozessen. OHSC beinhalten den funktionell intakten Entorhinalen Cortex, das Prä- und Parasubikulum, das Subikulum, das Ammonshorn, die Hilusregion und den Gyrus dentatus (Abb. 1.4).

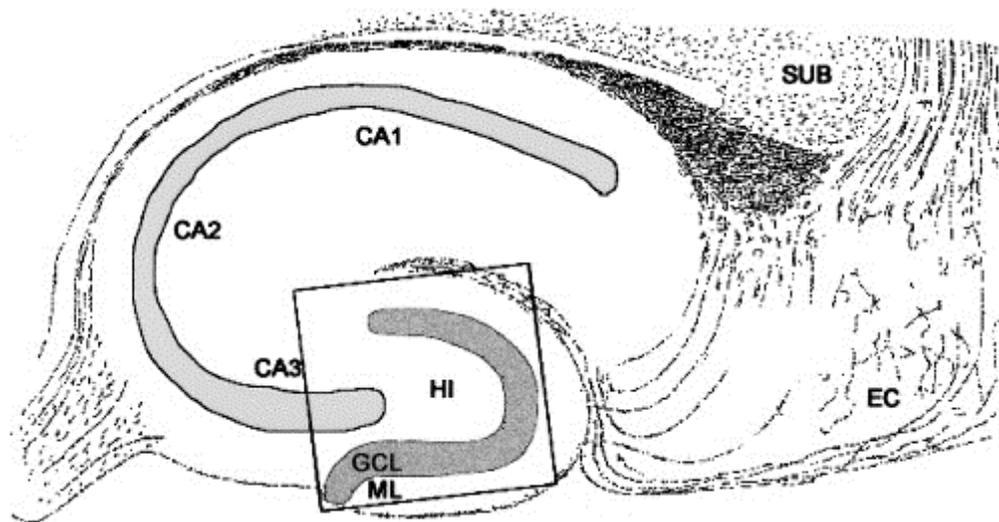


ABB. 1.4: Anatomische Struktur des Hippocampus der Maus. CA1-3 gehören zum Cornu Ammonis. Die Körnerzellschicht (GCL), die Lamina molecularis (ML) und der Hilus (HI) bilden den Gyrus Dentatus. SUB bezeichnet das Subikulum und EC den Entorhinalen Cortex. Die Abbildung entstammt der Publikation von Kohl et al [423].

Der Gyrus dentatus ist ein dreischichtiges System, zusammengesetzt aus der Lamina molecularis, der Lamina granularis und dem Hilus. Die apikalen Dendriten der Körnerzellen der Lamina granularis erreichen die Molekularschicht, wo sie synaptische Verbindungen mit den Afferenzen, insbesondere aus dem entorhinalen Kortex (Tractus perforans), eingehen. Entscheidend für das Modell der OHSC war die intakte Zytoarchitektur nach der Präparation, die eine gut erhaltene Körnerzellschicht im Gyrus dentatus, sowie der Pyramidenzellen im Cornu Ammonis ebenso aufwies, wie intakte Faserverbindungen zwischen den einzelnen Regionen. Somit bleiben synaptische Bahnen erhalten und vergleichbar zur *in vivo* Situation [424, 425].

Ko-Kulturexperimente zeigten, dass Gliomzellsphäroide in der Lage sind in OHSC zu invadieren und dabei ein infiltratives, diffuses Verhalten zeigten, wie es *in vivo* beobachtet werden kann [426]. Primäre Glioblastomzellsphäroide behielten ihren Stammzellcharakter und ihr Invasionspotential über mehrere Tage innerhalb eines Schnittkulturmodelles

[427]. Somit erlaubt das Modell der OHSC eine - verglichen mit Kollagen oder Gel-Modellen [428] - bessere Untersuchung des Metastasierungs- und Invasionsverhaltens von Tumorzellen, da es den physiologischen Bedingungen sehr viel näher kommt.

Die gute Erhaltung der (internen) Struktur der OHSC und die damit verbundene Nähe zum in vivo System machten sie ideal geeignet, um Untersuchungen zur Tumordinvasion durchzuführen. Die damit gegebene experimentelle Situation ist besonders geeignet, um Interaktionen zwischen Primärtumoren und neuronalem Gewebe, sowie die Neuentstehung von Rezidiven zu studieren.

1.9 Fragestellung und Zielsetzung

Malignome sind eine der häufigsten Krankheiten mit Todesfolge [312, 313] mit hohem Bedarf an verbesserter Diagnostik und Therapie. Eine potentielle, unterstützende Wirkstoffklasse sind die Cannabinoide. Bisherige Ergebnisse aus der Grundlagenforschung zeigten jedoch einen sehr heterogenen Einfluss. Für ein besseres Verständnis der Effekte ist es hilfreich, von der molekularen Betrachtungsebene auf eine zelluläre Ebene zu wechseln. Gleichzeitig ermöglicht die Untersuchung der Cannabinoide, unter Betrachtung der Parameter Elastizität, Adhäsion und Migrationseigenschaften der Tumorzellen, in einem geeigneten System, die Überprüfung der Hypothesen über den Einfluss dieser Größen auf das Tumordinvasionsverhalten. Da die in dieser Arbeit verwendeten organotypischen hippocampalen Schnittkulturen ein lebendiges, funktional erhaltenes Segment des Gehirns sind, bei dem nachweislich beide Cannabinoidrezeptoren vorhanden sind, ist eine Überprüfung dieser Hypothesen, in einem nahe an der physiologischen Situation befindlichen System, möglich.

Da sowohl für MACC1, als auch für IDH1-R132H bereits eine klinische Relevanz und eine starke Assoziation mit einer klinischen Prognose gegeben ist [398–403] und Cannabinoide nicht im Verdacht stehen mit MACC1 oder IDH1 zu interagieren, können diese verwendet werden, um gewonnene Erkenntnisse über den Effekt der Cannabinoide auf ihre Verallgemeinerbarkeit hin zu überprüfen.

Die in dieser Arbeit gestellten Fragen lauten folglich:

- 1) Verändern Cannabinoide, Bestrahlung, MACC1 und IDH1-R132H die elastischen und motilen Eigenschaften von Glioblastomzellen?
- 2) Beeinflussen Cannabinoide, Bestrahlung, MACC1 und IDH1-R132H das Invasionsvermögen von Glioblastomzellen in die Hirnsubstanz?
- 3) Gibt es einen Zusammenhang zwischen Motilität, mechanischen Eigenschaften und der Invasionsfähigkeit von Glioblastomzellen?

Kapitel 2

Methoden und Theorie

2.1 Lebendzellmikroskopie

Für die Lebendzellmikroskopieversuche wurden je 1000 Zellen in eine Vertiefung einer 6-Lochplatte überführt, für 24h adhären gelassen und anschließend vermessen. Für Aufnahmen lebender Zellen wurden diese bei $\theta = 37^\circ\text{C}$ und einem CO_2 Anteil von 5% in Zeitintervallen von $\Delta t = 5\text{min}$ beobachtet. Da die Bewegungsgeschwindigkeit der betrachteten Zellen gering ist, erlaubt dieses Zeitintervall die eindeutige Identifikation der beobachteten Zellen, über den gesamten Messzeitraum hinweg.

Bei der Beobachtung einzelner Zellen wurden die Geschwindigkeit, sowie die Fläche, Direktionalität, mittlere quadratische Abweichung, Persistenzzeit und Persistenzgeschwindigkeit einzelner Zellen gemessen.

2.2 Analyse von Lebendzellmikroskopieaufnahmen

Um die mittels Lebendzellmikroskopie gewonnen Bildsequenzen auszuwerten wurde ein Kantendetektionsalgorithmus, auf Basis des Sobel-Operators [429], angewendet. Da es sich bei dem Sobel-Operator um einen Gradientenfilter handelt, werden speziell die Kanten der Zellen hervorgehoben, da deren Intensität sich vom Hintergrund stark unterscheidet. Unerwünschte Objekte, wie zum Beispiel Zellreste oder Strukturen des Polystyrolsubstrates, wurden entfernt, indem nur solche Objekte betrachtet wurden, die eine zelltypabhängige Mindestgröße überschreiten. Hierdurch können die Kanten einer jeden Zelle in jedem Bild erhalten werden. Aus den Kanteninformationen konnten dann, durch deren diskrete Natur, die Fläche A der Zelle, als Summe aller von der Kante eingeschlossenen Pixel, ermittelt werden. Die Position der Zelle konnte durch ihren geometrischen Schwerpunkt x_s und y_s definiert werden:

$$\begin{aligned}
 x_{s,k,j} &= \frac{1}{6A} \sum_{i=1}^N (x_{i,k,j} + x_{i+1,k,j})(x_{i,k,j}y_{i+1,k,j} - x_{i+1,k,j}y_{i,k,j}) \\
 y_{s,k,j} &= \frac{1}{6A} \sum_{i=1}^N (y_{i,k,j} + y_{i+1,k,j})(x_{i,k,j}y_{i+1,k,j} - x_{i+1,k,j}y_{i,k,j})
 \end{aligned}
 \tag{2.1}$$

$x_{i,k,j}$ und $y_{i,k,j}$ sind dabei die i -te x - bzw y -Koordinate der N Randpunkte, des k -ten Objektes auf dem j -tem Bild der Bildreihe. Diese Berechnung wurde für jede Zelle und für jedes Bild der Bildserie durchgeführt. Eine eindeutige Zuordnung der Zellen, über verschiedene Zeitpunkte hinweg, wurde über eine Minimierung des Abstandes identifizierter Objekte in aufeinanderfolgenden Bildern vorgenommen. Ein Beispiel für eine erfolgte Detektion von U87 Zellen ist in Abb. 2.1 gezeigt. Der Quellcode für die beschriebenen Vorgänge befindet sich im digitalen Anhang.

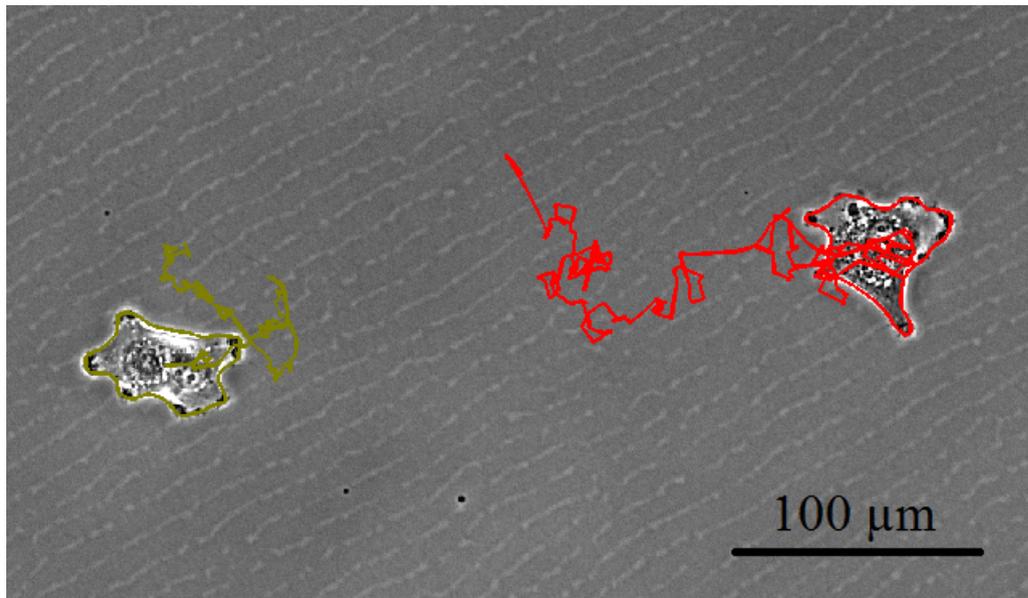


ABB. 2.1: Auf diesem Bild ist exemplarisch eine Kantendetektion mit Objektverfolgung am Beispiel zweier U87 Zellen gezeigt. Die rote bzw. dunkelgelbe, nicht geschlossene Linie zeigt dabei den Pfad der Zelle, während die geschlossenen Linien die detektierten Kanten darstellen. Der Maßstab entspricht $100\mu m$.

2.2.1 Analyse von Daten mit der Fürth Formel

Die motilen Eigenschaften einzelner Zellen, sowie deren Veränderungen durch externe Stimuli, wurden, unter anderem, mit Hilfe des Modells der persistenten Zufallsbewegung nach Fürth bestimmt [430]. Grundannahme für dieses Modell ist die Existenz einer persistenten Zufallsbewegung, das heißt, die Bewegung des betrachteten Objektes ist zufällig in der Art, dass das betrachtete Objekt im Zeitintervall Δt_2 sich wahrscheinlicher in diejenige Richtung bewegt in die es sich im direkt vorangegangenen Zeitintervall Δt_1 bereits bewegt hat. Diese Annahmen führen dann zur folgenden Gleichung:

$$\langle x^2 \rangle = \frac{2\nu^2}{\beta} (\beta t + e^{-\beta t} - 1) \quad (2.2)$$

β kann hierbei als inverse charakteristische Zeit der Bewegung interpretiert werden, also diejenige Zeit nach der die Bewegung unkorreliert mit sich selbst wird und ν bezeichnet die zugehörige charakteristische Geschwindigkeit (Persistenzgeschwindigkeit). $1/\beta$ entspricht damit der Persistenzzeit.

Die Analyse mit Hilfe der fürthschen Formel erfolgte für jede Zelle einzeln, über die Bestimmung der mittleren quadratischen Abweichung, für den Zeitmittelwert einer Trajektorie $\vec{R}(t)$, die definiert ist als:

$$\langle r^2(\tau) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T (\vec{R}(t - \tau) - \vec{R}(t))^2 dt \quad (2.3)$$

Da, aufgrund der diskreten Zeitaufösung, keine kontinuierliche Aufnahme möglich ist, wurden, im Abstand von $\Delta T = 5 \text{ min}$, N Bilder derselben Stelle aufgenommen, um so die Zellbewegung verfolgen zu können. Unter diesen Bedingungen musste Gleichung 2.3 diskretisiert werden zu:

$$\langle r^2(\tau) \rangle \approx \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (\vec{R}(n\Delta T - \tau) - \vec{R}(n\Delta T))^2 \quad (2.4)$$

Gleichung 2.4 ermöglichte aus den berechneten Zellmittelpunkten die mittlere quadratische Abweichung für jede Zelle zu ermitteln und mit Hilfe der Vorhersagen der Fürthformel (Gleichung 2.2) für $\langle r^2(t) \rangle$ konnten dann die Bewegungsparameter β und ν durch einen Fit bestimmt werden. Der Quellcode für die Analyse mit der fürthschen Formel befinden sich im digitalen Anhang.

2.3 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop (AFM) ist ein Messgerät, welches physisch direkt mit der Probe interagiert. Dementsprechend ist das Auflösungsvermögen limitiert durch die Kontaktfläche zwischen dem Messgerät und der Probe. Das wichtigste Messinstrument des AFMs ist der Cantilever, eine sehr feine elastische Blattfeder, die entweder flach sein kann oder mit einer feinen Spitze versehen ist. Der Cantilever selbst ist zur Stabilisierung an einen Chip befestigt, der wiederum an der AFM-Kontrolleinheit angebracht wird (Abb. 2.2). Wenn sich der Cantilever sehr nahe an der Oberfläche der Probe befindet kann er spontan, aufgrund der attraktiven van der Waals Kräfte, mit der Probe in Kontakt kommen ($d > 0.2 \text{ nm}$). Für noch kleinere Distanzen gibt es noch einen entgegengesetzten, repulsiven Effekt, die Pauli Abstoßung, die dann auftritt, wenn sich die Orbitale verschiedener Atome sehr nahe beieinander befinden und sich überlappen könnten ($d < 0.2 \text{ nm}$).

Durch den Kontakt des Cantilevers mit der Probe kommt es zu einer Verbiegung des Cantilevers, die sich mit Hilfe eines Lasers und einer 4-Quadrantenphotodiode messen lässt (Abb. 2.2). Dafür wird der Laser auf den Cantilever gerichtet und die Veränderung des Reflexionswinkels, also eine Biegung des Cantilevers, führt zu einer negativen bzw. positiven Spannung auf der 4-Quadrantenphotodiode.

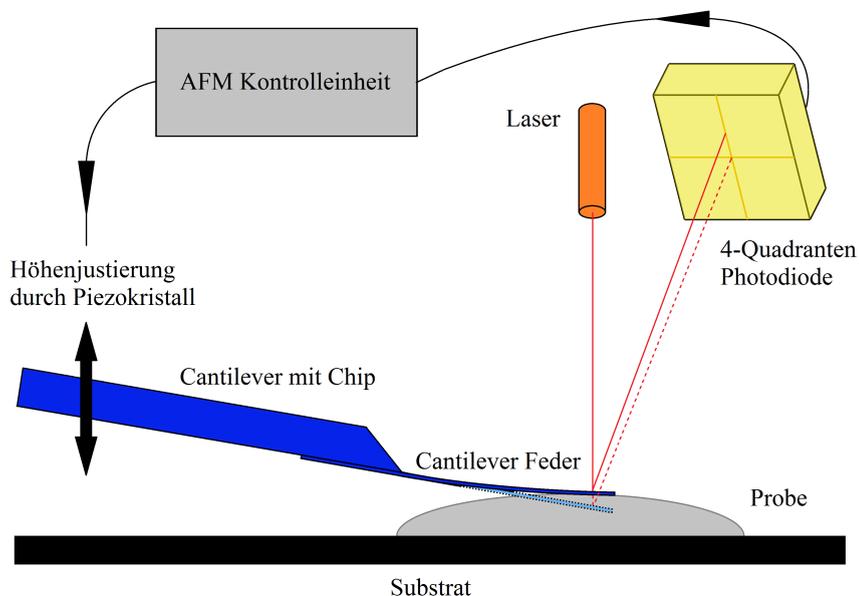


ABB. 2.2: Prinzipieller Aufbau eines AFMs. Das eigentliche Messinstrument des AFMs ist die Cantilever-Feder, hier dargestellt ohne Spitze. Wenn diese Feder in Kontakt kommt mit der zu vermessenden Probe, so verbiegt sie sich und diese Deformation kann mit Hilfe eines Lasers, der auf den Cantilever gerichtet ist, gemessen werden. Durch die Verbiegung des Cantilevers ändert sich der Reflektionswinkel des Lasers und auf einer 4-Quadranten Photodiode kann somit eine von Null verschiedene Spannung gemessen werden, aus der sich die Biegung des Cantilevers ermitteln lässt.

2.3.1 Messmodi und Kraft-Abstands-Kurven

Prinzipiell gibt es zwei mögliche Betriebsmodi für ein AFM, den bildgebenden, zur Messung hochauflösender Oberflächenbilder und den spektroskopischen Modus, zur Messung mechanischer Eigenschaften. Für die Messungen in dieser Arbeit wurde ausschließlich der Spektroskopiemodus eines Bioscope Catalyst (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) verwendet, um die mechanischen Eigenschaften von Einzelzellen mit Hilfe eines Spannungs-Dehnungsexperimentes zu bestimmen. Dabei wird die Eindringtiefe des Cantilevers gemessen, wenn auf eine Zelle eine vorher gewählte, definierte Kraft ausgeübt wird. Im Spektroskopiemodus wird der Cantilever mit festgelegter Geschwindigkeit, Kraft und Kontaktzeit nach Erreichen der Maximalkraft auf die Probe gepresst und wieder zurückgezogen. Dabei wird während der Messung die vertikale Ablenkung U_c , die von der Steuersoftware (Bruker Nanoscope v8.15r3) nach erfolgreicher Kalibrierung

automatisch in eine Kraft umgerechnet wird, sowie der Piezohöhe z_p aufgenommen, die zusammen die Kraft-Abstands-Kurve ergeben.

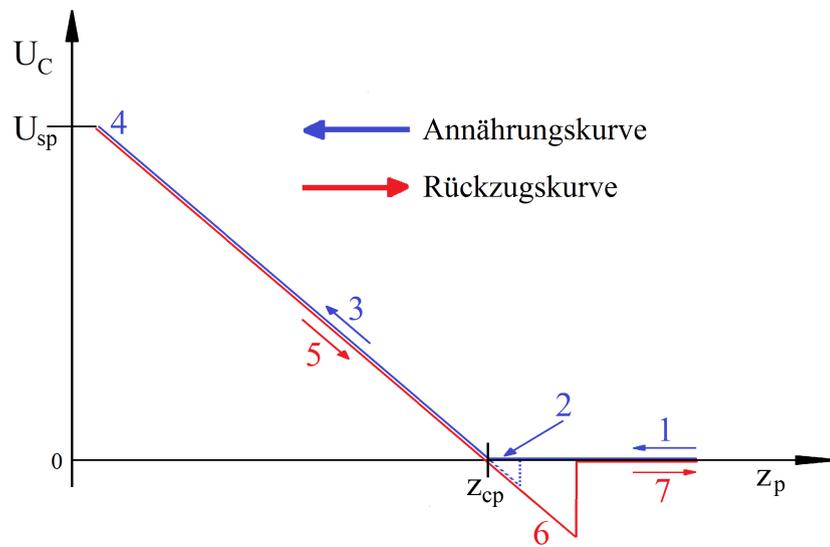


ABB. 2.3: Idealisierte Deflektions-Abstands-Kurve für ein unendlich hartes Substrat. In blau ist die Annäherungskurve gegeben und in rot die Rückzugskurve. Jede AFM Messung generiert ein solches Kurvenset, aus dem sich Materialeigenschaften ermitteln lassen.

Eine ideale Deflektions-Abstands-Kurve auf einem unendlich hartem Substrat ist dabei in Abb. 2.3 gezeigt. Auf dieser Abbildung wird ersichtlich, dass jede Messung eine Annäherungskurve (blau) und eine Rückzugskurve (rot) generiert. In der Abbildung beginnt die Messung am Punkt 1, der größten Piezohöhe z_p . Während der Annäherung wird der Cantilever zur Probe geführt, berührt diese aber noch nicht (Abb. 2.3 Punkt 1), weshalb die Ablenkung U_c konstant bleibt, während sich die Höhe des Piezokristalls z_p bzw des Cantilevers reduziert. Aufgrund adhäsiver Kräfte kann es passieren, dass der Cantilever nahe der Probe einen plötzlichen Sprung macht und mit selbiger in Kontakt kommt (Abb. 2.3 Punkt 2).

Der Punkt an dem die Ablenkung U_c das erste Mal größer Null ist, ist der Punkt an dem der Cantilever mit der Probe in Kontakt kommt. Diesen Punkt nennt man Kontaktpunkt z_{cp} . Ein weiteres absenken des Cantilevers führt dann zu einem linearen Anstieg der Ablenkung U_c (Abb. 2.3 Punkt 3), welcher für die Kalibrierung und die genaue Bestimmung des Kontaktpunktes z_{cp} genutzt werden kann. Mit Erreichen der vorher eingestellten maximalen Ablenkung U_{sp} (Abb. 2.3 Punkt 4), dem Setpunkt, wird der Cantilever wieder nach oben bewegt und die Verbiegung nimmt ab (Abb. 2.3 Punkt 5). In den meisten Fällen bleibt der Cantilever nach Überschreiten des Kontaktpunktes z_p , aufgrund von Adhäsionskräften, weiterhin an der Probe haften, weshalb sich negative Ablenkungen U_c messen lassen (Abb. 2.3 Punkt 6). Beim Erreichen der notwendigen Abrißkraft springt der Cantilever abrupt in den ungestörten Zustand und die Ablenkung U_c bleibt konstant bei null.

Bei einer nicht idealen Messung, wie es zum Beispiel bei der Bestimmung der Materialeigenschaften von biologischen Präparaten der Fall ist, werden die scharfen Übergänge, die den Kontaktpunkt und den Abrisspunkt der Rückzugskurve kennzeichnen, verschmiert (Abb. 2.4). In diesem Fall kann man im Allgemeinen sogar davon ausgehen, dass es keinen linearen Anstieg der Ablenkung bzw der Kraft gibt, so das nicht-lineare Modelle, wie das Hertz Modell genutzt werden müssen. Aus diesen Gründen kann die eigentliche Messung nicht mit der eingangs beschriebenen, idealen Situation verglichen werden, sondern zur Auswertung solcher Kurven werden komplexere Modelle benötigt.

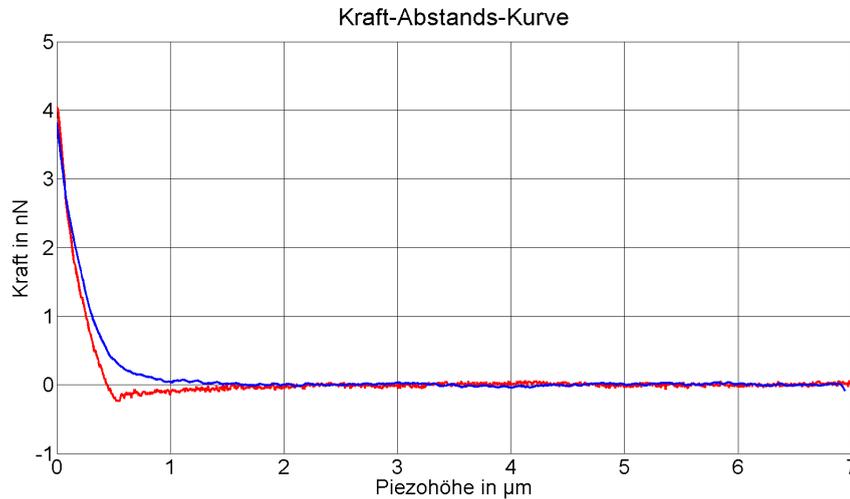


ABB. 2.4: Nicht idealisierte Kraft-Abstands-Kurve einer LN229 Glioblastomzelle. Man erkennt die Unschärfe des Kontaktpunktes, ebenso wie die des Abrisspunktes und den nicht linearen Anstieg der Kurve nach dem Kontakt mit der Probe. Somit kann eine Zelle nicht als ideales elastisches Objekt betrachtet werden und komplexere Modelle werden benötigt.

2.3.2 Kalibrierung

Für alle Messungen mit dem AFM wird für den Cantilever ein lineares Verhalten in Form des Hook'schen Gesetzes (Gleichung 2.5) angenommen, sobald Kontakt mit der Probe besteht.

$$F(z_c) = k * z_c \quad (2.5)$$

Dabei ist k die Federkonstante des Cantilevers und z_c dessen Höhe. Die Kalibrierung des AFMs ist notwendig, um die Federkonstante k zu bestimmen, da nur so die wirkende Kraft F bestimmt werden kann. Die Cantileverhöhe z_c kann bestimmt werden, indem die vertikale Ablenkung der 4-Quadranten-Photodiode U_c gemessen wird und die Höhe des Piezoelementes z_p über die Sensitivität s (Gleichung 2.6). Die gemessene Höhe des Piezokristalls z_p ist dabei eine Translation der gesuchten Cantileverhöhe z_c .

$$z_c = s * U_c \quad (2.6)$$

Die Sensitivität s lässt sich dabei am leichtesten mit Hilfe eines Substrats mit sehr hohem Youngmodul - gegenüber dem Cantilever - messen, wie zum Beispiel Glas oder Plastik. Dabei ist die Eindringtiefe des Cantilevers in das Substrat nahezu null, also vernachlässigbar und die sich ergebende Deflektions-Abstands-Kurve kann als ideale Deflektions-Abstands-Kurve angenommen werden (siehe Abb. 2.3). Mit diesem Faktum kann die Sensitivität einfach bestimmt werden, als negativ Inverses des Anstieges dieser Kurve (Gleichung 2.7).

$$s = -\frac{\Delta z_p}{\Delta U_c} = -\frac{1}{\text{Anstieg}} \quad (2.7)$$

Die Federkonstante k des Cantilevers wird mit Hilfe eines thermischen Rauschspektrums ermittelt [431]. Bei dieser Methode werden thermische Schwingungen gemessen und somit wird ein Frequenzspektrum, mit Resonanzpeaks, erstellt.

Grundannahme für eine Kalibrierungen mit dieser Methode ist, dass es sich bei dem betrachteten System um einen schwach gedämpften harmonischen Oszillator handelt, so dass der Zusammenhang zwischen Amplitude und Frequenz als Lorentzkurve modelliert werden kann. Gleichzeitig ergibt sich unter Ausnutzung des Equipartitionstheorems für die Berechnung der Materialkonstanten k , mit der mittleren quadratischen Fluktuation des Cantilevers n_c , der Temperatur T und der Boltzmannkonstanten k_B :

$$k = \frac{k_B T}{\langle n_c \rangle} \quad (2.8)$$

Diese Kalibrierungsmethode erlaubt eine schnelle und einfache Bestimmung der Federkonstanten k des Cantilevers, weshalb diese Kalibrierung vor dem Beginn jedes Experiments durchgeführt wurde. Nachteile dieser Methode sind allerdings, dass für die benötigten Messungen der Cantilever in Kulturmedium sein muss, wodurch er eine höhere Dämpfung als an Luft erfährt und damit Signalamplitude und Resonanzfrequenz reduziert sind. Das führt zu einem verschlechterten Signal-Rausch-Verhältnis und damit zu einer leicht erhöhten Unsicherheit bei der Bestimmung der Materialkonstanten k .

2.3.3 Messparameter

Für die AFM Messungen wurden Zellen ausgesät und 15min danach einzeln mit einem Cantilever ohne Spitze (Arrow TL-2, Nanoworld, Schweiz) vermessen. Die kurze Adhäsionszeit gewährleistete, dass die Zellen eine nahezu sphärische Geometrie aufzeigten. Die Messung wurde mit einer Annäherungsgeschwindigkeit von $5\mu\text{m}/\text{s}$, einer maximalen Kraft von $3n\text{N}$ und einer Kontaktzeit nach Erreichen der maximalen Kraft von 0s durchgeführt. Die Kraft-Abstandskurven wurden über eine Distanz von $7\mu\text{m}$ und mit 1024 Messpunkten aufgenommen. Die AFM Messung wurde genutzt, um das Young

Modul, die normierte Adhäsionsenergie, die Indentationstiefe, die Zellgröße, die Abrisskraft, die absolute Adhäsionsenergie, den Anstieg der Kurve zu Beginn des Kontaktes, sowie Zahl, Kraft und Energie von diskreten Sprungstellen zu ermitteln (Abb. 2.5). Die Größe der Zellen wurde direkt aus den während der AFM-Messung gemachten Phasenkontrastaufnahmen ermittelt. Die Indentationstiefe ist diejenige Länge, um die die Zelle deformiert wurde. Die Abrisskraft wurde als minimale Kraft der Rückzugskurve definiert, während die totale Adhäsionsenergie als das Integral, über den Teil der Rückzugskurve der kleiner als Null ist, berechnet wurde. Der Kurvenanstieg direkt nach dem Kontakt des Cantilevers mit der Zelle wurde als Ableitung der ersten 240nm der Indentation bestimmt. Für die Sprungstellen wurde die Kraft als Differenz der gemessenen Kraft zwischen Beginn und Ende des Sprunges definiert, die Sprungweite als Höhendifferenz des Sprunges und die Sprungenergie als Integral über diesen Bereich. Das Young Modul ist ein Maß für die Elastizität der vermessenen Zellen und beschreibt dabei den Zusammenhang zwischen Spannung und Dehnung eines Körpers bei einer Verformung. Die normierte Adhäsionsenergie beschreibt die totale Adhäsionsenergie normiert auf die maximale Kontaktfläche zwischen Cantilever und Zelle.

