

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

**Das Migrationsverhalten von Brustkrebszellen unter Einfluss von
Wnt-Signaling**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von

Julia Katharina Schoenen

aus

Würzburg

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo Klaus Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Tobias Pukrop

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Martin Oppermann

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2016

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	7
1.1	Zellmigration.....	7
1.2	Die ECM.....	9
1.3	Tumorausbreitung und Wundheilung: Parallelen und Unterschiede.....	10
1.4	Grundlagen der physiologischen und malignen Invasion und Metastasierung.....	13
1.5	Die Familie der Wnt-Gene.....	15
1.6	Wnt-Effekte über verschiedene Signalwege	17
1.6.1	Der kanonische Wnt-Signalweg	17
1.6.2	Die nicht-kanonischen Wnt-Signalwege	19
1.7	Antagonisten des Wnt-Signaling: die Dickkopf-Proteine	22
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	23
2	Material.....	25
2.1	Zelllinie.....	25
2.2	Rekombinante Proteine	25
2.3	Verbrauchsmaterialien	25
2.4	Verwendete Geräte	26
2.5	Analysesoftware	27
2.6	Verwendete Chemikalien, Puffer und Substanzen.....	27
2.7	Puffer, Lösungen und Medien für die Zellkultur.....	28
3	Methoden.....	29
3.1	Zellkulturmethoden.....	29
3.1.1	Standardkultivierung für MCF-7- Zellen.....	29
3.1.2	Kryokonservierung von Zellen	30
3.1.3	Revitalisierung kryokonservierter Zellen.....	30
3.2	Zellzahlbestimmung.....	30
3.3	Migrationsassay auf ECM	31
3.4	Neu etablierte Methode Modifizierter Konfrontationsassay auf ECM.....	33

3.5	Mikroskopie	36
3.6	Der colorimetrische MTT-Test zur Messung der Zytotoxizität	37
3.7	Markierungsfreie Zellanalyse durch Impedanzmessung.....	37
3.8	Statistische Auswertung.....	39
4	Ergebnisse der Migrationsuntersuchungen auf ECM.....	40
4.1	Kein Einfluss von Wnt5b und Dkk-2 auf die Viabilität der Zellen im MTT-Assay auf ECM	41
4.2	Kein Einfluss von Wnt5b und Dkk-2 auf die Zellproliferation in der Analyse mit dem xCELLigence System.....	41
4.3	Kein Einfluss von Wnt5b und Dkk-2 auf die Zellmigration im Migrationsassay auf ECM	42
5	Ergebnisse der Methodenentwicklung Konfrontationsassay auf ECM	46
5.1	Dreidimensionaler Start und Konfrontation	46
5.2	Migrationsfronten wandern umgeben von ECM aufeinander zu	48
5.3	Messung der zurückgelegten Distanzen der Migrationsfronten	48
5.4	Zugabe der Faktoren Wnt5b und Dkk-2 innerhalb des Konfrontationsassays auf ECM	49
5.5	Ergebnis der Untersuchungen mit der Methode Konfrontationsassay auf ECM: Kein Einfluss von Wnt5b und Dkk-2 auf das Migrationsverhalten.....	51
6	Diskussion der Ergebnisse.....	53
6.1	Bisherige Beobachtungen zur Bedeutung von Wnt5b und Dkk-2 für die Ausbreitung epithelialer Zellen	53
6.1.1	Aktivierung der Invasion epithelialer Zellen durch Wnt5b.....	53
6.1.2	Blockierung der Invasion epithelialer Zellen durch Dkk-2.....	53
6.2	Kein Einfluss von Wnt5b und Dkk-2 auf die Zellmigration in den Assaymodellen auf ECM	54
6.3	Kritik der Methode Migrationsassay auf ECM	55
6.3.1	Unterschiedliches Migrationsverhalten in Abhängigkeit vom Untergrund epithelialer Zellen	55
6.3.2	Unterschied bei der Zellmigration <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> und Invasion	56
6.4	Diskussion der Methodenentwicklung Konfrontationsassay auf ECM	57

6.4.1	Konventionelle zweidimensionale Scratchassays auf Plastikuntergrund.....	57
6.4.2	Vernachlässigung der Komponente extrazelluläre Matrix im Scratchassay auf Plastikuntergrund.....	57
6.4.3	Konfrontation auf ECM statt Scratch: der verletzungsfreie Assay als alternatives <i>In-Vitro</i> -Modell	58
6.4.4	Kein Einfluss von Wnt5b und Dkk-2 auf die Migrationsgeschwindigkeit epithelialer Zellen im Konfrontationsassay auf ECM	59
6.4.5	Möglichkeiten und Grenzen des <i>In-Vitro</i> -Modells zur epithelialen Wundheilung	59
6.4.6	Perspektiven zur Weiterentwicklung des Konfrontationsassays auf ECM	60
6.5	Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	60
7	Zusammenfassung	63
8	Literaturverzeichnis	64

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP-1	Activator Protein-1
APC	Adenomatous Polyposis Coli (Tumor-Suppressor-Protein)
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
CamKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II
c-Jun	Proto-Onkogen
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
Dkk-2	Dickkopf-Protein 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Dvl	<i>Dishevelled</i> (Protein) in Vertebraten
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ehtylendiamin-Tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKS	fötales Kälberserum
Fzd	<i>frizzled</i> -Rezeptor
°C	Grad Celsius
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3β
h	Stunde(n)

JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Krm	Kremen
l	Liter
LEF	<i>lymphoid enhancer factor</i>
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
M	molar (mol/l) (Molarität)
MET	<i>Mesenchymal-epithelial transition</i>
m	Meter
m-	milli (1×10^{-3})
μ -	mikro (1×10^{-6})
min	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMTV	<i>Mouse Mammary Tumor Virus</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCP	<i>Planar Cell Polarity</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein Kinase C
Rac	<i>Ras-like protein</i>
Rho	<i>Ras homologue gene family</i>
ROCK	<i>Rho associated coiled-coil domain protein kinase</i>
RPMI 1640	am Roswell Park Memorial Institute etabliertes Medium
s	Sekunde(n)
sFRP	Secreted Fz-Related Protein
TCF	<i>T-cell factor</i>
U	unit (Enzymaktivitätseinheit)

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	<i>volume/volume</i>
Wg	<i>wingless protein</i>
WIF	<i>Wnt inhibitory factor</i>
Wnt	<i>Wingless Type MMTV Integration Site Family</i>
(w/v)	<i>weight/volume</i>
x g	x-fache Erdbeschleunigung ($g = 9,80665 \text{ m/s}^2$)

1 EINLEITUNG

1.1 ZELLMIGRATION

Zellmigration spielt in zahlreichen biologischen Prozessen eine zentrale Rolle, sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Zusammenhängen. Während der Embryogenese und Organentwicklung ist die Zellmigration wesentlich, ebenso wie im adulten Organismus bei der Rekrutierung von Entzündungszellen, bei der Gewebereparatur oder bei der Gefäßneubildung. Abnorme Regulation von Zellmigration treibt das Fortschreiten verschiedener Krankheiten des erwachsenen Organismus voran und ist damit maßgeblich beteiligt an der Tumorinvasion und der Metastasierung (Yamaguchi et al. 2005).

