

Aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie
(Prof. Dr. med L. Trümper)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Wnt-Genexpression im Mammakarzinommodell und in Tumor-assoziierten
Makrophagen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Daniel Behme

aus

Peine

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer.nat. H.K. Kroemer

1. Berichterstatter: PD Dr. med. T. Pukrop

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. H. Hahn

3. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2013

1.0	Einleitung	1
1.1	Einteilung der Mammakarzinome	1
1.1.1	Epidemiologie des Mammakarzinoms	1
1.1.2	Die molekulare Einteilung des Mammakarzinoms	1
1.2	Die epitheliale mesenchymale Transition	3
1.3	Vergleich zweier Mammakarzinomzelllinien	3
1.3.1	MCF-7 als Luminal-A-Zelllinie.....	3
1.3.2	MDA-MB 231 als <i>triple negative</i> (TN) Mammakarzinomzelllinie	4
1.4	Bedeutung von Wnt-Signalwegen in Karzinomen	5
1.4.1	Kanonische Wnt-Signaltransduktion.....	5
1.4.2	Nicht kanonische Wnt-Signaltransduktion	5
1.4.3	Der Wnt/Ca ²⁺ -Signalweg.....	6
1.4.4	Der Wnt-Ror2-Signalweg.....	6
1.4.5	Neoplastische Transformation durch Wnt-Proteine	7
1.4.6	Die Rolle von Wnt-Signalwegen für die Invasivität von Karzinomen.....	7
1.4.7	Die Rolle von Wnt-Signalwegen für die Progression und Metastasierung von Mammakarzinomen	8
1.5	Dickkopf-1 als Wnt-Antagonist	8
1.6	Bedeutung von Tumor-assoziierten Makrophagen in Tumoren.....	9
1.6.1	Die Rolle von Makrophagen für die Invasivität von Tumoren	10
1.6.2	Die Rolle von TAM für die Metastasierung von Tumoren	11
1.6.3	Wnt-Expression in TAM.....	11
1.7	Zielsetzung.....	12
1.7.1	Vergleichende Analyse von MCF-7 und MDA-MB 231 auf Komponenten des Wnt-Signalweges und verschiedener Wnt-Zielgene	12
1.7.2	Entwicklung einer geeigneten Methode zur Generierung von Makrophagen für in-vitro-Versuche	13
1.7.3	Genaktivierung und Genregulation in humanen Makrophagen nach Kokultur mit MCF-7 und mögliche Antagonisten.....	13
2.0	Material und Methoden.....	14
2.1	Material	14
2.1.1	Zelllinien	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	14
2.1.3	Zellkulturmedien und Zusätze	14
2.1.4	Oligonukleotide.....	14
2.1.5	Antikörper	16
2.1.6	Reaktionssysteme	16
2.1.7	Rekombinante Proteine	17
2.1.8	Geräte	17
2.1.9	Software	17

2.2	Methoden	18
2.2.1	Zellkultur	18
2.2.1.1	Standardbedingungen für die Zellkultur	18
2.2.1.2	Subkultivierung der Zelllinien	18
2.2.1.3	Zellzahlbestimmung	19
2.2.1.4	Kokulturversuche	19
2.2.2	cDNA-Microarray	20
2.2.2.1	Grundsätzliche Feststellungen zum cDNA-Microarray	20
2.2.2.2	Funktionsprinzip des cDNA-Microarrays	20
2.2.2.3	Chemikalien	20
2.2.2.4	RNA-Isolation	21
2.2.2.5	Markierung der cDNA	21
2.2.2.6	Hybridisierung	22
2.2.2.7	Chemolumineszenz	23
2.2.3	Einfachgradient – <i>Counterflow Elutriation</i>	23
2.2.3.1	Einfachgradient	23
2.2.3.2	<i>Counterflow Elutriation</i>	24
2.2.4	Doppeldichtegradientenzentrifugation von humanen Monozyten	25
2.2.5	Differenzierung von humanen Monozyten zu Makrophagen	26
2.2.6	<i>Fluorescens activated cell sorting</i> (FACS®)	27
2.2.6.1	Funktionsprinzip des FACS®	27
2.2.6.2	Antikörpermarkierung der Zellen	28
2.2.6.3	Durchführung und Auswertung	28
2.2.7	Cytospin-Präparate	28
2.2.8	Histochemie	29
2.2.8.1	Naphthyl-Esterase-Färbung	29
2.2.8.2	Puffer und Chemikalien	29
2.2.8.3	Durchführung der Färbung	30
2.2.8.3.1	Herstellung des Substrates	30
2.2.8.3.2	Färbung der Cytospinpräparate	30
2.2.8.4	Mikroskopie und digitale Aufnahmen	30
2.2.9	RNA-Isolation	30
2.2.9.1	Zellernte und Homogenisation	31
2.2.9.2	Phasenseparation	31
2.2.9.3	RNA-Präzipitation und RNA-Waschschritt	31
2.2.9.4	DNase -Verdau	31
2.2.9.5	RNA-Aufreinigung	32
2.2.9.6	RNA-Präzipitation	32
2.2.9.7	RNA-Waschung	32
2.2.9.8	RNA-Lösen	32
2.2.9.9	RNA-Qualitätsbestimmung	33
2.2.10	cDNA-Synthese	33
2.2.11	<i>Primer-Design</i>	34
2.2.12	<i>Primer-Testung</i>	34

2.2.13	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i> (qPCR)	35
2.2.13.1	Grundprinzipien der qPCR	35
2.2.13.2	Reaktionsansatz.....	36
2.2.13.3	Pipettierschema	36
2.2.13.4	Durchführung der qPCR.....	36
2.2.13.5	Auswertung der qPCR	37
3.0	Ergebnisse	39
3.1	Wnt- und Wnt-assoziierte Genexpression	39
3.1.1	Ergebnisse des qualitativen <i>Microarrays</i>	39
3.1.2	Validierung der qualitativen <i>Wnt-Microarray</i> -Ergebnisse durch qPCR	41
3.1.3	Validierung des qualitativen <i>Wnt-Microarrays</i>	41
3.1.4	Expression von Wnt- und Wnt-assoziierten Genen	42
3.1.5	Zusammenfassung Wnt- und Wnt-assoziiierter Genexpression.....	42
3.2	Monozytenisolation- und Differenzierung	43
3.2.1	Quantitative Ausbeute der Isolation und der Differenzierung	43
3.2.2	Qualität der differenzierten Makrophagen	45
3.2.2.1	Esterase-Färbungen der differenzierten Makrophagen	45
3.2.2.2	FACS [®] -Analysen der gewonnenen Makrophagen.....	46
3.2.3	Zusammenfassung Monozytenisolation- und Differenzierung	49
3.3	Wnt-Genregulation in humanen Makrophagen.....	50
3.3.1	Makrophagen für Kokulturversuche.....	50
3.3.2	<i>Housekeeping</i> - Gene für qPCR-Experimente mit humanen Makrophagen.....	50
3.3.3	Expression von HPRT1 in humanen Makrophagen.....	50
3.3.4	Expression von GNB2L1 in humanen Makrophagen.....	50
3.3.5	Expressionsstabilität zweier <i>housekeeping</i> -Gene	51
3.3.6	Regulation der Expression von Wnt5b	51
3.3.7	Wnt- und Wnt-assoziierte Genregulation in humanen Makrophagen ..	51
3.3.8	Zusammenfassung Genregulation in humanen Makrophagen	54
4.0	Diskussion.....	55
4.1	Wnt5a- und Wnt5b-Expression im Mammakarzinom	55
4.2	Wnt-assoziierte Genregulation	56
4.3	MCF-7 als östrogenabhängige Mammakarzinomzelllinie	58
4.4	Vergleich zweier Methoden zur Isolation von Monozyten.....	58
4.4.1	Differenzierung zu Makrophagen.....	59
4.4.2	Qualität der differenzierten Makrophagen	60
4.5	Wnt5a- und Wnt5b-Expression in humanen Makrophagen	61
4.6	VEGF-A-Expression in humanen Makrophagen	62
4.7	TNF- α -Expression in humanen Makrophagen	63

5.0	Zusammenfassung	65
6.0	Literaturverzeichnis	67

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
AP-1	<i>Activator-protein-1</i>
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AWMF	Arbeitsgemeinschaft wissenschaftlicher medizinischer Fachgesellschaften
CamKII	<i>calcium/calmodulin dependent protein kinase</i>
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
COX2	Zyklooxygenase-2
CSF-1	<i>colony stimulating factor-1</i>
CTBP1	<i>c-terminal binding protein-1</i>
DAG	Diacylglycerin
DKK-1	Dickkopf-1
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMMPRIN	<i>extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
EMT	epitheliale mesenchymale Transition
EP300	<i>E1A binding protein P300</i>
FACS®	<i>fluorescens activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
Fw	<i>forward</i>
GMP	<i>guanosine monophosphate</i>
GNB2L1	<i>guanine nucleotide binding protein beta polypeptide 2-like-1</i>
GSK3β	Glykogensynthase Kinase 3β
HMLE	Humane immortalisierte Mammaepithelzellen
HPRT1	<i>hypoxanthine Phosphoribosyltransferase-1</i>
ID	<i>inhibitor of DNA-binding</i>

IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
JNK	<i>c-jun n-terminal kinase</i>
LEF	<i>lymphoid enhancer binding factor</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
LRP	<i>low density lipoprotein related receptor protein</i>
MET	mesenchymale epitheliale Transition
MIF	Makrophagen-migrations-Inhibitonsfaktor
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
mRNA	<i>messenger deoxyribonucleic acid</i>
MSP	mesenchymale Subpopulation
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-Cells</i>
PBMZ	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCP	<i>planar cell polarity</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDE6	Phosphodiesterase-6
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphonat
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLAU	<i>plasminogen activator urokinase</i>
PLAU-R	<i>plasminogen activator urokinase receptor</i>
PLC	Phospholipase C
PyMT	<i>polyoma middle T-antigen</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RAP	<i>ras related protein</i>

rh	<i>recombinant human</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROR	<i>tyrosine-protein kinase transmembrane receptor</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Rv	<i>reverse</i>
RYK	<i>receptor like kinase</i>
SA	Standardabweichung
SF	Standardfehler
SSC	<i>side scatter</i>
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCF	<i>transcription factor</i>
TGF-1 β	<i>transforming growth factor beta-1</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TN	<i>triple negative</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TNM	<i>tumor node metastasis</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Wnt	<i>wingless-type MMTV integration site</i>

1.0 Einleitung

1.1 Einteilung der Mammakarzinome

1.1.1 Epidemiologie des Mammakarzinoms

Mit circa 72.000 Neuerkrankungen pro Jahr ist das Mammakarzinom aktuell der häufigste Tumor der Frau in der Bundesrepublik Deutschland. Etwa jede achte Frau erkrankt während ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Circa jede vierte Frau ist bei Diagnosestellung unter 55 Jahren alt, jede zehnte jünger als 45 Jahre. (Robert-Koch-Institut 2012). In den USA stieg die 5-Jahres-Überlebensrate von 75% im Jahr 1975 auf 90% im Jahr 2010. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patientinnen mit distanten Metastasen betrug in den USA im Jahr 2010 jedoch lediglich 23% (*American Cancer Society* 2010).

1.1.2 Die molekulare Einteilung des Mammakarzinoms

Unterschiedliche Parameter zur Einschätzung der Prognose und zur Auswahl der geeigneten Therapie des Mammakarzinoms sind in den letzten Jahrzehnten etabliert worden. Neben dem Staging des Mammakarzinoms gemäß der TNM-Klassifikation, dem Grading des histologischen Präparates und der histologischen Einteilung in präinvasive Neoplasie (*carcinoma in situ*), lobulär invasive, duktal invasive und medulläre Mammakarzinome spielt die molekulare Charakterisierung des Mammakarzinoms eine entscheidende Rolle für die Therapieauswahl. Mit Ausnahme der präinvasiven Neoplasie (*carcinoma in situ*) wird für alle invasiven Mammakarzinome der Hormonrezeptorstatus erhoben. Dieser beinhaltet die Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, sowie eine semiquantitative Bestimmung des Her2-Proteins (Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2012). Durch neuere Analysen von Genexpressionsprofilen wurden insgesamt vier molekulare Subtypen des Mammakarzinoms definiert, die sich in ihrem klinischen Verlauf und dem Therapieansprechen signifikant unterscheiden. Im Einzelnen sind dies die Subtypen: Luminal-A, Luminal-B, Her2-positiv und *basal-like* (Perou et al. 2000; Sorlie et al. 2001). Da dieser Einteilung *Microarray*-Analysen

zugrunde liegen und diese im klinischen Alltag nicht immer einsetzbar sind, wurde als Ersatz eine vereinfachte, immunhistochemische Klassifikation eingeführt (Hugh et al. 2009). Hiernach werden folgende vier molekulare Subtypen unterschieden:

Bezeichnung	Molekulare Charakteristik:
Luminal-A	Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiv, Her2 -negativ Ki-67 niedrig (<14%)
Luminal-B	- HER2-negativ: ER- und/oder PgR-positiv und Ki-67 hoch (>= 14 %) - HER2-positiv: ER- und/oder PgR-positiv und Ki-67 hoch oder niedrig
Her2-positiv	Her2-positiv, Östrogen- und Progesteronrezeptor-negativ
<i>triple negative</i> (TN)	Her2-, Östrogen- und Progesteronrezeptor-negativ

(Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF 2012)

Der Hormonrezeptorstatus und der Her2-Status spielen hierbei eine entscheidende Rolle für die sogenannte *targeted therapy*. So reduziert die adjuvante Therapie eines östrogen- und progesteronrezeptorpositiven Mammakarzinoms mit dem selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen[®] die Rezidiv- und Sterberate signifikant. Der Nutzen der adjuvanten Therapie mit Tamoxifen besteht unabhängig von Alter, Lymphknotenstatus und zusätzlicher Chemotherapie (Davis et al. 2011). Bei Her2-überexprimierenden Mammakarzinomen kommt der monoklonale Antikörper Trastuzumab, Herceptin[®], zum Einsatz. Trastuzumab reduziert zum Beispiel in der adjuvanten Anwendung die Rezidivrate von Her2-positiven Mammakarzinomen um 45-50% (Yin et al. 2011). Im Gegensatz dazu geht ein *triple negative* (TN) Rezeptorstatus, also die fehlende Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie von Her2 mit der schlechtesten Prognose aller Mammakarzinome einher (Tischkowitz et al. 2007).

1.2 Die epitheliale mesenchymale Transition

Wie in 1.1 beschrieben lag die 5-Jahres-Überlebensrate für Mammakarzinompatientinnen mit distanten Metastasen in den USA im Jahr 2010 bei lediglich 23%. Daher sind die Metastasierung und die ihr zugrundeliegenden Mechanismen von besonderem Interesse. Eine wesentliche Theorie zur Entstehung von Metastasen ist die mesenchymale epitheliale Transition (EMT). Während der Embryogenese ist die Umbildung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen eine zwingende Voraussetzung der Morphogenese. Hierbei werden epitheliale Zellen definiert als Zellen mit apiko-basaler Polarität und stark ausgebildeten Zell-Zellkontakten. Spezifisch ist unter anderem die hohe Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin. Mesenchymale Zellen hingegen verlieren die apiko-basale Polarität und zeigen eine niedrige Expression von E-Cadherin. Ebenso verändert sich die Expression von Intermediärfilamenten. Epitheliale Zellen zeigen eine hohe Cytokeratinexpression, in mesenchymalen Zellen wird diese durch eine vermehrte Vimentinexpression ersetzt. Mesenchymale Zellen sind deutlich motiler und können in das umliegende Stroma invadieren. Die *triple negativen* (TN) Mammakarzinome haben in ihrer Signalwegsaktivität eine große Ähnlichkeit mit der Signalwegsaktivität der embryonalen EMT. Zu diesen gehören unter anderem der TGF- β - und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg (Drasin et al. 2011).

1.3 Vergleich zweier Mammakarzinomzelllinien

1.3.1 MCF-7 als Luminal-A-Zelllinie

Die Brustkrebszelllinie MCF-7 wurde 1970 aus Zellen des Pleuratranssudats einer neunundsechzig Jahre alten Patientin mit Mammakarzinom etabliert (Soule et al. 1973). Sie gehört zu den am häufigsten genutzten Mammakarzinomzelllinien und wurde nach ihrer Etablierung in vielerlei Hinsicht charakterisiert. Seit mehr als dreißig Jahren wird diese Zelllinie als Modell für eine östrogen- und progesteronrezeptorpositive Mammakarzinomzelllinie untersucht (Engel and Young 1978). Hinsichtlich der Invasivität entwickelte sich eine Einteilung der Mammakarzinomzelllinien gemäß ihrer Expressionsprofile und funktioneller Eigenschaften. Diese teilt die bisher etablierten Mammakarzinomzelllinien in drei

Gruppen ein. MCF-7 gehört gemäß dieser Einteilung in die Gruppe der Luminal-A-Mammakarzinomzelllinien, beziehungsweise in die Gruppe der niedrig invasiven Mammakarzinomzelllinien (Lacroix and Leclercq 2004). Typische molekulare Marker und verschiedene in-vitro-Versuche zur Klassifizierung der Invasivität dieser Zelllinien wurden etabliert. Zu den molekularen Markern für niedrige Invasivität zählen der positive Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus (Brooks et al. 1973), die Expression von E-Cadherin (Shimoyama et al. 1989) und weiterer Zelladhäsionsmoleküle. Weitere differenziell exprimierte Gene im Vergleich zu hochinvasiven Mammakarzinomzelllinien sind die Kollagene VI α -1, I α -2, Vimentin, c-jun und Integrin α -3 (Zajchowski et al. 2001). Des Weiteren wurden verschiedene Methoden zur in-vitro-Messung der Invasivität von MCF-7-Zellen angewandt. So bestätigte sich die geringere Invasivität der MCF-7-Zellen in der modifizierten Boyden-Kammer im Verhältnis zu anderen Mammakarzinomzelllinien, wie MDA-MB 231 oder MDA-MB 435s (Thompson et al. 1992). Die Invasivität der MCF-7-Zelllinie kann jedoch durch externe Faktoren gesteigert werden, etwa durch Kokultivierung mit Makrophagen oder durch Stimulation mit rekombinantem humanem Wnt5a (Pukrop et al. 2006).

1.3.2 MDA-MB 231 als *triple negative* (TN) Mammakarzinomzelllinie

Die Mammakarzinomzelllinie MDA-MB 231 wurde Anfang der siebziger Jahre aus Zellen des Pleuratranssudats einer einundfünfzigjährigen Patientin mit einem Mammakarzinom etabliert (Cailleau et al. 1974). Wie auch die MCF-7-Zelllinie ist sie seither für viele in-vitro-Modelle genutzt worden und molekular gut charakterisiert. Gemäß der Invasivität und ihres Expressionsprofils wird sie in die Gruppe der mesenchymal-ähnlichen Zellen, oder *basal-like* Zellen, beziehungsweise der hoch invasiven Mammakarzinomzelllinien eingeordnet. Molekular kennzeichnet diese Gruppe die fehlende Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, sowie von Her2 (Lacroix and Leclercq 2004, Tischkowitz et al. 2007). Aufgrund der fehlenden Expression dieser Hormonrezeptoren wird diese Gruppe auch als TN-Zelllinie bezeichnet. Klinisch geht diese Subgruppe der Mammakarzinome mit der schlechtesten Prognose aller Mammakarzinome einher (Fisher et al. 1990, Tischkowitz et al. 2007). Neben dem Fehlen von Hormonrezeptoren zeigt sich in der MDA-MB 231-Zelllinie eine hohe Expression von Vimentin, welches als ein

spezifischer Teil des Zytoskeletts von mesenchymalen Zellen bekannt ist. Durch die Herunterregulation von Vimentin in MDA-MB 231 konnte eine Verminderung der Migrationsfähigkeit und eine höhere Adhäsionsfähigkeit erreicht werden (McInroy and Maatta 2007). In anderen Untersuchungen zeigte die Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 die höchste Invasivität und Migrationsfähigkeit der untersuchten Zelllinien (Zajchowski et al. 2001).

1.4 Bedeutung von Wnt-Signalwegen in Karzinomen

1.4.1 Kanonische Wnt-Signaltransduktion

Seit der Entdeckung von Wnt1 als Onkogen in murinen Mammakarzinomen in den frühen achtziger Jahren, entwickelte sich ein komplexes Bild der Wnt-Signalwege in der Tumorentstehung (Nusse and Varmus 1982). Die Untersuchungen der Wnt-Signalwege zeigten eine Initialisierung der Signalkaskade durch die Bindung sekretierter Wnt-Proteine an die transmembranösen Frizzled-Rezeptoren (Bhanot et al. 1996). Die Wnt-Bindung an Frizzled führt zu einer Phosphorylierung von Dishevelled, welches in Verbindung mit Axin die Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β) inhibiert (Lee JS et al. 1999). Zu den Substraten von der GSK3 β gehören unter anderem die negativen Regulatoren des *Adenomatous Polyposis Coli*-Genes (APC) und β -Catenin (Rubinfeld et al. 1996). Unphosphoryliertes β -Catenin ist in der Lage, die Transkriptionsfaktoren Transkriptionsfaktor (TCF) und *lymphoid enhancerbinding-factor* (LEF) zu binden und die Wnt/ β -Catenin-Zielgene zu regulieren (Behrens et al. 1996). Eine konstitutive Aktivierung von β -Catenin führt auf diesem Weg im Mausmodell zur Entstehung von Mammakarzinomen (Roose et al. 1999).

