

Die Rolle der residenten monozytären Zellen sowie Tumorzell-spezifischer Faktoren bei der Metastasierung des Mammakarzinoms

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)“

im Studienprogramm Molekulare Medizin der

Georg-August-Universität-Göttingen

vorgelegt von

Eva Rietkötter

aus

Vechta

Göttingen 2012

Prüfungskomitee

Betreuer

PD Dr. T. Pukrop

Hämatologie & Onkologie

Universitätsmedizin Göttingen

1. Referent

Prof. Dr. U.-K. Hanisch

Neuropathologie

Universitätsmedizin Göttingen

2. Referent

Prof. Dr. D. Kube

Hämatologie & Onkologie

Universitätsmedizin Göttingen

Tag der Disputation:

AFFIDAVIT

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Die Rolle der residenten monozytären Zellen sowie Tumorzell-spezifischer Faktoren bei der Metastasierung des Mammakarzinoms“ selbstständig angefertigt habe. Genutzte Hilfsmittel und Quellen wurden vollständig angegeben

Eva Rietkötter

Göttingen, August 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Metastasierung – Ein komplexer Prozess	1
1.2	Das Mikromilieu des Tumors	2
1.2.1	Tumor-assoziierte Makrophagen	3
1.2.2	Die Rolle der Makrophagen in der Metastasierung	5
1.3	Makrophagen als Therapieansatz der Metastasierung	6
1.3.1	Bisphosphonate.....	6
1.3.2	Hemmung der CSF-1/CSF-1R-Interaktion.....	8
1.4	Der WNT-Signalweg.....	9
1.4.1	Der kanonische WNT-Signalweg	10
1.4.2	Der nicht-kanonische WNT-Signalweg.....	11
1.5	Die LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren	12
1.6	Der WNT-Signalweg in der Tumorprogression	14
1.7	Zielsetzung der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Oligonukleotide, Plasmide und Antikörper.....	17
2.2	Biologisches Material.....	19
2.2.1	Bakterienstämme	19
2.2.2	Eukaryotische Zelllinien.....	20
2.2.3	Mausstämme	20
2.2.4	Patientenmaterial	20
2.3	Medien, Antibiotika, Zellkulturzusätze	20
2.3.1	Medien für Bakterien.....	20
2.3.2	Medien für eukaryotische Zellkulturen	21
2.3.3	Antibiotika	21
2.3.4	Zusätze für die Zellkultur	22
2.4	Mikrobiologische Methoden	22
2.4.1	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	22
2.4.2	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	23
2.5	Präparation und Nachweis von Nukleinsäuren.....	23
2.5.1	Isolation von Plasmid-DNA	23
2.5.2	Isolation von Plasmid-DNA für die Transfektion eukaryotischer Zellen.....	24
2.5.3	Isolation der mRNA aus eukaryotischen Zellen	24
2.5.4	Isolation der Gesamt-RNA aus Geweben.....	24

2.5.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
2.6	Klonierungstechniken.....	25
2.6.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	25
2.6.2	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	26
2.6.3	Restriktion von DNA.....	26
2.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten.....	26
2.6.5	Sequenzierung von Plasmiden.....	27
2.7	Genexpressions-Analysen.....	28
2.7.1	Quantitative <i>real-time</i> Reverse Transkription-PCR (qRT-PCR).....	28
2.7.1.1	Bestimmung der Effizienz von Primern für die qRT-PCR.....	30
2.7.2	DNA-Microarray	30
2.8	Proteinbiochemische Methoden.....	31
2.8.1	Isolation des Gesamtproteins aus eukaryotischen Zellen	31
2.8.2	Auftrennung der Cytosol- und Kernproteine.....	31
2.8.3	Messung der Proteinkonzentration	32
2.8.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.8.5	Western Blot.....	33
2.8.6	Immunopräzipitation (IP)	35
2.9	Zellbiologische Methoden.....	36
2.9.1	Isolation von humanen Makrophagen aus dem Blut	36
2.9.2	Isolation von Knochenmarksmakrophagen aus der Maus	37
2.9.3	Isolation von Mikroglia-Zellen aus der Maus.....	38
2.9.4	Transfektion von eukaryotischen Zellen	39
2.9.5	Messung der Viabilität und Proliferation eukaryotischer Zellen.....	39
2.9.5.1	MTT-Assay.....	39
2.9.5.2	Proliferationsmessung mittels xCELLigence	40
2.9.5.3	Proliferationsmessung mittels Celigo-Zytometrie	40
2.9.5.4	Proliferationsmessung mittels PKH26 und FACS-Messung	40
2.9.5.5	<i>Colony Formation</i> Assay	41
2.9.5.6	<i>Soft Agar Colony Formation</i> Assay.....	41
2.9.6	Färbung eukaryotischer Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen	42
2.9.7	Nachweis von Metalloproteasen mittels Zymographie	42
2.9.8	Zellzyklusanalysen	44
2.9.9	Nachweis von Nitrit in Zellkulturüberständen.....	44
2.9.10	TOP/FOP <i>flash</i> Reporter-Assay	45
2.10	Invasions- und Migrations-Assays.....	46

2.10.1	Boyden-Kammer Experimente	46
2.10.2	ECM-basierte Migrationsexperimente.....	47
2.10.3	Organotypische Hirnschnittkulturen.....	47
2.10.3.1	Präparation von organotypischen Hirnschnitten und Anfertigung von Tumorplugs für die Ko-Kultur.....	48
2.10.3.2	Färbung der Hirnschnitte mit Fluoreszenzfarbstoffen und Quantifizierung der Tumorzellinvasion	49
2.11	Chorion-Allantois-Membran (CAM)-Assay.....	50
2.12	Histologie	51
2.12.1	Immunhistochemie	51
2.12.2	Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung.....	52
2.13	Statistik	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Etablierung einer organotypischen Leberschnittkultur.....	54
3.1.1	Präparation und Kultivierung von Leberschnitten.....	54
3.1.2	Viabilität der organotypischen Leberschnitte.....	55
3.2	Die Rolle der Makrophagen in der Invasion und Metastasierung von Mammakarzinomzellen.....	58
3.2.1	Das Bisphosphonat Zoledronat (ZA).....	59
3.2.1.1	Toxizität von ZA auf Tumorzellen und Makrophagen	59
3.2.1.2	Einfluss von ZA auf die Migration von Tumorzellen.....	62
3.2.1.3	Einfluss von ZA auf die Makrophagen-induzierte Invasion von Tumorzellen.....	63
3.2.1.4	Einfluss von ZA auf die MG-assistierte Tumordinvasion	64
3.2.1.5	Aktivierung von MΦ nach Behandlung mit ZA	67
3.2.2	„5A1“- Ein CSF-1 neutralisierender Antikörper	69
3.2.2.1	Toxizität von 5A1 auf Tumorzellen und Makrophagen.....	69
3.2.2.2	Einfluss von 5A1 auf die Migration von Tumorzellen	72
3.2.2.3	Einfluss von 5A1 auf die Makrophagen-induzierte Invasion von Tumorzellen	73
3.2.2.4	Einfluss von 5A1 auf die MG-assistierte Invasion von Tumorzellen	74
3.2.2.5	Aktivierung von MG nach der Behandlung mit 5A1.....	75
3.3	Die Rolle von LEF1 in der Invasion und Metastasierung des Mammakarzinoms	76
3.3.1	LEF1-Expression in zerebralen Metastasen des Mammakarzinoms	77
3.3.2	Expression von LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren in Mammakarzinom-Zelllinien.....	77
3.3.3	LEF1-Überexpression in MCF-7 Zellen.....	79
3.3.3.1	Konstruktion von LEF1 überexprimierenden Zellen.....	79
3.3.3.2	Charakterisierung der stabil transfizierten Zellen.....	81
3.3.3.3	Einfluss von LEF1 auf die Migration	86

3.3.3.4	Einfluss von LEF1 auf die Invasivität	87
3.3.3.5	Einfluss von LEF1 auf die Angiogenese	88
3.3.3.6	Beeinflussung des kanonischen WNT-Signalwegs.....	89
3.3.3.7	Beeinflussung des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs	93
3.3.3.8	Relevanz einer LEF1-Signatur in zerebralen Metastasen	94
4	Diskussion.....	97
4.1	Eignung organotypischer Leberschnitt Kulturen zur Analyse der Kupffer-Stern-Zell-induzierten Tumorinvasion	97
4.2	ZA besitzt Potential in der Therapie fortgeschrittener Tumor-erkrankungen außerhalb des Knochens	99
4.3	CSF-1 ist nicht für alle Makrophagen ein essentieller Wachstums-faktor	104
4.4	LEF1 charakterisiert invasive Mammakarzinom-Zelllinien	106
4.5	Die erhöhte Expression von LEF1 in MCF-7 hat keinen Einfluss auf die Viabilität, Proliferation oder Sensitivität gegenüber Chemotherapie oder Bestrahlung	107
4.6	LEF1 steigert die Invasion von MCF-7 Zellen durch einen β -Catenin-unabhängigen Mechanismus	109
4.7	Eine LEF1-Signatur als prognostischer Marker.....	112
5	Fazit	114
6	Literaturverzeichnis	116
7	Anhang.....	128
7.1	LEF1-Signatur.....	128
7.2	Zusätzlich verwendete Materialien	129
7.2.1	Verbrauchsmaterialien.....	129
7.2.2	Geräte.....	129

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Tobias Pukrop bedanken. Vielen Dank für dein Vertrauen in mich in den letzten Jahren, und dass du mir diese Arbeit ermöglicht hast. Danke für die sehr gute Betreuung und die nie endende Motivation, besonders in der ersten Zeit dieser Arbeit. Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Claudia Binder für die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte Prof. Dr. Uwe-Karsten Hanisch und Prof. Dr. Dieter Kube für die Teilnahme in meinem Prüfungskomitee und ihre hilfreichen Anregungen zur erfolgreichen Durchführung dieser Arbeit danken.

Ich danke unserem Kooperationspartner Novartis für die Bereitstellung der Substanzen Zoledronat und 5A1.

Ich danke dem Labor von Uwe-Karsten Hanisch für die kontinuierliche Bereitstellung von Mikroglia sowie Sabrina Becker für die Unterstützung bei der Sortierung meiner Zellen. Ich danke Birgit Jünemann und Katja Schulz für die Hilfe bei histologischen Färbungen. Der Arbeitsgruppe von Dr. Marian Grade danke ich für die Durchführung der Bestrahlungsversuche. Prof. Dr. Matthias Dobbstein danke ich für die Bereitstellung des Celigo-Zytometers.

Ein großer Dank geht an das gesamte Laborteam, Kerstin, Gini, Britta, Florian, Julia, Annalen, Meike, Lena und Matthias. Danke für die Unterstützung in zahlreichen Bereichen, viele lustige Stunden mit euch zusammen und die ständige Versorgung mit kleinen Leckereien. Außerdem danke ich dem Kube-Lab für die tolle Nachbarschaft sowie allen anderen wissenschaftlichen Mitgliedern der Abteilung für das tolle Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft. Ebenso danke ich Dr. Katja Farhat für die großartige Zusammenarbeit.

Danke auch an die Personen, die einen sehr großen Beitrag dazu geleistet haben, dass die letzten zehn Jahre in Göttingen unvergesslich bleiben.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie. Danke, dass ihr immer hinter mir steht und mich unterstützt. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Danke Henning, dass du einfach nur da bist.

Zusammenfassung

Das Auftreten von Metastasen ist die Haupttodesursache bei Krebspatienten und kennzeichnet den Wendepunkt jeder Tumorerkrankung, nach dem eine Heilung nur noch in Ausnahmefällen erfolgen kann. Eine wesentliche neue Erkenntnis in der Erforschung innovativer Therapieansätze zur Prävention der Metastasierung war, dass eingewanderte Immunzellen nicht nur die ersten Schritte der Tumorprogression fördern, sondern auch im Prozess der Metastasierung von Bedeutung sind. In diesem Zusammenhang konnten vor allem die Makrophagen als Vermittler der Migration und Invasion von Tumorzellen und deren Kolonisation in einem entfernten Organ identifiziert werden.

Bisphosphonate (BPs) sind bekanntermaßen sehr potente Inhibitoren von Makrophagen. Dennoch erklärt die Mehrzahl der Studien ihre Tumor hemmenden Eigenschaften mit direkten Effekten auf z.B. Migrations- und Invasionseigenschaften der Tumorzellen und berücksichtigt nicht die Auswirkungen auf das Tumorstroma. Diese Arbeit zeigt, dass Makrophagen sehr viel sensitiver gegenüber dem stickstoffhaltigen BP Zoledronat (ZA) sind als Mammakarzinom-Zelllinien. Weiterhin wird verdeutlicht, dass die Makrophagen-induzierte Invasion sowie die Mikroglia-assistierte Kolonisation von MCF-7 im Hirngewebe durch ZA gehemmt werden, während die Migrations- und Invasionseigenschaften der Tumorzellen nicht beeinflusst werden. Für einen weiteren Makrophageninhibitor, einen CSF-1 Antikörper (5A1), wird in dieser Arbeit gezeigt, dass er die Depletion von Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) induziert, jedoch keine Auswirkung auf die Viabilität von Mikroglia hat. Während 5A1 die Mikroglia-induzierte Invasion von MCF-7 wenig hemmt, induziert er eine starke Hemmung der BMDM-induzierten Invasion.

Neben den benignen Zellen des Tumorstromas können auch Eigenschaften der Tumorzellen die Metastasierung induzieren. So konnte vor einiger Zeit der Transkriptionsfaktor LEF1 als Faktor der zerebralen Metastasierung des Lungenadenokarzinoms identifiziert werden. Diese Arbeit verdeutlicht, dass die Expression von LEF1 in einer Subgruppe zerebraler Metastasen nachgewiesen werden kann und ebenfalls charakteristisch für invasive Mammakarzinom-Zelllinien ist. Während die Überexpression von LEF1 in der wenig invasiven MCF-7 keinen Einfluss auf die Proliferation, die Migration oder die Sensitivität gegenüber Chemotherapie oder Bestrahlung hat, steigert sie die Invasivität der Zellen und induziert die Angiogenese im Tumor. Diese Effekte sind unabhängig von der direkten Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA und scheinen durch einen β -Catenin-unabhängigen Mechanismus zu erfolgen.

Abstract

Metastasis is the leading cause of cancer death and marks the turning point of cancer diseases where cure is rarely possible. Searching for new therapy approaches to prevent metastasis, an important finding was the identification of immune cells to support not only the first steps of tumor progression but also the process of metastasis. In this context, especially macrophages were discovered as mediators of migration and invasion of cancer cells as well as their colonization in a distant organ.

Bisphosphonates (BPs) are known to be potent inhibitors of macrophages. Nevertheless, most of the current studies explain their anti-tumor activity with direct effects on the migration and invasion capacity of cancer cells but do not consider their effects on the tumor stroma. In this study we show that macrophages are much more sensitive to the nitrogen-containing BP zoledronic acid (ZA) than breast cancer cells. Furthermore, macrophage-induced invasion of MCF-7 as well as microglia-assisted colonization of brain tissue is reduced by ZA treatment while the migration and invasion capacity of the cancer cells is not affected. For a second macrophage inhibitor, a CSF-1 antibody (5A1), we show that it induces the depletion of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) whereas it is not affecting microglia viability. While 5A1 slightly reduces microglia-induced invasion of MCF-7, it strongly inhibits BMDM-induced invasion.

Not only benign cells of the tumor stroma but also cancer cell determinants can give rise to metastases. Recently, the transcription factor LEF1 could be identified to induce cerebral metastasis of lung adenocarcinomas. In this study we show that LEF1 expression can be detected in a subgroup of breast cancer brain metastases and that it is limited to invasive breast cancer cell lines. While overexpression of LEF1 in the weakly invasive MCF-7 does not affect proliferation, migration or the sensitivity towards chemotherapy or radiation, it increases the invasiveness and induces angiogenesis in the tumor. These effects are independent of the binding of the transcription factor to the DNA and seem to be mediated by a β -catenin-independent mechanism.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schritte der Metastasierung.	2
Abb. 1.2: Wirkmechanismus der N-BPs.	7
Abb. 1.3: Der kanonische WNT-Signalweg.	11
Abb. 1.4: Struktur der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren.	13
Abb. 3.1: Präparation von murinen Leberschnitten.	55
Abb. 3.2: Viabilität organotypischer Leberschnitte.	56
Abb. 3.3: HE-Färbungen von Leberschnitten.	56
Abb. 3.4: F4/80 Expression in organotypischen Leberkulturen.	57
Abb. 3.5: Stoffwechselaktivität von MCF-7 (Raute) und MDA-MB231 (Quadrat) nach ZA Behandlung.	60
Abb. 3.6: xCELLigence-Messung von MCF-7 (A) und MDA-MB231 (B) während der Behandlung mit ZA. ...	60
Abb. 3.7: Stoffwechselaktivität von MΦ (Raute) und BMDM (Quadrat) nach ZA Behandlung.	61
Abb. 3.8: xCELLigence-Messungen von MG (A), BMDM (B) und MΦ (C) während der Behandlung mit ZA.	62
Abb. 3.9: Migration von MCF-7 und MDA-MB231 bei Behandlung mit ZA.	63
Abb. 3.10: Makrophagen-induzierte Invasion von MCF-7 Zellen nach Behandlung mit ZA.	64
Abb. 3.11: Toxizität von ZA auf organotypische Hirnschnittkulturen.	66
Abb. 3.12: MG-assistierte Invasion von MCF-7 nach Behandlung mit ZA.	67
Abb. 3.13: Reaktion von MΦ nach Behandlung mit ZA.	68
Abb. 3.14: Stoffwechselaktivität von MCF-7 (Raute) und MDA-MB231 (Quadrat) nach 5A1 Behandlung.	70
Abb. 3.15: xCELLigence-Messung von MCF-7 (A) und MDA-MB231 (B) während der Behandlung mit 5A1.	70
Abb. 3.16: Stoffwechselaktivität von BMDM (Raute) nach 5A1 Behandlung.	71
Abb. 3.17: xCELLigence-Messung von MG (A) und BMDM (B) während der Behandlung mit 5A1.	71
Abb. 3.18: Migration von MCF-7 und MDA-MB231 bei Behandlung mit 5A1.	72
Abb. 3.19: Makrophagen-induzierte Invasion von MCF-7 Zellen nach Behandlung mit 5A1.	73
Abb. 3.20: Toxizität von 5A1 auf organotypische Hirnschnittkulturen.	74
Abb. 3.21: LPS-induzierte Aktivierung von MG-Zellen nach Behandlung mit 5A1.	75
Abb. 3.22: LEF1 Expression in zerebralen Metastasen des Mammakarzinoms.	77
Abb. 3.23: LEF/TCF Expression in humanen und murinen Mammakarzinom-Zelllinien.	78
Abb. 3.24: Klonierung der LEF-Fragmente in pIRES2-EGFP.	80
Abb. 3.25: Überexpression von LEF1 in MCF-7.	81
Abb. 3.26: Proliferation von LEF1 überexprimierenden MCF-7 Zellen.	82
Abb. 3.27: Zellzyklus von LEF1 überexprimierenden MCF-7 Zellen.	82
Abb. 3.28: Östrogen-Abhängigkeit von LEF1 überexprimierenden Zellen.	83
Abb. 3.29: Chemosensitivität von LEF1 überexprimierenden Zellen.	84
Abb. 3.30: Sensitivität von LEF1 überexprimierenden Zellen gegenüber Bestrahlung.	85
Abb. 3.31: <i>Anchorage-independent growth</i> von LEF1 überexprimierenden Zellen.	86
Abb. 3.32: Einfluss von LEF1 auf die Migration von MCF-7 Zellen.	86
Abb. 3.33: Einfluss von LEF1 auf die Invasivität von MCF-7 Zellen.	87
Abb. 3.34: Expression von EMT-Markern in LEF1 überexprimierenden Zellen.	88
Abb. 3.35: Tumorwachstum und Vaskularisierung von LEF1 überexprimierenden Zellen.	89
Abb. 3.36: Einfluss von LEF1 auf Komponenten des kanonischen WNT-Signalwegs.	90
Abb. 3.37: Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs in LEF1 überexprimierenden Zellen.	91
Abb. 3.38: Interaktion von LEF1 und β-Catenin in LEF1 überexprimierenden Zellen.	92
Abb. 3.39: Einfluss von LEF1 auf Komponenten des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs.	93
Abb. 3.40: Clusteranalyse für die LEF1-Signatur im Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom.	95
Abb. 3.41: Clusteranalyse für die LEF1-Signatur im Lungenadenokarzinom.	96

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Oligonukleotide.....	17
Tab. 2.2: Plasmide	18
Tab. 2.3: Antikörper	19
Tab. 2.4: Eukaryotische Zelllinien	20
Tab. 2.5: Medien für die Zellkultur	21
Tab. 2.6: Zellkulturzusätze	22
Tab. 7.1: LEF-1-Signatur	128

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APC	<i>adenomatous-polyposis-coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosinriphosphat
bidest.	deionisiert
BMDM(s)	<i>bone marrow derived macrophages</i> , Knochenmarksmakrophage(n)
ca.	circa
CAM	Chorion-Allantois-Membran
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CK1	Casein-Kinase 1
CRD	<i>context-dependent regulatory domain</i>
CSF-1(R)	<i>colony stimulating factor 1 (receptor)</i>
ctl	<i>control</i> , Kontrolle
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> , Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
DVL	<i>dishevelled</i>
ECM	<i>extra cellular matrix</i> , Extrazellulärmatrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(-R)	<i>epidermal growth factor (receptor)</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EMT	<i>epithelial mesenchymal transition</i>
EtOH	Ethanol
Fz	<i>frizzled</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSK-3 α/β	Glykogensynthase-Kinase-3 α/β
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMG	<i>high mobility group</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
hs	homo sapiens
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPP	Isopentenylpyrophosphat
LB	Luria Bertani
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	<i>low density lipoprotein receptor related protein</i>
M Φ	humane Makrophagen des peripheren Bluts
MG	Mikroglia
mm	mus musculus
MMP(s)	Matrix-Metalloprotease(n)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-Ribonukleinsäure
(N)-BP(s)	(stickstoffhaltige) Bisphosphonat(e)
NO	Stickstoffoxid
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei 600 nm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PFA	Paraformaldehyd
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> , Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure

Tab.	Tabelle
TAM(s)	Tumor-assoziierte Makrophage(n)
TCF	<i>T cell-specific transcription factor</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	versus
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
ZA	<i>zoledronic acid</i> , Zoledronat
z.B.	zum Beispiel

Maßeinheiten:

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
g	Gramm
l	Liter
m	Meter
M	Molar
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
V	Volt

Vorsätze:

c	centi; 10^{-2}
k	kilo; 10^3
m	milli; 10^{-3}
μ	mikro; 10^{-6}
n	nano; 10^{-9}

1 Einleitung

1.1 Metastasierung – Ein komplexer Prozess

Das Auftreten von Metastasen im Verlauf einer Krebserkrankung ist die Haupttodesursache der betroffenen Patienten. Die Fünfjahresüberlebensrate von z.B. Mammakarzinom Patienten nach der Diagnose von Metastasen beträgt nur ca. 23%. Im Gegensatz dazu beträgt sie bei Patienten mit einem lokalen Tumorstadium, ohne einen Befall von Lymphknoten oder entfernter Organe, ca. 99% (Siegel et al 2012). Der Zeitpunkt des Auftretens von Metastasen ist dabei sehr abhängig von der Tumorentität. Das Lungenadenokarzinom bildet sehr häufig innerhalb weniger Monate Organ-Metastasen, während beim Mammakarzinom die Metastasierung typischerweise nach mehreren Jahren auftritt. Im Gegensatz dazu entwickeln sich nicht invasive Adenome des Kolons bei einer ausbleibenden kurativen Entfernung erst nach Jahren zu invasiven Karzinomen. Ist dieser Schritt jedoch erfolgt, sind innerhalb von Monaten auch Metastasen nachzuweisen (Nguyen et al 2009a).

Der Verlauf der Metastasierung beginnend mit dem Lösen maligner Zellen vom Primärtumor und der abschließenden Kolonisation dieser Zellen in einem entfernten Organ umfasst viele Schritte (Bacac and Stamenkovic 2008, DeNardo et al 2008, Steeg 2006). Tumorzellen, die sich zu einer Metastase entwickeln, müssen zunächst die Fähigkeit besitzen, sich von den umgebenden Zellen des Primärtumors zu lösen und in das angrenzende Gewebe invadieren (Progression im Primärtumor). Anschließend gelangen sie in die Blut- bzw. Lymphzirkulation des Körpers, indem sie in ein entsprechendes Gefäß eindringen (Intravasation). Überleben sie in dieser Umgebung und zirkulieren z.B. in die Kapillare eines entfernten Organs, müssen sie erneut die Gefäßwand durchdringen (Extravasation), in das angrenzende Gewebe einwandern und sich der neuen Umgebung anpassen. Im letzten Schritt (Kolonisation) müssen die Tumorzellen dann beginnen zu proliferieren (Mikro-Metastase), danach Gefäße auszubilden (Angiogenese), Bindegewebszellen anzulocken und Bindegewebe zu produzieren, um so eine Makro-Metastase zu bilden (Bacac and Stamenkovic 2008) (s. Abb. 1.1).

Wie in Tiermodellen gezeigt werden konnte, ist nur ein sehr geringer Anteil der Zellen eines Primärtumors tatsächlich in der Lage, das Wachstum von Makro-Metastasen zu induzieren. Nur etwa 0,01% aller Zellen, die den Primarius verlassen und im Körper zirkulieren, entwickeln sich weiter zu Metastasen, wobei vor allem die letzten Schritte, d.h. die Extravasation und Kolonisation, sehr ineffizient verlaufen (Chambers et al 2002, Luzzi et al 1998). Diese Beobachtung ist darauf zurück zu führen, dass zur erfolgreichen Metastasierung

nicht nur zahlreiche genetische Veränderungen der Tumorzelle erforderlich sind, sondern dass die Tumorzelle auch Faktoren, die von außen auf sie einwirken, standhalten muss. Die wichtigsten Eigenschaften, die eine Tumorzelle zur erfolgreichen Metastasierung aufweisen muss, sind die Fähigkeit Angiogenese zu induzieren, die Fähigkeit zur Migration und Invasion, Apoptose zu unterdrücken sowie die Interaktion mit umgebenden Zellen, um z.B. den Angriff von Immunzellen zu überleben (Bacac and Stamenkovic 2008, Hanahan and Weinberg 2011).

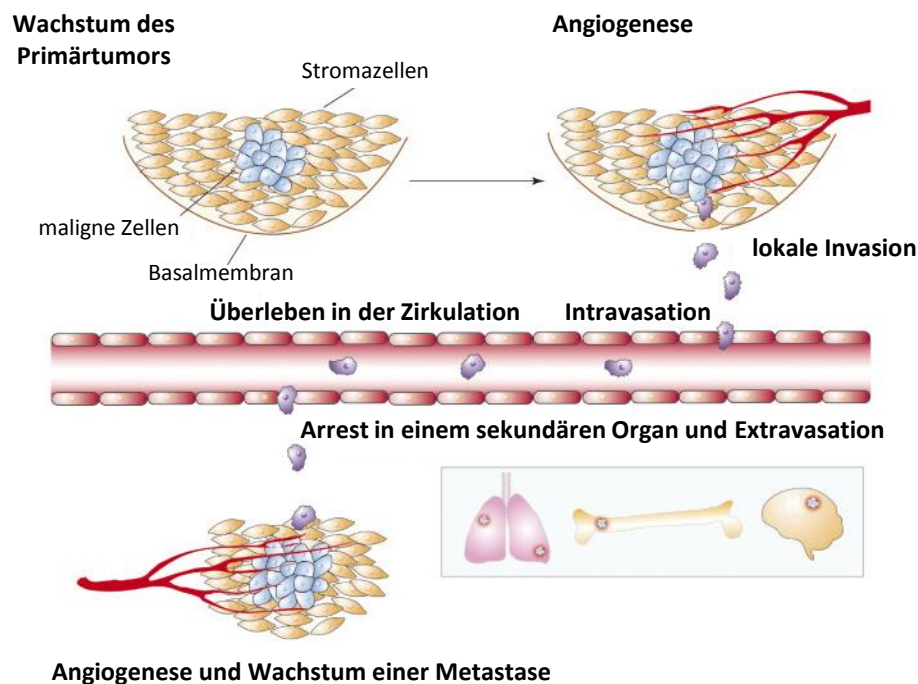


Abb. 1.1: Schritte der Metastasierung.

Zunächst erfolgt das Wachstum des Primärtumors unterstützt durch die induzierte Angiogenese. Zu einem unbestimmten Zeitpunkt durchqueren einzelne Tumorzellen die Gefäßwand und dringen in die Zirkulation ein. Überleben sie die Zirkulation, können sie in den Kapillaren eines sekundären Organs arretieren, z.B. Lunge, Knochen oder Hirn, erneut die Gefäßwand passieren und in dem angrenzenden Gewebe beginnen zu proliferieren und neues Tumorgewebe (Metastase) zu bilden. Abbildung nach (Ma and Weinberg 2008) mit der Genehmigung von Elsevier.

1.2 Das Mikromilieu des Tumors

Solide Tumore setzen sich nicht allein aus einer großen Anzahl maligner Zellen zusammen. Neben der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM), die aus einer Vielzahl von Proteinen, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Polysacchariden besteht (Ozbek et al 2010), enthält die Tumormasse auch eine große Zahl benignen Zellen, wie myeloide Zellen und Fibroblasten. Durch die Sekretion von Chemokinen und Cytokinen, sowie unterschiedlichster Wachstumsfaktoren tritt zwischen allen Komponenten des Tumors eine ständige Wechselwirkung und gegenseitige Beeinflussung auf. Diese Wechselwirkungen resultieren

darin, dass die malignen Zellen in der Lage sind, das umgebende Stroma in der Weise zu beeinflussen, dass sich ein für sie optimales Mikromilieu ausbildet, in dem ein Wachstum erfolgen kann.

Neben den Tumorzellen stehen die myeloiden Zellen, hier vor allem die Dendritischen Zellen und Makrophagen, des Tumorstromas seit ca. 20 Jahren im Fokus der Tumorforschung. Für Dendritische Zellen konnte gezeigt werden, dass sie bei einer Tumorerkrankung keine ausreichende Immunantwort stimulieren (Gabrilovich et al 2012). Weiterhin konnten klinische Studien zeigen, dass bei Patienten mit einem Mammakarzinom nicht nur weniger Dendritische Zellen nachzuweisen sind, sondern dass diese auch eine fehlerhafte Funktion aufweisen (Pinzon-Charry et al 2007). Zusätzlich übernehmen sie, ebenso wie die Makrophagen, eine wichtige Rolle in der Tumorprogression, indem sie die Angiogenese, einen essentiellen Schritt im Tumorwachstum, sowie die Invasion der Tumorzellen als auch die Metastasierung fördern (Coussens and Pollard 2011, Qian and Pollard 2010).

1.2.1 Tumor-assoziierte Makrophagen

Makrophagen sind eine sehr heterogene Zellpopulation, die aus monozytären Vorläuferzellen differenzieren und je nach Aktivierung stark variierende Phänotypen aufweisen können (Mosser 2003). Die Vielzahl an möglichen Aktivierungszuständen ermöglicht es den Makrophagen, sich an die jeweilige Umgebung, in der sie sich gerade befinden, anzupassen und eine optimale Immunantwort zu induzieren. Vor einigen Jahren wurde die Nomenklatur der M1- und M2-Makrophagen eingeführt, die zwei extreme Phänotypen dieser Zellen beschreiben sollen (Mantovani et al 2004). M1-Makrophagen werden oft als „klassisch“ aktivierte Makrophagen bezeichnet. Ihre Aktivierung erfolgt durch das Cytokin Interferon- γ oder auch bakterielle Produkte, wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS). Sie vermitteln eine Immunantwort gegen Bakterien und andere Pathogene, die in den Körper eingedrungen sind und zeichnen sich durch eine hohe Interleukin (IL)-12 sowie eine niedrige IL-10 Expression aus. Sie zählen zu den stark Antigen präsentierenden Zellen und weisen eine Tumor hemmende Wirkung auf, die unter anderem durch eine verstärkte Expression von MHC-II (*major histocompatibility complex II*) Molekülen, aber auch die Sekretion von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffoxid vermittelt wird (Gabrilovich et al 2012, Mantovani et al 2002, Mantovani et al 2004). Im Gegensatz dazu unterstützen „alternativ“ aktivierte M2-Makrophagen die Tumorprogression. Ihre Aktivierung erfolgt durch IL-4, IL-10, IL-13 oder Glukokortikoide. Charakteristische Merkmale dieses

Phänotyps sind eine geringe Antigenpräsentation, eine hohe IL-10 und eine niedrige IL-12 Expression (Mantovani et al 2002, Mantovani et al 2004).

Makrophagen, die im Stroma eines Tumors vorzufinden sind, weisen in der Regel einen M2-Phänotyp auf und werden auch als Tumor assoziierte Makrophagen (TAMs) bezeichnet. Ihre wichtige Rolle in der Tumorprogression zeigt nicht nur die Beobachtung, dass sie einen großen Anteil der Tumormasse ausmachen können (Pollard 2004) sondern auch die Ergebnisse zahlreicher Studien, die belegen, dass die Anzahl der Makrophagen in einem Primärtumor mit einem schlechten klinischen Verlauf der Krankheit korreliert (Bingle et al 2002, Mantovani and Sica 2010). Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre verdeutlichen, dass TAMs in fast allen Schritten der Tumorprogression eine unterstützende Funktion aufweisen.

Zur erfolgreichen Invasion von Tumorzellen muss ein proteolytischer Abbau der ECM erfolgen. Dies wird durch eine Interaktion mit Makrophagen ermöglicht, die eine Vielzahl von Proteasen, wie Urokinase/Plasminogen Aktivator, Cathepsine und Matrix-Metalloproteasen (MMPs), synthetisieren können (Egeblad and Werb 2002, Verollet et al 2011). So konnte unter anderem gezeigt werden, dass durch die Ko-Kultur von Makrophagen mit einer Mammakarzinom-Zelllinie die Expression von MMP-2 und -9 induziert wird was zu einer Invasionssteigerung der Tumorzellen führt (Hagemann et al 2004). Eine weitere viel untersuchte Interaktion zwischen den beiden Zelltypen, die zu einer gesteigerten Migration und Invasion führt, basiert auf den Proteinen CSF-1 (*colony-stimulating factor 1* auch *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF)) und EGF (*epidermal growth factor*). Von Tumorzellen sekretiertes CSF-1 stimuliert die Migration von Makrophagen und induziert in diesen die Expression von EGF. EGF wird anschließend von den Makrophagen in das Stroma abgegeben und führt wiederum zu einer Induktion der Tumormigration (Goswami et al 2005, Wyckoff et al 2004).

Neben der gesteigerten Migration und Invasion induziert die Interaktion über CSF-1 und EGF auch die Intravasation von Tumorzellen. Sie führt zu einer Ko-Migration von Tumorzellen und Makrophagen an Kollagenfasern entlang, die häufig mit Blutgefäßen verbunden sind. An den Blutgefäßen kommt es dann zu einer Interaktion der Tumorzellen mit perivaskulären Makrophagen, die in der Intravasation resultiert (Condeelis and Segall 2003, Wyckoff et al 2007).

Auch die Angiogenese, die essentiell für das Tumorwachstum ist, wird durch TAMs gefördert. Neben den Cytokinen und Wachstumsfaktoren VEGF (*vascular endothelial growth*

factor), TNF- α , IL-8 und bFGF (*basic fibroblast growth factor*), sezernieren TAMs auch Gefäß modulierende Enzyme wie COX-2 (*cyclooxygenase-2*) und MMPs (Lewis et al 1995, Sunderkotter et al 1991).

1.2.2 Die Rolle der Makrophagen in der Metastasierung

Die oben beschriebenen Tumor fördernden Eigenschaften der TAMs basieren alle auf Untersuchungen der ersten Schritte der Tumorprogression im Primärtumor. Ihre Funktion in den letzten Schritten der Tumorentwicklung, d.h. der Extravasation sowie der Kolonisation eines sekundären Organs, ist erst wenig untersucht. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Immunzellen auch hierbei eine entscheidende Rolle übernehmen. So konnte z.B. in einem genetisch manipulierten Mausmodell des Mammakarzinoms gezeigt werden, dass die Depletion der Makrophagen aufgrund einer Mutation in dem *Csfl* Gen zwar nicht das Auftreten und die Größe des Primärtumors beeinflusst, aber die Entwicklung zu einem invasiven metastasierenden Karzinom verzögerte (Lin et al 2001). Andere Untersuchungen zeigen, dass monozytäre Zellen des Knochenmarks zum Ort der späteren Metastasierung rekrutiert werden und dort das Gewebe in der Weise beeinflussen, dass die Kolonisation der Tumorzellen mit einer höheren Effizienz erfolgt (Kaplan et al 2005). Die Rekrutierung der monozytären Zellen basiert dabei auf Faktoren, die vom Primärtumor in das Serum abgegeben werden. Zwei dieser Faktoren, die bereits identifiziert werden konnten, sind die Proteine S100A8 und S100A9. Sie induzieren die Ansammlung von monozytären Zellen des Knochenmarks in der Lunge und eine daraus resultierende Metastasierung in dieses Gewebe (Hiratsuka et al 2006, Hiratsuka et al 2008).

Neben den monozytären Zellen des Knochenmarks stellen möglicherweise auch die stationären Makrophagen der Gewebe einen wichtigen Faktor in der erfolgreichen Metastasierung dar. Diese Hypothese basiert auf der Beobachtung, dass die Gewebe, in denen hauptsächlich Metastasen nachzuweisen sind, eine stationäre Makrophagenpopulation enthalten. Im Knochen sind es die Osteoklasten, in der Lunge die Alveolarmakrophagen, im Hirn die Mikroglia und in der Leber die Kupffer-Stern Zellen. Der Ursprung dieser Zellen ist bis heute umstritten und ihre Rolle in der Metastasierung nur sehr wenig untersucht. Für Mikroglia konnte bereits in einem organotypischen Hirnschnittmodell gezeigt werden, dass sie aktiv den Transport von Mammakarzinomzellen in das Hirngewebe vermitteln (Pukrop et al 2010). Ob dieser Mechanismus auch *in vivo* von Relevanz ist, bleibt jedoch noch zu klären. Die Funktion der Kupffer-Stern Zellen in der Tumorprogression ist sehr umstritten. Einerseits konnten sowohl tumorizide Eigenschaften der Kupffer-Stern Zellen nachgewiesen werden als

auch ein vermehrtes Auftreten von Lebermetastasen sowie eine schlechtere Prognose nach der Depletion dieser Zellen (Heuff et al 1993, Oosterling et al 2005, Zhang et al 1993). Andererseits zeigen Publikationen auch, dass eine Inhibition der Kupffer-Stern Zellen zu einer verminderten Metastasierung in die Leber führt (Gorden et al 2007, Sturm et al 2003). Trotz der kontroversen Ergebnisse deuten alle bisherigen Untersuchungen darauf hin, dass auch die stationären Makrophagen einen Einfluss auf die Metastasierung von Tumorzellen haben.

1.3 Makrophagen als Therapieansatz der Metastasierung

Makrophagen vermitteln in fast allen Schritten der Tumorprogression eine Tumor fördernde Wirkung (s. 1.2). Aus diesem Grund stellen sie ein interessantes Ziel in der Behandlung von Krebserkrankungen dar, wobei unterschiedliche Ansätze denkbar sind. Zwei Ansätze, zum einen die generelle Inhibition der Makrophagen durch die Behandlung mit Bisphosphonaten und zum anderen die spezifische Hemmung der CSF-1/CSF-1R-vermittelten Interaktion soll in den folgenden zwei Abschnitten vorgestellt werden.

1.3.1 Bisphosphonate

Bisphosphonate (BPs), die früher Anwendung als Zusatz in Düngemitteln und korrosionshemmenden Mitteln fanden (Rogers and Holen 2011), werden heute zur Behandlung von Krankheiten, die den Knochen betreffen, eingesetzt. Zu diesen zählen nicht nur Osteoporose und Morbus Paget sondern auch fortgeschrittene Tumorerkrankungen, die Metastasen in den Knochen ausgebildet haben.

BPs sind Analoga des anorganischen Pyrophosphats, in denen das zentrale Sauerstoffatom durch ein Kohlenstoffatom ersetzt wurde. Aufgrund ihrer Struktur können sie Zellmembranen nicht durch Diffusion passieren, werden aber durch Phagozytose von z.B. Makrophagen internalisiert. Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die einen unterschiedlichen Wirkmechanismus aufweisen. BPs der ersten Generation, die nicht-stickstoffhaltigen BPs, werden innerhalb der Zelle in ein toxisches ATP-Analogon metabolisiert (AppCCl₂p). Aufgrund seiner kompetitiven Hemmung der ADP/ATP-Translokase führt das ATP-Analogon zu einer fehlerhaften Funktion der Mitochondrien und induziert letztendlich die Apoptose (Lehenkari et al 2002). Auch die BPs der zweiten Gruppe, die stickstoffhaltigen BPs (N-BPs), induzieren die Apoptose von Zellen. Dies basiert jedoch auf einer Hemmung des Enzyms Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPP-Synthase) im Mevalonatstoffwechsel.

Aufgrund der Hemmung des Enzyms wird FPP nicht mehr gebildet. Dies ist jedoch essentiell für die Prenylierung, ein Prozess, der zur Aktivierung kleiner GTPasen wie RAS und RHO führt (Luckman et al 1998a, Luckman et al 1998b). Weiterhin führt die Hemmung der FPP-Synthese indirekt auch zu einer gesteigerten Synthese des ATP-Analogons ApppI (Triphosphorsäure 1-Adenosin-50-yl Ester 3-(3-Methylbut-3-enyl) Ester), welches in ADP und IPP umgesetzt wird. IPP induziert anschließend, vergleichbar zu dem Mechanismus der nicht-stickstoffhaltigen BPs, ebenfalls die Apoptose (Monkkonen et al 2006) (s. Abb. 1.2).

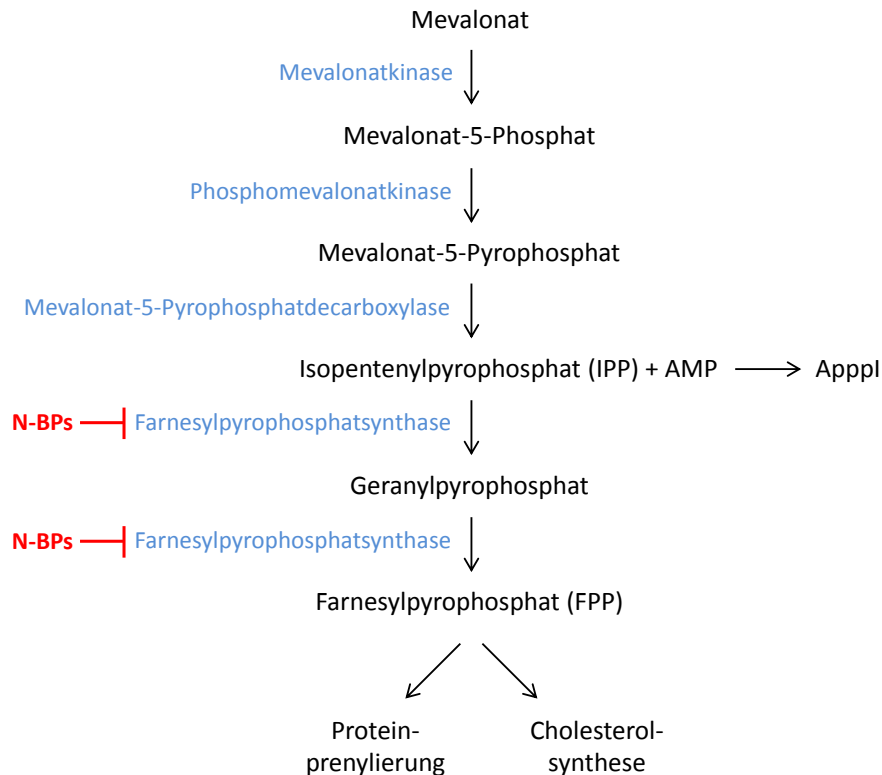


Abb. 1.2: Wirkmechanismus der N-BPs.

Schematische Darstellung des Mevalonat-Wegs mit seinen Zwischenprodukten. Die Enzyme, die die einzelnen Reaktionen katalysieren, sind in blau dargestellt. N-BPs hemmen das Enzym FPP-Synthase und somit die Prenylierung von Proteinen. Außerdem führt die Hemmung der FPP-Synthase zur Akkumulation von IPP, das anschließend zu dem ATP-Analogon ApppI umgesetzt wird.

Für viele BPs konnte sowohl eine direkte als auch eine indirekte hemmende Wirkung auf das Tumorstadium nachgewiesen werden (Neville-Webbe et al 2010, Rogers and Holen 2011). Aufgrund ihrer hohen Affinität zu Hydroxylapatit, dem Hauptbestandteil der Knochensubstanz, reichern sich BPs vorwiegend im Knochen an und entfalten dort ihre Wirkung. Basierend auf dem oben beschriebenen Mechanismus inhibieren sie dort aktive Osteoklasten und vermindern somit die Knochenresorption. Da durch die Osteoklasten-vermittelte Resorption des Knochens jedoch der Wachstumsfaktor TGF- β (*transforming growth factor- β*) freigesetzt wird, führt dieser Effekt zu einer indirekten Hemmung des Tumorstadiums (Mundy 2002, Rogers et al 2000). Direkte tumorizide Effekte von BPs

spiegeln sich in der Hemmung der Migration und Invasion von Tumorzellen wider (Boissier et al 2000), sowie in der Induktion von Apoptosemechanismen bzw. einer Reduktion der Zellproliferation der Tumorzellen (Almubarak et al 2011, Li et al 2012).

Zahlreiche vorklinische als auch klinische Studien verdeutlichen in zunehmendem Maße, dass BPs, neben ihrem Einsatz bei den Knochen betreffenden Komplikationen, ein deutlich größeres Potential in der Behandlung von Tumorerkrankungen aufweisen, als bislang vermutet wurde. Dies kann am Beispiel des N-BP Zoledronat (ZA) verdeutlicht werden. Seine weitreichenden Effekte zeigen sich in der Aktivierung von Tumor hemmenden Immunantworten (Benzaid et al 2011), in der Hemmung der Angiogenese (Stresing et al 2011), ebenso wie in der Hemmung der Interaktion zwischen Tumorzellen und mesenchymalen Stammzellen (Gallo et al 2012). Dass einige dieser Effekte bereits in translationalen Studien bestätigt werden konnten, verdeutlicht ihre Relevanz auch *in vivo* (Santini et al 2007, Santini et al 2009). Die tumorizide Wirkung von ZA außerhalb des Knochens konnte in drei großen Studien beim Einsatz in der adjuvanten Therapie von Mammakarzinom Patienten gezeigt werden. Sowohl in der ABCSG-12- als auch in der ZOFAST-Studie führt die adjuvante Therapie in Kombination mit ZA zu einem verlängerten krankheitsfreien Überleben, verglichen zu der Gruppe, die nur eine adjuvante Therapie ohne ZA erhalten hat (Gnant 2009, Gnant 2011). In der AZURE-Studie konnte nur ein Trend zu einem erhöhten allgemeinen Überleben von Patienten, die zusätzlich zu einer adjuvanten Chemotherapie ZA erhielten, verglichen zur Behandlung mit Chemotherapie allein, nachgewiesen werden (Gnant 2011). Die Analyse einer Subgruppe von Patienten, die eine neoadjuvante Chemotherapie in Kombination mit ZA erhielten, zeigte jedoch eine Verkleinerung des invasiven Primärtumors um ca. 43%, verglichen mit Patienten, die kein ZA erhielten (Coleman et al 2010).

1.3.2 Hemmung der CSF-1/CSF-1R-Interaktion

Der Wachstumsfaktor CSF-1 ist ein essentieller Regulator, der die Homöostase der Makrophagen *in vivo* vermittelt. Er wird von einer Vielzahl mesenchymaler und epithelialer Zellen synthetisiert und liegt hauptsächlich in drei Isoformen vor, die durch alternatives *splicing* generiert werden (Chitu and Stanley 2006). Durch die Bindung an den Rezeptor CSF-1R, der zur Gruppe der Typ III Protein-Tyrosinkinase-Rezeptoren zählt und dessen Expression in gesundem Gewebe nur auf Makrophagen zu finden ist, vermittelt der Wachstumsfaktor seine Wirkung.