An der Einzelzelle beobachtet, ist der Vorgang der Migration ein zyklischer, fünfschrittiger Prozess, der einem Vorwärtskrabbeln der Zelle auf ihrem Untergrund gleicht. Protrusive Aktivitäten an der Zellfront, kombiniert mit einer Nachziehbewegung des restlichen Zellkörpers, sind dabei sorgfältig koordinierte Abläufe (Lauffenburger und Horwitz 1996; Mitchison und Cramer 1996; Friedl und Wolf 2003). Die Zelle bildet als initiale Antwort auf einen promigratorischen Stimulus eine Polarität ihres Zellkörpers aus. Sie orientiert dabei ihr Innenleben nach der Richtung der Migration. Dabei nimmt die Zelle eine dreieckige Form an mit einer breiten Seite an ihrer Front und einem schmalen, dünn auslaufenden Fortsatz an ihrer Hinterseite (Lauffenburger und Horwitz 1996; Horwitz und Parsons 1999). Es existiert somit eine klare räumliche Asymmetrie, wobei molekulare Prozesse an der Zellfront andere sind als an der Zellhinterseite. Die Verteilung des Aktins innerhalb der Zelle ändert sich, chemosensorische Rezeptoren werden umverteilt, genau wie bestehende Verbindungen zum Zytoskelett. Als Konsequenz dieser Polarität findet im zweiten Schritt die Membranextension in Form von Ausläufern hauptsächlich an der Zellfront und in Richtung der Migration statt. Es bilden sich sowohl breite, flache Strukturen aus gitternetzartig angeordneten Aktinfilamenten, die Lamellipodien, als auch dünne, zylinderförmige Ausläufer aus zusammengelagerten Aktinfilamentbündeln, sogenannte Filopodien. Diese können als Antwort auf migratorische Stimuli reversibel an den Rändern der Zellvorderseite ausgefahren werden und beruhen auf lokaler Neuordnung von Aktinfilamenten in der Nähe der Zellmembran (Mitchison und Cramer 1996; Pollard und Borisy 2003). Es werden im Folgenden an den äußeren Enden der Lamelli- bzw. Filopodien Integrin-vermittelte Bindungskomplexe zu Bestandteilen der zugrundeliegenden Extrazellulären Matrix (ECM) ausgebildet. Auf molekularer Ebene sind die kleinen GTPasen der Rho-Familie (Rac, Rho und Cdc42) an den beschriebenen Vorgängen maßgeblich beteiligt (Hall 1998). Dabei ist

Rac wesentlich, um die Aktin-vermittelten Protrusionen an der Zellfront auszubilden, Rho reguliert die Bildung kontraktile Stressfasern und wird für die Bildung der Adhäsionskomplexe benötigt. Cdc42 ist hauptsächlich dafür verantwortlich, den polarisierten Phänotyp der Zellen aufrechtzuerhalten (Nobes und Hall 1995; Nobes und Hall 1999). Zur gleichen Zeit erfolgt eine Aktivierung von Oberflächen-Proteasen, welche eine lokale, perizelluläre Proteolyse der an die Zelle grenzenden ECM-Bestandteile erreichen. Sowohl bei der Protrusion der Zellausläufer an der Zellfront als auch bei der nun folgenden Traktionsbewegung, um den Zellkörper nachzuziehen, sind kontraktile, an Aktin gekoppelte Myosinketten beteiligt (Wolenski 1995). Sie bewirken ein ATP-vermitteltes Vorwärtsgleiten der Zelle über ihren Untergrund. Dazu lösen sich diese an der Zellhinterseite nur kurzzeitig gebildeten Adhäsionen an die ECM wieder, genau wie diejenigen an der Zellfront, was zu einer permanenten Kreislaufbewegung führt. Auf diese Weise bewegt sich die Zelle weiter vorwärts (Machesky und Hall 1997; Horwitz und Parsons 1999; Schwarz und Horwitz 2006).

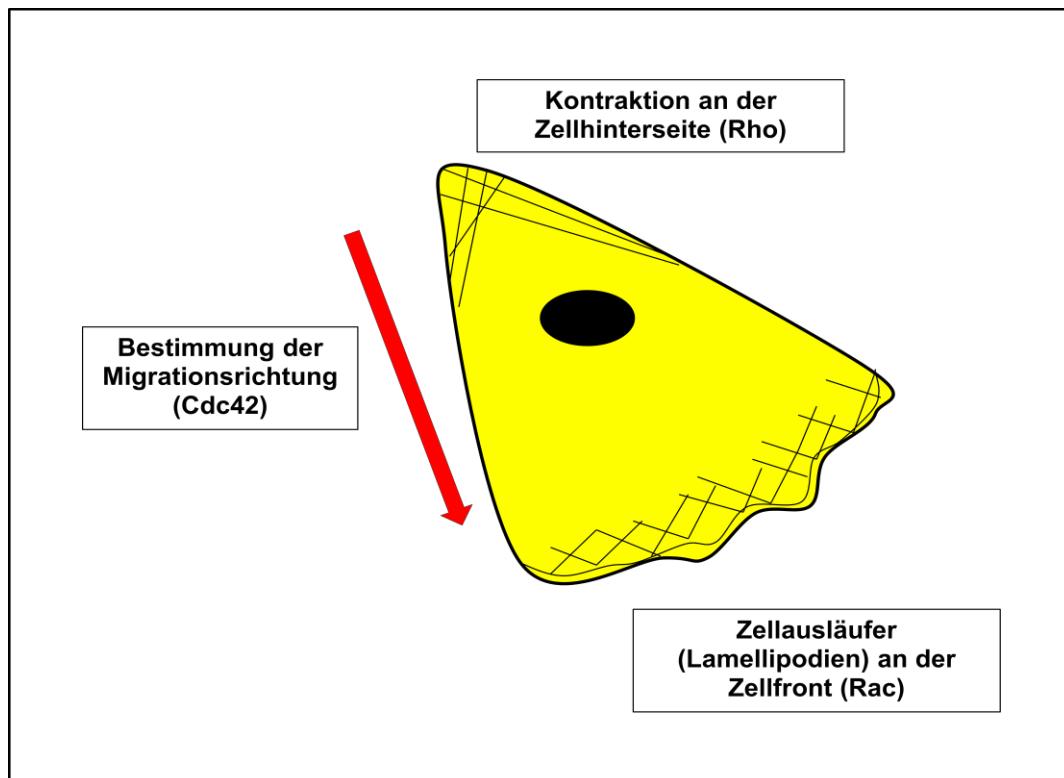


Abbildung 1 Migrierende Zelle (von oben gesehen). Für die Fortbewegung notwendig ist eine koordinierte Serie von nacheinander geschalteten Abläufen. Cdc42 koordiniert dabei die Richtung der Migration (roter Pfeil), Rac induziert Membranprotrusionen an der Zellfront durch Stimulation der Aktin-Polymerisation und (Integrin-vermittelten) Adhäsionskomplexen, und Rho fördert die Aktin-Myosin-Kontraktion im Zellinneren und an der Zellhinterseite. Schematische Darstellung nach Raftopoulou & Hall 2003, Seite 24.

