

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

Mikroglia fördert die Invasivität von Karzinomzellen

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
Anne Kathrin Abenstein
aus
Cuxhaven

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. C. Binder

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. Schritte der Metastasierung	1
1.2. Die Rolle der Makrophagen in Primärtumoren	3
1.3. Die Familie der Wnt-Gene	4
1.4. Der Kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg	5
1.5. Die Nicht-Kanonischen Wnt-Signalwege	6
1.6. Inhibitoren der Wnt-Signalkaskade	8
1.7. Effekte von Wnt 5a auf die Tumorprogression	8
1.8. Mikroglia – die ortsständigen Makrophagen des ZNS	10
1.9. Mikroglia in Hirnmetastasen	11
1.10. Zielsetzung der Arbeit	12
2. Material	14
2.1. Verwendete Zelllinien und Gewebe	14
2.2. Verwendete Substanzen und Chemikalien	14
2.3. Verbrauchsmaterialien	15
2.4. Rekombinante Proteine, Enzyme und Größenstandards	15
2.5. Nukleotide und Oligonukleotide	16
2.6. Primär- und Sekundärantikörper	16
2.7. Puffer, Lösungen und Medien	17
2.8. Verwendete Membranen	20
2.9. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	20
2.10. Verwendete Geräte	20
3. Methoden	22
3.1. Zellkulturmethoden	22
3.2. Zellzahlbestimmung	22
3.3. Präparation der Mikroglia	23
3.4. Kokulturen	24

3.5.	RNA-Isolation und cDNA-Synthese.....	24
3.6.	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	25
3.7.	Proteinextraktion	27
3.8.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
3.9.	Western Blot.....	29
3.10.	Zymographie	30
3.11.	Immunhistochemische Färbung	31
3.12.	Immunfluoreszenzfärbung.....	32
3.13.	Boyden-Chamber-Mikroinvasionsassay	33
3.14.	Viabilitätsassay mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Assay)	35
3.15.	Statistik.....	35
4.	Ergebnisse	36
4.1.	Invasivitätsmessungen	36
4.1.1.	<i>MTT-Assay</i>	36
4.1.2.	<i>Zellzählung</i>	37
4.1.3.	<i>Boyden-Chamber-Mikroinvasionsassay</i>	37
4.2.	Untersuchungen auf Protein-Ebene	40
4.2.1.	<i>Western Blot</i>	40
4.2.2.	<i>Zymographie</i>	41
4.3.	Semiquantitative mRNA-Expressionsanalyse	42
4.4.	Immunhistochemische Darstellung der Mikroglia/Makrophagen in Hirnmetastasen.....	43
4.5.	Immunfluoreszenzmikroskopie	45
4.5.1.	<i>Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts</i>	45
4.5.2.	<i>Wnt-5a-Expression</i>	47
4.5.3.	<i>β-Catenin-Expression</i>	48
5.	Diskussion	49
5.1.	Nachweis von Mikroglia/Makrophagen in Hirnmetastasen.....	49
5.2.	Invasivitätsmessungen	50
5.3.	Einfluss von LPS auf die Invasivität.....	51
5.4.	MMP-Produktion in Kokulturen.....	52
5.5.	Wnt-Signaling in Mikroglia.....	53

5.6. Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts der Mikroglia	54
5.7. Mikroglia/Makrophagen in Tumoren	55
6. Zusammenfassung.....	57
7. Summary	58
8. Anhang	59
8.1. Abbildungsverzeichnis.....	59
8.2. Tabellenverzeichnis.....	59
9. Literaturverzeichnis	60

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AP-1	Activator Protein-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli (Tumor-Suppressor-Protein)
ATCC	American Type Culture Collection
CamK II	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II
CBP	CREB-binding protein
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
CRD	Cysteine-Rich Domain
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindol
Dkk	Dickkopf
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dvl	Dishevelled (Protein) in Vertebraten
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fz	Frizzled-Rezeptor
°C	Grad Celsius
GSK-3β	Glykogen-Synthase-Kinase-3β
h	Stunde(n)
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HPF	High Power Field
HRP	Horseradish-Peroxidase
IL-	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminal-Kinase
l	Liter
LEF	Lymphoid Enhancer Factor

LPS	Lipopolysaccharid
LRP	Lipoprotein-Receptor-Related Protein
M	molar (mol/l) (Molarität)
m	Meter
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MG	Mikroglia
min	Minute(n)
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
P0	postnataler Tag 0
PBS	Phosphat-Buffered Saline
PCP	Planar Cell Polarity
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein-Kinase C
PLC	Phospholipase C
RAC	Ras-Like Protein
RHOA	Ras-Homologue Gene Family Member A
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	RHO-Associated Coiled-Coil-Containing Protein Kinase 1
rpm	rounds per minute
RPMI 1640	am Roswell Park Memorial Institute etabliertes Medium
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard Error of the Mean
sFRP	Secreted Fz-Related Protein
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCF	T-Cell Factor
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)

(v/v)	Volume/Volume
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
WIF	Wnt Inhibitory Factor
Wnt	Wingless Type MMTV Integration Site Family
(w/v)	Weight/Volume
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Schritte der Metastasierung

Metastasen sind heute die häufigste Todesursache aller malignen Erkrankungen. Die Metastasierung ist ein mehrschrittiger Prozess, der sich aus lokaler Invasion, Migration, Intravasation und somit hämatogener Streuung, Extravasation und Kolonisation im Metastasenorgan zusammensetzt (siehe Abb. 01). Als Grundvoraussetzung für die Tumorinitiation gelten Störungen der Replikation, des Zellzyklus und der Apoptose, die auf Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen basieren. Das Tumorstroma spielt eine entscheidende Rolle während der Invasion von Tumorzellen und trägt sowohl zur Degradation von ECM-Komponenten als auch zur aktiven Migration bei. Die aggressiven malignen Zellen gelangen nach Invasion des umgebenden Stromas in die Blutgefäße und über den Kreislauf schließlich in das Kapillarsystem der Metastasenorgane. Nach der Extravasation, dem Austritt aus der Zirkulation in das Parenchym des Metastasenorgans, beginnen die entarteten Zellen erneut zu proliferieren – eine Kolonie des Primärtumors entsteht.

Schon Ende des 19. Jahrhunderts konstatierte Paget in seiner „Seed and Soil“-Hypothese einen Zusammenhang zwischen der Lokalisation von Metastasen und dem Stroma der Metastasenorgane (Paget 1889). Bislang konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Schritte der Invasion und Intravasation durch Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) begünstigt werden (De Nardo et al. 2008). Die Mechanismen der Extravasation und Kolonisation sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. Hiratsuka et al. zeigten durch ihre Arbeit mit einem pulmonal metastasierenden Mausmodell, dass Primärtumoren das Gewebe ihrer potentiellen Metastasen-Zielorgane bereits vor dem Schritt der eigentlichen Metastasierung sensibilisieren können. Die Ausschüttung der inflammatorischen chemotaktischen Faktoren S100A8 und S100A9 und die konsekutive Einwanderung von Makrophagen

in das prämetastatische Organ waren in dem Modell essentielle Voraussetzungen für die spätere pulmonale Metastasierung (Hiratsuka et al. 2006). Das Modell eignete sich aber nicht zur direkten Visualisierung der Interaktionen der ortsständigen Makrophagen mit den Karzinomzellen. Andere Forschungsarbeiten konnten eine reduzierte Bildung von Metastasen im Makrophagen-depletierten Leberorgan zeigen (Sturm et al. 2003, Gorden et al. 2007).

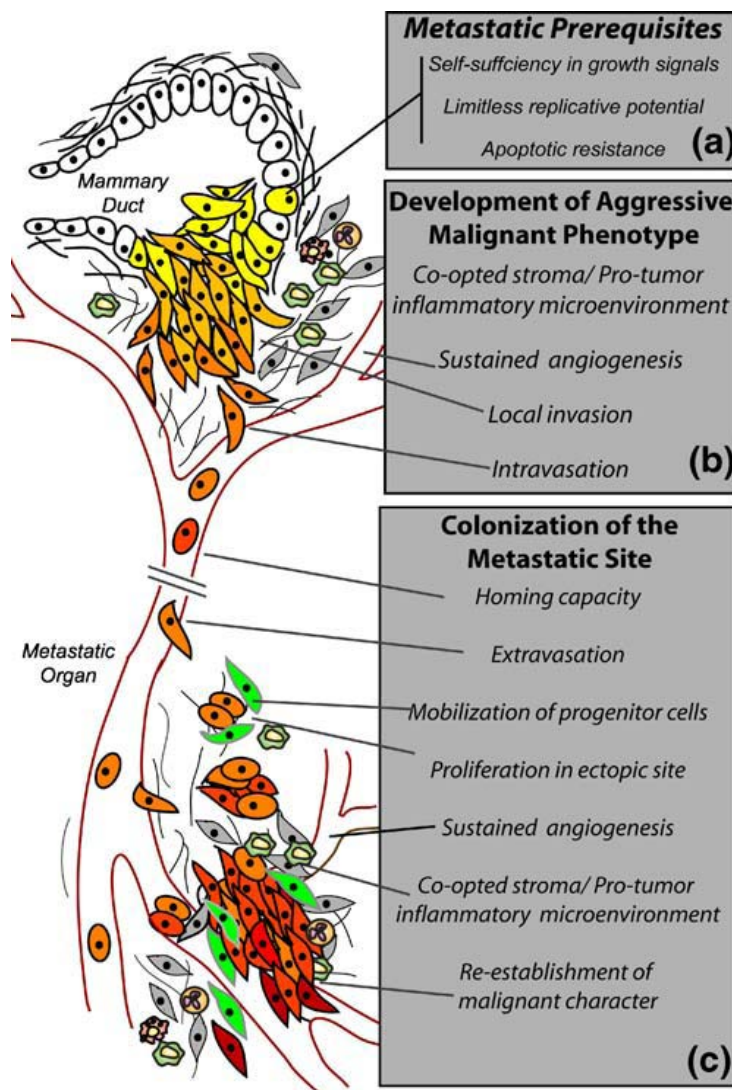


Abb. 01 Schritte der Metastasierung (übernommen aus: De Nardo et al. (2008), S. 13.)

(a) Onkogenetische Transformation und genomische Instabilität, apoptotische Resistenz, uneingeschränkte Replikation und Störungen des Zellzyklus gelten als Basisvoraussetzungen der Metastasierung. (b) Tumor-Stroma-Interaktionen führen zu verstärkter Angiogenese, lokaler Invasion sowie Intravasation. (c) Die malignen Zellen werden durch Expression bestimmter Rezeptoren und Freisetzung von Chemokinen aktiv vom Metastasenorgan angezogen (**Homing**). Nach Extravasation, Neoangiogenese und Proliferation entsteht eine Kolonie des Primärtumors im Metastasenorgan (**Kolonisation**).

1.2. Die Rolle der Makrophagen in Primärtumoren

Makrophagen sind die Schlüsselzellen der chronischen Inflammation, welche pathophysiologisch eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von Tumoren spielt (Balkwill et al. 2005). Bereits 1863 vermutete Virchow aufgrund seiner histopathologischen Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen chronischer lokaler Entzündungsreaktion und der Initiation von neoplastischen Prozessen. Die vielfältigen Funktionen von Makrophagen spiegeln sich in ihrer Heterogenität wider. Abhängig von den Signalen in ihrer Umgebung entwickeln sie sich in verschiedene Subtypen. In Entzündungen können diese Zellen in M1- oder M2- Makrophagen differenzieren. M1-Makrophagen stellen die klassisch aktivierten Makrophagen dar, während der Begriff M2-Zellen verschiedene nicht-klassisch aktivierte Makrophagen vereint (Mantovani et al. 2004). Der M1-Typ der Makrophagen wird durch mikrobielle Reize wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) über Toll-like Rezeptoren (TLR) aktiviert und ist charakterisiert durch die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren und Komplementrezeptoren. Der Arginin-Metabolismus in diesen Zellen führt zu der Produktion von Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoffspezies, die der direkten Abtötung von Pathogenen dienen (Mantovani et al. 2004). Die Differenzierung in M2-Makrophagen wird durch verschiedene Reize vermittelt. Sowohl die Stimulierung mit IL-4 oder IL-13 als auch mit IL-10 oder Glucocorticoiden induziert den alternativen Aktivierungsweg (Mantovani et al. 2004). Ein gemeinsames Merkmal, das diese Subtypen vom M1-Typ unterscheidet, ist die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10, IL-1-Rezeptor-Antagonist und dem Chemokin CCL18, während proinflammatorische Zytokine nicht oder nur in sehr geringen Mengen freigesetzt werden (Mantovani et al. 2004). An neoplastischen Prozessen sind überwiegend Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) vom M2-Typ beteiligt (Balkwill et al. 2005). Durch Pathogenstimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) kann in vitro ein Re-Switch von M2- in M1-Makrophagen induziert werden.

Die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) repräsentieren eine bedeutende Komponente des lymphoretikulären Infiltrates im Tumorstroma. TAM besitzen entgegen früheren Vorstellungen weniger tumorizides als vielmehr tumorförderndes Potential (Mantovani 1994). Histopathologische Untersuchungen ergaben, dass das

Ausmaß der TAM-Infiltration positiv mit der Angiogenese und negativ mit der Prognose einiger Tumore korreliert (Torisu et al. 2000, Leek und Harris 2002). In früheren Versuchen dieser Arbeitsgruppe zeigte sich, dass die Kokultivierung von Mammakarzinomzelllinien mit Makrophagen zu einer signifikant gesteigerten Invasivität der Tumorzellen führt. Dies geschieht über eine TNF- α -abhängige Hochregulation der Matrixmetalloproteinasen MMP-2, -3, -7 und -9 (Hagemann et al. 2004). MMP-7 kann aktives TNF- α aus seiner Membran-gebundenen Vorstufe freisetzen und gilt als eines der Zielgene des Wnt-Signalweges. Kürzlich konnte diese Arbeitsgruppe die Bedeutung des Wnt-Signalweges für die Makrophagen-vermittelte Steigerung der Tumorinvasivität anhand der Hochregulation von Wnt 5a in kokultivierten Makrophagen nachweisen (Pukrop et al. 2006).

1.3. Die Familie der Wnt-Gene

Die Gene der Wnt-Familie kodieren für sekretorische Glykoproteine, die an der Regulation von zahlreichen Prozessen wie Zellproliferation, Migration und Gewebedifferenzierung während der Embryonalentwicklung beteiligt sind (Nusse 2005). Bislang sind 19 verschiedene Wnts in Vertebraten bekannt. Durch Bindung der Wnt-Liganden an die Rezeptorzellen werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, die eine veränderte Genexpression zur Folge haben. Alle Wnts besitzen eine Signalsequenz zur Sekretion, viele potentielle Glykosylierungsstellen und ein charakteristisches Verteilungsmuster von 22 Cysteinresten. Sie sind durch Palmytoylierung hydrophob und zum größten Teil an die Zellmembran oder die extrazelluläre Matrix (ECM) gebunden (Mikels und Nusse 2006 b). Die Wnt-Proteine agieren als Liganden für unterschiedliche Wnt-Signalwege und werden demnach in 2 Gruppen klassifiziert. Wnt 1, Wnt 2, Wnt 3a, Wnt 8a und Wnt 8b zählen zu den Aktivatoren des Kanonischen, Wnt 4, Wnt 5a und Wnt 11 zu denen des Nicht-Kanonischen Pfades (Wodarz und Nusse 1998).

Dysregulationen der Wnt-Signalkaskade können zur Entstehung und Progression von malignen Tumoren beitragen. In einer Vielzahl von Tumoren ist eine Wnt-Überexpression zu beobachten (Polakis 2000). Zudem hat die Wnt-Signalkaskade

einen aktivierenden Effekt auf die Regulation von embryonalen Stammzellen (Reya und Clevers 2005).

1.4. Der Kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der bekannteste Wnt-abhängige Signalweg ist der sogenannte Kanonische Pfad und verläuft über β -Catenin. Bei Abwesenheit des Wnt-Liganden ist β -Catenin gemeinsam mit α -Catenin, E-Cadherin und Aktin am Aufbau des Zytoskeletts sowie an Zelladhäsionsvorgängen beteiligt. Zytosolisches β -Catenin wird in einem Multiproteinkomplex mit Axin, dem APC-Genprodukt und der Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) gebunden und anschließend durch GSK-3 β an den Serin- und Threoninresten phosphoryliert, was zur Ubiquitylierung und proteosomaler Degradation führt.

Bindet ein Wnt-Ligand an den 7-Transmembrandomänen-Rezeptor Frizzled (Fz) und den Lipoprotein-Rezeptor-verwandten LRP-5/6-Ko-Rezeptor, führt dies zur Rekrutierung des Dishevelled Proteins (Dvl), das im aktivierten Zustand die GSK-3 β -vermittelte Phosphorylierung des β -Catenins inhibiert. β -Catenin akkumuliert im Zytosol, transloziert in den Nukleus und aktiviert durch Bindung an die Transkriptionsfaktoren T-cell factor (TCF) und Lymphoid enhancer factor (LEF) die Expression von spezifischen Zielgenen wie Fibronectin, c-myc oder MMP-7. In Abwesenheit von Wnt-Liganden fungiert TCF als Repressor der Expression von Wnt-Zielgenen und interagiert mit dem CREB-bindenden Protein CBP und korepressorischen Proteinen namens CtBP und Groucho/TLE, die sich an zentralen Bindungsstellen neben der für β -Catenin befinden (Polakis 2000).

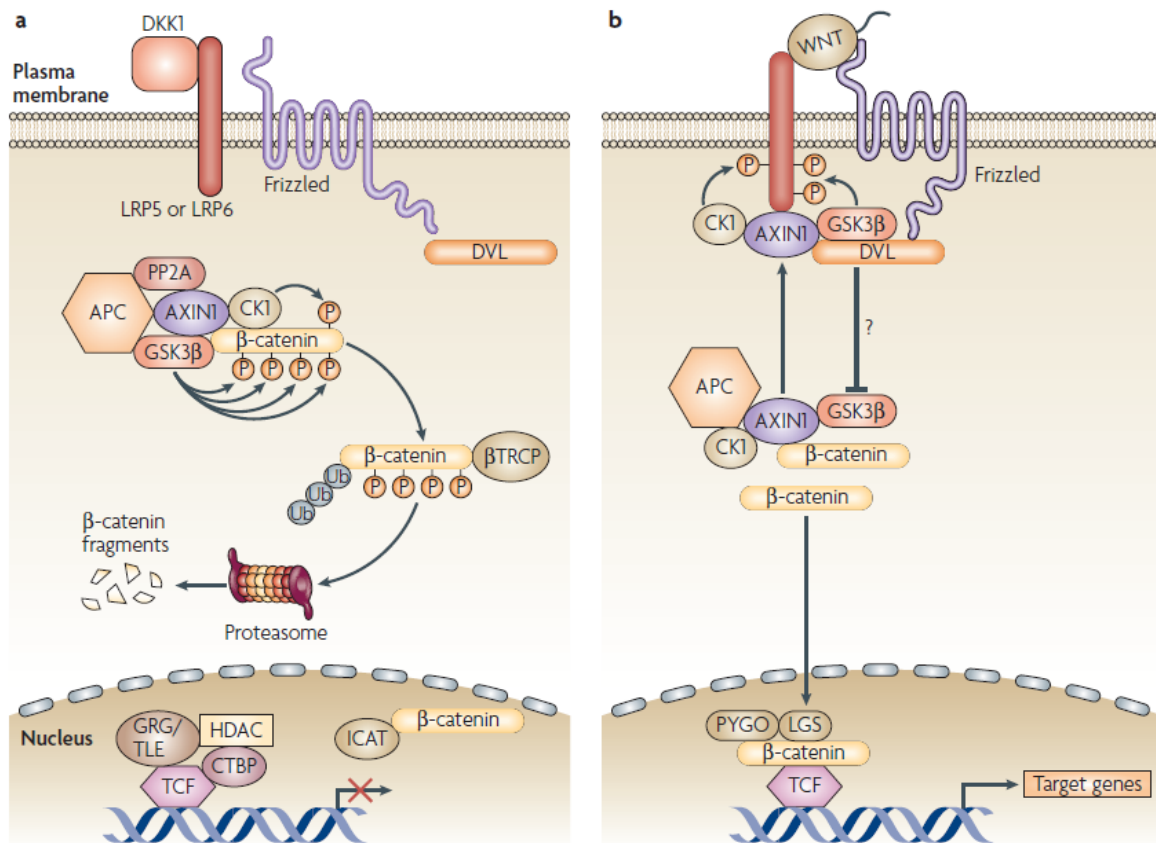


Abb. 02 Der Kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg (übernommen aus: Staal et al. (2008), S. 583.)
a Bei Abwesenheit des Wnt-Liganden am Fz/LRP-5/6-Rezeptorkomplex wird β-Catenin durch kontinuierliche Phosphorylierung und Ubiquitylierung im Proteasom degradiert. Der β-Catenin-Spiegel im Zytoplasma und Nucleus ist niedrig. **b** Nach Bindung der Wnt-Proteine am Rezeptorkomplex wird eine Signalkaskade initiiert. Durch Aktivierung des Dishevelled Proteins wird die GSK-3β-vermittelte Phosphorylierung des β-Catenins inhibiert und β-Catenin akkumuliert im Zytoplasma. Es transloziert in den Nucleus und bildet einen Transkriptionsfaktorkomplex mit TCF, der zur Transkription einer großen Gruppe von Zielgenen führt.

