

Die Rolle von Wnt5a bei der Regression des Basalzellkarzinoms

**Dissertation
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades
„Doctor rerum naturalium“
der Georg-August-Universität Göttingen**



**GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT
GÖTTINGEN**

**vorgelegt von
Simone König
aus Stade**

Göttingen 2012

Mitglieder des Thesis Commitees

Prof. Dr. Heidi Hahn (Referentin)
Abteilung Molekulare Entwicklungsgenetik
Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Matthias Dobbstein (Korreferent)
Abteilung Molekulare Onkologie
Georg-August-Universität Göttingen

Prof. Dr. Felix Brembeck
Abteilung Hämatologie und Onkologie
Universitätsmedizin Göttingen

Tag der Disputation:

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle von Wnt5a bei der Regression des Basalzellkarzinoms" von mir selbständig angefertigt wurde und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt wurden.

Göttingen, den 31. Januar 2012

*Wenn man studiert ... ist Wissenschaft neu und wunderbar,
und alles, was bekannt ist, wird so aufgenommen,
als habe man es schon immer gewußt.
Erst viel später,
nach jahrelanger Forschung mit fehlgeschlagenen und gelungenen Experimenten,
mit falschen Spuren, überraschenden Ergebnissen und Augenblicken echter Erkenntnis
wird einem klar, wie hart man sich jedes Körnchen Wissen erarbeiten muß,
wie jeder Fortschritt sich auf die gesammelten Fortschritte der Vergangenheit gründet,
wie jedes Experiment ein Teil des fortlaufenden Stromes der Wissenschaft ist,
ein Teil des wachsenden Schatzes menschlichen Wissens,
das uns aus der Dunkelheit geführt hat.
-Robert L. Sinsheimer-*

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Basalzellkarzinom (BCC)	1
1.2	Der Hedgehog/Patched (Hh/Ptch) Signalweg	2
1.2.1	Der Hh/Ptch Signalweg in Tumoren	4
1.2.2	Die Rolle von Ptch Mutationen beim BCC	5
1.2.3	Mausmodell für BCC	5
1.3	Wnt Signalwege	7
1.3.1	Der kanonische Wnt/ β -Catenin Signalweg	8
1.3.2	Die nicht-kanonischen Wnt Signalwege	9
1.3.2.1	Der Wnt/JNK Signalweg	9
1.3.2.2	Der Wnt/ Ca^{2+} abhängige Signalweg	10
1.4	Aktivierung der Wnt Signalwege durch Wnt5a	11
1.5	Die Rolle von Wnt5a bei Tumoren	11
1.5.1	Bedeutung des Wnt5a Signalwegs beim BCC	12
1.6	Zielsetzung der Arbeit	15
2	MATERIAL	17
2.1	Laborgeräte	17
2.2	Gebrauchswaren	18
2.3	Chemikalien und Reagenzien	18
2.4	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	20
2.5	Stammlösungen	20
2.6	Medien	22
2.6.1	Medien für die Bakterienkultur	22
2.6.2	Agarplatten	23
2.6.3	Medien für die Kultur eukaryotischer Zelllinien	23
2.7	Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinien und Primärzellen	23
2.8	Plasmide	24
2.9	Synthetische DNA-Oligonukleotide	25
2.9.1	DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen	25
2.9.2	DNA-Oligonukleotide für Sequenzanalyse	25
2.9.3	DNA-Oligonukleotide für RT-PCR	26
2.9.4	DNA-Oligonukleotide für quantitative <i>real time</i> PCR (qRT-PCR)	26
2.9.5	Sonden für <i>in situ</i> -Hybridisierung	27
2.10	Enzyme	27
2.11	Antikörper	27
2.11.1	Primäre Antikörper	27
2.11.2	Sekundäre Antikörper	28

Inhaltsverzeichnis

2.12	Datenbanken	28
2.13	Software	29
3	METHODEN	30
3.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren	30
3.1.1.1	Plasmid DNA	30
3.1.1.2	Genomische DNA aus Gewebe und Blut	30
3.1.1.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	30
3.1.1.2.2	Isolierung genomischer DNA aus murinen Föten	30
3.1.1.2.3	Isolierung genomischer DNA aus Blut	31
3.1.1.3	Gesamt-RNA aus eukaryotischer Zellkultur oder Gewebe	31
3.1.1.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Hautproben	32
3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
3.1.3	Reverse Transkription	32
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
3.1.4.1	Semiquantitative RT-PCR	33
3.1.4.2	Quantitative <i>real time</i> PCR (qRT-PCR)	33
3.1.4.3	RT Profiler PCR Array	34
3.1.5	DNA-Sequenzanalyse	35
3.1.6	Gezielte Mutagenese	35
3.1.7	Agarosegelelektrophorese	36
3.1.8	Klonierungen	36
3.2	Zellbiologische Methoden	36
3.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	36
3.2.1.1	Kokultivierung eukaryotischer Zellen	37
3.2.1.2	Transfektion eukaryotischer Zellen	38
3.2.2	Isolierung und Kultivierung von peritonealen Makrophagen und BMDM	38
3.2.3	Herstellung konditionierter Medien (CM, engl: conditioned medium)	39
3.2.4	Stimulation von ASZ001 mit Wnt5a-CM und rWnt5a	40
3.2.5	Bestimmung der Zellviabilität	40
3.2.6	Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen	41
3.2.7	5-Bromo-2-Deoxyuridin Assay	41
3.2.8	Isolierung und Kultivierung von Hautstanzen	42
3.3	Immunhistochemie und Immunzytochemie	43
3.3.1	Dualer Luciferase Assay	43
3.3.2	ELISA	43
3.3.3	Immunhistologische Antikörperfärbungen	44
3.3.3.1	Gewebeentnahme und /-fixierung	44
3.3.3.2	Herstellung von Paraffinschnitten von Geweben	44
3.3.3.3	Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung, Vermessung des Tumoreals und Antikörperfärbungen	44
3.3.4	<i>In situ</i> -Hybridisierung	45
3.3.4.1	Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden	46
3.3.4.2	Durchführung der <i>in situ</i> -Hybridisierung	47
3.3.5	Durchflusszytometrische Analysen (FACS)	48
3.3.6	Western Blot	50
3.3.7	X-Gal-Färbung von Hautbiopsien	51
3.4	Tierexperimentelle Methoden	51
3.4.1	Mauslinien	51
3.4.2	Maushaltung	52
3.4.3	Genotypisierung von Mäusen	52
3.4.4	Bestimmung des Kopulationszeitpunktes und der Trächtigkeit	52

Inhaltsverzeichnis

3.4.5	Applikation von Medikamenten und Blutabnahme	53
3.4.5.1	Intramuskuläre Injektion von Tamoxifen	53
3.4.5.2	Topische Applikation von Ionomycin	53
3.4.5.3	Subkutane Injektion eines Expressionsplasmids	53
3.4.5.4	Intraperitoneale Injektion von Clodrolip, Leerliposomen und BLP	54
3.4.5.5	Blutabnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus	54
3.4.5.6	Narkotisierung von Mäusen	54
3.4.6	Transplantation fötaler Leberzellen in <i>Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}</i> Mäuse	55
3.4.7	Präparation von Tumoren und Geweben	55
3.4.8	Statistische Auswertungsverfahren	56
4	ERGEBNISSE	57
4.1	Expression und Funktion von <i>Wnt5a</i> in der BCC-Zelllinie ASZ001 und BCC-tragenden Hautstanzen	57
4.1.1	ASZ001 induzieren die Expression von <i>Wnt5a</i> in kultierten Makrophagen	57
4.1.2	<i>Wnt5a</i> hat keinen Einfluss auf den kanonischen Wnt Signalweg in ASZ001	58
4.1.3	<i>Wnt5a</i> induziert die <i>K10</i> Expression in ASZ001	59
4.1.4	<i>Wnt5a</i> und Aktivierung des Wnt/ Ca^{2+} Signalwegs induziert die <i>K10</i> Expression in BCC in Zellkultur	60
4.1.4.1	Einfluss der CaMKII auf die <i>K10</i> Expression in ASZ001	61
4.1.4.2	Einfluss von <i>Wnt5a</i> und dem CaMKII Inhibitor KN-93 auf die <i>K10</i> Expression in BCC-tragenden Hautstanzen	61
4.1.5	<i>Wnt5a</i> oder CaMKII Inhibitor KN-93 haben keinen Einfluss auf die BCC Proliferation in BCC-tragenden Hautstanzen	62
4.1.6	Bedeutung anderer Komponenten des Wnt Signalwegs im BCC	64
4.2	Untersuchung der Effekte von Ca^{2+} und <i>Wnt5a</i> Überexpression auf BCC im Mausmodell	66
4.2.1	Das Calcium-Ionophor Ionomycin induziert die BCC-Differenzierung im Mausmodell	66
4.2.1.1	Ionomycin hat keinen Einfluss auf die Tumorgroße	66
4.2.1.2	Keine eindeutige Verringerung proliferierender BCC-Zellen durch Ionomycin	67
4.2.1.3	Ionomycin induziert die Expression von Differenzierungsmarkern in BCC	68
4.2.2	Einfluss einer <i>Wnt5a</i> Überexpression auf BCC: Vorarbeiten	69
4.3	Untersuchung der Effekte einer verminderten <i>Wnt5a</i> Expression auf BCC im Mausmodell	71
4.3.1	Genetischer Ansatz zur Reduzierung der <i>Wnt5a</i> Expression im BCC-Mausmodell	71
4.3.1.1	Keine signifikante Reduzierung der <i>Wnt5a</i> Expression in <i>Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}</i> Mäusen	72
4.3.1.2	Keine signifikante Veränderung der BCC-Größe in <i>Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}</i> Mäusen	72
4.3.1.3	Epidermale Hyperplasien in <i>Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}</i> Mäusen	73
4.3.2	Rekonstitution des Knochenmarks von <i>Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}</i> Mäusen mit <i>Wnt5a</i> -defizienten Zellen	74
4.3.3	Applikation von Clodrolip zur Depletion von <i>Wnt5a</i> -exprimierenden Makrophagen	76
4.3.3.1	Effiziente Depletion von Makrophagen in Milz und Haut durch Clodrolip	77
4.3.3.2	Signifikante Abnahme der <i>Wnt5a</i> Expression in der Haut nach Clodrolipbehandlung	79
4.3.3.3	Zunahme der Größe und des proliferativen Verhaltens von BCC nach Clodrolipapplikation	80
4.4	Einfluss von Liposomen auf das Wachstum von BCC	81
4.4.1	Wirkung von Liposomen und BLP auf das BCC-Wachstum im Mausmodell	82
4.4.1.1	Liposomen und BLP hemmen das Tumorstadium	82
4.4.1.2	Liposomen und BLP induzieren <i>K10</i> Expression in der BCC-tragenden Haut	83
4.4.1.3	Liposomen verringern die Makrophagenzahl in der Peritonealhöhle, der Milz und der Haut	84
4.4.2	Wirkung von Liposomen und BLP auf BMDM und ASZ001	85
4.4.2.1	Wirkung von Liposomen und BLP auf BMDM	85
4.4.2.1.1	Liposomen und BLP ändern die Morphologie von BMDM	85
4.4.2.1.2	Keine toxische Wirkung von Liposomen und BLP auf BMDM	86
4.4.2.1.3	BLP, nicht aber Liposomen, führen zur Cytokinfreisetzung aus BMDM	86
4.4.2.1.4	Liposomen und BLP führen zu vermehrter Migration von BMDM	87
4.4.2.1.5	Liposomen und BLP vermindern die Proliferation von BMDM	88
4.4.2.1.6	Liposomen führen in BMDM zum Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase	89
4.4.2.1.7	Liposomen und BLP induzieren Apoptose in BMDM	91

Inhaltsverzeichnis

4.4.2.2	Wirkung von Liposomen oder BLP auf ASZ001	92
4.4.2.2.1	Keine Proliferationshemmung von ASZ001 durch Liposomen oder BLP	92
4.4.2.2.2	Keine Stimulation der Apoptose von ASZ001 durch Liposomen oder BLP	93
5	DISKUSSION	94
5.1	Expression und Funktion von Wnt5a in der BCC-Zelllinie ASZ001 und BCC-tragenden Hautstanzen	94
5.1.1	<i>Wnt5a</i> wird von BCC-assoziierten Makrophagen exprimiert	94
5.1.2	<i>Wnt5a</i> induziert die BCC Differenzierung über den Wnt/Ca ²⁺ Signalweg in Abhängigkeit der CaMKII	95
5.1.3	Modell für die Funktion von <i>Wnt5a</i> in BCC-Entwicklung und /-Regression	98
5.2	Effekt von Ca²⁺ auf BCC im Mausmodell	99
5.3	Einfluss der <i>Wnt5a</i> Überexpression und der verminderten <i>Wnt5a</i> Expression auf BCC im Mausmodell	101
5.3.1	Einfluss der <i>Wnt5a</i> Überexpression im BCC <i>in vivo</i>	101
5.3.2	Untersuchung der Effekte einer verminderten <i>Wnt5a</i> Expression auf BCC im Mausmodell	103
5.3.2.1	Einfluss der Deletion eines <i>Wnt5a</i> Allels auf das BCC-Wachstum	103
5.3.2.2	Rekonstitution des Knochenmarks von <i>Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}</i> Mäusen mit <i>Wnt5a</i> -defizienten Zellen	104
5.3.3	Effektive Depletion <i>Wnt5a</i> -exprimierender Makrophagen durch Clodrolip	106
5.3.4	Effekt der Makrophagendepletion auf das BCC-Wachstum	107
5.4	Zusammenfassung der Effekte von Ca²⁺ sowie einer <i>Wnt5a</i>-Manipulation auf BCC im Mausmodell	109
5.5	Einfluss von Liposomen auf das Wachstum von BCC in <i>Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}</i> Mäusen und auf BMDM in Zellkultur	109
6	ZUSAMMENFASSUNG	114
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	115
8	LITERATURVERZEICHNIS	119
9	DANKSAGUNG	125
10	CURRICULUM VITAE	126

1 Einleitung

1.1 Das Basalzellkarzinom (BCC)

Das Basalzellkarzinom (BCC) ist der häufigste Tumor des Menschen (Rubin, AI *et al.* 2005). Die Wahrscheinlichkeit in seinem Leben an einem BCC zu erkranken liegt bei Kaukasiern bei etwa 30% (Abdulla, FR *et al.* 2005). Basalzellkarzinome wachsen langsam und sind semimaligne Tumoren (Robinson, JK und Dahiya, M 2003). Dies bedeutet, dass sie nur sehr selten metastasieren (Rubin, AI *et al.* 2005). Selbst nach zweijährigem Wachstum liegt die Metastasierungsrate des BCC bei nur 0,55% (Walling, HW *et al.* 2004). Dennoch können BCC in seltenen Fällen auch einen destruktiven Verlauf im Wachstum zeigen und sogar Knochen penetrieren (Gailani, MR *et al.* 1992; Holmberg, E *et al.* 1996).

Es gibt verschiedene Subtypen von BCC und generell werden sie in differenzierte und undifferenzierte bzw. solide Tumoren unterteilt (Crowson, AN 2006). Zu den differenzierten BCC gehören der infundibulozystische, keratotische, follikuläre und pleomorphe Typ. Bei den undifferenzierten BCC unterscheidet man zwischen indolenten und aggressiven Tumoren. Zum indolenten Typ zählt man superfizielle und noduläre BCC, zum aggressiven Typ gehören hingegen infiltrative und metatypische BCC (Crowson, AN 2006).

Die Behandlung der BCC ist sowohl Tumor-/ als auch Patientenabhängig und das Spektrum umfasst derzeit diverse chirurgische Eingriffe wie z.B. klassische Exzision, Kürettage oder Kryochirurgie (Goppner, D und Leverkus, M 2011). Außerdem erfolgt die Behandlung der Tumoren mit photodynamischer Therapie sowie Imiquimod, einem topisch applizierten Immunmodulator (Lacarrubba, F *et al.* 2011; Lien, MH und Sondak, VK 2011).

Retrospektive Studien haben gezeigt, dass die Häufigkeit von BCC in den letzten Jahren stark zugenommen hat und auch in den nächsten Jahren wird die Inzidenz weiter zunehmen. So wird angenommen, dass 25% aller nach 1994 geborenen Kaukasier ein BCC entwickeln werden (Athar, M *et al.* 2006).

Die Kosten, die das Gesundheitssystem zur Diagnose und Therapie dieser Hauttumoren aufbringen muss, sind bereits heute enorm. Aufgrund der Inzidenzsteigerung entwickelt sich das BCC immer mehr zu einem Problem für das Gesundheitswesen (Roewert-Huber, J *et al.* 2007).

Interessanterweise zeigen etwa 20% der BCC eine Spontanregression (Curson, C und Weedon, D 1979). Der zugrundeliegende Mechanismus ist nicht bekannt, jedoch scheint die spontane Regression mit Zellen des Immunsystems sowie Cytokinen assoziiert zu sein (Hunt, MJ *et al.* 1994; Wong, DA *et al.* 2000). Die Aufklärung des Mechanismus der Spontanregression birgt großes Potential. So könnte ein besseres Verständnis der

molekularen Grundlagen dieses Vorgangs zu kostengünstigeren und effizienteren Therapien des BCC führen.

Im Gegensatz zu den molekularen Vorgängen bei der Spontanregression von BCC kennt man heute jedoch die Ursache des BCC. So weiß man, dass dieser Tumor durch eine Fehlregulation des Hedgehog/Patched Signalwegs ausgelöst wird (Epstein, EH 2008). Daher soll dieser Signalweg hier etwas ausführlicher beschrieben werden.

1.2 Der Hedgehog/Patched (Hh/Ptch) Signalweg

Bei der genetischen Analyse von *Drosophila melanogaster* Larven identifizierten Nüsslein-Volhard und Wieschaus die Gene *Hedgehog* (*Hh*) und *Patched* (*Ptch*) (Nüsslein-Volhard, C und Wieschaus, E 1980). *Ptch* ist der Rezeptor für den Liganden *Hh* und vermittelt durch einen komplexen Mechanismus das Signal unter anderem über *Smoothed* (*Smo*), ein weiteres transmembranes Protein, und über den Transkriptionsfaktor *Cubitus interruptus* (*Ci*) ins Zellinnere.

Der Signalweg ist zwischen den Spezies hochkonserviert. In Vertebraten wurden drei *Hh* homologe Gene gefunden, *Desert hedgehog* (*Dhh*), *Indian hedgehog* (*Ihh*) und *Sonic hedgehog* (*Shh*). In Wirbeltieren sind weiterhin zwei homologe *Ptch* Rezeptoren bekannt. Hierbei handelt es sich um *Ptch1* und *Ptch2*, wobei *Ptch1* (das im Folgenden als *Ptch* bezeichnet wird) besser untersucht ist. Auch bei den Gli-Proteinen (ortholog zu *Ci* aus *D. melanogaster*) liegen in Vertebraten drei Homologe vor, *Gli1*, *Gli2* und *Gli3*.

Ptch ist ein Protein mit 12 transmembranen Domänen und fungiert als Rezeptor für *Hh* Proteine. In Abwesenheit des *Hh*-Liganden inhibiert *Patched* katalytisch den 7-Transmembranrezeptor *Smo*, der eine den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ähnliche Struktur besitzt. Hierdurch wird die Signaltransduktion unterbunden. Aufgrund seiner inhibitorischen Aktivität gegenüber *Smo* ist *Ptch* ein negativer Regulator der Signalkaskade. Der Prozess der Inhibierung von *Smo* durch *Ptch* ist noch nicht vollständig verstanden, erfolgt aber vermutlich nicht durch direkte Interaktion der beiden Proteine sondern über ein durch *Ptch* sezerniertes *Smo*-inhibitorisches Molekül. Durch Bindung des Liganden *Hh* an die extrazellulären Schleifen von *Ptch* wird die Repression von *Smo* aufgehoben und resultiert in der physiologischen Aktivierung des *Hh/Ptch* Signalwegs. Der Transduktionsmechanismus, mit dem das *Hh*-Signal vom Rezeptorkomplex zur Aktivierung seiner Zielgene führt, ist noch unklar. Man weiß jedoch, dass die Familie der Gli Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren involviert ist. Im inaktiven Zustand des Signalwegs werden die Gli-Transkriptionsfaktoren von einem Proteinkomplex, an dem *Sufu* („Suppressor of Fused“) und *Kif7* beteiligt sind, im Cytoplasma gehalten. Im aktiven Zustand werden die Gli-Proteine aus

dem cytoplasmatischen Proteinkomplex entlassen werden und gelangen in den Nukleus. Im Nukleus bewirken die Gli-Proteine dann die Transkription ihrer Zielgene. Gli1 und Gli2 sind die hauptsächlichen Aktivatoren der Hh/Ptch Signalkaskade, dagegen übt Gli3 eine repressorische Aktivität auf die Kaskade aus, welche jedoch durch das Hh-Signal aufgehoben wird. Es ist bekannt, dass durch das Hh-Signal die Transkription von *Gli1* aktiviert wird, wobei die transkriptionelle Aktivierung von *Gli1* von dem Vorhandensein funktioneller Gli2 und Gli3 Proteine abhängt. Die Expression von *Gli1* mRNA ist daher ein zuverlässiger Marker für die Aktivität der Hh/Ptch Signalkaskade. Da Gli-Proteine wiederum die *Ptch*-Transkription durch autoregulatorisches „Feedback“ stimulieren, gehört auch *Ptch* zu den heute anerkannten Zielgenen einer aktivierten Hh/Ptch Signalkaskade (Reviews von (Hooper, JE und Scott, MP 2005; Scales, SJ und de Sauvage, FJ 2009; Cohen, MM, Jr. 2010)).

Nach neuesten Erkenntnissen wird primären Zilien eine entscheidende Rolle bei der Hh/Ptch Signaltransduktion in Säugetieren zugeschrieben. Primäre Zilien sind sensorische Organellen auf der Zelloberfläche, die wie Antennen Signale aus der Umgebung der Zelle in das Zellinnere weiterleiten. An ihrer Basis werden sie durch einen als Basalkörper bezeichneten Proteinkomplex vom Zytoplasma der Zelle abgegrenzt und deshalb auch als eigenständige Kompartimente betrachtet. Die Verbindung zwischen primärem Zilium und Hh/Ptch Signalkaskade kann durch invers miteinander korrelierende Level von *Ptch* und *Smo* gezeigt werden. So verlässt *Ptch* nach Bindung von Hh das Zilium, wobei *Smo* hineintransloziert, und der Signalweg aktiviert wird (siehe Review (Cohen, MM, Jr. 2010)). Zwei aktuelle Studien zeigen, dass die Entstehung von BCC als auch von Medulloblastomen tatsächlich durch Zilien reguliert werden (Han, YG *et al.* 2009; Wong, SY *et al.* 2009).

Der Ablauf der Hh-Signaltransduktion bei Säugetieren ist in stark vereinfachter Form in Abbildung 1 dargestellt.

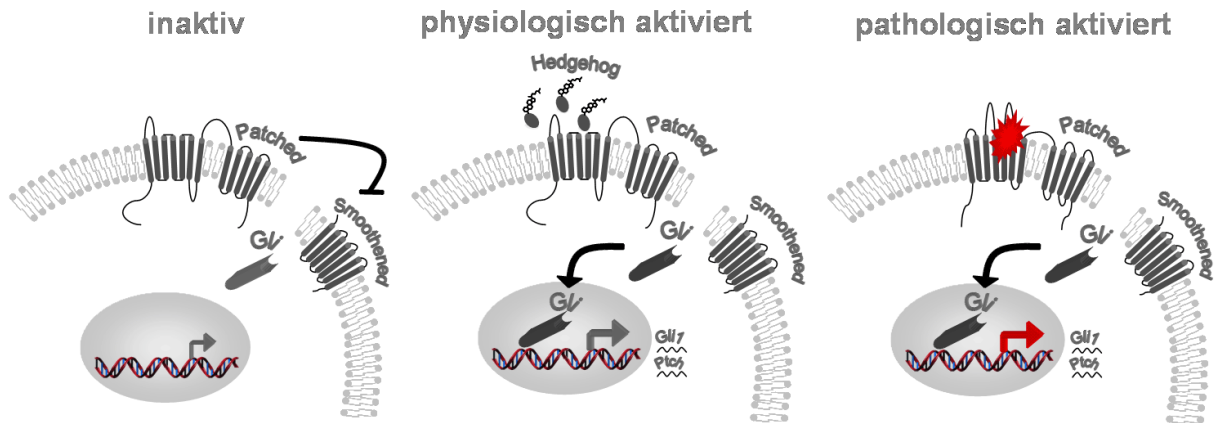


Abbildung 1: Schematische Darstellung des inaktiven, physiologisch und pathologisch aktivierten Hh/Ptch Signalwegs. Gezeigt ist der inaktive (links) und durch die Bindung des Liganden Hedgehog physiologisch aktivierte Hh/Ptch Signalweg (Mitte). Eine pathologische Aktivierung (rechts) kann durch eine inaktivierende Patched-Mutation (roter Stern) oder Überexpression von Hedgehog verursacht werden. Der inaktive Zustand der Signalkaskade beruht auf der Inhibition der Aktivität von Smoothened durch Patched. Ausgelöst durch die Bindung des Liganden Hedgehog an Patched oder durch eine inaktivierende Patched-Mutation vermittelt Smoothened die Translokation von Gli1 und weiteren Gli-Transkriptionsfaktoren in den Nucleus. Dort wird die Transkription von Zielgenen, darunter Patched (*Ptch*) und *Gli1*, ausgelöst. Diese Abbildung wurde aus der Dissertation von F. Nitzki (2008) übernommen.

Physiologischerweise spielt der Hh/Ptch Signalweg in Vertebraten eine essentielle Rolle bei der embryonalen Musterbildung, Regulation der Zellproliferation, *l*-differenzierung sowie Apoptose, bei der Entwicklung der Extremitäten, des Skelettsystems und des zentralen Nervensystems (Hammerschmidt, M *et al.* 1996; Hooper, JE und Scott, MP 2005).

Der physiologischen Aktivierung der Signalkaskade steht die pathologische Aktivierung gegenüber (Abbildung 1). Hierbei kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung der Signalkaskade, was zur Deregulation der zellulären Proliferation, Differenzierung und Apoptose führt und schließlich in Entwicklungsstörungen sowie Tumorstadium resultiert (Wetmore, C 2003; Scales, SJ und de Sauvage, FJ 2009). Deshalb hat die Hh/Ptch Signalkaskade eine bedeutende Funktion in der Regulation des Zellzyklus und eine Deregulation kann daher gravierende Folgen auf die Proliferation von Zellen haben.

1.2.1 Der Hh/Ptch Signalweg in Tumoren

Der Zusammenhang zwischen der pathologischen Reaktivierung des Hh/Ptch Signalwegs und der daraus resultierenden Tumorentstehung wurde zum ersten Mal beim Gorlin-Goltz-Syndrom (Basalzellnaevus-Syndrom) erkannt (Hahn, H *et al.* 1996; Johnson, RL *et al.* 1996). Diese autosomal-dominant vererbte Krankheit ist durch eine Kombination aus Entwicklungsdefekten und einer Prädisposition zu BCC charakterisiert (Gorlin, RJ 1987; Hahn, H *et al.* 1996; Johnson, RL *et al.* 1996) und wird durch Keimbahnmutationen in *Ptch* hervorgerufen.

Heute weiß man, dass der Hh/Ptch Signalweg bei einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten eine wichtige Rolle spielt. Eine pathologische Aktivierung kann hierbei nicht

nur durch mutationsbedingte Inaktivierung von *Ptch*, sondern auch durch aktivierende Mutationen in *Hh* oder *Smo*, oder aber durch Überexpression von *Hh* oder *Gli* hervorgerufen werden. So konnte beispielsweise bei Tumoren des Verdauungstraktes, des Pankreas, der Lunge, des Skelettmuskels, der Harnblase und des Ovars die pathologische Aktivierung des Signalwegs festgestellt werden (Berman, DM *et al.* 2003; Thayer, SP *et al.* 2003; Watkins, DN *et al.* 2003; Hamed, S *et al.* 2004; Chen, X *et al.* 2007; Zibat, A *et al.* 2010). Hierbei scheint die Überexpression von *Shh* eine wichtige Rolle zu spielen. Darüber hinaus konnten aktivierende *Smo*-Mutationen in Haut- und neuroektodermalen Tumoren detektiert werden (Vorechovsky, I *et al.* 1997; Reifenberger, J *et al.* 1998; Xie, J *et al.* 1998; Lam, CW *et al.* 1999). Somatische Mutationen von *Ptch* führen vor allem zu Basalzellkarzinomen. Aber auch andere Tumoren, wie bspw. Medulloblastome oder seltener Rhabdomyosarkome können durch *Ptch* Mutation entstehen (Raffel, C *et al.* 1997; Bridge, JA *et al.* 2000; Reifenberger, J *et al.* 2005; Tostar, U *et al.* 2006). Die für die Entstehung von Tumoren verantwortlichen *Ptch* Mutationen sind dabei häufig in den beiden extrazellulären Schleifen des Proteins lokalisiert (Lindstrom, E *et al.* 2006).

Die Fehlregulation der Hh/*Ptch* Signalkaskade wird in allen der oben genannten Tumoren durch Überexpression von *Gli1* oder *Ptch* deutlich.

1.2.2 Die Rolle von *Ptch* Mutationen beim BCC

Als molekulare Ursache konnten 1996 sowohl für das hereditäre als auch sporadische Basalzellkarzinom Mutationen in *Ptch* identifiziert werden (Gailani, MR *et al.* 1996; Hahn, H *et al.* 1996). Die weitaus am häufigsten detektierten Veränderungen (70%) sind loss of function-Mutationen des *Ptch*-Gens (Reifenberger, J *et al.* 2005). Aufgrund der *Ptch* Mutation ist die Hh/*Ptch* Signalkaskade dereguliert. Tatsächlich zeigen alle untersuchten BCC eine erhöhte Expression der Zielgene des Hh/*Ptch* Signalwegs, *Gli1* und *Ptch* (Evangelista, M *et al.* 2006). Neben *Ptch* Mutationen sind, wenn auch sehr selten, *Smo* Mutationen für die Entstehung des BCC verantwortlich (Xie, J *et al.* 1998). All diese Daten zeigen, dass der Hh/*Ptch* Signalweg bei der Entstehung von BCC von essentieller Bedeutung ist.

BCC entwickeln sich auch in verschiedenen Tiermodellen, in denen der Hh/*Ptch* Signalweg dereguliert ist. Exzellente Modelle zur Untersuchung der Pathogenese von BCC sind dabei Mäuse, bei denen sich BCC durch *Ptch* Mutationen entwickeln.

1.2.3 Mausmodell für BCC

BCC konnten in der Maus zum ersten Mal in heterozygoten *Ptch*^{+/-} Mäusen nach Bestrahlung hervorgerufen werden (Aszterbaum, M *et al.* 1999; Mancuso, M *et al.* 2004; Pazzaglia, S *et al.* 2004). Heute existieren jedoch sehr viel bessere konditionelle BCC-Mausmodelle, in denen sich die Tumoren zu einem bestimmten Zeitpunkt induzieren lassen. Unsere

Arbeitsgruppe hat ein solches Modell entwickelt. Hierzu wurden zunächst konditionelle *Ptch^{flox/flox}* Mäuse generiert (Uhmann, A *et al.* 2007), bei denen die Exone 8 und 9 des *Ptch*-Gens von *loxP*-Sequenzen in den Intronen 7 und 9 flankiert sind. Diese Mäuse wurden mit *Rosa26ERT2^{+/-}* Mäusen verpaart (Hameyer, D *et al.* 2007), die im Folgenden als *ERT2^{+/-}* Mäuse bezeichnet werden. Die daraus resultierenden *Ptch^{flox/+}ERT2^{+/-}* Nachkommen wurden wiederum mit *Ptch^{flox/flox}* Mäusen gekreuzt, um *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse zu generieren. Da *ERT2^{+/-}* Mäuse eine Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase exprimieren, kann die *ERT2* durch Tamoxifen aktiviert werden. In *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen führt die einmalige Injektion von 100µg Tamoxifen zur effizienten *Ptch* Mutation in der Haut (Zibat, A *et al.* 2009).

Schon 45 Tage nach Tumorinduktion zeigen alle Mäuse an den Ohren und am Schwanz BCC Vorläuferläsionen (Abbildung 2, oben). Wie Antikörperfärbungen mit K17 oder p63 gezeigt haben, entwickeln sich die Tumoren aus Zellen der äußeren Wurzelscheide des Haarfollikels und auch aus Basalzellen der interfollikulären Epidermis (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Vorläuferläsionen entwickeln sich bis zum Tag 90 nach Tumorinduktion vollentwickelte Tumoren. Diese Tumoren wachsen tiefer in die Dermis und ähneln histologisch dem humanen nodulären BCC, welches ein häufiger BCC-Subtyp des Menschen ist. Interessanterweise werden die Tumoren in diesem konditionellen Mausmodell im Laufe der Zeit nicht aggressiver, sondern bilden sich in 100% der Tiere etwa 250 Tage nach Induktion spontan zurück (regrediente BCC).

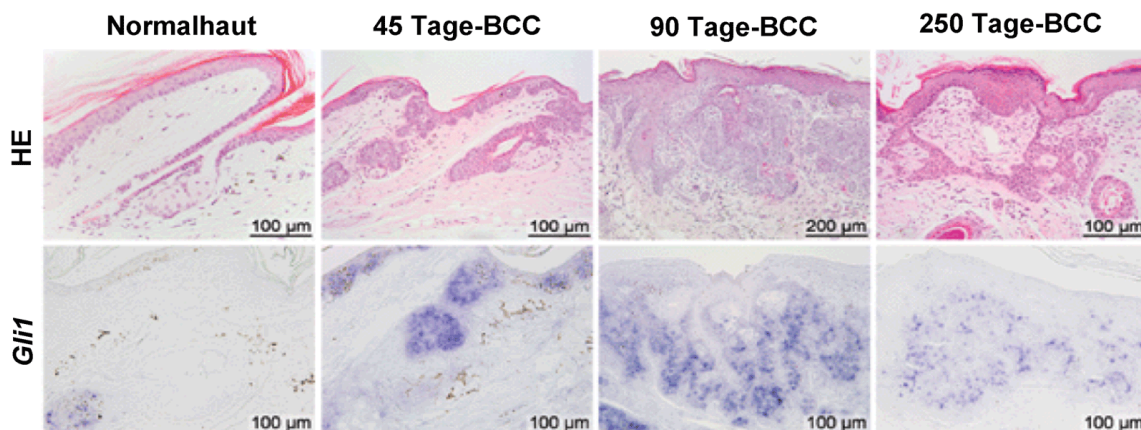


Abbildung 2: Darstellung von Normalhaut im Vergleich zu tumortragender Haut. Dargestellt sind HE-gefärbte Paraffinschnitte (oben) und Gli1 *in situ*-Hybridisierungen (unten) von Tamoxifen-behandelten *Ptch^{flox/flox}* Mäusen (Normalhaut) im Vergleich zu BCC von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen. Die Schnitte zeigen Tumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Tumorinduktion. Die Abbildung wurde aus Nitzki *et al.* (2010) übernommen.

Wie man der Abbildung 2 (unten) außerdem entnehmen kann, wird *Gli1* in allen BCC-Stadien exprimiert. Das bedeutet, dass die Hh/Ptch Signalkaskade auch in den regredienten Stadien weiterhin aktiv ist und die spontane Regression der BCC somit nicht durch eine Inaktivierung des Signalwegs bedingt sein kann.

Außerdem weisen die vollentwickelten und regredienten BCC im Vergleich zu den Vorläuferläsionen eine 2-/ bzw. 10-fache Reduzierung der Ki67 positiven Zellen auf (Abbildung 3a). Im Gegensatz dazu bleibt die Anzahl Caspase-3 positiver Zellen in allen BCC-Stadien durchgängig niedrig (Abbildung 3b). Somit ist die Regression der BCC eindeutig mit einer Verminderung der Proliferation und eher weniger mit zunehmender Apoptose assoziiert.

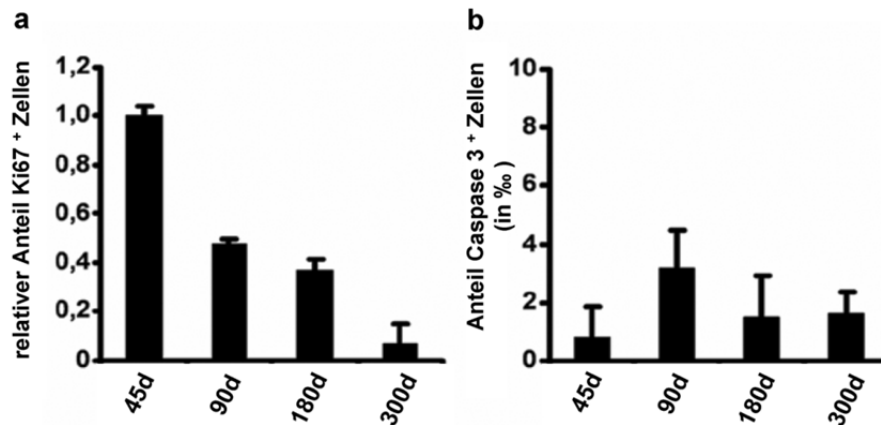


Abbildung 3: Darstellung des Proliferationsindex und der Caspase-Aktivität in BCC von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen. Dargestellt sind der relative Anteil Ki67 positiver Zellen (a) sowie der Anteil Caspase-3 positiver Zellen (b) in verschiedenen BCC-Stadien nach Tumorinduktion. Der Anteil Ki67 positiver Zellen wurde in Relation zu den Vorläuferläsionen (45d) dargestellt, deren Anteil auf 1 gesetzt wurde. Die Abbildung wurde aus Nitzki *et al.* (2010) übernommen.

Die *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Maus ist somit ein hervorragendes Modell um molekulare Vorgänge bei sowohl BCC-Pathogenese und *l*-Progression als auch bei der BCC-Regression zu untersuchen.

1.3 Wnt Signalwege

Der Wnt Signalweg spielt in der frühen Embryonalentwicklung von Vertebraten eine wichtige Rolle und reguliert dabei verschiedene Prozesse wie z. B. die Ausbildung von Körperachsen, Segmentpolarität oder Organanlagen. Auch sind die Wnt Proteine während der Embryonalentwicklung für den Erhalt adulter Gewebestrukturen notwendig (Logan, CY und Nusse, R 2004). Der Name Wnt setzt sich aus den Bezeichnungen für die homologen Gene *Wingless* (*Drosophila*) und *Int1* (Maus) zusammen (Cabrera, CV *et al.* 1987; Rijsewijk, F *et al.* 1987). Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* führen Mutationen im *Wingless*-Gen zu flügellosen Organismen (Sharma, RP und Chopra, VL 1976). Bei Mäusen wird die Entwicklung von Brustkrebs gefördert, wenn durch die Integration des *Mouse Mammary Tumorvirus* (MMTV) in der Nähe des *Int1*-Gens (heute *Wnt1*) seine Expression aktiviert wird (Nusse, R und Varmus, HE 1992). Bislang sind bereits 19 murine sowie humane *Wnt*-Gene

bekannt (vgl. Wnt-Homepage: www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html). Sie sind beispielsweise in die Kardiogenese (Pandur, P *et al.* 2002), Nephrogenese (Stark, K *et al.* 1994) oder die Extremitätenentwicklung (Church, VL und Francis-West, P 2002) involviert. Häufig sind die *Wnt* Gene jedoch mit malignen und metastasierenden Tumoren assoziiert (siehe Review (Giles, RH *et al.* 2003)).

Die Wnt Proteine sind eine Gruppe sezernierter Glykoproteine (Zhai, L *et al.* 2004), die an transmembrane Rezeptoren der Frizzled (Fzd)-Familie binden. Sie wirken auf ihre Zielzellen, indem sie drei verschiedene Signalkaskaden aktivieren können. So stehen dem kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg die beiden nicht-kanonischen Signalwege, zu denen der Wnt/ Ca^{2+} Signalweg sowie der Wnt/JNK Signalweg gehören, gegenüber. Die drei alternativen Signalkaskaden werden in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben und sind in Abbildung 4 und 5 dargestellt.

1.3.1 Der kanonische Wnt/ β -Catenin Signalweg

Der von den drei alternativen Wnt Signalwegen am besten untersuchte ist der kanonische Wnt/ β -Catenin Signalweg (Abbildung 4). Ist der Wnt Signalweg inaktiv, wird cytoplasmatisches β -Catenin vom sogenannten „Destruktions-Komplex“ gebunden (He, X *et al.* 2004; Gordon, MD und Nusse, R 2006). Der Komplex bewirkt eine Phosphorylierung aller 4 Phosphorylierungsstellen von β -Catenin. Dies ermöglicht es der E3-Ubiquitin-Ligase zu binden und β -Catenin zu ubiquitinieren. Dadurch kann β -Catenin im Proteasom abgebaut werden (He, X *et al.* 2004) (siehe Abbildung 4a). Bei der Aktivierung des Signalwegs werden die Wnt Faktoren an Fzd und seine Co-Rezeptoren wie LRP5/6 gebunden (He, X *et al.* 2004). Durch Bindung von Wnt an den Fzd/LRP5/6-Rezeptorkomplex wird Axin1 an die Zellmembran transloziert und an den cytoplasmatischen Teil von LRP5/6 gebunden (Zeng, X *et al.* 2008). Dies führt zur Aktivierung des Proteins Dishevelled (Dvl) und zum Zerfall des „Destruktions-Komplexes“ (Gordon, MD und Nusse, R 2006). β -Catenin wird somit nicht mehr phosphoryliert oder ubiquitiniert. Es wird daher auch nicht mehr abgebaut und akkumuliert im Cytoplasma (Hatsell, S *et al.* 2003). Stabilisiertes β -Catenin wird anschließend in den Nukleus transloziert. Dort fungiert β -Catenin als transkriptioneller Co-Aktivator (Clevers, H 2006) und bindet zusammen mit anderen Proteinen wie Bcl9 an den TCF/LEF-Transkriptionsfaktor, der dadurch aktiviert wird. TCF/LEF aktiviert wiederum eine RNA-Polymerase, die dann die Transkription verschiedener Zielgene bewirkt (siehe Abbildung 4b). Zu diesen gehören z. B. *Myc* und *CyclinD1* (Reya, T und Clevers, H 2005), die in der Onkogenese eine bedeutende Rolle spielen.

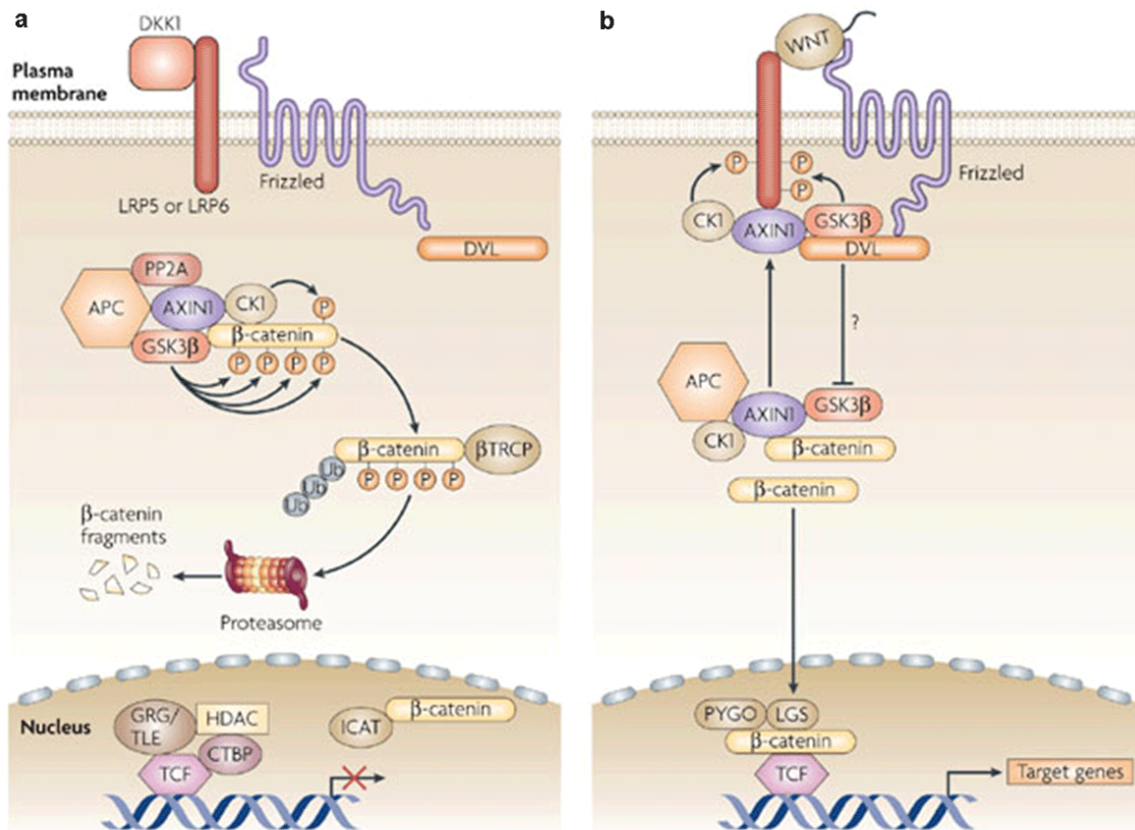


Abbildung 4: Der kanonische Wnt/β-Catenin Signalweg. Bei Abwesenheit des Wnt-Liganden am Rezeptorkomplex wird β-Catenin phosphoryliert und ubiquitiniert und durch das Proteasom degradiert (a). Durch Bindung der Wnt-Proteine am Rezeptorkomplex wird die Signalkaskade aktiviert. Die Aktivierung führt zur Stabilisierung und Translokation von β-Catenin in den Nucleus. Dies resultiert in Transkription der Zielgene (b). Die Abbildung wurde aus Staal *et al.*, Nature Reviews Immunology 8, 581-593, 2008 übernommen.

1.3.2 Die nicht-kanonischen Wnt Signalwege

1.3.2.1 Der Wnt/JNK Signalweg

Bei den beiden nicht-kanonischen Wnt Signalwegen wird der Wnt/JNK Signalweg (Boutros, M *et al.* 1998) vom Ca^{2+} -abhängigen Signalweg (Kuhl, M *et al.* 2000) unterschieden.

Da der Wnt/JNK Signalweg Ähnlichkeiten zu dem Signalweg aufweist, der in *Drosophila* die planare Zellpolarität kontrolliert, wird er deshalb auch als PCP (planar cell polarity) Signalweg bezeichnet (Abbildung 5a). Die Aktivierung des Signalwegs wird über die Bindung von Wnt an den Fzd-Rezeptor über Ror1/2 als Co-Rezeptoren vermittelt (Hikasa, H *et al.* 2002). Dann erfolgt die Rekrutierung des cytoplasmatischen Proteins Dvl an den Fzd-Rezeptor und die Aktivierung der beiden GTPasen Rho und Rac (Fanto, M *et al.* 2000; Habas, R *et al.* 2003). Daraus resultierend wird die c-Jun N-terminale Kinase JNK aktiviert, was wiederum zur Phosphorylierung und Aktivierung von c-Jun führt (Habas, R *et al.* 2003).

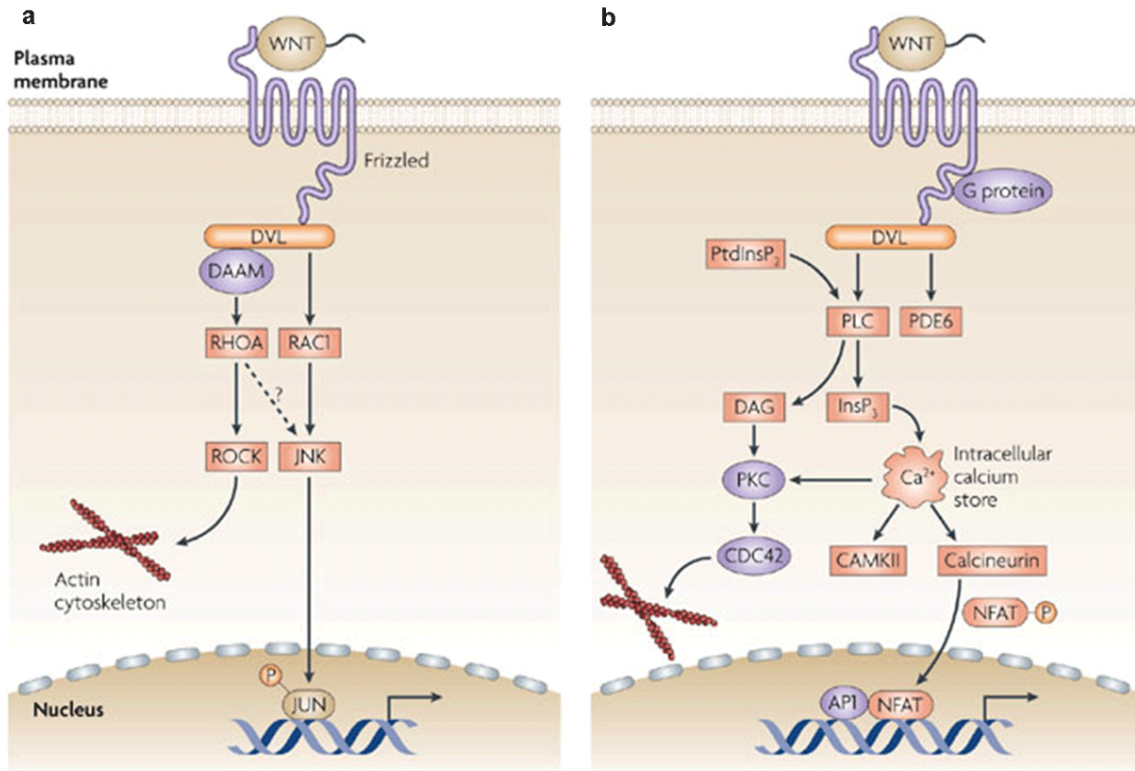


Abbildung 5: Die beiden nicht-kanonischen Wnt Signalwege. a) Der Wnt/JNK Signalweg führt durch Aktivierung von JNK und c-Jun zur Transkription von Zielgenen. b) Beim Wnt/Ca²⁺ abhängigen Signalweg wird durch Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration die Aktivierung der PKC, der CaMKII sowie der Phosphatase Calcineurin vermittelt. Die Abbildung wurde aus Staal *et al.*, Nature Reviews Immunology 8, 581-593, 2008 übernommen.