1.4.2 Nicht kanonische Wnt-Signaltransduktion

Als nicht kanonische Wnt-Signalwege werden alle β -Catenin-unabhängigen Signaltransduktionen über Wnt-Proteine bezeichnet. Zu diesen werden bis heute neun verschiedene Signalwege gezählt. Im Einzelnen, *wnt-planar cell polarity* (Wnt-PCP), *wnt-calcium*-Signalweg (Wnt-Ca²⁺), *wnt-ras-related-protein*-Signalweg (Wnt-RAP-1), *wnt-tyrosin-protein-kinase-receptor*-Signalweg (Wnt-ROR2), *wnt-protein-*

kinase-A-Signalweg (Wnt-PKA), Wnt-Glykogensynthetase-Kinase-Signalweg (Wnt-GSK3-Microtubulus), wnt-Proteinkinase-C-Signalweg (Wnt-aPKC), *wnt-receptor-like-kinase*-Signalweg (Wnt-RYK) und der *wnt-mammalian-target-of-rapamycin*-Signalweg (Wnt-mTOR) (Semenov et al. 2007). Im Vergleich zum kanonischen Wnt-Signalweg sind die nicht kanonischen Signalwege bisher weniger gut charakterisiert.

1.4.3 Der Wnt/Ca²⁺-Signalweg

Der Wnt/Ca²⁺-Signalweg induziert eine intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung durch Bindung von Wnt5a an Frizzled und die konsekutive Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) sowie der *calcium/calmodulin dependent kinase* (CaMKII). Diese aktiviert über Dishevelled die Phosphodiesterase 6 (PDE6). Aktive PDE6 führt zu einem Abbau von *cyclic guanosine monophosphate* (cGMP) zu GMP und damit zu einer Inhibition der Proteinkinase G (PKG). Diese führt zu einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und diese wiederum spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat (PIP₂) in Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG). DAG aktiviert die PKC, IP3 wiederum löst Ca²⁺ aus endogenen Speichern der Zelle. Die Aktivierung der PKC und CaMKII führt zu Phosphorylierung weiterer Zielsubstrate (De Koninck and Schulman 1998, Slusarski et al. 1997, Slusarski and Pelegri 2007, Wang et al. 2004). Unter anderem wird durch die Aktivierung des Wnt/Ca²⁺-Signalweges der *nuclear factor of activated T-Cells* (NFAT) in den Zellkern transloziert und führt hier zu einer Expression von Calcineurin-abhängigen Zielgenen (Saneyoshi et al. 2002). Zu diesen Zielgenen gehören zum Beispiel die Zyklooxygenase-2 (COX2) oder auch das Autaxingen. Über diese Mechanismen kann NFAT die Invasivität von Mammakarzinomzellen steigern (Mancini and Toker 2009).

1.4.4 Der Wnt-Ror2-Signalweg

Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit Karzinomen könnte die Wnt-Ror2-Signaltransduktion sein, welche zu einer Aktivierung von c-jun durch die jun-n-terminale-Kinase (JNK) führt. Hierbei bindet Wnt5a an die cytosinreiche Domäne des Tyrosinkinase-Rezeptors Ror2 und bewirkt so die Aktivierung von JNK. JNK wiederum aktiviert c-jun und den *activator-protein-1*-Transkriptionsfaktor (AP-1), deren Funktion eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von invasiven Karzinomen

spielt (Schambony and Wedlich 2007). So konnte durch Überexprimierung von c-jun in MCF-7 eine höhere Motilität und Invasivität der Zellen gezeigt werden (Smith LM et al. 1999).

1.4.5 Neoplastische Transformation durch Wnt-Proteine

Während die kanonischen Liganden Wnt1, Wnt3 und Wnt10b nach retroviraler Insertation mit Hilfe des *mouse mammary tumor virus* (MMTV) eine Induktion von Mammakarzinomen bewirken, konnte dies für die nicht kanonischen Wnt-Liganden Wnt5a, Wnt6 und Wnt14 nicht gezeigt werden. Für Wnt1 wurde zusätzlich eine transformierende Wirkung in Zellkulturexperimenten gezeigt (Lee FS et al. 1995, Nusse and Varmus 1982, Roelink et al. 1990, Wong et al. 1994).

1.4.6 Die Rolle von Wnt-Signalwegen für die Invasivität von Karzinomen

Wie bereits in 1.2 beschrieben, spielt die Transformation von epithelialen in mesenchymale Zellen eine zentrale Rolle für die Invasivität und Progression von Tumorzellen (Brabletz et al. 2005, Tse and Kalluri 2007). Da es über den kanonischen Wnt-Signalweg zu einer Aktivierung von β -Catenin kommt und es insbesondere in dedifferenzierten Karzinomen und in Zellen der invasiven Front von Kolonkarzinomen zu einer Akkumulation von β -Catenin kommt, kann angenommen werden, dass der kanonische Wnt-Signalweg eine zentrale Bedeutung für die EMT hat (Brabletz et al. 2001). Da die Zellen der invasiven Front im Zuge der weiteren Tumorprogression wieder ihren ursprünglichen epithelialen Phänotyp annehmen, kann man außerdem davon ausgehen, dass es einen komplementären Prozess zur EMT gibt. Dieser kann als mesenchymal epitheliale Transition (MET) bezeichnet werden und ist wahrscheinlich durch eine dynamische Interaktion mit dem Tumormikromilieu verursacht (Gupta and Massague 2006, Tse and Kalluri 2007). Die Evidenz für eine Wnt-abhängige Invasivitätssteigerung durch das Tumormikromilieu ist bisher gering, könnte aber die EMT-Hypothese ergänzen. Makrophagen sind zum Beispiel eine Quelle für Wnt5a, das in der Lage ist, die Invasivität unterschiedlicher Karzinome zu steigern (Blumenthal et al. 2006, Pukrop et al. 2006). In Twist-überexprimierenden humanen immortalisierten Mammaepithelzellen (HMLE) und in der mesenchymalen Subpopulation (MSP) dieser Zellen liegt eine signifikant höhere

Menge an aktivierter PKC vor als in HMLE-Zellen. Zudem zeigten die oben genannten Zellen auch eine gesteigerte Phosphorylierung von JNK und c-jun (Scheel et al. 2011).

1.4.7 Die Rolle von Wnt-Signalwegen für die Progression und Metastasierung von Mammakarzinomen

Neben den in 1.1.2 beschriebenen Rezeptoren und Signalwegen wurden weitere Signalwege im Zusammenhang mit der Genese und Progression des Mammakarzinoms untersucht. Unter anderem wurde der Wnt-Signalweg identifiziert. Immunhistochemische Untersuchungen des lobulären Mammakarzinoms zeigten eine erhöhte β -Catenin-Expression (Karayiannakis et al. 2001). In Mammakarzinomen fanden sich jedoch Mutationen des *Adenomatous Polyposis Coli* (APC)-Genes oder von β -Catenin nur selten als verantwortlicher Faktor für die nukleäre Akkumulation von β -Catenin (Candidus et al. 1996; Sorlie et al. 1998). Somit könnte auch eine Überaktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges für die nukleäre Akkumulation von β -Catenin verantwortlich sein. Der nicht kanonische Wnt-Signalweg scheint tatsächlich eine Bedeutung für die Progression des Mammakarzinoms zu haben. So konnte in Hirnmetastasen von Patientinnen mit primären Mammakarzinomen eine erhöhte Expression von Wnt5a und Wnt5b nachgewiesen werden (Klemm et al. 2011). Hinsichtlich der Expression von Wnt5a in primären Mammakarzinomen ist die Datenlage widersprüchlich. Wnt5a zeigte sich einerseits mit erhöhter Expression in Mammakarzinomen im Vergleich zu epithelialelem Gewebe, andererseits wird der Verlust der Wnt5a-Expression als ein unabhängiger positiver prognostischer Marker bezüglich der Rezidivwahrscheinlichkeit des invasiven duktales Mammakarzinoms beschrieben (Jonsson et al. 2002).

1.5 Dickkopf-1 als Wnt-Antagonist

Über den Wnt-Antagonisten Dickkopf-1 (Dkk-1) ist bisher wenig bekannt. Seine Rolle als negativer Regulator des kanonischen Wnt-Signalweges ist mehrfach beschrieben worden (Glinka et al. 1998, Niehrs 1999). Dkk bindet jedoch nicht direkt an Proteine der Wnt-Familie, sondern an deren Co-Rezeptoren, wie den LDL-related-Protein-

Rezeptor 6 (LRP6) (Bafico et al. 2001, Mao et al. 2001). Die Menge an Dkk-1-Protein oder seine relative Expression wurde in vielen Tumoren untersucht, insgesamt zeigt sich kein eindeutiges Bild. Zum Beispiel im Prostatakarzinom ist eine Abnahme der Dkk-1-Expression in der Entwicklung vom Primärtumor zu Metastasen beschrieben worden (Hall et al. 2008). In mit Tabakkondensat behandelten Lungenkarzinomzelllinien findet sich ebenso eine Herunterregulation der Dkk-1-mRNA. Diese geht interessanterweise mit einer erhöhten Expression von Wnt5a einher (Hussain et al. 2009). In verschiedenen Zervixkarzinomzelllinien konnte ein epigenetisches *Silencing* von Dkk-1 beobachtet werden (Lee J et al. 2008). Erhöhte Mengen an Dkk-1 lassen sich jedoch im Serum von Patienten mit multiplem Myelom oder bei Patientinnen mit Knochenmetastasen eines Mammakarzinoms messen (Politou et al. 2006, Voorzanger-Rousselot et al. 2007). In Invasivitätsstudien mit MCF-7-Zellen, welche mit *recombinant human* (rh) Wnt5a oder mit Makrophagen stimuliert wurden, konnte eine Reduktion der Invasivität durch Zugabe von rh Dkk-1 erreicht werden. Darüber hinaus kann Dkk-1 aus mesenchymalen Stammzellen das Wachstum von MCF-7-Zellen hemmen (Pukrop et al. 2006, Qiao et al. 2008).

1.6 Bedeutung von Tumor-assoziierten Makrophagen in Tumoren

Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) repräsentieren den Hauptanteil der inflammatorischen Komponente solider Tumore und beeinflussen in vielerlei Hinsicht die Tumorprogression und -Invasion. Schon seit den siebziger Jahren ist bekannt, dass TAM das Tumorwachstum beschleunigen können (Balkwill and Mantovani 2001, Mantovani et al. 2002). Nach heutigem Wissensstand zeigen TAM einen M2 Phänotyp, welcher durch die hohe Expression von Interleukin-10 (IL-10) und die niedrige Expression von Interleukin-12 (IL-12) charakterisiert ist (Mantovani et al. 2002). Diese so polarisierten Makrophagen sind in der Lage, die adaptive Immunität und den inflammatorischen Prozess zu bremsen. Allerdings wirken sie proliferationssteigernd, proangiogenetisch und unterstützen die Gewebsheilung. Durch die Inhibition verschiedener immunologischer Prozesse, wie der T-Zell-Aktivierung durch das mangelnde IL-12, kommt es zu einer verminderten Antitumorantwort (Mitsuhashi et al. 2004). Insgesamt kann die verminderte immunologische Reaktion zu einer chronischen Inflammation führen, auf deren

Boden Neoplasien entstehen können (Balkwill et al. 2005). In vielen Tumoren ist die Menge an infiltrierenden TAM negativ mit der Prognose korreliert, so zum Beispiel im Mammakarzinom (Leek et al. 1999, Tsutsui et al. 2005). Weitere Evidenz für die tumorsupportive Wirkung von TAM konnte durch Experimente mit homozygoten Mäusen mit einer *knock-down* Mutation für das *colony stimulating factor-1*-Gen (CSF-1) erbracht werden. Ohne CSF-1 Expression konnte in einem Modell für Brustkrebs eine verminderte Progression des Tumors und eine reduzierte Bildung von Lungenmetastasen erreicht werden (Lin et al. 2001). Auch für Interleukin-1 β (IL-1 β) ist bekannt, dass Mäuse ohne IL-1 β Expression im Melanommodell keine Metastasen entwickeln, was eine weitere Implikation für die besondere Bedeutung des Tumormikromilieus deutlich macht (Voronov et al. 2003).

1.6.1 Die Rolle von Makrophagen für die Invasivität von Tumoren

In Kokultorexperimenten konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen über einen Tumornekrosefaktor- α (TNF α)-abhängigen Mechanismus Matrix-Metalloproteinasen regulieren. Über die Aktivierung von c-Jun-NH₂-Kinase (JNK) und den *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (Nf κ B) wurden in den Tumorzellen Gene wie der Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (MIF) und der *extracellular matrix metalloproteinase inducer* (EMMPRIN) hochreguliert. Diese Proteine wiederum führen zu einer verstärkten Ausschüttung von MMP aus TAM des Tumormikromilieus (Hagemann et al. 2004, Hagemann et al. 2005, Tang et al. 2004). TAM exprimieren eine Reihe von Genen, welche die Tumorzellproliferation, Angiogenese und Matrixdegeneration beeinflussen. Darunter der *epidermal growth factor* (EGF), der *platelet derived growth factor* (PDGF), der *transforming growth factor* (TGF-1 β) oder der Hepatozytenwachstumsfaktor (Goswami et al. 2005, Lewis and Murdoch 2005). Die Matrixdegeneration wird durch Enzyme wie den MMP und Urokinase-Plasminogen-Aktivator (PLAU) vermittelt (Hildenbrand and Schaaf 2009). TAM sind auch in der Lage, die Angiogenese von Tumoren zu beeinflussen, so sezernieren TAM proangiogenetische Faktoren wie den *vascular endothelial growth factor* (VEGF), den Tumornekrosefaktor- α (TNF α) oder Interleukin-8 (IL-8). Zusätzlich spielen MMP eine große Rolle in der Modulation von angiogenetischen

Prozessen. So konnte im Mausmodell eine MMP-9-abhängige Angiogenese in der zervikalen Karzinogenese gezeigt werden (Giraud et al. 2004).

1.6.2 Die Rolle von TAM für die Metastasierung von Tumoren

Die Evidenz für eine Beteiligung von Makrophagen an der Metastasierung von Tumoren konnte in den letzten Jahren erhärtet werden. Makrophagen fördern in diesem Zusammenhang die Invasion der Tumorzellen im Primarius, als auch deren Ansiedlung an anderen Stellen im Gewebe. Vgl. hierzu auch 1.6.1. In *polyomavirus middle T-Antigen* (PyMT) induzierten murinen Mammakarzinomen und im Mammakarzinom-Xenograft-Modell für das Mammakarzinom in der Ratte konnten zwei Wege beschrieben werden, welche die Rolle von Makrophagen in der Metastasierung charakterisieren (Lin et al. 2006, Patsialou et al. 2009). Bei dem ersten Weg handelt es sich um die gesteigerte Invasivität von Tumorzellen, welche sich vom soliden Hauptteil des Tumors entfernen. Diese Zellen werden häufig in der unmittelbaren Nähe von TAM gefunden und sind wahrscheinlich durch diese in ihrer Invasivität gesteigert (Goswami et al. 2005). Auf dem zweiten Weg beeinflussen abluminal lokalisierte Makrophagen die Intravasation von Tumorzellen durch zum Beispiel Sekretion von Chemokinen wie VEGF-A oder PLAU (Giraud et al. 2004, Wyckoff et al. 2004).

1.6.3 Wnt-Expression in TAM

Mitglieder der Wnt-Genfamilie sind nicht nur in Tumorzellen, sondern auch in Zellen des Tumormikromilieus exprimiert. So konnte eine erhöhte Expression von Wnt2 und Wnt5a in kolorektalen Karzinomgeweben im Vergleich zu Adenomgewebe und gesundem Gewebe gezeigt werden. In erster Linie exprimieren Makrophagen im Tumormikromilieu Wnt2 und Wnt5a. Gleichzeitig sind diese Gene in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien nicht exprimiert (Smith K et al. 1999). In Makrophagen des Tumormikromilieus von verschiedenen Brustkrebspatientinnen konnte ebenso eine Wnt5a-Expression nachgewiesen werden. In Kokulturrexperimenten konnte eine Expression von Wnt5a in Makrophagen erst nach Kokultivierung mit der Brustkrebszelllinie MCF-7 gezeigt werden, was eine Regulation von Wnt5a in TAM vermuten lässt (Pukrop et al. 2006).

1.7 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll zum einen eine vergleichende Analyse der Mammkarzinomzelllinien MDA-MB 231 und MCF-7 hinsichtlich der Expression verschiedener Wnt-Gene und Wnt-Zielgene erfolgen. Zum anderen sollen unterschiedliche Methoden zur Isolation und Kultivierung von humanen Makrophagen für Kokulturrexperimente verglichen und optimiert werden, damit diese im dritten Abschnitt in Kokulturrexperimenten mit der niedrig invasiven MCF-7-Zelllinie eingesetzt werden können. Letztlich soll eine Charakterisierung der kokultivierten Makrophagen mittels quantitativer Analyse der Wnt-Genregulation erfolgen und damit deren Funktion als tumorsupportive Zellen weiter charakterisiert werden.

1.7.1 Vergleichende Analyse von MCF-7 und MDA-MB 231 auf Komponenten des Wnt-Signalweges und verschiedener Wnt-Zielgene

Der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert β -Catenin und führt somit zu einer höheren Invasivität von Zellen gemäß der EMT-Hypothese. Auch nicht kanonische Wnt-Signalwege können über die Aktivierung von c-jun zu höherer Invasivität führen. Diese bekannten funktionellen Veränderungen von Tumorzellen in Zellkultur lassen vermuten, dass die per se unterschiedlich invasiven Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB 231 unterschiedlich hohe Mengen verschiedener Gene der Wnt-Familie und ihrer Signalwegskomponenten exprimieren. Zudem repräsentiert die MCF-7-Zelllinie am ehesten den molekularen Luminal-A-Subtyp und die MDA-MB 231-Zelllinie den *basal-like* Subtyp. Für diesen *basal-like* Subtyp wurde bereits eine Anreicherung des Wnt-Signalweges gezeigt, sodass ein Vergleich des Wnt-Signalweges zwischen den Zelllinien naheliegt. Da in den bisherigen Untersuchungen zur Invasivität der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB 231 keine suffiziente Untersuchung der Wnt-Genexpression vorgenommen wurden, soll geklärt werden, ob eine unterschiedliche Wnt-Genexpression dieser Zelllinien besteht. Zu diesem Zweck soll zunächst ein Wnt-Gen spezifischer qualitativer *Microarray* durchgeführt werden. Anschließend soll die Validierung der *Microarray*-Ergebnisse durch *quantitative real time* PCR (qPCR) erfolgen.

1.7.2 Entwicklung einer geeigneten Methode zur Generierung von Makrophagen für in-vitro-Versuche

Um in-vitro-Experimente mit Makrophagen durchführen zu können, ist es notwendig, eine etablierte Methode zur Generierung großer Mengen an Makrophagen zur Verfügung zu haben. Da sich Makrophagen in vivo aus Blutmonozyten differenzieren, muss dieser Schritt in vitro imitiert werden. Zunächst müssen Monozyten aus humanem Vollblut, oder aus *Buffy-Coats* isoliert - und anschließend zu Makrophagen differenziert werden. Der Goldstandard der Monozytenisolation ist die *Counterflow Elutriation* (Contreras et al. 1980) und die anschließende Differenzierung von Blutmonozyten zu Makrophagen in Teflonbeuteln. Die Differenzierung geschieht in vitro durch die Hinzugabe von Wachstumsfaktoren, wie M-CSF und durch die Adhärenz der Monozyten an einer Teflon- oder Kunststoffoberfläche. Da für die *Counterflow Elutriation* eine besondere Laborausstattung notwendig ist, soll eine alternative Isolationsmethode der Monozyten über einen Ficoll-Percoll Gradienten mit anschließender Differenzierung in Teflonbeuteln mit dem Goldstandard verglichen werden.

1.7.3 Genaktivierung und Genregulation in humanen Makrophagen nach Kokultur mit MCF-7 und mögliche Antagonisten

TAM steigern die Invasivität der MCF-7-Zelllinie über Wnt5a. Nähere Analysen konnten zeigen, dass diese Makrophagen induzierte und Wnt5a vermittelte Invasivität durch Dkk-1 hemmbar ist. Signalwegsanalysen in den Tumorzellen haben darüber hinaus ergeben, dass die Invasivität über JNK/PCP vermittelt wird (Pukrop et al. 2006). Im Gegensatz zu den Tumorzellen ist bisher die Genexpression in den TAM unter dem Einfluss von Dkk-1 nicht untersucht worden. Aus diesem Grund sollen TAM in Kokultur mit MCF-7-Zellen und zusätzlicher Inkubation mit Dkk-1 analysiert werden.

2.0 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Die verwandten Zelllinien wurden von folgenden Quellen bezogen:

MCF-7: humanes Mammaadenokarzinom (HTB 22 *American Type Culture Collection* (ATCC), Rockville, Maryland, USA (Soule et al. 1973).

MDA-MB 231: humanes Mammaadenokarzinom (HTB 26 *American Type Culture Collection* (ATCC), Rockville, Maryland, USA (Cailleau et al. 1974).

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Verbrauchsmaterialien von den Firmen Nunc (Langensfeld, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und Greiner Bio-One (Frickhausen, Deutschland) bezogen.

2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller
RPMI-1640 Medium	PAA, Cölbe, Deutschland
PBS	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin-EDTA (10x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.1.4 Oligonukleotide

Alle genutzten Oligonukleotide wurden von IBA, Göttingen, bezogen. Die Tabelle zeigt den Genkurznamen, die *genaccsion number* (ID) der NCBI, sowie die Sequenzen der Oligonukleotide.