Die Inhibierung des Wachstumsfaktors CSF-1 bzw. des korrespondierenden Rezeptors zur Behandlung von Tumorerkrankungen findet noch keine Anwendung in der Klinik und ist erst seit kurzer Zeit in den Fokus der Forschung getreten. Dennoch gibt es erste Hinweise aus vorklinischen Studien, dass dieser Therapieansatz eine Alternative darstellen könnte. So konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit einem Antikörper gegen CSF-1R in einem Modell für das Osteosarkom zu einer Reduktion der Makrophagen führte. Dies war mit einer verminderten Vaskularisierung und Lymphangiogenese sowie mit einem reduzierten Tumorwachstum verbunden (Kubota et al 2009). Eine weitere Studie, die ebenfalls einen Antikörper gegen CSF-1R untersuchte, bestätigte die Beobachtung, dass die Behandlung mit dem Antikörper zu einer Depletion der Gewebemakrophagen aber auch der TAMs führt (MacDonald et al 2010). Zuletzt konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des CSF-1-Signalwegs in Kombination mit einer Chemotherapie nicht nur die Progression des Primärtumors verminderte, sondern auch das Wachstum von Metastasen reduzierte und die Überlebensrate positiv beeinflusste. In dieser Studie wurden sowohl Antikörper gegen den Wachstumsfaktor CSF-1 als auch gegen seinen Rezeptor untersucht (DeNardo et al 2011).

Obwohl Makrophagen eine essentielle Rolle in der Homöostase von Geweben sowie in der Immunabwehr einnehmen und die Depletion dieser Zellen schwere Nebenwirkungen verursachen kann, wurden drei klinische Phase I Studien zur Untersuchung von CSF-1R Inhibitoren in der Krebstherapie gestartet (NCT01004861, NCT01316822, NCT01346358) (www.clinicaltrials.gov).

1.4 Der WNT-Signalweg

Der hoch konservierte WNT-Signalweg spielt sowohl bei der embryonalen Entwicklung als auch in der Homöostase unterschiedlicher Gewebe im adulten Organismus eine entscheidende Rolle. Er reguliert neben der Proliferation von Zellen und deren Überleben auch die Zelldifferenzierung und embryonale Segmentierung (Clevers 2006). Vermittelt werden diese Effekte über sekretierte Cystein-reiche Glykoproteine mit einer Größe von 350-400 Aminosäuren, die sowohl eine autokrine als auch parakrine Signalweiterleitung ermöglichen. Der erste Vertreter dieser sogenannten WNT-Moleküle, Int-1, wurde im Jahr 1982 in einem murinen System zur Induktion von Mammakarzinomen identifiziert (Nusse and Varmus 1982). Nachdem Rijsewijk et al einige Jahre später zeigen konnten, dass es sich bei diesem Protein um ein Homolog des *wingless*-Gens in dem Organismus *Drosophila melanogaster* handelt, dass die Segmentierung während der Larvenentwicklung kontrolliert, erfolgte die

Umbenennung zu WNT1, wodurch der Familienname dieser Proteine geprägt wurde (Nusslein-Volhard and Wieschaus 1980, Rijsewijk et al 1987). Bis heute konnten 19 unterschiedliche WNT-Moleküle in den Säugetieren identifiziert werden. Ihre Effekte sind stark vom jeweiligen Gewebe und den rekrutierten Rezeptoren abhängig. Grundsätzlich lässt sich der WNT-Signalweg in zwei Signalkaskaden einteilen, den kanonischen und den nicht-kanonischen Signalweg.

1.4.1 Der kanonische WNT-Signalweg

Der kanonische WNT-Signalweg wird auch als „klassischer“ oder β -Catenin-abhängiger Signalweg bezeichnet. Er ist von allen WNT-Signalwegen am meisten untersucht worden und daher am besten charakterisiert (Clevers 2006, Nusse 2005).

In der Abwesenheit von WNT-Molekülen, d.h. im nicht aktivierten Zustand, liegt der Ko-Transkriptionsfaktor β -Catenin in einem Abbau-Komplex vor, der sich aus den Proteinen AXIN, APC (*adenomatosis polyposis coli*), CK1 (Casein-Kinase 1) und GSK3 α/β (Glykogensynthase-Kinase 3 α/β) zusammensetzt. In diesem Komplex erfolgt eine Phosphorylierung von β -Catenin an hoch konservierten N-terminalen Serin/Threonin-Resten durch CK1 und GSK3 α/β (Liu et al 2002). Aufgrund der Phosphorylierung wird β -Catenin anschließend von dem Protein β -TrCP (*β -transducin repeats containing protein*) erkannt, einer Komponente des E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes, und daraufhin ubiquitinyliert und als Folge durch das Proteasom abgebaut (Aberle et al 1997) (s. Abb. 1.3 A). Neben dem Abbau durch das Proteasom bewirkt auch die Interaktion von β -Catenin mit membranständigen Komponenten von Zell-Zell-Verbindungen (*adherence junctions*) die Erniedrigung der freien cytoplasmatischen Konzentration dieses Proteins. β -Catenin ist ein essentieller Interaktionspartner zahlreicher Cadherine, und liegt daher in epithelialen Zellen in einem stabilen membrangebundenen Pool vor, der nicht der Signalweiterleitung dient (Clevers 2006, Peifer et al 1992).

Die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs erfolgt über die Bindung von WNT-Molekülen an Transmembranrezeptoren der *Frizzled* (Fz)-Familie, die daraufhin mit einem der beiden Ko-Rezeptoren LRP5 oder LRP6 (*lipoprotein related protein 5/6*) interagieren (Pinson et al 2000, Tamai et al 2000). Eine Hemmung der WNT-Aktivierung kann durch zwei unterschiedliche Klassen von Inhibitoren induziert werden. Die erste Klasse umfasst sezernierte DKK (Dickkopf)-Proteine. Sie binden an die Ko-Rezeptoren LRP5/6 und verhindern so die Interaktion mit Fz (Glinka et al 1998). Die zweite Klasse, die SFRPs

(*soluble frizzled-related proteins*), komplexieren WNT-Moleküle und unterdrücken so ihre Bindung an den Rezeptor (Lin et al 1997).

Nach einer erfolgreichen Aktivierung des Fz/LRP-Rezeptorkomplexes kommt es zur Phosphorylierung von LRP5/6 durch CK1 und GSK3 α/β was zu einer Anlagerung von AXIN an den Ko-Rezeptor führt (Davidson et al 2005). Auch die Rekrutierung des zytoplasmatischen Proteins DVL (*dishevelled*) und dessen Interaktion mit Fz wird induziert (Wallingford and Habas 2005). Nach Bindung an den jeweiligen Membranrezeptor inhibieren DVL und AXIN den Abbaukomplex, der zur Degradation von β -Catenin führt und bewirken den Abbau von AXIN (Clevers 2006). Zusätzlich wird das Protein GSK3 durch DVL inhibiert. Diese Vorgänge führen zu einer Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma und seiner anschließenden Translokation in den Zellkern. Dort interagiert es mit Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF (*lymphoid enhancer factor/T cell factor*)-Familie und induziert die Expression zahlreicher Zielgene (Behrens et al 1996, Molenaar et al 1996, van de Wetering et al 1997) (s. Abb. 1.3 B).

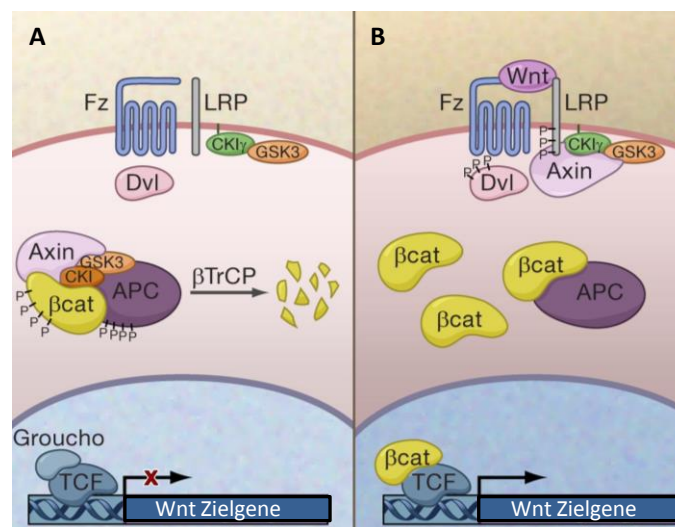


Abb. 1.3: Der kanonische WNT-Signalweg.

(A) Im nicht aktivierten Zustand kommt es zur Phosphorylierung von β -Catenin durch den Abbaukomplex woraufhin das Protein degradiert wird (B) In Anwesenheit von WNT-Molekülen wird der Signalweg aktiviert wodurch die Phosphorylierung von β -Catenin inhibiert wird. Das Protein akkumuliert im Zytoplasma bevor die Translokation in den Zellkern und die Interaktion mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren erfolgt. Details siehe Text. Abbildung nach (Clevers 2006) mit der Genehmigung von Elsevier.

1.4.2 Der nicht-kanonische WNT-Signalweg

Der nicht-kanonische WNT-Signalweg ist unabhängig von β -Catenin und lässt sich weiter in zwei Signalkaskaden einteilen, den PCP (*planar cell polarity*)-Signalweg und den WNT/Ca²⁺-Signalweg. Bei der Aktivierung des PCP-Wegs kommt es, wie nach der Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs, zu einer Rekrutierung des zytoplasmatischen Proteins DVL

an den Rezeptor Fz. Die Signalweiterleitung erfolgt anschließend jedoch über andere Domänen des Proteins und führt zur Aktivierung der kleinen GTPasen RHO und RAC (Wallingford and Habas 2005). RHO vermittelt die Aktivierung des Enzyms ROCK (*RHO-associated kinase*) und somit die Strukturierung des Zytoskeletts (Veeman et al 2003, Winter et al 2001). Dieser Signalweg hat somit einen starken Einfluss auf das Migrationsverhalten einer Zelle. RAC hingegen beeinflusst die Transkription zahlreicher Zielgene, da es die JUN-N-terminale Kinase (JNK) phosphoryliert und somit aktiviert und diese daraufhin den Transkriptionsfaktor cJUN erneut durch Phosphorylierung aktiviert (Boutros et al 1998).

Der WNT/ Ca^{2+} -Signalweg induziert einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, wodurch unterschiedliche Effekte ausgelöst werden. Zum einen erfolgt über mehrere Schritte die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Zum anderen komplexiert das Protein Calmodulin (CaM) Ca^{2+} -Ionen und induziert neben dem Protein CamKII (*calmodulin-dependent kinase II*) auch die Phosphatase Calcineurin, welche anschließend den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor associated with T cells*) aktiviert (Kuhl et al 2000, Pandur et al 2002).

1.5 Die LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren

Die Entdeckung der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren liegt inzwischen über 20 Jahre zurück. Wie der Name dieser Familie von Transkriptionsfaktoren widerspiegelt, wurde ihre Funktion zunächst nur auf Zellen des Immunsystems beschränkt (Travis et al 1991, van de Wetering et al 1991, Waterman et al 1991). Erst der Nachweis, dass diese Transkriptionsfaktoren mit dem Protein β -Catenin interagieren, verdeutlichte ihre entscheidende Rolle in der transkriptionellen Regulation von Zielgenen des WNT-Signalwegs (Behrens et al 1996, Molenaar et al 1996, van de Wetering et al 1997). Die LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren gehören zur HMG (*high mobility group*)-Familie von Transkriptionsfaktoren und sind evolutionär stark konserviert. Während Invertebraten, z.B. *Drosophila melanogaster*, in der Regel nur einen LEF/TCF-Transkriptionsfaktor exprimieren, sind in höheren Organismen vier Mitglieder dieser Familie zu finden, TCF1 (*TCF7*), TCF3 (*TCF7L1*), TCF4 (*TCF7L2*) und LEF1 (*LEF1*) (Arce et al 2006, Hurlstone and Clevers 2002).

Auch wenn durch alternatives *splicing* und die Verwendung alternativer Promotoren im Fall von LEF1 und TCF1 zahlreiche Isoformen dieser Proteine in einer Zelle vorliegen, ähneln sie sich in der allgemeinen Struktur (s. Abb. 1.4). Am N-Terminus der Proteine liegt die β -Catenin-Bindedomäne, die eine Größe von ca. 50 Aminosäuren aufweist. Über diese Domäne

interagieren alle LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren mit β -Catenin. In der Mitte des Proteins befindet sich eine variable Region, die sehr wenig konserviert ist, die CRD-Domäne (*context-dependent regulatory domain*). Bei allen vier Mitgliedern der Familie befindet sich in dieser Domäne ein alternatives Exon, welches in TCF3- und TCF4-Isoformen immer vorhanden ist, in den Transkriptionsfaktoren TCF1 und LEF1 jedoch durch alternatives *splicing* auch entfernt werden kann. Zusätzlich kann dieses alternative Exon bei TCF3 und TCF4 von kleinen Aminosäuremotiven flankiert sein, die eine hemmende Wirkung auf die Transkription aufweisen (Gradl et al 2002, Hoppler and Kavanagh 2007, Pukrop et al 2001).

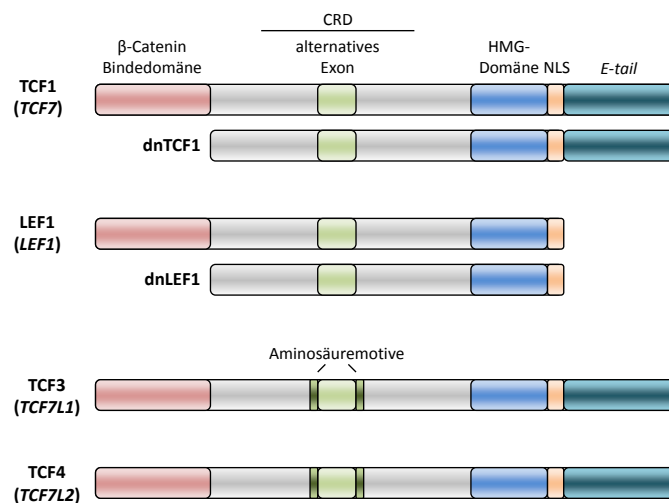


Abb. 1.4: Struktur der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren.

Schematische Darstellung der wichtigsten Isoformen der Proteine TCF1, LEF1, TCF3 und TCF4. Für die Proteine TCF1 und LEF1 werden durch alternative Promotornutzung dominant negative (dn) Isoformen generiert, denen die β -Catenin Bindedomäne (rot) fehlt. In der CRD (*context-dependent regulatory domain*) ist ein alternatives Exon (hellgrün) kodiert, das in den Proteinen TCF3 und TCF4 von kurzen Aminosäuremotiven (dunkelgrün) flankiert sein kann. C-terminal befinden sich die HMG (*high mobility group*)-Domäne (blau) sowie die NLS (*nuclear localization signal*)-Sequenz (orange). TCF1, TCF3 und TCF4 unterscheiden sich von LEF1 durch den E-tail (türkis). Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

Am C-Terminus der LEF/TCF Transkriptionsfaktoren liegt die HMG-Domäne. Sie ist mit 95-99% Sequenzübereinstimmung zwischen den Orthologen die am höchsten konservierte Domäne dieser Familie. Über diese Domäne erfolgt die Bindung der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren an die DNA innerhalb der kleinen Furche der Doppelhelix. Die Proteine binden dabei sehr spezifisch an die Konsensussequenz CCTTTGWW (Arce et al 2006). Gleichzeitig erfolgt eine starke Beugung der DNA. Auf diese Weise werden unterschiedliche Transkriptionsfaktoren in engen Kontakt zueinander gebracht, um daraufhin die Transkription zu induzieren (Giese et al 1992, Love et al 1995). Direkt im Anschluss an die HMG-Domäne ist die NLS (*nuclear localization signal*)-Sequenz kodiert, die den Transport der Proteine in den Zellkern vermittelt (Prieve et al 1998). Im Gegensatz zu LEF1 können die Transkriptionsfaktoren TCF1, TCF3 und TCF4 einen variablen C-Terminus, den

E-tail, aufweisen. Diese Region kodiert eine zweite nicht spezifische DNA-Bindedomäne und ist für die Regulation einiger Gene essentiell (Atcha et al 2003, Van de Wetering et al 1996).

Trotz des ähnlichen strukturellen Aufbaus variieren die LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren in ihrer Funktion. Während LEF1 hauptsächlich die Transkription induziert, bewirkt TCF3 eine Hemmung. Für TCF1 und TCF4 hingegen konnten beide Eigenschaften nachgewiesen werden (Arce et al 2006). Die Regulation der LEF/TCF-Aktivität erfolgt dabei nicht nur über die Bindung von β -Catenin, sondern auch über die Interaktion mit zahlreichen anderen Ko-Aktivatoren und –Repressoren, sowie die Expression dominant negativer Isoformen. So werden z.B. bei LEF1 und TCF1 durch die Nutzung eines alternativen Promotors Transkripte generiert, die keine β -Catenin-Bindedomäne enthalten und somit nicht durch den kanonischen WNT-Signalweg aktiviert werden können (Hovanes et al 2000, Van de Wetering et al 1996). Weitere Inhibitoren der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren sind u.a. die Proteine CtBP (*C-terminal binding protein*), das am *E-tail* bindet, sowie TLE (*transducin like enhancer of split*), das in der variablen Region an LEF/TCF bindet. Diese Inhibitoren binden in Abwesenheit eines WNT-Signals an LEF/TCF und interagieren mit Histondeacetylasen, was zu einer geschlossenen Chromatinstruktur führt und die Transkription somit verhindert (Brannon et al 1999, Daniels and Weis 2005). Ko-Aktivatoren der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren binden in der Regel an N- oder C-terminale Regionen von β -Catenin und beeinflussen auf diese Weise die LEF/TCF-Aktivität. Zu ihnen zählen unter anderem CBP (*CREB binding protein*) und BCL9-2 (*B cell lymphoma-9-2*) (Brembeck et al 2004, Takemaru and Moon 2000).

1.6 Der WNT-Signalweg in der Tumorprogression

Die Aktivierung des WNT-Signalwegs induziert die Expression zahlreicher Gene, die unter anderem die Zellproliferation und Migration steigern oder die einen Einfluss auf den strukturellen Aufbau der ECM haben. Diese Tatsache legt nahe, dass eine fehlerhafte Regulation des Signalwegs einen dramatischen Effekt auf die Homöostase von Geweben haben kann, der sich in einem ungehemmten Zellwachstum oder auch vermehrten Zellbewegungen widerspiegeln kann. Vor diesem Hintergrund wurde in den letzten Jahrzehnten in zahlreichen Studien eindeutig dargestellt, dass eine konstitutive Aktivierung des WNT-Signalwegs die Initiation unterschiedlicher Tumorentitäten induziert, aber auch einen positiven Effekt auf die ersten Schritte der Tumorprogression hat. So sind Mutationen in dem Tumorsuppressorgen *APC* die Ursache für das hereditäre Syndrom „Familiäre adenomatöse Polyposis“, bei dem sich im Dickdarm hunderte Polypen ausbilden, die ohne

Behandlung der Ursprung eines Kolonkarzinoms sein können (Clements et al 2003). Diese Mutation kann ebenfalls in ca. 80% aller spontan auftretenden Kolonkarzinome nachgewiesen werden und gilt als Initiator dieser Tumorentität (Fodde et al 2001). Aber auch Mutationen in anderen Komponenten des WNT-Signalwegs sind in verschiedenen Tumoren nachzuweisen. Mutationen in *AXIN* sind vor allem in hepatozellulären Karzinomen zu finden, ebenso wie Mutationen in *CTNNB1* (β -Catenin) (Salahshor and Woodgett 2005). Mutationen des zentralen Effektormoleküls β -Catenin sind außerdem im Medulloblastom sowie in Kolonkarzinomen ohne *APC* Mutation nachzuweisen (Morin et al 1997, Polakis 2012). Auch für das Mammakarzinom wird eine Fehlregulation des WNT-Signalwegs in der Tumorentstehung vermutet (Nguyen et al 2005). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestärkt, dass die Überexpression von LEF1 in Mammakarzinomzellen deren Invasivität steigert, die Überexpression eines dominant negativen LEF1-Konstruktes sie jedoch inhibiert (Nguyen et al 2005).

Wie Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, scheint der WNT-Signalweg nicht nur eine Rolle in den ersten Schritten der Tumorprogression zu spielen, sondern auch in den letzten Schritten, d.h. der Kolonisation in einem sekundären Organ und der damit verbundenen Metastasierung. Für das Lungenadenokarzinom konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Aktivität des WNT-Signalwegs charakteristisch für die Zellen ist, die im Verlauf der Erkrankung in das Hirn und die Knochen metastasieren (Nguyen et al 2009b). Die Fähigkeit, Metastasen im Hirn und in den Knochen auszubilden, wurde durch eine Inhibierung der TCF4-Aktivität unterdrückt, was auf eine verminderte Expression von LEF1 und HOXB9 zurückgeführt werden konnte (Nguyen et al 2009b). Eine zweite Studie, die fast zeitgleich erschien, konnte ebenfalls zeigen, dass der Transkriptionsfaktor LEF1 in Zellen des Mammakarzinoms, die in das Hirn metastasiert waren, deutlich hoch reguliert war, im Vergleich zu Zellen des Primärtumors (Bos et al 2009). Die Effekte von LEF1 auf die Metastasierung sind jedoch nicht nur auf das Mammakarzinom beschränkt. Die gesteigerte Expression dieses Transkriptionsfaktors konnte ebenfalls in stark migrierenden Zellen des metastasierenden Melanoms, jedoch nicht im Primärtumor, nachgewiesen werden (Murakami et al 2001).

Neben Mutationen in einzelnen Komponenten des WNT-Signalwegs kann auch eine erhöhte Konzentration von WNT-Molekülen die Tumorprogression fördern. So gelten die WNT-Moleküle WNT1, WNT3A und WNT7A als stark transformierende Liganden (Wong et al 1994). Die Funktion des Moleküls WNT5A ist hingegen umstritten, da sowohl Tumor fördernde als auch Tumor hemmende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Es

konnte z.B. gezeigt werden, dass die Sekretion dieses Moleküls durch TAMs eine gesteigerte Invasion von Mammakarzinomzellen induziert (Pukrop et al 2006). Im Gegensatz dazu inhibiert WNT5A aber auch den kanonischen WNT-Signalweg, indem es einen GSK3-unabhängigen Abbau von β -Catenin induziert (Topol et al 2003).

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Wachstum von Metastasen erfolgt bevorzugt in Organen, die eine stationäre Makrophagenpopulation aufweisen, in den Knochen, der Lunge, der Leber und dem Hirn. Dies wirft die Frage auf, ob die residenten Makrophagen einen positiven Einfluss auf die Metastasierung von malignen Zellen haben. Nachdem in früheren Arbeiten der Gruppe bereits, basierend auf einem organotypischen Hirnschnitt Ko-Kulturmodell, gezeigt werden konnte, dass Mikroglia die Invasion von Mammakarzinomzellen in das Gewebe aktiv fördern (Pukrop et al 2010), bestand ein Ziel dieser Arbeit darin, ein zweites organotypisches Ko-Kulturmodell unter Verwendung von Leberschnitten zu etablieren. Mit diesem Modell sollte die Rolle der Kupffer-Stern Zellen in der Metastasierung des Mammakarzinoms untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war das Bisphosphonat ZA, sowie den Antikörper 5A1, der gegen das murine CSF-1 gerichtet ist, hinsichtlich ihres Potentials zur Behandlung von fortgeschrittenen Tumorerkrankungen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollte die Toxizität der Substanzen auf unterschiedliche Makrophagenpopulationen und auf Mammakarzinom-Zelllinien ermittelt werden. Weiterhin sollten ihre Effekte auf die Makrophagen-induzierte Invasion von Mammakarzinomzellen, sowie auf die Mikroglia-assistierte Kolonisation maligner Zellen im Hirngewebe untersucht werden.

Nachdem für das Lungenadenokarzinom gezeigt werden konnte, dass der Transkriptionsfaktor LEF1 eine entscheidende Rolle in der Metastasierung der Zellen in das Hirn und in die Knochen spielt (Nguyen et al 2009b), sollte in einem dritten Projekt die Frage beantwortet werden, ob eine gesteigerte LEF1 Expression ebenfalls charakteristisch für metastasierende Zellen des Mammakarzinoms ist. In diesem Rahmen sollte auch geklärt werden, welchen Effekt die Überexpression von LEF1 in einer schwach invasiven Zelllinie auf deren Verhalten bezüglich Invasion, Migration und auch Sensitivität gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie hat. Weiterhin sollte untersucht werden, welche Signalwege durch die Überexpression beeinflusst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Oligonukleotide, Plasmide und Antikörper

Tab. 2.1: Oligonukleotide

Nummer	Name	Sequenz
Oligonukleotide für Klonierungen		
01	pIRES2-check-fw	CGTGTACGGTGGGAGGTCTA
02	pIRES2-check-rv	CCAAAAGACGGCAATATGGT
Oligonukleotide für qRT-PCR mit humanen Proben		
03	hsCDH1-fw (163)	CCTGCCAATCCCGATGAAAT
04	hsCDH1-rv (163)	ACTCTGAGGAGTTCAGGGAG
05	hsGNB2L1-fw (84)	AACCCTATCATCGTCTCCT
06	hsGNB2L1-rv (84)	CAATGTGGTTGGTCTTCAG
07	hsHPRT1-fw (89)	TATGCTGAGGATTTGGAAAGG
08	hsHPRT1-rv (89)	CATCTCCTTCATCACATCTCG
09	hsIL10-fw (240)	TGAAGGATCAGCTGGACAAC
10	hs-IL10-rv (240)	TTGCTCTTGTTTTACAGGG
11	hsLEF1-fw (125)	ACCAGATTCTTGGCAGAAGG
12	hsLEF1-rv (125)	ATTGTCTCTTGCAGACCAGC
13	hsSNAI1-fw (60)	CAATCGGAAGCCTAACTACAG
14	hsSNAI1-rv (60)	CTGCTGGAAGGTAAACTCTG
15	hsTCF7-fw (85)	TTCTACTCCCTGACCTCAG
16	hsTCF7-rv (85)	CCAGAACCTAGCATCAAGG
17	hsTCF7L1-fw (154)	AGTCGGTTCTCTCCTCACAT
18	hsTCF7L1-rv (154)	TCACGGTGACTGGTGATTTT
19	hsTCF7L2-fw (106)	CTGACCGTCAATGCTTCCATG
20	hsTCF7L2-rv (106)	ACTGTTGGTGTGACTATGGCCG
21	hsTNF α -fw (181)	GCCCAGGCAGTCAGATCATCTTC
22	hsTNF α -rv (181)	TGAGGTACAGGCCCTCTGATGG
23	hsVEGFA-fw (212)	AGTACCCTGATGAGATCGAG
24	hsVEGFA-rv (212)	CTTCTTTGGTCTGCATTAC
25	hsVIM-fw (106)	CCTTGAACGCAAAGTGGAAATC
26	hsVIM-rev (106)	GACATGCTGTTCTGAATCTGAG
27	hsWNT5A-fw (109)	AGGGCTCCTACGAGAGTGCT
28	hsWNT5A-rv (109)	GACACCCCATGGCACTTG
29	hsZEB1-fw (127)	ACAACAAGACACTGCTGTCA
30	hsZEB1-rv (127)	TGGACAGGTGAGTAATTGTGAA

Nummer	Name	Sequenz
Oligonukleotide für qRT-PCR mit murinen Proben		
31	mmCsf1-fw (127)	GCGCTTTAAAGACAACACCC
32	mmCsf1-rv (127)	ATGGAAAGTTCGGACACAGG
33	mmCsf1r-fw (72)	CACCATCCACTTGTATGTC
34	mmCsf1r-rv (72)	CTCAACCACTGTCACCTC
35	mmF4/80-fw (164)	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC
36	mmF4/80-rv (164)	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
37	mmGapdh-fw (146)	CATCTTGGGCTACACTGAG
38	mmGapdh-rv (146)	CTGTAGCCGTATTCATTGTC
39	mmGfap-fw (135)	TGGCCACCAGTAACATGCAAGAG
40	mmGfap-rv (135)	CTGCAGTTGGCGGCGATAGT
41	mmI134-fw (160)	TGGCTTTGGGAAACGAGAAT
42	mmI134-rv (160)	CCCTCATAAGGCACAGCAAT
43	mmLef1-fw (98)	TCATCCAGCTATTGTAACACCT
44	mmLef1-rv (98)	TGCTCCTTTCTCTGTTCTG
45	mmRbfox3-fw (90) (NeuN)	CCAATAAGAAGCCTGGGA
46	mmRbfox3-rv (90) (NeuN)	GTCACTGCATAGAATTCAGG
47	mmRn18s-fw (150)	GTAACCCGTTGAACC CCATT
48	mmRn18s-rv (150)	CCAT CCAATCGGTAG TAGCG
49	mmTcf7-fw (97)	TCTGACCTCAGGCAGCAT
50	mmTcf7-rv (97)	GTGCTGTCTATATCCGCAGG
51	mmTcf7l1-fw (161)	GTTCAGCACCTCATCACAT
52	mmTcf7l1-rv (161)	GGGTAATACGGTGACAGCTC
53	mmTcf7l2-fw (135)	CCTCTCATCACGTACAGCAA
54	mmTcf7l2-rv (135)	CGACAGCGGGTAATATGGAG

Die synthetischen Oligonukleotide wurden bei der Firma Iba (Göttingen) bezogen. Die Auswahl der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes „PerlPrimer“ (<http://perlprimer.sourceforge.net>).

Tab. 2.2: Plasmide

Plasmid	Eigenschaften oder Genotyp	Referenz
Verwendete Vektoren		
pIRES2-EGFP	P _{CMV} , MCS, IRES, <i>EGFP</i> , SV40 polyA, <i>kan/neo</i>	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Verwendete Plasmide		
pSG5-LEF-FL-HA	wt hsLEF1 mit C-terminalem HA- <i>tag</i>	Prof. Dr. D. Kube, Göttingen, nicht veröffentlicht

Plasmid	Eigenschaften oder Genotyp	Referenz
pSG5-LEF-ΔHMG-HA	hsLEF1 ohne HMG-Domäne mit C-terminalem HA-tag	Prof. Dr. D. Kube, Göttingen, nicht veröffentlicht
pSG5-LEF-DN-HA	hsLEF1 ohne β-Catenin Bindedomäne mit C-terminalem HA-tag	Prof. Dr. D. Kube, Göttingen, nicht veröffentlicht
pCl-neo-β-cateinin-S33Y	hsβ-cateinin mit der Mutation S33Y	Prof. Dr. D. Kube, Göttingen, nicht veröffentlicht
pTOPFLASH	drei Kopien des optimalen TCF Bindemotivs, Luciferase Reporter	(van de Wetering et al 1991)
pFOPFLASH	drei Kopien eines mutierten TCF Bindemotivs, Luciferase Reporter	(van de Wetering et al 1991)
pRL-TK	Renilla Luciferase Reporter	Promega, Mannheim
Konstruierte Plasmide		
pIRES2-LEF-FL-HA-EGFP	wt hsLEF1 mit C-terminalem HA-Tag	diese Arbeit
pIRES2-LEF-ΔHMG-HA-EGFP	hsLEF1 ohne HMG-Domäne mit C-terminalem HA-Tag	diese Arbeit

Tab. 2.3: Antikörper

Name	Verdünnung	Firma
Primärantikörper		
β-catenin (E-5)	WB: 1:500; IP: 1:50	sc-7963, Santa Cruz (Heidelberg)
c-Jun (60A8)	WB: 1:500	#9165, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
Dvl3	WB: 1:1000	#3218; Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
HDAC1	WB: 1:1000	#2062, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
LEF1 (C18A7)	WB: 1:1000	#2286, Cell Signaling (Frankfurt a. M.)
TCF1 (G.452.9)	WB: 1:1000	MA5-14972, Thermo Scientific (Bonn)
TCF7L2 (EP2033Y)	WB: 1:5000	ab76151, abcam (Cambridge, UK)
Sekundärantikörper		
goat anti-mouse IgG-HRP	WB: 1:6000	sc-2005, Santa Cruz (Heidelberg)
goat-anti-rabbit IgG-HRP	WB: 1:6000	sc-2004, Santa Cruz (Heidelberg)

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Bakterienstämme

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α (Invitrogen, Darmstadt) verwendet.

2.2.2 Eukaryotische Zelllinien

Tab. 2.4: Eukaryotische Zelllinien

Name	Spezies / Ursprung	Merkmal/Mausstamm	Herkunft	Referenz
MCF-7	humane Mamma-adenokarzinom-Zelle	ER-positiv	DSMZ, Braunschweig	(Soule et al 1973)
MDA-MB231	humane Mamma-adenokarzinom-Zelle	ER-negativ, PR-negativ, ERBB2 negativ	ATCC, Wesel	(Cailleau et al 1974)
SK-BR3	humane Mamma-adenokarzinom-Zelle	ERBB2-positiv	ATCC, Wesel	(Trempe 1976)
SW480	humane Kolorektal-adenokarzinom-Zelle	konstitutiv aktives β -Catenin	Prof. D. Gradl, Karlsruhe	(Leibovitz et al 1976)
410.4	murine Mamma-adenokarzinom-Zelle	BALB/c	Prof. F. Balkwill, London, UK	(Miller et al 1983)
4T1	murine Mamma-adenokarzinom-Zelle	BALB/c	Prof. F. Balkwill, London, UK	(Aslakson and Miller 1992)
L929	murine Fibroblasten des subkutanen Bindegewebes	C3H/An	Prof. U.-K. Hanisch, Göttingen	(Sanford et al 1956)

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in FKS mit 10% (v/v) DMSO aufgenommen und bei -150°C eingefroren.

2.2.3 Mausstämme

Verwendet wurden Mäuse des Stammes NMRI, die aus der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen stammten oder von der Firma Charles River (Hannover) bezogen wurden. Die Haltung der Tier erfolgte unter Standardbedingungen mit einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus.

2.2.4 Patientenmaterial

Zerebrale Metastasen des Mamma-Karzinoms wurden nach der Information der Patienten beim Vorliegen einer erforderlichen neurochirurgischen Resektion gesammelt. Die erforderliche Genehmigung des Ethikausschusses lag vor.

2.3 Medien, Antibiotika, Zellkulturzusätze

2.3.1 Medien für Bakterien

Das Medium wurde mit H_2O (bidest.) angesetzt und zur Sterilisation für 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Zur Herstellung von Plattenmedien wurde dem Grundmedium vor dem Autoklavieren 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Luria Bertani (LB)-Medium: Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	ad. 1 l

2.3.2 Medien für eukaryotische Zellkulturen

Die Medien zur Kultivierung eukaryotischer Zelllinien wurden vor Gebrauch, wenn nicht anders angegeben, mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FKS) versetzt.

Tab. 2.5: Medien für die Zellkultur

Name	Zelllinie	Firma
RPMI 1640	MCF-7, MDA-MB231, SK-BR3, 4T1, SW480	PAA, Cölbe
DMEM	410.4, L929	Biochrom, Berlin
MEM		Gibco, Darmstadt

2.3.3 Antibiotika

Die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin dienen der Selektion von transformierten Bakterienstämmen. Sie wurden als 1.000-fach konzentrierte Stammlösung in H₂O (bidest.) angesetzt und mit einem Spritzenfilter („Filtropur S 0,2“, Sarstedt, Nümbrecht) steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Den Medien wurden sie in einer Konzentration von 100 µg/ml (Ampicillin) bzw. 50 µg/ml (Kanamycin) entweder nach dem Abkühlen auf ca. 50°C oder direkt vor Gebrauch zugesetzt.

Antibiotika, die zur Selektion eukaryotischer Zellen dienen, wurden als Gebrauchslösung käuflich erworben. Zur Selektion von transfizierten Zellen wurde Geneticin („G418“, Roche, Mannheim) in einer Konzentration von 750 µg/ml eingesetzt. Den Kulturmedien für organotypische Gewebeschnitte (s. 2.10.3) wurden Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 mg/ml) zugesetzt (Penicillin/Streptomycin-Lösung; Biochrom, Berlin).

2.3.4 Zusätze für die Zellkultur

Tab. 2.6: Zellkulturzusätze

Name	Abkürzung	Firma
Fetales Kälber Serum	FKS	Sigma, München
<i>Normal Horse Serum</i>	NHS	Invitrogen, Darmstadt
<i>Normal Goat Serum</i>	NGS	Sigma, München
<i>Newborn Calf Serum</i>	NCS	Sigma, München
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>	HBSS	Gibco, Darmstadt
Natriumpyruvat		Sigma, München
20% Glucose		Braun, Melsungen
L-Glutamin		Biochrom, Berlin
Trypsin		Biochrom, Berlin
MTT		Sigma, München
LPS		Enzo Life Sciences (Alexis), Lörrach
rhWNT5A		R&D Systems, Wiesbaden

2.4 Mikrobiologische Methoden

2.4.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde die Calciumchlorid-Methode verwendet. Dafür wurden 200 ml LB-Medium (s. 2.3.1) mit 2 ml einer über Nacht Kultur von *E. coli* angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Beim Erreichen einer optischen Dichte von 0,3, die mit dem Plattenphotometer „Sunrise“ (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 600 nm gemessen wurde (OD₆₀₀), wurde die Bakteriensuspension auf 50 ml Falcon-Gefäße verteilt und für 10 min auf Eis inkubiert, wobei sie gelegentlich geschüttelt wurde. Anschließend wurden die Bakterien geerntet, indem sie für 15 min bei 4°C und 4.500×g zentrifugiert wurden. Die Pellets wurden in 20 ml einer 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut für 20 min auf Eis inkubiert. Nachdem die beschriebene Zentrifugation wiederholt wurde, wurden die Pellets in einem Gesamtvolumen von 4 ml 100 mM CaCl₂-Lösung, die 15% (v/v) Glycerin enthielt, aufgenommen. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 15 min, wurden die Zellen zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.4.2 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Hitzeschock-Methode (Hanahan 1983). Kompetente Bakterienzellen wurden für ca. 10 min auf Eis aufgetaut. 100 µl Zellen wurden mit 10-100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert, bevor sie für 90 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt wurden. Nachdem die Zellen anschließend für 1 min auf Eis gekühlt wurden, wurden 400 µl LB-Medium (s. 2.3.1) zugefügt und die Zellen für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurden 50 µl und der aufkonzentrierte Rest auf selektivem LB-Agar ausplattiert.

2.5 Präparation und Nachweis von Nukleinsäuren

2.5.1 Isolation von Plasmid-DNA

Zur schnellen Überprüfung oder Sequenzierung von Plasmiden wurde zunächst eine geringe Menge Plasmid-DNA isoliert. Dazu wurden 3 ml einer über Nacht Kultur des gewünschten *E. coli* Stammes für 10 min bei 4600×g pelletiert. Die Pellets wurden in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurde der Ansatz einige Male invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Puffer P3 zugefügt, erneut durch Invertieren gemischt und dann bei 16.000×g für 10 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Plasmid-DNA befindet, wurde in ein neues Gefäß überführt, bevor 525 µl Isopropanol zugefügt wurden. Zum Fällen der DNA wurde der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 16.000×g für 10 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 500 µl 70% EtOH gewaschen. Abschließend wurde der Überstand von dem Pellet vollständig entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und dann in 40 µl H₂O (bidest.) resuspendiert.

Puffer P1:	Tris-HCl (pH 8)	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
	Lagerung bei 4°C	
Puffer P2:	NaOH	200 mM
	SDS	1% (w/v)
Puffer P3:	Natriumacetat (pH 5,5)	3 M

2.5.2 Isolation von Plasmid-DNA für die Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur Transfektion eukaryotischer Zellen ist es erforderlich, große Mengen hoch reiner Plasmid-DNA zu isolieren. Dazu wurde das „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben eingesetzt. Mittels dieses Kits wird die DNA über Anionenaustausch-Membranen isoliert und gleichzeitig die Konzentration an Endotoxinen, die eine störende Auswirkung auf die Transfektion von eukaryotischen Zellen haben können, stark reduziert.

2.5.3 Isolation der mRNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Isolation von mRNA aus eukaryotischen Zellen wurde das „High Pure RNA Isolation Kit“ (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Bei diesem Kit wird die RNA affinitätschromatographisch über Säulen aufgereinigt.

2.5.4 Isolation der Gesamt-RNA aus Geweben

Die Isolation von Gesamt-RNA aus humanen und murinen Geweben erfolgte über eine Trizol (Invitrogen, Darmstadt) basierte Methode. Dazu wurde das Gewebe in 1 ml Trizol homogenisiert. Nachdem dem Ansatz 200 µl Chloroform zugefügt wurden, wurde dieser sehr gut gemischt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 20.000×g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Die obere Phase, die die RNA enthält, wurde in ein neues Gefäß überführt, bevor 500 µl Isopropanol zugefügt wurden. Die Fällung der RNA erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation bei 13.000×g und 4°C für 30 min. Das RNA-Pellet wurde einmal mit 1ml 70% EtOH gewaschen (20.000×g, 4°C, 5 min), bevor der Überstand zum Trocknen des Pellets vollständig abgenommen wurde. Nach dieser beschriebenen Aufreinigung der RNA wurde ein DNase I-Verdau angeschlossen, da die RNA für Expressionsanalysen mittels qRT-PCR (s. 2.7.1) verwendet werden sollte. Hierzu wurde 1 µl DNase I (10 U/µl) (Roche, Mannheim) mit 0,5 µl RNase OUT (40 U/µl) (Invitrogen, Darmstadt) und 5 µl „10 x DNase I Incucation Buffer“ (Roche, Mannheim) in H₂O (RNase-frei) in einem Gesamtvolumen von 50µl aufgenommen. In dieser Lösung wurde das RNA-Pellet resuspendiert und für 20 min bei 37°C inkubiert. Zur erneuten Aufreinigung der RNA wurde dem Ansatz zunächst 150 µl H₂O (RNase-frei) zugefügt und anschließend 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol. Nachdem die Lösung 30 sec gevortext wurde, wurde sie bei 20.000×g und 4°C für 2 min zentrifugiert. Die obere Phase, die die RNA enthält, wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 20 µl Natriumacetat pH 4,8 (3 M) und 200 µl Isopropanol versetzt. Die Fällung der RNA erfolgte für 30 min bei 4°C und anschließender Zentrifugation

bei 20.000×g und 4°C für 30 min. Das RNA Pellet wurde zweimal mit 1 ml 70% EtOH gewaschen (20.000×g, 4°C, 5 min). Abschließend wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet, bevor es in 15 µl H₂O (RNase-frei) resuspendiert wurde und eine Konzentrationsmessung durchgeführt wurde.

2.5.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des „Spectrophotometer ND-1000“ (PeqLab, Erlangen) bestimmt.

2.6 Klonierungstechniken

2.6.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR dient dazu ein Fragment von einer als Matrize dienenden DNA mit Hilfe von sequenzspezifischen Oligonukleotiden, die als Primer dienen, enzymatisch *in vitro* zu vervielfältigen (Mullis et al 1986). Bei dieser Reaktion wird zunächst die dsDNA durch hohe Temperaturen denaturiert und dadurch in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Nach einer Erniedrigung der Temperatur kommt es zur Anlagerung der Oligonukleotide an die ssDNA. Dies ermöglicht die Bindung der DNA-Polymerase an die DNA, die nach einer erneuten Temperaturerhöhung aktiviert wird und die DNA-Synthese startet. Die mehrfache Wiederholung dieses Zyklus führt zu einer exponentiellen Amplifikation des DNA-Fragments.

Alle Reaktionsansätze sowie die Thermocycler-Programme für die PCR wurden nach Herstellerangaben angefertigt. Je nach Verwendung des amplifizierten Fragments wurden jedoch unterschiedliche DNA-Polymerasen eingesetzt. Sollte das PCR Produkt in einer Klonierung eingesetzt werden, wurde die „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“ (NEB, Frankfurt a.M.), die eine *proof reading*-Aktivität aufweist, verwendet. Diente die PCR zur Überprüfung von konstruierten Plasmiden oder für die Amplifikation von Fragmenten, die sequenziert werden sollten (s. 2.6.5), wurde die *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Darmstadt) eingesetzt. Alle Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tab. 2.1 aufgeführt. Alle PCR-Reaktionen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, in Thermocyclern des Typs „T3000“ (Biometra, Göttingen).

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Aufgrund ihrer negativ geladenen Struktur können DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Hierzu wurden 1-1,5% (w/v) Agarose HEEO Ultra (Roth, Karlsruhe) in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde der Lösung ca. 0,1% (v/v) „SERVA DNA Stain G“ (Serva, Heidelberg) zugesetzt, das dsDNA markiert und durch UV-Licht sichtbar gemacht wird. Anschließend wurde die Lösung zum Polymerisieren in eine horizontale Elektrophorese-Kammer (Biotec-Fischer, Reiskirchen) gegossen. Nach dem vollständigen Aushärten des Agarosegels wurde es in der Laufkammer mit TAE-Puffer überschichtet und mit den DNA Proben, die zuvor mit 6× Ladepuffer (Fermentas, St. Leon Rot) versetzt wurden, beladen. Um eine Größenbestimmung zu ermöglichen, wurde ebenfalls ein Größenstandard mit aufgetragen. Hierbei handelte es sich, je nach erwarteter Fragmentgröße, um „1kb DNA-Ladder“ (NEB, Frankfurt a.M.) oder um „100 bp-DNA-Ladder“ (NEB, Frankfurt a.M.). Die Elektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt, bevor die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht betrachtet und dokumentiert werden konnte.

10× TAE:	Tris	0,4 M
	Essigsäure	0,2 M
	EDTA (pH 8,5)	0,01 M

2.6.3 Restriktion von DNA

DNA-Fragmente und Plasmide wurden mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen (Roche, Darmstadt) geschnitten. Die Restriktionsreaktion erfolgte in einem Volumen von 20-50 µl mit einem DNA-Gehalt von 100-1000 ng. Enzym- und Pufferkonzentrationen wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Die geschnittenen DNA-Fragmente oder Plasmide wurden anschließend nach Herstellerangaben mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) aufgereinigt oder aus einem Agarose-Gel (s. 2.6.2) mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden), nachdem die Bande mit der entsprechenden Größe ausgeschnitten wurde, eluiert.

2.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Um geschnittene DNA-Fragmente in ein linearisiertes Plasmid zu integrieren, wurde eine Ligation durchgeführt. Für diese Reaktion wurde die „T4 DNA Ligase“ (Fermentas, St. Leon-Rot) eingesetzt, die die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer

5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe von dsDNA katalysiert. Die Reaktionsansätze wurden nach Herstellerangaben angefertigt. Dabei wurden 50-100 ng Plasmid-DNA und ein 1,5-2-facher molarer Überschuss des Fragments eingesetzt. Der Ansatz wurde für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für die Transformation von *E. coli* (s. 2.4.2) eingesetzt.