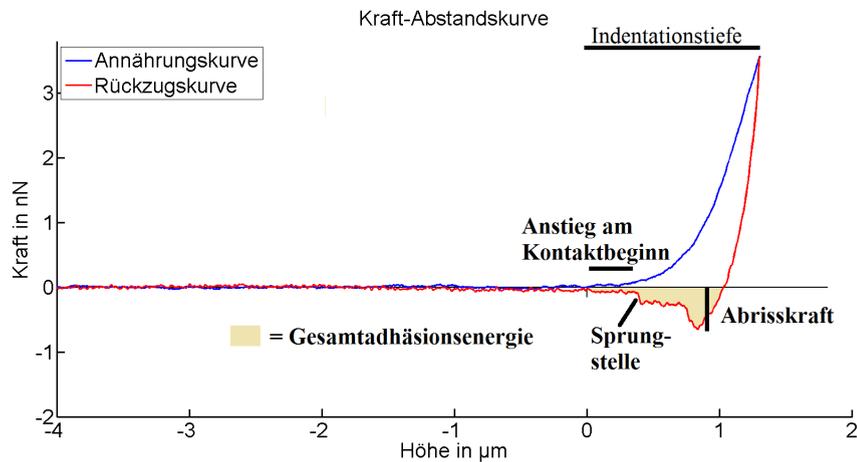


ABB. 2.5: Exemplarische Darstellung der Messparameter am AFM (außer Zellgröße, Young Modul und normierter Adhäsionsenergie). Zu sehen sind die Annäherungskurve in blau und die Rückzugskurve in rot, sowie die Beschriftung der betrachteten Bestandteile der Kurve, inklusive ihres Messbereiches. Zu beachten ist, dass der Anstieg der Kurve aus dem dargestellten Bereich als Ableitung, die Gesamtadhäsionsenergie als Integral über den markierten Bereich und die Energie der Sprungstelle ebenfalls als Integral über die Höhendifferenz des Sprunges ermittelt wird.

2.3.4 Mechanische Eigenschaften von biologischen Materialien

Zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften wurde für diese Arbeit das Young Modul E verwendet. Zusammen mit der Poissonzahl μ charakterisiert das Young Modul E die elastischen Materialeigenschaften einer Zelle sehr gut. Die Poissonzahl μ ist dabei das Verhältnis von relativer Änderung der Größe eines Objektes senkrecht zur Spannungsrichtung, zur Längenänderung in Spannungsrichtung.

Eine einfache Möglichkeit das Youngmodul E , für zellelastische Messungen mit einem AFM, zu berechnen ist das Hertzmodell. Das Modell setzt dabei eine statische Situation voraus, bei der 2 Sphären des Radius $R_{1/2}$, mit Youngmoduli $E_{1/2}$ und Poissonzahlen $\mu_{1/2}$ miteinander interagieren. Diese Situation entspricht in guter Approximation dem, in dieser Arbeit genutzten, Fall, dass Zellen die gerade beginnen an einem Substrat zu adhären, also noch nahezu kugelförmig sind, mit einem flachen Cantilever in Kontakt gebracht werden. Der Cantilever kann dabei als unendlich große und gegenüber der Zelle sehr harten Kugel genähert werden. Unter diesen Annahmen lässt sich das Young Modul E berechnen aus:

$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1 - \mu^2} \sqrt{R\delta_0^3} \quad (2.9)$$

Dabei ist F die vom Cantilever ausgeübte Kraft, E das Young Modul, μ die Poissonzahl, R der Zellradius und δ_0 die zentrale Indentation.

Zur Bestimmung der Adhäsionsenergien wurden zwei weitere Modelle verwendet und bezüglich ihrer Gültigkeit überprüft, da das Hertzmodell Adhäsion vernachlässigt. Bei diesen Modellen handelt es sich um das Johnson Kendall Roberts (JKR) [432] und das Derjarguin-Muller-Toporov (DMT) Modell [433]. Beide Modelle erlauben die Berechnung einer Kontaktfläche πa^2 , zwischen Cantilever und Zelle, aus der sich eine normierte Adhäsionsenergie $\gamma = E_{adh}/(\pi a^2)$ berechnen lässt. E_{adh} ist dabei die totale Adhäsionsenergie. Der Kontaktradius a für das DMT Modell lässt sich berechnen aus:

$$a^3 = \frac{4R(1 - \mu^2)}{3\pi E} (F + 3\gamma\pi R + \sqrt{6\gamma\pi R F + (3\gamma\pi R)^2}) \quad (2.10)$$

Für das JKR Modell gilt entsprechend:

$$a^3 = \frac{4R(1 - \mu^2)}{3\pi E} (F + 2\pi\gamma R) \quad (2.11)$$

Auflösen der Gleichungen 2.10 und 2.11 nach dem Kontaktradius a liefert eine Abschätzung für die Kontaktfläche πa^2 und kann für die Abschätzung der Gültigkeit verwendet werden. Zur Überprüfung der Gültigkeit des jeweiligen Modells wurde ihre Vorhersage über die zu erwartende Abrisskraft des Cantilevers genutzt. Das DMT Modell macht für eine Zelle des Radius R , bei einer Kontaktfläche πa^2 und einer Gesamtadhäsionsenergie E_{adh} folgende Vorhersage für die Abrisskraft F_S :

$$F_S = \frac{2RE_{adh}}{a^2} \quad (2.12)$$

Das JKR Modell sagt dahingegen vorher:

$$F_S = \frac{3RE_{adh}}{2a^2} \quad (2.13)$$

Eine Division der Gleichungen mit der tatsächlich gemessenen Abrisskraft F_S ermöglicht somit eine Validierung der Vorhersagen und eine Berechnung der normierten Adhäsionsenergien $\gamma = E_{adh}/(\pi a^2)$.

2.4 Erstellung eines Netzwerkes und Ermittlung von Parameterclustern

In dieser Arbeit wurden mittels AFM und Lebendzellmikroskopie insgesamt 16 Parameter ermittelt. Um diese Parameter bezüglich ihres gemeinsamen Informationsgehaltes zu gruppieren, wurde eine Netzwerkanalyse durchgeführt. Ein Netzwerk ist ein System, das sich mathematisch als Graph organisieren lässt. Bei einem Graphen handelt es sich, im mathematischen Sinne, um eine Struktur, die eine Menge von Objekten zusammen mit den Verbindungen zwischen diesen Objekten repräsentiert. Ein Graph besteht aus Knoten, den Hauptelementen des Graphen und Kanten, die Knoten paarweise verbinden. Wenn die Struktur eines Graphen (hier: Netzwerkes), also sowohl Knoten als auch Kanten, vollständig bekannt ist, kann man Rückschlüsse über mögliche Redundanzen, Zusammenhänge einzelner Gruppen, etc ziehen. Die in dieser Arbeit ermittelten 16 Parameter entsprechen dabei den Knoten des Netzwerkes.

Das Ziel der hier durchgeführten Analyse war es, diejenigen Parameter zu finden, die statistische Gemeinsamkeiten aufweisen und daraus folgend Gruppen von Parametern zu erstellen, die einen hohen gemeinsamen Informationsgehalt, eine Kante, haben. Aus diesen Gruppen wurden dann neue Parameter, so genannte Kompositparameter erstellt, um für weitere Analysen verwendet zu werden. Für die Feststellung, ob zwei Parameter einen gemeinsamen Informationsanteil enthalten, wurde die Transinformation (englisch: mutual information, MI) berechnet. Die Transinformation geht gegen Null, wenn die betrachteten Größen statistisch unabhängig sind und wird maximal, wenn sich die eine Größe aus der anderen vollständig ermitteln lässt. Ein Vorteil der Transinformation, gegenüber zum Beispiel Korrelationsanalysen, ist die Modellfreiheit, so dass auch hochgradig nicht-lineare Zusammenhänge erfasst werden können. Zur Berechnung der Transinformation wurde folgende Definition genutzt:

$$MI_{K,I} = \sum_{k \in K, i \in I} p(k, i) \log \left(\frac{p(k, i)}{p(k)p(i)} \right) \quad (2.14)$$

Dabei ist $p(i)$ bzw $p(k)$ die Wahrscheinlichkeit bei der Messung des Parameters I bzw K den Messwert i bzw k zu erhalten, während $p(k, i)$ die Wahrscheinlichkeit dafür ist, das man bei einer Messung der Parameter I und K den Wert i für Parameter I und gleichzeitig den Wert k für Parameter K erhält. Für die Wichtung der erhaltenen Kanten wurde eine Methode von Faith et al [434] verwendet, die nach Kießling et al [435] modifiziert wurde. Mit Durchführung dieses Rechenschrittes waren alle Kanten und Knoten des Netzwerkes vollständig bekannt und die Analyse für die Anordnung der Parameter in Gruppen konnte durchgeführt werden.

Zur Erstellung von Parameterclustern wurde ein Verfahren von Newman [436] verwendet, dass die sogenannte Modularität Q maximiert. Anschaulich gesprochen entspricht der Wert der Modularität Q dem Unterschied zwischen einem Netzwerk, dessen Kanten zufällig verteilt wurden und dem zu untersuchenden, bereits in Subnetzwerke eingeteilten Netzwerk. Der Wert 0 entspricht dabei einer Einteilung des Netzwerkes in Subnetzwerke, die sich nicht von einer zufälligen Anordnung unterscheidet. Der Maximalwert der Modularität wird dementsprechend erreicht, wenn eine optimale Einteilung des Netzwerkes erfolgt. Die so ermittelten Teilnetzwerke haben eine deutlich stärkere Verknüpfung innerhalb ihre Teilnetzwerkes, als sie es mit dem Rest des Netzwerkes haben.

Die Unterteilung des Netzwerkes in Teilnetzwerke erlaubt nun jeden der gemessenen Parameter einer Parametergruppe zuzuordnen und aus diesen einen gemeinsamen Parameter zu ermitteln, den sogenannten Kompositparameter M_c [435]:

$$M^C = \frac{1}{N_C} \sum_{i \in C} \frac{m_i - \langle m_i \rangle}{\sigma(m_i)} = \frac{1}{N_C} \sum_{i \in C} z[m_i] \quad (2.15)$$

Dabei ist m_i ein Set von Messwerten des Parameters i und sowohl Mittelwert als auch Standardabweichung dieses Wertes wurden bezüglich allen gemessenen Werten, von allen Zelltypen und Behandlungen ermittelt. Die Summe in Gleichung 2.15 läuft über alle Parameter im Cluster C . Die Einführung der Kompositparameter M^C reduzierte somit die Zahl der Parameter auf die Zahl der Teilnetzwerke.

2.5 Zelllinien und Zellkultur

Für die Durchführung der Elastizitäts-, Migrations- und Invasionsversuche wurden verschiedene Glioblastozelllinien benutzt, namentlich: LN229, U87-MG, sowie U138-MG. Im Folgenden werden die Zellen nur noch als LN229, U87 und U138 bezeichnet. Bei LN229, U138 und U87 handelt es sich um humane Glioblastozelllinien. LN229 wurden aus dem Kortex isoliert, während der Ursprung der U87 und U138 Zellen im Hirn nicht weiter spezifiziert wurde. LN229 und U87 weisen ein invasives Verhalten in immundefizienten Mäusen auf [437], während U138 Zellen in vivo als nicht-invasiv gelten [438]. LN229 und U87 wurden in 89% (v/v) Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI, Lonza, Verviers, Belgien) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FBS, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA), sowie 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin (P/S, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) kultiviert. U138 wurde in 87% (v/v) Low Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (Low DMEM, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit 10% (v/v) FBS, sowie 1% (v/v) P/S und 2% (v/v) nicht essentieller Aminosäuren (NEAA, Biochrom, Berlin, Deutschland) kultiviert.

2.5.1 Transfizierte Zelllinien

In Kooperation mit Prof. Ulrike Stein und Dr. Carsten Hagemann wurde die Rolle von MACC1 in Glioblastomzellen untersucht [420]. Für diese Untersuchungen wurde ein Subtyp, der im Folgenden als U138+ bezeichnet wird, verwendet, der von Prof. Stein und Dr. Hagemann zur Verfügung gestellt wurde. Bei U138+ handelt es sich um eine MACC1 transfizierte Variante der U138 Zelllinie, die in der Publikation von Hagemann et al beschrieben wird [420]. Das Kulturmedium blieb unverändert.

Weiterhin wurden Zelllinien genutzt, in denen eine Isocitrat-Dehydrogenase 1 (IDH1) Mutation (IDH1-R132H) eingebracht wurde. Dabei wurden von drei Zelllinien jeweils drei weitere Varianten verwendet: eine Leervektor, eine IDH1-Wildtyp überexprimierende und eine IDH1-R132H Form. Dafür wurden die Zelllinien U251-MG, U343-MG und LN229 verwendet. Bei U251-MG handelte es sich um humane, als Grad IV klassifizierte Glioblastomzellen, während die Gliomzelllinie U343-MG dem Grad III zugeordnet wurde. Alle drei Zelllinien, mit ihren vier Varianten, wurden von Prof. Dirk Vordermark zur Verfügung gestellt und wurden von Kessler et al beschrieben [413]. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden diese Zelllinien als U251 und U343 bezeichnet.

2.6 Behandlung von Zellen

Alle Zellbehandlungen wurden 24h vor Beginn des Experimentes durchgeführt. Zur Behandlung wurden der Cannabinoid Rezeptor (CB) 1 Agonist ACEA (Tocris Cookson Ltd., Bristol, GB) und der CB2 Agonist JWH133 (Tocris Cookson Ltd., Bristol, GB) in der Konzentration von $10\mu M$ verwendet. Die Konzentrationen wurden gewählt, da bereits antitumorale Effekte dieser Substanzen, in diesen Konzentrationen, in anderen Tumorentitäten auf Apoptose und Migration nachgewiesen werden konnten [439, 440]. Weiterhin wurde der MET-Inhibitor Crizotinib (Active Biochem, Wanchai/Hongkong, China) in einer Konzentration von $0.5\mu M$, bei U138+ Zellen, verwendet, da diese Konzentration in Voruntersuchungen als wirksam zur Inhibierung MACC1 induzierter Effekte ermittelt wurde [420]. Alle Substanzen wurden für eine Dauer von 24h appliziert. Für die Evaluierung von Bestrahlungseffekten wurde, 24h vor Beginn des Experimentes, eine Dosis von $D = 2Gy$ verwendet. Diese Dosis entspricht der üblichen maximalen Dosis einer Sitzung während der Radiotherapie [441].

2.7 Murine organotypische hippocampale Schnittkulturen

2.7.1 Zellkulturmedien für organotypische hippocampale Schnittkulturen

Für organotypische hippocampale Schnittkulturen (OHSC) wurden zwei verschiedene Medien benötigt, das Präparationsmedium, welches ausschließlich während der Anfertigung der OHSC genutzt wurde und das Kulturmedium, das während der anschließenden Kultivierungsphase verwendet wurde. Für das Präparationsmedium wurden *97ml* Minimal Essential Medium (MEM, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) mit *1ml* Glutamin (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA), *1ml* 45 %-iger (w/v) Glukose (Merck, Darmstadt, Deutschland) und *1ml* P/S gemischt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7.35 – 7.38 eingestellt und das Medium steril filtriert. Das Präparationsmedium wurde während der Präparation bei $4^{\circ}C$ gehalten.

Das Kulturmedium setzte sich aus *47ml* MEM, *25ml* HBSS mit Kalzium und Magnesium (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA), sowie *25ml* Pferdeserum (NHS, Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA), *1ml* Glutamin, *1ml* 45 %-iger (w/v) Glukose, *1ml* P/S und *80 μ l* Vitamin C (Sigma Aldrich, Steinheim) zusammen. Nach der Zusammenstellung des Mediums wurde der pH-Wert auf 7.2 – 7.3 eingestellt und das Medium steril filtriert. Bei der Nutzung hatte das Medium eine Temperatur von $35^{\circ}C$.

2.7.2 Präparation von organotypischen hippocampalen Schnittkulturen

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach Maßgabe der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 2010/63/EU) durchgeführt. Die Gewinnung der OHSC erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Stoppini et al [442]. Dafür wurden 4-5 Tage alte Mäuse dekapitiert und im Anschluss die Kopfhaut entfernt. Daraufhin wurde die Kalotte aufgeschnitten, das Gehirn entfernt und unmittelbar in eine Gewebeskulturschale (*35mm*) mit Präparationsmedium übertragen. Auf einem Metallteller wurde Agar zur Stabilisation mit Histoacrylkleber befestigt. Mit Hilfe eines Vibratoms (Leica VT 1200 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) wurden *350 μ m* dicke Schnitte des Hippocampus angefertigt. Diese wurden dann unter einem Mikroskop mit einem Skalpell zugeschnitten und in gekühltem Präparationsmedium gelagert. Mit dieser Methode konnten etwa 3-6 Schnitte aus einer Maus gewonnen werden. Nach der Präparation eines Gehirnes wurden die Schnitte in Zellkultureinsätze (Millipore, Schwalbach, Deutschland) übertragen und in 6-Lochplatten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) mit *1ml* Kulturmedium in einem Inkubator bei $35^{\circ}C$ und 5% CO_2 für 2 Wochen inkubiert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte jeden 2. Tag.

2.7.3 Tumorinvasion in Schnittkulturen

Die verwendeten Tumorzellen wurden am Tag 13, nach der Präparation der OHSC, wie bereits beschrieben, behandelt (siehe Kapitel 2.6). Zusätzlich wurden die Zellen mit $10\mu M$ CFDA-SE (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA) für $24h$ inkubiert. Dabei diffundierte CFDA-SE in die Zellen, wo dann die Acetatgruppe, durch intrazelluläre Esterasen, zu einem fluoreszenten Produkt gespalten wurde. Dies führte dazu, dass die so gefärbten Zellen über mehrere Zellteilungen hinweg fluoreszent markiert waren.

Anschließend wurden die Zellen mit PBS (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) gespült und mit Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland) für ca $5min$ inkubiert bis sich die Zellen ablösten. Das Trypsin/EDTA wurde dann mit Kulturmedium deaktiviert und die Zellsuspension in ein $15ml$ Röhrchen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt und zentrifugiert. Daraufhin wurde der Flüssigkeitsüberstand abgesaugt und Kulturmedium hinzugegeben, so dass in $10\mu l$ dieser Suspension 50.000 Zellen enthalten waren. Nun wurden $10\mu l$ der Suspension auf jedes OHSC gegeben. Zur Visualisierung wurde dies in Abb. 2.6 schematisch, idealisiert dargestellt. Nach 3 oder 4 Tagen wurden die OHSC mit 4% Paraformaldehyd (PFA) über Nacht fixiert. Nach der Fixierung wurden die Schnitte mit Propidium Iodid (PI, Merck, Darmstadt, Deutschland) eingefärbt, um die Zytoarchitektur zu visualisieren. Somit ergab sich in der Fluoreszenz ein Kontrastbild in dem gebildete Tumore grün fluoreszierten und die Struktur des Schnittes selbst rot. Zur Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurde ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM, Leica TCS SP 2, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) verwendet und die OHSC dann in $2\mu m$ Tiefenintervallen abgerastert.

2.7.4 Analyse der Tumorinvasion in Schnittkulturen

Die quantitative Analyse der Invasionsversuche erfolgte mit Hilfe eines CLSM. Für die Anregung von CFDA wurde eine Wellenlänge von $\lambda = 488nm$ und für PI $\lambda = 543nm$ verwendet. Dabei wurden optische Schnitte im Abstand von $2\mu m$ aufgenommen und zu einem Stack zusammengefasst, welches die Position des Tumors innerhalb des Schnittes und dessen Größeninformation enthält. Die erhaltenen Bilder erlaubten jedoch nicht immer eine Differenzierung einzelner Tumore innerhalb des Schnittes, sondern zeigten häufig netzwerkartige Strukturen.

Aufgrund dessen konnten keine individuellen Tumore innerhalb der Schnittkultur analysiert werden, sondern lediglich globale, den ganzen Schnitt betreffende Eigenschaften. Für die Analyse der Invasivität wurde die Fläche A des Tumors für jeden optischen Schnitt ermittelt. Im Anschluss wird daraus das approximierte Volumen V , mit Hilfe des Abstandes der optischen Schnitte d ermittelt als:

$$V = \sum_i A_i d \quad (2.16)$$

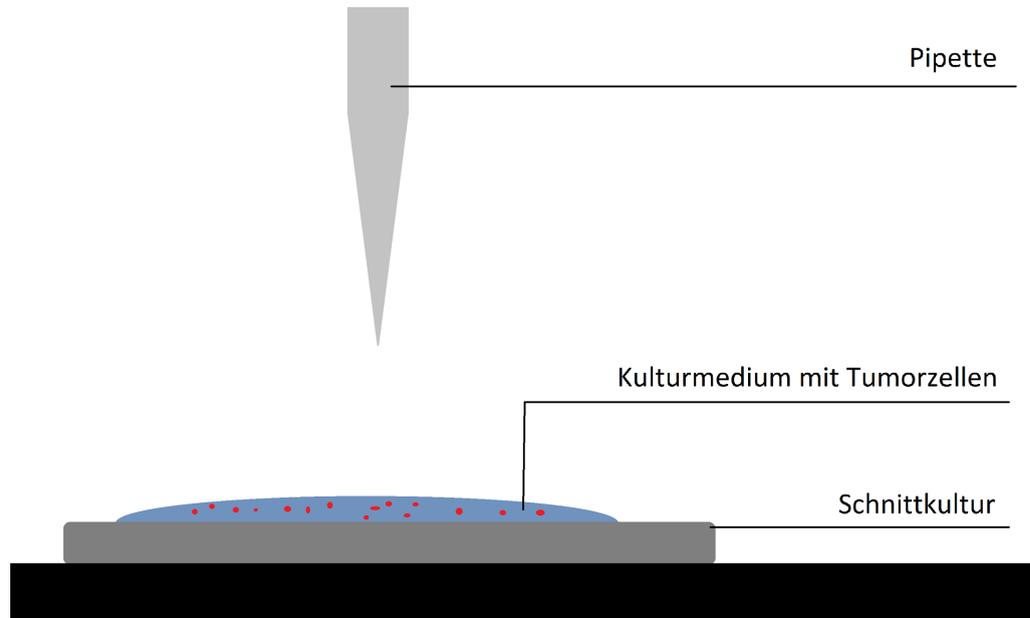


ABB. 2.6: Schematische Darstellung eines Tumorinvasionsexperimentes. Zu sehen ist die idealisierte Applikation der Tumorzellen auf die Schnittkultur. Im Gegensatz zu der hier gewählten idealisierten Darstellung kommt es bei der Hinzugabe der Tumorzellen zum Schnitt zu einem Abfluss eines Teils des Kulturmediums, aufgrund des Flüssigkeitsfilms auf dem Schnitt.

Um eine Unabhängigkeit des Volumens und der bedeckten Fläche von der Größe der verwendeten Schnittkultur zu gewährleisten, wurde auf die Fläche der Schnittkultur normiert.

2.8 Analyse der Cannabinoidrezeptorexpression auf mRNA-Ebene

Für die Analyse der mRNA Expression der genutzten Zellen wurden zuerst konfluente Zellen mit Trypsin/EDTA gelöst. Anschließend wurde das Zellpellet mit PBS gespült, nach Zugabe von 0.5ml Trizol (Peqlab, Erlangen, Deutschland) aufgeschlossen und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden $200\mu\text{l}$ Chloroform (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) zugesetzt und bei Raumtemperatur 3min inkubiert. Daraufhin erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei $10000g$ für 15min bei 4°C , nach dessen Abschluß die RNA-enthaltende Phase mit $500\mu\text{l}$ Isopropanol (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gefällt und mit $500\mu\text{l}$ Ethanol (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gewaschen und in DNase freies Wasser (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) überführt wurde.

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde $1\mu\text{g}$ RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf $10\mu\text{l}$ aufgefüllt und für 10min bei 70°C denaturiert. Nach 1min Zentrifugation bei $10000g$ wurden die Proben auf Eis gekühlt und $10\mu\text{l}$ des Mastermixes (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) hinzugegeben. Die Transkription erfolgte durch Inkubation bei

37 ° C für 60min und wurde bei einer anschließenden Hitzeinaktivierung für 5min bei 99 ° C gestoppt. Die qRT-PCR wurde dann durchgeführt wie bei Benz et al beschrieben [439]. Der Primer für CB1 wurde entsprechend der NM 016083.4 Homo sapiens cannabinoid receptor 1 (CNR1) Sequenz erstellt und der Primer für CB2 nach der Sequenz für NM 001841.2 Homo sapiens cannabinoid receptor 2 (macrophage) (CNR2), mRNA. Die Liste der Primer befindet sich im Anhang.

Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Urszula Grabiec durchgeführt.

2.9 Analyse der Cannabinoidrezeptoren mittels Western Blot

Western Blotting wurde durchgeführt, wie in Benz et al und Ernst et al beschrieben [439, 443]. Die Spezifität des verwendeten CB1 Antikörpers wurde in Benz et al gezeigt [439]. Zuerst wurden Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt, wo die Zellen sonifiziert und auf 70 ° C erhitzt wurden. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 ° C. Nach der Messung der Proteinkonzentration mit einem BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA) wurden 20µg (für den CB1 Rezeptor) des Proteins für die Gelektrophorese verwendet. Die Gele wurden anschließend auf der Nitrozellulosemembran (GE Healthcare, Darmstadt, Deutschland) geblottet, mit Waschpuffer gewaschen, mit Roti-Block (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland) 30min blockiert und über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Membranen wurden danach 3x mit Waschpuffer gewaschen, mit Meerrettichperoxidase konjugiertem anti-Kaninchen IgG inkubiert und anschließend 5x gewaschen. Die Signaldetektion erfolgte mit einem Luminata Classico Western HRP Substrat (Merck, Darmstadt, Deutschland). GAPDH wurde als Referenz verwendet und Image J zur Auswertung genutzt. Eine Liste der genutzten Antikörper befindet sich im Anhang.

Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Urszula Grabiec durchgeführt.

2.10 Analyse der Cannabinoidrezeptorverteilung

Die Rezeptorverteilung wurde mittels immunocytochemischer Untersuchungen ermittelt, wobei die Spezifität des verwendeten CB1 Antikörpers bereits bestätigt werden konnte [439]. Dafür wurden 50000 Zellen auf Poly-L-Lysin (PLL, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) beschichtete Glasplättchen ausgesät und mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung (Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland bzw Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) für 10min inkubiert, 3x gewaschen mit PBS/Triton (Triton: Merck, Darmstadt, Deutschland) und anschließend mit Ziegenerum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, USA) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Für die Markierung des CB1 Rezeptors wurden die Proben über Nacht bei 4 ° C

mit einem entsprechenden Antikörper inkubiert, der in 5%(w/v) Rinderalbumin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst ist. Nach erneutem Waschen mit PBS/Triton, wurden die Proben mit einem kanninchenspezifischen biotynilierten Sekundärantikörper inkubiert, gewaschen und mit Meerrettichperoxidase konjugiertem Streptavidin (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA), gelöst in PBS/Triton, behandelt. Die Färbung wurde abgeschlossen mit einer Inkubation über 3min mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB, Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) und einer Gegenfärbung mit Meyers Hämatoxylin (Dr. K. Hollborn und Söhne, Leipzig, Deutschland). Eine Liste der genutzten Antikörper befindet sich im Anhang.

Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Dr. Urszula Grabiec durchgeführt.

2.11 Evaluation der Messgenauigkeiten

Bei der Durchführung von Messungen an biologischen Objekten entstehen zwei verschiedene Arten von Messunsicherheiten: die biologisch (var_b) und die messtechnisch (var_m) induzierte Varianz. Erstere ergibt sich aus der Heterogenität einer Population, während letztere durch zufällige, systematische und Messgerätefehler auftreten. Diese zwei Arten der Unsicherheit lassen sich jedoch im Allgemeinen nicht einzeln messen, so dass nur eine Gesamtvarianz var_g bzw eine Gesamtstandardabweichung $\sigma_g = \sqrt{var_g}$ ermittelt werden kann. Zur Abschätzung der jeweiligen Einzelgrößen kann jedoch ausgenutzt werden, dass Varianzen additiv sind: $var_g = var_m + var_b$. Die maximale Messgenauigkeit kann mittels Fehlerfortpflanzung oder Größtfehlerabschätzung ermittelt werden und damit kann, zusammen mit der gemessenen Gesamtvarianz var_g , eine Abschätzung der biologisch verursachten Varianz var_b erfolgen.

Dabei errechnet sich der Einfluss fehlerbehafteter Größen für eine Funktion $f(x_1, \dots)$ wie folgt (siehe DIN 1319):

$$\Delta f(x_1, x_2, \dots) = \left| \frac{\partial f}{\partial x_1} \right| * \Delta x_1 + \left| \frac{\partial f}{\partial x_2} \right| * \Delta x_2 + \dots \quad (2.17)$$

Die so erhaltene Unsicherheit entspricht der maximalen, messtechnisch induzierten Abweichung. Dieser erhaltene Wert kann in diesem Sinne als die Standardabweichung, die durch Messprozesse verursacht wurde, genutzt werden. Zu beachten ist jedoch, dass die Identifizierung der Messunsicherheit mit der Standardabweichung zu einer Überschätzung des Anteils der Messunsicherheit an der Gesamtvarianz führt.

2.11.1 Größtfehlerabschätzung - AFM

Für die Bestimmung der Elastizität ergibt sich somit bei der Annahme dreier fehlerbehafteter Größen (Indentation, Kraft und Young Modul), nach Umstellen der Gleichung 2.9 nach δ , für ΔE :

$$\Delta E = \frac{E^{\frac{5}{3}}}{F^{\frac{2}{3}}} \left(\frac{3\Delta\delta}{2\alpha} - \frac{\Delta F}{(FE^2)^{\frac{1}{3}}} \right) \quad (2.18)$$

Wobei $\alpha = \left(\frac{4}{(3-3\mu^2)\sqrt{R}} \right)^{\frac{2}{3}}$ eine Konstante ist.

Für die Abschätzung des Fehlers bei der Berechnung der normierten Adhäsionsenergien wird ebenfalls die vorher beschriebene Größtfehlerabschätzung verwendet. Dabei sind für die Bestimmung der normierten Adhäsionsenergie $\gamma = E_{adh}/(\pi a^2)$ aus Abschnitt 2.3.4 zwei Größen fehlerbehaftet: die Kontaktfläche zwischen Cantilever und Zelle πa^2 , sowie die totale Adhäsionsenergie E_{adh} . Die Abschätzung für die normierte Adhäsionsenergie γ liefert:

$$\Delta\gamma = \frac{\Delta E_{adh}}{\pi a^2} + \frac{E}{\pi a^4} \Delta a^2 \quad (2.19)$$

Für die Berechnung des Fehler bei der Bestimmung der Kontaktfläche wird Gleichung 2.12 verwendet, unter der Maßgabe, dass die Abrisskraft und die totale Adhäsionsenergie fehlerbehaftet sind. Somit ergibt sich für die Größtfehlerabschätzung der Kontaktfläche:

$$\Delta a^2 = 2R \left(\Delta E_{adh} + \frac{E_{adh} \Delta F_s}{F_s^2} \right) \quad (2.20)$$

Für die Abschätzung des Fehlers bei der Berechnung der Adhäsionsenergien E_{adh} wird der Teil der Rückzugskurve mit Werten unter null als Parabel genähert, wobei der Schnittpunkt mit der y-Achse der gewählten Minimalkraft F_s entspricht und die Fläche der Kurve unterhalb der y-Achse so gewählt wird, dass diese der gewählten Adhäsionsenergie entspricht. Dieser Ansatz entspricht der Taylornäherung dieser Kurve bis zu Gliedern zweiter Ordnung. Es gilt also in Approximation:

$$E_{Adh} = \int_{-s}^s (cx^2 - F_s) dx = \frac{2}{3} cs^3 + 2F_s s \quad (2.21)$$

Die entsprechende Größtfehlerabschätzung liefert für die Adhäsionsenergie:

$$\Delta E_{Adh} = (cs^2 - F_s) \Delta s + 2s \Delta F_s \quad (2.22)$$

2.11.2 Größtfehlerabschätzung - Lebendzellmikroskopie

Bei den Lebendzellmikroskopiemessungen wurden einzelne Bildbereiche alle $\Delta T = 5 \text{ min}$ über einen Zeitraum von 20-24h aufgenommen. Als Abschätzung für die Genauigkeit der Bestimmung der Zellgeschwindigkeit v wird die Zelle als Kreis mit der Fläche A betrachtet. Für die Fehlerbetrachtung wird dann an einer beliebigen Seite des Kreises

ein Segment von ΔA entfernt, wodurch ein Kreissegment entsteht. Da für die Geschwindigkeit gilt $v = (|s_2 - s_1|)/\Delta T$, mit den Schwerpunktkoordinaten der Zelle s_i und lediglich die Determinierung des Zellmittelpunktes fehlerbehaftet ist, ist der Größtfehler für die Geschwindigkeit: $\Delta v = \Delta s/\Delta T$. Die Verschiebung des Mittelpunktes zwischen dem ursprünglichen Kreis und dem gebildeten Kreissegment entspricht dann der halben maximalen Abweichung bei der Betrachtung der Geschwindigkeit, da sowohl in Bild 1 als auch in Bild 2 eine fehlerhafte Detektion vorliegen kann, welche im ungünstigsten Fall zu einer Addition des Fehlers führen.