1.3.2.2 Der Wnt/Ca²⁺ abhängige Signalweg

Auch beim Wnt/Ca²⁺ abhängigen Signalweg erfolgt die Signalweiterleitung zunächst durch Bindung von Wnt an den Fzd-Rezeptor (Abbildung 5b). Dadurch wird die membranständige Phospholipase C aktiviert und bewirkt die Freisetzung intrazellulärer Ca²⁺-Ionen vom endoplasmatischen Reticulum ins Cytoplasma. Dies hat zur Folge, dass die Ca²⁺-abhängige Kinase Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) (Kuhl, M *et al.* 2000) und die Protein Kinase C (PKC) (Sheldahl, LC *et al.* 1999) aktiviert werden. Sowohl die CaMKII als auch die PKC aktivieren verschiedene regulatorische Proteine sowie Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und Creb. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch der Calcium-abhängige Transkriptionsfaktor NFAT durch den Wnt/Ca²⁺ Weg aktiviert werden kann (Murphy, LL und Hughes, CC 2002; Saneyoshi, T *et al.* 2002; Pongracz, JE und Stockley, RA 2006). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass auch Dvl intrazelluläres Ca²⁺ freisetzen und somit Calcium-sensitive Kinasen aktivieren kann (Sheldahl, LC *et al.* 2003).

1.4 Aktivierung der Wnt Signalwege durch Wnt5a

Wnt5a kann als Ligand des kanonischen Wnt Signalwegs als auch der nicht-kanonischen Signalwege fungieren (Abbildung 6).

Seine aktivierende bzw. antagonisierende Funktion im kanonischen Signalweg ist vom jeweiligen Rezeptorkontext abhängig (Mikels, AJ und Nusse, R 2006). So wird der kanonische Wnt Signalweg aktiviert, wenn Wnt5a an die Rezeptorkombination Fzd4/LRP5 (Umbhauer, M *et al.* 2000; Mikels, AJ und Nusse, R 2006) oder an Fzd7 (Umbhauer, M *et al.* 2000) bindet. Auch durch Bindung an Fzd8 ist wahrscheinlich eine Wnt5a-vermittelte Aktivierung der Signalkaskade möglich (Itoh, K *et al.* 1998). Über den Rezeptor Fzd8 ist darüber hinaus bekannt, dass er vermehrt im BCC exprimiert wird (Asplund, A *et al.* 2008).

Eine Bindung von Wnt5a an Ror1/2 resultiert in der Aktivierung des Wnt/JNK Signalwegs (Li, L *et al.* 2009), wohingegen durch Bindung an die Rezeptoren Fzd2, 3, 4, 6 (He, X *et al.* 1997; Kuhl, M *et al.* 2000; Weeraratna, AT *et al.* 2002; Kohn, AD und Moon, RT 2005) oder Fzd5 (Blumenthal, A *et al.* 2006) der Wnt/Ca²⁺ abhängige Signalweg aktiviert wird. Die alternativen Wnt Signalwege sind sehr komplex und miteinander quervernetzt, wie der Abbildung 6 zu entnehmen ist. Diese Interaktionen sind in Pukrop und Binder 2008 beschrieben.

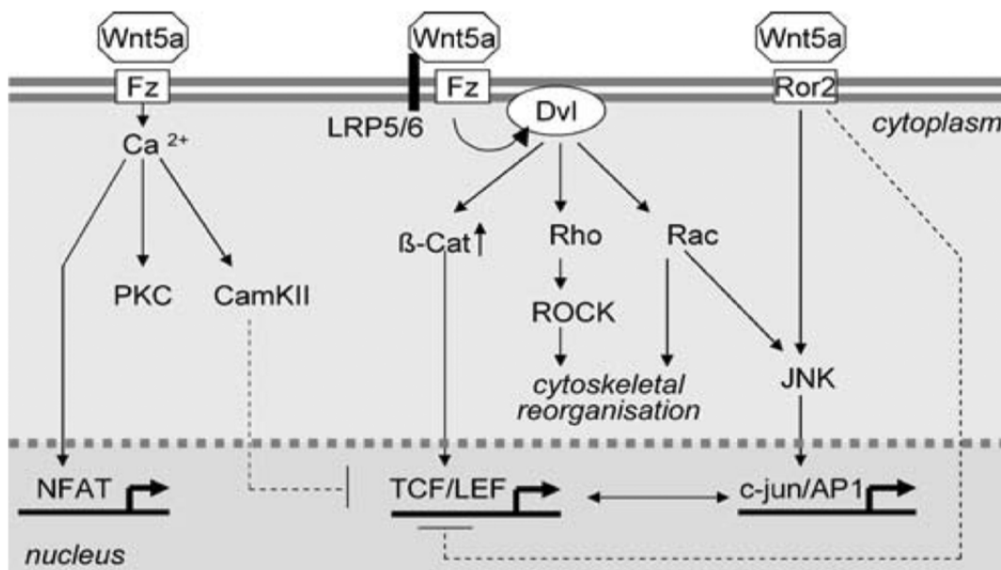


Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen Wnt Signalwege aktiviert durch Wnt5a. Dargestellt sind sowohl der kanonische Wnt/ β -Catenin Signalweg als auch die beiden nicht kanonischen Wnt Signalwege (Wnt/JNK sowie Wnt/Ca²⁺) und deren Interaktionen. Die Abbildung wurde aus Pukrop und Binder, Journal of Molecular Medicine 86:259-266, 2008 übernommen.

1.5 Die Rolle von Wnt5a bei Tumoren

Generell wird die Rolle von Wnt5a in Tumoren kontrovers diskutiert. Mehrere Studien schreiben Wnt5a eine onkogene Funktion bei Tumoren zu. So konnte in soliden malignen Tumoren eine Überexpression von Wnt5a gezeigt werden (Iozzo, RV *et al.* 1995). Auch beim

malignen Melanom (Bittner, M *et al.* 2000) ist Wnt5a ein zuverlässiger Marker für aggressives Tumorwachstum. Weiterhin ist gezeigt worden, dass eine Überexpression von *Wnt5a* sogar zur erhöhten Invasivität von Melanomzellen führt (Weeraratna, AT *et al.* 2002). Dies konnte auch für Brustkrebszellen gezeigt werden, wobei hier *Wnt5a* nicht tumorintrinsic, sondern interessanterweise in tumorassoziierten Makrophagen (TAM, engl. tumor-associated macrophages) exprimiert wurde (Pukrop, T *et al.* 2006).

Dagegen zeigen einige Studien auch eine tumorsuppressorische Funktion von. So entwickeln hemizygot *Wnt5a* Knockout-Mäuse in ca. 25% der Fälle B-Zell Lymphome und chronisch myeloische Leukämien (CML) (Liang, H *et al.* 2003). Weiterhin ist gezeigt worden, dass Wnt5a die Proliferation und Migration von Karzinomzellen der Schilddrüse hemmt (Kremenevskaja, N *et al.* 2005). Außerdem korreliert die *Wnt5a* Expression invers mit der Metastasierung und dem Überleben von Brustkrebspatienten (Jonsson, M *et al.* 2002). Schließlich konnte gezeigt werden, dass aggressive Brusttumoren generell nur wenig *Wnt5a* exprimieren (Leris, AC *et al.* 2005). Aufgrund der vorherrschenden Datengrundlage resultiert, dass die Funktion von Wnt5a vermutlich mit der einzelnen Tumorentität zusammenhängt und wahrscheinlich auch vom jeweiligen Rezeptorkontext abhängig ist.

1.5.1 Bedeutung des Wnt5a Signalwegs beim BCC

Neben dem Hh/Ptch Signalweg ist auch Wnt5a in die Pathogenese von Basalzellkarzinomen involviert. So konnte in allen bisher untersuchten BCC eine Überexpression von Wnt5a festgestellt werden (Bonifas, JM *et al.* 2001; Mullor, JL *et al.* 2001; Saldanha, G *et al.* 2004; Yang, SH *et al.* 2008). Deshalb wird diesem Gen eine wichtige Bedeutung bei der Entstehung und Progression von BCC zugeschrieben.

Wnt5a wird normalerweise in der Haut in der äußeren Wurzelscheide des Haares exprimiert. Zudem spielt Wnt5a eine wichtige Rolle bei der Haarfollikelmorphogenese und wird bei diesem Vorgang wahrscheinlich direkt durch den Hh/Ptch Signalweg reguliert (Reddy, S *et al.* 2001). Daher hat unsere Arbeitsgruppe zunächst untersucht, ob sich die Expression von *Wnt5a* in der BCC-Zelllinie ASZ001 durch Aktivierung der Hh/Ptch-Signalkaskade induzieren lässt. Mittels Transfektionsexperimenten konnte unsere Gruppe zeigen, dass dies jedoch nicht der Fall ist.

Weiterhin konnte bei einigen BCC eine nukleäre Lokalisation von β -Catenin festgestellt werden (Saldanha, G *et al.* 2004). Deshalb wurde angenommen, dass Wnt5a über die Aktivierung des kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalwegs zur Progression und vermehrter Proliferation dieser Tumoren führt. Auf der anderen Seite werden wichtige Downstream-Targets von β -Catenin wie bsw. *c-Myc* in BCC nicht überexprimiert (Bonifas, JM *et al.* 2001). Daher ist die Funktion von kanonischem Wnt Signaling bei der Progression des Basalzellkarzinoms nicht eindeutig. Weiterhin zeigen *in vivo* Daten, dass kanonisches Wnt

Signaling zumindest nicht mit der Initiation dieser Tumoren in Verbindung steht. So entwickeln transgene Mäuse, bei denen β -Catenin in der Haut überexprimiert wird, keine Basalzellkarzinome, sondern Trichofollikulome und Pilomatrikome (Reya, T und Clevers, H 2005).

Unsere Arbeitsgruppe konnte nun zeigen, dass *Wnt5a* auch in BCC von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen exprimiert wird. Interessanterweise ist diese Expression nicht in den BCC-Vorläuferläsionen zu sehen (Abbildung 7, oben). Sie tritt erst in vollentwickelten BCC auf und bleibt während der Tumorrogression bestehen. Dies führte zur Hypothese, dass *Wnt5a* mit der Tumorrogression in Verbindung stehen könnte.

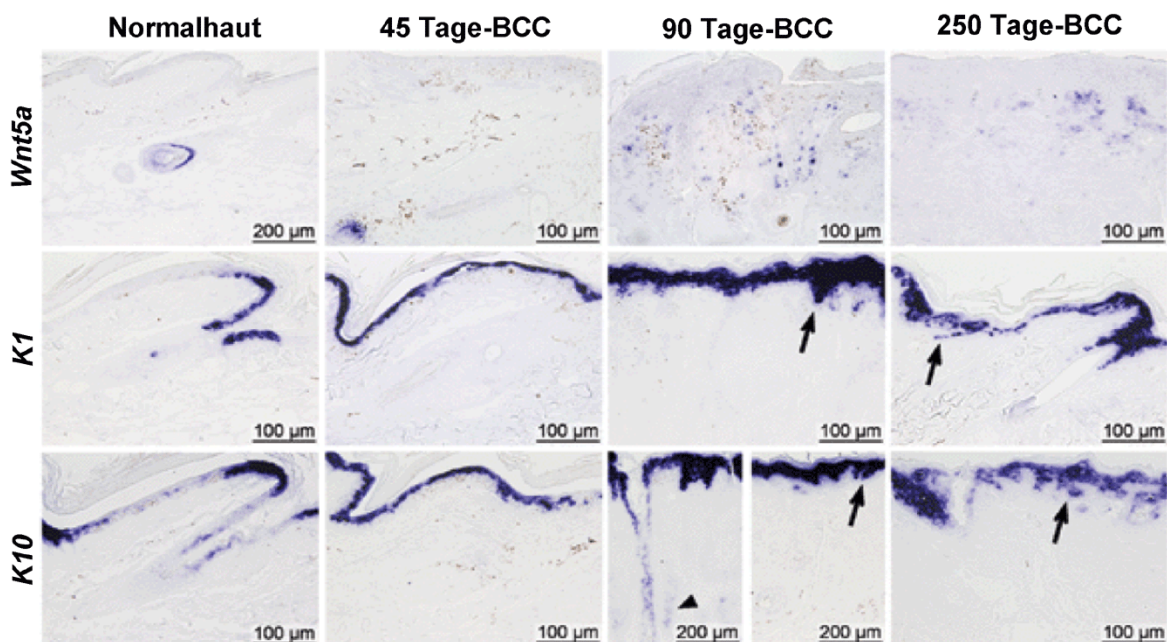


Abbildung 7: Darstellung von Normalhaut im Vergleich zu tumortragender Haut. Gezeigt ist die Expression von *Wnt5a* sowie der Differenzierungsmarker *K1* und *K10* in der Haut von Mäusen mittels *in situ*-Hybridisierung. Die jeweilige Expression wurde in Paraffinschnitten von Tamoxifen-behandelten *Ptch^{flox/flox}* Mäusen (Normalhaut) und in BCC von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Tumorinduktion nachgewiesen. Die Pfeile weisen auf *K1* sowie *K10* positive Areale in hyperproliferativer Haut bzw. tiefer gelegenen Hautschichten. Die Abbildung wurde aus Nitzki *et al.* (2010) übernommen.

Hochinteressant war dabei die Beobachtung, dass die *Wnt5a* Expression dabei lediglich auf das Stroma begrenzt war (Abbildung 8).

Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Spontanregression der Tumoren neben erhöhter stromaler *Wnt5a* Expression auch mit einer erhöhten tumorintrinsic Expression der epidermalen Differenzierungsmarker *K1* und *K10* einhergeht (Abbildung 7, Mitte und unten).

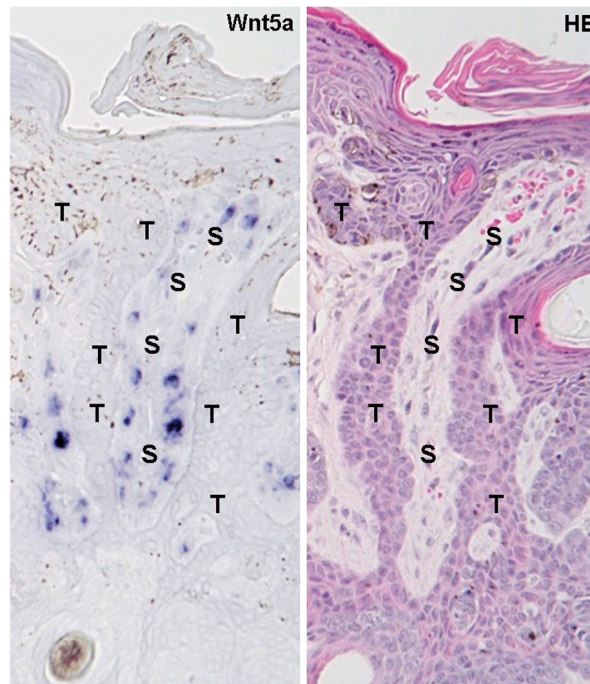


Abbildung 8: *Wnt5a* Expression und HE-Färbung von Haut einer *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Maus. Dargestellt sind direkt aneinander angrenzende Paraffinschnitte eines BCC 90 Tage nach Tumorinduktion in 200facher Vergrößerung. Der linke Ausschnitt der Abbildung zeigt die *Wnt5a* Expression mittels *in situ*-Hybridisierung und der rechte Ausschnitt eine entsprechende HE-Färbung des Gewebes. Abkürzungen: S, Stroma; T, Tumor.

Da angenommen wird, dass *Wnt5a* zur Aktivierung und nukleären Lokalisation von β -Catenin führen kann (siehe oben), hat unsere Arbeitsgruppe auch die Expression und Lokalisation von β -Catenin sowie diejenige von Bcl9-2 in verschiedenen BCC Stadien der *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäuse untersucht. Die Analysen zeigten eine ausschließlich membranständige Färbung von β -Catenin. Bcl9-2, welches normalerweise die Translokation von β -Catenin aus dem Zelladhäsionskomplex an der Zellmembran in den Zellkern bewirkt um dort einen transkriptionell aktiven Komplex zu bilden, war nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Diese Daten zeigen, dass kanonisches Wnt Signaling wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle in BCC von *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen spielt und wahrscheinlich nicht durch *Wnt5a* in diesem Modell aktiviert wird.

Unsere Arbeitsgruppe hat ebenfalls versucht, Hinweise über die Rolle von *Wnt5a* hinsichtlich der Aktivierung des Wnt/JNK und des Wnt/ Ca^{2+} Signalwegs zu bekommen.

Zur Überprüfung der Aktivität des Wnt/JNK Signalwegs wurden verschiedene BCC Stadien von *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen mit Hilfe eines Antikörpers gegen aktives c-Jun gefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression heterogen und fokal lokalisiert war. Da die Expression von aktivem c-Jun jedoch nicht mit derjenigen von *Wnt5a* oder *K10* korrelierte und in allen BCC Stadien gleich ausgeprägt war, war eine Aktivierung dieses Signalwegs durch *Wnt5a* eher unwahrscheinlich.

Um auch einen Eindruck über die Aktivität des Wnt/Ca²⁺ abhängigen Signalwegs in BCC von *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen zu erlangen, hat unsere Arbeitsgruppe den Aktivierungsstatus von sowohl PKC als auch der CaMKII untersucht. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass sowohl PKC als auch die CaMKII in den vollausgebildeten und regredienten Tumoren gegenüber normaler Haut aktiver zu sein scheint.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass *Wnt5a* in BCC von *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen nicht tumorintrinsic, sondern im BCC-Stroma exprimiert wird. Die stromale Expression wird hierbei erst in vollausgeprägten BCC-Stadien beobachtet. Sie bleibt auch in den regredienten Stadien bestehen und korreliert hierbei mit Differenzierungsvorgängen. Weiterhin ließen diese Daten vermuten, dass der Wnt/Ca²⁺ abhängige Signalweg während der BCC-Regression aktiv zu sein scheint. Ob die stromale *Wnt5a* Expression jedoch *Wnt5a* direkt mit den Differenzierungs- und Regressionsvorgängen, oder direkt mit der Aktivierung des Wnt/Ca²⁺ abhängigen Signalwegs im Zusammenhang stand, war zu Beginn dieser Arbeit unklar.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Basalzellkarzinom (BCC) ist der häufigste Tumor des Menschen. Ungefähr 20% aller BCC zeigen eine Spontanregression. Die Erforschung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Regression kann von besonderer Relevanz für neue Therapien des BCC sein.

Im *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mausmodell können durch einmalige Gabe von Tamoxifen BCC induziert werden. Die Tumoren sind nach ca. 90 Tagen vollausgebildet und zeigen danach eine Spontanregression. Diese geht mit einer Differenzierung der Tumoren einher. Interessanterweise wird *Wnt5a* in BCC von *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen im Tumorstroma exprimiert und scheint mit der Tumorregression in Verbindung zu stehen. Außerdem scheint bei der Tumorregression der Wnt/Ca²⁺ Signalweg aktiviert zu sein.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte zunächst geklärt werden, ob der Wnt/Ca²⁺ Signalweg durch *Wnt5a* aktiviert werden kann und ob dies im direkten Zusammenhang mit Differenzierungsvorgängen von BCC steht. Außerdem sollte untersucht werden, ob *Wnt5a* auch bei der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin oder des Wnt/JNK Signalwegs eine Rolle spielt. Zudem sollte geklärt werden, welche stromale Zellpopulation für die *Wnt5a* Expression verantwortlich ist und ob die *Wnt5a* Expression durch BCC-Tumorzellen induziert werden kann.

Dann sollte geprüft werden, ob *Wnt5a* auch *in vivo* in die Tumorregression und/oder Differenzierung von BCC involviert ist. Hierzu sollte die *Wnt5a* Expression in der Haut von BCC-tragenden *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen zum einen erhöht, und zum anderen vermindert werden.

Zur Erhöhung der *Wnt5a* Expression sollte ein *Wnt5a*-Expressionsplasmid kloniert und in die BCC-tragende Haut injiziert werden. Außerdem wurde das Calcium-Ionophor Ionomycin appliziert. Ionomycin sollte zur Erhöhung des Ca^{2+} -Spiegels in der Haut führen. Dieses Experiment sollte somit Aufschluss über die potentielle Rolle von Calcium bei Differenzierung und Regression von BCC geben.

Zur Verminderung der *Wnt5a* Expression in der BCC-tragenden Haut wurden zunächst *Wnt5a*^{+/-} Mäuse in konditionelle *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Knockout-Mäuse eingekreuzt. Da sich im Laufe der Experimente zeigte, dass *Wnt5a* vorwiegend in BCC-assoziierten Makrophagen exprimiert ist, sollte das *Wnt5a* Level auch mittels Depletion der *Wnt5a*-exprimierende Makrophagen dezimiert werden. Hierzu wurde *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Knockout-Mäusen in Liposomen-verpacktes Clodronat (Clodrolip) appliziert. Zudem wurde versucht, das Knochenmark von *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen durch *Wnt5a*-defizientes Knochenmark zu ersetzen. Nach erfolgreicher Repopulation der *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäuse sollten in diesen Tieren dann BCC induziert und das Wachstum der Tumoren verfolgt werden.

Da sich während der Experimente herausstellte, dass schon die alleinige Applikation von Leerliposomen einen Effekt auf Makrophagen und das Tumorwachstum in *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen hatte, wurde dieser unerwartete Liposomen-bedingte Effekt ebenfalls analysiert.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Laborgeräte.

Agarosegelelektrophorese-Kammern	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Autoklav	W. Krannich GmbH & Co KG, Göttingen
BD FACSCalibur flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
BD LSR II flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Blotapparaturen	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Begasungs-/Brutschränke (B6060, BBD 6220)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Crosslinker (Crosslinker CL-1)	Herolab GmbH, Wiesloch
Digitale Fotokamera (PowerShot G10)	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Entwicklermaschine (Curix 60)	AGFA Vertriebsgesellschaft mbH & Cie. KG, Köln
Feinwaagen (Sartorius Basic plus)	Sartorius AG, Göttingen
Filmkassetten	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fluoreszenzmikroskop (BX60F5)	Olympus Optical Co. Ltd., Japan
Gasbrenner (Gasprofi 2 scs)	WILD-TEC GmbH, Göttingen
Gewebeeinbett und /-entwässerungsautomat (TP 1020)	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf, Hamburg
Heizrührer (MR 3000/300)	Heidolph Instruments, Schwalbach
Homogenisator (Micra D-1)	ART-moderne Labortechnik e. K., Mühlheim
Hybridisierungsöfen (HB-1000 Hybridizer)	UVP, Inc., Upland, USA
Inverses Mikroskop mit Fluoreszenzfilter (Axiovert 25, Filter Set 43,01,09)	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Kühlplatte (EG1150C)	Leica, Nussloch
Kühlschrank (4°C)	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Mikrowelle (Dimension 4)	Panasonic, Hamburg
MilliQ-Anlage	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Multi-Mod Microplate Reader (Synergy Mx)	BioTek Instruments, Inc., USA
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Paraffinspender, Ausgießstation (Dispenser PAG 12)	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Paraffinstreckbad	Medax GmbH & Co KG, Rendsburg
pH-Meter I (inoLab ph Level 1)	WTW GmbH, Wien, Österreich
Photometer (Biophotometer 6131)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe (Accu-jet)	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Präparierbesteck	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Schlittenmikrotom (HN 40)	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
Schüttelwasserbad (1083)	GFL mbH, Burgwedel
Sequenziergerät (ABI 3500 XL)	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbank (Euroflow Klasse IIA)	Clean Air Technik bv, Woerden, Niederlande
Stromquellen für Elektrophorese	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tank für Flüssigstickstoff	L'air liquide S.A., Paris Cedax, Frankreich
TaqMan (ABI Prism 7900HT)	Applied Biosystems, Darmstadt
Thermodrucker DPU-414	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschränke (-20°C)	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen und Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Trans Blot, SD Semi Dry	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
UV-Dokumentation (digital monochrome Printer P91D)	Mitsubishi, Ratingen
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Rotierender Plattformschüttler (Unimax 1010)	Heidolph Instruments, Schwalbach
Zählkammer nach Neubauer (Assistent)	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zentrifugen (Biofuge pico, fresco, primo, Multifuge 3L-R)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
-80°C Schrank	Sanyo Electric Co, Ltd, Japan

2.2 Gebrauchswaren

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Gebrauchswaren.

Biopsie-Einbettkassetten	G. Kisker GbR, Steinfurt
Blottingpapier	Inapa Tecno, Lissabon
CL-XPosure Film	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Companion-Platte (24-well-Format)	BD GmbH, Heidelberg
Deckgläser	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Dispensionspipetten (Combitips plus)	Eppendorf, Hamburg
EDTA-Röhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Einwegspritzen (BD Plastipak und Micro-Fine)	BD GmbH, Heidelberg
Faltenfilter	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Kanülen (Sterican Ø 0,45 x 12 mm)	B. Braun Medical AG, Emmenbrücke
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Küvette (UVette)	Eppendorf, Hamburg
Luminometer Messplatten (96 well Assay Plate)	Costar, Corning Incorporated, Corning, USA
Whatman-Papier (Nuclepore Track-Etched Membranes)	GE Healthcare, Whatman GmbH, Dassel
NuPAGE MES SDS Running buffer 20x	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
NuPAGE Novex Midi Gel	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (Na-Heparin)	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Objektträger (SuperFrost Plus, unbeschichtet)	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Paraffin zum Ausgießen (Paraplast Plus)	Thermo Fisher Scientific, Bonn
PCR-Reaktionsgefäße und Deckel (ThermoFast 96)	4titude [®] Ltd., Surrey, USA
Petrischalen	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
Pipettenspitzen, gestopft (10 µl)	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gestopft (100 µl, 200 µl, 1000µl)	G. Kisker GbR, Steinfurt
Pipettenspitzen, ungestopft (10 µl, 200 µl)	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
Pipettenspitzen, ungestopft (1000 µl)	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
Nitrozellulose-Membran (Hybond-ECL, 0,2 µM)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Skalpells (#10, #24)	Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen
Sterilfilter (0,2µm und 0,45µm)	Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen
TaqMan Platten (384-well Optical Reaction Plate)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
TaqMan Folien (Adhesive Clear Seals)	4titude [®] Ltd., Surrey, USA
Zellkulturflaschen, 100ml	Sarstedt AG & Co KG, Nümbrecht
Zellkultur-Gewebeeinsätze (25mm)	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
Zellkultur-Membraneinsätze (Porengröße 8 µm)	BD GmbH, Heidelberg
Zellkulturschalen, 100 mm, 35 mm (Nunclon Surface)	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
Zellschaber	Sarstedt, Inc., Newton, USA
Zellsiebe (40µm und 70µm)	BD GmbH, Heidelberg
1,5 ml Reaktionsgefäße	Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern
2,0 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
15 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
6-Loch Platten (Tissue Culture Plate 6-well)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
96-Loch Platten (Tissue Culture Plate 96-well)	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.

Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Bio-Budget Technologie GmbH, Krefeld
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampuwa (steriles pyrogenfreies Wasser)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
BLP (=Pam ₃ CSK ₄)	InvivoGen San Diego, USA
BM Purple AP-Substrat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Borgal-Lösung	Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe
Borsäure	MP Biochemicals, LLC, Frankreich

Material

Calcein-AM	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Casein (I-Block)	Tropix, Bedford, USA
Chelex 100 Resin Chelating Ion Exchanger Resin	BioRad Laboratories Inc., Hercules, USA
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Collagenase Typ2	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, USA
Deoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP)	Bio-Budget Technologie GmbH, Krefeld
Diethylcarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dig RNA Labeling Mix, 10x conc.	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNA-Größenstandard (1kb, 100bp und 50bp)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Eosin Y	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäureanhydrid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol 99%ig	J.T.Baker, Darmstadt
Ethanol 99%ig vergällt	Chemie-Vertrieb Hannover, Hannover
Ethidiumbromid	inna-TRAIN-Diagnostics. Kronberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	ICN Biochemicals Inc., Aurora, USA
First strand buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Formamid 99% DNase, RNase frei	Acros Organics, Geel, Belgien
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Glycergel (Einbett-Medium)	Dako GmbH, Hamburg
Glycerol	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Hepes	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ionomycin	Cell Signaling; NEB GmbH, Frankfurt/Main
Lachsspermien-DNA (10mg/ml)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Liquid Barrier Marker	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ketanest S (25mg/ml)	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
KN-93	ALEXIS Corporation, Lausen, Schweiz
Mayers Hämalaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nystatin	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PBS pH 7,4 (gebrauchsfertig)	GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS-Tabletten	GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pertex Montagemedium	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Pferdeserum (hitzeinaktiviert)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Propidiumiodid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Random Hexamer-Oligonukleotide	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNase/DNase-freies destilliertes Wasser	GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNAseZap	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Rompun 2%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
rWnt5a (murines Protein)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Salzsäure, rauchend 37 %	Merck KGaA, Darmstadt
Sephadex G-50 fine	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
S.O.C. Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
TRIzol Reagent	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim
Tween-20	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spanien
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck KGaA, Darmstadt
WST-1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
X-Gal	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Xylol	J. T. Baker B.V., Deventer, Holland

2.4 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Bei Verwendung gebrauchsfertiger Reaktionssysteme wurde nach Herstellerangaben gearbeitet, eine alternative Vorgehensweise wurde bei Beschreibung der Methoden (Kapitel 3) entsprechend angeführt.

Tabelle 4: Auflistung verwendeter gebrauchsfertiger Reaktionssysteme.

Pierce [®] BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dako REAL [™] EnVision [™] Detection System	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega GmbH, Mannheim
Effectene Transfection Reagent Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Enhanced chemoluminescence (ECL) Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
High Pure PCR Cleanup Micro Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
pGEM-Teasy TA-cloning Kit	Promega GmbH, Mannheim
PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
QuantiTect SYBR Green PCR	Qiagen GmbH, Hilden
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RotiFect	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SYBR Green Invitrogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.5 Stammlösungen

Zum Ansetzen und Verdünnen von Stammlösungen wurde ddH₂O aus der Milli-Q Anlage (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) verwendet.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Stammlösungen.

Binding Buffer (Annexin V)	0,1 M	Hepes	pH 7,4
	1,4 M	NaCl	
	25 mM	CaCl ₂	
Blocking Puffer	5 % (w/v)	Milchpulver	in PBST
Blotting Puffer	6 % (w/v)	Tris Base	
	3 % (w/v)	Glycin	
	0,075 %	SDS	
	20 % (v/v)	Methanol	
BSA/Azid-Lösung	0,1 % (v/v)	Tween-20	in PBS
	0,02 % (w/v)	Natriumazid	
	2 % (w/v)	BSA	
Citratpuffer pH 6,0	10 mM	Natriumcitrat	
Cresol-Lösung	0,1 % (w/v)	Cresol gesättigte Sucroselösung	
Deoxyribonukleotidtriphosphat-Mix (dNTPs)	10 mM	dATP	
	10 mM	dCTP	
	10 mM	dGTP	
	10 mM	dTTP	
Eosin, 1%	1 % (w/v)	Eosin Y	
	80 % (v/v)	Ethanol	
Glutaraldehyd/1xPBS	0,2 % (v/v)	Glutaraldehyd	in PBS

Material

Hämalaun nach Mayer	0,1 % (w/v)	Hämatoxylin	
	5 % (w/v)	Kaliumaluminiumsulfat	
	0,015 % (w/v)	Natriumjodat	
	5 % (w/v)	Trichloracetaldehydhydrat	
	1 % (w/v)	Citronensäure	
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	0,8 % (w/v)	NaCl	
	0,04 % (w/v)	KCl	
	0,006% (w/v)	KH ₂ PO ₄	
	0,0048% (w/v)	Na ₂ HPO ₄	
	0,15 % (w/v)	MgSO ₄	
	0,1 % (w/v)	Glucose	
Hybridisierungspuffer Hyb F	40 % (v/v)	Formamid	
	10 % (w/v)	Dextransulfat	
		4x SSC 1x Denhardts	pH 6,4
Hybridisierungspuffer Hyb M	50 % (v/v)	Formamid	
	10 % (w/v)	Dextransulfat	
	0,3 M	NaCl	
	20 mM	Tris/HCl	
	5 mM	EDTA	
	10 mM	NaPO ₄	pH 8,0
LacZ-Puffer	0,5 mg/ml	Hefe-tRNA	
	2 mM	MgCl ₂	
	0,02 % (v/v)	NP-40	
LacZ-Färbepuffer	0,01 % (w/v)	Natrium Deoxycholat	in PBS
	5 mM	K ₃ Fe(CN) ₆	
	5 mM	K ₄ Fe(CN) ₆	
	2 mM	MgCl ₂	
	0,02 % (v/v)	NP-40	
	0,01 % (w/v)	Natrium Deoxycholat	
LB-Medium („lysogeny broth“-Medium)	500 µg/ml	X-Gal-Stocklösung	in PBS
	1 % (w/v)	Trypton	
	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt	
Lysepuffer (für Gewebe)	1 % (w/v)	NaCl	pH 7,0
	1 % (v/v)	Triton X-100	
	150 mM	Hepes	
Protease- und Phosphataseinhibitoren: je 1 Tablette auf 10 ml Lysepuffer	1 mM	EDTA	
MBSTL-Puffer pH 7,5	0,15 M	NaCl	
	0,1 M	Maleinsäure	
	0,1 %	Tween-20	
Neufuchsin-Chromogen	0,6 % (v/v)	N,N-Dimethylformamid	
	0,05 % (w/v)	Levamisol	
	0,03 % (w/v)	Naphtol As-Bi Phosphat	
	0,02 % (w/v)	NaN ₃	
	0,01 % (w/v)	Neu-Fuchsin	in TBS pH 8,8
NT-Puffer	0,15 M	NaCl	
	0,1 M	Tris/HCl	pH 7,5
NTM-Puffer	0,1 M	NaCl	
	0,1 M	Tris/HCl	
	50 mM	MgCl ₂	pH 9,5
NTMLT-Puffer	0,1 M	NaCl	
	0,1 M	Tris/HCl	
	50 mM	MgCl ₂	
	2 mM	Levamisol	pH 9,5
	0,1 %	Tween-20	
Paraformaldehyd-Lösung (PFA)	4 % (w/v)	Paraformaldehyd	in PBS
PBST (Waschpuffer)	0,1 % (v/v)	Tween-20	in PBS

Material

Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung, 10x, pH 7,4 (PBS)	8 % (w/v)	NaCl	
	0,2 % (w/v)	KH ₂ PO ₄	
	0,2 % (w/v)	KCl	
	1,77 % (w/v)	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	
Proteinase K-Puffer	50 mM	Tris/HCl	
	5 mM	EDTA	pH 8,0
	40µg/ml	Proteinase K	
RIPA Puffer (modifiziert)	50 mM	Tris HCl	
	150 mM	NaCl	
	1 mM	EDTA	pH 7,4
	1 % (v/v)	NP-40	
Protease- und Phosphataseinhibitoren: je 1 Tablette auf 10 ml Lysepuffer	0,25 % (w/v)	Na-Deoxycholat	
	35 % (v/v)	Glycerol	in
	9 % (w/v)	SDS	Upper
SDS Ladepuffer 6x	8,5 % (w/v)	DTT	Gel
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau	Puffer
	0,3 M	Natriumcitrat	
	3 M	NaCl	
STE-Puffer	50 mM	Tris HCl	
	100 mM	NaCl	pH 8,0
	1 mM	EDTA	
	1 % (w/v)	SDS	
STE- <i>in situ</i> -Puffer	10 mM	Tris/HCl	pH 8,0
	5 mM	EDTA	pH 8,0
	0,5 M	NaCl	
Stop-Puffer	10 mM	Tris/HCl	pH 8
	1 mM	EDTA	
Tris-EDTA Puffer pH 9,0 (TE)	10 mM	Tris	
	1 mM	EDTA	
Tris-Borsäure-EDTA Lösung, 10x (TBE) Stammlösung, die für alle Anwendungen 1:10 verdünnt wurde	890 mM	Tris/HCl	
	730 mM	Borsäure	pH 8,0
	12,5 mM	EDTA	
Tris-EDTA Puffer pH 9,0 (TE)	10 mM	Tris	
	1 mM	EDTA	
Tris-gepufferte Natriumchlorid-Lösung, 10x (TBS) pH 7,4 bzw. pH 8,8 Stammlösung, die für alle Anwendungen 1:10 verdünnt wurde	0,5 M	Tris/HCl	
	1,5 M	NaCl	
TBST (Waschpuffer)	0,1 % (v/v)	Triton X-100	In TBS
Upper Gel Puffer	6 % (w/v)	Tris	pH 6,8
	4 % (v/v)	SDS	
X-Gal Stocklösung	40 mg/ml	X-Gal	
	100%	N,N-Dimethylsulfoxid (DMSO)	

2.6 Medien

2.6.1 Medien für die Bakterienkultur

Bakterienkulturen (*E. coli*) wurden in LB-Medium kultiviert, das mit ddH₂O angesetzt, autoklaviert und bei 4°C gelagert wurde. Unmittelbar vor Verwendung des Mediums erfolgte die Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums (z.B. 50µg/ml Ampicillin).

2.6.2 Agarplatten

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5% (w/v) Agar-Agar zugegeben, der Ansatz autoklaviert und auf 55°C abgekühlt. Danach wurde das entsprechende Antibiotikum zugegeben und der noch warme LB-Agar luftblasenfrei in 10cm Petrischalen gegossen. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten in sterilen Plastiktüten bei 4°C gelagert.

2.6.3 Medien für die Kultur eukaryotischer Zelllinien

Eukaryotische Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) oder in RPMI 1640 mit jeweils 10% fötalem Kälberserum (Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) kultiviert. Die für die verschiedenen Zelllinien verwendeten Medien und Serumkonzentrationen sind in Tabelle 6 aufgeführt, abweichende Konzentrationen bzw. weitere Zusätze sind bei der Beschreibung der jeweiligen Experimente angegeben.

Zur Herstellung von Ca^{2+} -chelatiertem FCS für das 154CF-Medium (Cascade Biologics™, Portland, USA) wurden zunächst 50ml FCS für 30min bei 56°C hitzeinaktiviert. Nach Zugabe von 10g *Chelex 100 Resin Chelating Ion Exchange Resin* rührte das FCS für 60min bei RT auf dem Magnetrührer, wodurch dem Serum die Ca^{2+} -Ionen entzogen wurden. Danach wurde die Mischung sowohl durch einen UV-Licht sterilisierten Faltenfilter als auch durch einen Sterilfilter (0,2µm Porengröße) filtriert. Das hitzeinaktivierte und Ca^{2+} -chelatierte FCS wurde in 1ml Aliquots dauerhaft bei -20°C gelagert.

2.7 Bakterienstämme, eukaryotische Zelllinien und Primärzellen

Zur Transformation und Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der chemisch-kompetente Wirtstamm *E. coli* DH5α (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet.

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien und primär kultivierten Zellen aufgelistet. Alle Zellen wurden bei 37°C in einer konstanten CO_2 -haltigen Atmosphäre (5% CO_2) mit 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Material

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Zelllinien. Spalte 1: Bezeichnung der Zelllinie; Spalte 2: Ursprungsspezies und Zelltyp; Spalte 3: verwendetes Medium; Spalte 4: Mediumzusätze (Serum-/ und Antibiotikakonzentration nur angegeben, sofern abweichend von 10%FCS und 1%P/S). Abkürzung: CM, konditioniertes Medium (engl. conditioned medium).

1	2	3	4
ASZ001	murine BCC-Zelllinie aus <i>Ptch1</i> ^{neo12/+} -Mäusen	154CF	2% FCS (chelatiert) 0,05mM CaCl ₂
B16F10	murine Melanomzellen	RPMI 1640	
L929	murine Fibroblasten	RPMI 1640	
NIH3T3	embryonale murine Fibroblasten	DMEM	
NIH3T3-Wnt5a	embryonale murine Fibroblasten, stabil transfiziert	DMEM	400µg/ml G418
NIH3T3-lacZ	embryonale murine Fibroblasten, stabil transfiziert	DMEM	
<i>Ptch</i> ^{flx/flx}	adulte murine Fibroblasten	DMEM	
BMDM	bone marrow-derived macrophages (murin)	DMEM (Pluznikmedium; zur Differenzierung)	30% L929-CM 5% Pferdeserum 0,002% β-Mercaptoethanol
		DMEM (BMDM-Kulturmedium; zum Wachstum)	15% L929-CM
Peritoneal-Makrophagen	mittels Peritoneallavage isolierte murine Makrophagen	154CF	2% FCS (chelatiert) 0,05mM CaCl ₂

2.8 Plasmide

Für Klonierungen wurden die Plasmide *pGEM-Teasy* (Promega GmbH, Mannheim), *pcDNA3*, *pCR3.1* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) sowie *pBluescript II-SK* (Stratagene/Agilent Technologies GmbH & Co. KG, Waldbronn) verwendet.

In Tabelle 7 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide aufgelistet.

Tabelle 7: Plasmide. Spalte 1: Bezeichnung der Expressionsplasmide; Spalte 2: Bezeichnung der inserierten cDNA/Gen-Sequenz; Spalte 3: Bezeichnung des Promotors; Spalte 4: Referenz/Hersteller. Abkürzungen: CMV, Cytomegalie Virus.

1	2	3	4
CaMKIIT286D-CS2	konstitutiv aktive CaMKII	CMV Promotor	(Kuhl, M <i>et al.</i> 2000)
CaMKII-K42M1-271-CS2	Kinase-inaktive CaMKII	CMV Promotor	(Kuhl, M <i>et al.</i> 2000)
pCMV-βGAL	β-Galaktosidase	CMV Promotor	AG P. Burfeind, Göttingen
pCl-neo-b-catS33Y	konstitutiv aktives β-catenin	CMV Promotor	(Morin, PJ <i>et al.</i> 1997)
SuperFOPFlash (FOP)	TCF/LEF Bindestellen	CMV Promotor	(Korinek, V <i>et al.</i> 1997)
SuperTOPFlash (TOP)	mutierte TCF/LEF Bindestellen	CMV Promotor	(Korinek, V <i>et al.</i> 1997)
pWnt5a(murin)-pcDNA3	Wnt5a	CMV Promotor;	diese Arbeit
mWnt5a-Kozak-pcDNA3	Wnt5a	CMV Promotor; Kozak-Konsensus-Sequenz	diese Arbeit
pEGFP-N1	EGFP	CMV Promotor	BD Bioscience Clontech
pRL-CMV	Renilla-Luziferase	CMV Promotor	Promega GmbH

2.9 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Synthetische DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg, bezogen und die Stammkonzentrationen mit RNase/DNase-freiem Wasser (GIBCO Invitrogen GmbH, Karlsruhe) auf 100 µM eingestellt. In der PCR wurden Stocklösungen von 10µM verwendet.

2.9.1 DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung von Mäusen ist unter 3.4.3 beschrieben und hierzu verwendete DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Auflistung der DNA-Oligonukleotide zur Genotypisierung von Mäusen. Spalte 1: Bezeichnung der getesteten Mauslinie; Spalte 2: Fragmentgröße des wildtypischen (wt), geflochten (flox) oder des deletierten (del) *Ptch* Allels, des mutierten *Wnt5a* (mut) Allels oder des entsprechenden Wildtyp (wt) Allels; Spalte 3: Bezeichnung der DNA-Oligonukleotide; Spalte 4: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3'); Spalte 5: Literaturreferenz. Abkürzungen: ^{wt} Amplifikatlänge des Wildtyp-Allels; ^{mut} Amplifikatlänge des mutanten Allels; ^{del} Amplifikatlänge des Allels bei erfolgter Deletion durch Cre-Rekombinase vermittelte Rekombination.

1	2	3	4	5
<i>Ptch</i> ^{flox/flox} <i>ERT2</i> ^{+/-}	150 bp ^{flox} 445 bp ^{wt}	mPTCNx_f mPTCNx_r mPTCwt_r.2	TGGTAATTCTGGGCTCCCGT CCGGTAGAATTAGCTTGAAGTTCCCT ACACAACAGGGTGGAGACCACT	(Uhmann, A <i>et al.</i> 2007)
<i>Ptch</i> ^{flox/flox} <i>ERT2</i> ^{+/-}	950 bp ^{del}	Exon7-F neo-R	AGGAAGTATATGCATTGGCAGGAG GCATCAGAGCAGCCGATTGTCTG	(Uhmann, A <i>et al.</i> 2007)
<i>Ptch</i> ^{flox/flox} <i>ERT2</i> ^{+/-}	600 bp	Ella-Cre-F Ella-Cre-R	CCAGGCTAAGTGCCTTCTCTACA AATGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT	(Uhmann, A <i>et al.</i> 2007)
<i>Wnt5a</i> ^{+/-}	400 bp ^{mut} 484 bp ^{wt}	oIMR7415 9261 9260	GCCAGAGGCCACTTGTGTAG CATCTCAACAAGGGCCTCAT GAGGAGAAGCGCAGTCAATC	(Yamaguchi, TP <i>et al.</i> 1999)

2.9.2 DNA-Oligonukleotide für Sequenzanalyse

Die für die Analyse der murinen *Wnt5a*-Sequenz (siehe 3.1.5) verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für die DNA-Sequenzanalyse. Spalte 1: Bezeichnung des sequenzierten Plasmids; Spalte 2: Bezeichnung des DNA-Oligonukleotids; Spalte 3: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3').

1	2	3
mWnt5a-Kozak- pcDNA3	mWnt5a-F.2 mWnt5a-R.2 Wnt5a-R Wnt5a-Kozak-F Wnt5a-Kozak-R mWnt5a-SNP_F mWnt5a-SNP_R	TAAGCCCGGGAGTGGCTTTG CCTGCCAGTTGGCTGCAGA CAGCTTGCCCCGGCTGTTGA GGAATTCGCCACCATGAAGAAGCCCATTGGA AGTCCTTATCATCGTCGTCTTTGTAATC CTTGGTGGTCTCTAGGTATGAATAACCCTGTTTCAGAT ATCTGAACAGGGTTATTCATACCTAGAGACCACCAAG

2.9.3 DNA-Oligonukleotide für RT-PCR

Der spezifische Nachweis von amplifizierten Transkripten erfolgte semiquantitativ über RT-PCR an cDNA und den in Tabelle 10 aufgeführten DNA-Oligonukleotiden.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten DNA-Oligonukleotide für die RT-PCR. Spalte 1: Bezeichnung der Gentranskripte; Spalte 2: Fragmentgröße; Spalte 3: Bezeichnung der DNA-Oligonukleotide; Spalte 4: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3'); Spalte 5: Referenz.

1	2	3	4	5
<i>Gapdh</i>	576 bp	Gapdh-F	ATCTTCTTGTGCAGTGCCAG	(Uhmann, A et al. 2005)
		Gapdh-R	ATGACCACAGTCCATGCCAT	
<i>Wif1</i>	158 bp	mWif1-F	TCCTGTCAATATCCACTCCATGAA	diese Arbeit
		mWif1-R	CTGATGCCTTGTGAGGCACT	

2.9.4 DNA-Oligonukleotide für quantitative *real time* PCR (qRT-PCR)

DNA-Oligonukleotide für die Messung von Genexpressionsniveaus mittels quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR) mit SYBR Green sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Auflistung der für die qRT-PCR verwendeten DNA-Oligonukleotide. Spalte 1: Bezeichnung der Gentranskripte; Spalte 2: Bezeichnung der DNA-Oligonukleotide; Spalte 3: DNA-Oligonukleotidsequenz (5'→3'); Spalte 4: Referenz.

1	2	3	4
<i>18S</i>	18S-fwd	CGCAAATTACCCACTCCCG	F. Nitzki; AG Hahn
	18S-rev2	TTCCAATTACAGGGCCTCGAA	
<i>F4/80</i>	mF4/80F.1	CGGAGTACCTAGACATCGAAAGCA	diese Arbeit
	mF4/80R.1	GGGGCCCTGTAGATACTGATT	
<i>Ivl-1</i>	Ivl-1-F1	CCTCCTGTGAGTTTGTGGTCT	A. Uhmann, AG Hahn
	Ivl-1-R1	CTGAGGATATGATCTGGAGAAC	
<i>K1</i>	mK1-F	TCAACGTTGAGGTTGACCCTC	A. Zibat; AG Hahn
	mK1-R	ACCTTCCTTCTGAGGATGCTG	
<i>K10</i>	mK10-F	GGATGCTGAAGAGTGGTTCAA	A. Zibat; AG Hahn
	mK10-R	TCTGTTTCTGCCAAGGAGGCT	
<i>Loricrin</i>	Lor-F1	CACTCATCTTCCCTGGTGCTTC	A. Uhmann, AG Hahn
	Lor-R1	GTCTTTCCACAACCCACAGGAG	
<i>Mac1</i>	mMac1-F	GAGGCAACCATGGAATTCAGCC	diese Arbeit
	mMac1-R	CATAAGTGACAGTGCTCTGGATATC	
<i>Tgm</i>	Tgm1-F	GCAGTGGTGTAATGCAGCTGG	A. Uhmann, AG Hahn
	Tgm1-R	ATGAGGAGCTCAAGGGCAATGC	
<i>Wif1</i>	mWif1-F	TCCTGTCAATATCCACTCCATGAA	diese Arbeit
	mWif1-R	CTGATGCCTTGTGAGGCACT	
<i>Wnt5a</i>	Wnt5a-F	TCCTATGAGAGCGCACGCAT	A. Zibat; AG Hahn
	Wnt5a-R	CAGCTTGCCCCGGCTGTTGA	

2.9.5 Sonden für *in situ*-Hybridisierung

In Tabelle 12 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sonden für *in situ*-Hybridisierungen aufgeführt.