Zellmigration kann eingeteilt werden in ziellose Beweglichkeit von Zellen (Motilität) und in gerichtete Migration. Letztere findet statt, wenn eine Zelle über einen anhaltenden Zeitraum eine einzige Wanderungsrichtung einhalten kann. Außerdem erfolgt übergeordnet eine

Unterscheidung von Einzelzellmigration und Migration im Zellverband (Friedl 2004; Rørth 2009). Im Unterschied zur oben beschriebenen Einzelzellmigration ziehen Zellen, die im Verband migrieren, nicht ihren dorsalen Zelleib nach, sondern üben vielmehr kontrahierende Kräfte auf ihre Nachbarzellen aus, welche durch Adhäsionskontakte mit ihnen verbunden sind. Somit behalten die Zellen in den meisten Fällen ihre Position innerhalb der kollektiven zweidimensionalen oder dreidimensionalen Struktur. Die kollektive Migration im Zellverband als zusammenhängende Gruppe findet sich bei sämtlichen Formen der Gewebeentstehung und –wiederherstellung (Weijer 2009). Sie liegt den Vorgängen der embryonalen Morphogenese, der Wundheilung sowie der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen gemeinsam zugrunde. Bei einer solchen gemeinschaftlichen Migration bewegen sich Zellen eher als Platten oder Fäden, als Zellhaufen oder als dreidimensionale Röhrenstrukturen vorwärts, weniger durch die Migration einer einzelnen Zelle. Dabei sind jedoch ganz ähnliche Aktin- und Myosin-vermittelte Ausläufer beteiligt, die Zellen im Verband lassen sich durch die gleichen (extrinsischen) chemotaktischen und mechanischen Signale leiten wie Zellen bei der Einzelzellmigration. Cadherin-vermittelte Kontakte zwischen Zellen erhalten zusätzlich suprazelluläre Eigenschaften aufrecht, wie etwa eine übergeordnete Polarisation innerhalb eines Gewebes, Krafterzeugung und Entscheidungsfindung.

Vergleicht man unterschiedliche Arten der Migration im Zellverband auf molekularer und zellulärer Ebene, so zeigen sich klare mechanistische Gemeinsamkeiten zwischen den Forschungsgebieten der Embryonalentwicklung und der Tumorgenese: der Prozess der Tumorentstehung ahmt gewissermaßen morphogenetische Vorgänge nach (Friedl und Gilmour 2009). Typischerweise erlangen diejenigen Gewebe, welche die Migration im Zellverband bereits während der Morphogenese verwenden, während der neoplastischen Progression ähnliche Migrationsmuster wieder. Beispielsweise breiten sich die meisten gut differenzierten Karzinome überwiegend durch Migration im Zellverband aus (Friedl et al. 2004; Yilmaz und Christofori 2010). Ebenso sind zahlreiche morphogenetische Signalwege relevant bei der Tumorentstehung und -ausbreitung; einer davon ist der für die Untersuchungen innerhalb dieser Arbeit entscheidende Wnt-Signalweg (Llense und Martin-Blanco 2008).

1.2 DIE ECM

Die extrazelluläre Matrix ist ein dynamisches, hochkomplexes Netzwerk, welches die Zellen des Körpers umgibt. Sie ist ständig im Umbau begriffen, wird lokal synthetisiert und fügt sich zu einem interzellulären, stabilisierenden Gebilde zusammen. Als Untergrund für die Zelladhäsion sowie als Reservoir für Wachstumsfaktoren reguliert die ECM Fortbewegung, Proliferation und Ausdifferenzierung der Zellen. Die Synthese und der Abbau von ECM

begleiten die Prozesse Morphogenese, Wundheilung sowie Tumordinvasion und Tumormetastasierung. Die interstitielle Matrix kommt in den Räumen zwischen den Zellen des Bindegewebes vor, zwischen Epithelzellen und den versorgenden Gefäß- und Muskelzellstrukturen. Sie wird hauptsächlich von mesenchymalen Zellen, den Fibroblasten, sezerniert und bildet ein dreidimensionales, locker geordnetes Gel aus fibrillären und nichtfibrillären Kollagenen, darunter vornehmlich Typ I-Kollagen. Weitere Bestandteile sind Fibronectin, Elastin, Proteoglykane und andere Elemente. Basalmembranen (BM) sind zweidimensionale Anordnungen, die strenger organisiert sind als die interstitielle Matrix und dem Epithel als Basis unterliegen. Sie können als spezialisierte Form der ECM bezeichnet werden. Ihre Hauptbestandteile sind nichtfibrilläres Typ IV-Kollagen und Laminin. Beide werden von denen ihnen aufliegenden Epithelzellen sowie den mesenchymalen Zellen der umgebenden interstitiellen Matrix synthetisiert.

Insgesamt besteht jede Art der ECM aus drei Grund-Komponenten: den Kollagenen, den Glykoproteinen und den Proteoglykanen (Robbins 2007; Liotta 1984; Worthley et al. 2010; Kalluri 2003). Eine der Hauptaufgaben der ECM ist die Gewebshomöostase mit Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen Zellwachstum und Zelltod (Apoptose), um so die optimale Funktionsfähigkeit von Gewebe- und Organsystemen sicherzustellen. Sie setzt Zytokine und Wachstumsfaktoren frei und bildet durch ihre Grundbestandteile eine strukturgebende Masse, in welcher sich zelluläres Leben unter fein abgestimmten Regeln entfalten kann. Durch Dysbalancen in der Gewebshomöostase kann es zu abnormer, meist übermäßiger Proliferation, Adhäsion und Migration der Zellen kommen und hierdurch beispielsweise eine maligne Entwicklung und Ausbreitung begünstigt werden (Park et al. 2000).

1.3 TUMORAUSBREITUNG UND WUNDHEILUNG: PARALLELEN UND UNTERSCHIEDE

Bereits Mitte der 80er Jahre bezeichnet der Bostoner Pathologe Harold F. Dvorak Tumoren als „Wunden, die nicht heilen“. Weiter führt er aus, dass Tumoren ihr sie umgebendes Stroma bilden, indem sie die Wundheilungsreaktion des befallenen Körpers aktivieren. Er nennt die Bildung von Tumorstroma eine Art fehlgeleitete Wundheilung (Dvorak 1986). Tatsächlich weist das Granulationsgewebe in der Wunde starke Ähnlichkeiten auf mit dem Stroma von soliden Tumoren epithelialer Herkunft. Sowohl in der Wunde als auch im Tumor finden sich migrierende und proliferierende Epithelzellen. Den Hauptunterschied zwischen Wunden und Tumoren stellt somit das invasive Wachstum der maligne transformierten Epithelzellen im Tumor dar (Dvorak 1986; Bissell und Radisky 2001; Mueller und Fusenig 2004; Schäfer und Werner 2008).

Zur Unterscheidung zwischen benignen und malignen Tumoren spielen der Differenzierungsgrad der Zellen, die Wachstumsrate und die Fähigkeit zur lokalen Invasion und Metastasierung eine Rolle (Vogelstein und Kinzler 1993). Dabei setzen sich alle soliden Primärtumoren, benigne ebenso wie maligne, aus zwei grundlegenden Komponenten zusammen: dem Parenchym, bestehend aus entarteten neoplastischen Zellen und aus dem unterstützenden, nicht-neoplastischen Stroma des befallenen Organismus. Letzteres besteht aus Bindegewebe, Blutgefäßen und Entzündungszellen. Das Tumorparenchym bestimmt weitestgehend das biologische Verhalten des Tumors und gibt dem Tumor seinen Namen. Das Tumorstroma hingegen ist entscheidend für das Wachstum und die Ausbreitung des Tumors. Dabei bieten das Bindegewebe und die Blutgefäße den wesentlichen Anteil zur Unterstützung der Zellproliferation. Die Tumor-Stroma-Interaktion beeinflusst maßgeblich Beschaffenheit und Eigenschaften des Tumors und macht ihn zu einem komplexen, multizellulären Organ (Mueller und Fusenig 2004; Bhowmick und Moses 2005).