2.12 Statistik

Für die statistische Analyse wurde der Mann-Whitney Test verwendet, wenn nur 2 Gruppen miteinander verglichen werden sollten und der Kruskal-Wallis Test sonst. Bei beiden Tests handelt es sich um parameterfreie Tests für ordinalskalierte Variablen. Ein Effekt wurde als signifikant angenommen für $p < 0.05$.

Kapitel 3

Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt. Die genauen Messwerte befinden sich im Anhang A.

3.1 Endocannabinoid Rezeptoren in Glioblastomzelllinien

Vor der Bestimmung des Einflusses von Cannabinoiden auf das motile, adhäsive, mechanische und invasive Verhalten von Glioblastomzellen wurde die Präsenz der Cannabinoidrezeptoren (CB) 1 und 2 auf mRNA und Proteinebene untersucht. Mittels PCR konnten in den betrachteten Zelllinien U138, LN229 und U87 der CB1 Rezeptor auf mRNA Ebene bei einer Größe von $250bp$ nachgewiesen werden, während die mRNA des CB2 Rezeptors ($125bp$) nur in U138 Zellen gefunden werden konnte (Abb. 3.1 A). Als Negativkontrolle wurde Wasser verwendet. Die Western Blots konnten den Nachweis des CB1 Rezeptors bei einer Größe von $60kDa$ auf Proteinebene für alle 3 Zelllinien erbringen (Abb. 3.1 B). Die immunhistochemische Markierung bestätigte die mittels PCR und Western Blot gewonnenen Erkenntnisse. Bei den Färbungen ist zu erkennen, dass alle verwendeten Zelllinien eine braune Färbung des Zytoplasmas und auch der Zellmembran aufweisen und somit CB1 positiv sind (Abb. 3.1 C). Eine immunzytochemische Färbung sowie Western Blot für den CB2 Rezeptor wurde nicht durchgeführt, da kein geeigneter CB2 Antikörper existiert.

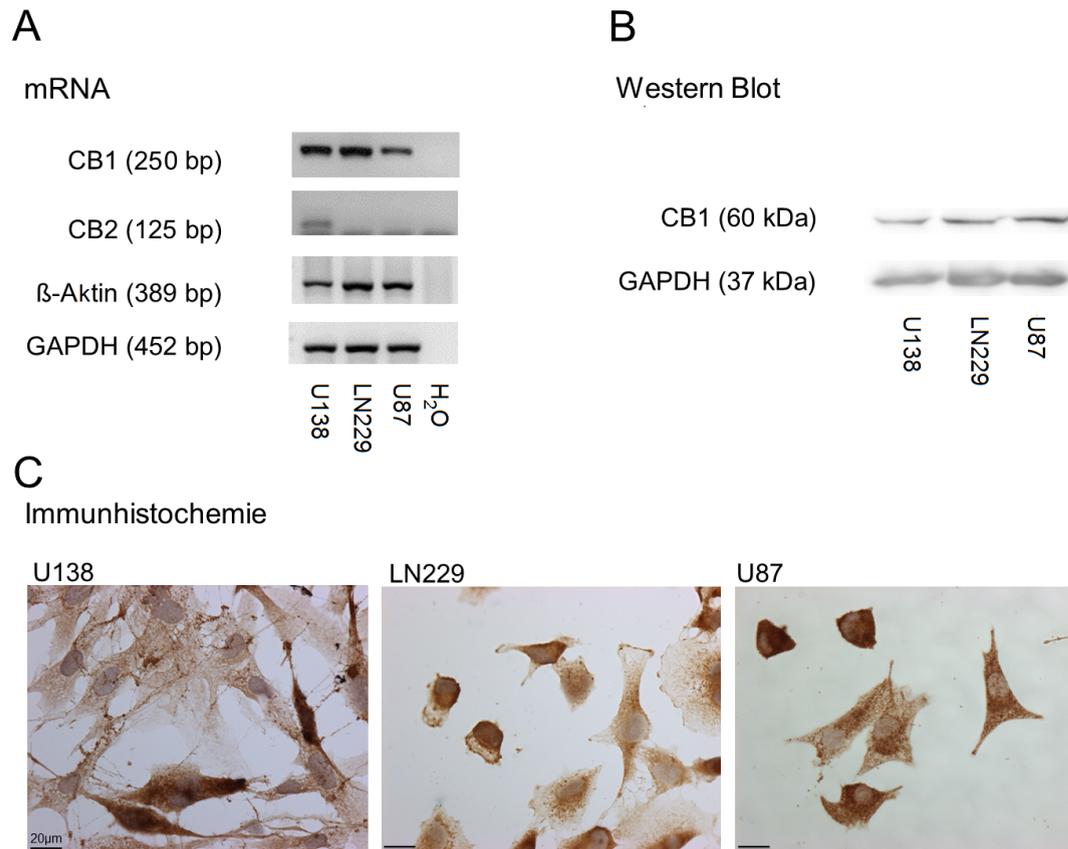


ABB. 3.1: CB1 Rezeptorexpression in U138, LN229 und U87 Zellen. A) mRNA für hCB1 Rezeptoren ist in allen Zelllinien vorhanden. hCB2 mRNA wurde ausschließlich in U138 Zellen gefunden. β -Aktin und GAPDH wurden als Referenz verwendet. B) Western Blot Analysen und C) immunhistochemische Färbungen, die die Präsenz des CB1 Rezeptors in allen drei Zelllinien bestätigten. Der Maßstab entspricht 20 μ m

3.2 Evaluation der Modelle für die Bestimmung der normierten Adhäsionsenergien

Für die Messungen der unspezifischen Adhäsionsenergien wurden Zellen 15min nach dem aussäen mit dem AFM vermessen, da sie so noch eine nahezu sphärische Geometrie besitzen. Zur Evaluation der unspezifischen Adhäsionsenergien zwischen Cantilever und Zelle wurde diese durch das JRK- und DMT-Modell normiert. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Modelle auf die Messsituation wurde das Verhältnis aus berechneter zu gemessener Abrisskraft betrachtet (Gleichung 2.12 und 2.13 in Kapitel 2.3.4). Dabei ergab sich, dass das DMT-Modell bei den LN229 und U87 Zellen bessere Vorhersagen macht, während U138 Zellen besser durch das JRK Modell beschrieben werden (siehe Tabelle 3.1). Eine statistische Untersuchung mittels Mann-Whitney-Test konnte keine Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und Behandlungen einer Zelllinie identifizieren. Entsprechend wurde das JRK Modell für U138 Zellen verwendet und das DMT Modell für die anderen beiden Zelllinien.

Zelltyp	JKR	DMT	Zellzahl
U87	0.59 ± 0.16	1.14 ± 0.33	60
U87 + JWH 133	0.56 ± 0.18	1.08 ± 0.36	40
U87 + ACEA	0.58 ± 0.17	1.14 ± 0.34	60
U87 + 2 Gy	0.55 ± 0.19	1.05 ± 0.40	35
U138	0.79 ± 0.31	1.55 ± 0.63	60
U138+	0.70 ± 0.21	1.35 ± 0.44	40
U138+ + MACC1 Inh	0.79 ± 0.21	1.58 ± 0.45	42
U138 + JWH 133	0.84 ± 0.38	1.63 ± 0.75	40
U138 + ACEA	0.76 ± 0.34	1.44 ± 0.69	40
LN229	0.61 ± 0.39	1.17 ± 0.40	60
LN229 + JWH 133	0.51 ± 0.20	0.95 ± 0.41	40
LN229 + ACEA	0.50 ± 0.19	0.93 ± 0.38	40
LN229 + 2 Gy	0.52 ± 0.19	0.97 ± 0.37	35

TABELLE 3.1: Darstellung des Verhältnisses der berechneten zur gemessenen Abrisskraft, sowie der Standardabweichung zur Überprüfung der Validität des JKR bzw DMT Modells. Je näher ein Wert an eins liegt, desto genauer die Vorhersage des Modells. Das DMT Modell erzielt gute Übereinstimmungen für die U87 und LN229 Zellen, während das JKR Modell besser für die U138 Zellen geeignet ist.

3.3 Einzelzeleigenschaften von Glioblastomzelllinien unter Cannabinoideinfluss

3.3.1 Elastische Eigenschaften von Glioblastomzelllinien unter Cannabinoideinfluss

Für die Bestimmung adhäsiver und elastischer Eigenschaften wurden einzelne Zellen mittels AFM charakterisiert. Das Youngmodul konnte mit dem Hertzmodell und die normierte Adhäsionsenergie mittels DMT bzw JKR Modell berechnet werden. Bei den durchgeführten AFM-Messungen wurden, neben den hier dargestellten Messparametern, auch die Indentationstiefe, die Zellgröße, die Abrisskraft, die absolute Adhäsionsenergie, der Anstieg der Kurve zu Beginn des Kontaktes, sowie Zahl, Kraft und Energie von diskreten Sprungstellen ermittelt. Diese Parameter werden innerhalb dieser Arbeit nicht dargestellt, sind jedoch in die Netzwerkanalyse eingeflossen. Die untersuchten Zellen wurden 24h vor der Messung mit den Cannabinoidrezeptoragonisten JWH 133 (CB2 Agonist) und ACEA (CB1 Agonist) inkubiert.

Für die Bestimmung der elastischen Parameter wurden vereinzelte Glioblastomzellen der Zelllinien U87, U138 und LN229 mit entsprechender Behandlung (Kontrolle, $10\mu M$ ACEA, $10\mu M$ JWH 133) am AFM vermessen. Die Analyse mit dem Hertzmodells ergab dabei für die U138 Zellen eine signifikante Reduktion des Young Moduls für die Behandlung der Zellen mit JWH 133, während eine Behandlung mit ACEA zu einer Erhöhung des Young Moduls führte. Für LN229 Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und der Behandlung mit ACEA bzw JWH 133 festgestellt werden. Für U87 Zellen konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Behandlung mit ACEA und JWH 133 aufgelöst werden (Abb 3.2 A).

Die Analyse der Adhäsionsenergien ergab bei U138 Zellen eine signifikant reduzierte Adhäsionsenergie im Falle der JWH 133 Stimulation, sowie bei einer Applikation von ACEA. Bei den LN229 Zellen konnte eine Reduktion der Adhäsionsenergie durch die Behandlung mit JWH 133 und ACEA beobachtet werden. Bei mit JWH 133 behandelten U87 Zellen konnte eine Reduktion der Adhäsionsenergie gemessen werden, während bei ACEA kein Effekt nachweisbar war (Abb 3.2 B).

Bei den Messungen der adhäsiven und elastischen Eigenschaften konnte keine eindeutige Rezeptor- oder Agonistenspezifität für die ermittelten Effekte festgestellt werden.

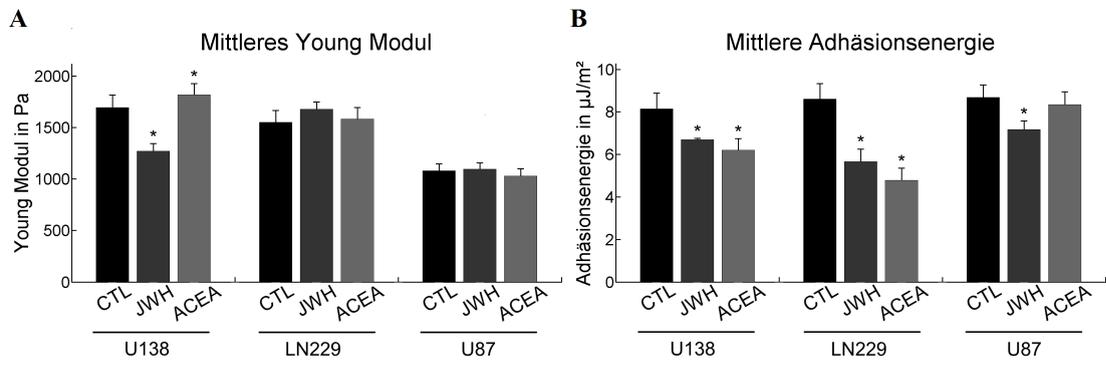


ABB. 3.2: Ergebnisse der AFM-Messungen unter Cannabinoideinfluss. A) zeigt die gemessenen mittleren Young Module unter dem Einfluss von Cannabinoiden, dargestellt mit Standardfehler. Statistisch signifikante Effekte konnten lediglich bei U138 Zellen nachgewiesen werden. B) stellt die mittleren Adhäsionsenergien mit Standardfehler dar. Alle Behandlungstypen resultierten in einer Reduktion der Adhäsivität, mit Ausnahme von U87 Zellen, die mit ACEA behandelt wurden. Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ gewählt. Das Sternchen bezeichnet signifikante Resultate bezüglich der Kontrolle derselben Zelllinie.

3.3.2 Motile Eigenschaften von Glioblastomzelllinien unter Cannabinoideinfluss

Für die Lebendzellmikroskopieversuche wurden vereinzelte Zellen über einen Zeitraum von 24h beobachtet und die Direktionalität, mittlere quadratische Abweichung, Persistenzzeit, Persistenzgeschwindigkeit, mittlere Geschwindigkeit und Zell-Substrat-Kontaktfläche einzelner Zellen bestimmt. Die so erhaltenen Messwerte wurden erst über die Zeit und anschließend über die Zellpopulation gemittelt. In diesem Abschnitt werden jedoch nur die mittlere Zellgeschwindigkeit, sowie die Zell-Substrat-Kontaktfläche dargestellt. Die restlichen Parameter sind jedoch ebenfalls in die Netzwerkanalyse mit einfließen.

Die Messungen der Lebendzellmikroskopie wurden für dieselben Gruppen wie zuvor durchgeführt. Während der CB2-Agonist JWH 133 keinen nachweisbaren Effekt auf die Geschwindigkeit von U138 Zellen hatte, ergab sich eine Reduktion der Geschwindigkeit durch die Behandlung von U138 Zellen mit dem CB1-Agonisten ACEA. Qualitativ ähnliche Effekte konnten bei der Zelllinie LN229 festgestellt werden. Die Applikation von

JWH 133 hatte keinen Effekt auf die mittlere Zellgeschwindigkeit von LN229, jedoch konnte nach der Anwendung des CB1 Agonisten ACEA eine Reduktion der Geschwindigkeit beobachtet werden. Im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien hatten bei U87 Zellen sowohl ACEA als auch JWH 133 eine Steigerung der Geschwindigkeit zur Folge (Abb 3.3 A).

Bei der Betrachtung der Kontaktfläche einzelner Zellen konnte, für eine Behandlung der U138 Zellen mit JWH 133 und ACEA, im Vergleich zur Kontrolle, keinerlei Effekt festgestellt werden. Bei LN229 Zellen führte eine JWH 133 Applikation zu einer Reduktion der Kontaktfläche, während die Inkubation mit ACEA keinen Effekt zur Folge hatte. Die Cannabinoidapplikation bei U87 Zellen resultierte für beide Substanzen in einer Reduktion der Kontaktfläche (Abb 3.3 B).

Auch bei den Lebendzellmikroskopieversuchen konnte keine klare Rezeptor- oder Agonistenspezifität festgestellt werden.

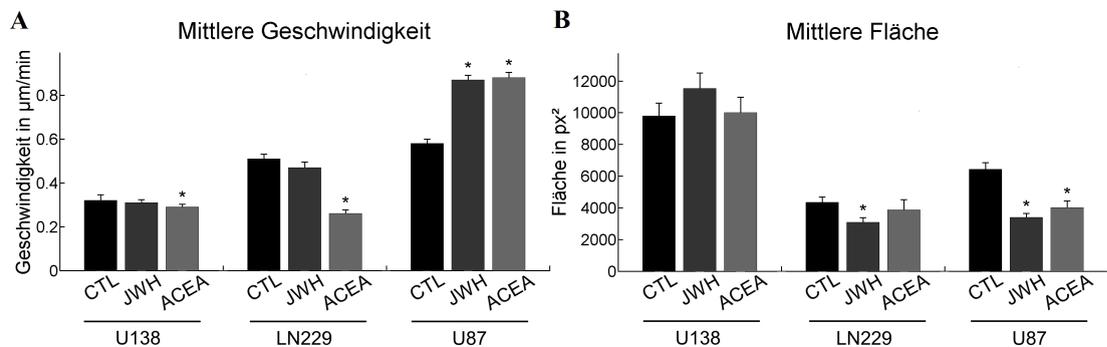


ABB. 3.3: Ergebnisse der Lebendzellmikroskopiemessungen unter Cannabinoideinfluss. A) zeigt die Ergebnisse der Geschwindigkeitsmessungen der Einzelzellen mit Standardfehler. Es wurden diverse Effekte beobachtet, die aber keine offensichtliche Rezeptor-/Agonistenspezifität aufzeigen. B) Darstellung der mittleren Kontaktfläche jedes Zelltyps mit Standardfehler. Der CB2 Agonist JWH 133 hatte eine Reduktion der Kontaktfläche bei U87 und LN229 Zellen zur Folge, jedoch keinen Effekt bei U138 Zellen. ACEA führte lediglich bei U87 Zellen zu einer Reduktion der Kontaktfläche. Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ gewählt. Das Sternchen bezeichnet signifikante Resultate bezüglich der Kontrolle derselben Zelllinie.

3.4 Invasioneigenschaften von Glioblastomzelllinien unter Cannabinoideinfluss

Für die Untersuchung der Invasivität der betrachteten Zelllinien und Behandlungen wurde ein Kokulturmodell von Tumorzellen mit organotypischen hippocampalen Schnittkulturen verwendet, bei dem die Tumorzellen drei bzw vier Tage Zeit für eine Invasion des Hirngewebes hatten. Innerhalb dieses Experimentalmodelles zeigten alle untersuchten Zelllinien ein invasives Verhalten. Für die Datenanalyse wurden alle Werte auf den Mittelwert der Kontrollmessung, der entsprechenden Zelllinie, normiert. Dementsprechend ist der Wert einer jeden Kontrolle $A_{CTL} = 1$. Bei U138 Zellen führte eine Behandlung

der Zellen mit ACEA, nach einer Zeit von 3 Tagen, zu einer Reduktion des Invasionsvermögens. Nach 4 Tagen konnte jedoch kein signifikanter Effekt mehr nachgewiesen werden. Die Applikation von JWH 133 hatte jedoch einen entgegengesetzten Effekt und führte sowohl nach 3 Tagen als auch nach 4 Tagen zu einer starken Erhöhung der Invasivität. Angewandt auf LN229 Zellen hatte ACEA keinen signifikanten Effekt zur Folge, während JWH 133 zu beiden Messzeitpunkten eine Reduktion des Invasionsvermögens zur Folge hatte. Weder der CB1 noch der CB2 Agonist hatten einen signifikanten Einfluss auf das Invasionsvermögen von U87 Zellen (Abb 3.4).

Auch bei der Messung des Invasionsvermögens konnte keine Cannabinoid- bzw Rezeptorspezifität der Effekte gezeigt werden.

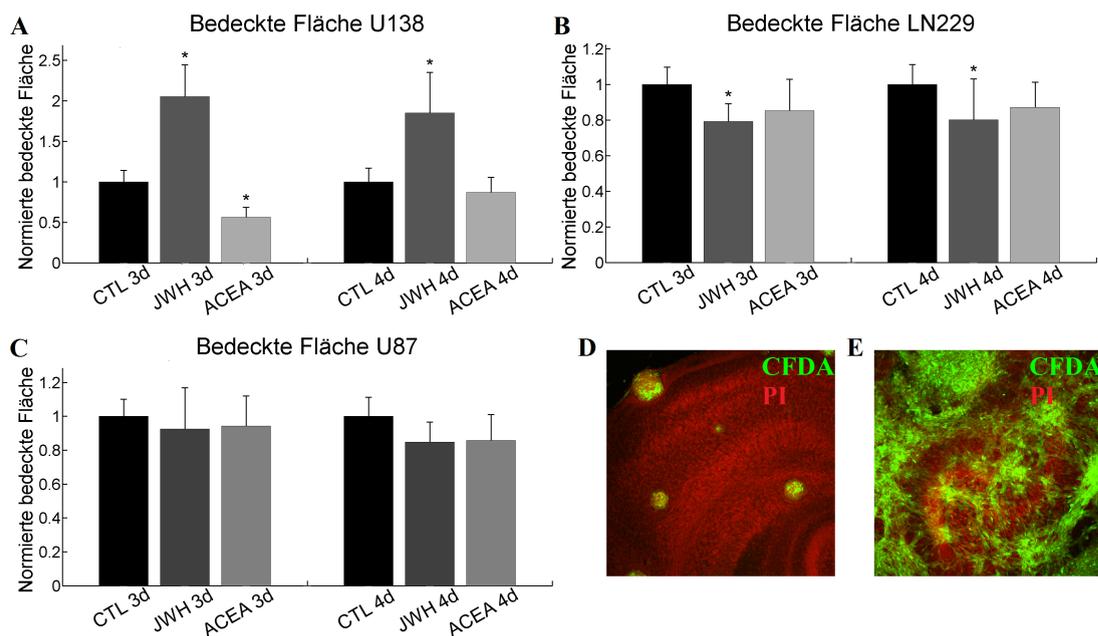


ABB. 3.4: Ergebnisse der Tumorinvasionsmessungen unter Cannabinoideinfluss. A) Für U138 Zellen konnte ein pro-tumoröser Effekt durch den CB2-Agonisten JWH 133 nach 3 bzw 4 Tagen Invasionszeit nachgewiesen werden, während ACEA eine anti-tumoröse Wirkung hatte. B) Im Gegensatz dazu hatte JWH 133 bei LN229 eine reduzierte Invasivität zur Folge, während ACEA keinen Effekt hatte. C) Bei U87 Zellen konnte kein Effekt durch eine Cannabinoidbehandlung nachgewiesen werden. D) Typisches Invasionsmuster generiert, durch U138 Zellen. Erkennbar sind klar abgegrenzte, sphärische Tumorspheroide in grün und die Struktur der Schnittkultur in Rot. E) Repräsentatives Bild der durch U87 und LN229 Zellen geformten Tumornetzwerke, bei denen keine klar abgrenzbaren Tumore erkennbar sind (grün) und in Rot die Zytoarchitektur der Schnittkultur. Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ gewählt. Das Sternchen bezeichnet signifikante Resultate bezüglich der Kontrolle derselben Zelllinie.

3.5 Einzelzeleigenschaften von Glioblastomzelllinien mit MACC1 Expression

Um Ergebnisse auch über die Stoffklasse der Cannabinoide hinaus verallgemeinern zu können wurden, neben den Cannabinoiden, die mit dem pro-tumorösen Faktor MACC1 transfizierte Zelllinie U138+ verwendet. Als potentieller Inhibitor für MACC1 induzierte Effekte wurde der c-Met-Inhibitor Crizotinib verwendet.

3.5.1 Elastische Eigenschaften von Glioblastomzelllinien mit MACC1 Expression

Die AFM Messungen zur Bestimmung der mechanischen und adhäsiven Eigenschaften einzelner Zellen wurden wie bei den Messungen zum Einfluss der Cannabinoide durchgeführt und sowohl das Young Modul als Maß für die Zellelastizität als auch die normierte Adhäsionsenergie bestimmt. Die weiteren ermittelten Parameter flossen ebenfalls in die Netzwerkanalyse mit ein. Bei den Berechnungen des Young Moduls ergab sich eine signifikante Erhöhung des Young Moduls durch die Überexpression von MACC1 in U138 Zellen. Diese Erhöhung konnte jedoch durch die Applikation des Inhibitors Crizotinib wieder rückgängig gemacht werden (Abb.3.5 A). Bei der Betrachtung der normierten Adhäsionsenergie konnten keine Veränderungen durch MACC1 festgestellt werden (Abb.3.5 B). Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass die Wirkung von MACC1 über den c-Met-HGF Signalweg vermittelt wird.

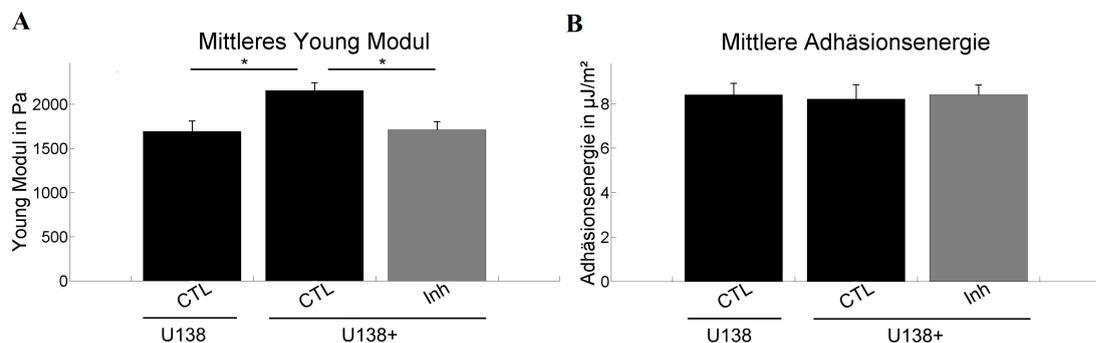


ABB. 3.5: Ergebnisse der AFM-Messungen unter MACC1 Einfluss. A) zeigt die mittleren Young Module unter dem Einfluss von MACC1, sowie deren Standardfehler. Es wurde eine Erhöhung des Young Moduls durch MACC1 beobachtet, die durch den entsprechenden Inhibitor wieder aufgehoben werden konnte. B) stellt die mittleren Adhäsionsenergien, inklusive Standardfehler dar. Es konnten keine Effekte beobachtet werden. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test genutzt, mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$. Sternchen bezeichnen signifikante Veränderungen.

3.5.2 Motile Eigenschaften von Glioblastozelllinien mit MACC1 Expression

Bei der Lebendzellmikroskopie wurden die gleichen Parameter wie zuvor ermittelt und es flossen alle Parameter in die Netzwerkanalyse mit ein. Die Messungen zur mittleren Geschwindigkeit der einzelnen Zellen zeigte qualitativ ein ähnliches Bild wie beim Young Modul. Die MACC1 transfizierten Zellen bewegten sich signifikant schneller, verglichen mit den Kontrollzellen. Der Effekt konnte jedoch durch den Inhibitor Crizotinib vollständig aufgehoben werden (Abb.3.6 A). Eine Analyse der Kontaktfläche zeigte zusätzlich, dass MACC1 die Zellkontaktfläche reduzierte. Dieser Effekt konnte zwar neutralisiert werden durch die Applikation des Inhibitors, der jedoch zusätzlich zu einer weiteren Erhöhung der Fläche gegenüber den U138 Zellen führte (Abb.3.6 B). Mit diesen Messungen zeigt sich ebenfalls, dass die Wirkung von MACC1 über den c-Met-HGF Signalweg vermittelt werden kann.

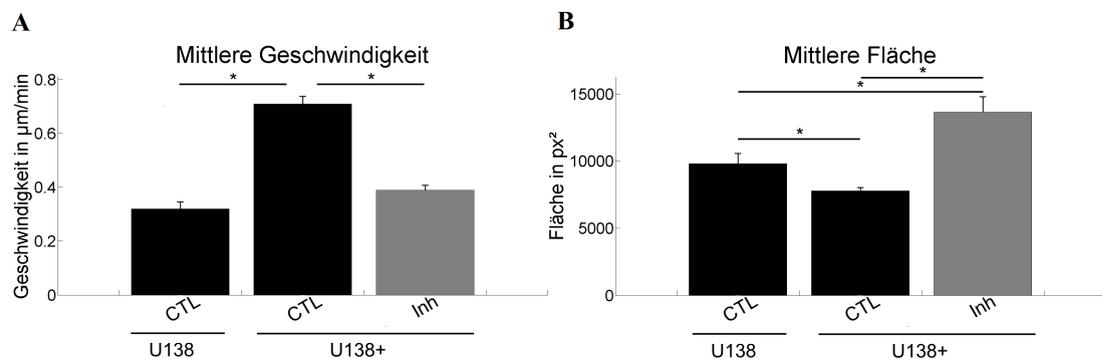


ABB. 3.6: Ergebnisse der Lebendzellmikroskopiemessungen unter MACC1 Einfluss. A) illustriert die Ergebnisse der Geschwindigkeitsmessungen, sowie deren Standardfehler. Auch hier konnte eine Steigerung durch MACC1 festgestellt werden, welche durch den Inhibitor wieder neutralisiert werden konnte. B) fasst die Ergebnisse der Kontaktflächenbestimmung mit den entsprechenden Standardfehlern zusammen. MACC1 verursachte eine Reduktion der Kontaktfläche, während der entsprechende Inhibitor diesen Effekt nicht nur rückgängig machte, sondern sogar zu einer Erhöhung der Kontaktfläche führte. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test genutzt, mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$. Sternchen bezeichnen signifikante Veränderungen.

3.6 Invasioneigenschaften von Glioblastozelllinien mit MACC1 Expression

Mit diesen Messungen wurden MACC1-abhängige Invasioneigenschaften von Tumorzellen im selben Kokulturmodell wie zuvor untersucht und die Kontrolle entsprechend auf eins normiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich nach drei Tagen Invasionszeit keine signifikante Änderung des Invasionsvermögens zeigte. Nach vier Tagen Invasionszeit konnte jedoch eine Erhöhung des Invasionsvermögens durch MACC1 festgestellt werden, welche durch Applikation des Inhibitors aufgehoben werden konnte (Abb.

3.7). Auch bei diesem Modell zeigt sich die, mindestens partielle, c-Met/HGF-Achsen abhängige Vermittlung der MACC1 induzierten Effekte erneut.

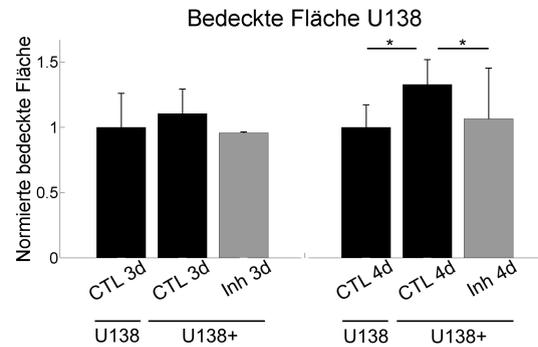


ABB. 3.7: Ergebnisse der Tumorinvasionsmessungen unter MACC1 Einfluss. Für U138 Zellen konnte ein pro-tumoröser Effekt durch MACC1 nach vier Tagen Invasionszeit nachgewiesen werden, der durch die Applikation des Inhibitors blockiert werden konnte. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test genutzt, mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$. Sternchen bezeichnen signifikante Veränderungen.