1.5. Die Nicht-Kanonischen Wnt-Signalwege

Die Nicht-Kanonischen Signalwege funktionieren β-Catenin-unabhängig und laufen prinzipiell über zwei unterschiedliche Mechanismen: den Planar-Cell-Polarity (PCP)-Signalweg und den Wnt-Ca²⁺-Signalweg. Beide Pfade werden über die Bindung von Wnt-Liganden an Fz-Rezeptoren und Aktivierung des zytoplasmatischen Proteins Dvl stimuliert.

Der Wnt- Ca^{2+} -Signalweg aktiviert über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} das Calcium-sensitive Enzym PKC (Protein-Kinase C), die Phosphatase Calcineurin sowie die Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CamK II) und kann den Kanonischen Signalweg direkt antagonisieren (Kühl et al. 2001). Der PCP-Signalweg wirkt über die Aktivierung der RHOA-GTPase (RAS-Homologue Gene Family Member A) bzw. der Rac-GTPase. Daraus resultiert sowohl die Aktivierung der Protein-Kinase ROCK (RHO-Associated Coiled-Coil-Containing Protein Kinase 1), welche an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt ist, als auch die Aktivierung der c-Jun-N-terminal-Kinase (JNK) mit Phosphorylierung von c-Jun und anschließender Genregulation von Faktoren für morphogenetische Bewegungen und Polarisation von Zellen in epithelialen Verbänden (Yamanaka et al. 2002).

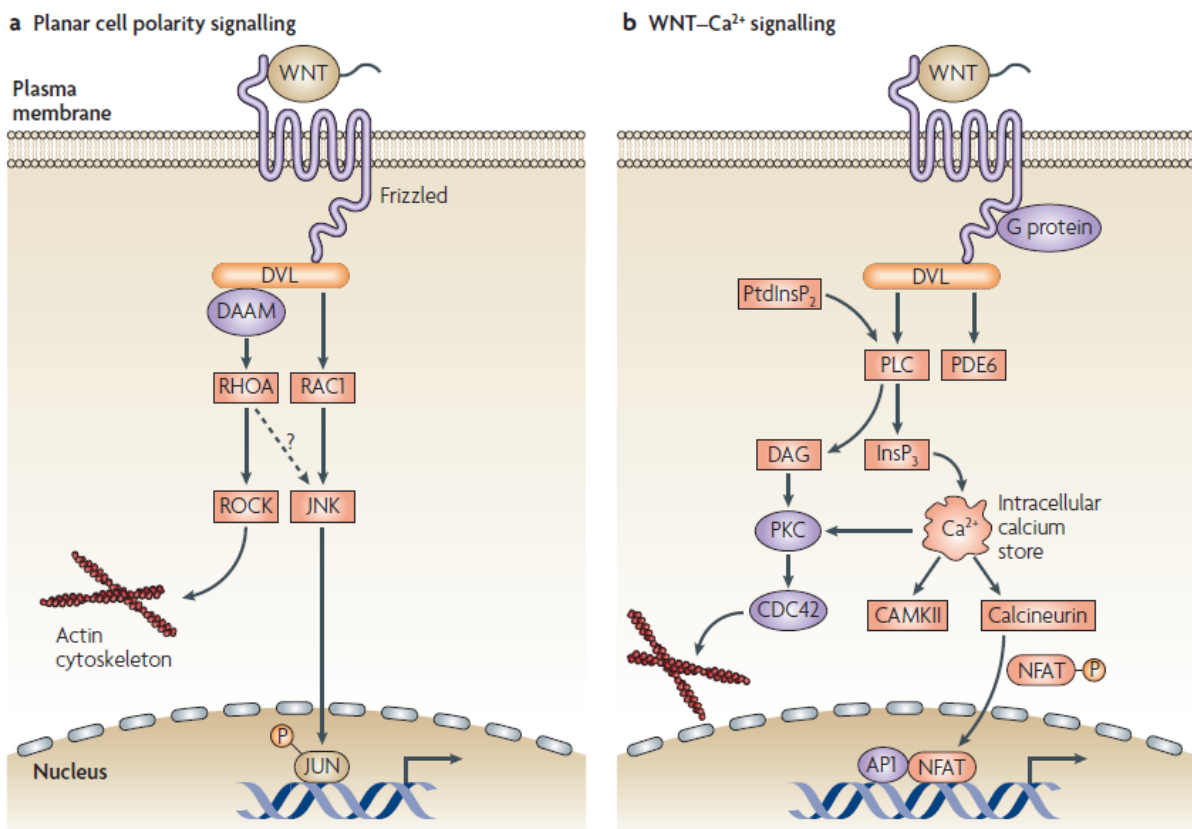


Abb. 03 Die Nicht-Kanonischen Signalwege (übernommen aus: Staal et al. (2008), S. 584.)
a Der Planar-Cell-Polarity (PCP)-Signalweg ist β -Catenin-unabhängig und führt über die Aktivierung der JNK (c-Jun-N-terminal-Kinase) und ROCK (RHO-Associated Coiled-Coil-Containing Protein Kinase 1) durch die GTPasen RHOA (RAS-Homologue Gene Family Member A) und RAC1 zum Remodelling des Zytoskeletts und Veränderungen der Zelladhäsion und -motilität. **b** Der Wnt- Ca^{2+} -Signalweg wird über einen Anstieg des zytosmatischen freien Kalziums mit konsekutiver Aktivierung der PKC, CamKII und der Phosphatase Calcineurin vermittelt.

1.6. Inhibitoren der Wnt-Signalkaskade

Als physiologische Inhibitoren des Wnt-Signalweges sind bislang die sezernierten Proteine Dickkopf-1 (Dkk-1), Wnt Inhibitory Factor (WIF) und die Secreted Fz-Related Proteine (sFRP) bekannt. Es wurde gezeigt, dass Wnt-Antagonisten in einer Vielzahl von Tumoren vermindert exprimiert werden (Kuphal et al. 2006; Lee et al. 2004).

WIF und sFRP binden direkt an den Wnt-Liganden und verhindern so die Bindung an den Fz-Rezeptor. Dkk-1 gilt als der bereits am besten charakterisierte Wnt-Antagonist und hemmt den Wnt-Signalweg durch Bindung an den LRP-5/6-Ko-Rezeptor und das Membranprotein Kremen. Die Familie der Dkk-Gene spielt eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung und ist besonders in Geweben mit epithelial-mesenchymaler Transformation hochreguliert (Kuphal et al. 2006). Dkk-1 besitzt eine sehr hohe Bindungsaffinität zu LRP 5/6 und gilt somit als spezifischer Inhibitor des Wnt-Signalweges (Semenov et al. 2001). Der Dkk-Rezeptor-Komplex wird von der Zelle endozytotisch aufgenommen und dort durch die Wnt-Liganden-induzierte Fz-LRP-5/6-Komplexbildung verhindert. Während bislang nur eine inhibitorische Wirkung auf den Kanonischen Signalweg bekannt war, gibt es nun zunehmend Hinweise auf eine β -Catenin-unabhängige Hemmung der Wnt-Signale von Dkk-1 (Lee et al. 2004; Mikheev et al. 2004).

1.7. Effekte von Wnt 5a auf die Tumorprogression

Wnt 5a gilt als Ligand des Nicht-Kanonischen Wnt-Signalwegs und kann den Kanonischen Signalweg abhängig von der Rezeptorexpression antagonisieren, aber auch aktivieren (Mikels und Nusse 2006 a). In der Literatur wurde Wnt 5a aufgrund teils kontroverser Untersuchungsergebnisse bislang sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogen bezeichnet. Angesichts der Komplexität der Wnt-Signalwege ist dies nicht verwunderlich. In zahlreichen soliden malignen Tumoren wurde eine Überexpression von Wnt 5a gefunden (Iozzo et al. 1995). Die Wnt-5a-Expression erwies sich als zuverlässiger Marker für aggressives Tumorwachstum beim malignen

Melanom (Bittner et al. 2000). Wnt-Proteine werden nicht nur von Tumorzellen, sondern auch von Zellen des Tumorstromas wie z.B. den Makrophagen synthetisiert. Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) können durch Erhöhung der Invasivität der neoplastischen Zellen mittels Hochregulation von MMPs und Produktion von TNF- α zur Tumorprogression beitragen. Diese Arbeitsgruppe konnte vor kurzem nachweisen, dass über eine vermehrte Wnt-5a-Expression in TAM die Invasivität von Tumorzellen gesteigert wird (Pukrop et al. 2006). Dieser Effekt war durch den spezifischen Wnt-Inhibitor Dkk-1 antagonisierbar. Der nichtkanonische JNK-Signalweg erwies sich als entscheidender Mechanismus der Makrophagen-induzierten Invasion - ein intakter Kanonischer Signalweg war jedoch notwendige Voraussetzung. Der Nachweis von Wnt 5a in TAM in primären Mammakarzinomen und insbesondere an der Invasionsfront von Lymphknotenmetastasen unterstreichen die klinische Bedeutung dieser Ergebnisse.

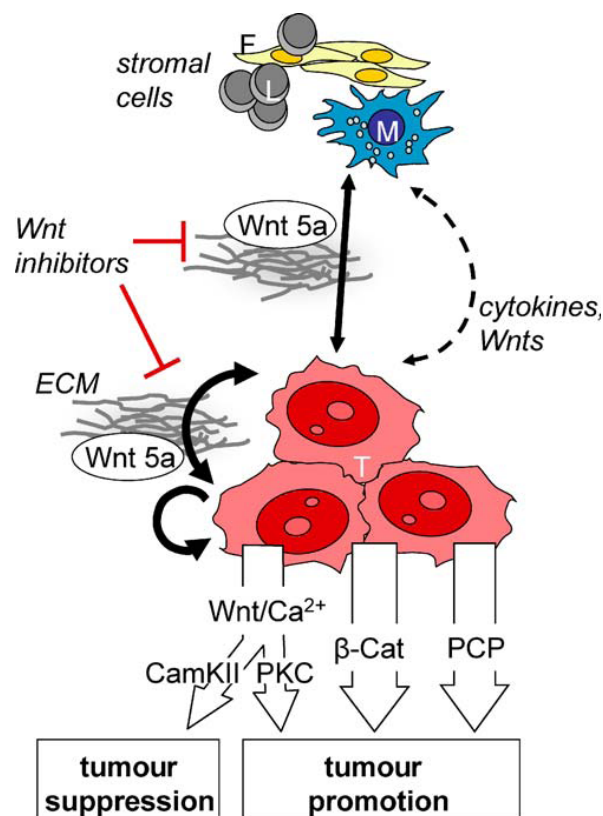


Abb. 04 Intratumorales Wnt-5a-Signaling und seine Effekte (übernommen aus: Pukrop und Binder (2007), S. 263.)

T Tumorzellen *F* Fibroblasten *L* Lymphozyten *M* Makrophagen

Eine Funktion als Tumorpromotor ist für Wnt 5a hauptsächlich über den PKC- und PCP-Signalweg bekannt, wohingegen die Aktivierung von CamKII mit Tumorsuppressor-Effekten verbunden ist. Die Effekte des Wnt-5a-Signaling können offenbar im Kontext der Wnt-Signalwege stark variieren. Entscheidend hierfür sind die Expression von Rezeptoren und Downstream-Effektoren auf/in Tumorzellen, die durch die Zelle und die extrazelluläre Matrix (ECM) des umliegenden Stroma beeinflusst wird. Das in Tumorzellen gebildete Wnt 5a kann benachbarte benigne und maligne Zellen entweder autokrin oder parakrin stimulieren. Auch die Stromazellen können Wnt 5a produzieren.

1.8. Mikroglia – die ortsständigen Makrophagen des ZNS

Mikroglia sind die residenten Makrophagen des Gehirns. Anfang des 20. Jahrhunderts wurde Mikroglia von P. del Rio Hortega als eigenständiger Zelltyp des Gehirns beschrieben (Rio Hortega und Asua 1921). Sie stammt von monozytären Zellen des Blutes ab, die während der perinatalen Entwicklungsphase das Gehirn infiltrieren und dort verbleiben. Ihre Hauptaufgaben bestehen im Schutz der Neurone vor schädigenden Einflüssen und in der Erhaltung des homöostatischen Gleichgewichts im ZNS (Streit 2002). Im Gegensatz zu peripheren Makrophagen kann Mikroglia in situ proliferieren. Mikrogliazellen sind über das gesamte ZNS einschließlich des Rückenmarkes verteilt. Größere Mengen kommen vor allem in der grauen Substanz, im zerebralen Kortex und im Hippokampus vor (Perry und Gordon 1991). Mikroglia besitzt prinzipiell zwar neuroprotektive, nach neueren Erkenntnissen jedoch auch neurodestruktive Funktionen (Streit et al. 1999). Sie spielt eine tragende Rolle bei der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, AIDS-Demenz, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose (Nakamura 2002).

Unter physiologischen Bedingungen befinden sich Mikrogliazellen in einer Art Ruhezustand, der durch eine ramifizierte Morphologie gekennzeichnet ist. Die Zellen überwachen die Homöostase des Hirnparenchyms und reagieren mittels zahlreicher Rezeptoren sehr schnell und empfindlich auf kleinste Änderungen des Mikromilieus (Schwartz et al. 2006). Die Erneuerung der Population erfolgt durch intrinsische Proliferation und Rekrutierung monozytärer Zellen. Neben den residenten Mikrogliazellen sind im Gehirn und Rückenmark also auch periphere Makrophagen zu finden, wobei die perivaskulären, die Plexus-Choroideus-assoziierten und die Meningealmakrophagen als wichtigste Beispiele zu nennen sind. Im Ruhezustand ist die Proliferationsrate und der Zellumsatz der Mikroglia gering. Bei Aktivierung jedoch beginnt sie zu proliferieren und zu phagozytieren, und verändert sich morphologisch in einen amöboiden Zelltyp. Untersuchungen ergaben, dass unter pathologischen Bedingungen große Anzahlen von peripheren Makrophagen in das Hirnparenchym einwandern können (Hanisch und Kettenmann 2007). Abhängig vom aktivierenden Stimulus resultieren sehr variable Phänotypen der ortsständigen Makrophagen (Schwartz et al. 2006). Aktivierte Mikroglia produziert zahlreiche Zyto- und Chemokine und weist ein verändertes Rezeptorprofil auf.

1.9. Mikroglia in Hirnmetastasen

Zerebrale Metastasen sind die häufigsten intrakraniellen Tumoren und stammen überwiegend von Lungen- oder Mammakarzinomen ab. Sie treten bei etwa 20-30% aller Patienten mit systemischer Metastasierung auf (Posner 1992) und repräsentieren derzeit 30% aller Hirntumoren. Die Inzidenz zerebraler Mammakarzinom-Metastasen ist in den letzten Jahren infolge der verbesserten Primärtherapie und der damit verbundenen verlängerten Überlebenszeit gestiegen. Die therapeutischen Möglichkeiten sind jedoch noch immer sehr begrenzt. Viele Chemotherapeutika können die Blut-Hirn-Schranke nicht ausreichend durchdringen. Nach der Diagnose einer Hirnmetastase beträgt die mediane Überlebenszeit unter alleiniger Cortison- und supportiver Therapie ca. 1-3 Monate. Baumert et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass das infiltrative Wachstum von Hirnmetastasen häufig über den in bildgebenden Verfahren sichtbaren Tumorrand hinausgeht (Baumert et al. 2006).

Obwohl Mikroglia einen essentiellen Bestandteil des zerebralen Immunsystems darstellt, sind die Interaktionen zwischen metastatischen Karzinomzellen und den ortsständigen Makrophagen noch weitgehend ungeklärt. Es scheint offenbar eine Korrelation zwischen dem Grad der Malignität und der Infiltrationsdichte von Mikroglia in ZNS-Tumoren zu geben. In humanen malignen Hirntumoren imponiert ein signifikanter Anstieg der Mikroglia-Population im Vergleich zum gesunden Hirngewebe (Roggendorf et al. 1996). Ein Kennzeichen der häufigsten primären Hirntumoren im Erwachsenenalter, der astrozytären Gliome, ist die diffuse Infiltration des Hirnparenchyms (Graeber et al. 2002). Die hochgradig malignen Glioblastome (WHO Grad IV) bestehen bis zu 30% aus Mikroglia/Makrophagen. Die Zellen bewegen sich Richtung Glioblastom und akkumulieren insbesondere im Grenzbereich zwischen Tumor und gesundem Gewebe (Hanisch und Kettenmann 2007). Die Mikroglia zeigt hier einen amöboiden Phänotyp und kann die Migration und Invasivität von Glioblastomzellen verstärken (Sliwa et al. 2007; Bettinger et al. 2001).

In histopathologischen Untersuchungen der Hirnmetastasen von Bronchialkarzinomen zeigte sich ein charakteristischer umgebender Wall aus Mikroglia, der eine klare Grenze zwischen Tumorgewebe und angrenzendem Hirngewebe bildet (He et al. 2006). Auffällig waren hierbei eine Aktivierung der

Mikroglia, d.h. eine morphologische Wandlung von ramifizierter zu amöboider Form, und Hinweise auf eine verstärkte Proliferation. Das Verteilungsmuster ramifizierter und amöboider Mikroglia variiert sehr stark in unterschiedlichen Tumoren (Roggendorf et al. 1996). Die progressionsfördernde Rolle der peripheren Makrophagen in extrakraniellen Tumoren auf der einen und die äußerst seltene Fernmetastasierung von malignen primären Hirntumoren auf der anderen Seite sprechen für unterschiedliche Reaktionen der Makrophagen und Mikroglia auf Tumorzellen und auch auf verschiedene Tumorspezies.

Die Untersuchung zerebraler Metastasen gestaltet sich problematisch. Derzeit existieren nur wenige Modell-Systeme, mittels derer jedoch keine direkte Aussage über die Interaktionen zwischen Karzinom- und Stromazellen getroffen werden kann. Zudem ist es aufgrund fehlender immunhistochemischer Marker bislang nicht möglich, eingewanderte TAM von der ortsständigen Makrophagenpopulation, der Mikroglia, zu unterscheiden (Graeber et al. 2002).