Genname	NCBI ID	Vorwärts- und Rückwärtssequenz
HPRT1	3251	TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT
GNB2L1	10399	GAG TGT GGC CTT CTC CTC TG GCT TGC AGT TAG CCA GGT TC
Wnt5a	7474	AGG GCT CCT ACG AGA GTG CT GAC ACC CCA TGG CAC TTG
Wnt5b	81029	CTG CTG CTG CRG TTC ACG CAC CGG GTT CAA AGC TAA TG
TNF α	7124	GCC CAG GCA GTC AGA TCA TCT TC TGA GGT ACA GGC CCT CTG ATG G
VEGF-A	7422	TAC ATC TTC AAG CCA TCC TG ACA TTT GTT GTG CTG TAG GA
Dkk-1	22943	CAT AGC ACC TTG GAT GGG TA ATG ACC GGA GAC AAA CAG AA

E-Cadherin	999	CCT GCC AAT CCC GAT GAA AT ACT CTG AGG AGT TCA GGG AG
PLAU	5328	CCA CTA CTA CGG CTC TGA AG ATT CCA GTC AAA GTC ATG CG
PLAU-R	5329	ATG CAG TGT AAG ACC AAC G GTG ATC TTC AAG CCA GTC C

2.1.5 Antikörper

Antikörper

Hersteller

CD 14 PE	Biolegend, San Diego, CA, USA
CD 206 FITC	Biolegend, San Diego, CA, USA
IgG1 FITC	Biolegend, San Diego, CA; USA
IgG1 PE	Biolegend, San Diego, CA, USA
CD 14 PE	B&D, Franklin Lakes, NJ, USA
CD 206 PE	B&D, Franklin Lakes, NJ, USA

2.1.6 Reaktionssysteme

Reaktionssystem

Hersteller

<i>I-Script</i> [®] , <i>cDNA Synthesis Kit</i>	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
<i>I-Taq</i> [®] <i>Mastermix with ROX</i>	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

2.1.7 Rekombinante Proteine

Protein	Hersteller
rh Dkk-1	R&D, McKinley Place, MN, USA
rh M-CSF	R&D, McKinley Place, MN, USA

2.1.8 Geräte

Gerätename	Hersteller
7900 HT	ABI, Carlsbad, CA, USA
NanoDrop1000®	Thermo Scientific, Wilmington, NC, USA
JE-6B- Rotor	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
FACS® Calibur	B&D, Franklin Lakes, NJ, USA
Rotanta 460 Zentrifuge	Hettich, Tübingen, Deutschland
Leica®DM5000B	Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland
Neubauer improved Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Laminar Flow Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl- Genkingen, Deutschland
Zytozentrifuge Cytopsin2	Shandon, Runcorn, Cheshire, UK
Casy® Cell Counter	Roche, Basel, Schweiz

2.1.9 Software

Software	Hersteller
SDS 2.1	ABI, Carlsbad, CA, USA
Excel® 2003	Microsoft, Redmond, WA, USA
FACS® Diva	B&D, Franklin Lakes, NJ, USA
Graph Pad Prism®	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Word® 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Standardbedingungen für die Zellkultur

Alle verwandten Verbrauchsmaterialien, Kulturmedien und Lösungen wurden, sofern nicht steril verpackt, bei 121 °Celsius und 1 Bar Überdruck für 30 min autoklaviert, respektive vier Stunden bei 180 °Celsius Kerntemperatur hitzesterilisiert. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank der Sicherheitsstufe II durchgeführt.

Die für die Versuche benutzten Zelllinien wurden im Zellkulturmedium RPMI 1640, versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem *fetal calf serum* (FCS), in einem Inkubator bei 37 °Celsius, 5% CO₂ Begasung und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 3 Tage ersetzt. Zur Überprüfung der Keimfreiheit wurden die verwandten Zelllinien alle 2 Monate mit Hilfe des Venor[®] GeM *Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR* von Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland getestet.

2.2.1.2 Subkultivierung der Zelllinien

Je nach gewünschter Zellmenge wurden die Zellen in einer Konzentration von 1-2x10⁵/ ml Zellkulturmedium in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Bodenfläche und je 10 ml Kulturmedium ausgesät. Ein Kulturmediumswechsel erfolgte alle drei Tage. Bei Erreichen einer 70-80%igen Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 geteilt. Hierzu wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gespült. Das PBS wurde abgenommen und die Zellen wurden mit 1,5 ml Trypsin-EDTA Lösung für 5 min im Brutschrank inkubiert. Die Trypsin-EDTA Lösung wurde mit 8,5 ml Zellkulturmedium antagonisiert und die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde zur weiteren Kultur der Zellen im Verhältnis 1:10, beziehungsweise je nach Bedarf gesplittet und die Zellen wurden erneut in Zellkulturflaschen ausgesät, respektive für Versuche verwandt.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer improved Zählkammer verwandt. Die Bestimmung erfolgte durch das Zählen der Zellzahl in vier definierten Volumina von je $0,1 \text{ mm}^3$.

2.2.1.4 Kokulturversuche

Die Durchführung basiert auf der von Hagemann et al. 2004 veröffentlichten Methode zur Untersuchung von in-vivo-Kokulturen. Um die Interaktion von Tumorzellen und Makrophagen zu untersuchen, wurden Versuche in einem Kokulturansatz durchgeführt welcher eine räumliche Trennung von Makrophagen und Tumorzellen ermöglicht. Die räumliche Trennung war notwendig, um nach Beendigung der Versuche zellspezifisches Material für die Expressionsanalysen zu gewinnen. Hierzu wurden zunächst 6-well Zellkulturplatten mit je $100 \mu\text{l}$ *extra cellular matrix* (ECM - Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gemäß der Herstellerinstruktionen beschichtet. Nach dem Aushärten der ECM im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 60 min wurden 1×10^6 , beziehungsweise eine gemäß der durch die *American Type Culture Collection* (ATCC) angegebenen Zellteilungszeit errechnete Zellzahl Tumorzellen ausgesät, sodass zu Versuchsbeginn eine Zellzahl von 1×10^6 vorlag. Diese Zellen wurden für weitere 24 Stunden mit RPMI 1640, 10% FCS, im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Parallel wurden je 2×10^6 Makrophagen in RPMI 1640, 1% FCS in Zellkulturinserts mit einer Porengröße von $0,4 \mu\text{m}$ ausgesät und ebenfalls für 24 Stunden inkubiert. Die Porengröße ermöglichte eine direkte Zell-Zellinteraktion ohne jedoch ein Durchwandern der Poren für einzelne Zellen zu ermöglichen. Die Inkubation vor Beginn der Kokultur diente dazu, den Zellen ausreichend Zeit zu geben, um an den jeweiligen Oberflächen eine stabile Adhärenz auszubilden. Nach 24 Stunden Präinkubation wurde jeweils das Zellkulturmedium gewechselt und auf RPMI 1640 mit 1% FCS für die Durchführung der Kokultur umgestellt. Unter einer sterilen Werkbank wurden die Zellkulturinserts mit Hilfe einer Pinzette in die mit Tumorzellen bewachsenen Zellkulturplatten eingesetzt. Ohne weiteren Mediumwechsel wurde die Kokultur anschließend für 24 Stunden im Inkubator durchgeführt. Prinzipiell konnte durch diese Technik RNA, Protein und Zellkulturüberstand für weitere Versuche gewonnen werden. In dieser Arbeit richtete

sich der Fokus auf die Gewinnung möglichst großer Mengen an RNA, prinzipiell aber kann durch den beschriebenen Versuchsaufbau in diversen Richtungen variiert werden. Zum Beispiel kann die Zellzahl und Inkubationszeit frei variiert werden.

2.2.2 **cDNA-Microarray**

2.2.2.1 **Grundsätzliche Feststellungen zum cDNA-Microarray**

Der Einsatz von cDNA-Hybridisierungs-Arrays macht es möglich, eine relativ hohe Zahl verschiedener Gene in den 2 untersuchten Zelllinien zu analysieren. Somit konnte hier, mit geringem Aufwand, eine verhältnismäßig große Anzahl Wnt- und Wnt-assoziiierter Gene untersucht werden. Da die Methode zwar spezifisch ist, jedoch keine sehr differenzierte Aussage über die Höhe des Genexpressionsunterschiedes zulässt, wurde sie im Sinne dieser Arbeit lediglich als primäres Screening zur Einschränkung der im Weiteren untersuchten Genexpressionen eingesetzt.

2.2.2.2 **Funktionsprinzip des cDNA-Microarrays**

Der hier verwandte *Microarray* beruht auf dem Grundprinzip der Hybridisierung von markierter cDNA mit membrangebundenen genspezifischen Fragmenten. Die Markierung wird hierbei durch biotinyliertes dUTP während der reversen Transkription der mRNA in die cDNA integriert. Die auf der Membran gebundene, markierte cDNA wird durch Peroxidase gekoppeltes Streptavidin sichtbar gemacht.

2.2.2.3 **Chemikalien**

GEArray Q Series Human Wnt, Sabioscience, Maryland USA
(Produkt wird in dieser Konfiguration nicht mehr hergestellt)

GEAhyb Lösung	Teil des Kits
Puffer F	Teil des Kits
Puffer G	Teil des Kits
GEAblocklösung	Teil des Kits

20xSSC	175,3 g NaCl und 88,2 g Natriumcitratdihydrat in 900ml H ₂ O lösen. pH 7,0 mit 1 M HCl Lösung herstellen und auf 1L auffüllen
20% SDS	200 g Natriumdodecylsulfat (SDS) in 1 L H ₂ O lösen, dabei auf 65 °C erhitzen
Waschlösung 1	100 ml 20xSSC, 50 ml 20%SDS auf 1 L H ₂ O
Waschlösung 2	5 ml 20x SSC und 25 ml 20% SDS auf 1 L H ₂ O
10x Formaldehyd-Gelpuffer	200 nM3-[N-Morpholino-]Propansulfonsäure (MOPS)
1x Formaldehyd-Laufpuffer	100 ml 10x Formaldehyd Gelpuffer, 20 ml 37% Formaldehyd auf 880 ml Rnase-freies H ₂ O

2.2.2.4 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde wie in 2.2.9 beschrieben durchgeführt. Alle danach folgenden Arbeitsschritte wurden gemäß den Instruktionen des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.5 Markierung der cDNA

Zur Herstellung des zunächst benötigten BN-Puffers wurde dem Reverse-Transkription Puffer Dithiothreitol-(DIT) und dNTPs hinzugegeben. Das empfohlene Protokoll wurde wie folgt angewandt:

BN-Puffer:

50 µl	RT-Puffer
1 µl	1 M DTT
50 µl	dNTP Mix: 5mM dATP, dGTP, dCTP, 0,5 mM dTTP

Da bei der folgenden Reaktion Biotin-16-dUTP eingesetzt wurde, betrug die Menge an eingesetztem dTTP nur zehn Prozent der übrigen Nukleotidmenge.

RT-Mastermix:

4 µl BN-Puffer	
2 µl Biotin-16-dUTP	2 mM
2 µl Rnase-freies H ₂ O	
1 µl Rnase Inhibitor	
1 µl Reverse Transkriptase	(50 units/ µl)

Mit jeweils 7,5µg RNA wurde der nachfolgend beschriebene Annealing Mix hergestellt:

7,5 µg	Gesamt RNA
3 µg	Puffer A
ad zu	10 µl Rnase-freies H ₂ O

Nach ausreichendem Mischen des Reaktionsgemisches mit Hilfe einer sterilen Pipette wurde das Gemisch kurz zentrifugiert und im vorgeheizten Thermocycler für 3 min denaturiert. Danach erfolgte die reverse Transkription zusammen mit 10 µl des vorher auf 42 °C erhitzten reverse Transkriptase-Mixes. Die reverse Transkription wurde bei 42 °C für weitere 90 min durchgeführt. Die reverse Transkription wurde durch Erhitzen der Probe auf 92 °C beendet.

2.2.2.6 Hybridisierung

Zur Verringerung des Hintergrundsignals war vor der Hybridierung ein Blockierungsschritt nötig. Dafür wurde 1ml der GEHyb-Lösung auf 60 °C erhitzt, mit 100 µg denaturierter Lachs-Hoden-DNA versetzt und anschließend als Blockierungslösung genutzt. In jedes Hybridisierungsröhrchen wurden 2 ml der Blockierungslösung hinzugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation bei 60 °C und einer Rotation von 5-10 rpm für 2 Stunden. Die vorher hergestellte Sonden-cDNA wurde in 750 µl GEHyb-Lösung bei 60 °C gelöst. Die eigentliche Hybridisierung wurde hiernach bei 60 °C und 5-10 rpm für weitere 2 Stunden durchgeführt. Nach Abschluss der Hybridisierungszeit erfolgten insgesamt vier 15 minütige

Waschschritte, zwei davon mit auf 60 °C erwärmter Waschlösung 1 und zwei weitere mit ebenfalls auf 60 °C erwärmter Waschlösung 2.

2.2.2.7 Chemoluminiszenz

Zunächst wurde die Membran durch 40 min Inkubation mit GEAblocking Lösung geblockt. Danach erfolgte die Zugabe des Streptavidins, welches mit Peroxidase markiert war und im Verhältnis 1:8000 in Puffer F gelöst wurde. Die Inkubation mit diesem AP-Streptavidin wurde für 10 min durchgeführt. Die Membran wurde nach der Inkubation einmalig mit Puffer F und zweimal mit Puffer G gewaschen. Für den Zweck der Chemolumineszenzdetektion wurde in jeden Hybridisierungszylinder 1 ml CDP-Star-Chemoluminiszenz-Substrat hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Am Ende der Chemoluminiszenz wurde ein Photofilm mit der Membran belichtet. Die Auswertung erfolgte über online zur Verfügung stehende Software des Herstellers.

2.2.3 Einfachgradient – *Counterflow Elutriation*

Die Isolation von Monozyten aus Vollblut durch *Counterflow Elutriation* wurde am Forschungszentrum Borstel, Abteilung Molekulare Infektiologie, durchgeführt.

2.2.3.1 Einfachgradient

Die Gewinnung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) erfolgte aus Buffycoats. Zur Auftrennung der Buffycoats wurde eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation nach Boyum durchgeführt (Boyum 1968). Hierfür wurden 40 ml des Buffycoates mit 10 ml Pancoll-Paque in einem sterilen Röhrchen unterschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 1200 rpm, 21 °C, 42 min (Rotanta 460r, Hettich, Tübingen) mit geringst möglicher Beschleunigung und Bremse, um den Gradienten nicht zu verwirbeln. Der Plasmaüberstand wurde abgesaugt und die PBMZ in der Interphase mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen in PBS resuspendiert und bei 1200 rpm, 4 °C, 10 min, Beschleunigung maximal, Bremse maximal zentrifugiert. Das Waschen der Zellen in PBS wurde weitere zweimal

wiederholt. Die weitere Aufreinigung der PBMZ erfolgte durch *Counterflow Elutriation*.

2.2.3.2 **Counterflow Elutriation**

Die über Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen PBMZ wurden in Hanks' balanced salt solution (HBSS) mit 0,1% Rinderserumalbumin (BSA) aufgenommen. Die Gesamtzellzahl wurde vor der Elutriation mit Hilfe einer Neubauer Advanced Zählkammer bestimmt. Die Elutriation funktioniert nach dem Prinzip der Gegenstromzentrifugation, bei der zwei entgegengesetzte Kräfte auf die Zellen wirken. Einerseits ist dies die Zentrifugalkraft, erzeugt durch die Geschwindigkeit des Elutriatorrotors (JE-6B-Rotor, Beckman, München), andererseits die Zentripedalkraft erzeugt durch die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums, welche über eine Peristaltik-Pumpe regelbar ist. Durch Zusammenwirken dieser Kräfte und weiterer Faktoren (Zusammensetzung des Zellgemisches, Temperatur, Viskosität und Dichte des Mediums) werden die Zellen gemäß ihrer Größe und Dichte voneinander getrennt. Die in PBS gewaschenen PBMZ werden bei einer definierten Medium-Fließgeschwindigkeit in das System eingeladen. Bei dieser Geschwindigkeit verbleiben die mononukleären Zellen in der Rotorkammer. Durch kontinuierliche Erhöhung der Fließgeschwindigkeit erfolgt die Auftrennung der PBMZ in Fraktionen mit distinkten Zellpopulationen. Die Elutriation wurde mit einer modifizierten Methode, basierend auf der Arbeit von Contreras et al., durchgeführt (Contreras et al. 1980). Zu Beginn wurde der Rotor mit unvergälltem Ethanol (70%) gespült. Anschließend wurde das gesamte System mit 0,5 l sterilem, einfach deionisiertem Wasser gespült und mit 0,25 l HBSS, 0,1% BSA, equilibriert. Die gewaschenen PBMZ wurden bei laufendem Rotor (3500 rpm, 12 °C) mit einer Fließgeschwindigkeit von 31 ml/min eingeladen. Gemäß eines definierten Protokolls wurden die gewünschten Zellpopulationen in sterilen 50 ml Röhrchen aufgefangen und in einer Neubauerzählkammer ausgezählt.

Elutriationsprotokoll:

Durchflussgeschwindigkeit (ml/min)	Volumen (ml)	Fraktion
31	200	einladen
34	50	Thrombozyten
36	50	Spülschritt
40	200	Kleine Lymphozyten
41	50	Lymphozyten
42	50	Lymphozyten
43	50	Lymphozyten
44	50	Lymphozyten
45	200	Große Lymphozyten
46	200	Spülschritt
47	200	Spülschritt
48	200	Spülschritt
49	50	Beginn Monozyten
50 - Stopp	50	Monozyten, hochrein

2.2.4 Doppeldichtegradientenzentrifugation von humanen Monozyten

Die Isolation der Monozyten erfolgte nach einer modifizierten Version, der von Seager Danciger et al. 2004 beschriebenen Methode zur Isolation von Monozyten aus peripherem humanem Blut ohne spezielle Laborausstattung. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit einer Multifuge 3-LR durchgeführt. Die verwendeten *Buffy-Coats* wurden von der Abteilung für Transfusionsmedizin zur Verfügung gestellt. Die *Buffy-Coats* waren nicht älter als vierundzwanzig Stunden. Es wurden gesunde Spender aller Blutgruppen mit positivem oder negativem Rhesus Faktor berücksichtigt. Zur Isolation der Monozyten aus peripherem Blut wurde der *Buffy-Coat* zunächst im Verhältnis von 100 ml *Buffy-Coat* zu 100 ml Dulbecco's phosphat gepufferter Salzlösung (DPBS), 1 mM EDTA, verdünnt. Anschließend wurden sechs Falcon Tubes mit jeweils 15 ml Bicolll-Lösung, Dichte 1,077 g/ml,

vorgelegt und mit je 33,33 ml *Buffy-Coat*, unter Erhaltung eines klaren Gradienten, überschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur für 30 min bei 335xg und ausgestellter Bremse. Der durch die Zentrifugation entstandene Ring aus mononukleären Zellen wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein neues Falcon Tube überführt und in 25 ml DPBS, 1 mM EDTA, gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei Raumtemperatur, Dauer 10 min, bei 335xg und Bremse 3 wurden die Zellen in RPMI 1640 ohne Phenolrot, 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, resuspendiert. Während der Zentrifugation wurde die Percoll™ Gebrauchslösung für die zweite Dichtegradientenzentrifugation erstellt. Hierzu wurden 46,25 ml Percoll™ mit 3,75 ml 10xDPBS versetzt und anschließend je 11,5 ml dieser Lösung in ein Falcon Tube überführt und mit 13,5 ml RPMI 1640 mit Phenolrot, 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin zur Percoll™ Gebrauchslösung ergänzt. Die in RPMI 1640 ohne Phenolrot suspendierten Zellen werden unter Erhaltung eines klaren Gradienten über die Percoll™ Gebrauchslösung geschichtet. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur von 40min, bei 550xg und ausgestellter Bremse. Der durch die Zentrifugation entstandene Zellring aus Monozyten wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein neues Falcon tube überführt. Die Zellen wurden in 25 ml DPBS, 1 mM EDTA, resuspendiert und ein weiteres Mal bei Raumtemperatur, 335xg, Bremse 3, zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 10ml RPMI 1640 mit Phenolrot, 10%FCS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden danach in einem Falcon Tube vereinigt und die Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Je 20-30 Millionen Monozyten wurden in je ein Falcon Tube überführt und in 50 ml RPMI 1640 mit Phenolrot, 10% FCS, suspendiert.

2.2.5 Differenzierung von humanen Monozyten zu Makrophagen

Die durch *Counterflow Elutriation* oder Doppeldichtegradientenzentrifugation gewonnenen Monozyten wurden in Teflonzellkulturbeuteln mit Differenzierungsmedium (RPMI 1640 supplementiert mit 2 ng/ml rh M-CSF und 10% FCS, 2 mM L-Glutamin), 7 Tage zu Makrophagen differenziert. Die Monozyten wurden mit einer sterilen 50ml Spritze zu je 20-30 Millionen pro 50 ml Differenzierungsmedium in den Teflon-Zellkulturbeutel überführt und 7 Tage bei 37 °C , 5% CO₂ inkubiert. Für die

Funktionsuntersuchungen mussten die Makrophagen von der Teflonoberfläche gelöst werden. Hierfür wurde der Teflonzellkulturbeutel 3 Stunden bei 0 °C in Eiswasser gelagert, was zur Abrundung der Makrophagen mit damit verbundener Lösung von der Teflonoberfläche führte. Ein Aliquot der Makrophagen wurden danach 1:1000 in Casytronlösung verdünnt und mit einem CASY Zellcounter gezählt. Zellen über 12 µm Durchmesser wurden als Makrophagen definiert, Zellen unter 12 µm als Debris (van der Meer et al. 1982).

2.2.6 ***Fluorescens activated cell sorting (FACS®)***

2.2.6.1 **Funktionsprinzip des FACS®**

Aufgrund ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften können Zellen durch Messung im Durchflusszytometer gut und schnell charakterisiert werden. Die Durchflusszytometrie wurde bereits 1968 zum Patent angemeldet (Dittrich and Göhde 1969). Im Wesentlichen besteht das Durchflusszytometer aus drei Systemeinheiten: Einem optischen System, Signalelektroden und einem dazugehörigen Computersystem. Die zu analysierenden Zellen werden aus dem Probenröhrchen einzeln durch das Lasersystem analysiert. Hierzu werden die Zellen mit Druckluft in eine Einspritznadel und darauf folgend gelöst in entgastem Wasser (*FACSFlow®*) in die Flusskammer überführt. In dieser laminaren Strömung werden die Zellen einzeln dem Laserlicht ausgesetzt und gemessen. Innerhalb des optischen Systems werden die Zellen durch Erfassung der Lichtbrechung in Richtung des Laserstrahls vermessen. Dies geschieht zum einen in Richtung der Vorwärtsstreuung (FSC: *forward light scatter*) und zum anderen in Richtung der Seitwärtsstreuung (SSC. *side scatter*). Die Zellgröße wird hierbei durch die Vorwärtstrennung gemessen. Die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen wiederum werden durch die Laser gemessen. Deren Lichtwellenlängen liegen im Bereich von 488nm für den Argon-Laser, beziehungsweise bei 633 nm für den Helium-Laser. Über die Photodetektoren wird schließlich die Emission der verschiedenen fluoreszierenden Antikörper auf den Zellen gemessen. Die Detektoren wandeln diese Signale dann in elektrische Signale um, welche durch ein Computerprogramm als „dot blot“ angezeigt werden können. Der „*dot blot*“, oder Punktgraph, zeigt eine Zweiparameterdarstellung, in welcher der Schnittpunkt der beiden Werte als Punkt

abgebildet wird. Auf der Abszisse werden des Diagramms werden die Fluoreszenzkanäle gezeigt, während auf der Ordinate die Anzahl der jeweiligen Messungen dargestellt werden. Mit Hilfe von sogenannten „gates“ können Teilpopulationen der gemessenen Zellen eingegrenzt und ausgewertet werden.