3.7 Einzelzeleigenschaften von Glioblastomzelllinien nach Bestrahlung

Als weiteres Modell für transiente, zelluläre Alterationen wurde die Bestrahlung mit einer Dosis von $D = 2Gy$ gewählt. Diese Dosis entspricht der maximalen Tagesdosis bei der Strahlentherapie, während einer Behandlung. Somit diente die Bestrahlung als weiterer Aspekt für die Verallgemeinerung beobachteter Effekte. Für diese Experimente wurden die zwei Zelllinien LN229 und U87 ausgewählt, da somit an jeder der bisher verwendeten Zelllinien (U138, U87, LN229) eine weitere, cannabinoidunabhängige transiente bzw nicht-transiente Veränderung durchgeführt wurde.

3.7.1 Elastische Eigenschaften von Glioblastomzelllinien nach Bestrahlung

Die AFM Messungen erfolgten $24h$ nach der Bestrahlung und es wurden die gleichen Parameter wie zuvor ermittelt und für die spätere Netzwerkanalyse verwendet. Die Analyse der Elastizität der LN229 Zellen zeigte, dass die Bestrahlung mit $2Gy$ zu einer Erhöhung des Young Moduls führte, während bei U87 Zellen kein Effekt festgestellt werden konnte (Abb.3.8 A). Die normierte Adhäsionsenergie wurde sowohl für LN229 Zellen als auch für U87 Zellen signifikant erniedrigt (Abb.3.8 B). Somit zeigte die Bestrahlung lediglich hinsichtlich der Elastizität einen heterogenen Effekt.

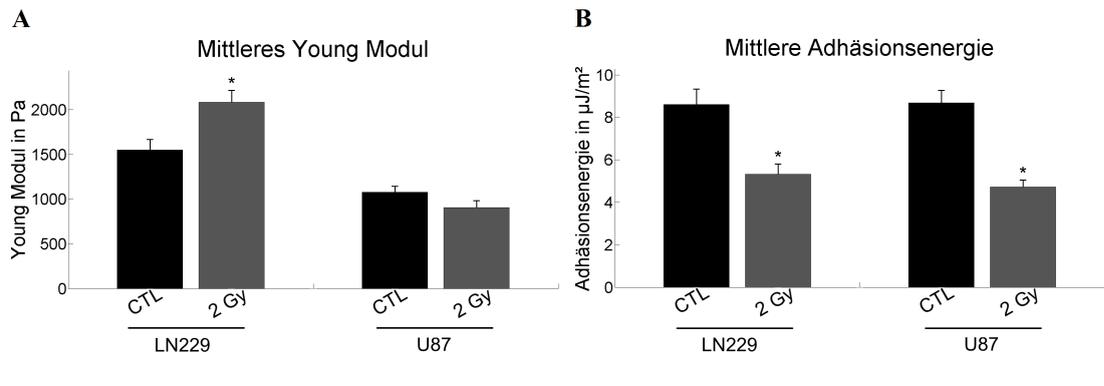


ABB. 3.8: Ergebnisse der AFM Messungen bei Bestrahlung. A) zeigt die mittleren Young Module mit Standardfehler. Es wurde eine Erhöhung des Young Moduls durch Bestrahlung für LN229 Zellen beobachtet, jedoch keine Veränderung für U87 Zellen. B) stellt die mittleren Adhäsionsenergien und Standardfehler dar. Bei beiden Zelllinien führte die Bestrahlung zu einer signifikanten Reduktion der gemessenen Adhäsionsenergien. Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ gewählt. Das Sternchen bezeichnet signifikante Resultate bezüglich der Kontrolle derselben Zelllinie.

3.7.2 Motile Eigenschaften von Glioblastomzelllinien nach Bestrahlung

Die Lebendzellmikroskopiemessungen erfolgten $24h$ nach der Bestrahlung und es wurden die gleichen Parameter wie zuvor ermittelt und für die spätere Netzwerkanalyse verwendet. Bei der Betrachtung der motilen Eigenschaften der untersuchten Zellen konnte festgestellt werden, dass die Bestrahlung bei LN229 Zellen bewegungshemmend wirkte, während bei U87 Zellen ein konträrer Effekt beobachtet wurde (Abb.3.9 A). Die Berechnung der Kontaktfläche zeigte für beide Zelllinien eine Reduktion in Folge der Bestrahlung (Abb.3.9 B). Analog zu den mechanischen Eigenschaften konnte auch hier ein heterogener Effekt der Bestrahlung beobachtet werden.

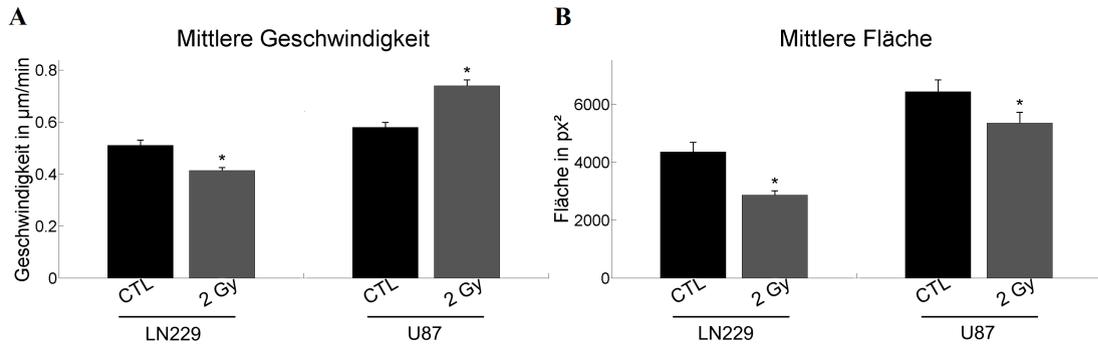


ABB. 3.9: Ergebnisse der Lebendzellmikroskopiemessungen bei Bestrahlung. A) Ergebnisse der Geschwindigkeitsmessungen, sowie deren Standardfehler. Hier konnte bei den beiden Zelllinien ein entgegengesetzter Effekt beobachtet werden. Während die Bestrahlung bei LN229 Zellen zu einer Reduktion der mittleren Geschwindigkeit führte, wurde bei U87 Zellen eine Erhöhung festgestellt. B) fasst die Ergebnisse der Kontaktflächenbestimmung, inklusive Standardfehlern, zusammen. Hierbei konnte eine Reduktion der Kontaktfläche für beide Zelltypen festgestellt werden. Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ gewählt. Das Sternchen bezeichnet signifikante Resultate bezüglich der Kontrolle derselben Zelllinie.

3.8 Invasionseigenschaften von Glioblastomzelllinien nach der Bestrahlung

Die Bestimmung der Invasionsfähigkeit der bestrahlten Zellen erfolgte im selben Kulturmodell wie zuvor und wurde drei bzw vier Tage nach Beginn der Tumordinvasion evaluiert. Die Messung der von Tumorzellen bedeckten Fläche zeigte dabei sowohl nach drei als auch nach vier Tagen Invasionszeit eine signifikante Reduktion des Invasionsvermögens für U87 und LN229 Zellen (Abb. 3.10 A und B).

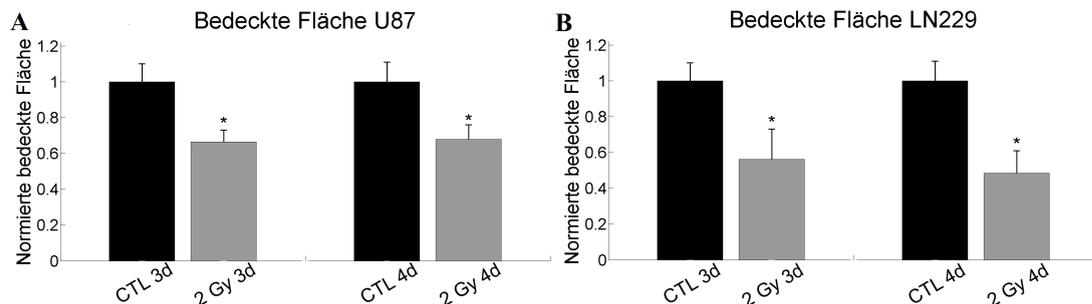


ABB. 3.10: Ergebnisse der Tumordinvasionsmessungen nach der Bestrahlung. A) Zeigt die anti-tumöröse Wirkung von Bestrahlung auf LN229 Zellen, nach drei und vier Tagen Invasionszeit. B) In U87 Zellen führte die Bestrahlung ebenfalls zu einem Rückgang der, durch Tumorzellen bedeckten, Fläche nach drei und vier Tagen Invasionszeit. Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ gewählt. Das Sternchen bezeichnet signifikante Resultate bezüglich der Kontrolle derselben Zelllinie.

3.9 Einzelzeleigenschaften von Glioblastomzelllinien mit IDH1 Mutation

Als weiteres, unabhängiges Modell zur Verallgemeinerung der beobachteten Effekte wurde die IDH1 Mutation IDH1-R132H betrachtet, die mit einem besseren klinischen Ergebnis assoziiert ist. Für diese Versuche wurden die Zelltypen LN229, U251 und U343 und ihre transfizierten Varianten verwendet. Dabei wurden pro Zelllinie 4 verschiedene Typen genutzt: eine unveränderte Variante (CTL), ein mit Leervektor transfizierter (Leer), ein IDH1 überexprimierender (WT) und ein IDH1-R132H exprimierender (Mut) Typus.

3.9.1 Elastische Eigenschaften von Glioblastomzelllinien bei IDH1 Mutation

Die durchgeführten AFM Messungen wurden nach dem bereits beschriebenen Muster durchgeführt und alle ermittelten Parameter flossen in die Netzwerkanalyse mit ein. Nach der Berechnung des Young Moduls ergab sich weder für die LN229 Zellen, noch für die U251 Zellen oder die U343 Zellen ein signifikanter Effekt (Abb. 3.11 A). Die Auswertung der zugehörigen Adhäsionsenergien zeigte ebenfalls keine Änderungen für LN229 Zellen, U251 Zellen und U343 Zellen (Abb. 3.11 B).

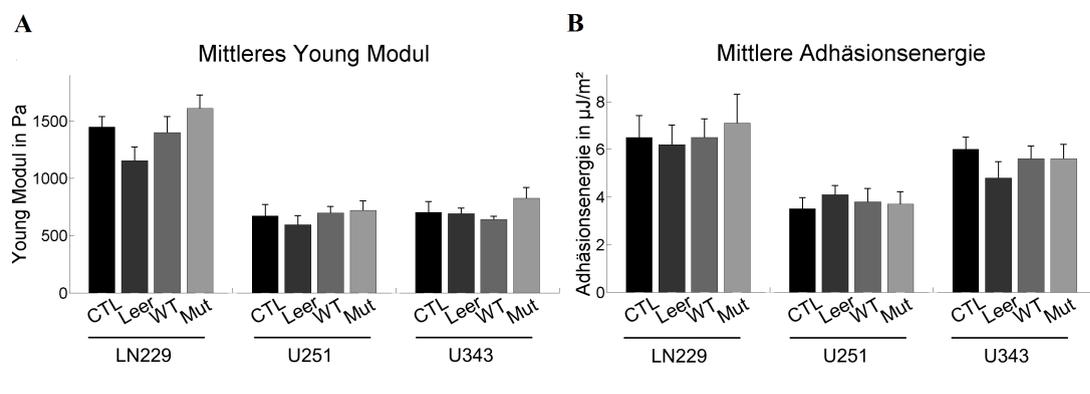


ABB. 3.11: Ergebnisse der Einzelzellmessung für die IDH1 Mutation. A) stellt die berechneten Young Module mit Standardfehler dar. Es konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. B) zeigt die Adhäsionsenergien, inklusive Standardfehler. Es konnte ebenfalls kein signifikanter Effekt festgestellt werden. Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney Test mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ gewählt.

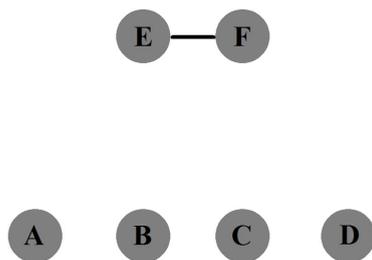
3.10 Netzwerkanalyse der Einzelzeleigenschaften

Um die Zahl der Parameter zu reduzieren und stochastische Abhängigkeiten zwischen den Einzelzellparametern zu ermitteln, wurde ein netzwerkanalytischer Ansatz genutzt. Bei der Netzwerkanalyse wurden alle in den Kapiteln 2.1 und 2.3.3 genannten Einzelzeleigenschaften, mit Hilfe der Transfinformation, analysiert und klassifiziert. Wenn die

Transinformation zweier Parameter größer als Null ist, sind die betrachteten Parameter nicht vollständig unabhängig voneinander. Für die Lebendzellmikroskopiemessungen ergab sich eine stochastische Abhängigkeit zwischen der mittleren Geschwindigkeit und der Persistenzgeschwindigkeit (Abb. 3.12 A). Bei den Parametern der AFM Messungen ließen sich mehrere Zusammenhänge ermitteln: Sprungenergie und -kraft waren korreliert, Young Modul und Indentation zeigten Abhängigkeiten voneinander, sowie die mittlere Adhäsionsenergie, totale Adhäsionsenergie und Abrisskraft (Abb. 3.12 B).

A

Lebendzellmikroskopie- messungen

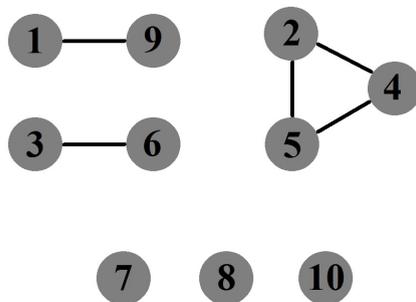


Parameter:

A = Kontaktfläche
 B = Mittlere quadratische Verschiebung
 C = Direktionalität
 D = Persistenzzeit
 E = Persistenzgeschwindigkeit
 F = Mittlere Geschwindigkeit

B

AFM Messungen



Parameter:

1 = Indentation
 2 = Normierte Adhäsionsenergie
 3 = Sprungenergie
 4 = Gesamtadhäsionsenergie
 5 = Abrisskraft
 6 = Sprungkraft
 7 = Anstieg der Annäherungskurve
 8 = Zellradius
 9 = Young Modul
 10 = Sprungzahl

ABB. 3.12: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Netzwerkanalyse. Knoten wurden dabei als Kreise und Kanten als Linien, die die Kreise verbinden, dargestellt. Die Buchstaben und Zahlen entsprechen den, auf der rechten Seite, aufgelisteten Parametern. A) zeigt die sich ergebenden Abhängigkeiten für die Lebendzellmikroskopiemessungen und B) für die AFM Messungen.

Nach der formalen Generierung des Netzwerkes wurde ein sogenanntes „Community Grouping“ durchgeführt, also eine Zuordnung der Parameter des Netzwerkes in Teilnetzwerke. Diese Teilnetzwerke haben eine deutlich höhere Kantendichte innerhalb des Teilnetzwerkes, als sie es zum Rest des Netzwerkes haben. Für die Bestimmung der Teilnetzwerke wurde die Modularität, die den Unterschied zwischen einem zufällig angeordneten Netzwerk und dem betrachteten Netzwerk charakterisiert, maximiert. Die

Maximierung der Modularität Q führte zu Parameterclustern, die mit den oben beschriebenen identisch sind. Die Berechnung und Einführung der Kompositparameter, also derjenigen Parameter die ein komplettes Teilnetzwerk repräsentieren, reduzierte somit die Zahl der betrachteten Parameter von 16 auf 11 (Abb. 3.12). Für die Lebendzellmikroskopiemessungen konnte der Cluster - geformt aus mittlerer Geschwindigkeit und Persistenzgeschwindigkeit - als eine verallgemeinerte Geschwindigkeit interpretiert werden. Innerhalb des AFM Parameternetzwerkes konnte die Kombination aus Indentation und Young Modul als eine verallgemeinerte Elastizität interpretiert werden, da beide Größen die Antwort der Zelle bezüglich einer äußeren Kraft beschreiben, das Young Modul in Form einer Zellelastizität und die Indentation als modellfreie Deformation unter der einwirkenden Kraft. Die drei adhäsiven Größen, normierte Adhäsionsenergie, Gesamtadhäsionsenergie und Abrisskraft, beschreiben adhäsive Eigenschaften der Zelle und können somit in Form eines erweiterten Adhäsionsbegriffes verstanden werden. Die Energie und Kraft der beobachteten diskreten Sprünge in der Rückzugskurve der AFM Messungen sind voneinander per Definition abhängig, da gilt $E = \int F ds$, mit der Energie E , der Kraft F und der Sprunglänge s . Somit beschreibt der resultierende Kompositparameter die energetischen Eigenschaften der auftretenden Abrissprozesse. Zur Evaluation eines Zusammenhanges zwischen den ermittelten Kompositparametern und der Tumorinvasionsfähigkeit wurde eine Korrelationsanalyse mit Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. Dies entspricht der Untersuchung, ob es eine beliebige monotone Funktion gibt, die einen Zusammenhang zwischen der Invasivität und den Kompositparametern gibt. Eine Analyse der Kompositparameter in Relation zur Tumorinvasivität zeigte, dass ausschließlich der Kompositparameter, gebildet aus Young Modul und Indentation (kurz: verallgemeinerte Elastizität), mit der Invasivität korreliert, mit einem Spearmankoeffizienten von $r_{3d} = -0.917[-0.740; -0.975]$ für 3 Tage Invasionszeit und $r_{4d} = -0.956[-0.855; -0.987]$ für 4 Tage Invasionszeit (Abb. 3.13). Es ist zu erkennen, dass für beide Invasionszeitpunkte eine Abnahme der verallgemeinerten Elastizität mit einer Zunahme der Invasivität einhergeht und andersherum. Keiner der anderen Kompositparameter zeigte einen klaren Zusammenhang mit der Invasivität.

Der gleiche Zusammenhang, zwischen der verallgemeinerten Festigkeit und der Aggressivität, konnte ebenfalls für die betrachtete IDH1 Mutation beobachtet werden (Abb. 3.14 C). Hierbei führte eine Leervektortransfektion in den 3 Zelllinien U251, U343 und LN229 zu keinem Effekt auf den Kompositparameter "verallgemeinerte Elastizität", während eine Überexpression von IDH1 zu einer Erhöhung des selbigen führte und die IDH1-R132H Mutation eine erneute Steigerung des Kompositparameters zur Folge hatte. Da die IDH1-R132H Mutation mit einem verbesserten klinischen Resultat, aufgrund einer geringeren Therapieresistenz und Aggressivität, assoziiert ist, bestärken diese Daten die in Abb. 3.13 dargestellten Befunde.

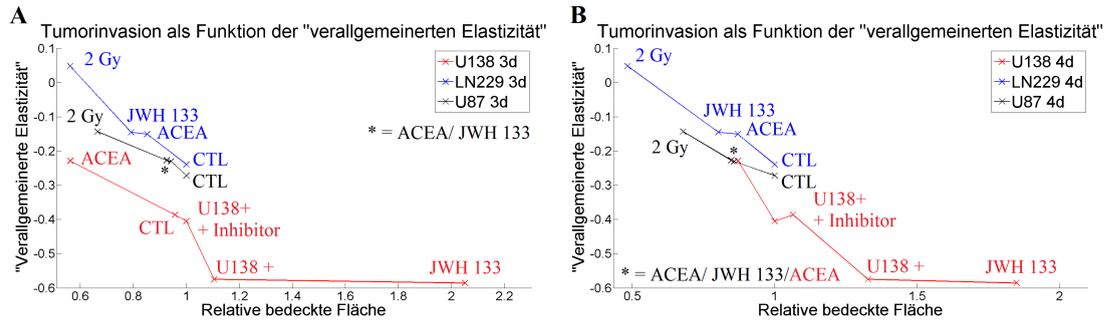


ABB. 3.13: Darstellung der verallgemeinerten Elastizität zusammen mit der Tumordinvasivität. A) zeigt die Invasivität für alle Zelllinien und Behandlungen nach 3 Tagen Invasionszeit aufgetragen über der verallgemeinerten Elastizität. B) zeigt denselben Zusammenhang nach 4 Tagen Invasionszeit. Es ist zu erkennen, dass in beiden Fällen eine Abnahme der verallgemeinerten Elastizität mit einer Zunahme der Invasivität einhergeht und andersherum. Die entsprechenden Spearmankorrelationskoeffizienten ließen sich zu $r_{3d} = -0.917[-0.740; -0.975]$ für 3 Tage Invasionszeit und $r_{4d} = -0.9558[-0.855; -0.987]$ für 4 Tage Invasionszeit berechnen.

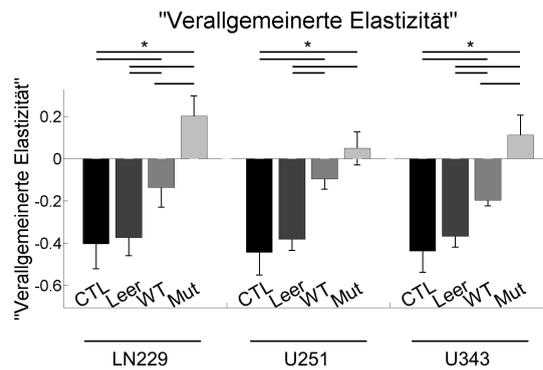


ABB. 3.14: Ergebnisse für die verallgemeinerte Elastizität für die IDH1 Mutation. Dabei ist zu erkennen, dass eine Transfektion mit dem Leervektor keinerlei Effekt auf den Kompositparameter "verallgemeinerte Elastizität" hatte, während eine IDH1 Überexpression zu einer Erhöhung führte. Die entsprechende IDH1-R132H Mutation führte zu einer weiteren Erhöhung des Kompositparameters. Dieses Verhalten konnte für alle verwendeten Zelllinien beobachtet werden. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test genutzt, mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$. Sternchen bezeichnen signifikante Veränderungen.

3.11 Evaluation der Messgenauigkeiten

3.11.1 Größtfehlerabschätzung - AFM

Die Berechnungen für die Größtfehlerabschätzung für die AFM Daten wurden wie in Kapitel 2.11.1 beschrieben durchgeführt.

Aus dem Messbereich der Annäherungskurve, der oberhalb der Zelle liegt, ergibt sich, dass die Rauschamplitude und damit die doppelte maximale Abweichung der gemessenen Kraft vom realen Mittelwert, zwischen $2\Delta F = 60 - 100pN$ liegt. Die Genauigkeit

der Bestimmung der Indentation lässt sich nur abschätzen aus einer virtuellen Verschiebung der Kraft-Achse, um deren maximale Schwankung von $50pN$. Damit ergibt sich eine maximale Verschiebung um $\Delta\delta = 35nm$. Typische Werte für den Zellradius lagen zwischen $R = 8 - 15\mu m$, während die maximale Kraft bei $F = 3nN$ festgesetzt wurde. Die Zelllinie mit dem höchsten Young Modul hatte einen Mittelwert von $E = 2158Pa$, während der niedrigste Wert bei $E = 1028Pa$ lag. Eingesetzt in die Gleichung für die Fehlerabschätzung ergibt sich somit, bei Wahl der Werte in der Form, dass der Fehler maximiert wird: $\Delta E = 188Pa$.

Für jede Zelle wurden 5 Kraft-Abstands-Kurven aufgenommen und der daraus resultierende Mittelwert genutzt. Durch die Nutzung des zentralen Grenzwertsatzes ist davon auszugehen, dass die ermittelten Werte sich mit $1/\sqrt{n}$ dem wahren Mittelwert annähern und somit auch die maximalen Fehlergrenzen um denselben Faktor (hier: ≈ 0.44) skaliert werden müssen. Gleichzeitig schwankt die experimentell gemessene Standardabweichung, abhängig von Zelltyp und Behandlung, innerhalb der Messungen zwischen $\sigma_E = 449 - 938Pa$. Somit ist davon auszugehen, dass die biologische Schwankung mindestens um den Faktor 4 größer ist, als die Geräteungenauigkeit im ungünstigsten aller Fälle. Der größte Anteil der gemessenen Schwankungen, bei der Bestimmung des Young Moduls, ist somit biologischer Natur.

Für die Abschätzung des Fehlers bei der Berechnung der normierten Adhäsionsenergien $\gamma = E_{adh}/(\pi a^2)$ wurde ebenfalls der in Kapitel 2.11.1 beschriebene Ansatz verwendet. Für die gemessenen Rückzugskurven ergab sich die Abrisslänge im Mittel zu $\approx 1\mu m$, was aufgrund der Symmetrie hier $s/2$ entspricht, während die mittlere totale Adhäsionsenergie etwa $E_{adh} \approx 0.18fJ$ und die mittlere Abrisskraft etwa $F_s \approx 380pN$ betrug. Der Parameter c lässt sich somit für diese Werte aus Gleichung 2.21 zu $c = 361J/m^3$ ermitteln. Somit ergibt sich die Abweichung der totalen Adhäsionsenergie, unter Berücksichtigung von $\Delta s = 35nm$, $\Delta F_s = 50pN$ (siehe vorher), zu $\Delta E_{adh} = 0.05fJ$. Aus diesen Werten lässt sich nun die maximale Unsicherheit der Kontaktfläche ermitteln zu $\Delta a^2 = 0.189\mu m^2$. Folglich ergibt sich, bei einer gemessenen mittleren Kontaktfläche von $a^2 = 14.3\mu m^2$, für die normierte Adhäsionsenergie $\Delta\gamma = 1.17\frac{\mu J}{m^2}$.

Auch hier wurden für jede Zelle 5 Kraft-Abstands-Kurven aufgenommen und der daraus resultierende Mittelwert genutzt, somit ergibt sich auch hier ein Skalenfaktor von ≈ 0.44 . Die entsprechenden gemessenen Standardabweichungen liegen, abhängig von Zelltyp und Behandlung, innerhalb der Messungen zwischen $\sigma_\gamma = 2.15\frac{\mu J}{m^2}$ und $\sigma_\gamma = 4.00\frac{\mu J}{m^2}$. Entsprechend zu den Berechnungen für das Youngmodul ergibt sich auch hier, dass die biologische Schwankung mindestens um den Faktor 2 größer ist, als die Geräteungenauigkeit im betrachteten Fall. Der Größte Anteil der gemessenen Schwankungen der normierten Adhäsionsenergien sind somit biologischer Natur bzw der Beschreibungsgüte des zu Grunde liegenden DMT bzw JRK Modelles geschuldet.

3.11.2 Größtfehlerabschätzung - Lebendzellmikroskopie

Die Einzelbildaufnahmen der Lebendzellmikroskopiemessungen erlauben eine Abschätzung der Genauigkeit der Messungen bezüglich der intrinsischen Variabilität der Zelle im Zeitverlauf. Ein typischer Zeitverlauf, gezeigt am Beispiel einer LN229 Zelle, der auch für die weiteren Abschätzungen verwendet wird, ist in Abb. 3.15 dargestellt. Hieraus ist bereits ersichtlich, dass die intrinsischen, biologisch bedingten Schwankungen einer hohen Variabilität unterliegen. Nach der automatisierten Analyse der einzelnen Bilder wurde für alle Positionen eine manuelle Überprüfung der erfolgten Kantendetektionen durchgeführt und bei einer Abweichung der Zellfläche von $\gtrsim 5\%$ wurde das entsprechende Bild aus der weiteren Auswertungsroutine entfernt. Somit kann bei der Berechnung der Kontaktfläche von Fehlern von $\Delta A = 0.05A$ ausgegangen werden.

Für das hier vorliegende, repräsentative Beispiel beträgt der Mittelwert der Fläche $A = 3284px$ und für die Geschwindigkeit $v = 0.346\mu m/min$. Somit ergibt sich bei den Annahmen aus 2.11.2 eine Verschiebung um $\approx 2.5px$, was $\approx 1.6\mu m$ entspricht. Folglich lässt sich der Größtfehler bei der Bestimmung der Geschwindigkeit zu $\Delta v \approx 0.32\mu m/min$ berechnen. Im Vergleich dazu beträgt die Standardabweichung innerhalb des Zeitverlaufes bei der Kontaktfläche $\sigma_A = 881px$, also $\sigma_A = 0.27A$, während bei der Geschwindigkeit eine Standardabweichung von $\sigma_v = 0.21\mu m/min$ gemessen werden konnte. Für die Berechnung der, in den vorherigen Kapiteln dargestellten Werte, wurde der Mittelwert aus den Zeitreihen betrachtet, weshalb der entsprechende Fehler mit $1/\sqrt{n} \approx 0.06$ skaliert.

Bei der Messung der Kontaktflächen sieht man leicht, dass die Standardabweichung bei den Populationsmessungen aller Zelllinien etwa 20% der Kontaktfläche ausgemacht hat, so dass auch hier erneut die Biodiversität, sowohl auf Ebene der einzelnen Zelle im Zeitverlauf, als auch auf Populationsebene den dominierenden Einfluss hat. Bei der Geschwindigkeitsmessung liegen die Standardabweichungen der Populationsmessungen, abhängig von Zelltyp und Behandlung, zwischen $\sigma_v = 0.11 - 0.34\mu m/min$. Während also bei der Messung des Verlaufs der Geschwindigkeit die technische Seite in ungünstigen Fällen einen mindestens ebenso großen Einfluss haben kann, lässt sich für die Ermittlung der Populationsmittelwerte der Geschwindigkeit schlussfolgern, dass die Schwankungen größtenteils von biologischen Faktoren verursacht werden.