2.6.5 Sequenzierung von Plasmiden

Zur Überprüfung der korrekten Integration eines PCR-Fragments und seiner Sequenz wurde eine Sequenz-PCR mit anschließender Sequenzierung nach der Kettenabbruch-Methode durchgeführt (Sanger et al 1977). Für die Sequenz-PCR wurde das „BDT Cycle sequencing kit v.1.1“ (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet, der folgende Ansatz angefertigt und das angegebene PCR-Programm durchgeführt:

Sequenz-PCR-Ansatz:	Plasmid-DNA	500 ng
	5× Sequenz-Puffer	1,25 µl
	BDT CyclesequencingKit v.1.1	1,5 µl
	Primer (5 µM)	1 µl
	H ₂ O (bidest.)	ad 10 µl
PCR-Programm:	96°C	30 sec
	50°C	15 sec
	60°C	2 – 4 min

Als Primer dienten die Oligonukleotide 01/02, die bereits zur Kontrolle des jeweiligen Plasmids eingesetzt wurden (s. Tab. 2.1). Nach erfolgter Sequenz-PCR wurde der Ansatz mittels des „innuPREP DYEpure Kit“ (Analytik Jena, Jena) aufgereinigt, 10 µl des aufgereinigten Produkts mit 10 µl „HiDi Formamid“ (Applied Biosystems, Darmstadt) gemischt, und die Sequenzierung im „3130 Gentic Analyzer“ (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

2.7 Genexpressions-Analysen

2.7.1 Quantitative *real-time* Reverse Transkription-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR dient zur Quantifizierung des mRNA-Gehalts in einem Zelllysats. Sie ist daher eine weit verbreitete Methode in der Expressionsanalyse einzelner Gene. Die Reaktion lässt sich in zwei Schritte unterteilen. Im ersten Schritt wird die RNA mittels einer Reversen Transkriptase in cDNA (*complementary* DNA) umgeschrieben, die im zweiten Schritt, der anschließenden PCR, als Matrize dient. Zur Quantifizierung eines spezifischen Produkts kann bei dieser PCR unter anderem der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green eingesetzt werden. Dieser bindet, unter Veränderung des Fluoreszenzspektrums, unspezifisch an dsDNA, wodurch eine Messung der Produktzunahme während der PCR in Echtzeit ermöglicht wird. Bei der qRT-PCR ist jede einzelne Reaktion durch den Zyklus charakterisiert, in dem das Fluoreszenzsignal über einen definierten Hintergrund steigt. Dieser Zeitpunkt wird als C_t -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet. Für die Auswertung der qRT-PCR kann im Anschluss entweder eine absolute Quantifizierung durchgeführt werden, für die es erforderlich ist, eine Standardkurve mitzuführen, die es ermöglicht, definierte RNA-Mengen einem bestimmten C_t -Wert zuzuordnen. Alternativ kann eine relative Quantifizierung vorgenommen werden, bei der die Expression eines Gens, definiert durch den C_t -Wert, unter zwei Bedingungen in Bezug auf ein Referenzgen miteinander verglichen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die qRT-PCR unter Verwendung des DNA markierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green durchgeführt. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben, wobei 1 μ g RNA eingesetzt wurde. Für die PCR wurden der unten angegebene Reaktionsmix und das dargestellte PCR-Programm verwendet. Die Reaktionen wurden in 384-*well* Platten mit dem „ABI Prism 7900 HT Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Die Daten wurden mit Hilfe der Software „SDS Version 2.4“ (Applied Biosystems, Darmstadt) ausgewertet.

10× PCR-Puffer:	Tris-HCl pH 8,8	0,75 M
	Ammoniumsulfat	0,2 M
	Tween-20	0,1% (v/v)

SYBR-Green Master Mix:	10x PCR-Puffer	2,5 ml
	25 mM MgCl ₂	3 ml
	1:100 SYBR-Green (Roche, Mannheim)	31,3 µl
	20 mM dNTP-Mix	250 µl
	5 U/µl Taq-Polymerase	100 µl
	10% Triton X-100	652 µl
	1 M Trehalose	7,5 ml

Alle Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt. Die Trehalose wurde in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst.

PCR-Reaktionsmix:	SYPR-Green Master Mix	5,6 µl
	fw-Primer (10 µM)	0,3 µl
	rv-Primer (10 µM)	0,3 µl
	cDNA 5 ng/µl	2 µl
	H ₂ O	1,8 µl

PCR-Programm:	95°C	12 min	Aktivierung <i>Taq</i> -Polymerase	
	40×	95°C	15 sec	Denaturierung
		60°C	1 min	<i>Annealing</i> / Elongation
		95°C	15 sec	Schmelzkurvenanalyse
		60-95°C	2°C/min	

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression eines Gens in zwei unterschiedlichen Bedingungen miteinander verglichen. Aus diesem Grund wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt. Nach der folgenden Formel kann dabei über die C_t-Werte des zu untersuchenden Gens in beiden Bedingungen im Vergleich zu den C_t-Werten eines Referenzgens, das konstitutiv exprimiert ist, der Expressionsunterschied (*fold change*) ermittelt werden (Talaat et al 2002). Im humanen System wurden als Referenzgene *HPRT1* und *GNB2L1* gewählt. Im murinen System dienten das Gen *Gapdh* sowie 18S-rRNA als Referenzgene. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

$$fold\ change = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

mit $\Delta\Delta C_t = (C_t - C_{t(\text{konstitutiv})})_{\text{Bedingung 1}} - (C_t - C_{t(\text{konstitutiv})})_{\text{Bedingung 2}}$

Die als Primer dienenden Oligonukleotide wurden unter Verwendung der Software „PerlPrimer“ generiert, wobei ihre Schmelztemperatur möglichst genau 60°C und die Länge des Produkts zwischen 50-150 bp betragen sollte. Außerdem wiesen sie eine Effizienz von 90-110% auf (s.2.7.1.1).

2.7.1.1 Bestimmung der Effizienz von Primern für die qRT-PCR

Die Auswertung einer qRT-PCR nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (s. 2.7.1) darf nur durchgeführt werden, wenn die Primer, die eingesetzt werden sollen, eine vergleichbare Effizienz aufweisen. Unter optimalen Bedingungen sollte es in jedem PCR-Zyklus zu einer Verdopplung der Matrize kommen, was einer Primereffizienz von 100% entspricht. Zur Bestimmung der Effizienz wurde eine Standardreihe mit bekannten cDNA-Konzentrationen erstellt. Nach erfolgter qRT-PCR wurde, mit Hilfe der Software „SDS Version 2.4“ (Applied Biosystems, Darmstadt), der C_t -Wert gegen die cDNA-Konzentration aufgetragen und die Steigung der resultierenden Geraden ermittelt. Die Primereffizienz lässt sich im Anschluss mit der folgenden Formel ermitteln:

$$\text{Effizienz} = 10^{\frac{-1}{\text{Steigung der Geraden}}}$$

Eine Effizienz von 100% liegt dann vor, wenn die Steigung den Wert -3,3 aufweist. Eine Effizienz, die über 100% liegt, kann unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass die PCR Reaktion inhibiert wird oder die Matrize zu konzentriert vorliegt.

2.7.2 DNA-Microarray

Mit Hilfe von DNA-Microarrays kann die differenzielle Genexpression, basierend auf der Bestimmung des mRNA-Gehalts, tausender Gene untersucht werden. Dazu wird RNA, z.B. aus Zellkulturen, isoliert, in cDNA umgeschrieben, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, auf einem Trägermaterial hybridisiert und das Fluoreszenzsignal detektiert, welches Aufschluss darüber gibt, welche mRNA in welcher Konzentration in dem Ausgangsmaterial vorhanden war.

Die Microarray-Analysen wurden durch das Transkriptom-Analyse-Labor (TAL) in Göttingen ausgeführt. Dabei wurde das „Low Input Quick Amp Labeling Kit Cy3 One Color“ (Agilent, Böblingen) in Kombination mit dem „Human GE 4 x 44K v2 Microarray Kit“ (Agilent, Böblingen) nach Herstellerangaben verwendet.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Isolation des Gesamtproteins aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolation des Gesamtproteins wurden die Zellen mit „*Radioimmunoprecipitation Assay*“ (RIPA)-Puffer lysiert. Adhärenz wachsende Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen, bevor der RIPA-Puffer direkt im Kulturgefäß zugefügt wurde. Das Lysat wurde anschließend in ein Eppendorf Gefäß überführt und zur vollständigen Lyse für 10-20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde es bei $20.000\times g$ und $4^{\circ}C$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt, bevor die Bestimmung der Proteinkonzentration durchgeführt wurde (s. 2.8.3).

RIPA-Puffer:	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	SDS	0,1% (w/v)
	Natriumdeoxycholat	0,5% (w/v)
	Triton X-100	1% (v/v)

Vor der Verwendung des RIPA-Puffers wurden diesem frisch Proteaseinhibitoren („100× Proteaseinhibitor Cocktail“, Cell Signaling, Frankfurt a.M.) und Phosphataseinhibitoren („PhosStop“, Roche, Mannheim) laut Herstellerangaben zugefügt.

2.8.2 Auftrennung der Cytosol- und Kernproteine

Sollte bei der Proteinisolation aus Zellen eine Auftrennung von Cytosol- und Kernproteinen erfolgen, wurden die Zellen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Aufarbeitung eine Konfluenz von 70-80% aufwiesen. Für die Auftrennung wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen, anschließend trypsiniert und im Kulturmedium aufgenommen, bevor sie für 5 min bei $100\times g$ pelletiert wurden. Danach wurden die Zellen erneut mit kaltem PBS gewaschen und für 10 min bei $200\times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in Puffer A resuspendiert (ca. 150 μl für 4×10^6 Zellen) und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 0,5% NP-40 zugefügt, dieser kräftig gevortext und für 1 min bei $750\times g$ und $4^{\circ}C$ zentrifugiert. Der Überstand, der die Cytosolfraktion enthält, wurde in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet wurde in kaltem Puffer B resuspendiert (ca. 150 μl für 4×10^6 Zellen) und für 30 min bei $4^{\circ}C$ inkubiert. Zur Trennung der Kernproteine von den Membranproteinen wurde der Ansatz abschließend für 5 min bei $5000\times g$ zentrifugiert und der Überstand in ein

neues Gefäß überführt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte wie in 2.8.3 beschrieben.

Puffer A:	Hepes-KOH pH7,9	100 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	KCl	10 mM
Puffer B:	Hepes-KOH pH7,9	20 mM
	NaCl	420 mM
	MgCl ₂	15 mM
	EDTA/NaOH	0,2 mM
	Glycerol	25% (v/v)
	NP-40	1% (v/v)
	Natriumdesoxycholat	0,5% (v/v)

Vor Gebrauch der Puffer wurde diesen frisch DTT (0,5 mM), PMSF sowie Phosphatase- und Proteaseinhibitoren zugefügt.

2.8.3 Messung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen in einem Zelllysat wurden mit Hilfe des „BCA Pierce Protein Assay Kit“ (Thermo Scientific, Bonn) nach Herstellerangaben quantifiziert. Dieses Kit basiert auf der kolorimetrischen Detektion von Cu¹⁺-Ionen durch Bicinchoninsäure (BCA), die zusammen einen Komplex violetter Farbe bilden. Cu¹⁺-Ionen entstehen in einem alkalischen Milieu durch die Reduktion von Cu²⁺-Ionen durch Proteine.

2.8.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zum Nachweis von Proteinen in Zelllysaten mittels Western Blot (s. 2.8.5) wurden diese zunächst mittels SDS-PAGE (Laemmli 1970) der Größe nach aufgetrennt. Bei dieser Methode durchlaufen Proteine zwei hintereinander liegende Polyacrylamidgele, die an ein elektrisches Feld angeschlossen sind. Im Sammelgel, das einen neutralen pH-Wert aufweist, kommt es zunächst zu einer Fokussierung der Proteine, die im folgenden Trenngel mit basischem pH-Wert aufgetrennt werden. Um die Auftrennung im elektrischen Feld zu ermöglichen, wird das Proteinlysat vor dem Auftragen auf das Gel mit dem anionischen

Tensid SDS versetzt, welches an alle Proteine, proportional zu ihrer Größe, negative Ladungen anbringt.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurde zunächst ein Trenngel gegossen über das nach dem vollständigen Aushärten das Sammelgel geschichtet wurde. Vor dem Auftragen der Proteinlysate wurden diese mit 4× Probenpuffer „Roti-Load 1“ (Roth, Karlsruhe) versetzt und anschließend zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Minigel-Elektrophoresekammer (Biometra, Göttingen) unter Verwendung eines TRIS-Glycin-Laufpuffers. Die Fokussierung der Proteine im Sammelgel erfolgte für ca. 30 min bei 90 V, die anschließende Auftrennung im Trenngel für ca. 90 min bei 130 V. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ein Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen („Precision Dual Color Protein Standard“, Biorad, München).

5% Sammelgel:	Tris + 2% SDS (1,5 M; pH 6,8)	630 µl
	Acrylamid/Bisacrylamid 30%	830 µl
	APS (10% w/v)	50 µl
	TEMED	5 µl
	H ₂ O (bidest.)	3,45 ml
10% Trenngel:	Tris + 2% SDS (1,5 M; pH 8,8)	5 ml
	Acrylamid/Bisacrylamid 30%	6,7 ml
	APS (10% w/v)	200 µl
	TEMED	20µl
	H ₂ O (bidest.)	7,9 ml
1× Elektrophoresepuffer:	Tris	3 g
	Glycin	14,4 g
	SDS	1 g
	H ₂ O (bidest.)	ad 1 l

2.8.5 Western Blot

Der Western Blot dient dazu, Proteine aus einem Gel auf eine Trägermembran zu übertragen und diese anschließend mit Hilfe von Antikörpern nachzuweisen. Als Trägermembran können

dabei unterschiedliche Materialien dienen, häufige Anwendung finden jedoch Nitrocellulosemembranen (Towbin et al 1979).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Western Blot in Form des Semi-Dry-Blots durchgeführt. Dabei wurde die Nitrocellulosemembran „Hybond-C Extra“ (Amersham Biosciences, Freiburg) für 5 min in Transferpuffer äquilibriert, bevor sie auf drei „GB33Whatman-Papier B003“ (Heinemann Labortechnik, Duderstadt), die ebenfalls mit Transferpuffer getränkt waren, gelegt wurde. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel, das für die SDS-PAGE verwendet wurde (s. 2.8.4), kurz mit Transferpuffer gewaschen und auf der Nitrocellulosemembran platziert. Abschließend wurden drei weitere, mit Transferpuffer getränkte „GB33 Whatman-FilterB003“, auf das Gel gelegt, die Blotkammer (Biometra, Göttingen) geschlossen und der Proteintransfer bei 10 V für 75 min durchgeführt. Zur Überprüfung eines erfolgreichen Transfers wurde die Nitrocellulosemembran im Anschluss mit Ponceau S-Lösung (Omnilab-Krannich, Göttingen) gefärbt, die unspezifisch alle Proteine anfärbt.

Zum Nachweis eines Proteins wurde die Nitrocellulosemembran nach Abschluss des Proteintransfers mit einem für das Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzublocken, wurde diese dafür zunächst für 1 h in Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper nach Herstellerangaben in Blocklösung verdünnt und über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit TBS + 0,1% Tween gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur erfolgte. Die Sekundärantikörper, die verwendet wurden, waren mit der Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) konjugiert, welche zur Sichtbarmachung der Proteine dient. Nach erfolgter Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran erneut dreimal 5 min mit TBS + 0,1% Tween gewaschen. Zur Visualisierung des gesuchten Proteins wurde die Membran abschließend für 5 min mit dem Detektionsreagenz „ECL Plus“ (GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben inkubiert. Bei dieser Reaktion wird das Substrat der Arbeitslösung durch die HRP umgesetzt, wobei ein lichtemittierendes Präzipitat gebildet wird, das sich um den Antigen-Antikörper Komplex ablagert. Dieses Präzipitat wurde mit Hilfe des „LAS 4000 Imager“ (Fujifilm/GE Healthcare, Freiburg) sichtbar gemacht.

Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen sind in Tab. 2.3 aufgeführt.

Blocklösung:	Tris	2,4 g		TBS
	NaCl	8 g		
	H ₂ O (bidest.) pH 7,6	ad 1 l		
	Tween	0,1% (v/v)		
	BSA	5% (w/v)		

2.8.6 Immunopräzipitation (IP)

Die Immunopräzipitation (IP) ist eine Methode, mit deren Hilfe man ein bestimmtes Protein aus einem Zelllysate isolieren kann. Dabei wird das Lysat mit einem spezifischen Antikörper inkubiert, anschließend wird der Antigen-Antikörper Komplex an einer Matrix immobilisiert, das restliche Lysat abgewaschen und im Anschluss von der Matrix eluiert. Abschließend kann der Antigen-Antikörper Komplex mittels SDS-PAGE (s. 2.8.4) und Western Blot (s. 2.8.5) identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IP zur Identifizierung von Protein-Protein Interaktionen eingesetzt (CoIP). Es sollte untersucht werden, ob in MCF-7 Zellen eine Interaktion zwischen LEF1 und β -Catenin nachzuweisen ist, nachdem die Zellen stabil mit einem LEF1 überexprimierenden Konstrukt transfiziert wurden (s.2.9.4). Für die CoIP wurden 3×10^6 Zellen in einer 10 cm Petrischale für adhärente Zellen (Nunc, Langensfeld) ausgesät und über Nacht inkubiert. Zur Lyse der Zellen wurden diese einmal mit kaltem PBS gewaschen, mit 400 μ l CoIP Lysepuffer versetzt, 5 min auf Eis inkubiert, in ein neues Gefäß überführt, bei $12.000 \times g$ und $4^\circ C$ für 5 min zentrifugiert und der Überstand erneut in ein frisches Gefäß überführt.

Für die IP von LEF1 wurden 400 μ l des Lysats mit 30 μ l HA-Agarose-*beads* (50% *slurry*) (Thermo Scientific, Bonn) versetzt und über Nacht bei $4^\circ C$ inkubiert. Anschließend wurden die *beads* bei $12.000 \times g$ und $4^\circ C$ für 10 sec pelletiert. Der Überstand wurde bei $-20^\circ C$ gelagert (1. Waschschrift). Anschließend wurden die *beads* dreimal mit TBS + 0,01% Tween gewaschen, wobei die Zentrifugation jedes Mal bei $12.000 \times g$ und $4^\circ C$ für 10 sec erfolgte. Auch der letzte Überstand wurde bei $-20^\circ C$ gelagert (3. Waschschrift). Abschließend wurden die *beads* mit 3 M NaSCN-Lösung versetzt, um den Proteinkomplex zu eluieren. Die *beads* wurden erneut durch Zentrifugation pelletiert, bevor das Eluat bei $-20^\circ C$ gelagert wurde.

Für die IP von β -Catenin wurden 400 μ l Zelllysate mit einem Antikörper gegen β -Catenin versetzt (s. Tab. 2.3) und über Nacht bei $4^\circ C$ inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz zur

Immobilisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes 30 μ l Protein G-Sepharose (50% *slurry*) (Thermo Scientific, Bonn) zugefügt und erneut für 2 h bei 4°C inkubiert. Bevor der Antigen-Antikörper Komplex eluiert wurde, wurde die Sepharose ebenfalls wie oben beschrieben gewaschen, wobei jedoch der CoIP Lysepuffer verwendet wurde. Zum Eluieren des Proteinkomplexes wurde die Protein G Sepharose mit 2 \times Ladepuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt und 5 min bei 95°C aufgekocht. Abschließend wurde die Sepharose durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand, der die Proteinkomplexe enthält, in ein neues Gefäß überführt.

Zum Nachweis der Proteine, die durch die CoIP isoliert werden konnten, wurde eine SDS-PAGE (s. 2.8.4) mit anschließendem Western Blot (s. 2.8.5) durchgeführt.

CoIP Puffer: NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Tris-HCl pH 7,5	50 mM
Natriumdeoxycholat	0,5% (w/v)
Triton X-100	1% (v/v)

2.9 Zellbiologische Methoden

2.9.1 Isolation von humanen Makrophagen aus dem Blut

Humane Makrophagen wurden aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts mit einer Methode isoliert, wie sie von (Seager Danciger et al 2004) beschrieben wurde. Hierbei wird ein *buffy coat*, der aus Leukozyten und Thrombozyten besteht und ca. 1% einer Vollblutprobe ausmacht, über zwei Dichtegradienten aufgereinigt, wobei es zu einer Isolation der monozytären Zellen kommt. Die *buffy coats* gesunder Blutspender wurden über die Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Göttingen bezogen.

Im ersten Schritt wurde der *buffy coat* in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS + 1 mM EDTA versetzt, bevor 33 ml dieser Suspension auf 15 ml Ficoll/Biocoll-Lösung (Biochrom, Berlin) geschichtet wurden. Durch die anschließenden Zentrifugation bei 400 \times g für 30 min ohne Bremse bildet sich eine weiße Interphase, die im folgenden Schritt abgenommen wurde und erneut in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS + 1 mM EDTA versetzt und gevortext wurde. Zur Depletion der Thrombozyten wurde die Lösung bei 300 \times g für 10 min zentrifugiert, das Pellet erneut mit dem gleichen Volumen PBS + 1 mM EDTA gewaschen und bei 300 \times g für 10 min

zentrifugiert. Im Folgenden wurden alle Pellets eines *buffy coats* vereinigt, in 20 ml RPMI 1640 ohne Phenolrot aufgenommen und über 25 ml einer 46% iso-osmotischen Percoll-Lösung geschichtet. Nach einer Zentrifugation bei 550×g für 30 min ohne Bremse wurde die Interphase in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS + 1 mM EDTA versetzt und erneut bei 400×g für 10 min zentrifugiert. Die Pellets, d. h. die monozytären Zellen, wurden abschließend in 20 ml RPMI 1640 + 10% FKS vereinigt. 30-50×10⁶ Monozyten wurden in Zellkulturbeuteln „VueLife Cell Culture Bags“ (CellGenix, Freiburg) nach Zusatz von 2,5 ng/ml rhM-CSF (Immuno Tools, Friesoythe) ausgesät, in denen die Zellen für sieben Tage bei 37°C und 5% CO₂ zu Makrophagen ausreifen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte anschließend in RPMI 1640 Medium + 1% FKS.

46% iso-osmotische Percoll-Lösung:

- | | |
|--------------------------------------|----------|
| a) Percoll (GE Healthcare, Freiburg) | 46,26 ml |
| 10× PBS | 3,74 |
| b) Percoll-Lsg. von a) | 46 ml |
| RPMI 1640 + 10% FCS | 54 ml |

2.9.2 Isolation von Knochenmarksmakrophagen aus der Maus

Die Isolation der Knochenmarksmakrophagen (BMDM, *bone marrow-derived macrophages*) aus der Maus erfolgte, mit leichten Veränderungen, nach einer Methode, die von (Reiling et al 2001) beschrieben wurde.

Zur Isolation der BMDM wurden NMRI-Mäuse verwendet, die 8-12 Wochen alt waren. Aus diesen Mäusen wurden die Femora präpariert und von anhaftenden Geweberesten befreit. Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Insulinkanüle Gr.17 (Braun, Melsungen) das Knochenmark mit 10 ml Differenzierungsmedium ausgespült und über Nacht in einer 10 cm Zellkultur-Petrischale (Nunc, Langenselbold) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium in ein neues Gefäß überführt, wobei die BMDM von den restlichen Zellen des Knochenmarks getrennt wurden, die über Nacht am Boden der beschichteten Petrischale adhärirt waren. Das Medium wurde bei 2000×g für 10 min zentrifugiert, das Pellet anschließend in 40 ml Differenzierungsmedium aufgenommen und die Zellsuspension in vier unbeschichteten 10 cm Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät. Die Zellen wurden anschließend für sechs Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, wobei nach drei Tagen ein Mediumwechsel erfolgte. Zur Vorbereitung der Versuche wurden

die Zellen mit Accutase-Lösung (Sigma-Aldrich, München) von den Petrischalen gelöst und in Kulturmedium aufgenommen.

Differenzierungsmedium: DMEM

FKS	10%
NHS (Gibco, Darmstadt)	5%
L929 konditioniertes Medium	30%
L-Glutamin	2 mM
Natriumpyruvat	0,01 mM
β -Mercaptoethanol	0,05 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 mg/ml

Kulturmedium:

DMEM	
FKS	10%
L929 konditioniertes Medium	15%

L929 ist eine murine Fibroblasten-Zelllinie, die den Wachstumsfaktor CSF-1 in das Kulturmedium sezerniert. Konditioniertes Medium dieser Zelllinie, das als Bezugsquelle für CSF-1 dient, wurde wie folgt hergestellt (Pfannes et al 2001). 10×10^6 Zellen wurden in 100 ml DMEM ausgesät und für sieben Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor das Medium bei 2000×g zentrifugiert, mit einem „0,22 µM Steritop-Filter“ (Millipore, Darmstadt) sterilfiltriert und bei -20°C gelagert wurde.

2.9.3 Isolation von Mikroglia-Zellen aus der Maus

Primäre Mikroglia-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe um U.-K. Hanisch aus der Neuropathologie (Universitätsmedizin Göttingen) zur Verfügung gestellt. Die Isolation erfolgte nach dem folgenden Protokoll (Giulian and Baker 1986, Regen et al 2011).

Aus Neugeborenen (P0) NMRI Mäusen wurde das Hirn präpariert und von der Hirnhaut sowie von Blutgefäßen befreit. Zur Auflösung des Gewebes wurden beide Hemisphären in 2,5% Trypsin-EDTA (Biochrom, Berlin) bei 37°C für 10 min geschüttelt. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 0,4 mg/ml DNase (Cell Systems, Troisdorf) zugefügt und für weiter 5 min inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation für 10 min bei 4°C wurden die Zellen im

Kulturmedium resuspendiert und für 10-14 Tage in Zellkulturflaschen, die mit 200 µg/ml Poly-L-Lysin (Sigma, München) beschichtet waren, bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, wobei täglich ein Mediumwechsel erfolgte. Zur Ernte der Mikroglia wurden die Zellen von den Astrozyten durch Schütteln isoliert. Diese Methode basiert auf einem unterschiedlichen Adhäsionsverhalten von Mikroglia und Astrozyten.

2.9.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen wurde mit Hilfe des „Nanofectin Kit“ (PAA, Cölbe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei dieser Methode wird DNA in Nanopartikeln aufgenommen, die in der Lage sind, sowohl die Zellmembran zu passieren als auch in den Zellkern einzudringen.

Dieses Kit wurde sowohl für transiente als auch für stabile Transfektionen eingesetzt, wobei grundsätzlich das DNA/Nanofectin-Verhältnis 3 verwendet wurde. Zellen, die transient transfiziert wurden, wurden 24-48 h nach Transfektion für die folgenden Versuche eingesetzt. Erfolgte eine stabile Transfektion von Zellen, wurde dem Kulturmedium 24 h nach Transfektion das Selektionsantibiotikum G418 (Roche, Mannheim) zugefügt.

2.9.5 Messung der Viabilität und Proliferation eukaryotischer Zellen

2.9.5.1 MTT-Assay

Zur Messung der Viabilität eukaryotischer Zellen wurde der MTT-Test verwendet (Mosmann 1983). Bei diesem Test wird der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch Reduktion in ein blau-violettes Formazan umgesetzt. Diese Reduktion erfolgt nur in Zellen mit einem aktiven Stoffwechsel.

Für diesen Test wurden Zellen in einem 24-well ausgesät und mit der zu testenden Substanz behandelt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit wurde den Zellen 500 µl Kulturmedium + 10% MTT (5mg/ml) zugefügt und dieser Ansatz für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 500 µl 5% Ameisensäure + 63% Isopropanol + 32% DMSO lysiert. Abschließend wurde der Gehalt des umgesetzten Substrats mit dem Plattenphotometer „Sunrise“ (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 540 nm gemessen. Wurde der MTT-Test auf Gewebeschnitten durchgeführt, erfolgte die Inkubation mit Kulturmedium + 10% MTT über Nacht. Ebenso wurde die Inkubationszeit zur Lyse auf 1 h verlängert.

2.9.5.2 Proliferationsmessung mittels xCELLigence

Das „xCELLigence RTCA DP-System“ (Roche, Mannheim) ermöglicht die kontinuierliche Messung der Zellproliferation und Zellmorphologie in Echtzeit. Dabei werden Zellen auf Gold beschichteten Platten ausgesät. Dies ermöglicht die Messung der Impedanz, die sich je nach Zellzahl oder Zellmorphologie verändert. Eine steigende Zellzahl z.B. führt zu einer steigenden Impedanz.

Je nach Zelllinie wurden die Zellen in einer Dichte von $1 \times 10^4 - 8 \times 10^5$ Zellen pro *well* (E Plate 16; Roche, Mannheim) ausgesät und die Messung für 72 h durchgeführt.

2.9.5.3 Proliferationsmessung mittels Celigo-Zytometrie

Die Sensitivität von Zellen gegenüber Chemotherapie wurde mittels des Celigo-Zytometers (Cyntellect, Newport, UK), das uns von Prof. Dr. Dobbstein (Molekulare Onkologie, Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde, analysiert. Dieses Zytometer misst die Zellproliferation, basierend auf einer Hellfeldaufnahme einer Zellkultur und der anschließenden Ermittlung der Zellzahl dieser Kultur bzw. deren Konfluenz.

Für diese Proliferationsmessung wurden 3×10^3 Zellen in einem 96-*well* (Corning, Amsterdam, Niederlande) ausgesät, für ca. 2 h inkubiert und anschließend die erste Konfluenzmessung durchgeführt, die alle 24 h wiederholt wurde. Nach einer Inkubation von insgesamt 96 h wurde der Versuch beendet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Nach 24 h erfolgte die Behandlung mit dem zu untersuchenden Chemoreagenz für 24 h im Fall von Doxorubicin, Cisplatin und Cycloheximid bzw. für die gesamte Versuchsdauer im Fall von Tamoxifen.

2.9.5.4 Proliferationsmessung mittels PKH26 und FACS-Messung

Eine weitere Methode, die zur Messung der Zellproliferation durchgeführt wurde, basiert auf der Färbung einer Zellkultur mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26 (Sigma-Aldrich, München). Da sich die Intensität dieses Farbstoffes nach jeder Zellteilung halbiert, lässt sich durch die Messung der Fluoreszenzintensität mittels FACS unter Berücksichtigung der verstrichenen Zeit die Anzahl der Zellteilungen, die eine Zellpopulation durchlaufen hat, ermitteln.

Für diese Proliferationsmessung wurden MCF-7 Zellen wie in 2.9.6 beschrieben mit PKH26 gefärbt und anschließend für 0 h, 48 h bzw. 96 h inkubiert. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurden die Zellen trypsiniert, in PBS aufgenommen und die

Fluoreszenzintensität mit Hilfe des „FACS CantoII Flow Cytometer“ (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Die Anzahl der Zellteilungen nach 48 h bzw. 96 h wurde anschließend mit der folgenden Formel berechnet (Lagadec et al 2010):

$$D = \log_2 \frac{F_0}{F_t}$$

mit: D = Anzahl der Zellteilungen

F_0 = mittlere Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0 h

F_t = mittlere Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 48 h bzw. 96 h

2.9.5.5 Colony Formation Assay

Das Wachstum von Zellen nach einer Behandlung mit Röntgenstrahlen wurde mit Hilfe eines *Colony Formation Assays* analysiert. Die Durchführung dieser Experimente erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Dr. M. Grade (Allgemein- und Viszeralchirurgie, Göttingen) (Kendziorra et al 2011).

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einem *6-well* ausgesät und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden sie mit einer einmaligen Dosis von 1, 2, 4, 6 bzw. 8 Gy bestrahlt. Die folgende Inkubation erfolgte so lange, bis die meisten Kolonien eine Größe von ca. 50 Zellen aufwiesen. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen mit 70% EtOH fixiert, an der Luft getrocknet und mit Hämalaun gefärbt, bevor die Kolonien gezählt wurden. Abschließend wurde die Überlebensrate der Zellen mit der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Überlebensrate} = \text{Kolonienzahl} \div \text{ausgesäte Zellzahl} \div \text{plating efficiency}$$

2.9.5.6 Soft Agar Colony Formation Assay

Der *Soft Agar Colony Formation Assay* dient der Analyse des „*anchorage-independent growth*“. Die Fähigkeit von Zellen, in einem semi-soliden Medium Kolonien auszubilden, ist ein Charakteristikum für transformierte Zellen. Nicht transformierte Zellen sind in der Regel abhängig von der Anheftung an eine feste Oberfläche und gehen daher in einer 3D-Kultur in einen Ruhezustand über und bilden keine Kolonien. Bildet eine Zelle viele und große Kolonien in einer 3D-Kultur, deutet dies darauf hin, dass sie einen aggressiven Phänotyp aufweist.

Für den *Soft Agar Colony Formation Assay* werden Zellen in einem semi-soliden Kulturmedium, bestehend aus zwei Schichten, eingebettet und ihr Wachstum für eine bestimmte Zeit verfolgt. Zur Präparation der unteren Mediumschicht wurde RPMI 1640

Medium + 10% FKS mit 0,6% aufgekochter Agarose versetzt und 2 ml dieser Lösung in ein 6-well gegeben. Zum Aushärten der Agarose wurde die Platte für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für die obere Mediumschicht RPMI 1640 + 10% FKS mit 0,33% aufgekochter Agarose versetzt. In diesem Medium wurden die zu untersuchenden Zellen aufgenommen und 2×10^4 Zellen in einem Volumen von 1,5 ml auf die untere Mediumschicht gegeben. Die Aushärtung der Agarose erfolgte erneut bei Raumtemperatur für mindestens 30 min. Die Inkubationsdauer dieser 3D-Kultur betrug 30 Tage, wobei alle 3-4 Tage 200 μ l RPMI 1640 + 10% FKS auf die obere Mediumschicht gegeben wurde. Das Koloniewachstum wurde durch Hellfeldaufnahmen unter Verwendung des Mikroskops „Axiovert 200 M“ (Zeiss, Göttingen) dokumentiert und mit Hilfe der Software „Axiovision Rel. 4.6.3“ (Zeiss, Göttingen) ausgewertet.

2.9.6 Färbung eukaryotischer Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Zur Markierung eukaryotischer Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde das „PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit“ bzw. das „PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit“ (Sigma-Aldrich, München) verwendet, durch welches der Fluoreszenzfarbstoff in die Lipidmembran von Zellen eingelagert wird.

Für die Färbung wurden 1×10^6 Zellen einmal mit Serum-freiem Medium gewaschen und bei $500 \times g$ für 5 min pelletiert. Nachdem 1 μ l PKH26 bzw. PKH67 in 125 μ l Diluent C verdünnt wurden, wurde das Zellpellet in 120 μ l dieser Lösung aufgenommen und für 3-5 min vorsichtig resuspendiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden dem Ansatz zunächst 120 μ l FKS und anschließend 240 μ l Serum-freies Medium zugefügt. Abschließend wurden die Zellen ein weiteres Mal in Serum-freiem Medium gewaschen, bevor sie im Kulturmedium aufgenommen wurden und für folgende Versuche eingesetzt wurden.

2.9.7 Nachweis von Metalloproteasen mittels Zymographie

Der Nachweis der Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 beruht auf deren Fähigkeit Gelatine abzubauen. Diese wird in ein SDS-Polyacrylamidgel eingegossen, über das eine Auftrennung der Proteine erfolgt. Im Anschluss an die Auftrennung folgt ein Inkubationsschritt, in dem die Metalloproteasen die Gelatine abbauen. Dieser Abbau kann dann durch die Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliant-Blue sichtbar gemacht werden (Hagemann et al 2004).

Für die Zymographie wurden Proteine aus Zellkulturüberständen wie unter 2.8.1, 2.8.3 und 2.8.4 beschrieben durch SDS-PAGE aufgetrennt. Da die Proteine unter nativen Bedingungen

aufgetrennt wurden, wurde jedoch ein Ladepuffer verwendet, der kein β -Mercaptoethanol enthielt. Auch die Denaturierung der Proteine durch ein Erhitzen auf 95°C für 5 min wurde nicht durchgeführt. Außerdem wurde das Trenngel mit 1 mg/ml Gelatine versetzt.

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel für 30 min in H₂O (bidest.) + 2,5% (v/v) Triton X-100 inkubiert, anschließend dreimal mit H₂O (bidest.) gewaschen und in Entwicklungspuffer überführt. Der Entwicklungspuffer wurde nach 30 min einmal ausgetauscht, bevor das Gel für 24 h bei 37°C inkubiert wurde. Zum Nachweis des Abbaus der Gelatine, wurden Färbelösung und Entfärbelösung in einem Verhältnis von 1:9 gemischt und für 3-4 h auf das Gel gegeben. War die Färbung zu kräftig, wurde das Gel in Entfärbelösung inkubiert, bis der Gelatine-Abbau deutlich zu erkennen war. Anschließend wurde das Gel 15 min in Fixierlösung inkubiert und dann getrocknet.

5× Ladepuffer:	Bromphenolblau	0,03% (w/v)
	Tris-HCl	0,4 M
	Glycerol	20% (v/v)
	SDS	5% (w/v)
Entwicklungspuffer:	Tris-Base	50 mM
	NaCl	200 mM
	CaCl ₂	5 mM
	pH 7,5	
	Brij-35	0,02% (v/v)
Färbelösung:	Coomassie-Brilliant-Blue	0,5% (w/v)
	Methanol	30% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
Entfärbelösung:	Methanol	30% (v/v)
	Essigsäure	10% (v/v)
Fixierlösung:	Methanol	30% (v/v)
	Glycerol	5% (v/v)

2.9.8 Zellzyklusanalysen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellzyklusanalysen basieren auf der Messung des DNA-Gehalts einer Zelle, der für jede Phase des Zellzyklus spezifisch ist. Bei dieser Methode wird die DNA mit dem Farbstoff Propidium Iodid angefärbt und die Intensität der Färbung pro Zelle anschließend mit Hilfe eines FACS gemessen.

Zu Beginn der Analysen wurden Kulturen von MCF-7 Zellen synchronisiert, d.h. alle Zellen wurden in der gleichen Zellzyklusphase arretiert. Die Synchronisation wurde durchgeführt, indem die Zellen für 24 h in Serum-freiem Medium inkubiert wurden. Diese Behandlung führt zu einem Wachstumsarrest in der G1-Phase. Anschließend wurden die Zellen in Medium mit 10% FCS überführt und nach 0 h, 24 h, 32 h und 48 h geerntet. Bei der Ernte der Zellen wurden diese einmal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und bei 500×g pelletiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen fixiert, indem das Pellet in kaltem 70% EtOH resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert wurde. Nach einem erneuten Pelletieren der Zellen wurden sie in 500 µl PI-Lösung aufgenommen und zur vollständigen Färbung der DNA für 40 min bei 37°C inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Zellen erneut pelletiert und in 500 µl PBS aufgenommen bevor sie zur Messung der PI-Färbung in FACS-Röhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) überführt wurden. Die Messung wurde mit einem „FACS CantoII Flow Cytometer“ (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt und die Auswertung erfolgte mit der Software „BD FACS Diva“ (Becton Dickinson, Heidelberg). Pro Messung wurden 20.000 Ereignisse aufgenommen.

PI-Lösung:	Propidium Iodid (Mobictec, Göttingen)	50 µg/ml
	Triton X-100	0,05% (v/v)
	PBS	

2.9.9 Nachweis von Nitrit in Zellkulturüberständen

Aktiviert Makrophagen setzen Stickstoffmonoxid (NO) frei, welches schnell zu Nitrit (NO₂) abgebaut wird. Der Nitritgehalt in einem Zellkulturüberstand kann anschließend mit Hilfe des Griess-Reagenz nachgewiesen werden, das in Anwesenheit von Nitrit einen rosa-farbigen Komplex bildet.

Für den Griess-Test wurden Makrophagen mit der zu testenden Substanz stimuliert und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und bei 15.000×g für 1 min zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden mit 100 µl Griess-Reagenz (Merck, Darmstadt)

versetzt und für einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Konzentration des Nitrits bestimmen zu können, wurde eine Standardreihe mit Na-Nitrit in einem Bereich von 0-80 μM angefertigt. Die Menge des umgesetzten Griess-Reagenz wurde in einem Plattenphotometer („Sunrise“, Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 550 nm gemessen.

2.9.10 TOP/FOPflash Reporter-Assay

Der TOP/FOPflash Reporter-Assay wurde zum Nachweis eines aktiven kanonischen WNT-Signalwegs eingesetzt. Er basiert auf der Transfektion von eukaryotischen Zellen mit dem Plasmid pTOPFLASH bzw. pFOPFLASH. Beide Plasmide enthalten ein *firefly* Luciferasegen unter der Kontrolle des minimalen *c-Fos* Promotors. Im Plasmid pTOPFLASH enthält der Promotor drei Kopien des optimalen TCF-Bindemotivs, wodurch eine Expression des Luciferasegens in Anwesenheit eines aktiven kanonischen WNT-Signalwegs ermöglicht wird. Das Plasmid pFOPFLASH kodiert in der Promotorregion drei Kopien eines mutierten TCF-Bindemotivs (Korinek et al 1997). Diese Mutation führt dazu, dass auch in Anwesenheit eines aktiven kanonischen WNT-Signalwegs keine Luciferase exprimiert wird. Dieses Plasmid wird daher für diesen Assay als Negativkontrolle eingesetzt.

Für den Assay wurden 1×10^5 Zellen in einem 24-well ausgesät, über Nacht inkubiert und anschließend mittels Nanofectin (s. 2.9.4) mit dem Plasmid pTOPFLASH bzw. pFOPFLASH transfiziert. Um auszuschließen, dass Schwankungen in der Luciferaseaktivität auf eine unterschiedliche Transfektionseffizienz zurückzuführen sind, erfolgte eine Ko-Transfektion mit dem Plasmid pRL-TK, das eine Renilla Luciferase kodiert. 24 h nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen mit 50 μl „1 \times Passiv Lysis Buffer“ (Promega, Mannheim) für 30 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden 40 μl des Lysats in ein 96-well überführt und die Luciferaseaktivität mit Hilfe des „TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader“ (Berthold Technologies, Bad Wildbad) gemessen. Die Messung erfolgte dabei nach dem dualen Luciferase Assay (Hampf and Gossen 2006). Dabei wird im ersten Schritt die *firefly* Luciferaseaktivität unter Verwendung der P/Rluc-A Lösung gemessen. Im zweiten Schritt wird unter Verwendung der P/Rluc-B Lösung die *firefly* Luciferase inhibiert und die Renilla Luciferaseaktivität gemessen.

P/Rluc-A Lösung:	MgSO ₄	15 mM
	EDTA	0,1 mM
	Dithiothreitol (DTT)	25 mM
	ATP	1 mM

	Coenzym A	200 μ M	(AppliChem, Darmstadt)
	Luciferin	200 μ M	(SYNCHEM, Felsberg)
	Tris-HCl	200 mM	
	pH 8		
P/Rluc-B Lösung:	Natriumacetat	10 mM	
	EDTA	15 mM	
	NaCl	500 mM	
	Phenylbenzothiazol (APMBT)	50 μ M	(AppliChem, Darmstadt)
	Benzylcoelenterazin	4 μ M	(SYNCHEM, Felsberg)
	Na ₂ SO ₄	500 mM	
	Na ₄ PP _i	25 mM	
	pH 5		
Programmeinstellungen:	100 μ l P/Rluc-A Lösung		
	0,5 sec Inkubation		
	10 sec <i>firefly</i> Luciferasemessung		
	75 μ l P/Rluc-B Lösung		
	0,5 sec Inkubation		
	10 sec Renilla Luciferasemessung		

2.10 Invasions- und Migrations-Assays

2.10.1 Boyden-Kammer Experimente

Zur Untersuchung der Invasivität von Tumorzellen unter unterschiedlichen Bedingungen wurden modifizierte Boyden-Kammer Assays durchgeführt (Hagemann et al 2004). Bei diesem Assay wird die Anzahl an Tumorzellen gemessen, die in der Lage waren, durch eine künstliche Basalmembran zu wandern.

Vor dem Zusammenbau der Boyden-Kammer, die aus einem oberen und einem unteren *well* besteht, wurde eine Polycarbonatmembran mit 10 μ m Porendurchmesser (Nucleopore, Pleasanton, USA) mit Matrigel (ECM, *extra cellular matrix*; R&D Systems, Wiesbaden-

Nordenstadt) beschichtet. Das ECM wurde dabei zuvor 1:3 mit Serum-freiem Medium verdünnt. Anschließend wurden die unteren *wells* mit Kulturmedium befüllt, die beschichtete Membran auf den unteren Teil der Boyden-Kammer gelegt und der obere Teil fest darauf verschraubt. Danach wurden in den oberen *wells* der Kammer 1×10^5 Tumorzellen ausgesät. Sollte die Invasivität der Tumorzellen in einer Ko-Kultur mit Makrophagen bestimmt werden, ließ man die Tumorzellen für mindestens 1 h adhären, bevor man die Makrophagen zufügte. Für die Ko-Kultur wurden 2×10^5 Makrophagen in einem Zellkultur-*insert* (Millipore, Darmstadt) ausgesät, das anschließend in das *well* mit den Tumorzellen gestellt wurde. Anschließend wurde die Boyden-Kammer für 96 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor die Zellzahl im unteren *well* bestimmt wurde.

2.10.2 ECM-basierte Migrationsexperimente

Die ECM-basierten Migrationsexperimente wurden wie in (Pukrop et al 2010) beschrieben durchgeführt. Tumorzellen wurden auf runden Deckgläschen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90% bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden sie mit der Oberseite nach unten in ein 6-*well* überführt, das zuvor mit ECM (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) beschichtet worden war. Für die Beschichtung wurde das ECM 1:4 mit Serum-freiem Medium verdünnt, 100 µl dieser Lösung gleichmäßig auf dem Boden des 6-*wells* verteilt und zum Aushärten einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem das Deckgläschen im 6-*well* platziert war, wurde der Ansatz bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bis eine deutliche Front von auswandernden Zellen zu erkennen war. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Messung gestartet (0 h). Die Messung wurde als Endpunktmessung durchgeführt. Hierfür wurde sowohl nach Start der Messung (0 h), also auch nach 48 h, eine Hellfeldaufnahme der auswandernden Zellen unter Verwendung des Mikroskops „Axiovert 200 M“ (Zeiss, Göttingen) angefertigt. Anschließend wurde entweder die zurück gelegte Strecke oder die Fläche der ausgewanderten Zellen mit Hilfe der Software „Axiovision Rel. 4.6.3“ (Zeiss, Göttingen) ermittelt. Unter Berücksichtigung der zurückgelegten Strecke in einer bestimmten Zeit konnte die Geschwindigkeit der migrierenden Zellen ermittelt werden.

2.10.3 Organotypische Hirnschnittkulturen

Die organotypische Hirnschnittkultur wurde verwendet, um die Invasion von Tumorzellen in das Hirngewebe zu untersuchen. Die Methode ermöglicht die Kultivierung von Tumorzellen in direktem Zell-Zell-Kontakt mit Zellen des Hirngewebes (Pukrop et al 2010).

2.10.3.1 Präparation von organotypischen Hirnschnitten und Anfertigung von Tumorplugs für die Ko-Kultur

NMRI Mäuse im Alter von P7-P10 wurden durch Enthauptung getötet. Anschließend wurde unter sterilen Bedingungen das Hirn präpariert, der olfaktorische Bulbus sowie das Stammhirn entfernt und in Präparationsmedium überführt. Das so gewonnene Gewebe wurde auf einem Probenteller mit Hilfe von Sekundenkleber (Renfert GmbH, Hilzingen) fixiert und auf drei Seiten mit 5% Agarblöcken fixiert. Im Anschluss wurden mit einem Vibratom („Leica VT1200S“; Leica, Wetzlar) horizontale Schnitte mit einer Dicke von 350 µm angefertigt, die in ein Zellkultur-*insert* (BD Falcon, Heidelberg) überführt wurden. Zur Kultivierung der Schnitte wurden die *inserts* in ein 6-well gestellt, das mit 1 ml Kulturmedium gefüllt war und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Präparationsmedium:	MEM	
	Glucose	4,5 mg/ml
	L-Glutamin	0,2 mM
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 mg/ml
Inkubationsmedium:	MEM	50%
	HBSS	25%
	NHS	25%
	Glucose	4,5 mg/ml
	L-Glutamin	0,2 mM
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 mg/ml

Sollte eine Ko-Kultur mit Tumorzellen erfolgen, wurden 24 h nach Präparation der Schnitte Tumorplugs angefertigt und diese neben den Schnitten platziert. Dazu wurden zunächst 4×10^4 Tumorzellen in 7 µl ECM (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) resuspendiert. Im Anschluss wurden 5 µl dieser Lösung in einem deutlichen Abstand neben dem Hirnschnitt aufgebracht und zum Aushärten der ECM für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dem vollständigen Aushärten der ECM wurde der Tumorplug direkt an den Rand des Hirngewebes

geschoben, ein Mediumwechsel durchgeführt und dieser Aufbau für 96 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 48 h Stunden wurde erneut ein Mediumwechsel vorgenommen.

Die Behandlung der Schnitte mit Zoledronat erfolgte an Tag 0 (Tag der Präparation), Tag 1 und Tag 3. Die Behandlung der Schnitte mit dem Antikörper gegen das murine CSF-1 (5A1) erfolgte an Tag 1 und Tag 3.