2.2.6.2 Antikörpermarkierung der Zellen

Für die Durchführung der FACS[®] Analysen wurden die Makrophagen in Aliquots a $2,5 \times 10^5$ Zellen per 250 μ l aufgenommen. Dazu wurde dasselbe Volumen an Azid-PBS hinzugegeben und die Zellsuspension bei 1500 rpm, 5 min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 50 μ l Azid-PBS mit 3% humanem Serum resuspendiert. Die Zugabe der Antikörper erfolgte in der Dunkeldammer. Die Antikörper zur Isotypen-Markierung (IgG1 PE und IgG1 FITC, sowie CD 14 FITC und CD 206 PE) wurden im Verhältnis 1:5 hinzugegeben und es folgte eine Inkubationszeit von 30 min im Kühlschrank bei 4 ° C. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 1 ml Azid-PBS. Nach dem Waschschrift wurden die Zellsuspension bei 1500 rpm, 5 min, 4 ° Celsius, zentrifugiert und in 200 μ l Azid-PBS resuspendiert. Abschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen durch Zugabe von 200 μ l 4% PFA.

2.2.6.3 Durchführung und Auswertung

Die Versuche wurden an einem FACS-Calibur[®] durchgeführt. Die anschließende Auswertung erfolgte mittels der Software FACSDiva[®].

2.2.7 Cytospin-Präparate

Für die Anfertigung wurden die Makrophagen nach Differenzierung in Teflonbeuteln in Aliquots a 10^6 Zellen/ml aufgeteilt, 1x in PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Anschließend wurden je 200 μ l Zellsuspension pro Cytospinpräparat per Tropfentrichter auf einen Objektträger durch Zentrifugation bei 800 rpm und 5 min Länge aufgetragen. Diese wurden anschließend für 24 Stunden luftgetrocknet.

2.2.8 Histochemie

2.2.8.1 Naphthyl-Esterase-Färbung

Die in 2.2.9 beschriebenen Cytospin-Präparate wurden für die Anfertigung von naphthyl-Esterase-Färbungen verwendet. Diese dient dem Nachweis von monozytären Zellen, zum Beispiel in der Routinediagnostik der akuten myeloischen Leukämie (Catovsky et al. 1981).

2.2.8.2 Puffer und Chemikalien

Alpha-Naphtylacetat

Ethylenglycolmonoethylether

Für 500 ml Phosphatpuffer 0,1 m pH 7,6:

Lösung A: 0,908 g / 100 ml KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)

Lösung B: 5,935 g / 500 ml Na_2HPO_4 (Natriumhydrogenphosphat) $\times 2\text{H}_2\text{O}$

441ml der Lösung B und 64 ml der Lösung A wurden gemischt, anschließend erfolgte eine pH-Messung und Titration des pH auf 7,6 durch Zugabe der Lösung A.

4% Pararosanilin: 2 g Parafuchsin wurden in 50 ml 2 N HCl gelöst und filtriert.

4% Natriumnitrit: 2 g Natriumnitrit wurden in 50 ml Ampuwa (pyrogenfreies H_2O) gelöst.

Für 500 ml Fixpuffer pH 6,6:

0,333 g Na_2HPO_4 und 1,67 g KH_2PO_4 wurden in Ampuwa auf 500 ml Gesamtlösung ergänzt. Der pH wurde auf 6,6 eingestellt.

2.2.8.3 Durchführung der Färbung

2.2.8.3.1 Herstellung des Substrates

44,5ml Phosphatpuffer wurden in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Dazu wurden 50mg Alfa-Naphtylacetat mit 2,5ml Ethylenglycolmonomethylether gegeben. Hierzu wurden 1,5ml 4% Pararosanilin und 1,5ml 4% Natriumnitrit zunächst durch Vortexen vermischt und anschließend zu dem Puffer-Gemisch gegeben. Der Puffer wurde anschließend filtriert und auf einen pH zwischen 6,1 und 6,3 eingestellt. Zur Fixierung der Cytospinpräparate wurde Fixierungspuffer vorbereitet. Dieses bestand aus 15 ml Fixpuffer, 22,5 ml Aceton und 12,5 ml Formalin (37%).

2.2.8.3.2 Färbung der Cytospinpräparate

Die zuvor luftgetrockneten Schnitte wurden zunächst für 30 sek im Kühlschrank fixiert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Danach erfolgte eine Inkubation im Substrat-Puffer Gemisch für 45 min bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde erneut mehrmals mit Leitungswasser gespült. Hiernach erfolgte die Kernfärbung für 3 min mit Mayers Haemalaun-Lösung und abschließend eine fünf minütige Blaufärbung unter einem tropfenden Wasserhahn. Nach erneutem Trocknen und Eindeckeln konnten die Präparate mikroskopiert werden.

2.2.8.4 Mikroskopie und digitale Aufnahmen

Die Cytospinpräparate wurden anschließend bei 10x Vergrößerung unter einem Leica® DM5000B Mikroskop mit Kamera mikroskopiert und fotografiert.

2.2.9 RNA-Isolation

Alle Arbeitsschritte wurden unter Rnase-freien Bedingungen durchgeführt, hierfür wurde der RNA Arbeitsplatz vor Arbeitsbeginn gründlich mit Rnase-away-Spray (Qiagen, Valencia, CA, USA) gereinigt. Die RNA-Isolation erfolgte mittels Phenol und Präzipitation der RNA durch Isopropanol (Chomczynski und Sacchi 1987).

2.2.9.1 Zellernte und Homogenisation

Der Überstand wurde von den Zellen abgenommen, die Zellen wurden anschließend zweimalig in der Zellkulturschale mit warmen PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml einfacher Trypsin-EDTA Lösung, die Zellen wurden in Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ernten der Zellen geschah per Zellschaber, die Zellsuspension wurde dann in ein 0,5 ml Eppendorf® Cup überführt und für 3min bei 3000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1ml Trizol® wurde hinzugegeben. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren und anschließendes Vortexen homogenisiert. Danach wurde das Homogenisat für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.9.2 Phasenseparation

Es erfolgte die Zugabe von 0,2xVolumenanteil Chloroform, die Lösung wurde dann 15 sek geschüttelt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Lösung für 15 min bei 14000xg und 4 ° C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase, in der die RNA enthalten war, wurde in ein neues 0,5 ml Eppendorf® Cup überführt.

2.2.9.3 RNA-Präzipitation und RNA-Waschschritt

Zur wässrigen Phase wurde 0,5X Volumenanteil Isopropanol und 1 µl *Glycoblu*e® (Ambion, Austin, TX, USA) hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei -20 °C für 10 min. Anschließend wurde die Lösung für 30 min bei 14000xg bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 0,75X Volumenanteil der ursprünglichen Trizolmenge gewaschen. Dann wurde eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 14000xg und 4 °C durchgeführt. Das Pellet wurde im Thermoblock bei 37 °C getrocknet.

2.2.9.4 DNase -Verdau

Für den DNase-Verdau wurde zunächst eine Lösung der DNase nach folgendem Schema hergestellt:

5 µl	10X Inkubationspuffer
1µl	DNase out
0,5 µl	RNase out
Ad 50 µl	RNase freies Wasser

Die DNase Lösung wurde für 20 min bei 37 °C im Thermoblock inkubiert.

2.2.9.5 RNA-Aufreinigung

Zur DNase-Lösung wurde 150 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben. Dazu wurden 200 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol gegeben. Die Lösung wurde für 30 Sekunden gevortext und danach für 2 min bei 14000xg zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in eine neues Eppendorf Cup überführt.

2.2.9.6 RNA-Präzipitation

Es erfolgte die Zugabe von 0,1xVolumenanteil der wässrigen Phase 3M Na-Acetat und die Zugabe von 1xVolumenanteil Isopropanol und 1µl Glycoblu[®]. Diese Lösung wurde nach kurzem Vortexen und 30 min Inkubation bei 4 °C für 30 min bei 4 °C bei 14000xg zentrifugiert.

2.2.9.7 RNA-Waschung

Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen und kurze Zeit gevortext. Die Lösung wurde 5 min bei 14000xg bei 4 ° Celsius zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und die Waschung wiederholt.

2.2.9.8 RNA-Lösen

Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Pellet bei 37 °C im Thermoblock getrocknet und nach der Trocknung in 20 µl Rnase-freiem Wasser gelöst und bei 42 ° C im Thermoblock zur vollständigen Lyse geschüttelt.

2.2.9.9 RNA-Qualitätsbestimmung

Mit einem NanoDrop1000[®] Spektrophotometer wurde die Konzentration an RNA in der Lösung und deren Reinheit bestimmt. Der Nanodrop[®] misst gleichzeitig die Absorptionsintensität bei 260 nm und 280 nm als Extinktion. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist diese proportional zum molaren Extinktionskoeffizienten für RNA, der Konzentration des gelösten Stoffes und der durchstrahlten Schichtdicke. Der Quotient der Extinktionen bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, und der bei 280nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, ist ein Index für die Verunreinigung der Probe mit Proteinen. Er sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen, um eine Verunreinigung mit Protein auszuschließen.

2.2.10 cDNA-Synthese

Für die Synthese stabiler Doppelstrang cDNA als Ausgangsmaterial für die qPCR wurde je 1 µg totale RNA eingesetzt. Für die reverse Transkription wurde das iScript[®] cDNA-Synthese-Kit von Biorad benutzt. Jede Probe wurde zweimal unabhängig voneinander umgeschrieben und die cDNA anschließend zusammengeführt. Im Einzelnen wurden je 1µg totale RNA mit 4 µl 5X cDNA Synthese Kit Puffer, 1 µl iScript[®] reverse Transkriptase in einen gesamt Ansatz von 20µl rnasefreiem Wasser zusammenpipetiert. Die Reverse Transkription wurde in 0,5ml Eppendorf[®] Cups in einem T3000 (Biometra, Göttingen, Deutschland) Cycler durchgeführt. Im Einzelnen erfolgten folgende Reaktionsschritte:

Temperatur in °C	Zeit in Minuten
25	5
42	30
85	5
-20	dauerhaft

2.2.11 **Primer-Design**

Alle *Primer* wurden für den Gebrauch in der qPCR erstellt, sind intronspanning und decken alle bekannten Splicevarianten der zu untersuchenden Gene ab. Zunächst wurde die genomische Sequenz des Gens aus der Datenbank des European Bioinformatics Institute (www.ensembl.org) betrachtet. Geeignete Exonsequenzen wurden unter Berücksichtigung verschiedener Splicevarianten ausgewählt und für das eigentliche *Primer-Design* in die Eingabemaske des *Primer-Design* Programmes Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) eingegeben. In der Primer3 Maske wurde die maximale Größe des Produktes auf 50-250 Basenpaare, das Temperatur Optimum auf 59-61 °C, die Salzkonzentration für monovalente Kationen auf 0 mM, die für divalente Kationen auf 5 mM, eingestellt. Für die thermodynamische Berechnung des Produktes wurde die Formel nach Santa Lucia verwandt, ebenso für die Salzkorrekturformel (SantaLucia 1998). Die durch Primer3 erzeugten Sequenzen wurden in der NCBI Gene Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) auf Spezifität geprüft und anschließend von IBA, Göttingen bezogen.

2.2.12 **Primer-Testung**

Die *Primer* wurden direkt in der qPCR getestet. Als *template* diente cDNA, welche aus RNA unstimulierter Makrophagen gewonnen wurde. Es wurden drei Reaktionsansätze mit *template*- und weitere drei als *no-template*-Kontrolle durchgeführt. Die Schmelzkurven der Primer wurden analysiert und es wurden nur solche mit einem eindeutigen Schmelzpunkt verwandt. Siehe Schmelzkurve von GNB2I1 (Abb.1).

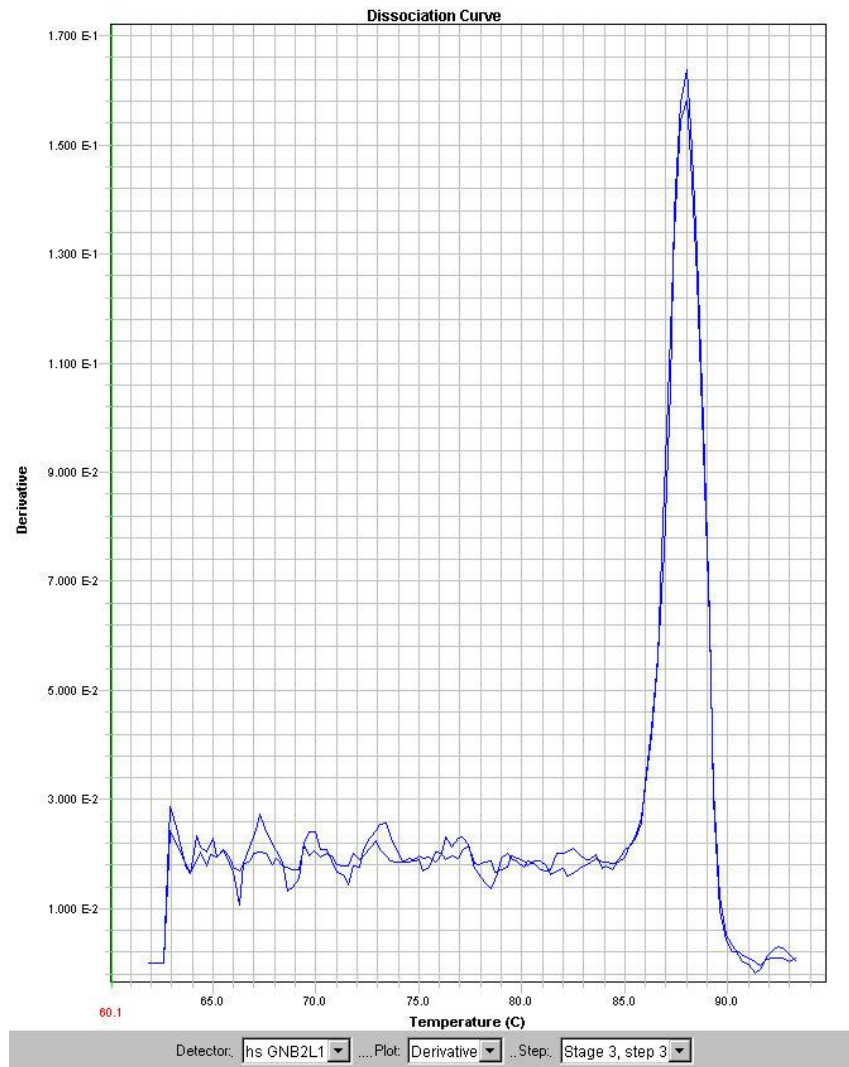


Abb. 1: Schmelzkurve des Primers für GNB2L1: Durchführung als Duplikat, spezifischer Schmelzpunkt als Maximum bei circa 86.0 °C.

2.2.13 *Quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR)*

2.2.13.1 Grundprinzipien der qPCR

Die *quantitative real time polymerase chain reaction* (qPCR) beruht auf dem Grundprinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al. 1985). Hierbei kommt es zur enzymatischen Amplifikation eines spezifischen DNA Bereichs durch eine Kombination aus DNA-Denaturierung, Primer Anlagerung und Extension des zu amplifizierenden Abschnittes der DNA. Während der Extension wird der amplifizierte Abschnitt mittels interkalierendem *SYBR Green* fluoreszierend markiert (Morrison et al. 1998). Nach jedem Zyklus wird von der PCR Maschine die

Zunahme der Fluoreszenz bestimmt. Die Stärke der Fluoreszenz wird gegen die Zyklenzahl aufgezeichnet und der so genannte Ct-Wert kann als Anzahl der PCR Zyklen bis zum Erreichen einer exponentiellen Amplifikation des Produktes gemessen werden. Generell haben somit hoch exprimierte Gene einen niedrigen, niedrig exprimierte Gene einen hohen Ct-Wert.

2.2.13.2 Reaktionsansatz

Zur Herstellung der Reaktionsansätze wurden zunächst cDNA und *Primer* spezifische Lösungen produziert. Hierzu wurde die jeweilige cDNA wie in 2.2.10 beschrieben genutzt. Für alle Reaktionsansätze wurde der *iTaq*[®] Mastermix mit ROX verwendet. Die PCR wurde in Triplikaten durchgeführt, die Reaktionsansätze wurden also als Mastermix pipettiert und anschließend in drei Wells der 384-Well Platte geteilt. Die zu erwartende Standardabweichung wurde dadurch ausgeglichen, dass bei einem dreifach Ansatz jeweils mit 5% Ungenauigkeit gerechnet wurde und somit jedes Reagenz als 100% plus 5% zugegeben wurde. Zusätzlich wurden Kontrollreaktionsansätze angefertigt, hierzu wurden jeweils eine Kontrolle ohne Template und eine Kontrolle ohne Primer produziert.

2.2.13.3 Pipettierschema

Reagenz	Menge in μ l
<i>iTaq</i> [®] Mastermix mit ROX	5
Primer fw	0,2
Primer rv	0,2
Nuklease freies H ₂ O	3,60
cDNA	1
Gesamtvolumen	10

2.2.13.4 Durchführung der qPCR

Die qPCR wurde mit dem ABI 7900 HT durchgeführt. Das Temperaturprotokoll wurde wie folgt eingestellt. Siehe hierzu auch Abb. 2.

1.) Denaturierung	95°C	3:00 min
2.) Amplifikation	95°C	15 sek
	60°C	45 sek
	72°C	1:00 min

3.) Dissoziation für Schmelzkurve

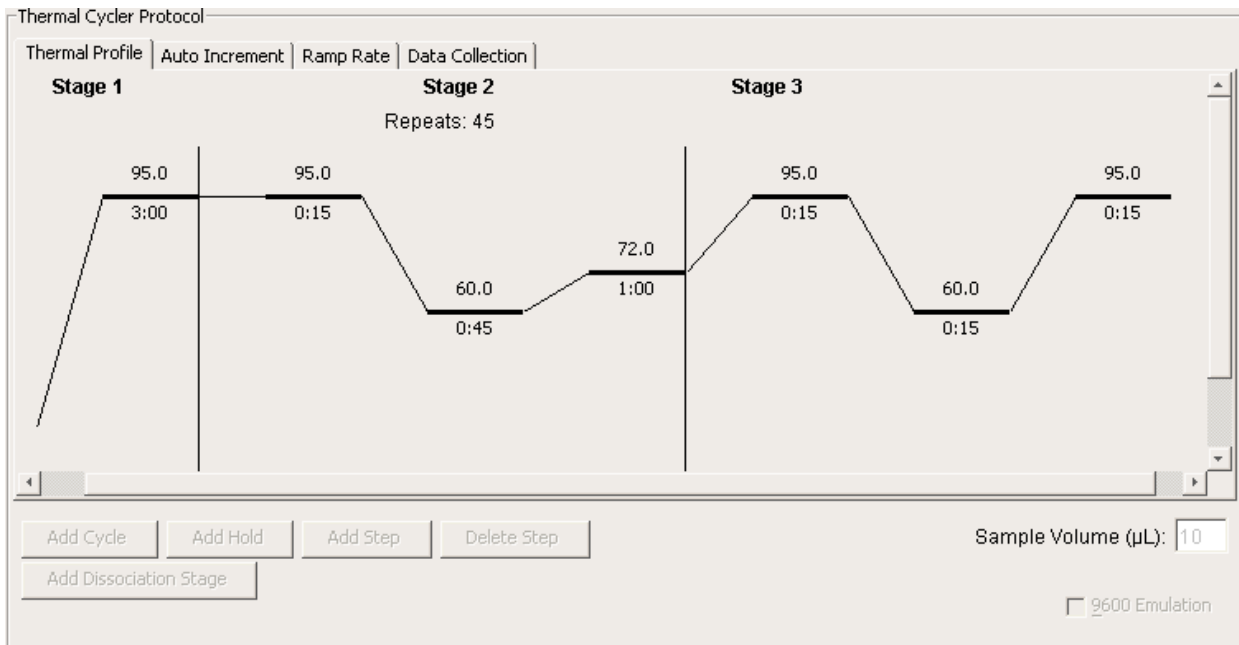


Abb. 2: Durchführung der qPCR: Protokoll des PCR-Programmes mit Denaturierungs-, Amplifikations- und Dissoziationsschritt

2.2.13.5 Auswertung der qPCR

Die Analyse der primären Fluoreszenzdaten erfolgte mit der Software SDS 2.1. Die Berechnung erfolgte unter automatischer *threshold*- und Ct-Wert-Bestimmung. Anschließend wurden die so ermittelten Ct-Werte in Excel exportiert und hier weiter ausgewertet. Die Expression der Zielgene wurde gegen die Housekeeping Gene GNB2L1 und HPRT1 normalisiert und anschließend wurde die relative Expression mittels der $\Delta\Delta Ct$ -Methode berechnet. Die mathematische Gleichung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode lautet:

$$\text{Ratio} = 2^{-[\Delta\text{ct sample} - \Delta\text{ct control}]} = 2^{-[\Delta\Delta\text{ct}]}$$

Für die Versuche zur Genregulation in Makrophagen unter Kokulturbedingungen wurde die Signifikanz der Resultate mittels gepaartem, zweiseitigem Students t-test berechnet. Die Signifikanzniveaus wurden als signifikant (*= $p < 0,05$), hochsignifikant (**= $p < 0,01$) und höchstsignifikant (***= $p < 0,001$) definiert.