3.11.3 Fehlerabschätzung Invasionsversuche

Bei den durchgeführten Invasionsversuchen ist keine Größtfehlerabschätzung im obigen Sinne möglich. Eine Betrachtung möglicher Fehlerquellen zeigt jedoch, dass 2 Faktoren eine besondere Bedeutung zukommt: die Zahl der applizierten Zellen, sowie diejenige Zahl der Zellen die auf dem Schnitt verbleibt. Bei der Durchführung der Tumorinvasionsexperimente wird, nach Ablösen und Zentrifugation, die Zellzahl ermittelt, woraufhin ein erneuter Zentrifugationsschritt mit anschließendem Absaugen des Überstandes erfolgte. Dies war notwendig um die benötigte Zelldichte von $50.000\text{Zellen}/10\mu l$ zu erreichen, führt jedoch zu potenziellen Ungenauigkeiten. Zu nennen ist dabei die Möglichkeit, dass während des Absaugens des Überstandes ein Teil der Zellen mit abgesaugt wurde. Dem

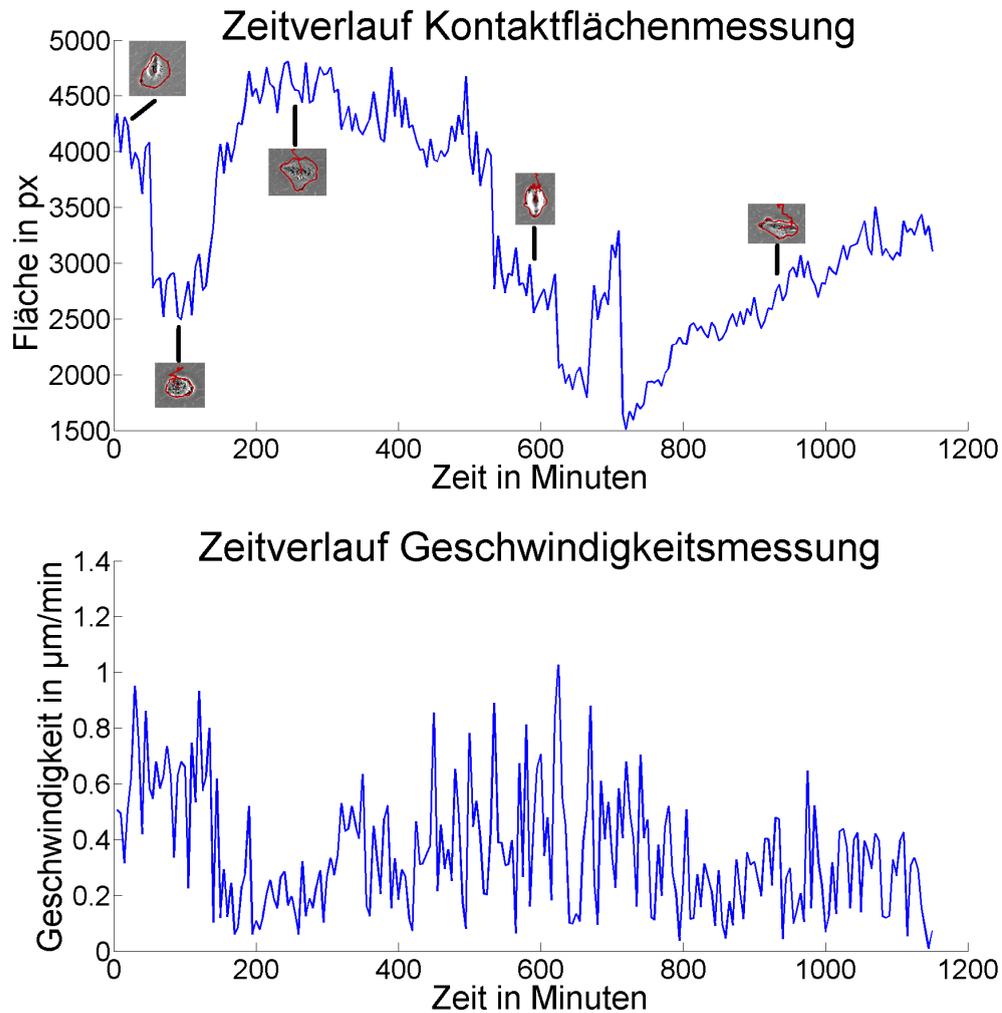


ABB. 3.15: Darstellung eines typischen Zeitverlaufes für die Lebendzellmikroskopie-messungen am Beispiel einer LN229 Zelle. Der obere Graph zeigt den Zeitverlauf der Kontaktfläche, sowie Abbildungen, inklusive entsprechender, erfolgreicher Detektion der Zelle zum entsprechenden Zeitpunkt. Man sieht hierbei einen phasischen, stark schwankenden Verlauf der Zellgröße, zwischen einer Minimalgröße von $1507px$ bis hin zu $3284px$. Der untere Graph stellt den entsprechenden Geschwindigkeitsverlauf für dieselbe Zelle dar. Auch hier sind sehr starke Schwankungen von $0.0095\mu m/min$ bis $1.0271\mu m/min$ zu beobachten, die jedoch keine klar definierten Phasen aufweisen.

wurde jedoch entgegengewirkt durch einen 2. Zählschritt, nach der Herstellung der entsprechenden Zelldichte. Somit konnte gewährleistet werden, dass die Zellzahl nur um $\lesssim 5\%$ abweicht. Eine weitere Fehlerquelle ist die Zellapplikation, da die in Abb. 2.6 dargestellte Form der Tumorinvasionsversuche stark vereinfacht ist. Auf der Schnittkultur befindet sich jedoch ein Flüssigkeitsfilm, welcher dafür sorgt, dass die applizierte Zelllösung den kompletten Schnitt und einen Teil seiner Umgebung benetzt. Zur Minimierung hierdurch verursachter Schwankungen wurde bei jedem Experiment die gleiche Zelldichte von $50.000Zellen/10\mu l$ und ein konstantes Volumen von $10\mu l$ appliziert. Weiterhin wurde bei der Auswertung auf die Größe des Schnittes normiert, um zu gewährleisten, dass die Zahl der potentiell invadierenden Zellen unabhängig von der

Schnittgröße ist. Die exakte Ungenauigkeit die durch die unklare Zahl von invadierenden Zellen hervorgerufen wird, lässt sich insgesamt jedoch nur sehr schwer abschätzen. Die hohen Schwankungen innerhalb der Messungen zeigen jedoch, dass die getroffenen Maßnahmen zur Reduktion dieses Effektes nur unzureichend funktioniert haben oder innerhalb des Systems eine hohe Biodiversität vorliegt. Eine genaue Differenzierung der beiden Größen ist an dieser Stelle nicht möglich und muss mit einer erhöhten Stichprobenzahl kompensiert werden. Für die Analyse von Cannabinoid- und Bestrahlungseffekten auf die Tumorinvasion wurden mindestens 20 Schnitte verwendet, woraus ein Skalenfaktor von $1/\sqrt{n} \approx 0.22$ resultiert. Im Falle der Cannabinoid- und Bestrahlungsuntersuchungen konnten bereits Effekte aufgelöst werden, die eine Abweichung von 20% vom Kontrollwert hatten, wodurch biologisch relevante Unterschiede bereits gut nachweisbar sind. Bei den MACC1 Untersuchungen wurden dagegen nur 7 ($1/\sqrt{n} \approx 0.38$) bzw 10 ($1/\sqrt{n} \approx 0.31$) Schnittkulturen untersucht. Die Analyse der Invasionsdaten, die den Effekt von MACC1 auf das Invasionsvermögen untersuchten, zeigten keinen Effekt nach 3 Tagen Invasionszeit, jedoch eine MACC1 abhängige Modulation der Invasivität nach 4 Tagen. Ob eine erhöhte Stichprobenzahl den Nachweis eines biologisch signifikanten Effektes - im Falle der 3 tägigen Tumorinvasion MACC1 transfizierter Zellen - erbringen kann bleibt jedoch fraglich.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Interpretation der Rasterkraftmikroskopiedaten

Für diese Arbeit wurden einzelne Zellen mit einem AFM bezüglich ihrer mechanischen und adhäsiven Eigenschaften untersucht. Die genutzten Zellen wurden 15min nach dem Aussäen vermessen, damit sie eine nahezu kugelförmige Geometrie besitzen, welche Voraussetzung für die Applikation des Hertzmodells ist [444]. Nach einer solch kurzen Adhäsionszeit ist die Zyttoarchitektur der Zelle nur unvollständig ausgeprägt [234, 319, 445, 446]. Eine solche Zelle besitzt noch keine Stressfasern, aber ein ausgeprägtes kortikales Aktinnetzwerk, sowie im Zellinneren eine nahezu isotrope Aktinstruktur [319, 445, 446]. Analog zu vielen Aktinstrukturen kollabiert auch das Intermediärfilamentnetzwerk durch die Trypsinierung und zieht sich in den juxt nukleären Raum zurück [234]. Während der ersten zwei Stunden nach dem erneuten Aussäen ist Vimentin im peripheren Bereich der Zelle nur in Form von nicht vernetzten Protofilamenten zu finden und formt erst später weitere Filamente die mit dem juxt nukleären Bereich verbunden sind [234]. Im Gegensatz dazu erscheint die Struktur der Mikrotubuli typisch netzwerkartig [319, 446]. Für die hier durchgeführten Messungen wurden Zellen einer Kraft von $F = 3nN$ ausgesetzt, was zu einer zentralen Indentation von $\delta \approx 1.2 - 1.4\mu\text{m}$, bei einem mittleren Zelldurchmesser von $d \approx 15 - 25\mu\text{m}$ und somit zu einer relativen Deformation von $D \approx 5 - 9\%$ führte. Folglich ist die zentrale Indentation klein gegenüber der Zellgröße, weshalb Intermediärfilamente nur einen sehr kleinen Einfluss auf die gemessenen Elastizitätsmodule haben [220, 229, 320]. Weiterhin konnten vorherige Studien zeigen, dass Mikrotubuli einen vernachlässigbaren Einfluss auf die gemessenen Elastizitätsmodule haben [326, 334]. Eine Messung des elastischen Moduls von einzelnen Zellen mittels AFM determiniert, in der hier verwendeten Methodik, somit höchstwahrscheinlich hauptsächlich die Eigenschaften bzw Veränderungen des Aktinzytoskeletts, also des Aktinkortexes und des isotropen Netzwerkes im inneren der Zelle.

Neben den elastischen Eigenschaften einzelner Zellen wurden in dieser Arbeit auch Adhäsionseigenschaften aus den Rückzugskurven des Cantilevers ermittelt. Da die AFM

Messungen in Kulturmedium stattfinden muss der Einfluss der Absorption von Proteinen des Serums durch den Cantilever betrachtet werden. Die Absorption der Proteine kann zu einer spezifischen Adhäsionsbindung zwischen Cantilever und Zelle führen, welche sich beim Abriss der Bindung als diskreter Sprung äußert [284]. Ein Vergleich der Kraftdifferenz vor und nach dem Abriss liefert eine mittlere Kraft von $F_{\text{Sprung}} \approx 0.07nN$ für einzelne Abrisse, wobei für jede Messkurve im Mittel $n \approx 0.5$ solcher Abrissprozesse beobachtet werden konnten. Die maximale Adhäsionskraft betrug jedoch im Gegensatz dazu $F_{\text{max}} \approx 0.3 - 0.4nN$, weshalb die diskreten Abrissprozesse einen Anteil von $q \approx 8.8 - 11.7\%$ an der maximalen Adhäsionskraft hatten. Folglich sind die adhäsiven Eigenschaften, die während der AFM Messungen bestimmt wurden, hauptsächlich durch unspezifische Interaktionen, wie zum Beispiel elektromagnetische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte, geometrischen Veränderungen, etc determiniert.

4.2 Effekte von Cannabinoiden auf Glioblastomzellen

4.2.1 Cannabinoide verändern die Elastizität von Glioblastomzellen

In dieser Arbeit wurden Einzelzeleigenschaften von Glioblastomzelllinien unter dem Einfluss von CB1 und CB2 Agonisten untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Cannabinoide, die mit dem Zytoskelett assoziierte Elastizität, beeinflussen. Frühere Studien zur Interaktion zwischen Cannabinoiden und dem Zytoskelett konnten zeigen, dass in Myelomzellen eine Inhibition von CB2 zu einer Reduktion der β -Aktin und β -Tubulin Proteinmenge führte [393]. Eine Reorganisation des Mikrotubuli- und Aktinnetzwerkes konnte ebenfalls in weiteren Zelltypen, die mit Cannabinoiden behandelt wurden, beobachtet werden [394–397]. Dabei wurden jedoch keine präzisen Messungen bezüglich biomechanischer Eigenschaften durchgeführt. Messungen innerhalb der Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass die hier betrachteten Cannabinoide, in den hier untersuchten Zelllinien zu einer Veränderung der Dichte der Aktinstrukturen führen können [447]. Dabei ist jedoch zu beachten, dass für diese Messungen vollständig adhärenzte, fixierte Zellen genutzt wurden, weshalb der Großteil der Aktinzellstrukturen durch Aktinbündel und Stressfasern gebildet wird, wohingegen bei den mit dem AFM vermessenen Zellen keine Stressfasern vorhanden sind [234, 319, 445–447]. Auch wenn eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse der vollständig adhärenzten Zellen nicht möglich ist, so zeigen sie dennoch die Fähigkeit der hier verwendeten Cannabinoide die Organisation des Aktinzytoskeletts zu modulieren und somit Einfluss auf die Zellelastizität zu nehmen. Die Erhöhung des Elastizitätsmoduls in U138 Zellen nach der Gabe von JWH 133 könnte im Zusammenhang mit einer verminderten Cofilinphosphorylierung stehen, welche bereits in Zellen des trabekulären Maschenwerkes des Auges, in Folge einer CB2 Aktivierung, beobachtet werden konnte [448]. Cofilin ist ein Aktindisassemblierungsfaktor und eine reduzierte Aktivität kann zu einem erhöhten Elastizitätsmodul führen [449]. Da LN229 und U87 Zellen CB2 nicht exprimieren kann nach der Stimulation mit JWH 133 ein solcher Mechanismus nicht vorausgesetzt werden. Dies ist im Einklang mit den erhobenen Messdaten, die keinerlei JWH 133 bedingten Einfluss auf das Elastizitätsmodul von LN229 und U87 nachweisen konnten. Weiterhin könnte die Stimulation

mit dem CB1 Agonisten eine rezeptorunspezifische Wirkung auf die Zellelastizität entfalten. Sowohl LN229, als auch U87 Zellen exprimieren den CB1 Rezeptor, zeigen aber keinen Effekt bei der Stimulation mit ACEA - im Gegensatz zu U138 Zellen. Dieser Effekt könnte durch ein zelllinienspezifisch unterschiedliches Downstream-Signaling verursacht sein, in dem CB1 assoziierte Signalkaskaden sich stark unterscheiden und somit verschiedene Ergebnisse bezüglich der Zytoskelettorganisation zur Folge haben. Ein vergleichbarer Effekt konnte schon bei der neuronalen Zelllinie PC12 beobachtet werden, bei der eine differentiationsabhängige Mikrotubuli- und Mikrofilamentmengenveränderung gemessen wurde [395, 397]. Die hier beobachtete Heterogenität der Effekte entspricht auch derjenigen, die bereits von anderen Arbeitsgruppen bezüglich der Expression anderer Proteine und Rezeptoren, wie zum Beispiel TP53 und einiger Integrine, für die hier genutzten Zelllinien gemacht wurde [358, 359]. Die beobachtete Heterogenität der Zellen entspricht damit auch dem typischen Verhalten von Glioblastomen, welche sich durch die Mutation von über 1000 Genen voneinander und von gesundem Gewebe unterscheiden können [352].

Ein weiterer möglicher Grund für die uneindeutigen Effekte der Cannabinoide könnten weitere Zielrezeptoren der verwendeten Cannabinoide sein, die, abhängig von ihrem Vorhandensein bzw ihrer Expression in der entsprechenden Glioblastomzelllinie, zu anderen Effekten führen. Mögliche Rezeptoren, mit denen ACEA und JWH 133 zusätzlich wechselwirken könnten, sind GPR55 (G-Protein gekoppelter Rezeptor 55) und TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1) [450–453]. Besonders GPR55 ist hier von Bedeutung, da Studien bereits eine regulatorische Rolle des GPR55 Rezeptors für die kleinen GTPasen Rac1, RhoA und Cdc42 gezeigt haben, welche wiederum die Organisation des Aktinzytoskelettes modulieren können [454, 455]. GPR55 konnte bereits in Gliomzelllinien nachgewiesen werden, ob dieser Rezeptor jedoch auch in den hier verwendeten Zelllinien vorkommt, soll in zukünftigen Studien untersucht werden [456].

4.2.2 Cannabinoide verändern die Motilität, Kontaktfläche und das Invasionsverhalten von Glioblastomzellen

Durch die bereits erwähnten Cannabinoid-induzierten Veränderungen des Elastizitätsmoduls wurde erwartet, dass diese ebenfalls einen Einfluss auf die motilen Eigenschaften einzelner Zellen haben, da das Elastizitätsmodul vom Zytoskelett dominiert wird und speziell Aktin stark mit Migrationseigenschaften assoziiert ist [457–459]. Im Fall der Cannabinoide führte der CB1 Agonist Methanandamid in endometrialen Stromazellen zu einem migratorischen Phänotyp, der charakterisiert wurde durch eine schnellere F-Aktindegradation, mehr Stressfasern und einer verstärkten Lokalisation von F-Aktin an der Leading Edge [460]. Andere Studien konnten wiederum eine Erhöhung bzw Erniedrigung des Phosphorylierungsgrades von FAK, welches an der Steuerung der Zellmotilität beteiligt ist, in Folge einer Cannabinoidstimulation beobachten [375, 391, 392, 461]. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden jedoch bereits Messungen der FAK und pFAK Mengen in den hier genutzten Zelllinien mit den Cannabinoiden JWH 133 und ACEA durchgeführt, bei denen keine Veränderung der phosphorylierten oder der Gesamtmenge

an FAK ermittelt werden konnte, weshalb ein anderer Mechanismus für die beobachteten Geschwindigkeitsänderungen verantwortlich sein muss [447]. Jedoch ist die durch Cannabinoide veränderte Motilität konsistent mit den, innerhalb der Arbeitsgruppe ermittelten, strukturellen Veränderungen des Aktinzytoskelettes nach der Cannabinoidgabe [447]. Die Veränderung des Aktinzytoskeletts lassen sich jedoch nicht direkt mit der Motilität assoziieren, weil die Analysemethoden lediglich die Dichte der Strukturen innerhalb der Zelle quantifiziert, nicht jedoch die Ausrichtung der Aktinfasern zueinander und relativ zur Bewegungsrichtung [447, 462]. Diese Messungen zeigen jedoch die grundsätzliche Befähigung der Cannabinoide zur Veränderung des Aktinzytoskeletts, mit einer begleitenden Motilitätsänderung, die über einen bisher unbekanntem Signalweg vermittelt wird.

Ähnlich wie bei der Messung des Elastizitätsmoduls konnten auch bei der Motilität keine einheitlichen Beobachtungen für die Zellgeschwindigkeit gemacht werden, da die Inkubation von LN229 und U138 Zellen mit ACEA in einer Reduktion der Geschwindigkeit resultierte, während der CB1 Agonist in U87 zu einer Erhöhung führte. Auch hier kommen, bedingt durch die hohe Heterogenität der Zelllinien bzw. Glioblastome im Allgemeinen, zelllinienspezifische Unterschiede in Frage [352, 358, 359], jedoch auch erneut andere Rezeptoren wie GPR55, die weitere Bindungspartner der hier verwendeten Cannabinoide sein könnten und über zum Beispiel Rho GTPasen die Motilität steuern können [450–455].

Ein weiterer Faktor, der die Motilität beeinflussen kann, ist das Elastizitätsmodul einer Zelle. Wenn sich das Elastizitätsmodul des Lamellipodiums erhöht, so wird eine größere Kraft benötigt, um das Lamellipodium auszuformen, woraus eine reduzierte Motilität folgt [333]. Ein vergleichbarer Effekt kann die veränderte Motilität hier jedoch nicht erklären, da für U138 Zellen eine reduzierte Motilität mit einem erhöhten Elastizitätsmodul einhergeht, während in LN229 und U87 Zellen eine veränderte Motilität einem gleichbleibenden Young Modul entgegensteht.

Ebenso wie die restlichen Messungen lieferte auch die Bestimmung der Kontaktfläche ein sehr heterogenes Bild. Bei U138 und LN229 Zellen konnte nach der Zugabe von ACEA kein Effekt auf die Kontaktfläche festgestellt werden, wohingegen U87 Zellen mit einer Reduktion der selbigen reagierten. Auch hier ist keine offensichtliche Rezeptor bzw. Agonistenspezifität zu erkennen. Ein Faktor welcher die Kontaktfläche beeinflussen kann, ist die Adhäsivität der Zelle gegenüber dem Substrat. Im Falle der hier verwendeten Kulturschalen wird dieser Kontakt, bei vollständiger Adhäsion, über fokale Kontakte gesteuert. Cannabinoide wurden von anderen Arbeitsgruppen bereits mit einer veränderten FAK Aktivität assoziiert, die auch die Kontaktfläche verändert, da FAK integraler Bestandteil der fokalen Adhäsionen ist [375, 391, 392, 463]. In parallel durchgeführten Studien innerhalb der Arbeitsgruppe fanden sich, nach Cannabinoidgabe, keine veränderten FAK oder pFAK Mengen in den hier genutzten Zellen, so dass dieser Mechanismus als Erklärungsansatz zu verwerfen ist [447]. Eine zelllinienspezifische Veränderung anderer, FAK unabhängiger, Adhäsionen durch die Gabe der Cannabinoide ist dennoch nicht auszuschließen.

Ein erhöhtes Elastizitätsmodul einer Zelle führt zu einer höheren notwendigen Kraft zur Ausformung der Zellkontaktfläche und somit zu einer insgesamt kleineren Kontaktfläche zum Substrat [333]. Dies kann die hier beobachteten Effekte jedoch ebenfalls nicht vollständig erklären, da U87 und LN229 Zellen zwar eine veränderte Kontaktfläche nach Cannabinoidgabe aufwiesen, aber keine veränderten Young Module. Somit muss es weitere Einflussparameter geben, die diesen Effekt verursachen.

Ein weiterer Aspekt, der die Kontaktfläche beeinflussen kann, ist die Kontraktilität der Zelle. Je mehr kontraktile Elemente eine Zelle enthält desto größer muss die entgegengesetzte Kraft sein, um eine konstante Kontaktfläche aufrechtzuerhalten. Die in der Arbeitsgruppe bereits durchgeführten Messungen der Aktinstrukturichte in vollständig adhärennten Zellen könnten dazu einen Hinweis liefern, da die beobachtete Struktur hauptsächlich durch Stressfasern und sonstige Aktinstränge determiniert war [447]. Die gemessene Aktinstrukturichte veränderte sich jedoch auch bei Zellen, die keine veränderte Kontaktfläche besaßen und andersherum [447]. Dies liefert einen Hinweis, dass nicht ausschließlich kontraktile Strukturen für die Veränderung in der Kontaktfläche verantwortlich sein können.

Generell kann über die Messungen der Zellgeschwindigkeit und Kontaktfläche gesagt werden, dass beide von einer großen Menge an Einflussparametern abhängen, die sich gegenseitig verstärken oder abschwächen können. Dazu gehören unter anderem die Adhäsivität zum Substrat, die Elastizität der Zelle, die Kontraktilität der Zelle und speziell des Kortexes, die Remodulierungszeit des Zytoskelettes und weitere ([114]; siehe Kapitel 1.1.1). Folglich ist es schwierig, Änderungen auf nur eine der einzelnen Messparameter zurückzuführen. Hinzu kommt, dass einige der obigen Eigenschaften nur sehr schwer messbar sind und in dieser Arbeit nicht gemessen werden konnten.

Da alle gemessenen Einzelzeleigenschaften in Beziehung zum Zytoskelett stehen, konnte ein Einfluss von Cannabinoiden auf die untersuchten Invasioneigenschaften angenommen werden [314–333]. Die invasiven Charakteristika der genutzten Glioblastomzelllinien nach der Cannabinoidbehandlung entsprechen den Befunden, die bereits von anderen Arbeitsgruppen erhoben wurden. Dabei wurde der Effekt von Cannabinoiden in verschiedenen Tumortypen im allgemeinen als anti-tumorös beschrieben [375, 383, 464–466], wobei jedoch eine Studie eine erhöhte Invasivität nach der Cannabinoidgabe beobachtete [467]. Da die Phosphorylierung von p44/42 MAPK und die Aktivierung des Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K)/Akt Signalweges bereits mit einer reduzierten Invasivität nach der Cannabinoidgabe assoziiert werden konnte, wurde diese auch innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht, jedoch ohne signifikante Veränderungen beobachten zu können [389, 447, 468]. Die für diese Arbeit durchgeführten Experimente zeigten unterschiedliche Effekte nach der Cannabinoidapplikation. Während der CB1 Agonist ACEA immer zu einer (zum Teil nicht signifikanten) Reduktion der Invasivität führte, resultierte die Applikation des CB2 Agonisten in einer stark erhöhten Invasivität bei U138 Zellen und einer (zum Teil nicht signifikanten) Reduktion für U87 und LN229 Zellen. Da sowohl U87 als auch LN229 Zellen keine mRNA für den CB2 Rezeptor exprimieren, ist es möglich, dass der Effekt von JWH 133 in U87 und LN229 nicht über klassische Cannabinoidrezeptoren vermittelt wurde [450–453].

4.2.3 Der CB2 Rezeptor-Agonist JWH 133 zeigt CB2 unabhängige Effekte

Sowohl LN229 als auch U87 Zellen exprimieren den CB2 Rezeptor auf mRNA-Ebene nicht, werden jedoch von dem spezifischen CB2 Agonisten JWH 133 beeinflusst, was eine Vermittlung der Effekte über einen anderen Rezeptor nahe legt. JWH 133 zählt zu den selektivsten synthetischen Cannabinoiden [469, 470]. In vitro Bindungsassays ergaben für JWH 133 Affinitäten für den CB2 Rezeptor ($K_i = 3.4 \pm 1.0 nM$) und den CB1 Rezeptor ($K_i = 677 \pm 132 nM$) [471], aber Daten bezüglich der Affinität zu weiteren Rezeptoren wurden nicht erhoben. Daher ist eine mögliche Erklärung für die Effekte von JWH 133, eine Aktivierung eines nicht Cannabinoidrezeptors, wie es bereits für AM251 gezeigt wurde. AM251 galt als hochselektiver Antagonist für CB1, bis gezeigt wurde, dass AM251 ebenfalls GPR55 aktiviert [472]. Vorangegangene Studien mit JWH 133 lieferten Hinweise auf die Aktivierung von GPR55 und TRPV1 [450, 452, 453]. Eine Studie von Taylor et al liefert weitere Indizien auf einen anderen, bisher nicht genauer beschriebenen Bindungspartner für JWH 133, der jedoch weder GPR55 noch TRPV1 ist [473].

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass JWH 133 in der gegebenen Konzentration von $10 \mu M$ den CB1 Rezeptor aktiviert, da sowohl LN229 als auch U87 selbigen exprimieren. Basierend auf dieser Annahme wäre zu erwarten, dass ACEA und JWH 133 bei beiden Zelllinien denselben Effekt haben. Im Falle von LN229 Zellen zeigten beide Agonisten unterschiedliche Effekte bei den Messungen der Zellgeschwindigkeit, Zellfläche und Invasivität, wohingegen ein identisches Verhalten nach der Applikation nur bei der Adhäsionsenergie gemessen werden konnte. Für U87 Zellen gab es Übereinstimmungen bei den Effekten für die Zellgeschwindigkeit und Zellfläche. Unterschiedliche Effekte konnten bei U87 nur für die Adhäsivität ermittelt werden. Parameter, bei denen beide Substanzen keinen Effekt hatten, wurden dabei nicht betrachtet, da sie nicht eindeutig als identischer Effekt angesehen werden können.

Somit ist es wahrscheinlich, dass JWH 133 neben den CB1 und CB2 Rezeptoren mindestens einen weiteren Zielrezeptor besitzt. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen auch andere Arbeitsgruppen, die gezielt den CB2 Rezeptor inhibiert oder per Knock-Out funktionell ausgeschaltet haben [450, 452, 453, 473].

4.3 Der Effekt einer MACC1 Expression bei Glioblastomzellen

4.3.1 MACC1 Effekte auf die Elastizität von Glioblastomzellen

Eine erhöhte Expression von MACC1 wurde in einer Vielzahl von Studien als promotumoröser Faktor beschrieben [417–421], welcher auch die HGF/c-Met-Achse reguliert [401, 416, 420, 474]. Eine Stimulation von HGF ist wiederum mit einer Vielzahl von zytoskelettalen Alterationen verbunden, wie zum Beispiel die Regulation von Rac1 und

Cdc42 [475–478], die maßgeblich die Zytoarchitektur beeinflussen (siehe Kapitel 1.1.1). HGF kann Cdc42 und Rac1 an der Zellperipherie und Rac1 auch längerfristig in perinukleären Endosomen aktivieren [475–478]. Ebenso kann HGF über den PI3K/Akt Signalweg Aktinfilamente stabilisieren [479] und über die Ezrinphosphorylierung zur Kortextremodulierung beitragen [480]. Neben den Aktininteraktionen resultiert eine HGF-Aktivierung auch in einer Rekrutierung von +TIPs an die Microtubulienden und kann auch über andere Signalwege zur Stabilisierung von Microtubulifilamenten beitragen [480]. Neben den HGF/c-Met induzierten zytoskeletalen Veränderungen konnte auch ein direkter Einfluss der MACC1-Expression auf die Organisation des Aktinzytoskelettes beobachtet werden [417], sowie eine positive Korrelation mit dem Vimentinlevel [418, 481].

Bei der Messung des Young Moduls konnte durch die Expression von MACC1 eine Erhöhung festgestellt werden, welche durch den MET-Inhibitor Crizotinib wieder aufgehoben werden konnte. Dies ist grundsätzlich im Einklang mit den zuvor beschriebenen, durch MACC1 induzierten Alterationen des Zytoskelettes. Wie bereits beschrieben, haben im hier gewählten Messsystem Intermediärfilamente und Microtubuli einen vernachlässigbaren Einfluss auf das Elastizitätsmodul, weshalb es wahrscheinlich ist, dass eine veränderte Aktinorganisation für das erhöhte Youngmodul bei erhöhter MACC1 Expression verantwortlich ist. Eine für die hier durchgeführten mechanischen Messungen bedeutende Struktur ist der Aktinkortex, der etwa $50 - 200\text{nm}$ dick ist [114] und damit die Größenordnung der Indentation von $\delta \approx 1.2 - 1.4\mu\text{m}$ hat. Hieraus ergibt sich ein möglicher Erklärungsansatz für das erhöhte Youngmodul bei einer erhöhten MACC1 Expression: die verstärkte Phosphorylierung des Aktincrosslinkers Ezrin, welcher die Organisation und damit das Elastizitätsmodul, des Kortex beeinflusst ([482]; siehe Kapitel 1.1.4). Die Aufhebung des erhöhten Elastizitätsmoduls durch Crizotinib, einem c-Met Inhibitor, deutet darauf hin, dass der beobachtete Effekt durch die HGF/c-Met Achse vermittelt wird und unterstützt somit die Hypothese, dass eine verstärkte Ezrinphosphorylierung Grund für das erhöhte Youngmodul bei erhöhter MACC1 Expression sein könnte.

4.3.2 MACC1 verändert die Motilität, Kontaktfläche und das Invasionsverhalten von Glioblastomzellen

Von Hagemann et al wurde erstmalig beschrieben, dass eine MACC1 Expression zu einer erhöhten Migrationsaktivität in U138 Zellen führte, die sich durch Crizotinib aufheben ließ [420]. Für die Bestimmung des Migrationsverhaltens wurde eine impedanzbasierte Messmethode verwendet, die jedoch nur eine dimensionslose Messung der Migrationsaktivität erlaubt. Ebenfalls erlaubt diese Methode lediglich die Messung eines globalen Parameters (Cell Index), der keinerlei Rückschlüsse auf das Verhalten einzelner Zellen ermöglicht [420]. In dieser Arbeit wurde die Motilität einzelner Zellen direkt bestimmt, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass der beobachtete Effekt durch kollektive Zelleigenschaften verursacht wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Resultate, da ebenfalls eine Zunahme der ungerichteten Zellgeschwindigkeit durch einer erhöhte

MACC1 Expression, sowie deren Inhibierung mit Crizotinib beobachtet wurde. Als resultierende Erkenntnis lässt sich schlussfolgern, dass die motilen Veränderungen, die durch MACC1 Überexpression in U138 Zellen verursacht werden, schon auf Einzelzellebene beobachtbar sind und Zell-Zellinteraktionen für diese Art der Änderungen nicht zwingend notwendig sind.

Bei der Betrachtung der Zellkontaktfläche konnte beobachtet werden, dass eine MACC1 Überexpression zu einer Reduktion der selbigen führte. Dies lässt sich nicht mit den Ergebnissen von Wang et al in Einklang bringen, die bei einer erhöhten MACC1 Expression eine Erhöhung des Fibronectin-Levels feststellen konnten [418]. Da Fibronectin an der Formung von Adhäsionsbindungen beteiligt ist, kann eine Erhöhung des Fibronectin-Levels mit einer erhöhten Kontaktfläche in Zusammenhang gebracht werden, da die Kontaktfläche unter anderem durch die Adhäsionsfähigkeit zum Substrat beeinflusst wird. Ebenfalls wurde nach einer Stimulation von HGF, welches durch MACC1 reguliert wird, eine verstärkte Adhäsion von Zellen an Laminin, Fibronectin und Vitronectin beobachtet, wodurch sich die Adhäsion zum Substrat und somit die Kontaktfläche ebenfalls erhöhen könnte [483]. Da jedoch in dieser Arbeit ebenfalls festgestellt wurde, dass das Elastizitätsmodul der MACC1 überexprimierenden U138 Zellen erhöht war, besteht die Möglichkeit, dass durch die erhöhte Festigkeit der Zellen eine größere Kraft für die Adhäsion der Zelle am Substrat notwendig ist, die durch eine erhöhte Expression von Fibronectin nicht vollständig ausgeglichen wurde.