2.10.3.2 Färbung der Hirnschnitte mit Fluoreszenzfarbstoffen und Quantifizierung der Tumorzellinvasion

Die Quantifizierung von Tumorzellen, die in das Hirngewebe invadiert waren, erfolgte wie in (Pukrop et al 2010) beschrieben. Zunächst wurde der Hirnschnitt zusammen mit dem Tumorplug über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurde er für 15 min mit PBS + 0,2% Triton X-100 gewaschen und für 1 h mit PBS + 5% NGS (Sigma, München) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Im nächsten Schritt erfolgte eine Färbung der Mikroglia-Zellen mit einem Fluoreszenz markierten *Griffonia simplicifolia* Isolectin B4 (Alexa Fluor 568-ILB4; Invitrogen, Darmstadt). Hierzu wurde der Farbstoff 1:500 mit PBS verdünnt und 250 µl der Verdünnung für 1-2 h auf den Hirnschnitt gegeben. Nachdem der Schnitt dreimal mit PBS gewaschen wurde, erfolgte eine Kernfärbung, wobei der Schnitt für 5 min mit DAPI (1:1000 in PBS; Sigma, München) inkubiert wurde. Das Gewebe wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen, bevor es aus dem *insert* herausgeschnitten wurde, auf einem Objektträger platziert wurde und mit „DAKO Fluorescent Mounting Medium“ (DAKO, Hamburg) überschichtet wurde.

Zur Quantifizierung der invadierten Tumorzellen in das Hirngewebe wurde das Konfokalmikroskop „LSM 510“ (Zeiss, Göttingen) verwendet. Die Identifizierung der Tumorzellen war möglich, da diese entweder mit einem GFP exprimierenden Plasmid stabil transfiziert waren oder vor Anfertigung der Tumorplugs mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH67 gefärbt worden waren (s. 2.9.6). Im ersten Schritt wurde die Länge des Kontaktbereiches zwischen Hirngewebe und Tumorplug bestimmt. Anschließend wurde die Invasivität der Tumorzellen nach der folgenden Abstufung ermittelt: +++ = $\geq 50\%$ des gesamten Kontaktbereichs waren von Tumorzellen invadiert, ++ = 25-50% Invasion, + = 1-25% Invasion und 0 = keine oder nur einzelne Tumorzellen waren in das Gewebe invadiert.

2.11 Chorion-Allantois-Membran (CAM)-Assay

Der CAM-Assay im Hühnerei ist eine weit verbreitete Methode, um die Schleimhautverträglichkeit von Substanzen, aber auch das Wachstum und die Vaskularisierung von Tumorzellen zu untersuchen. Die Chorion-Allantois-Membran entwickelt sich nach der Befruchtung eines Hühnereies. Sie umgibt den Embryo und ist von Blutgefäßen durchzogen. Bei dem Assay werden die zu testende Substanz oder die Tumorzellen spätestens am zehnten Tag nach der Befruchtung des Eies auf die Membran gegeben und für eine gewünschte Zeit weiter inkubiert, bevor die Effekte der Substanz oder das Tumorstadium analysiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden SPF-Eier verwendet, die von Charles River (Sulzfeld) bezogen wurden. Die Inkubation der Eier erfolgte bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80%. Im ersten Schritt wurden die Eier am dritten Tag der Inkubation gefensternt, wodurch ein Zugang zur CAM ermöglicht wurde. Hierzu wurde das Ei zunächst im Bereich der Luftblase angesägt. Dies führt dazu, dass die Luft aus dem Ei entweicht und der Embryo sich absenkt und von der Schale löst. Anschließend wurde oberhalb des Embryos eine kleine Öffnung in die Schale gesägt. Bevor die Schale vom Ei abgehoben wurde, wurde sie von der darunter liegenden Eihaut gelöst, indem sie mit Locke-Lösung befeuchtet wurde. Nach dem Entfernen der Schale und der Eihaut wurde die Öffnung mit Leukosilk S (BSNmedicalGMBH, Hamburg) abgedeckt und das Ei für weitere sieben Tage inkubiert. Im zweiten Schritt wurden die zu untersuchenden Tumorzellen auf die CAM gegeben. Dazu wurden 3×10^6 Zellen in 40 µl ECM (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) resuspendiert und anschließend direkt auf die CAM gegeben. Die Öffnung wurde erneut mit Leukosilk S abgedeckt, bevor das Ei für weitere sieben Tage inkubiert wurde. Im letzten Schritt wurde die CAM zusammen mit dem Tumorgewebe aus dem Ei herausgeschnitten und fixiert. Hierfür wurde das Gewebe zunächst 15 min in 4% PFA inkubiert, bevor es dreimal 15 min mit PBS gewaschen wurde. Abschließend wurde das Gewebe für 1 h in 10% Succrose-Lösung und anschließend über Nacht in 30% Succrose-Lösung bei 4°C inkubiert. Bevor das Gewebe zur Anfertigung von Cryoschnitten in „Tissue Tek Einbettmedium“ (Weckert Labortechnik, Kitzingen) eingebettet wurde, erfolgte eine Dokumentation der Tumore mit einem Stereomikroskop.

Locke-Lösung:	NaCl (1,61 M)	100 ml
	KCl (0,16 M)	37 ml
	CaCl ₂ (0,14 M)	21 ml

2.12.2 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

HE-Färbungen von Gewebeschnitten wurden von B. Jünemann (Allgemein- und Viszeralchirurgie, Göttingen) angefertigt.

Zunächst wurden Paraffinschnitte entwachst und rehydriert, indem sie für je 10 min in Xylol, 100% EtOH, 96% EtOH und 75% EtOH inkubiert und anschließend mit H₂O (bidest.) gespült wurden. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min mit Hämalaun (Roth, Karlsruhe) nach Mayer gefärbt, bevor sie für 10 min in Leitungswasser gebläut wurden. Die Färbung mit Eosin (Eosin G, Merck, Darmstadt) erfolgte für 30 sec. Abschließend wurden die Schnitte mit H₂O (bidest.) gespült, durch eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol (s.o.) dehydriert und mit „Vitro Clud“ (Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen) überschichtet.

2.13 Statistik

Standardmäßig erfolgte die Signifikanzberechnung der erhaltenen Ergebnisse mit dem zweiseitigen ungepaarten t-Test. Ergebnisse mit einem p-Wert < 0,05 wurden als signifikant angesehen. Die Ergebnisse der Invasion von Tumorzellen in Hirngewebe wurden unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov Test bei zwei Stichproben miteinander verglichen.

Die Auswertung der Microarray-Daten, die Erstellung der LEF1-Signatur sowie die Durchführung der Überlebensanalysen und Erstellung der Kaplan-Meier Kurven wurde von Dr. A. Bleckmann (Medizinische Statistik Göttingen, Hämatologie/Onkologie Göttingen) übernommen.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Aspekte der Mammakarzinom Metastasierung bearbeitet, deren Ergebnisse im Folgenden in drei Abschnitten dargestellt werden.

Der erste Abschnitt befasst sich mit der Etablierung einer organotypischen Leberschnittkultur. Dieses Kultursystem sollte es ermöglichen, die Rolle der stationären Makrophagen der Leber, die Kupffer-Stern Zellen, während der Invasion des Mammakarzinoms in das Gewebe zu untersuchen. Es wird dargestellt, wie die Präparation der Leberschnitte, deren Kultivierung und die anschließenden Viabilitätstests erfolgten.

Im zweiten Abschnitt wurde untersucht, welche Wirkung zum einen das Bisphosphonat ZA und zum anderen ein Antikörper gegen das murine CSF-1 auf Mammakarzinomzellen und den Tumor umgebende Makrophagen haben. Es wurden Toxizitätsmessungen durchgeführt und analysiert, wie die Migration und Invasion der Tumorzellen durch die Behandlung mit den beiden Substanzen beeinflusst wird. Weiterhin wurde untersucht, welche Effekte die Substanzen auf die Aktivierung von Makrophagen zeigen.

Im letzten Abschnitt dieses Ergebnisteils wird die Rolle des Transkriptionsfaktors LEF1 in unterschiedlichen Mammakarzinomzellen untersucht und dessen Auswirkung auf die Metastasierungseigenschaften. Für diesen Transkriptionsfaktor konnte bereits gezeigt werden, dass er eine entscheidende Rolle in der Metastasierung des Lungenadenokarzinoms spielt (Nguyen et al 2009b). Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit dessen Funktion in der Metastasierung des Mammakarzinoms näher untersucht werden. Hierzu wurde zum einen die LEF1-Expression in mehreren zerebralen Metastasen des Mammakarzinoms immunhistochemisch und mittels qRT-PCR untersucht. Weiterhin erfolgte eine Charakterisierung unterschiedlicher Mammakarzinom-Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression von LEF1. Nach einer erfolgreichen Überexpression von LEF1 in der Zelllinie MCF-7 wurde dessen Effekt auf u.a. die Proliferation der Zellen, den Zellzyklus, deren Sensitivität gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung sowie der Effekt auf die Migrationseigenschaften und Invasivität der Zellen untersucht. Abschließend wurde untersucht, welche Signalwege aufgrund einer gesteigerten Expression von LEF1 beeinflusst werden, und welche prognostische Relevanz eine neu generierte LEF1-Signatur aufweist.

3.1 Etablierung einer organotypischen Leberschnittkultur

Bereits im Jahr 1889 konnte Stephen Paget bei der Untersuchung von Brusttumoren beobachten, dass die Bildung von Metastasen nicht einer zufälligen Verteilung folgte, sondern immer nur in bestimmten Organen auftrat (Paget 1989). Er war der Begründer der „*Seed and Soil*“-Theorie, die besagt, dass Tumorzellen (*seed*) nur in den Organen Metastasen ausbilden, die ein Milieu (*soil*) liefern, welches die Kolonisation von Tumorzellen und deren Wachstum fördert. Betrachtet man die Organe, in denen hauptsächlich Metastasen auftreten, Knochen, Leber, Lunge und Hirn, stellt man fest, dass alle diese Organe von einer stationären Makrophagenpopulation besiedelt sind. Es stellt sich daher die Frage, ob diese Makrophagen ein entscheidender Faktor sind, der die Kolonisation von Tumorzellen und somit die Bildung von Metastasen in den jeweiligen Organen vermittelt.

Nachdem in Vorarbeiten der Gruppe bereits gezeigt werden konnte, dass Mikroglia (MG) die Invasion von Mammakarzinomzellen in Hirngewebe aktiv fördern (Pukrop et al 2010), sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle der Kupffer-Stern Zellen in der Metastasierung der Leber untersucht werden. Um dies zu ermöglichen, sollte eine organotypische Leberschnittkultur etabliert werden, die eine Ko-Kultur von Tumorzellen mit vitalen Leberschnitten ermöglichen sollte. Dies sollte in Anlehnung an das bereits etablierte organotypische Hirnschnitt-Ko-Kultur-Modell (s. 2.10.3) erfolgen (Pukrop et al 2010).

3.1.1 Präparation und Kultivierung von Leberschnitten

Für die Präparation von Leberschnitten wurden NMRI-Mäuse in einem Alter von 6-9 Tagen verwendet. Aus diesen Mäusen wurde unter sterilen Bedingungen die Leber isoliert und in Präparationsmedium (s. 2.10.3.1) überführt. Anschließend wurde der große Leberlappen abgetrennt, da nur dieser für die Leberschnitte eingesetzt wurde. Um das Gewebe mit einem Vibratom schneiden zu können, wurde es im nächsten Schritt in 3% Agar eingebettet. Hierzu wurde aus einem ca. 2 cm³ großen Agarblock mit Hilfe einer 1000 µl Pipettenspitze ein Bolzen herausgestanzt, der Agarblock auf einem Probenhalter festgeklebt, der Leberlappen in die Aussparung gelegt und mit dem Bolzen fixiert, der ebenfalls mit Kleber fixiert wurde. Anschließend wurden mit Hilfe eines Vibratoms (Leica VT1200S, Leica, Wetzlar) Schnitte mit einer Dicke von 350 µm hergestellt. Die Schnitte wurden anschließend auf ein Zellkulturinsert (BD Falcon, Heidelberg) überführt, welches zur Kultivierung der Schnitte in ein 6-well gestellt wurde, das mit 1 ml Inkubationsmedium gefüllt war. Die Inkubation der Schnitte

erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. In Abb. 3.1 sind drei Schritte der Präparation von Leberschnitten dargestellt.

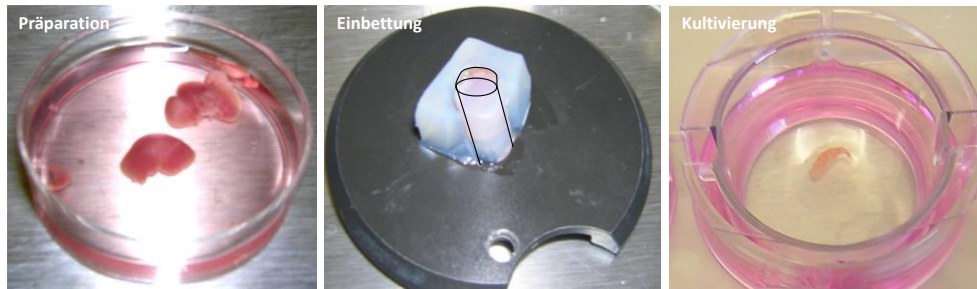


Abb. 3.1: Präparation von murinen Leberschnitten.

Aus NMRI-Mäusen (P6-P9) wurde der große Leberlappen präpariert (links), in 3% Agar eingebettet (Mitte) und 350 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf einem Zellkultur-*insert* kultiviert wurden (rechts).

Inkubationsmedium:	DMEM	44,5 ml
	NCS	5 ml
	Actrapid (100 I.E./ml)	13,5 µl
	Dexamethason (1:200 verdünnt)	5 µl
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 mg/ml

3.1.2 Viabilität der organotypischen Leberschnitte

Zur Überprüfung der Viabilität der Leberschnitte wurden MTT-Assays (s. 2.9.5.1) durchgeführt. Dazu wurden Leberschnitte zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0-72 h) mit MTT-Lösung behandelt und die MTT-Reduktion auf den 0 h Wert normalisiert, der auf 100% gesetzt wurde (s. Abb. 3.2). Es zeigte sich, dass Leberschnitte, die für 24 h kultiviert wurden, bereits eine um ca. 50% verminderte MTT-Reduktion im Vergleich zu frisch präparierten Schnitten (0 h) aufwiesen. Diese starke Abnahme der MTT-Reduktion war auch bei den Schnitten, die für 48 h bzw. 72 h kultiviert wurden, zu beobachten. Hier betrug die MTT-Reduktion nur noch ca. 40%.

Das Ergebnis des MTT-Assays sollte in einem weiteren Schritt verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden Leberschnitte erneut für unterschiedlich lange Zeiträume kultiviert, bevor sie fixiert wurden. Anschließend wurden aus diesen Geweben ultradünne Paraffinschnitten hergestellt (3 µm) und eine HE-Färbung angefertigt (s. 2.12.2). Bei der Auswertung der Färbungen bestätigte sich, dass der Großteil des Gewebes bereits nach 48 h Kultur

abgestorben war. Dieser Zerfall des Gewebes nahm zu, je länger die Schnitte kultiviert wurden (s. Abb. 3.3).

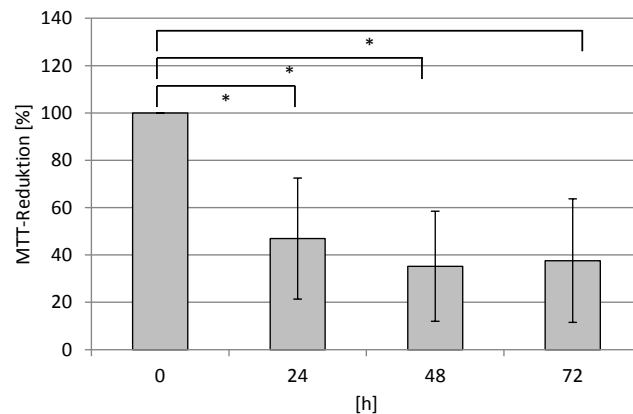


Abb. 3.2: Viabilität organotypischer Leberschnitte.

Leberschnitte wurden für den auf der x-Achse gekennzeichneten Zeitraum kultiviert, bevor der MTT-Assay durchgeführt wurde. Auf der y-Achse ist die MTT-Reduktion in %, bezogen auf den Wert der 0 h Kultur, als Mittelwert von drei Experimenten \pm Standardabweichung aufgetragen. * $P < 0,05$

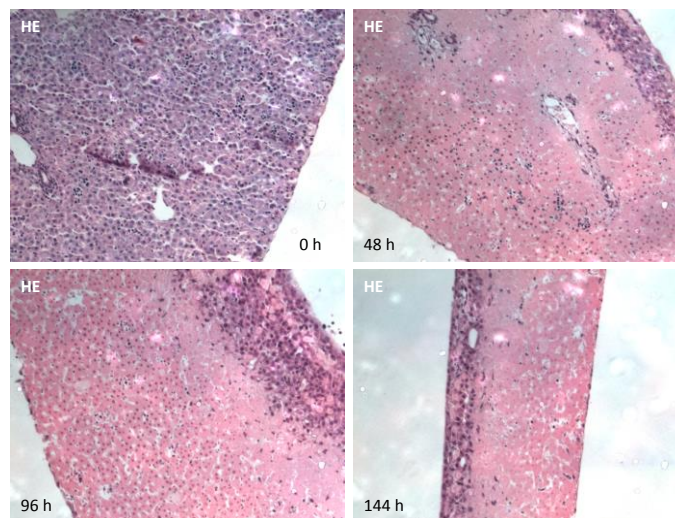


Abb. 3.3: HE-Färbungen von Leberschnitten.

Leberschnitte wurden für 0 h (oben links), 48 h (oben rechts), 96 h (unten links) bzw. 144 h (unten rechts) kultiviert, bevor HE-Färbungen angefertigt wurden. Für jeden Zeitpunkt ist eine repräsentative Färbung dargestellt.

Sowohl im MTT-Assay als auch in den HE-Färbungen hatte sich gezeigt, dass nicht alle Zellen des Gewebeschnitts im Lauf der Kultivierung abstarben. Um zu untersuchen, ob die Makrophagen zu den Zellen gehörten, die die Kultivierung überlebten, wurde eine semi-quantitative RT-PCR für den Makrophagenmarker F4/80 durchgeführt. Dazu wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung RNA aus dem Lebergewebe isoliert (s. 2.5.4), diese in cDNA umgeschrieben (s. 2.7.1) und anschließend eine PCR (s. 2.6.1) unter

Verwendung der Oligonukleotide 35/36 (s.Tab. 2.1) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode konnte gezeigt werden, dass die Expression des Markers F4/80 über den gesamten Zeitraum der Kultivierung konstant blieb (s. Abb. 3.4), was vermuten lässt, dass die Makrophagen in dem Gewebe auch nach 144 h Kultur noch vital waren.

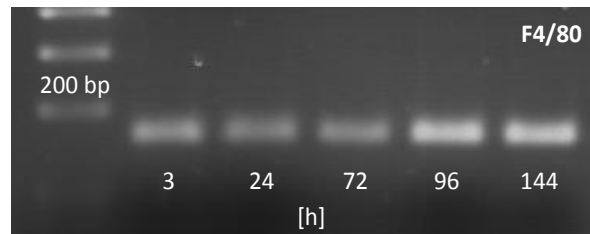


Abb. 3.4: F4/80 Expression in organotypischen Leberkulturen.

Leberschnitte wurden für den gekennzeichneten Zeitraum kultiviert, bevor die RNA aus dem Gewebe isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und eine semi-quantitative RT-PCR für das Gen *F4/80* durchgeführt wurde. 10 µl des PCR-Ansatzes wurden im Anschluss über ein 1% Agarosegel aufgetrennt.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass der Leberschnitt nicht vollständig abstarb, zeigte sich bei der Durchführung einer *time-lapse* Mikroskopie („Leica inverted DMI 6000B“, Leica Wetzlar). Bei diesem Versuch erfolgte die Kultivierung der Leberschnitte für 96 h. Während dieser Zeit konnte man beobachten, dass das Gewebe eine Art Narbe bildete, indem sehr viele Zellen aus dem Schnitt heraus wanderten und diese nach einiger Zeit kontrahierten und sich wieder Richtung Schnittrand bewegten (s. Film 1, DVD).

Da sich in den HE-Färbungen zeigte, dass im Randbereich des Schnittes auch nach 144 h Kultur noch vitale Zellen vorhanden waren, stellte sich die Frage, ob bei der oben beschriebenen Kultivierung der Schnitte eine zu geringe Diffusion des Mediums in das Gewebe die Ursache für das Absterben der Zellen im Zentrum des Schnittes war. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Kultivierungsbedingungen getestet. Zum einen wurden dünnere Schnitte präpariert (200 µm, 250 µm) und zum anderen wurde das Inkubationsmedium nicht nur unter das Zellkultur-*insert*, sondern zusätzlich 200 µl des Mediums in das *insert* gegeben. Diese Abänderung der Kultivierung brachte jedoch keinen Erfolg. Auch unter den beschriebenen Bedingungen starben mehr als 50% der Zellen bereits nach einer Kulturdauer von 24 h ab (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Schritt zur Etablierung einer Leberschnittkultur wurde die Zusammensetzung des Inkubationsmediums verändert. Da die Leber ein Insulin-abhängiges Organ ist, wurde zum einen die Konzentration dieses Hormons erhöht und zum anderen wurde der Gehalt an Dexamethason gesteigert. Das geänderte Inkubationsmedium setzte sich dann wie folgt zusammen:

DMEM	44,5 ml
NCS	5 ml
Actrapid (100 I.E./ml)	71 µl
Dexamethason	2,5 µl
Penicillin	100 U/ml
Sreptomycin	100 mg/ml

Auch die gesteigerten Konzentrationen an Insulin (Actrapid, Novo Nordisk Pharma, Dänemark) und Dexamethason hatten keinen Einfluss auf die Viabilität der Leberschnitte.

Für die Versuche, die im Rahmen dieses Projektes geplant waren, sollte eine Ko-Kultur der Leberschnitte mit Tumorzellen über mindestens 72 h erfolgen. Da für diesen Zeitraum die Viabilität der Leberschnitte nicht aufrechterhalten werden konnte, wurde die Entscheidung getroffen, dieses Projekt nicht weiter zu führen.

3.2 Die Rolle der Makrophagen in der Invasion und Metastasierung von Mammakarzinomzellen

Die Tumor fördernde Funktion der Makrophagen in den ersten Schritten der Tumorprogression ist heute unumstritten. Ihre Funktion in den letzten Schritten, d.h. in der Kolonisation in ein sekundäres Organ und damit die Metastasierung ist bislang nur wenig untersucht worden. Aber auch hier gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass Makrophagen eine entscheidende Rolle in diesen Vorgängen übernehmen (Lin et al 2001, Robinson-Smith et al 2007). Bis heute sterben die meisten Krebspatienten aufgrund des Auftretens von Metastasen. Es ist daher erforderlich, die Funktion der Makrophagen in den letzten Schritten der Tumorprogression genauer zu verstehen und zu untersuchen, ob diese Zellen möglicherweise ein gutes therapeutisches Ziel zur Verhinderung der Metastasierung darstellen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Substanzen, die in der Lage sind, Makrophagen zu depletieren, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Invasion und Metastasierung von Mammakarzinomzellen untersucht. Diese zwei Substanzen waren zum einen das Bisphosphonat Zoledronat und zum anderen ein Antikörper gegen das murine CSF-1 (5A1). Sie wurden uns von der Firma Novartis (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

3.2.1 Das Bisphosphonat Zoledronat (ZA)

ZA gehört zur Gruppe der Stickstoff-haltigen Bisphosphonate. Aufgrund seiner Fähigkeit, Osteoklasten zu inhibieren, was zu einer Verhinderung des Knochenabbaus führt, kommt es z.B. bei der Behandlung von Osteoporose oder auch bei den Knochen betreffenden Ereignissen, wie z.B. Metastasierung bei Krebspatienten zum Einsatz. In mehreren Publikationen wurde bereits die hemmende Wirkung von ZA auf das Tumorwachstum dargestellt (Almubarak et al 2011, Boissier et al 2000, Li et al 2012). Außerdem konnte bei der Analyse einer Subgruppe der AZURE-Studie gezeigt werden, dass die neo-adjuvante Chemotherapie von Brustkrebspatienten in Kombination mit ZA zu einer signifikanten Verringerung des invasiven Primärtumors führte (Coleman et al 2010). Diese Beobachtung wurde mit einer direkten Wirkung des Bisphosphonats auf die Tumorzellen begründet.

Ausgehend von den beschriebenen Effekten von ZA wollten wir die Frage beantworten, ob die Tumor hemmenden Wirkungen des BP ausschließlich durch direkte Effekte auf die Tumorzellen hervorgerufen werden oder ob sie zusätzlich auch auf Effekte auf das Tumorstroma, hier besonders auf die Makrophagen, zurückzuführen sind.

3.2.1.1 Toxizität von ZA auf Tumorzellen und Makrophagen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Effekt von ZA auf die Makrophagen des Mikromilieus eines Tumors untersucht werden. Um Effekte auf die Makrophagen klar von Effekten auf die Tumorzellen abgrenzen zu können, musste zunächst eine ZA Konzentration bestimmt werden, die nur die Makrophagen, nicht aber die Tumorzellen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden Toxizitätstests mit Hilfe von MTT-Assays (s. 2.9.5.1) sowie Proliferationsmessungen unter Verwendung des xCELLigence (s. 2.9.5.2) durchgeführt. Dabei wurden die beiden Zelllinien MCF-7 und MDA-MB231, die murinen Makrophagenpopulationen BMDM und MG sowie humane Makrophagen, ausdifferenziert aus Monozyten des peripheren Bluts (MΦ), für 72 h mit unterschiedlichen ZA Konzentrationen behandelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5 - Abb. 3.8 dargestellt.

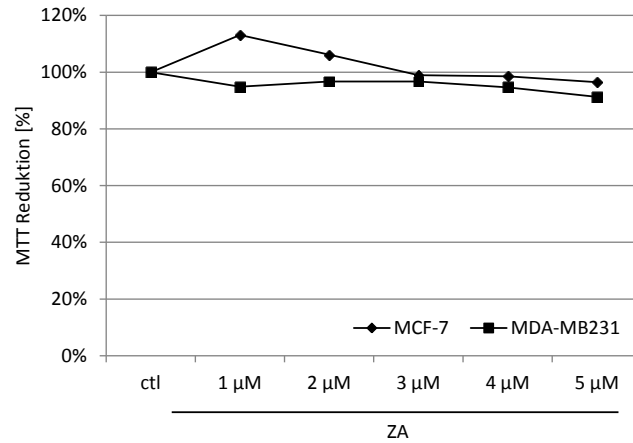


Abb. 3.5: Stoffwechselaktivität von MCF-7 (Raute) und MDA-MB231 (Quadrat) nach ZA Behandlung. 5×10^4 Tumorzellen wurden für 72 h mit den auf der x-Achse gekennzeichneten ZA Konzentrationen behandelt, bevor der MTT-Assay durchgeführt wurde. Nicht behandelte Zellen dienen als Kontrolle (ctl). Auf der y-Achse ist die relative MTT-Reduktion in %, bezogen auf die Kontrolle, als Mittelwert von zwei Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten dargestellt.

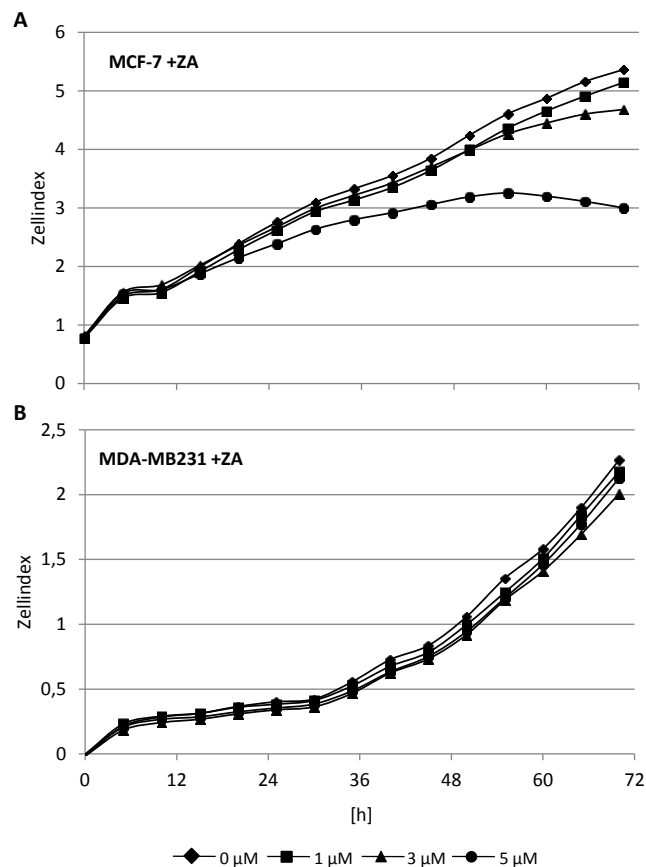


Abb. 3.6: xCELLigence-Messung von MCF-7 (A) und MDA-MB231 (B) während der Behandlung mit ZA. 4×10^4 (MCF-7) bzw. 1×10^3 (MDA-MB231) Tumorzellen wurden ausgesät und für 72 h mit 0 µM (Raute), 1 µM (Quadrat), 3 µM (Dreieck) oder 5 µM (Kreis) ZA behandelt. Die Proliferation wurde kontinuierlich über die Zeit aufgenommen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden (h) aufgetragen, auf der y-Achse die relative Proliferation in Form des Zellindex. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs.

Es konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Makrophagen deutlich sensibler gegenüber ZA waren als die beiden Tumorzelllinien MCF-7 und MDA-MB231. Während im MTT-Assay kein Effekt von ZA auf die Tumorzellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.5), zeigte die sensitivere xCELLigence-Messung, dass das Wachstum von MCF-7 Zellen bei einer Konzentration von 5 μM ZA inhibiert wurde. Für MDA-MB231 konnte kein Einfluss von ZA auf die Proliferation nachgewiesen werden (s. Abb. 3.6).

Die M Φ zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber ZA im Vergleich zu den Tumorzellen. Obwohl auch hier im MTT-Assay kein Effekt des N-BP auf den Stoffwechsel nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 3.7), zeigte die xCELLigence-Messung, dass bei einer Behandlung mit 1 μM ZA die Zellen signifikant beeinflusst wurden. Dieser Effekt nahm deutlich mit steigender Konzentration zu (s. Abb. 3.8 C). Die höchste Sensitivität gegenüber ZA wiesen sowohl BMDM als auch MG auf. Für BMDM konnte schon im MTT-Assay gezeigt werden, dass bereits die Konzentration von 1 μM ZA nach 72 h letale Auswirkungen hatte (s. Abb. 3.7). In der xCELLigence-Messung konnte man erkennen, dass die Behandlung mit ZA bei MG und BMDM nach 36 h bzw. 48 h zum Zelltod führte (s. Abb. 3.8 A, B).

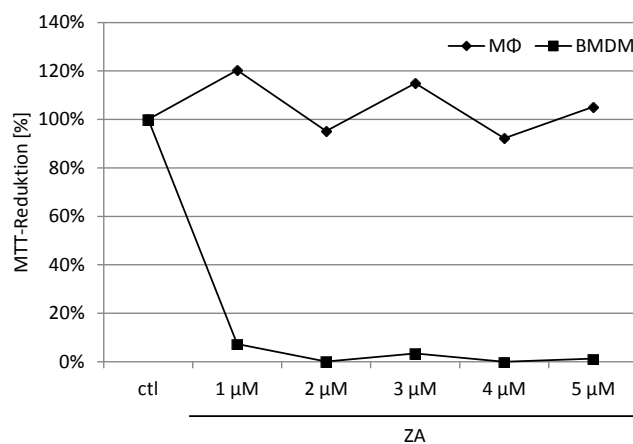


Abb. 3.7: Stoffwechselaktivität von M Φ (Raute) und BMDM (Quadrat) nach ZA Behandlung.

1×10^5 Makrophagen wurden für 72 h mit den auf der x-Achse gekennzeichneten ZA Konzentrationen behandelt, bevor der MTT-Assay durchgeführt wurde. Nicht behandelte Zellen dienen als Kontrolle (ctl). Auf der y-Achse ist die relative MTT-Reduktion in %, bezogen auf die Kontrolle, als Mittelwert von zwei Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten dargestellt.

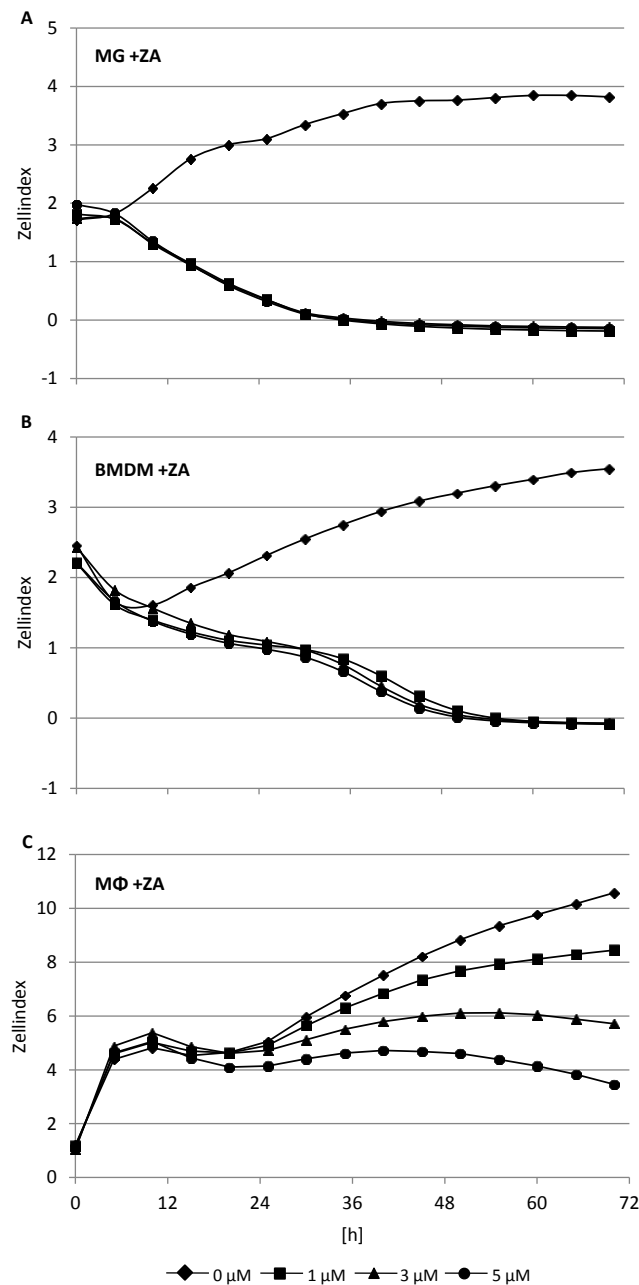


Abb. 3.8: xCELLigence-Messungen von MG (A), BMDM (B) und M Φ (C) während der Behandlung mit ZA.

4×10^4 Makrophagen wurden ausgesät und für 72 h mit 0 μM (Raute), 1 μM (Quadrat), 3 μM (Dreieck) oder 5 μM (Kreis) ZA behandelt. Die Proliferation/Zellmorphologie wurde mittels des xCELLigence kontinuierlich über die Zeit aufgenommen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden (h) aufgetragen, auf der y-Achse die relative Proliferation/Zellmorphologie in Form des Zellindexes. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs.

3.2.1.2 Einfluss von ZA auf die Migration von Tumorzellen

Ein Faktor, der bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt, ist die Fähigkeit der Zellen zu migrieren. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Schritt analysiert, ob ZA das Migrationsvermögen von MCF-7 und MDA-MB231 Zellen beeinflusst. Hierzu wurde ein ECM-basierter Migrationsassay durchgeführt (s. 2.10.2) bei

dem die Zellen für 48 h mit 2 μM ZA behandelt wurden. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten deutlich, dass die Behandlung der Zellen mit ZA keinen Effekt auf die Migration der Zellen hatte (s. Abb. 3.9). Sowohl in Anwesenheit von ZA als auch in der nicht behandelten Kontrolle zeigten beide Zelllinien den gleichen Flächenzuwachs. Weiterhin konnte man beobachten, dass MDA-MB231 Zellen deutlich stärker migrierten als MCF-7 Zellen, was sich durch einen wesentlich größeren Flächenzuwachs nach 48 h Inkubation widerspiegelte (ca. 0,4 mm^2 (MCF-7) vs. ca. 1,2 mm^2 (MDA-MB231)). Diese Beobachtung ist darauf zurückzuführen, dass MDA-MB231 zur Subgruppe der *triple negative* Mammakarzinome zählt und daher einen deutlich aggressiveren Phänotyp als MCF-7 aufweist (Neve et al 2006, Nielsen et al 2004).

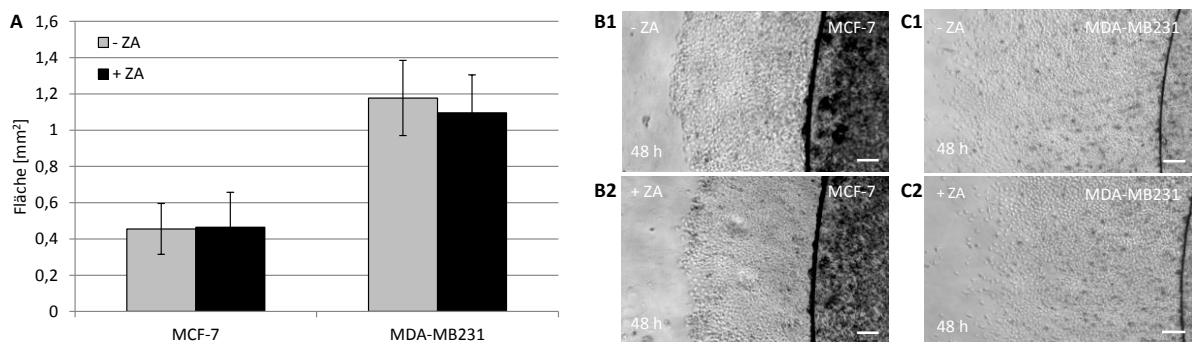


Abb. 3.9: Migration von MCF-7 und MDA-MB231 bei Behandlung mit ZA.

ECM-basierter Migrationsassay für MCF-7 und MDA-MB231. (A) Dargestellt ist die ausgemessene Fläche (mm^2) nach 48 h Inkubation in Abwesenheit (graue Balken) bzw. Anwesenheit (schwarze Balken) von 2 μM ZA. (B-C) Repräsentative Darstellung der ausgewanderten MCF-7 Zellen (B1 = -ZA, B2 = +ZA) und MDA-MB231 Zellen (C1 = -ZA, C2 = +ZA). Die Maßstabsbalken kennzeichnen 200 μm .

3.2.1.3 Einfluss von ZA auf die Makrophagen-induzierte Invasion von Tumorzellen

In früheren Arbeiten konnte bereits mittels modifizierter Boyden-Kammer Experimente gezeigt werden, dass eine Ko-Kultur von MCF-7 mit MG oder $\text{M}\Phi$ zu einer gesteigerten Invasion der Tumorzellen führt (Hagemann et al 2004, Pukrop et al 2010). Da im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung von ZA auf das Mikromilieu eines Tumors und die daraus resultierenden Effekte auf die Invasivität der Tumorzellen analysiert werden sollte, stellte dieser experimentelle Aufbau ein geeignetes Modell dar.

MCF-7 Zellen wurden in einer modifizierten Boyden-Kammer mit MG, BMDM bzw. $\text{M}\Phi$ ko-kultiviert und die Invasivität der Tumorzellen nach 96 h analysiert (s. 2.10.1). Zur Untersuchung des ZA Effekts auf die Makrophagen-induzierte Invasion wurden die Ko-Kulturen mit 1 μM ZA behandelt. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten, dass die durch Makrophagen gesteigerte Invasivität von MCF-7 Zellen durch 1 μM ZA signifikant reduziert wurde. Dies galt für alle untersuchten Ko-Kulturen (s. Abb. 3.10). Es konnte jedoch

beobachtet werden, dass die Behandlung mit ZA die Invasivität der Tumorzellen nicht vollständig auf das Ausgangsniveau (100%), d.h. Tumorzellen ohne Ko-Kultur, verminderte. Eine Ko-Kultur von MCF-7 und MG bzw. MΦ steigerte die Invasionsrate auf ca. 400% (MG) bzw. 500% (MΦ). Die Behandlung mit ZA reduzierte sie in beiden Bedingungen auf ca. 200%. Im Fall der Ko-Kultur mit BMDM war der Effekt nicht ganz so stark ausgeprägt. Hier führte die reine Ko-Kultur zu einer gesteigerten Invasionsrate auf ca. 600%, die Behandlung mit ZA reduzierte die Invasionsrate auf ca. 400%.

Da bereits aus früheren Arbeiten bekannt war, dass auch durch die Stimulation mit WNT5A die Invasivität von MCF-7 gesteigert wird (Pukrop et al 2006), wurden in einem weiteren Ansatz MCF-7 Zellen mit 100 ng/ml des rekombinanten Proteins stimuliert und zusätzlich mit 1 μ M bzw. 2 μ M ZA behandelt. Dieser Ansatz diente dazu, auszuschließen, dass der oben beschriebene Effekt von ZA auf die Ko-Kultur mit Makrophagen darauf zurückzuführen ist, dass durch das N-BP die Invasionseigenschaften der Tumorzellen selbst beeinflusst werden. Die Stimulation der MCF-7 Zellen mit WNT5A steigerte die Invasionsrate auf ca. 300%. Eine zusätzliche Behandlung mit 1 μ M ZA hatte keinen Einfluss auf die Invasionsrate, wohingegen die Behandlung mit 2 μ M ZA zu einer gesteigerten Invasionsrate auf nur noch ca. 180% führte (s. Abb. 3.10).

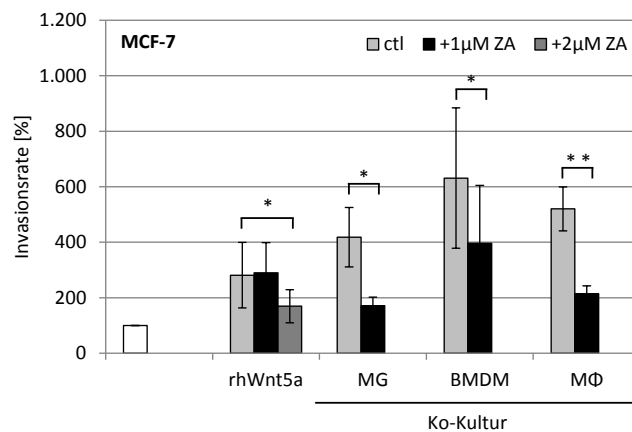


Abb. 3.10: Makrophagen-induzierte Invasion von MCF-7 Zellen nach Behandlung mit ZA.

Tumorzellen und Makrophagen wurden in einem Verhältnis von 1:2 in einer modifizierten Boyden-Kammer für 96 h in Abwesenheit (hellgraue Balken) und Anwesenheit von 1 μ M ZA (schwarze Balken) ko-kultiviert. In einem weiteren Ansatz wurden die Tumorzellen mit 100 ng/ml rhWNT5A allein (hellgrauer Balken), und in Kombination mit 1 μ M ZA (schwarzer Balken) bzw. 2 μ M ZA (dunkelgrauer Balken) für 96 h kultiviert. Die Invasionsrate wurde dabei auf die Bedingung MCF-7 Zellen allein bezogen, die auf 100% gesetzt wurde (weißer Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

3.2.1.4 Einfluss von ZA auf die MG-assistierte Tumordinvasion

In den oben beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass ZA, wenn es in niedrigen Konzentrationen vorliegt, keinen Einfluss auf die Tumorzellen hat. Die niedrigen

Konzentrationen reichten jedoch aus, um z.B. MG nach 36 h beinahe zu 100% abzutöten (s. Abb. 3.8), und somit indirekt die Invasivität der Tumorzellen zu beeinflussen (s. Abb. 3.10). Wie bereits gezeigt werden konnte, spielen MG auch im Vorgang der Metastasierung von Mammakarzinomzellen in das Hirngewebe eine entscheidende Rolle (Pukrop et al 2010). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob ZA eine Wirkung auf die MG-assistierte Invasion von MCF-7 Zellen hat. Hierzu wurde ein organotypisches Hirnschnitt Ko-Kultur Modell eingesetzt, bei dem Tumorzellen, die in ECM eingebettet sind, neben einem lebenden Hirnschnitt platziert werden und die Invasion der Zellen in das Gewebe nach 96 h analysiert wird (s. 2.10.3).

Da im Rahmen dieser Versuche eine Behandlung der Hirnschnitte mit ZA erfolgen sollte, musste in einem ersten Schritt die Toxizität des N-BP auf das Gewebe untersucht werden. Dazu wurde zunächst ein Viabilitätstest in Form des MTT-Assays (s. 2.9.5.1) durchgeführt, bei dem das Hirngewebe für 96 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von ZA behandelt wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.11 A dargestellt. Zur Normalisierung der Ergebnisse diente die unbehandelte Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde. Es zeigte sich, dass keine der getesteten ZA Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der Stoffwechselaktivität des Gesamtgewebes führte. Zum Nachweis, dass dieser Assay mit Hirngewebe durchzuführen ist, wurden einige Schnitte mit MeOH behandelt, was zum Absterben der Zellen führt. Wie erwartet, konnte in diesen Schnitten eine stark reduzierte MTT-Reduktion gemessen werden. Wie in 3.2.1.1 dargestellt, wurden MG bereits bei einer ZA-Konzentration von 1 μM abgetötet. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die Behandlung von Hirnschnitten mit ZA ebenfalls zu einer Depletion der stationären Makrophagen führt, obwohl im Gesamtgewebe keine Unterschiede in der MTT-Reduktion nachzuweisen waren. Um diese Frage zu beantworten, wurden Hirnschnitte erneut mit ZA behandelt, die RNA aus dem Gesamtgewebe isoliert (s. 2.5.4) und anschließend die Expression von spezifischen Markern für Makrophagen und Astrozyten mittels qRT-PCR (s. 2.7.1) nachgewiesen. Die Expression der Gene wurde auf die nicht behandelte Kontrolle normalisiert, deren Genexpression auf 1 gesetzt wurde. In dem Fall, dass ZA ebenfalls in den Hirnschnitten eine Depletion der Makrophagen bewirkt, war zu erwarten, dass durch die Behandlung mit ZA die Expression von Makrophagen-spezifischen Genen reduziert, die Expression von Genen spezifisch für Astrozyten jedoch nicht beeinflusst wird. Diese Theorie konnte bestätigt werden, wie in Abb. 3.11 B dargestellt ist. Die Behandlung der Hirnschnitte mit 1 μM ZA bewirkte keine signifikante Reduktion der Expression der getesteten Gene. Durch die Behandlung mit 2 μM ZA bzw. 5 μM ZA wurde jedoch die Expression der Gene *F4/80* und *Csf-1r*, die spezifische

Marker für Makrophagen sind, stark reduziert. Im Gegensatz dazu veränderte sich die Expression des Gens *Gfap*, das ein spezifischer Marker für Astrozyten ist, nicht. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass ZA in einem Hirnschnitt selektiv MG depletiert, andere Zellen des Gewebes jedoch nicht beeinflusst. Die Depletion der Makrophagen ist auch nicht darauf zurückzuführen, dass die beiden Wachstumsfaktoren CSF-1 und IL-34, die diese Zellen benötigen, dem Schnitt entzogen werden. Die Expression dieser beiden Gene veränderte sich ebenfalls nicht unter den getesteten Bedingungen. Dieses Ergebnis deutet auch darauf hin, dass die Zellen, die die beiden Wachstumsfaktoren sezernieren, nicht durch ZA beeinflusst werden.