1.10. Zielsetzung der Arbeit

Bei 20 bis 30 % aller Patienten mit soliden Tumoren werden zerebrale Metastasen diagnostiziert. Hirnmetastasen gehen mit einer hohen Mortalität und erheblicher Beeinträchtigung neurologischer Funktionen sowie der allgemeinen Lebensqualität einher. Viele bisherige onkologische Forschungsarbeiten zielten auf das bessere Verständnis von Tumorinitiation und Evasion der Tumorzellen aus dem Primärtumor ab. Ein progressionsfördernder Effekt von Tumor-assoziierten Makrophagen auf Tumorzellen in dieser ersten Phase der Dissemination konnte ausreichend belegt werden. Die Hochregulation von Wnt 5a in TAM des Primärtumors erwies sich als entscheidender Mechanismus der Makrophagen-induzierten Tumordinvasivität (Pukrop et al. 2006).

Doch wie es zur Kolonisation der entarteten Zellen in anderen Organen und somit zur tatsächlichen Entstehung von Metastasen kommt, ist bislang noch weitgehend ungeklärt. Insbesondere stellt sich die Frage, ob die ortsständigen Makrophagen dabei eine ähnliche Rolle wie die TAM bei der Evasion aus dem Primärtumor spielen. Hirnmetastasen zeigen histopathologisch eine starke Infiltration mit aktivierten,

amöboiden Mikrogliazellen. Die Mikroglia kann die Migration und Invasivität von hirneigenen Tumorzellen verstärken (Sliwa et al. 2007; Bettinger et al. 2001). Eine pro-metastatische Funktion der residenten Hirnmakrophagen erscheint somit denkbar.

In dieser Arbeit sollen nun die Interaktionen zwischen Mikroglia und Karzinomzellen im Hinblick auf die Kolonisation von Hirnmetastasen analysiert werden. Wie bereits erwähnt, gibt es bislang keinen spezifischen Marker, mit dem man histologisch Makrophagen von Mikroglia unterscheiden kann. Um dennoch den Einfluss von Mikroglia auf die Invasion von Karzinomzellen messen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit Mikroglia aus Maushirnen isoliert, mit Mammakarzinomzellen kokultiviert und die Invasivität in Mikroinvasionsassays untersucht. Mit dieser Methode können *in vitro* die Interaktionen zwischen Mikroglia und Mammakarzinomzellen in Hirnmetastasen simuliert werden. Die Expressionsanalyse von Wnt 5a in Mikroglia nach Mono- und Kokultivierung soll Aufschluss über die Rolle des Wnt-Signalwegs bei der Kolonisation bringen. Des Weiteren wird untersucht, ob sich die Expression von β -Catenin, einem Downstream-Target des Kanonischen Wnt-Signalwegs, unter Kokultivierung von Mammakarzinomzellen und Mikroglia verändert und ob eine Induktion von invasionsfördernden Matrix-Metalloproteinasen stattfindet. Die Effekte der Kokultivierung mit Karzinomzellen auf das Aktin-Zytoskelett von Mikroglia werden in Immunfluoreszenzfärbungen ermittelt.

2. Material

2.1. Verwendete Zelllinien und Gewebe

MCF-7: humanes Mamma-Adenokarzinom (ATCC, Rockville, Maryland, USA)

4T-1: murines Mammakarzinom (ATCC, Rockville, Maryland, USA)

M.410.4: muriner Mammatumor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Grimshaw, Cancer Research UK, London)

Hirngewebe-Paraffinschnitte von 5 Patientinnen mit der Diagnose *Zerebrale Metastasen bei Mammakarzinom* sowie von P0-Mäusen (Ergebnisse nicht gezeigt) wurden im Rahmen der Studie *Die Bedeutung des Tumorstromas im Hinblick auf die Tumorprogression und die verantwortlichen Signalwege* in Kooperation mit der Abteilung Neuropathologie des Universitätsklinikums Göttingen zur Verfügung gestellt (Ethikvotum am 24.10.05).

2.2. Verwendete Substanzen und Chemikalien

Alle verwendeten Substanzen wurden, soweit nicht anders benannt, von Sigma, Deisenhofen, Deutschland bezogen.

Moviol

Hoechst, Frankfurt, Deutschland

2.3. Verbrauchsmaterialien

Sämtliche verwendete Plastik-Verbrauchsmaterialien, wurden von folgenden Firmen bezogen:

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Nunc, Wiesbaden, Deutschland

Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Zellkultur Inserts

Millipore, Billerica, USA

2.4. Rekombinante Proteine, Enzyme und Größenstandards

DNA-Leitermix

Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

DNA-Taq-Polymerase

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Protein-Molekulargewichtsmarker

R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

Rekombinante humane MMP-2

R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

Rekombinante humane MMP-9

R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

Rekombinantes humanes Dkk-1

R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

Rekombinantes humanes sFRP-1

R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

Rekombinantes murines Wnt 5a

R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

Reverse Transkriptase

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

RNAse Block

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.5. Nukleotide und Oligonukleotide

dNTP-Set Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Oligo-dT-Primer Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Alle verwendeten Forward- und Reverse-Primer wurden von IBA, Göttingen, Deutschland bezogen.

2.6. Primär- und Sekundärantikörper

Aktin (*Prod.-Nr. AF4000*) R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

β -Catenin dephosphoryliert Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
(*Prod.-Nr. ALX-804-260*)

β -Catenin gesamt Santa Cruz, Santa Cruz, USA
(*Prod.-Nr. sc-7963*)

Anti-mouse, HRP-konjugiert Upstate, Chicago, USA
(*Prod.-Nr. 123-49*)

KiM1P freundlicherweise zur Verfügung gestellt von
der Abteilung Neuropathologie,
Universitätsklinikum Göttingen

Mac3 freundlicherweise zur Verfügung gestellt von
der Abteilung Neuropathologie,
Universitätsklinikum Göttingen

Anti-mouse, FITC-gelabelt Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
(*Prod.-Nr. F5262*)

Phalloidin (*Prod.-Nr. P5282*) Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Anti-goat, FITC-gelabelt (<i>Prod.-Nr. F7367</i>)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Wnt 5a (<i>Prod.-Nr. AF645</i>)	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

2.7. Puffer, Lösungen und Medien

Agarose	Biozym AG, Oldendorf, Deutschland
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS) 10%	Serva, Heidelberg, Deutschland
BCA-Reagenz	Pierce, Rockford, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Chromogenes Substrat	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
Coomassie brilliant blue	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI	Arbeitslösung 200ng/ml (4', 6-diamino-2-phenylindol) Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM	Gibco, Eggenstein, Deutschland
ECM Matrigel	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresepuffer 10x	Tris 30g, Glycin 144g, SDS 10g, Aqua bidest ad 1l
Entfärberlösung (Destain)	30%Methanol, 10%Essigsäure, Aqua bidest ad 2l

Entwicklungspuffer 10x	50mM Tris, 200mM NaCl, 5mM CaCl ₂ , 40mM 6N HCl, Aqua bidest ad 500ml, pH 7,5, 0,2%Brij-35
Ethidiumbromid 1%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Färbelösung (Stain)	0,5%Coomassie-Brilliant-Blue, 30%Methanol, 10%Essigsäure, Aqua bidest ad 1l
Gelatine Beads	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Gelatine 2,5%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Hanks Salt Solution	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hyperfilm	Amersham Biosciences, München, Deutschland
L929-Medium	konditioniertes Medium der Zelllinie L929 mit DMEM (Biochrom, Berlin), Eigenherstellung in Kooperation mit der Abteilung Neuropathologie, Universitätsklinikum Göttingen
Laemmli-Puffer	187,5 mM Tris HCl pH6,8, 6%SDS, 30%Glycerin, 0,01%Bromphenolblau
Laufpuffer für Zymographie	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Lipopolysaccharid (LPS) aus E.coli	Arbeitslösung 10µg/ml Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
Loading Dye Solution	Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) 50mM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Salita, Sachsen, Deutschland
MTT-Lyse-Puffer	75% (v/v) Ameisensäure, 25% (v/v) DMSO

MTT-Reagenz	Arbeitslösung 5mg/ml (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
PCR-Puffer 10x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PFA	4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS
Ponceau S	5% Essigsäure, 0,1% Ponceau S Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteinaseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
RPMI-1640-Medium	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Target Retrieval Solution	DakoCytomation, Hamburg, Deutschland
TBE-Puffer 10x	Tris 108g, EDTA 9,3g, Borsäure 55g, Aqua bidest ad 1l
TEMED	Tetramethylethyldiamin Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Transblot-SD	Tris 5,8g, Glycin 2,9g, SDS 0,04g, Methanol 0,2l, Aqua bidest ad 1l
TRIZOL-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA (w/v) in PBS Biochrom, Berlin, Deutschland
WesternBlot Luminal Solution	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

2.8. Verwendete Membranen

Hybond-C-Membran	Amersham Biosciences, München, Deutschland
Polycarbonat-Membran (Porengröße 10µm)	Nucleopore, Pleasanton, USA

2.9. Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

RNeasy Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
------------	-----------------------------

2.10. Verwendete Geräte

Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Blotkammer WB	Biometra, Göttingen, Deutschland
Boyden Chamber	modifiziertes Modell, hergestellt in der Werkstatt des Universitätsklinikums Göttingen
Cytospin	ThermoScientific, Montreal, Kanada
Gellaufkammer PCR	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Gellaufkammer WB	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gemüsedampfgarer	Braun, Deutschland

Laminar-Flow-Werkbank	BDK Luft und Reinraumtechnik, Sonnenbühl, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Axioskop 2 Plus	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	Whirlpool, Schorndorf, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Supply	Biometra, Göttingen, Deutschland
Rührer	Janke&Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Schüttler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer-Block	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex	Janke&Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Großburgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
“	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

3. Methoden

3.1. Zellkulturmethoden

Die Kultivierung der Zelllinie MCF-7 erfolgt in RPMI-1640-Medium, die der Zelllinien 4T-1 und M.410.4 in DMEM-Medium (D-Glucose-Konzentration: 1g/dl) +10% (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) im CO₂-Inkubator (bei 37°C mit 5%CO₂ und 90%Luftfeuchtigkeit). Die Zellen wachsen adhärent und werden durch eine Trypsin-EDTA-Behandlung vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Nach 5-15min Inkubation mit 1ml Trypsin-EDTA bei 37°C werden die Zellen wieder in 10ml Kulturmedium mit FCS aufgenommen, um die Wirkung des Trypsins zu inaktivieren. Die Zellen werden je nach gewünschter Zellmenge in einer Konzentration von 1-2x10⁵/ml Medium in Zellkulturflaschen mit 25cm² Fläche (5-6ml Medium) oder in Flaschen mit 75cm² Fläche (10ml Medium) ausgesät. Alle drei Tage wird das Nährmedium gewechselt. Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens werden die Zellen wieder mit Trypsin-EDTA abgelöst und 1:5 – 1:10 gesplittet.

3.2. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wird mit Hilfe der Neubauer-Improved-Zählkammer bestimmt. Hierbei wird die Zellmenge in einem definierten Volumen von 0,4mm³ ermittelt. Vor der Auszählung wird jeweils das gesamte Linienraster mit einer geringen Vergrößerung betrachtet und überprüft, ob die Zellen gleichmäßig über die Quadrate verteilt sind. Andernfalls sollte die Zellsuspension nochmals aufgeschüttelt und neu aufgebracht werden. Nach Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Zellen unter dem Lichtmikroskop mit Durchlicht lässt sich deren Anzahl je Volumeneinheit (Zellzahl/ml) errechnen.

3.3. Präparation der Mikroglia

Die Präparation der Mikroglia erfolgte im Rahmen der Studie *Die Bedeutung des Tumorstromas im Hinblick auf die Tumorprogression und die verantwortlichen Signalwege* in Kooperation mit der Abteilung Neuropathologie des Universitätsklinikums Göttingen. Die Zellen für primäre mikrogliale Kulturen wurden aus neugeborenen P0- bis P3-Mäusen (NMRI, bezogen durch die Tierzucht Schönwalde GmbH, Schönwalde, Deutschland) gewonnen. Die Tötungsanzeige erfolgte durch Prof. Dr. U.-K. Hanisch (Abteilung Neuropathologie, Universitätsklinikum Göttingen).

Die neugeborenen Mäuse werden zunächst durch Dekapitierung mit einer sterilen Schere getötet. Nach Aufsuchen des Spinalkanals wird der Kopf bis zu den Augen aufgeschnitten, wobei das Riechhirn verworfen werden kann. Die entnommenen Gehirne werden dann in Petrischalen mit Hanks Salt Solution auf Eis gelegt und nach Entfernung der Hirnhäute mit der Pinzette unter mikroskopischer Sicht in Falcon Cups mit Hanks Salt Solution überführt. Es folgen 3 Waschschriffe mit Earls Salzen sowie die Behandlung mit 1ml Trypsin-EDTA (10min bei 37°C im Wasserbad). Die Reaktion wird nach 10min durch Zugabe von 2ml DMEM+10%FCS + Penicillin/Streptomycin gestoppt und 400µl DNase hinzupipettiert. Die durch mehrmaliges Resuspendieren mit einer 5ml-Pipette und anschließend mit einer Pasteurpipette vereinzelter Zellen werden bei 4°C 10min zentrifugiert (800rpm) und nach vorsichtigem Absaugen des Mediums mit 5ml frischem DMEM+10%FCS versehen. Nun werden zunächst Zellkulturflaschen 30min mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet und nach der Inkubationszeit 3x mit autoklaviertem H₂O gewaschen. Die Flaschen werden mit 10ml DMEM+10%FCS und der Zellsuspension befüllt. Am nächsten Tag erfolgt ein 3-facher Waschschriff mit PBS sowie anschließend die Zugabe von 10ml DMEM+10%FCS. Sobald nach wenigen Tagen mikroskopisch ein konfluenter Zellrasen zu erkennen ist, wird das Medium von DMEM auf L929-Medium gewechselt. Dies ist ein Mediumüberstand der Mausfibroblasten-Zelllinie L929 und fördert das Wachstum der Mikroglia. Die Mikroglia wächst auf einem Rasen (Monolayer) aus Astrozyten an, während die Neuronen degenerieren. Nach 10 bis 14 Tagen Kultivierung erfolgt die Separierung der Mikroglia, indem sie 30min auf dem Schüttler inkubiert und vom restlichen Zellrasen abgeschüttelt wird.

Anschließend kann die Mikroglia für Versuche in entsprechende Wells bzw. Inserts ausgesät werden.

3.4. Kokulturen

Die Tumorzelllinien MCF-7, M.410.4 und 4T-1 werden mit der Mikroglia im Verhältnis 1:2 kokultiviert. Je nach späterem Versuchsaufbau werden die Tumorzellen in 6er- oder 24er-Wells und die Mikroglia in den entsprechenden Kunststoff-Inserts ausgesät. Für spätere Immunfluoreszenzfärbungen werden die Zellen andersherum ausgesät, damit die Mikroglia auf den Deckgläsern am Boden der Wells wachsen kann. In den 6er-Wells werden pro Well 1×10^6 Tumorzellen und 2×10^6 Mikroglia eingesetzt, in den 24er-Wells 1×10^5 Tumorzellen und 2×10^5 Mikroglia.

Nach dem Aussäen müssen die Mikrogliazellen 30min und die Tumorzellen 2h anheften und werden anschließend mit DMEM+10%FCS gewaschen. Nach 24h können die verschiedenen Zelltypen dann für Kokultur-Versuche eingesetzt werden.

Die Inserts stehen nach dem vorsichtigen Einsetzen mit einer Pinzette auf kleinen Plastikfüßen im Well. Durch eine im Insert integrierte Membran mit $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße stehen die Zellen während der Inkubationszeit über das Medium in indirektem Kontakt zueinander. Für alle Kokulturversuche wird DMEM+10%FCS eingesetzt. Die Zellen werden für 96h (bzw. 24h für Immunfluoreszenzfärbungen) im CO_2 -Inkubator kokultiviert.

Folgende Substanzen wurden je nach Versuchsaufbau hinzugefügt: LPS, Dkk-1, sFRP.

3.5. RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die RNA wird mit dem gebrauchsfertigen RNeasy Kit aus 2×10^6 Mikroglia bzw. 1×10^6 Tumorzellen nach 96h Kokultivierung isoliert. Nach Zugabe eines β -Mercaptoethanol-haltigen Puffers werden die Zellen direkt im Well bzw. Insert lysiert.

Das Lysat wird in die vom Hersteller vorgesehenen Säulen überführt und die weiteren Schritte nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Im letzten Schritt wird mit 40µl RNase-freiem H₂O die RNA aus der Membran eluiert.

Die Quantifizierung der gewonnenen RNA wird mittels einer photometrischen Messung im BioPhotometer durchgeführt. Dazu wird die RNA 1:100 verdünnt und gegen Wasser als Leerwert bei 260nm und 280nm gemessen.

Die cDNA-Synthese wird mit Oligo-dT-Primern und Reverser Transkriptase (RT) durchgeführt. Dazu wird 2µg Gesamt-RNA 3min im Thermocycler auf 75°C erhitzt. Anschließend wird der Mix aus RNase Block, Oligoprimer, dNTP-Mix, Puffer und RT zugegeben und der Ansatz für 1h 5min bei 37°C inkubiert.

Die cDNA-Synthese erfolgt in einem 30µl-Versuchsansatz:

-2,0µl Gesamt-RNA

-18,9µl dd H₂O (steril)

-0,6µl RNase Block

-1,0µl Oligoprimer

-1,5µl dNTP-Mix

-6,0µl Puffer

-2,0µl Reverse Transkriptase.

3.6. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR besteht aus 3 Phasen: Denaturierung, Annealing und Elongation. Während der Denaturierungsphase werden durch Erhitzung die Wasserstoffbrücken der DNA aufgebrochen, sodass sie in Einzelsträngen vorliegt. Anschließend hybridisieren die Primer bei abgesenkter Temperatur mit der einzelsträngigen DNA (Annealing). Schließlich füllt die Polymerase während der Elongationsphase beginnend am 3'-Ende die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden wieder auf.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Sequenzen mit Hilfe dieser Standard-PCR Methode amplifiziert.

Die PCR erfolgt in einem 50µl-Reaktionsansatz:

-5,0µl 10xPCR-Puffer (-MgCl₂)

-1,0µl dNTP-Mix (10mM)

-1,0µl forward Primer

-1,0µl reverse Primer

-2,0µl cDNA Template

-0,5µl Taq Polymerase (5 U/µl)

-xµl MgCl₂,

-xµl dd H₂O (steril).

Nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5min im Thermocycler erfolgt die PCR-Reaktion mit 30 Zyklen des folgenden Standardprogrammes: Denaturierung bei 95°C für 1min, Primer-Annealing bei 64-69°C (in Abhängigkeit der Primer) für 1min, Primer-Extension bei 72°C für 1min. Zum Abschluß erfolgt ein finaler Syntheseschritt für 10min bei 72°C, danach Kühlung bei 4°C.

Sequenzen der verwendeten Primer (nach Mohamed et al. 2004):

Wnt 5a

5' TCCTATGAGAGCGCACGCAT

3' CAGCTTGCCCCGGCTGTTGA

Wnt 5b

5' TCGGAGGAGCAGGGCCGAGC

3' CAGCTTGCCCTGGCGGGTGA

Gen	MgCl ₂ mM	Annealing-Temp. (°C)	Größe (bp)
Wnt 5a	1,5	64	224
Wnt 5b	1,0	69	225

Tab. 01 Optimierte PCR-Konditionen für Wnt-5a- bzw. Wnt-5b-Amplifikation Angabe der MgCl-Konzentration im Reaktionsansatz, Annealing-Temperatur und Länge des Amplifikats

Zum Nachweis der PCR-Amplifikate erfolgt eine Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarose-Gel. Um dieses Gel herzustellen, werden 2g Agarose in 100ml 1xTBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und anschließend mit 10µl der interkalierenden Substanz Ethidiumbromid versetzt, welches an Nukleinsäuren bindet und dabei sein Absorptionsspektrum verändert (Zunahme der Intensität der Fluoreszenz-Emission um den Faktor 50–100).

Die erhitzte Agarose wird auf den Träger der Gellaufkammer gegossen. Die Herstellung der Probestaschen erfolgt durch den Einsatz eines Kammes in das noch flüssige Gel. Nach Verfestigung des Gels wird die Gellaufkammer mit 1xElektrophoresepuffer befüllt und jeweils 7,5µl PCR-Produkt + 2,5µl Loading Dye Solution bzw. 5µl DNA-Leitermix als Größenstandard pro Slot aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 120V für 90min durchgeführt. Anschließend kann unter dem UV-Transilluminator die Größe der hergestellten Amplifikate beurteilt werden.