Die erhobenen Invasivitätsdaten spiegeln den allgemeinen Trend wieder, dass eine erhöhte MACC1 Expression zu einer erhöhten Invasivität führt [417–421]. Frühere Publikationen zeigten, dass der Grad eines Astrozytoms mit dessen c-Met Expression positiv korreliert [484] und die hier verwendeten MACC1 exprimierenden U138+ Zellen eine höhere c-Met Expression aufweisen, als ihre Ursprungszelllinie U138 [420]. Auch hier führte der c-Met Inhibitor Crizotinib zu einer Aufhebung des beobachteten Effektes, so dass sich schlussfolgern lässt, dass - wie bereits beschrieben [484–487]- c-Met einen regulierenden Einfluss auf die Glioblastominvasion hat. Ebenfalls erhärten diese Experimente die Hypothese, dass MACC1 ein Regulator des c-Met Signalings ist [401, 416, 422].

4.4 Der Effekt einer Bestrahlung auf Glioblastomzellen

4.4.1 Bestrahlungseffekte auf die Elastizität von Glioblastomzellen

Die Messungen der Elastizitätsmodule zeigten einen differenzierten Effekt für die beiden Zelltypen. U87 zeigte keinerlei Veränderung in Folge der Bestrahlung, während LN229 Zellen ein erhöhtes Young Modul besaßen. Mehrere Arbeiten zeigten bereits, dass die Bestrahlung von Gliomzellen unter anderem zu einer Deregulation von über einhundert Genen führt, deren Expression für die Adhäsivität, die Zytoskelettorganisation und Invasivität mit verantwortlich sind ([360–362]; siehe Kapitel 1.5). Diese Effekte wurden jedoch in diesen Studien nicht weiter untersucht. Soweit es dem Autor bekannt

ist, sind die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen die ersten Messungen elastischer Eigenschaften von Glioblastomen nach der Bestrahlung. Studien in normalen und transformierten Fibroblasten zeigten eine ähnliche Heterogenität [488]. Während Fibroblasten nach einer Bestrahlung mit $2Gy$ keine Veränderungen der Elastizität aufwiesen, reagierten die transformierten Fibroblasten mit einem erhöhten Young Modul [488]. Eine weitere Studie untersuchte den Effekt der Bestrahlung auf die Elastizität von Leberzellkarzinomlinien und beobachtete eine Reduktion der Elastizität in fünf von sechs Zelllinien [489]. Die hier beobachtete Zelllinienabhängigkeit ist entsprechend konsistent mit Ergebnissen aus anderen Zelltypen und dem bereits beschriebenen Einfluss auf die Expression von Genen, die für die Zytoskelettorganisation verantwortlich sind.

4.4.2 Einfluss der Bestrahlung auf Motilität, Kontaktfläche und Invasionsverhalten von Glioblastomzellen

Die erhaltenen Messwerte für die mittlere Geschwindigkeit liefern ein unterschiedliches Bild der Einzelzellgeschwindigkeiten. Während bei U87 Zellen eine starke Erhöhung der Motilität gemessen wurde, kam es bei den LN229 Zellen zu einer geringen Reduktion. Frühere Studien demonstrierten, dass die Bestrahlung zu einer erhöhten Motilität in Gliomzellen führen kann [490, 491], wobei argumentiert wurde, dass dies über die Aktivierung von Rac1 und einer nachfolgenden Inhibierung von RhoA vermittelt wird [490]. Bei U87 Zellen wurde in anderen Studien eine erhöhte Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktorezeptors (EGFR), in Folge einer Bestrahlung mit $2Gy$, beobachtet [492], welche wiederum zur Aktivierung von Rac1 führt [493–495]. Es ist folglich wahrscheinlich, dass vergleichbare Mechanismen auch für die hier beobachtete erhöhte Motilität der U87 Zellen nach der Bestrahlung verantwortlich sind. Diese Hypothese wird weiter durch die innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführten Analysen der Aktinstruktur gestützt, die eine erhöhte Aktinstrukturichte in U87 Zellen nach der Bestrahlung nachweisen konnten [496]. In LN229 Zellen wurde in Folge der Bestrahlung jedoch keine erhöhte EGFR Aktivierung festgestellt [492], weshalb ein anderer Mechanismus für die Reduktion der Zellgeschwindigkeit verantwortlich sein muss. Ein Anhaltspunkt liefert die erhöhte Elastizität der LN229 Zellen, was dazu führt, dass eine größere Kraft notwendig ist, um - für die Zellbewegung notwendige - Protrusionen zu erzeugen und somit zu einer Einschränkung der Bewegungsfähigkeit führen kann [333].

Bei der Betrachtung der Kontaktfläche zeigten beide Zelllinien eine Reduktion in Folge der Bestrahlung. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass LN229 und U87 sowohl auf der sehr kurzen Zeitskala der AFM-Messungen als auch auf einer längeren Zeitskala auf Bestrahlung mit einer verminderten Adhäsivität reagieren. Bei der Messung der Kontaktflächen ist zu beachten, dass sie nur eine sehr indirekte Messung, der langzeitigen Wechselwirkungen der Zellen mit dem Substrat ist. Die Kontaktfläche wird ebenfalls durch weitere Effekte, wie ein verändertes Zellvolumen, eine modulierte Aktinkortextension oder der Anzahl kontraktile Strukturen moduliert. Im Falle der U87 Zellen könnte die erhöhte Dichte an Aktinstrukturen, die nach der Bestrahlung beobachtet wurde, einen Erklärungsansatz liefern, da die dominanteste Struktur innerhalb der U87 Zellen Stressfasern sind [496]. Eine erhöhte Zahl an Stressfasern in U87 bedingt eine

erhöhte Kontraktilität, welche in einer reduzierten Kontaktfläche mündet. Unterstützt wird dieser Befund durch die Beobachtung anderer Arbeiten, die in C6 Gliomzellen und in Endotelzellen eine erhöhte Stressfaserzahl in Folge der Bestrahlung beobachten konnten [497, 498]. Da für LN229 Zellen keine Veränderung der Aktinstrukturichte festgestellt wurde [496], ist es möglich, dass die reduzierte Kontaktfläche auch hier mit dem erhöhten Elastizitätsmodul einhergeht, da so die Kraft die notwendig ist um die Zelle zu deformieren steigt und es so zu einer geringeren Kontaktfläche kommt.

Da die Strahlentherapie zu den Standardmethoden zur Behandlung von Glioblastomen gehört, entsprechen die erzielten Ergebnisse bezüglich der Invasivität der Erwartungshaltung einer Reduktion des Tumorwachstums. Dies entspricht auch den Ergebnissen anderer Studien, welche eine Reduktion der Tumorinvasivität und Proliferation nach der Bestrahlung feststellen konnten [496, 499–501].

4.5 Veränderung elastischer und adhäsiver Eigenschaften durch IDH1 Mutation

Die IDH1 Mutation IDH1-R132H ist eine Punktmutation im IDH1-Gen, bei der am Codon 132 eine Substitution von Histidin durch Arginin erfolgte. Diese Mutation ist im allgemeinen assoziiert mit einer besseren klinischen Prognose [398–400]. Dieses Ergebnis wird einerseits durch eine geringere Resistenz gegenüber gängigen Therapieformen [413], sowie andererseits durch eine verringerte Aggressivität verursacht [413–415]. Frühere Studien konnten, beim Vergleich von Astrozytomen und Oligodendrogliomen mit und ohne IDH1-R132H Mutation, differentiell exprimierte zytoskelettassoziierte Proteine ermitteln. Zu finden war eine erhöhte Expression für den Intermediärfilamentcrosslinker Plektin, welcher auch Aktin und Mikrotubuli binden kann, dem Aktincrosslinker Fascin, dem sauren Gliafaserprotein (Intermediärfilament), der Tropomyosin α -3 Kette (reguliert Kontraktilität) und der Tubulin α -1C Kette (Bestandteil von Mikrotubuli) [502]. Herunterreguliert wurden dahingegen der Aktincrosslinker α -Aktinin 4, die Aktinkortextkomponenten Ezrin, Radixin und Moesin, sowie die Intermediärfilamente Vimentin, Desmin und Peripherin [502, 503]. Die möglicherweise daraus resultierenden veränderten Elastizitätsmoduli, die jedoch für das Youngmodul innerhalb dieser Arbeit nicht nachweisbar waren, könnte durch eine entgegengesetzte Wirkung einiger dieser Proteine aufgehoben wurden sein. Eine erhöhte Myosinexpression würde zu einer erhöhten Kontraktilität und somit zu einem erhöhten Youngmodul des Kortexes führen, während die reduzierte Expression von Moesin einen gegenteiligen Effekt hat [504]. Ebenso muss betrachtet werden, dass die erwähnten Studien Astrozytome des Grades III und Oligodendrogliome untersucht haben, also eine andere Tumorentität als Ausgangslage nutzten, so dass die genannten Proteine nicht zwingend auch in Glioblastomen in vergleichbarer Art und Weise differentiell reguliert sein müssen.

4.6 Die verallgemeinerte Elastizität als Marker für die Invasivität

Es ist bekannt, dass einzelne Tumorzellen ein geringeres Elastizitätsmodul, als die Zellen ihres gesunden Ursprungsgewebes, besitzen [319, 321, 324–329, 331, 332]. Die Frage ob sich ein verändertes Elastizitätsmodul auf das Invasionsvermögen von Tumorzellen auswirkt, wurde bisher jedoch nur wenig untersucht. In dieser Arbeit konnte eine negative Korrelation zwischen einer verallgemeinerten Elastizität und der Invasivität von Glioblastomzellen hergestellt werden. Ein ähnliches Verhalten wurde bereits für Ovarkarzinome [505, 506] und für Melanome beobachtet [507]. Der gemessene Effekt scheint für Glioblastome von allgemeiner Natur zu sein, da er für verschiedene Zelllinien, sowie transiente (Cannabinoid, Bestrahlung) und nicht-transiente (IDH1 Mutation, MACC1) Beeinflussungen erhalten blieb. Eine Veränderung der Aktinorganisation, sowohl nach der Bestrahlung, als auch nach der Cannabinoidgabe konnte für die hier genutzten Zelllinien und Cannabinoide bereits innerhalb der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [447, 496]. Im Einklang mit früheren Beobachtungen sind die reduzierten Elastizitätsmoduli von Tumorzellen mit Veränderungen innerhalb der Aktinstruktur assoziiert [319, 327, 331]. Besonders hervorzuheben ist, dass die klinische Bedeutsamkeit der betrachteten IDH1 Mutation (bessere Prognose) und des MACC1 Expressionslevels (schlechtere Prognose bei Kolonkarzinomen) bereits nachgewiesen wurde [398–403]. Somit liefern die Messungen an IDH1 mutierten und MACC1 überexprimierenden Zellen auch Hinweise auf die Vorhersagekraft des Parameters „verallgemeinerte Elastizität“ für die Aggressivität eines Tumors in der komplexen in vivo Situation. Diese negative Korrelation zwischen Invasivität und „verallgemeinerte Elastizität“ ist insofern bemerkenswert, als dass die gemessenen Einzelzellparameter ausschließlich passive Eigenschaften einzelner Zellen darstellen und somit jegliche Zell-Zell-Interaktionen vernachlässigen. Da die Vermessung der mechanischen Eigenschaften einzelner Zellen schnell erfolgt, kann dieses Ergebnis potentiellen Nutzen bei der Exploration der Wirksamkeit anti-tumoraler Wirkstoffe haben, da sie direkt eine Abschätzung ihrer Wirksamkeit liefert.

4.7 Das Young Modul alleine ist kein Marker für die Invasivität

Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen der hier definierten „verallgemeinerten Elastizität“ und der Invasivität von Glioblastomzellen ermittelt werden. Dabei ist zu beachten, dass das Hertzmodell, als einfachste Variante zur Bestimmung des Youngmoduls, alleine keine solche Korrelation liefert, sondern erst dessen Kombination mit der physischen Deformation (Indentation). Dies deutet darauf hin, dass entweder das Hertzmodell oder die Annahme eines isotropen Young Moduls unzureichend ist. Das Hertzmodell setzt - für eine adäquate Anwendbarkeit - einen spannungsfreien, also adhäsionsfreien Kontakt, geringe Deformationen und eine in Relation zur Zellgröße geringe Kontaktfläche voraus, sowie dass beide Objekte

als Halbsphären beschrieben werden können [444]. Die indirekte Voraussetzung der Isotropie der Zelle kann betrachtet werden, indem Messmethoden, welche zum Beispiel die Bestimmung des Longitudinal-, Schub- oder Kompressionsmoduls erlauben, zusätzlich verwendet werden oder lokale Messungen an adhärennten Zellen durchgeführt werden.

Als Annahmen sind offensichtlich die der Halbsphären erfüllt, da die Zellen nur eine geringe Adhäsionszeit hatten und somit nahezu sphärisch waren, während der flache Cantilever sehr gut mittels Taylorentwicklung als unendlich große Kugel approximiert werden kann. Da die genutzten Zellen einen Durchmesser von ca $15 - 25\mu\text{m}$ hatten und die Indentation etwa $1\mu\text{m}$ betrug ist auch die Bedingung der geringen Deformation und Kontaktfläche erfüllt. Als kritischer Aspekt kann die vernachlässigte Adhäsivität betrachtet werden, welche trotz der geringen Kontaktzeit zwischen Cantilever und Zelle klar messbar war und nachweislich durch die genutzten Behandlungen moduliert werden konnte. Dieser Aspekt weist auf die Notwendigkeit der Verwendung geeigneterer, komplexerer Modelle hin, wie zum Beispiel das JRK- oder DMT-Modell, welche eine Erweiterung des Hertzmodells um Adhäsionsenergie darstellen [432, 433]. Hierbei bedarf es jedoch einer Methodik, die, neben den ermittelten Parametern, ebenso die Kontaktfläche zwischen Cantilever und Zelle ermitteln kann.

4.8 Experimentelle Limitationen

Die AFM Versuche wurden an Zellen, während einer sehr frühen Phase der Adhäsion, durchgeführt, die somit nahezu eine sphärische Geometrie besaßen. Im weiteren Verlauf verändert sich das Zytoskelett während der fortschreitenden Adhäsion der Zelle massiv, was Auswirkungen auf die am AFM gemessenen Größen haben kann [234, 319, 445, 446]. Während der Messzeit von ca $2h$ konnte jedoch keine systematische Veränderung der Messgrößen festgestellt werden, wodurch ein Messzeiteffekt und Effekte der fortschreitenden Adhäsion auf die Messparameter unwahrscheinlich erscheint. Am Ende der Messzeit waren die meisten Zellen noch nicht vollständig an das Substrat adhärnt, so das eine Deviation gegenüber vollständig adhärennten Zellen nicht auszuschließen ist. Vollständig adhärennte Zellen können jedoch, aufgrund ihrer räumlichen und mechanischen Inhomogenität nicht nach dem gleichen Messprinzip untersucht werden und erfordern einen lokalen Ansatz, der eine höhere Komplexität als der hier verwendete lokale Ansatz besitzt, da die einzelnen Strukturen der Zelle (zum Beispiel Nucleus, Lamellipodium, etc) unterschiedliche mechanische Eigenschaften haben (siehe Kapitel 1.1.1.7). Als weiterer Aspekt muss die spezifische Geometrie oder Dicke der zu vermessenden Zellregion betrachtet werden, was ebenfalls andere Analysemodelle, wie zum Beispiel Dünnschichtapproximationen für Messungen am Lamellipodium [481], erfordert. Ebenfalls ist zu beachten, dass der verwendete Cantilever unbeschichtet ist und somit auf Adhäsionsebene nur Interaktionen zwischen Siliziumnitrit und den vermessenen Zellen betrachtet werden konnten. Explizite, spezifische Adhäsionsbindungen lassen sich somit nicht einzeln oder gezielt betrachten. Für die Untersuchung spezifischer Interaktionen wäre eine Beschichtung des Cantilevers mit Molekülen der extrazellulären Matrix oder Adhäsionsmolekülen notwendig.

Bei dem verwendeten Invasionsmodell handelt es sich um ein organotypisches Hippocampusmodell, welches intakte neuronale Bahnen besitzt. Nach der Präparation bildet sich oberhalb und unterhalb der Schnittkultur eine Glianarbe, die aus Astrozyten und Mikroglia geformt wird und sich somit von der Struktur der restlichen Schnittkultur unterscheidet. Interessanterweise findet sich eine starke Gliareaktion in der Nachbarschaft von Tumoren. Für eine erfolgreiche Infiltration müssen die Tumorzellen ebenfalls diese zusätzliche Barriere passieren, was das verwendete Modell näher an die *in vivo* Situation bringt. Allerdings können mit dem jetzigen Setup nur Endpunktmessungen durchgeführt werden, weshalb über den Prozess der Tumorerkrankung nur wenige Informationen gewonnen werden können. Eine weitere Limitation stellt der verwendete Fluoreszenzfarbstoff CFDA dar, der nur Invasionszeitpunkte bis zu 5 Tagen sinnvoll auflöst, da danach die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes zu stark nachlässt. Längerfristige Effekte auf das Invasionsvermögen können somit methodisch nicht aufgelöst werden.

4.9 Ausblick

Die hier durchgeführten Experimente zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen dem Einzelzellparameter „verallgemeinerte Elastizität“ und der „Gewebeeigenschaft Invasivität“. Weitere Experimente zur Validierung dieses Effektes mit einem größeren Spektrum an Zellentitäten, sowie Behandlungen und sonstigen transienten und nicht-transienten Alterationen, wie zum Beispiel bekannten Chemotherapeutika oder genetischen Markern, sind notwendig, um ein vollständigeres, allgemeines Bild zu erlangen.

Ein weiterer Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen der Motilität und Migration ist die Verwendung drei dimensionaler Modelle, da diese sich signifikant von Untersuchungen in zwei Dimensionen unterscheiden können. Im Falle der Motilitätsuntersuchungen wären Experimente in einer drei dimensional Matrix eine entsprechende Erweiterung, während im Falle der Elastizitätsmessungen die Verwendung von Tumorsphäroiden eine solche Ergänzung darstellen würde.

Ein dritter entscheidender Faktor für die weitere Entwicklung der in dieser Arbeit vorgestellten Hypothesen liegt in der Verwendung von primären Tumorzellen, da diese eine sehr viel höhere Heterogenität aufweisen, als etablierte Zelllinien und somit die klinische Realität besser abbilden.

Perspektivisch können die hier gewonnen Erkenntnisse möglicherweise in der individualisierten Medizin verwendet werden. Da - nach jetzigem Stand - die optimale Glioblastomtherapie eine möglichst vollständige Resektion beinhaltet, können die so gewonnen Tumorzellen genutzt werden, um eine optimale Zusammensetzung der Chemotherapie zu finden. Für die hier vorgenommenen Messungen wurde nur eine relativ geringe Zahl an Zellen benötigt. Es wird daher möglich ein breites Spektrum an Therapeutika zu testen. Durch eine Übertragung des Messprinzipes vom AFM hin zu automatisierten Methoden mit einem höheren Zelldurchsatz, wie zum Beispiel einem automatischen, optischen Stretcher, kann zusätzlich noch die Genauigkeit verbessert, sowie eine vereinfachte Handhabung gewährleistet werden.

Anhang A

Messdaten

Messdaten Young Modul

Zelllinie	Behandlung	Mittelwert [Pa]	SEM [Pa]	n
U138	CTL	1692	117	60
U138	JWH133	1270	70	40
U138	ACEA	1817	108	40
U138+	CTL	2158	88	85
U138+	Cri	1711	94	88
LN229	CTL	1585	110	60
LN229	JWH133	1677	71	40
LN229	ACEA	1594	112	40
LN229	2 Gy	2084	141	35
U87	CTL	1079	65	60
U87	JWH133	1029	74	40
U87	ACEA	1095	71	40
U87	2 Gy	906	72	35
LN229	CTL	1448	90	20
LN229	Leer	1153	122	20
LN229	WT	1400	138	20
LN229	Mut	1610	117	20
U251	CTL	672	110	20
U251	Leer	595	66	20
U251	WT	696	62	20
U251	Mut	719	84	20
U343	CTL	704	96	20
U343	Leer	693	46	20
U343	WT	639	30	20
U343	Mut	826	91	20

TABELLE A.1

Messdaten normierte Adhäsionsenergie

Zelllinie	Behandlung	Mittelwert [$\mu\text{J}/\text{m}^2$]	SEM [$\mu\text{J}/\text{m}^2$]	n
U138	CTL	8.4	0.8	60
U138	JWH133	6.0	0.1	40
U138	ACEA	5.9	0.5	40

U138+	CTL	8.2	0.6	85
U138+	Cri	8.4	0.4	88
LN229	CTL	9.2	0.6	60
LN229	JWH133	5.5	0.5	40
LN229	ACEA	4.4	0.5	40
LN229	2 Gy	5.3	0.5	35
U87	CTL	9.2	0.5	60
U87	JWH133	7.1	0.4	40
U87	ACEA	8.2	0.6	40
U87	2 Gy	4.7	0.3	35
LN229	CTL	6.5	0.9	20
LN229	Leer	6.2	0.8	20
LN229	WT	6.5	0.8	20
LN229	Mut	7.1	1.2	20
U251	CTL	3.5	0.5	20
U251	Leer	4.1	0.4	20
U251	WT	3.8	0.5	20
U251	Mut	3.7	0.5	20
U343	CTL	6.0	0.5	20
U343	Leer	4.8	0.6	20
U343	WT	5.6	0.5	20
U343	Mut	5.6	0.6	20

TABELLE A.2

Messdaten Zellgeschwindigkeit

Zelllinie	Behandlung	Mittelwert [$\mu\text{m/s}$]	SEM [$\mu\text{m/s}$]	n
U138	CTL	0.32	0.03	67
U138	JWH133	0.31	0.01	81
U138	ACEA	0.29	0.01	78
U138+	CTL	0.71	0.03	164
U138+	Cri	0.39	0.02	102
LN229	CTL	0.51	0.02	118
LN229	JWH133	0.47	0.02	177
LN229	ACEA	0.26	0.01	57
LN229	2 Gy	0.41	0.02	245
U87	CTL	0.58	0.02	158
U87	JWH133	0.86	0.02	229
U87	ACEA	0.88	0.02	93
U87	2 Gy	0.74	0.02	158

TABELLE A.3

Messdaten Zellkontaktfläche

Zelllinie	Behandlung	Mittelwert [Px]	SEM [Px]	n
U138	CTL	9809	788	67
U138	JWH133	11539	878	81
U138	ACEA	10015	909	78
U138+	CTL	7776	263	164
U138+	Cri	13657	1145	102

LN229	CTL	4354	301	118
LN229	JWH133	3092	253	177
LN229	ACEA	3866	584	57
LN229	2 Gy	2861	128	245
U87	CTL	6433	353	158
U87	JWH133	3406	190	229
U87	ACEA	4017	343	93
U87	2 Gy	5348	322	158

TABELLE A.4

Messdaten Invasivität 3d

Zelllinie	Behandlung	Mittelwert	SEM	n
U138	CTL	1	0.14	39
U138	JWH133	2.05	0.39	22
U138	ACEA	0.56	0.12	20
U138+	CTL	1.11	0.19	13
U138+	Cri	0.96	0.01	7
LN229	CTL	1	0.1	37
LN229	JWH133	0.87	0.1	19
LN229	ACEA	0.79	0.18	24
LN229	2 Gy	0.56	0.17	22
U87	CTL	1	0.1	53
U87	JWH133	0.92	0.24	25
U87	ACEA	0.94	0.18	26
U87	2 Gy	0.67	0.09	30

TABELLE A.5

Messdaten Invasivität 4d

Zelllinie	Behandlung	Mittelwert	SEM	n
U138	CTL	1	0.17	26
U138	JWH133	1.85	0.5	18
U138	ACEA	0.87	0.18	18
U138+	CTL	1.33	0.19	46
U138+	Cri	1.07	0.39	10
LN229	CTL	1	0.11	41
LN229	JWH133	0.8	0.23	21
LN229	ACEA	0.85	0.14	22
LN229	2 Gy	0.48	0.13	20
U87	CTL	1	0.11	51
U87	JWH133	0.84	0.12	21
U87	ACEA	0.86	0.15	30
U87	2 Gy	0.68	0.17	16

TABELLE A.6

Anhang B

Chemikalien

B.1 Chemikalien

Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
anti- β -Aktin	Maus	Cell Signaling	1:5000
CB1 Western Blot Immunzytochemie	Maus	Cayman	0.5 μ g/ml 1.65 μ g/m
anti-GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000

TABELLE B.1: Liste der genutzten primären Antikörper

Sekundäre Antikörper

Methode	Antikörper	Spezies	Firma	Verdünnung
Western Blot	anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Vector	1:20000
	anti-Maus-IgG	Ziege	Vector	1:10000
Immunzytochemie	anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Sigma Aldrich	1:100

TABELLE B.2: Liste der genutzten sekundären Antikörper

Größenstandards

Methode	Bezeichnung	Firma
Western Blot - Primärmarker	Precision Plus Protein WesternC Standards	Bio-Rad
Western Blot - Sekundärmarker	Precision Protein StrepTactin -HRP Conjugate	Bio-Rad
DNA-Gelelektrophorese	BenchTop 100bp DNA Ladder	Promega

TABELLE B.3: Liste der genutzten Größenstandards

Primer

Gen	Primersequenz vorwärts rückwärts	Produktlänge [bp]
cnr1	GCATCCAAGGAAGGGATGTA CCGTTGTGTGTCTCATCCAC	250
cnr2	GCTCCTCATCTGTTGGTTCC TGACCATGGAGTTGATGAGGC	125
β -Aktin	ACTCCTACGTGGGCGACGAGG CAGGTCCAGACGCAGGATGGC	389
gapdh	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452

TABELLE B.4: Liste der genutzten Primer

Bibliographie

- [1] A Bruce et al. Molecular biology of the cell (5th ed.). *New York: Garland Science*, 2008.
- [2] DA Fletcher et al. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280):485–492, 2010.
- [3] H Herrmann et al. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7):562–573, 2007.
- [4] Q Wen et al. Polymer physics of the cytoskeleton. *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 15(5):177–182, 2011.
- [5] D Sept et al. Annealing accounts for the length of actin filaments formed by spontaneous polymerization. *Biophys J*, 77(6):2911–2919, 1999.
- [6] D Sept et al. Computer simulations of actin polymerization can explain the barbed-pointed end asymmetry. *J Mol Biol*, 295(5):1181–1189, 1999.
- [7] D Sept et al. Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys J*, 81(2):667–674, 2001.
- [8] D Vavylonis et al. Actin polymerization kinetics, cap structure, and fluctuations. *PNAS USA*, 102(24):8543–8548, 2005.
- [9] TD Pollard. Rate constants for the reactions of atp- and adp-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*, 103(6):2747–2754, 1986.
- [10] TD Pollard et al. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29:545–576, 2000.
- [11] SC Almo et al. Purification, characterization and crystallization of acanthamoeba profilin expressed in escherichia coli. *J Mol Biol*, 236(3):950–952, 1994.
- [12] F Kang et al. *J Biol Chem*, 274(Profilin Promotes Barbed-end Actin Filament Assembly without Lowering the Critical Concentration.):36963–36972, 1999.
- [13] D Pantaloni et al. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell*, 75(5):1007–1014, 1993.
- [14] VK Vinson et al. Interactions of acanthamoeba profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochem*, 37(31):10871–10880, 1998.
- [15] LM Machesky et al. Scar1 and the related wiskott-aldrich syndrome protein, wasp, regulate the actin cytoskeleton through the arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8(25):1347–1356, 1998.
- [16] LM Machesky et al. Scar, a wasp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the arp2/3 complex. *PNAS*, 96(7):3739–3744, 1999.
- [17] R Rothagi et al. The interaction between n-wasp and the arp2/3 complex links cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 97(2):221–231, 1999.

- [18] C Higashida et al. Actin polymerization-driven molecular movement of mdial in living cells. *Science*, 303(5666):2007–2010, 2004.
- [19] DR Kovar et al. Control of the assembly of atp- and adp-actin by formins and profilin. *Cell*, 124(2):423–435, 2006.
- [20] H Mizuno et al. Rotational movement of the formin mdial along the double helical strand of an actin filament. *Science*, 331(6013):80–83, 2011.
- [21] S Romero et al. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated atp hydrolysis. *Cell*, 119(3):419–429, 2004.
- [22] L Vidali et al. Rapid formin-mediated actin-filament elongation is essential for polarized plant cell growth. *PNAS*, 106(32):13341–13346, 2009.
- [23] M Pring et al. Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochem*, 31(2):1827–1836, 1992.
- [24] M Machesky et al. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*, 127(1):107–115, 1994.
- [25] RD Mullins et al. The interaction of arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *PNAS USA*, 95(11):6181–6186, 1998.
- [26] RD Mullins et al. Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the arp2/3 complex from acanthamoeba. *J Cell Biol*, 136(2):331–343, 1997.
- [27] RC Robinson et al. Crystal structure of arp2/3 complex. *Science*, 5547(294):1679–1684, 2001.
- [28] H Boukella et al. Soft listeria: actin-based propulsion of liquid drops. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 6(69), 2004.
- [29] PA Giardini et al. Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles. *PNAS*, 100(11):6493–6498, 2003.
- [30] J Tauntin et al. Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of n-wasp. *J Cell Biol*, 148(3):519–530, 2000.
- [31] A Upadhyaya et al. Probing polymerization forces by using actin-propelled lipid vesicles. *PNAS USA*, 100(8):4521–4526, 2003.
- [32] TM Svitkina et al. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*, 145(5):1009–1026, 1999.
- [33] HN Higgs et al. Regulation of actin polymerization by arp2/3 complex and wasp/scar proteins. *J Biol Chem*, 274(46):32531–32531, 1999.
- [34] JB Marchand et al. Interaction of wasp/scar proteins with actin and vertebrate arp2/3 complex. *Nat Cell Biol*, 3(1):76–82, 2001.
- [35] V Archar et al. A “primer”-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr Biol*, 20(5):423–428, 2010.
- [36] BA Smith et al. Pathway of actin filament branch formation by arp2/3 complex revealed by single-molecule imaging. *PNAS*, 110(4):1285–1290, 2013.
- [37] O Akin et al. Capping protein increases the rate of actin-based motility by promoting filament nucleation by the arp2/3 complex. *Cell*, 133(5):841–851, 2008.