3.0 Ergebnisse

3.1 Wnt- und Wnt-assoziierte Genexpression

Die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB 231 und MCF-7 wurden hinsichtlich der Expression verschiedener Wnt- und Wnt-assoziiierter Gene verglichen. Vgl. hierzu auch 1.6.1. Zunächst wurde ein Genexpression mittels eines qualitativen Wnt-Gen-*Microarrays* durchgeführt. Die Wnt-Gene, welche der *Microarray* als unterschiedlich exprimiert detektierte, wurden in einem zweiten Schritt mittels qPCR validiert.

3.1.1 Ergebnisse des qualitativen *Microarrays*

Die graphische Auswertung des qualitativen *Microarrays* mittels der *GeArray Analyzer* Software 1.3 zeigte eine höhere Expression von *cluster of differentiation 44* (CD44), *fos-like*-Antigen, c-jun, VEGF-A, PLAUR, Wnt5a und Wnt5b in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB 231 im Vergleich zur MCF-7-Zelllinie. Andere Wnt-Gene wurden hingegen in diesem *Array* nicht als unterschiedlich exprimiert vorgefunden. In der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 waren im Vergleich zur Zelllinie MDA-MB 231 die Gene c-terminal binding protein-1 (CTBP1), E1A-Bindungsprotein-P300 (EP300), Msh-Homeobox-2 (MSX2), *inhibitor of DNA-binding-2* (ID2), *inhibitor of DNA-Binding-3* (ID3), Glycogen-Synthase-Kinase-3 alpha (GSK3A) und Ret proto-onkogen (RET) höher exprimiert (Abb.3).

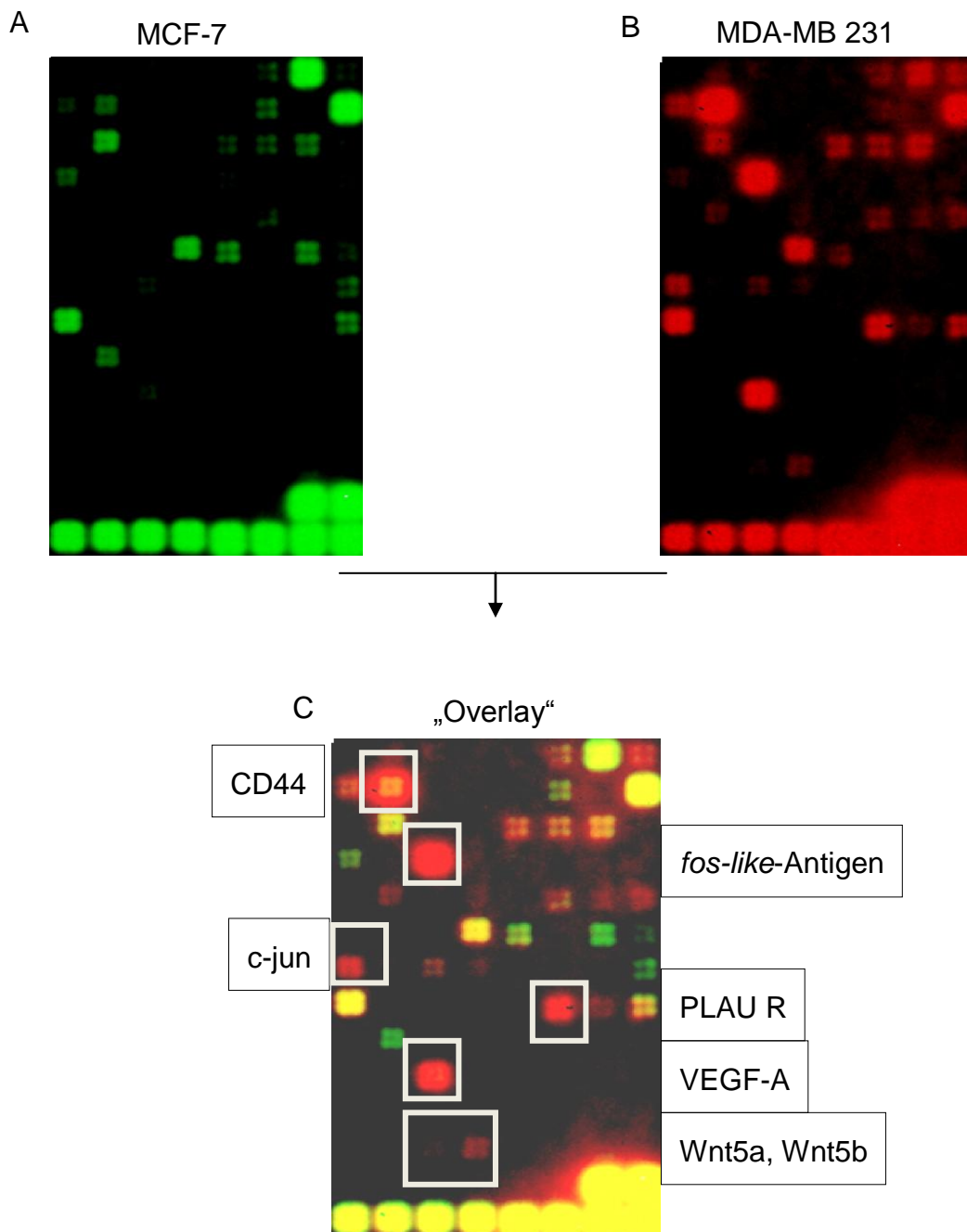


Abb. 3 Ergebnisse des qualitativen Wnt- Microarrays: Die graphische Auswertung des qualitativen Microarrays mit Hilfe der GeArray Analyzer Software 1.3. zeigt eine additive Darstellung beider Arrays. In grün werden die hoch exprimierten Gene der Zelllinie MCF-7 (A) und in rot die hoch exprimierten Gene der Zelllinie MDA-MB 231 (B) dargestellt. Gelb zeigt in etwa ein gleiches Expressionsniveau an. Im Overlay zeigt sich hier ein höheres Expressionsniveau der Gene: CD44, *fos-like*-Antigen, c-jun, VEGF-A, PLAUR, Wnt5a und Wnt5b in der Zelllinie MDA-MB 231 im Vergleich zur Zelllinie MCF-7(C).

3.1.2 Validierung der qualitativen Wnt-Microarray-Ergebnisse durch qPCR

Die Validierung der *Array*-Ergebnisse wurde für Wnt5a, Wnt5b, PLAUR und VEGF-A mittels qPCR durchgeführt. Des Weiteren wurde die relative Expression von E-Cadherin gemessen. Die E-Cadherin Expression wurde als Marker für epitheliale Zellen mitbestimmt. Die Ergebnisse zeigen die n-fache Expression der jeweiligen Gene in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB 231 im Vergleich zu MCF-7. Die Versuche wurden jeweils zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ct-Werte der einzelnen Gene werden als geometrisches Mittel einer Dreifachmessung mit Standardfehler angegeben. Die n-fache Expression wurde mit Hilfe der delta-delta Ct-Methode berechnet.

3.1.3 Validierung des qualitativen Wnt-Microarrays

Zunächst wurde per qPCR die Expression von E-Cadherin in MCF-7 relativ zur Expression in MDA-MB 231 bestimmt. E-Cadherin gilt als Markerprotein epithelialer Zellen und sollte in diesem Experiment MCF-7 als epithelialen Zelltyp verifizieren. Es zeigte sich eine um 3094,40 ($\pm 149,42$ SF) höhere Expression in der MCF-7-Zelllinie im Vergleich zur MDA-MB 231 Zelllinie. Somit konnten zahlreiche Beschreibungen bestätigt werden, die bereits zuvor gezeigt hatten, dass die MDA-MB 231-Zelllinie sich sehr weit von einem epithelialen Zelltyp entfernt hat (Lacroix and Leclercq 2004).

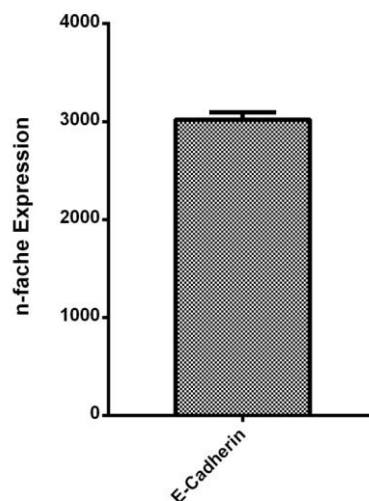


Abb.4: n-fache Expression von E-Cadherin in MCF-7 relativ zur Expression in MDA-MB 231: Die Abbildung zeigt die relative Expression von E-Cadherin in der Zelllinie MCF-7 relativ zur Expression in der Zelllinie MDA MB 231. Angegeben ist die relative Expression \pm SF.

3.1.4 Expression von Wnt- und Wnt-assoziierten Genen

Für die Expression von Wnt5a zeigte sich eine 38,5 ($\pm 1,58$ SF) fach höhere Expression in der MDA-MB 231-Zelllinie im Vergleich zur Expression in der MCF-7-Zelllinie und für Wnt5b eine 119,7 ($\pm 2,34$ SF) höhere Expression im Vergleich zur Expression in der MDA-MB 231-Zelllinie (Abb.5 A). Die Ergebnisse des qualitativen Wnt-Microarrays konnten somit bestätigt werden. Ebenso wie Wnt5a und Wnt5b waren auch VEGF-A und PLAU-R in der Zelllinie MDA-MB 231 höher exprimiert als in MCF-7-Zellen. VEGF-A war um 15,86 ($\pm 2,70$ SF) höher – und PLAU-R um 119,63 ($\pm 2,15$ SF) höher exprimiert als in der Vergleichszelllinie MCF-7 (Abb.5 B).

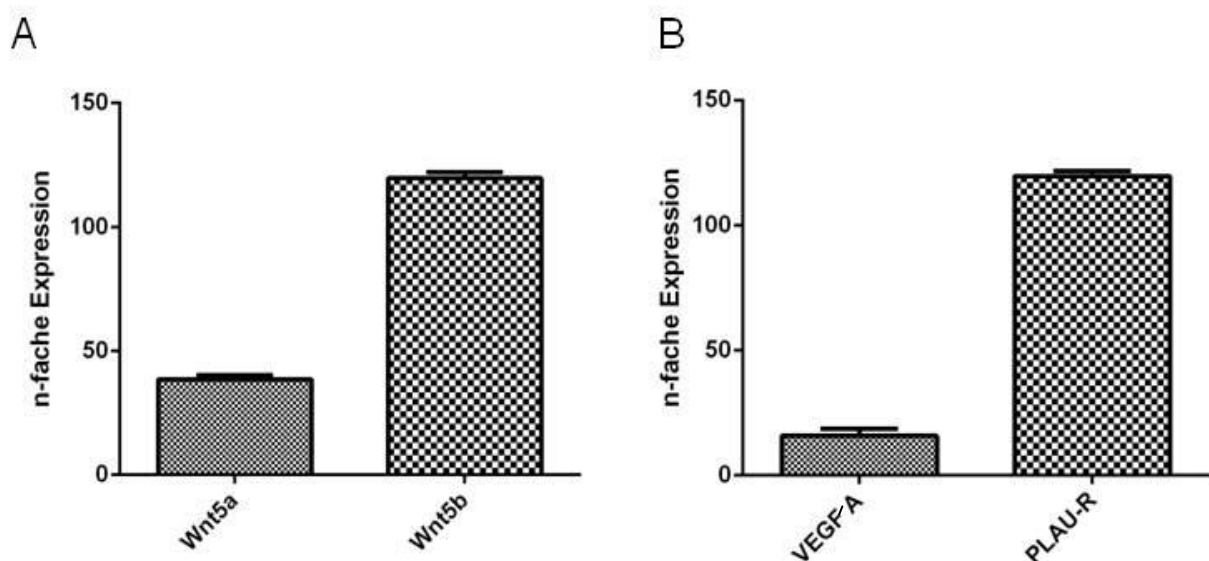


Abb.5: Wnt- und Wnt-assoziierte Genexpression: n-fache Expression von Wnt5a und Wnt5b in MDA-MB 231 relativ zur Expression in MCF-7 (A), n-fache Expression von VEGF-A und PLAU-R in MDA-MB 231 relativ zur Expression in MCF-7 (B) Angegeben ist die n-fache Expression \pm SF

3.1.5 Zusammenfassung Wnt- und Wnt-assoziiierter Genexpression

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich im Vergleich der Zelllinien MDA-MB 231 und MCF-7 hinsichtlich der Expression verschiedener Wnt- und Wnt-assoziiierter Gene eine höhere Expression der nicht-kanonischen Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt5b in der Zelllinie MDA-MB 231. Darüber hinaus zeigen sich die Wnt-assoziierten Gene c-jun, VEGF-A und PLAU-R in der mesenchymalen Mammakarzinomzelllinie

MDA-MB 231 höher exprimiert als in der Zelllinie MCF-7. Als Markerprotein für epitheliale Zellen zeigte sich E-Cadherin höher exprimiert in der MCF-7-Zelllinie. MCF-7 zeigt sich somit als weniger Wnt-Gen exprimierende Zelllinie in diesem Vergleich. Für die geplanten Kokulturrexperimente eignet sich somit die MCF-7-Zelllinie deutlich besser, da aufgrund ihres weiterhin bestehenden epithelialen Phänotyps und der geringen Wnt-Genexpression größere Veränderungen unter Kokulturbedingungen zu erwarten sind.

3.2 Monozytenisolation- und Differenzierung

Wie bereits in 1.6.2 beschrieben, sollte eine geeignete Methode zur Herstellung von Makrophagen für weitere Versuche in Kokulturrexperimenten mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 etabliert werden. Diese insgesamt neue Methode (Seager Dancinger et al. 2004) wurde mit dem Goldstandard der Isolation und Differenzierung von Monozyten aus peripherem Blut, der *Counterflow Elutriation* (Contreras et al. 1980) mit anschließender Differenzierung der Zellen in Teflonbeuteln verglichen. Die Isolation durch Einfachgradient und *Counterflow Elutriation* wurde am Leibniz Forschungszentrum in Borstel durchgeführt.

3.2.1 Quantitative Ausbeute der Isolation und der Differenzierung

Um die Methode für weitere Versuche anwenden zu können, war es notwendig eine adäquate Menge an Zellen gewinnen zu können. Diese Voraussetzung musste auch erfüllt sein, um weitere Versuche zur Untersuchung der Qualität der gewonnenen Zellen durchzuführen, da ohne entsprechende Zellmenge keine Anwendbarkeit gegeben gewesen wäre.

	Monozyten nach Isolation (in $\times 10^6$)	Makrophagen nach Differenzierung ($\times 10^6$)
1	120	95
2	100	80
3	80	70
Ø	100	81,66

Tabellarische Darstellung der Menge an Monozyten/Makrophagen nach Doppelgradientenisolation und Differenzierung in 3 Beispielversuchen.

Mit der Kombination aus Einfachdichtegradient und *Counterflow Elutriation* konnte eine durchschnittliche Menge von 100×10^6 Monozyten aus 250ml Vollblut isoliert werden, nach Differenzierung zu Makrophagen konnten durchschnittlich $81,66 \times 10^6$ Zellen gewonnen werden. Die entspricht einer Effizienz von 82%, gemessen an der Ausgangsmenge.

	Monozyten nach Isolation (in $\times 10^6$)	Makrophagen nach Differenzierung ($\times 10^6$)
1	120	60
2	110	45
3	70	36
Ø	100	47

Tabellarische Darstellung der Menge an Monozyten/Makrophagen nach Doppelgradientenisolation und Differenzierung in 3 Beispielversuchen.

Durch Doppeldichtegradientenzentrifugation konnten durchschnittlich 100×10^6 Monozyten aus 100 ml *Buffy-Coat* isoliert werden. Nach Differenzierung ergab sich eine Menge von 47×10^6 , die entspricht einer Effizienz der Differenzierung von 47%.

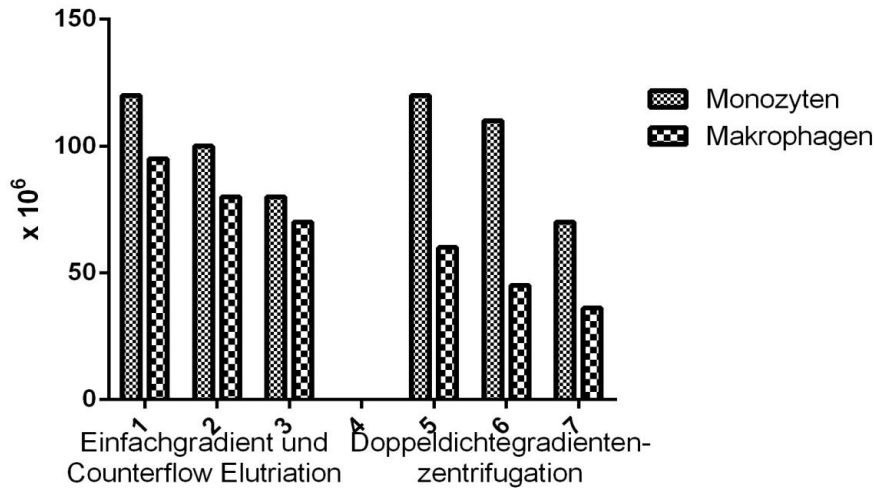


Abb. 6: Effizienz der Monozytenisolation und Differenzierung zu Makrophagen: Die Abbildung zeigt auf der linken Seite die Effizienz der Isolation von Monozyten aus Vollblut und die absolute Anzahl an Makrophagen nach Differenzierung. Rechts ist die absolute Anzahl an Monozyten nach Isolation aus *Buffy-Coats* und die Anzahl der daraus differenzierten Makrophagen dargestellt.

3.2.2 Qualität der differenzierten Makrophagen

Da durch die Doppeldichtegradientenzentrifugation in ausreichendem Maße Makrophagen für weitere Versuche generiert werden konnte, sollte die Qualität der Zellen überprüft werden. Hierzu wurden zum einen histochemische Färbungen auf Esterase und zum anderen *fluorescens activated cell sorting* (FACS[®]) Analysen auf *cluster of differentiation 14* (CD 14) und *cluster of differentiation 206* (CD 206) vorgenommen.

3.2.2.1 Esterase-Färbungen der differenzierten Makrophagen

Die histochemische Färbung wurde jeweils für jede der drei Beispielversuche aus 3.2.1 durchgeführt. Es zeigte sich jeweils eine monomorphe Zellpopulation, welche deutlich Esterase-positiv war. Die Abbildung zeigt eine Übersichtsaufnahme mit 10x Vergrößerung der angefertigten Cytospinpräparate.

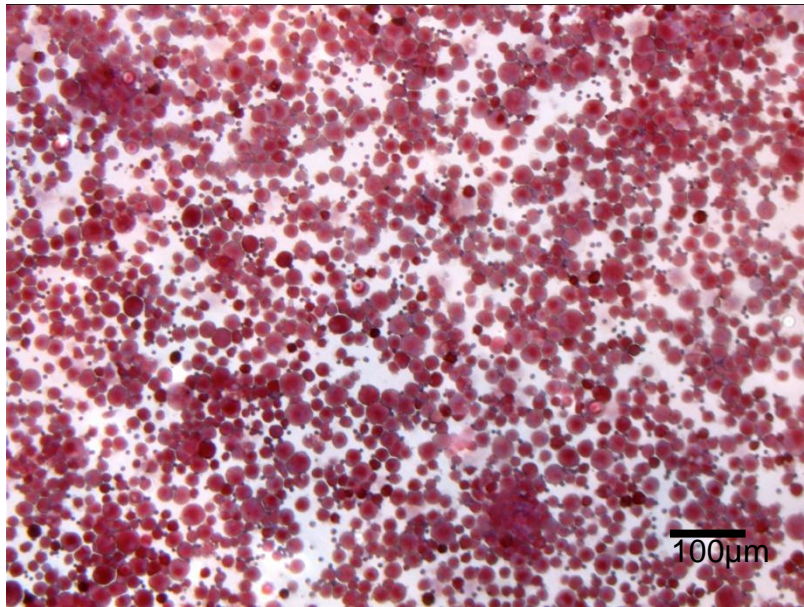


Abb. 7: Esterase-gefärbte Makrophagen: Die Abbildung zeigt einen einfachen, homogenen Zellrasen aus Esterase positiven Makrophagen in einer Vergrößerung von 1×10^4 , $1 \text{ cm} = 100 \mu\text{m}$.

3.2.2.2 FACS[®]-Analysen der gewonnenen Makrophagen

Die differenzierten Makrophagen wurden für die zuvor beschriebenen Methoden durch FACS-Analysen für CD14 und CD206 als Makrophagen verifiziert. Sowohl die durch Einfachgradient und *Counterflow Elutriation*, als auch die, durch Doppeldichtegradientenzentrifugation gewonnen und durch Differenzierung in Teflonbeuteln produzierten Makrophagen waren positiv für CD14 und CD206. In der quantitativen Auswertung zeigten sich für die Makrophagen aus *Counterflow Elutriation* und Differenzierung 87,6% CD14 positive und 64,2% CD206 positive Zellen (Abb.8). Für die Makrophagen welche durch Isolation mittels Doppeldichtegradientenzentrifugation und anschließender Differenzierung mittels Teflonbeutel zeigten sich 88,4% der Zellen CD14 positiv und 83,4% der Zellen CD 206 positiv (Abb.9). Somit konnte gezeigt werden, dass für die in dieser Arbeit ausgewählte Qualitätskriterien, die Isolation mittels Doppeldichtegradientenzentrifugation und anschließender Differenzierung in Teflonbeuteln, zu einer höheren Ausbeute an CD14 und CD206 positiven Zellen im Vergleich zum Goldstandard führt. In den Abbildungen 8 und 9 sind die graphischen Auswertungen der FACS-Experimente mittels „dot blot“ dargestellt. Zunächst wurde ein Makrophagen spezifisches „gate“ festgelegt, anschließend wurde der Anteil der

CD14 und CD 206 positiven Zellen ermittelt. Zur Kontrolle dienten jeweils IgG1 markierte Zellen.