3.7. Proteinextraktion

Die Proteine werden aus 2×10^6 Mikrogliazellen bzw. 1×10^6 Tumorzellen nach 96h Kokultivierung isoliert. Die Zellen werden zunächst mit PBS gewaschen. Auf die Mikroglia wird 100µl, auf die Tumorzellen 200µl erhitzter Solubilisationspuffer 10mM Tris-1%SDS (pH7,4) pipettiert. Mit einem Zellschaber werden die Zellen vorsichtig vom Boden des Wells bzw. des Inserts gelöst und dann in ein Schraubcup überführt. Nach anschließender Inkubation im Thermoblock (5-10min bei 95°C) wird pro 100µl Probe 1µl Proteinaseinhibitor-Cocktail hinzupipettiert.

Es folgt die Konzentrationsbestimmung mit BCA-Reagenz (Bicinchoninsäure), welches Kupfer komplexiert und hierdurch eine Farbbildung induziert. Das BCA-Reagenz besteht aus 2 Komponenten A und B, welche im Verhältnis 1:50 gemischt und dann mit den Proteinextrakten für 30min bei 60°C inkubiert werden. Unmittelbar danach werden die Proben sowie eine Eichgerade im Biophotometer bei einer Wellenlänge von 562nm vermessen.

3.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung nach ihrer Größe werden die Proben zunächst denaturiert und auf ein polyacrylamidhaltiges Gel geladen, welches aus einem 8%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel zusammengesetzt ist.

Zuerst wird das Trenngel in die Gelkammer gegossen und zur Glättung des Gelrandes mit Isopropanol überschichtet. Sobald das Gel verfestigt ist, wird das Isopropanol mittels eines Filterpapiere abgeseugt und das Sammelgel aufgetragen. Durch Einbringen eines Kamms in das noch flüssige Gel werden dabei Auftragstaschen für die Proben ausgespart. Die Gelkammer wird mit Elektrophoresepuffer befüllt und erst dann der Kamm entfernt.

Komponenten Trenngel, 8%	ml
Acrylamid	10
Tris-HCl 1,5M 2%SDS pH 8,8	10
Gelatine (2,5%)	2
Aqua bidest	18
APS 10%	0,270
TEMED	0,070

Tab. 02 Komponenten für 8%iges Trenngel

Komponenten Sammelgel, 4%	ml
Acrylamid	1,8
Tris-HCl 1,5M 2%SDS pH 6,8	3,5
Aqua bidest	9,4
APS 10%	0,150
TEMED	0,025

Tab. 03 Komponenten für 4%iges Sammelgel

Für die Western-Blot-Versuche wurden jeweils 50µg Protein pro Slot eingesetzt. Die Proben werden mit Lämmli-Laufpuffer (1/5 der höchsten eingesetzten Proteinmenge) und β-Mercaptoethanol (15% der Menge des eingesetzten Lämmli-Laufpuffers) versetzt und 5min bei 90°C im Thermoblock inkubiert.

Es folgt nun die Beladung der Taschen mit den vorbereiteten Proben. Zusätzlich wird zur späteren Größenidentifizierung ein Protein-Molekulargewichtsmarker auf jedes Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Spannung von 90V, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen haben, danach wird sie auf 120V erhöht.

3.9. Western Blot

Der spezifische Nachweis bestimmter Proteine erfolgt nach ihrer elektrophoretischen Übertragung aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine Hybond Membran durch eine immunologische Färbung mittels eines spezifischen primären Antikörpers.

Für den Blotting-Vorgang werden jeweils 3 dicke und 1 dünnes Filterpapier(e) über und unter das Gel geschichtet. Direkt unter dem Gel werden 1-2 Membranen platziert. Die Filterpapiere und Membranen werden vor dem Auflegen in Transblottpuffer getränkt. Der gesamte Stapel wird nach dem Schichten in der Blotkammer mit einer Pipette glattgerollt und ggfs. Luftblasen entfernt. Der Deckel der Blotkammer wird verschlossen und 75min bei 10V geblottet. Nach dem Blotten werden die Membranen 3-5min mit Ponceau-Rot gefärbt, um somit die gleichmäßige Beladung und den Blotting-Erfolg zu überprüfen.

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgt nach dem Blotting in PBS +1%Tween +5%Milchpulver für 30min auf dem Schüttelinkubator. Als Primärantikörper werden monoklonale Maus-Antiseren verwendet, die gegen die jeweils nachzuweisenden Proteine gerichtet sind. Als Sekundärantikörper dienen Anti-Maus-Immunglobuline, welche mit der Horseradish-Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase) konjugiert sind. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Die Inkubationsbedingungen für die jeweiligen Antikörper sind in Tab. 04 angegeben.

Antigen	1. AK	2. AK
Aktin	R&D Systems 1:1500, über Nacht/4°C	Anti-Mouse 1:2000, 1h/Raumtemp.
β-Catenin gesamt	Santa Cruz 1:1500, über Nacht/4°C	Anti-Mouse 1:2000, 1h/Raumtemp.
β-Catenin dephosphoryliert	Alexis Biochemicals 1:1500, über Nacht/4°C	Anti-Mouse 1:2000, 1h/Raumtemp.

Tab. 04 Primär- und Sekundärantikörper zum Nachweis von Aktin, β-Catenin gesamt und dephosphoryliert Angaben zur Konzentration und Inkubationszeit/-temperatur.

Nach der Inkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper erfolgt mittels Zugabe der WesternBlot Luminal Solution eine Chemilumineszenzreaktion, die nach der Entwicklung auf einem Fotofilm zu detektieren ist.

3.10. Zymographie

Die Zymographie basiert auf der Methode der Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-PAGE enthält das Zymographie-Gel zusätzlich Gelatine, so dass die Gelatinasen (z. B. MMP-2, MMP-9) nach ihrer Renaturierung das Substrat enzymatisch abbauen können. Das Gel färbt sich in diesen Arealen schwächer mit Coomassie Blue an, was als Banden sichtbar wird. Mittels rekombinanter Proteine kann dann eine Zuordnung der Banden zu einzelnen Proteasen erfolgen.

Die verwendeten Überstände werden nach 96h Kokultivierung gewonnen. Das zur Supplementierung des Mediums eingesetzte FCS wurde zuvor bereits unter sterilen Bedingungen 5x mit Gelatine Beads von Gelatinasen depletiert. Hierfür werden 100µl gereinigte Beads zu 10ml FCS gegeben und 1h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird das FCS 10min bei 4000rpm zentrifugiert und der Überstand erneut mit gereinigten Beads depletiert. Dieser Vorgang wird 4x wiederholt.

Die Proben werden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt (jeweils 10µl) und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Proben mit einer Hamilton-Pipette vorsichtig in die Taschen gegeben. Außerdem werden rekombinante Marker für MMP-2 (72 kDa) und MMP-9 (92 kDa) als Standards aufgetragen. Die Gelelektrophorese wird mit einer Spannung von 130V für 2h15min durchgeführt. Nach der Elektrophorese wird das Sammelgel abgetrennt. Zur Entfernung des SDS aus dem Gel und zur Renaturierung der Proben wird das Trenngel für 1h unter Schütteln in einem Triton-X-100-haltigen Puffer inkubiert und anschließend 3-4x in Aqua dest. gewaschen. Danach wird das Gel zunächst 30min in 100ml Entwicklungspuffer äquilibriert und über Nacht bei 37°C in frischem Entwicklungspuffer inkubiert (optimale Bedingungen für die enzymatische Wirksamkeit der Gelatinasen). Die Färbung erfolgt in einer Mischung aus 20ml Coomassie-Färbelösung und 180ml Entfärbelösung auf dem Schüttler für 4h. Anschließend wird das Gel in Entfärbelösung unter mehrmaligem Wechsel der Lösung so lange inkubiert, bis die Banden deutlich zu erkennen sind. Nach Spülung in Aqua dest. und Einweichen in Fixierungslösung kann das Gel für zwei bis drei Tage im Trocknungsrahmen zwischen Cellophanfolie trocknen.

3.11. Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material durchgeführt. Die Anfertigung der Gewebeschnitte sowie die KiM1P-Färbungen erfolgte durch die Abteilung Neuropathologie im Rahmen der Studie *Die Bedeutung des Tumorstromas im Hinblick auf die Tumorprogression und die verantwortlichen Signalwege*. Es wurden jeweils entsprechende Isotypkontrollen mitgeführt.

Die Schnitte werden zunächst mittels einer absteigenden Ethanolreihe entparaffiniert und dann rehydriert. Um das Antigen zu demaskieren, werden die Objektträger in eine vortemperierte Target Retrieval Solution (pH 6,1) eingelegt und 20min im Dampfgarer inkubiert. Nach 30min Abkühlungsphase und zweifachem Waschen in PBS werden die Schnitte zum Blockieren der endogenen Peroxidase für 20min mit

3% H_2O_2 behandelt. Nach erneutem Waschen erfolgt die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30min mit 2%Humanserum. Anschließend werden die Objektträger mit dem unkonjugierten Primärantikörper beschichtet und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Schnitte wieder gewaschen und dann für 1h bei Raumtemperatur mit dem konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend werden die Präparate erneut mit PBS gewaschen und in eine feuchte Kammer gelegt. Nun werden die Schnitte mit chromogenem Substrat beschichtet. Nach etwa 20min tritt infolge der Enzym-Substrat-Reaktion eine deutliche rötliche Verfärbung der Präparate auf. Es folgt ein 20min Waschschriff mit Aqua dest. und anschließend die Gegenfärbung für 5min in Hämalau. Die Schnitte werden für 20min unter fließendem Leitungswasser gebläut und dann mit Aquamount eingedeckelt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte am Inversmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen, Deutschland).

3.12. Immunfluoreszenzfärbung

Die Mikroglia wird auf sterile, runde Deckgläser (Durchmesser: 10mm) in 24-Lochplatten ausgesät und mit Tumorzellen in Inserts kokultiviert. Es werden 5×10^4 Mikrogliazellen pro Deckglas und 3×10^4 Tumorzellen (jeweils MCF-7, 4T-1 oder M.410.4) pro Insert ausgesät. Nach 24h Kokultivierung werden die Inserts verworfen und die Deckgläser 3x mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen 20min mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und erneut wieder gewaschen. Um die Permeabilität der Zellmembran zu erhöhen, wird die Mikroglia 10min mit Triton X inkubiert. Nach dem erneuten Waschschriff werden die Deckgläser über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper bzw. Phalloidin inkubiert. Das Farbstoff-gebundene Phalloidin (Toxin des Weißen Knollenblätterpilzes) bindet spezifisch an Aktin und erfordert daher keinen Sekundärantikörper. Phalloidin wird 1:50 in PBS verdünnt. β -Catenin- und Wnt-5a-Antikörper werden beide in einer Verdünnung von 1:100 in PBS eingesetzt. Am nächsten Tag werden die Deckgläser in einem 24er Well 3x2min gewaschen. Es folgt die lichtgeschützte Inkubation mit

dem FITC-gelabelten Sekundärantikörper. Anschließend werden die Deckgläser erneut im 24er Well gewaschen.

Zur Darstellung der Zellkerne werden die Zellen für 5min mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) gefärbt. Nach abschließendem Waschen werden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten mit Moviol auf Objektträger aufgeklebt und lichtgeschützt gelagert. Nach 24h Trocknen können die Präparate mikroskopiert werden. Hierbei werden die fluoreszierenden Präparate durch Anregungslicht einer geeigneten Wellenlänge beleuchtet (durch das Objektiv), die emittierte Fluoreszenz wird wieder in das Objektiv gestrahlt und durch geeignete Filtersysteme vom Anregungslicht getrennt und zum Okular bzw. PC weitergeleitet. Für FITC (Anregung bei 495nm, Emission 519nm) und Phalloidin (Anregung bei 495nm, Emission 520nm) werden die Filter 480/40nm als Anregungs- und 535/50nm als Emissionsfilter verwendet. Für DAPI (UV-Licht, Anregung bei 358nm, Emission 463 nm) werden die Filter 365nm als Anregungs- und 525nm als Emissionsfilter benutzt.

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte am Axioskop 2 Plus (Zeiss, Göttingen, Deutschland).

3.13. Boyden-Chamber-Mikroinvasionsassay

In einer modifizierten Boyden-Kammer werden Mikroglia und Mammakarzinom-Zelllinien ohne direkten Zell-Zell-Kontakt kokultiviert. Nach 96h Inkubationszeit werden die Zellen, die durch eine mit Extrazellulärer Matrix (ECM) beschichtete artifizielle Basalmembran vom oberen in den unteren Teil der Kammer invadiert sind, aufgenommen, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt sowie für einen Cytospin mit anschließender DAPI-Färbung zur Zellzählung verwendet.

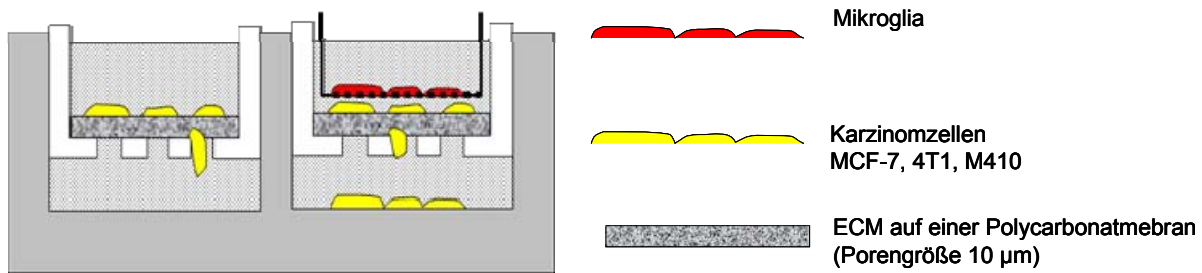


Abb. 05 Schematische Darstellung eines Boyden-Chamber-Invasionsassays Mikrogliazellen befinden sich im Insert, Tumorzellen im Well. Durch 10 μm große Poren können die Tumorzellen in den unteren Teil der Kammer invadieren.

Zunächst werden 250 μl ECM mit 750 μl serumfreiem Medium gelöst und unmittelbar danach auf einer Polycarbonatmembran (Porengröße 10 μm) ausgestrichen und 10min trocknen gelassen. Beide Substanzen werden zuvor bei 4°C gekühlt, daher sollte dieser Arbeitsschritt möglichst zügig vollzogen werden. Der untere Teil der Boyden-Kammer wird unter Bildung eines konvexen Flüssigkeitsspiegels mit Medium befüllt, anschließend die beschichtete Membran aufgelegt und der obere Teil der Kammer aufgesetzt. Mit einem sterilen Imbusschlüssel wird die Kammer von der Mitte ausgehend verschraubt. Die oberen Wells werden mit je 0,5ml Medium befüllt. Im Brutschrank wird die Membran für mindestens 30min äquilibriert. Anschließend wird vorsichtig das Medium abgesaugt und die Zellen (1 $\times 10^5$ Tumorzellen im Well der Boyden-Kammer und 2 $\times 10^5$ Mikrogliia im Insert) ausgesät.

Nach 96h wird das Medium oberhalb der Membran abgenommen, mit einer Pipette die Membran durchstoßen und das Medium mit allen zellulären Bestandteilen unter sorgfältigem Kratzen vom Boden der Kammer aufgenommen. Es werden jeweils drei identisch befüllte Wells in einem 15ml-Falcon-Cup zusammengefasst und 5min bei 1500rpm zentrifugiert. Das Pellet wird mit 5ml PBS resuspendiert und wieder 5min bei 1500rpm zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand auf 1ml reduziert und das Pellet gründlich resuspendiert und gevortext. Die Zellen werden in der Neubauer-Zählkammer unter dem Inversmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen, Deutschland) bei einer Vergrößerung von 10x40 pro HPF (High Power Field) ausgezählt. Nach der Auszählung von 4 Quadranten wurde jeweils der Mittelwert +/- Standardabweichung errechnet.

Für den Cytospin werden 200 μl der Zellsuspension 5min bei 800rpm zentrifugiert und mindestens 2h luftgetrocknet. Die Objektträger werden in PBS gewaschen und die

Zellen für 5min mit DAPI-Lösung gefärbt. Nach abschließendem Waschen werden mit Moviol Deckgläser auf die Objektträger aufgebracht. Intakte Zellkerne pro HPF wurden mittels UV-Mikroskopie bei einer Vergrößerung von 10x63 ausgezählt. Die Auswertung der Cytospin-Versuche erfolgte am Axioskop 200M (Zeiss, Göttingen, Deutschland)

3.14. Viabilitätsassay mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test (MTT-Assay)

In diesem Test wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt. Die Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen, gelben Tetrazoliums Salzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blauen, unlöslichen Formazan. Da der Farbstoff nur von vitalen Zellen umgesetzt wird, ist die gemessene Absorption direkt proportional zur Menge der vitalen Zellen. Für den Test werden in Triplikaten je 1×10^5 Tumorzellen (MCF-7, 4T-1 und M.410.4) und 2×10^5 Mikroglia pro Well einer 24er-Well-Platte bzw. pro Insert ausgesät.

Nach 20 bis 24h wird in allen Vertiefungen 100 μ l MTT-Stammlösung (5mg/ml) hinzugefügt. Es findet dann eine weitere Inkubation der Zellen für 4h statt. Danach wird das MTT-Medium entnommen und die Zellen werden im MTT-Lyse-Puffer (75% Ameisensäure (v/v), 25% DMSO (v/v)) lysiert, gemischt und in eine 96-Loch-Platte überführt. Diese kann bei 562nm in einem ELISA-Reader gemessen werden. Es werden die Mittelwerte der Extinktionen aus den triplikaten Ansätzen gebildet und ins Verhältnis zu der monokultivierten bzw. unstimulierten Kontrolle gesetzt.

3.15. Statistik

In-vitro-Daten werden als Mittelwerte (MW) +/- Standardabweichung (SD) bzw. Standardfehler (SEM) präsentiert. Statistische Signifikanzen wurden mittels Student's T-Test berechnet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant bewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Invasivitätsmessungen

4.1.1. MTT-Assay

Die Messung des MTT-Einbaus in die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in Mono- und Kokultur mit Mikroglia zeigt, dass es keine Unterschiede zwischen den kokultivierten Zellen und der Kontrolle gibt. Daraus lässt sich ableiten, dass etwaige Unterschiede in der Invasion nicht auf einer veränderten Viabilität beruhen. In der Abbildung 06 sind die für die kokultivierten Zellen gemessenen Absorptionen in Prozent der Kontrolle dargestellt.

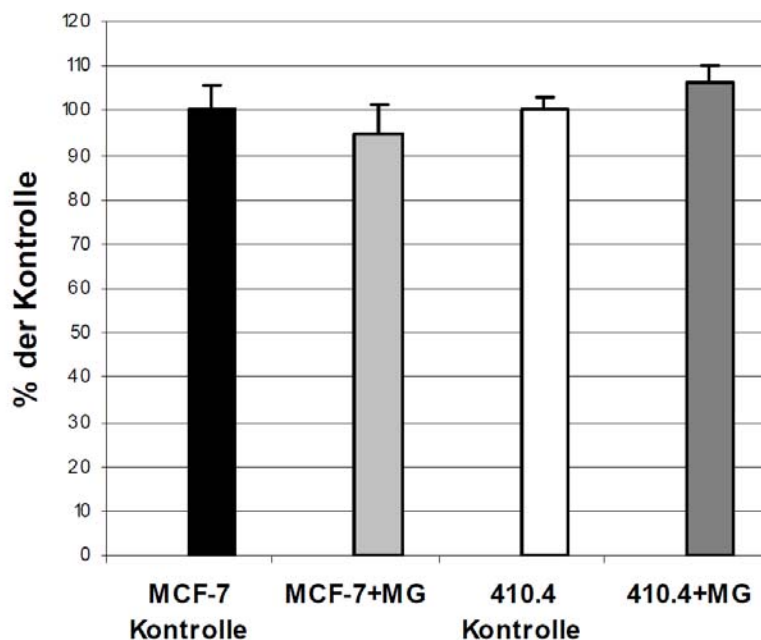


Abb. 06 Viabilitätsrate +/- Kokultur im MTT-Test der Tumorzelllinien MCF-7 und M.410.4 Pro Versuchsansatz 1×10^5 Tumorzellen +/- 2×10^5 Mikrogliazellen. Jeweils Kontrolle und nach 24h Kokultivierung mit Mikroglia. MW +/- SD aus triplikaten Versuchsansätzen. Keine signifikanten Schwankungen der Viabilität.