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Sonden für *in situ*-Hybridisierung. Spalte 1: Bezeichnung der detektierten Gentranskripte; Spalte 2: Bezeichnung der verwendeten Plasmide; Spalte 3: Verwendete Restriktionsendonukleasen zur Linearisierung des Plasmids; Spalte 4: Größe des Inserts; Spalte 5: Eingesetzte Verdünnung und verwendeter Hybridisierungspuffer; Spalte 6: Referenz; Abkürzungen: as, antisense-Sonde; HybM, Hefe-tRNA enthaltender Hybridisierungspuffer; HybF, Lachsspermien-DNA enthaltender Hybridisierungspuffer; sense, sense-Sonde.

1	2	3	4	5	6
<i>mShh</i>	<i>pBluescript II-SK</i>	Not I (sense) Hind III (as)	642 bp	1:100 in HybF	M Wijgerde; Rotterdam
<i>mWif1</i>	<i>pGEM-Teasy</i>	Spe I (Klon 6; sense) Spe I (Klon 5; as)	725 bp	1:350 in HybF	diese Arbeit
<i>hWnt5a_1</i>	<i>pGEM-Teasy</i>	Spe I (Klon 11; sense) Spe I (Klon 10; as)	514 bp	1:500 in HybM	diese Arbeit
<i>hWnt5a_2</i>	<i>pGEM-Teasy</i>	Spe I (Klon 1; sense) Spe I (Klon 2; as)	540 bp	1:500 in HybM	diese Arbeit

2.10 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Invitrogen GmbH, Karlsruhe, und New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, bezogen. Soweit nicht anders erwähnt wurde grundsätzlich nach Herstellerangaben gearbeitet. Alle weiteren verwendeten Enzyme sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Enzyme. Spalte 1: Bezeichnung des Enzyms; Spalte 2: Anwendung des Enzyms; Spalte 3: Hersteller; Abkürzungen: ISH, *in situ*-Hybridisierung; *Taq*, *Thermus aquaticus*.

1	2	3
Proteinase K	DNA-Isolierung; ISH	Carl Roth GmbH, Karlsruhe Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen	Restriktionshydrolyse	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.
Reverse Transkriptase Super Script II	cDNA-Synthese	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNase A	ISH; Zellzyklus-Analyse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Taq</i> -DNA Polymerase	RT-PCR	Molzym GmbH & Co.KG, Bremen
T3 RNA Polymerase	Sonden-Herstellung für ISH	Promega GmbH, Mannheim
T7 RNA Polymerase	Sonden-Herstellung für ISH	Promega GmbH, Mannheim

2.11 Antikörper

2.11.1 Primäre Antikörper

Die für proteinchemische Methoden (siehe 3.3) verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Material

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten primären Antikörper. Spalte 1: Bezeichnung des Antikörpers; Spalte 2: Ursprungsspezies des Antikörpers; Spalte 3: Verwendung; Spalte 4: Eingesetzte Verdünnung und verwendeter Puffer; Spalte 5: Hersteller. Abkürzungen: Cy, Indodikarbocyanin-Derivat; FACS, fluorescence-activated cell sorting; FITC, Fluoresceinisothiocyanat; IHC, Immunhistochemie; mono, monoklonal; PE, Phycoerythrin; poly, polyklonal; WB, Western Blot.

1	2	3	4	5
anti-Annexin V FITC	Ratte; mono	FACS	1:50 in Binding Buffer	BD Pharmingen
anti-B220 PE-Cy7	Kaninchen; mono	FACS	1:50 in PBS	BD Biosciences
anti-CD4 FITC	Ratte; mono	FACS	1:50 in PBS	BD Biosciences
anti-CD8 PE-Cy7	Ratte; mono	FACS	1:50 in PBS	BD Biosciences
anti-CD11b FITC	Ratte; mono	FACS	1:50 in PBS	BD Biosciences
anti-CD19 FITC	Ratte; mono	FACS	1:50 in PBS	BD Biosciences
anti-F4/80	Ratte; mono	IHC	1:100 in 10% Casein/TBST	AbD Serotec
anti-F4/80 Cy5	Ratte; mono	FACS	1:50 in PBS	eBioscience
anti-Gr1 PE	Ratte; mono	FACS	1:50 in PBS	BD Biosciences
anti-HSC 70	Maus; mono	WB	1:10000 in BSA/Azid-Lösung	Santa Cruz
anti-Ki-67	Maus; mono	IHC	1:50 in TBS	BD Pharmingen
anti-Wnt5a	Maus; poly	WB	1:500 in BSA/Azid-Lösung	R&D Systems

2.11.2 Sekundäre Antikörper

Die für proteinchemische Methoden (siehe 3.3) verwendeten sekundären Antikörper sind in Tabelle 15 aufgeführt. Für die Detektion des biotinylierten anti-Ratte Immunglobulins wurde StreptABComplex/AP (Dako GmbH, Hamburg) verwendet.

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten sekundären Antikörper. Spalte 1: Bezeichnung des Antikörpers; Spalte 2: Ursprungsspezies des Antikörpers; Spalte 3: Verwendung; Spalte 4: eingesetzte Antikörperverdünnung; Spalte 5: Hersteller; Abkürzungen: AP, Alkalische Phosphatase; DB, Dot Blot; Fab, antigenbindendes Fragment; Ig, Immunglobulin; IHC, Immunhistochemie; ISH, *in situ*-Hybridisierung; HRP, horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase).

1	2	3	4	5
anti-Digoxigenin Fab; AP-konjugiert	Schaf	DB ISH	1:5000 1:500	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
anti-Maus IgG; HRP-konjugiert	Schaf	WB	1:5000	GE Healthcare, Dassel
anti-Maus IgG; HRP-konjugiert	Ziege	IHC	gebrauchsfertig	Dako GmbH, Hamburg
anti-Ratte IgG; biotinyliert	Kaninchen	IHC	1:50	Dako GmbH, Hamburg
anti-Ziege IgG, HRP-konjugiert	Esel	WB	1:10000	Pierce Biotechnology Inc, Rockford, USA

2.12 Datenbanken

Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
MGI Mouse Genome Informatics	http://www.informatics.jax.org/
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
BasicLocalAlignmentSearchTool_BLAST (NCBI)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

2.13 Software

Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Software.

ABI 3500	Applied Biosystems, Darmstadt
BD FACSDiva	BD Biosciences, Heidelberg
cell ^F	Olympus Europa GmbH, Hamburg
Endnote	Thomson ISI ResearchSoft
Excel 2007	Microsoft Co., Redmont, USA
FlowJo	Tree Star Inc., Ashland
ImageJ	National Health Institute, Maryland, USA
Intas GDC	Intas, Göttingen
Photoshop 7.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Powerpoint 2007	Microsoft Co., Redmont, USA
SDS 2.1	Applied Biosystems, Darmstadt
Statistica 9	StatSoft GmbH, Hamburg
Word 2007	Microsoft Co., Redmont, USA

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.1.1.1 Plasmid DNA

Die Transformation von Bakterienzellen erfolgte im Standardprotokoll an 50µl kompetenten Zellen (*E. coli* DH5α, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) mit 100ng reiner Plasmid-DNA oder aber 5-10µl eines Ligationsansatzes durch Hitzeschock. Anschließend wurden die Zellen in 500µl S.O.C.-Medium aufgenommen und unter leichtem Schütteln (900rpm) 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 50-100µl des Ansatzes auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

„Mini-Präparation“ von Plasmid-DNA erfolgte aus 1,5ml einer 2ml-Übernachtskultur einer gepickten Einzelkolonie mit dem HiPure Plasmid DNA Purification Kit (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Für eine „Maxi-Präparation“ von Plasmid-DNA wurde die DNA aus 100ml einer Übernachtskultur mit Hilfe des oben genannten Kits aufgereinigt.

Die DNA-Konzentration wurde am Photometer gegen einen Leerwert bestimmt.

Zur Überprüfung der aufgereinigten Plasmide erfolgten eine oder mehrere Restriktionshydrolysen an 100 bis 200ng DNA (siehe 3.1.8).

3.1.1.2 Genomische DNA aus Gewebe und Blut

3.1.1.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Das Gewebe wurde über Nacht bei 55°C in 400µl STE-Puffer mit 20µl Proteinase K (10mg/ml) inkubiert. Unverdautes Gewebe wurde 10min bei 13000rpm abzentrifugiert und der klare Überstand in 99% Ethanol überführt. Durch kräftiges Schütteln der Reaktionsgefäße und anschließendes Zentrifugieren (25min, 13000rpm) erfolgte die Präzipitation der DNA. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 125µl Ampuwa aufgenommen. Nach dem Lösen des Pellets (10min, 42°C, 1400rpm) erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration am Photometer.

3.1.1.2.2 Isolierung genomischer DNA aus murinen Föten

Für die Transplantation fötaler Leberzellen in bestrahlte Mäuse (3.4.6) war es notwendig innerhalb kürzester Zeit den Genotyp der Föten bestimmen zu können. Zu diesem Zweck wurde ein fötales Vorderbein isoliert und mit 400µl STE-Puffer und 25µl Proteinase K für 6min bei 55°C auf dem Schüttler (1400rpm) inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation

(4min, 13000rpm, 4°C) wurden 300µl des Verdaus in 1ml 100% Ethanol überführt. Zur Präzipitation der DNA wurden die Reaktionsgefäße zunächst kräftig geschüttelt und danach für 9min (13000rpm, 4°C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 300µl 70% Ethanol gewaschen, 2min bei zuvor genannten Bedingungen zentrifugiert und für 5min bei 55°C über Kopf getrocknet. Die pelletierte DNA wurde schließlich in 125µl Ampuwa aufgenommen und 10min bei 47°C auf dem Schüttler (1400rpm) gelöst.

Für die sich anschließende Genotypisierungs-PCR wurden 2µl der Lösung eingesetzt.

3.1.1.2.3 Isolierung genomischer DNA aus Blut

Aus Mäuseblut wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben DNA isoliert und diese wurde zur Amplifikation von Genen in der RT-PCR eingesetzt.

3.1.1.3 Gesamt-RNA aus eukaryotischer Zellkultur oder Gewebe

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen einer 6-Loch-Platte wurden diese mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 1ml TRIzol Reagent durch mehrmaliges Auf-/und Abpipettieren von der Platte gelöst. Das Lysat wurde in ein steriles 2ml Reaktionsgefäß überführt. Durch 2-minütiges Vortexen (höchste Stufe) wurden die Zellen vollständig homogenisiert und anschließend sofort auf Eis gelagert.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe wurde das Organ zunächst mit einem sterilen Skalpell zerkleinert, möglichst zügig in 2ml TRIzol Reagent überführt und darin dann maximal 1min auf Eis homogenisiert. Der Ansatz wurde für 10min (10000rpm, 4°C) abzentrifugiert, der Überstand in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und ebenfalls sofort auf Eis gelagert.

Die weitere Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte für beide Ansätze in der gleichen Weise, indem die Lysate zunächst für 5min bei RT inkubiert wurden. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde der Ansatz 15sec lang auf dem Vortexer geschüttelt und danach 3min bei RT inkubiert. Die sich anschließende Zentrifugation bei 11000rpm für 10min bei 4°C führte zur Phasentrennung, wobei die obere wässrige Phase in 1000µl Isopropanol überführt wurde. Die Reaktionsgefäße wurden mehrfach invertiert und es folgte die Präzipitation der RNA über Nacht bei -20°C. Durch erneute Zentrifugation (12000rpm, 25min, 4°C) wurde die RNA pelletiert und es schloss sich zweimaliges Waschen mit 70%igem Ethanol an, bevor das Pellet getrocknet und schließlich in 20µl RNase/DNase-freiem Wasser bei 50°C für 8min auf dem Schüttler (900rpm) gelöst wurde. Nach Bestimmung der Konzentration am Photometer wurde die RNA bei -80°C gelagert.

3.1.1.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Hautproben

Eine Besonderheit stellte die Isolierung von RNA aus Hautproben dar, da diese mit Hilfe des RNeasy Fibrous Tissue Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert wurde. Generell erfolgte die Isolierung nach Herstellerangaben. Jedoch wurde eine zusätzliche Behandlung mit der in diesem Kit enthaltenen DNase I und dem zugehörigen RDD-Puffer vorgenommen. Dazu wurden 20µl Eluat mit 10% (v/v) RDD-Puffer und 2,7U DNase I versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation schloss sich eine 5-minütige Inkubation bei 65°C an. Danach wurde zum Ansatz 99% Ethanol gegeben und die RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation (12000rpm, 4°C) wurde die RNA zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, das Pellet anschließend getrocknet und in 20µl RNase/DNase-freiem Wasser aufgenommen. Nach Bestimmung der Konzentration am Photometer wurde die RNA bei -80°C gelagert.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260nm mit Hilfe eines Spektralphotometers gegen einen Leerwert bestimmt. Durch Messung der Absorptionsmaxima von Proteinen (280nm) und niedermolekularen Salzen (230nm) konnte die Reinheit der Nukleinsäuren ermittelt werden.

Die Absorption der RNA für die Verwendung im RT Profiler PCR Array (SABiosciences, Qiagen, Hilden) wurde in 10mM Tris, pH 8,0 gemessen und musste folgenden Quotienten entsprechen:

- $A_{260}:A_{230} > 1,7$
- $A_{260}:A_{280} = 1,8$ bis $2,0$

3.1.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von 2µg Gesamt-RNA in cDNA erfolgte mit der reversen Transkriptase SuperScript II in einem Endvolumen von 20µl. Da davon ausgegangen wurde, dass die Effizienz der reversen Transkription ca. 50% beträgt, sollte die Endkonzentration der cDNA somit bei etwa 50ng/µl liegen.

Zuerst wurde zur Gesamt-RNA 250ng Hexamere gegeben und der Ansatz für 10min bei 70°C denaturiert. Nach Zugabe von Puffer (First Strand Buffer, Endkonzentration 1x), DTT (Endkonzentration 10mM) und dNTPs (Endkonzentration 0,5mM) wurde der Ansatz für 10min bei RT inkubiert und anschließend für 2min bei 42°C angewärmt. Es folgte die Zugabe von 1µl SuperScript II (40 U/µl; bei Haut 200 U/µl) und die vorsichtige Durchmischung des Ansatzes mit der Pipettenspitze. Die reverse Transkription erfolgte für 1h bei 42°C. Durch abschließende 10-minütige Inkubation bei 70°C wurde die Reaktion abgestoppt.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.1.4.1 Semiquantitative RT-PCR

Zur semiquantitativen Analyse der Expression von Genen wurde die Amplifikation von DNA in Reaktionsvolumina von 10 bzw. 20 µl pro Ansatz mit folgenden Reagenzien und Endkonzentrationen durchgeführt:

1x	Polymerase-Puffer
10% (v/v)	Cresol-Lösung
0,5 µM	sequenzspezifisches Vorwärts-DNA-Oligonukleotid
0,5 µM	sequenzspezifisches Rückwärts-DNA-Oligonukleotid
0,2 mM	dNTP-Mix
0,1 U	Polymerase
10-100 ng	Matrizen-DNA

Um die Amplifikatmengen untereinander vergleichen zu können, musste von allen Proben die gleiche Menge cDNA eingesetzt werden. Daher wurde zusätzlich in jeder zu messenden cDNA das Haushaltsgen Gapdh amplifiziert, das der Normalisierung diene. Außerdem wurden die PCR-Bedingungen den verwendeten synthetischen DNA-Oligonukleotiden und DNA-Polymerasen jeweils optimal angepasst. Ein typisches Programm für die RT-PCR beinhaltet folgende Schritte:

Denaturierung	5-10 min	95°C	
Denaturierung	0:30-1:00 min	95°C	
Annealing	0:30-2:00 min	55-68°C	25-35 Zyklen
Elongation	1-10 min	68 oder 72°C	
Elongation	10-30 min	72°C	

Je nach Weiterverwendung der PCR-Amplifikate wurde entweder der gesamte Ansatz oder nur ein Aliquot mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

3.1.4.2 Quantitative *real time* PCR (qRT-PCR)

Mittels quantitativer *real-time* PCR konnten Genexpressionsniveaus an verschiedener cDNA quantifiziert und untereinander verglichen werden. Dazu wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) verwendet, dessen Fluoreszenzsignal beim Interkalieren in die DNA quantifiziert wird und sich somit proportional zu der sich bildenden Amplifikatmenge verhält. Die Messung erfolgte in 10µl Reaktionsvolumen in einer PCR-384-Loch-Platte und jede zu analysierende Probe wurde in Triplikaten vermessen. Ein typischer qRT-PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

4,0 µl	SYBR Green Mix
0,4 µl	Vorwärts-DNA-Oligonukleotid (10µM)
0,4 µl	Rückwärts-DNA-Oligonukleotid (10µM)
3,2 µl	Ampuwa
2,0 µl	cDNA

Für jedes zu quantifizierende Gen wurde eine entsprechende Standardkurve an einer speziellen cDNA als Matrize erstellt (Tabelle 17). Hierfür wurde die cDNA siebenmal (S1-S7) in jeweils 1:5 Verdünnungsschritten verdünnt. Außerdem wurde in jeder Probe die Expression von 18S rRNA zur Normalisierung vermessen.

Abhängig vom Hersteller des verwendeten SYBR Greens variierten die PCR-Programme, wobei die Amplifikatmenge immer über 40 Zyklen hinweg quantifiziert wurde. Nach Beendigung der Amplifikation wurde grundsätzlich eine Dissoziationskurve erstellt, um die Spezifität der verwendeten DNA-Oligonukleotide und die daraus resultierende Homogenität der Amplifikate zu überprüfen.

Die ermittelten Daten wurden mit der SDS 2.1 Software von Applied Biosystems und Microsoft Excel 2007 analysiert.

Tabelle 17: Auflistung verwendeter cDNA zur Erstellung von Standardkurven für die qRT-PCR verschiedener Gentranskripte. Spalte 1: Bezeichnung des analysierten Gentranskripts; Spalte 2: Ursprungsgewebe/zellen der cDNA zum Erstellen einer Standardkurve; Spalte 3: eingesetzte Menge an cDNA für Verdünnungsstufe S1 (in ng/µl); Abkürzungen: BCC, Basalzellkarzinom; dpc, days post coitum.

1	2	3
18S rRNA	Mausembryo 12,5 dpc	0,025
F4/80	murine Milz	50
Ivl-1	murines BCC	50
K1	murines BCC	50
K10	murines BCC	50
Loricrin	Normalhaut	50
Mac1	murine Milz	50
Tgm	murines BCC	50
Wif1	murines BCC	50
Wnt5a	Mausembryo 12,5 dpc	50

3.1.4.3 RT Profiler PCR Array

Mit RT Profiler PCR Arrays (SABiosciences) konnten im 384-Loch-Format innerhalb kurzer Zeit die Expressionsniveaus einer Vielzahl von Genen quantifiziert werden, die im Zusammenhang mit dem Wnt Signalweg stehen. Dazu wurden vom Hersteller empfohlene Kits zur Isolierung der RNA sowie zur Synthese der cDNA (RT² First Strand Kit) verwendet. Außerdem wurde das vom Hersteller empfohlene SYBR Green (RT²SYBR Green / ROX qPCR Master Mix) genutzt und es erfolgten die empfohlenen Überprüfungen von RNA und cDNA, um verlässliche Messergebnisse gewährleisten zu können.

Mit Hilfe dieser Methode wurden murine BCC zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Tumorentstehung analysiert. Zunächst wurde je 1µg RNA von sechs einzelnen BCC Proben oder sechs normalen Hautproben gepoolt und revers transkribiert. Die so erhaltene cDNA (20µl) wurde zunächst mit 91µl RNase/DNase-freiem Wasser gemischt. 102µl der cDNA-Lösung wurde mit 550µl Mastermix gemischt. Jeweils 10µl dieses Ansatzes wurden zur

Expressionsanalyse jedes einzelnen Gens eingesetzt. Jedes Gen konnte pro Arrayplatte vierfach vermessen werden, so dass nach dieser Versuchsanordnung pro Arrayplatte die beiden zu untersuchenden Gruppen (BCC versus Normalhaut) in Duplikaten gemessen wurden. Danach wurde auf drei weiteren Arrayplatten die Genexpression in jeweils drei ausgewählten individuellen BCC bzw. Normalhaut RNA-Proben separat analysiert und miteinander verglichen.

In dieser Weise wurde die Genexpression von sowohl vollentwickelten als auch regredienten BCC untersucht (Beschreibung der unterschiedlichen Stadien der Tumorentwicklung, siehe Einleitung).

Alle Messungen wurden in dem Gerät ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Die Datensätze wurden online mit Hilfe der von SABiosciences zur Verfügung gestellten Software ausgewertet (<http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>).

3.1.5 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierungs-PCR des Plasmids mWnt5a-Kozak-pcDNA3 wurde folgendermassen durchgeführt:

1x	Sequenzierungspuffer	95°C	1:00 min	30 Zyklen
1,0µl	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	95°C	0:30 min	
1,0µl	DNA-Oligonukleotid (10µM)	60°C	2:30 min	
100ng	DNA	60°C	5:00 min	
add 10µl	Ampuwa			

Die DNA-Oligonukleotide für die Sequenzierung sind in Tabelle 9 gelistet.

Im Anschluss an die PCR wurde der Reaktionsansatz mit 10µl Ampuwa aufgefüllt und die Amplifikate zunächst über Sephadex G50-Säulchen aufgereinigt. Dann wurden die Proben in eine MultiScreenHTS-HV Platte überführt und im ABI 3500 XL genetic analyser und der entsprechenden Software ABI 3500 data collection analysiert. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte anhand des Sequenzchromatogramms und mit Hilfe eines BLAST-Programms des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.1.6 Gezielte Mutagenese

Sequenzauffälligkeiten des Plasmids mWnt5a-Kozak-pcDNA3 (aggtaCgaata) wurden mit Hilfe des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits (Agilent Technologies Deutschland GmbH) und den DNA-Oligonukleotiden mWnt5a-SNP_F und mWnt5a-SNP_R ausgebessert.

3.1.7 Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe der DNA-/ oder RNA-Fragmente wurden Gele von 0,5 bis 2,5% (w/v) Agaroseanteil in TBE mit 0,2µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in mit TBE gefüllten Gelelektrophoresekammern bei konstanter Spannung von 30 bis 100V. Für die Dokumentation wurde ein UV-Transilluminator (Intas, Göttingen) verwendet. Durch gleichzeitiges Auftrennen eines DNA-Größenstandards konnte sowohl die Fragmentgröße als auch die Konzentration der DNA durch vergleichendes Abschätzen mit dem Standard bestimmt werden.

3.1.8 Klonierungen

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des pGEM-Teasy TA-Cloning Kits (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die Ligation der Reaktionsansätze erfolgte über Nacht bei 4°C.

Die erforderliche Restriktionshydrolyse von DNA erfolgte unter Zugabe von 2-3 Units eines jeweiligen Enzyms (pro µg DNA) in einem Volumen von 10 bis 50µl im optimalen Puffer. Wurden pro Restriktionsansatz mehrere Enzyme gleichzeitig verwendet, so wurde ein für alle Restriktionsendonukleasen optimaler Puffer gewählt. War dies jedoch nicht möglich, so erfolgte eine serielle Hydrolyse der DNA-Probe mit anschließender Ethanolfällung. Die Reaktionsansätze wurden jeweils für 1h oder über Nacht bei optimaler Temperatur inkubiert. Nach Zugabe von 3µl Cresol-Lösung wurden die Fragmente auf einem Agarosegel über Gelelektrophorese aufgetrennt.

Aufzureinigende DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten. Für die Aufreinigung der DNA wurde das Reaktionssystem High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen wurden in Zellkulturschalen im Begasungsbrutschrank in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre mit 16% O₂, 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Die verwendeten Medien sind in Tabelle 6 angegeben, abweichende Serumkonzentration bzw. Antibiotikazugabe wird bei Beschreibung der jeweiligen Experimente angegeben.

Ein Mediumwechsel wurde alle drei bis vier Tage durchgeführt. Bei Erreichen einer etwa 70%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert.

Zur Kryokonservierung von Zelllinien wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 5ml Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Nach der Zugabe von ebenfalls 5ml FCS-haltigem Medium (10%) wurde durch vorsichtiges Auf-/ und Abziehen des Mediums eine Einzell-Suspension hergestellt. Diese wurde dann 5min bei 300xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das verbleibende Zellpellet in 10ml Medium mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryokonservierungsröhrchen zu je 1ml aliquotiert und zunächst für zwei Stunden bei -20°C eingefroren. Danach wurden die Zellen über Nacht bei -80°C gelagert, bevor sie zur Dauerkonservierung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.2.1.1 Kokultivierung eukaryotischer Zellen

ASZ001 wurden sowohl mit *Ptch*^{flox/flox} Fibroblasten als auch mit Peritonealmakrophagen kokultiviert. Die Experimente wurden in 6-Loch-Platten mit 25mm-Zellkulturgewebeeinsätzen (Nunc GmbH, Wiesbaden) durchgeführt. Für die Kokultivierung wurden 100.000 ASZ001/Loch in je 1ml 154CF-Medium (0,05mmol/l CaCl₂, 2% chelatiertes FCS, 1% P/S) gesät. Pro Zellkulturgewebeeinsatz wurden 60.000 Fibroblasten in 1ml DMEM (10% FCS, 1% P/S) gesät. Die Zellkultureinsätze

wurden in einer separaten Platte in einem Loch platziert, in dem bereits 1ml DMEM (10% FCS, 1% P/S) vorgelegt worden war. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium der Fibroblasten abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und der Gewebeeinsatz in eine Petrischale mit PBS überführt. Das 154CF-Medium der ASZ001-Zellen wurde erneuert und der Gewebeeinsatz mit den Fibroblasten luftblasenfrei auf die ASZ001 gesetzt. Die Kokultur der Zellen erfolgte in 154CF Medium (0,05mmol/l CaCl₂, 2% chelatiertes FCS, 1% P/S) für 72h. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend jeweils mit 1ml TRIzol Reagent zur Isolierung der RNA lysiert.

Zur Genexpressionsanalyse von ASZ001, die mit Peritonealmakrophagen kokultiviert worden waren, wurden die aus einer Maus isolierten Peritonealmakrophagen nach der Zentrifugation in 2ml 154CF-Medium (0,05mmol/l CaCl₂, 2% chelatiertes FCS, 1% P/S) resuspendiert. Jeweils 350µl der Zellsuspension wurden auf Zellkulturgewebeeinsätze gegeben, die im Loch einer 6-Loch-Platte hingen und bereits 1ml 154CF-Medium (0,05mmol/l CaCl₂, 2% chelatiertes FCS, 1% P/S) enthielt. Am folgenden Tag wurden die Zellen für die 72h andauernde Kokultivierung luftblasenfrei zusammengesetzt (siehe experimentelles Vorgehen zur Kokultur von Fibroblasten). Danach wurden die ASZ001 mit 1ml TRIzol Reagent zur Isolierung von RNA lysiert.

Um die Genexpression der kokultivierten Makrophagen zu analysieren, wurde das experimentelle Design umgekehrt. So wurden die Peritonealmakrophagen direkt in die 6-Loch-Platte und die ASZ001 in die Gewebeeinsätze gesät.

3.2.1.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

Die Transfektion von Zelllinien wurde mit dem Transfektionsmedium RotiFect (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) durchgeführt. Dazu wurde nach Herstellerangaben gearbeitet und pro Loch einer 6-Loch-Platte 0,2 bis 2µg Expressionsplasmid-DNA mit 2-3µl RotiFect in Zellen transfiziert. Die Inkubation der Zellen mit dem Nukleinsäure/Lipidkomplex betrug 3h.

Ein von diesem Protokoll abweichendes Vorgehen war für die Transfektion von ASZ001-Zellen notwendig, die mit dem Effectene Transfection Reagent (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben transfiziert wurden. Hierzu wurden 200.000 Zellen in 154CF-Medium (0,05mmol/l CaCl₂, 2% chelatiertes FCS, 1% P/S) pro Loch einer 6-Loch-Platte gesät. Am nächsten Tag wurde die zu transfizierende Plasmid-DNA (in einem 1,5ml Reaktionsgefäß) mit EC-Puffer bis zu einem Volumen von 150µl aufgefüllt und mit der Pipettenspitze gemischt. Dann wurde 8µl Enhancer zugegeben und der Ansatz kurz auf dem Vortexer geschüttelt. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT wurden 20µl Effectene Transfection Reagent dazugegeben und zum Durchmischen auf- und abpipettiert. Während der darauffolgenden Inkubation des Transfektionsansatzes für 10min bei RT wurden die ASZ001 mit PBS gewaschen und anschließend mit 500µl 154CF-Medium (ohne P/S) pro Loch bedeckt. Nach Zugabe von 500µl 154CF-Medium (ohne P/S) zum Transfektionsansatz wurde dieser auf die Zellen gegeben. Während der Liposomen-vermittelten Transfektion sollte aufgrund verminderter Effizienz auf die Zugabe von Antibiotika verzichtet werden. Nach einer 8-stündigen Inkubation bei 37°C wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend wie gewohnt in 154CF-Medium (0,05mmol/l CaCl₂, 2% chelatiertes FCS, 1% P/S) für 48h kultiviert.

Eine in parallel dazu durchgeführte Transfektion mit 2µg pEGFP-N1 diente als Kontrolle, wobei die Transfektionseffizienz nach 24h mit einem Fluoreszenzmikroskop überprüft wurde.

3.2.2 Isolierung und Kultivierung von peritonealen Makrophagen und BMDM

Zur Isolierung peritonealer Makrophagen wurde eine Maus auf einem Präparationsbrett fixiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Dann erfolgte eine Peritoneallavage. Dazu wurde das desinfizierte Bauchfell vorsichtig mit der Pinzette angehoben, eingeschnitten und mit der Schere vom Peritoneum abgelöst. Nach erneuter Desinfektion mit 70%igem Ethanol wurden 10ml steriles PBS mit Hilfe einer Spritze in die Peritonealhöhle injiziert. Dies sollte mit viel Druck erfolgen, um schon beim Einspritzen eine Durchmischung der intraperitonealen Flüssigkeit zu erzielen. Dann wurde das Präparationsbrett mit der darauf fixierten Maus geschwenkt, um die Zellen möglichst effektiv vom Peritoneum abzulösen. Anschließend wurde das PBS mit einer Spritze lateral abgesaugt. Dabei musste sehr sorgsam vorgegangen werden, um das Ansaugen etwaiger Darm- und Fettzellen zu vermeiden. Nach Entfernen der Kanüle von der Spritze wurde die Flüssigkeit (etwa 8ml)

vorsichtig in ein 15ml Röhrchen gespritzt und sofort auf Eis gelagert. Nach erfolgter Zentrifugation (4min, 300xg, 4°C) wurde der Überstand verworfen.

Für FACS-Analysen wurden die Zellen in 5ml sterilem PBS und für die Kultivierung in Zellkultur in 2ml 154CF-Medium (0,05mmol/l CaCl_2 , 2% chelatiertes FCS, 1% P/S) resuspendiert. Die genaue Beschreibung der weiteren Kultivierung dieser Primärzellen ist im Abschnitt zur Kokultivierung eukaryotischer Zellen (siehe 3.2.1.1) beschrieben.

Um BMDM (engl. bone marrow-derived macrophages) zu isolieren wurde zunächst die Haut entlang des Femurs vom darunter liegenden Gewebe gelöst. Mit Nadeln wurde die Felldecke dann seitlich fixiert, so dass die Muskeln besser von den Knochen präpariert werden konnten. Anschließend wurde der Femur entfernt und solange auf Eis gelagert bis auch der zweite Knochen auf die oben beschriebene Weise aus der Maus isoliert war. Nachdem die beiden Knochen unter Zuhilfenahme steriler Gaze gründlich von Gewebe befreit waren, wurden sie an beiden Enden mit einer Schere eröffnet. Mit einer Spritze wurde dann jeder Knochen mit 2,5ml Pluznikmedium (siehe Tabelle 6) durchspült und in einer beschichteten Nunc-Petrischale aufgefangen. Nach Zugabe von weiteren 5ml Pluznikmedium wurde durch mehrmaliges Auf-/und Abziehen des Mediums mit einer 10ml Pipette eine Einzelsuspension hergestellt.

Die so gewonnenen Zellen wurden über Nacht (37°C, 5%CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die BMDM setzen sich in dieser kurzen Zeit nicht auf der beschichteten Petrischale und konnten am nächsten Tag aus dem Medium durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 1200rpm zurückgewonnen werden. Die pelletierten Zellen wurden in 40ml Pluznikmedium aufgenommen und dann auf vier unbeschichtete, sterile Sarstedt-Petrischalen á 10ml aufgeteilt. Nur die BMDM konnten auf der unbeschichteten Oberfläche adhären und nach drei Tagen wurde das verbrauchte Pluznikmedium durch 10ml frisches ersetzt. Vier Tage später (also eine Woche nach Isolierung der Zellen) waren die BMDM soweit ausdifferenziert, dass sie für weiterführende Versuche genutzt werden konnten.

Dazu wurden die Zellen mit 2ml Accutase pro Platte für 5min im Brutschrank abgelöst und in 10ml DMEM (inklusive 10% FCS) aufgenommen. Nach einer 10-minütigen Pelletierung bei 1200rpm wurden die Zellen in 15ml BMDM-Kultmedium (siehe Tabelle 6) aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

3.2.3 Herstellung konditionierter Medien (CM, engl: conditioned medium)

Zum Herstellen von Wnt5a konditioniertem Medium (Wnt5a-CM) wurden 1×10^7 NIH3T3-Wnt5a-Zellen in 10ml Medium in 10cm Petrischalen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das gleiche erfolgte mit NIH3T3-lacZ-Zellen, die der Gewinnung von konditioniertem Kontrollmedium (lacZ-CM) dienten. Beide Zelllinien wurden zum Anwachsen

in DMEM (10% FCS, 1% P/S) kultiviert, wobei das Medium der NIH3T3-Wnt5a-Zellen zusätzlich mit 400µg/ml G418 supplementiert wurde. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70% erreicht hatten (meistens schon am nächsten Tag), wurden sie mit 5ml PBS gewaschen und anschließend in 10ml 154CF-Medium (0,05mmol/l CaCl₂, nur 0,5% chelatiertes FCS, 1% P/S) für 24h inkubiert. Dann wurde das Medium mit einer 10ml-Spritze aufgezogen, sterilfiltriert (Porengröße 0,2µm) und im 50ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die so gewonnenen konditionierten Medien konnten mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden und wurden für die Versuche unverdünnt für 24h auf ASZ001 gegeben (siehe 3.2.4).

Zur Gewinnung von L929 konditioniertem Medium (L929-CM) wurden 1x10⁷ L929-Zellen in 100ml RPMI1640 (10% FCS, 1% P/S) in Zellkulturflaschen gesät und bei standardisierten Kultivierungsbedingungen für eine Woche kultiviert. Das konditionierte Medium wurde in 50ml Reaktionsgefäße überführt und 10min bei 300rpm abzentrifugiert. Dadurch wurden die im Medium befindlichen toten Zellen entfernt und es folgte die Sterilfiltration (Porengröße 0,2µm) des gewonnenen Überstands. Das L929-CM wurde bei -20°C gelagert und wurde für die Ausdifferenzierung sowie Kultivierung von BMDM benötigt (vgl. 3.2.2).

3.2.4 Stimulation von ASZ001 mit Wnt5a-CM und rWnt5a

Für die Stimulationsexperimente wurden 100.000 ASZ001 in 1ml 154CF-Medium (0,05mmol/l CaCl₂, 2% chelatiertes FCS, 1% P/S) in 6-Loch-Platten gesät. Am folgenden Tag wurde das Medium entweder durch 1ml Wnt5a-CM (bzw. lacZ-CM), oder durch 1ml 154CF-Medium (0,05mmol/l CaCl₂, nur 0,5% chelatiertes FCS, 1% P/S) mit 50ng/ml rWnt5a (bzw. dem Lösungsmittel PBS) ersetzt.

Nach 24h Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1ml TRIzol Reagent für Genexpressionsanalysen lysiert.

3.2.5 Bestimmung der Zellviabilität

Die Viabilität von BMDM nach Stimulation mit 100ng/ml BLP oder 100µg/ml Liposomen wurde mittels des WST-1 Assays untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit 90µl frischem Kulturmedium und 10µl WST-1-Lösung (Roche Applied Science, Mannheim) für 3h bei 37°C inkubiert. Das Tetrazoliumsalz WST-1 (engl. water soluble tetrazolium) wurde während der Inkubation durch mitochondriale Dehydrogenasen der noch stoffwechselaktiven Zellen zu Formazan reduziert (orange-farbene Verbindung). Die Menge an gebildetem Farbstoff korrelierte mit der Anzahl lebender Zellen und konnte mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450nm in einem Microplate Reader (BioRad, München) quantifiziert werden.

3.2.6 Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von BLP und Liposomen auf das Migrationsverhalten von BMDM wurden am nächsten Tag $0,75 \times 10^5$ BMDM pro Zellkultur-Membraneinsatz ($8 \mu\text{m}$ Porengröße, von BD) in $300 \mu\text{l}$ BMBM-Kulturmedium ausgesät. Die Einsätze wurden in der 24-Loch-Platte platziert und nun für 18h in mit 100ng/ml BLP oder $100 \mu\text{g/ml}$ Liposomen supplementiertem Medium inkubiert.

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von mit Tumorzellen kokultivierten BMDM wurden 50.000 MCF-7 (in DMEM, 10%FCS, 1% P/S) oder 50.000 B16F10 (in RPMI1640, 10%FCS, 1% P/S) pro Loch einer 24-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, $500 \mu\text{l}$ BMDM-Kulturmedium dazugegeben und der Einsatz mit den daraufgesäten BMDM aufgesetzt.

In beiden Experimenten wurden die Einsätze (18h nach Inkubation mit BLP oder Liposomen; 18h nach Kokultivierung mit Tumorzellen) in eine neue 24-Loch-Platte überführt und in $500 \mu\text{l}$ $5 \mu\text{M}$ Calcein-Lösung (verdünnt in Medium) für 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die nicht durch die Membran gewanderten BMDM mit handelsüblichen Wattestäbchen von der Oberseite der Membran entfernt. Jede Membran wurde 2x mit $300 \mu\text{l}$ PBS gewaschen und erneut mit Wattestäbchen gereinigt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden abschließend $300 \mu\text{l}$ PBS auf die Membraneinsätze gegeben. Die durch die Membran gewanderten und an der Unterseite anheftenden BMDM wurden dann unter dem Mikroskop ausgezählt. Dazu wurden pro Membran sieben sich aneinander anschließende Fotos in 100facher Vergrößerung gemacht und die Zellen mit der Software ImageJ ausgezählt.

3.2.7 5-Bromo-2-Deoxyuridin Assay

Zur Analyse der Proliferation von BMDM und ASZ001 wurde der 5-Bromo-2-Deoxyuridin Assay (Cell Proliferation ELISA/BrdU-Kit von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt und das Produkt nach Herstellerangaben verwendet. Es basiert auf dem namensgebenden Pyrimidinanalogon Bromdeoxyuridin (BrdU), das während der Replikation anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Dadurch verhält sich die Menge an gebundenem BrdU proportional zur Proliferationsrate der Zellen. Für den Assay wurden in einer 96-Loch-Platte 8000 ausdifferenzierte BMDM in $100 \mu\text{l}$ BMDM-Kulturmedium bzw. 6000 ASZ001 in $100 \mu\text{l}$ 154CF-Medium ($0,05 \text{mmol/l}$ CaCl_2 , 2% chelatiertes FCS, 1% P/S) in Triplikaten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium erneuert und mit 100ng/ml BLP oder $100 \mu\text{g/ml}$ Liposomen bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel supplementiert. Die Zellen wurden für 72h mit den Substanzen inkubiert und das angereicherte Medium wurde täglich erneuert. Beim letzten Mediumwechsel wurden zusätzlich $10 \mu\text{l}$ BrdU für die folgenden 24h zugegeben. Dann wurde das Medium abgesaugt und $200 \mu\text{l}$ FixDenat zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung abgesaugt. Nach einer kurzen Trockenphase wurden die Zellen für 1h bei RT mit $100 \mu\text{l}$ anti-BrdU-POD inkubiert, wobei der

Antikörper zuvor 1:100 in Medium verdünnt wurde. Anschließend wurde das Medium wieder abgesaugt und die Zellen für 10min mit 300µl Waschpuffer inkubiert, der 1:10 mit ddH₂O verdünnt wurde. Dieser Waschschrift wurde 3fach wiederholt, der Puffer letztlich abgesaugt und die Platte kurz getrocknet. Schließlich wurde die BrdU-Inkorporation am Luminometer bestimmt, wobei die Zugabe des Peroxidase-Substrats (1:100 in Substratpuffer verdünnt) erst unmittelbar vor der Messung über eine Schlauchverbindung erfolgte.

3.2.8 Isolierung und Kultivierung von Hautstanzen

Die in Zellkultur inkubierten Hautstanzen stammten von *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen. In den Mäusen wurden durch einmalige Applikation von 100µg Tamoxifen BCC induziert, wobei eine Maus ohne Cre-Rekombinase als Normalhaut-Kontrolle verwendet wurde. Für den Versuch wurde die Haut 45 Tage nach Tumorinduktion isoliert, so dass sie bereits Vorläuferläsionen aufwies. Durch diese Art der Kultivierung von Gewebe wurde ein System geschaffen, das den *in vivo* Konditionen eher ähnelte als die Analysen mit der stabilen BCC-Zelllinie ASZ001.

Um eine keimfreie Kultivierung des Gewebes zu gewährleisten, wurden die Tiere 48h vor Isolierung der Hautstanzen mit Ketanest S und Rompun (siehe 3.4.5.6) anästhesiert. Dann wurde auf den Schwanz handelsübliche Enthaarungscreme appliziert, die nach einer Inkubation von 20min mit Leitungswasser wieder abgespült wurde. Am folgenden Tag wurde der Schwanz mit 70µl eines Antimykotikums (1,2mg/ml Nystatin in Ethanol) behandelt und 24 Stunden später wurden die Tiere durch zervikale Dislokation abgetötet. Die Schwanzhaut wurde mit 70%igem Ethanol desinfiziert und mit einem sterilen Skalpell vorsichtig vom subkutanen Binde- und Stützgewebe abgelöst. Nach Überführen in eine Petrischale mit PBS wurde sie in 1mm² große Stücke geschnitten. Anschließend wurden jeweils fünf Hautstanzen mit der Dermis nach unten auf einen sterilen Milliporefilter gelegt, welcher auf der Oberfläche von 2ml Kulturmedium (DMEM, 2% FCS, 1% P/S) schwamm. Die Biopsien wurden sieben Tage lang mit oder ohne 50ng/ml rekombinantem Wnt5a oder 20 µmol/l KN-93 bzw. den entsprechenden Lösungsmitteln (PBS oder DMSO) in einer 24-Loch-Platte kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag teilweise erneuert, indem 1ml des verbrauchten Mediums abgenommen und durch 1ml frisches ersetzt wurde.

Danach wurden jeweils drei der Biopsien bei -80°C weggefroren, um molekularbiologisch analysiert zu werden. Die beiden anderen Hautstanzen wurden für zwei Tage in 4%iger PFA-Lösung fixiert, dann in Paraffin eingebettet und anschließend histologisch analysiert.

3.3 Immunhistochemie und Immunzytochemie

3.3.1 Dualer Luciferase Assay

Die Analyse der Aktivität des kanonischen Wnt Signalwegs in BCC-Zellen erfolgte mittels Quantifizierung der Luciferaseaktivität mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega nach Herstellerangaben.

Dazu wurden 200.000 ASZ001 im 6-Loch-Format in 154CF-Medium (0,05mmol/l CaCl_2 , 2% chelatiertes FCS, 1% P/S) ausgesät und am nächsten Tag transfiziert (vgl.3.2.1.2). Die Aktivitätsmessung des SuperTOPFlash-Expressionsplasmids (TOP hat 8 TCF/LEF-Bindestellen zur Aktivierung der Expression des Luciferasegens) bzw. des Kontrollvektors SuperFOPFlash (FOP hat 8 mutierte TCF/LEF-Bindestellen) erfolgte 48h nach Transfektion. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 500 μl PLB (passive lysis buffer; im Luciferase-Kit enthalten) für 20min auf dem Schüttler lysiert. Dann wurden 20 μl des Lysats in eine 96-Loch-Platte überführt und im Luminometer nach zeitversetzter Zugabe von je 100 μl LAR II und Stop&Glo quantifiziert. Das Zellysat wurde dann für etwaige weitere Analysen bei -80 C gelagert.

Normalisiert wurden die gemessenen Werte auf die Aktivität der vom Renilla-Reporterplasmid konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase aus *Renilla reniformis*. Die Werte wurden als Änderung der RLU (relative light units) graphisch dargestellt.

3.3.2 ELISA

Mit Hilfe kommerziell erworbener Testsysteme (enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA) wurde der Überstand von mit BLP oder Liposomen stimulierten BMDM hinsichtlich Cytokinfreisetzung analysiert.

Dazu wurden 15.000 Zellen in einer 96-Loch-Platte in BMDM-Kulturmedium inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium erneuert und mit 100ng/ml BLP oder 100 μg /ml Liposomen supplementiert. Die Zellen wurden nun für 6h, 12h oder 24h inkubiert. Danach wurde der Überstand in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert und 10min bei 13000rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Die Level von IL-6, IL-10, CCL2 (monocyte chemoattractant protein, MCP-1), CCL3 (macrophage inflammatory protein, MIP-1 α), CCL5 (regulated upon activation normal T-cell expressed and presumably secreted, RANTES) und CXCL1 (KC, mouse equivalent of human GRO α) wurden mit DuoSet ELISA Development Kits (R&D Systems GmbH, Wiesbaden) bestimmt. Das Level von TNF- α wurde mit dem ELISA-Kit von BioLegend (San Diego, CA, USA) quantifiziert und das von IL-12p40 wurde mit dem ELISA-Kit von eBioscience (San Diego, CA, USA) bestimmt. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet

und die nach Substratzugabe entstandene chromogene Verbindung wurde photometrisch bei 450nm in einem Microplate Reader von BioRad, München gemessen.

3.3.3 Immunhistologische Antikörperfärbungen

3.3.3.1 Gewebeentnahme und /-fixierung

Gewebe von Mäusen wurde entweder sofort auf Trockeneis für die Kryokonservierung weggefroren (zur Dauerlagerung bei -80°C) oder in 4%iger PFA-Lösung für mindestens zwei Tage (Haut zwei Wochen) bei 4°C fixiert. Die weitere Fixierung des Gewebes für die Einbettung in Paraffinblöcke erfolgte maschinell im Universitätsklinikum Göttingen, Abteilung Neuropathologie. Dann wurde das Gewebe manuell luftblasenfrei in eine Einbettungsform überführt und mit Hilfe einer erhitzten Pinzette ausgerichtet. Zum Auffüllen der Einbettungsform wurde flüssiges Paraplast zugefügt. Nach dem Erkalten konnten die Blöcke aus den Einbettungsformen gelöst und bei Raumtemperatur dauerhaft gelagert werden.

3.3.3.2 Herstellung von Paraffinschnitten von Geweben

Die Paraffinblöcke wurden auf einer Kühlplatte gekühlt. Dann wurden Schnitte (etwa 3µm dick) am Schlittenmikrotom hergestellt. Für Färbungen wurden sie in einem 50°C heißen Wasserbad gestreckt. Für immunhistologische Antikörperfärbungen und *in situ*-Hybridisierungen wurden die Schnitte auf Superfrost-Objektträger gezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Für HE-Färbungen wurden die Schnitte auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen und für 20min bei 80°C getrocknet.

3.3.3.3 Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung, Vermessung des Tumoreals und Antikörperfärbungen

Für die HE-Färbung wurde das Gewebe zunächst durch Inkubation in Xylol (2x10min) entparaffiniert und anschließend mittels einer absteigenden Ethanolreihe (je 2min in 100% (2x), 96% und 70% Ethanol) rehydriert. Nach ausgiebigem Spülen in ddH₂O wurden die Schnitte für 15min in Hämalaun nach Meyer inkubiert. Die anschließende Farbentwicklung fand unter fließendem, lauwarmem Leitungswasser für mindestens 5min statt. Dann wurden die Schnitte für 20sec in 1%ige Eosin-Lösung getaucht, in die unmittelbar zuvor einige Tropfen Eisessig (0,5% v/v) gegeben wurde. Anschließend wurden die Schnitte kurz in ddH₂O gespült und mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (je 1min in 70%, 96%, 100% Ethanol). Vor dem Eindeckeln des Gewebes mit Pertex wurden die Objektträger zur vollständigen Dehydrierung kurz in Xylol geschwenkt. Die Aushärtung des Montagemediums erfolgte durch Inkubation der Präparate bei 55°C für mindestens 15min.