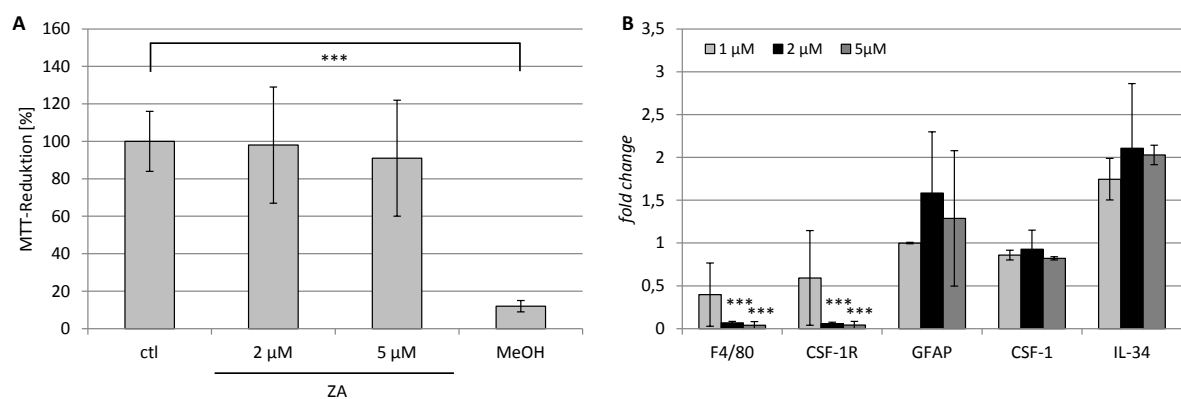


Abb. 3.11: Toxizität von ZA auf organotypische Hirnschnittkulturen.

(A) MTT-Assay von Hirnschnitten, die für 96 h mit ZA behandelt wurden. Für eine Kontrolle, dass der Assay aussagekräftig ist, wurden Schnitte mit Methanol (MeOH) abgetötet, bevor der Versuch durchgeführt wurde. Nicht behandelte Schnitte dienen als Kontrolle (ctl). Auf der y-Achse ist die relative MTT-Reduktion in %, bezogen auf die Kontrolle, als Mittelwert von drei Versuche \pm Standardabweichung dargestellt. (B) qRT-PCR für die auf der x-Achse gekennzeichneten Gene in Hirnschnitten, die für 96 h mit 1 μ M (hellgraue Balken), 2 μ M (schwarze Balken) oder 5 μ M (dunkelgraue Balken) ZA behandelt wurden. Auf der y-Achse ist die relative Genexpression als *fold change* als Mittelwert von drei Experimenten \pm Standardabweichung dargestellt. Nicht behandelte Schnitte dienen zur Normalisierung der Genexpression (*fold change*=1). *** $P < 0,001$

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ZA selektiv MG in einer organotypischen Hirnschnittkultur depletiert, konnte in einem weiteren Schritt sein Einfluss auf die MG-assistierte Invasion untersucht werden. Hierzu wurden organotypische Hirnschnitt-Kulturen angefertigt und diese bereits am Tag der Präparation mit 2 μ M ZA behandelt (s. 2.10.3). Auch während der Ko-Kultur mit Tumorzellen für 96 h erfolgte eine Behandlung mit 2 μ M ZA. Die Invasivität der Tumorzellen wurde mittels Konfokalmikroskopie quantifiziert. Der Grad der Invasivität wurde dabei in vier Gruppen aufgeteilt: 0 = nicht invasiv, d.h. in weniger als 1% des gesamten Kontaktbereiches zwischen Tumorzellen und Hirngewebe konnte eine Invasion nachgewiesen werden; + = schwach invasiv (s. Abb. 3.12 A), d.h. 1-25% Invasion; ++ = mäßig invasiv, d.h. 25-50% Invasion und +++ = hoch invasiv, d.h. >50% Invasion (s. Abb. 3.12 B). Die Ergebnisse verdeutlichten, dass durch die Behandlung der Hirnschnitte mit 2 μ M

ZA die MG-assistierte Invasion von MCF-7 Zellen signifikant reduziert wurde (s. Abb. 3.12 B). Während in unbehandelten Schnitten in ca. 50% der Schnitte eine Invasivität von +++ nachgewiesen werden konnte, betrug dieser Anteil bei den Schnitten, die mit ZA behandelt wurden, nur noch ca. 12%. Eine mäßige bis geringe Invasivität konnte bei der Kontrollgruppe in ca. 19,2% bzw. 26,9% nachgewiesen werden, im Gegensatz zu ca. 32% bzw. ca. 44% in der Gruppe der behandelten Schnitte. Auch der Anteil an Schnitten, bei denen keine Invasion von Tumorzellen zu beobachten war, lag in der Gruppe der behandelten Schnitte mit ca. 12% deutlich über der Kontrollgruppe, bei der dieser Anteil lediglich ca. 3,8% ausmachte.

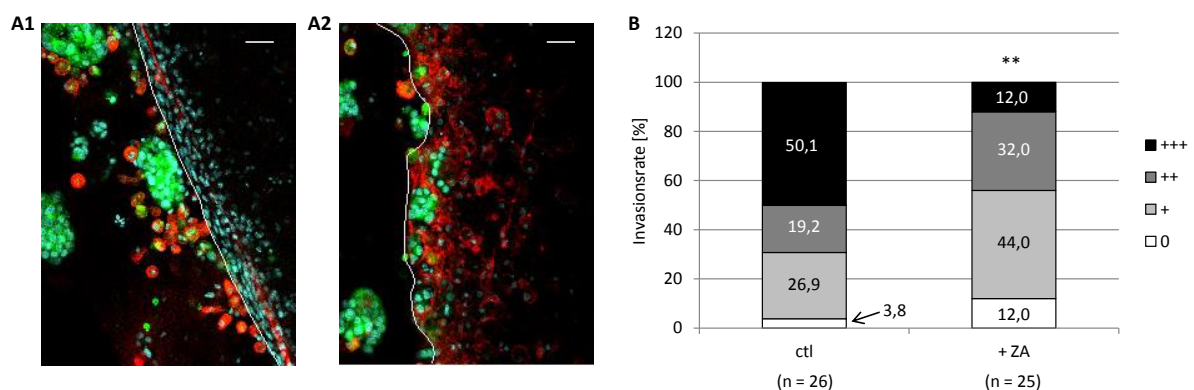


Abb. 3.12: MG-assistierte Invasion von MCF-7 nach Behandlung mit ZA.

(A) Repräsentative Konfokalaufnahmen einer schwachen Invasion von MCF-7 Zellen in das Gewebe (= +, A1) bzw. einer starken Invasion (= +++, A2); grün = GFP-transfizierte MCF-7 Zellen, rot = IB4-568 gefärbte MG Zellen, blau = Kernfärbung mit DAPI. Die Maßstabsbalken kennzeichnen 50 μm. (B) Quantifizierung der MCF-7 Invasion in unbehandelte (ctl) bzw. mit 2 μM ZA behandelte (+ ZA) organotypische Hirnschnitte nach 96 h Ko-Kultur. Auf der y-Achse ist der Anteil der Schnitte mit keiner (= 0), niedriger (= +), mäßiger (= ++), bzw. starker (= +++) Invasion in % aufgetragen. n = Anzahl der Schnitte; * $P = 0,01$

3.2.1.5 Aktivierung von MΦ nach Behandlung mit ZA

Bei der Durchführung der Toxizitätsmessung konnte gezeigt werden, dass MΦ sensitiver gegenüber ZA sind als die getesteten Mammakarzinom-Zelllinien, dass sie jedoch nicht, im Gegensatz zu den murinen Makrophagen, durch die Behandlung mit ZA abgetötet werden (s. 3.2.1.1). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass trotz der geringeren Toxizität von ZA auf MΦ, die Makrophagen-induzierte Invasion von MCF-7 Zellen durch ZA vermindert wurde (s. 3.2.1.3). Es stellte sich daher die Frage, worauf dieser Effekt zurückzuführen ist. Da bereits gezeigt werden konnte, dass ZA die Expression von MMPs vermindern kann (Li et al 2012), stellte dies eine mögliche Erklärung dar. Eine weitere Möglichkeit war die, dass die MΦ nach der Behandlung mit ZA nicht mehr in der Lage waren, auf externe Stimuli zu reagieren. Zur Überprüfung dieser beiden Hypothesen wurden zum einen Zymographie-Versuche (s. 2.9.7)

und zum anderen qRT-PCR Analysen (s. 2.7.1) für Invasions-assoziierte Gene nach LPS-Stimulation durchgeführt.

Zur Untersuchung des Effekts von ZA auf die MMP-Sekretion wurden MCF-7 Zellen mit M Φ in An- bzw. Abwesenheit von 2 μ M ZA für 24 h ko-kultiviert und anschließend die Überstände der Kulturen mittels Zymographie analysiert (s. Abb. 3.13 A). Es konnte gezeigt werden, dass das N-BP unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf die Sekretion der beiden Metalloproteasen MMP-2 und MMP-9 hatte.

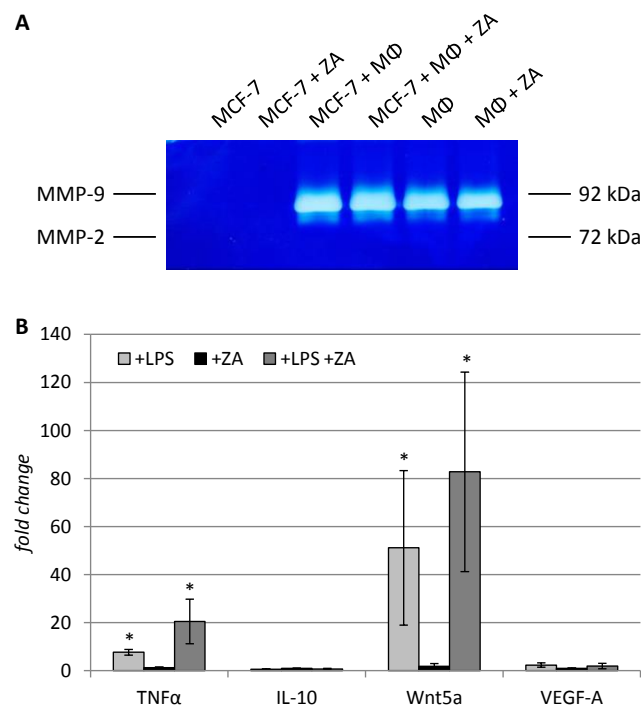


Abb. 3.13: Reaktion von M Φ nach Behandlung mit ZA.

(A) Nachweis von MMP-9 und MMP-2 mittels Zymographie in den gekennzeichneten Bedingungen. Die Ko-Kultur von Tumorzellen und M Φ erfolgte in einem Verhältnis von 1:2. Die Ko-Kulturen wurden für 24 h Stunden mit 2 μ M ZA behandelt, bevor die Überstände für die Analyse verwendet wurden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis. (B) qRT-PCR für die auf der x-Achse gekennzeichneten Gene in M Φ , die mit 100 ng/ml LPS (hellgraue Balken), 5 μ M ZA (schwarze Balken) oder mit beiden Substanzen (dunkelgraue Balken) behandelt wurden. Auf der y-Achse ist die relative Genexpression (*fold change*) als Mittelwert von drei Experimenten \pm Standardabweichung, bezogen auf die nicht behandelte Kontrolle, dargestellt. * $P < 0,05$ Die RNA-Isolation erfolgte aus subkonfluenten Kulturen.

Die Fähigkeit der M Φ auf externe Stimuli nach einer Behandlung mit ZA zu reagieren, wurde analysiert, indem die Zellen zunächst für 72 h mit 5 μ M ZA behandelt wurden, bevor der Kultur für weitere 24 h 100 ng/ml LPS zugefügt wurde. Anschließend wurde die Expression der Gene *TNF- α* , *IL-10*, *WNT5A* und *VEGF-A* mittels qRT-PCR analysiert und auf die nicht behandelte Kontrolle bezogen, deren Genexpression auf 1 gesetzt wurde. Es zeigte sich, dass durch die Behandlung mit ZA die gesteigerte Expression der Gene *TNF- α* und *WNT5A* nach LPS-Stimulation zusätzlich verstärkt wurde (s. Abb. 3.13 B). Wurde die Genexpression durch

die alleinige LPS-Stimulation ca. 8-fach bzw. 50-fach gesteigert, bewirkte die Vorbehandlung mit ZA eine ca. 20-fache bzw. 83-fache Steigerung in Bezug auf die nicht behandelte Kontrolle. Die Behandlung der Zellen mit ZA allein bewirkte keine Änderung der Expression dieser beiden Gene. Die Expression der Gene *IL-10* und *VEGF-A* wurde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unter keiner der getesteten Bedingungen verändert.

3.2.2 „5A1“- Ein CSF-1 neutralisierender Antikörper

Wie oben bereits erwähnt wurde, sollte neben dem N-BP ZA auch der Antikörper 5A1, der gegen das murine CSF-1 gerichtet ist, und dessen Einfluss auf die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen untersucht werden. Im Gegensatz zu ZA findet der Antikörper 5A1 keine Anwendung in der Klinik. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass auch 5A1 eine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum haben könnte. In einem *in vivo* Mausmodell, das spontan Brusttumore entwickelt, konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von CSF-1 zwar nicht das Auftreten und das Wachstum des Primärtumors beeinflusst, dass aber die Progression zum invasiven Karzinom und somit die Metastasierung stark verzögert wird (Lin et al 2001).

3.2.2.1 Toxizität von 5A1 auf Tumorzellen und Makrophagen

Ebenso, wie es bereits für ZA beschrieben wurde (s. 3.2.1.1 - 3.2.1.5), sollte auch der Effekt des CSF-1 neutralisierenden Antikörpers 5A1 auf das Stroma eines Tumors und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Invasion und Metastasierung untersucht werden. Damit die Effekte auf die Tumorzellen und Makrophagen klar voneinander abgegrenzt werden konnten, wurde auch hier zunächst eine Konzentration bestimmt, die die Makrophagen beeinflusst, jedoch nicht die Tumorzellen. Dazu wurden für die Tumorzellen MCF-7 und MDA-MB231 sowie die beiden Makrophagenpopulationen MG und BMDM sowohl MTT-Assays (s. 2.9.5.1) als auch Proliferationsmessungen mittels xCELLigence (s. 2.9.5.2) durchgeführt. Die humanen Makrophagen (MΦ) wurden in dieser Versuchsreihe nicht mit eingeschlossen, da der Antikörper gegen das murine CSF-1 gerichtet ist, weshalb sein Effekt auf die murinen Makrophagen untersucht wurde.

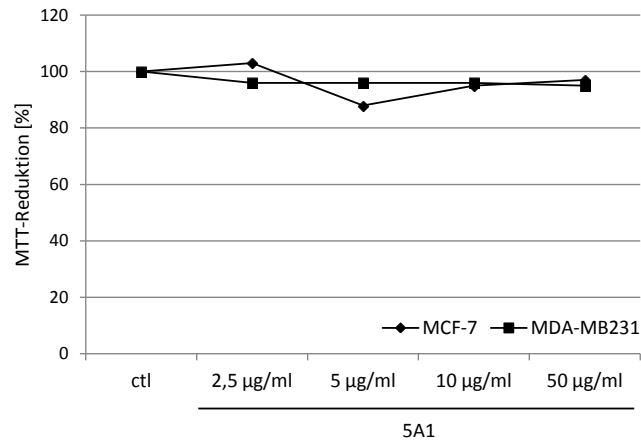


Abb. 3.14: Stoffwechselaktivität von MCF-7 (Raute) und MDA-MB231 (Quadrat) nach 5A1 Behandlung. 5×10^4 Tumorzellen wurden für 96 h mit den auf der x-Achse gekennzeichneten 5A1 Konzentrationen behandelt, bevor der MTT-Assay durchgeführt wurde. Nicht behandelte Zellen dienten als Kontrolle (ctl). Auf der y-Achse ist die relative MTT-Reduktion in %, bezogen auf die Kontrolle, als Mittelwert von zwei Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten dargestellt.

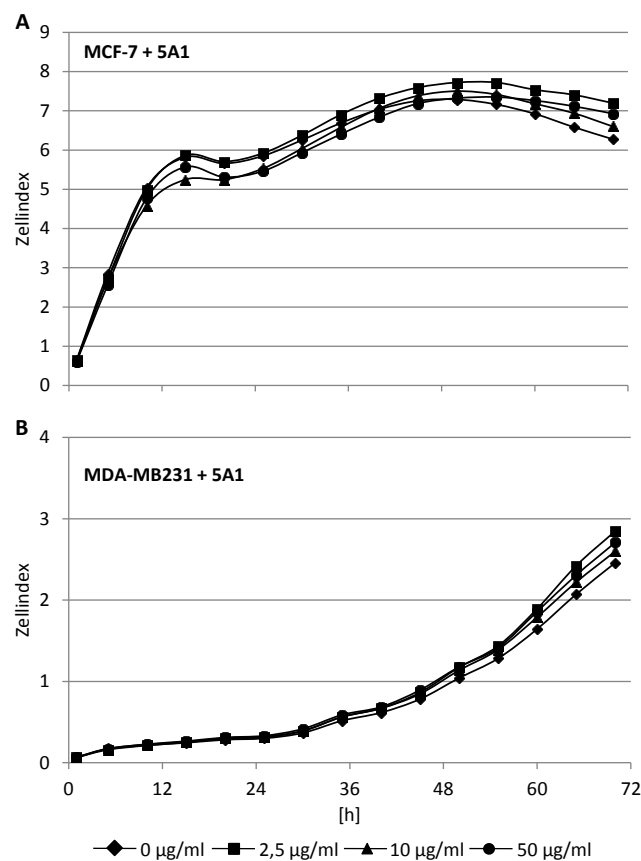


Abb. 3.15: xCELLigence-Messung von MCF-7 (A) und MDA-MB231 (B) während der Behandlung mit 5A1.

4×10^4 (MCF-7) bzw. 1×10^3 (MDA-MB231) Tumorzellen wurden ausgesät und für 72 h mit 0 µg/ml (Raute), 2,5 µg/ml (Quadrat), 10 µg/ml (Dreieck) oder 50 µg/ml (Kreis) 5A1 behandelt. Die Proliferation wurde kontinuierlich über die Zeit aufgenommen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden (h) aufgetragen, auf der y-Achse die relative Proliferation in Form des Zellindex. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs.

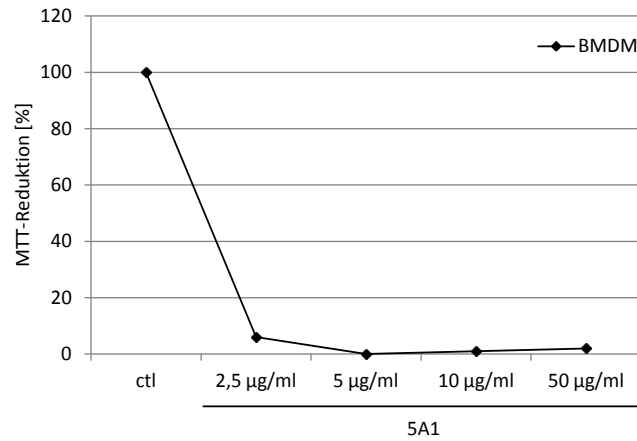


Abb. 3.16: Stoffwechselaktivität von BMDM (Raute) nach 5A1 Behandlung.

1×10^5 BMDM wurden für 96 h mit den auf der x-Achse gekennzeichneten 5A1 Konzentrationen behandelt, bevor der MTT-Assay durchgeführt wurde. Nicht behandelte Zellen dienen als Kontrolle (ctl). Auf der y-Achse ist die relative MTT-Reduktion in %, bezogen auf die Kontrolle, als Mittelwert von zwei Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten dargestellt.

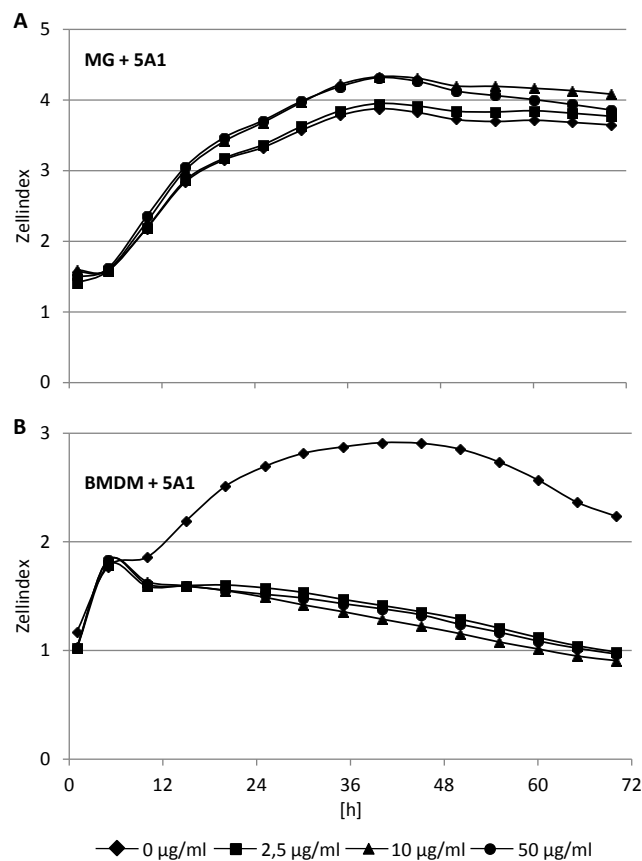


Abb. 3.17: xCELLigence-Messung von MG (A) und BMDM (B) während der Behandlung mit 5A1.

4×10^4 Makrophagen wurden ausgesät und für 72 h mit 0 µg/ml (Raute), 2,5 µg/ml (Quadrat), 10 µg/ml (Dreieck) oder 50 µg/ml (Kreis) 5A1 behandelt. Die Proliferation wurde kontinuierlich über die Zeit aufgenommen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden (h) aufgetragen, auf der y-Achse die relative Proliferation in Form des Zellindex. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs.

Vergleichbar zu den Resultaten, die für ZA erhalten wurden (s. Abb. 3.5 und Abb. 3.6), stellte sich auch für den Antikörper 5A1 heraus, dass dieser keinen Effekt auf die beiden Tumorzelllinien zeigte. Für den MTT-Assay wurden die Zellen 96 h mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antikörpers inkubiert. Keine der getesteten Konzentrationen führte dabei zu einer Verminderung der MTT-Reduktion (s. Abb. 3.14). Auch bei der xCELLigence-Messung, bei der die Zellen für 72 h mit 5A1 behandelt wurden, konnte kein Einfluss auf das Wachstum der Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 3.15).

Bei der Analyse der Toxizität von 5A1 auf MG und BMDM zeigte sich ein unterschiedliches Bild. Während MG auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration (50 $\mu\text{g/ml}$) keine Sensitivität gegenüber dem Antikörper aufwies, wurden BMDM bereits bei der niedrigsten Konzentration, die getestet wurde (2,5 $\mu\text{g/ml}$), nach 72 h vollständig abgetötet (s. Abb. 3.16 und Abb. 3.17). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die Tatsache, dass MG, im Gegensatz zu BMDM, nicht von CSF-1 abhängig sind, sondern den alternativen Wachstumsfaktor IL-34 nutzen (s. auch 3.2.2.4) (Nandi et al 2012, Wang et al 2012).

3.2.2.2 Einfluss von 5A1 auf die Migration von Tumorzellen

Bevor Untersuchungen zum Einfluss von 5A1 auf die Invasion von Tumorzellen durchgeführt wurden, sollte in einem ersten Schritt analysiert werden, ob das migratorische Verhalten von Mammakarzinomzellen in Anwesenheit des Antikörpers beeinflusst wird. Hierzu wurden ECM-basierte Migrationsassays (s. 2.10.2) durchgeführt, bei denen sowohl MCF-7 als auch MDA-MB231 für 48 h mit dem Antikörper behandelt wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 3.18 dargestellt.

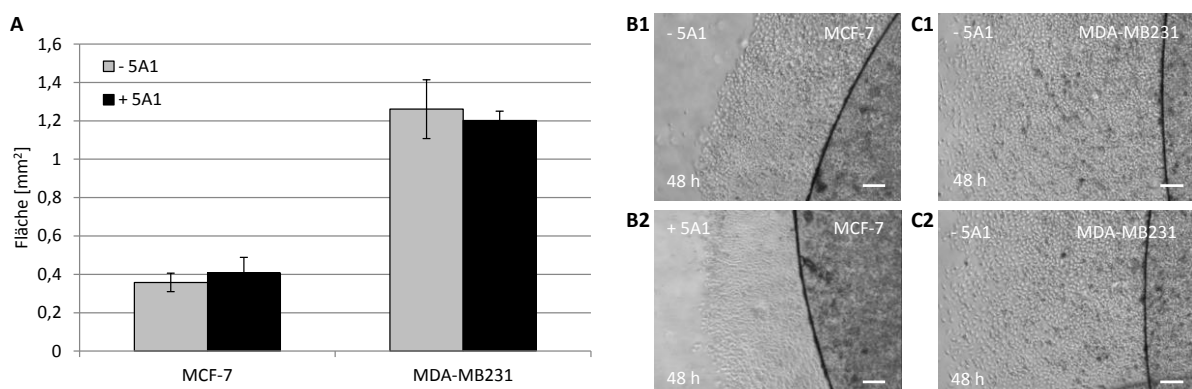


Abb. 3.18: Migration von MCF-7 und MDA-MB231 bei Behandlung mit 5A1.

ECM-basierter Migrationsassay für MCF-7 und MDA-MB231. (A) Dargestellt ist die ausgemessene Fläche (mm^2) nach 48 h Inkubation in Abwesenheit (graue Balken) bzw. Anwesenheit (schwarze Balken) von 25 $\mu\text{g/ml}$ 5A1. (B-C) Repräsentative Darstellung der ausgewanderten MCF-7 Zellen (B1 = -5A1, B2 = +5A1) und MDA-MB231 Zellen (C1 = -5A1, C2 = +5A1). Die Maßstabsbalken kennzeichnen 200 μm .

Es konnte für beide Zelllinien gezeigt werden, dass sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch in dem Ansatz, dem der Antikörper zugefügt wurde, der Flächenzuwachs identisch war. Auch hier zeigte sich erneut, dass MDA-MB231 deutlich schneller migrierte als MCF-7, was sich in einem ca. dreimal so großen Flächenzuwachs widerspiegelte (MCF7 ca. 0,4 mm²; MDA-MB231 ca. 1,2 mm²) (vgl. Abb. 3.9).

3.2.2.3 Einfluss von 5A1 auf die Makrophagen-induzierte Invasion von Tumorzellen

Zur Untersuchung des Einflusses des Antikörpers 5A1 auf die Makrophagen-induzierte Invasion von Tumorzellen wurden modifizierte Boyden-Kammer Experimente durchgeführt. Hierzu wurden MCF-7 Zellen mit MG bzw. BMDM für 96 h ko-kultiviert, wobei dem Ansatz der Antikörper in einer Konzentration von 2,5 µg/ml zugefügt wurde. Zur Auswertung wurde die Invasionsrate der Ko-Kulturen auf die Invasivität von Tumorzellen alleine normalisiert, die auf 100% gesetzt wurde.

Im Fall der BMDM zeigte sich, dass die durch die Ko-Kultur gesteigerte Invasion von MCF-7 durch Zugabe von 5A1 signifikant reduziert wurde. Betrug die Invasionsrate in der unbehandelten Ko-Kultur ca. 500%, waren es nach Behandlung mit 5A1 nur noch ca. 200%. Dieser Effekt ist auf die letale Wirkung von ZA auf BMDM in dem Zeitraum der Ko-Kultur zurückzuführen (vgl. Abb. 3.16 und Abb. 3.17). Für MG konnte ebenfalls eine Reduktion der Invasionsrate von ca. 400% auf ca. 250% durch die Behandlung mit 5A1 gezeigt werden (s. Abb. 3.19).

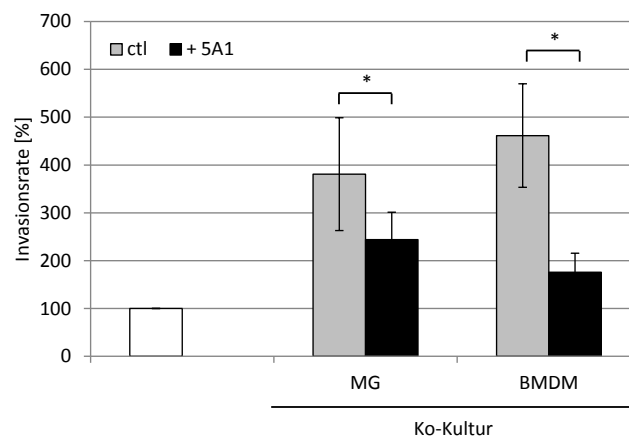


Abb. 3.19: Makrophagen-induzierte Invasion von MCF-7 Zellen nach Behandlung mit 5A1.

Tumorzellen und Makrophagen wurden in einem Verhältnis von 1:2 in einer modifizierten Boyden-Kammer für 96 h in Abwesenheit (hellgraue Balken) und Anwesenheit von 2,5 µg/ml 5A1 (schwarze Balken) ko-kultiviert. Die Invasionsrate wurde dabei auf die Bedingung MCF-7 Zellen allein bezogen, die auf 100% gesetzt wurde (weißer Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. * $P < 0,05$

3.2.2.4 Einfluss von 5A1 auf die MG-assistierte Invasion von Tumorzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MG durch die Behandlung mit dem Antikörper 5A1 nicht abgetötet werden (s. Abb. 3.17) und auch die MG-induzierte Tumordinvasion nur geringfügig beeinflusst wird (s. Abb. 3.19), stellte sich die Frage, ob 5A1 eine Auswirkung auf die MG-assistierte Invasion zeigt. Um diese Frage zu beantworten, sollten organotypische Hirnschnitt Ko-Kultur Versuche durchgeführt werden. Bevor diese durchgeführt werden konnten, musste zunächst überprüft werden, ob der Antikörper eine toxische Wirkung gegenüber dem Hirngewebe aufweist. Zu diesem Zweck wurden zum einen MTT-Assays (s. 2.9.5.1) und zum anderen qRT-PCR Analysen (s. 2.7.1) für zellspezifische Marker des Hirngewebes durchgeführt. Für beide Experimente wurde Hirngewebe über 96 h mit unterschiedlichen 5A1 Konzentrationen behandelt. Wie in Abb. 3.20 zu sehen ist, zeigte sich im MTT-Assay, dass der Antikörper toxisch auf das Gewebe einwirkte. Dies spiegelte sich durch eine Verminderung der MTT-Reduktion, im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle (100%), auf ca. 60-70% bei allen getesteten 5A1 Konzentrationen wider. Um die Frage zu klären, welche Zellen des Gewebes durch die Behandlung mit dem Antikörper getroffen wurden, wurde die Expression der Gene *F4/80*, *Csf-1r*, *Gfap*, und *Rbfox3* (NeuN) mittels qRT-PCR analysiert, wobei die Expression auf die nicht behandelte Kontrolle bezogen wurde, deren Expression auf 1 gesetzt wurde.

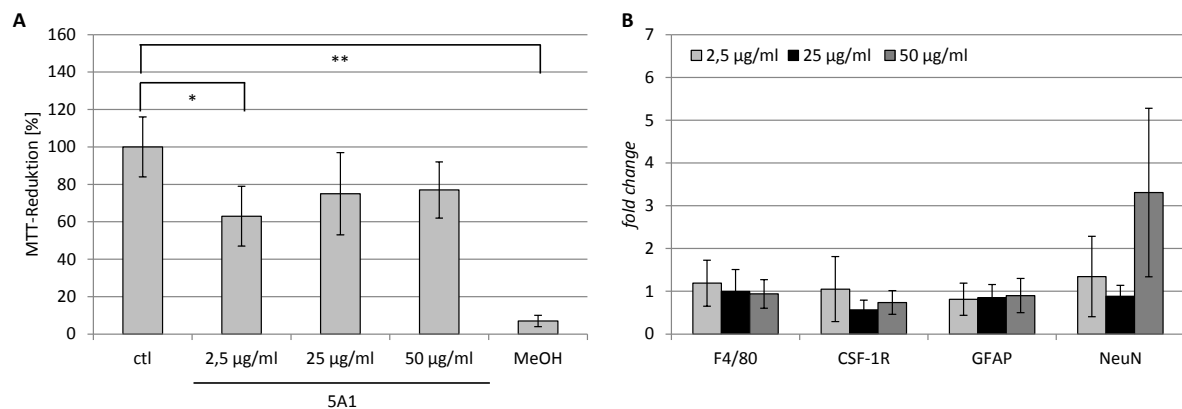


Abb. 3.20: Toxizität von 5A1 auf organotypische Hirnschnittkulturen.

(A) MTT-Assay von Hirnschnitten, die für 96 h mit 5A1 behandelt wurden. Für eine Kontrolle, dass der Assay aussagekräftig ist, wurden Schnitte mit Methanol (MeOH) abgetötet, bevor der Versuch durchgeführt wurde. Nicht behandelte Schnitte dienen als Kontrolle (ctl). Auf der y-Achse ist die relative MTT-Reduktion in %, bezogen auf die Kontrolle, als Mittelwert von drei Versuchen \pm Standardabweichung dargestellt. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (B) qRT-PCR für die auf der x-Achse gekennzeichneten Gene in Hirnschnitten, die für 96 h mit 2,5 µg/ml (hellgraue Balken), 25 µg/ml (schwarze Balken) oder 50 µg/ml (dunkelgraue Balken) 5A1 behandelt wurden. Auf der y-Achse ist die relative Genexpression (*fold change*) als Mittelwert von drei Experimenten \pm Standardabweichung, bezogen auf die nicht behandelte Kontrolle (*fold change* = 1), dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Behandlung der Hirnschnitte mit 5A1 keine Auswirkung auf die Expression der genannten Gene hatte (s. Abb. 3.20). Die verminderte Stoffwechselaktivität

des Gewebes nach der Behandlung mit 5A1 ist daher vermutlich nicht mit der Depletion bestimmter Zellen, wie z.B. der Neuronen, zu begründen, sondern eher mit einer allgemeinen toxischen Wirkung des Antikörpers. Aufgrund der Toxizität des Antikörpers auf organotypische Hirnschnittkulturen konnte der Einfluss von 5A1 auf die MG-assistierte Invasion von Karzinomzellen nicht weiter untersucht werden.

3.2.2.5 Aktivierung von MG nach der Behandlung mit 5A1

Bei der Durchführung der oben beschriebenen Experimente wurde deutlich, dass die Proliferation von MG nicht durch die Behandlung mit dem Antikörper 5A1 inhibiert wurde (s. Abb. 3.17). Auch die MG-induzierte Invasion von MCF-7 wurde nur geringfügig durch 5A1 verringert (s. Abb. 3.19). Basierend auf diesen Beobachtungen war zu vermuten, dass der Antikörper ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivierung von MG hat. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Aktivierung von MG-Zellen, basierend auf der Nitritkonzentration, im Kulturüberstand bestimmt (s. 2.9.9). Hierzu wurden MG für 6 h mit 25 $\mu\text{g/ml}$ 5A1 behandelt bevor, zusätzlich für weitere 24 h eine Stimulation der Zellen mit 100 ng/ml LPS erfolgte.

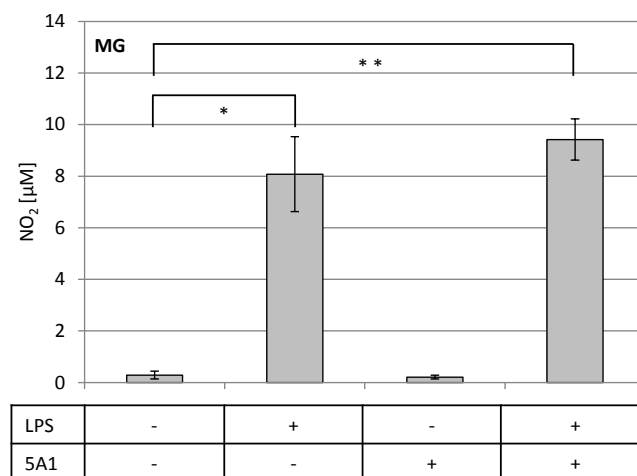


Abb. 3.21: LPS-induzierte Aktivierung von MG-Zellen nach Behandlung mit 5A1.

2×10^5 Zellen wurden für 6 h mit 25 $\mu\text{g/ml}$ 5A1 behandelt, bevor für weitere 24 h eine Aktivierung mit 100 ng/ml LPS erfolgte. Die Nitritkonzentration, aufgetragen auf der y-Achse in μM , wurde im Kulturüberstand gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen als Mittelwert \pm Standardabweichung. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Wie in Abb. 3.21 verdeutlicht wird, hatte die Behandlung von MG mit 5A1 keinen Effekt auf die Aktivierung der Zellen durch eine Stimulation mit LPS. Die Nitritkonzentration in den Kulturüberständen von Zellen, die nur mit LPS behandelt wurden, lag bei ca. 8 μM . Nach einer Vorbehandlung der Zellen mit 5A1 änderte sich diese Konzentration nicht signifikant und lag bei ca. 9,5 μM . In den Kulturüberständen der nicht behandelten Zellen und der Zellen,

die zwar mit 5A1 behandelt, aber nicht mit LPS stimuliert wurden, konnte kein Nitrit nachgewiesen werden.

3.3 Die Rolle von LEF1 in der Invasion und Metastasierung des Mammakarzinoms

Bis heute ist das Auftreten von Metastasen die Haupttodesursache bei Krebspatienten. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, die Ursachen, die zur Bildung von Metastasen führen, zu verstehen. Im zweiten Abschnitt dieses Ergebnisteils wurde bereits die Funktion des Tumorstromas in der Progression des Mammakarzinoms untersucht. Dieser Abschnitt konzentriert sich auf die Tumorzellen und Faktoren, die deren Eigenschaften beeinflussen können. Ein Fokus wird dabei auf den Transkriptionsfaktor LEF1 gelegt.

Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass eine fehlerhafte Regulation des WNT-Signalwegs zur Initiation und Progression einiger Tumorentitäten führen kann. Aber auch eine Funktion in der Metastasierung wurde in den letzten Jahren beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass eine starke Aktivierung des WNT-Signalwegs charakteristisch für Zellen des Lungenadenokarzinoms ist, die in das Hirn und die Knochen metastasieren (Nguyen et al 2009b). Weiterhin konnte für das Mammakarzinom gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor LEF1 in Hirnmetastasen überexprimiert ist (Bos et al 2009). Dies wurde jedoch nicht weiter untersucht.

Auch in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe erhielten wir Hinweise darauf, dass LEF1 einen wichtigen Faktor darstellt, der die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen beeinflussen kann. In einer Studie, bei der die Genexpression der schwach invasiven Zelllinie MCF-7 mit der Genexpression der hoch invasiven Zelllinie MDA-MB231, basierend auf einem NCBI GEO Datensatz von drei unabhängigen Experimenten, verglichen wurde, zeigte sich eine signifikant gesteigerte Expression von LEF1 in MDA-MB231. Dieses Ergebnis konnte mit Hilfe eines WNT-spezifischen Genexpressions-Arrays validiert werden (Klemm et al 2011). Weiterhin konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass die Makrophagen-induzierte Invasionssteigerung von MCF-7 durch die Überexpression eines dominant negativen LEF1 deutlich reduziert wird (Pukrop et al 2006).

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen stellten wir die Hypothese auf, dass eine gesteigerte LEF1 Expression zu einem aggressiveren Phänotyp von Mammakarzinomen führt.

3.3.1 LEF1-Expression in zerebralen Metastasen des Mammakarzinoms

Es konnte bereits gezeigt werden, dass, basierend auf der Expression von LEF1, Subgruppen in zerebralen Metastasen des Lungenadenokarzinoms identifiziert werden können (Bleckmann et al, nicht veröffentlicht). Zur Untersuchung, ob die Expression von LEF1 auch beim Mammakarzinom eine Rolle in der zerebralen Metastasierung spielen könnte, wurden zerebrale Metastasen von Brustkrebspatienten immunhistochemisch (s.2.12.1) und mittels qRT-PCR Analysen (s. 2.7.1) auf die LEF1 Expression untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch beim Mammakarzinom eine Subgruppe der Metastasen eine nukleäre LEF1-Färbung aufwies (s. Abb. 3.22 A-B). Ebenso verdeutlichten die qRT-PCR Analysen, dass Unterschiede in der *LEF1* Expression mehrerer zerebraler Metastasen auftraten (s. Abb. 3.22 C).

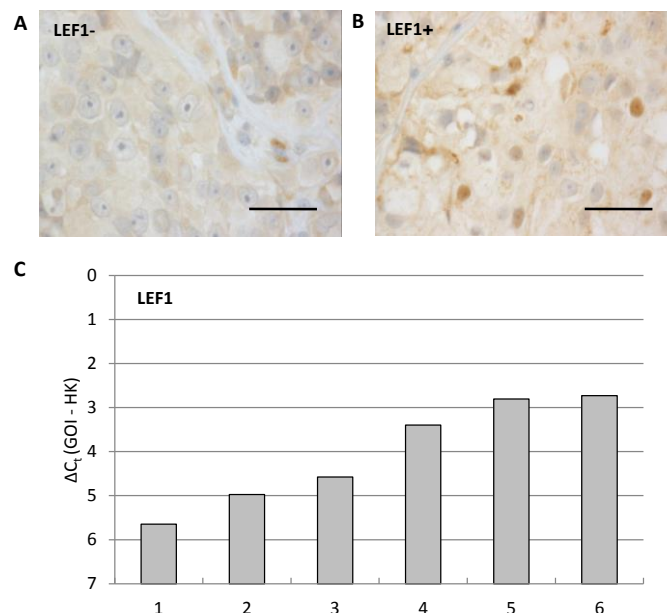


Abb. 3.22: LEF1 Expression in zerebralen Metastasen des Mammakarzinoms.

(A-B) IHC für LEF1 von einer Metastase, die keine LEF1 Expression aufweist (A) und einer Metastase mit nukleärer LEF1-Färbung (B). Der Maßstabsbalken kennzeichnet 50 μ m. (C) qRT-PCR für LEF1 in sechs zerebralen Metastasen (1-6). Auf der y-Achse ist der ΔC_t , d.h. C_t (Gen von Interesse (GOI)) – C_t (Referenzgen (HK)), einer repräsentativen Messung dargestellt.

3.3.2 Expression von LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren in Mammakarzinom-Zelllinien

Aufgrund der oben beschriebenen Beobachtungen stellten wir die Hypothese auf, dass eine gesteigerte LEF1 Expression charakteristisch für hoch invasive Zellen ist. Aus diesem Grund analysierten wir die LEF1-Expression ebenso wie die Expression der anderen LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren in mehreren Mammakarzinom-Zelllinien. Verglichen wurden die

wenig invasiven humanen Zelllinien MCF-7 und SK-BR3 mit der hoch invasiven humanen MDA-MB231 sowie die moderat invasive murine Zelllinie 410.4 mit den hoch invasiven murinen 4T1 Zellen. Zur Charakterisierung der Zellen wurde sowohl die Genexpression mittels qRT-PCR ermittelt (s. 2.7.1) als auch die Proteinexpression durch Western Blot Analysen bestimmt (s. 2.8.5).

In den wenig invasiven Zelllinien SK-BR3 und 410.4 konnte weder eine *LEF1* Genexpression nachgewiesen werden, noch war das Protein im Western Blot detektierbar. Auch in der schwach invasiven MCF-7 war kein LEF1 Protein nachweisbar, obwohl diese Zelllinie eine schwache Expression für dieses Gen aufwies. Im Gegensatz dazu war LEF1 in den beiden hoch invasiven Zelllinien MDA-MB231 und 4T1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene deutlich nachweisbar und wurde hier somit deutlich stärker exprimiert als in den schwach invasiven Zelllinien (s. Abb. 3.23). In MDA-MB231 war das Gen ca. 20× stärker exprimiert im Vergleich zu MCF-7.

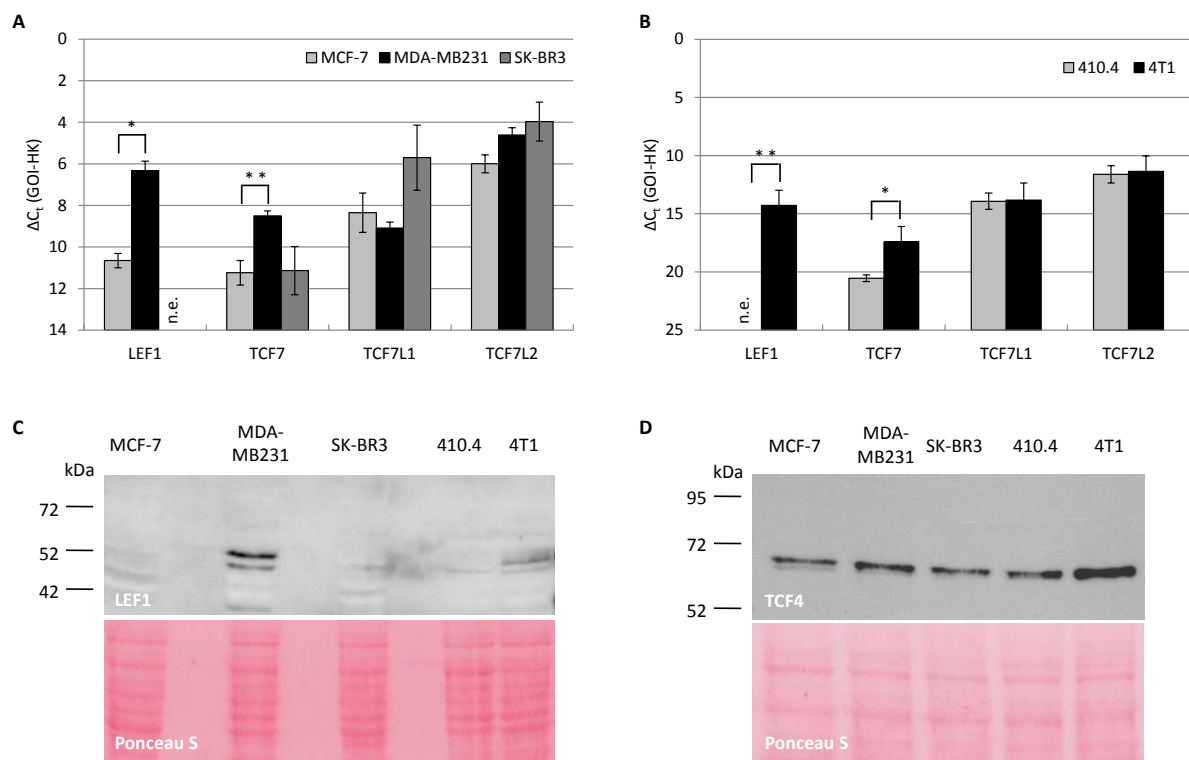


Abb. 3.23: LEF/TCF Expression in humanen und murinen Mammakarzinom-Zelllinien.

(A-B) qRT-PCR für die auf der x-Achse gekennzeichneten Gene in (A) humanen MCF-7 (hellgraue Balken), MDA-MB231 (schwarze Balken) sowie SK-BR3 (dunkelgraue Balken) und (B) murinen 410.4 (hellgraue Balken) bzw. 4T1 (schwarze Balken). Auf der y-Achse ist der ΔC_t , d.h. C_t (Gen von Interesse (GOI)) – C_t (Referenzgen (HK)), als Mittelwert von drei Experimenten \pm Standardabweichung dargestellt; * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; n.e. = nicht exprimiert. (C-D) Western Blot Analyse für die Proteine LEF1 (C) und TCF4 (D) in den humanen und murinen Mammakarzinom-Zelllinien. Für eine Ladekontrolle wurde die Membran mit Ponceau S gegengefärbt. Der Protein-Größenstandard ist in kDa angegeben. Die RNA- sowie Proteinisolierung erfolgte aus subkonfluenten Kulturen.

Auch für das Gen *TCF7* konnte gezeigt werden, dass es in den hoch invasiven Zelllinien signifikant stärker exprimiert wurde als in den schwach invasiven (s. Abb. 3.23 A und B). Die Genexpression war insgesamt jedoch sehr gering, so dass sie auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden konnte (nicht dargestellt). Die Expressionsanalyse für TCF3 (*TCF7L1*) und TCF4 (*TCF7L2*) zeigte keine Unterschiede zwischen den schwach und hoch invasiven Zelllinien, wobei für TCF3 keine Western Blot Analysen durchgeführt werden konnten, da kein Antikörper zur Verfügung stand.