4.1.2. Zellzählung

Die per Zellzählung ermittelte Proliferationsrate nach 96h Kokultur liegt im Rahmen biologischer Schwankungen. Somit kann ein Effekt auf die Invasion im Rahmen einer veränderten Proliferation und Stoffwechselaktivität als Folge der Kokultivierung ausgeschlossen werden.

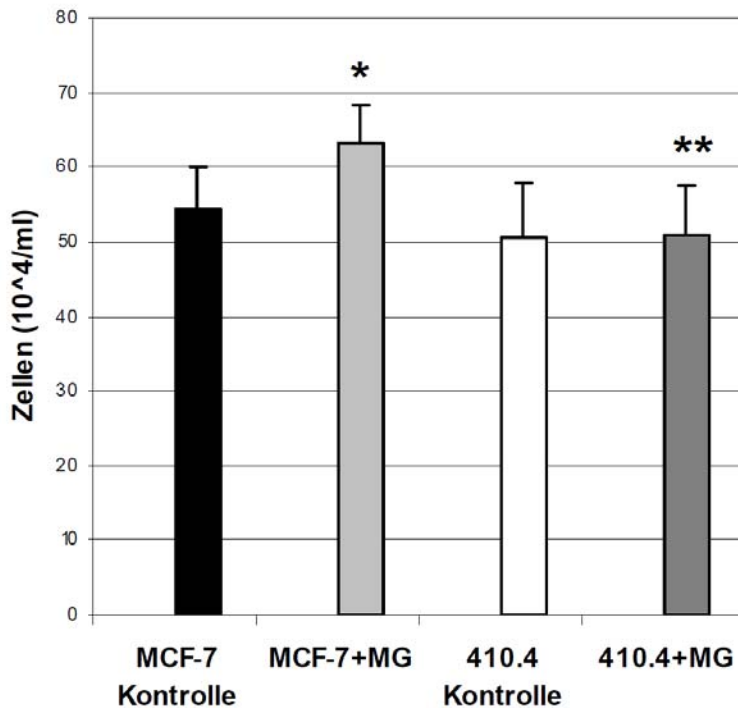


Abb. 07 Proliferationsrate +/- Kokultur nach 96h Pro Versuchsansatz 1×10^5 Tumorzellen +/- 2×10^5 Mikroglia. MW +/- SEM aus triplikativen Versuchsansätzen. Kein signifikanter Effekt auf die Proliferation der Karzinomzellen durch Kokultivierung mit Mikroglia. Für die Kokulturansätze im Vergleich zur Kontrolle wurden die Signifikanzen mittels T-Test berechnet. * $p=0,0512$ ** $p=0,9088$

4.1.3. Boyden-Chamber-Mikroinvasionsassay

Im Boyden-Chamber-Invasionsassay kann als Effekt der Kokultivierung mit Mikroglia für 96h eine gesteigerte Invasivität der Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und M.410.4 im Vergleich zur Monokultur gezeigt werden (Abb. 08). Es wandern signifikant mehr Tumorzellen durch die Polycarbonatmembran in den unteren Teil der modifizierten Boyden-Kammer. Die invadierten Zellen wurden unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung von 10×40 pro HPF (High Power Field) ausgezählt. Um die Rolle des Wnt-Signaling an der Mikroglia-induzierten Invasion der Tumorzellen zu untersuchen, wurden für die Kokultur-Experimente die Wnt-

spezifischen Inhibitoren Dkk-1 und sFRP1 eingesetzt. Der proinvasive Effekt der Kokultivierung mit Mikroglia lässt sich sowohl durch den Zusatz von Dkk-1 als auch sFRP1 partiell antagonisieren (Abb. 09). Durch Pathogenstimulation der Kokulturen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) wird der invasionssteigernde Effekt der Mikroglia ebenfalls vermindert (Abb. 11).

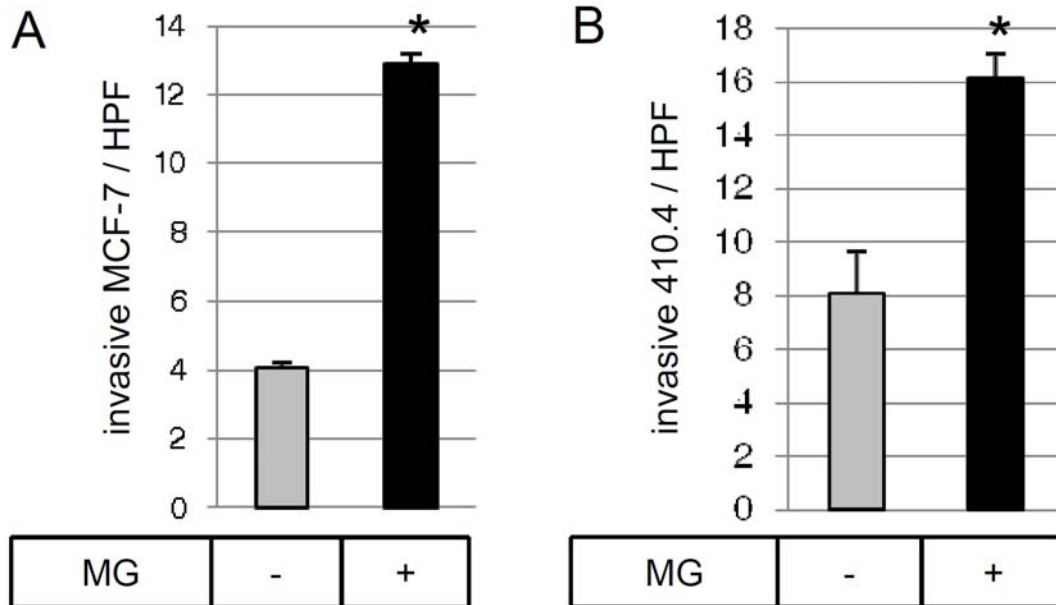


Abb. 08 Invasivitätssteigerung der Tumorzellen durch Mikroglia im Mikroinvasionsassay
A MCF-7 +/- Mikroglia **B** M.410.4 +/- Mikroglia. 1×10^5 Tumorzellen +/- 2×10^5 Mikroglia im Insert wurden 96h in der Boyden Chamber kokultiviert und anschließend die invadierten Zellen in der Neubauer-Zählkammer pro High Power Field (HPF) ausgezählt. Die Invasivität beider Tumorzelllinien wird durch die Kokultivierung mit Mikroglia gesteigert. MW +/- SD aus >5 Versuchen. Die Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle wurden mittels T-Test berechnet. * $p < 0,0001$.

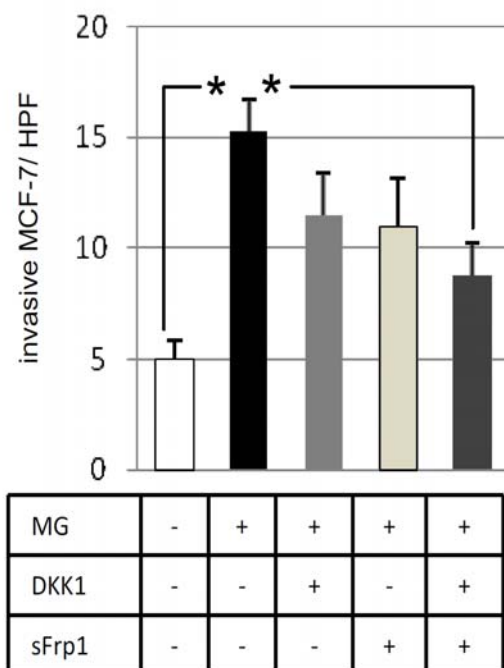


Abb. 09 Partielle Inhibition der proinvasiven Effekte durch Dkk1 und sFRP1 im Mikroinvasionsassay 1×10^5 Tumorzellen +/- 2×10^5 Mikroglia im Insert +/- 100ng/mL Dkk-1 bzw. 400ng/mL sFRP1 wurden 96h in der Boyden Chamber kokultiviert und anschließend die invadierten Zellen in der Neubauer-Zählkammer pro High Power Field (HPF) ausgezählt. Die durch Kokultur mit der Mikroglia induzierte Steigerung der Invasivität wird durch die Wnt-Inhibitoren Dkk-1 und sFRP1 reduziert. MW +/- SD aus >5 Versuchen. Die Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle wurden mittels T-Test berechnet. * $p < 0,0001$.

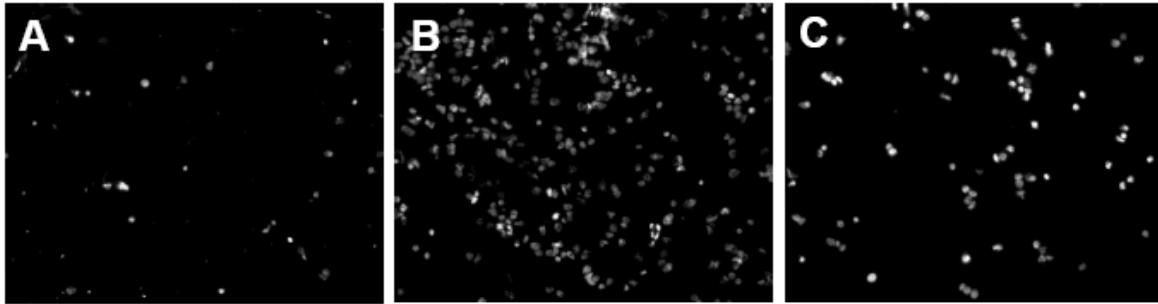


Abb. 10 Invasionsrate der Tumorzelllinie MCF-7 unter verschiedenen Konditionen

DAPI-Färbung von Cytospin-Versuchen, Vergrößerung 10x10.

A MCF-7 Kontrolle **B** Nach Kokultivierung mit Mikroglia **C** Nach Kokultivierung mit Mikroglia + Dkk-1
Man erkennt die DAPI-gefärbten Nuklei der Karzinomzellen, die innerhalb von 96h durch die ECM-beschichtete Membran des Mikroinvasionsassays invadiert sind.

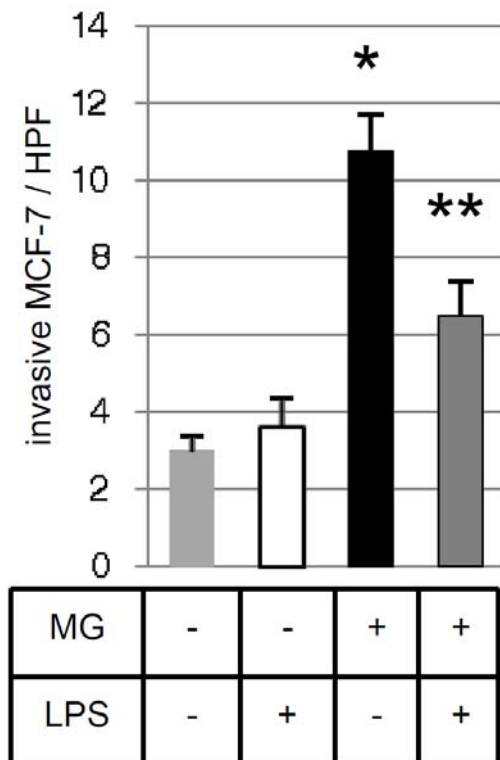


Abb. 11 Reduktion der proinvasiven Effekte durch LPS im Mikroinvasionsassay 1×10^5 Tumorzellen +/- 2×10^5 Mikroglia im Insert +/- 10ng/mL LPS wurden 96h in der Boyden Chamber kokultiviert und anschließend die invadierten Zellen in der Neubauer-Zählkammer pro High Power Field (HPF) ausgezählt. Die durch Kokultur mit der Mikroglia induzierte Steigerung der Invasivität wird durch die LPS reduziert. MW +/- SD aus >5 Versuchen. Die Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle wurden mittels T-Test berechnet. * und ** $p < 0,0001$.

4.2. Untersuchungen auf Protein-Ebene

4.2.1. Western Blot

Um eine mögliche Aktivierung des Kanonischen Wnt-Signalweges im Rahmen der invasionsfördernden Effekte der Kokultivierung zu untersuchen, wurde in Western-Blot-Versuchen die Expression von β -Catenin analysiert.

Unter Kokultivierung mit der Tumorzelllinie MCF-7 zeigt sich kein Anstieg des β -Catenins in den Mikrogliazellen. Auch in den Mammakarzinomzellen selbst kann keine Veränderung der β -Catenin-Expression durch Kokultivierung festgestellt werden. Die Zusätze von LPS oder Dkk scheinen ebenfalls hierauf keinen Effekt zu haben.

Es wurde jeweils eine Ladekontrolle mit Aktin durchgeführt, um die gleichmäßige Beladung der Slots des Gels zu überprüfen. Jeder Slot wurde mit 50 μ g des Proteins beladen.

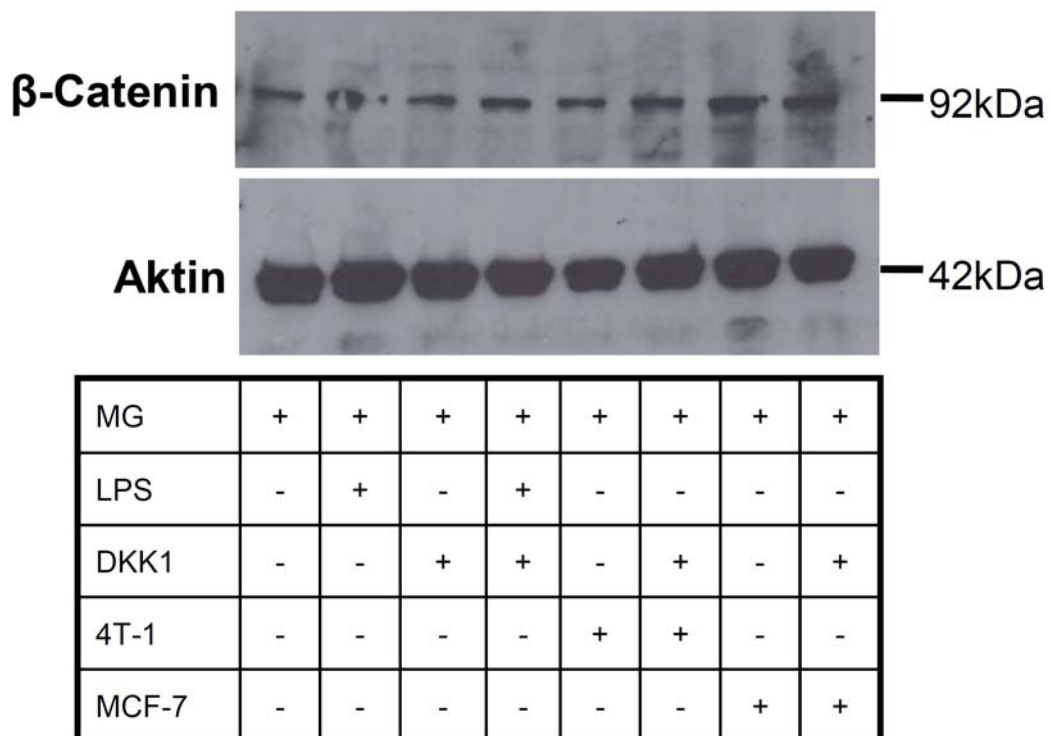


Abb. 12 Western Blot zur Detektion von β -Catenin in Mikroglia Jeweils Kontrolle und nach 96h Kokultivierung mit Tumorzellen +/- 100ng/ml Dkk-1 bzw. 10ng/ml LPS. 8%iges SDS-Gel. β -Catenin-AK 1:1500, Aktin-AK 1:1000 (Ladekontrolle). Keine Veränderung der β -Catenin-Expression in Mikroglia nach Kokultivierung mit MCF-7 und 4T-1.

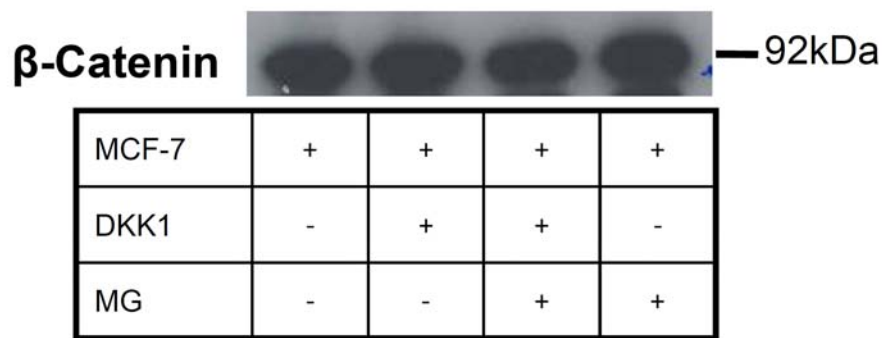


Abb. 13 Western Blot zur Detektion von β-Catenin in MCF-7 Kontrolle und nach 96h Kokultivierung mit Mikroglia +/- 100ng/ml Dkk-1. 8%iges SDS-Gel. β-Catenin-AK 1:1500. Keine Veränderung der β-Catenin-Expression in den Tumorzellen.

4.2.2. Zymographie

Mittels Gelatine-Zymographie wurden die Matrix-Metalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 in den Kulturüberständen (nach 96h Inkubationszeit) bestimmt. MMPs können sowohl von Tumorzellen selbst als auch von TAM produziert werden und hierdurch invasionsfördernd wirken.

Es zeigt sich in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche keine Beeinflussung der MMP-Produktion durch Kokultivierung der Mikroglia mit den Mammakarzinomzelllinien. Die Tumorzelllinie MCF-7 produziert in der Monokultur sowohl MMP-9 als auch geringe Mengen MMP-2. Die Mikroglia bildet geringfügig ebenfalls MMP-2 in Monokultur. In den Überständen aus Kokulturen ist lediglich ein additiver Effekt durch Zusammengabe der beiden Zellarten, aber keine Steigerung der MMP-Synthese zu erkennen. Auf jedes Gel wurde jeweils eine Kontrolle DMEM (versetzt mit 10%igem, 5x depletierten FCS) sowie rekombinante MMP-2 und MMP-9 als Größenmarker aufgetragen.

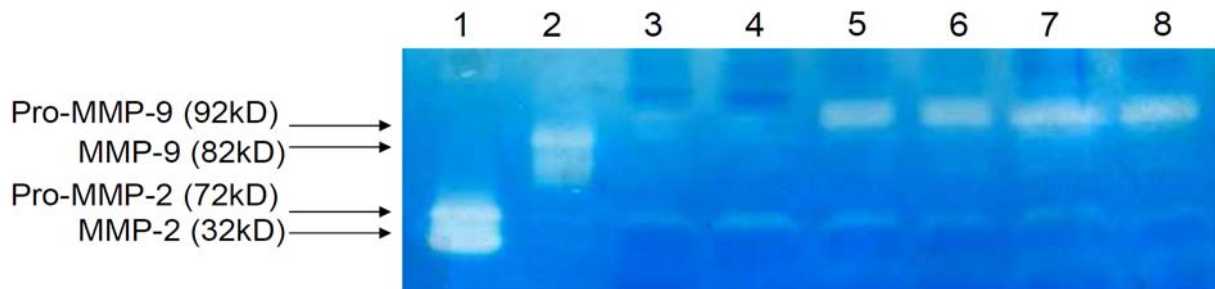


Abb. 14 Einfluss der Kokultivierung auf die MMP-Produktion 8%iges Gelatingel, Inkubationszeit 48h bei 37°C. **1** Standard-MMP-2 **2** Standard-MMP-9 **3** MG Ctl **4** MG + Dkk-1 **5** MG + MCF-7 **6** MG + MCF-7 + Dkk-1 **7** MCF-7 Ctl **8** MCF-7 + Dkk-1. Die Überstände wurden von Mono- / Kokulturen nach 96h gewonnen. Keine Änderung der MMP-2- und MMP-9-Sekretion in das Medium der Kokulturen.