Im Granulationsgewebe bei der Wundheilung migrieren die Zellen im Verlauf der Re-Epithelialisierung in das Wundgebiet hinein (Tremblay 1979). Diese Vorgänge werden maßgeblich geregelt durch die Einwirkung von Wachstumsfaktoren und anderen Komponenten der ECM auf die epithelialen Zellen. Das Stroma am Ort einer Verletzung und das an der Stelle einer neoplastischen Läsion teilen viele Charakteristika. Ebenso gibt es experimentelle Belege dafür, dass Verletzung einen direkten tumorfördernden Effekt hat (Sieweke et al. 1990). Die erhöhte Inzidenz von Tumorentstehung an Stellen von Narbengewebe und in Bereichen chronischer Defekte ist gut vereinbar mit der These, dass stromale Veränderungen, welche mit Verletzungen einhergehen, das Tumorstromawachstum unterstützen (Tlsty 2001; Tlsty und Coussens 2006).

Auch auf molekularer Ebene konnten beim Prozess der epithelialen Wundheilung Parallelen gezeigt werden. Es spielen ähnliche Steuerungsvorgänge und Signalkaskaden eine Rolle wie bei der Ausbreitung von Tumorzellen (Bissell und Radisky 2001). Eine beinahe identische zytoskelettale Maschinerie ist an den Vorgängen der embryonalen Wundheilung und morphogenetischen Bewegungen beim dorsalen Verschluss in *Drosophila melanogaster* (Schwarzbäuchige Taefliege)-Embryos sowie dem ventralen Verschluss bei *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) beteiligt. Auch die zugrundeliegenden molekularen Signal-Mechanismen zeigen deutliche Analogien (Wood et al. 2002; Martin und Parkhurst 2004). Sowohl während der Wundheilung als auch während embryonaler Gewebeentwicklung (Gastrulation, Neurulation) bewegen sich Zellfelder dabei als Einheit im Zellverband vorwärts. (Fenteany et al. 2000). Es finden sich somit Hinweise, dass Tumoren, insbesondere Karzinome, die latent vorhandenen Wundheilungsprogramme des befallenen

Organismus aktivieren, jedoch in einer übertriebenen und unkontrollierten Art und Weise (Schäfer und Werner 2008).

Wnt-Signaling ist notwendig für normale Hautentwicklung und Haarfollikel-Morphogenese während der Embryonalentwicklung (Clevers 2006; Reya und Clevers 2005). Offenbar kann die adulte Haut auf dieselben morphogenetischen Signale antworten. Wundheilung nach Hautdefekt geht mit verstärktem Wnt signaling einher – β -Catenin-unabhängig innerhalb der Wunde und β -Catenin-abhängig in angrenzenden Regionen der Wunde. Allerdings entsteht funktionell minderwertiges Narbengewebe mit nur einer epithelialen Zellschicht (*monolayer*). Wundheilung im erwachsenen Organismus könnte als benignes Äquivalent zu maligner Invasion gesehen werden, wenn morphogenetische Signale in anderem Kontext beziehungsweise in anderer Mikroumgebung wirken (Fathke et al. 2006).

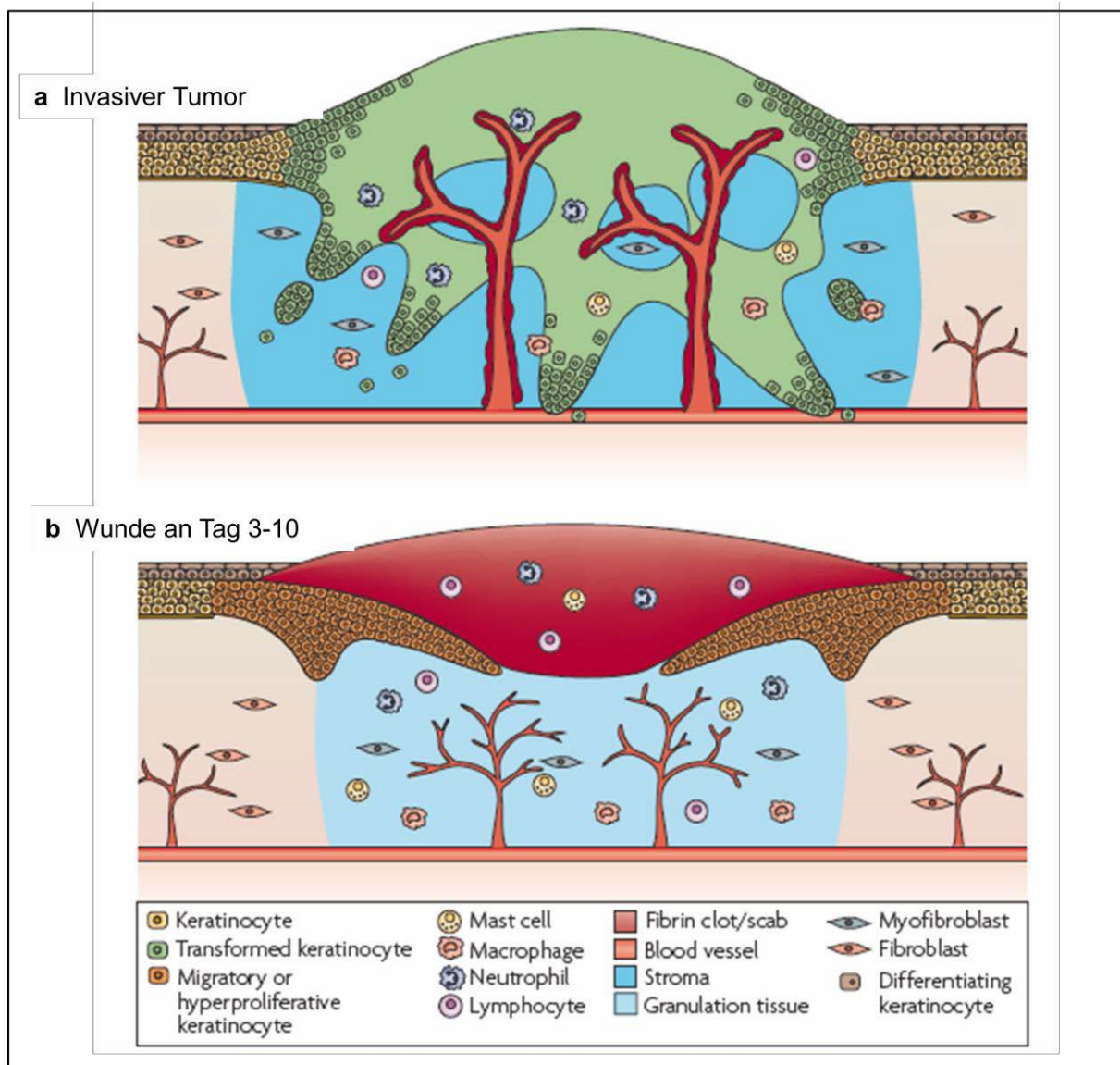


Abbildung 2 Parallelen zwischen Tumor und kutaner Wunde auf zellulärer Ebene. Schematische Darstellung **a** eines epithelialen Tumors und **b** einer Hautwunde 3-10 Tage nach „Verwundung“ in der Phase der (neuen) Gewebeformation. Sämtliche Komponenten des Wund-Granulationsgewebes (wie der Fibrinpropf, Entzündungszellen, neu ausgebildete Blutgefäße und eine große Anzahl an Fibroblasten und Myofibroblasten) finden sich auch im Tumorgewebe. (Aus: Schäfer und Werner 2008, Seite 631).