3.3.3 LEF1-Überexpression in MCF-7 Zellen

Nachdem mittels qRT-PCR und Western Blot gezeigt werden konnte, dass eine verstärkte Expression von LEF1 charakteristisch für hoch invasive Zellen ist (s. 3.3.2), sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine Überexpression von LEF1 in MCF-7 Zellen zu einer Veränderung des Phänotyps der Zellen führt. Es sollte unter anderem geklärt werden, ob durch die LEF1-Überexpression die Proliferationsrate, der Zellzyklus, die Sensitivität gegenüber Chemotherapie oder Bestrahlung oder auch das Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen beeinflusst wird.

3.3.3.1 Konstruktion von LEF1 überexprimierenden Zellen

Zur Konstruktion von LEF1 überexprimierenden MCF-7 Zellen wurde der Vektor pIRES2-EGFP (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Dieser Vektor enthält eine „multiple cloning site“ (MCS) direkt vor einer „internal ribosome entry site“ (IRES)-Sequenz. Hinter der IRES-Sequenz ist das Gen „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) kodiert. Durch die Klonierung eines Gens in die MCS können sowohl das gewünschte Gen als auch das *EGFP*-Gen nach der Transfektion eukaryotischer Zellen gemeinsam von einer bicistronischen mRNA translatiert werden. Dies ermöglicht die Überexpression eines Gens in eukaryotischen Zellen zeitgleich mit der Expression von EGFP.

Um die für die Überexpression erforderlichen Plasmide zu konstruieren, dienten zwei bereits vorhandene Plasmide (nicht veröffentlicht) als Ausgangsmaterial. Das erste Plasmid, pSG5-LEF-FL-HA, basierte auf dem Vektor pSG5, in den unter Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* das *LEF1* Gen, welches zuvor mit einem HA-tag fusioniert worden war, integriert wurde. Das integrierte Fragment kodiert die native Gensequenz (= *full length*, FL). Das zweite Plasmid, pSG5-LEF-ΔHMG-HA, war identisch mit dem Plasmid pSG5-LEF-FL-HA bis auf den Unterschied, dass das integrierte LEF1-

Fragment nicht der nativen Gensequenz entsprach. In diesem Fragment ist der Bereich, der die HMG-Domäne des Proteins kodiert, deletiert (= Δ HMG).

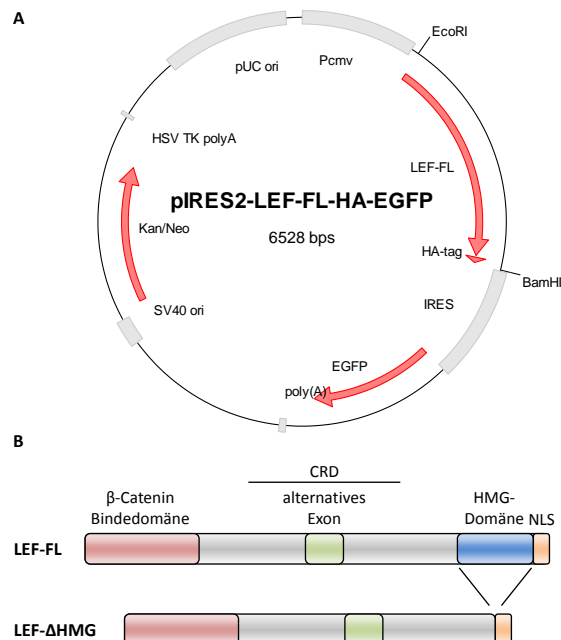


Abb. 3.24: Klonierung der LEF-Fragmente in pIRES2-EGFP.

(A) Plasmidkarte der konstruierten Plasmide am Beispiel von pIRES2-LEF-FL-HA-EGFP. Die LEF-FL cDNA mit C-terminalem HA-tag wurde unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* in den Vektor pIRES2-EGFP kloniert. Auf dem Plasmid kodierte Gene sind als rote Pfeile dargestellt, wichtige Regionen als grauer Kasten. (B) Schematische Darstellung der klonierten LEF-Fragmente.

Im ersten Schritt der Klonierung wurden die beiden LEF1-Fragmente unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* aus den Ausgangsplasmiden herausgeschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt (s. 2.6.3). Parallel wurde der Vektor pIRES2-EGFP mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Anschließend wurde der Vektor mit je einem LEF-Fragment ligiert (s. 2.6.4), bevor der Bakterienstamm *E. coli* DH5 α mit dem Ligationsansatz transformiert wurde (s. 2.4.2). Zur Überprüfung der erfolgreichen Integration des LEF1-Fragments in den Vektor wurden die Plasmide isoliert (s. 2.5.1) und im Anschluss eine PCR unter Verwendung der Oligonukleotide 01/02 (s. Tab. 2.1) durchgeführt. Abschließend wurden die Plasmide mit Hilfe der gleichen Oligonukleotide zur Überprüfung der Basensequenz sequenziert (s. 2.6.5). In Abb. 3.24 sind die konstruierten Plasmide und die klonierten LEF-Fragmente schematisch dargestellt.

Nach der erfolgten Subklonierung der LEF1-Fragmente wurden die resultierenden Plasmide pIRES2-LEF-FL-HA-EGFP und pIRES2-LEF- Δ HMG-HA-EGFP erneut aufgereinigt (s. 2.5.2) und anschließend MCF-7 Zellen mit je einem Plasmid stabil transfiziert (s. 2.9.4).

Für eine Kontrollzelllinie wurden MCF-7 Zellen ebenfalls mit dem Leervektor pIRES2-EGFP transfiziert. Um eine reine Population von transfizierten Zellen zu erhalten, wurden die Kulturen zweimal im Abstand von ca. drei Wochen mittels FACS sortiert und nur die Fraktion der EGFP-positiven Zellen weiter kultiviert. Die Überexpression des LEF1 Proteins wurde abschließend mittels Western Blot kontrolliert (s. Abb. 3.25).

Zur Vereinfachung werden die genetisch veränderten Zellen im Folgenden mit „EGFP“ (MCF-7 transfiziert mit dem Leervektor), „LEF-FL“ (MCF-7 transfiziert mit dem nativen LEF-Konstrukt) und „LEF- Δ HMG“ (MCF-7 transfiziert mit dem LEF-Konstrukt ohne HMG-Domäne) bezeichnet.

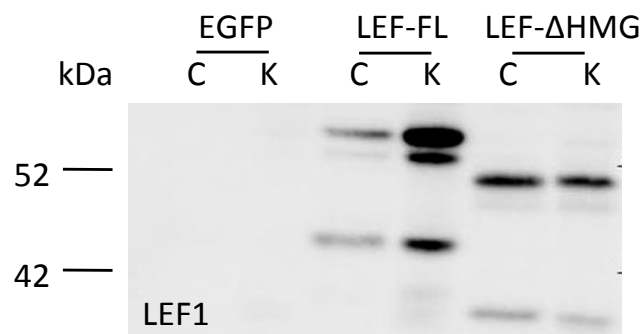


Abb. 3.25: Überexpression von LEF1 in MCF-7.

MCF-7 Zellen wurden stabil mit dem Leervektor pIRES2-EGFP (EGFP) oder mit dem Plasmid pIRES2-LEF-FL-HA-EGFP (LEF-FL) bzw. pIRES2-LEF- Δ HMG-HA-EGFP (LEF- Δ HMG) transfiziert. Zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion wurden die Cytosol- (C) und Kernproteine (K) aus den Zellen isoliert und ein Western Blot für LEF1 durchgeführt. Der Proteingrößenstandard ist in kDa dargestellt.

3.3.3.2 Charakterisierung der stabil transfizierten Zellen

Nachdem MCF-7 Zellen erfolgreich mit einem nativen LEF-Konstrukt bzw. mit einem LEF-Konstrukt, in dem die HMG-Domäne deletiert war, stabil transfiziert wurden, sollten diese Zellen in weiteren Schritten charakterisiert werden. Dabei sollte die Zellproliferation, der Zellzyklus, die Abhängigkeit von Östrogen, die Sensitivität gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung sowie die Fähigkeit, unter nicht-adhärenenten Bedingungen zu wachsen, analysiert werden.

Für die Untersuchung der Proliferation der stabil transfizierten Zellen wurden sowohl MTT-Assays (s. 2.9.5.1) als auch Proliferationsmessungen auf einer FACS-basierten Methode (s. 2.9.5.4) durchgeführt. Bei der Durchführung der MTT-Assays wurden die Zellen insgesamt für 120 h inkubiert, bevor die MTT-Reduktion gemessen wurde. Normalisiert wurden die Werte dabei auf die MTT-Reduktion von Zellen, die für 24 h inkubiert wurden, deren Wert auf 100% gesetzt wurde. Für die FACS-basierte Proliferationsmessung wurden die stabil transfizierten Zellen mit PKH26 gefärbt, für 0 h, 48 h bzw. 96 h inkubiert und

anschließend die Anzahl der Zellteilungen ermittelt. In beiden Assays zeigte sich, dass die Überexpression der LEF-Konstrukte in MCF-7 keinen Einfluss auf die Zellproliferation hatte. In allen Zellen steigerte sich die MTT-Reduktion nach 120 h Kultur auf ca. 300-350%, bezogen auf eine 24 h Kultur, und die Anzahl der Zellteilungen betrug ca. 1 (nach 48 h) bzw. 2,5 nach 96 h (s. Abb. 3.26).

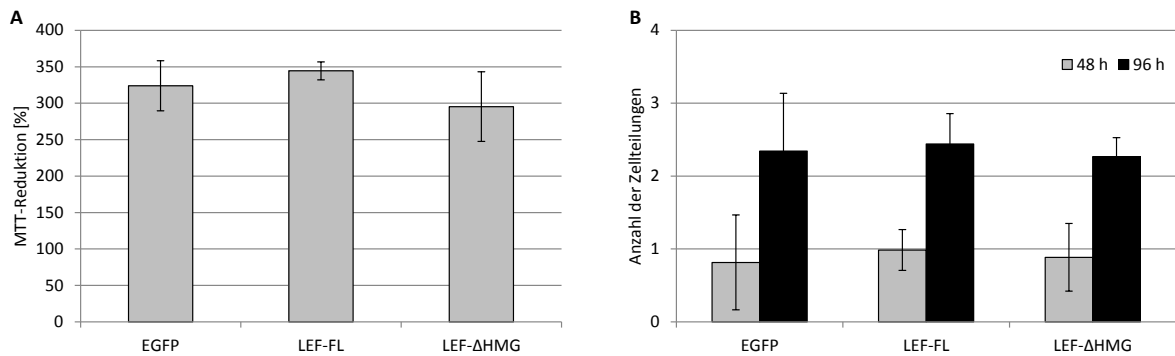


Abb. 3.26: Proliferation von LEF1 überexprimierenden MCF-7 Zellen.

(A) Stabil transfizierte MCF-7 Zellen (EGFP, LEF-FL und LEF-ΔHMG) wurden für 120 h inkubiert, bevor der MTT-Assay durchgeführt wurde. Die MTT-Reduktion wurde auf eine 24 h Kultur normalisiert, die auf 100% gesetzt wurde. (B) Die Anzahl der Zellteilungen (aufgetragen auf der y-Achse) wurde für die mit PKH26 gefärbten stabil transfizierten Zellen (EGFP, LEF-FL und LEF-ΔHMG) nach 48 h (graue Balken) und 96 h (schwarze Balken) Kultur mittels FACS ermittelt.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss der gesteigerten LEF1 Expression auf den Zellzyklus untersucht. Die Zellzyklusanalysen wurden wie in 2.9.8 beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich, dass auch der Zellzyklus von MCF-7 nicht durch die stabile Transfektion mit unterschiedlichen LEF-Konstrukten beeinflusst wurde (s. Abb. 3.27).

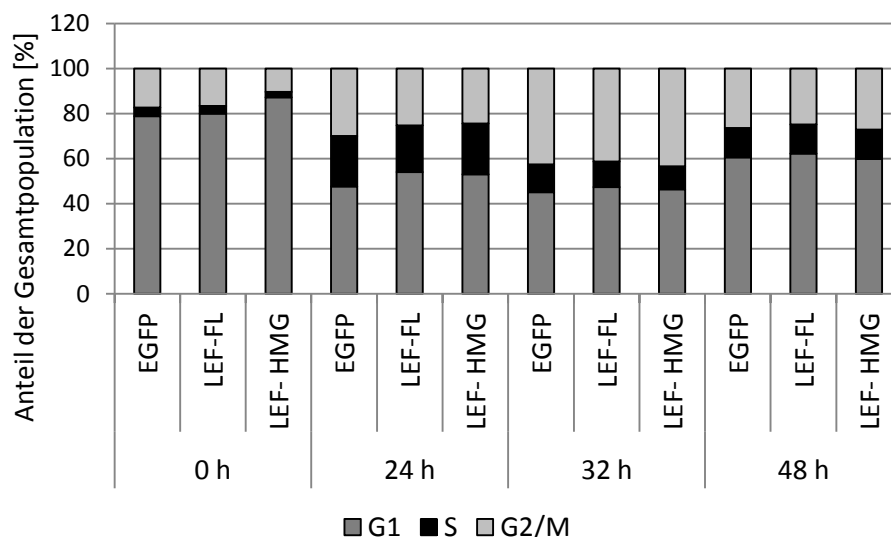


Abb. 3.27: Zellzyklus von LEF1 überexprimierenden MCF-7 Zellen.

EGFP, LEF-FL und LEF-ΔHMG Zellen wurden synchronisiert und die Zellzyklusanalyse nach 0 h, 24 h, 32 h und 48 h durchgeführt. Auf der y-Achse ist der Anteil der Gesamtpopulation, der sich in der G1-Phase (dunkelgrau), S-Phase (schwarz) bzw. G2/M-Phase (hellgrau) befindet, in % aufgetragen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Direkt nach der Synchronisation der Zellen befanden sich ca. 80% der Gesamtpopulation in der G1-Phase, ca. 3% in der S-Phase und ca. 16% in der G2/M-Phase. 24 h später lagen ca. 50% der Zellen in der G1-Phase vor und ca. 20% bzw. 30% in der S- und G2/M-Phase. Nach 32 h Kultur setzte sich die Gesamtpopulation wie folgt zusammen: ca. 45% G1-Phase, ca. 10% S-Phase und ca. 45% G2/M-Phase. Wurden die Zellen für 48 h inkubiert, lag die Phasenverteilung so vor wie man es in einer nicht synchronisierten Kultur beobachten kann. Ca. 60% der Zellen befanden sich in der G1-Phase, ca. 14% in der S-Phase und ca. 26% in der G2/M-Phase.

Aus früheren Publikationen gibt es Hinweise darauf, dass LEF1 eine antagonistische Wirkung auf die Regulation von Zielgenen des Östrogenrezeptors hat (Holmes et al 2008). Es stellte sich daher die Frage, ob eine verstärkte Expression von LEF1 in MCF-7 einen Einfluss auf die Abhängigkeit von Östrogen hat. Um diese Frage zu beantworten, wurden Kulturen der Zelllinien EGFP, LEF-FL und LEF- Δ HMG in Östrogen-freiem Medium angesetzt und die Zellproliferation nach sieben Tagen durch Anfärben der Zellen mit Kristallviolett nachgewiesen. Wie in Abb. 3.28 zu erkennen ist, waren die getesteten Zelllinien weiterhin von Östrogen abhängig, da in Östrogen-freiem Medium kein Wachstum nachzuweisen war.

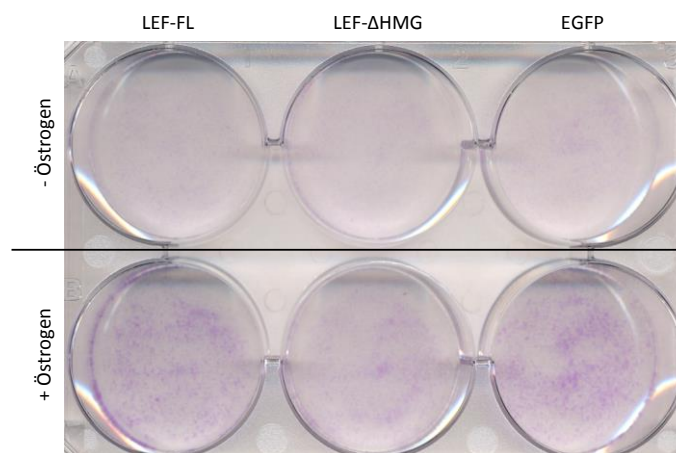


Abb. 3.28: Östrogen-Abhängigkeit von LEF1 überexprimierenden Zellen.

5×10^4 Zellen (EGFP, LEF-FL und LEF- Δ HMG) wurden in einem 6-well ausgesät und für sieben Tage in Östrogen-freiem Medium (obere Reihe) bzw. Medium, dem Östrogen zugefügt wurde (untere Reihe), kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 70% EtOH fixiert und mit 0,1% Kristallviolett gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Zwei weitere Eigenschaften, die in den LEF1-transfizierten Zellen analysiert wurden, waren zum einen die Sensitivität der Zellen gegenüber Chemotherapie und zum anderen die Resistenz gegenüber Bestrahlung. Für die Behandlung mit Chemotherapie wurden vier Medikamente eingesetzt, die in unterschiedliche Prozesse des Zellzyklus eingreifen. Cisplatin und Doxorubicin wurden gewählt, da sie die DNA-Synthese blockieren, Cycloheximid hemmt

die Translation und Tamoxifen wurde eingesetzt, da es zu einer kompetitiven Hemmung der Östrogenrezeptoren führt. Die transfizierten Zellen wurden 96 h mit jeweils einem dieser Medikamente behandelt, während die Proliferation der Zellen kontinuierlich über eine Messung der Konfluenz verfolgt wurde (s. 2.9.5.3). Jede Messung wurde im Anschluss auf den 0 h Wert normalisiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.29 zusammengefasst. Daraus ist zu entnehmen, dass alle getesteten Chemoreagenzien das Wachstum der stabil transfizierten Zellen hemmten. Erreichten die Zellen nach 96 h in der unbehandelten Kontrolle eine relative Konfluenz von 10, betrug diese nach der Behandlung mit Cisplatin bzw. Cycloheximid nur noch 2. Der wachstumshemmende Effekt von Tamoxifen und Doxorubicin war weniger stark ausgeprägt. Hier konnten relative Konfluenzen von 5 (Tamoxifen) bzw. 4 (Doxorubicin) gemessen werden. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass alle Zelllinien die gleiche Sensitivität gegenüber den Medikamenten aufweisen, da alle Wachstumskurven einer Bedingung gleich verlaufen.

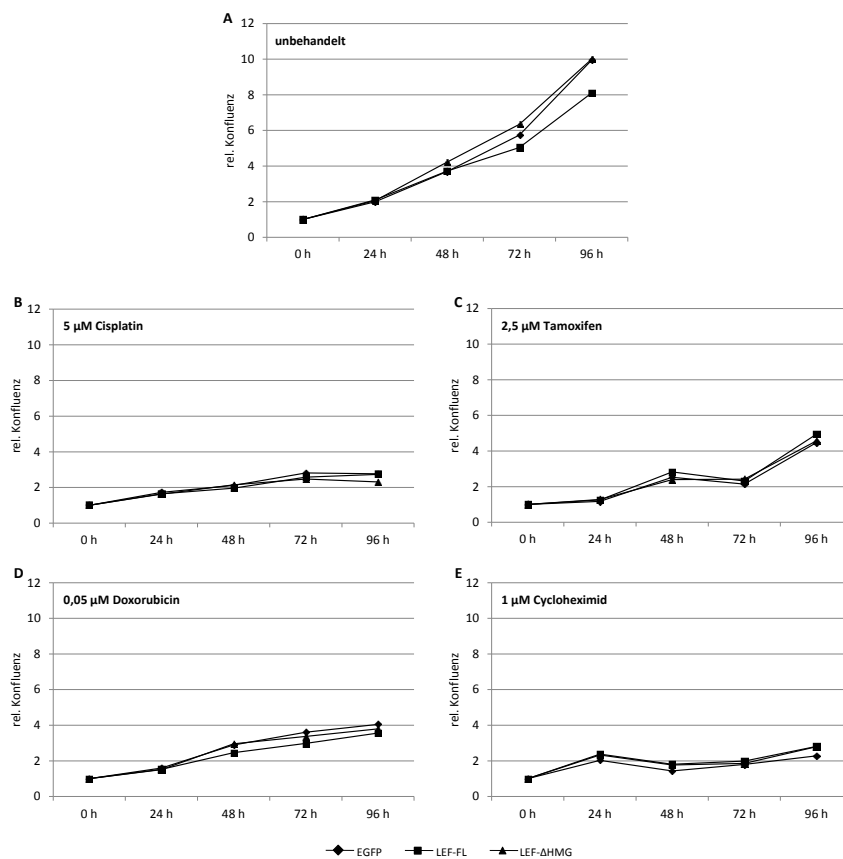


Abb. 3.29: Chemosensitivität von LEF1 überexprimierenden Zellen.

Das Wachstum der Zellen EGFP, LEF-FL und LEF- Δ HMG wurde für 96 h durch die tägliche Messung der Konfluenz mittels Celigo bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs für die nicht behandelte Kontrolle (A) und für Zellen, die mit 5 μ M Cisplatin (B), 2,5 μ M Tamoxifen (C), 0,05 μ M Doxorubicin (D) bzw. 1 μ M Cycloheximid (E) behandelt wurden. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden (h) aufgetragen, auf der y-Achse die relative Konfluenz normalisiert auf den 0 h-Wert, der auf 1 gesetzt wurde.

Bei der Analyse der Sensitivität der LEF1-transfizierten Zellen gegenüber Bestrahlung zeigte sich ein ähnliches Bild. Diese Versuche wurden, wie in 2.9.5.5 beschrieben, in Zusammenarbeit mit der Allgemein- und Viszeralchirurgie (Göttingen) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.30 dargestellt. Da in allen getesteten Zellen die Fähigkeit, nach Bestrahlung Kolonien zu bilden, sehr ähnlich ist, kann man daraus schließen, dass LEF1 keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Bestrahlung hat.

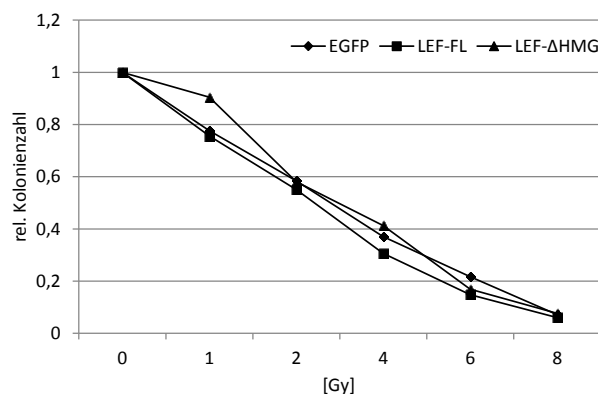


Abb. 3.30: Sensitivität von LEF1 überexprimierenden Zellen gegenüber Bestrahlung.

Die Zellen EGFP, LEF-FL und LEF- Δ HMG wurden einen Tag nach dem Ausplattieren mit der auf der x-Achse gekennzeichneten Dosis (Gy) bestrahlt. Das Auszählen der Kolonien erfolgte zu dem Zeitpunkt, als die meisten Kolonien eine Größe von ca. 50 Zellen aufwiesen. Die Anzahl der Kolonien wurde auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert, die auf 1 gesetzt wurde, und auf der y-Achse aufgetragen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Abschließend wurde im Rahmen der Charakterisierung der LEF1 überexprimierenden Zellen die Fähigkeit dieser Zellen in einer 3D-Kultur, d.h. ohne feste Anhaftung auf einer Oberfläche, untersucht. Dieser Assay zur Analyse des „*anchorage-independent growth*“ ist weit verbreitet, um die Aggressivität von Tumorzellen zu untersuchen (s.2.9.5.6). Er stellte einen wichtigen Aspekt der Charakterisierung der Zellen dar, da für die metastasierenden Zellen des Lungenadenokarzinoms gezeigt wurde, dass die Fähigkeit, in einer 3D-Kultur zu wachsen, ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zu den nicht metastasierenden Zellen war (Nguyen et al 2009b). Die Bildung und die Größe von Kolonien der Zellen EGFP, LEF-FL und LEF- Δ HMG wurde nach 30 Tagen Kultur dokumentiert (s. Abb. 3.31). Sowohl die Anzahl der Kolonien als auch ihre Größe war bei allen Zelllinien vergleichbar.

Zusammenfassend lässt sich für die Charakterisierung der LEF1 überexprimierenden Zellen sagen, dass der gesteigerte Gehalt des Transkriptionsfaktors keinen Einfluss auf eine der getesteten Zelleigenschaften hat.

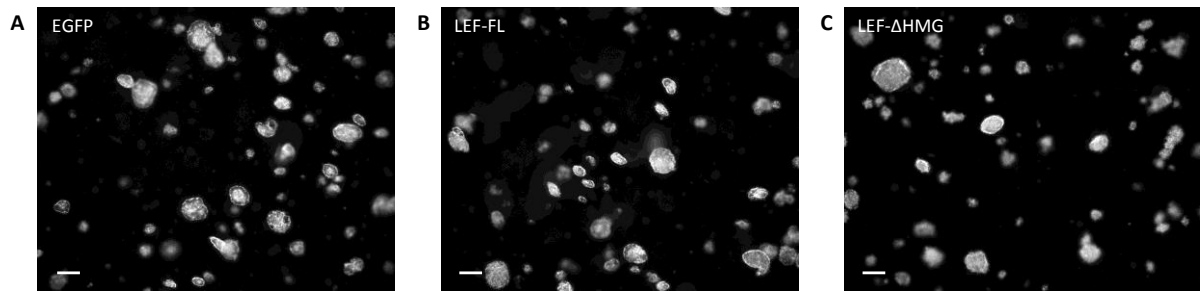


Abb. 3.31: Anchorage-independent growth von LEF1 überexprimierenden Zellen.

Die Zellen EGFP (A), LEF-FL (B) und LEF- Δ HMG (C) wurden in einem semi-soliden Kulturmedium ausgesät und für 30 Tage inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum der Kolonien mittels Hellfeld-Mikroskopie dokumentiert. Dargestellt ist je ein repräsentatives Ergebnis für jede Zelllinie. Der Maßstabsbalken kennzeichnet 200 μ m.

3.3.3.3 Einfluss von LEF1 auf die Migration

Nachdem in den oben beschriebenen Experimenten keine Unterschiede zwischen den stabil transfizierten Zellen beobachtet werden konnten, stellte sich die Frage, ob die gesteigerte Expression von LEF1 eine Auswirkung auf das Migrationsverhalten der Zellen hat. Im Fall des Melanoms konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von LEF1 vor allem in den stark migrierenden Zellen, jedoch nicht im Primärtumor, zu beobachten ist (Murakami et al 2001). Um den Einfluss der LEF1 Expression auf die Migration von Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurde ein ECM-basierter Migrationsassay (s. 2.10.2) durchgeführt. Bei diesem Versuch wurde nach 96 h Inkubation die Laufgeschwindigkeit der Zellen ermittelt (s. Abb. 3.32).

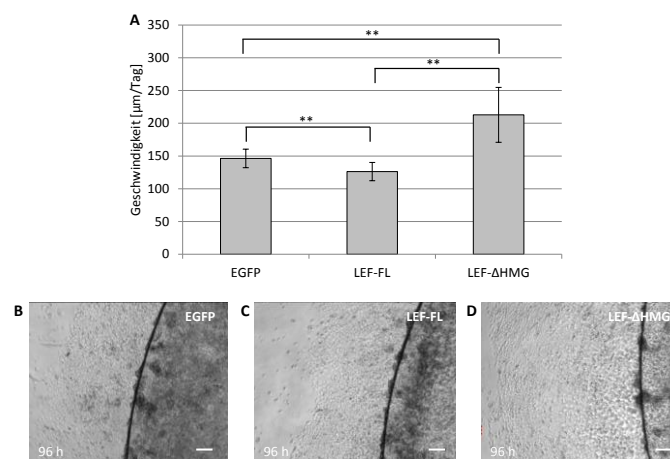


Abb. 3.32: Einfluss von LEF1 auf die Migration von MCF-7 Zellen.

ECM-basierter Migrationsassay für EGFP, LEF-FL und LEF- Δ HMG. (A) Dargestellt ist die Laufgeschwindigkeit in μ m/Tag für die auf der x-Achse gekennzeichneten Zelllinien. (B-D) Repräsentative Darstellung, mittels Hellfeld-Mikroskopie, der ausgewanderten Zellen EGFP (B), LEF-FL (C) und LEF- Δ HMG (D). Die Maßstabsbalken kennzeichnen 200 μ m.

Es zeigte sich, dass die erhöhte Expression von LEF-FL zur Folge hatte, dass die Zellen etwas langsamer migrierten (ca. 125 μ m/Tag) als die Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert

worden waren (ca. 150 $\mu\text{m}/\text{Tag}$). Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von LEF- ΔHMG zu einer gesteigerten Migrationsgeschwindigkeit (ca. 210 $\mu\text{m}/\text{Tag}$).

3.3.3.4 Einfluss von LEF1 auf die Invasivität

Es konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Expression von LEF- ΔHMG zu einer erhöhten Migrationsgeschwindigkeit führte, die Überexpression von LEF-FL jedoch zu einer leicht verringerten Geschwindigkeit (s. 3.3.3.3). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch die Invasivität von MCF-7 durch eine veränderte LEF1 Expression beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurden Invasionsversuche mit der modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt (s. 2.10.1).

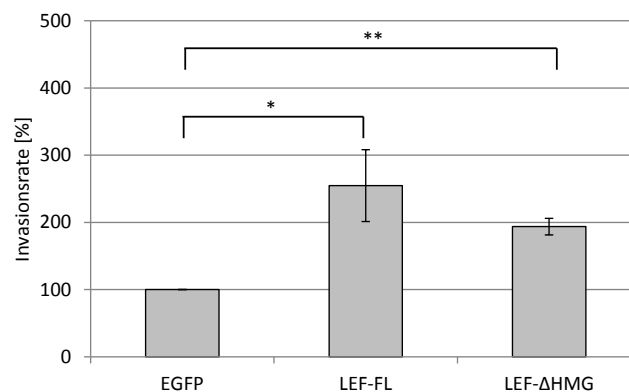


Abb. 3.33: Einfluss von LEF1 auf die Invasivität von MCF-7 Zellen.

1×10^5 Tumorzellen wurden in einer modifizierten Boyden-Kammer für 96 h kultiviert. Die Invasionsrate wurde dabei auf die Invasivität der Zellen EGFP bezogen, die auf 100% gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

Hierbei wurde die Invasionsrate der Zellen EGFP, LEF-FL und LEF- ΔHMG nach 96 h ermittelt. Den Ergebnissen dieses Versuchs (s. Abb. 3.33) ist zu entnehmen, dass sowohl die Überexpression des nativen LEF1 also auch des LEF- ΔHMG zu einer signifikanten Steigerung der Invasionsrate führte. Für die Zellen LEF-FL betrug sie ca. 250%, bezogen auf MCF-7 Zellen ohne LEF1 Überexpression (EGFP), deren Invasivität auf 100% gesetzt wurde. Im Gegensatz dazu war der Anstieg der Invasionsrate für die Zellen LEF- ΔHMG etwas geringer und betrug ca. 200%.

Im Weiteren sollte untersucht werden, worauf die gesteigerte Invasionsrate von MCF-7 nach der Überexpression von LEF-FL bzw. LEF- ΔHMG zurückzuführen ist. Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Invasivität war die, dass die Überexpression von LEF1 eine verstärkte Expression von EMT-Markern zur Folge hat. Diese Hypothese basierte auf dem Vergleich der Genexpression von MCF-7 und MDA-MB231, der gezeigt hatte, dass einige

EMT-Gene in der hoch invasiven MDA-MB231 stärker exprimiert sind als in der schwach invasiven MCF-7 (Florian Klemm, persönliche Kommunikation).

Zur Expressionsanalyse der EMT-Marker Vimentin, ZEB1 und SNAI1 sowie des Zelladhäsionsproteins E-Cadherin (CDH1) wurden qRT-PCR Versuche (s. 2.7.1) durchgeführt. Wie in Abb. 3.34 dargestellt ist, konnte keine veränderte Expression der EMT-Marker bzw. von *CDH1* aufgrund einer gesteigerten LEF1 Expression nachgewiesen werden. Die gesteigerte Invasivität der Zellen LEF-FL und LEF- Δ HMG lässt sich somit nicht auf eine Transformation der Zellen zu einem mesenchymalen Phänotyp zurückführen.

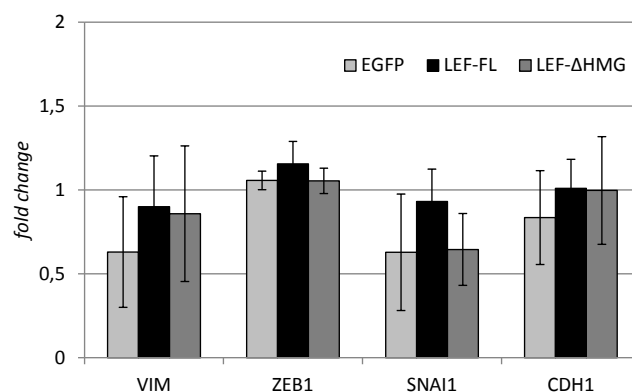


Abb. 3.34: Expression von EMT-Markern in LEF1 überexprimierenden Zellen.

qRT-PCR für die auf der x-Achse gekennzeichneten Gene in den Zellen EGFP (hellgraue Balken), LEF-FL (schwarze Balken) und LEF- Δ HMG (dunkelgraue Balken). Auf der y-Achse ist die relative Genexpression (*fold change*) als Mittelwert von drei Experimenten \pm Standardabweichung dargestellt. Die RNA-Isolation erfolgte aus subkonfluenten Kulturen.

3.3.3.5 Einfluss von LEF1 auf die Angiogenese

Es konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Expression von LEF1 zu einer erhöhten Invasionsrate von MCF-7 Zellen (s. Abb. 3.33) und somit zu einem aggressiveren Phänotyp führt. Eine weitere Eigenschaft, die aggressive Tumorzellen auszeichnet und die einen wichtigen Schritt in der Tumorprogression hin zum metastasierenden Tumor darstellt, ist die Fähigkeit, eine gesteigerte Angiogenese zu induzieren. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von LEF1 auf die Angiogenese des Mammakarzinoms mittels CAM-Assays, wie in 2.11 beschrieben, durchgeführt.

Bei der Auswertung der Versuche konnte kein Unterschied in der Größe der Tumore, die auf der CAM gewachsen waren, beobachtet werden. Es wurde jedoch deutlich, dass die Tumore, die aus den Zellen LEF-FL bzw. LEF- Δ HMG hervorgingen, stärker vaskularisiert waren als die Tumore, die aus den Zellen ohne gesteigerte LEF1 Expression (EGFP) hervorgingen

(s. Abb. 3.35). Dies zeigte sich in einer erhöhten Anzahl an Blutgefäßen, die auf die Tumore der Zellen LEF-FL und LEF- Δ HMG zuliefen.

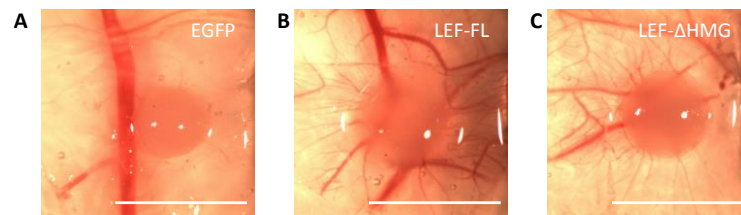


Abb. 3.35: Tumorwachstum und Vaskularisierung von LEF1 überexprimierenden Zellen.

CAM-Assay für die Zellen EGFP (A), LEF-FL (B) und LEF- Δ HMG (C). 3×10^6 Zellen, resuspendiert in $40 \mu\text{l}$ ECM, wurden für sieben Tage auf der CAM inkubiert, bevor die Tumore mittels Stereomikroskopie dokumentiert wurden.

3.3.3.6 Beeinflussung des kanonischen WNT-Signalwegs

Generiert man MCF-7 Zellen, die das native LEF1 bzw. LEF- Δ HMG überexprimieren, stellt sich die Frage, welchen Einfluss diese gesteigerte Expression auf andere Komponenten des kanonischen Signalwegs hat, und ob sie zu einer Aktivierung dieser Signalkaskade führt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde zunächst die Expression der Proteine TCF4 und β -Catenin mit Hilfe von Western Blot Analysen (s. 2.8.5) untersucht. Da im Fall einer Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs zu erwarten war, dass es zu einer Translokation von β -Catenin aus dem Cytosol in den Zellkern kommt, wurden die Cytosol- und Kernproteine, wie in 2.8.2 beschrieben, aufgereinigt und getrennt voneinander im Western Blot untersucht. Wie Abb. 3.36 zu entnehmen ist, konnte in den Zellen, die stabil mit LEF-FL bzw. LEF- Δ HMG transfiziert worden waren, weder eine Veränderung in der Expressionsstärke von β -Catenin noch eine Translokation dieses Proteins vom Cytosol in den Zellkern beobachtet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine gesteigerte LEF1 Expression nicht zu einer Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs führt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch die Expression des Transkriptionsfaktors TCF4 in keiner der stabil transfizierten Zellen verändert vorlag. Die TCF1 Expression lag in allen getesteten Zelllinien unter der Nachweisgrenze und wurde daher nicht dargestellt. Zum Nachweis einer erfolgreichen Auftrennung von Cytosol- und Kernproteinen wurde die Membran mit einem Antikörper gegen das Kernprotein HDAC1 gefärbt, das in allen Auftrennungen nur in der Kernfraktion nachzuweisen war.

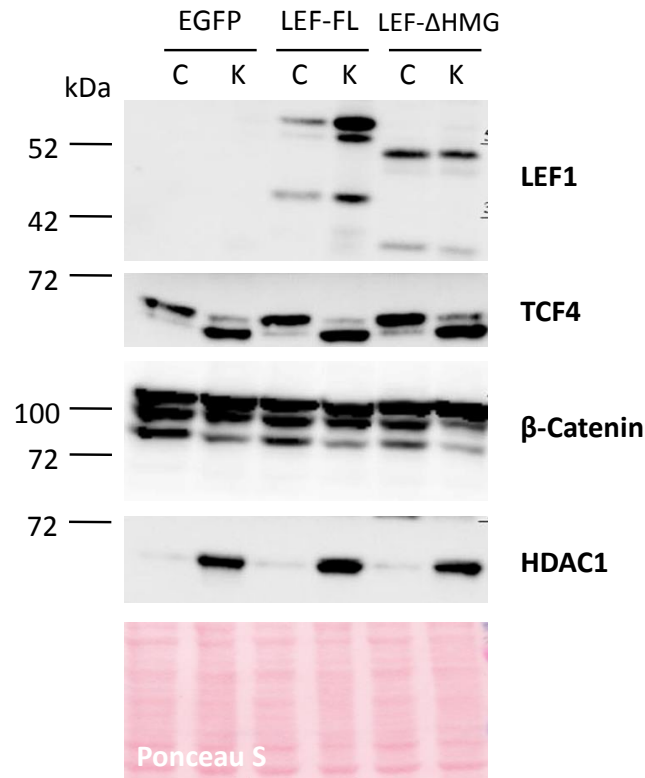


Abb. 3.36: Einfluss von LEF1 auf Komponenten des kanonischen WNT-Signalwegs.

Western Blot Analysen für die Proteine LEF1, TCF4 und β -Catenin in den Zellen EGFP, LEF-FL und LEF- Δ HMG. Die Cytosol- (C) und Kernproteine (K) wurden getrennt voneinander aufgetragen. Zum Nachweis der erfolgreichen Auftrennung beider Fraktionen wurde die Membran mit einem Antikörper gegen HDAC1 gefärbt. Für eine Ladekontrolle wurde die Membran mit Ponceau S gegengefärbt. Der Proteingrößenstandard ist in kDa dargestellt.

Eine weitere Methode, um die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs nachzuweisen, bietet der TOP/FOP*flash* Reporter Assay, der wie in 2.9.10 beschrieben, durchgeführt wurde. Da die Aktivierung des Signalwegs zu einer höheren TOP*flash* Aktivität führen würde, deuteten auch die Ergebnisse dieses Assays darauf hin, dass eine gesteigerte LEF1 Expression nicht zu einer erhöhten Aktivität des Signalwegs führt. Sowohl in den EGFP- als auch den LEF- Δ HMG-Zellen betrug das Verhältnis TOP/FOP ca. 2. In den Zellen, die LEF-FL überexprimierten, war das Verhältnis nicht signifikant auf ca. 2,3 erhöht. Zum Nachweis, dass der Assay erfolgreich durchgeführt wurde und die unveränderte Aktivität nicht auf einen systematischen Fehler zurückzuführen war, wurde dieser Assay ebenfalls mit SW480 Zellen durchgeführt. Diese Kolonkarzinom-Zelllinie enthält eine Mutation in dem Gen, das APC kodiert, wodurch der kanonische WNT-Signalweg konstitutiv aktiviert vorliegt. Daher war in diesen Zellen eine hohe TOP*flash* Reporteraktivität zu erwarten. Da das Verhältnis TOP/FOP in der Zelllinie SW480 ca. 6 betrug, konnte diese erhöhte Aktivität nachgewiesen werden (s. Abb. 3.37). Für eine weitere Positivkontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit einem konstitutiv aktiven β -Catenin-Konstrukt (β -Catenin S33Y) ko-transfiziert. Eine Steigerung der

TOPflash Aktivität konnte wie erwartet in den Zellen LEF-FL, jedoch nicht in LEF-ΔHMG nachgewiesen werden. Auch in den Zellen EGFP führte die Ko-Transfektion zu einer gesteigerten Reporteraktivität, diese war jedoch sehr gering. Hier betrug das TOP/FOP-Verhältnis nach Ko-Transfektion ca. 3, bei LEF-FL ca. 6. Die fehlende Zunahme der Reporteraktivität in den Zellen LEF-ΔHMG ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass dieses Konstrukt nicht an die DNA binden kann und somit den Reporter nicht induziert.

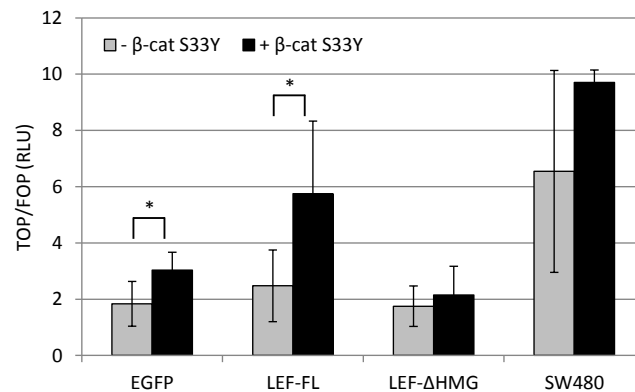


Abb. 3.37: Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs in LEF1 überexprimierenden Zellen.

TOP/FOPflash Reporterassay für die auf der x-Achse gekennzeichneten Zellen in Abwesenheit (graue Balken) bzw. Anwesenheit (schwarze Balken) eines konstitutiv aktiven β -Catenin (β -Catenin S33Y). Aufgetragen ist das Verhältnis der TOPflash und FOPflash Aktivität als Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

Sowohl die dargestellten Western Blot Analysen (s. Abb. 3.36) als auch der Nachweis der Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs mittels TOP/FOPflash Reporterassay (s. Abb. 3.37) deuten darauf hin, dass die Überexpression der unterschiedlichen LEF-Konstrukte in MCF-7 Zellen nicht zu einer verstärkten Interaktion mit β -Catenin und somit zu einer Aktivierung des Signalwegs führen. Um diese Hypothese zu stärken, wurden CoIP-Analysen durchgeführt (s. 2.8.6), in denen die Interaktion von LEF1 und β -Catenin untersucht wurde.

Im Fall der MCF-7 Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren, konnte im Eluat nach der IP von LEF1 das Protein β -Catenin nachgewiesen werden. Dies war jedoch auf eine Verunreinigung mit nicht komplexiertem β -Catenin zurückzuführen, da das Protein auch in einem Waschüberstand (Bahn Nr. 3) vorhanden war. Außerdem konnte in dem Input-Lysat, wie zu erwarten, kein LEF1 nachgewiesen werden, wodurch auch keine Interaktion der beiden Proteine ermöglicht wird. Aus diesem Grund konnte auch nach der IP von β -Catenin kein LEF1 nachgewiesen werden (s. Abb. 3.38 A).

Für die Zellen, die mit LEF-FL transfiziert worden waren, ergab sich ein ähnliches Bild (s. Abb. 3.38 B). Nach der erfolgreichen LEF1 Präzipitation konnte im Eluat auch β -Catenin nachgewiesen werden. Da es aber zu keiner Anreicherung des Proteins im Vergleich zum

Waschüberstand kam, war dies erneut auf eine Verunreinigung mit nicht komplexiertem Protein zurückzuführen. Dies wurde dadurch bestätigt, dass nach der IP von β -Catenin kein LEF1 im Eluat zu identifizieren war.

In Abb. 3.38 C sind die Ergebnisse der IP für die LEF- Δ HMG transfizierten Zellen dargestellt. Wie schon bei den Zellen EGFP und LEF-FL konnte auch hier weder nach der IP von LEF1 noch nach der IP von β -Catenin eine Interaktion der Proteine nachgewiesen werden.

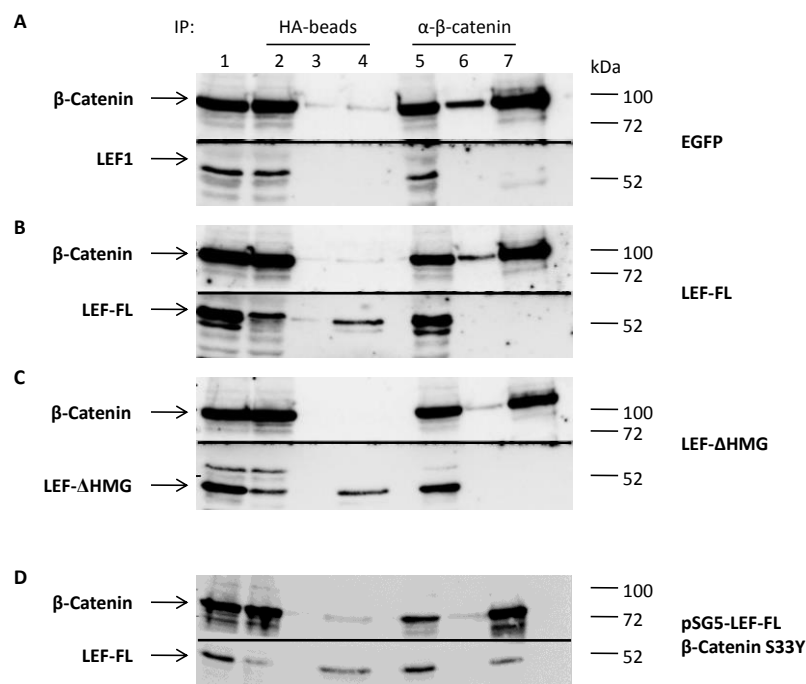


Abb. 3.38: Interaktion von LEF1 und β -Catenin in LEF1 überexprimierenden Zellen.

CoIP Analyse für die Zellen EGFP (A), LEF-FL (B), LEF- Δ HMG (C) und für Zellen, die transient mit LEF1 und β -Catenin S33Y ko-transfiziert wurden (D). Die Präzipitation (IP) erfolgte sowohl für LEF1 (HA-*beads*) als auch für β -Catenin (α - β -Catenin). Die anschließenden Western Blot Analysen wurden für die Proteine LEF1 und β -Catenin durchgeführt. Aufgetragen wurden jeweils das Input-Lysat (1), der erste Waschüberstand (2 + 5), der dritte Waschüberstand (3 + 6) sowie das Eluat (4 + 7). Der Proteingrößenstandard ist in kDa dargestellt.