4.3. Semiquantitative mRNA-Expressionsanalyse

Mittels RT-PCR wurde die Expression von Wnt-Genen in der Mikroglia untersucht.

Die Ergebnisse der durchgeführten PCRs zeigen eine Expression von Wnt-5a- und Wnt-5b-mRNA in Mono- und Kokultur in Mikrogliazellen aus P0-Mausgehirnen. Dies konnte sowohl für die Kokultivierung mit der humanen Zelllinie MCF-7 (hier nicht dargestellt) als auch mit der murinen Zelllinie M.410.4 (Abb. 15) nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle der cDNA-Qualität wurde jeweils eine β -Aktin-PCR durchgeführt.

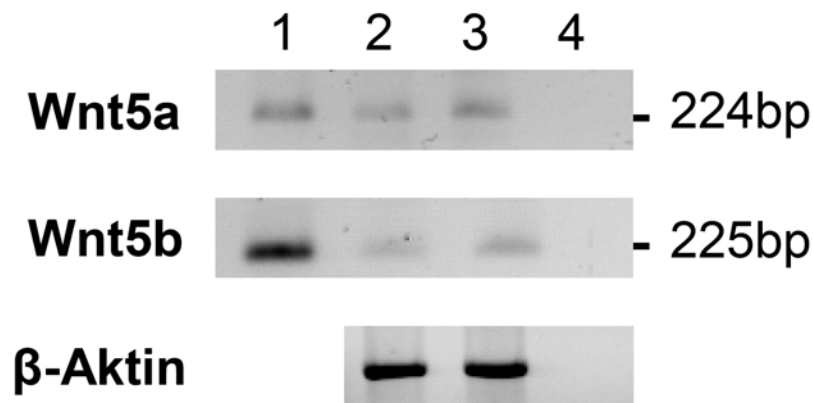


Abb. 15 Nachweis der RT-PCR-Amplifikate 1 Positivkontrolle 2 Mikroglia-Kontrolle 3 Mikroglia + M.410.4 4 Negativkontrolle. Das 2%ige Agarosegel wurde mit 7,5µl Probe/Slot beladen. Nachweis der Wnt-5a- und Wnt-5b-mRNA in Mikrogliazellen in Mono- und Kokulturen.

4.4. Immunhistochemische Darstellung der Mikroglia/Makrophagen in Hirnmetastasen

Mittels Immunhistochemiefärbungen mit dem Antikörper KiM1P kann eine diffuse Infiltration durch Mikrogliazellen/Makrophagen in Hirnmetastasen von 5 Patientinnen mit dem Primärtumor Mammakarzinom nachgewiesen werden. Analog zu diesen Gewebeschnitten wurden H&E-Färbungen zur Lokalisierung der KiM1P-positiven Zellen verwendet. Die Mikroglia/Makrophagen finden sich in großer Anzahl inmitten der Tumorzellen, durchsetzen aber auch nekrotische und fibrotische Areale, Stroma und die Dura mater. Die malignen Zellen der Hirnmetastasen stehen in direktem Zellkontakt zu den Mikrogliazellen/Makrophagen (Abb. 16 F).

Mittels Durchlichtmikroskopie wurden homologe Areale der KiM1P- und H&E-Färbungen miteinander verglichen.

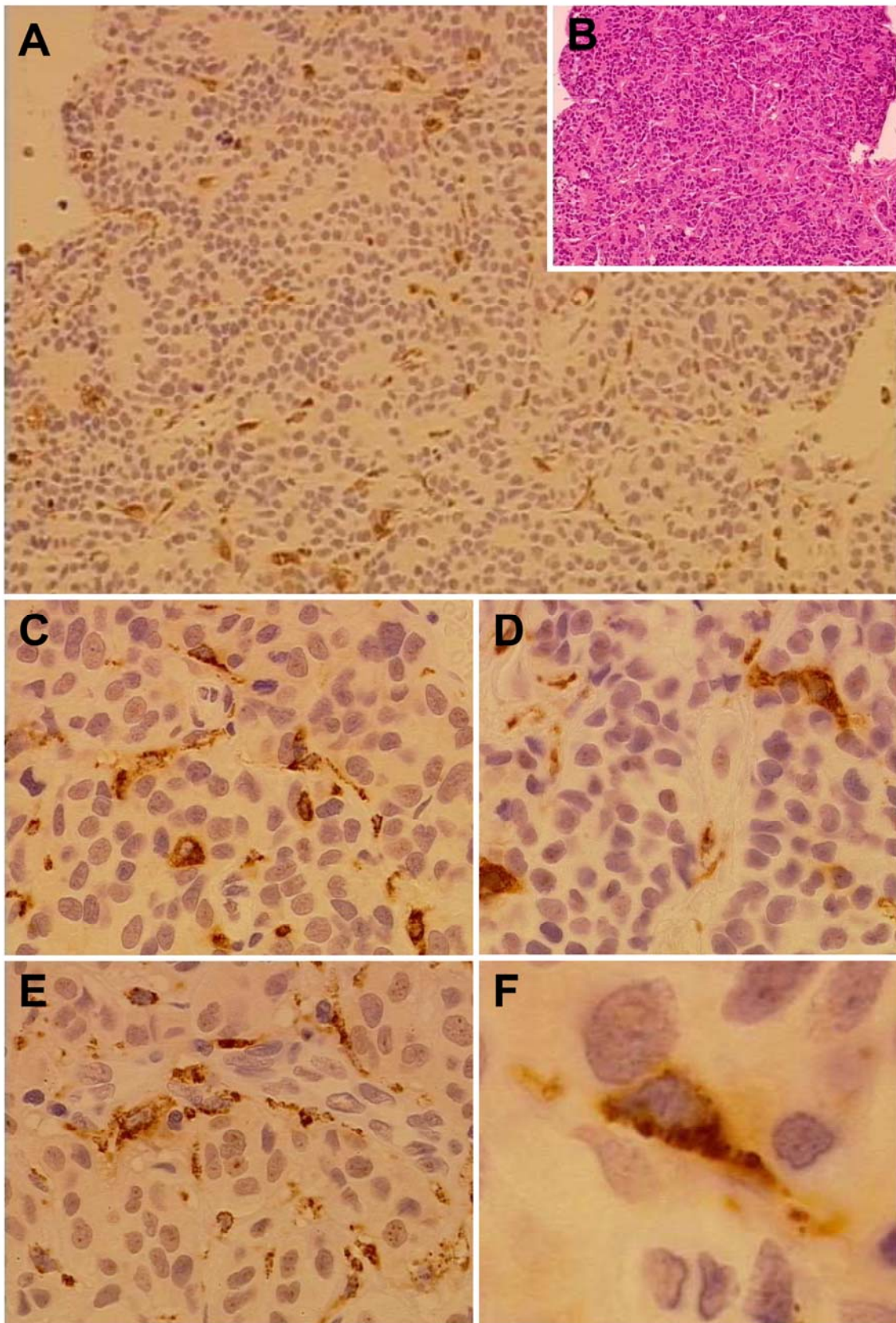


Abb. 16 Immunhistochemiefärbung der Mikroglia/Makrophagen in humanen Hirnmetastasen
A KiM1P, Vergrößerung 10x10 **B** Homologes Areal H&E-Färbung, Vergrößerung 10x10 **C-E** KiM1P, Vergrößerung 10x40 **F** KiM1P, Vergrößerung 10x100
Diffuse Infiltration der Hirnmetastasen durch KiM1P-positive Zellen (braun). Die Färbungen wurden an Gewebe von 5 Patientinnen mit zerebralen Metastasen eines primären Mammakarzinoms durchgeführt.

4.5. Immunfluoreszenzmikroskopie

4.5.1. Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts

Mittels Phalloidin-Färbung kann das Aktin-Zytoskelett dargestellt werden. Hierbei zeigen sich deutliche morphologische Veränderungen der Mikroglia nach Kokultivierung. Die Färbungen wurden jeweils nach 24h Kokultur bzw. Stimulation mit LPS angefertigt. Es wurden pro Färbung mikroskopisch jeweils 20 repräsentative Zellen in der Vergrößerung 10x100 nach morphologischen Kriterien eingeteilt.

Es wird hier zwischen einem ramifizierten, amöboiden und „seeigelförmigen“ Zelltypus differenziert. Der ramifizierte Typus ist charakterisiert durch lange Zellausläufer und kleine Zellkörper und zeigt den Ruhezustand der Mikroglia an. Ein Zwischenstadium zwischen ruhend und voll aktiviert stellt der amöboide Zelltyp dar. Er zeigt sich in Mikrogliaulturen und wird durch Kultivierung mit Astrozyten-konditioniertem Medium zum ramifizierten Typ transformiert. Die „seeigelförmige“ Morphe weist multiple filiforme und eher kürzere Zellausläufer auf und ist bislang nicht in der Literatur beschrieben. Derartige Zellen wurden fast ausschließlich nach Kokultivierung der Mikroglia mit Mammakarzinomzelllinien sowie in geringerer Anzahl auch nach Stimulation der Zellen mit LPS detektiert. Es zeigt sich nach Kokultivierung eine starke Verschiebung vom ramifizierten Zelltyp hin zu multiplen filiformen Zellausläufern. Die Abbildungen 14 a-c zeigen die verschiedenen beobachteten morphologischen Erscheinungsbilder der Mikroglia.

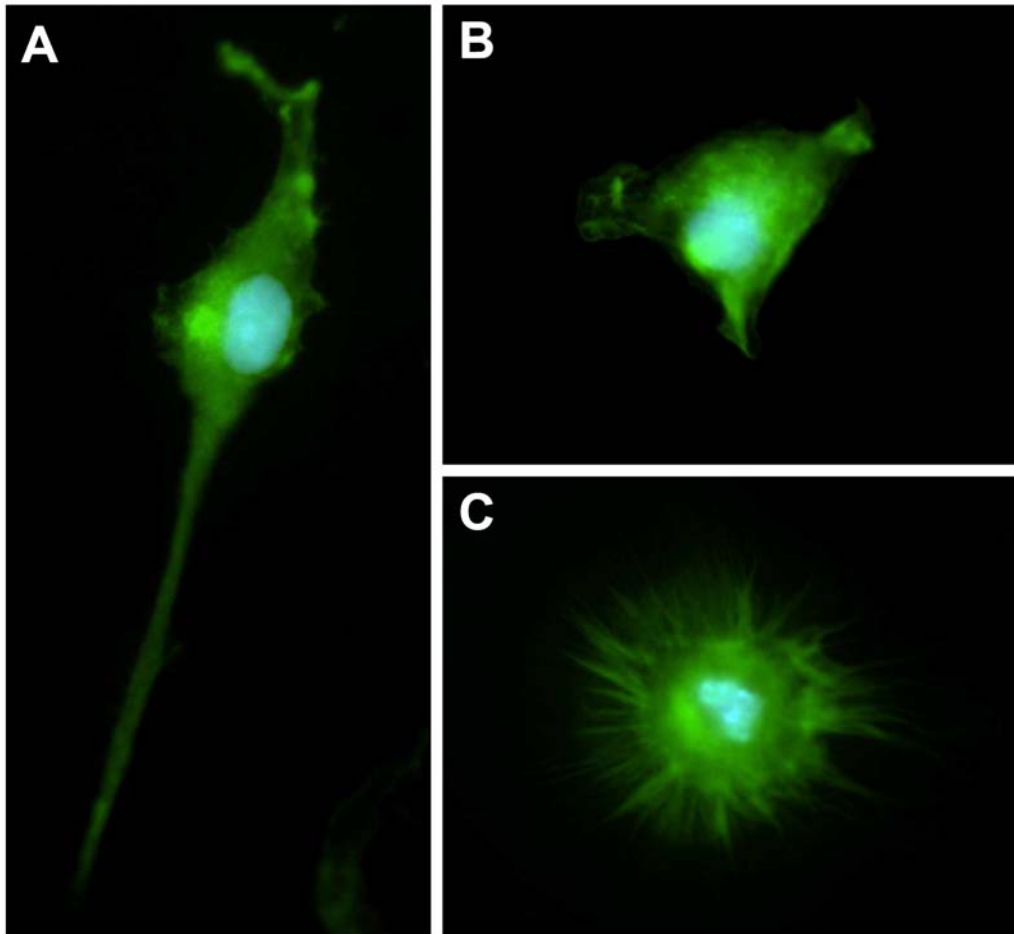


Abb. 17 Phalloidin-Färbung der Mikroglia Auf Deckgläsern adhärenente Zellen, fixiert mit PFA, DAPI-Kernfärbung. Vergrößerung 10x100 **A** ramifiziert **B** amöboid **C** multiple filiforme Zellausläufer („Seeigel-Form“). In Monokultur der Mikroglia finden sich überwiegend ramifizierte und amöboide Mikrogliazellen, in Kokultur mit Tumorzellen zeigt sich ein gehäuftes Auftreten von Zellen mit multiplen filiformen Ausläufern.

	Ramifiziert	Amöboid	Multiple filiforme Zellausläufer
Mikroglia-Kontrolle	9,0 (+/-1,2)	8,1 (+/-1,5)	1,2 (+/-1,6)
Mikroglia+MCF-7	1,3 (+/-1,5)	7,7 (+/-4,9)	11,0 (+/-6,2)
Mikroglia+M.410.4	1,3 (+/-1,9)	5,0 (+/-3,6)	13,7 (+/-5,9)

Tab. 05 Morphologische Kategorisierung der Mikroglia Auswertung von jeweils 20 Zellen in drei verschiedenen Experimenten, MW +/- SD. In Monokultur der Mikroglia wurden fast ausschließlich ramifizierte und amöboide Zellen beobachtet. In Kokulturen mit Mammakarzinomzellen vermehrtes Auftreten von Zellen mit multiplen filiformen Zellausläufern und kaum ramifizierte Zellen.

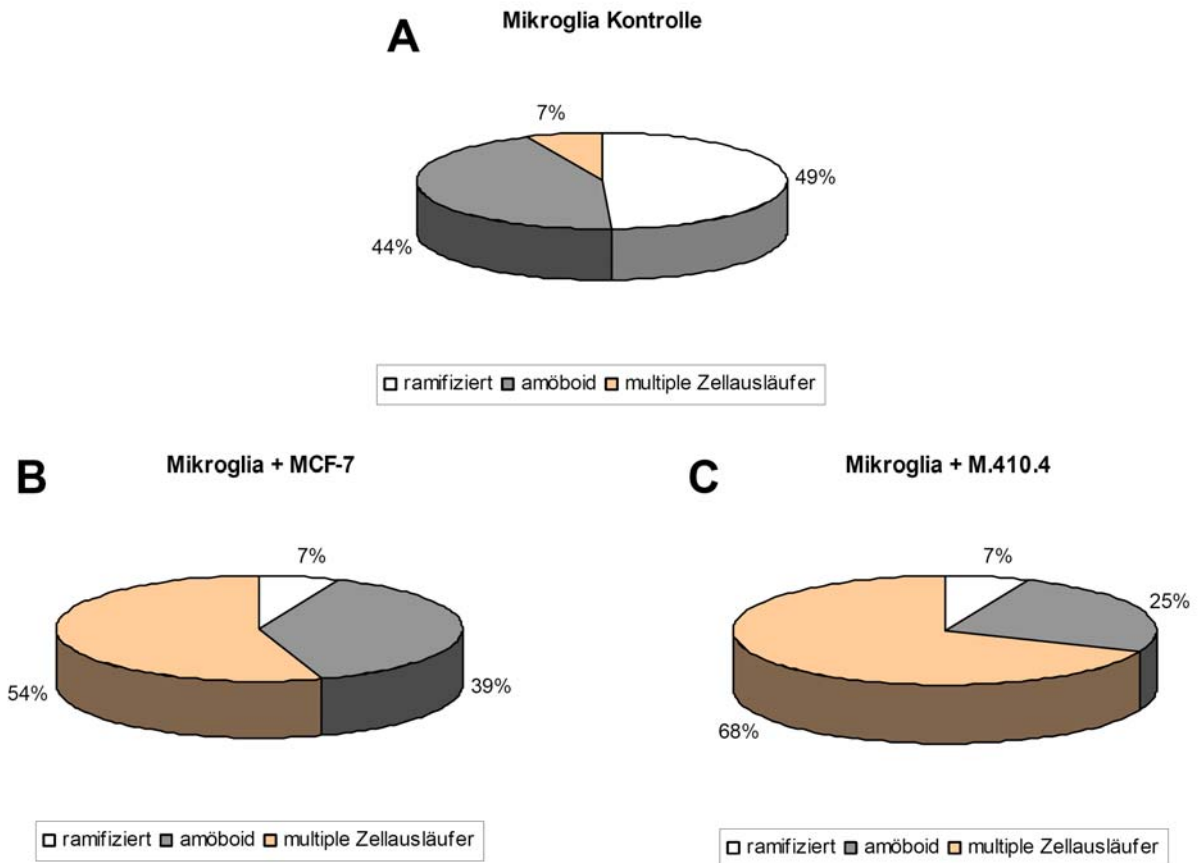


Abb. 18 Prozentuales Verteilungsmuster der morphologischen Erscheinungsbilder der Mikroglia **A** Mikroglia-Kontrolle **B** Mikroglia in Kokultur mit MCF-7 **C** Mikroglia in Kokultur mit M.410.4. Nach Kokultivierung mit Tumorzellen bilden Mikrogliazellen vermehrt multiple filiforme Zellausläufer.

4.5.2. Wnt-5a-Expression

In der Immunfluoreszenzfärbung können keine signifikanten Unterschiede in der Wnt-5a-Expression zwischen Mikroglia-Kontrollen und mit Mammakarzinomzellen kokultivierter Mikroglia festgestellt werden. Analog zu den Ergebnissen der RT-PCR färben sich sowohl die mono- als auch die kokultivierten Mikrogliazellen Wnt-5a-positiv.

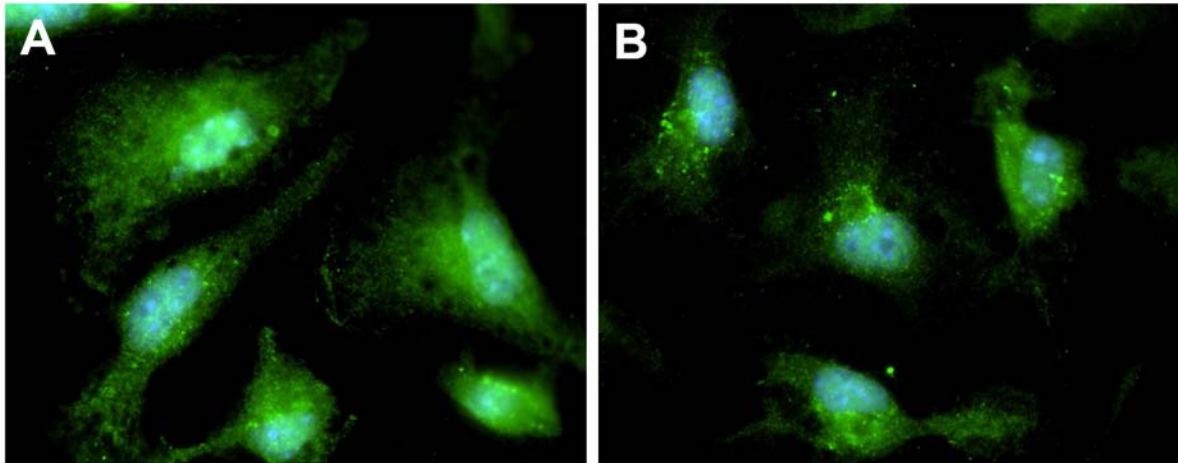


Abb. 19 Wnt-5a-Färbung der Mikroglia Auf Deckgläsern adhärente Zellen, fixiert mit PFA, DAPI-Kernfärbung. Vergrößerung 10x100. **A** Mikroglia-Kontrolle **B** nach 24 h Kokultur mit M.410.4. Mono- und kokultivierte Mikrogliazellen exprimieren Wnt 5a.