1.4 GRUNDLAGEN DER PHYSIOLOGISCHEN UND MALIGNEN INVASION UND METASTASIERUNG

Neutral betrachtet sind mit Invasion alle Formen der Zellbewegung durch dreidimensionales Gewebe gemeint, die mit einer Veränderung der Gewebestruktur und evtl. mit der Aufhebung normaler Gewebsgrenzen sowie mit Gewebszerstörung einhergehen. Entscheidende Grundvoraussetzung für eine Invasion ist die Bewegung der Zellkörper, dementsprechend der Migrationsvorgang. Gewebe ist in Kompartimenten organisiert, welche durch die ECM

voneinander abgegrenzt werden. Die ECM existiert in zwei Grundformen: als interstitielle Matrix und als Basalmembran (BM). Die Gewebeinvasion über die Grenze der BM hinaus ist ein Kennzeichen der Malignität (Hanahan und Weinberg 2000). Neovaskularisation, Nervenwachstum und Wundheilung sind an dieser Stelle Beispiele für physiologische Invasion (Liotta und Kohn 2001; Friedl und Gilmour 2009).

Die maligne Zellinvasion erfolgt als aktiver Prozess in mehreren Schritten. An die Destruktion der Basalmembran und der interstitiellen Matrix schließt sich die Bindung der Zellen an neue ECM-Komponenten an. Darüber hinaus führt im Wesentlichen immer die fortschreitende aktive Migration der Zellen zum Eindringen in umliegendes Gewebe. Um durch eine äußerliche Barriere wie die dichte ECM zu migrieren, bilden die Zellen an der Invasionsfront einen Invasionspfad und dringen als Zellkollektiv in sie hinein. Die Führungszellen benutzen Integrin-vermittelte fokale Adhäsionen und die lokale Ausbildung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) an ihrer Zellfront um Kollagenfasern zu spalten. Dadurch generieren sie muldenartige Mikrospuren, welche die Masse der nachfolgenden Zellen für die Migration benutzen kann (Wolf et al. 2007; Friedl und Wolf 2008; Sahai 2005). Von malignen, soliden Primärtumoren ausgehend, müssen die Zellen an mehreren Stellen der Metastasierungskaskade mit der Basalmembran bzw. der extrazellulären Matrix in Kontakt treten um den Primärtumor verlassen und Tochtergeschwulste bilden zu können. Zunächst müssen sie die ihrem Epithelverband zugrunde liegende Basalmembran durchbrechen. Anschließend müssen die Tumorzellen die interstitielle Matrix auf der stromalen Seite der Basalmembran migrierend durchqueren und schließlich erneut die Basalmembran der vaskulären bzw. der lymphatischen Endothelzellen überwinden um Anschluss an das Gefäßsystem zu erhalten. An dem Ort schließlich, an dem die Absiedlung erfolgen soll, muss die Tumorzelle nach ihrer Adhäsion an die Gefäßwand und Transmigration des Endothels erneut die BM des Endothels durchbrechen, woraufhin sie zuletzt Kontakt zur interstitiellen Matrix des jeweiligen Organs aufnimmt (DeNardo et al. 2008). Es wird somit deutlich, dass an zahlreichen Stellen des zellulären Invasionsprozesses in Gewebe der Umgebung und nachfolgend an der Ausbreitung von Zellen die aktive Migration ein unabdingbarer Promotor ist.

Nach allgemeiner Auffassung ist Tumorentstehung als ein multifaktorieller, mehrschrittiger Prozess anzusehen. Bei der Entstehung von Karzinomen erwirbt die Zelle multiple genetische Veränderungen, wobei Onkogene und Tumorsuppressorgene beteiligt sind (Farber 1984; Weinberg 1985; Nguyen und Massagué 2007; Chiang und Massagué 2008; Compagni und Christofori 2000). Jedoch beschrieb der englische Chirurg Stephen Paget schon 1889 die entscheidende Bedeutung des „soil“, also des Nährbodens bzw. der Mikro-Umgebung eines Primärtumors sowie seiner Metastase (Paget 1889). Metastasierung hängt

seiner Ansicht nach maßgeblich von der Kommunikation zwischen ausgewählten Tumorzellen (dem „Saatgut“) und deren Mikroumgebung (dem „Acker-/ Nährboden“) ab. Ein fruchtbarer Boden ist demzufolge für das Wachstum ebenso wichtig wie ein vermehrungsstarkes Saatgut. Erst in den letzten 10-20 Jahren rückten diese Standortfaktoren als wichtiges Forschungsfeld wieder mehr ins Zentrum des Interesses (Fidler 2003; Fokas et al. 2007). Auch Virchow beschrieb bereits 1863 im deutschen Sprachraum die „Causa occasionalis“, die örtliche Veranlassung, welche die Entstehung der Geschwulst an einer bestimmten Stelle bedingt, und die „Causa praedisponens“, die „begünstigende Einrichtung der Stelle“ einer malignen Geschwulst (z. B. die chronische Entzündung). Er betonte somit bereits lokale Ursachen der Tumorentstehung (siehe Hauptmann und Schnalke 2001). Sowohl in der Embryonalentwicklung als auch bei der Regeneration verletzten Gewebes ist es erwünscht und von größtem Nutzen: das Wachstum und die Ausbreitung von Zellen um Gewebe neu entstehen zu lassen bzw. wieder herzustellen. Beim Prozess der Wundheilung migrieren Zellen in Richtung des Wundspaltes und an dessen Rand entlang um den Defekt im Gewebe wieder zu verschließen. Die Parallelen der drei Prozesse Morphogenese, Wundheilung und Tumorausbreitung sind dabei wesentlich für das Verständnis der in weiten Teilen ähnlichen zugrundeliegenden Mechanismen auf molekularer Ebene (Friedl und Gilmour 2009).

Von einer wachsenden Anzahl an Signalkaskaden, die eine Rolle in der frühen Embryogenese spielen, wird nach und nach bekannt, dass sie auch an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind und deren fortschreitende Invasion und Metastasierung begünstigen (Wedlich S. 299). Ein weiteres gängiges Konzept zur Tumorzellinvasion beschreibt, dass die Zellen einen motilen Phänotyp ausbilden, wobei sie mesenchymale Eigenschaften erlangen und ihre epithelialen Merkmale zumindest vorübergehend verlieren. Dieser Vorgang wird Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) genannt (Thiery 2002; Yang und Weinberg 2008; Yilmaz und Christofori 2009). Er beschreibt die Emigration von Zellen aus ihrem Zellverband, welche durch die Auflösung von Zell-Zell-Kontakten bedingt ist. Seit den frühen 90er Jahren wird die Rolle verschiedener Signalkaskaden bei der Induktion der EMT diskutiert, die die Dysfunktion des Cadherin/Catenin-Adhäsionskomplexes zwischen Zellen triggern (Wedlich S. 299).