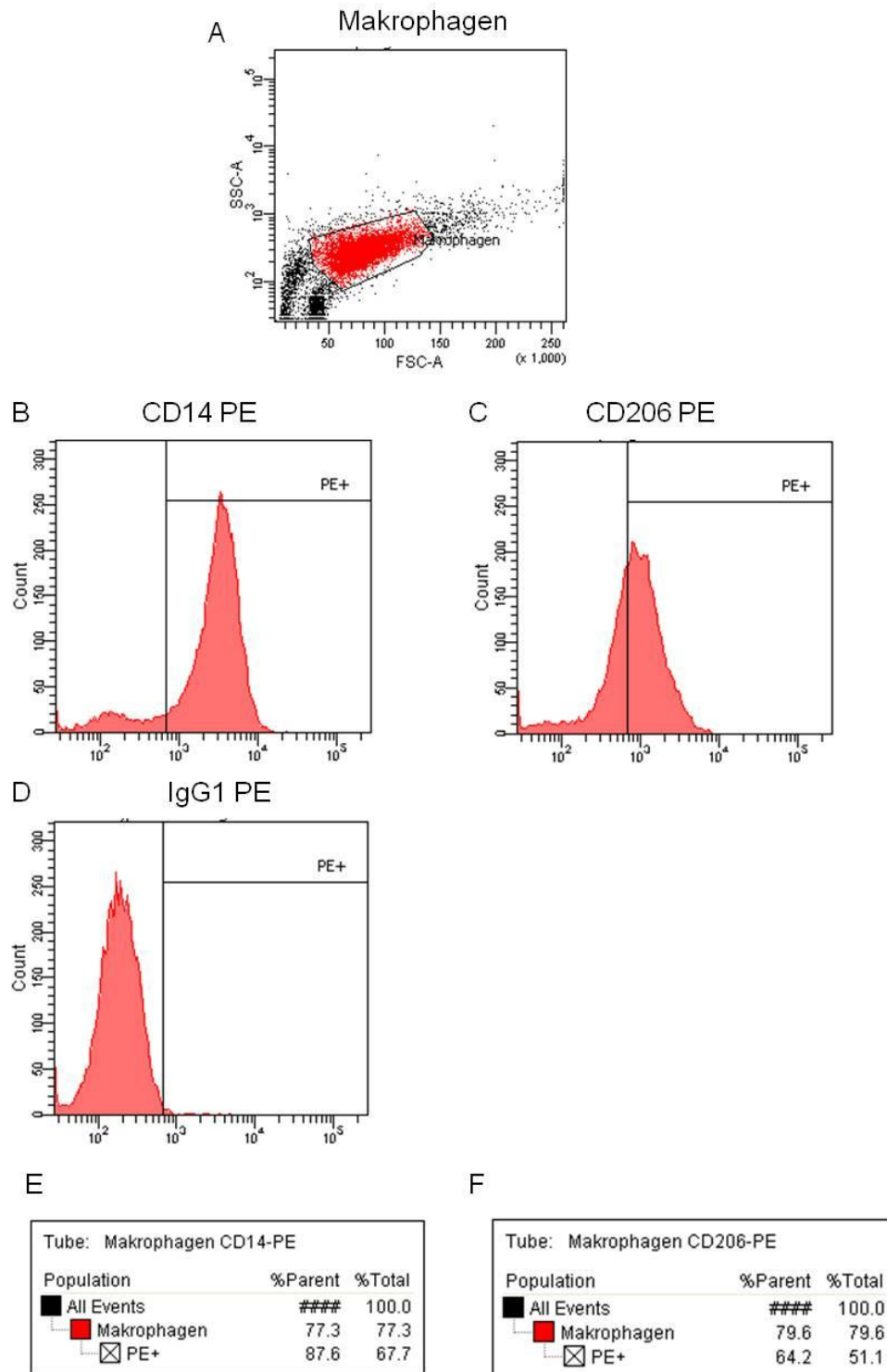


Abb. 8: FACS Analysen für Makrophagen nach *Counterflow Elutriation*: „dot blot“ aller Zellen nach Differenzierung, Makrophagen im Bereich des „gates“ (rot) (A). CD14 PE positive Zellen (B). CD206 PE positive Zellen (C). Isotypenkontrolle IgG1 PE (D). Statistische Auswertung der CD14 PE positiven Zellen an den Gesamtzellen und Makrophagen (D). Statistische Auswertung der CD206 PE positiven Zellen an den Gesamtzellen und Makrophagen (E).

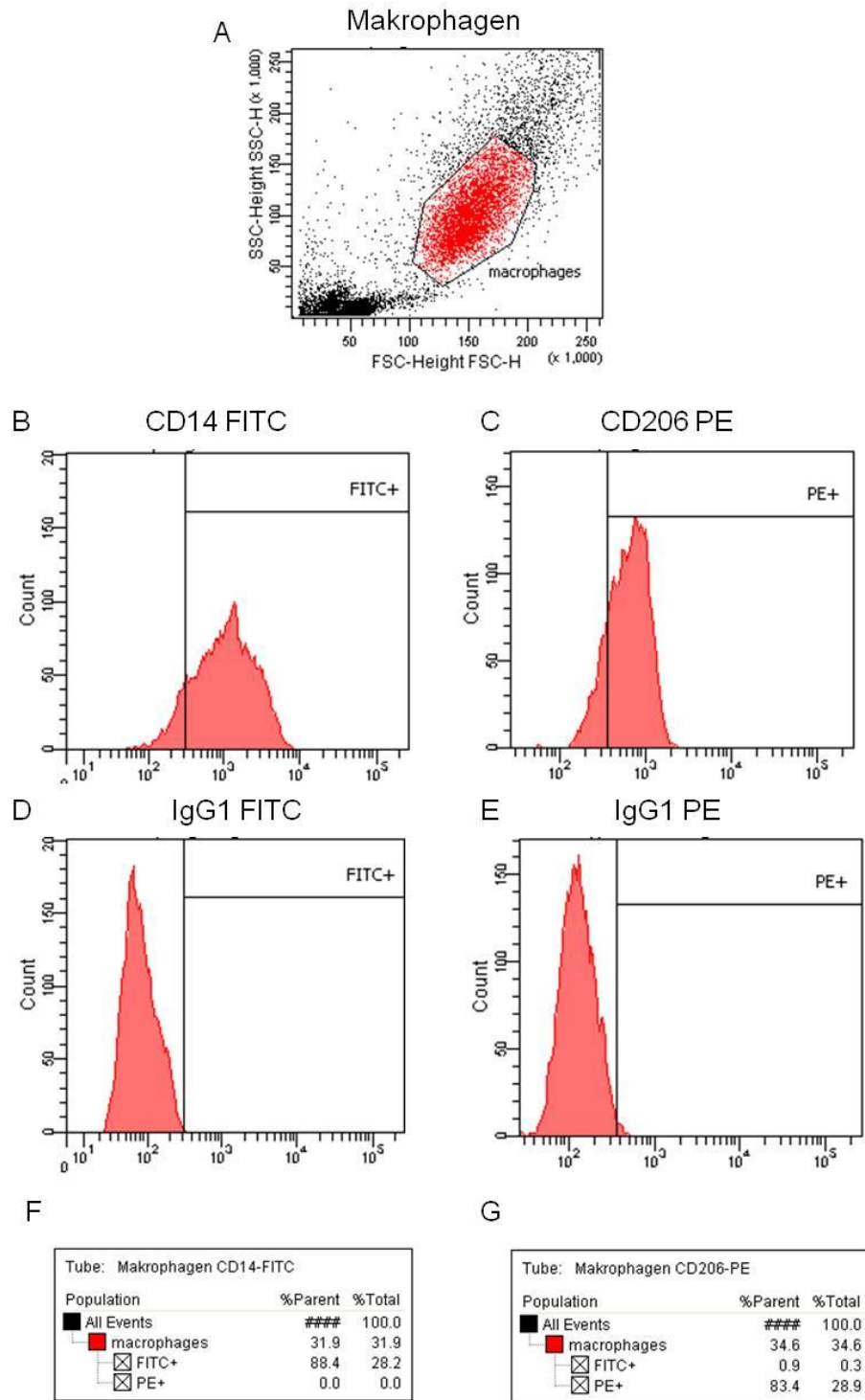


Abb. 9: FACS Analysen für Makrophenen nach Doppeldichtegradientenzentrifugation: „dot blot“ aller Zellen nach Differenzierung, Makrophenen im Bereich des „gates“ (rot) (A). CD14 FITC positive Zellen (B). CD206 PE positive Zellen (C). Isotypenkontrolle IgG1 FITC (D). Isotypenkontrolle IgG1 FITC (E). Statistische Auswertung der CD14 FITC positiven Zellen an den Gesamtzellen und Makrophenen (F). Statistische Auswertung der CD206 PE positiven Zellen an den Gesamtzellen und Makrophenen (G).

3.2.3 Zusammenfassung Monozytenisolation- und Differenzierung

Zielsetzung der Arbeit war es eine geeignete Methode zur Generierung großer Mengen an Makrophagen zu gewinnen, ohne eine besondere technische Ausstattung nutzen zu müssen. Die gewonnenen Zellen sollten quantitativ und qualitativ vergleichbar sein mit den Zellen der gewählten Referenzmethode durch *Counterflow Elutriation* und anschließende Differenzierung der Zellen in Teflonbeutel. Hinsichtlich der Quantität konnte gezeigt werden, dass sich mittels Doppeldichtegradientenzentrifugation eine äquivalente Menge an Monozyten aus 100ml *Buffy-Coat* im Vergleich zur *Counterflow Elutriation* isolieren lassen. Nach Differenzierung ergab sich für die Makrophagen, welche nach Doppeldichtegradientenzentrifugation differenziert wurden, eine Effizienz von durchschnittlich 47% im Vergleich zu 81,66% nach *Counterflow Elutriation*. Hinsichtlich der Qualität zeigten sich die Makrophagen, welche aus Monozyten nach Doppeldichtegradientenzentrifugation differenziert wurden, Esterase-positiv und zu einem höheren Prozentsatz CD14- und CD206-positiv als die Makrophagen welche nach *Counterflow Elutriation* differenziert wurden. Somit konnte im Sinne der Zielsetzung eine geeignete Methode zur Isolation von Monozyten und anschließenden Differenzierung zu Makrophagen etabliert werden.

3.3 Wnt-Genregulation in humanen Makrophagen

3.3.1 Makrophagen für Kokulturversuche

Zur Generierung der Makrophagen für die Kokulturversuche mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurden Monozyten genutzt, welche mittels Doppeldichtegradientenzentrifugation aus *Buffy-Coats* isoliert und anschließend in Zellkulturteflonbeuteln zu Makrophagen differenziert wurden.

3.3.2 Housekeeping- Gene für qPCR-Experimente mit humanen Makrophagen

Da humane Makrophagen, welche aus peripheren Blutmonozyten differenziert wurden und gemäß der biologischen Varianz ihrer Spender eine sehr variable Expression verschiedener Gene zeigten, war es notwendig die Expression der zu untersuchenden Gene mit zwei verschiedenen *housekeeping*-Genen zu normalisieren. Zum einen wurde zunächst die Stabilität des *housekeeping*-Gens HPRT1 überprüft. Anschließend wurde ein evidenzbasierteres zweites *housekeeping*-Gen überprüft, *guanine nucleotide binding protein subunit beta-2-like-1* (GNB2L1) (Ishii et al. 2006). Letztlich wurden beide für die durchzuführenden Experimente verwandt.

3.3.3 Expression von HPRT1 in humanen Makrophagen

HPRT1 zeigte in fünf Experimenten eine Expression mit einem durchschnittlichen Ct-Wert von 21,11 bei einer SA von 0,69 in humanen Makrophagen.

3.3.4 Expression von GNB2L1 in humanen Makrophagen

GNB2L1 zeigte in denselben fünf Experimenten eine Expression mit einem durchschnittlichen Ct-Wert von 16,89 und einer SA von 0,48 in humanen Makrophagen.

3.3.5 Expressionsstabilität zweier *housekeeping*-Gene

Die Kombination aus beiden *housekeeping*-Genen zeigte einen durchschnittlichen Ct-Wert (Mittelwert der Ct-Werte beider *housekeeping*-Gene) von 18,80 und eine SA von 0,35 und war damit den jeweils einzeln eingesetzten *housekeeping*-Genen überlegen. Für die folgenden Experimente wurden beide *housekeeping*-Gene zur Normalisierung der zu untersuchenden Gene übernommen.

3.3.6 Regulation der Expression von Wnt5b

Nach 24 Stunden Kokultivierung von humanen Makrophagen und MCF-7 Zellen konnte keine signifikante Regulation von Wnt5b gemessen werden. Es zeigte sich eine 1,06 ($\pm 0,683$) fache höhere Expression relativ zur Expression in unbehandelten Makrophagen. Da keine signifikante Regulation von Wnt5b vorlag, wurde auf weitere Kokultivversuche mit *rekombinant human-Dickkopf 1* (rh Dkk-1) verzichtet.

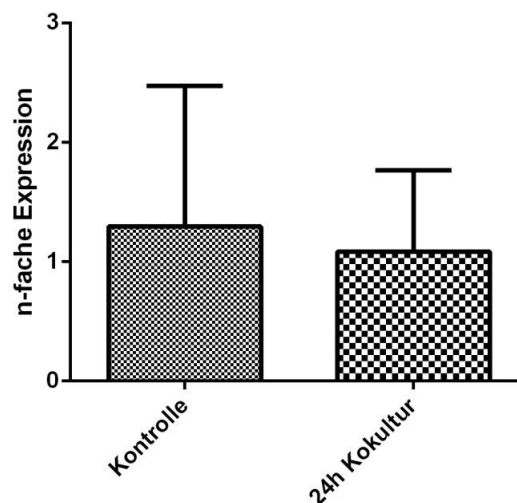


Abb. 10: Regulation der Expression von Wnt5b in humanen Makrophagen: n-fache Expression von Wnt5b in humanen Makrophagen nach 24h Kokultur, \pm SA.

3.3.7 Wnt- und Wnt-assoziierte Genregulation in humanen Makrophagen

Für Wnt5a zeigte sich eine signifikante Regulation der Expression in humanen Makrophagen nach 24 Stunden Kokultur mit der Zelllinie MCF-7. Es zeigte sich eine durchschnittlich 2,16x ($\pm 0,201$) höhere Expression nach 24 Stunden Kokultur

($p=0,0153$). Während die Expression von Wnt5a in Makrophagen nach 24 Stunden signifikant hochreguliert war, zeigten die Makrophagen in Kokultur plus 100 ng/ml rh Dkk-1 eine signifikant niedrigere Expression von Wnt5a im Vergleich zu Kokulturbedingung (Abb. 11 A). Zusätzlich zur relativen Expression von Wnt5a wurden auch die relativen Expressionen von TNF- α und VEGF-A bestimmt. Auf Versuche zur Bestimmung der relativen Expression von PLAU-R wurde verzichtet, nachdem deutlich wurde, dass Makrophagen PLAU-R auf sehr hohem Niveau konstitutiv exprimieren. (Ergebnisse werden hier nicht gezeigt.) Für VEGF-A zeigte sich nach 24 Stunden Kokultivierung von humanen Makrophagen mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 eine 3,15x ($\pm 0,311$) höhere Expression relativ zur unbehandelten Kontrolle. Damit ist VEGF-A signifikant hochreguliert nach 24 Stunden Kokultivierung ($p=0,0483$). Nach 24 Stunden Kokultur + 100ng/ml rh Dkk-1 zeigte sich hingegen eine signifikant niedrigere Expression von VEGF-A im Vergleich zur Kokulturbedingung ($p=0,0168$) (Abb.11 B). Für TNF- α zeigte sich eine 2,94x ($\pm 0,319$) höhere Expression nach 24 Stunden Kokultur mit MCF-7-Zellen ($p=0,0285$). Nach 24 Stunden Kokultur + 100ng/ml rh Dkk-1 zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression von TNF- α im Vergleich zur Kokulturbedingung ($p=0,0142$) (Abb. 11 C).

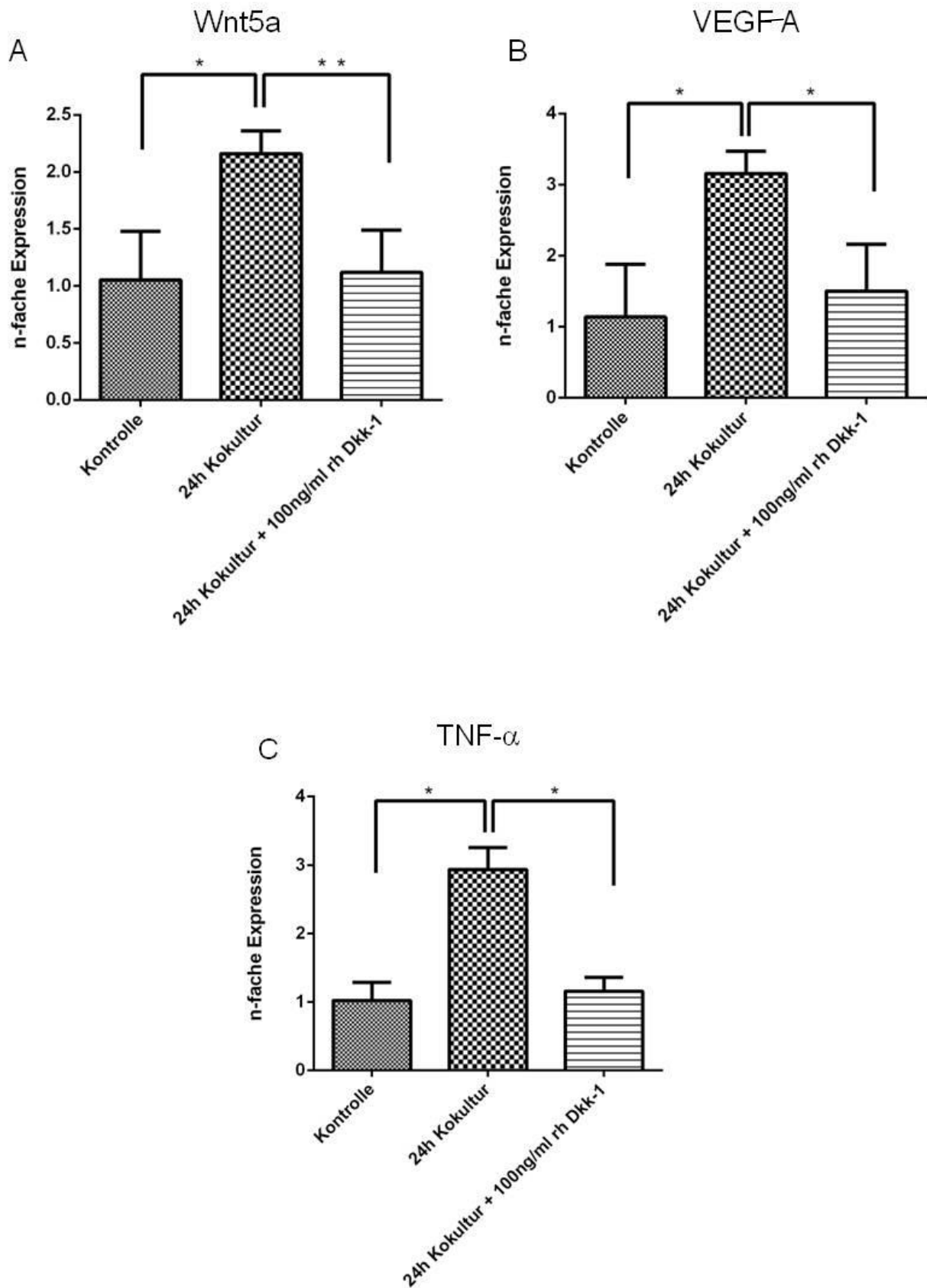


Abb. 11: Wnt- und Wnt-assoziierte Genregulation in humanen Makrophagen: N-fache Expression (\pm SA) von Wnt5a in humanen Makrophagen nach 24h Kokultur mit MCF-7 und nach 24h Kokultur mit MCF-7 + rh-Dkk (A). N-Fache Expression (\pm SA) von VEGF-A in humanen Makrophagen nach 24h Kokultur mit MCF-7 und nach 24h Kokultur mit MCF-7 + rh-Dkk (B). N-Fache Expression (\pm SA) von TNF- α in humanen Makrophagen nach 24h Kokultur mit MCF-7 und nach 24h Kokultur mit MCF-7 + rh-Dkk (C). * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$

3.3.8 Zusammenfassung Genregulation in humanen Makrophagen

Da bei der Durchführung von qPCR-Experimenten mit humanen Makrophagen eine hohe Varianz der Grundexpression verschiedener Gene zu erwarten war, wurden zunächst zwei *housekeeping*-Gene etabliert. Die Kombination der Gene HPRT1 und GNB2L1 zeigte eine geringere SA in der Grundexpression als die jedes der beiden einzelnen Gene. Anschließend wurden die Wnt- und Wnt-assoziierten-Gene, welche zwischen den beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB 231 differenziell exprimiert waren, in humanen Makrophagen nach Kokultur mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 und anschließend in Kokultur mit MCF-7 und Zugabe von rh Dkk-1 untersucht. Für die Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt5b zeigt sich ein uneinheitliches Bild. Während Wnt5b nach Kokultur mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 nicht signifikant reguliert war, zeigte sich für Wnt5a eine signifikante Hochregulation, welche durch die Zugabe von rh Dkk-1 verhindert werden konnte. Analog zu Wnt5a zeigten sich VEGF-A und TNF- α nach 24h Kokultur mit MCF-7 signifikant hochreguliert. Diese Regulation konnte ebenso wie die Regulation von Wnt5a mit rh Dkk-1 verhindert werden.