4.5.3. β -Catenin-Expression

Die Mikroglia zeigt sich sowohl in der Kontrolle als auch in der Kokultur schwach positiv für β -Catenin. Die Zellen färben sich gleichmäßig an und weisen keine Anzeichen für eine Translokation von β -Catenin in den Nukleus nach Kokultivierung auf.

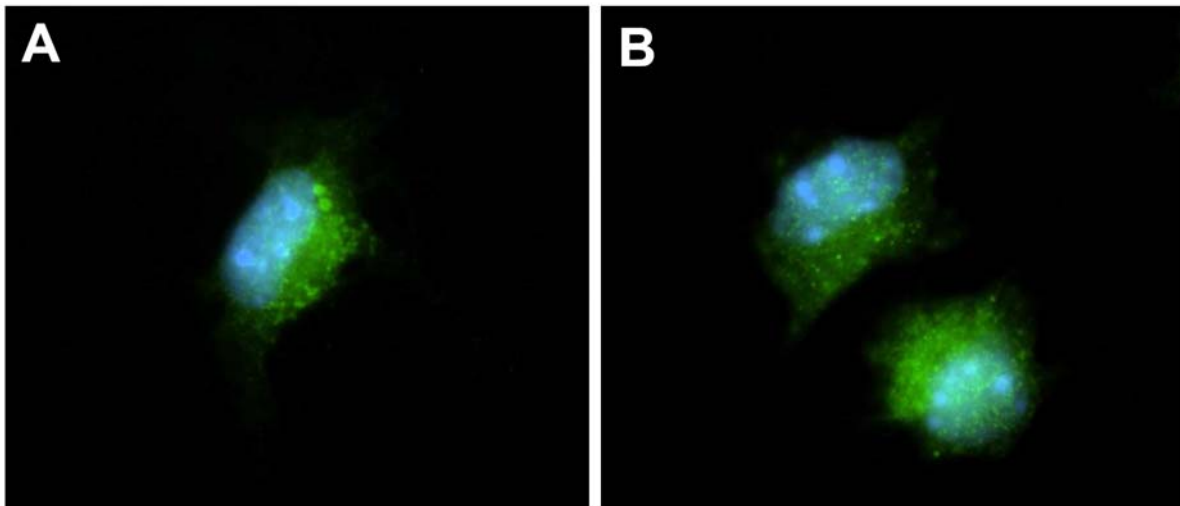


Abb. 20 β -Catenin-Färbung der Mikroglia Auf Deckgläsern adhärente Zellen, fixiert mit PFA, DAPI-Kernfärbung. Vergrößerung 10x100. **A** Mikroglia-Kontrolle **B** nach 24 h Kokultur mit M.410.4. Mono- und kokultivierte Mikrogliazellen exprimieren β -Catenin, keine Anzeichen für β -Catenin-Translokation in den Nukleus in kokultivierten Zellen.

5. Diskussion

Makrophagen können die Tumorprogression durch Steigerung der Invasivität der malignen Zellen fördern. Wie diese Arbeitsgruppe kürzlich zeigen konnte, wird durch die Kokultivierung mit Mammakarzinomzellen die Sekretion von Wnt 5a in Tumorassoziierten Makrophagen (TAM) induziert. In den Tumorzellen bewirkt Wnt 5a über die Aktivierung von c-Jun und AP-1 und Sekretion von TNF- α und MMP-7 eine Steigerung der Invasivität. Die lokale Invasion im Organ des Primärtumors ist einer der ersten Schritte der Metastasierung. Hirnmetastasen sind die häufigsten Tumore des ZNS und stammen mehrheitlich von Bronchial- und Mammakarzinomen ab. Die therapeutischen Optionen sind derzeit bei zunehmender Inzidenz sehr begrenzt. Es gibt viele Hinweise, dass Stromazellen im Metastasenorgan an der Kolonisation der entarteten Zellen beteiligt sind. Doch die Interaktionen zwischen den ortsständigen Makrophagen des ZNS, der Mikroglia, und den Karzinomzellen im Metastasenorgan sind noch weitgehend ungeklärt.

5.1. Nachweis von Mikroglia/Makrophagen in Hirnmetastasen

Hirnmetastasen sind aus einem Zentrum, einem Invasionsrand mit Tumorzellnestern (sogenannten Mikrosatelliten) und verstreuten, infiltrativ wachsenden Tumorzellen aufgebaut (Baumert et al. 2006). Interaktionen zwischen den malignen Zellen und den Stromazellen sind maßgeblich für die Entstehung und Metastasierung von Tumoren. Histopathologische Untersuchungen konnten eine peri- und intratumorale Gliose in humanen zerebralen Metastasen von Mammakarzinomen nachweisen (Fitzgerald et al. 2008). Die Mikroglia in Hirnmetastasen zeigt eine amöboide Morphologie, was auf eine Transformation von ruhender, ramifizierter zu aktivierter Mikroglia hindeutet (He et al. 2006).

Mittels immunhistochemischer Färbungen konnte im Rahmen dieser Arbeit in Paraffinschnitten von Patientinnen mit zerebralen Metastasen von

Mammakarzinomen in allen untersuchten Proben eine diffuse Infiltration der Metastasen durch Mikroglia/Makrophagen nachgewiesen werden. Die Mikrogliazellen/Makrophagen finden sich besonders zahlreich inmitten der Tumorzellen und tragen signifikant zur allen Bestandteilen der tatsächlichen Tumormasse bei. Die metastatischen Mammakarzinomzellen stehen in direktem Zellkontakt zu den ortsständigen zerebralen Makrophagen. Die diffuse Infiltration der Hirnmetastasen ist Ausdruck einer Mikrogliose, resultierend aus einer verstärkten fokalen Proliferation durch Aktivierung der Mikroglia (Streit et al. 1999). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Beteiligung der Mikroglia/Makrophagen an aktiven Interaktionen mit den entarteten Zellen der Metastasen und somit der Kolonisation im ZNS. In den untersuchten Gewebeschnitten fällt zudem auf, dass die metastatischen Areale mit hoher mikroglialer Infiltrationsdichte kaum Nekrosen oder apoptotische Zellen enthalten. Dies ist ein Hinweis, dass die Mikroglia/Makrophagen in den Metastasen offenbar nicht zur Abtötung der Tumorzellen führen.

In Gliomen korreliert die Infiltration mit Mikroglia direkt mit dem Grad der Malignität. Obwohl sie die größte Population an immunologisch aktiven Zellen in Gliomen darstellt, so scheinen die Regulationsmechanismen zur effektiven Antitumor-Antwort gestört zu sein. Die Mikroglia überwacht stets das Mikromilieu des Hirnparenchyms und reagiert sehr spezifisch und empfindlich auf verschiedenste Reize. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Mikroglia/Makrophagen in Hirnmetastasen durch die Tumorzellen zur Sekretion von progressionsfördernden Faktoren aktiviert werden und aktiv zum Metastasenwachstum beitragen können.

5.2. Invasivitätsmessungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Mikroinvasionsassays gezeigt werden, dass die Invasivität von Mammakarzinomzelllinien durch Kokultivierung mit Mikrogliazellen signifikant gesteigert wird. Dies scheint mit der Aktivierung des Wnt-Signalweges einherzugehen, da sich der invasionfördernde Effekt durch die Wnt-Inhibitoren Dkk-1 und sFRP1 partiell reduzieren lässt. Diese Ergebnisse stehen im Kontext mit einer Publikation dieser Arbeitsgruppe, die eine Makrophagen-vermittelte, Wnt-5a-abhängige Invasivitätssteigerung von Mammakarzinomzellen zeigte (Pukrop et al.

2006). Andere Arbeitsgruppen haben bereits einen progressionsfördernden Effekt der Mikroglia in hirneigenen malignen Tumoren beschrieben (Sliwa et al. 2007; Badie und Schartner 2001; Bettinger et al. 2001).

Ein großer Vorteil der Mikroinvasionsassays bestand darin, dass selektiv der Effekt der Mikroglia auf die Tumorzellen untersucht werden konnte, wohingegen in immunhistochemischen Untersuchungen bislang nicht zuverlässig zwischen Mikroglia/Makrophagen differenziert werden kann (Graeber et al. 2002). Somit konnten durch diesen Versuchsaufbau die Interaktionen zwischen Mikroglia und Mammakarzinomzellen in zerebralen Metastasen *in vitro* simuliert werden. Eine Steigerung der Invasivität durch Kokultivierung mit Mikroglia zeigte sich sowohl in Versuchen mit der humanen Zelllinie MCF-7 also auch der murinen Zelllinie M.410.4. Nach Extravasation und Eintritt in das Hirnparenchym beginnen *in vivo* die Interaktionen der metastatischen Tumorzellen mit dem Stroma. Dieser Schritt wird als limitierender Prozess der Formierung von Metastasen betrachtet. In Studien über die metastatische Effizienz von Melanomzellen in Modellen imponierte eine über 80%ige Extravasationsrate der Tumorzellen (Koop et al. 1995; Luzzi et al. 1998), jedoch bildeten sich in weniger als 3% Mikrometastasen und nur in 1% Makrometastasen (Luzzi et al. 1998). Diese Beobachtungen zeigen analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit die Abhängigkeit der erfolgreichen Kolonisation von den Zellen des Stromas im Metastasenorgan. Die Beobachtung der proinvasiven Effekte in Hirnmetastasen und Gliomen verdeutlichen die progressionsfördernde Rolle der Mikroglia in neoplastischen Prozessen des ZNS.

5.3. Einfluss von LPS auf die Invasivität

Die Steigerung der Invasivität von Mammakarzinomzellen durch Kokultivierung mit Mikroglia konnte durch Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) reduziert werden. LPS ist ein Lipidbaustein von gramnegativen Bakterien, der sowohl starke systemische als auch zentrale inflammatorische Reaktionen hervorruft und durch Bindung an den Toll-Like-Rezeptor-4 (TLR 4) zur Aktivierung des M1-Profiles der Makrophagen führt (Mantovani et al. 2002). An neoplastischen Prozessen sind vorwiegend Makrophagen vom M2-Typ beteiligt (Balkwill et al. 2005). M1- und M2-

Makrophagen unterscheiden sich sowohl in Funktionalität als auch in ihrem Zytokin-Profil. Lediglich die Zellen vom M2-Typ scheinen progressionsförderndes Potential zu besitzen und sind charakterisiert durch die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine. Durch die Stimulation mit LPS kann in vitro ein Re-Switch von M2- in M1-Makrophagen induziert werden. In einer früheren Publikation dieser Arbeitsgruppe wurde bereits eine Abschwächung des proinvasiven Effekts von peripheren Makrophagen durch die Aktivierung mit LPS beschrieben (Hagemann et al. 2004).

In hirneigenen Gliomen korreliert die Anzahl von Mikroglia/Makrophagen mit dem histologischen Grad der Tumore. Als verantwortlicher Mechanismus für den pro-metastatischen Shift der Mikroglia/Makrophagen erwies sich die Expression von Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in den Gliomzellen (Komohara et al. 2008). Unpublizierte Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe in Kooperation mit Prof. Dr. U.-K. Hanisch (Abteilung Neuropathologie, Universitätsklinikum Göttingen) zeigen, dass sich die Mikroglia anders verhält als periphere Makrophagen und nicht den für letztere bekannten IL-10^{high}/IL-12^{low}-Phänotyp annimmt. Dennoch wird durch die Stimulation der Mikroglia mit LPS der proinvasive Effekt auf die Mammakarzinomzellen supprimiert, was dem typischen Switch zu einem klassisch aktivierten Phänotyp nach LPS-Stimulation entspricht.

5.4. MMP-Produktion in Kokulturen

In dieser Arbeit wurde die Produktion der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 in Kokulturen der Mammakarzinomzellen mit Mikroglia untersucht. Die Gelatinasen sind in erster Linie Typ-IV-Kollagenasen, die durch ihre Fähigkeit zur Degradierung der Basalmembran eine wichtige Rolle für die Invasion von Tumorzellen spielen (Stetler-Stevenson et Yu 2001). Zahlreiche Untersuchungen haben ergeben, dass die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke verursachen können. MMPs sind in der Lage, einen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, die Basallamina, zu degradieren, wodurch der Einstrom von inflammatorischen Zellen und Proteinen ermöglicht wird (Mun-Bryce und Rosenberg 1998).

In den zymographischen Untersuchungen konnte kein Anstieg der MMP-2- und MMP-9-Produktion nach Kokultivierung von Mammakarzinomzellen mit Mikroglia

beobachtet werden. Dies unterscheidet die Reaktion der Mikroglia auf Kokultivierung von der der peripheren Makrophagen. Wie diese Arbeitsgruppe bereits in einer früheren Veröffentlichung zeigen konnte, geht die durch Kokultivierung mit Makrophagen gesteigerte Invasivität von Tumorzellen mit einer Hochregulation der MMP-2, MMP-3, MMP-7 und MMP-9 in den Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) einher (Hagemann et al. 2004). Die in dieser Arbeit nicht veröffentlichten Untersuchungen der MMP-3- und MMP-7-Produktion in Kokulturen von Mammakarzinomzellen mit Mikroglia zeigten ebenfalls keinen Anstieg. Dieser Unterschied im Vergleich zu den TAM weist darauf hin, dass Mikroglia im Gegensatz zu den Makrophagen ohne zusätzliche Induktion von MMP-2,-3,-7 und -9 die Invasivität der Mammakarzinomzellen steigert.

5.5. Wnt-Signaling in Mikroglia

Um zu klären, ob der proinvasive Effekt auf die Tumorzellen mit einer Aktivierung des Wnt-Signalwegs in Mikroglia einhergeht, wurde die Expression von Wnt 5a und β -Catenin in Mikroglia untersucht. Sowohl in den PCRs als auch in Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich eine Expression von Wnt 5a in Mono- und Kokulturen. Die Wnt-5a-Expression der Mikroglia-Kontrollen ist möglicherweise Ausdruck einer Semi-Aktivierung der hochsensiblen Zellen durch den Isolierungsprozess. Selbst minimale Änderungen des Mikromilieus können ausreichen, eine Mikrogliazelle zu aktivieren (Schwartz et al. 2006). In Kultur sind Mikrogliazellen weder „ruhend“ noch sind sie voll aktiviert. Vielmehr stellen sie ein Zwischenstadium in der Aktivierung dar.

Zur Verifizierung, ob die Mikroglia schon vor der Isolierung für Zellkulturen in P0-Maushirnen Wnt 5a exprimiert, wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits erste immunhistochemische Färbungen angefertigt (nicht gezeigt). Im Hirngewebe von insgesamt 3 P0-Mäusen konnten lichtmikroskopisch reichlich Mikrogliazellen, jedoch keine Wnt-5a-positiven Zellen detektiert werden. Zur Auswertung wurden homologe Areale von MAC3-/Wnt-5a-Färbungen sorgfältig verglichen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mikroglia im ramifizierten Ruhezustand in vivo kein Wnt 5a exprimiert. Um jedoch spezifisch die Bedeutung der Wnt-5a-Aktivierung in Mikroglia

in vivo nachzuweisen, sollten in Zukunft sowohl immunhistochemische Wnt-5a- als auch immunfluoreszente CD68-/Wnt-5a-Ko-Färbungen durchgeführt werden. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Vorversuche geleistet, die nun im Rahmen einer anderen Dissertation noch weiter etabliert werden.

Nach Kokultivierung mit der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 konnte in Western-Blot-Versuchen kein Anstieg des intrazellulären Gesamt- β -Catenins in der Mikroglia beobachtet werden. Die für die Versuche eingesetzten Proteine wurden jeweils nach 96h Kokultur gewonnen. Zusätzlich sollten zukünftig andere Inkubationszeiten sowie eine Differenzierung der Membran-, Zytosol- und Kernfraktion durchgeführt werden, um die Lokalisation und Quantität sowohl des phosphorylierten β -Catenins näher zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen gegen eine direkte Induktion der gemessenen Wnt-Zielgene im Rahmen der proinvasiven Effekte der Mikroglia auf die Mammakarzinomzellen. Jedoch wird die Mikroglia-induzierte Steigerung der Invasivität durch die Wnt-Inhibitoren Dkk-1 und sFRP reduziert, was die Involvierung des Wnt-Signaling zeigt.

5.6. Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts der Mikroglia

Mittels Phalloidin-Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Effekte der Kokultivierung mit Mammakarzinomzellen auf das Aktin-Zytoskelett der Mikroglia untersucht. Die kokultivierten Mikrogliazellen zeigen in den Färbungen vermehrt multiple filiforme Zellausläufer, wohingegen in Monokulturen überwiegend nur ramifizierte und amöboide Zellen zu finden sind. Die Zellen zeigen in Kokultur sehr feine, stachelförmige Protrusionen und erinnern an die Gestalt eines Seeigels. Die Mikroglia wird offensichtlich in Gegenwart der malignen Zellen aktiviert. Eine Arbeitsgruppe beschrieb bereits eine deutliche Aktivierung der Mikroglia in der Umgebung von Glioblastomzellen (Roggendorf et al. 1996). Die ramifizierte, „ruhende“ Mikroglia fungiert bekanntermaßen als eine Art Wachposten, der auf kleinste Änderungen des lokalen Mikromilieus reagiert. Je nach Art des Stimulus kann die Mikroglia sehr unterschiedliche Aktivierungszustände annehmen (Schwartz et al. 2006). Die in diesen Untersuchungen beobachtete „seeigelförmige“ Morphologie der Mikroglia lässt sich jedoch nicht in das klassische Bild der

amöboiden Veränderung als Zeichen der mikroglialen Aktivierung einordnen. Es scheint sich um eine spezifische, bislang nicht in der Literatur beschriebene Reaktion der Mikroglia auf die malignen Zellen zu handeln. Die beiden unterschiedlichen Zelltypen stehen während der Kokultivierung lediglich in indirektem Kontakt über das Medium zueinander. Der Effekt auf die Organisation des mikroglialen Zytoskeletts muss also folglich über eine lösliche Substanz im Medium vermittelt werden.

5.7. Mikroglia/Makrophagen in Tumoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Interaktionen zwischen Mikroglia und Tumorzellen auf verschiedenen Ebenen untersucht. Die Kokultivierung von Mikroglia und Mammakarzinomzellen führt auf Seiten der Tumorzellen zu einer signifikanten Invasivitätssteigerung, die durch die Wnt-spezifischen Inhibitoren Dkk-1 und sFRP1 hemmbar ist. In der Mikroglia lässt sich nach Kokultivierung eine deutliche Veränderung des Zytoskeletts als Ausdruck einer Aktivierung beobachten. In den untersuchten Hirnmetastasen von Mammakarzinomen finden sich diffuse Infiltrate von Mikroglia, die erheblich zur Gesamttumormasse beitragen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sprechen für eine Involvierung des Wnt-Signaling in die Mikroglia-induzierte Invasivitätssteigerung, da diese durch die Wnt-Inhibitoren Dkk-1 und sFRP signifikant reduziert werden konnte. Wnt-Proteine scheinen genau wie bei der Makrophagen-induzierten Tumordinvasion auch während der Kolonisation im Metastasenorgan eine wichtige Funktion zu besitzen.

Jedoch wird in der Mikroglia – im Gegensatz zu den peripheren Makrophagen – durch Kokultivierung keine Änderung der β -Catenin- und MMP-Expression induziert. Ein weiterer Unterschied ist die Expression von Wnt 5a in Mikroglia-Kontrollen. Die Mikroglia scheint in der Lage zu sein, die Invasivität der Tumorzellen ohne direkte Induktion von Wnt 5a zu fördern.