1.5 DIE FAMILIE DER WNT-GENE

1982 entdeckten Nusse und Varmus das erste Wnt-Gen in der Maus, das murine Wnt1. Sie identifizierten es als ein Proto-Onkogen, welches durch die Integration eines Brusttumor-Virus aktiviert wurde und zur Entstehung von Adenokarzinomen der Mamma bei Mäusen führte. Wnt-1 stellte das benachbarte Gen der Integrationsstelle für die DNA dieses *Mouse*

Mammary Tumor Virus (MMTV) im Genom der Maus dar und wurde zunächst mit dem Namen *Int-1* (Integrator-1) versehen (Nusse und Varmus 1982).

Kurze Zeit später wurde *Int-1* als ein Homolog des in *Drosophila melanogaster* erforschten Gens *Wingless* detektiert (Rijsewijk et al. 1987). *Wingless* war bereits bekannt als entscheidendes Gen für die Kontrolle der Segmentpolarisierung in *Drosophila*-Embryos (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980). Aus der Homologie dieser beiden Gensequenzen heraus entstand schließlich die Kombinationsbezeichnung *Wnt1* (*Wingless Type MMTV Integration Site 1*) (Nusse et al. 1991).

Die von den Wnt-Genen abgeleiteten Wnt-Proteine bilden eine Familie evolutionär hoch konservierter Signalmoleküle. Es sind von Zellen sezernierte Cystein-reiche Glykoproteine, die über Rezeptoren an der Zelloberfläche eine intrazelluläre Signaltransduktion bewirken. Sie fungieren als autokrine oder parakrine Faktoren (Nusse 1999). Sezernierte Wnt-Proteine sind aufgrund einer Lipid-Modifikation, der Palmitoylierung, hydrophob und damit für die Bindung an Zellmembranen sowie an die ECM prädestiniert (Mikels und Nusse 2006). Eine besondere Rolle spielen die Wnt-Signalwege während Prozessen der Zelldifferenzierung, -migration, -proliferation und Zellpolarität, sowohl im embryonalen als auch im adulten Organismus. Derzeit sind in Vertebraten 19 Wnt-Gene bekannt, für die meisten gibt es Homologe in anderen Organismen (Moon et al. 2002; Nusse 2005; siehe auch <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>).

Erkenntnisse über die Mechanismen der Wnt-Aktivitäten wurden mit Hilfe verschiedener Modellorganismen gewonnen: durch genetische Analysen in *Drosophila melanogaster* (Schwarzbäuchige Taufliege), *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) und *Danio rerio* (Zebrafisch), durch Genexpressionsanalysen bei *Xenopus laevis* (Glatter Krallenfrosch)-Embryos und Beobachtungen an Mausmodellen und isolierten Säugerzellen sowie durch biochemische Untersuchungen auf Zellkulturebene (Wodarz und Nusse 1998).

Die Wnts spielen einerseits eine wichtige Rolle in der normalen embryonalen Entwicklung eines Organismus und bei der Aufrechterhaltung einer physiologischen Gewebs- bzw. Stammzellhomöostase, andererseits bei der Entstehung von Krankheiten. Mutationen innerhalb der Wnt-Gene oder Fehler der Wnt-Signalweg-Komponenten führen in der Embryonalentwicklung zu spezifischen Defekten. Beim adulten Organismus wird beispielsweise das Tumorwachstum durch abnormes Wnt-Signaling verursacht (Clevers 2006; Reya und Clevers 2005).

1.6 WNT-EFFEKTE ÜBER VERSCHIEDENE SIGNALWEGE

Die von den beteiligten Rezeptoren sowie von der mikromolekularen Umgebung abhängigen Wirkungen der Wnt-Proteine werden maßgeblich über zwei verschiedene Signalkaskaden vermittelt. Der sogenannte kanonische oder auch „klassische“ Wnt-Signalweg ist länger und genauer bekannt, er beinhaltet als wesentlichen Baustein das Protein β -Catenin. In Abgrenzung zu diesem sind unter dem Begriff der nicht-kanonischen Signalwege der *Planar Cell Polarity* (PCP)-Signalweg, der Wnt/Calcium(Ca^{2+})-Signalweg sowie der erst kürzlich identifizierte Signalzweig über die Rezeptor-Tyrosinkinase Ror-1 und -2 zusammengefasst (Nusse 2008). Die nicht-kanonischen Signalkaskaden wirken alle drei unabhängig von β -Catenin und stellen sich abgesehen davon sehr heterogen dar. Bereits kurz nach Identifizierung der ersten Mitglieder der Wnt-Familie wurde deutlich, dass diese ihre Effekte jeweils über verschiedene Signalwege vermitteln. Sie lassen sich demnach in verschiedene Klassen einordnen, deren Wnts jeweils unterschiedliches onkogenes Potenzial besitzen. Im Mausmodell mit benignen Brustzellen führten manche Wnts zu einer malignen Transformation dieser Zellen und manche nicht (Wnt5a) bzw. manche etwas (Wnt5b) (Wong et al. 1994; Wodarz und Nusse 1998).

1.6.1 DER KANONISCHE WNT-SIGNALWEG

Am längsten erforscht ist die Wnt-Signaltransduktion über den kanonischen Weg, welcher das Zelladhäsionsprotein β -Catenin als zentralen Bestandteil enthält. Es vermittelt die Weiterleitung eines extrazellulären Wnt-Signals durch das Zytoplasma hindurch bis in den Zellkern. Ist kein Wnt-Ligand gebunden oder liegt dieser antagonistisch vor, so wird zytoplasmatisches β -Catenin durch einen Abbaukomplex bestehend aus dem Gerüstprotein Axin, dem Tumorsuppressorgen-Produkt *Adenomatosis Polyposis Coli* (APC), der *Glykogensynthase-Kinase-3 β* (GSK3 β) und der *Casein-Kinase 1 α* (CK1 α) an seinen N-terminalen Serin/Threonin-Resten phosphoryliert (Ikeda et al. 1998). Die Phosphorylierung von β -Catenin bewirkt seine anschließende Ubiquitinierung, woraufhin es schließlich im Proteasom der Zelle abgebaut wird (Aberle et al. 1997). Bindet jedoch ein Wnt-Ligand an einen Rezeptorkomplex auf der Zellmembran, führt dies zu einer Aktivierung des Signalweges und inhibiert den Abbau von β -Catenin. Der Rezeptorkomplex setzt sich zusammen aus einem Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor der *Frizzled* (Fz)-Familie und dem Ko-Rezeptor *Lipoprotein Related Protein 5/6* (LRP 5/6) (Bhanot et al. 1996; Wehrli et al. 2000). Nach Bindung des Wnt-Moleküls an den extrazellulären Teil des Rezeptorkomplexes wird das intrazelluläre Schaltprotein *Dishevelled* (Dvl) an den Transmembranrezeptor Fz rekrutiert und dort phosphoryliert (Wallingford und Habas 2005). Dishevelled gilt als Knotenpunkt, an dem sich anschließend kanonischer und nicht-kanonischer Signalweg aufteilen. Es ist Bestandteil aller Wnt-Signalwege, außer des zuletzt