Als Positivkontrolle für diese Methode dienten MCF-7 Zellen, die transient mit LEF1 und einem mutierten β -Catenin (S33Y) ko-transfiziert worden waren. Die Mutation des β -Catenin führt dazu, dass das Protein nicht mehr abgebaut wird und somit in der Zelle akkumuliert. Die Transfektion der Zellen mit LEF1 erhöht ebenfalls die Konzentration des Transkriptionsfaktors in der Zelle. Basierend auf diesen Voraussetzungen ist zu erwarten, dass unter Verwendung der korrekten Pufferbedingungen während der IP, eine Interaktion von LEF1 und β -Catenin nachgewiesen werden kann. Wie in Abb. 3.38 D zu erkennen ist, konnte die Interaktion der beiden Proteine nach einer Ko-Transfektion von MCF-7 Zellen gezeigt werden. In der ersten IP wurde LEF1, das mit einem HA-*tag* fusioniert war, unter Verwendung von HA-Agarose *beads* aus dem Lysat präzipitiert. In dem Proteinkomplex, der

von den Agarose *beads* eluiert wurde, konnte sowohl LEF1 als auch β -Catenin nachgewiesen werden (Bahn Nr. 4). Auch in der zweiten IP, bei der β -Catenin aus dem Lysat präzipitiert wurde, konnte in dem eluierten Proteinkomplex LEF1 identifiziert werden (Bahn Nr. 7).

Insgesamt stärken die beschriebenen Ergebnisse die Hypothese, dass die gesteigerte Expression von LEF1 nicht zu einer Interaktion mit β -Catenin und somit zu einer Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs führt.

3.3.3.7 Beeinflussung des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs

In früheren Arbeiten der Gruppe konnte gezeigt werden, dass in zerebralen Metastasen des Mammakarzinoms kein nukleäres β -Catenin nachweisbar war (Klemm et al 2011). Zusätzlich zu den oben beschriebenen Ergebnissen (s. 3.3.3.6) lässt diese Beobachtung vermuten, dass die LEF1 Expression im Mammakarzinom keine klassische Rolle im kanonischen WNT-Signalweg zusammen mit β -Catenin ausübt. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Auswirkung der gesteigerten LEF1 Expression auf zwei Proteine des nicht kanonischen WNT-Signalwegs, DVL3 und cJUN, mittels Western-Blot Analysen (s. 2.8.5) untersucht.

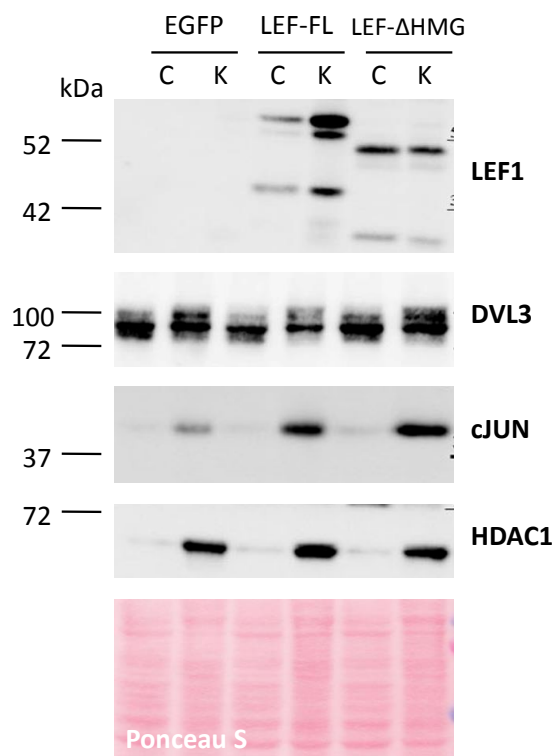


Abb. 3.39: Einfluss von LEF1 auf Komponenten des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs.

Western Blot Analysen für die Proteine LEF1, DVL3 und cJUN in den Zellen EGFP, LEF-FL und LEF- Δ HMG. Die Cytosol- (C) und Kernproteine (K) wurden getrennt voneinander aufgetragen. Zum Nachweis der erfolgreichen Auftrennung beider Fraktionen wurde die Membran mit einem Antikörper gegen HDAC1 gefärbt. Für eine Ladekontrolle wurde die Membran mit Ponceau S gegengefärbt. Der Proteingrößenstandard ist in kDa dargestellt.

Im Rahmen dieser Versuche erfolgte eine Analyse der Cytosol- und Kernproteine getrennt voneinander (s. 2.8.2). Es zeigte sich, dass sowohl die Überexpression von LEF-FL als auch von LEF- Δ HMG zu einer Anreicherung von cJUN in der nukleären Fraktion führte. Im Gegensatz dazu wies DVL3 in allen getesteten Zelllinien das gleiche Expressionsniveau auf (s. Abb. 3.39). Zum Nachweis einer erfolgreichen Auftrennung von Cytosol- und Kernproteinen wurde die Membran mit einem Antikörper gegen HDAC1 gefärbt. Dieses Protein war, wie zu erwarten, nur in der Kernfraktion nachzuweisen.

3.3.3.8 Relevanz einer LEF1-Signatur in zerebralen Metastasen

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Überexpression von LEF1 in MCF-7 Zellen zu einer gesteigerten Invasivität sowie zu einer vermehrten Angiogenese während des Tumorwachstums führt, stellte sich die Frage, ob LEF1 auch *in vivo* eine Relevanz aufweist. Aus diesem Grund wurde in Kooperation mit Dr. A. Bleckmann eine LEF1-Signatur generiert, die anschließend mit dem Gesamtüberleben und mit dem Fernmetastasen-freien Überleben von Lungenadeno- bzw. Mammakarzinompatienten korreliert wurde.

Zur Erstellung der LEF1-Signatur wurden MCF-7 Zellen mit dem Leervektor pSG5 (ctl) bzw. mit den Plasmiden pSG5-LEF-FL-HA (LEF-FL) oder pSG5-LEF- Δ HMG-HA (LEF- Δ HMG) transient transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die RNA isoliert (s. 2.5.3) und anschließend Microarrayanalysen durchgeführt (s. 2.7.2). In einem ersten Schritt wurden daraufhin die zwei Listen der hoch signifikant regulierten Gene (ctl vs. LEF-FL und ctl vs. LEF- Δ HMG) miteinander verglichen und die Gene, die in beiden Listen enthalten waren, in eine neue Liste aufgenommen. In einem zweiten Schritt wurde diese mit der Liste der differentiell exprimierten Gene in den Zellen MCF-7 und MDA-MB231 (Klemm et al 2011) verglichen. Dabei ergab sich eine Überschneidung von 52 Genen (s. Anhang Tab. 7.1). Diese Gene wurden in weiteren Analysen als LEF1-Signatur verwendet.

Im Folgenden wurde untersucht, ob, basierend auf der LEF1-Signatur, eine Aussage über den Krankheitsverlauf von Krebspatienten ermöglicht wird. Hierzu wurde die Signatur im Rahmen einer Clusteranalyse auf zwei Microarraydatensätzen getestet. Der erste Datensatz (GSE6532, GSE2990) umfasste 137 Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinome (Loi et al 2010, Sotiriou et al 2006). Der zweite Datensatz umfasste 129 Lungenadenokarzinome (Nguyen et al 2009b). Da in beiden Datensätzen sowohl das Gesamtüberleben der Patienten als auch der Zeitpunkt des Auftretens von Fernmetastasen annotiert war, konnte die LEF1-Signatur mit diesen Daten korreliert werden.

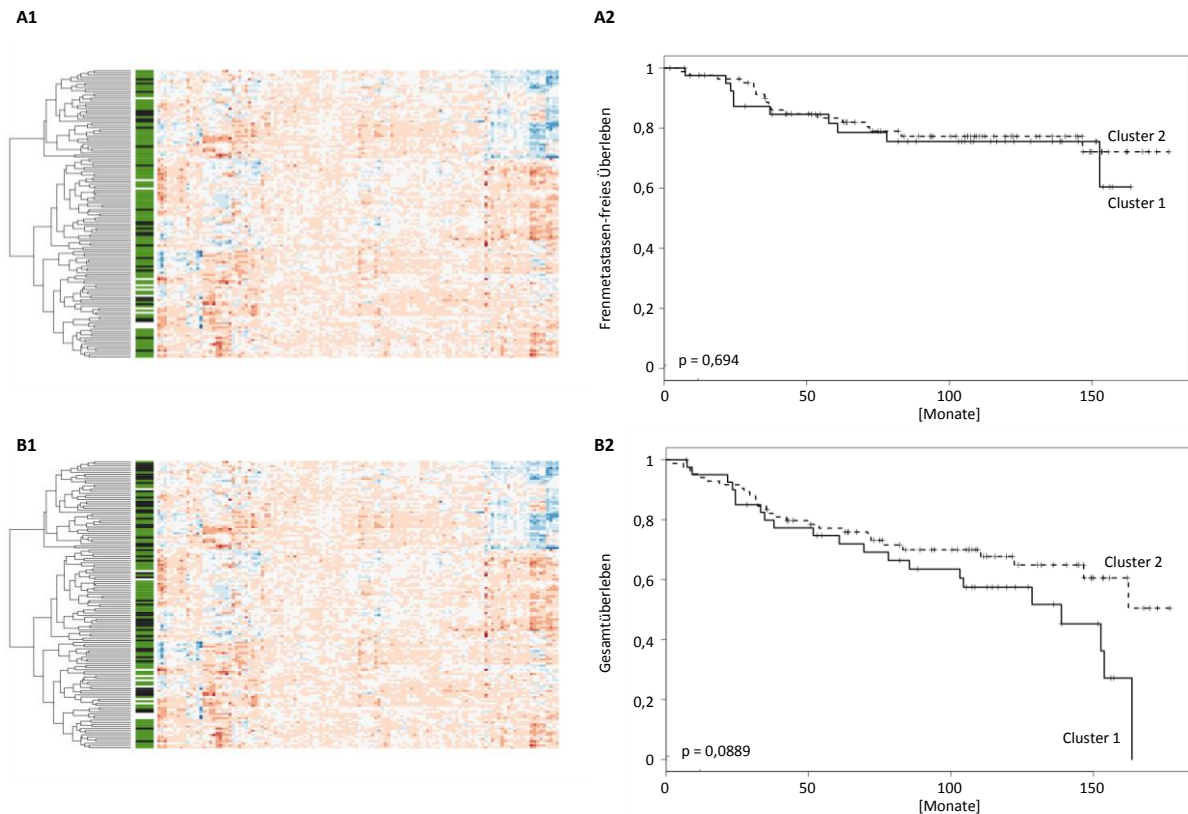


Abb. 3.40: Clusteranalyse für die LEF1-Signatur im Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom.

(A) Analyse des Fernmetastasen-freien Überlebens. (A1) Die *heatmap* der Clusteranalyse zeigt die Auftrennung in zwei große Cluster. Die Spalte neben der *heatmap* kennzeichnet Patienten, bei denen keine Fernmetastasen aufgetreten sind (grüne Balken), Patienten, bei denen Fernmetastasen nachgewiesen wurden (schwarze Balken), und Patienten, bei denen keine Angaben vorliegen (weiße Balken). (A2) Kaplan-Meier-Kurve für den Verlauf des Fernmetastasen-freien Überlebens der beiden Cluster. (B) Analyse des Gesamtüberlebens. (B1) Die *heatmap* der Clusteranalyse zeigt die Auftrennung in zwei große Cluster. Die Spalte neben der *heatmap* kennzeichnet überlebende Patienten (grüne Balken), verstorbene Patienten (schwarze Balken) und Patienten, bei denen keine Angaben vorliegen (weiße Balken). (A2) Kaplan-Meier-Kurve für den Verlauf des Gesamtüberlebens der beiden Cluster.

Die Clusteranalyse zeigte, dass die LEF1-Signatur in beiden Datensätzen zwei Cluster voneinander trennen konnte. Im Fall der Mammakarzinome konnte kein Unterschied im Fernmetastasen-freien Überleben zwischen den beiden Clustern nachgewiesen werden (s. Abb. 3.40 A). Die Analyse des Gesamtüberlebens verdeutlichte aber einen schlechteren Verlauf eines Clusters, auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war (s. Abb. 3.40 B).

Die Korrelation der zwei Cluster des Lungenadenokarzinom-Datensatzes mit dem Fernmetastasen-freien Überleben bzw. Gesamtüberleben ergab einen signifikanten Unterschied im Fernmetastasen-freien Überleben, der sich tendenziell auch auf das Gesamtüberleben auswirkte (s. Abb. 3.41). Somit scheint die LEF1-Signatur bei beiden Karzinomkrankungen eine prognostische Bedeutung zu haben, die aber noch an weiteren Datensätzen oder mit längeren Verläufen untersucht werden sollte.

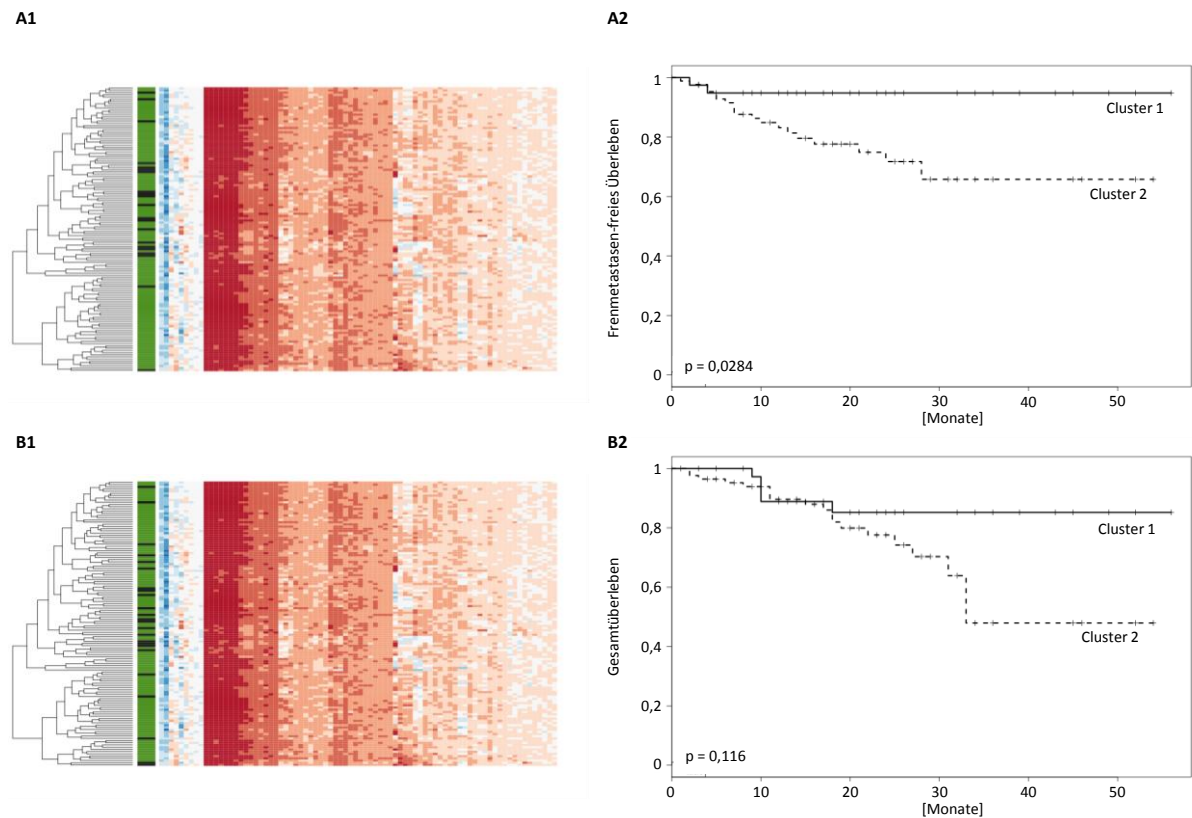


Abb. 3.41: Clusteranalyse für die LEF1-Signatur im Lungenadenokarzinom.

(A) Analyse des Fernmetastasen-freien Überlebens. (A1) Die *heatmap* der Clusteranalyse zeigt die Auftrennung in zwei große Cluster. Die Spalte neben der *heatmap* kennzeichnet Patienten, bei denen keine Fernmetastasen aufgetreten sind (grüne Balken) und Patienten, bei denen Fernmetastasen nachgewiesen wurden (schwarze Balken). (A2) Kaplan-Meier-Kurve für den Verlauf des Fernmetastasen-freien Überlebens der beiden Cluster. (B) Analyse des Gesamtüberlebens. (B1) Die *heatmap* der Clusteranalyse zeigt die Auftrennung in zwei große Cluster. Die Spalte neben der *heatmap* kennzeichnet überlebende Patienten (grüne Balken) und verstorbene Patienten (schwarze Balken). (A2) Kaplan-Meier-Kurve für den Verlauf des Gesamtüberlebens der beiden Cluster.

4 Diskussion

4.1 Eignung organotypischer Leberschnitt Kulturen zur Analyse der Kupffer-Stern-Zell-induzierten Tumorinvasion

Es ist heute unumstritten, dass TAMs einen positiven Einfluss auf die Tumorprogression haben können, indem sie nicht nur die Proliferation maligner Zellen induzieren, sondern auch die Migration und Invasion sowie die Intravasation fördern. Die Rolle residenter Gewebsmakrophagen ist erst wenig untersucht worden. Die Tatsache, dass die Organe, in denen bevorzugt Metastasen auftreten, eine residente Makrophagenpopulation enthalten, legt jedoch die Vermutung nahe, dass diese Zellen eine wichtige Funktion in der Kolonisation maligner Zellen in einem entfernten Organ übernehmen. Bereits gewonnene Erkenntnisse über die Rolle residenter Makrophagen in der Tumorprogression basieren in der Regel auf *in vitro* Experimenten in der Zellkultur oder auf *in vivo* Tierversuchen. Zellkultur-Experimente haben den Nachteil, dass die Untersuchungen mit aufgereinigten Zellpopulationen durchgeführt werden. Dieser Ansatz ist wichtig, um grundlegende Eigenschaften einzelner Zellen zu analysieren, sie ermöglicht jedoch keine Rückschlüsse auf Effekte, die durch die Interaktion unterschiedlicher Zellen in einem Zellverband, wie z.B. in einem Organ, hervorgerufen werden. In diesem Zusammenhang stellen daher die Tiermodelle einen besseren Ansatz dar. Zur Untersuchung spezifischer Makrophagenpopulationen sind jedoch auch sie nicht geeignet. Aufgrund fehlender selektiver Marker können unterschiedliche Makrophagen nicht eindeutig voneinander unterschieden werden. Daher ist keine Diskriminierung zwischen residenten Makrophagen eines Gewebes und Makrophagen, die über den Blutkreislauf zu einem späteren Zeitpunkt in das Gewebe eingewandert sind, möglich. Zudem gibt es nur sehr wenig *in vivo* Modelle, die eine spontane Fernmetastasierung aufweisen.

Um die beschriebenen Nachteile der zwei Versuchsansätze zu umgehen, konnte in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich ein organotypisches Hirnschnitt Ko-Kultur Modell etabliert werden (Pukrop et al 2010). Dieses Modell ermöglicht die Ko-Kultur von Tumorzellen mit Hirngewebe in einem direkten Zell-Zell-Kontakt über mehrere Tage und die Untersuchung der Kolonisation des Hirngewebes durch unterschiedliche Tumorzellen. Aufgrund der 3D-Struktur des Hirnschnittes wird die tatsächliche Gewebezusammensetzung mit den auftretenden Interaktionen zwischen unterschiedlichen Zellen dabei aufrechterhalten.

Aufgrund der fehlenden Blutversorgung in dem Gewebeschnitt können keine peripheren Makrophagen in das Gewebe einwandern. Auf diese Weise wird die Identifizierung der residenten Makrophagen ermöglicht. Folglich können Einflüsse auf die Invasion und Kolonisation maligner Zellen im Gewebe aufgeklärt werden, die spezifisch durch MG Zellen hervorgerufen werden.

In Anlehnung an das beschriebene Hirnschnitt Ko-Kultur Modell (s. 2.10.3) sollte im Rahmen dieser Arbeit ein zweites Modell, die organotypische Leberschnitt Kultur, etabliert werden. Mit Hilfe dieses Modells sollte die Funktion der Kupffer-Stern Zellen in der Invasion und Kolonisation maligner Zellen im Lebergewebe untersucht werden. Organotypische Leberschnitt Kulturen finden seit vielen Jahren Anwendung in der Untersuchung der Verstoffwechselung, der Toxizität und des Transports von Medikamenten (de Graaf et al 2010, Olinga et al 1997b, Olinga et al 2001, Shigematsu et al 2000). Dabei kommen unterschiedliche Kultivierungsmethoden zum Einsatz, bei denen der Leberschnitt in der Regel vom Kulturmedium umgeben ist (Olinga et al 1997a). Diese sind daher nicht für eine Ko-Kultur mit Tumorzellen in einem direkten Zell-Zell-Kontakt geeignet. Weiterhin wird die Viabilität der Leberschnitte in diesen Systemen für maximal 48 h aufrechterhalten. Zur Untersuchung der Invasion von Tumorzellen in das Gewebe ist das ein zu geringer Zeitraum.

Wir entschieden uns daher für eine Kultivierungsmethode, die der bereits etablierten organotypischen Hirnschnittkultur entsprach (s. 3.1.1). Viabilitätsmessung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Präparation der Leberschnitte verdeutlichten jedoch, dass die Hepatozyten im Gewebe bereits nach 24 h Stunden abstarben. Diese Beobachtung widerspricht den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Verrill et al. Diese Gruppe verwendete die gleiche Kultivierungsmethode für Leberschnitte, konnte aber zeigen, dass die mittlere Viabilität der Hepatozyten nach einer siebentägigen Kultur noch 35% betrug (Verrill et al 2002). Da die Gruppe ebenfalls Lebern aus neugeborenen Mäusen präparierte, könnten die abweichenden Ergebnisse auf eine andere Präparationsmethode oder auf eine andere Medienzusammensetzung zurückzuführen sein.

Die histologische Auswertung von Leberschnitten, die unterschiedlich lange kultiviert worden waren, ergab, dass im Randbereich des Gewebes auch nach sechs Tagen Kultur noch viable Zellen vorzufinden waren (s. Abb. 3.3). Dies lässt vermuten, dass eine zu geringe Diffusion des Mediums in das Gewebe die Ursache für das Absterben der Hepatozyten im Zentrum des Schnittes ist. Die Vermutung wird gestützt durch Beobachtungen von Verrill et al, die ebenfalls einen Gradienten der Viabilität von Hepatozyten im Leberschnitt nachweisen

konnten (Verrill et al 2002). Die Verringerung der Schnittdicke sowie zusätzliches Medium im *insert* führte jedoch nicht zu einer gesteigerten Viabilität.

Durch die Präparation der Leberschnitte werden zwei Schnittflächen erzeugt, an denen das Gewebe beschädigt wird. Lebergewebe reagiert auf Beschädigung mit einer Induktion der Geweberegeneration. Die durchgeführten *time-lapse* Experimente lassen vermuten, dass auch in unserem System diese Regeneration sofort induziert wird (s. Film 1, DVD). Dies führt jedoch zu Problemen, wenn man Effekte der Kupffer-Stern-Zellen auf die Invasion maligner Zellen untersuchen möchte. Zum einen können das Auswandern der Leberzellen aus dem Gewebe und die anschließende Kontraktion zur Folge haben, dass durch diesen Vorgang Tumorzellen in das Gewebe aufgenommen werden. Es stellt sich die Frage, ob dieser Mechanismus von einer möglichen Makrophagen-induzierten Invasion klar abzugrenzen ist. Zum anderen ist die Regeneration des Lebergewebes mit einer gesteigerten Aktivität von MMP-2 und MMP-9 verbunden (Kim et al 2000). Für diese beiden Proteasen konnte gezeigt werden, dass sie wichtige Vermittler der Makrophagen-induzierten Invasion sind (Hagemann et al 2004). Falls sie ebenfalls in der möglichen Kupffer-Zell-induzierten Invasion eine Rolle spielen sollten, wären auch in diesem Fall die Effekte nicht von Auswirkungen der Regeneration des Gewebes abzutrennen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Etablierung der organotypischen Leberschnitt Kultur nicht erfolgreich war und sie unter den gegebenen Bedingungen nicht zur Untersuchung der Effekte der Kupffer-Stern Zellen auf die Invasion und Kolonisation von Tumorzellen verwendet werden kann. Ob eine Langzeitkultivierung von Lebergewebe überhaupt möglich ist, ist fraglich. So konnte in einem Modell für die Rattenleber auch die Verwendung einer Konservierungslösung während der gesamten Präparation, eine neue Kultivierungsmethode, sowie eine Optimierung des Kulturmediums die Viabilität der Schnitte auf nur 96 h verlängern (Vickers et al 2004).

4.2 ZA besitzt Potential in der Therapie fortgeschrittener Tumorerkrankungen außerhalb des Knochens

Zahlreiche Studien belegen die Tumor hemmenden Eigenschaften der BPs. Die Mehrzahl dieser Untersuchungen konzentriert sich dabei einerseits auf die Osteoklasten-vermittelte Hemmung des Tumorwachstums oder der Tumorerkrankung. Auf der anderen Seite verdeutlichen Publikationen, dass die BPs direkt die Tumorzellen beeinflussen können. Obwohl die hemmende Wirkung der BPs auf Osteoklasten bekannt ist, wurden erst in

wenigen Studien die Auswirkungen dieser Substanzen auf TAMs bzw. residente Gewebemakrophagen und die damit verbundenen Effekte auf die Tumorprogression analysiert. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, welche Tumor hemmenden Effekte von ZA auf eine Beeinflussung der Makrophagen zurückzuführen sind.

Mit Hilfe von Toxizitätsmessungen konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Makrophagen eine sehr viel höhere Sensitivität gegenüber ZA aufweisen als die Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB231 (s. 3.2.1.1). Diese Beobachtung ist nachvollziehbar, wenn man berücksichtigt, dass BPs ihre Wirkung intrazellulär ausüben und durch Phagozytose internalisiert werden können. Makrophagen weisen im Vergleich zu Tumorzellen eine viel höhere Phagozytoserate auf und akkumulieren daher deutlich höhere Mengen der N-BPs im Cytosol. Die höhere Sensitivität der Makrophagen gegenüber dem N-BP deutet darauf hin, dass die Tumor-hemmenden Effekte bei niedrigen ZA Konzentrationen eher auf eine Hemmung der Makrophagen zurückzuführen sind und weniger auf eine direkte Beeinflussung der malignen Zellen.

Um diese Hypothese zu stützen, wurden Invasionsversuche in der modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt, bei denen Ko-Kulturen von MCF-7 Zellen und Makrophagen mit einer ZA-Konzentration (1 μM) behandelt wurden, die eine toxische Wirkung auf Makrophagen, jedoch nicht auf MCF-7 Zellen gezeigt hatte. Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten eine signifikante Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasion von MCF-7 Zellen in allen untersuchten Ko-Kulturen (s. Abb. 3.10). Um auszuschließen, dass die Migrations- und Invasionseigenschaften der Tumorzellen durch 1 μM ZA beeinflusst werden, wurden zuvor entsprechende Kontrollversuche durchgeführt. In Migrationsversuchen für MCF-7 und MDA-MB231, bei denen eine Behandlung der Zellen mit 2 μM ZA erfolgte, konnte, übereinstimmend mit Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, keine Hemmung der Migration durch ZA beobachtet werden (s. Abb. 3.9) (Boissier et al 2000). Auch wenn für die Zelllinie MDA-MB231 bereits gezeigt werden konnte, dass ZA in einer Konzentration von 1 μM die Invasivität der Zellen inhibiert, scheint dies nicht für MCF-7 zu gelten (Boissier et al 2000, Denoyelle et al 2003). Nach einer Stimulation der Zellen mit WNT5A wurde die induzierte Invasion von MCF-7 bei einer Konzentration von 1 μM ZA nicht inhibiert. Erst bei einer Konzentration von 2 μM kam es zu einer geringen Reduktion der WNT5A-induzierten Invasion.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Effekte von ZA auf die Invasion und Kolonisation von MCF-7 Zellen in Hirngewebe untersucht. Die Ko-Kulturen wurden dabei mit 2 μM ZA behandelt, nachdem eine toxische Wirkung der Substanz auf das Gewebe ausgeschlossen werden konnte (s. Abb. 3.11). Analysen mittels qRT-PCR verdeutlichten, dass die Behandlung mit ZA zu einer selektiven Depletion der MG in dem Schnitt führt. Dies zeigt sich in einer Herunterregulation der Makrophagen-spezifischen Marker *Csf-1r* und *F4/80* und einer unveränderten Expression des Astrozyten-spezifischen Markers *Gfap*. Ebenso verdeutlicht die konstant bleibende Expression der Wachstumsfaktoren *Il-34* und *Csf-1* die selektive Depletion der MG. Die anschließende Auswertung der Invasionsversuche zeigte, dass ZA die MG-assistierte Invasion von MCF-7 Zellen signifikant reduzierte (s. Abb. 3.12). Auch für das BP Clodronat konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass es selektiv MG inhibiert und auf diese Weise die Invasivität von Mammakarzinomzellen hemmt (Pukrop et al 2010). Daher lässt sich vermuten, dass die Hemmung der MG eine generelle Wirkung der BPs darstellt.

Zusammenfassend deuten die beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass bei niedrigen Konzentrationen von ZA ein Mechanismus zur Hemmung der Tumordinvasion auf indirekten Effekten durch Beeinflussung der Makrophagen beruht. Erst bei hohen Konzentrationen des N-BP tritt eine zusätzliche Beeinflussung der Tumorzellen auf. Auch *in vivo* sind außerhalb des Knochens vermutlich die indirekten Tumor hemmenden Effekte von ZA von größerer Relevanz als die direkte Beeinflussung der malignen Zellen. Diese Annahme beruht auf der Tatsache, dass nach der Behandlung von Patienten mit ZA eine maximale Serumkonzentration von 1-3 μM nachgewiesen werden kann (Morgan and Lipton 2010, Tsagozis et al 2008).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Mechanismen beschrieben, die die Makrophagen-induzierte Invasion von Tumorzellen vermitteln. Nachdem die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hindeuteten, dass ZA in niedrigen Konzentrationen zunächst nur Auswirkungen auf die Makrophagen, jedoch nicht auf die Tumorzellen hat, stellte sich die Frage, welche Makrophagen-induzierten Effekte durch ZA beeinflusst werden. Im Fall der beiden murinen Makrophagenpopulationen MG und BMDM lässt sich die inhibierende Auswirkung einer ZA Behandlung dadurch erklären, dass bereits niedrige Konzentrationen des N-BP letale Auswirkungen auf die Makrophagen haben und diese in Folge dessen ihre Tumor fördernden Eigenschaften nicht mehr ausüben können. Die in den Versuchen eingesetzten ZA-Konzentrationen führen jedoch nicht zu einem Absterben der humanen Makrophagen. Folglich liegt hier ein anderer Mechanismus zu Grunde. Einen wichtigen Mediator zur

erfolgreichen Invasion von Tumorzellen stellen MMPs dar. Diese werden in einer Ko-Kultur mit Tumorzellen in TAMs hochreguliert und sind ein Grund für die gesteigerte Invasion der malignen Zellen (Hagemann et al 2004, Pukrop et al 2006). Eine Hemmung der Expression von MMP-2 und MMP-9 in Zellen des nasopharyngealen Karzinoms durch die Behandlung mit 10-40 μM ZA konnte bereits nachgewiesen werden (Li et al 2012). Aber auch für TAMs des Prostatakarzinoms konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung der Zellen mit 20 μM ZA zu einer signifikanten Reduktion der MMP-9 Expression führte, ohne die Viabilität der Makrophagen zu beeinflussen (Tsagozis et al 2008). Ebenso führte die Behandlung mit ZA *in vivo* zu einer Reduktion der MMP-9 Expression in TAMs des Zervixkarzinoms (Giraud et al 2004). Aus diesem Grund war nicht auszuschließen, dass die Hemmung der M Φ -induzierten Invasion durch 1 μM ZA auf einer Inhibierung von MMPs in M Φ beruht. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass der beschriebene Mechanismus in dem untersuchten System nicht von Relevanz ist. Die Ko-Kultur von M Φ mit MCF-7 Zellen führte wie erwartet zu einer leicht gesteigerten Expression von MMP-9 in den M Φ , die Behandlung mit ZA hatte jedoch keinen Einfluss auf diese Expression (s. Abb. 3.13). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Resultaten der Arbeitsgruppe um Valleala et al, die zeigen konnte, dass sowohl Clodronat (30-1000 μM) als auch Pamidronat (100-300 μM) in humanen Makrophagen, ausdifferenziert aus Monozyten des peripheren Bluts, die Expression von MMP-9 nach LPS-Stimulation inhibieren (Valleala et al 2003). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass Pamidronat zunächst eine gesteigerte MMP-9 Sekretion induzierte und erst in sehr hohen Konzentrationen zur Hemmung der Sekretion führte. Auch wenn die Resultate für Clodronat und Pamidronat nicht analog auf ZA übertragen werden können, konnte in einem *in vivo* Modell des Mammakarzinoms bereits gezeigt werden, dass auch ZA Einfluss auf die MMPs haben kann. In dieser Studie induzierte die Behandlung mit ZA eine signifikante Reduktion der pro-MMP-9 Konzentration im Serum von ca. 1,4 μM auf ca. 0,2 μM . Zusätzlich führte die Therapie zu einer Hemmung der Einwanderung von Makrophagen in das Tumorstroma (Melani et al 2007).

Eine alternative Erklärung für die Hemmung der Makrophagen-induzierten Invasion von MCF-7 Zellen ist die Beeinflussung der Ko-Kultur-vermittelten Signalwege in Makrophagen oder Tumorzellen. Die Reduktion der WNT5A-induzierten Invasion von MCF-7 Zellen durch 2 μM ZA könnte darauf hinweisen (s. Abb. 3.10). Es ist bekannt, dass WNT5A in M Φ durch eine Ko-Kultur mit Tumorzellen induziert wird und dieses wiederum die Invasion der malignen Zellen steigert, was über den nicht kanonischen PCP-Signalweg vermittelt wird (Pukrop et al 2006). Da diese Signalkaskade über die kleinen G-Proteine RHOA und RAC

vermittelt wird, stellt sie einen Angriffspunkt für N-BPs dar, die die Prenylierung kleiner G-Proteine und damit deren Aktivität inhibieren (s. 1.3.1). Die beiden Proteine RHOA und RAC sind an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt und haben somit einen starken Einfluss auf die Migration und Invasion von Zellen. Die Hemmung dieser Proteine kann somit eine Reduktion der Zellmigration und -invasion zur Folge haben. Dieser Mechanismus konnte bereits für die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB231 beschrieben werden (Denoyelle et al 2003). Die Studie zeigte, dass ZA die Translokation von RHOA an die Zytoplasmamembran inhibierte, was eine Fehlorganisation des Aktinzytoskeletts und eine damit verbundene Reduktion der Invasion zur Folge hatte. Da diese Effekte bereits bei einer Konzentration von 1 μ M ZA nachgewiesen werden konnten, ist nicht auszuschließen, dass dieser Mechanismus auch in dem System, das in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, von Bedeutung ist. Während hierfür weitere Analysen erforderlich sind, um zu klären, ob ZA modulierende Effekte auf die Signalstärke oder Signalwahrnehmung ausübt, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass ZA ein Potential aufweist, Signale, die durch LPS vermittelt werden, zu verändern. So führte eine Behandlung von M Φ mit ZA zu einer Verstärkung der LPS-induzierten Reaktion dieser Zellen (s. Abb. 3.13). Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen, die ebenfalls eine Steigerung der IL-12- oder TLR-induzierten Genexpression durch ZA in M Φ zeigen konnten (Tsagozis et al 2008). Darüber hinaus verdeutlichen diese Ergebnisse, dass Makrophagen durch die Kombination von ZA und LPS in einer Therapie von einem M2-Phänotyp hin zu dem Tumor hemmenden M1-Phänotyp polarisiert werden können.

Neben dieser Arbeit veranschaulichen auch andere Studien die komplexen Auswirkungen einer Behandlung mit ZA. So konnten Coscia et al in einem Mausmodell des Mammakarzinoms zeigen, dass die Behandlung der Tiere mit ZA zu einem signifikant gesteigerten Tumor-freien Überleben sowie einem gesteigerten Gesamtüberleben führte. Gleichzeitig konnte eine verminderte Rekrutierung von Makrophagen in das Tumorgewebe und eine reduzierte Vaskularisierung nachgewiesen werden (Coscia et al 2010). Auch klinische Studien konnten bereits belegen, dass ZA nicht nur das Auftreten von Knochenmetastasen reduziert, sondern auch die Metastasierung in andere Organe vermindert (Gnant et al 2009).

Insgesamt verdeutlichen die Ergebnisse, dass es erforderlich ist, die Einflüsse von ZA und auch anderer BPs auf das Tumormilieu und die tatsächlichen Konzentrationen dieser Substanzen in den unterschiedlichen Geweben weiter zu analysieren. Darüber hinaus scheint eine Modifikation der BPs, die eine vermehrte Anreicherung in das primäre Tumorgewebe

sowie die entsprechenden Metastasenorgane bewirkt, ein sehr aussichtsreiches Therapiekonzept. Unterschiedliche liposomale Modifikationen dieser Substanzklasse sollten im Tiermodell auf bereits bekannte tumorizide Effekte sowie die Verteilung und die Metastasierung in unterschiedliche Organe untersucht werden.

4.3 CSF-1 ist nicht für alle Makrophagen ein essentieller Wachstumsfaktor

Neben ZA wurde in dieser Arbeit eine zweite Substanz, 5A1, hinsichtlich ihrer tumoriziden Eigenschaften untersucht. Dieser Antikörper ist gegen das murine CSF-1 gerichtet, welches ein essentieller Wachstumsfaktor für Makrophagen ist.

Auch für diese Substanz wurde zunächst die Toxizität auf die beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB231 sowie auf zwei murine Makrophagenpopulationen ermittelt. Wie zu erwarten war, konnte keine Toxizität des Antikörpers gegenüber den malignen Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wiesen BMDMs eine sehr hohe Sensitivität gegenüber dem Antikörper auf und wurden bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration abgetötet. Das lässt darauf schließen, dass BMDMs sehr stark von CSF-1 abhängig sind. MG zeigten hingegen keine CSF-1-Abhängigkeit (s. 3.2.2.1). Sie wiesen auch bei der höchsten getesteten 5A1 Konzentration keine Sensitivität gegenüber dem Antikörper auf. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass in der *Csf1^{op/op}* Maus, bei der kein funktionelles CSF-1 gebildet wird, MG nachzuweisen sind, wohingegen andere Gewebemakrophagen depletiert sind (Witmer-Pack et al 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Viabilität von Monozyten, die mit IL-34 stimuliert wurden, durch einen Antikörper gegen IL-34 inhibiert werden konnte, jedoch nicht durch einen anti-CSF-1 Antikörper (Lin et al 2008). Im Unterschied zu der Mehrzahl der Makrophagenpopulationen nutzen MG den alternativen Wachstumsfaktor IL-34, der vor einigen Jahren als spezifischer CSF-1R-Ligand identifiziert werden konnte (Lin et al 2008, Wang et al 2012). IL-34 wird sowohl in der Embryonalphase als auch im adulten Tier hauptsächlich in unterschiedlichen Regionen des Hirns exprimiert, während keine bzw. eine sehr geringe CSF-1 Expression in diesen Regionen nachzuweisen ist (Nandi et al 2012, Wei et al 2010). Dieses Expressionsmuster liefert eine Erklärung für die Abhängigkeit der MG von IL-34 und nicht von CSF-1.

Aufgrund der Beobachtung, dass MG keine Abhängigkeit von CSF-1 aufwiesen, war bei der Durchführung der Invasionsversuche in der modifizierten Boyden-Kammer zu erwarten, dass

der Antikörper 5A1 keinen Einfluss auf die MG-induzierte Invasion von MCF-7 Zellen zeigte. Überraschenderweise konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. Auch wenn nur ein schwacher Effekt des Antikörpers auf die MG-induzierte Invasionssteigerung der malignen Zellen nachzuweisen war, konnte eine signifikante Abnahme der Invasion gezeigt werden (s. Abb. 3.19). Worauf dieser Effekt zurückzuführen ist, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht klar beantwortet werden. Es deutet jedoch darauf hin, dass die induzierte Invasion der Tumorzellen zu einem geringen Teil auf einem CSF-1-vermittelten Mechanismus beruht. Dieser Mechanismus könnte die bereits viel beschriebene Interaktion zwischen Tumorzellen und Makrophagen über den CSF-1/EGF-*loop* sein, der im Zusammenhang mit der Invasion maligner Zellen steht, und der durch den Antikörper 5A1 unterdrückt wird (Goswami et al 2005, Ojalvo et al 2010, Wyckoff et al 2004). Im Fall der BMDM-induzierten Invasion von MCF-7 führte die Behandlung mit 5A1 zu der erwarteten starken Reduktion der MCF-7 Invasivität. Diese Beobachtung ist auf das Absterben der Makrophagen durch den CSF-1-Entzug zu erklären.

In einem weiteren Schritt sollte analysiert werden, ob der Antikörper 5A1 einen Einfluss auf die MG-assistierte Invasion von MCF-7 Zellen in Hirngewebe hat, auch wenn die MG-induzierte Invasion in der Boyden-Kammer nur leicht inhibiert wurde. Hier zeigte sich jedoch in Vorversuchen, dass der Antikörper eine toxische Wirkung auf den Hirnschnitt aufwies, da die Behandlung des Gewebes mit 5A1 eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität zur Folge hatte (s. Abb. 3.20). Da bereits gezeigt werden konnte, dass CSF-1 nicht nur als Wachstumsfaktor für Makrophagen dient, sondern auch ein Wachstumsfaktor im zentralen Nervensystem ist und seine Depletion zu einer verstärkten Anfälligkeit der Neuronen auf Verletzung führt (Berezovskaya et al 1995), stellte sich die Frage, ob die beschriebene Toxizität des Antikörpers auf ein Absterben der Neuronen zu erklären war. Aus diesem Grund wurde die Expression des Neuronenmarkers *Rbfox3* (NeuN) mittels qRT-PCR analysiert. Hier zeigte sich jedoch, dass 5A1 keine Veränderung der Expression induzierte und demzufolge kein Absterben der Neuronen zu Grunde lag (s. Abb. 3.20). Wie erwartet hatte die Behandlung mit 5A1 keine Reduktion der Expression der Makrophagenmarker *F4/80* und *Csf-1r* zur Folge. Auch die Expression des Astrozytenmarkers *Gfap* blieb nach 5A1 Behandlung unverändert. Basierend auf den beschriebenen Ergebnissen kann zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage darüber getroffen werden, worauf die toxische Wirkung von 5A1 beruht. Dieses Resultat führte jedoch dazu, dass keine Invasionsversuche mit MCF-7 Zellen in der organotypischen Hirnschnittkultur durchgeführt werden konnten.

In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass MG auch nach der Behandlung mit 5A1 noch durch LPS stimulierbar waren, was sich in einer vergleichbaren Nitritsynthese wie nach einer alleinigen LPS-Stimulation widerspiegelte (s. Abb. 3.21). Dies lässt vermuten, dass der Antikörper ebenfalls keinen Einfluss auf die Aktivierbarkeit der Zellen hat. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass 5A1 die Reaktion auf andere Stimuli unterdrückt oder modifiziert.

Zusammenfassend bestätigen die geschilderten Ergebnisse, dass MG unabhängig von CSF-1 sind und daher durch den Antikörper 5A1 nicht inhibiert werden. Die Untersuchungen mit diesem Antikörper wurden mit der Absicht gestartet, zu klären, ob er zur Prävention oder Therapie der zerebralen Metastasierung eingesetzt werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen jedoch, dass 5A1 sich für diese Verwendung nicht anbietet, da er vermutlich keine ausreichende Wirkung auf die zerebrale Metastasierung aufweist. Welche Effekte der Antikörper jedoch auf andere residente Makrophagenpopulationen ausübt und somit möglicherweise die Metastasierung beeinflusst, bleibt zu klären. Weiterhin wurde bisher nicht systematisch untersucht, wie stark der CSF-1/EGF-*loop* durch 5A1 beeinflusst wird und welche Auswirkungen dies auf den Primärtumor oder die Metastasierung hat. Basierend auf den dargestellten Ergebnissen stellt sich weiterhin die Frage, ob die Verwendung eines Antikörpers gegen den CSF-1R einen besseren Therapieansatz der zerebralen Metastasierung darstellt.

4.4 LEF1 charakterisiert invasive Mammakarzinom-Zelllinien

Ausgehend von der Beobachtung, dass LEF1 die zerebrale Metastasierung von Lungenadenokarzinomen induziert (Nguyen et al 2009b), wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob LEF1 auch bei der zerebralen Metastasierung des Mammakarzinoms von Bedeutung ist. Zunächst wurde analysiert, ob es Hinweise auf eine klinische Relevanz des Transkriptionsfaktors gibt, indem die LEF1 Expression in zerebralen Metastasen des Mammakarzinoms immunhistochemisch ermittelt wurde. Hierbei zeigte sich, dass die untersuchten Metastasen in zwei Gruppen eingeteilt werden können, zum einen die LEF1-positiven und zum anderen die LEF1-negativen. Dieser Unterschied in der LEF1 Expression zwischen einzelnen Metastasen konnte mittels qRT-PCR validiert werden (s. Abb. 3.22). Zusammen mit den Resultaten einer Genexpressionsanalyse zerebraler Metastasen des Mammakarzinoms, die eine starke Expression von LEF1 in den Gewebeproben zeigte (Bos et al 2009), deuten diese Ergebnisse auf eine tatsächliche Relevanz des Transkriptionsfaktors in der Metastasierung dieser Tumorentität hin. Auch für das Lungenadenokarzinom konnte

unsere Arbeitsgruppe bereits nachweisen, dass sich zerebrale Metastasen, basierend auf der LEF1 Expression, in zwei Gruppen einteilen lassen. Zusätzlich korreliert die gesteigerte Expression von LEF1/TCF4 in dieser Entität mit einer schlechteren Prognose (Bleckmann et al., nicht veröffentlicht). Weitere Analysen sind erforderlich, um zu ermitteln, ob eine Korrelation zwischen der LEF1 Expression und der Metastasierung oder dem Gesamtüberleben auch beim Mammakarzinom besteht.

Die Charakterisierung mehrerer humaner und muriner Mammakarzinom-Zelllinien ergab, dass eine deutliche Expression des Transkriptionsfaktors nur in den hoch invasiven Zelllinien MDA-MB231 und 4T1 nachzuweisen ist. Dieses Ergebnis verstärkt die Hypothese, dass LEF1 eine entscheidende Funktion in der Invasion aufweist. Im Gegensatz dazu scheinen die anderen Mitglieder der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren in der Invasion des Mammakarzinoms nicht von großer Bedeutung zu sein. Während das Expressionsniveau von TCF3 und TCF4 in den getesteten Zelllinien vergleichbar ist, konnte eine gesteigerte Expression von TCF1 in den hoch invasiven Zelllinien nachgewiesen werden. Diese Expression war jedoch sehr schwach und konnte nur mittels qRT-PCR gezeigt, jedoch nicht auf Proteinebene validiert werden.

4.5 Die erhöhte Expression von LEF1 in MCF-7 hat keinen Einfluss auf die Viabilität, Proliferation oder Sensitivität gegenüber Chemotherapie oder Bestrahlung

Um die funktionellen Auswirkungen einer gesteigerten LEF1 Expression analysieren zu können und die Hypothese, dass LEF1 die Invasion maligner Zellen steigert, zu bestätigen, wurden nicht invasive MCF-7 Zellen mit zwei unterschiedlichen LEF1-Konstrukten stabil transfiziert.

Der Transkriptionsfaktor LEF1 ist ein wichtiger Regulator der Zellproliferation während der embryonalen Entwicklung, wird aber auch in adulten Organismen in proliferierenden Zellen exprimiert (Hovanes et al 2000). Dennoch führte die Überexpression von LEF1 in MCF-7 nicht zu einer gesteigerten Proliferation der Zellen. Ebenso hatte die erhöhte LEF1 Expression keine Veränderung des Zellzyklus zur Folge. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Resultaten einer gerade erschienenen Arbeit, die zeigen konnte, dass eine Herunterregulation von LEF1 sowohl in MCF-7 als auch in MDA-MB231 die Proliferation der Zellen reduzierte, aber auch zu einem Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase führte (Bucan et al 2012). Die Ursache dieser Diskrepanz ist nicht ersichtlich. Überraschenderweise konnten Bucan et al

jedoch auch in beiden Zelllinien vergleichbare Proteinmengen des Transkriptionsfaktors LEF1 nachweisen. Dies ist ebenfalls ein deutlicher Gegensatz zu den hier beschriebenen Resultaten.