Durch die Kokultivierung mit Mammakarzinomzellen wird in der Mikroglia, anders als in Tumor-assoziierten Makrophagen, kein typischer M2-Phänotyp induziert. Jedoch lässt sich der proinvasive Effekt der Mikroglia auf die Mammakarzinomzellen durch LPS-Stimulation aufheben, was für einen Re-Switch, ähnlich dem der Makrophagen, spricht. Neben der Mikroglia beherbergt das adulte ZNS eine heterogene Population

an sogenannten ZNS-assoziierten Makrophagen, die perivaskuläre, meningeale und Plexus-Choroideus-assoziierte Makrophagen umfasst (McMenamin 1999). Im Parenchym des ZNS selbst sind in engem Kontakt zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten jedoch nur die Mikrogliazellen lokalisiert (Davoust et al. 2008). Priller et al. konnten in ihrer Arbeit an einem Mausmodell mit markierten Stammzellen demonstrieren, dass nach Knochenmarkstransplantation bis zu einem Viertel der Mikroglia im ZNS durch reife monozytäre Zellen ersetzt wurde. Die Monozyten differenzierten sich nach dem Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke in Mikroglia. Durch pathologische Veränderungen des ZNS wurde das Engraftment der Mikroglia zusätzlich verstärkt (Priller et al. 2001). Bislang ist immunhistochemisch aufgrund fehlender Marker keine sichere Differenzierung zwischen eingewanderten, ZNS-assoziierten Makrophagen und Mikroglia möglich. Vermutlich haben Mikroglia und ZNS-assoziierte Makrophagen jedoch bei der Entstehung von zerebralen Metastasen additive Effekte.

Diese Arbeit konnte spezifisch eine Steigerung der Invasivität von Mammakarzinomzellen durch Mikroglia nachweisen. Ebenso wie die Makrophagen kann die Mikroglia somit aktiv zur Tumorprogression beitragen. Die Makrophagen interagieren mit den malignen Zellen im Primärtumor und tragen zur lokalen Invasion bei – einer der ersten Schritte der Metastasierung. Im ZNS spielt die Mikroglia als sessile zerebrale Makrophagenpopulation offenbar eine aktive Rolle bei der Bildung von Metastasen, dem Prozess der Kolonisation. Die mikroglialen Infiltrate in humanen Hirnmetastasen unterstreichen die Bedeutung dieser Ergebnisse in vivo.

6. Zusammenfassung

Hirnmetastasen sind die häufigsten Tumore des ZNS und stammen überwiegend von Bronchial- und Mammakarzinomen ab. Obwohl die Inzidenz in den letzten Jahren aufgrund der verbesserten Primärtherapie stark gestiegen ist, sind die therapeutischen Möglichkeiten noch immer begrenzt. Die Invasion von Tumorzellen und somit einer der ersten Schritte der Metastasierung werden durch Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) gefördert. Kürzlich konnte diese Arbeitsgruppe die Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die Makrophagen-vermittelte Steigerung der Tumorinvasivität anhand der Hochregulation von Wnt 5a in kokultivierten Makrophagen nachweisen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen zwischen der sessilen Makrophagenpopulation des ZNS, der Mikroglia, und Mammakarzinomzellen im Hinblick auf die Bildung von Metastasen (Kolonisation) untersucht. Immunhistochemisch imponierte in Hirnmetastasen eine diffuse Infiltration durch Mikroglia/Makrophagen mit direktem Kontakt zu den Tumorzellen. In Mikroinvasionsassays steigert Mikroglia signifikant die Invasivität der malignen Zellen. Dieser Effekt ist durch die Wnt-spezifischen Inhibitoren Dkk-1 und sFRP1 partiell hemmbar, was für eine Aktivierung des Wnt-Signaling im Rahmen der proinvasiven Effekte spricht. Im Gegensatz zu den peripheren Makrophagen fördert die Mikroglia die Tumorprogression ohne direkte Induktion von Wnt 5a, das bereits konstitutiv exprimiert wird. Nach Pathogenstimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) wird die Invasivitätssteigerung durch den Switch der Mikroglia zu einem klassisch aktivierten, inflammatorischen Phänotyp reduziert. Untersuchungen des Aktin-Zytoskeletts der Mikroglia zeigten nach Kokultur mit Tumorzellen morphologische Veränderungen in Form von multiplen filiformen Zellausläufern. Diese Arbeit verdeutlicht das Potential der Mikroglia zur Förderung der Tumorprogression unter Beteiligung des Wnt-Signaling. Sich gegenseitig ergänzende Effekte der peripheren Makrophagen und Mikroglia scheinen eine wesentliche Rolle für den komplexen Prozess der Metastasierung zu spielen. Hieraus könnten sich in Zukunft neue therapeutische Strategien zur Behandlung und Prävention zerebraler Metastasen ergeben.

7. Summary

Brain metastases are the most prevalent tumors of the CNS and predominantly deriving from lung and breast cancer. CNS metastasis is increasing due to impaired primary therapy, however, therapeutic possibilities are still limited. Tumor-associated macrophages (TAM) promote invasiveness of cancer cells and thereby one of the first steps of the metastatic cascade. Recently, it has been demonstrated that up-regulation of Wnt 5a in TAM promotes macrophage-induced invasiveness.

Within this thesis, the interactions between the resident macrophage population of the CNS, the microglia, and breast cancer cells were analysed with regard to the formation of metastases (colonization). A diffuse infiltration of brain metastases by macrophages/microglia could be detected in immunohistochemical samples. In microinvasion assays, microglia significantly promotes the invasiveness of cancer cells. This effect can be partially inhibited by the Wnt-specific inhibitors Dkk-1 and sFRP1, indicating the relevance of Wnt signaling for the proinvasive effects. In contrast to peripheral macrophages, microglia is able to support tumor progression without direct induction of Wnt 5a, which is constitutively expressed. The invasiveness is reduced by pathogen stimulation with bacterial lipopolysaccharide (LPS) due to a microglial switch to a classically activated, inflammatory phenotype. The actin cytoskeleton of microglia forms multiple filiform cell protrusions after co-cultivation with breast cancer cells. This thesis shows the microglial potential to promote tumor progression by activation of Wnt signaling. In this context, peripheral macrophages and microglia seem to have additive effects on the complex process of metastasis. In view of these findings, new therapeutic strategies for treatment and prevention of cerebral metastases may be developed in the future.

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01 Schritte der Metastasierung	2
Abbildung 02 Der Kanonische Wnt-/ β -Catenin-Signalweg	6
Abbildung 03 Die Nicht-Kanonischen Signalwege	7
Abbildung 04 Intratumorales Wnt-5a-Signaling und seine Effekte	9
Abbildung 05 Schemat. Darstellung eines Boyden-Chamber-Invasionsassays	34
Abbildung 06 Viabilitätsrate +/- Kokultur im MTT-Test	36
Abbildung 07 Proliferationsrate +/- Kokultur nach 96h	37
Abbildung 08 Invasivitätssteigerung der Tumorzellen durch Mikroglia	38
Abbildung 09 Partielle Inhibition der proinvasiven Effekte durch Dkk1 und sFRP1 ..	38
Abbildung 10 Invasionsrate der Tumorzelllinie MCF-7	39
Abbildung 11 Reduktion der proinvasiven Effekte durch LPS	39
Abbildung 12 Western Blot zur Detektion von β -Catenin in Mikroglia	40
Abbildung 13 Western Blot zur Detektion von β -Catenin in MCF-7	41
Abbildung 14 Einfluss der Kokultivierung auf die MMP-Produktion	42
Abbildung 15 Nachweis der RT-PCR-Amplifikate	43
Abbildung 16 Immunhistochemiefärbung der Mikroglia/Makrophagen	44
Abbildung 17 Phalloidin-Färbung der Mikroglia	46
Abbildung 18 Prozent. Verteilungsmuster der morphologischen Erscheinungsbilder	47
Abbildung 19 Wnt-5a-Färbung der Mikroglia	48
Abbildung 20 β -Catenin-Färbung der Mikroglia	48

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 01 Optimierte PCR-Konditionen für Wnt-5a- bzw. Wnt-5b-Amplifikation	26
Tabelle 02 Komponenten für 8%iges Trenngel	28
Tabelle 03 Komponenten für 4%iges Sammelgel	28
Tabelle 04 Primär- und Sekundärantikörper	30
Tabelle 05 Morphologische Kategorisierung der Mikroglia	46

9. Literaturverzeichnis

Badie B, Schartner J (2001): *Role of microglia in glioma biology*. Microsc Res Tech **54**, 106-113.

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

Baumert BG, Rutten I, Dehing-Oberije C, Twijnstra A, Dirx MJ, Debougnoux-Huppertz RM, Lambin P, Kubat B (2006): *A pathology-based substrate for target definition in a radiosurgery of brain metastases*. Int J Radiat Oncol Biol Phys **66**, 178-194.

Bettinger I, Paulus W, Thanos S (2001): *Microglia promote glioma migration*. Acta Neuropathol **103**, 351-355.

Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A et al. (2000): *Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling*. Nature **406**, 536-540.

Davoust N, Vuillat C, Androdias G, Nataf S (2008): *From bone marrow to microglia: barriers and avenues*. Trends Immunol **29**, 227-234.

De Nardo DG, Johansson M, Coussens L (2008): *Immune cells as mediators of solid tumor metastasis*. Cancer Metastasis Rev **27**, 11-18.

Fitzgerald D, Palmieri D, Hua E, Hargrave E, Herring J, Qian Y, Vega-Valle E, Weil RJ, Stark AM, Vortmeyer A et al. (2008): *Reactive glia are recruited by highly proliferative brain metastases of breast cancer and promote tumor cell colonization*. Clin Exp Metastasis **25**, 799-810.

- Gorden DL, Fingleton B, Crawford HC, Jansen DE, Lepage M, Matrisian LM (2007): *Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment*. Int J Cancer **121**, 495-500.
- Graeber M, Scheithauer BW, Kreutzberg GW (2002): *Microglia in Brain Tumors*. Glia **40**, 252-259.
- Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill F, Binder C (2004): *Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNFalpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases*. Carcinogenesis **25**, 1543-1549.
- Hanisch U-K, Kettenmann H (2007): *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nat Neurosci **10**, 1387-1394.
- He BP, Wang JJ, Zhang X, Wu Y, Wang M, Bay B-H, Chang AY-C (2006): *Differential Reactions of Microglia to Brain Metastasis of Lung Cancer*. Mol Med **12**, 161-170.
- Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y (2006): *Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis*. Nat Cell Biol **8**, 1369-1375.
- Iozzo RV, Eichstetter I, Danielson KG (1995): *Aberrant expression of the growth factor Wnt 5a in human malignancy*. Cancer Res **55**, 3495-3499.
- Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M (2008): *Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas*. J Pathol **216**, 15-24.
- Koop S, MacDonald IC, Luzzi K (1995): *Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80% survive and extravasate*. Cancer Res **55**, 2520-2523.

- Kühl M, Geis K, Sheldahl LC, Pukrop T, Moon RT, Wedlich D (2001): *Antagonistic regulation of convergent extension movements in Xenopus by Wnt/ β -Catenin and Wnt/ Ca^{2+}* . Mech Dev **106**, 61-76.
- Kuphal S, Lodermeier S, Bataille F, Schuierer M, Hoang BH, Bosserhof AK (2006): *Expression of Dickkopf genes is strongly reduced in malignant melanoma*. Oncogene **25**, 5027-5036.
- Lee AY, He B, You L, Xu Z, Mazieres J, Reguart N, Mikami I, Batra S, Jablons DM (2004): *Dickkopf-1 antagonizes Wnt signalling independent of β -Catenin in human mesothelioma*. Biochem Biophys Res Commun **323**, 1246-1250.
- Leek RD, Harris AL (2002): *Tumor-associated macrophages in breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia **7**, 177-189.
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG (1991): *Tumor Invasion and Metastasis: An Imbalance of Positive and Negative Regulation*. Cancer Res **51**, 5054-5059.
- Lobov I, Rao S, Carroll T, Vallance JE, Ito M, Ondr JK, Kurup S, Glass DA, Pate MS, Shu W et al. (2005): *Wnt7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature*. Nature **437**, 417-421.
- Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE (1998): *Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases*. Am J Pathol **153**, 865-873.
- Mantovani A (1994): *Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines*. Lab Invest **71**, 5-16.
- 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.

- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004): *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol **25**, 677-686.
- McMenamin PG (1999): *Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations*. J Comp Neurol **405**, 553-562.
- Mikels A, Nusse R (2006 a): *Purified Wnt5a Protein Activates or Inhibits β -Catenin-TCF Signaling Depending on Receptor Context*. PLoS Biol **4**, 570-582.
- Mikels A, Nusse R (2006 b): *Wnts as ligands: processing, secretion and reception*. Oncogene **25**, 7461-7468.
- Mikheev A, Mikheeva S, Liu B, Cohen P, Zarbl H (2004): *A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as a suppressor of HeLa cell transformation*. Carcinogenesis **25**, 47-59.
- Mohamed OA, Dufort D, Clarke HJ (2004): *Expression and Estradiol Regulation of Wnt Genes in the Mouse Blastocyst Identify a Candidate Pathway for Embryo-Maternal Signaling at Implantation*. Biol Reprod **71**, 417-424.
- Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998): *Matrix Metalloproteinases in Cerebrovascular Disease*. J Cereb Blood Flow Metab **18**, 1163-1172.
- Nakamura Y (2002): *Regulating Factors for Microglial Activation*. Biol Pharm Bull **25**, 945-953.
- Nishita M, Kan Yoo S, Nomachi A, Kani S, Sougawa N, Ohta Y, Takada S, Kikuchi A, Minami Y (2006): *Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration*. J Cell Biol **175**, 555-562.
- Nusse R (2005): *Wnt signalling in disease and in development*. Cell Res **15**, 28-32.

-
- Paget S (1889): *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. Lancet **1889**, **1**, 571-573.
- Perry VH, Gordon S (1991): *Macrophages and the nervous system*. Int Rev Cytol **125**, 103-144.
- Polakis P (2000): *Wnt signalling and cancer*. Genes Dev **14**, 1837-1851.
- Posner JB (1992): *Management of brain metastases*. Rev Neurol **148**, 477-487.
- Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, De Boer BA et al. (2001): *Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: Use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment*. Nat Med **12**, 1356-1361.
- Pukrop T, Binder C (2007): *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, Trümper L, Binder C (2006): *Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines*. Proc Natl Acad Sci USA **103**, 5454-5459.
- Reya T, Clevers H (2005): *Wnt signalling in stem cells and cancer*. Nature **434**, 843-850.
- Rio Hortega P del, Asua FJ de (1921): *Sobre la fagocytosis en los tumours y en otros procesos patológicos*. Arch Cardiol Hematol **2**, 161-220.
- Roggendorf W, Strupp S, Paulus W (1996): *Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors*. Acta Neuropathol **92**, 288-293.

- Rossi ML, Jones NR, Candy E, Nicoll JA, Compton JS, Hughes JT, Esiri MM, Moss TH, Cruz-Sanchez FF, Coakham HB (1989): *The mononuclear cell infiltrate compared with survival in high-grade astrocytomas*. Acta Neuropathol **78**, 189-193.
- Schwartz M, Butovsky O, Brück W, Hanisch UK (2006): *Microglial phenotype: is the commitment reversible?* Trends Neurosci **29**, 68-74.
- Semenov M, Tamai K, Brott BK, Kühl M, Sokol S, He X (2001): *Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6*. Curr Biol **11**, 951-961.
- Sliwa M, Markovic D, Gabrusiewicz K, Synowitz M, Glass R, Zawadzka M, Wesolowska A, Kettenmann H, Kaminska B (2007): *The invasion promoting effect of microglia on glioblastoma cells is inhibited by cyclosporine A*. Brain **130**, 476-489.
- Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT (1997): *Modulation of Embryonic Intracellular Ca²⁺ Signaling by Wnt5a*. Dev Biol **182**, 114-120.
- Staal F, Tiago CL, Machteld MT (2008): *Wnt signalling in the immune system: Wnt is spreading its wings*. Nat Rev Immunol **8**, 581-593.
- Stetler-Stevenson WG, Yu AE (2001): *Proteases in invasion: matrix metalloproteinases*. Semin Cancer Biol **11**, 143-153.
- Streit W (2002): *Microglia as Neuroprotective, Immunocompetent Cells of the CNS*. Glia **40**, 133-139.
- Streit W, Walter SA, Pennell NA (1999): *Reactive Microgliosis*. Prog Neurobiol **57**, 563-581.
- Sturm JW, Magdeburg R, Berger K, Petrush B, Samel S, Bönninghoff R, Keese M, Hafner M, Post S (2003): *Influence of TNF- α on the formation of liver metastases in a syngenic mouse model*. Int J Cancer **107**, 11-21.

-
- Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M (2000): *Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha*. Int J Cancer **85**, 182-188.
- Wernert N (1997): *The multiple roles of tumour stroma*. Virchows Arch **430**, 433-443.
- Wodarz A, Nusse R (1998): *Mechanisms of Wnt signalling in development*. Annu Rev Cell Dev Biol **14**, 59-88.
- Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, Takada S, Nishida E (2002): *JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates*. EMBO Rep **3**, 69-75.

Danksagung

Die Dissertation wurde an der Abteilung Hämatologie und Onkologie des Zentrums Innere Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen durchgeführt.

Hiermit möchte ich allen herzlich danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer, Dr. med. Tobias Pukrop, dem ich von erster Stunde an eine großartige engagierte Betreuung zu verdanken habe und der mir sowohl während der Datenauswertung als auch beim späteren Niederschreiben der Forschungsergebnisse jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Claudia Binder, insbesondere für die Bereitstellung des Themas, die vielzähligen hilfreichen Ratschläge und ein jeweils blitzschnelles Korrekturlesen der vorgelegten Manuskripte.

Weiterhin möchte ich nicht zuletzt Matthias Schulz, Elke Pralle, Prof. Dr. rer. nat. U.-K. Hanisch sowie der Abteilung Neuropathologie des Universitätsklinikums Göttingen ganz herzlich danken, denn ohne sie wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Lebenslauf

Mein Name ist Anne Kathrin Abenstein. Ich wohne in der Gundhofstr. 9 in 60528 Frankfurt am Main. Geboren wurde ich am 25.12.1981 in Cuxhaven. Im Jahre 2001 schloss ich meine schulische Laufbahn mit der Abiturnote 1,6 am Geschwister Scholl-Gymnasium in Bremerhaven ab. Nach dem Abitur nahm ich im April 2002 das Medizinstudium an der Georg August-Universität Göttingen auf. Im März 2004 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung mit der Note 2,6. Das Praktische Jahr leistete ich im Krankenhaus Neu-Mariahilf Göttingen (Klinik für Innere Medizin), in den Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (Klinik für Chirurgie) und im Universitätsklinikum Göttingen (Zentrum für Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin). Während meines Auslandsaufenthaltes in Frankreich im Rahmen des „Gö4med“ Stipendiums der Georg August-Universität Göttingen konnte ich meine Französisch-Sprachkenntnisse vertiefen und meine Fähigkeit zur Arbeit im Team stärken. Im November 2008 absolvierte ich den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note „gut“ und erhielt somit die Approbation. Seit 2005 beschäftige ich mich in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Claudia Binder mit der experimentellen Doktorarbeit zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Mikroglia und Mammakarzinomzellen in zerebralen Metastasen. Während des Medizinstudiums war ich als studentische Hilfskraft in der Abteilung Klinische Chemie des Universitätsklinikums Göttingen tätig und ging einer regelmäßigen Tätigkeit als Nachtbereitschaft im Übergangwohnheim Göttingen für seelisch Kranke (Träger: Göttinger Werkstätten) nach. Seit März 2009 arbeite ich als Assistenzärztin in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie (KAIS) des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.