- [38] MJ Dayel et al. In silico reconstitution of actin-based symmetry breaking and motility. *PLoS Biol*, 7(9), 2009.
- [39] A Kawska et al. How actin network dynamics control the onset of actin-based motility. *PNAS*, 109(36):14440–14445, 2012.
- [40] D Vignjevic et al. In vitro assembly of filopodia-like bundles. *Met Enzym*, 406:727–739, 2006.
- [41] D Vignjevic et al. Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol*, 160(6):951–962, 2003.
- [42] L Haviv et al. Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system. *PNAS USA*, 103(13):4906–4911, 2006.
- [43] D Pantaloni et al. The arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol*, 2(7):385–391, 2000.
- [44] AC Reymann et al. Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat Mat*, 9(10):827–832, 2010.
- [45] V Noireaux et al. Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophysical journal*, 78(3):1643–1654, 2000.
- [46] ES Chhabra et al. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol*, 9(10):1110–1121, 2007.
- [47] ML Gardel et al. Mechanical response of cytoskeletal networks. *Meth Cell Biol*, 89:487–519, 2008.
- [48] S Koehler et al. Collective dynamics of active cytoskeletal networks. *PloS One*, 6(8), 2011.
- [49] C Revenu et al. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(8):635–646, 2004.
- [50] B Wagner et al. Cytoskeletal polymer networks: the molecular structure of cross-linkers determines macroscopic properties. *PNAS*, 103(38):13974–13978, 2006.
- [51] TT Falzone et al. Assembly kinetics determine the architecture of α -actinin crosslinked f-actin networks. *Nat Com*, 3:861, 2012.
- [52] S Huang et al. Arabidopsis villin1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerization. *Plant Cell*, 17(2):486–501, 2005.
- [53] KE Kasza et al. Actin filament length tunes elasticity of flexibly cross-linked actin networks. *Biophys J*, 99(4):1091–1100, 2010.
- [54] MG Klein et al. Structure of the actin crosslinking core of fimbrin. *Struct*, 12(6):999–1013, 2004.
- [55] J Sedzinski et al. Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature*, 476(7361):462–466, 2011.
- [56] TP Stossel et al. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2):138–145, 2001.
- [57] O Lieleg et al. Cytoskeletal polymer networks: viscoelastic properties are determined by the microscopic interaction potential of cross-links. *Biophys J*, 96(11):4725–4732, 2009.
- [58] CT Skau et al. Actin filament bundling by fimbrin is important for endocytosis, cytokinesis, and polarization in fission yeast. *J Biol Chem*, 286(30):26964–26977, 2011.
- [59] RK Meyer et al. Bundling of actin filaments by alpha-actinin depends on its molecular length. *J Cell Biol*, 110(6):2013–2024, 1990.

- [60] KM Schmoller et al. Cross-linking molecules modify composite actin networks independently. *Phys Rev Lett*, 101(11), 2008.
- [61] DH Wachsstock et al. Affinity of alpha-actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels. *Biophys J*, 65(1):205–214, 1993.
- [62] DH Wachsstock et al. Cross-linker dynamics determine the mechanical properties of actin gels. *Biophys J*, 66(3):801–809, 1994.
- [63] J Xu et al. Mechanical properties of actin filament networks depend on preparation, polymerization conditions, and storage of actin monomers. *Biophys J*, 74(5):2731–2740, 1998.
- [64] C Yang et al. Filopodia initiation: focus on the arp2/3 complex and formins. *Cell Adh Mig*, 5(5):402–408, 2011.
- [65] JR Bartles. Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 12(1):72–78, 2000.
- [66] JM Ferrer et al. Measuring molecular rupture forces between single actin filaments and actin-binding proteins. *PNAS*, 105(27):9221–9226, 2008.
- [67] H Miyata et al. Strength and lifetime of the bond between actin and skeletal muscle α -actinin studied with an optical trapping technique. *Biochem Biophys Acta*, 1290(1):83–88, 1996.
- [68] MA Chesarone et al. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(1):62–74, 2010.
- [69] ES Harris et al. Actin cytoskeleton: formins lead the way. *Curr Biol*, 14(13):520–522, 2004.
- [70] Q Chen et al. Formins filter modified actin subunits during processive elongation. *J Struct Biol*, 177(1):32–39, 2012.
- [71] BL Goode et al. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*, 76:593–627, 2007.
- [72] A Michelot et al. A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr Biol*, 16(19):1924–1930, 2006.
- [73] ES Harris et al. Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, frl1 and mdia2. *J Biol Chem*, 281(20):14383–14392, 2006.
- [74] A Michelot et al. The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of arabidopsis formin1. *Plant Cell*, 17(8):2296–2313, 2005.
- [75] JB Moseley et al. Differential activities and regulation of saccharomyces cerevisiae formin proteins bni1 and bnr1 by bud6. *J Biol Chem*, 280(30):28023–28033, 2005.
- [76] ES Harris et al. Assembly of filopodia by the formin frl2 (fmnl3). *Cytoskel*, 67(12):755–772, 2010.
- [77] M Barzik et al. Ena/vasp proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Bio Chem*, 280(31):28653–28662, 2005.
- [78] D Breitsprecher et al. Clustering of vasp actively drives processive, wh2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J*, 27(22):2943–2954, 2008.
- [79] D Breitsprecher et al. Molecular mechanism of ena/vasp-mediated actin-filament elongation. *EMBO J*, 30(3):456–467, 2011.
- [80] SD Hansen et al. Vasp is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J Cell Biol*, 191(3):571–584, 2010.

- [81] L Pasic et al. Ena/vasp proteins capture actin filament barbed ends. *J Biol Chem*, 283(15): 9814–9819, 2008.
- [82] A Michelot et al. Actin-filament stochastic dynamics mediated by adf/cofilin. *Curr Biol*, 17(10): 825–833, 2007.
- [83] MJ Footer et al. Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *PNAS*, 104(7):2181–2186, 2007.
- [84] K Burridge et al. The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol*, 200(1):9–19, 2013.
- [85] P Hotulainen et al. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells.
- [86] D Laporte et al. Alpha-actinin and fimbrin cooperate with myosin ii to organize actomyosin bundles during contractile-ring assembly. *Mol Biol Cell*, 23(16):3094–3110, 2012.
- [87] US Schwarz et al. United we stand—integrating the actin cytoskeleton and cell–matrix adhesions in cellular mechanotransduction. *J Cell Sci*, 125(13):3051–3060, 2012.
- [88] M Theyry et al. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskel*, 63(6):341–355, 2006.
- [89] S Tojkander et al. A molecular pathway for myosin ii recruitment to stress fibers. *Curr Biol*, 21(7):539–550, 2011.
- [90] S Kohler et al. Contraction mechanisms in composite active actin networks. *PLoS One*, 7(7), 2012.
- [91] T Thoresen et al. Reconstitution of contractile actomyosin bundles. *Biophys J*, 100(11):2698–2705, 2011.
- [92] L Haviv et al. A cytoskeletal demolition worker: myosin ii acts as an actin depolymerization agent. *J Mol Biol*, 375(2):325–330, 2008.
- [93] MP Murrell et al. F-actin buckling coordinates contractility and severing in a biomimetic actomyosin cortex. *PNAS*, 109(51):20820–20825, 2012.
- [94] SK Vogel et al. Myosin motors fragment and compact membrane-bound actin filaments. *Elife*, 2, 2013.
- [95] AC Reymann et al. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science*, 336(6086):1310–1314, 2012.
- [96] T Thoresen et al. Thick filament length and isoform composition determine self-organized contractile units in actomyosin bundles. *Biophys J*, 104(3):655–665, 2013.
- [97] E Ingerman et al. Arp2/3 complex atp hydrolysis promotes lamellipodial actin network disassembly but is dispensable for assembly. *J Cell Biol*, 200(5):619–633, 2013.
- [98] AC Reymann et al. Turnover of branched actin filament networks by stochastic fragmentation with adf/cofilin. *Mol Biol Cell*, 22(14):2541–2550, 2011.
- [99] MF Carlier et al. Actin depolymerizing factor (adf/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, 136(6):1307–1322, 1997.
- [100] E Andrianantoandro et al. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of adf/cofilin. *Mol Cell*, 24(1):13–23, 2006.
- [101] M Enrique. How cofilin severs an actin filament. *Biophys Rev*, 1(2):51–59, 2009.

- [102] WA Elam et al. Biophysics of actin filament severing by cofilin. *FEBS letters*, 587(8):1215–1219, 2013.
- [103] BR McCullough et al. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J Mol Biol*, 381(3):550–558, 2008.
- [104] C Suarez et al. Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Curr Biol*, 21(10):862–868, 2011.
- [105] L Blanchoin et al. Mechanism of interaction of acanthamoeba actophorin (adf/cofilin) with actin filaments. *J Biol Chem*, 274(22):15538–15546, 1999.
- [106] I Mabuchi. An actin-depolymerizing protein (depactin) from starfish oocytes: properties and interaction with actin. *J Cell Biol*, 97(161):2–1, 1983.
- [107] D Breitsprecher et al. Cofilin cooperates with fascin to disassemble filopodial actin filaments. *J Cell Sci*, 124(19):3305–3318, 2011.
- [108] KM Schmoller et al. Slow down of actin depolymerization by cross-linking molecules. *J Struct Biol*, 173(2):350–357, 2011.
- [109] L Blanchoin et al. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by arp2/3 complex and wasp/scar proteins. *Nature*, 404(6781):1007, 2000.
- [110] C Chan et al. Cofilin dissociates arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr Biol*, 19(7):537–545, 2009.
- [111] RE Mahaffy et al. Kinetics of the formation and dissociation of actin filament branches mediated by arp2/3 complex. *Biophys J*, 91(9):3519–3528, 2006.
- [112] HY Kueh et al. Quantitative analysis of actin turnover in listeria comet tails: Evidence for catastrophic filament turnover. *Biophys J*, 99(7):2153–2162, 2010.
- [113] HY Kueh et al. Actin disassembly by cofilin, coronin, and aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J Cell Biol*, 182(2):341–353, 2008.
- [114] L Blanchoin et al. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*, 94(1):235–263, 2014.
- [115] M Abercrombie et al. The locomotion of fibroblasts in culture: Iv. electron microscopy of the leading lamella. *Exp Cell Res*, 67(2):359–367, 1971.
- [116] M Abercrombie et al. Locomotion of fibroblasts in culture: V. surface marking with concanavalin a. *Exp Cell Res*, 73(2):536–539, 1972.
- [117] DA Lauffenburger et al. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3):359–369, 1996.
- [118] TJ Mitchison et al. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 84(3):371–379, 1996.
- [119] A Mogilner et al. The physics of filopodial protrusion. *Biophys J*, 89(2):782–795, 2005.
- [120] JA Theriot et al. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature*, 352(6331):126, 1991.
- [121] K Xu et al. Dual-objective storm reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nat Meth*, 9(2):185, 2012.
- [122] KG Campellone et al. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4):237–251, 2010.
- [123] Z Chen et al. Structure and control of the actin regulatory wave complex. *Nature*, 468(7323):533–538, 2010.

- [124] AM Lebensohn et al. Activation of the wave complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell*, 36(3):512–524, 2009.
- [125] TM Svitkina et al. Analysis of the actin–myosin ii system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol*, 139(2):397–415, 1997.
- [126] J Weichsel et al. Reconstructing the orientation distribution of actin filaments in the lamellipodium of migrating keratocytes from electron microscopy tomography data. *Cytometry A*, 81(6):496–507, 2012.
- [127] H Tang et al. Loss of scar/wave complex promotes n-wasp-and fak-dependent invasion. *Curr Biol*, 23(2):107–117, 2013.
- [128] RJ Petrie et al. Nonpolarized signaling reveals two distinct modes of 3d cell migration. *J Cell Biol*, 197(3):439–455, 2012.
- [129] JE Bear et al. Antagonism between ena/vasp proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*, 109(4):509–521, 2002.
- [130] CI Lacayo et al. Emergence of large-scale cell morphology and movement from local actin filament growth dynamics. *PLoS Biol*, 5(9), 2007.
- [131] K Rottner et al. Vasp dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol*, 1(5):321–322, 1999.
- [132] D Raucher et al. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol*, 148(1):127–136, 2000.
- [133] AR Houk et al. Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrophil migration. *Cell*, 148(1):175–188, 2012.
- [134] N Ofer et al. Actin disassembly clock determines shape and speed of lamellipodial fragments. *PNAS*, 108(51):20394–20399, 2011.
- [135] CA Wilson et al. Myosin ii contributes to cell-scale actin network treadmilling via network disassembly. *Nature*, 465(7296):373–377, 2010.
- [136] F Heinemann et al. Keratocyte lamellipodial protrusion is characterized by a concave force-velocity relation. *Biophys J*, 100(6):1420–1427, 2011.
- [137] Y Marcy et al. Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation. *PNAS USA*, 101(16):5992–5997, 2004.
- [138] M Prass et al. Direct measurement of the lamellipodial protrusive force in a migrating cell. *J Cell Biol*, 174(6):767–772, 2006.
- [139] J Block et al. Fmnl2 drives actin-based protrusion and migration downstream of cdc42. *Curr Biol*, 22(11):1005–1012, 2012.
- [140] JV Small et al. Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. *J Cell Biol*, 129(5):1275–1286, 1995.
- [141] CE Chan et al. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science*, 322(5908):1687–1691, 2008.
- [142] SW Moore et al. Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing. *Dev Cell*, 19(2):194–206, 2010.
- [143] L Vonna et al. Micromechanics of filopodia mediated capture of pathogens by macrophages. *Eur Biophys J*, 36(2):145–151, 2007.
- [144] S Romero et al. Atp-mediated erk1/2 activation stimulates bacterial capture by filopodia, which precedes shigella invasion of epithelial cells. *Cell Host Micr*, 9(6):508–519, 2011.

- [145] H Kress et al. Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. *PNAS*, 104(28):11633–11638, 2007.
- [146] P Naumanen et al. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J Microsc*, 231(3):446–454, 2008.
- [147] S Pellegrin et al. Actin stress fibres. *J Cell Sci*, 120(20):3491–3499, 2007.
- [148] DT Burnette et al. A role for actin arcs in the leading edge advance of migrating cells. *Nat Cell Biol*, 13(4):371–381, 2011.
- [149] A Schonichen et al. Fhod1 is a combined actin filament capping and bundling factor that selectively associates with actin arcs and stress fibers. *J Cell Sci*, 126(8):1891–1901, 2013.
- [150] M Nemethova et al. Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella. *J Cell Biol*, 180(6):1233–1244, 2008.
- [151] AY Alexandrova et al. Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PloS one*, 3(9), 2008.
- [152] CK Choi et al. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin ii motor-independent manner. *Nat Cell Biol*, 10(9):1039–1050, 2008.
- [153] A Ponti et al. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science*, 305(5691):1782–1786, 2004.
- [154] SL Gupton et al. Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell*, 125(7):1361–1374, 2006.
- [155] P Vallotton et al. Tracking retrograde flow in keratocytes: news from the front. *Mol Biol Cell*, 16(3):1223–1231, 2005.
- [156] P Kanchanawong et al. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323):580–584, 2010.
- [157] N Morone et al. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J Cell Biol*, 174(6):851–862, 2006.
- [158] CT Charras et al. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J Cell Biol*, 175(3):477–490, 2006.
- [159] AI McClatchey et al. Merlin and the erm proteins—regulators of receptor distribution and signaling at the cell cortex. *Trends Cell Biol*, 19(5):198–206, 2009.
- [160] GT Charras et al. Life and times of a cellular bleb. *Biophys J*, 94(5):1836–1853, 2008.
- [161] GT Charras et al. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature*, 435(7040):365–369, 2005.
- [162] E Paluch et al. Cortical actomyosin breakage triggers shape oscillations in cells and cell fragments. *Biophys J*, 89(1):724–733, 2005.
- [163] J Sedzinski et al. Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature*, 476(7361):462, 2011.
- [164] G Charras et al. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(9):730–736, 2008.
- [165] P Friedl et al. Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the dictyostelium paradigm of cell movement. *J Leuko Biol*, 70(4):491–509, 2001.
- [166] K Yoshida et al. Dissection of amoeboid movement into two mechanically distinct modes. *J Cell Sci*, 119(18):3833–3844, 2006.

- [167] RM Hochmuth. Micropipette aspiration of living cells. *J Biomech*, 33(1):15–22, 2000.
- [168] M Bergert et al. Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration. *PNAS*, 109(36):14434–14439, 2012.
- [169] J Howard. Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton. 2001.
- [170] R Ananthakrishnan et al. Quantifying the contribution of actin networks to the elastic strength of fibroblasts. *J Theo Biol*, 242(2):502–516, 2006.
- [171] A Desai et al. Microtubule polymerization dynamics. *An Rev Cell Develop Biol*, 13(1):83–117, 1997.
- [172] J Howard et al. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature*, 422(6933):753–758, 2003.
- [173] E Nogales et al. Structural mechanisms underlying nucleotide-dependent self-assembly of tubulin and its relatives. *Curr Opin Struct Biol*, 16(2):221–229, 2006.
- [174] E Nogales et al. Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Curr Opin Cell Biol*, 18(2):179–184, 2006.
- [175] S Doxsey. Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(9):688–698, 2001.
- [176] T Vinogradova et al. Microtubule network asymmetry in motile cells: role of golgi-derived array. *Cell Cycle*, 8(14):2168–2174, 2009.
- [177] T Meads et al. Polarity and nucleation of microtubules in polarized epithelial cells. *Cell Motil Cytoskel*, 32(4):273–288, 1995.
- [178] AM Tassin et al. Centrosome structure and microtubule nucleation in animal cells. *Biol Cell*, 91(4-5):343–354, 1999.
- [179] T Mitchison et al. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312(5991):237–242, 1984.
- [180] A Dimitrov et al. Detection of gtp-tubulin conformation in vivo reveals a role for gtp remnants in microtubule rescues. *Science*, 322(5906):1353–1356, 2008.
- [181] CP Brangwynne et al. Force fluctuations and polymerization dynamics of intracellular microtubules. *PNAS*, 104(41):16128–16133, 2007.
- [182] M Dogterom et al. Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science*, 278(5339):856–860, 1997.
- [183] DK Fygenson et al. Mechanics of microtubule-based membrane extension. *Phys Rev Let*, 79(22):4497, 1997.
- [184] A Mogilner et al. Polymer motors: pushing out the front and pulling up the back. *Curr Biol*, 13(18):721–733, 2003.
- [185] PM Miller et al. Golgi-derived clasp-dependent microtubules control golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol*, 11(9):1069–1080, 2009.
- [186] S Yadav et al. A primary role for golgi positioning in directed secretion, cell polarity, and wound healing. *Mol Biol Cell*, 20(6):1728–1736, 2009.
- [187] N Osmani et al. Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J Cell Biol*, 191(7):1261–1269, 2010.
- [188] A Palamidessi et al. Endocytic trafficking of rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*, 134(1):135–147, 2008.

- [189] LA Mingle et al. Localization of all seven messenger rnas for the actin-polymerization nucleator arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J Cell Sci*, 118(11):2425–2433, 2005.
- [190] Y Oleynikov et al. Rna localization: different zipcodes, same postman? *Trends Cell Biol*, 8(10):381–383, 1998.
- [191] CM Waterman-Storer et al. Microtubule growth activates rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol*, 1(1):45–50, 1999.
- [192] G Rinnerthaler et al. Contact formation during fibroblast locomotion: involvement of membrane ruffles and microtubules. *J Cell Biol*, 106(3):747–760, 1988.
- [193] S Stehbens et al. Targeting and transport: how microtubules control focal adhesion dynamics. *J Cell Biol*, 198(4):481–489, 2012.
- [194] C Rooney et al. The rac activator stef (tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *EMBO reports*, 11(4):292–298, 2010.
- [195] I Kaverina et al. Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J Cell Biol*, 142(1):181–190, 1998.
- [196] Z Gu et al. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *J Cell Biol*, 193(1):61–70, 2011.
- [197] S Etienne-Manneville et al. Rho gtpases in cell biology. *Nature*, 420(6916):629–635, 2002.
- [198] O Krylyshkina et al. Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. *J Cell Biol*, 161(5):853–859, 2003.
- [199] I Kaverina et al. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol*, 146(5):1033–1044, 1999.
- [200] R Rid et al. The last but not the least: the origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells. *Cytoskel*, 61(3):161–171, 2005.
- [201] Z Qin et al. A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. *Journal of Biomechanics*, 43(1):15–22, 2010.
- [202] E Fuchs et al. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63:345–382, 1994.
- [203] TA Smith et al. Sequence comparisons of intermediate filament chains: Evidence of a unique functional/structural role for coiled-coil segment 1a and linker 11. *J Struct Biol*, 137(1-2):128–145, 2002.
- [204] AV Sokolova et al. Monitoring intermediate filament assembly by small-angle x-ray scattering reveals the molecular architecture of assembly intermediates. *PNAS*, 103(44):128–145, 2006.
- [205] H Hermann et al. Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins. *J Mol Biol*, 286(5):1403–1420, 1999.
- [206] PM Steinert et al. Diversity of intermediate filament structure. evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments. *J Biol Chem*, 268(33):24916–24925, 1993.
- [207] N Mücke et al. Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin. *J Mol Biol*, 340(1):97–114, 2004.
- [208] S Georgakopoulou et al. Near-uv circular dichroism reveals structural transitions of vimentin subunits during intermediate filament assembly. *J Mol Biol*, 386(2):544–553, 2009.

- [209] L Chang et al. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Mol Cell Biol*, 5(8):601–613, 2004.
- [210] SM Troyanovsky et al. Contributions of cytoplasmic domains of desmosomal cadherins to desmosome assembly and intermediate filament anchorage. *Cell*, 72(4):601–613, 1993.
- [211] MM Mogenson et al. Keratin filament deployment and cytoskeletal networking in a sensory epithelium that vibrates during hearing. *Cytoskel*, 41(2):138–153, 1998.
- [212] RD Goldman et al. Intermediate filament networks: organization and possible functions of a diverse group of cytoskeletal elements. *J Cell Sci*, 5:69–97, 1986.
- [213] MAJ Chidgey. Desmosomes and disease. *Histol Histopathol*, 12:1159–168, 1997.
- [214] PJ Koch et al. Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*, 6:682–687, 1994.
- [215] AP Kowalczyk et al. Ve-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: A pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *J Cell Sci*, 11(20):3045–3057, 1998.
- [216] YJ Kim et al. Modulating the strength of cadherin adhesion: Evidence for a novel adhesion complex. *J Cell Sci*, 118(17):3883–3894, 2005.
- [217] S Kreis et al. The intermediate filament protein vimentin binds specifically to a recombinant integrin $\alpha 2/\beta 1$ cytoplasmic tail complex and co-localizes with native $\alpha 2/\beta 1$ in endothelial cell focal adhesions. *Exp Cell Res*, 305(1):110–121, 2005.
- [218] D Tsurata et al. The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress. *J Cell Sci*, 116(24):4977–4984, 2003.
- [219] C Alberti. Cytoskeleton structure and dynamic behaviour: quick excursus from basic molecular mechanisms to some implications in cancer chemotherapy. *Euro Rev Med Pharmacol Sci*, 13(1): 13–21, 2009.
- [220] N Wang et al. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(1):C188–194, 2000.
- [221] PM Steinert et al. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu Rev Biochem*, 57(1):593–625, 1988.
- [222] LM Godsel et al. Intermediate filament assembly: dynamics to disease. *Trends Cell Biol*, 18(1): 28–37, 2008.
- [223] H Herrmann et al. Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu Rev Biochem*, 73:749–789, 2004.
- [224] L Kreplak et al. Tensile properties of single desmin intermediate filaments. *Biophys J*, 94(7): 2790–2799, 2008.
- [225] L Kreplak et al. Exploring the mechanical behavior of single intermediate filaments. *J Mol Biol*, 354(3):569–577, 2005.
- [226] N Mücke et al. Assessing the Flexibility of Intermediate Filaments by Atomic Force Microscopy. *J Mol Biol*, 335(5):1241–1250, 2004.
- [227] C Storm et al. Nonlinear elasticity in biological gels. *Curr Opin Solid State Mater Sci*, 435: 1191–194, 2005.
- [228] JD Ferry. Viscoelastic properties of polymers, 3. edition. 1980.

- [229] N Wang et al. Mechanics of vimentin intermediate filaments. *J Muscle Res Cell Motil*, 23(5-6): 535–540, 2002.
- [230] RD Goldman. The role of three cytoplasmic fibers in bhk-21 cell motility. *J Cell Biol*, 51(3): 752–762, 1971.
- [231] R Windoffer et al. De novo formation of cyokeratin filament networks originates from the cell cortex in a-431 cells. *Cell Motil Cytoskel*, 50(1):33–44, 2001.
- [232] KJ Green et al. The relationship between intermediate filaments and microfilaments before and during the formation of desmosomes and adherens-type junctions in mouse epidermal keratinocytes. *J Cell Biol*, 104(5):1389–1402, 1987.
- [233] MV Rao et al. Myosin va binding to neurofilaments is essential for correct myosin va distribution and transport and neurofilament density. *J Cell Biol*, 159(2):279–290, 2002.
- [234] V Prahlad et al. Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. *J Cell Biol*, 143(1):159–170, 1998.
- [235] FK Gyoeva et al. Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin. *Nature*, 353(6343):445–448, 1991.
- [236] BT Helfand et al. A requirement for cytoplasmic dynein and dynactin in intermediate filament network assembly and organization. *J Cell Biol*, 157(5):795–806, 2002.
- [237] V Prahlad et al. Fast transport of neurofilament protein along microtubules in squid axoplasm. *J Cell Sci*, 113(22):3939–3946, 2000.
- [238] JT Yabe et al. Phospho-dependent association of neurofilament proteins with kinesin in situ. cell motil. *Cell Motil Cytoskel*, 45(4):249–262, 2000.
- [239] JT Yabe et al. Kinesin-mediated transport of neurofilament protein oligomers in growing axons. *J Cell Sci*, 112(21):3799–3814, 1999.
- [240] JV Shah et al. Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin. *Mol Biol Cell*, 11(10):3495–3508, 2000.
- [241] KH Yoon et al. Insights into the dynamic properties of keratin intermediate filaments in living epithelial cells. *J Cell Biol*, 153(3):503–516, 2001.
- [242] KJ Green et al. Relationship between intermediate filaments and microfilaments in cultured fibroblasts: evidence for common foci during cell spreading. *Cell Motil Cytoskel*, 6(4):408–418, 1986.
- [243] M Yoon et al. Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J Cell Biol*, 143(1):147–157, 1998.
- [244] BT Helfand et al. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol Biol Cell*, 22(8):1274–1289, 2011.
- [245] R Windoffer et al. Focal adhesions are hotspots for keratin filament precursor formation. *J Cell Biol*, 173(3):341–348, 2006.
- [246] ML Gardel et al. Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science*, 304(5675): 1301–1305, 2004.
- [247] ML Gardel et al. Prestressed f-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *PNAS USA*, 103(6):1762–1767, 2006.
- [248] FC MacKintosh et al. Elasticity of semiflexible biopolymer networks. *Phys Rev Let*, 75(24), 1995.

- [249] J Xu et al. Strain hardening of actin filament networks regulation by the dynamic cross-linking protein α -actinin. *J Biol Chem*, 275(46):35886–35892, 2000.
- [250] PA Janmey et al. Negative normal stress in semiflexible biopolymer gels. *Nat Mat*, 6(1):48–51, 2007.
- [251] YC Lin et al. Viscoelastic properties of microtubule networks. *Macromol*, 40(21):7714–7720, 2007.
- [252] J Xu et al. Dynamic cross-linking by α -actinin determines the mechanical properties of actin filament networks. *J Biol Chem*, 273(16):9570–9576, 1998.
- [253] O Chaudhuri et al. Reversible stress softening of actin networks. *Nature*, 445(7125):295–298, 2007.
- [254] H Kojima et al. Direct measurement of stiffness of single actin filaments with and without tropomyosin by in vitro nanomanipulation. *PNAS*, 91(26):12962–12966, 1994.
- [255] F Gittes et al. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol*, 120:923–923, 1993.
- [256] A Ott et al. Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy. *Phys Rev E*, 48(3), 1993.
- [257] C Bustamante et al. Entropic elasticity of lambda-phage dna. *Science*, 265(5178):1599–1600, 1994.
- [258] M Fixman et al. Polymer conformational statistics. iii. modified gaussian models of stiff chains. *J Chem Phys*, 58(4):1564–1568, 1973.
- [259] X Liu et al. Mechanics of f-actin characterized with microfabricated cantilevers. *Biophys J*, 83(5):2705–2715, 2002.
- [260] DA Head et al. Deformation of cross-linked semiflexible polymer networks. *Phys Rev Lett*, 91(10), 2003.
- [261] DA Head et al. Distinct regimes of elastic response and deformation modes of cross-linked cytoskeletal and semiflexible polymer networks. *Phys Rev E*, 68(6), 2003.
- [262] M Das et al. Effective medium theory of semiflexible filamentous networks. *Phys Rev Lett*, 99(3), 2007.
- [263] ML Gardel et al. Scaling of f-actin network rheology to probe single filament elasticity and dynamics. *Phys Rev Letter*, 93(18), 2004.
- [264] J Liu et al. Visualizing the strain field in semiflexible polymer networks: strain fluctuations and nonlinear rheology of f-actin gels. *Phys Rev Lett*, 98(19), 2007.
- [265] M Sato et al. Dependence of the mechanical properties of actin/ α -actinin gels on deformation rate. *Nature*, 325(6107):828–830, 1987.
- [266] M Tempel et al. Temperature-induced sol-gel transition and microgel formation in α -actinin cross-linked actin networks: a rheological study. *Phys Rev E*, 54(2):1802, 1996.
- [267] ML Gardel et al. Stress-dependent elasticity of composite actin networks as a model for cell behavior. *Phys Rev Lett*, 96(8), 2006.
- [268] D Humphrey et al. Active fluidization of polymer networks through molecular motors. *Nature*, 416(6879):413–416, 2002.
- [269] D Smith et al. Molecular motor-induced instabilities and cross linkers determine biopolymer organization. *Biophys J*, 93(12):4445–4452, 2007.
- [270] D Mizuno et al. Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science*, 315(5810):370–373, 2007.

- [271] PM Bendix et al. A quantitative analysis of contractility in active cytoskeletal protein networks. *Biophys J*, 94(8):3126–3136, 2008.
- [272] GH Koenderink et al. An active biopolymer network controlled by molecular motors. *PNAS*, 106(36):15192–15197, 2009.
- [273] NL Dasanayake et al. General mechanism of actomyosin contractility. *Phys Rev Lett*, 107(11), 2011.
- [274] JA Tuszynski et al. Anisotropic elastic properties of microtubules. *Euro Phys J E: Soft Mat Biol Phys*, 17(1):29–35, 2005.
- [275] C Guzman et al. Exploring the mechanical properties of single vimentin intermediate filaments by atomic force microscopy. *J Mol Biol*, 360(3):623–630, 2006.
- [276] H Herrmann et al. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest*, 119(7):1772–1783, 2009.
- [277] DS Fudge et al. The mechanical properties of hydrated intermediate filaments: insights from hagfish slime threads. *Biophys J*, 85(3):2015–2027, 2003.
- [278] L Kreplak et al. New aspects of the α -helix to β -sheet transition in stretched hard α -keratin fibers. *Biophys J*, 87(1):640–647, 2004.
- [279] DB Staple et al. Stretching, unfolding, and deforming protein filaments adsorbed at solid-liquid interfaces using the tip of an atomic-force microscope. *Phys Rev Lett*, 102(12):128302, 2009.
- [280] PA Janmey et al. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol*, 113(1):155–160, 1991.
- [281] YC Lin et al. Origins of elasticity in intermediate filament networks. *Phys Rev Lett*, 104(5):058101, 2010.
- [282] YC Lin et al. Divalent cations crosslink vimentin intermediate filament tail domains to regulate network mechanics. *J Mol Biol*, 399(4):637–644, 2010.
- [283] EA Evans et al. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science*, 316(5828):1148–1153, 2007.
- [284] S Rakshit et al. Biomechanics of cell adhesion: how force regulates the lifetime of adhesive bonds at the single molecule level. *Phys Chem Chem Phys*, 16(6):2211–2223, 2014.
- [285] RO Hynes. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6):673–687, 2002.
- [286] B Zimmerman et al. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cytoskel*, 58(3):143–159, 2004.
- [287] JT Parsons et al. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(9):633–643, 2010.
- [288] AJ Ridley et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651):1704–1709, 2003.
- [289] E Puklin-Faucher et al. The mechanical integrin cycle. *J Cell Sci*, 122(2):179–186, 2009.
- [290] M Vicente-Manzanares et al. Integrins in cell migration—the actin connection. *J Cell Sci*, 122(2):199–206, 2009.
- [291] ID Campbell et al. The talin–tail interaction places integrin activation on firm ground. *Trends Biochem Sci*, 29(8):429–435, 2004.
- [292] WH Ziegler et al. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol*, 16(9):453–460, 2006.