Die gefärbten Schnitte wurden am Mikroskop analysiert und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

Anhand der oben beschriebenen HE-gefärbten Schnitte wurde die Größe von BCC am Mikroskop mit der cell^F Software quantifiziert.

Für immunhistologische Antikörperfärbungen wurden die Epitope der entparaffinierten und rehydrierten Schnitte falls notwendig demaskiert (siehe Tabelle 18). Dann wurden die Schnitte 2x in TBS gespült und zur Inhibierung endogener Peroxidasen für 20min mit 3%iger H₂O₂-Lösung (verdünnt in TBS) auf dem Schüttler inkubiert. Die Reaktion wurde durch intensives Spülen mit ddH₂O gestoppt, die Schnitte anschließend kurz in TBS gespült und das Gewebe für 20min mit 5% FCS/10% BSA in TBS geblockt. Danach wurden die Schnitte mit primärem Antikörper (siehe Tabelle 14, für Verdünnung) jeweils 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Visualisierung der Signale wurde das EnVision Detection System von Dako verwendet. Dazu wurden die Schnitte zunächst für 30min mit dem gebrauchsfertigen Sekundärantikörper (HRP-konjugiert) inkubiert, danach zweimal mit TBS gewaschen und für 10min in DAB-Chromogen (1:50 verdünnt) entwickelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Schnitte intensiv mit ddH₂O gespült und zur besseren Übersicht mit Hämalaun gegengefärbt.

Die immunhistologischen Färbungen mit dem anti-Ki67 Antikörper wurden anschließend am Mikroskop ausgewertet. Hierzu wurden 1000Zellen/Gewebeschnitt gezählt und der prozentuale Anteil positiver Zellen berechnet.

Tabelle 18: Antigen-Demaskierung und Verdünnung der verwendeten primären Antikörper. Spalte 1: Bezeichnung des Antigens; Spalte 2: Antigendemaskierung; Spalte 3: eingesetzte Verdünnung und verwendeter Puffer.

1	2	3
anti-F4/80	ohne Vorbehandlung	1:100 in 10% Casein/TBST
anti-Ki67	Citratpuffer pH6; 16min 100°C	1:50 in TBS

3.3.4 *In situ*-Hybridisierung

Zum Nachweis von mRNA-Transkripten in Gewebeschnitten wurde die Methode der *in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Um eine RNA-Degradation zu verhindern, wurden mit Ausnahme von 0,1 M Triethanolamin pH 8,0, STE-*in situ*-Puffer, MBSTL-Puffer und NTMTL-Puffer sämtliche benötigten Lösungen und Puffer vor der Verwendung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Dazu wurden die Lösungen/Puffer mit 0,03% DEPC (v/v) versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur DEPC-Inaktivierung autoklaviert. Verwendete Pinzetten wurden mit RNaseZap behandelt und danach mit 0,03% DEPC-H₂O abgespült. Darüber hinaus wurden die für *in situ*-

Hybridisierung verwendeten Küvetten nach jedem Einsatz mit ddH₂O gespült und anschließend gebacken.

3.3.4.1 Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden

Zur Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden für die in situ-Hybridisierung wurden 10µg Plasmid mit 20U eines geeigneten Restriktionsenzym in einem 50µl-Ansatz für 2h bei 37°C linearisiert. Die DNA wurde dann in 600µl 100%igem Ethanol für 30min bei 13000rpm (4°C) gefällt, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in 20µl RNase/DNase-freiem Wasser aufgenommen. Zur Quantifizierung der DNA-Menge wurde 1µl mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch vergleichendes Abschätzen mit dem DNA-Größenstandard die Konzentration ermittelt.

Für die Markierungsreaktion wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

- 1 µg linearisiertes Plasmid
- 1x DIG RNA Labeling Mix
- 1x Transcription Buffer
- 10 mM DTT
- 1 U RNA Polymerase (T3 bzw. T7)

Der Reaktionsansatz wurde für 1,5 h bei 37°C inkubiert, danach wurde die Reaktion für eine weitere Stunde bei 37°C nach Zugabe folgender Reagenzien wiederholt:

- 1x DIG RNA Labeling Mix
- 1x Transcription Buffer
- 10 mM DTT
- 1 U RNA Polymerase (T3 bzw. T7)

Dann wurden 1x DNase-Puffer sowie 2µl RQ1-DNase (1U/µl) zum Ansatz gegeben und dieser für 8min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10µl Stop-Puffer erfolgte die Aufreinigung der RNA-Sonde über Sephadex-G50-Säulchen. Zur Überprüfung der RNA-Sonde wurde 1µl Sonde für 45min bei 37°C mit 1µl RNase A (10mg/ml) verdaut und neben 1µl unverdauter RNA-Sonde auf ein Agarosegel aufgetragen. Nur die unbehandelte Sonde darf im Gel sichtbar werden.

Mittels eines sogenannten Dot Blots wurde die Markierungseffizienz der RNA-Sonde überprüft. Dafür wurde eine serielle 1:10 Verdünnungsreihe (fünf Verdünnungsstufen) der Sonde mit 6x SSC hergestellt. Je 1µl der Verdünnungen wurde auf eine Nylonmembran pipettiert und mittels UV-Licht (Cross-Linker, 125 mJ) auf dieser fixiert. Danach wurden überschüssige Bindungsstellen der Membran für 5min mit 55°C warmen 4%igem BSA in NT-Puffer abgesättigt. Nach kurzem Waschen der Membran in NT-Puffer wurde sie für 7min in Antikörperlösung (1:5000 anti-Digoxigenin Fab Fragments/AP in NT-Puffer) gelegt. Die Membran wurde 3x 2min in NT-Puffer gewaschen und anschließend für 3min in NTM-Puffer

umgepuffert. Die Entwicklung erfolgte mit NBT/BCIP im Dunkeln bis zur gewünschten Farbintensität (10-20 min). Abschließend wurde die Membran intensiv mit ddH₂O gespült. Nach erfolgreichem Testen wurde der Sondenansatz mit RNase/DNase-freiem Wasser versehen und zur Stabilisierung 1:1 mit Formamid aufgefüllt. Das Volumen wurde nach Abschätzen der Konzentration im Dot Blot so gewählt, dass sense-/ und antisense-Sonden gleich stark konzentriert waren. Danach wurden die Sonden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.3.4.2 Durchführung der *in situ*-Hybridisierung

Die auf Superfrost Objektträger aufgezogenen Paraffinschnitte wurden wie beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Es folgten 5min Inkubation in PBS und 0,83% NaCl-Lösung und danach eine Fixierung in 4%iger PFA-Lösung (in PBS) für 20min auf Eis. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Gewebeschnitte in Proteinase K-Puffer für 7,5 min permeabilisiert. Die Schnitte wurden kurz mit PBS gewaschen, erneut in 4%iger PFA-Lösung (in PBS) für 5min auf Eis fixiert und zunächst in 0,1M Triethanolamin, pH 8,0, und dann für 10 min in 0,25% (v/v) Essigsäureanhydrid überführt. Danach wurden die Schnitte mit PBS und 0,83% NaCl-Lösung gewaschen und schließlich in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert.

Die Schnitte wurden an der Luft getrocknet und noch am gleichen Tag für die Hybridisierung verwendet. Der näher zum Mattrand hin aufgezoogene Gewebeschnitt fungierte als Negativkontrolle (sense-Sonde) und wurde vor der Hybridisierung mittels Liquid Barrier Marker vom anderen Gewebeschnitt abgegrenzt. Die sense-/ und antisense-Sonden wurden im entsprechenden Hybridisierungspuffer verdünnt (siehe Tabelle 12), für 2min bei 80°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Zum Hybridisierungspuffer F wurde zusätzlich 50µg/ml Lachsspermien-DNA gegeben, die zuvor für 10 min bei 95°C denaturiert worden war. Dann wurden 100µl der jeweiligen Probe auf das Gewebe gegeben und luftblasenfrei mit einem autoklavierten Deckgläschen abgedeckt. Für die Hybridisierung wurden die Objektträger über Nacht bei 59°C in einer feuchten Kammer inkubiert, deren Boden mit 50% Formamid/5xSSC bedeckt war.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger zum Entfernen der Deckgläschen in eine Küvette mit 5xSSC gestellt. Anschließend wurden die Schnitte für 30min in 5xSSC (pH 6,4) bei 55°C inkubiert und für weitere 30min in 50% Formamid, 2xSSC (pH 6,4) bei 63°C im Schüttel-Wasserbad gewaschen. Es folgten ein Waschschrift bei RT und 3 Waschschriftte bei 37°C in STE-*in situ*-Puffer für jeweils 10min. Nach einer Inkubation mit 8ng/ml RNase A in STE-*in situ*-Puffer für 30min bei 37°C und einem 15-minütigen Spülen mit STE-*in situ*-Puffer bei 37°C erfolgte eine erneute Inkubation für 30min in 50% Formamid, 2xSSC (pH 6,4) bei 63°C im Schüttel-Wasserbad. Dann wurden die Objektträger für 15min bei RT in 2xSSC (pH 6,4)

und danach für 10min bei RT in NT-Puffer überführt. Anschließend wurden sie 3x5min mit MBSTL-Puffer gewaschen. Danach wurde 0,2% Casein in PBS zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf die Gewebeproben gegeben und die Objektträger für 1h in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Der Antikörper Anti-Digoxigenin Fab fragments/AP wurde 1:500 in 0,02% Casein in MBSTL-Puffer verdünnt. 80µl dieser Verdünnung wurde auf die Gewebeschnitte gegeben und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Objektträger 6x für 15min bei RT in MBSTL-Puffer (in einer Küvette) und danach 3x5min in NTMLT-Puffer (in feuchter Kammer, direkt auf dem Objektträger) gewaschen. Anschließend wurde das gebrauchsfertige Substrat BM-Purple (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) auf die Schnitte gegeben und die Objektträger bei RT solange im Dunkeln inkubiert bis eine ausreichende Signalintensität erreicht war. In Abhängigkeit von der verwendeten Sonde dauerte dieser Vorgang meist mehrere Tage, wobei täglich frisches BM-Purple auf die Gewebeschnitte gegeben wurde. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurden die Objektträger kurz in Stop-Puffer inkubiert und danach in PBS überführt. Es folgte die Fixierung der Färbung für mindestens 1h in 4% PFA/ 0,2% Glutaraldehyd (in PBS), dann wurde intensiv mit PBS gewaschen und abschließend das Gewebe mit Glycergel (Dako GmbH, Hamburg) eingedeckt.

3.3.5 Durchflusszytometrische Analysen (FACS)

Für die Analyse der Apoptose mittels Annexinfärbung wurden 240.000 ausdifferenzierte BMDM in 1ml BMDM-Kulturmedium bzw. die gleiche Anzahl ASZ001 in 1ml 154CF-Medium in 6-Loch-Platten (in Duplikaten) gesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch mit 100ng/ml BLP oder 100µg/ml Liposomen supplementiertem Medium ersetzt. Als Positivkontrolle wurde der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin eingesetzt. Die Zellen wurden für 72h mit den Substanzen kultiviert, wobei das Medium täglich erneuert wurde. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1ml Accutase (von PAA) 5min bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in 15ml Röhrchen gegeben, in dem bereits 2ml Medium vorgelegt worden war. Dann wurden sie 5min (300xg, 4°C) abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut pelletiert. Danach wurden die Zellen in 100µl Binding Buffer von BD Pharmingen (1:10 verdünnt in ddH₂O) resuspendiert und nach Zugabe von 2µl Annexin V-FITC für 10min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurde 1µl To-Pro-3 Iodid (von Invitrogen) zugegeben. Nach einer Inkubation von 5min im Dunkeln erfolgte die Zugabe von 200µl 1xBinding Buffer, und die Proben wurden innerhalb einer Stunde am BD FACSCalibur gemessen.

Für Zellzyklus-Analysen wurden ebenfalls 240.000 ausdifferenzierte BMDM in 1ml BMDM-Kulturmedium in 6-Loch-Platten gesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag

wurden die Zellen für 72h entweder mit Liposomen (0,1mg/ml) oder mit dem entsprechenden Lösungsmittel PBS behandelt. Das Medium mit den Zusätzen wurde täglich gewechselt. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 1ml Accutase von der Platte gelöst und in ein 15ml Röhrchen (mit 2ml Medium) überführt. Die Zellen wurden für 5min (1000rpm, 4°C) pelletiert und in 1ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit viel Druck in 10ml 100% Ethanol gespritzt, der zuvor für mindestens 2 Stunden bei -80°C lagerte. Das 15ml Röhrchen wurde invertiert, sofort auf Trockeneis gelagert und die Zellen für mindestens 2h bei -20°C fixiert. Für die Färbung wurden die Zellen zunächst für 5min (1500rpm, 4°C) pelletiert, dann mit 2ml 100% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach in 500µl Propidiumiodid-Lösung (10µg/ml Propidiumiodid und 100µg/ml RNaseA in PBS) resuspendiert und für 30min bei 37°C inkubiert. Direkt im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen am BD LSR II flow cytometer analysiert.

Für die durchflusszytometrische Analyse von Blutzellen erfolgte die Blutabnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus (siehe 3.4.5.5). Es wurden 49µl des Vollbluts mit 1µl Antikörper für 20min auf Eis inkubiert. Daran schloss sich eine Erythrozytenlyse an, indem der Ansatz mit 1ml gebrauchsfertigem Lyse-Puffer (BD Pharmingen) für 10min auf Eis inkubiert wurde. Danach wurden die Zellen für 4min (300xg; 4°C) abzentrifugiert und zweimal mit 2ml PBS gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in 300µl PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert (maximal 1h).

Zur FACS Analyse von Milzzellen wurde dieses Organ in 10ml PBS in einer Petrischale durch ein feinmaschiges Zellsieb (40µm Porengröße) gedrückt. Durch mehrmaliges Auf-/und Abziehen wurde mit einer Spritze und einer feinen Kanüle eine Einzell-Suspension hergestellt.

Für FACS-Analysen von Hautzellen wurden Ohren isoliert, mit einem Skalpell in sehr kleine Stücke gehackt und in 2ml HBSS mit 0,2% Collagenase Typ II (von Worthington) für 1h bei 37°C, 1000rpm inkubiert. Diese Suspension wurde dann durch ein Zellsieb (70µm Porengröße) filtriert. Durch die Zugabe von 10% FCS (in PBS) erfolgte die Inaktivierung der Collagenase.

Die isolierten Zellen aus Milz, Haut und Peritoneallavage wurden dann für 4min (300xg, 4°C) abzentrifugiert und die jeweiligen Pellets in 5ml PBS resuspendiert. Nach Quantifizierung in der Neubauer-Zählkammer wurden pro durchflusszytometrischer Färbung 1×10^6 Zellen eingesetzt.

Die Färbungen mit den jeweiligen Antikörpern (1:50 in PBS; siehe auch Tabelle 14) erfolgten in einem Volumen von 50µl in lichtundurchlässigen 1,5ml Reaktionsgefäßen für 20 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 300µl PBS gewaschen und

abzentrifugiert (300xg; 4°C, 4min). Danach wurde das Zellpellet in 300µl PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert (maximal 1h).

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden am BD LSR II flow cytometer durchgeführt. Die Software BD FACS Diva™ diente zur Dokumentation der Daten, die dann mit der Software FlowJo ausgewertet wurden.

3.3.6 Western Blot

Zur Isolierung von Proteinen aus Haut wurde diese zunächst mit dem Skalpell zerkleinert und anschließend mit dem Homogenisator in Lyse-Puffer (für Gewebe) in 15ml Röhren homogenisiert. Danach wurde das Gewebe für 10min (13000rpm, 4°C) abzentrifugiert, das Proteinlysate in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

Um Proteine aus Zellen (Kultivierung in 6-Loch-Platten) zu isolieren, wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und dann in 200µl modifiziertem RIPA-Puffer aufgenommen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden noch anhaftende Zellen von der Petrischale gelöst und es folgte die Inkubation des Lysats für 10min bei RT. Dann wurden die Zellen für 10min (13000rpm, 4°C) pelletiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und schließlich bei -80°C gelagert.

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) nach Herstellerangaben bestimmt und für die Analyse wurden 18µg Protein eingesetzt.

Vor Laden des Gels wurde das Volumen der Proteinlysate (entsprechend 18µg Protein) mit 6x Ladepuffer bzw. Ampuwa auf ein Volumen von 25µl aufgefüllt. Dann wurden die Proteine für 5min bei 96°C denaturiert und mittels eines NuPAGE Novex Midi Gels (Gradient von 4%-12%) bei 160 Volt aufgetrennt. Danach wurden die Proteine innerhalb von anderthalb Stunden bei 120mA mittels Semi-Dry Blot (Trans Blot SD Semi-Dry; Bio-Rad Laboratories GmbH) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurde die Membran für 1h in Blocking Puffer auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen vor Zugabe des primären Antikörpers abzusättigen. Dann wurde die Membran 3x10min in PBST gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit primärem Antikörper in BSA/Azid-Lösung über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst 3x10min mit PBST gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in Blocking Puffer) für 1h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten á 10min wurde das ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham) nach Herstellerangaben gemischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach Inkubation von etwa 2min im Dunkeln wurde das ECL-Gemisch wieder von der Membran entfernt. Dann wurde die Membran luftblasenfrei mit Folie

bedeckt, um vor Austrocknung geschützt zu sein. Die Entwicklung erfolgte in der Dunkelkammer unter Verwendung von Filmkassetten.

Die eingesetzten Verdünnungen der verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 14 und 15 aufgeführt.

3.3.7 X-Gal-Färbung von Hautbiopsien

Die isolierte Haut wurde in 1x PBS auf Eis gewaschen und dann für mindestens 2h in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (pH 7,8) auf Eis fixiert. Nach dem Waschen (3x 20min in 1x PBS auf Eis) wurde die Haut solange in 25%iger Sucrose-Lösung (in 1xPBS) auf Eis inkubiert, bis das Gewebe auf den Boden des Reaktionsgefäßes sank. Dann wurde die Haut in LacZ-Puffer 3x 5min bei RT äquilibriert. Anschließend wurde das Gewebe über Nacht bis hin zu 5 Tage in LacZ-Färbepuffer bei 30°C im Brutschrank inkubiert, wobei bei mehrtägiger Färbedauer der Puffer täglich erneuert wurde. Abschließend wurde die Haut 3x 20min mit 1xPBS gewaschen und für die lichtmikroskopische Untersuchung in einer aufsteigenden Glycerolreihe (15%, 30%, 50%, 80% in 1x PBS) für je 12 h bei 4°C äquilibriert. Das Material kann nach erfolgter Behandlung bei 4°C jahrelang gelagert werden.

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Mauslinien

Wildtypmäuse des Inzuchtstamms C57BL/6N wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben und im Tierstall des Instituts für Humangenetik (Universität Göttingen) gezüchtet.

Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-} Mäuse (Uhmann, A *et al.* 2007) waren im Labor zur Induktion und Untersuchung von Basalzellkarzinomen (BCC) bereits vorhanden. In *Ptch^{flox/flox}* Mäusen sind die Exone 8 und 9 des *Ptch* Gens von Erkennungssequenzen für die Cre-Rekombinase flankiert („gefloxt“). Durch eine Kreuzung mit *Rosa26CreERT2* Mäusen, die eine tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase *ERT2* unter der Kontrolle des *Rosa26* Promotors exprimieren, kann dann ein *Ptch* Knockout (und damit BCC) induziert werden. Die Induktion der BCC in den *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen wird in Kapitel 3.4.5.1 detailliert beschrieben.

Wnt5a^{+/-} Mäuse wurden vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) über R. Smits (Medical Center Rotterdam, Niederlande) bezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Verpaarung der beiden zuletzt genannten Mauslinien eine neue Mauslinie *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* generiert (siehe Tabelle 19). Diese Mäuse waren zum einen heterozygot für *Wnt5a* und zum anderen konnte durch Induktion der *Ptch*-Deletion BCC hervorgerufen werden.

In Tabelle 19 sind die genetisch manipulierten Mauslinien aufgelistet. Die Zucht und Haltung sowie tierexperimentelle Methoden werden im Folgenden beschrieben.

Tabelle 19: Auflistung der verwendeten Mauslinien. Spalte 1: Bezeichnung der Mauslinie; Spalte 2: Genetischer Hintergrund; Spalte 3: Art der genetischen Veränderung; Spalte 4: Literaturreferenz.

1	2	3	4
A) <i>Ptch</i> ^{fl^{ox}/fl^{ox}} <i>ERT2</i> ^{+/-}	129Sv / C57BL/6N	konditionelles <i>Ptch</i> Knockout kombiniert mit einem ERT2 Transgen	(Uhmann, A <i>et al.</i> 2007)
B) <i>Wnt5a</i> ^{+/-}	C57BL/6N	konventionelles <i>Wnt5a</i> Knockout	(Yamaguchi, TP <i>et al.</i> 1999)
C) <i>Ptch</i> ^{fl^{ox}/fl^{ox}} <i>ERT2</i> ^{+/-} <i>Wnt5a</i> ^{+/-}		Kombination von A) und B)	diese Arbeit

3.4.2 Maushaltung

Die verwendeten Mausstämme wurden im institutseigenen Tierstall (Institut für Humangenetik, Universität Göttingen) gehalten und gezüchtet. Die Tierhaltung erfolgte in Makrolonkäfigen Typ II und III, bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus, einer Temperatur von 20±2°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50±10%. Pelletiertes Trockenfutter sowie Leitungswasser standen den Mäusen ständig zur Verfügung.

Im Falle von Knochenmarkstransplantationen erhielten die Tiere eine Woche vor bis 6 Wochen nach Transplantation über das Trinkwasser eine antibiotische Behandlung (3x wöchentlich 0,12% Borgallösung).

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Analysen lagen die entsprechenden genehmigten Tierversuchsanträge vor.

3.4.3 Genotypisierung von Mäusen

Ohrlochmarkierung zur Kennzeichnung und die Entnahme von Schwanzbiopsien (ca. 0,2cm der Schwanzspitze) von drei Wochen alten Mäusen wurden von Tierpflegern des Instituts vorgenommen.

Nach Isolierung von DNA aus den Schwanzbiopsien wurde der Genotyp der Mäuse mittels PCR bestimmt. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in Tabelle 8 aufgeführt.

3.4.4 Bestimmung des Kopulationszeitpunktes und der Trächtigkeit

Um Embryonen für die Transplantation fötaler Leberzellen (siehe 3.4.6) an Tag 14,5 nach Befruchtung isolieren zu können, wurden die Weibchen aus Verpaarungen früh morgens auf eine erfolgte Kopulation hin untersucht. Durch Koagulation der Samenflüssigkeit kann bis zu 24h nach erfolgter Ejakulation ein fester Vaginalplaque entstehen. Die Sichtung des Vaginalplaques wurde als Tag 0,5 nach erfolgter Kopulation definiert (*days post coitum; dpc*).

Ob die vaginalplaque-positiven Weibchen tatsächlich tragend waren, konnte visuell erst nach 9,5 bis 10,5 Tagen bestätigt werden.

3.4.5 Applikation von Medikamenten und Blutabnahme

3.4.5.1 Intramuskuläre Injektion von Tamoxifen

Zunächst wurde eine 100mg/ml Tamoxifen-Lösung (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim) in 96% Ethanol hergestellt. Diese Lösung wurde dann in sterilem Sonnenblumenöl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) 1:10 verdünnt. Diese Emulsion (10mg/ml) wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Zur Induktion der Cre-Rekombinase in den Mauslinien *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* und *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* wurden 6-9 Wochen alte Mäuse im Genick fixiert und einmalig 10µl der Tamoxifenemulsion (100µg Tamoxifen) intramuskulär (i.m.; in den *musculus soleus*) injiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch allen Kontrollmäusen ohne Cre-Rekombinase 100µg Tamoxifen i.m. gespritzt.

3.4.5.2 Topische Applikation von Ionomycin

Zur Erhöhung von Ca²⁺ in der Haut wurden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion von BCC mit 0,2µM Ionomycin (gelöst in Aceton) behandelt. Kontrollen wurde nur das Lösungsmittel appliziert. Darüber hinaus wurden auch Mäuse ohne BCC mit Ionomycin behandelt, um einen generellen Einfluss der Substanz auf die Haut zu überprüfen.

Die Behandlung der Tiere erfolgte 5x wöchentlich. Hierzu wurde die Maus im Genick fixiert und der gesamte Schwanz kurz in Ionomycin-Lösung getaucht. Die Maus blieb zum Verdampfen des Lösungsmittels noch für weitere 30sec fixiert. Die Behandlung erfolgte in drei unabhängigen Kohorten. Dazu wurde entweder unmittelbar, 15 oder 45 Tage nach Tamoxifen-Injektion (und damit BCC Induktion) mit der Applikation begonnen und endete jedes Mal an Tag 90 der Tumorentwicklung.

3.4.5.3 Subkutane Injektion eines Expressionsplasmids

Zur Überexpression von nackter Plasmid-DNA in vivo wurde in Vorversuchen durch Applikation eines βGal-Expressionsplasmids zunächst ein geeignetes Spritzschema etabliert. Dann wurde ein Wnt5a-Expressionsplasmid sowie PBS (als Kontrolle) in Wildtyp-Mäuse subkutan injiziert, wobei das Experiment zukünftig mit Basaliom-tragenden Mäusen durchgeführt werden soll.

Den Mäusen wurde subkutan 3x je 50µg Plasmid (in 10µl PBS) 1cm von der Schwanzwurzel entfernt gespritzt. Zwischen den Injektionen wurde jeweils ein Tag pausiert. 24h bzw. sieben Tage nach der letzten Dosis folgte das schmerzfreie Abtöten der Tiere. An der isolierten β Galaktosidase-gespritzten Haut wurde eine X-Gal-Färbung durchgeführt (siehe 3.3.7) und aus den Wnt5a-gespritzten Hautarealen wurden Proteine zur Analyse im Western Blot isoliert.

3.4.5.4 Intraperitoneale Injektion von Clodrolip, Leerliposomen und BLP

Zur Depletion von Makrophagen *in vivo* wurde $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäusen Clodrolip i.p. injiziert, als Kontrolle dienten Leerliposomen. Die Substanzen wurden freundlicherweise von R. Schwendener, Schweiz zur Verfügung gestellt. Die Injektion erfolgte in einem Volumen von 120µl PBS (erste Dosis 2mg/20g; folgende Dosen 1mg/20g) jeden vierten Tag. Um einen Einfluss der Makrophagendepletion auf die Tumorgroße zu untersuchen, wurde die Behandlung an Tag 15 nach der BCC-Initiation begonnen und wurde für 75 Tage fortgesetzt.

Außerdem wurde den $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäusen der TLR1/2-Agonist BLP (Pam₃CSK₄) i.p. gespritzt. Die Konzentration betrug 25µg/Tier in einem Volumen von 120µl PBS und die Injektion wurde jeden vierten Tag appliziert. Kontrolltieren wurde die gleiche Menge PBS i.p. gespritzt. Die erste Injektion erfolgte 15 Tage nach Tumorinduktion und wurde bis zum Tag 90 nach Induktion fortgeführt.

3.4.5.5 Blutabnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus

Durch festes Fixieren der Maus im Genick wurde das Blut im Plexus gestaut, um es mit einer angebrochenen Mikro-Hämatokrit-Kapillare aus dem retroorbitalen Venenplexus zu entnehmen. Das zu analysierende Blut lief direkt in ein EDTA-Röhrchen, das sofort kräftig geschüttelt wurde. Die Blutproben wurden bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

Die Isolierung von DNA aus Blut ist im Abschnitt 3.1.1.2.3 und die weitere Behandlung des Blutes für FACS-Analysen in Abschnitt 3.3.5 beschrieben.

3.4.5.6 Narkotisierung von Mäusen

Zur Narkotisierung wurde den Mäusen i.p. 64µg Ketanest S und 12µg Rompun pro 1g Körpergewicht injiziert. Um eine Austrocknung der Augen während der Narkose zu verhindern, wurden sie mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung bedeckt.

3.4.6 Transplantation fötaler Leberzellen in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse

Zur Isolierung fötaler Leberzellen von 14,5 Tage alten Mausembryonen wurden zunächst heterozygote *Wnt5a^{+/-}* Mäuse miteinander verpaart. Am folgenden Morgen wurden die Weibchen aus den Verpaarungen auf Vaginalplaques hin untersucht (siehe Abschnitt 3.4.4). Am Tag 14,5 dpc wurden die tragenden Weibchen durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet, der Uterus isoliert und die Embryonen auf Eis in 1x PBS aus dem Uterusgewebe präpariert. Dann wurde der Embryo an Kopf und Schwanz auf einem Präparationsbrett fixiert und zunächst ein Vorderbein zur Isolierung von DNA für die Genotypisierung (siehe 3.1.1.2.1) entfernt. Dann wurde die Bauchhaut des Embryos eröffnet, mit einer Pinzette die fötale Leber entnommen und in 5ml PBS auf Eis bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Nach erfolgter Genotypisierung wurden die Lebern entsprechend ihres Genotyps (*Wnt5a^{+/+}* oder *Wnt5a^{-/-}*) gepoolt und mit 10ml PBS/0,1% BSA durch ein Zellsieb (40µm Porengröße) gedrückt. Anschließend wurden die Zellen 7min (300xg, 4°C) pelletiert und vorsichtig in 1ml PBS/0,1% BSA resuspendiert. Dann wurden sie mittels Trypanblau auf ihre Viabilität geprüft und bis zur Injektion ständig auf Eis gelagert.

Die zu transplantierenden 12-15 Wochen alten *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse, die einen Tag vor der Transplantation mit einer letalen Dosis (10Gy) im Universitätsklinikum Göttingen, Abteilung Radiologie bestrahlt worden waren, wurden etwa 5min vor Transplantation unter eine Rotlicht-Wärmelampe gesetzt und anschließend in einer Plexiglasröhre fixiert. Dann wurden den bestrahlten Mäusen 2×10^6 fötale Leberzellen in 200µl sterilem PBS i.v. gespritzt, wobei ein Kontrolltier kein Transplantat erhielt.

3.4.7 Präparation von Tumoren und Geweben

Nach zervikaler Dislokation wurde die Maus auf dem Präparationsbrett fixiert und mit 70% Ethanol desinfiziert. Dann wurde das Abdomen entlang der Mittellinie eröffnet, die Bauchaorta freigelegt und durchtrennt, um das Tier ausbluten zu lassen.

Die Isolierung der Schwanzhaut erfolgte mit einem Skalpell, indem sie längs mit zwei sich gegenüberliegenden Schnitten aufgeschnitten wurde. Die eine Hälfte der Schwanzhaut wurde vorsichtig vom subkutanen Binde- und Stützgewebe abgetragen und für weitere Analysen bei -80°C gelagert. Die andere Hälfte der Haut wurde am Knochen belassen und auf diese Weise für 2 Wochen in 4%iger PFA-Lösung für histologische Analysen fixiert.

Die histologische Abklärung aller Tumoren erfolgte anhand von HE-gefärbten Gewebeschnitten durch den erfahrenen Neuropathologen der Universitätsklinik Göttingen, PD. Dr. W. Schulz-Schaeffer.

3.4.8 Statistische Auswertungsverfahren

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe der Software Statistica und dem Microsoft-Programm Excel. Die Graphiken wurden in Box-Whisker-Plots dargestellt, um Streuung und Spannweite einer Verteilung inklusive möglicher Ausreißer in einem Bild zusammenzufassen. Die Box umfasst die mittleren 50% der Verteilung und der Median der Einzelwerte wird durch einen horizontalen Strich an entsprechender Stelle in der Box dargestellt. Die Signifikanz von Unterschieden und Gleichheit einzelner Gruppen wurde durch einen t-Test für unabhängige Gruppen (Mann-Whitney-U-Test) ermittelt. Hierbei werden Unterschiede mit p-Werten von $p < 0,05$ als signifikant und $p > 0,05$ als nicht-signifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Funktion von *Wnt5a* in der BCC-Zelllinie ASZ001 und BCC-tragenden Hautstanzen

In unserer Arbeitsgruppe waren bereits vor Beginn dieser Doktorarbeit murine Basalzellkarzinome intensiv analysiert worden. Auch gab es bereits Vorarbeiten zur Rolle von *Wnt5a* bei der Regression dieser Tumorentität. Wie bereits ausführlich beschrieben, war bekannt, dass die Regressionsvorgänge mit einer *Wnt5a* Expression im Tumorstroma einhergehen (siehe Einleitung und (Nitzki, F *et al.* 2010)).

Gleichzeitig werden Differenzierungsmarker der Haut (*K1* und *K10*) überexprimiert.

Weiterhin gab es Hinweise, dass der *Wnt/Ca²⁺* Signalweg, nicht aber der *Wnt/β-Catenin* oder *Wnt/JNK* Signalweg, eine Rolle bei der Regression von BCC spielt.

Diese Tatsachen legen die Vermutung nahe, dass *Wnt5a* im BCC direkt die *Wnt/Ca²⁺* Signalkaskade aktiviert und über die Induktion von Differenzierungsmarkern mit der Regression der Tumoren in Verbindung stehen könnte.

Um diese Hypothesen und Ergebnisse zu verifizieren, wurden Untersuchungen an der BCC-Zelllinie ASZ001 und an BCC-tragenden Hautstanzen durchgeführt.

Zunächst wurde jedoch untersucht, welche stromale Zellpopulation für die *Wnt5a* Expression im BCC verantwortlich sein könnte.

4.1.1 ASZ001 induzieren die Expression von *Wnt5a* in kokultivierten Makrophagen

Aus der Literatur von anderen Tumorentitäten war bekannt, dass die *Wnt5a* Expression in tumorassoziierten Makrophagen (TAM, engl. tumor-associated macrophages) induziert werden kann (Pukrop, T *et al.* 2006). Da aber Fibroblasten ebenfalls zu Zellen des Tumorstromas gehören, wurden für den Versuch auch murine Fibroblasten untersucht. Beide Zellsubpopulationen wurden mit der BCC-Zelllinie ASZ001 kokultiviert. Nach einer Kokultivierung von 72h wurde die *Wnt5a* Expression in beiden Zelltypen mittels qRT-PCR analysiert. Außerdem wurden die Makrophagen bzw. Fibroblasten ohne Tumorzellen für 72h unter ansonsten gleichen Bedingungen kultiviert. Auf diese Kontrollen wurden die ermittelten Expressionsniveaus der stromalen Zellen nach Kokultur normalisiert. Wie in Abbildung 9 zu sehen, konnte die *Wnt5a* Expression tatsächlich in den Makrophagen induziert werden. Das *Wnt5a* Expressionslevel wurde dabei um das ca. 2-fache induziert. Ein solcher Anstieg konnte in den Fibroblasten nicht gemessen werden. Vielmehr nahm die *Wnt5a* Expression in diesen Zellen sogar ab.

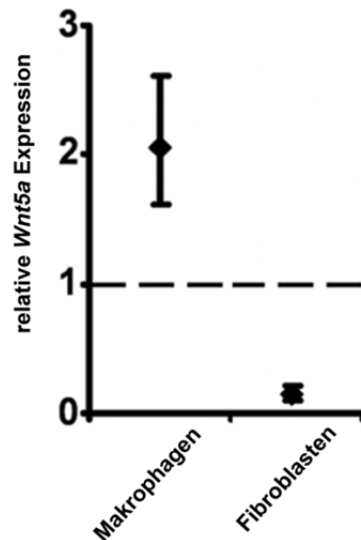


Abbildung 9: Analyse der *Wnt5a* Expression in Makrophagen und Fibroblasten nach Kokultivierung mit ASZ001. Die gezeigten Daten repräsentieren sechs (Makrophagen) und drei (Fibroblasten) unabhängige Experimente, die jeweils in Triplikaten vermessen wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- Konfidenzintervall) der Experimente in Relation zur *Wnt5a* Expression in den entsprechenden nicht-kokultivierten Zellen, deren Expression auf 1 gesetzt wurde (gestrichelte Linie).

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass eine *Wnt5a* Expression nur in Makrophagen nach Kokultivierung mit ASZ001 induziert werden konnte. In Fibroblasten war dies hingegen nicht der Fall.

4.1.2 *Wnt5a* hat keinen Einfluss auf den kanonischen Wnt Signalweg in ASZ001

Um zu untersuchen, ob *Wnt5a* den kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweg induzieren kann, wurden ASZ001 mit *SuperTOPFlash* (TOP hat 8 TCF/LEF-Bindestellen zur Aktivierung der Expression des Luciferasegens) oder *SuperFOPFlash* (FOP hat 8 mutierte TCF/LEF-Bindestellen) transfiziert, siehe Kapitel 3.3.1. Die Kotransfektion von pCI-neo-b-catS33Y (S33Y) diente in dem Experiment als Positivkontrolle, da das durch diesen Vektor exprimierte konstitutiv aktive β -Catenin zur Aktivierung des kanonischen Signalwegs führt. 24h vor Lyse der Zellen wurden die transfizierten Zellen mit 50ng/ml rWnt5a bzw. dem entsprechenden Volumen PBS (als Kontrolle) inkubiert. Dann wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Luciferase-Werte nach Transfektion des TOP-Vektors wurden =1 gesetzt. Die anderen Werte wurden auf diesen Wert normalisiert.

In der Abbildung 10 ist erkennbar, dass die Transfektion des TOP-Vektors und zusätzliche Kotransfektion von pCI-neo-b-catS33Y die Aktivierung des Luciferasegens induziert und zu einer fast 6-fachen Änderung der Luciferase-Aktivität führt. Damit zeigt das Ergebnis, dass der Assay generell sehr gut funktioniert. Die Inkubation mit rWnt5a führt zwar zu einer

leichten Induktion des TOP-Vektors im Vergleich zur Kontrolle, allerdings ist dieser Effekt nicht stärker als die Induktion des FOP-Vektors durch die aktive Form von β -catenin (S33Y). Diese Daten zeigen, dass Wnt5a keinen Einfluss auf den kanonischen Wnt Signalweg in ASZ001 Zellen hat.

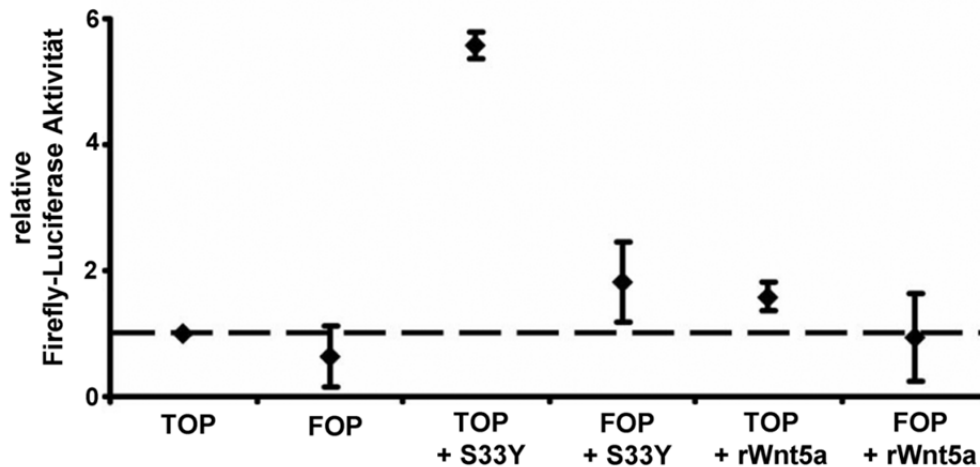


Abbildung 10: TOP/FOP Luciferase Reporter Assay in der BCC-Zelllinie ASZ001 nach Inkubation mit Wnt5a. Die gezeigten Daten repräsentieren jeweils vier unabhängige Experimente, die in Duplikaten vermessen wurden und als Änderung der Luciferase-Aktivität dargestellt sind. Die Luciferaseaktivität der TOP Kontrolle (transfiziert mit *SuperTOPFlash*) wurde auf 1 gesetzt (gestrichelte Linie). Die Luciferaseaktivität aller weiteren Transfektionen ist relativ zu diesem Wert dargestellt. Abkürzungen: FOP, Transfektion mit *SuperFOPFlash*; S33Y, Transfektion mit pCI-neo-b-catS33Y. Auf die Inkubation der Zellen mit rWnt5a wird entsprechend hingewiesen.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass Wnt5a den kanonischen Wnt Signalweg in ASZ001 nicht induzieren kann.

4.1.3 Wnt5a induziert die *K10* Expression in ASZ001

Um zu untersuchen, ob Wnt5a tatsächlich in der Lage ist, die *K1* oder *K10* Expression in BCC-Zellen zu beeinflussen, wurden ASZ001 mit rWnt5a (50ng/ml) oder mit Wnt5a-CM (konditioniertes Medium aus *Wnt5a*-exprimierenden Fibroblasten, siehe Kapitel 3.2.3) für 24h inkubiert. Zudem wurden die ASZ001 mit Makrophagen kokultiviert, da Makrophagen unter diesen Bedingungen *Wnt5a* exprimieren (siehe Kapitel 3.2.1.1). Im Anschluss wurde die Expression der beiden Differenzierungsmarker *K1* und *K10* mittels qRT-PCR in den ASZ001 gemessen und die Expression jeweils auf die Expressionsniveaus der mit PBS oder konditioniertem Medium aus Kontrollzellen behandelten Ansätze normalisiert. Da *K1* in den ASZ001 weder exprimiert noch nach Inkubation mit Wnt5a reguliert wurde, sind die Daten hier nicht gezeigt. Interessanterweise wurde jedoch die Expression von *K10* durch Inkubation mit rWnt5a etwa 3-fach und durch Wnt5a-CM 2-fach induziert. Auch nach Kokultivierung mit

Wnt5a-exprimierenden Makrophagen wurde eine ca. 3-fache Induktion der *K10* Expression gemessen (Abbildung 11).

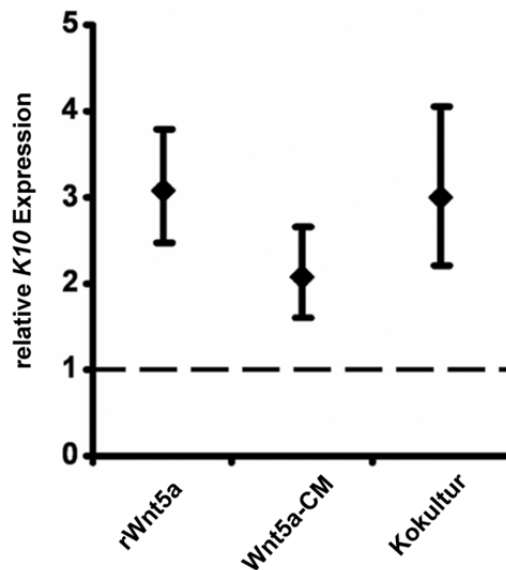


Abbildung 11: *K10* Expression in ASZ001 nach Inkubation mit *Wnt5a* oder Kokultur mit *Wnt5a*-exprimierenden Makrophagen. Gezeigt ist die *K10* Expression in der BCC-Zelllinie ASZ001 nach Inkubation mit rekombinatem *Wnt5a* (rWnt5a), *Wnt5a*-konditioniertem Medium (Wnt5a-CM) oder nach Kokultivierung mit Peritonealmakrophagen (Kokultur). Dargestellt sind die Mittelwerte (+/-Konfidenzintervall) in Relation zur *K10* Expression von unbehandelten Makrophagen, deren Expression auf 1 gesetzt wurde (gestrichelte Linie). Die gezeigten Daten repräsentieren die Ergebnisse von neun (rWnt5a), drei (Wnt5a-CM) bzw. zwei (Kokultur) unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten vermessen wurden.

Diese Daten belegen, dass *Wnt5a* die *K10* Expression in BCC-Zellen induzieren kann.

4.1.4 *Wnt5a* und Aktivierung des *Wnt/Ca*²⁺ Signalwegs induziert die *K10* Expression in BCC in Zellkultur

Da die Differenzierung von epidermalen Zellen *Ca*²⁺ abhängig verläuft (Hennings, H *et al.* 1980) wurde nun untersucht, ob die *Wnt5a*-induzierte *K10* Expression in BCC-Zellen durch den *Ca*²⁺-abhängigen *Wnt* Signalweg vermittelt wird.

Wie andere Mitglieder unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, ließ sich die *Wnt5a*-induzierte *K10* Expression durch KN-93, nicht aber durch Dkk-1, BIM (ein spezifischer Inhibitor der PKC) oder SP600125 (ein spezifischer Inhibitor der JNK) hemmen (Nitzki, F *et al.* 2010). Dies zeigt, dass die *Wnt5a*-vermittelte *K10* Induktion in den ASZ001 über den *Ca*²⁺-abhängigen *Wnt* Signalweg in Abhängigkeit der CaMKII induziert wird.

4.1.4.1 Einfluss der CaMKII auf die *K10* Expression in ASZ001

Die Abhängigkeit der *K10* Expression von der CaMKII wurde nochmals mit Hilfe eines Transfektionsexperiments von ASZ001 verifiziert.

Hierzu wurden die Zellen mit CaMKII-T286D-CS2 (konstitutiv aktive CaMKII) und mit einem Kinase-inaktiven Plasmid (CaMKII-K42M1-271-CS2) transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Proben hinsichtlich ihrer *K10* Expression mittels qRT-PCR analysiert. Die Daten wurden auf ermittelte Werte nach Transfektion mit dem Kontrollvektor pcS2 normalisiert. Wie man der Abbildung 12 entnehmen kann, stieg die *K10* Expression durch die Expression von konstitutiv aktiver CaMKII im Vergleich zu inaktiver CaMKII in ASZ001 fast 3,5-fach an.

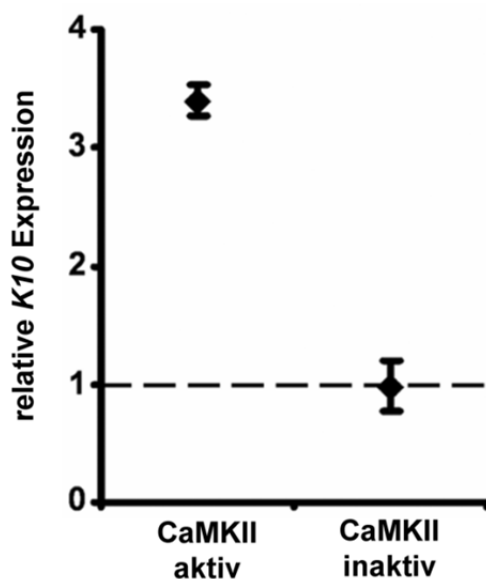


Abbildung 12: Einfluss der CaMKII auf die *K10* Expression in ASZ001. Gezeigt ist die *K10* Expression in der BCC-Zelllinie ASZ001 nach Transfektion mit CaMKII-T286D-CS2 (aktive CaMKII) oder CaMKII-K42M1-271-CS2 (inaktive CaMKII). Dargestellt sind die Mittelwerte (+/-Konfidenzintervall) in Relation zur *K10* Expression von mit pcS2 (Kontrollvektor) transfizierten ASZ001, deren Expression auf 1 gesetzt wurde (gestrichelte Linie). Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten, vermessen in Duplikaten.

Zusammengefasst lassen die Daten darauf schließen, dass die Wnt5a-vermittelte *K10* Expression in der BCC-Zelllinie ASZ001 über den Ca^{2+} -abhängigen Wnt Signalweg in Abhängigkeit von der CaMKII induziert wird.

4.1.4.2 Einfluss von Wnt5a und dem CaMKII Inhibitor KN-93 auf die *K10* Expression in BCC-tragenden Hautstanzen

Um die oben beschriebene Abhängigkeit der *K10* Expression von Wnt5a und CaMKII zu bestätigen, wurden Hautstanzen von BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen oder von tumorlosen *Ptch^{flox/flox}* Mäusen für sieben Tage in der Zellkultur kultiviert. Das Kulturmedium wurde entweder mit rekombinantem Wnt5a (50ng/ml) oder mit dem CaMKII-Inhibitor KN-93

(20 $\mu\text{mol/l}$) supplementiert. Ein etwaiger Einfluss der Substanzen bzw. ihrer Lösungsmittel auf Normalhaut konnte durch histologische Analyse der HE-Schnitte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). In den BCC-tragenden Hautstanzen konnte gezeigt werden, dass die Inkubation mit rWnt5a im Gegensatz zur Lösungsmittelkontrolle zu einer etwa 7-fachen Erhöhung der *K10* Expression führt (Abbildung 13). Dagegen wird die *K10* Expression durch den CaMKII-Inhibitor KN-93 um das etwa 0,05-fache im Vergleich zu den Lösungsmittelkontrollen inhibiert.

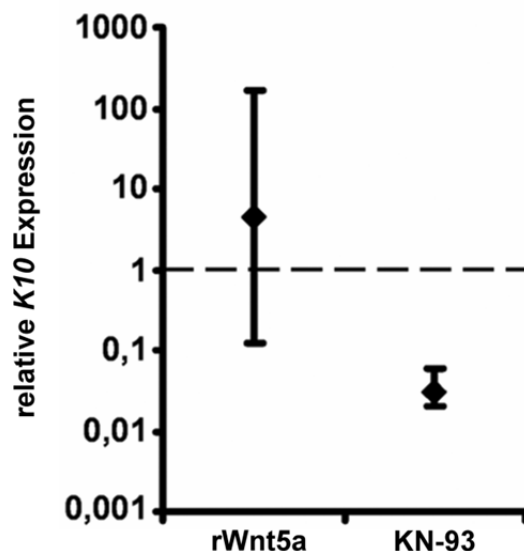


Abbildung 13: Einfluss von Wnt5a oder KN-93 auf die *K10* Expression in BCC-tragenden Hautstanzen. Die Hautstanzen wurden entweder mit rWnt5a oder dem CaMKII-Inhibitor KN-93 für sieben Tage inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/-Konfidenzintervall) in Relation zur *K10* Expression von Lösungsmittel-behandelten Stanzen, deren Expression auf 1 gesetzt wurde (gestrichelte Linie). Die Daten repräsentieren die Ergebnisse von drei und sechs unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten analysiert wurden.