4.0 Diskussion

4.1 Wnt5a- und Wnt5b-Expression im Mammakarzinom

Die Ergebnisse des qualitativen *Wnt-Microarrays* und der qPCR zeigen eine relativ höhere Expression der nichtkanonischen Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt5b in der TN-Mammakarzinomzelllinie MDA-MB 231 im Vergleich zur niedrig invasiven Zelllinie MCF-7. Andere Arbeiten zeigen hinsichtlich der unterschiedlichen Expression verschiedener Wnt-Liganden widersprüchliche Ergebnisse. Für Wnt5a wurde eine signifikant höhere Expression in Mammakarzinomzellen bereits metastasierter Karzinome im Vergleich zu nicht metastasierten Mammakarzinomen gezeigt. Auf der anderen Seite zeigte sich in derselben Arbeit keine signifikante Regulation von Wnt5a im Vergleich der Zelllinien MCF-7 und MDA-MB 231 (Fernandez-Cobo et al. 2007). Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass Wnt5a in nichtmalignen Epithelzellen deutlich höher exprimiert wird als in humanen Brustkrebszelllinien. Ähnliche Ergebnisse wurden für Wnt5b publiziert (Benhaj et al. 2006). In Untersuchungen von klinischen Brustkrebsgewebeproben wurde der Verlust von Wnt5a als möglicher ungünstiger prognostischer Faktor beschrieben (Dejmek et al. 2005). Wnt5a wurde jedoch auch als hochreguliert in Brustkrebs und in Metastasen beschreiben (Lejeune et al. 1995). Für Wnt5a und Wnt5b ist neben der signifikanten Hochregulation in der Zelllinie MDA-MB 231 im Vergleich zur Zelllinie MCF-7 auch beschrieben, dass diese Wnt-Liganden in Hirnmetastasen von primären Mammakarzinomen signifikant höher exprimiert werden als in der Zelllinie MCF-7. Zudem kann die Invasivität der Zelllinie MCF-7 durch Hinzugabe von rekombinantem Wnt5a oder Wnt5b gesteigert werden. Die Invasivität der Zelllinie MDA-MB 231 wiederum kann durch den Wnt-Antagonisten Dkk-1 gesenkt werden. Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass c-jun in MDA-MB 231 höher exprimiert ist, als in MCF-7-Zellen. Dies konnte auch für zerebrale Metastasen von Mammakarzinomen gezeigt werden. Des Weiteren ist bekannt, dass eine Überexpression von c-jun in MCF-7 zu einer höheren Motilität und Invasivität dieser Zelllinie führt. Zusammen mit einer höheren Expression von Ror-1 und Ror-2 in MDA-MB 231 und zerebralen Metastasen könnte dies eine Beteiligung des nichtkanonischen Wnt-Signalweges

über eine Wnt5a induzierte Aktivierung von JNK und c-jun nahelegen. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass die Wnt5a und Wnt5b abhängige Invasivitätssteigerung der MCF-7-Zellen durch einen JNK-Inhibitor teilweise ausbleibt (Klemm et al. 2011, Pukrop et al. 2006, Smith 1999b). Insgesamt wird die funktionelle Rolle von Wnt5a im Brustkrebs weiterhin kontrovers diskutiert. So ist es bis heute unklar, unter welchen Umständen Wnt5a tumorsuppressiv oder tumorpermissiv wirken kann (Pukrop and Binder 2008). Die Regulation von Wnt5b in Brustkrebszelllinien wurde bereits beschrieben (Saitoh and Katoh 2002). Seine funktionelle Bedeutung muss aber durch weitere Experimente, zum Beispiel siRNA Versuche und funktionelle Untersuchungen weiter geklärt werden. Bisher gibt es wenig Hinweise auf die biologische Bedeutung von Wnt5b im Brustkrebs. Die hier gezeigten Ergebnisse erhärten jedoch die Bedeutung der nichtkanonischen Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt5b im Kontext der hochinvasiven Brustkrebsmodelle. Um die spezifische Bedeutung der höheren Expression von Wnt5a und Wnt5b in MDA-MB 231 relativ zu MCF-7 zu klären, müssen allerdings weitere Untersuchungen folgen.

4.2 Wnt-assoziierte Genregulation

VEGF-A und PLAU-R zeigten sich im qualitativen *Wnt-Microarray* und auch in der qPCR-Analyse als deutlich höher exprimiert in der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB 231 im Vergleich zu MCF-7. Diese Ergebnisse sind im Kontext der höheren Invasivität und Malignität der Zelllinie MDA-MB 231 zu erwarten gewesen und in Bezug auf andere Gene der Angiogenese bereits mehrfach vorbeschrieben (Lacroix and Leclercq 2004). Interessanter Weise ist die Korrelation zwischen hoher Wnt5a Expression und hoher VEGF-A Expression bereits im nichtkleinzelligen Lungenkarzinom beschrieben. Diese ging hier allerdings auch mit einer erhöhten Expression von β -Catenin einher, welche in dieser Arbeit nicht untersucht wurde (Huang et al. 2005). Für PLAU-R konnte gezeigt werden, dass es unter Hypoxiebedingungen eine epitheliale mesenchymale Transition in Brustkrebszellen auslösen kann. Die Aktivierung des PLAU-Rezeptor-Promotors aktiviert viele Signalwege und kann so auch zur Metastasierung beitragen (Lester et al. 2007). Zu diesen Signalwegen gehören unter anderen AP-1, so dass es hier eine Verbindung

zum nichtkanonischen Wnt-Signalweg geben könnte. Sowohl die Hochregulation von PLAU-R, als auch die VEGF-A sprechen neben den schon bekannten Unterschieden im Expressionsprofil von MDA-MB 231 für eine höhere Invasivität und Malignität dieser Zelllinie. Verschiedene Arbeiten zeigen einen Zusammenhang zwischen hoher PLAU-R und VEGF-A Expression und kanonischen Wnt-Signalwegen. Eine Korrelation zwischen Akkumulation von β -Catenin und hoher PLAU-R Expression wurde in primären Kolonkarzinomen und deren Lebermetastasen beschrieben (Mann et al. 1999). Für VEGF-A wiederum wurde eine TCF4 abhängige Hochregulation in Kolonkarzinomzellen gezeigt (Zhang et al. 2001). Ob es sich bei den in dieser Arbeit gezeigten Expressionsunterschieden um ein Wnt-vermitteltes Phänomen handelt, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. So könnte zunächst durch einen Vergleich der β -Catenin-Expression geklärt werden, ob kanonische Wnt-Signalwege unterschiedlich stark aktiviert sind. Durch verschiedene Wnt-Antagonisten könnte anschließend eine spezifische Analyse der involvierten Signalkaskaden erfolgen. Die relative Expression von c-jun, Fos-like Antigen und CD44 wurde hier im qualitativen Wnt-Microarray bestätigt. Hinweise auf die hohe Expression dieser Gene in hochmalignen Zellen sind zahlreich. So führt zum Beispiel die c-Jun Überexprimierung in MCF-7 Zellen zu einem invasiveren Phänotyp (Smith et al. 1999b). Die FOS/JUN-Signalkaskade kann über den PLAU-R-Promotor aktiviert werden (Lester et al. 2007). Ebenso kann AP-1 über den JNK- und den nichtkanonischen Wnt-Signalweg aktiviert werden (Pukrop et al. 2006). CD44 ist in vielen Karzinomen exprimiert und wird mit der Fähigkeit zur Metastasierung in Verbindung gebracht. So unter anderem auch in der MDA-MB 231 Subpopulationen mit CD44+/CD24-Phänotyp (Sheridan et al. 2006). Bei Patientinnen mit erhöhtem Serumspiegel an löslichen CD44 korreliert dieser mit einem erhöhten Risiko für Lymphknotenmetastasen (Mayer et al. 2008). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die relativ hohe Expression von c-jun, Fos-like Antigen und CD44 bereits bekannt waren. Weitgehend unbekannt ist, wie hoch der Stellenwert der verschiedenen hochregulierten Signalwege im Verhältnis zu den nichtkanonischen Wnt-Signalwegen und anderen Signalwegen ist. Funktionelle Analysen durch knockout-Modelle oder auch siRNA Modelle könnten diese Fragen beantworten.

4.3 MCF-7 als östrogenabhängige Mammakarzinomzelllinie

Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 gilt als eine typische Luminal-A-Zelllinie, welche nur schwach invasiv ist (Lacroix and Leclercq 2004, Zajchowski et al. 2001). Die in dieser Arbeit beschriebene relativ hohe Expression von E-Cadherin zeigt, dass die MCF-7-Zelllinie ihren epithelialen Ursprung behalten hat. Wie in 4.1. bis 4.2. beschrieben, zeigt MCF-7 eine nur sehr geringe Expression von Wnt5a, Wnt5b, VEGF-A und PLAU-R in Relation zur Mammakarzinomzelllinie MDA-MB 231. Ebenso sind CD44, c-jun und Fos-like Antigen niedriger exprimiert. Die relativ niedrige Expression von Wnt5a und anderer nichtkanonischer Liganden wurde gemäß der Hypothese der Invasivitätssteigerung durch nichtkanonische Wnt-Liganden erwartet. Die Literatur gibt hierzu unterschiedliche Angaben (Pukrop et al. 2006). Da die Invasivität von MCF-7 durch rekombinantes Wnt5a und durch rekombinantes Wnt5b gesteigert werden kann (Klemm et al. 2011), ist die relative Höhe der Expression dieser Gene von Interesse. Da die Untersuchungen durchgeführt worden, um MCF-7 als weniger invasive Zelllinie im Wnt-Kontext zu verifizieren, kann diese Hypothese erhärtet werden. Unter Kenntnis der sehr niedrigen Expression von Wnt5a in der Zelllinie MCF-7, lässt sich auch die Bedeutung der Wnt5a Expression in TAM besser einordnen. MCF-7 zeigte sich in dieser Arbeit als geeignete Zelllinie, um weitere Expressionsanalysen in Makrophagen nach Kokultur mit dieser Zelllinie durchzuführen, da sie nur auf sehr niedrigem Niveau Gene der nichtkanonischen Wnt-Liganden und proangiogenetische Gene wie VEGF-A und PLAU-R exprimiert.

4.4 Vergleich zweier Methoden zur Isolation von Monozyten

Für die Durchführung von Versuchen mit humanen Makrophagen war es notwendig, eine zuverlässige Methode zu etablieren, mit der man große Mengen möglichst reiner Monozyten aus humanem peripheren Blut gewinnen und anschließend möglichst verlustfrei zu Makrophagen differenzieren kann. Zusätzlich sollte die Methode ohne besondere technische Ausstattung durchführbar sein. Der Goldstandard für die Isolation von humanen Monozyten aus peripherem Blut ist die *Counterflow Elutriation* (Contreras et al. 1980). Diese liefert zu über 95% reine

Monozyten, ist jedoch sehr zeitaufwendig und nur mit entsprechender Laborausstattung durchzuführen. Die Methode ist mehrfach vorbeschrieben und wurde im Rahmen dieser Arbeit am Leibnizforschungszentrum Borstel, AG Molekulare Infektiologie durchgeführt (Blumenthal et al. 2006, Contreras et al. 1980, Reiling et al. 2001). Die Effizienz der Isolation betrug durchschnittlich 100×10^6 Monozyten aus 250 ml Vollblut. Verglichen wurde diese Methode mit der Isolation mittels Doppeldichtegradientenzentrifugation (Seager Dancinger et al. 2004), welche im Rahmen dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe Pukrop/Binder etabliert wurde. Hierbei dienten *Buffy-Coats*, welche von der Abteilung für Transfusionsmedizin zur Verfügung gestellt worden, als Ausgangsmaterial. Die Methode ist mehrfach vorbeschrieben und erzielte in unseren Experimenten eine ähnliche Effizienz, wie in der Literatur beschrieben (Seager Dancinger et al. 2004). Die Methode kann mit einfacher Laborausstattung und ohne spezielle Vorkenntnisse angewandt werden und zeigte sich als gut geeignet um hohe Mengen an Monozyten aus Vollblut, beziehungsweise *Buffy-Coats* zu isolieren.

4.4.1 Differenzierung zu Makrophagen

Die isolierten Monozyten wurden gemäß der in Borstel angewandten Methode zur Monozytendifferenzierung zu Makrophagen differenziert (Blumenthal et al 2006). Diese grundsätzlich schon seit den achtziger Jahren etablierte Technik liefert im Gegensatz zur Differenzierung per Adhärenz auf Kunststoffoberflächen größere Mengen an Makrophagen (van der Meer 1982). Die Zugabe von rekombinantem m-CSF führt zu einer gerichteten Differenzierung, ist allerdings im Sinne des späteren Phänotyps kritisch zu sehen. So ist von vielen Tumorzellen bekannt, dass diese m-CSF sezernieren und so einen M2 Phänotyp von TAM induzieren könnten (Beck et al. 2009). Die Effizienz der Differenzierung zeigte sich in dieser Arbeit mit 81,66% Makrophagen aus Monozyten nach *Counterflow Elutriation* und nur 47% Makrophagen aus Monozyten nach Doppeldichtegradientenzentrifugation. Unterschiede in der Reinheit der Monozyten und der Ausbeute an Monozyten in sind in der Literatur vorbeschrieben (Seager Dancinger et al. 2004). Ob diese Unterschiede in der Differenzierungseffizienz eine Auswirkung auf funktionelle Eigenschaften von Makrophagen in verschiedenen Experimenten haben können, ist nicht bekannt, kann jedoch vermutet werden. Dabei ist nicht klar, warum sich die

Effizienz der beiden Methoden unterscheidet. Eine mögliche Ursache ist, dass durch die Doppeldichtegradientenzentrifugation eine größere Verunreinigung durch nicht monozytäre Zellen entsteht und die zuvor gezählte Monozytenzahl somit überschätzt wurde. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die monozytären Zellen nach Doppeldichtegradientenzentrifugation eine stärkere Adhärenz an die Teflonoberfläche ausbilden, was zu einer geringeren Ausbeute durch mangelndes Lösen der Zellen führen könnte. Letztlich könnte auf Basis von Genexpressions- und Funktionsanalysen geklärt werden, ob die Isolationsmethode eine signifikante Auswirkung auf die Adhärenz der Monozyten an Teflonoberflächen hat. Möglicherweise könnten die unterschiedlich isolierten Zellen auch in biologischen System unterschiedlich reagieren. So könnten bestimmte Gene oder ganze Gensets unterschiedlich reguliert sein und so die Aussagekraft und Vergleichbarkeit späterer Experimente minimieren.

4.4.2 Qualität der differenzierten Makrophagen

Da die Kombination aus Doppeldichtegradientenzentrifugation und Differenzierung in Teflonbeuteln eine neue technische Kombination zur Produktion von Makrophagen darstellt, wurde die entstandenen Zellen qualitativ überprüft und mit den Makrophagen nach *Counterflow Elutriation* und Teflonbeutelndifferenzierung verglichen. Es zeigten sich deutlich Esterase-positive Zellen, die größtenteils CD14 und CD206 positiv waren. Es zeigten sich mehr CD14 und CD206 positive Zellen verglichen mit den Makrophagen nach *Counterflow Elutriation* und Differenzierung im Teflonbeutel. Dies zeigt, dass im Sinne der gewählten Qualitätskriterien eine höhere Makrophagenreinheit als durch die Referenzmethode erzielt werden konnte. Insgesamt ist jedoch festzuhalten, dass die Ausbeute schlechter, die Qualität vergleichbar gut und der Aufwand für die hier beschriebene Methode deutlich geringer, als bei der Vergleichsmethode ist. Um letzte Unsicherheiten der Qualität und des Phänotyps der Makrophagen auszuräumen, wurden die Zellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf Zellkulturinserts mit 1% FCS RPMI 1640 ausgesät und vor Versuchsbeginn mit PBS gewaschen, somit wurde die mögliche Wirkung des M-CSF minimiert und alle nicht adhärennten Zellen entfernt.

4.5 Wnt5a- und Wnt5b-Expression in humanen Makrophagen

Die Expression von Wnt5a in humanen Makrophagen ist *in vitro* und *in vivo* vorbeschrieben (Pukrop et al. 2006, Smith et al. 1999a). Diese Ergebnisse konnten auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Wnt5a steigert unter Kokulturbedingungen mit MCF-7 die Invasivität dieser Zelllinie, wobei eine Regulation der Wnt5a Expression vermutet wurde. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von rh Dkk-1 zur Kokultur antagonisiert werden. Ob diese Abnahme der Invasivität auch mit einer Abnahme, oder fehlender Induktion der Wnt5a Expression zusammenhängt, war bisher unklar. Diese Arbeit konnte zum einen zeigen, dass die Wnt5a Expression in Makrophagen unter Kokulturbedingungen signifikant hochreguliert ist und zum anderen, dass diese Regulation durch die Zugabe des Wnt-Antagonisten rh Dkk-1 ausbleibt. Die relativ hohe Expression von Wnt5a in Makrophagen ist in verschiedenen Zusammenhängen beobachtet worden, so in Makrophagen der lamina propria in kolorektalen Karzinomen, in Makrophagen von Lymphknotenmetastasen bei Mammakarzinomen und auch in inflammatorischen Prozessen, an denen Makrophagen beteiligt sind (Blumenthal et al. 2006, Pukrop et al. 2006, Smith et al. 1999a). Die Funktion von Dkk-1 als Antagonist des kanonischen Wnt-Signalweges ist mehrfach beschrieben worden (Gonzalez-Sancho et al. 2005, Lee AY et al. 2004). Wie Dkk-1 letztlich die Induktion von Wnt5a verhindert, ist unklar, es könnte sich zum Beispiel um eine Antagonisierung eines autokrinen-loop Systems handeln. In Lungenkarzinomzelllinien konnte durch knock-down von Dkk-1 eine erhöhte Expression von Wnt5a erreicht werden (Hussain et al. 2009). Es ist anzunehmen, dass rh Dkk-1 über einen unbekanntem Mechanismus die Induktion der Wnt5a Expression in humanen Makrophagen unter *in-vitro*-Kokulturbedingungen mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verhindert. Die mit rh Dkk-1 behandelten Makrophagen zeigen eine Wnt5a Expression, die sich nicht signifikant von der Expression in unbehandelten Makrophagen unterscheidet. Dkk-1 könnte somit direkt den Signalaustausch zwischen Makrophagen und Stromazellen blockieren, oder die Induktion von Wnt5a bei unverändertem Signalaustausch zwischen den Zellen verhindern. Die Wnt5b Expression in humanen Makrophagen ist weder *in vivo* noch *in vitro* vorbeschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Wnt5b auf einem sehr niedrigen Niveau in humanen Makrophagen *in vitro* exprimiert wird. Es

konnte keine Regulation unter Kokulturbedingungen mit der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 beobachtet werden. Ob die basale Expression von Wnt5b eine biologische Rolle in Makrophagen spielt, bleibt unklar. Im Gegensatz zu Wnt5a ist die Rolle von Wnt5b in Karzinomen wenig untersucht. In B-CLL Zellen ist Wnt5b einer von verschiedenen Wnt-Liganden, die im Vergleich zu normalen B-Zellen hochreguliert sind (Lu et al. 2004). Insgesamt werden weitere Untersuchungen notwendig sein, um eine mögliche Bedeutung von Wnt5b in Karzinomen und Stromazellen zu klären. Die hier gezeigten Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass Makrophagen diesen Wnt-Liganden exprimieren, wobei unklar bleibt, ob eine Regulation von Wnt5b vorliegen könnte. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Wnt5b in den invasionsfördernden TAM zusammen mit Wnt7b signifikant hochreguliert ist, eventuell erhärtet dies die Hypothese, dass verschiedene Wnt-Liganden in der Maus und im Menschen ähnliche biologische Rollen spielen (Ojalvo et al. 2010).

4.6 VEGF-A-Expression in humanen Makrophagen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Makrophagen VEGF-A nach 24 Stunden Kokultivierung mit MCF-7-Zellen signifikant höher exprimieren als ohne Kokultur mit MCF-7-Zellen. Die proangiogenetische Rolle von Makrophagen ist in anderen Untersuchungen schon mehrfach beschrieben worden (Pollard 2004, Pollard 2008). So konnte im Brustkrebsmausmodell gezeigt werden, dass die Produktion von VEGF-A durch TAM eine entscheidende Rolle für die weitere Invasion des Tumors hat (Lin et al. 2007). Andere Arbeitsgruppen identifizierten TAM als mögliche Zielzellen für eine anti-VEGF Therapie (Gerber et al.). Der Zusammenhang mit den Wnt-Signalwegen ist bisher noch weitgehend ungeklärt. Jedoch gibt es Hinweise auf eine proangiogenetische Rolle von Wnt7b in Zusammenhang mit Endothelzellen im sich entwickelnden Auge der Maus (Lobov et al. 2005). Auf diesen Mechanismus wird auch von einer anderen Arbeitsgruppen verwiesen, welche die Expression von Wnt7b in den invasionsfördernden TAM in einem Mausbrustkrebsmodell als hochreguliert beschrieben (Ojalvo et al. 2010). Dies lässt die Überlegung zu, dass TAM nicht nur VEGF-A produzieren, sondern ihre proangiogenetische Funktion zusätzlich durch die höhere Expression von Wnt-Liganden verstärken. Wie schon in 4.2 beschrieben zeigen Untersuchungen des

nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms eine Korrelation zwischen hoher Wnt5a und VEGF-A Expression (Huang et al. 2005). Somit zeigt sich, dass die Produktion von VEGF-A in Makrophagen relativ gut charakterisiert ist. In dieser Arbeit konnte jedoch zudem gezeigt werden, dass es zu keiner signifikanten Hochregulation der Expression von VEGF-A in humanen Makrophagen nach Kokultur mit MCF-7 kommt, wenn diese mit rh Dkk-1 behandelt wurde. Das Ausbleiben der VEGF-A mRNA-Induktion durch rh Dkk-1 stellt somit einen weiteren Anhaltspunkt für die Verknüpfung der VEGF-A Expression mit den Wnt-Signalwegen dar. Da Dkk-1 sowohl kanonische als auch das nicht kanonische Wnt-Signale inhibieren kann, könnte eine mögliche Erklärung in einem autokrinen Aktivierungsmechanismus liegen, welcher durch rh Dkk-1 geblockt werden kann. Letztlich müssen diese Ergebnisse in weiteren Untersuchungen bestätigt und geklärt werden, wie Dkk-1 die Expressionssteigerung von VEGF-A verhindern kann

4.7 TNF- α -Expression in humanen Makrophagen

TNF- α ist von zentraler Bedeutung in inflammatorischen Prozessen und Tumoren. Seine multiplen Funktionen sind seit langer Zeit Gegenstand der medizinischen Forschung (Balkwill 2009). Auch die Rolle von TNF- α in TAM wurde in vielen Zusammenhängen untersucht. So konnte gezeigt werden, dass die Invasivitätssteigerung von verschiedenen Brustkrebszelllinien nach Kokultur mit Makrophagen von einer TNF- α induzierten Produktion von verschiedenen MMP in Makrophagen abhängig ist (Hagemann et 2004). Andere Arbeitsgruppen beschrieben eine über die Aktivierung von toll like receptor-2/toll like receptor-6 (TLR2/TLR6) getriggerte TNF- α Produktion durch Zellen, welche die Metastasierung von Lewis- Lungenkarzinomzellen in Mäusen beschleunigte. Die Aktivierung des TLR2/TLR6 Rezeptorkomplexes wurde hier durch das Matrxiproteoglykan Versican induziert (Kim et al. 2009). In diesem Zusammenhang spielt wahrscheinlich auch die oben beschriebene Produktion verschiedener MMP eine bedeutende Rolle. Die Rolle von TNF- α als Aktivator der Wnt-Expression wird kontrovers diskutiert. In Magenkarzinomzelllinien ist TNF- α als Induktor der Wnt5a Expression beschrieben (Saitoh and Katoh 2002), während in inflammatorischen Prozessen die Wnt5a Induktion unabhängig von TNF- α ist. Die Wnt5a Expression in inflammatorischen

Prozessen allerdings konnte durch TLR2 Antikörper reduziert werden (Blumenthal et al. 2006). In dieser Arbeit konnte nach 24 Stunden Kokultur von humanen Makrophagen eine höhere Wnt5a mRNA Produktion in Makrophagen beobachtet werden. Im weiteren Verlauf bleibt zu untersuchen, ob die Wnt5a Expression von Makrophagen im Karzinomkontext TNF- α abhängig oder unabhängig ist. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Hochregulation der TNF- α Expression unter Kokulturbedingungen mit rh Dkk-1 gesenkt werden konnte. Letztlich ist diese Beobachtung momentan nicht zu erklären. Sie legt aber eine enge Interaktion von Wnt-Signalwegen und TNF- α Expression nahe, deren Funktionsweise in weiteren Untersuchungen geklärt werden muss.