entdeckten Ror-Signalweges (Boutros und Mlodzik 1999). Der β -Catenin-Degradationskomplex wird nun über verschiedene Schritte und Mechanismen inaktiviert, sodass im Folgenden keine Phosphorylierung von β -Catenin stattfinden kann. β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma der Zelle und transloziert anschließend in den Nucleus. Dort bindet es an DNA-Bindungsproteine der *Lymphoid Enhancer Factor /T-Cell Factor*-(LEF/TCF-)Familie (Behrens et al. 1996; Huber et al. 1996; Molenaar et al. 1996). Diese besitzen im Komplex mit nukleärem β -Catenin Transkriptionsfaktoraktivität und veranlassen, dass Wnt-Zielgene vermehrt exprimiert werden. Zu den Zielgenen gehören Gene, die eine Rolle für die physiologische Differenzierung und Ausbreitung von Zellen, Stammzellen und Geweben spielen, sowie gleichermaßen für die Entstehung und Expansion von Tumoren (Clevers 2006; Reya und Clevers 2005).

Eine aktualisierte Auflistung aller Wnt-Zielgene in den verschiedenen Organismen findet sich unter <http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>. In der nachfolgenden Abbildung ist der kanonische Signalweg in seiner durch Wnt aktivierten Form schematisch dargestellt.

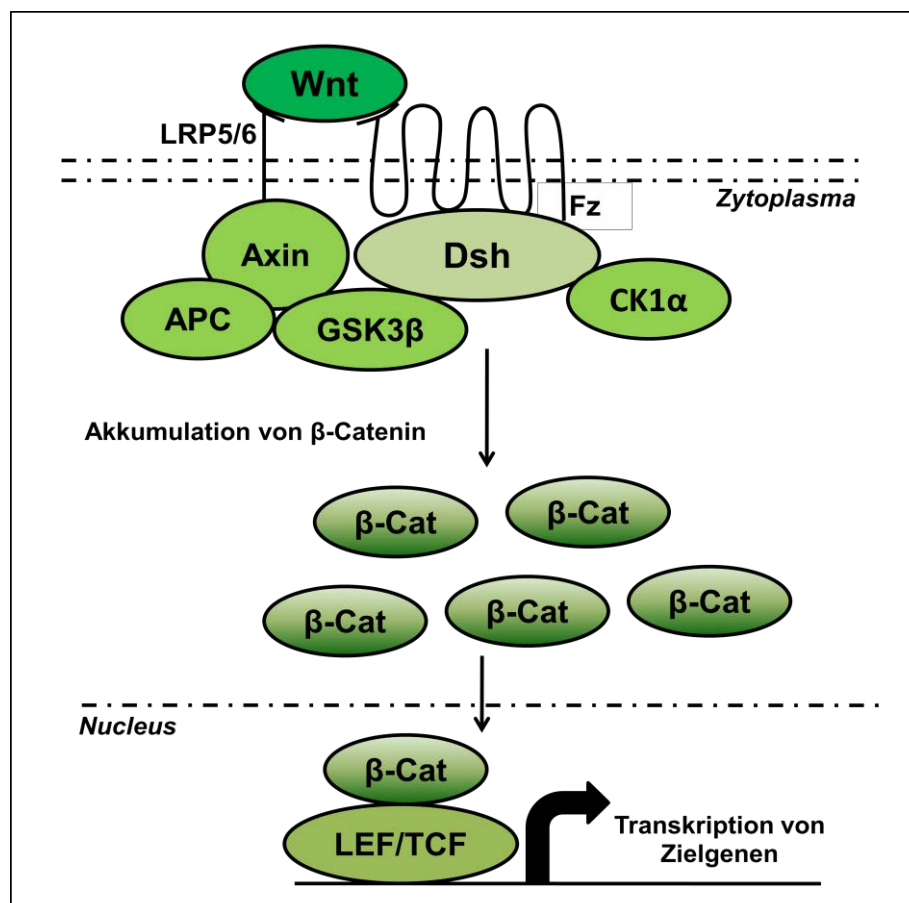


Abbildung 3 Schematische Darstellung des kanonischen, β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweges nach Bindung von Wnt an den Rezeptorkomplex aus Fz und LRP5/6. Unphosphoryliertes, akkumuliertes β -Catenin transloziert in den Zellkern und bewirkt im Komplex mit den DNA-Bindungsproteinen LEF/TCF die Transkription von Wnt-Zielgenen (nach Komiya und Habas 2008, Seite 69).

1.6.2 DIE NICHT-KANONISCHEN WNT-SIGNALWEGE

Neben dem besser bekannten kanonischen Wnt-Signalweg existieren andere, sogenannte nicht-kanonische Signalwege. Sie haben einige Rezeptor- und Signalmoleküle mit dem kanonischen Signalweg gemeinsam (Fz, Dvl), bedürfen aber noch weiterer Proteine um Signale vermitteln zu können und wirken alle β -Catenin-unabhängig (Veeman et al. 2003).

1.6.2.1 Der PCP-Pathway

Zellen zeigen in funktionellen Geweben eine gewisse koordinierte Anordnung. In Epithelien ist es zunächst die apiko-basale Achse, an welcher die eng miteinander verbundenen Zellen einheitlich ausgerichtet sind. Zusätzlich zu dieser apiko-basalen Polarität verlangen Zellen in den meisten Gewebearten auch nach Informationen, die ihre Lage in der Ebene definieren. Nur so können sie sich gemeinsam organisieren und eine einheitliche Polarität ausbilden, um sich als Zellverband planar in eine gemeinsame Richtung zu bewegen. Diese gezielte Polariätsausbildung innerhalb eines Zellfeldes in der Ebene wird *Planar Cell Polarity* (PCP) genannt (Klein und Mlodzik 2005; Seifert und Mlodzik 2007). Der für diese Ausbildung einer Zellpolarität innerhalb eines Epithelzellverbandes verantwortliche, entsprechend PCP-Signalweg genannte, ist einer der alternativen, nicht-kanonischen Wnt-Signalwege. Er wurde zuerst in den Insekten *Oncopeltus fasciatus* (Milchkrautwanze) und *Drosophila melanogaster* (Schwarzbäuchige Taufliede) entdeckt (Adler 1992). Durch Ausschaltung von Genen des PCP-Signalwegs entwickelte *Drosophila melanogaster* eine unorganisierte Flügelbehaarung anstelle des typischen polarisierten, von einem definierten Scheitelpunkt ausgehenden Behaarungsmuster (Mlodzik 1999; Adler 2002; Axelrod und McNeil 2002). In der frühen Embryonalentwicklung von Vertebraten steuert der PCP-Weg das Fortschreiten von mesenchymalen Zellverbänden während der Ausbildung der drei Keimblätter (Gastrulation) sowie die konvergente Extension und Zellbewegungen während des Neuralrohr-Verschlusses, außerdem die murine Innenohrentwicklung und die Ziliogenese (Jenny und Mlodzik 2006; Yamanaka et al. 2002).