Zusammengefasst bestätigen diese Daten, dass KN-93 die *K10* Expression inhibiert und Wnt5a die *K10* Expression induziert.

4.1.5 Wnt5a oder CaMKII Inhibitor KN-93 haben keinen Einfluss auf die BCC Proliferation in BCC-tragenden Hautstanzen

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, ob die Differenzierung (sprich *K10* Expression) direkt mit einer Proliferationshemmung der BCC in Verbindung steht, wurden die Hautstanzen histologisch begutachtet und mit dem Proliferationsmarker Ki67 gefärbt.

Wie man der Abbildung 14 entnehmen kann, konnten keine eindeutigen Unterschiede hinsichtlich der Tumorgröße in den mit Wnt5a, KN-93 oder Lösungsmittel-behandelten Hautstanzen festgestellt werden.

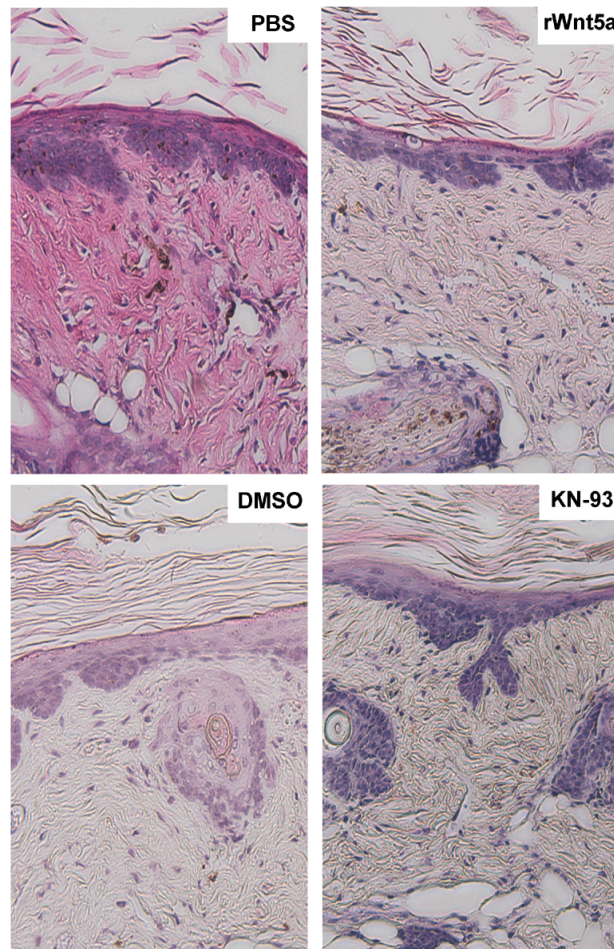


Abbildung 14: Tumorgröße von mit Wnt5a, KN-93 oder Lösungsmittel behandelten BCC-tragenden Hautstanzen. Gezeigt sind die HE-gefärbten Schnitte von repräsentativen Hautstanzen, die für sieben Tage mit rWnt5a, dem Lösungsmittel PBS, dem CaMKII-Inhibitor KN-93 oder dem Lösungsmittel DMSO inkubiert wurden. Die Aufnahme der Fotos erfolgte bei 200facher Vergrößerung.

Eine immunhistochemische Färbung für den Proliferationsmarker Ki67 ist für repräsentative Hautstanzen in Abbildung 15 gezeigt. Eine Quantifizierung des Anteils Ki67 positiver Zellen war aufgrund der zu kleinen Stanzen nicht möglich. Durch intensives Vergleichen der Färbungen wurde subjektiv festgelegt, dass sich die Proliferationsrate nach Inkubation der Gewebestücke mit den Substanzen eher nicht unterscheidet.

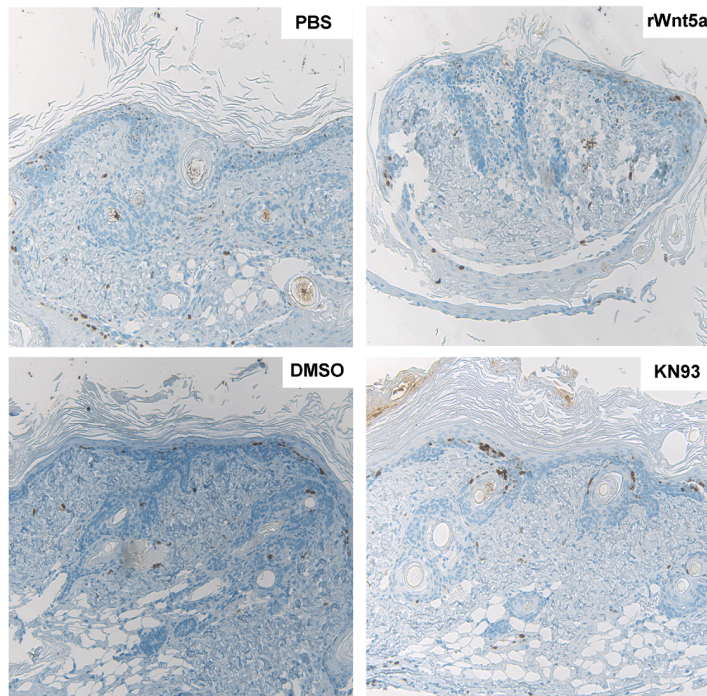


Abbildung 15: Ki67 Expression in BCC-tragenden Hautstanzen nach Behandlung mit Wnt5a, KN-93 oder Lösungsmittel. Gezeigt sind immunhistochemische Färbungen für den Proliferationsmarker Ki67 an Hautstanzen, die für sieben Tage mit rWnt5a, dem Lösungsmittel PBS, dem CaMKII-Inhibitor KN-93 oder dem Lösungsmittel DMSO inkubiert wurden. Die Aufnahmen sind bei 100facher Vergrößerung gemacht worden.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Hemmung der *K10* Expression in den Hautstanzen nicht direkt mit einer Proliferationshemmung assoziiert ist und auch in keiner eindeutigen Änderung der Tumorgöße resultiert.

4.1.6 Bedeutung anderer Komponenten des Wnt Signalwegs im BCC

Weiterhin wurden mit Hilfe von RT Profiler PCR Arrays noch weitere Gene des Wnt Signalwegs identifiziert, die in vollentwickelten und regredienten BCC reguliert zu sein scheinen (für die qRT-PCR Analysen wurde die Genexpression von normaler Haut mit derjenigen von vollentwickelten und regredienten BCC miteinander verglichen). Allerdings steht die Validierung der Array-Ergebnisse für viele der Gene noch aus. Für Wnt5a entsprach das ermittelte Genexpressionsmuster jedoch den bereits mehrfach gezeigten Ergebnissen: So konnte auch in der Arrayanalyse gezeigt werden, dass die *Wnt5a* Expression in den vollentwickelten Tumoren gegenüber der normalen Haut stark ansteigt und auch in den regredienten Stadien erhalten bleibt.

Ein weiteres interessantes und etwas näher untersuchtes Gen, das bei den Arrayanalysen entdeckt wurde, ist der „Wnt inhibitory factor 1“ *Wif1*. *Wif1* interagiert mit Wnt Liganden und blockiert sie dadurch (Hsieh, JC *et al.* 1999). Allerdings ist bislang unbekannt, ob *Wif1* die Inhibierung über den kanonischen oder einen der nichtkanonischen Wnt Signalwege

vermittelt. Ebenso wie für *Wnt5a* wird auch die Rolle von *Wif1* beim Tumorwachstum kontrovers diskutiert. So wird zum einen berichtet, dass *Wif1* in malignen Tumoren wie dem Glioblastom nicht exprimiert wird (Lambiv, WL *et al.* ; Wissmann, C *et al.* 2003) und im Melanom epigenetisch abgeschaltet ist (Lin, YC *et al.* 2007). Andere Studien zeigen dagegen, dass *Wif1* in intestinalen Adenomen und beim Kolonkarzinom überexprimiert ist (Cebrat, M *et al.* 2004).

In den qRT-Profiler Analysen von BCC-Proben schien *Wif1* in den vollentwickelten Tumorstadien im Vergleich zur Normalhaut etwa 20-fach überexprimiert zu sein. Obwohl die Expression in regredienten Tumoren abnahm, war sie jedoch gegenüber der normalen Haut immer noch stark erhöht (Daten nicht gezeigt).

Mittels *in situ*-Hybridisierungen konnte daraufhin gezeigt werden, dass sich die Lokalisation der *Wif1* Expression im Laufe der BCC-Entwicklung verändert. So scheint *Wif1* in vollentwickelten BCC tumorintrinsic exprimiert zu werden. Hingegen wird *Wif1* bei Regression der Tumoren im Stroma exprimiert (siehe Abbildung 16). Möglicherweise wird auch *Wif1* - ähnlich wie *Wnt5a* - in den regredienten Tumoren in tumorassoziierten Makrophagen exprimiert. Allerdings zeigen die *Wif1* exprimierenden Stromazellen keine Makrophagen-ähnliche Morphologie.

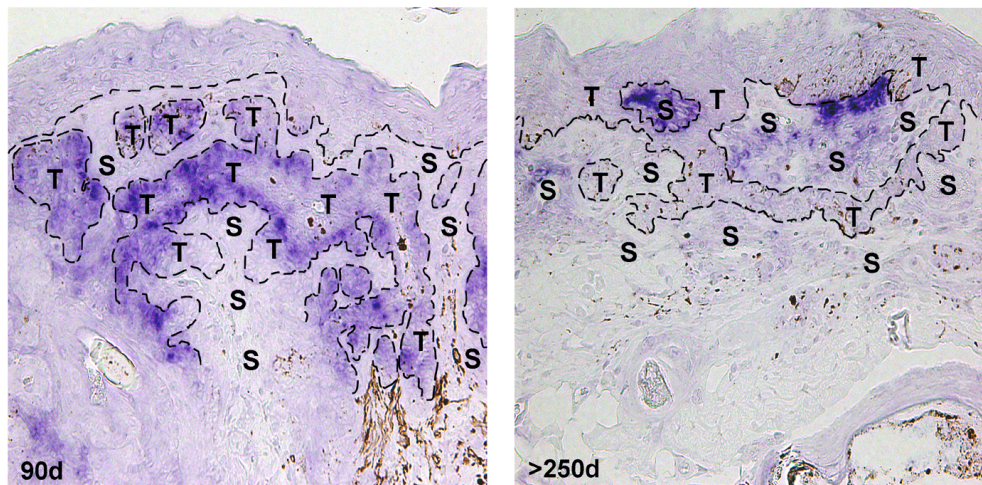


Abbildung 16: Lokalisation der *Wif1* Expression verändert sich mit dem Zeitpunkt nach BCC-Induktion. Gezeigt sind *in situ*-Hybridisierungen für *Wif1* an einem vollentwickelten (90d) sowie regredienten (>250d) BCC von *Ptch^{fllox/fllox}ERT2^{+/-}* Mäusen. Die gestrichelte Linie grenzt den Tumor (T) vom Stroma (S) ab, die Aufnahmen entsprechen einer 200fachen Vergrößerung.

Da sich das Expressionsmuster von *Wif1* in vollentwickelten und regredienten BCC so stark unterscheidet, ist die Vermutung naheliegend, dass *Wif1* in diesen BCC-Stadien eine völlig unterschiedliche Funktion hat. Es wäre denkbar, dass stromales *Wif1* in regredienten BCC möglicherweise Wnt Liganden inhibiert und dadurch das Wnt Signaling im Tumor unterbindet. Die Funktion von *Wif1* und seine Rolle bei Progression bzw. Regression des BCC soll daher in kommenden Folgearbeiten näher charakterisiert werden.

4.2 Untersuchung der Effekte von Ca²⁺ und *Wnt5a* Überexpression auf BCC im Mausmodell

4.2.1 Das Calcium-Ionophor Ionomycin induziert die BCC-Differenzierung im Mausmodell

Aus den im vorigen Abschnitt beschriebenen Zellkulturexperimenten geht hervor, dass die *Wnt5a*-vermittelte *K10* Induktion in ASZ001 über den Ca²⁺-abhängigen Wnt Signalweg erfolgen könnte. Da dieses Erkenntnis nur auf *in vitro* Analysen basiert wurde daraufhin untersucht, ob *Wnt5a* auch *in vivo* eine Differenzierung der BCC hervorrufen kann. Auch sollte untersucht werden, ob die Differenzierung direkt mit antiproliferativen Vorgängen in Verbindung stehen könnte.

Da man davon ausgehen kann, dass eine Behandlung mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin zur Ca²⁺ Erhöhung in der Haut führt (Perchellet, EM *et al.* 1990), wurden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse in unterschiedlichen BCC-Stadien mit einer 0,2µM Ionomycinlösung (gelöst in Aceton) behandelt. Kontrollen wurde nur das Lösungsmittel appliziert. Die Behandlung der Tiere erfolgte 5x wöchentlich an drei Kohorten. Dazu wurde entweder unmittelbar (Kohorte 1), 15 Tage (Kohorte 2) oder 45 Tage (Kohorte 3) nach BCC-Induktion durch Tamoxifen (siehe Einleitung) mit der Ionomycin-Applikation begonnen. Die Behandlung endete am Tag 90 nach der Tumorinduktion. Die Kontrolltiere erhielten über denselben Zeitraum das Lösungsmittel Aceton.

Alle Tumoren wurden nun histologisch und molekularbiologisch untersucht.

4.2.1.1 Ionomycin hat keinen Einfluss auf die Tumorgroße

Die Tumorgroße der BCC wurde an HE-Färbungen von Paraffinschnitten mittels der Software cell^F bestimmt. Die Abbildung 17 zeigt, dass sich die Tumorgroße zwischen Lösungsmittel-/ und Ionomycin-behandelten Tieren in allen drei Kohorten nicht signifikant voneinander unterscheidet.

Somit hat Ionomycin offenbar keinen direkten Einfluss auf die Tumorgroße.



Abbildung 17: Tumorfläche nach Behandlung der Haut mit Ionomycin. BCC-tragende *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse wurden mit 0,2µM Ionomycin bzw. dem Lösungsmittel Aceton behandelt. Die Tumorfläche wurde mittels der cell^F Software berechnet und ist in mm² angegeben. Kohorte 1: Behandlungsbeginn unmittelbar nach BCC-Induktion (Ionomycin n=5; Lösungsmittel n=4); Kohorte 2: Behandlungsbeginn 15 Tage nach BCC-Induktion (Ionomycin n=9; Lösungsmittel n=8) oder Kohorte 3: Behandlungsbeginn 45 Tage nach BCC-Induktion (Ionomycin n=8; Lösungsmittel n=8). Alle Tumoren wurden am Tag 90 nach Tumorinduktion untersucht. Dargestellt sind die analysierten Tumoreinzelwerte und der errechnete Median (—). * signifikant (p<0,05 im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

4.2.1.2 Keine eindeutige Verringerung proliferierender BCC-Zellen durch Ionomycin

Zur Bestimmung der Proliferation wurde mittels immunhistologischer Antikörperfärbung die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 quantifiziert. Abbildung 18 zeigt, dass der Proliferationsindex der mit Ionomycin-behandelten Tumoren in Kohorte 1 und Kohorte 3 niedriger ist als der der Lösungsmittel-behandelten BCC. Für die Kohorte 3 ist dieser Effekt sogar signifikant. In der Kohorte 2 konnte keine Änderung des Anteils Ki67 positiver Zellen festgestellt werden.

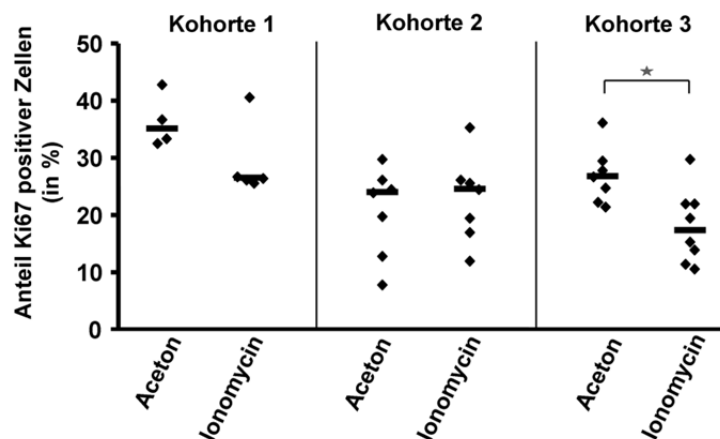


Abbildung 18: Darstellung des Proliferationsindex nach Ionomycin-Applikation. BCC-tragende *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse wurden mit 0,2µM Ionomycin bzw. dem Lösungsmittel Aceton behandelt. Gezeigt ist der prozentuale Anteil Ki67 positiver Tumorzellen für die drei Kohorten (siehe Text). Alle BCC wurden am Tag 90 nach Tumorinduktion untersucht. Dargestellt sind die analysierten Tumoreinzelwerte und der errechnete Median (—). * signifikant (p<0,05 im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Ionomycin die BCC-Proliferation bzw. die Zahl Ki67 positiver Zellen in BCC tendenziell verringert, wobei die Ergebnisse jedoch nur teilweise signifikant sind.

4.2.1.3 Ionomycin induziert die Expression von Differenzierungsmarkern in BCC

Eine potentielle Induktion von Differenzierungsmarkern durch Ionomycin wurde in BCC der Kohorte 1 analysiert. Diese Kohorte war am längsten mit Ionomycin behandelt worden, da die Applikation unmittelbar nach Tumorinduktion begonnen und für 90 Tage fortgeführt wurde.

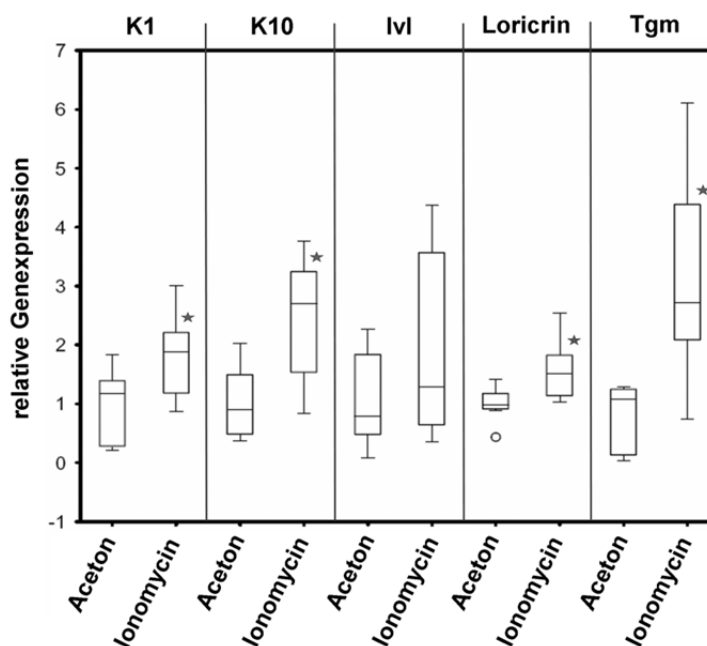


Abbildung 19: Expression von Differenzierungsmarkern in BCC-tragender Haut nach Ionomycin-Applikation. Untersucht wurde die Expression in Ionomycin (n=5) und Lösungsmittel behandelten (n=4) BCC-Proben der Kohorte 1 mittels qRT-PCR. Die genspezifische Expression wurde zunächst auf die Expression von 18sRNA normalisiert. Die Messung pro Einzelprobe erfolgte in Triplikaten. Alle Messungen sind als Box-Whisker-Plot und in Relation zur Lösungsmittel-Kontrolle, deren mittlere Expression auf 1 gesetzt wurde, dargestellt. * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle. Legende: ○ Ausreißer.

Es wurde sowohl die Expression der frühen Differenzierungsmarker *K1* und *K10*, als auch die der späten Differenzierungsmarker *Involucrin (Ivl)*, *Loricrin* und *Transglutaminase (Tgm)* untersucht. Wie die Abbildung 19 zeigt wird für alle getesteten Marker in den Ionomycin-behandelten Tumoren eine erhöhte Genexpression gemessen. Mit Ausnahme von *Involucrin* ist dieser Effekt signifikant.

Aus dieser Analyse geht eindeutig hervor, dass Ionomycin die Expression von Differenzierungsmarkern im BCC induzieren kann.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Ionomycin zur Expression von Differenzierungsmarkern im BCC führt. Wenn man davon ausgeht, dass die durch Ionomycin bedingten Effekte durch eine Ca^{2+} Erhöhung hervorgerufen werden, wird *K10* tatsächlich durch Ca^{2+} induziert. Dies würde auch die im Kapitel 4.1.4 aufgestellte Hypothese, dass *K10* durch den Wnt/ Ca^{2+} Signalweg induziert werden kann, unterstützen. Jedoch hat Ionomycin gleichzeitig keinen direkten Einfluss auf Größe und Proliferation der Tumoren. Daher zeigen diese Daten, dass Differenzierungsvorgänge eher nicht in die Regression des BCC involviert sind.

4.2.2 Einfluss einer *Wnt5a* Überexpression auf BCC: Vorarbeiten

Um den Einfluss von *Wnt5a* auf BCC im Mausmodell zu untersuchen, sollte *Wnt5a* durch Spritzen einer nackten Plasmid-DNA in der Haut überexprimiert werden. Die sich anschließenden Analysen in Hinblick auf Größe und Differenzierung der Tumoren können Aufschluss über die Rolle von *Wnt5a* bei der Regression von BCC geben.

Dass die Überexpression von nackter Plasmid-DNA *in vivo* möglich ist, konnte bereits vor über einem Jahrzehnt gezeigt werden (Hengge, UR *et al.* 1996). Zur Etablierung der Methode in unserem Labor wurde zunächst ein β Galaktosidase-kodierendes Plasmid in der Haut exprimiert. Um ein geeignetes Spritzschema zu etablieren, wurde den Mäusen subkutan 3x je 50 μg Plasmid (in 10 μl PBS; 1cm von der Schwanzwurzel entfernt) gespritzt. Den Kontrollen wurde das gleiche Volumen PBS injiziert. Zwischen den Injektionen wurde jeweils ein Tag pausiert. 24h bzw. sieben Tage nach der letzten Applikation wurde dann eine X-Gal-Färbung des behandelten Hautareals durchgeführt.

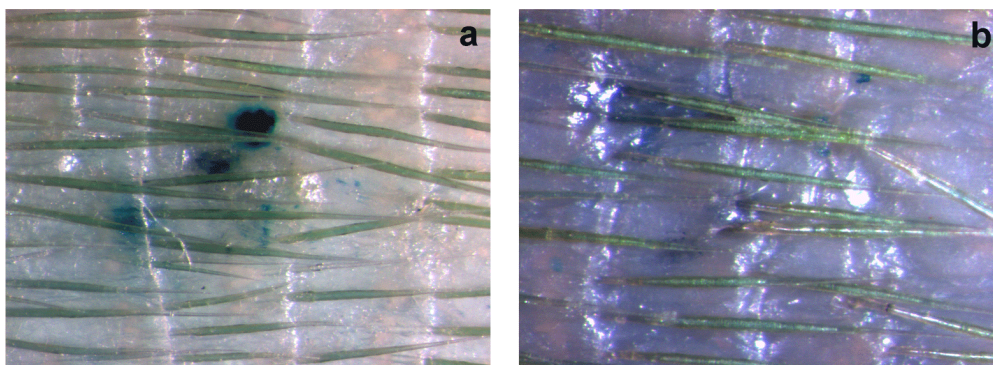


Abbildung 20: β Galaktosidase-Aktivität in Haut nach Injektion eines β Galaktosidase-exprimierenden Plasmids. Gezeigt ist die β Galaktosidase-Aktivität in Plasmid-gespritzter Schwanzhaut mittels X-Gal-Färbung. Den Mäusen wurde 3x je 50 μg Plasmid subkutan gespritzt und die Haut 24h (a) bzw. sieben Tage (b) nach der letzten Injektion isoliert. Die Aufnahme der Fotos erfolgte bei 10facher Vergrößerung.

Mittels X-Gal-Färbung war es möglich die Aktivität der β Galaktosidase im Gewebe sichtbar zu machen (Abbildung 20). Dazu wurde die Haut vier Tage in der Färbelösung inkubiert, PBS-gespritzte Kontrollen zeigten dagegen keinerlei Färbung (Daten nicht gezeigt).

Die β Galaktosidase-Aktivität war lediglich auf das Plasmid-gespritzte Areal limitiert. Die Abbildung 20 lässt vermuten, dass 24h nach der letzten Injektion eine etwas höhere β Galaktosidase-Aktivität vorliegen könnte (Abbildung 20, a).

Nach der Etablierung der Methode sollte dann versucht werden, *Wnt5a* in der Haut überzuexprimieren. Hierzu wurde zunächst das pWnt5a(murin)-pcDNA3 Plasmid eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass sich dieses Plasmid nicht in der Haut exprimieren ließ (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde ein neues *Wnt5a*-Expressionsplasmid (mWnt5a-Kozak-pcDNA3) kloniert. Dieses neue Plasmid enthielt zusätzlich eine Kozak-Konsensus-Sequenz, welche die Expression von cDNAs verbessern kann. Um mögliche weitere Fehlerquellen in den zukünftigen *in vivo* Versuchen auszuschließen, erfolgte die Sequenzierung des neuen Plasmids. Tatsächlich wurde dabei ein SNP entdeckt, der jedoch mit anschließender zielgerichteter Mutagenese (site-directed mutagenesis) wieder ausgetauscht wurde. Das Plasmid wurde dann in NIH3T3-Zellen exprimiert. Hierzu wurden 2 μ g des Plasmids bzw. des Kontrollvektors transfiziert. Die Isolierung der Zellen erfolgte 48h nach der Transfektion und die Proteinlysate wurden im Western Blot analysiert.

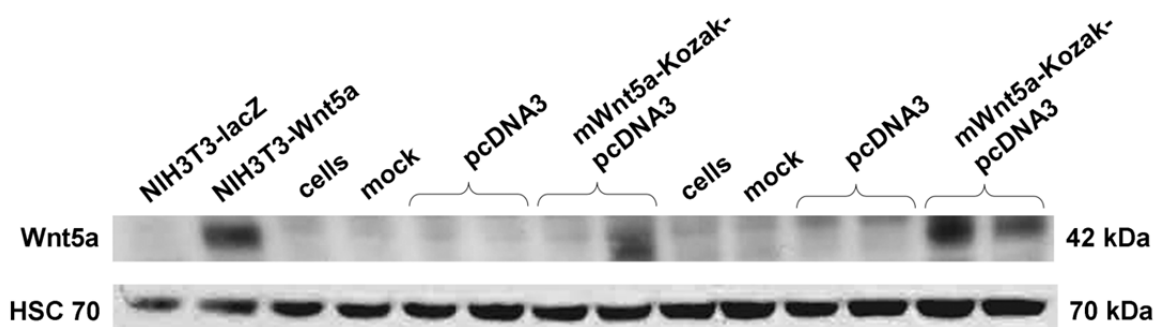


Abbildung 21: Analyse der *Wnt5a* Expression nach Transfektion des mWnt5a-Kozak-pcDNA3 Plasmids in NIH3T3-Zellen. Gezeigt ist die Proteinexpression von *Wnt5a* mittels Western Blot nach Transfektion von NIH3T3 mit 2 μ g *Wnt5a*-Expressionsplasmid (mWnt5a-Kozak-pcDNA3) bzw. dem entsprechenden Kontrollvektor (pcDNA3). Als Positivkontrolle wurden NIH3T3-*Wnt5a* und als Negativkontrolle NIH3T3-lacZ eingesetzt. Die Konzentration der aufgetragenen Proteinlysate betrug 18 μ g. Die Analyse von HSC70 (housekeeper) diente der Verifizierung gleicher Proteinmengen. Abkürzungen: cells, unbehandelte NIH3T3; mock, mit Transfektionsreagenz behandelte NIH3T3.

Der in Abbildung 21 dargestellte Western Blot zeigt, dass im Proteinlysat der NIH3T3-*Wnt5a* (Positivkontrolle) eindeutig *Wnt5a* überexprimiert wird. Weiterhin wird *Wnt5a* in den mit *Wnt5a*-Expressionsplasmid transfizierten Zellen exprimiert. In den entsprechenden Kontrolllysaten (pcDNA3) wird dagegen kein *Wnt5a*-Signal detektiert. In einem der vier analysierten Proteinlysate (mit *Wnt5a*-Expressionsplasmid transfizierte Zellen) kann keine *Wnt5a* Überexpression nachgewiesen werden, wobei dies jedoch mit mangelnder Transfektionseffizienz zusammenhängen könnte.

Aufgrund dieser Analysen kann das Expressionsplasmid mWnt5a-Kozak-pcDNA3 zukünftig in BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen zur Überexpression von Wnt5a *in vivo* genutzt werden. Leider war dies aufgrund von Zeitmangel im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich.

4.3 Untersuchung der Effekte einer verminderten *Wnt5a* Expression auf BCC im Mausmodell

Um den Einfluss von Wnt5a auf BCC *in vivo* zu untersuchen, wurde versucht die *Wnt5a* Expression im Mausmodell zu vermindern. Falls unsere Hypothese, dass Wnt5a im BCC als Tumorsuppressor agiert, zutreffen sollte, müssten BCC der Maus nach Verminderung der *Wnt5a* Expression ein verstärktes Wachstum zeigen. Um die *Wnt5a* Expression zu reduzieren, wurden drei verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Hierbei handelt es sich um das Einkreuzen von *Wnt5a* Knockout-Mäusen in das *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mausmodell als genetischer Ansatz, das Ersetzen von wildtypischen Makrophagen durch *Wnt5a*^{-/-} Makrophagen, und die Depletion von *Wnt5a*-exprimierenden Makrophagen durch eine systemische Gabe von Clodrolip.

4.3.1 Genetischer Ansatz zur Reduzierung der *Wnt5a* Expression im BCC-Mausmodell

Um die Expression von *Wnt5a in vivo* zu vermindern, wurden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse mit heterozygoten *Wnt5a^{+/-}* Knockout-Mäusen verpaart. Da *Wnt5a^{-/-}* Knockout-Mäuse perinatal sterben (Yamaguchi, TP *et al.* 1999), konnten nur *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* generiert werden. In den *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mäusen wurden dann mittels Tamoxifeninjektion BCC induziert. Als Kontrollen wurden BCC in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen induziert.

Die BCC wurden dann zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten nach Tumorinduktion analysiert: nach 45 Tagen (Kohorte1 *Wnt5a^{+/-}* n=11; *Wnt5a^{+/+}* n=10), nach 90 Tagen (Kohorte2 *Wnt5a^{+/-}* n=10; *Wnt5a^{+/+}* n=10) und nach 250 Tagen (Kohorte 3 *Wnt5a^{+/-}* n=10; *Wnt5a^{+/+}* n=12). Die entsprechenden Tumoren wurden hinsichtlich ihrer *Wnt5a* Expression sowie der generellen Tumorgroße analysiert. Darüber hinaus wurde die gesamte Haut auf etwaige hyperplastische Veränderungen untersucht.

4.3.1.1 Keine signifikante Reduzierung der *Wnt5a* Expression in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mäusen

Eine qRT-PCR Analyse zeigte, dass die *Wnt5a* Expression in den *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mäusen in allen drei untersuchten Kohorten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen aufwies (Abbildung 22).

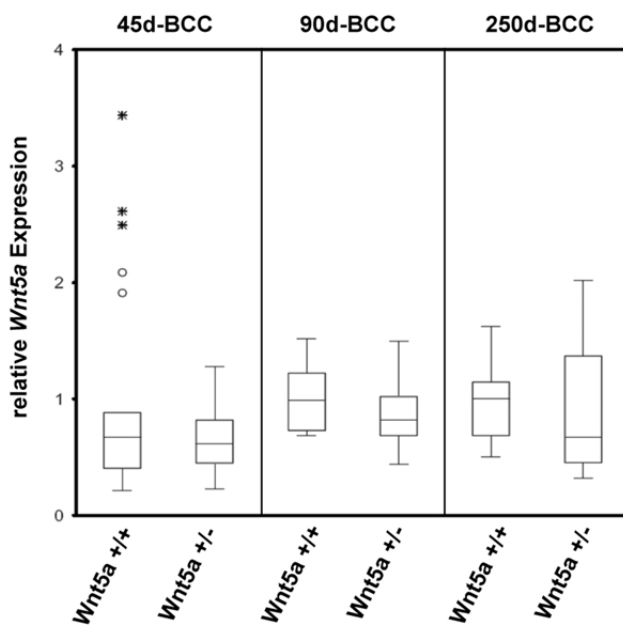


Abbildung 22: Analyse der *Wnt5a* Expression in verschiedenen BCC-Stadien in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* (*Wnt5a^{+/-}*) und *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* (*Wnt5a^{+/+}*) Mäusen. Die Genexpressionsanalyse wurde in drei verschiedenen BCC-Stadien (45, 90 und 250 Tage nach BCC Induktion) durchgeführt. Untersucht wurde die Expression in BCC von *Wnt5a^{+/+}* und *Wnt5a^{+/-}* Mäusen (Anzahl, siehe Text) mittels qRT-PCR. Die genspezifische Expression wurde zunächst auf die Expression von 18sRNA normalisiert. Die Messung pro Einzelprobe erfolgte in Triplikaten und alle Messungen sind als Box-Whisker-Plot und in Relation zur Kontrolle dargestellt. Abkürzungen/Legende: d, Tage; * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Kontrolle; o Ausreißer; * Extremwert.

4.3.1.2 Keine signifikante Veränderung der BCC-Größe in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mäusen

Wie der Abbildung 23 zu entnehmen ist, zeigt das Tumoreal in keiner der drei analysierten Kohorten einen signifikanten Unterschied zwischen *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* und *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen. Auch der Unterschied in Kohorte 1 (mittlere Tumorfäche in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen 64mm²; mittlere Tumorfäche in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mäusen 44mm²) ist nicht signifikant. Zudem wird deutlich, dass die berechnete Tumorfäche der vollentwickelten BCC (Kohorte 2, mittlere Tumorfäche etwa 86mm²) im Vergleich zu denen der regredienten BCC (Kohorte 3, mittlere Tumorfäche 30mm²) sehr groß ist. Da sich hierbei *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Kontrollmäuse nicht von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mäusen

unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass eine *Wnt5a* Heterozygotie keinen Einfluss auf die Regression von BCC hat

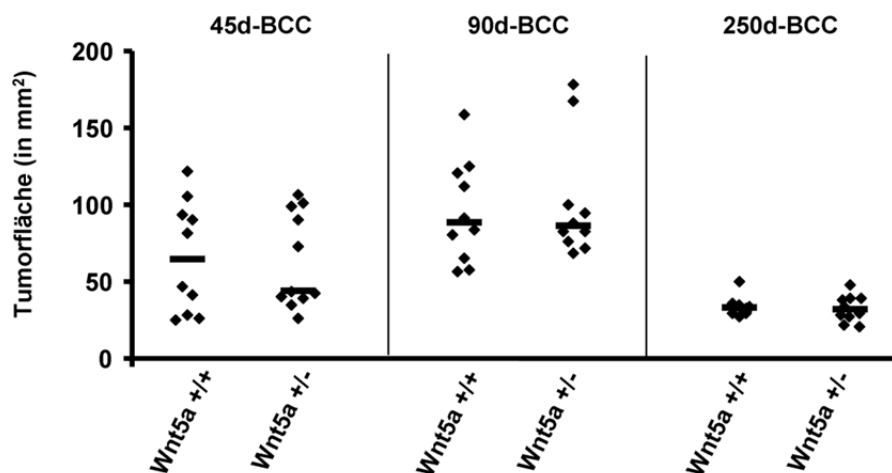


Abbildung 23: Vergleich der Tumorgöße zwischen *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-}*Wnt5a*^{+/-} (*Wnt5a*^{+/-}) und *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} (*Wnt5a*^{+/+}) Mäusen. Die Tumoren wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (45, 90 und 250 Tage nach BCC Induktion) analysiert. Dargestellt sind die ermittelten Tumoreinzelwerte (Anzahl analysierter BCC: Kohorte 1, n=21; Kohorte 2, n=20 und Kohorte 3, n=22) und ihr errechneter Median (—). * signifikant (p<0,05 im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Kontrolle.

Zusammengefasst zeigen die Daten, dass sich in keiner der drei analysierten Kohorten die Tumorgöße der *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-}*Wnt5a*^{+/-} Mäuse signifikant von der BCC-Größe der *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäuse unterscheidet.

4.3.1.3 Epidermale Hyperplasien in *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-}*Wnt5a*^{+/-} Mäusen

Eine der *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-}*Wnt5a*^{+/-} Mäuse der Kohorte 3 wurde drei Monate nach Tumorinduktion phänotypisch auffällig. So zeigte die Maus im Nacken blutig-schorfige Bereiche auf, die nicht abheilen, erhaben waren und sich vergrößerten. Das Tier wurde bis zum Abtöten regelmäßig observiert, zeigte jedoch keine weiteren Auffälligkeiten. 250 Tage nach Tumorinduktion wurden die auffälligen Hautareale histologisch analysiert.

Die Abbildung 24a zeigt den auffälligen Nackenbereich. In Abbildung 24b ist der entsprechende Nackenbereich im HE-gefärbten Paraffinschnitt gezeigt. Neben einer abnorm verdickten Epidermis weisen die Areale eine papillomartige Struktur auf. Es handelt sich jedoch weder um ein BCC noch um ein Plattenepithelkarzinom. Papillomartige Veränderungen wurden dagegen bei *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen nie beobachtet.

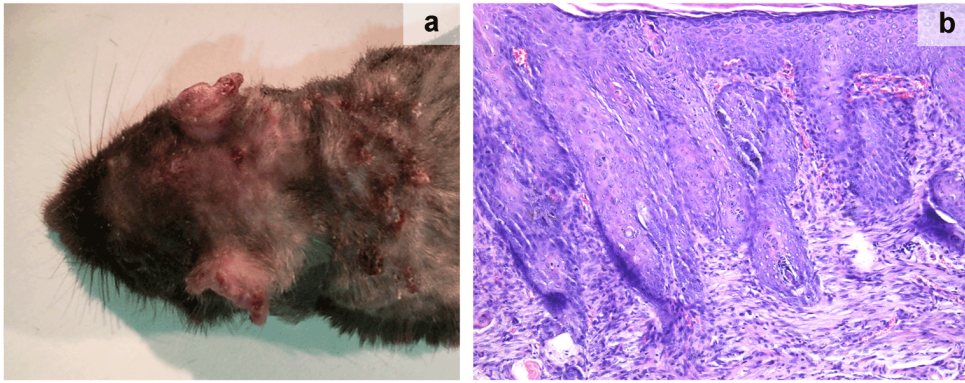


Abbildung 24: Papillomartige Veränderungen der Haut in einer $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}$ Maus. Dargestellt sind die phänotypische Erscheinung (a) sowie der HE-gefärbte Paraffinschnitt der Haut (b, 100fache Vergrößerung) einer $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}$ Maus 250 Tage nach Tumorinduktion.

Kleinere hyperproliferative Hautareale konnten jedoch sowohl in $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}$ Mäusen als auch in $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäusen der Kohorte 3 detektiert werden (Abbildung 25). Jedoch waren solche Hyperplasien in $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}$ Mäusen (3/11 Tiere) häufiger als in $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäusen (1/10 Tiere).

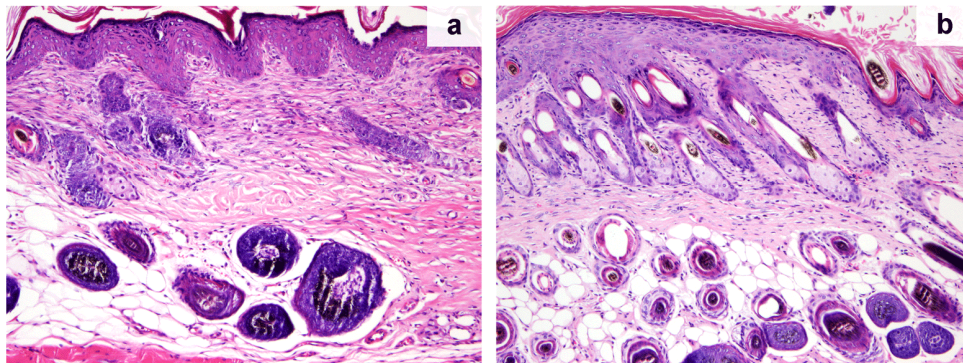


Abbildung 25: Hyperproliferative Bereiche behaarter Haut von $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}$ ($Wnt5a^{+/-}$) und $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ ($Wnt5a^{+/+}$) Mäusen. Dargestellt sind HE-gefärbte Paraffinschnitte von der Rückenhaut einer $Wnt5a^{+/-}$ Maus (a) und von der Nackenhaut einer $Wnt5a^{+/+}$ Maus (b) 250 Tage nach Tumorinduktion. Die Fotos wurden bei 100facher Vergrößerung aufgenommen.

4.3.2 Rekonstitution des Knochenmarks von $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäusen mit $Wnt5a$ -defizienten Zellen

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die spontane Regression der BCC mit der Induktion von $Wnt5a$ in Makrophagen assoziiert. Daher sollte in einem weiteren experimentellen Ansatz versucht werden, $Wnt5a$ -exprimierende Makrophagen durch $Wnt5a$ -defiziente zu ersetzen.

Dazu wurden $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäuse mit einer letalen Dosis bestrahlt. Am nächsten Tag wurden sie mit Leberzellen aus $Wnt5a$ -defizienten ($Wnt5a^{-/-}$) Embryonen transplantiert.

Kontrollen erhielten Leberzellen aus wildtypischen Embryonen (*Wnt5a*^{+/+}). Das genaue Vorgehen ist in Kapitel 3.4.6 beschrieben.

Nach mehreren vergeblichen Versuchen, konnten schließlich alle Mäuse erfolgreich transplantiert werden. Sechs Wochen nach der Transplantation der Leberzellen wurden die Tiere auf eine erfolgreiche Rekonstitution des Immunsystems untersucht. Dazu wurden B- und T-Zellen im Blut der Mäuse mittels FACS analysiert. Alle 14 bestrahlten bzw. transplantierten Mäuse haben innerhalb der sechs Wochen wieder ein intaktes Immunsystem mit normaler Lymphozytenanzahl aufgebaut (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurde das Blut und die DNA von Körperzellen (isoliert aus Schwanzbiopsien) der repopulierten *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäuse genotypisiert. Abbildung 37 zeigt exemplarisch für vier der Tiere die DNA-Analyse des Blutes und der Schwanzhaut hinsichtlich der Expression wichtiger Gene, die zum Nachweis der erfolgreichen Substitution des Knochenmarks bedeutsam sind.

Alle vier *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäuse zeigen bei der Analyse somatischer DNA die *Wnt5a* Wildtyp-Bande (Abbildung 26a, oben). Diese Wildtyp-Bande findet sich auch in der Analyse des Blutes für die Tiere #1 und #2, denen Leberzellen aus wildtypischen Embryonen injiziert wurden. Hingegen erhielten die Tiere #3 und #4 Leberzellen aus *Wnt5a*-defizienten Embryonen. Bei diesen Tieren wird in Blut-DNA tatsächlich das *Wnt5a* Knockout-Allel detektiert (Abbildung 26b, oben).

Die Analyse der DNA aus Schwanzhaut aller *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäuse zeigt, dass das *Ptch* Allel gefloxt ist und auch die Cre-Rekombinase vorhanden ist. Bei der Analyse des Blutes wird jedoch deutlich, dass die Tiere nach erfolgreicher Repopulation durch die fötalen Leberzellen (unabhängig vom Genotyp der transplantierten Zellen) wieder wildtypisch für *Ptch* sind. Abgesehen von Maus #2 kann bei den drei übrigen *Ptch*^{flox/flox}*ERT2*^{+/-} Mäusen nach der Repopulation keine Cre-Rekombinase im Blut mehr detektiert werden. Auch kann das gefloxtete *Ptch* Allel nicht mehr nachgewiesen werden. Maus #2 dagegen zeigt neben dem Wildtyp *Ptch* Allel auch das gefloxtete Allel. Weiterhin kann in dieser Maus auch die Cre-Rekombinase in der Blut-DNA nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass in diesem Tier das Knochenmark durch die Bestrahlung nicht vollständig eliminiert wurde. Ein solcher Chimärismus konnte bei 5/14 Mäusen nachgewiesen werden.

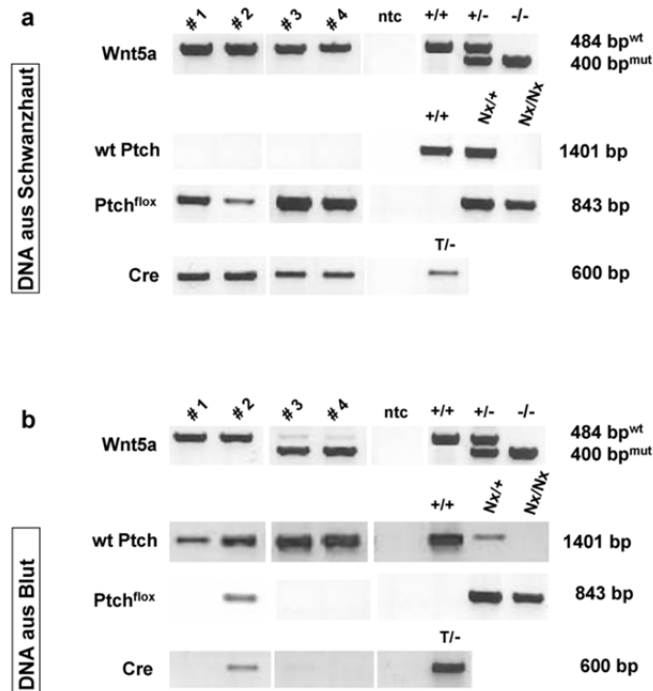


Abbildung 26: Analyse der Schwanzhaut und des Blutes von $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäusen nach Transplantation mit fötalen Leberzellen. Gezeigt sind RT-PCR-Analysen an DNA von Schwanzbiopsien und des Blutes von $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäusen nach erfolgreicher Repopulation des Knochenmarks durch Leberzellen aus wildtypischen Embryonen (Maus #1 und Maus #2) oder $Wnt5a$ -defizienten Leberzellen (Maus #3 und Maus #4). Die Analysen wurden sechs Wochen nach erfolgter Transplantation der fötalen Leberzellen durchgeführt. Abkürzungen: ntc, Negativkontrolle (engl. no template control).

Nach dieser Überprüfung wurde den Tieren Tamoxifen zur Induktion von BCC injiziert. Die Tumoren werden 90 Tage nach Tumorumgebung hinsichtlich ihrer Größe, Proliferation und des Differenzierungsstatus analysiert. Das Experiment konnte leider vor Abgabe dieser Doktorarbeit nicht abgeschlossen werden.

4.3.3 Applikation von Clodrolip zur Depletion von $Wnt5a$ -exprimierenden Makrophagen

Wie bereits mehrfach erwähnt, wird die Spontanregression der BCC in $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäusen mit der $Wnt5a$ Expression in Makrophagen in Verbindung gebracht. In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde daher versucht, diese $Wnt5a$ -exprimierenden Makrophagen im BCC-Stroma zu depletieren. Diese Depletion erfolgte durch Applikation von Clodrolip, das freundlicherweise von R. Schwendener (Institut für Molekulare Krebsforschung, Universität Zürich, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurde. Bei Clodrolip handelt es sich um in Liposomen-verpacktes Clodronat, ein Bisphosphonat. Bisphosphonate sind Medikamente, die normalerweise für diagnostische und therapeutische Zwecke bei Knochen- / sowie Calciumstoffwechselkrankheiten eingesetzt werden. Sie haben eine hohe Affinität zu anorganischen Calciumverbindungen, binden also an Knochensubstanz.

Bisphosphonate, wie Clodronat, werden in der Klinik gegen Knochenmetastasen und wegen der hohen Endocytosekapazität von Osteoklasten gegen Knochenresorption eingesetzt (Henneman, ZJ *et al.* 2008).

BCC wurden in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen durch Tamoxifengabe induziert. Am Tag 15 nach BCC-Induktion wurden die Tiere dann mit Clodrolip (n=7) bzw. Leerliposomen (n=4) behandelt. Die Applikation erfolgte jeden vierten Tag (erste Dosis 2mg/20g; folgende Dosen 1mg/20g – siehe auch Kapitel 3.4.5.4). Dieses Schema wurde gewählt, damit jegliche einsetzende *Wnt5a* Expression in der Haut von Beginn an verhindert wird. Durch *in situ*-Hybridisierungen in verschiedenen Tumorstadien war ja bekannt, dass in den Vorläuferläsionen (45 Tage nach Tumorinduktion) noch kein *Wnt5a* exprimiert wird. Somit wird durch die rechtzeitige Applikation von Clodrolip (also an Tag 15 nach Tumorinduktion) die mögliche *Wnt5a* Expression sogleich unterbunden. Die Behandlung endete nach 75 Tagen.

Auch wurden drei *Ptch^{flox/flox}* Mäuse ohne BCC mit Clodrolip behandelt, um einen Einfluss der Substanz auf Normalhaut zu überprüfen. Analysen von HE-gefärbten Hautschnitten der letzteren Tiere zeigten jedoch keine Auffälligkeiten.