5.0 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB 231 und MCF-7 zwei nichtkanonische Wnt-Liganden und zwei wahrscheinlich Wnt- assoziierte Gene (VEGF-A und PLAU-R) differenziell exprimieren. Die differenzielle Expression von Wnt5a und Wnt5b war bisher nicht bekannt und ermöglicht nun die unterschiedliche Invasivität dieser Zelllinien unter einem neuen Gesichtspunkt weiter zu charakterisieren. Außerdem legen die Ergebnisse nahe, dass neben Wnt5a auch Wnt5b eine Rolle für die in-vitro-Modelle des Mammakarzinoms haben kann. Weitere Untersuchungen sollten die funktionelle Bedeutung des nichtkanonischen Signalwegs in beiden Zelllinien klären. Für MCF-7 wurde durch diese Arbeit erneut belegt, dass es die Wnt-Liganden Wnt5a und Wnt5b nur basal exprimiert. Diese Feststellung galt innerhalb der Fragestellung als notwendig, um MCF-7 als schwach invasive und nur gering nichtkanonische Wnt-Liganden exprimierende Zelllinie für weitere Versuche in Kokultur mit humanen Makrophagen zu nutzen. Um ausreichende Mengen an Makrophagen für Kokulturversuche mit MCF-7 zur Verfügung zu haben, wurde in dieser Arbeit eine neue Kombination aus bekannten Monozytenisoliationsverfahren und Differenzierungsverfahren etabliert. Es zeigte sich, dass die Isolation von Monozyten und die anschließende Differenzierung zu Makrophagen mittels Doppeldichtegradientenzentrifugation und Differenzierung in Teflonbeuteln im Vergleich zum Goldstandard mittels *Counterflow Elutriation* hochqualitativ erbracht werden kann. Die Effizienz der Methode ist noch nicht optimal, produziert aber ausreichend Makrophagen für große Versuchsdurchläufe. Die Etablierung dieses Verfahrens macht es ohne Counterflow Elutriator möglich, Versuche mit großen Mengen an humanen Makrophagen durchzuführen. Die anschließend durchgeführten Kokulturversuche betätigten zum einen schon vermutete, oder bekannte Ergebnisse. So zeigte sich eine signifikante Hochregulation des Wnt-Liganden Wnt5a, jedoch keine signifikante Regulation des Wnt-Liganden Wnt5b. Des Weiteren zeigte sich eine signifikante Regulation von VEGF-A und eine Regulation von TNF- α . Die Regulation dieser Gene zeigt zum einen schon bekannte

Mechanismen, kann im Rahmen dieser Arbeit aber auch als interne biologische Kontrolle der Kokulturversuche angesehen werden. Die Antagonisierbarkeit einer signifikanten Genregulation von Wnt5a, VEGF-A und TNF- α durch rh Dkk-1 war nicht vorbeschrieben. Dieser Effekt ist allerdings hochinteressant und ermöglicht es, neue Hypothesen über die Funktion des nicht kanonischen Wnt-Signalweges selber, als auch über seine Interaktion mit anderen Signalwegen, aufzustellen. Durch diese Arbeit konnte ein Grundstein für weitere Untersuchungen des Wnt-Antagonisten Dkk-1 gelegt werden.

6.0 Literaturverzeichnis

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2010, American Cancer Society, Atlanta , 2010, 17-18.

Bafico A,Liu G,Yaniv A,Gazit A,Aaronson SA (2001): Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol* 3, 683-686.

Balkwill F (2009): Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 361-371.

Balkwill F, Mantovani A (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.

Balkwill F,Charles KA,Mantovani A (2005): Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211-217.

Beck AH,Espinosa I,Edris B,Li R,Montgomery K,Zhu S,Varma S,Marinelli RJ,van de Rijn M,West RB (2009): The macrophage colony-stimulating factor 1 response signature in breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 15, 778-787.

Behrens J,von Kries JP,Kuhl M,Bruhn L,Wedlich D,Grosschedl R,Birchmeier W (1996): Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.

Benhaj K,Akcali KC,Ozturk M (2006): Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines. *Oncol Rep* 15, 701-707.

Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R (1996): A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225-230.

Blumenthal A, Ehlers S, Lauber J, Buer J, Lange C, Goldmann T, Heine H, Brandt E, Reiling N (2006): The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* 108, 965-973.

Boyum A (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 77 -89.

Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA, Knuechel R, Kirchner T (2001): Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10356-10361.

Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T (2005): Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 744-749.

Brooks SC, Locke ER, Soule HD (1973): Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* 248, 6251-6253.

Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. (1974): Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53, 661-674.

Candidus S, Bischoff P, Becker KF, Hofler H (1996): No evidence for mutations in the alpha- and beta-catenin genes in human gastric and breast carcinomas. *Cancer Res* 56, 49 - 52.

Catovsky D, de Salvo Cardullo L, O'Brien M, Morilla R, Costello C, Galton D, Ganeshaguru K, Hoffbrand V (1981): Cytochemical markers of differentiation in acute leukemia. *Cancer Res* 41:4824-32.

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.

Contreras TJ, Jemionek JF, Stevenson HC, Hartwig VM, Fauci AS (1980): An improved technique for the negative selection of large numbers of human lymphocytes and monocytes by counterflow centrifugation--elutriation. *Cell Immunol* 54, 215-229.

Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2011) Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 378, 771-84.

De Koninck P, Schulman H (1998): Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 279, 227-230.

Dejmek J, Leandersson K, Manjer J, Bjartell A, Emdin SO, Vogel WF, Landberg G, Andersson T (2005): Expression and signaling activity of Wnt-5a/discoidin domain receptor-1 and Syk plays distinct but decisive roles in breast cancer patient survival. *Clin Cancer Res* 11, 520-528.

Dittrich W, Göhde W (1969): Impulse fluorometry of single cells in suspension. *Z Naturforsch B.* 24, 360-1.

Drasin DJ, Robin TP, Ford HL (2011): Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Res* 13, 226.

Engel LW, Young NA (1978): Human breast carcinoma cells in continuous culture: a review. *Cancer Res* 38, 4327-4339.

Fernandez-Cobo M, Zammarchi F, Mandeli J, Holland JF, Pogo BG (2007): Expression of Wnt5A and Wnt10B in non-immortalized breast cancer cells. *Oncol Rep* 17, 903-907.

Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G (1990): Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 65, 2121 - 2128.

Gerber HP, Olazoglu E, Grewal IS (2010): Targeting inflammatory cells to improve anti-VEGF therapies in oncology. *Recent Results Cancer Res* 180, 185-200.

Giraud E, Inoue M, Hanahan D (2004): An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* 114, 623-633.

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.

Gonzalez-Sancho JM, Aguilera O, Garcia JM, Pendas-Franco N, Pena C, Cal S, Garcia de Herreros A, Bonilla F, Munoz A (2005): The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24, 1098-1103.

Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, Cammer M, Cox D, Pixley FJ, Stanley ER, Segall JE, Condeelis JS (2005): Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Res* 65, 5278-5283.

Gupta GP, Massague J (2006): Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.

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.

Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster DA, Charles K, Klemm F, Pukrop T, Binder C, Balkwill FR (2005): Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J Immunol* 175, 1197-1205.

Hall CL, Daignault SD, Shah RB, Pienta KJ, Keller ET (2008): Dickkopf-1 expression increases early in prostate cancer development and decreases during progression from primary tumor to metastasis. *Prostate* 68, 1396-1404.

Hildenbrand R, Schaaf A (2009): The urokinase-system in tumor tissue stroma of the breast and breast cancer cell invasion. *Int J Oncol* 34, 15-23.

Huang CL, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, Ueno M (2005): Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor--an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23, 8765-8773.

Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C, Reed J, Krajewska M, Treilleux I, Rupin M, Magherini E, Mackey J, Martin M, Vogel C (2009): Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol* 27, 1168-76.

Hussain M, Rao M, Humphries AE, Hong JA, Liu F, Yang M, Caragacianu D, Schrupp DS (2009): Tobacco smoke induces polycomb-mediated repression of Dickkopf-1 in lung cancer cells. *Cancer Res* 69, 3570-3578.

Ishii T,Wallace AM,Zhang X,Gosselink J,Abboud RT,English JC,Pare PD,Sandford AJ (2006): Stability of housekeeping genes in alveolar macrophages from COPD patients. *Eur Respir J* 27, 300-306.

Jonsson M, Dejmek J, Bendahl PO, Andersson T (2002): Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 62, 409 -416.

Karayiannakis AJ, Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A, Davaris PS, Pignatelli M (2001): Expression patterns of beta-catenin in in situ and invasive breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 27, 31 - 36.

Kim S,Takahashi H,Lin WW,Descargues P,Grivennikov S,Kim Y,Luo JL,Karin M (2009): Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457, 102-106.

Klemm F,Bleckmann A,Siam L,Chuang HN,Rietkotter E,Behme D,Schulz M,Schaffrinski M,Schindler S,Trumper L,Kramer F,Beissbarth T,Stadelmann C,Binder C,Pukrop T (2011): beta-catenin-independent WNT signaling in basal-like breast cancer and brain metastasis. *Carcinogenesis* 32, 434-442.

Lacroix M, Leclercq G (2004): Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 83, 249-289.

Lee AY,He B,You L,Xu Z,Mazieres J,Reguart N,Mikami I,Batra S,Jablons DM (2004): Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 1246-1250.

Lee FS,Lane TF,Kuo A,Shackleford GM,Leder P (1995): Insertional mutagenesis identifies a member of the Wnt gene family as a candidate oncogene in the mammary epithelium of int-2/Fgf-3 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2268-2272.

Lee J,Yoon YS,Chung JH (2008): Epigenetic silencing of the WNT antagonist DICKKOPF-1 in cervical cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 109, 270-274.

Lee JS,Ishimoto A,Yanagawa S (1999): Characterization of mouse dishevelled (Dvl) proteins in Wnt/Wingless signaling pathway. *J Biol Chem* 274, 21464-21470.

Leek RD,Landers RJ,Harris AL,Lewis CE (1999): Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 79, 991-995.

Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, , Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 14057 Berlin, 2012 , 167-169.

Lejeune S,Huguet EL,Hamby A,Poulsom R,Harris AL (1995): Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* 1, 215-222.

Lester RD,Jo M,Montel V,Takimoto S,Gonias SL (2007): uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J Cell Biol* 178, 425-436.

Lewis C, Murdoch C (2005): Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 167, 627-635.

Lin EY,Nguyen AV,Russell RG,Pollard JW (2001): Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193, 727-740.

Lin EY, Li JF, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, Qian H, Xue XN, Pollard JW (2006): Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res* 66, 11238-11246

Lin EY, Li JF, Bricard G, Wang W, Deng Y, Sellers R, Porcelli SA, Pollard JW (2007): Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages. *Mol Oncol* 1, 288-302.

Lobov IB, Rao S, Carroll TJ, Vallance JE, Ito M, Ondr JK, Kurup S, Glass DA, Patel MS, Shu W, Morrissey EE, McMahon AP, Karsenty G, Lang RA (2005): WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature* 437, 417-421.

Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, Kipps TJ, Corr M, Carson DA (2004): Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3118-3123.

Mancini M, Toker A (2009): NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 9, 810-820.

Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ, Hanski C (1999): Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1603-1608.

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 Immunol* 23, 549-555.

Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C (2001): LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 411, 321-325.

Mayer S,zur Hausen A,Watermann DO,Stamm S,Jager M,Gitsch G,Stickeler E (2008): Increased soluble CD44 concentrations are associated with larger tumor size and lymph node metastasis in breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 134, 1229-1235.

McInroy L, Maatta A (2007): Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 360, 109-114.

Mitsubishi M,Liu J,Cao S,Shi X,Ma X (2004): Regulation of interleukin-12 gene expression and its anti-tumor activities by prostaglandin E2 derived from mammary carcinomas. *J Leukoc Biol* 76, 322-332.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998): Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24,954-8, 960, 962.

Niehrs C (1999): Head in the WNT: the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends Genet* 15, 314-319.

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.

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.

Patsialou A,Wyckoff J,Wang Y,Goswami S,Stanley ER,Condeelis JS (2009): Invasion of human breast cancer cells in vivo requires both paracrine and autocrine loops involving the colony-stimulating factor-1 receptor. *Cancer Res* 69, 9498-9506.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747-52.

Politou MC, Heath DJ, Rahemtulla A, Szydlo R, Anagnostopoulos A, Dimopoulos MA, Croucher PI, Terpos E (2006): Serum concentrations of Dickkopf-1 protein are increased in patients with multiple myeloma and reduced after autologous stem cell transplantation. *Int J Cancer* 119, 1728-1731.

Pollard JW (2004): Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 4, 71-78.

Pollard JW (2008): Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol* 84, 623-630.

Pukrop T, Binder C (2008): The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. *J Mol Med* 86, 259-266.

Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trumper L, Binder C (2006): Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5454-5459.

Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, Ye LH, Zhang XD (2008): Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett* 269, 67-77.

Reiling N, Blumenthal A, Flad H-D, Ernst M, Ehlers S (2001): Mycobacteria-induced TNF-alpha and IL-10 formation by human macrophages is differentially regulated at the level of mitogen-activated protein kinase activity. *J Immunol.* 167, 3339-3345.

Robert-Koch-Institut Krebs in Deutschland 2007/2008 Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, RKI, Berlin, 2012 ,64-67.

Roelink H,Wagenaar E,Lopes da Silva S,Nusse R (1990): Wnt-3, a gene activated by proviral insertion in mouse mammary tumors, is homologous to int-1/Wnt-1 and is normally expressed in mouse embryos and adult brain. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 4519-4523.

Roose J,Huls G,van Beest M,Moerer P,van der Horn K,Goldschmeding R,Logtenberg T,Clevers H (1999): Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. Science 285, 1923-1926.

Rubinfeld B,Albert I,Porfiri E,Fiol C,Munemitsu S,Polakis P (1996): Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. Science 272, 1023-1026.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 20, 230(4732):1350-4.

Saitoh T, Katoh M (2002): Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer: up-regulation of WNT5A by TNFalpha in MKN45 cells and up-regulation of WNT5B by beta-estradiol in MCF-7 cells. Int J Mol Med 10, 345-349.

Saneyoshi T,Kume S,Amasaki Y,Mikoshiha K (2002): The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos. Nature 417, 295-299.

SantaLucia J, Jr. (1998): A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 1460-1465.

Schambony A, Wedlich D (2007): Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. Dev Cell 12, 779-792.

Scheel C, Eaton EN, Li SH, Chaffer CL, Reinhardt F, Kah KJ, Bell G, Guo W, Rubin J, Richardson AL, Weinberg RA (2011): Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 145, 926-940.

Seager Danciger J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J (2004): Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods* 288, 123-134.

Semenov MV, Habas R, Macdonald BT, He X (2007): SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell* 131, 1378.

Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R, Jr., Badve S, Nakshatri H (2006): CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 8, R59.

Shimoyama Y, Hirohashi S, Hirano S, Noguchi M, Shimosato Y, Takeichi M, Abe O (1989): Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res* 49, 2128-2133.

Slusarski DC, Pelegri F (2007): Calcium signaling in vertebrate embryonic patterning and morphogenesis. *Dev Biol* 307, 1-13.

Slusarski DC, Corces VG, Moon RT (1997): Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410-413.

Smith K,Bui TD,Poulsom R,Kaklamanis L,Williams G,Harris AL (1999): Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. Br J Cancer 81, 496-502.

Smith LM,Wise SC,Hendricks DT,Sabichi AL,Bos T,Reddy P,Brown PH,Birrer MJ (1999): cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. Oncogene 18, 6063-6070.

Sorlie T, Bukholm I, Borresen-Dale AL (1998): Truncating somatic mutation in exon 15 of the APC gene is a rare event in human breast carcinomas. Mutations in brief no. 179. Online. Hum Mutat 12, 215.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL (2001): Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.Proc Natl Acad Sci U S A 11,10869-74.

Soule HD,Vazquez J,Long A,Albert S,Brennan M (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 51, 1409-1416.

Tang Y,Kesavan P,Nakada MT,Yan L (2004): Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of *extracellular matrix* metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. Mol Cancer Res 2, 73-80.

Thompson EW,Paik S,Brunner N,Sommers CL,Zugmaier G,Clarke R,Shima TB,Torri J,Donahue S,Lippman ME,et al. (1992): Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. J Cell Physiol 150, 534-544.

Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, Nielsen TO, Foulkes WD (2007): Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 7, 134.

Tse JC, Kalluri R (2007): Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem* 101, 816-829.

Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S (2005): Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep* 14, 425-431.

Van der Meer JW, van de Gevel JS, Blusse van Oud Alblas A, Kramps JA, van Zwet TL, Leijh PC, van Furth R (1982): Characteristics of human monocytes cultured in the Teflon culture bag. *Immunology* 47, 617-625.

Voorzanger-Rousselot N, Goehrig D, Journe F, Doriath V, Body JJ, Clezardin P, Garnero P (2007): Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases. *Br J Cancer* 97, 964-970.

Voronov E, Shouval DS, Krelin Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN (2003): IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2645-50.

Wang H, Lee Y, Malbon CC (2004): PDE6 is an effector for the Wnt/Ca²⁺/cGMP-signalling pathway in development. *Biochem Soc Trans* 32, 792-796.

Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP (1994): Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 14, 6278-6286.

Wyckoff J, Wang W, Lin EY, Wang Y, Pixley F, Stanley ER, Graf T, Pollard JW, Segall J, Condeelis J (2004): A paracrine loop between tumor cells and

macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64, 7022-7029.

Yin W, Jiang Y, Shen Z, Shao Z, Lu J (2011): Trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients: a meta-analysis of published randomized controlled trials. *PLoS One* 6, e21030.

Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, Beauheim C, Harvey S, Ethier SP, Johnson PH (2001): Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Res* 61, 5168-5178.

Zhang X, Gaspard JP, Chung DC (2001): Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 61, 6050-6054.

Danksagung

... an Frau Prof. Dr. med. Claudia Binder und PD Dr. med. Tobias Pukrop für die Überlassung dieses Themas und die hervorragende Unterstützung und Motivation;

... an PD Dr. med. Tobias Pukrop für die Begeisterung, mit der er und seine Mitarbeiter Forschung betreiben;

... an Dr. med. Florian Klemm für die großartige praktische Hilfe im Labor und viele sehr hilfreiche Diskussionen;

... an Matthias Schulz und Meike Schaffrinski, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben;

... an PD Dr. Reiling für die Zeit am Forschungszentrum Borstel;

... an meine Mitdoktoranden Eva, Eugenia, Kerstin und Christina;

... an Jens Kaiser für viele Diskussionen

... an alle, die mir geholfen haben, diese Arbeit zu einem erfolgreichen Ende zu bringen.

Lebenslauf

Ich, Daniel Behme, wurde am 29.07.1982 in Peine als Sohn von Eleonora Behme, geborene Schöpke und Ralf Behme geboren. Nach dem Besuch der Grundschule und anschließend des Gymnasiums am Silberkamp in Peine endete meine Schulzeit im Juni 2002 mit dem Abitur. Von Juni 2002 bis März 2003 absolvierte ich meinen Zivildienst in der Jugendherberge in Heidelberg. Anschließend begann ich im Wintersemester 2003/2004 das Studium der Internationalen Wirtschaft an der Georg-August-Universität Göttingen. Im folgenden Sommersemester wechselte ich das Studienfach und begann das Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen. Im April 2006 absolvierte ich das Physikum, im Dezember 2010 das Staatsexamen in Medizin. Seit Februar 2011 war ich zunächst als Assistenzarzt an der neurologischen Universitätsklinik in Göttingen tätig, seit Juni 2012 war ich an der LWL-Klinik Lengerich als Assistenzarzt tätig. Im Januar 2013 wechselte ich in die Abteilung für Radiologie und Neuroradiologie des Klinikums Vest, Recklinghausen.

Daniel Behme, Münster Mai 2013