- [293] CA Otey et al. α -actinin revisited: A fresh look at an old player. *Cytoskel*, 58(2):104–111, 2004.
- [294] JT Parsons. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, 116(8):1409–1416, 2003.
- [295] U Cavallaro et al. Cell adhesion and signalling by cadherins and ig-cams in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4(2):118–132, 2004.
- [296] R Sarpal et al. Mutational analysis supports a core role for drosophila α -catenin in adherens junction function. *J Cell Sci*, 125(1):233–245, 2012.
- [297] R Desai et al. Monomeric [alpha]-catenin links cadherin to the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, 15(3):261–273, 2013.
- [298] A Pacquelet et al. Regulatory mechanisms required for de-cadherin function in cell migration and other types of adhesion. *J Cell Biol*, 170(5):803–812, 2005.
- [299] NK Noren et al. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via rho family gtpases. *J Cell Biol*, 150(3):567–580, 2000.
- [300] PZ Anastasiadis et al. The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *J Cell Sci*, 113(8):1319–1334, 2000.
- [301] S Yamada et al. Localized zones of rho and rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell–cell adhesion. *J Cell Biol*, 178(3):517–527, 2007.
- [302] TD Perez et al. Immediate-early signaling induced by e-cadherin engagement and adhesion. *J Biol Chem*, 283(8):5014–5022, 2008.
- [303] PZ Anastasiadis et al. Inhibition of rhoa by p120 catenin. *Nat Cell Biol*, 2(9):637–644, 2000.
- [304] LDM Derycke et al. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Devel Biol*, 48(5-6):463–476, 2004.
- [305] W Birchmeier et al. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochem Biophys Acta*, 1198(1):11–26, 1994.
- [306] S Hirohashi. Inactivation of the e-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*, 153(2):333–339, 1998.
- [307] RB Hazan et al. Exogenous expression of n-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol*, 148(4):779–790, 2000.
- [308] MT Nieman et al. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their e-cadherin expression. *J Cell Biol*, 147(3):631–644, 1999.
- [309] A Gama et al. Cadherin cell adhesion system in canine mammary cancer: a review. *Veterinary Med Internat*, 2012, 2012.
- [310] World Health Organization. Cancer fact sheet no 297. 2014.
- [311] National Cancer Institute. Defining cancer. 2014.
- [312] P Kaatsch et al. Krebs in deutschland 2007/2008 – häufigkeiten und trends. *Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert-Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.*, pages 1–136, 2012.
- [313] J Ferlay et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: Globocan 2008. *Int J Cancer*, 127(12):2893–2917, 2010.
- [314] A Ben-Ze'ev. The cytoskeleton in cancer cells. *Biochem Biophys Acta*, 780(3):197–212, 1985.

- [315] C Cunningham et al. Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science*, 255(5042):325, 1992.
- [316] J Katsantonis et al. Differences in the g/total actin ratio and microfilament stability between normal and malignant human keratinocytes. *Cell Biochem Funct*, 12(4):267–274, 1994.
- [317] A Moustakas et al. Regulation of actin organisation by tgf-beta in h-ras-transformed fibroblasts. *J Cell Sci*, 112(8):1169–1179, 1999.
- [318] MK Rao et al. Actin cytoskeletal network in aging and cancer. *Mut Res*, 256(2-6):139–148, 1991.
- [319] J Guck et al. Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophys J*, 88(5):3689–3698, 2005.
- [320] S Suresh et al. Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria. *Acta Biomater*, 1(1):15–30, 2005.
- [321] SE Cross et al. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nat Nanotechnol*, 2(12):780–783, 2007.
- [322] J Bercoff et al. In vivo breast tumor detection using transient elastography. *Ultrasound Med Biol*, 29(10):1387–1396, 2003.
- [323] AL McKnight et al. Mr elastography of breast cancer: preliminary results. *Am J Roent*, 178(6):1411–1417, 2002.
- [324] S Iyer et al. Atomic force microscopy detects differences in the surface brush of normal and cancerous cells. *Nat Nanotech*, 4(6):389–393, 2009.
- [325] M Lekka et al. Cancer cell detection in tissue sections using afm. *Arch Biochem Biophys*, 518(2):151–156, 2012.
- [326] M Lekka et al. Cancer cell recognition–mechanical phenotype. *Micron*, 43(12):1259–1266, 2012.
- [327] QS Li et al. Afm indentation study of breast cancer cells. *Biochemi Biophys Res Commun*, 374(4):609–613, 2008.
- [328] T Ochalek et al. Correlation between cell deformability and metastatic potential in b16-f1 melanoma cell variants. *Cancer Res*, 48(18):5124–5128, 1988.
- [329] TW Remmerbach et al. Oral cancer diagnosis by mechanical phenotyping. *Cancer Res*, 69(5):1728–1732, 2009.
- [330] O Thoumine et al. Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *Biorheology*, 110(17):309–326, 1997.
- [331] EM Darling et al. A thin-layer model for viscoelastic, stress-relaxation testing of cells using atomic force microscopy: do cell properties reflect metastatic potential? *Biophys J*, 92(5):1784–1791, 2007.
- [332] EC Faria et al. Measurement of elastic properties of prostate cancer cells using afm. *Analyst*, 133(11):1498–1500, 2008.
- [333] S Park et al. Cell motility and local viscoelasticity of fibroblasts. *Biophys J*, 89(6):4330–4342, 2005.
- [334] CP Brangwynne et al. Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J Cell Biol*, 173(5):733–741, 2006.
- [335] TL Hwang et al. Rosenthal fibers in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol*, 57(2):230–232, 1982.

- [336] K Heikinheimon et al. Cytoskeletal gene expression in normal and neoplastic human odontogenic epithelia. *Lab Invest*, 65(6):688–701, 1991.
- [337] MJ Hendrix et al. Coexpression of vimentin and keratins by human melanoma tumor cells: correlation with invasive and metastatic potential. *Natl Cancer Inst*, 84(3):165–174, 1992.
- [338] MJ Hendrix et al. Role of intermediate filaments in migration, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 15(4):507–525, 1996.
- [339] MJ Hendrix et al. Biologic determinants of uveal melanoma metastatic phenotype: role of intermediate filaments as predictive markers. *Lab Invest*, 78(2):153–163, 1998.
- [340] SH Lang et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate*, 52(4):253–263, 2002.
- [341] M Huszar et al. Use of antibodies to intermediate filaments in the diagnosis of metastatic amelanotic malignant melanoma. *Hum Pathol*, 14(11):1006–1008, 1983.
- [342] S Shuster et al. Immunofluorescent localization of intermediate filament subunits for the differential diagnosis of malignant melanoma. *Am J Dermatopathol*, 52(7):79–86, 1985.
- [343] CL Sommers et al. Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin- and vinblastine-resistant human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 52(19):5190–5197, 1992.
- [344] PA Thomas et al. Association between keratin and vimentin expression, malignant phenotype, and survival in postmenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 5(10):2698–2703, 1999.
- [345] QT Ostrom et al. Cbtrus statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2007-2011. *Neuro Oncol*, 4(16), 2014.
- [346] G Velasco et al. Cannabinoids and gliomas. *Mol Neurobiol*, 36(1):60–67, 2007.
- [347] PY Wen et al. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*, 359(5):492–507, 2008.
- [348] H Oghaki et al. Genetec pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, 170(5):1445–1453, 2007.
- [349] DN Louis et al. The 2007 who classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2):97–109, 2007.
- [350] KH Plate. Mechanisms of angiogenesis in the brain. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(4):313–320, 1999.
- [351] S Bao et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the dna damage response. *Nature*, 444(7120):756–760, 2006.
- [352] RG Verhaak et al. Cancer genome atlas research network. integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in pdgfra, idh1, egfr, and nf1. *Cancer Cell*, 17(1):98–110, 2010.
- [353] HS Phillips et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9(3):157–173, 2006.
- [354] CW Brennan et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 155(2):462–477, 2013.
- [355] H Nousmehr et al. Identification of a cpg island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*, 17(5):510–522, 2010.
- [356] DW Parsons et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321(5897):1807–1812, 2008.

- [357] B Wiestler et al. Atrx loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of idh mutant astrocytic tumors with better prognosis. *Acta Neuropathol*, 126(3):443–451, 2013.
- [358] C Wilde-Bode et al. Molecular determinants of glioma cell migration and invasion. *J Neurosurg*, 94(6):978–984, 2001.
- [359] EG Van Meir et al. Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 54(3):649–652, 1994.
- [360] C Bassi et al. Transcriptional changes in U343 MG-a glioblastoma cell line exposed to ionizing radiation. *Hum Exp Toxicol*, 27(12):919–929, 2008.
- [361] PRDV Godoy et al. Ionizing radiation-induced gene expression changes in TP53 proficient and deficient glioblastoma cell lines. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 756(1-2):46–55, 2013.
- [362] T Zhao et al. Starvation after Cobalt-60 γ -Ray Radiation Enhances Metastasis in U251 Glioma Cells by Regulating the Transcription Factor SP1. *Int J Mol Sci*, 17(4):386–399, 2016.
- [363] O Takashi et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the dna damage response. *J Radiat Res*, 45(1):53–60, 2004.
- [364] N Cordes et al. Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines. *Br J Cancer*, 89(11):2122–2132, 2003.
- [365] A Carracedo et al. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell*, 9(4):301–312, 2006.
- [366] A Carracedo et al. Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res*, 66(13):6748–6755, 2006.
- [367] K Gustafsson et al. Cannabinoid receptor-mediated apoptosis induced by r(+)-methanandamide and win55,212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma. *Mol Pharmacol*, 70(5):1612–1620, 2006.
- [368] S Sarfaraz et al. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res*, 65(5):1635–1641, 2005.
- [369] A Ligresti et al. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther*, 318(3):1375–1387, 2006.
- [370] C Blázquez et al. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB J*, 20(14):2633–2645, 2006.
- [371] N Saghafi et al. Cannabinoids attenuate cancer pain and proliferation in a mouse model. *Neurosci Lett*, 488(3):247–251, 2010.
- [372] MM Caffarel et al. Cannabinoids reduce erbB2-driven breast cancer progression through akt inhibition. *Mol Cancer*, 9(1):185–196, 2010.
- [373] S Sreevalsan et al. Induction of apoptosis by cannabinoids in prostate and colon cancer cells is phosphatase dependent. *Anticancer Res*, 31(11):3799–3808, 2011.
- [374] N Olea-Herrero et al. Inhibition of human tumour prostate pc-3 cell growth by cannabinoids r(β)-methanandamide and jwh-015: Involvement of cb2. *Br J Cancer*, 101(6):940–950, 2009.
- [375] A Preet et al. D(9)-tetrahydrocannabinol inhibits epithelial growth factor-induced lung cancer cell migration in vitro as well as its growth and metastasis in vivo. *Oncogene*, 27(3):339–346, 2008.
- [376] O Aizpurua-Olaizola et al. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. *Drug Discov Today*, 22(1):105–110, 2017.

- [377] AC Howlett et al. International union of pharmacology. xxvii. classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, 54(2):161–202, 2002.
- [378] M Guzman. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer*, 10(3):745–755, 2003.
- [379] P Pacher et al. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*, 58(3):389–462, 2006.
- [380] X Wu et al. Alteration of endocannabinoid system in human gliomas. *J Neurochem*, 120(5):842–849, 2012.
- [381] ML De Jesus et al. Opposite changes in cannabinoid cb1 and cb2 receptor expression in human gliomas. *Neurochem Int*, 56(6):829–833, 2010.
- [382] M Salazar et al. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of er stress in human glioma cells. *J Clin Invest*, 119(5):1359–1372, 2009.
- [383] G Galanti et al. Delta 9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression by downregulation of E2F1 in human glioblastoma multiforme cells. *Acta Oncol*, 47(6):1062–1070, 2008.
- [384] C Blazquez et al. Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *FASEB J*, 17(3):529–531, 2003.
- [385] T Aguado et al. Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J Biol Chem*, 282(9):6854–6862, 2007.
- [386] M Guzman et al. A pilot clinical study of Delta9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Br J Cancer*, 95(2):197–203, 2006.
- [387] C Blazquez et al. Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Res*, 68(6):1945–1952, 2008.
- [388] A Vaccani et al. Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol*, 144(8):1032–1036, 2005.
- [389] M Solinas et al. Cannabidiol, a non-psychoactive cannabinoid compound, inhibits proliferation and invasion in u87-mg and t98g glioma cells through a multitarget effect. *PLoS One*, 10(8), 2013.
- [390] C Njoo et al. The cannabinoid receptor cb1 interacts with the wave1 complex and plays a role in actin dynamics and structural plasticity in neurons. *PLoS One*, 10(13), 2015.
- [391] C Grimaldi et al. Anandamide inhibits adhesion and migration of breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 312(4):363–373, 2006.
- [392] GD Dalton et al. Cb 1 cannabinoid receptors promote maximal fak catalytic activity by stimulating cooperative signaling between receptor tyrosine kinases and integrins in neuronal cells. *Cell Sig*, 25(8):1665–1677, 2013.
- [393] R Feng et al. Targeting cannabinoid receptor-2 pathway by phenylacetamide suppresses the proliferation of human myeloma cells through mitotic dysregulation and cytoskeleton disruption. *Mol Carcinog*, 54(12):1796–1806, 2015.
- [394] SK Tahier et al. Influence of marijuana on cellular structures and biochemical activities. *Pharmacol Biochem Behav*, 40(3):617–623, 1991.
- [395] RG Wilson et al. Cannabinoid enantiomer action on the cytoarchitecture. *Cell Biol Int*, 20(2):147–157, 1996.
- [396] GA Cabral et al. Interaction of delta-9-tetrahydrocannabinol with rat b103 neuroblastoma cells. *Arch Toxicol*, 60(6):438–449, 1987.

- [397] SK Tahir et al. Cytoskeletal organization following cannabinoid treatment in undifferentiated and differentiated pc12 cells. *Biochem Cell Biol*, 70(10-11):1159–1173, 1992.
- [398] H Yan et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med*, 360(8):765–773, 2009.
- [399] K Ichimura et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol*, 11(4):341–347, 2009.
- [400] C Hartmann et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: A study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*, 118(4):469–474, 2009.
- [401] LA Boardman. Overexpression of MACC1 leads to downstream activation of HGF/MET and potentiates metastasis and recurrence of colorectal cancer. *Genome Med*, 1(4), 2009.
- [402] MP Legolvan et al. Pathobiology of colorectal cancer hepatic metastases with an emphasis on prognostic factors. *J Surg Oncol*, 102(8):898–908, 2010.
- [403] I Zlobec. Novel biomarkers for the prediction of metastasis in colorectal cancer. *Expert Opin Med Diagn*, 7(2):137–146, 2013.
- [404] X Xu et al. Structures of human cytosolic nadp-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J Biol Chem*, 279(32):33946–33957, 2004.
- [405] T Yoshihara et al. Localization of cytosolic nadp-dependent isocitrate dehydrogenase in the peroxisomes of rat liver cells biochemical and immunocytochemical studies. *J Histochem Cytochem*, 49(9):1112–1131, 2001.
- [406] S Zhao et al. Glioma-derived mutations in idh1 dominantly inhibit idh1 catalytic activity and induce hif-1a. *Science*, 324(5924), 2009.
- [407] PS Ward et al. The common feature of leukemia-associated idh1 and idh2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*, 17(3):225–234, 2010.
- [408] S Gross et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med*, 207(2), 2010.
- [409] L Dang et al. Cancer-associated idh1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274):739–744, 2010.
- [410] S Turcan et al. Idh1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*, 483(7390):479–483, 2012.
- [411] CG Duncan et al. A heterozygous idh1r132h/wt mutation induces genome-wide alterations in dna methylation. *Genome Res*, 22(12):2339–2355, 2012.
- [412] C Horbinski et al. What do we know about idh1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathol*, 125(5):621–636, 2013.
- [413] J Kessler et al. IDH1(R132H) mutation causes a less aggressive phenotype and radiosensitizes human malignant glioma cells independent of the oxygenation status. *Radiother Oncol*, 116(3):381–387, 2015.
- [414] LBC Bralten et al. IDH1 R132H decreases proliferation of glioma cell lines in vitro and in vivo. *Ann Neurol*, 69(3):455–463, 2011.
- [415] AA Saetta et al. Expression of pERK and pAKT in human astrocytomas: correlation with IDH1-R132H presence, vascular endothelial growth factor, microvascular characteristics and clinical outcome. *Virchows Arch*, 458(6):749–759, 2011.

- [416] U Stein et al. MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat Med*, 15(1):59–67, 2009.
- [417] H Chai et al. Effects of MACC1 siRNA on biological behaviors of HeLa. *Arch Gynecol Obstet*, 289(6):1271–1280, 2014.
- [418] L Wang et al. Metastasis-associated in colon cancer-1 upregulation predicts a poor prognosis of gastric cancer, and promotes tumor cell proliferation and invasion. *Int J Cancer*, 133(6):1419–30, 2013.
- [419] L Sun et al. Silence of MACC1 expression by RNA interference inhibits proliferation, invasion and metastasis, and promotes apoptosis in U251 human malignant glioma cells. *Mol Med Rep*, 12(3):3423–3431, 2015.
- [420] C Hagemann et al. Impact of macc1 on human malignant glioma progression and patients' unfavorable prognosis. *Neuro Oncol.*, 15(12):1696–1709, 2013.
- [421] H Li et al. The expression of MACC1 and its role in the proliferation and apoptosis of salivary adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 44(10):810–817, 2015.
- [422] F Galimi et al. Genetic and expression analysis of MET, MACC1, and HGF in metastatic colorectal cancer: Response to Met inhibition in patient xenografts and pathologic correlations. *Clin Cancer Res*, 17(10):3146–3156, 2011.
- [423] A Kohl et al. The bisphosphonate clodronate depletes microglial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurology*, 181(1):1–11, 2003.
- [424] M Frotscher et al. Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Prog Neurobiol*, 45(6):7–28, 1995.
- [425] BH Gahwiler et al. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci*, 20(10):471–477, 1997.
- [426] H Matsumura et al. Quantitative analysis of glioma cell invasion by confocal laser scanning microscopy in a novel brain slice model. *Biochem Biophys Res Commun*, 269(2):513–520, 2000.
- [427] C Aaberg-Jessen et al. Invasion of primary glioma- and cell line-derived spheroids implanted into corticostriatal slice cultures. *Int J Clin Exp Pathol*, 6(4):546–560, 2013.
- [428] M Vinci et al. Three-dimensional (3d) tumor spheroid invasion assay. *J Vis Exp*, (99), 2015.
- [429] I Sobel. An isotropic 3x3 image gradient operator. *Presentation at Stanford A.I. Project*, 1968.
- [430] R Fürth. Die brownsche bewegung bei berücksichtigung einer persistenz der bewegungsrichtung. mit anwendungen auf die bewegung lebender infusorien. *Zeitschrift für Physik*, 2(3):244–256, 1920.
- [431] HJ Butt et al. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, 6(1):1–7, 1993.
- [432] KL Johnson et al. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proc R Soc Lond*, 324(1558):301–313, 1971.
- [433] BV Derjaguin et al. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *J Colloid Interface Sci*, 53(2):314–326, 1975.
- [434] JJ Faith et al. Large-scale mapping and validation of escherichia coli transcriptional regulation from a compendium of expression profiles. *PLoS Bio*, 5(1):54–66, 2007.
- [435] TR Kießling et al. Analysis of multiple physical parameters for mechanical phenotyping of living cells. *Eur Biophys J*, 42(5):383–394, 2013.

- [436] MEJ Newman. Modularity and community structure in networks. *PNAS*, 103(23):8577–8522, 2006.
- [437] N Ishii et al. Frequent co-alterations of TP53, p16/CDKN2A, p14ARF, PTEN tumor suppressor genes in human glioma cell lines. *Brain Pathol*, 9(3):469–479, 1999.
- [438] CH Ryu et al. Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012.
- [439] AH Benz et al. Expression and functional relevance of cannabinoid receptor 1 in hodgkin lymphoma. *PLoS One*, 8(12), 2013.
- [440] Z Qamri et al. Synthetic cannabinoid receptor agonists inhibit tumor growth and metastasis of breast cancer. *Mol Cancer Ther*, 8(11):3117–3129, 2009.
- [441] <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/therapieformen/strahlentherapie-bei-krebs.html>. *Deutsche Krebsgesellschaft*, 12-05-2017.
- [442] L Stoppini et al. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, 37(2):173–182, 1991.
- [443] J Ernst et al. The endocannabinoid system in the human granulosa cell line kgn. *Mol Cell Endocrinol*, 423(1):67–76, 2016.
- [444] H Hertz. Über die berührung fester elastischer körper. *Journal für die reine und angewandte Mathematik*, 92:156–171, 1881.
- [445] L Chierico et al. Live cell imaging of membrane/cytoskeleton interactions and membrane topology. *Sci Rep*, 4, 2014.
- [446] J Bereiter-Hahn et al. Spreading of trypsinized cells: cytoskeletal dynamics and energy requirements. *J Cell Sci*, 96(1):171–188, 1990.
- [447] K Feese. Der einfluss von cannabinoiden auf glioblastomzellen. *Masterarbeit*, 2017.
- [448] F He et al. Molecular and cellular changes induced by the activation of cb2 cannabinoid receptors in trabecular meshwork cells. *Mol Vis*, 13:1348–1356, 2007.
- [449] BR McCullough et al. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J Mol Biol*, 381(3):550–558, 2008.
- [450] S Anavi-Goffer et al. Modulation of l- α -lysophosphatidylinositol/gpr55 mitogen-activated protein kinase (mapk) signaling by cannabinoids. *J Biol Chem*, 287(1):91–104, 2012.
- [451] SK Walsh et al. Pharmacological profiling of the hemodynamic effects of cannabinoid ligands: a combined in vitro and in vivo approach. *Pharmacology research & perspectives*, 3(3), 2015.
- [452] RG Pertwee et al. Pharmacology of cannabinoid cb1 and cb2 receptors. *Pharmacol Therap*, 74(2):129–180, 1997.
- [453] JJ McDougall et al. In vivo effects of cb2 receptor-selective cannabinoids on the vasculature of normal and arthritic rat knee joints. *Brit J Pharmacol*, 153(2):358–366, 2008.
- [454] NAB Balenga et al. Gpr55 regulates cannabinoid 2 receptor-mediated responses in human neutrophils. *Cell Res*, 21(10):1452, 2011.
- [455] CM Henstridge et al. The gpr55 ligand l- α -lysophosphatidylinositol promotes rhoa-dependent ca²⁺ signaling and nfat activation. *FASEB J*, 23(1):183–193, 2009.
- [456] C Andradas et al. The orphan g protein-coupled receptor gpr55 promotes cancer cell proliferation via erk. *Oncogene*, 30(2):245, 2011.

- [457] YL Wang. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: Possible role of treadmilling. *J Cell Biol*, 101(2):597–602, 1985.
- [458] TJ Mitchison et al. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 84(3):371–379, 1996.
- [459] TD Pollard et al. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112(4):453–465, 2003.
- [460] D Gentilini et al. Endocannabinoid system regulates migration of endometrial stromal cells via cannabinoid receptor 1 through the activation of PI3K and ERK1/2 pathways. *Fertil Steril*, 93(8):2588–2593, 2010.
- [461] SK Mitra et al. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1):56, 2005.
- [462] J Weichsel et al. A quantitative measure for alterations in the actin cytoskeleton investigated with automated high-throughput microscopy. *Cytometry Part A*, 77(1):52–63, 2010.
- [463] SK Mitra et al. Integrin-regulated fak–src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*, 18(5):516–523, 2006.
- [464] K Nithipatikom et al. 2-arachidonoylglycerol: a novel inhibitor of androgen-independent prostate cancer cell invasion. *Cancer Res*, 64(24):8826–8830, 2004.
- [465] P Massi et al. The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cell Mol Life Sci*, 63(17):2057–2066, 2006.
- [466] SN Gurley et al. Mechanism of anti-glioma activity and in vivo efficacy of the cannabinoid ligand KM-233. *J Neurooncol*, 110(2):163–177, 2012.
- [467] B Gardner et al. Methanandamide increases COX-2 expression and tumor growth in murine lung cancer. *FASEB J*, 17(14):2157–2169, 2003.
- [468] T Kubiawski et al. Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas. *J Neurosurgery*, 95(3):480–488, 2001.
- [469] D Baker et al. Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature*, 404(6773):84–87, 2000.
- [470] F Correa et al. Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. *Br J Pharmacol*, 145(4):441–448, 2005.
- [471] JW Huffman et al. 3-(1',1'-Dimethylbutyl)-1-deoxy-delta8-THC and related compounds: synthesis of selective ligands for the CB2 receptor. *Bioorg Med Chem*, 7(12):2905–2914, 1999.
- [472] E Ryberg et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*, 152(7):1092–1101, 2007.
- [473] L Taylor et al. Primary Macrophage Chemotaxis Induced by Cannabinoid Receptor 2 Agonists Occurs Independently of the CB2 Receptor. *Sci Rep*, (5), 2015.
- [474] XJ Sheng et al. MACC1 induces metastasis in ovarian carcinoma by upregulating hepatocyte growth factor receptor c-MET. *Oncol Lett*, 8(2):891–897, 2014.
- [475] M Sagara et al. Asef2 and neurabin2 cooperatively regulate actin cytoskeletal organization and are involved in hgf-induced cell migration. *Oncogene*, 28(10):1357, 2009.
- [476] Y Tian et al. Hepatocyte growth factor-induced asef-iqgap1 complex controls cytoskeletal remodeling and endothelial barrier. *J Biol Chem*, 290(7):4097–4109, 2015.

- [477] DW Murray et al. Guanine nucleotide exchange factor dock7 mediates hgf-induced glioblastoma cell invasion via rac activation. *Brit J Cancer*, 110(5):1307, 2014.
- [478] L Menard et al. Receptor tyrosine kinase c-met controls the cytoskeleton from different endosomes via different pathways. *Nat Comm*, 5, 2014.
- [479] CKM Ip et al. p70 s6 kinase in the control of actin cytoskeleton dynamics and directed migration of ovarian cancer cells. *Oncogene*, 30(21):2420, 2011.
- [480] C Xiang et al. Hgf/met signaling in cancer invasion: The impact on cytoskeleton remodeling. *Cancers*, 9(5):44, 2017.
- [481] Y Ding et al. Silence of macc1 decreases cell migration and invasion in human malignant melanoma through inhibiting the emt. *Bio Sci Trends*, 10(4):258–264, 2016.
- [482] BR Bruckner et al. Ezrin is a major regulator of membrane tension in epithelial cells. *Sci Rep*, 5, 2015.
- [483] L Trusolino et al. Growth factor-dependent activation of $\alpha\beta3$ integrin in normal epithelial cells: implications for tumor invasion. *J Cell Biol*, 142(4):1145–1156, 1998.
- [484] K Nabeshima et al. Expression of c-Met correlates with grade of malignancy in human astrocytic tumours: an immunohistochemical study. *Histopathology*, 31(5):436–443, 1997.
- [485] J Lathera et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor expression enhances human glioblastoma tumorigenicity and growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 235(3):743–747, 1997.
- [486] T Moriyama et al. Effects of hepatocyte growth factor (HGF) on human glioma cells in vitro: HGF acts as a motility factor in glioma cells. *Int J Cancer*, 66(9):678–685, 1996.
- [487] S Yamamoto et al. Modulation of Motility and Proliferation of Glioma Cells by Hepatocyte Growth Factor. *Jpn J Cancer Res*, 88(6):564–577, 1997.
- [488] V Panzetta et al. X-rays effects on cytoskeleton mechanics of healthy and tumor cells. *Cytoskel*, 74(1):40–52, 2017.
- [489] B Zhang et al. Carbon ion-irradiated hepatoma cells exhibit coupling interplay between apoptotic signaling and morphological and mechanical remodeling. *Sci Rep*, 6, 2016.
- [490] GG Zhai et al. Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *J Neurooncol*, 76(3):227–237, 2006.
- [491] K Alapati et al. uPAR and cathepsin B knockdown inhibits radiation-induced PKC integrated integrin signaling to the cytoskeleton of glioma-initiating cells. *Int J Oncol*, 41(2):599–610, 2012.
- [492] C Stahler et al. Impact of carbon ion irradiation on epidermal growth factor receptor signaling and glioma cell migration in comparison to conventional photon irradiation. *Int J Rad Biol*, 89(6):454–461, 2013.
- [493] G Ramis et al. Egfr inhibition in glioma cells modulates rho signaling to inhibit cell motility and invasion and cooperates with temozolomide to reduce cell growth. *PLoS One*, 7(6):e38770, 2012.
- [494] G Zhu et al. An egfr/pi3k/akt axis promotes accumulation of the rac1-gef tiam1 that is critical in egfr-driven tumorigenesis. *Oncogene*, 34(49):5971–5982, 2015.
- [495] R Wu et al. Up-regulation of rac1 by epidermal growth factor mediates cox-2 expression in recurrent respiratory papillomas. *Mol Med*, 13(3-4):143, 2007.
- [496] T Hohmann et al. The impact of a non-lethal single dose radiation on tumor invasion and cytoskeletal properties. *In Vorbereitung*.

- [497] SY Hwang et al. Dominant-negative Rac increases both inherent and ionizing radiation-induced cell migration in C6 rat glioma cells. *Int J Cancer*, 118(8):2056–2063, 2006.
- [498] D Gabrys et al. Radiation Effects on the Cytoskeleton of Endothelial Cells and Endothelial Monolayer Permeability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 69(5):1553–1562, 2007.
- [499] PR Wachsberger et al. Effect of the tumor vascular-damaging agent, zd6126, on the radioresponse of u87 glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 11(2):835–842, 2005.
- [500] A Canazza et al. Increased migration of a human glioma cell line after in vitro cyberknife irradiation. *Cancer Biol Ther*, 12(7):629–633, 2011.
- [501] SE Combs et al. Radiobiological evaluation and correlation with the local effect model (LEM) of carbon ion radiation therapy and temozolomide in glioblastoma cell lines. *Int J Radiat Biol*, 85(2):126–37, 2009.
- [502] NK Avliyakov et al. C-terminally truncated form of α -crystallin is associated with idh1 r132h mutation in anaplastic astrocytoma. *J Neuro Oncol*, 117(1):53–65, 2014.
- [503] C Thirant et al. Proteomic analysis of oligodendrogliomas expressing a mutant isocitrate dehydrogenase-1. *Proteomics*, 11(21):4139–4154, 2011.
- [504] AI McClatchey. Erm proteins at a glance, 2014.
- [505] V Swaminathan et al. Mechanical Stiffness grades metastatic potential in patient tumor cells and in cancer cell lines. *Cancer Res*, 71(15):5075–5080, 2011.
- [506] Xu W et al. Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *PLoS One*, 7(10), 2012.
- [507] T Watanabe et al. Higher cell stiffness indicating lower metastatic potential in B16 melanoma cell variants and in (2)-epigallocatechin gallate-treated cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 138(5): 859–866, 2012.

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

Selbstständigkeitserklärung

Ich, Tim HOHMANN, erkläre, die Promotionsarbeit mit dem Titel, 'Die Wechselwirkungen zwischen (Endo-)Cannabinoiden und Mechanik bei der Tumorinvasion' selbstständig angefertigt zu haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt zu haben. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß, aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften oder Medien entnommen sind, sind als solche gekennzeichnet.

Unterschrift: _____

Datum: _____