4.3.3.1 Effiziente Depletion von Makrophagen in Milz und Haut durch Clodrolip

Nach 75tägiger Behandlung der *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse mit Clodrolip bzw. Leerliposomen (Kontrolle) wurde zunächst geprüft, ob die erstgenannte Substanz tatsächlich in einer Depletion der Makrophagen *in vivo* resultiert. Dazu wurde zunächst an den isolierten Milzen eine immunhistologische Antikörperfärbung gegen den Makrophagenmarker F4/80 durchgeführt. Die Milzen der Clodrolip-behandelten Mäuse wiesen deutlich weniger F4/80-positive Zellen auf (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurde die Expression von F4/80 als auch *Mac1* (ein weiterer Makrophagenmarker) mittels qRT-PCR untersucht. Wie man in Abbildung 27 sieht, ist sowohl die F4/80 als auch die *Mac1* Expression in der Milz nach Applikation von Clodrolip signifikant gegenüber der Leerliposomenkontrolle vermindert.

Ergebnisse

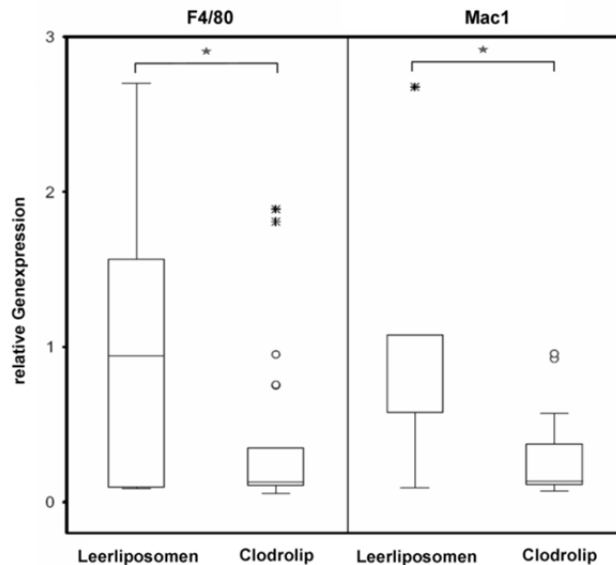


Abbildung 27: Genexpressionsanalyse von *F4/80* und *Mac1* in Milzen von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen nach 75tägiger Applikation von Clodrolip. Gezeigt ist die Genexpression der beiden Makrophagenmarker *F4/80* sowie *Mac1* in Milzen von mit Clodrolip-behandelten Mäusen. Jede Probe wurde in Triplikaten vermessen. Alle gemessenen Werte sind als Box-Whisker-Plot dargestellt und in Relation zur Leerliposomen-behandelten Kontrolle dargestellt. Legende: * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Kontrolle; ○ Ausreißer; * Extremwert.

Um zu untersuchen, ob die Clodrolipbehandlung auch in der Haut der BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse zur Makrophagendepletion führte, wurde die Expression der beiden Makrophagenmarker auch in der Schwanzhaut analysiert. Wie man Abbildung 28 entnehmen kann, ist sowohl die Expression von *F4/80* als auch von *Mac1* nach Clodrolipapplikation in der Haut signifikant reduziert.

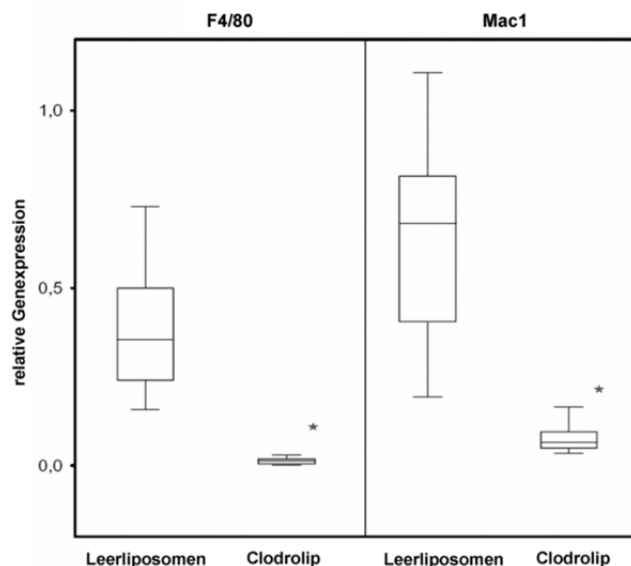


Abbildung 28: Genexpressionsanalyse von *F4/80* und *Mac1* in Haut von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen nach 75tägiger Applikation von Clodrolip. Gezeigt ist die Genexpression der beiden Makrophagenmarker *F4/80* sowie *Mac1* in Haut von mit Clodrolip-behandelten Mäusen. Jede Probe wurde in Triplikaten vermessen und alle gemessenen Werte sind dann als Box-Whisker-Plot dargestellt.* signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Kontrolle.

Die erfolgreiche Depletion von Makrophagen durch Clodrolip in Milz und Haut konnte auch über FACS-Analysen bestätigt werden. Wie man Tabelle 20 entnehmen kann, war der prozentuale Anteil an Mac1, F4/80 und Gr1-positiver Zellen in Relation zur Gesamtpopulation nach Applikation von Clodrolip in beiden Geweben deutlich reduziert.

Tabelle 20: FACS-Analysen der Milz- und Hautzellen von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen nach 75tägiger Applikation von Clodrolip. Gezeigt ist der prozentuale Anteil F4/80 positiver Zellen in Relation zur Gesamtpopulation in Milz und Haut sowie Gr1 positiver Zellen der Haut nach 75tägiger Applikation von Leerliposomen (Kontrolle) oder Clodrolip.

Leerliposomen	Milz	Haut	
	F4/80 (%)	Gr1 (%)	F4/80 (%)
Maus # 1	3,76	7,91	8,28
Maus # 2	2,06	8,00	6,47
Maus # 3	1,14	4,91	4,63
Mittelwert	2,32	6,94	6,46
Clodrolip	Milz	Haut	
	F4/80 (%)	Gr1 (%)	F4/80 (%)
Maus # 4	0,11	1,73	1,4
Maus # 5	0,12	6,68	5,62
Maus # 6	0,12	3,33	2,37
Mittelwert	0,12	3,91	3,13

Zusammengefasst belegen diese Daten, dass die 75tägige Applikation von Clodrolip zur signifikanten Depletion von Makrophagen in Milz und Haut der BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse führt.

4.3.3.2 Signifikante Abnahme der *Wnt5a* Expression in der Haut nach Clodrolipbehandlung

Um zu untersuchen, ob durch die Clodrolipbehandlung, die ja zur effizienten Makrophagendepletion in der Haut der BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse geführt hatte, tatsächlich mit einer Reduzierung der *Wnt5a* Expression einhergeht, wurde eine qRT-PCR Analyse durchgeführt. Wie die Abbildung 29 zeigt, resultiert die 75tägige Applikation von Clodrolip in einer signifikant verminderten *Wnt5a* Expression gegenüber der Leerliposomenkontrolle.

Da laut unserer Hypothese das *Wnt5a* Level im direkten Zusammenhang mit der Induktion des Differenzierungsmarkers *K10* stehen könnte, wurde zusätzlich die Expression von *K10* in den Proben untersucht. Falls *Wnt5a* tatsächlich die *K10* Expression induzieren sollte, müsste die Abnahme von *Wnt5a* mit einer verminderten *K10* Expression korrelieren. Wie man Abbildung 29 entnehmen kann, hatte Clodrolip keinen signifikanten Einfluss auf die *K10* Expression in den BCC-tragenden Hautproben.

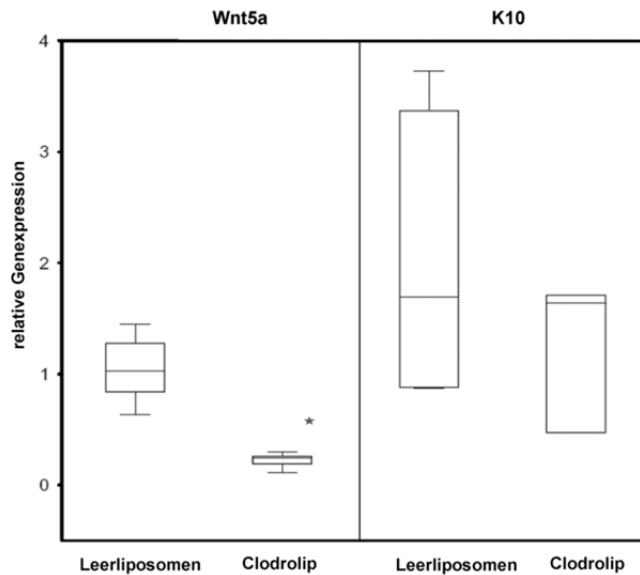


Abbildung 29: Genexpressionsanalyse von *Wnt5a* und *K10* in Haut von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen nach 75tägiger Applikation von Clodrolip. Gezeigt ist die Genexpression von *Wnt5a* sowie *K10* in Haut von mit Clodrolip-behandelten Mäusen. Jede Probe wurde in Triplikaten vermessen und alle gemessenen Werte sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Kontrolle.

Zusammengefasst zeigen diese Versuche, dass die Applikation von Clodrolip *in vivo* zur signifikanten Depletion von Makrophagen in der Milz und Haut führt. Dies korreliert mit einer signifikanten Verminderung der *Wnt5a* Expression in der Haut der BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse. Zudem lassen die Analysen vermuten, dass *Wnt5a* nicht in die Regulation bzw. Induktion des Differenzierungsmarkers *K10* involviert ist.

4.3.3.3 Zunahme der Größe und des proliferativen Verhaltens von BCC nach Clodrolipapplikation

Es konnte gezeigt werden, dass nach Applikation von Clodrolip die *Wnt5a* Expression in der Haut signifikant herunterreguliert wurde. Laut unserer Hypothese sollte die Reduzierung von *Wnt5a* mit aggressiverem Tumorwachstum einhergehen und letztlich in größeren BCC resultieren. Daher wurden die BCC der mit Clodrolip- und Leerliposomen-behandelten Tiere hinsichtlich ihres Proliferationsstatus und hinsichtlich ihrer Größe analysiert.

In Abbildung 30a ist zu sehen, dass die Applikation von Clodrolip den Anteil proliferierender Zellen erhöht. Dieser Effekt ist zwar nicht signifikant, jedoch ist der prozentuale Anteil der Ki67 positiven Zellen nach Clodrolipbehandlung um ca. 5% höher im Vergleich zur Leerliposomenkontrolle. Die Berechnung des Tumoreals zeigt weiterhin, dass die Applikation von Clodrolip zum signifikanten Anstieg der Tumorgöße im Vergleich zur Leerliposomenkontrolle geführt hat (Abbildung 30b). So beträgt der Median der Tumorphäche nach Behandlung mit Leerliposomen 45mm^2 , wogegen dieser nach Clodrolipbehandlung 82mm^2 beträgt.

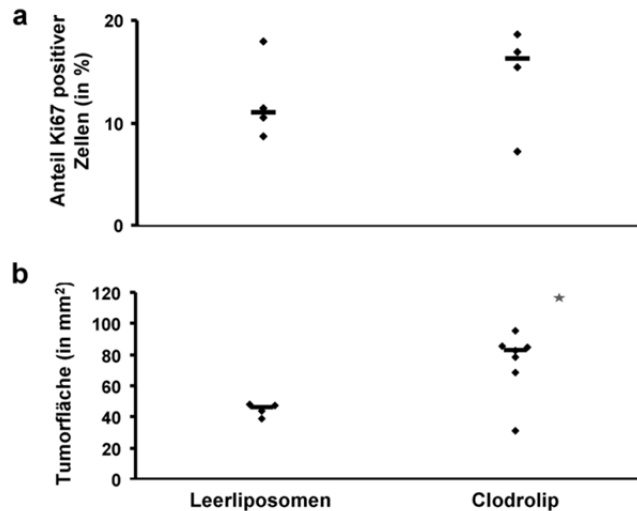


Abbildung 30: Proliferationsindex und Tumorgroße von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen nach Applikation von Clodrolip. Gezeigt sind der prozentuale Anteil Ki67 positiver BCC-Zellen (a) sowie die gemessene Tumorgroße (b) nach 75tägiger Behandlung der Mäuse mit Clodrolip bzw. Leerliposomen (Kontrolle). Der Anteil Ki67 positiver Zellen wurde in % angegeben. Die Daten repräsentieren in a) je 4 Proben und in b) 4 bzw. 6 BCC. * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Kontrolle.

Diese Daten zeigen, dass die stromale *Wnt5a* Expression im BCC der *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse tatsächlich auf Makrophagen zurückzuführen ist. Außerdem wird bestätigt, dass eine Verminderung der *Wnt5a* Expression in der Haut zu aggressiverem Tumorstadium führt und schließlich in größeren BCC resultiert. Entgegen der ursprünglichen Hypothese zeigen die Daten weiterhin, dass K10 weder durch *Wnt5a* reguliert wird noch eine Rolle beim BCC-Wachstum spielt (siehe auch voriges Kapitel, vgl. 4.3.3.2)

4.4 Einfluss von Liposomen auf das Wachstum von BCC

Obwohl Clodrolip im Vergleich zu Liposomen eindeutig zur Depletion von Makrophagen, Verminderung der *Wnt5a* Expression in der Haut und schließlich zu aggressiverem Tumorstadium führt, fiel dennoch auf, dass die BCC sowohl nach Clodrolip- als auch Liposomenapplikation extrem viel kleiner waren als sonst gesehene BCC in unserer Arbeitsgruppe.

Ein Vergleich zwischen einem völlig unbehandelten und einem mit Liposomen-behandelten BCC ist in Abbildung 31 dargestellt. Man erkennt, dass der unbehandelte Tumor (Abbildung 31a) wesentlich größer ist als der liposomenbehandelte (Abbildung 31b).

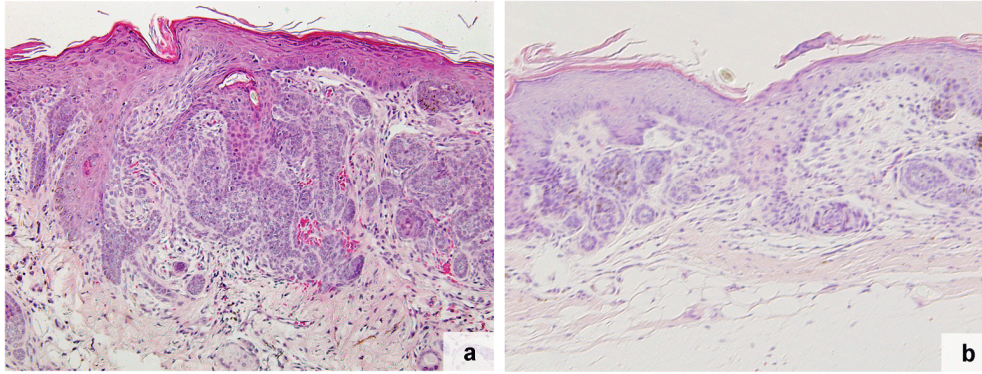


Abbildung 31: Einfluss von Liposomen auf das BCC-Wachstum *in vivo*. Gezeigt sind HE-gefärbte Schnitte von BCC 90 Tage nach Tumorinduktion in 100facher Vergrößerung. (a) zeigt ein unbehandeltes BCC, (b) zeigt ein über 75 Tage mit Liposomen-behandeltes BCC.

4.4.1 Wirkung von Liposomen und BLP auf das BCC-Wachstum im Mausmodell

Wie soeben beschrieben, wurde im Rahmen der mit Clodrolip und Leerliposomen durchgeführten Experimente auffällig, dass auch die Applikation von Leerliposomen in $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäusen zu kleineren Tumoren führte (Abbildung 31). Da diese Aussage jedoch auf Tumoren beruhte, die nicht aus derselben Studie stammten (bei der Applikation von Clodrolip wurden lediglich Liposomenkontrollen, nicht aber unbehandelte Kontrollen, mitgeführt) wurde der Einfluss von Liposomen auf das BCC-Wachstum nochmals genauer in einem weiteren Experiment untersucht.

In diesem Experiment wurden in allen $Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}$ Mäusen BCC induziert. 15 Tage nach der Tumorinduktion wurden die Tiere über 75 Tage entweder mit PBS (n=4), mit Liposomen (n=4) oder mit BLP (n=5) behandelt. Behandlungszeitraum und *I*-schema entspricht demjenigen des ersten Experiments (siehe Kapitel 4.3.3).

Bei BLP (Pam_3CSK_4) handelt es sich um einen TLR1/2-Agonisten. Von BLP ist bekannt, dass es zu einer dosisabhängigen Verkleinerung von Melanomen *in vivo* führt (Zhang, Y *et al.* 2011). In Anlehnung an die Publikation von Zhang *et al.* wurde den Mäusen BLP in einer Dosis von 25µg/Tier jeden vierten Tag i.p. gespritzt.

4.4.1.1 Liposomen und BLP hemmen das Tumorstwachstum

Nach der Behandlung wurden alle Tumoren isoliert und hinsichtlich der Tumorstgröße analysiert. In Abbildung 32 ist gezeigt, dass sowohl eine Applikation von Liposomen als auch von BLP, verglichen mit den PBS-behandelten Kontrollen, zu einer signifikanten Hemmung des BCC-Wachstums führt.

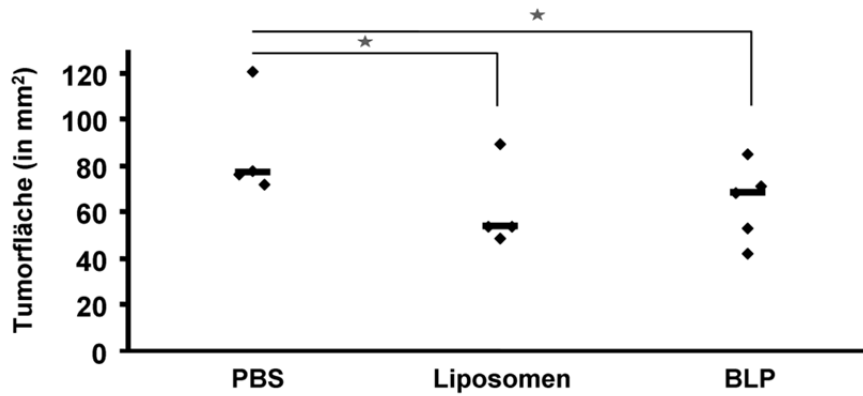


Abbildung 32: Tumorfläche von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen nach Applikation von PBS, Liposomen oder BLP. Gezeigt ist die gemessene Tumorfläche nach 75tägiger Behandlung der Mäuse mit PBS (n=4), Liposomen (n=4) oder BLP (n=5). Alle Tumoren wurden am Tag 90 nach Tumorinduktion untersucht. Dargestellt sind die analysierten Tumoreinzelwerte und der errechnete Median (—). * signifikant (p<0,05 im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Kontrolle.

4.4.1.2 Liposomen und BLP induzieren *K10* Expression in der BCC-tragenden Haut

Die Tumoren wurden außerdem hinsichtlich ihrer Differenzierung untersucht. Hierzu wurde mittels qRT-PCR die Expression des Differenzierungsmarkers *K10* gemessen. In Abbildung 33 ist die auf PBS-behandelte Tumoren normalisierte Genexpression dargestellt. Sowohl nach Behandlung der Tiere mit Liposomen als auch mit BLP steigt die *K10* Expression in den analysierten BCC signifikant an.

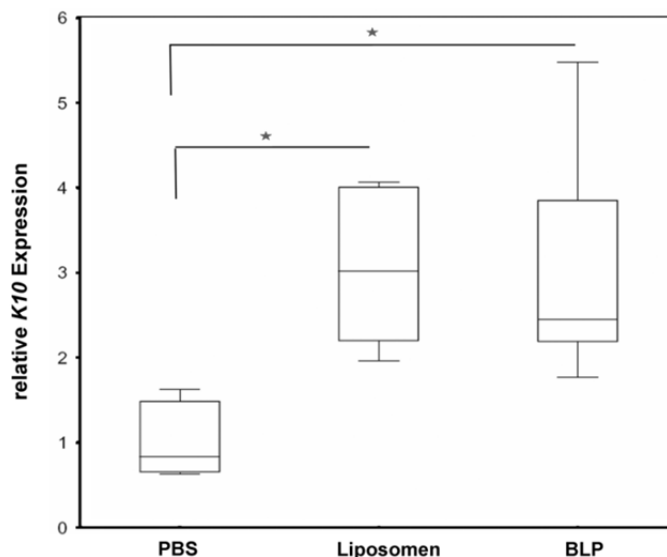


Abbildung 33: *K10* Expression in BCC nach *in vivo* Applikation von Liposomen oder BLP. Gezeigt ist die *K10* Expression in BCC-tragender Haut von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen nach Behandlung mit PBS (n=4), Liposomen (n=4) oder BLP (n=5). Die gemessenen Werte sind als Box-Whisker-Plot dargestellt und der Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle wurde =1 gesetzt. Die *K10* Expression der anderen Gruppen ist relativ zu diesem Wert dargestellt. * signifikant (p<0,05 im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Kontrolle.

Zusammengefasst zeigen diese Versuche, dass die Applikation von Liposomen und BLP *in vivo* sowohl zur signifikanten Verringerung der BCC-Größe als auch zur signifikant höheren K10 Expression in der Haut von BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse führt.

4.4.1.3 Liposomen verringern die Makrophagenzahl in der Peritonealhöhle, der Milz und der Haut

Auch bei diesem Versuch wurde direkt nach dem Isolieren der Tumoren der prozentuale Anteil an Makrophagen in Peritoneallavage, Milz und Haut mittels FACS-Analysen bestimmt (Abbildung 34).

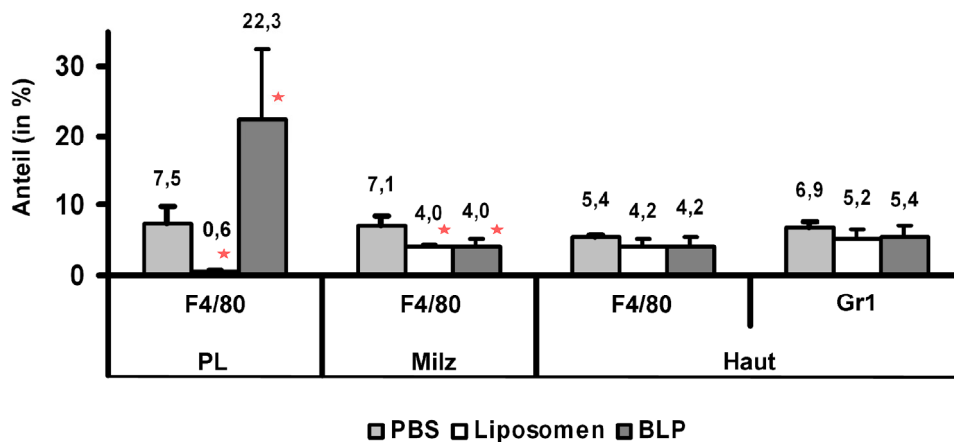


Abbildung 34: Makrophagensubgruppen in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen nach Behandlung mit PBS, Liposomen oder BLP. Gezeigt ist der über FACS ermittelte prozentuale Anteil an F4/80 bzw. Gr1 positiven Zellen (in %) nach Applikation von PBS (n=4), Liposomen (n=4) oder BLP (n=5) in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen. Der prozentuale Anteil des Makrophagenmarkers F4/80 wurde sowohl für Zellen der Peritoneallavage (PL), der Milz sowie der Haut bestimmt. In der Haut wurde zusätzlich der prozentuale Anteil des Makrophagenmarkers Gr1 analysiert. Aufgetragen wurde der Mittelwert der Messwerte mit entsprechender Standardabweichung.

Der Anteil F4/80 positiver Zellen nimmt nach Behandlung der Tiere mit Liposomen im Vergleich zu PBS-behandelten Mäusen in der Peritoneallavage signifikant ab. Dagegen steigt nach Applikation von BLP der Anteil F4/80 positiver Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrolle in der Lavage signifikant an. In Milz und Haut nimmt der prozentuale Anteil an Makrophagen sowohl nach Applikation von Leerliposomen als auch BLP im Vergleich zu den PBS-Kontrollen ab. Dieser Effekt ist in der Milz, nicht aber in der Haut, signifikant. In der Haut wurde daher noch der Anteil Gr1 positiver Zellen bestimmt. Wie man sieht nimmt der prozentuale Anteil auch dieser Makrophagenpopulation sowohl nach Applikation von Leerliposomen als auch BLP im Vergleich zu den PBS-Kontrollen ab. Jedoch ist dieser Effekt ebenfalls nicht signifikant.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl Liposomen als auch BLP einen bedeutenden Einfluss auf die Anzahl von Makrophagen in der Peritonealhöhle und der Milz nehmen.

4.4.2 Wirkung von Liposomen und BLP auf BMDM und ASZ001

Die bisherigen Experimente zeigen, dass Liposomen und BLP einen Einfluss auf das BCC-Wachstum und auf die Anzahl der Makrophagen in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen haben. Um diese Wirkung näher zu charakterisieren, wurden Zellkulturexperimente mit BMDM (bone marrow-derived macrophages) und der BCC-Zelllinie ASZ001 durchgeführt.

Da BLP *in vivo* genauso wie Liposomen a) zur Wachstumshemmung der BCC führt und b) die Anzahl der Makrophagen vermindert, wurde diese Substanz auch für die *in vitro* Experimente als Kontrollsubstanz verwendet.

4.4.2.1 Wirkung von Liposomen und BLP auf BMDM

4.4.2.1.1 Liposomen und BLP ändern die Morphologie von BMDM

Schon eine 24stündige Inkubation der BMDM mit Liposomen oder BLP führte zu einer deutlichen Veränderung der Morphologie dieser Zellen (Daten nicht gezeigt). Die in Abbildung 35 dargestellten Aufnahmen zeigen BMDM nach 72stündiger Inkubation mit den Substanzen. Nach Inkubation mit BLP erscheinen die BMDM abgeflacht. Dagegen sind die Zellen nach Inkubation mit Liposomen abgekugelt. Die Lösungsmittelkontrollen zeigen nach 72stündiger Inkubation die gleiche Morphologie wie unbehandelte BMDM.

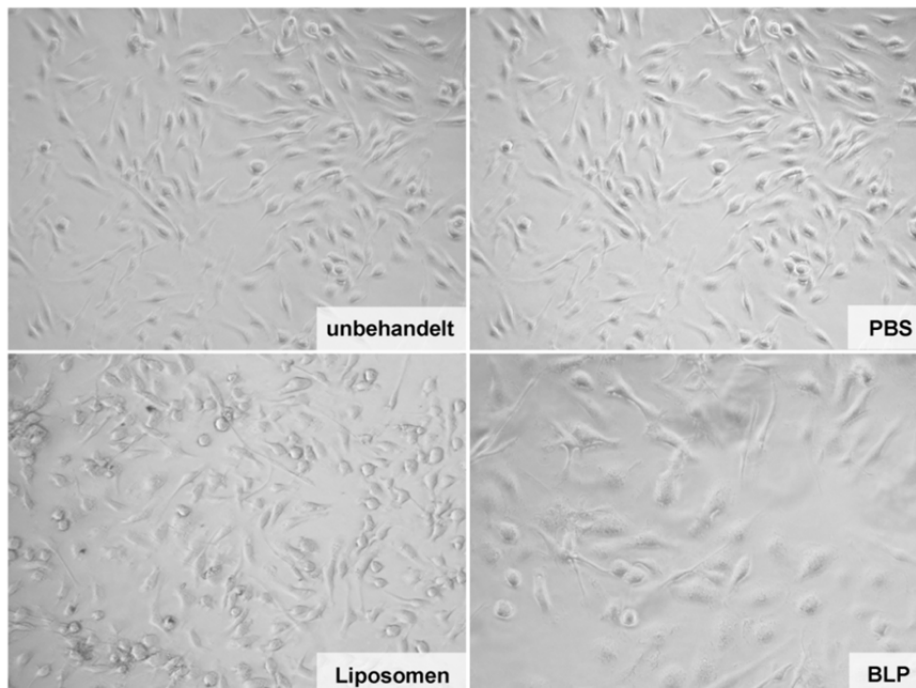


Abbildung 35: Morphologie von BMDM nach Inkubation mit Liposomen oder BLP. Gezeigt sind BMDM nach 72stündiger Inkubation mit Liposomen oder BLP im Vergleich zu unbehandelten und Lösungsmittel-behandelten (PBS) BMDM.

4.4.2.1.2 Keine toxische Wirkung von Liposomen und BLP auf BMDM

Um eine eventuelle toxische Wirkung der beiden Substanzen auf die BMDM zu untersuchen, wurde die Zellviabilität mittels WST-1 Assay untersucht. Bei diesem Experiment wurden die Zellen für 6, 12, 24 und 72 Stunden mit den Substanzen inkubiert. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse für die 72stündige Inkubation dargestellt. Wie man der Abbildung entnehmen kann, hat sogar eine solch lange Inkubationsdauer mit Liposomen keinen Einfluss auf die Zellviabilität (Daten für 6, 12, 24stündige Inkubation nicht gezeigt). BLP scheint hingegen sogar die Stoffwechselaktivität der BMDM signifikant anzuregen.

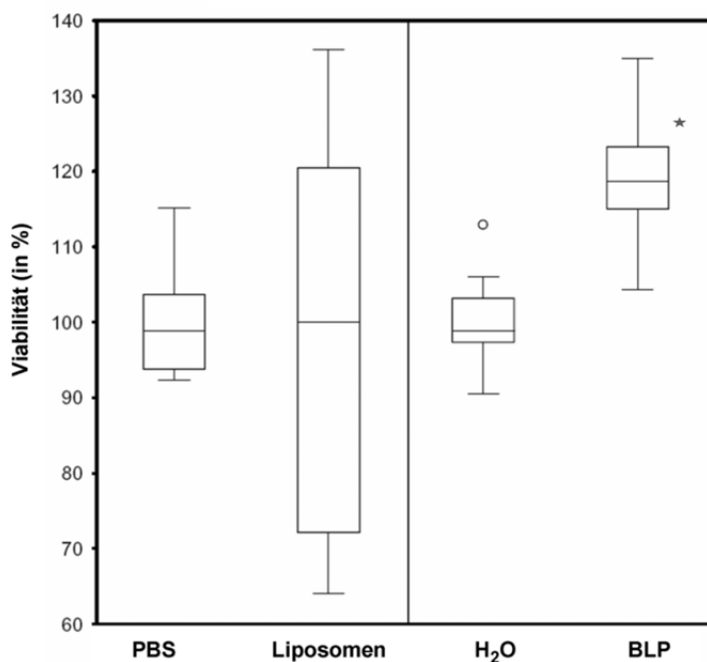


Abbildung 36: WST-1 Assay von BMDM nach Inkubation mit Liposomen oder BLP. Gemessen wurde nach 72stündiger Inkubation der BMDM mit Liposomen, BLP oder den entsprechenden Lösungsmitteln (PBS, H₂O) die Absorptionsänderung von WST-1. Die ermittelten Werte sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. Der Mittelwert der jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurde =100% gesetzt. Die Messwerte der Behandlungsgruppen sind relativ zu diesem Wert dargestellt. Die Daten zeigen die Auswertung von vier unabhängigen Experimenten. Legende: * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Kontrolle; ○ Ausreißer.

4.4.2.1.3 BLP, nicht aber Liposomen, führen zur Cytokinfreisetzung aus BMDM

Weiterhin wurde der Einfluss von Liposomen und BLP auf die Cytokinproduktion von BMDM untersucht. Die in Abbildung 37 dargestellte Graphik zeigt den im Medium gemessenen Cytokingehalt von acht verschiedenen Cytokinen nach Inkubation der Zellen mit Liposomen oder BLP.

Für alle analysierten Zeitpunkte (6, 12, 24 Stunden Inkubation) ist deutlich erkennbar, dass Liposomen keinen Effekt haben. Dagegen führt eine Inkubation mit BLP zur Freisetzung der Cytokine IL-6, MIP-1 α /CCL3, Rantes/CCL5, TNF- α , KC/CXCL1, und MCP-1/CCL2 ins

Medium. Bis auf MCP-1, das erst nach 24h ansteigt, steigt der Gehalt der genannten Cytokine dabei proportional zur Inkubationszeit an. Auffällig ist jedoch, dass auch durch eine Inkubation mit BLP die Cytokine IL-10 und IL-12p40 nicht beeinflusst werden.

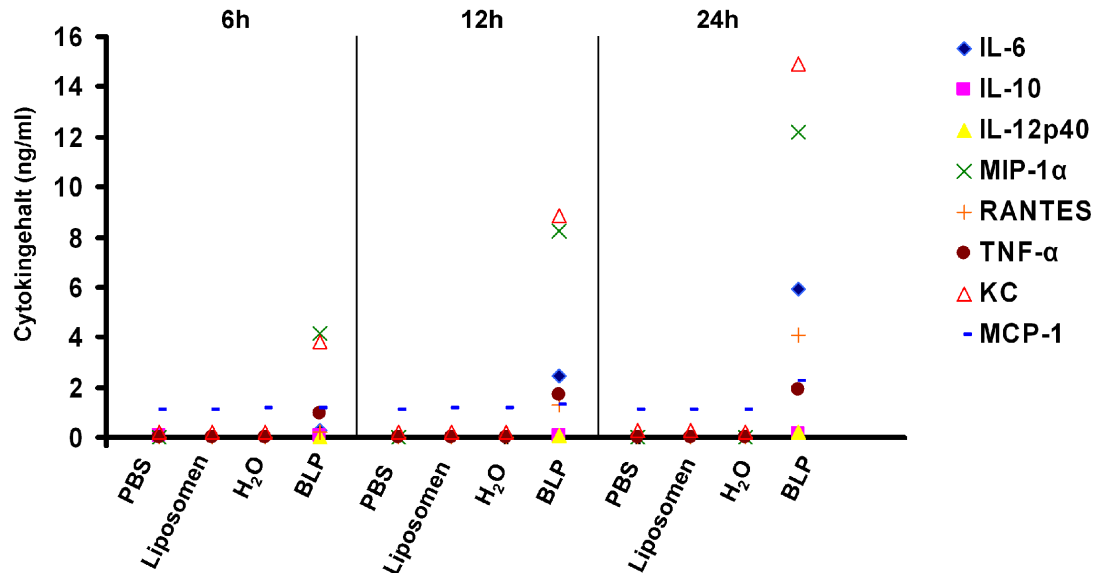


Abbildung 37: Cytokinfreisetzung aus BMDM nach Inkubation mit Liposomen bzw. BLP. Gezeigt ist der absolute Cytokingehalt nach 6, 12 und 24stündiger Inkubation von BMDM mit Liposomen, BLP oder den entsprechenden Lösungsmitteln (PBS, H₂O). Der Cytokingehalt wurde im Überstand des Mediums mittels ELISA vermessen.

Zusammengefasst kann man sagen, dass Liposomen (im Gegensatz zu BLP) keine Produktion von IL-6, MIP-1α/CCL3, Rantes/CCL5, TNF-α, KC/CXCL1, und MCP-1/CCL2 in BMDM anregen können. Allerdings führt auch BLP zu keiner Produktion von IL-10 und IL-12p40 in BMDM.

4.4.2.1.4 Liposomen und BLP führen zu vermehrter Migration von BMDM

Zur Untersuchung des Einflusses von Liposomen und BLP auf das Migrationsverhalten von BMDM wurden die Zellen in mit Liposomen oder BLP supplementiertem Medium inkubiert. Dazu wurden $0,75 \times 10^5$ BMDM in Zellkultur-Membraneinsätze ausgesät und in einer 24-Loch-Platte platziert. Nach einer 18stündigen Inkubation wurden durch die Membran migrierte Zellen mit Calcein gefärbt und am Mikroskop ausgezählt (siehe Kapitel 3.2.6). Der Zeitraum der Inkubation sollte maximal 18h andauern, da die Zellen besonders direkt nach Stimulation mit vermehrter Migration reagieren und längere Inkubationszeiten so möglicherweise das Ergebnis verfälschen. Ist die Inkubation dagegen länger als 18h, können die bereits migrierten Zellen von der Membran abfallen und damit ebenfalls das Ergebnis verfälschen.

Wie in Abbildung 38 gezeigt, ist der Anteil gewanderter Zellen sowohl nach Inkubation der Zellen mit Liposomen als auch mit BLP im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle signifikant erhöht.

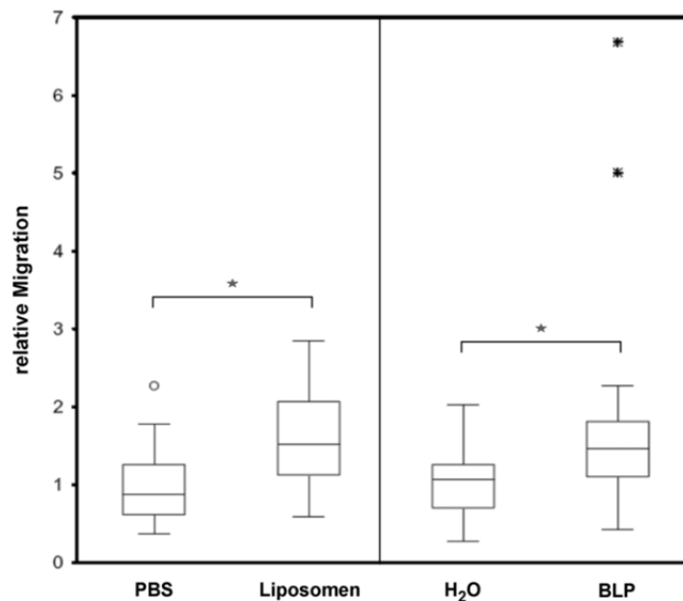


Abbildung 38: Migration von BMDM nach Inkubation mit Liposomen oder BLP. Gezeigt ist die relative Migration von BMDM nach 72stündiger Inkubation mit Liposomen, BLP oder den entsprechenden Lösungsmitteln. Die gemessenen Werte sind als Box-Whisker-Plot dargestellt und der Mittelwert der jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurde =1 gesetzt. Die Messwerte der anderen Gruppen sind relativ zu diesem Wert dargestellt. Die Daten zeigen die Auswertung von je fünf unabhängigen Experimenten, wobei jedes Experiment in Triplikaten durchgeführt wurde. Legende: * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Kontrolle; o Ausreißer; * Extremwert.

4.4.2.1.5 Liposomen und BLP vermindern die Proliferation von BMDM

Die *in vivo* Versuche zur Applikation von Liposomen und BLP in den *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen haben gezeigt, dass beide Substanzen die Anzahl von Makrophagen deutlich beeinflussen (siehe Abbildung 34).

Da die verminderte Anzahl der Makrophagen in Peritonealhöhle, Milz und Haut auch durch eine Proliferationshemmung zustande gekommen sein könnte, wurde der Einfluss von Liposomen und BLP auf die BMDM mittels BrdU-Assay untersucht. Hierzu wurden in einer 96-Loch-Platte 8000 BMDM ausgesät und das Medium am nächsten Tag mit Liposomen bzw. BLP supplementiert. Die Zellen wurden für 72h mit den Substanzen inkubiert. Für die letzten 24h wurde das Medium mit BrdU angereichert. Die BrdU-Inkorporation wurde am Luminometer bestimmt (siehe Kapitel 3.2.7).

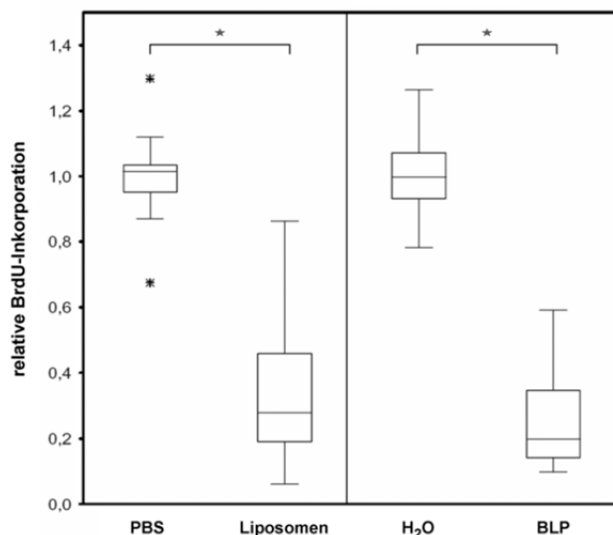


Abbildung 39: Relative Proliferationsrate von BMDM nach Inkubation mit Liposomen oder BLP. Gezeigt ist die relative BrdU-Inkorporation von BMDM nach 72stündiger Inkubation mit Liposomen, BLP oder den entsprechenden Lösungsmitteln. Die gemessenen Werte sind als Box-Whisker-Plot dargestellt und der Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle wurde =1 gesetzt und die Messwerte der anderen Gruppe sind relativ zu diesem Wert dargestellt. Die Daten zeigen die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten, wobei jedes in Triplikaten durchgeführt wurde. Legende: * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle; * Extremwert.

Wie man Abbildung 39 entnehmen kann, inhibieren sowohl BLP als auch Liposomen die Proliferation der BMDM. Im Vergleich zum entsprechenden Lösungsmittel ist dieser Effekt signifikant.

4.4.2.1.6 Liposomen führen in BMDM zum Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase

Wie aus den Experimenten deutlich hervorgeht, inhibieren Liposomen die Proliferation von BMDM. In einem weiteren Schritt wurde daher analysiert, zu welchem Zeitpunkt des Zellzyklus diese Hemmung stattfindet. Hierzu wurden die Zellen für 72h mit Liposomen oder dem Lösungsmittel PBS inkubiert, danach mit Propidiumiodid gefärbt und anschließend über FACS analysiert (siehe Kapitel 3.3.5).

Wie man in Abbildung 40 sieht, führt die 72stündige Inkubation der BMDM mit Liposomen zu einem Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase. So steigt der Anteil der Zellen nach Inkubation mit Liposomen um etwa 8% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle an. Hingegen nimmt der Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen um ca. 8% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle ab.

In Abbildung 41 ist der prozentuale Anteil an BMDM in der jeweiligen Zellzyklus-Phase zusätzlich als Box-Whisker-Plot dargestellt. Anhand dieser Graphik ist erkennbar, dass der sich in der G0/G1-Phase befindliche Zellanteil durch Inkubation mit Liposomen im Vergleich zu den PBS-behandelten Zellen signifikant ansteigt. Dagegen verringert sich der prozentuale Anteil der sich in der S-Phase befindlichen Zellen signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

Ergebnisse

Zellen der G2/M-Phase bleiben durch eine Inkubation mit Liposomen im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert.

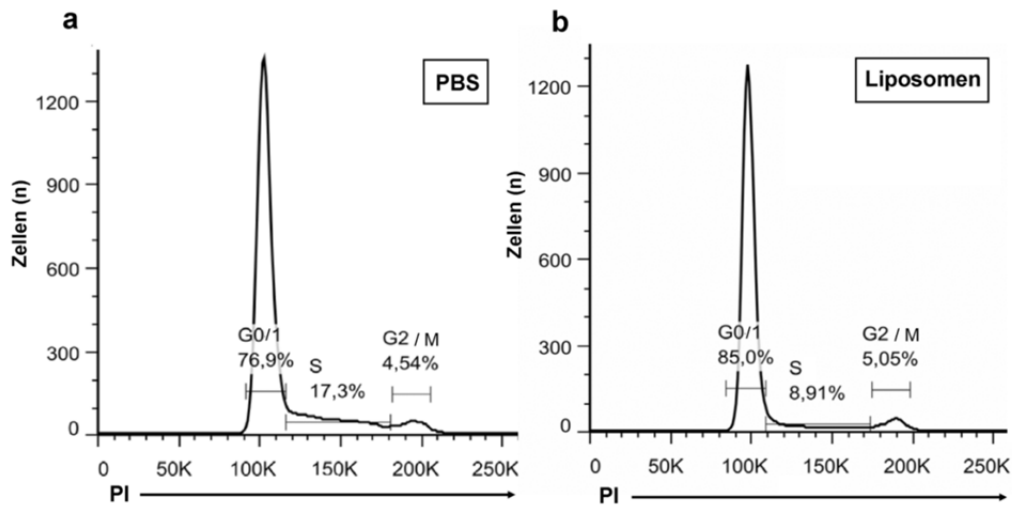


Abbildung 40: Zellzyklus von BMDM nach Inkubation mit PBS oder Liposomen. BMDM wurden für 72 Stunden mit PBS (a) oder Liposomen (b) inkubiert. Nach Färbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI), folgte die Analyse mittels FACS. Im FACS-Histogramm sind die verschiedenen Stadien des Zellzyklus markiert. Es wird die G0/G1-Phase (Ruhephase (G0) und postmitotische Phase oder Präsynthesephase (G1)) von der S-Phase (Synthesephase) und der G2/M-Phase (prämitotische Phase oder Postsynthesephase (G2) und Mitosephase (M)) unterschieden. Die relativen prozentualen Anteile der Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus sind in Prozent angegeben.

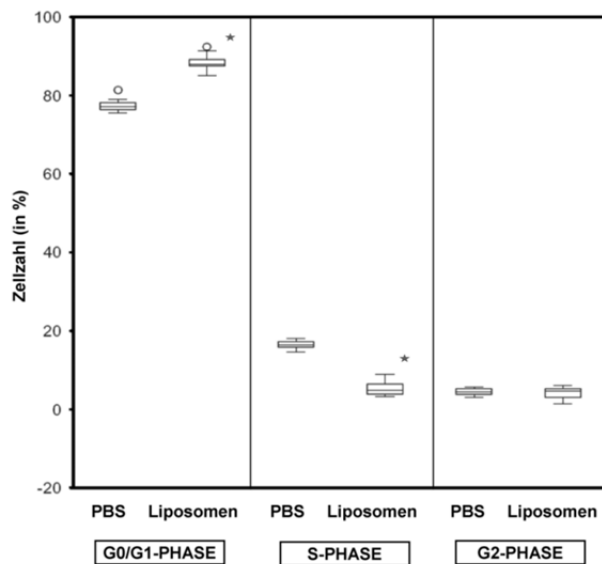


Abbildung 41: Zellzyklus von BMDM nach Inkubation mit PBS oder Liposomen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an BMDM nach 72stündiger Inkubation mit Liposomen oder dem Lösungsmittel PBS in verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Die über FACS ermittelten Daten (vgl. Abbildung 40) sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. In die Analyse flossen die Daten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ein (PBS, n=4; Liposomen, n=10). Legende: * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle; o Ausreißer.

Die obigen Ergebnisse belegen, dass eine 72stündige Inkubation mit Liposomen zum Zellzyklusarrest von BMDM in der G0/G1-Phase führt.

4.4.2.1.7 Liposomen und BLP induzieren Apoptose in BMDM

Darüber hinaus wurde untersucht, ob Liposomen und BLP das Apoptoseverhalten von BMDM beeinflussen. Hierzu wurden die Zellen für 72 Stunden mit den Substanzen inkubiert und die Zellen anschließend mit FITC-gelabeltem Annexin sowie To-Pro-3 Iodid gefärbt (siehe Kapitel 3.3.5). Die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen erfolgte über FACS-Analyse und wurde als prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl berechnet. Wie in Abbildung 42 deutlich zu sehen, führt die Inkubation von BMDM mit Liposomen im Vergleich zur PBS-Kontrolle zum signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen. So steigt der mittlere Anteil von etwa 7% auf 13%. Gleichmaßen führt auch die Inkubation der BMDM mit BLP zum signifikanten Anstieg apoptotischer Zellen, ihr mittlerer Anteil steigt von ebenfalls 7% auf sogar über 30%.

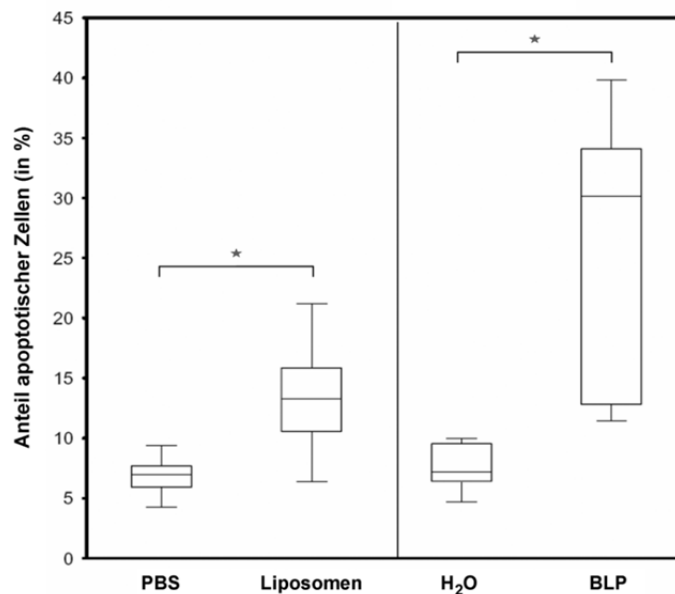


Abbildung 42: Anteil Annexin-/ und To-Pro-3 Iodid positiver BMDM nach Behandlung mit Liposomen oder BLP. Dargestellt ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen nach 72stündiger Inkubation von BMDM mit Liposomen, BLP oder den entsprechenden Lösungsmitteln. Die über FACS ermittelten Daten sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. In die Analyse flossen die Daten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ein, die Apoptose wurde pro Behandlung in Duplikaten gemessen. * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

Diese Analyse zeigt, dass sowohl Liposomen als auch BLP die Apoptose in BMDM induzieren.

Zusammengefasst zeigen die erhobenen *in vitro* Daten, dass Liposomen und BLP einen vergleichbaren Einfluss auf BMDM haben. Beide Substanzen verändern die Morphologie der BMDM, sie führen zu vermehrter Migration, sie vermindern die Proliferation der Zellen und induzieren Apoptose. Ein Unterschied besteht jedoch darin, dass Inkubation der BMDM mit BLP, nicht aber mit Liposomen, in einer Cytokinfreisetzung resultiert. Es muss außerdem betont werden, dass sowohl Liposomen als auch BLP keine toxische Wirkung auf die Zellen

haben. Deshalb sind alle hier analysierten Effekte hinsichtlich Proliferation und Apoptose nicht durch Toxizität der beiden Substanzen bedingt.