Für das Prostatakarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass Androgen-unabhängige Zellen eine deutlich höhere Expression von LEF1 aufweisen als Androgen-abhängige. Weiterhin korreliert die Expression des Transkriptionsfaktors positiv mit der Invasivität der Zellen (Li et al 2009). Auch aggressive Mammakarzinome können eine Unabhängigkeit gegenüber dem Hormon Östrogen aufweisen. Im Gegensatz zum Prostatakarzinom scheint diese jedoch nicht mit der Expression von LEF1 zu korrelieren, da die erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors in MCF-7 Zellen keine Hormon-Unabhängigkeit induziert (s. Abb. 3.28). Diese Beobachtung wird bestätigt durch Analysen, die zeigten, dass LEF1 die Bindung des Östrogenrezeptors an die DNA inhibiert und dabei eine Aktivität als transkriptioneller Repressor des Östrogen-Signalwegs aufweist (Holmes et al 2008).

Die Sensitivität maligner Zellen gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung hat einen großen Einfluss auf die Aggressivität sowie die Therapierbarkeit von Tumorerkrankungen. Für den Transkriptionsfaktor TCF4 konnte bereits gezeigt werden, dass im Kolonkarzinom eine vermehrte Expression dieses Proteins mit einer geringeren Sensitivität gegenüber einer Radiochemotherapie verbunden ist (Ghadimi et al 2005, Kendziorra et al 2011). Aus diesem Grund wurde der Effekt einer gesteigerten LEF1 Expression in MCF-7 Zellen auf diese zwei Eigenschaften analysiert. Es zeigte sich, dass weder die Chemoresistenz noch die Bestrahlungsresistenz durch den Transkriptionsfaktor beeinflusst werden. Im Fall des Kolonkarzinoms führte die erhöhte TCF4 Expression zu einem Zellzyklusarrest in der G₂/M-Phase und somit zu einer höheren Bestrahlungsresistenz (Kendziorra et al 2011). Da in dieser Arbeit kein Einfluss von LEF1 auf den Zellzyklus nachgewiesen werden konnte, stellt dies einen möglichen Erklärungsansatz dar, warum ebenfalls die Sensitivität gegenüber Bestrahlung nicht beeinflusst wird. Die unveränderte Sensitivität gegenüber den getesteten Chemoreagenzien lassen darauf schließen, dass LEF1 weder einen Einfluss auf DNA-Reparatursysteme noch auf die Proteinsynthese hat. Weiterhin bestätigen sie, dass die gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors nicht zu einer Unabhängigkeit gegenüber Östrogen führt.

Nguyen et al konnten zeigen, dass LEF1 in Zellen des Lungenadenokarzinoms ebenfalls keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hatte, jedoch das *anchorage-independent growth* induzierte (Nguyen et al 2009b). Aus diesem Grund analysierten wir ebenfalls den Effekt von

LEF1 auf das *anchorage-independent growth* von MCF-7 Zellen. Wie die Ergebnisse zeigten, war kein Unterschied zwischen den LEF1 exprimierenden Zellen und den Zellen ohne LEF1 Expression im Wachstum in der 3D-Kultur nachzuweisen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass auch Zellen, die nicht mit LEF1 transfiziert worden waren, bereits ein deutliches Koloniewachstum aufwiesen. Dadurch sind möglicherweise kleinere Unterschiede im Koloniewachstum zu LEF1 exprimierenden Zellen nicht nachzuweisen.

4.6 LEF1 steigert die Invasion von MCF-7 Zellen durch einen β -Catenin-unabhängigen Mechanismus

Die Charakterisierung unterschiedlicher Mammakarzinom-Zelllinien deutete darauf hin, dass die Expression des Transkriptionsfaktors LEF1 positiv mit der Invasivität der Zelle korreliert. Um diese Schlussfolgerung zu kräftigen, analysierten wir die ursprünglich schwach invasive MCF-7 nach konstitutiver Überexpression von LEF1. Wie erwartet, steigerte die vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors die Invasivität der Zellen (s. Abb. 3.33). Somit konnte bestätigt werden, dass LEF1 eine Auswirkung auf die Invasion von Tumorzellen hat.

Überraschenderweise induzierte sowohl die Überexpression von LEF-FL als auch von LEF- Δ HMG eine signifikant gesteigerte Invasion von MCF-7. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Invasionssteigerung durch LEF1 ein Mechanismus zu Grunde liegt, der unabhängig von der direkten Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA ist. Eine derartige Funktion von LEF1 wurde bislang noch nicht beschrieben. Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine DNA-Bindungsanalysen für das LEF- Δ HMG-Konstrukt durchgeführt wurden, und daher nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Protein trotz der fehlenden HMG-Domäne an die DNA bindet, ist eine endgültige Aussage zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

Bei der Durchführung von Migrationsversuchen zeigte sich ein überraschendes Ergebnis. Während die Überexpression von LEF-FL zu einer geringen, aber signifikanten Hemmung der Migration von MCF-7 führte, induzierte die Expression von LEF- Δ HMG eine deutliche Steigerung der Migration (s. Abb. 3.32). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu anderen Studien, in denen eine erhöhte LEF1 Expression mit einer vermehrten Zellmigration korreliert wurde (Huang et al 2012, Iwai et al 2010, Murakami et al 2001). Es zeigt jedoch, dass die LEF1-induzierte Invasionssteigerung von MCF-7 auf unterschiedlichen Mechanismen basieren könnte. Während die gesteigerte Invasion nach der Überexpression von LEF- Δ HMG mit der gesteigerten Migration verbunden sein könnte, ist dies bei LEF-FL exprimierenden Zellen auszuschließen.

In der embryonalen Entwicklung wird die Migration und Invasion von Zellen vor allem durch den Vorgang der *epithelial-mesenchymal-transition* (EMT) induziert. Ein wichtiger Regulator der EMT ist der WNT/ β -Catenin-Signalweg (Yang and Weinberg 2008). Der Transkriptionsfaktor LEF1 ist dabei essentiell in der embryonalen Brustentwicklung, da er die erforderliche EMT induziert (van Genderen et al 1994). Aber auch in der Progression maligner Erkrankungen ist der Vorgang der EMT von Bedeutung. Er steht in Verbindung mit der Metastasierung von Tumorzellen und dient häufig als Begründung der gesteigerten Invasion (Thiery 2002, Yang and Weinberg 2008). Auch in diesem Zusammenhang konnte bereits eine Schlüsselfunktion von LEF1 nachgewiesen werden (Kim et al 2000, Medici et al 2006). Die LEF-induzierte Invasionssteigerung von MCF-7, die in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist jedoch nicht auf eine Induktion der EMT zurückzuführen (s. Abb. 3.34), auch wenn der Vergleich der differentiellen Genexpression in der schwach invasiven MCF-7 und der hoch invasiven MDA-MB231 eine erhöhte Expression einiger EMT-Marker in MDA-MB231 zeigte (F. Klemm, persönliche Kommunikation). So ist dieses Ergebnis doch in Übereinstimmung mit der Arbeit von Nguyen et al, die zwar eine LEF1-induzierte zerebrale Metastasierung beschreiben, diese jedoch unabhängig von EMT ist (Nguyen et al 2009b).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten verdeutlichen, dass LEF1 aber nicht nur die Invasivität von MCF-7 Zellen steigert, sondern auch die Angiogenese in wachsenden Tumoren induziert (s. Abb. 3.35). Auch wenn die Ausbildung neuer Gefäße vor allem für das Wachstum eines Tumors essentiell ist, unterstützt dieses Ergebnis jedoch auch die Hypothese, dass die gesteigerte Expression von LEF1 auch mit einer vermehrten Metastasierung verbunden ist. Um eine endgültige Aussage treffen zu können, sind jedoch noch weitere Untersuchungen erforderlich.

LEF1 gilt als der Vermittler des kanonischen WNT-Signalwegs. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die LEF1-induzierte Invasionssteigerung auf einem β -Catenin-abhängigen Mechanismus beruht. Dies wurde auch bereits in verschiedenen Studien postuliert. Nguyen et al zeigen neben dem hemmenden Effekt eines dominant-negativen LEF1 Konstrukts auf die Invasivität von Mammakarzinomzellen auch eine nukleäre Akkumulation von β -Catenin in LEF1 exprimierenden Mamma-Tumoren der Maus (Nguyen et al 2005). Ebenso wird die LEF1-induzierte zerebrale Metastasierung des Lungenadenokarzinoms auf einen β -Catenin-abhängigen Mechanismus bezogen (Nguyen et al 2009b). Aber auch im malignen Melanom wird die LEF1-vermittelte Migration der Zellen mit einer konstitutiven Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalwegs begründet (Murakami et al 2001). Weiterhin konnte unsere

Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass die Makrophagen-induzierte Invasion von MCF-7 signifikant reduziert wird, wenn die Tumorzellen ein dominant negatives LEF1-Konstrukt exprimieren, dem die β -Catenin-Bindedomäne fehlt (Pukrop et al 2006). Dies deutet ebenfalls auf eine β -Catenin-abhängige Wirkung von LEF1 auf die Invasion maligner Zellen hin. Dennoch liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einige Hinweise darauf, dass die gesteigerte Invasion von MCF-7 nach der Überexpression von LEF1 auf einem Mechanismus beruht, der unabhängig von β -Catenin ist. Zunächst konnte gezeigt werden, dass nicht nur LEF-FL sondern auch LEF- Δ HMG eine Invasionssteigerung von MCF-7 induziert. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch kein Mechanismus beschrieben worden, bei dem die β -Catenin/LEF1-vermittelte Signaltransduktion ohne die direkte Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA erfolgte. Weiterhin blieb eine Translokation von β -Catenin vom Cytosol in den Zellkern in LEF1 exprimierenden MCF-7 Zellen aus (s. Abb. 3.36), die bei einer Aktivierung des kanonischen Signalwegs zu erwarten gewesen wäre. Auch im TOP/FOPflash Reporterassay konnte eine Aktivierung der β -Catenin-abhängigen Signalkaskade erst nachgewiesen werden, nachdem MCF-7 Zellen zusätzlich zu LEF-FL auch mit einem konstitutiv aktiven β -Catenin transfiziert wurden. Wie zu erwarten war, galt dies nicht für die Ko-Transfektion mit LEF- Δ HMG, da dieses Konstrukt nicht an die DNA bindet und somit keine Aktivierung des Reporters induziert (s. Abb. 3.37). Zur Bestätigung der bereits genannten Resultate deuten auch die durchgeführten Interaktionsstudien darauf hin, dass β -Catenin und LEF1 in den untersuchten Zellen nicht miteinander interagieren (s. Abb. 3.38).

Für das Mammakarzinom konnte in den letzten Jahren eindeutig belegt werden, dass der nicht-kanonische WNT-Signalweg die Progression sowie die Metastasierung fördert (Hagemann et al 2004, Klemm et al 2011, Pukrop et al 2006, Pukrop et al 2010). Bislang konnte zwar keine Interaktion mit oder eine Aktivierung durch den nicht-kanonischen Signalweg in Zusammenhang mit LEF1 nachgewiesen werden, dennoch ist ein derartiger Mechanismus nicht auszuschließen. Dies zeigt sich in der Tatsache, dass eine gesteigerte Proteinmenge von LEF1 die Expression des Transkriptionsfaktors cJUN induziert (s. Abb. 3.39). In welchem Zusammenhang diese beiden Transkriptionsfaktoren tatsächlich stehen, und ob eine Beteiligung des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs vorliegt, bleibt zu klären.

Funktionen des Transkriptionsfaktors LEF1 unabhängig von β -Catenin wurden bei der Erforschung maligner Erkrankungen bislang erst wenig berücksichtigt. Dennoch lassen einige Studien auf eine fehlende Interaktion der beiden Proteine in der Tumorprogression schließen. So war unsere Arbeitsgruppe in der Lage nachzuweisen, dass die Expression von LEF1 in

zerebralen Metastasen des Lungenadenokarzinoms nicht mit einer nukleären Lokalisation von β -Catenin korreliert (Bleckmann et al, nicht veröffentlicht). Aber auch im malignen Melanom korreliert nukleäres β -Catenin mit einer besseren Prognose, während eine erhöhte LEF1 Expression die Migration von Melanomzellen induziert (Lucero et al 2010, Murakami et al 2001). Zusätzlich zu diesen Resultaten stützen Studien über eine TGF- β -vermittelte und LEF1-induzierte EMT die Hypothese einer β -Catenin-unabhängigen, aber LEF1-abhängigen Tumorprogression (Medici and Nawshad 2010, Nawshad and Hay 2003, Nawshad et al 2007).

4.7 Eine LEF1-Signatur als prognostischer Marker

Zur weiteren Analyse der prognostischen Relevanz von LEF1 wurde in Rahmen dieser Arbeit eine LEF1-Signatur generiert, die anschließend auf zwei Microarray-Datensätzen getestet wurde. Die LEF1-Signatur führte in beiden Datensätzen zu einer Aufspaltung in zwei Cluster. Im ersten Datensatz, der Östrogenrezeptor-positive Mammakarzinome umfasste, konnte weder eine Korrelation mit dem Fernmetastasen-freien noch mit dem Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Dennoch war in der Analyse des Gesamtüberlebens ein deutlicher Trend eines schlechteren Verlaufs von Cluster 1 zu erkennen (s. Abb. 3.40). Der fehlende Unterschied vor allem mit Fernmetastasen-freien Überleben ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Datensatz Östrogenrezeptor-positive Karzinome umfasste. Möglicherweise ist die LEF1-Signatur jedoch nur in der Subgruppe der Östrogenrezeptor-negativen Karzinome von prognostischer Relevanz. Im Gegensatz zu den Mammakarzinomen zeigte die Analyse der Lungenadenokarzinome, dass die beiden Cluster sowohl im Fernmetastasen-freien als auch im Gesamtüberleben einen unterschiedlichen Verlauf aufwiesen (s. Abb. 3.41). Zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch keine Aussage darüber möglich, ob die Expression von LEF1 zu einem besseren oder schlechteren Krankheitsverlauf führt. Hierzu sind weitere Analysen nötig.

Insgesamt deutet die Cluster-Analyse jedoch darauf hin, dass die LEF1-Signatur ein Potential als prognostischer Marker aufweist. Dass möglicherweise auch das Expressionsniveau des Transkriptionsfaktors LEF1 eine Aussage über den Krankheitsverlauf ermöglicht, lassen Studien in anderen Tumorentitäten vermuten. So war unsere Arbeitsgruppe vor kurzem in der Lage zu zeigen, dass zwar die alleinige nukleäre LEF1 Expression in zerebralen Metastasen des Lungenadenokarzinoms keinen Einfluss auf das Überleben hat, dass die gleichzeitige Expression von TCF4 aber zu einem signifikant schlechteren Verlauf führt (Bleckmann et al,

nicht veröffentlicht). Im Fall des Kolonkarzinoms existieren widersprüchliche Daten, die eine vermehrte LEF1-Expression sowohl mit einem schlechteren als auch einem besseren Gesamtüberleben korrelieren (Kriegl et al 2010, Lin et al 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktors mit dem Auftreten von Lebermetastasen korreliert (Lin et al 2011). Trotz der widersprüchlichen Ergebnisse verdeutlichen beide Studien das prognostische Potential von LEF1. Ebenso konnte in der prä-B-Zell-ALL (akute lymphatische Leukämie) eine positive Korrelation zwischen LEF1 Expression und einer schlechten Prognose gezeigt werden (Kuhnl et al 2011).

5 Fazit

Es steht heute außer Frage, dass Monozyten des peripheren Bluts in Primärtumore einwandern, zu Makrophagen ausdifferenzieren und dort als TAMs zahlreiche Schritte der Tumorprogression unterstützen können. Obwohl die betroffenen Metastasenorgane eine residente Makrophagenpopulation aufweisen, ist im Gegensatz zu den TAMs relativ wenig über die Rolle der Makrophagen in den letzten Schritten der Metastasierung, d.h. der Kolonisation, bekannt. Es konnte aber, basierend auf organotypischen Hirnschnitt-Ko-Kulturen, bereits gezeigt werden, dass MG die Invasion und Kolonisation von MCF-7 in Hirngewebe aktiv fördern (Pukrop et al 2010). Diese Eigenschaften sind auch für die residenten Makrophagen der Leber, die Kupffer Stern-Zellen, denkbar. Die organotypische Leberschnittkultur scheint jedoch kein geeignetes Modell zu sein, um die Kupffer Stern-Zell-spezifischen Effekte auf die Tumordinvasion und -kolonisation zu untersuchen, da eine Langzeitkultivierung des Gewebes ohne ein Absterben der Hepatozyten nicht möglich zu sein scheint. Dennoch wäre es hilfreich, Kupffer Stern-Zellen zu isolieren, und deren Effekte auf Tumorzellen, z.B. in *in vitro*-Invasionsversuchen, zu analysieren.

Die Effekte von ZA in der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms und die damit verbundene Reduktion der Metastasierung wurden auf eine direkte Beeinflussung der Tumorzellen zurückgeführt (Gnant 2009). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen jedoch nahe, dass das N-BP vor allem zunächst Auswirkungen auf benigne Zellen, die Makrophagen, hat, bevor es maligne Zellen beeinflusst. Während der Therapie beträgt die Plasmakonzentration von ZA ca. 1 μM (Morgan and Lipton 2010). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, beeinflusst diese Konzentration weder die Migrations- noch die Invasionseigenschaften der Tumorzellen. Im Gegensatz dazu führt sie jedoch zu einer vollständigen Depletion unterschiedlicher Makrophagenpopulationen. Erst bei höheren Konzentrationen werden auch Eigenschaften der Tumorzellen beeinflusst. Dies verdeutlicht eine konzentrationsabhängige Tumor hemmende Wirkung von ZA. Liegt das N-BP in niedrigen Konzentrationen vor, wird zunächst die Makrophagen-induzierte Invasion inhibiert. Bei steigenden Konzentrationen werden zunächst die Invasionseigenschaften der Tumorzellen und zuletzt deren Viabilität beeinflusst. Die in dieser Arbeit durchgeführten Invasionsversuche in der organotypischen Hirnschnittkultur verdeutlichen, dass ZA ein Potential zur Prävention zerebraler Metastasen aufweist. Zur erfolgreichen Depletion der MG müsste jedoch eine Modifikation der Substanz vorgenommen werden, damit sie die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. In diesem Zusammenhang ist auch zu berücksichtigen, dass

Makrophagen einen großen Einfluss auf die Homöostase von Geweben haben und die Hemmung dieser Zellen mit schweren Nebenwirkungen verbunden sein kann. Für humane Makrophagen konnte weiterhin gezeigt werden, dass ZA LPS-induzierte Genexpressionen verstärkt. Dies könnte in der Therapie zur Repolarisation der Makrophagen von M2 zum Tumor hemmenden M1-Phänotyp ausgenutzt werden. Im Gegensatz zu ZA bietet sich der Antikörper 5A1 in der Therapie zerebraler Metastasen nicht an, da er keine ausreichende Hemmung der MG induziert. Dieses Ergebnis bestätigt die Unabhängigkeit dieser Makrophagenpopulation gegenüber CSF-1 und lässt die Nutzung des alternativen Wachstumsfaktors IL-34 vermuten. Auch wenn andere Makrophagen-populationen wie z.B. BMDM mit Hilfe des Antikörpers depletiert werden können, stellt die Verwendung eines Antikörpers gegen den Rezeptor CSF-1R möglicherweise den besseren Ansatz dar.

Der Transkriptionsfaktor LEF1 konnte bereits als Mediator der zerebralen Metastasierung des Lungenadenokarzinoms identifiziert werden (Nguyen et al 2009b). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass LEF1 auch in der Metastasierung des Mammakarzinoms von Relevanz sein könnte. Der Transkriptionsfaktor kann nicht nur in einer Subgruppe zerebraler Metastasen nachgewiesen werden, seine Expression ist auch charakteristisch für invasive Zelllinien. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssten in weiteren Schritten *loss of function* Experimente von LEF1 z.B. in der hoch invasiven und LEF1 exprimierenden MDA-MB231 erfolgen. Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass die LEF1-induzierte Invasionssteigerung unabhängig von der Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA zu sein scheint und auf einem β -Catenin-unabhängigen Mechanismus beruht. Dies bedeutet, dass LEF1 möglicherweise über die Interaktion mit anderen Proteinen eine indirekte DNA-Bindung eingeht und auf diese Weise eine transkriptionelle Aktivität aufweist. In diesem Zusammenhang wären CoIP-Analysen mit einer anschließenden Massenspektrometrie hilfreich, um neue Interaktionspartner von LEF1 zu identifizieren. Um die Unabhängigkeit von β -Catenin zu bestätigen, wäre es sinnvoll, die Auswirkungen der Überexpression eines LEF1-Konstrukts ohne β -Catenin-Bindedomäne in MCF-7 zu analysieren. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit eine stabile Transfektion dieses Konstrukts nicht erfolgreich etabliert werden. Worauf die LEF1-induzierte Invasion von MCF-7 Zellen zurückzuführen ist, und welcher Mechanismus dieser Beobachtung zu Grunde liegt, bleibt noch zu klären. Insgesamt deuten die geschilderten Ergebnisse jedoch auf eine bislang unbekannte Funktion von LEF1 hin.

6 Literaturverzeichnis

- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO journal* **16**: 3797-3804.
- Almubarak H, Jones A, Chaisuparat R, Zhang M, Meiller TF, Scheper MA (2011). Zoledronic acid directly suppresses cell proliferation and induces apoptosis in highly tumorigenic prostate and breast cancers. *Journal of carcinogenesis* **10**: 2.
- Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML (2006). Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* **25**: 7492-7504.
- Aslakson CJ, Miller FR (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer research* **52**: 1399-1405.
- Atcha FA, Munguia JE, Li TW, Hovanes K, Waterman ML (2003). A new beta-catenin-dependent activation domain in T cell factor. *The Journal of biological chemistry* **278**: 16169-16175.
- Bacac M, Stamenkovic I (2008). Metastatic cancer cell. *Annual review of pathology* **3**: 221-247.
- Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R *et al* (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**: 638-642.
- Benzaid I, Monkkonen H, Stresing V, Bonnelye E, Green J, Monkkonen J *et al* (2011). High phosphoantigen levels in bisphosphonate-treated human breast tumors promote Vgamma9Vdelta2 T-cell chemotaxis and cytotoxicity in vivo. *Cancer research* **71**: 4562-4572.
- Berezovskaya O, Maysinger D, Fedoroff S (1995). The hematopoietic cytokine, colony-stimulating factor 1, is also a growth factor in the CNS: congenital absence of CSF-1 in mice results in abnormal microglial response and increased neuron vulnerability to injury. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **13**: 285-299.
- Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of pathology* **196**: 254-265.
- Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M *et al* (2000). Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer research* **60**: 2949-2954.
- Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX *et al* (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* **459**: 1005-1009.
- Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M (1998). Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**: 109-118.
- Brannon M, Brown JD, Bates R, Kimelman D, Moon RT (1999). XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* **126**: 3159-3170.
- Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W (2004). Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes & development* **18**: 2225-2230.

- Bucan V, Mandel K, Bertram C, Lazaridis A, Reimers K, Park-Simon TW *et al* (2012). LEF-1 regulates proliferation and MMP-7 transcription in breast cancer cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **17**: 559-567.
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute* **53**: 661-674.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews Cancer* **2**: 563-572.
- Chitu V, Stanley ER (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Current opinion in immunology* **18**: 39-48.
- Clements WM, Lowy AM, Groden J (2003). Adenomatous polyposis coli/beta-catenin interaction and downstream targets: altered gene expression in gastrointestinal tumors. *Clinical colorectal cancer* **3**: 113-120.
- Clevers H (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**: 469-480.
- Coleman RE, Winter MC, Cameron D, Bell R, Dodwell D, Keane MM *et al* (2010). The effects of adding zoledronic acid to neoadjuvant chemotherapy on tumour response: exploratory evidence for direct anti-tumour activity in breast cancer. *British journal of cancer* **102**: 1099-1105.
- Condeelis J, Segall JE (2003). Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature reviews Cancer* **3**: 921-930.
- Coscia M, Quaglino E, Iezzi M, Curcio C, Pantaleoni F, Riganti C *et al* (2010). Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *Journal of cellular and molecular medicine* **14**: 2803-2815.
- Coussens LM, Pollard JW (2011). Leukocytes in mammary development and cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**.
- Daniels DL, Weis WI (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature structural & molecular biology* **12**: 364-371.
- Davidson G, Wu W, Shen J, Bilic J, Fenger U, Stannek P *et al* (2005). Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature* **438**: 867-872.
- de Graaf IA, Olinga P, de Jager MH, Merema MT, de Kanter R, van de Kerkhof EG *et al* (2010). Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nature protocols* **5**: 1540-1551.
- DeNardo DG, Johansson M, Coussens LM (2008). Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer metastasis reviews* **27**: 11-18.
- DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF *et al* (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer discovery* **1**: 54-67.
- Denoyelle C, Hong L, Vannier JP, Soria J, Soria C (2003). New insights into the actions of bisphosphonate zoledronic acid in breast cancer cells by dual RhoA-dependent and -independent effects. *British journal of cancer* **88**: 1631-1640.
- Egeblad M, Werb Z (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews Cancer* **2**: 161-174.

- Fodde R, Smits R, Clevers H (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature reviews Cancer* **1**: 55-67.
- Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews Immunology* **12**: 253-268.
- Gallo M, De Luca A, Lamura L, Normanno N (2012). Zoledronic acid blocks the interaction between mesenchymal stem cells and breast cancer cells: implications for adjuvant therapy of breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23**: 597-604.
- Ghadimi BM, Grade M, Difilippantonio MJ, Varma S, Simon R, Montagna C *et al* (2005). Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**: 1826-1838.
- Giese K, Cox J, Grosschedl R (1992). The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* **69**: 185-195.
- Giraud E, Inoue M, Hanahan D (2004). An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation* **114**: 623-633.
- Giulian D, Baker TJ (1986). Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **6**: 2163-2178.
- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**: 357-362.
- Gnant M (2009). Bisphosphonates in the prevention of disease recurrence: current results and ongoing trials. *Current cancer drug targets* **9**: 824-833.
- Gnant M, Mlineritsch B, Schippinger W, Luschin-Ebengreuth G, Postlberger S, Menzel C *et al* (2009). Endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal breast cancer. *The New England journal of medicine* **360**: 679-691.
- Gnant M (2011). Zoledronic acid in breast cancer: latest findings and interpretations. *Therapeutic advances in medical oncology* **3**: 293-301.
- Gorden DL, Fingleton B, Crawford HC, Jansen DE, Lepage M, Matrisian LM (2007). Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment. *International journal of cancer Journal international du cancer* **121**: 495-500.
- Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ *et al* (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer research* **65**: 5278-5283.
- Gradl D, König A, Wedlich D (2002). Functional diversity of Xenopus lymphoid enhancer factor/T-cell factor transcription factors relies on combinations of activating and repressing elements. *The Journal of biological chemistry* **277**: 14159-14171.
- Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* **25**: 1543-1549.

- Hampf M, Gossen M (2006). A protocol for combined Photinus and Renilla luciferase quantification compatible with protein assays. *Analytical biochemistry* **356**: 94-99.
- Hanahan D (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.
- Heuff G, Oldenburg HS, Boutkan H, Visser JJ, Beelen RH, Van Rooijen N *et al* (1993). Enhanced tumour growth in the rat liver after selective elimination of Kupffer cells. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **37**: 125-130.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nature cell biology* **8**: 1369-1375.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, Miyake K *et al* (2008). The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nature cell biology* **10**: 1349-1355.
- Holmes KA, Song JS, Liu XS, Brown M, Carroll JS (2008). Nkx3-1 and LEF-1 function as transcriptional inhibitors of estrogen receptor activity. *Cancer research* **68**: 7380-7385.
- Hoppler S, Kavanagh CL (2007). Wnt signalling: variety at the core. *Journal of cell science* **120**: 385-393.
- Hovanes K, Li TW, Waterman ML (2000). The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nucleic acids research* **28**: 1994-2003.
- Huang FI, Chen YL, Chang CN, Yuan RH, Jeng YM (2012). Hepatocyte growth factor activates Wnt pathway by transcriptional activation of LEF1 to facilitate tumor invasion. *Carcinogenesis* **33**: 1142-1148.
- Hurlstone A, Clevers H (2002). T-cell factors: turn-ons and turn-offs. *The EMBO journal* **21**: 2303-2311.
- Iwai S, Yonekawa A, Harada C, Hamada M, Katagiri W, Nakazawa M *et al* (2010). Involvement of the Wnt-beta-catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *International journal of oncology* **37**: 1095-1103.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C *et al* (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**: 820-827.
- Kendziorra E, Ahlborn K, Spitzner M, Rave-Frank M, Emons G, Gaedcke J *et al* (2011). Silencing of the Wnt transcription factor TCF4 sensitizes colorectal cancer cells to (chemo-) radiotherapy. *Carcinogenesis* **32**: 1824-1831.
- Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK (2000). Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* **31**: 75-82.
- Klemm F, Bleckmann A, Siam L, Chuang HN, Rietkotter E, Behme D *et al* (2011). beta-catenin-independent WNT signaling in basal-like breast cancer and brain metastasis. *Carcinogenesis* **32**: 434-442.
- Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW *et al* (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* **275**: 1784-1787.

- Kriegel L, Horst D, Reiche JA, Engel J, Kirchner T, Jung A (2010). LEF-1 and TCF4 expression correlate inversely with survival in colorectal cancer. *Journal of translational medicine* **8**: 123.
- Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M *et al* (2009). M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *The Journal of experimental medicine* **206**: 1089-1102.
- Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends in genetics : TIG* **16**: 279-283.
- Kuhnl A, Gokbuget N, Kaiser M, Schlee C, Stroux A, Burmeister T *et al* (2011). Overexpression of LEF1 predicts unfavorable outcome in adult patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **118**: 6362-6367.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lagadec C, Vlashi E, Della Donna L, Meng Y, Dekmezian C, Kim K *et al* (2010). Survival and self-renewing capacity of breast cancer initiating cells during fractionated radiation treatment. *Breast cancer research : BCR* **12**: R13.
- Lehenkari PP, Kellinsalmi M, Napankangas JP, Ylitalo KV, Monkkonen J, Rogers MJ *et al* (2002). Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Molecular pharmacology* **61**: 1255-1262.
- Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer research* **36**: 4562-4569.
- Lewis CE, Leek R, Harris A, McGee JO (1995). Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *Journal of leukocyte biology* **57**: 747-751.
- Li XY, Lin YC, Huang WL, Hong CQ, Chen JY, You YJ *et al* (2012). Zoledronic acid inhibits proliferation and impairs migration and invasion through downregulating VEGF and MMPs expression in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Med Oncol* **29**: 714-720.
- Li Y, Wang L, Zhang M, Melamed J, Liu X, Reiter R *et al* (2009). LEF1 in androgen-independent prostate cancer: regulation of androgen receptor expression, prostate cancer growth, and invasion. *Cancer research* **69**: 3332-3338.
- Lin AY, Chua MS, Choi YL, Yeh W, Kim YH, Azzi R *et al* (2011). Comparative profiling of primary colorectal carcinomas and liver metastases identifies LEF1 as a prognostic biomarker. *PLoS one* **6**: e16636.
- Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *The Journal of experimental medicine* **193**: 727-740.
- Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E *et al* (2008). Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science* **320**: 807-811.
- Lin K, Wang S, Julius MA, Kitajewski J, Moos M, Jr., Luyten FP (1997). The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 11196-11200.

- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y *et al* (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**: 837-847.
- Loi S, Haibe-Kains B, Majjaj S, Lallemand F, Durbecq V, Larsimont D *et al* (2010). PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 10208-10213.
- Love JJ, Li X, Case DA, Giese K, Grosschedl R, Wright PE (1995). Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature* **376**: 791-795.
- Lucero OM, Dawson DW, Moon RT, Chien AJ (2010). A re-evaluation of the "oncogenic" nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers. *Current oncology reports* **12**: 314-318.
- Luckman SP, Coxon FP, Ebetino FH, Russell RG, Rogers MJ (1998a). Heterocycle-containing bisphosphonates cause apoptosis and inhibit bone resorption by preventing protein prenylation: evidence from structure-activity relationships in J774 macrophages. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **13**: 1668-1678.
- Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ (1998b). Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **13**: 581-589.
- Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF *et al* (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *The American journal of pathology* **153**: 865-873.
- Ma L, Weinberg RA (2008). Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends in genetics : TIG* **24**: 448-456.
- MacDonald KP, Palmer JS, Cronau S, Seppanen E, Olver S, Raffelt NC *et al* (2010). An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* **116**: 3955-3963.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* **23**: 549-555.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* **25**: 677-686.
- Mantovani A, Sica A (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Current opinion in immunology* **22**: 231-237.
- Medici D, Hay ED, Goodenough DA (2006). Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecular biology of the cell* **17**: 1871-1879.
- Medici D, Nawshad A (2010). Type I collagen promotes epithelial-mesenchymal transition through ILK-dependent activation of NF-kappaB and LEF-1. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **29**: 161-165.

- Melani C, Sangaletti S, Barazzetta FM, Werb Z, Colombo MP (2007). Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma. *Cancer research* **67**: 11438-11446.
- Miller FR, Miller BE, Heppner GH (1983). Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion & metastasis* **3**: 22-31.
- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V *et al* (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **86**: 391-399.
- Monkkonen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen IE, Vepsalainen J *et al* (2006). A new endogenous ATP analog (ApppI) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *British journal of pharmacology* **147**: 437-445.
- Morgan G, Lipton A (2010). Antitumor effects and anticancer applications of bisphosphonates. *Seminars in oncology* **37 Suppl 2**: S30-40.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B *et al* (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**: 1787-1790.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**: 55-63.
- Mosser DM (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology* **73**: 209-212.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**: 263-273.
- Mundy GR (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature reviews Cancer* **2**: 584-593.
- Murakami T, Toda S, Fujimoto M, Ohtsuki M, Byers HR, Etoh T *et al* (2001). Constitutive activation of Wnt/beta-catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential. *Biochemical and biophysical research communications* **288**: 8-15.
- Nandi S, Gokhan S, Dai XM, Wei S, Enikolopov G, Lin H *et al* (2012). The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Developmental biology* **367**: 100-113.
- Nawshad A, Hay ED (2003). TGFbeta3 signaling activates transcription of the LEF1 gene to induce epithelial mesenchymal transformation during mouse palate development. *The Journal of cell biology* **163**: 1291-1301.
- Nawshad A, Medici D, Liu CC, Hay ED (2007). TGFbeta3 inhibits E-cadherin gene expression in palate medial-edge epithelial cells through a Smad2-Smad4-LEF1 transcription complex. *Journal of cell science* **120**: 1646-1653.
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T *et al* (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer cell* **10**: 515-527.

- Neville-Webbe HL, Gnant M, Coleman RE (2010). Potential anticancer properties of bisphosphonates. *Seminars in oncology* **37 Suppl 1**: S53-65.
- Nguyen A, Rosner A, Milovanovic T, Hope C, Planutis K, Saha B *et al* (2005). Wnt pathway component LEF1 mediates tumor cell invasion and is expressed in human and murine breast cancers lacking ErbB2 (her-2/neu) overexpression. *International journal of oncology* **27**: 949-956.
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J (2009a). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature reviews Cancer* **9**: 274-284.
- Nguyen DX, Chiang AC, Zhang XH, Kim JY, Kris MG, Ladanyi M *et al* (2009b). WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell* **138**: 51-62.
- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z *et al* (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 5367-5374.
- Nusse R, Varmus HE (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**: 99-109.
- Nusse R (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell research* **15**: 28-32.
- Nusslein-Volhard C, Wieschaus E (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**: 795-801.
- Ojalvo LS, Whittaker CA, Condeelis JS, Pollard JW (2010). Gene expression analysis of macrophages that facilitate tumor invasion supports a role for Wnt-signaling in mediating their activity in primary mammary tumors. *J Immunol* **184**: 702-712.
- Olinga P, Groen K, Hof IH, De Kanter R, Koster HJ, Leeman WR *et al* (1997a). Comparison of five incubation systems for rat liver slices using functional and viability parameters. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **38**: 59-69.
- Olinga P, Meijer DK, Slooff MJ, Groothuis GM (1997b). Liver slices in in vitro pharmacotoxicology with special reference to the use of human liver tissue. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **12**: 77-100.
- Olinga P, Hof IH, Merema MT, Smit M, de Jager MH, Swart PJ *et al* (2001). The applicability of rat and human liver slices to the study of mechanisms of hepatic drug uptake. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **45**: 55-63.
- Oosterling SJ, van der Bij GJ, Meijer GA, Tuk CW, van Garderen E, van Rooijen N *et al* (2005). Macrophages direct tumour histology and clinical outcome in a colon cancer model. *The Journal of pathology* **207**: 147-155.
- Ozbek S, Balasubramanian PG, Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP, Adams JC (2010). The evolution of extracellular matrix. *Molecular biology of the cell* **21**: 4300-4305.
- Paget S (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer metastasis reviews* **8**: 98-101.
- Pandur P, Maurus D, Kuhl M (2002). Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **24**: 881-884.
- Peifer M, McCrea PD, Green KJ, Wieschaus E, Gumbiner BM (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment

- polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *The Journal of cell biology* **118**: 681-691.
- Pfannes SD, Muller B, Korner S, Bessler WG, Hoffmann P (2001). Induction of soluble antitumoral mediators by synthetic analogues of bacterial lipoprotein in bone marrow-derived macrophages from LPS-responder and -nonresponder mice. *Journal of leukocyte biology* **69**: 590-597.
- Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* **407**: 535-538.
- Pinzon-Charry A, Ho CS, Maxwell T, McGuckin MA, Schmidt C, Furnival C *et al* (2007). Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *British journal of cancer* **97**: 1251-1259.
- Polakis P (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**.
- Pollard JW (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer* **4**: 71-78.
- Prieve MG, Guttridge KL, Munguia J, Waterman ML (1998). Differential importin-alpha recognition and nuclear transport by nuclear localization signals within the high-mobility-group DNA binding domains of lymphoid enhancer factor 1 and T-cell factor 1. *Molecular and cellular biology* **18**: 4819-4832.
- Pukrop T, Gradl D, Henningfeld KA, Knochel W, Wedlich D, Kuhl M (2001). Identification of two regulatory elements within the high mobility group box transcription factor XTCF-4. *The Journal of biological chemistry* **276**: 8968-8978.
- Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S *et al* (2006). Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 5454-5459.
- Pukrop T, Dehghani F, Chuang HN, Lohaus R, Bayanga K, Heermann S *et al* (2010). Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way. *Glia* **58**: 1477-1489.
- Qian BZ, Pollard JW (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**: 39-51.
- Regen T, van Rossum D, Scheffel J, Kastriti ME, Revelo NH, Prinz M *et al* (2011). CD14 and TRIF govern distinct responsiveness and responses in mouse microglial TLR4 challenges by structural variants of LPS. *Brain, behavior, and immunity* **25**: 957-970.
- Reiling N, Klug K, Krallmann-Wenzel U, Laves R, Goyert S, Taylor ME *et al* (2001). Complex encounters at the macrophage-mycobacterium interface: studies on the role of the mannose receptor and CD14 in experimental infection models with *Mycobacterium avium*. *Immunobiology* **204**: 558-571.
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* **50**: 649-657.
- Robinson-Smith TM, Isaacsohn I, Mercer CA, Zhou M, Van Rooijen N, Husseinzadeh N *et al* (2007). Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. *Cancer research* **67**: 5708-5716.
- Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J *et al* (2000). Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* **88**: 2961-2978.

- Rogers TL, Holen I (2011). Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *Journal of translational medicine* **9**: 177.
- Salahshor S, Woodgett JR (2005). The links between axin and carcinogenesis. *Journal of clinical pathology* **58**: 225-236.
- Sanford KK, Hobbs GL, Earle WR (1956). The tumor-producing capacity of strain L mouse cells after 10 years in vitro. *Cancer research* **16**: 162-166.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467.
- Santini D, Vincenzi B, Galluzzo S, Battistoni F, Rocci L, Venditti O *et al* (2007). Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**: 4482-4486.
- Santini D, Martini F, Fratto ME, Galluzzo S, Vincenzi B, Agrati C *et al* (2009). In vivo effects of zoledronic acid on peripheral gamma delta T lymphocytes in early breast cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **58**: 31-38.
- Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J *et al* (2004). Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *Journal of immunological methods* **288**: 123-134.
- Shigematsu A, Motoji N, Momose Y, Iida A, Higashi N (2000). Viability of liver slices exhibiting absorption, metabolism, and elimination of substrates in culture medium. *Experimental and molecular pathology* **69**: 119-143.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012). Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **62**: 10-29.
- Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J *et al* (2006). Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *Journal of the National Cancer Institute* **98**: 262-272.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **51**: 1409-1416.
- Steeg PS (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature medicine* **12**: 895-904.
- Stresing V, Fournier PG, Bellahcene A, Benzaid I, Monkkonen H, Colombel M *et al* (2011). Nitrogen-containing bisphosphonates can inhibit angiogenesis in vivo without the involvement of farnesyl pyrophosphate synthase. *Bone* **48**: 259-266.
- Sturm JW, Magdeburg R, Berger K, Petruch B, Samel S, Bonninghoff R *et al* (2003). Influence of TNFA on the formation of liver metastases in a syngenic mouse model. *International journal of cancer Journal international du cancer* **107**: 11-21.
- Sunderkotter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K, Bhardwaj R, Sorg C (1991). Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacology & therapeutics* **51**: 195-216.
- Takemaru KI, Moon RT (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *The Journal of cell biology* **149**: 249-254.

- Talaat AM, Howard ST, Hale Wt, Lyons R, Garner H, Johnston SA (2002). Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic acids research* **30**: e104.
- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y *et al* (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**: 530-535.
- Thiery JP (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer* **2**: 442-454.
- Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *The Journal of cell biology* **162**: 899-908.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 4350-4354.
- Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R (1991). LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes & development* **5**: 880-894.
- Trempe GL (1976). Human breast cancer in culture. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer*: 33-41.
- Tsagozis P, Eriksson F, Pisa P (2008). Zoledronic acid modulates antitumoral responses of prostate cancer-tumor associated macrophages. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **57**: 1451-1459.
- Valleala H, Hanemaaijer R, Mandelin J, Salminen A, Teronen O, Monkkonen J *et al* (2003). Regulation of MMP-9 (gelatinase B) in activated human monocyte/macrophages by two different types of bisphosphonates. *Life sciences* **73**: 2413-2420.
- van de Wetering M, Oosterwegel M, Dooijes D, Clevers H (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *The EMBO journal* **10**: 123-132.
- Van de Wetering M, Castrop J, Korinek V, Clevers H (1996). Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Molecular and cellular biology* **16**: 745-752.
- van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J *et al* (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell* **88**: 789-799.
- van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L *et al* (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes & development* **8**: 2691-2703.
- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT (2003). A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Developmental cell* **5**: 367-377.
- Verollet C, Charriere GM, Labrousse A, Cougoule C, Le Cabec V, Maridonneau-Parini I (2011). Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough. *European journal of immunology* **41**: 2805-2813.
- Verrill C, Davies J, Millward-Sadler H, Sundstrom L, Sheron N (2002). Organotypic liver culture in a fluid-air interface using slices of neonatal rat and adult human tissue--a model of fibrosis in vitro. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **48**: 103-110.

- Vickers AE, Saulnier M, Cruz E, Merema MT, Rose K, Bentley P *et al* (2004). Organ slice viability extended for pathway characterization: an in vitro model to investigate fibrosis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **82**: 534-544.
- Wallingford JB, Habas R (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* **132**: 4421-4436.
- Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M *et al* (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature immunology* **13**: 753-760.
- Waterman ML, Fischer WH, Jones KA (1991). A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer. *Genes & development* **5**: 656-669.
- Wei S, Nandi S, Chitu V, Yeung YG, Yu W, Huang M *et al* (2010). Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells. *Journal of leukocyte biology* **88**: 495-505.
- Winter CG, Wang B, Ballew A, Royou A, Karess R, Axelrod JD *et al* (2001). Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton. *Cell* **105**: 81-91.
- Witmer-Pack MD, Hughes DA, Schuler G, Lawson L, McWilliam A, Inaba K *et al* (1993). Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *Journal of cell science* **104 (Pt 4)**: 1021-1029.
- Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP (1994). Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Molecular and cellular biology* **14**: 6278-6286.
- Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER *et al* (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer research* **64**: 7022-7029.
- Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER *et al* (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer research* **67**: 2649-2656.
- Yang J, Weinberg RA (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell* **14**: 818-829.
- Zhang W, Arii S, Sasaoki T, Adachi Y, Funaki N, Higashitsuji H *et al* (1993). The role of Kupffer cells in the surveillance of tumor growth in the liver. *The Journal of surgical research* **55**: 140-146.

7 Anhang

7.1 LEF1-Signatur

Tab. 7.1: LEF-1-Signatur

Entrez-Nr.	Symbol	Genname
6352	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
54443	ANLN	anillin, actin binding protein
6451	SH3BGR1	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like
2181	ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3
9969	MED13	mediator complex subunit 13
2633	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible
6782	HSPA13	heat shock protein 70kDa family, member 13
8204	NRIP1	nuclear receptor interacting protein 1
10513	APPBP2	amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2
30836	DNTTIP2	deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein 2
2274	FHL2	four and a half LIM domains 2
3434	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
4233	MET	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
24138	IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5
9111	NMI	N-myc (and STAT) interactor
6198	RPS6KB1	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
10964	IFI44L	interferon-induced protein 44-like
23287	AGTPBP1	ATP/GTP binding protein 1
5966	REL	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)
54739	XAF1	XIAP associated factor 1
48	ACO1	aconitase 1, soluble
1063	CENPF	centromere protein F, 350/400kDa (mitosin)
10111	RAD50	RAD50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
3430	IFI35	interferon-induced protein 35
51592	TRIM33	tripartite motif containing 33
4502	MT2A	metallothionein 2A
9522	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1
11059	WWP1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
56987	BBX	bobby sox homolog (<i>Drosophila</i>)
253959	RALGAPA1	Ral GTPase activating protein, alpha subunit 1 (catalytic)
91543	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
7227	TRPS1	trichorhinophalangeal syndrome I
28986	MAGEH1	melanoma antigen family H, 1
64151	NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G
79682	MLF1IP	MLF1 interacting protein
23586	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
55930	MYO5C	myosin VC
55601	DDX60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60
64135	IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1
11254	SLC6A14	solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14
83990	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
2635	GBP3	guanylate binding protein 3
378938	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)
54625	PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14
57584	ARHGAP21	Rho GTPase activating protein 21

7.2 Zusätzlich verwendete Materialien

7.2.1 Verbrauchsmaterialien

10 cm Petrischale (unbeschichtet)	Sarstedt, Nümbrecht
10 cm Zellkulturpetrischale (beschichtet)	Nunc, Langenselbold
6-well-Zellkulturschalen	Nunc, Langenselbold
24-well-Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen (25 / 75 / 175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Auslaufpipetten (5 / 10 / 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0,5 / 1,5 / 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Tubes (15 / 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikroliterpipetten (10 / 100 / 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen (2 / 50 ml)	Braun, Melsungen

7.2.2 Geräte

Autoklav Varioklav	Thermo Scientific, Bonn
CO ₂ -Inkubator CB150	Binder, Tuttlingen
Magnetrührer REO basic C	IAK Werk, Staufen
Mikroskop Telaval 31	Zeiss, Göttingen
PowerPack P25	Biometra, Göttingen
Sicherheitswerkbank UVF 6.12S	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator-CCD-Kamera	Intas, Göttingen
UV-Transilluminator TI3	Biometra, Göttingen
Vortexer Genius 3	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Köttermann, Uetze, Hänigsen

Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Schwalbach
Zählkammer Neubauer Improved	LO Laboroptik, Friedrichsdorf
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 1-15K	Sigma, München
Zentrifuge Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Multifuge 3 L-R Heraeus	Thermo Scientific, Bonn