4.4.2.2 Wirkung von Liposomen oder BLP auf ASZ001

Die bisherigen *in vitro* Experimente zeigen, dass Liposomen und auch BLP einen deutlichen Einfluss auf BMDM haben. Um zu untersuchen, ob Liposomen oder BLP auch eine antiproliferative oder proapoptotische Wirkung auf BCC-Zellen haben, wurde die BCC-Zelllinie ASZ001 mit den Substanzen behandelt.

4.4.2.2.1 Keine Proliferationshemmung von ASZ001 durch Liposomen oder BLP

Zunächst wurden die Tumorzellen nach Inkubation mit Liposomen bzw. BLP hinsichtlich ihrer Proliferation im BrdU-Assay analysiert. Hierzu wurden in einer 96-Loch-Platte 6000 ASZ001-Zellen ausgesät und das Medium am nächsten Tag mit Liposomen bzw. BLP supplementiert. Die Zellen wurden für 72h mit den Substanzen inkubiert. Für die letzten 24h wurde BrdU zugegeben. Die Auswertung der BrdU-Inkorporation erfolgte am Luminometer (siehe Kapitel 3.2.7).

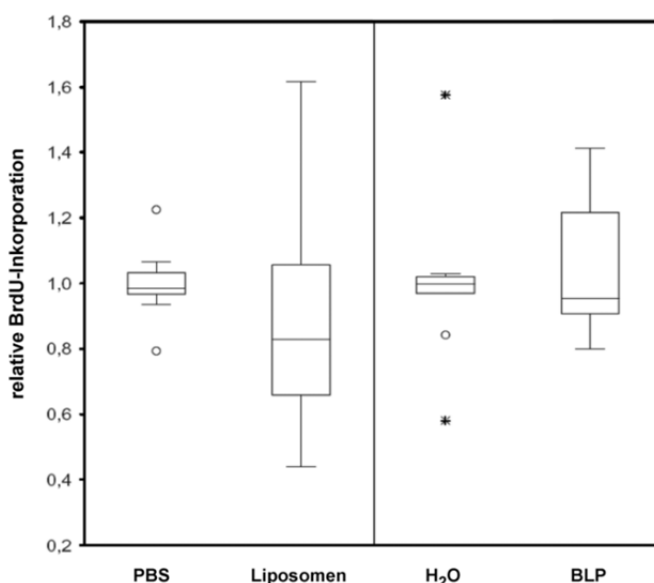


Abbildung 43: Relative Proliferationsrate von ASZ001 nach Inkubation mit Liposomen oder BLP. Gezeigt ist die relative BrdU-Inkorporation von ASZ001 nach 72stündiger Inkubation mit Liposomen, BLP oder den entsprechenden Lösungsmitteln. Die gemessenen Werte sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. Der Mittelwert der Lösungsmittelkontrolle wurde =1 gesetzt und die Messwerte der anderen Gruppe sind relativ zu diesem Wert dargestellt. Die Daten zeigen die Auswertung von zwei unabhängigen Experimenten, wobei jedes Experiment in Triplikaten durchgeführt wurde. Legende: * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle; ○ Ausreißer, * Extremwert.

Aus der Abbildung 43 geht hervor, dass eine Inkubation der ASZ001 mit Liposomen oder BLP keinen signifikanten Einfluss auf die BrdU-Inkorporation hat.

4.4.2.2 Keine Stimulation der Apoptose von ASZ001 durch Liposomen oder BLP

Weiterhin wurde analysiert, ob die Inkubation der ASZ001 mit Liposomen bzw. BLP das Apoptoseverhalten der Zellen beeinflusst. Dazu wurden die Zellen für 72 Stunden mit den beiden Substanzen inkubiert und die Zellen anschließend mit FITC-gelabeltem Annexin sowie To-Pro-3 Iodid gefärbt (siehe Kapitel 3.3.5). Die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen erfolgte über FACS-Analyse und wurde als prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl berechnet.

In der Abbildung 44 ist erkennbar, dass eine Inkubation der Zellen mit Liposomen den Anteil apoptotischer Zellen nicht signifikant verändert. Die Werte zeigen jedoch eine sehr hohe Varianz. Nach Inkubation der Tumorzellen mit BLP wird die Zahl apoptotischer Zellen im Mittel von etwa 43% auf 38% vermindert. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant.

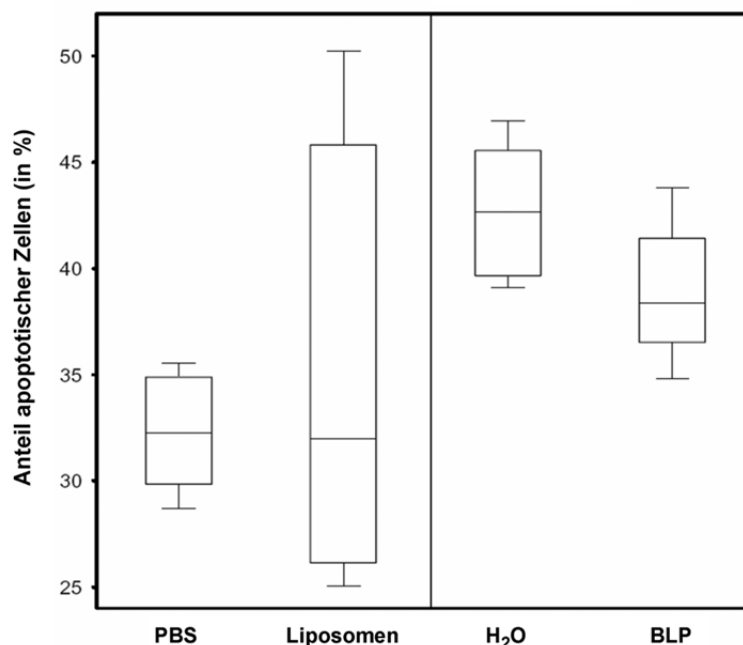


Abbildung 44: Anteil Annexin-/ und To-Pro-3 Iodid positiver ASZ001 nach Behandlung mit Liposomen oder BLP. Dargestellt ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen nach 72stündiger Inkubation von ASZ001 mit Liposomen, BLP oder den entsprechenden Lösungsmitteln. Die über FACS ermittelten Daten sind als Box-Whisker-Plot dargestellt. In die Analyse flossen die Daten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ein, die Apoptose wurde pro Behandlung in Duplikaten gemessen. * signifikant ($p < 0,05$ im t-Test für unabhängige Variablen) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass weder Liposomen noch BLP die Proliferation oder das Apoptoseverhalten von BCC-Zellen beeinflussen.

5 Diskussion

5.1 Expression und Funktion von Wnt5a in der BCC-Zelllinie ASZ001 und BCC-tragenden Hautstanzen

In unserer Arbeitsgruppe wurden murine Basalzellkarzinome bereits intensiv analysiert und es wurde damit begonnen die Rolle von Wnt5a in dieser Tumorentität zu charakterisieren. Mit Hilfe des konditionellen *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Knockout-Mausmodells (siehe Einleitung und (Uhmann, A *et al.* 2007)) wurde dokumentiert, dass die Tumoren im Laufe der Zeit histologisch einen stärker differenzierten Phänotyp aufwiesen und etwa 200-250 Tage nach Tumorinduktion eine Spontanregression zeigten, was mit einer verminderten Proliferationsrate der Tumoren einherging.

5.1.1 Wnt5a wird von BCC-assoziierten Makrophagen exprimiert

Die *Wnt5a* Expression setzte *in vivo* interessanterweise erst im vollentwickelten Tumor, also etwa 90 Tage nach Tumorinduktion, ein und blieb auch in den regredienten Tumorstadien bestehen. In den frühen Vorläuferläsionen war die *Wnt5a* Expression auf den Haarfollikel limitiert und entsprach dem Status wie in normaler Haut (Reddy, S *et al.* 2001; Reddy, ST *et al.* 2004). Daher schien *Wnt5a* nicht mit der Initiation von BCC in Verbindung zu stehen. Vorversuche unserer Arbeitsgruppe zeigten außerdem, dass die *Wnt5a* Expression im BCC nur auf das Stroma beschränkt war. Die stärkste *Wnt5a* Expression schien hierbei in den stromalen Zellen zu sein, die mit hyperproliferativen Bereichen der Epidermis assoziiert waren und welche ein besonders hohes Level der Differenzierungsmarker *K1* und *K10* exprimierten. Dieses Ergebnis stützte die Annahme, dass *Wnt5a* mit der Differenzierung und möglicherweise auch der Regression der Tumoren in Verbindung stehen könnte. Es stellte sich dann aber noch die Frage, welche stromale Zellpopulation für die *Wnt5a* Expression verantwortlich war. Dazu wurden immunhistochemische Analysen an Paraffinschnitten von BCC gegen Fibroblasten (Vimentin-Antikörper) und Makrophagen (F4/80-Antikörper) durchgeführt. Das Stroma war für beide Marker positiv. Aufgrund des Fehlens eines geeigneten *Wnt5a*-Antikörpers war es uns somit leider nicht möglich immunhistochemische Ko-Färbungen auf dem gleichen Schnitt durchzuführen. Folglich konnte auch keine eindeutige Aussage über die stromale *Wnt5a*-exprimierende Zellpopulation gemacht werden. Um herauszufinden, welche Zellen für die stromale *Wnt5a* Expression verantwortlich waren, wurden deshalb sowohl Fibroblasten als auch Makrophagen mit der BCC-Zelllinie ASZ001 kokultiviert. In dieser Versuchsanordnung wurde eine erhöhte *Wnt5a* Expression in den Tumorzellen lediglich durch Makrophagen induziert. Diese Tatsache wurde auch durch

weitere Analysen unserer Arbeitsgruppe unterstützt. So korrelierte die erhöhte *Wnt5a* Expression in vollentwickelten und regredienten Tumoren mit einer erhöhten *F4/80* Expression in diesen Tumorstadien (Nitzki, F *et al.* 2010).

Es war bereits bekannt, dass tumorassoziierte Makrophagen (TAM, engl. tumor-associated macrophages) *Wnt5a* exprimieren können. So konnten Pukrop *et al.* zeigen, dass die Expression von *Wnt5a* in TAM zur Tumorprogression beim Brustkrebs beitrug (Pukrop, T *et al.* 2006). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit Tumorzellen kokultivierte Makrophagen *Wnt5a* exprimierten. Im Gegensatz zum Brustkrebs schien beim BCC die Makrophagen-assoziierte *Wnt5a* Expression eher mit Tumorregression in Verbindung zu stehen. Dies passte zu der bereits beschriebenen Tatsache, dass Zellen des Immunsystems und Cytokine mit der spontanen Regression von BCC assoziiert waren (Hunt, MJ *et al.* 1994).

Die Kokultur-Versuche von Makrophagen und ASZ001 wurden zusätzlich mit dem spezifischen Hh-Signalweg-Inhibitor Cyclopamin durchgeführt. Hierdurch sollte untersucht werden, ob die *Wnt5a* Expression in den Makrophagen durch parakrines Hh Signaling der ASZ001 induziert wurde. Da Cyclopamin jedoch die durch Kokultivierung hervorgerufene *Wnt5a* Expression in den Makrophagen nicht hemmen konnte, kann man davon ausgehen, dass die Expression von *Wnt5a* in Makrophagen durch einen bisher unbekanntem Faktor der Tumorzellen induziert wird und unabhängig vom Hh/Ptch Signalweg ist.

5.1.2 *Wnt5a* induziert die BCC Differenzierung über den *Wnt/Ca²⁺* Signalweg in Abhängigkeit der CaMKII

Es war bekannt, dass *Wnt5a* sowohl als Ligand des kanonischen Wnt Signalwegs als auch der nicht-kanonischen Signalwege fungieren kann. Dies ist jeweils vom Rezeptorkontext abhängig. Aus den Analysen der Tumoren der *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse ging hervor, dass *Wnt5a* im Stroma von vollentwickelten und regredienten BCC exprimiert wird. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass in diesen Tumorstadien die Differenzierungsmarker *K1* und *K10* hochreguliert wurden. Diese Tatsache legte die Vermutung nahe, dass *Wnt5a* direkt mit der Differenzierung der Tumoren in Verbindung steht. Das konnten die Versuche mit der BCC-Zelllinie ASZ001 bestätigen. So wurde sowohl nach Inkubation der ASZ001 mit r*Wnt5a*, *Wnt5a*-CM als auch nach Kokultivierung mit *Wnt5a*-exprimierenden Makrophagen die *K10* Expression in den Tumorzellen induziert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun geklärt werden, über welchen der drei alternativen Signalwege (siehe Einleitung) *Wnt5a* die *K10* Expression induziert. Dazu wurden qRT-PCR Analysen, immunhistochemische Analysen und Western Blots durchgeführt. Darüber hinaus wurde versucht die Aktivität der Signalwege mit der

beobachteten Erhöhung der *Wnt5a* Expression in vollentwickelten und regredienten BCC zu korrelieren.

Analysen von β -Catenin, seines Partners Bcl9-2 und seines Targets Axin2 in vollausgebildeten nodulären murinen und humanen BCC ergaben keinen Anhaltspunkt für eine Aktivierung des kanonischen Wnt Signalwegs. Weiterhin zeigten zellkulturbasierte Assays, dass rWnt5a den kanonischen Wnt Signalweg in der BCC-Zelllinie ASZ001 nicht aktivieren kann. Alle diese Daten legen daher die Vermutung nahe, dass der kanonische Wnt Signalweg in den nodulären BCC der *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse und auch in nodulären humanen BCC eine untergeordnete Rolle spielt und zudem nicht durch Wnt5a aktiviert werden kann. Diese Annahme steht im Gegensatz zu einer Publikation von Yang *et al.*, die belegt, dass kanonisches Wnt Signaling in transgenen M2SMO Mäusen und in humanen superfiziellen BCC bei der Initiierung der BCC eine Rolle spielt (Yang, SH *et al.* 2008). Zusammend mit unseren Daten kann man daher vermuten, dass die Aktivität des kanonischen Wnt Signalwegs offenbar nur bei der BCC Initiation, nicht aber bei vollausgebildeten BCC, und vor allem nicht bei der BCC-Regression, eine Rolle spielt. Außerdem ist es möglich, dass der kanonische Signalweg mit speziellen histologischen BCC-Subtypen assoziiert ist. So waren die BCC in der Studie von Yang *et al.* einheitlich vom superfiziellen Subtyp, wogegen diejenigen unserer Studie ausschließlich vom nodulären Subtyp waren. Möglicherweise spielt der kanonische Signalweg auch noch eine Rolle bei infiltrativen BCC sowie bei anderen Hauttumoren wie z.B. Pilomatrikulomen, da auch in diesen Tumoren eine nukleäre Expression von β -Catenin nachgewiesen werden konnte (Doglioni, C *et al.* 2003; El-Bahrawy, M *et al.* 2003; Palmer, HG *et al.* 2008).

Die Aktivität des Wnt/JNK Signalwegs wurde in den nodulären BCC der *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse unter Verwendung eines anti-phospho-c-Jun Antikörpers analysiert, wobei das Expressionsmuster von phospho-c-Jun sehr heterogen war. Die Expression war nicht auf Tumorzellen beschränkt, sondern war auch im Stroma und Zellen der Epidermis zu finden. Außerdem wurde phospho-c-Jun in allen Tumorstadien exprimiert. Darüber hinaus korrelierte das Expressionsmuster von phospho-c-Jun ebenfalls nicht mit dem erhöhten Expressionslevel von *Wnt5a* in vollentwickelten und regredienten BCC. Daher ist anzunehmen, dass im *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mausmodell für BCC a) Wnt5a nicht in die Aktivierung des Wnt/JNK Signalwegs involviert ist und b) der Wnt/JNK Signalweg nicht an der BCC-Regression beteiligt ist.

Die Aktivität des Wnt/Ca²⁺ Signalwegs wurde zunächst mittels eines Antikörpers untersucht, der die aktive Form der PKC detektierte. Hierbei zeigte sich, dass die PKC sowohl in den

vollentwickelten als auch in den regredienten nodulären BCC der *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse aktiviert war. Dies war der erste Hinweis, dass Wnt5a den Wnt/Ca²⁺ Signalweg in den BCC induzieren konnte.

Interessanterweise ist auch die Differenzierung von epidermalen Zellen Ca²⁺-abhängig (Fan, H und Khavari, PA 1999). Da eine Differenzierung wiederum zur Regression von BCC beitragen kann und da unsere Daten zeigten, dass Wnt5a die *K10* Expression in BCC-Zellen induzierte, wurde nun untersucht, ob die Wnt5a-vermittelte *K10* Expression durch Aktivierung des Ca²⁺-abhängigen Wnt Signalwegs zustande kommen kann.

Wie andere Mitglieder unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten, ließ sich die Wnt5a-induzierte *K10* Expression in ASZ001 nur durch den CaMKII-spezifischen Inhibitor KN-93, nicht aber durch spezifische Inhibitoren der anderen Wnt Signalwege hemmen (Nitzki, F *et al.* 2010). Dies zeigt, dass die Wnt5a-induzierte *K10* Expression tatsächlich den Wnt/Ca²⁺ Signalweg involviert. Der Zusammenhang zwischen Ca²⁺ und *K10* Expression wurde durch eine Inkubation von ASZ001 mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin deutlich. Hierdurch wurde ebenfalls eine *K10* Expression induziert. Außerdem zeigten Transfektionsversuche, dass die konstitutiv aktive CaMKII-T286D zur Zunahme der *K10* Expression in ASZ001 führte, das Kinase-inaktive CaMKII-Plasmid vermochte dies jedoch nicht.

Basierend auf all diesen Versuchen kann man schließen, dass Wnt5a in BCC von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen den Wnt/Ca²⁺ Signalweg aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer erhöhten *K10* Expression in Abhängigkeit der CaMKII.

Um die oben beschriebene Abhängigkeit der *K10* Expression von Wnt5a und CaMKII zu bestätigen, wurden Hautstanzen von BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen oder von Kontrollmäusen mit rWnt5a oder dem CaMKII-Inhibitor KN-93 kultiviert. Dadurch wurde ein System geschaffen, das den *in vivo* Konditionen eher ähnelt als die bisherigen Analysen mit der BCC-Zelllinie ASZ001. Auch diese Analysen zeigten, dass die Inkubation mit rWnt5a zu einem Anstieg der *K10* Expression führt, welche sich durch Inkubation mit KN-93 rückgängig machen lässt. Somit zeigte auch dieser Versuch, dass der Wnt/Ca²⁺ Signalweg bei der Wnt5a-vermittelten *K10* Induktion im BCC involviert ist.

Da die Inkubationszeit in Zellkultur wahrscheinlich zu kurz war, um die Tumorgroße oder aber die Proliferationsrate der BCC-Stanzen zu beeinflussen (eine längere Inkubation der Hautstanzen führte allerdings zur Nekrose des Gewebes, was im Vorfeld dieses Versuchs ausgetestet worden war), sollten die Effekte von Ca²⁺ und Wnt5a auf das BCC-Wachstum nun in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen *in vivo* untersucht werden (siehe Kapitel 4.2 und 4.3).

5.1.3 Modell für die Funktion von Wnt5a in BCC-Entwicklung und /-Regression

Bevor zur Diskussion der *in vivo* Versuche übergegangen wird, soll zunächst das bis zu diesem Zeitpunkt aufgestellte Modell zu der Rolle von Wnt5a in der BCC-Entwicklung sowie /-Regression erklärt werden (Abbildung 45).

In frühen, vollentwickelten und regredienten nodulären BCC ist die Hh/Ptch Signalkaskade aktiv. Dies wird durch die Expression von Markergenen wie beispielsweise *Gli1* deutlich. Die spontane Regression der Tumoren scheint in unserem Mausmodell durch Wnt5a ausgelöst zu werden, dessen Expression in Stromalen Zellen durch unbekannte, von den Tumorzellen sezernierte lösliche Faktoren induziert werden. Stromales Wnt5a induziert in den Tumorzellen unter Aktivierung der CaMKII den Wnt/Ca²⁺ Signalweg. Das wiederum resultiert in einer erhöhten *K10* Expression der Tumorzellen und schließlich in der Differenzierung der Tumoren. Daher kann die Abnahme der Proliferation und Zunahme der *K10* Expression trotz bestehender Hh/Ptch Signalwegsaktivität in vollentwickelten und regredienten BCC mit einem nichtzell-autonomen Szenario erklärt werden, das Tumor-Stroma-Interaktionen über den Wnt5a Signalweg vermittelt.

Diese Daten sind in Nitzki *et al.*, 2010 in Cancer Research veröffentlicht worden (Nitzki, F *et al.* 2010).

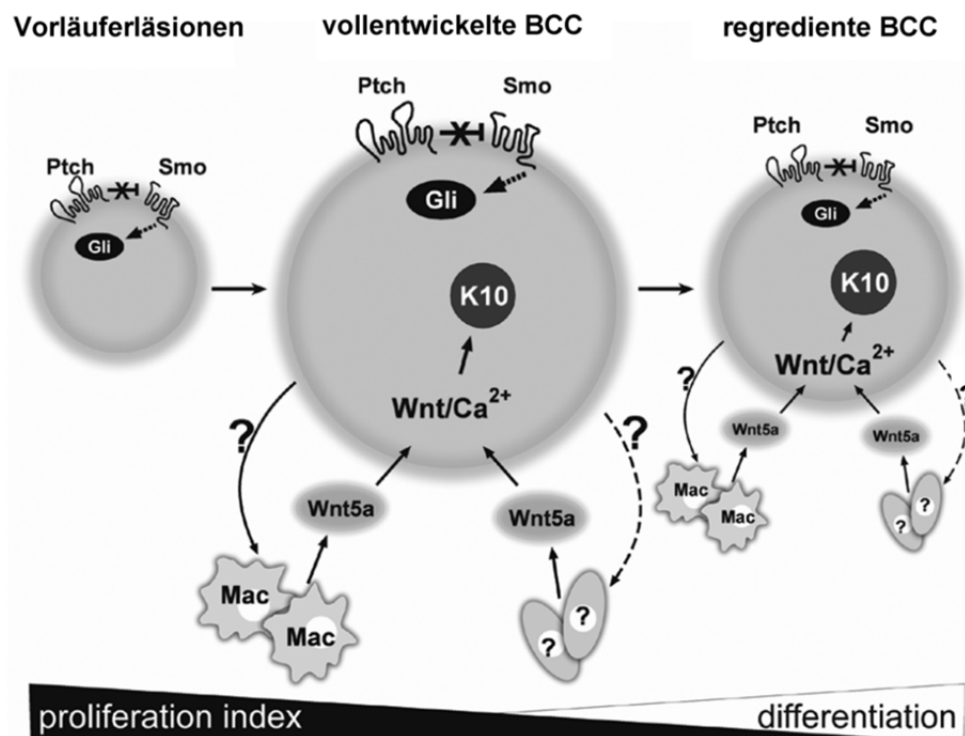


Abbildung 45: Modell der Funktion von Wnt5a in der BCC-Entstehung und /-Regression. Zur Erklärung siehe Text.

An dieser Stelle sollen noch kurz weitere, im Rahmen dieser Arbeit generierte Daten diskutiert werden.

So wurde auch in humanen BCC versucht, die *Wnt5a* Expression mit dem Proliferationsstatus der Tumoren in Verbindung zu bringen. Wie schon in der Einleitung beschrieben, kommt es auch beim Menschen in ca. 20% der Fälle zur Spontanregression von BCC (Curson, C und Weedon, D 1979). Zudem ist *Wnt5a* anscheinend in vielen humanen BCC überexprimiert (Bonifas, JM *et al.* 2001; Saldanha, G *et al.* 2004; Yang, SH *et al.* 2008). Für die Analysen wurden 28 humane BCC, die von der Abteilung Dermatologie (Universitätsmedizin Göttingen) bezogen worden sind, zunächst hinsichtlich ihrer *Wnt5a* Expression untersucht. Leider stand kein Frischgewebe zur Verfügung, so dass die *Wnt5a* Expression nicht quantifiziert werden konnte. Die *Wnt5a* Expression musste daher anhand von *in situ*-Hybridisierung gemessen werden, was sich jedoch aufgrund von Hintergrundfärbung als extrem schwierig gestaltete. Da die Proben nicht explizit für den Nachweis von RNA konserviert worden waren, könnte dies daher mit der RNA Qualität zusammenhängen. In 6 der *Wnt5a* positiven und 4 der *Wnt5a* negativen Proben wurde dann mittels immunhistologischer Färbung für Ki67 versucht, den Anteil proliferierender Tumorzellen prozentual zu quantifizieren. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen *Wnt5a* Expression und dem Proliferationsstatus hergestellt werden. Da jedoch a) keine Information zu den BCC hinsichtlich ihres Regressionsstatus vorlag, b) die RNA in den Proben möglicherweise degradiert war und c) daher auch keine klare Aussage zur Stromalen Expression von *Wnt5a* gemacht werden konnte, ließ sich somit auch kein eindeutiger Rückschluss auf eine Korrelation von *Wnt5a* Expression, Proliferationsstatus oder Regression der Tumoren ziehen.

5.2 Effekt von Ca^{2+} auf BCC im Mausmodell

Aus den im ersten Abschnitt der Diskussion beschriebenen Zellkulturexperimenten geht hervor, dass die *Wnt5a*-vermittelte *K10* Induktion in ASZ001 höchstwahrscheinlich über den Ca^{2+} -abhängigen Wnt Signalweg erfolgt. Da diese Erkenntnisse nur auf *in vitro* Analysen basierten, wurde der Einfluss von Ca^{2+} auf Differenzierung und BCC-Regression nun *in vivo* untersucht.

Um die Ca^{2+} Konzentration in der BCC-tragenden Haut anzuheben, wurden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse über 90, 75 oder 45 Tage mit Ionomycin behandelt. Dass Mäuse eine derartige Applikation des Ionophors tolerieren, wurde bereits in der Studie von Perchellet *et al.* gezeigt (Perchellet, EM *et al.* 1990). In der hier vorgestellten Studie wurde die Behandlung in unterschiedlichen BCC-Stadien, d.h. direkt, 15 oder 45 Tage nach Tumorinduktion begonnen. Alle Mäuse wurden am Tag 90 nach der Tumorinduktion abgetötet.

Nun ist aus der Literatur bekannt, dass Ca^{2+} einen antiproliferativen und differenzierungsfördernden Effekt auf Keratinozyten hat (Perchellet, EM *et al.* 1990).

Zusammen mit der Hypothese, dass der Wnt/Ca²⁺ Signalweg eine Differenzierung der BCC aktivieren kann, wurde erwartet, dass die Applikation von Ionomycin daher auf BCC a) antiproliferativ und b) differenzierungsfördernd wirkt. Obwohl die Applikation von Ionomycin in keiner der drei Kohorten einen Einfluss auf die histologisch-vermessbare Tumorgroße hatte, konnte die Expression von *K10* und von weiteren epidermalen Differenzierungsmarkern nach einer 90tägigen Behandlung signifikant induziert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass das Level der Ca²⁺ Konzentration in der Haut durch Ionomycin tatsächlich ansteigt. Dieser Anstieg reicht anscheinend auch aus, um eine Verringerung proliferierender BCC-Zellen nach einer 90tägigen oder 45tägigen Applikation hervorzurufen. Warum sich allerdings der Proliferationsindex der Kohorte 2, welche von Tag 15 bis Tag 90 nach Tumorinduktion, also über 75 Tage mit Ionomycin behandelt wurde, gar nicht veränderte, ist etwas verwunderlich. Möglich ist, dass nicht die Dauer der Ionomycin-Applikation Einfluss auf die BCC-Proliferation nimmt, sondern dass der Zeitpunkt der Applikation viel entscheidender für eine Verminderung proliferierender Zellen ist. Sehr viel wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Variabilität der Messdaten der einzelnen Tumoren zu groß und die Anzahl der vermessenen Tumoren zu gering war, um signifikante Ergebnisse zu erzielen.

Weiterhin ist schwer zu erklären, warum die Abnahme der Proliferationsrate nach Ionomycin-Applikation in den Kohorten 1 und 3 nicht mit einer Abnahme der histologisch messbaren Tumorgroße korrelierte. Da letztere aber eine eher ungenaue Methode war und in einem völlig zufällig getroffenen Tumorareal vermessen wurde, war die Auszählung von Ki67 positiven Zellen sicherlich die objektivere Methode.

Die Tatsache, dass eine 90-tägige Applikation von Ionomycin zur signifikanten Expression von Differenzierungsmarkern in der Haut führt und zudem die Proliferationsrate der Tumoren senkt, ist sicherlich interessant. Es ist nämlich möglich, dass eine längere Ionomycin-Behandlung der *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse (sprich länger als 90 Tage) die Differenzierung der Tumoren dann derart beeinflusst, dass die Behandlung schließlich sogar in einer histologisch-vermessbaren Tumorabnahme resultiert.

Zusammengefasst kann man festhalten, dass die Ionomycin-Applikation zur Expression von Differenzierungsmarkern in BCC geführt hat. Zudem beweist dieses Experiment, dass Ca²⁺ auch *in vivo* eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung und auch bei antiproliferativen Vorgängen von BCC spielt.

5.3 Einfluss der *Wnt5a* Überexpression und der verminderten *Wnt5a* Expression auf BCC im Mausmodell

Im Rahmen dieser Dissertation sollte außerdem geprüft werden, ob *Wnt5a* auch *in vivo* in die Differenzierung von BCC und/oder Tumorregression involviert ist. Hierzu wurde die *Wnt5a* Expression in der Haut von BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen zum einen erhöht, und zum anderen vermindert. Sollte *Wnt5a* tatsächlich in Differenzierung und BCC-Regression involviert sein, sollte eine *Wnt5a* Überexpression zu vermindertem Tumorwachstum führen. Falls es sich im BCC bei *Wnt5a* jedoch wider Erwarten um ein Onkogen handeln sollte (wie dies für viele andere Tumorentitäten gezeigt worden war (Iozzo, RV *et al.* 1995; Bittner, M *et al.* 2000)), dann sollte die Überexpression von *Wnt5a* in aggressiverem Tumorwachstum und schließlich in der Vergrößerung der BCC resultieren.

5.3.1 Einfluss der *Wnt5a* Überexpression im BCC *in vivo*

Um den Einfluss von *Wnt5a* auf das Wachstum und die Differenzierung von BCC im Mausmodell zu untersuchen, sollte *Wnt5a* in der Haut zunächst überexprimiert werden.

Am einfachsten wäre die topische Applikation von r*Wnt5a* auf BCC-tragende Haut gewesen. Dieser Ansatz wurde jedoch aus Kostengründen schnell verworfen, da kommerziell erwerbliche rekombinante Proteine sehr teuer sind. Zudem unterscheiden sich die einzelnen Chargen rekombinanter Proteine häufig in ihrer Wirksamkeit. Eine andere alternative Möglichkeit zur Überexpression von *Wnt5a in vivo* wäre die Generierung transgener Mäuse gewesen, die *Wnt5a* in stromalen Makrophagen exprimieren. Dieser Ansatz wurde verworfen, weil bislang kein geeigneter Promotor bekannt ist, der zu einer Makrophagen-spezifischen Expression von Genen genutzt werden kann. Voruntersuchungen zur Identifikation eines adäquaten Promotors hätten den Rahmen dieser Arbeit gesprengt. Auch wurde überlegt, *Wnt5a*-exprimierende Zelllinien wie beispielsweise die NIH3T3-*Wnt5a* Zelllinie, in BCC-tragende Mäuse zu transplantieren. Da es sich bei den *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen jedoch um immunkompetente Mäuse handelt, wurde auch diese Idee verworfen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die *Wnt5a* Expression in der BCC-tragenden Haut durch Spritzen einer nackten *Wnt5a*-exprimierenden Plasmid-DNA erhöht werden. Dass die Überexpression von nackter Plasmid-DNA *in vivo* möglich ist, konnte bereits vor über einem Jahrzehnt gezeigt werden (Hengge, UR *et al.* 1996). Auch Collinet *et al.* zeigten in ihren Untersuchungen, dass die Applikation nackter DNA neben der herkömmlichen Behandlung von Ovarialkarzinomen ein unterstützendes therapeutisches Potential aufwies (Collinet, P *et al.* 2006). Auch bei primären bzw. metastasierenden Tumoren konnte eine intramuskuläre Injektion nackter Plasmid-DNA, die für IFN- α kodierte, einen antitumoralen Effekt erzielen (Horton, HM *et al.* 1999).

Um diese Methode im Labor zu etablieren, wurde zunächst ein β Galaktosidase-kodierendes Plasmid in der murinen Haut exprimiert. Die Abbildung 20 zeigt, dass diese Methode in der Maushaut funktionierte. Zudem konnte gezeigt werden, dass die β Galaktosidase Aktivität 24h nach der letzten Injektion höher war als 7 Tage nach der letzten Injektion. Daher sollte die BCC-tragende Maushaut nach Spritzen des *Wnt5a*-exprimierenden Plasmids zukünftig bereits 24h nach der letzten Injektion isoliert werden, um kontinuierlich ein hohes *Wnt5a*-Level in der Haut zu gewährleisten.

Leider konnte das Experiment aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden, da das zunächst verwendete *Wnt5a*-Expressionsplasmid für die Analysen nicht geeignet war und ein neues *Wnt5a*-exprimierendes Plasmid kloniert werden musste. Dabei war die Einführung einer Kozak-Konsensussequenz in das Plasmid für die bessere *Wnt5a* Expression notwendig. Das klonierte Plasmid steht nun für die Analysen bereit.

Es wurde außerdem überlegt, ob man die *Wnt5a* Expression *in vivo* durch eine Verpackung des Expressionsplasmids in Polyethylenimin(PEI)-Komplexe steigern kann. PEI ist das Polymerisationsprodukt des Monomers Ethylenimin. PEI-Komplexe werden in der Molekularbiologie bei der Transfektion von Nukleinsäuren, wie beispielsweise Plasmiden oder häufig auch siRNAs in humane oder murine Zellen, sowohl für *in vitro* als auch *in vivo* Transfektionen eingesetzt (Malek, A *et al.* 2009). In dem Review von Lemkine und Demeneix wurde beschrieben, dass PEIs insbesondere zur Gentherapie *in vivo* eingesetzt werden können (Lemkine, GF und Demeneix, BA 2001). In einer aktuellen Studie konnte weiterhin gezeigt werden, dass DNA/PEI-Komplexe den Haarwuchs nach Transfektion von Haarfollikel-Stammzellen stimulieren konnten (Jan, HM *et al.*). Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, dass die PEI-Komplexierung des *Wnt5a*-Expressionsplasmids wahrscheinlich zu einer höheren Expression von *Wnt5a* in der Haut führen könnte. Bei dieser Applikationsform sollte jedoch die Gefahr berücksichtigt werden, dass DNA/PEI-Komplexe bei systemischer Applikation nicht-spezifische Interaktionen mit Komponenten des Blutes und anderen Zellen eingehen können, was dann natürlich zu Nebenwirkungen der Applikation führt (siehe Review (Kichler, A 2004)).

Weiterhin wurde überlegt, ob die Überexpression von *Wnt5a* *in vivo* durch Elektroporation gesteigert werden kann. Dies ist schon für andere Expressionsplasmide gezeigt worden (Titomirov, AV *et al.* 1991; Heller, R *et al.* 2001).

5.3.2 Untersuchung der Effekte einer verminderten *Wnt5a* Expression auf BCC im Mausmodell

Falls unsere Hypothese zutreffen sollte und *Wnt5a* im BCC tatsächlich als Tumorsuppressor agiert, d.h. dass *Wnt5a* sowohl in BCC-Differenzierung als auch in BCC-Regression involviert ist, müssten BCC der Maus nach Verminderung der *Wnt5a* Expression ein verstärktes Wachstum zeigen.

Um die *Wnt5a* Expression in der BCC-tragenden Haut von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen zu vermindern, wurden drei verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Hierbei handelte es sich um das Einkreuzen von *Wnt5a* Knockout-Mäusen in das *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mausmodell als genetischer Ansatz, das Ersetzen von *Wnt5a*-exprimierenden Makrophagen durch *Wnt5a*^{-/-} Makrophagen und die Depletion der *Wnt5a*-exprimierenden Makrophagen durch eine systemische Gabe von Clodrolip.

5.3.2.1 Einfluss der Deletion eines *Wnt5a* Allels auf das BCC-Wachstum

Zunächst wurden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse mit heterozygoten *Wnt5a^{+/-}* Knockout-Mäusen verpaart. Da *Wnt5a^{-/-}* Knockout-Mäuse perinatal sterben (Yamaguchi, TP *et al.* 1999), konnten nur *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* generiert werden. In diesen Mäusen wurden dann mittels Tamoxifeninjektion BCC induziert. Als Kontrollen wurden BCC in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen, d.h. in Mäusen ohne *Wnt5a* Knockout, induziert. Die BCC wurden dann 45 Tage (Vorläuferläsionen; Kohorte 1), 90 Tage (vollentwickelte BCC; Kohorte 2) und 250 Tage (regrediente BCC; Kohorte 3) nach Tumorinduktion analysiert.

In keiner der drei analysierten Kohorten (Vorläuferläsionen, vollentwickelte BCC und regrediente Tumoren) konnte eine signifikante Herunterregulierung der *Wnt5a* Expression gemessen werden. Diese Daten zeigen, dass die Deletion eines *Wnt5a* Allels nicht ausreicht, um eine signifikante Verminderung der *Wnt5a* Expression in der BCC-tragenden Haut zu erzielen. Deshalb war es nicht verwunderlich, dass bei diesem genetischen Versuchsansatz keine Änderungen der BCC-Größe in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden konnten. Zudem zeigten alle *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mäuse, wie auch *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Kontrollmäuse, nach 250 Tagen eine Spontanregression. Hierzu ist jedoch zu sagen, dass manchmal schon geringe „dosage-Unterschiede“ zu einer Änderung des Phänotyps führen können. So ist bekannt, dass hemizygoten *Wnt5a* Knockout-Mäuse im Alter von etwa 24 Monaten in ca. 25% der Fälle B-Zell Lymphome und chronisch myeloische Leukämien (CML) entwickeln (Liang, H *et al.* 2003).

Auffällig war in dem Versuchsansatz jedoch, dass eine der *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mäuse der Kohorte 3 (regrediente BCC) einen unerwarteten Phänotyp aufwies. So zeigte der Nackenbereich eine enorme Hyperplasie der Epidermis, was sofort mit der Verminderung

der *Wnt5a* Expression in Verbindung gebracht wurde. Dieser Phänotyp könnte für eine tumorsuppressorische Funktion von *Wnt5a* sprechen, zudem nach dem Rasieren der Haut von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mäusen weitere, kleinere hyperplastische Veränderungen in 3 von 11 Mäusen makroskopisch sichtbar wurden. Da jedoch ein solcher kleiner hyperproliferativer Hautbereich auch bei einer *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Kontrollmaus detektiert wurde, ist es möglich, dass diese Veränderungen häufiger im konditionellen *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* BCC-Mausmodell auftreten und bisher nicht detektiert wurden. Um dies zu bestätigen, müsste man eine größere Zahl an BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse untersuchen. Sollte man dann tatsächlich in mehreren dieser Mäuse nach der Rasur diese Hautveränderungen finden, könnten sie eventuell durch eine deregulierte Hh/*Ptch* Signalkaskade bedingt sein und hätten somit nichts mit *Wnt5a* Heterozygotie zu tun. Da die *Wnt5a* Heterozygotie *per se* nicht zur verminderten *Wnt5a* Expression in der Haut führte, waren weitere Ansätze zur Verminderung der *Wnt5a* Expression, insbesondere in Makrophagen, notwendig.

5.3.2.2 Rekonstitution des Knochenmarks von *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen mit *Wnt5a*-defizienten Zellen

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde daher versucht, *Wnt5a*-exprimierende Makrophagen durch *Wnt5a*-defiziente zu ersetzen.

Dazu wurden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse mit einer letalen Dosis von 10Gy bestrahlt. Am nächsten Tag wurden sie mit Leberzellen aus *Wnt5a*-defizienten *Wnt5a*^{-/-} Embryonen transplantiert. Kontrollen erhielten Leberzellen aus wildtypischen *Wnt5a*^{+/+} Embryonen. Das genaue Vorgehen ist in Kapitel 3.4.6 beschrieben.

Dieses Experiment bereitete zunächst große Probleme, da die Methode inklusive der i.v. Injektion zunächst etabliert werden musste. Dass bestrahlte Mäuse mittels Transplantation fötaler Leberzellen jedoch generell repopulierbar sein müssen, stand außer Frage (siehe z.B. (Aziz, A *et al.* 2006)). Nach dem ersten missglückten Transplantationsexperiment sind alle Mäuse im Zeitraum von 8 und 11 Tagen nach Transplantation gestorben. Man hätte spekulieren können, dass die letale Strahlendosis möglicherweise zu hoch gewählt worden war. Da Mäuse in den Studien von Wüst *et al.* sogar eine Bestrahlung mit 11,5Gy überlebten (Wust, S *et al.* 2008), wurde diese Idee wieder verworfen. Weiterhin wurde spekuliert, dass Mäuse mit *Wnt5a*-defizientem Knochenmark nicht lebensfähig sind. Dagegen sprach jedoch, dass auch *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse eingingen, denen Leberzellen aus wildtypischen *Wnt5a*-Embryonen injiziert wurden. Außerdem wurde schon im Jahr 2003 gezeigt, dass sich Leberzellen aus 16 Tage alten *Wnt5a*^{-/-} Embryonen transplantieren lassen und ein funktionelles Knochenmark bilden (Liang, H *et al.* 2003). Außerdem konnte das Absterben der Tiere nicht durch eine „Graft versus Host Disease“ erklärt werden. Da die *Wnt5a*

Knockout-Mäuse zudem auch in IVC-Haltung in einem sterilen Umfeld lebten, konnte auch die Übertragung von Infektionen der transplantierten fötalen Leberzellen ausgeschlossen werden. Letztendlich stellte sich dann heraus, dass die Ursache für die fehlgeschlagenen Transplantationsexperimente eine Paravasation der Zellen war. Tatsächlich konnten alle Mäuse erfolgreich transplantiert werden, als die i.v. Injektion von einer erfahrenen Wissenschaftlerin eines Nachbarlabors anstelle des Tierstall-Personals durchgeführt wurde.

Wie die FACS-Analysen des Blutes zeigten, hatten alle bestrahlten bzw. transplantierten Mäuse innerhalb von sechs Wochen wieder ein intaktes Immunsystem mit normaler Lymphozytenanzahl aufgebaut. Die Genotypisierungen des Blutes (siehe Abbildung 26) zeigten, dass die *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse entsprechend des Genotyps der Donorzellen erfolgreich repopuliert waren. Allerdings sollte erwähnt werden, dass in 5 von 14 Mäusen im Blut weiterhin die Bande der *ERT2* (Cre-Rekombinase) auftrat und somit durch die Bestrahlung nicht alle Knochenmarkszellen der bestrahlten *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse abgetötet wurden.

In allen transplantierten Tieren sind dann BCC induziert worden. Die Analysen sind jedoch noch nicht abgeschlossen und können erst nach Abgabe dieser Arbeit durchgeführt werden.

Bei den kommenden Analysen ist nun zu beachten, dass manche der Tiere ein chimäres Knochenmark haben dessen Zellen sowohl aus den ursprünglichen *Wnt5a^{+/+}* Knochenmarkszellen als auch aus den transplantierten *Wnt5a^{-/-}* Leberzellen hervorgeht. Da es denkbar ist, dass wildtypische *Wnt5a*-Zellen möglicherweise einen Proliferationsvorteil gegenüber den *Wnt5a^{-/-}* Zellen haben, könnte es sein, dass die *Wnt5a^{-/-}* Zellen bei bestehendem Chimärismus von wildtypischen Zellen verdrängt werden. In der Literatur gibt es zwar keine konkreten Hinweise zur Bestätigung einer solchen Annahme, allerdings muss beim Abtöten der Mäuse erneut das Knochenmark analysiert werden.

Das Vorhandensein eines Chimärismus muss auch bei der Analyse der BCC-Größe beachtet werden. Falls nicht alle hämatopoetischen *Wnt5a^{+/+}* Zellen durch *Wnt5a*-defiziente ersetzt wurden, wird es sehr schwer sein, den Einfluss eines reinen *Wnt5a*-defizienten Stromas auf das BCC-Wachstum zu bestimmen. Außerdem muss beachtet werden, dass natürlich auch andere hämatopoetische Zellen wie beispielsweise B- und T-Zellen nach der Repopulation *Wnt5a*-defizient sind. Da auch diese Zellen in die Haut einwandern, können sie möglicherweise ebenfalls in das potentiell veränderte BCC-Wachstumsverhalten involviert sein.

Bezogen auf die Strahlung sollte noch erwähnt werden, dass die repopulierten *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse einer letalen Dosis ausgesetzt waren. Es ist daher nicht auszuschließen, dass strahlenbedingte Effekte den Organismus und auch die Haut

geschädigt haben. Falls solche Effekte auftreten sollten, sind sie wahrscheinlich nicht gravierend, da sie in keiner der bisher beschriebenen Studien diskutiert wurden.

Die transplantierten *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse werden momentan regelmäßig observiert und gewogen. Bisher sind die Tiere wohlauf. Das bedeutet, dass das *Wnt5a*-defiziente Knochenmark wahrscheinlich zu einem funktionstüchtigen Immun-/Blutsystem führt und nicht in Immun- oder Gerinnungsstörungen resultiert.

5.3.3 Effektive Depletion *Wnt5a*-exprimierender Makrophagen durch Clodrolip

Wie bereits mehrfach erwähnt, wurde die Spontanregression der BCC in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen mit der *Wnt5a* Expression in Makrophagen in Verbindung gebracht. In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde daher versucht, diese *Wnt5a*-exprimierenden Makrophagen im BCC-Stroma zu depletieren. Die Depletion erfolgte durch Applikation von Clodrolip.

Bei Clodrolip handelt es sich um in Liposomen-verpacktes Clodronat, ein Bisphosphonat. Bisphosphonate sind Medikamente, die für diagnostische und therapeutische Zwecke bei Knochen- sowie Calciumstoffwechselkrankheiten eingesetzt werden. Sie haben eine hohe Affinität zu anorganischen Calciumverbindungen, binden also an Knochensubstanz. Bisphosphonate, wie Clodronat, werden in der Klinik gegen Knochenmetastasen und wegen der hohen Endocytosekapazität von Osteoklasten gegen Knochenresorption eingesetzt (Rogers, MJ *et al.* 2000). Die therapeutischen Effekte von Clodronat werden hierbei durch Depletion von Makrophagen, zu deren Familie auch Osteoklasten gehören, hervorgerufen. Die Depletion von Makrophagen durch Clodronat erfolgt durch eine Störung der ATP-Synthese in diesen Zellen. Clodronat, also das Bisphosphonat, wird anstelle von Pyrophosphat in die ATP-Moleküle eingebaut. Dadurch wird Clodronat zum toxischen ATP-Analogon AppCCl₂p (Adenosin 5'-[β,γ-Dichlormethyl] Triphosphat) metabolisiert, das die mitochondriale ATP-Synthese hemmt. Die neu entstehende Verbindung kann nicht mehr hydrolytisch gespalten werden, führt zum Verlust des Membranpotentials und schließlich zur Induktion von Apoptosevorgängen.

Auch Clodrolip (d.h. in Liposomen-verpacktes Clodronat) führt zur Apoptose von Makrophagen. Dies konnte bislang nicht nur *in vitro* gezeigt werden (Hiraoka, K *et al.* 2008), sondern auch durch *in vivo* Experimente. So führt die Applikation von Clodrolip zur signifikanten Reduzierung der Anzahl infiltrierender mononukleärer Makrophagen in Tumoren (Zeisberger, SM *et al.* 2006; Gazzaniga, S *et al.* 2007). Weiterhin belegen mehrere Studien, dass Applikation von Clodrolip die Anzahl F4/80-positiver Zellen in der Peritonealhöhle sowie Mac1/Gr1-positiver Zellen im peripheren Blut und andere

mononukleäre Zellen vermindert (Priceman, SJ *et al.* ; Nakao, S *et al.* 2005; Torroella-Kouri, M *et al.* 2009).

Makrophagen sind wichtige Zellen des Immunsystems. Daher wurde in einem Vorversuch zunächst die Toleranz der Mäuse gegenüber der Substanz ausgetestet. In Anlehnung an die Empfehlungen von R. Schwendener erfolgte die Clodrolipapplikation jeden vierten Tag (erste Dosis 2mg/20g; folgende Dosen 1mg/20g). Die Mäuse vertrugen diese Dosis sogar über 75 Tage hinweg, ohne dass Gewichtsverlust oder weitere Anzeichen einer eingeschränkten Vitalität auftraten.

Die vorliegenden Daten zeigen eindeutig, dass die Applikation von Clodrolip in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen zur signifikanten Depletion von Makrophagen in Milz und Haut führte. So wiesen immunhistologische Antikörperfärbungen an Milzen von Clodrolip-behandelten Mäusen deutlich weniger F4/80-positive Zellen im Vergleich zu denen von Leerliposomen-behandelten Mäusen auf. Außerdem konnte über quantitative RT-PCR gezeigt werden, dass sowohl die *F4/80* als auch die *Mac1* Expression in der Milz und Haut nach Applikation von Clodrolip signifikant vermindert wurde. Diese Ergebnisse stimmen mit den Studien von Zeisberger *et al.*, Zumsteg *et al.* und Kataru *et al.* überein (Zeisberger, SM *et al.* 2006; Kataru, RP *et al.* 2009; Zumsteg, A *et al.* 2009). In der Studie von Zeisberger *et al.* führte die Applikation von Clodrolip zur Depletion F4/80 und MOMA-I positiver Zellen in der Milz. Zusätzlich zu diesen genannten Markern konnte eine Depletion CD11b positiver Zellen in Tumoren beobachtet werden, welche mit einer Inhibierung des Tumorstwachstums und mit gleichzeitiger Verminderung der Angiogenese korreliert (Zeisberger, SM *et al.* 2006). In der Studie von Kataru *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Clodrolipapplikation zur Depletion CD11b/Gr1 positiver Zellen der Haut führte (Kataru, RP *et al.* 2009). Auch in den *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen war nach Applikation von Clodrolip nahezu keine *F4/80* Expression in der Haut mehr nachzuweisen. Der noch geringe Anteil an vorhandener *Mac1* Expression lässt sich durch ständige Rekrutierung von Makrophagen in das Tumorgewebe erklären, da die Mäuse die Tumoren teilweise aufkratzen und es so zur verstärkten Inflammation der Haut kommen kann.

5.3.4 Effekt der Makrophagendepletion auf das BCC-Wachstum

Wie soeben erläutert, führte die Clodrolipbehandlung zur effizienten Makrophagendepletion in der Haut der BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse. Die Daten zeigten weiterhin, dass dies gleichzeitig mit einer signifikant verminderten *Wnt5a* Expression in der BCC-tragenden Haut einherging. Letzteres lässt nun den Schluss zu, dass die stromale *Wnt5a* Expression im BCC der *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse tatsächlich von Makrophagen ausgeht.

Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise neben Makrophagen auch noch andere stromale Zellen *Wnt5a* exprimieren. Die qRT-PCR Analyse der Haut belegte zwar, dass die *Wnt5a* Expression nach Clodrolipapplikation signifikant vermindert, allerdings nicht vollständig eliminiert war. Die Tatsache, dass sich jedoch auch die Makrophagenmarker *F4/80* bzw. *Mac1* in der Haut mittels PCR nach 75tägiger Applikation von Clodrolip nachweisen ließen, könnte die residuale *Wnt5a* Expression erklären. Auf der anderen Seite ist es möglich, dass Makrophagen nicht die alleinige Quelle für die stromale *Wnt5a* Expression im BCC sind. Aufgrund dieser Tatsachen ist es schwer zu beurteilen, ob *Wnt5a* ausschließlich von Makrophagen oder noch von anderen stromalen Zellen exprimiert wird.

Laut unserer Hypothese und den *in vitro* Daten stand das *Wnt5a* Level auch im direkten Zusammenhang mit der Induktion des Differenzierungsmarkers *K10*. Aufgrund dieser Annahme hätte daher eine verminderte *Wnt5a* Expression *in vivo* auch die Expression von *K10* in der BCC-tragenden Haut senken müssen. Die verminderte Expression dieses Differenzierungsmarkers konnte jedoch nicht eindeutig gezeigt werden. Dies kann möglicherweise mit der Behandlungsdauer (75 Tage) der BCC-tragenden Mäuse zusammenhängen. Dies widerspricht jedoch den erhobenen Daten hinsichtlich Proliferation und Größe der BCC, da beide Parameter nach Clodrolipapplikation zunahmten. Diese Daten lassen daher stark vermuten, dass *Wnt5a* Expression und *K10* Induktion nicht direkt miteinander verknüpft sind.

Die Beobachtung, dass die Clodrolip-Gabe tatsächlich mit einer Zunahme des BCC-Wachstums assoziiert ist, ist hochinteressant. So nahmen sowohl die Größe der BCC als auch die Anzahl Ki67 positiver Zellen nach Clodrolipapplikation - im Gegensatz zur Leerliposomenbehandlung - zu. Da dies a) mit einer verminderten Anzahl an Makrophagen und b) mit einer verminderten Expression von *Wnt5a* einherging, ist es möglich, dass Makrophagen, oder *Wnt5a* oder beide Faktoren in den *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen eine tumorsuppressorische Funktion im BCC haben.

Welcher Faktor bei der Hemmung des BCC-Wachstums wichtiger ist, ist schwer zu sagen. Es gibt Studien die belegen, dass tumorassoziierte Makrophagen (TAM) tatsächlich einen hemmenden Einfluss auf das Tumorstadium haben können (Hallam, S *et al.* 2009). Auf der anderen Seite ist bekannt, dass TAM durch Interaktion mit den Tumorzellen zur Produktion von angiogenen Faktoren, entzündlichen Cytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen angeregt werden. Dies kann dann einen fördernden Einfluss auf Angiogenese, Invasion und Metastasierung des Tumors haben (Polverini, PJ *et al.* 1977; Mantovani, A *et al.* 2003) und

mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit verschiedenen Tumoren assoziiert sein (Sunderkotter, C *et al.* 1994; Leek, RD *et al.* 1996).

Im *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mausmodell für BCC scheinen TAM möglicherweise einen solchen tumorhemmenden Einfluss zu haben (siehe auch Diskussion im Kapitel 5.3.4). Dies steht im Gegensatz zu einer Studie von Tjiu *et al.*, in der postuliert wird, dass TAM einen tumorfördernden Einfluss auf BCC haben könnten, indem sie COX2 in den Tumorzellen induzieren (Tjiu, JW *et al.* 2009). Dieser Rückschluss resultiert aus der Tatsache, dass aggressivere BCC vermehrt mit TAM infiltriert sind und dass die mit PMA-stimulierten THP-1 Zelllinie nach Kokultur mit einer BCC-Zelllinie von ATCC zur vermehrten COX2 Expression führt. Da jedoch bekannt ist, dass alle käuflichen BCC-Zelllinien zumindest bzgl. der Aktivität der Hh Signalkaskade keinerlei Ähnlichkeit mit nativen BCC haben und da THP-1 eine Leukämiezelllinie ist und zudem noch mit PMA stimuliert wurde, ist davon auszugehen, dass das *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mausmodell für BCC sehr viel näher an der realen Situation ist.

5.4 Zusammenfassung der Effekte von Ca²⁺ sowie einer Wnt5a-Manipulation auf BCC im Mausmodell

Zusammenfassend für die in den Abschnitten 5.2 und 5.3 diskutierten Daten kann man sagen, dass Wnt5a tatsächlich in Makrophagen exprimiert wird. Dies resultiert aus der Tatsache, dass eine Depletion von Makrophagen mit einer signifikanten Verminderung der Wnt5a Expression in der Haut korreliert. Da jedoch die Abnahme von Wnt5a nicht mit einer Abnahme von K10 korreliert, impliziert diese Tatsache, dass Wnt5a nicht in die Regulation dieses Differenzierungsmarkers involviert ist. Vielmehr scheint K10 durch Ca²⁺-abhängige Prozesse reguliert zu werden, die jedoch nicht Wnt5a-abhängig sind. Dies wird auch durch die Ionomycin-Applikation deutlich. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die K10 Expression in keinem direkten Zusammenhang mit der BCC-Regression steht.

Am interessantesten ist jedoch die Beobachtung, dass eine Verminderung des Wnt5a Expressionslevels mit einem stärkeren BCC-Wachstum korreliert. Daher kann man annehmen, dass Wnt5a im BCC tatsächlich die Rolle eines Tumorsuppressors spielt

5.5 Einfluss von Liposomen auf das Wachstum von BCC in *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen und auf BMDM in Zellkultur

Die oben diskutierten Daten zur Makrophagendepletion und dem Einfluss auf das BCC-Wachstum basierten auf einem Vergleich einer Clodrolip-/ mit einer Leerliposomenbehandlung. Obwohl dieser direkte Vergleich eindeutig zeigte, dass Clodrolip

(d.h. in Liposomen-verpacktes Clodronat) im Gegensatz zu Leerliposomen zu einer Abnahme von TAM, einer Abnahme von *Wnt5a* und zu einem vermehrten Tumorstadium führte, schien jedoch das BCC-Wachstum durch beide Medikamente generell blockiert zu sein.

So zeigen unsere Daten, dass die Tumoren sowohl nach Clodrolip-/ als auch Liposomenapplikation extrem viel kleiner waren als sonst gesehene BCC in unserer Arbeitsgruppe. Dies bedeutet, dass Liposomen, die ja auch für die Verpackung von Clodronat eingesetzt worden waren, *per se* eine tumorsuppressorische Wirkung haben könnten.

Die Beobachtung, dass möglicherweise schon die alleinige Applikation von Leerliposomen im *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* BCC-Mausmodell einen tumorsuppressorischen Effekt hat, war sehr erstaunlich. Studien anderer Arbeitsgruppen haben einen derartigen Einfluss bisher nicht beschrieben. In der Studie von Jeon *et al.* wird sogar explizit darauf hingewiesen, dass sich bei Analysen zur Lymphbahn-Angiogenese im Ovarialkarzinom die mit Kontrollliposomen-behandelten nicht von denen mit PBS-behandelten Mäuse unterschieden (Jeon, BH *et al.* 2008). Eine Studie zeigt jedoch, dass Leerliposomen die Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen in Nacktmäusen hemmen können. Die Autoren erklären diesen Effekt durch die Erhöhung des Phospholipid-Gehalts im Plasma, der zur systemischen Beeinflussung des Fettsäurestoffwechsels führen kann (Graeser, R *et al.* 2009). Aber auch in dieser Studie hatten die Liposomen keinen Einfluss auf das Wachstum des Primärtumors.

Um den tumorsuppressorischen Effekt von Liposomen im *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* BCC-Mausmodell zu bestätigen, wurde das Experiment nochmals wiederholt. Hierzu wurden BCC-tragende *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäuse mit Leerliposomen, dem Lösungsmittel PBS oder mit BLP (Pam₃CSK₄) behandelt. Bei BLP handelt es sich um ein bakterielles Lipoprotein. Die Wirkung dieses Lipoproteins beruht auf dem acetylierten Aminoterminus, welcher die Toll-Like-Rezeptoren TLR1/2 aktivieren kann. BLP ist somit ein TLR1/2-Agonist. Die Aktivierung von TLR1/2 resultiert in Aktivierung einer Signalkaskade, welche zur Induktion des Transkriptionsfaktors NF-κB führt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass BLP auch die Apoptose monozytärer Zellen sowie humaner epithelialer Zellen induzieren kann (Aliprantis, AO *et al.* 1999).

Von BLP ist weiterhin bekannt, dass es dosisabhängig zur Verkleinerung von Melanomen *in vivo* führt (Zhang, Y *et al.* 2011). Zudem konnte gezeigt werden, dass BLP auch eine antitumorale Wirkung auf Lungenkarzinomzellen hat. Wir sind daher davon ausgegangen, dass eine systemische Gabe von BLP auch in den *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen zur Hemmung des BCC-Wachstums führen könnte.

Dies ist tatsächlich der Fall und BLP führt im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrollen zu einer signifikanten Hemmung des BCC-Wachstums. Im gleichen Maße wie durch BLP wurde das Tumorstadium auch durch die Applikation von Liposomen gehemmt.

Das zeigt zunächst, dass eine Applikation von Liposomen tatsächlich das BCC-Wachstum hemmen kann. Die wachstumshemmende Wirkung von BLP und Liposomen ging dabei mit einer signifikanten Induktion des Differenzierungsmarkers *K10* einher. Dass diese Differenzierung direkt mit der Hemmung des Tumorstadiums in Zusammenhang steht, ist durch die im Abschnitt 4.2 gezeigten Daten jedoch eher unwahrscheinlich.

Die Hemmung des BCC-Wachstums durch BLP oder Liposomen kann jedoch mit der beobachteten Modulation des Immunsystems erklärt werden. So zeigen unsere Daten, dass sowohl die Applikation von Liposomen als auch von BLP *in vivo* im Vergleich zu PBS-Kontrollen zur Verringerung des Makrophagenanteils in der Milz (Mac1_F4/80 positive Zellen; signifikanter Effekt) und der Haut (Mac1_F4/80 positive Zellen; Mac1_Gr1 positive Zellen; nicht signifikanter Effekt) führt. Auch wird durch Liposomenapplikation der Anteil von Mac1_F4/80 positiven Peritonealzellen vermindert. Dagegen führt die Applikation von BLP zu einem drastischen Anstieg der F4/80 positiven Zellen in der Peritonealhöhle. Dieser enorme Anstieg von F4/80 positiven Peritonealzellen nach BLP-Applikation könnte darin begründet sein, dass die BLP-Applikation einen inflammatorischen Stimulus darstellt, der zur verstärkten Rekrutierung von Makrophagen geführt haben kann. So gehört das verabreichte BLP (Pam₃CSK₄) genau wie LPS zu den bakteriellen Lipoproteinen. Von BLP als auch von LPS ist bekannt, dass sie bei systemischer Applikation zur verstärkten Rekrutierung von Immunzellen führen können (Cabanski, M *et al.* 2009; Doi, K *et al.* 2009).

Liposomen dagegen führen zu einer signifikanten Abnahme der Makrophagen in der Peritonealhöhle. Dies zeigt, dass sich die Effekte von Liposomen und BLP auf Makrophagen unterscheiden. Das wird auch in den Zellkulturexperimenten deutlich, in denen BLP, nicht aber Liposomen, eine Freisetzung der Cytokine IL-6, MIP-1 α /CCL3, Rantes/CCL5, TNF- α , KC/CXCL1, und MCP-1/CCL2 induziert.

Nichtsdestotrotz führen beide Medikamente zu einer Abnahme von Makrophagen in Milz und Haut. Gerade die Abnahme der Makrophagen in der Haut könnte das Tumorstadium in diesem Experiment gehemmt haben, da die mit PBS-behandelten Tiere im Gegensatz zu Liposomen-/ bzw. BLP-behandelten Tiere a) eine höhere Zahl von Hautmakrophagen und b) größere BCC aufwiesen.

Die Abnahme der Makrophagen in Haut und Milz könnte wiederum durch die durchgeführten *in vitro* Experimente erklärt werden. So werden BMDM durch sowohl BLP als auch Liposomen in ihrer Proliferation gehemmt und zudem vermehrt in die Apoptose getrieben

(ein toxischer Effekt der Substanzen konnte in den Zellkulturexperimenten ausgeschlossen werden). Auf der anderen Seite werden die BMDM durch beide Substanzen aktiviert, da sie in Zellkultur eine größere migratorische Kapazität zeigen.

Für die Situation in den BLP-behandelten Tieren müsste dies dann zusammengefasst bedeuten, dass a) nach i.p. Injektion eine lokale inflammatorische Reaktion ausgelöst wird, die zur beobachteten lokalen Infiltration mit Makrophagen geführt hat (dies könnte möglicherweise durch eine BLP-bedingte Induktion von spezifischen Makrophagen-anlockenden Faktoren ausgelöst worden sein) und b) Makrophagen in ihrer Proliferation gestoppt und in die Apoptose getrieben werden (z.B. durch Stimulation von TLR2 (Aliprantis, AO *et al.* 1999)), was dann in Milz und Haut zu einer messbaren Abnahme der Makrophagen geführt hat.

Für die Liposomen-behandelten Tiere würden die Ergebnisse bedeuten, dass sich der Liposomen-induzierte antiproliferative und proapoptotische Effekt auf Makrophagen schon bei lokaler Injektion, sprich nach i.p. Injektion, bemerkbar macht und sich dann auch in der Peripherie, also in Milz und Haut, widerspiegelt. Diese Unterschiede der BLP-/ und Liposomenbehandlung könnten wiederum durch die oben beschriebenen Unterschiede in der Induktion von Cytokinen erklärt werden.

Nun wird sowohl durch eine Liposomen-/ als auch durch eine BLP-Behandlung die Tumorprogression gestoppt. In beiden Versuchsanordnungen korreliert dies mit einer Abnahme von TAM. Diese Tatsache bedeutet, dass TAM beim BCC tatsächlich auch einen tumorfördernden Effekt haben könnten. Dies steht auf den ersten Blick im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Experimenten mit Clodrolip. Unter der Clodrolipbehandlung kommt es zu einer ausgeprägteren Makrophagendepletion als mit Liposomen, allerdings scheint eine Makrophagendepletion im Gegensatz zur Liposomenbehandlung das Tumorstadium jedoch nicht so stark zu beeinflussen.

Wie schon im Abschnitt 5.3.4 diskutiert wurde, gibt es sowohl tumorfördernde als auch tumorhemmende TAM. Hierbei handelt es sich um den M1 und M2 Subtyp (Hallam, S *et al.* 2009). Grundsätzlich hängt die Induktion des Makrophagen-Phänotyps von der Mikroumgebung ab und kann durch T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen reguliert werden. M1 Makrophagen werden zumeist durch IFN- γ und durch LPS (TLR4-Agonist) aktiviert. Dann produzieren sie große Mengen an proinflammatorischen Cytokinen wie TNF und IL-12 (Mantovani, A *et al.* 2002), exprimieren hohe Level an MHC-Molekülen und können Tumorzellen abtöten. Dagegen wird der M2 Phänotyp durch IL-4, IL-13, IL-10, Immunkomplexe, Glucocorticoidhormone, Agonisten von TLR oder IL-1R induziert (Hallam,

S *et al.* 2009). Im Gegensatz zu M1 Makrophagen hemmen M2 Makrophagen eine inflammatorische Immunantwort und fördern die Angiogenese in Tumoren, d.h. sie haben eine tumorfördernde Funktion. Der M2 Phänotyp ist u.a. durch eine niedrige Expression von IL-12 und durch hohe Expression von IL-10 und IL1Ra charakterisiert (Mantovani, A *et al.* 2002).

Es ist möglich, dass sowohl BLP als auch Liposomen die Makrophagen in solch einer Art und Weise stimulieren, dass sie einen tumorhemmenden (M1) Phänotyp annehmen. Möglicherweise führen beide Substanzen zur Sekretion von bestimmten Cytokinen, die durch unsere Auswahl analysierter Cytokine nicht abgedeckt wurde. Es könnte auch sein, dass beide Substanzen die Sekretion bestimmter Cytokine hemmen, die normalerweise einen tumorfördernden Effekt haben. Hierbei könnte es sich beispielsweise um IL-10 handeln, welches weder durch BLP noch durch Liposomen in BMDM induziert wird. Dies könnte dann die Hemmung des BCC-Wachstums erklären. Clodronat könnte in nicht-depletierten Makrophagen hingegen eher einen M2 Phänotyp induzieren, so dass es gegenüber einer Liposomenbehandlung zu einem etwas verstärkten Tumorwachstum kommt. Dies könnte über bestimmte Cytokine laufen, die speziell durch Clodronat induziert werden und darüber hinaus für die Induktion eines M2 Phänotyps spezifisch sind. Sollte Clodronat tatsächlich den M2 Phänotyp induzieren können, würde entsprechend auch die Abnahme von *Wnt5a* typisch für einen M2 Subtyp sein.

6 Zusammenfassung

Das Basalzellkarzinom (BCC) ist der häufigste Tumor des Menschen. Interessanterweise zeigen etwa 20% der BCC eine Spontanregression. Eine Spontanregression der BCC tritt auch im *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mausmodell auf und geht mit einer Differenzierung der Tumoren sowie einer stromalen *Wnt5a* Expression einher. In Zellkulturexperimenten wird gezeigt, dass *Wnt5a* in tumorassoziierten Makrophagen durch unbekannte Faktoren induziert wird. *Wnt5a* wiederum induziert in den Tumorzellen die Expression des Differenzierungsmarkers *K10*, was über den *Wnt/Ca²⁺* Signalweg in Abhängigkeit der CaMKII vermittelt wird (veröffentlicht als Zweitautor in (Nitzki, F *et al.* 2010)). Aufgrund dieser Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass *Wnt5a* direkt in die Regression von BCC involviert ist, wobei es Differenzierungsvorgänge im BCC anregt.

Um zu überprüfen, ob diese Hypothese zutrifft, wurden mehrere Experimente an BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen durchgeführt. Diese Experimente umfassten den Einsatz des Calcium-Ionophors Ionomycin, die Generierung einer *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}Wnt5a^{+/-}* Mauslinie, sowie die Applikation von Clodrolip (in Liposomen-verpacktes Clodronat). Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass der Differenzierungsmarker *K10* in der tumortragenden Haut nicht durch *Wnt5a*, sondern lediglich *Ca²⁺*-abhängig reguliert wird. Auch wird gezeigt, dass Differenzierungsvorgänge eine untergeordnete Rolle beim BCC-Wachstum spielen. Sehr interessant ist die Beobachtung, dass eine Clodronat-vermittelte Makrophagendepletion in der Haut neben einer Reduzierung des *Wnt5a* Expressionslevels mit einem stärkeren BCC-Wachstum korreliert. Daher kann man davon ausgehen, dass *Wnt5a* im BCC tatsächlich die Rolle eines Tumorsuppressors spielt. Den eindeutigen Beweis hierfür wird ein noch nicht abgeschlossenes Experiment liefern, in dem in BCC-tragenden *Ptch^{flox/flox}ERT2^{+/-}* Mäusen *Wnt5a*-positive Makrophagen durch *Wnt5a*-defiziente ersetzt wurden.

Weiterhin wurde im Verlauf der Arbeit deutlich, dass auch Leerliposomen zur Makrophagendepletion und zur BCC-Wachstumshemmung führen können. Diese Effekte werden möglicherweise durch Liposomen-induzierte Proliferationshemmung, Apoptose und Migrationsstörung von Makrophagen ausgelöst, was eine Abnahme von tumorassoziierten Makrophagen in der BCC-tragenden Haut zur Folge hat.

Die Daten der vorliegenden Arbeit tragen somit zum besseren Verständnis der Spontanregression von BCC bei und können dadurch möglicherweise zu neuen Therapieansätzen gegen diesen sehr häufig auftretenden Tumor führen.

7 Abkürzungsverzeichnis

154CF	Medium 154 (calcium-free)
AP	alkalische Phosphatase
AppCCl ₂ p	Adenosin 5'-[β,γ-Dichlormethyl] Triphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
B6	C57BL/6N
BCC	Basal cell carcinoma – Basalzellkarzinom
BIM	Bisindolylmaleimid I; spezifischer PKC-Inhibitor
BLP	bacterial lipoprotein
BMDM	bone marrow-derived macrophages
bp	basepairs; Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2-Deoxyuridin
BSA	bovine serum albumine – Rinderserumalbumin
bspw	beispielsweise
c	Konzentration von Nukleinsäuren
CaMKII	Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Type II
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
cDNA	copyDNA
<i>Ci</i>	<i>Cubitus interruptus (D. Melanogaster Gli-Homolog)</i>
CM	conditioned medium; konditioniertes Medium
CML	chronisch myeloische Leukämien
CMV	Cytomegalie Virus
COX	Cyclooxygenase
Cre-ERT2	Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
Cy	Indodikarbocyanin-Derivate
d	days – Tage
DAB	Diamino-Benzidin
DB	Dot blot
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>Dhh</i>	<i>Desert Hedgehog</i>
Dkk-1	Dickkopf-1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	N.N.-Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
<i>dpc</i>	<i>days post coitum</i> (Tage nach der Kopulation)
DTT	Dithiothreitol
<i>Dvl</i>	<i>Dishevelled</i>
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
<i>ERT2</i>	Mauslinie <i>ROSA26CreERT2</i>
Fab	antigenbindendes Fragment

Abkürzungsverzeichnis

FACS	fluorescent-activated cell sorting (durchflusszytometrische Analyse)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOP	SuperFOP <i>Flash</i> -Expressionsplasmids
<i>Fu</i>	<i>Fused</i>
<i>Fzd</i>	<i>Frizzled</i>
G0-Phase	Ruhephase
G1-Phase	postmitotische Phase bzw. Präsynthesephase
G2-Phase	prämitotische Phase bzw. Postsynthesephase
G418	Geneticinsulfat
<i>Gapdh</i>	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphatase-dehydrogenase</i>
gDNA	genomische DNA
Gy	Gray
h	Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin
<i>Hh</i>	<i>Hedgehog</i>
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HSC70	Heat Shock Cognate 70-Proteins
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
<i>Ihh</i>	<i>Indian Hedgehog</i>
IL	Interleukin
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
IVC	individuell ventilierbarer Käfig
IvI	Involucrin
JNK	<i>c-Jun</i> -N-terminale Kinase
K1	Keratin 1
K10	Keratin 10
KC	keratinocyte-derived chemokine
kDa	Kilodalton
Kif7	<i>Kinesin family member 7</i>
KN-93	spezifischer Inhibitor der CaMKII
LacZ	β-Galaktosidase
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
<i>loxP</i>	<i>loxP</i> Sequenz (DNA-Konsensussequenz zur Bindung der Cre-Rekombinase)
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
MBSTL	Maleinsäure/Natriumchlorid/Levamisol/Tween-20-haltiger Puffer
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
min	Minute
MIP-1α	macrophage inflammatory protein-1 alpha
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumorvirus</i>

Abkürzungsverzeichnis

MOMA I	Monocyte/Macrophage I
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NT	Natriumchlorid/Tris-haltiger Puffer
ntc	no template control
NTMLT	Natriumchlorid/Tris/Magnesiumchlorid/Levamisol/Tween-20-haltiger Puffer
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pam ₃ CSK ₄	Pam3CysSerLys4
PBS	Phosphate buffered saline (Phoshat-gepufferte Natriumchlorid Lösung)
PCP	planar cell polarity
PCR	Polymerase chain reaction – Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PKC	Protein Kinase C
<i>Ptch</i>	<i>Patched</i>
<i>Ptch^{del}</i>	<i>Ptch</i> Allel mit Cre-vermittelter Deletion der Exone 8 und 9
<i>Ptch^{lox}</i>	<i>Ptch</i> Allel zur Cre-vermittelten Deletion der Exone 8 und 9
<i>Ptch^{wt}</i>	Wildtyp <i>Ptch</i> Allel
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> PCR
Rantes	CCL5; chemokine (C-C) motif ligand 5
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
S33Y	pCl-neo-b-catS33Y
SCC	squamous cell carcinoma – Plattenepithelkarzinom
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Shh</i>	<i>Sonic Hedgehog</i>
<i>Smo</i>	<i>Smoothened</i>
SNP	single nucleotide polymorphism – Einzelpunktmutation
SP600125	Inhibitor der JNK
S-Phase	Synthesephase
SSC	standard saline citrate (Standard Natriumcitrat Lösung)
STE	SDS/Tris/EDTA-haltiger Puffer
<i>Sufu</i>	<i>Suppressor of fused</i>
TAM	tumor-associated macrophages
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Lösung
TBS	tris-buffered saline (Tris-gepufferte Natriumchlorid Lösung)
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
Tgm	Transglutaminase
TLR	toll-like receptor

Abkürzungsverzeichnis

TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor alpha
TOP	SuperTOPFlash-Expressionsplasmids
U	unit (Enzymaktivitätseinheit)
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
v/v	volume/volume (Volumen/Volumen)
Vol	Volumen
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
WB	Western Blot
<i>Wif1</i>	<i>Wnt inhibitory factor 1</i>
<i>Wnt/WNT</i>	<i>Wingless</i>
WST	water soluble tetrazolium
wt	Wildtyp
xg	-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -Galaktosid

8 Literaturverzeichnis

- Abdulla, FR, *et al.* (2005). "Tanning and skin cancer." *Pediatr Dermatol* 22(6): 501-512.
- Aliprantis, AO, *et al.* (1999). "Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2." *Science* 285(5428): 736-739.
- Asplund, A, *et al.* (2008). "Expression profiling of microdissected cell populations selected from basal cells in normal epidermis and basal cell carcinoma." *Br J Dermatol* 158(3): 527-538.
- Aszterbaum, M, *et al.* (1999). "Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice [In Process Citation]." *Nat Med* 5(11): 1285-1291.
- Athar, M, *et al.* (2006). "Hedgehog signalling in skin development and cancer." *Exp Dermatol* 15(9): 667-677.
- Aziz, A, *et al.* (2006). "Development of macrophages with altered actin organization in the absence of MafB." *Mol Cell Biol* 26(18): 6808-6818.
- Berman, DM, *et al.* (2003). "Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours." *Nature* 425(6960): 846-851.
- Bittner, M, *et al.* (2000). "Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling." *Nature* 406(6795): 536-540.
- Blumenthal, A, *et al.* (2006). "The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation." *Blood* 108(3): 965-973.
- Bonifas, JM, *et al.* (2001). "Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas." *J Invest Dermatol* 116(5): 739-742.
- Boutros, M, *et al.* (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." *Cell* 94(1): 109-118.
- Bridge, JA, *et al.* (2000). "Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: an intergroup rhabdomyosarcoma study." *Genes Chromosomes Cancer* 27(4): 337-344.
- Cabanski, M, *et al.* (2009). "Genome-wide transcriptional profiling of mononuclear phagocytes recruited to mouse lungs in response to alveolar challenge with the TLR2 agonist Pam3CSK4." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(4): L608-618.
- Cabrera, CV, *et al.* (1987). "Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene." *Cell* 50(4): 659-663.
- Cebzat, M, *et al.* (2004). "Wnt inhibitory factor-1: a candidate for a new player in tumorigenesis of intestinal epithelial cells." *Cancer Lett* 206(1): 107-113.
- Chen, X, *et al.* (2007). "Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: its inhibition leads to growth suppression and apoptosis." *Cancer Sci* 98(1): 68-76.
- Church, VL und Francis-West, P (2002). "Wnt signalling during limb development." *Int J Dev Biol* 46(7): 927-936.
- Clevers, H (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." *Cell* 127(3): 469-480.
- Cohen, MM, Jr. (2010). "Hedgehog signaling update." *Am J Med Genet A* 152A(8): 1875-1914.
- Collinet, P, *et al.* (2006). "In vivo expression and antitumor activity of p53 gene transfer with naked plasmid DNA in an ovarian cancer xenograft model in nude mice." *J Obstet Gynaecol Res* 32(5): 449-453.
- Crowson, AN (2006). "Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications." *Mod Pathol* 19 Suppl 2: S127-147.
- Curson, C und Weedon, D (1979). "Spontaneous regression in basal cell carcinomas." *J Cutan Pathol* 6(5): 432-437.
- Dogliani, C, *et al.* (2003). "Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation." *Am J Pathol* 163(6): 2277-2287.
- Doi, K, *et al.* (2009). "Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury." *J Clin Invest* 119(10): 2868-2878.
- El-Bahrawy, M, *et al.* (2003). "Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma." *Br J Dermatol* 148(5): 964-970.
- Epstein, EH (2008). "Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog." *Nat Rev Cancer* 8(10): 743-754.
- Evangelista, M, *et al.* (2006). "The hedgehog signaling pathway in cancer." *Clin Cancer Res* 12(20 Pt 1): 5924-5928.

- Fan, H und Khavari, PA (1999). "Sonic hedgehog opposes epithelial cell cycle arrest." *J Cell Biol* 147(1): 71-76.
- Fanto, M, et al. (2000). "Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye." *Curr Biol* 10(16): 979-988.
- Gailani, MR, et al. (1992). "Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9." *Cell* 69(1): 111-117.
- Gailani, MR, et al. (1996). "Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma [see comments]." *J Natl Cancer Inst* 88(6): 349-354.
- Gazzaniga, S, et al. (2007). "Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft." *J Invest Dermatol* 127(8): 2031-2041.
- Giles, RH, et al. (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer." *Biochim Biophys Acta* 1653(1): 1-24.
- Goppner, D und Leverkus, M (2011). "Basal cell carcinoma: from the molecular understanding of the pathogenesis to targeted therapy of progressive disease." *J Skin Cancer* 2011: 650258.
- Gordon, MD und Nusse, R (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." *J Biol Chem* 281(32): 22429-22433.
- Gorlin, RJ (1987). "Nevoid basal-cell carcinoma syndrome." *Medicine (Baltimore)* 66(2): 98-113.
- Graeser, R, et al. (2009). "Antimetastatic effects of liposomal gemcitabine and empty liposomes in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer." *Pancreas* 38(3): 330-337.
- Habas, R, et al. (2003). "Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation." *Genes Dev* 17(2): 295-309.
- Hahn, H, et al. (1996). "Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome." *Cell* 85(6): 841-851.
- Hallam, S, et al. (2009). "Activated macrophages in the tumour microenvironment-dancing to the tune of TLR and NF-kappaB." *J Pathol* 219(2): 143-152.
- Hamed, S, et al. (2004). "Accelerated induction of bladder cancer in patched heterozygous mutant mice." *Cancer Res* 64(6): 1938-1942.
- Hameyer, D, et al. (2007). "Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues." *Physiol Genomics* 31(1): 32-41.
- Hammerschmidt, M, et al. (1996). "Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo." *Genes Dev* 10(6): 647-658.
- Han, YG, et al. (2009). "Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development." *Nat Med* 15(9): 1062-1065.
- Hatsell, S, et al. (2003). "Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8(2): 145-158.
- He, X, et al. (1997). "A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A." *Science* 275(5306): 1652-1654.
- He, X, et al. (2004). "LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way." *Development* 131(8): 1663-1677.
- Heller, R, et al. (2001). "Intradermal delivery of interleukin-12 plasmid DNA by in vivo electroporation." *DNA Cell Biol* 20(1): 21-26.
- Hengge, UR, et al. (1996). "Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin." *J Clin Invest* 97(12): 2911-2916.
- Henneman, ZJ, et al. (2008). "Bisphosphonate binding affinity as assessed by inhibition of carbonated apatite dissolution in vitro." *J Biomed Mater Res A* 85(4): 993-1000.
- Hennings, H, et al. (1980). "Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture." *Cell* 19(1): 245-254.
- Hikasa, H, et al. (2002). "The *Xenopus* receptor tyrosine kinase *Xror2* modulates morphogenetic movements of the axial mesoderm and neuroectoderm via Wnt signaling." *Development* 129(22): 5227-5239.
- Hiraoka, K, et al. (2008). "Inhibition of bone and muscle metastases of lung cancer cells by a decrease in the number of monocytes/macrophages." *Cancer Sci* 99(8): 1595-1602.
- Holmberg, E, et al. (1996). "Differential allele loss on chromosome 9q22.3 in human non-melanoma skin cancer." *Br J Cancer* 74(2): 246-250.
- Hooper, JE und Scott, MP (2005). "Communicating with Hedgehogs." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(4): 306-317.
- Horton, HM, et al. (1999). "A gene therapy for cancer using intramuscular injection of plasmid DNA encoding interferon alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1553-1558.

- Hsieh, JC, *et al.* (1999). "A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities." *Nature* 398(6726): 431-436.
- Hunt, MJ, *et al.* (1994). "Regression in basal cell carcinoma: an immunohistochemical analysis." *Br J Dermatol* 130(1): 1-8.
- Iozzo, RV, *et al.* (1995). "Aberrant expression of the growth factor Wnt-5A in human malignancy." *Cancer Res* 55(16): 3495-3499.
- Itoh, K, *et al.* (1998). "A role for *Xenopus* Frizzled 8 in dorsal development." *Mech Dev* 74(1-2): 145-157.
- Jan, HM, *et al.* "The use of polyethylenimine-DNA to topically deliver hTERT to promote hair growth." *Gene Ther* 19(1): 86-93.
- Jeon, BH, *et al.* (2008). "Profound but dysfunctional lymphangiogenesis via vascular endothelial growth factor ligands from CD11b+ macrophages in advanced ovarian cancer." *Cancer Res* 68(4): 1100-1109.
- Johnson, RL, *et al.* (1996). "Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome." *Science* 272(5268): 1668-1671.
- Jonsson, M, *et al.* (2002). "Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas." *Cancer Res* 62(2): 409-416.
- Kataru, RP, *et al.* (2009). "Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution." *Blood* 113(22): 5650-5659.
- Kichler, A (2004). "Gene transfer with modified polyethylenimines." *J Gene Med* 6 Suppl 1: S3-10.
- Kohn, AD und Moon, RT (2005). "Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways." *Cell Calcium* 38(3-4): 439-446.
- Korinek, V, *et al.* (1997). "Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma." *Science* 275(5307): 1784-1787.
- Kremenevskaja, N, *et al.* (2005). "Wnt-5a has tumor suppressor activity in thyroid carcinoma." *Oncogene* 24(13): 2144-2154.
- Kuhl, M, *et al.* (2000). "Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*." *J Biol Chem* 275(17): 12701-12711.
- Lacarrubba, F, *et al.* (2011). "Successful treatment and management of large superficial basal cell carcinomas with topical imiquimod 5% cream: a case series and review." *J Dermatolog Treat* 22(6): 353-358.
- Lam, CW, *et al.* (1999). "A frequent activated smoothed mutation in sporadic basal cell carcinomas." *Oncogene* 18(3): 833-836.
- Lambiv, WL, *et al.* "The Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) is targeted in glioblastoma and has a tumor suppressing function potentially by induction of senescence." *Neuro Oncol* 13(7): 736-747.
- Leek, RD, *et al.* (1996). "Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma." *Cancer Res* 56(20): 4625-4629.
- Lemkine, GF und Demeneix, BA (2001). "Polyethylenimines for in vivo gene delivery." *Curr Opin Mol Ther* 3(2): 178-182.
- Leris, AC, *et al.* (2005). "WNT5A expression in human breast cancer." *Anticancer Res* 25(2A): 731-734.
- Li, L, *et al.* (2009). "Wnt5a induces simultaneous cortical axon outgrowth and repulsive axon guidance through distinct signaling mechanisms." *J Neurosci* 29(18): 5873-5883.
- Liang, H, *et al.* (2003). "Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue." *Cancer Cell* 4(5): 349-360.
- Lien, MH und Sondak, VK (2011). "Nonsurgical treatment options for Basal cell carcinoma." *J Skin Cancer* 2011: 571734.
- Lin, YC, *et al.* (2007). "Wnt inhibitory factor-1 gene transfer inhibits melanoma cell growth." *Hum Gene Ther* 18(4): 379-386.
- Lindstrom, E, *et al.* (2006). "PTCH mutations: distribution and analyses." *Hum Mutat* 27(3): 215-219.
- Logan, CY und Nusse, R (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 781-810.
- Malek, A, *et al.* (2009). "In vivo pharmacokinetics, tissue distribution and underlying mechanisms of various PEI(-PEG)/siRNA complexes." *Toxicol Appl Pharmacol* 236(1): 97-108.
- Mancuso, M, *et al.* (2004). "Basal cell carcinoma and its development: insights from radiation-induced tumors in *Ptch1*-deficient mice." *Cancer Res* 64(3): 934-941.
- Mantovani, A, *et al.* (2003). "Tumor-associated macrophages and dendritic cells as prototypic type II polarized myeloid populations." *Tumori* 89(5): 459-468.

- Mantovani, A, et al. (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." *Trends Immunol* 23(11): 549-555.
- Mikels, AJ und Nusse, R (2006). "Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context." *PLoS Biol* 4(4): e115.
- Morin, PJ, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." *Science* 275(5307): 1787-1790.
- Mullor, JL, et al. (2001). "Wnt signals are targets and mediators of Gli function." *Curr Biol* 11(10): 769-773.
- Murphy, LL und Hughes, CC (2002). "Endothelial cells stimulate T cell NFAT nuclear translocation in the presence of cyclosporin A: involvement of the wnt/glycogen synthase kinase-3 beta pathway." *J Immunol* 169(7): 3717-3725.
- Nakao, S, et al. (2005). "Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth." *J Clin Invest* 115(11): 2979-2991.
- Nitzki, F, et al. (2010). "Tumor stroma-derived Wnt5a induces differentiation of basal cell carcinoma of Ptch-mutant mice via CaMKII." *Cancer Res* 70(7): 2739-2748.
- Nusse, R und Varmus, HE (1992). "Wnt genes." *Cell* 69(7): 1073-1087.
- Nusslein-Volhard, C und Wieschaus, E (1980). "Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila." *Nature* 287(5785): 795-801.
- Palmer, HG, et al. (2008). "The vitamin D receptor is a Wnt effector that controls hair follicle differentiation and specifies tumor type in adult epidermis." *PLoS ONE* 3(1): e1483.
- Pandur, P, et al. (2002). "Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis." *Nature* 418(6898): 636-641.
- Pazzaglia, S, et al. (2004). "Modulation of patched-associated susceptibility to radiation induced tumorigenesis by genetic background." *Cancer Res* 64(11): 3798-3806.
- Perchellet, EM, et al. (1990). "Ability of the Ca2+ ionophores A23187 and ionomycin to mimic some of the effects of the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on hydroperoxide production, ornithine decarboxylase activity, and DNA synthesis in mouse epidermis in vivo." *Cancer Res* 50(18): 5806-5812.
- Polverini, PJ, et al. (1977). "Activated macrophages induce vascular proliferation." *Nature* 269(5631): 804-806.
- Pongracz, JE und Stockley, RA (2006). "Wnt signalling in lung development and diseases." *Respir Res* 7: 15.
- Priceman, SJ, et al. "Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy." *Blood* 115(7): 1461-1471.
- Pukrop, T, et al. (2006). "Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14): 5454-5459.
- Raffel, C, et al. (1997). "Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations." *Cancer Res* 57(5): 842-845.
- Reddy, S, et al. (2001). "Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis." *Mech Dev* 107(1-2): 69-82.
- Reddy, ST, et al. (2004). "Expression of Frizzled genes in developing and postnatal hair follicles." *J Invest Dermatol* 123(2): 275-282.
- Reifenberger, J, et al. (2005). "Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas." *Br J Dermatol* 152(1): 43-51.
- Reifenberger, J, et al. (1998). "Missense mutations in SMOH in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system." *Cancer Res* 58(9): 1798-1803.
- Reya, T und Clevers, H (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." *Nature* 434(7035): 843-850.
- Rijsewijk, F, et al. (1987). "The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." *Cell* 50(4): 649-657.
- Robinson, JK und Dahiya, M (2003). "Basal cell carcinoma with pulmonary and lymph node metastasis causing death." *Arch Dermatol* 139(5): 643-648.
- Roewert-Huber, J, et al. (2007). "Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma." *Br J Dermatol* 157 Suppl 2: 47-51.
- Rogers, MJ, et al. (2000). "Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates." *Cancer* 88(12 Suppl): 2961-2978.
- Rubin, AI, et al. (2005). "Basal-cell carcinoma." *N Engl J Med* 353(21): 2262-2269.
- Saldanha, G, et al. (2004). "Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation." *Br J Dermatol* 151(1): 157-164.

- Saneyoshi, T, et al. (2002). "The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos." *Nature* 417(6886): 295-299.
- Scales, SJ und de Sauvage, FJ (2009). "Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy." *Trends Pharmacol Sci*.
- Sharma, RP und Chopra, VL (1976). "Effect of the Wingless (*wg1*) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* 48(2): 461-465.
- Sheldahl, LC, et al. (1999). "Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner." *Curr Biol* 9(13): 695-698.
- Sheldahl, LC, et al. (2003). "Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos." *J Cell Biol* 161(4): 769-777.
- Stark, K, et al. (1994). "Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4." *Nature* 372(6507): 679-683.
- Sunderkotter, C, et al. (1994). "Macrophages and angiogenesis." *J Leukoc Biol* 55(3): 410-422.
- Thayer, SP, et al. (2003). "Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis." *Nature* 425(6960): 851-856.
- Titomirov, AV, et al. (1991). "In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA." *Biochim Biophys Acta* 1088(1): 131-134.
- Tjiu, JW, et al. (2009). "Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction." *J Invest Dermatol* 129(4): 1016-1025.
- Torroella-Kouri, M, et al. (2009). "Identification of a subpopulation of macrophages in mammary tumor-bearing mice that are neither M1 nor M2 and are less differentiated." *Cancer Res* 69(11): 4800-4809.
- Tostar, U, et al. (2006). "Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development." *J Pathol* 208(1): 17-25.
- Uhmann, A, et al. (2007). "The Hedgehog receptor Patched controls lymphoid lineage commitment." *Blood* 110(6): 1814-1823.
- Uhmann, A, et al. (2005). "A model for PTCH1/Ptch1-associated tumors comprising mutational inactivation and gene silencing." *Int J Oncol* 27(6): 1567-1575.
- Umbhauer, M, et al. (2000). "The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling." *Embo J* 19(18): 4944-4954.
- Vorechovsky, I, et al. (1997). "Somatic mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in primitive neuroectodermal tumours." *Oncogene* 15(3): 361-366.
- Walling, HW, et al. (2004). "Aggressive basal cell carcinoma: presentation, pathogenesis, and management." *Cancer Metastasis Rev* 23(3-4): 389-402.
- Watkins, DN, et al. (2003). "Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer." *Nature* 422(6929): 313-317.
- Weeraratna, AT, et al. (2002). "Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma." *Cancer Cell* 1(3): 279-288.
- Wetmore, C (2003). "Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models." *Curr Opin Genet Dev* 13(1): 34-42.
- Wissmann, C, et al. (2003). "WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer." *J Pathol* 201(2): 204-212.
- Wong, DA, et al. (2000). "Cytokine profiles in spontaneously regressing basal cell carcinomas." *Br J Dermatol* 143(1): 91-98.
- Wong, SY, et al. (2009). "Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis." *Nat Med* 15(9): 1055-1061.
- Wust, S, et al. (2008). "Peripheral T cells are the therapeutic targets of glucocorticoids in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* 180(12): 8434-8443.
- Xie, J, et al. (1998). "Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma." *Nature* 391(6662): 90-92.
- Yamaguchi, TP, et al. (1999). "A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo." *Development* 126(6): 1211-1223.
- Yang, SH, et al. (2008). "Pathological responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/beta3-catenin signaling." *Nat Genet* 40(9): 1130-1135.
- Zeisberger, SM, et al. (2006). "Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach." *Br J Cancer* 95(3): 272-281.

- Zeng, X, et al. (2008). "Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions." *Development* 135(2): 367-375.
- Zhai, L, et al. (2004). "Drosophila wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine." *J Biol Chem* 279(32): 33220-33227.
- Zhang, Y, et al. (2011). "TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells." *J Immunol* 186(4): 1963-1969.
- Zibat, A, et al. (2010). "Activation of the hedgehog pathway confers a poor prognosis in embryonal and fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma." *Oncogene*: Sep 6. [Epub ahead of print].
- Zibat, A, et al. (2009). "Time-point and dosage of gene inactivation determine the tumor spectrum in conditional Ptch knockouts." *Carcinogenesis* 30(6): 918-926.
- Zumsteg, A, et al. (2009). "Myeloid cells contribute to tumor lymphangiogenesis." *PLoS One* 4(9): e7067.

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik (Universität Göttingen) in der Abteilung Molekulare Entwicklungsgenetik unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Heidi Hahn angefertigt.

Mein Dank gilt daher in erster Linie Dir, Heidi! Nicht nur für die Bereitstellung des überaus spannenden Themas und die intensive wissenschaftliche Betreuung, sondern auch dafür, dass Du wirklich jederzeit bei notwendigem Diskussionsbedarf hinsichtlich des Projektes für Deine Mitarbeiter ansprechbar bist.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Felix Brembeck sowie Herrn Prof. Dr. Matthias Dobbstein für die wissenschaftliche Unterstützung bzw. wertvollen Anregungen während der Thesis Committee Meetings bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dobbstein für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich an dieser Stelle Dr. Tobias Pukrop für die interessanten Anregungen sowie PD Dr. Walter Schulz-Schaeffer für die Interpretation histologischer Färbungen danken.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Kai Dittmann und Dr. Michael Engelke (Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie, Universität Göttingen) für die Ermöglichung der FACS-Analysen.

Weiterhin gilt ein großer Dank unserer gesamten Arbeitsgruppe für die entspannte Arbeitsatmosphäre und die unterhaltsamen Mittagspausen. Ach, es ist schön mit euch!

Insbesondere danke ich Dr. Frauke Nitzki und Dr. Arne Zibat, weiterhin Dr. Anja Uhmann, Diana Marklein und Penelope Pelczar für den wissenschaftlichen und auch nicht-wissenschaftlichen Austausch. Außerdem möchte ich mich bei Ina Heß & Anke Frommhold für ihre technische Unterstützung sowie allen für ihre Menschlichkeit im „ganz normalen Laboralltag“ danken.

Mein herzlicher Dank gilt jedoch meiner Mutter für ihr immerwährendes Verständnis und ihre Unterstützung egal in welcher Hinsicht – eine Verbindung, die keiner Worte bedarf.

Schön, dass ich Dich habe & danke für alles, Mama!

10 Curriculum vitae

Persönliche Angaben

geboren am 26. Januar 1982 in Stade

Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung

SS 2012

Disputation und Abschluss der Dissertation (Dr. rer. nat)

08/2008 bis 01/2012

Promotion am Institut für Humangenetik (Abteilung Molekulare Entwicklungsgenetik), Arbeitsgruppe Prof. Dr. Heidi Hahn, Georg-August-Universität Göttingen

„Die Rolle von Wnt5a im Basalzellkarzinom“

02/2008

Diplom in Biologie (Note: sehr gut)

2007-2008

Diplomarbeit am Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie & Anthropologie, Georg-August-Universität Göttingen

10/2003

Vordiplom in Biologie

2001-2007

Studium der Biologie, Georg-August-Universität Göttingen

05/2001

Abitur, Vincent-Lübeck-Gymnasium Stade

Berufserfahrung und Praktika

04/2006 bis 05/2008

Studentische bzw. wissenschaftliche Hilfskraft am Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie & Anthropologie, Georg-August-Universität Göttingen

07/2005

Praktikum in der Rechtsmedizin, Abteilung Forensische Entomologie, an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main

Publikationen

Nitzki, F, *et al.* (2010). "Tumor stroma-derived Wnt5a induces differentiation of basal cell carcinoma of *Ptch*-mutant mice via CaMKII." *Cancer Res* 70(7): 2739-2748.