Somit dient der PCP-Pfad in Vertebraten und Fliegen in vielen Kontexten als Regulator gerichteter Migration (Seifert und Mlodzik 2007). Der PCP-Signalweg wird durch die nichtkanonischen Wnts sowie einige Rezeptoren aus der Fz-Familie aktiviert. Der Ko-Rezeptor LRP ist für die Wnt-Signalübermittlung im PCP-Pfad keine Voraussetzung. Anstelle einer Stabilisierung von β -Catenin werden beim PCP-Signalweg intrazellulär über die Ausbildung eines Fz-Dvl-Komplexes die kleinen GTPasen RhoA und Rac aktiviert. Im Anschluss daran teilt sich der PCP-Weg in zwei Verläufe. Rho kann die Rho-assoziierte Kinase (ROCK) induzieren, welche direkt intrazellulär zytoskelettale Umgestaltungen sowie die Bildung von Adhäsionskomplexen zur Folge hat (Hall 1998; Nobes und Hall 1995; Nobes und Hall 1999). Rac hingegen ist zum einen (s. Kap. 1.2) maßgeblich an der Aktin-

vermittelten Ausbildung von Ausläufern an der Zellfront beteiligt (Wehrle-Haller und Imhof 2003), zum anderen kann es jedoch auch die c-jun-N-terminale Kinase (JNK) aktivieren. Diese wiederum phosphoryliert das Protein c-jun im Zellkern und aktiviert dadurch den Transkriptionsfaktorkomplex, den c-jun zusammen mit dem *Activator Protein 1* (AP1) bildet. Es findet folglich über Rac gleichzeitig eine Regulation über die Transkription von Zielgenen statt (Djiane et al. 2000; Heisenberg et al. 2000; Wallingford et al. 2000; Wallingford et al. 2002).

In der folgenden Abbildung ist der PCP-Signalweg mit seinem zweigeteilten Verlauf und den unterschiedlichen Effekten auf das Zytoskelett bzw. auf die Transkription von Zielgenen zu sehen.

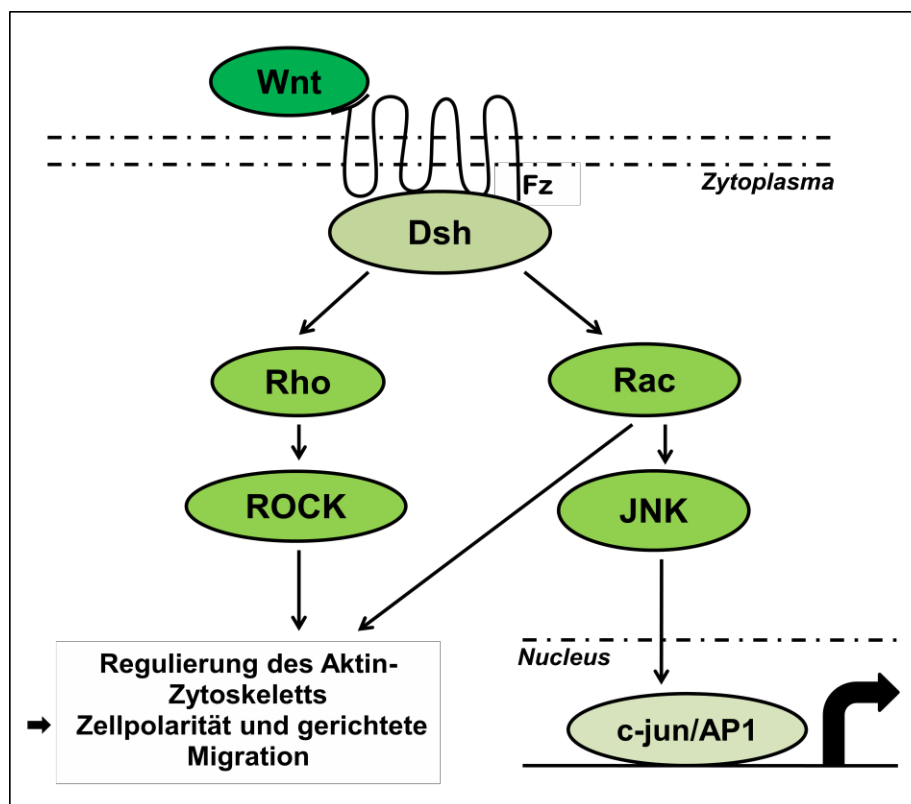


Abbildung 4 Der nicht-kanonische Planar Cell Polarity (PCP)-Signalweg. Schematische Darstellung (nach Komiya und Habas 2008, Seite 71).

Die Signale, welche über den PCP-Weg vermittelt werden, spielen eine wichtige Rolle bei migratorischen Phänomenen von Einzelzellen und Zellverbänden. Der PCP-Signalweg ist daher wesentlich für die Vorgänge bei der Tumorzellausbreitung und Wundheilung.

1.6.2.2 Der Wnt/Calcium-Signalweg

Auf einen weiteren nicht-kanonischen Signalweg wurde man aufmerksam, als in Experimenten mit *Xenopus*-Embryos die Injektion von Wnt5a-mRNA eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Ausstroms zur Folge hatte (Slusarski et al. 1997).

Weitere Nachforschungen führten zu einer genaueren Aufschlüsselung dieser weiteren β -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalkaskade. Über die Bindung von Wnt-Liganden an den Rezeptor Fz erfolgt auch beim Ca^{2+} -Signalweg die Aktivierung des intrazellulären Adapterproteins Dvl (Sheldahl et al. 2003). Über eine anschließende intrazelluläre Calcium-Freisetzung werden die Calcium-sensitiven Enzyme Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CamKII) sowie die Protein-Kinase C (PKC) aktiviert (Kuhl et al. 2000). Die Aktivierung der ebenfalls Calcium-sensitiven Phosphatase Calcineurin bewirkt im Zellkern eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear Factor of T Cells* (NFAT) (Saneyoshi et al. 2002). Somit hat auch der Wnt/Calcium-Signalweg Auswirkungen auf die Genexpression.

1.6.2.3 Der Signalweg über Ror-1 und -2

Der dritte, zuletzt entdeckte β -Catenin-unabhängige Wnt-Signalweg verwendet einen gänzlich anderen Rezeptormechanismus als alle übrigen Wnt-Signalwege. Auch beinhaltet er als einziger nicht das bei allen anderen Wnt-Signalwegen zentrale Schaltprotein Dvl. Der Wnt-Ligand bindet hier an die extrazelluläre, Cystein-reiche Domäne der Rezeptor-Tyrosinkinase Ror und vermittelt intrazellulär eine Rho-GTPase-unabhängige Aktivierung des Effektorproteins JNK (Oishi et al. 2003; Schambony und Wedlich 2007; Liu et al. 2008). Wie im PCP-Signalweg aktiviert JNK c-jun und AP-1 und dadurch die Transkription der gleichen Zielgene, die auch beim PCP-Signalweg für die Pathogenese bei invasiven Vorgängen eine herausragende Rolle spielen.

Auch der Ror-Signalweg ist mit dem kanonischen Signalweg querverschaltet. Unabhängig von den GTPasen wird bei Bindung von Wnt5a an Ror-2 der β -Catenin/TCF-Weg inhibiert (Mikels und Nusse 2006).

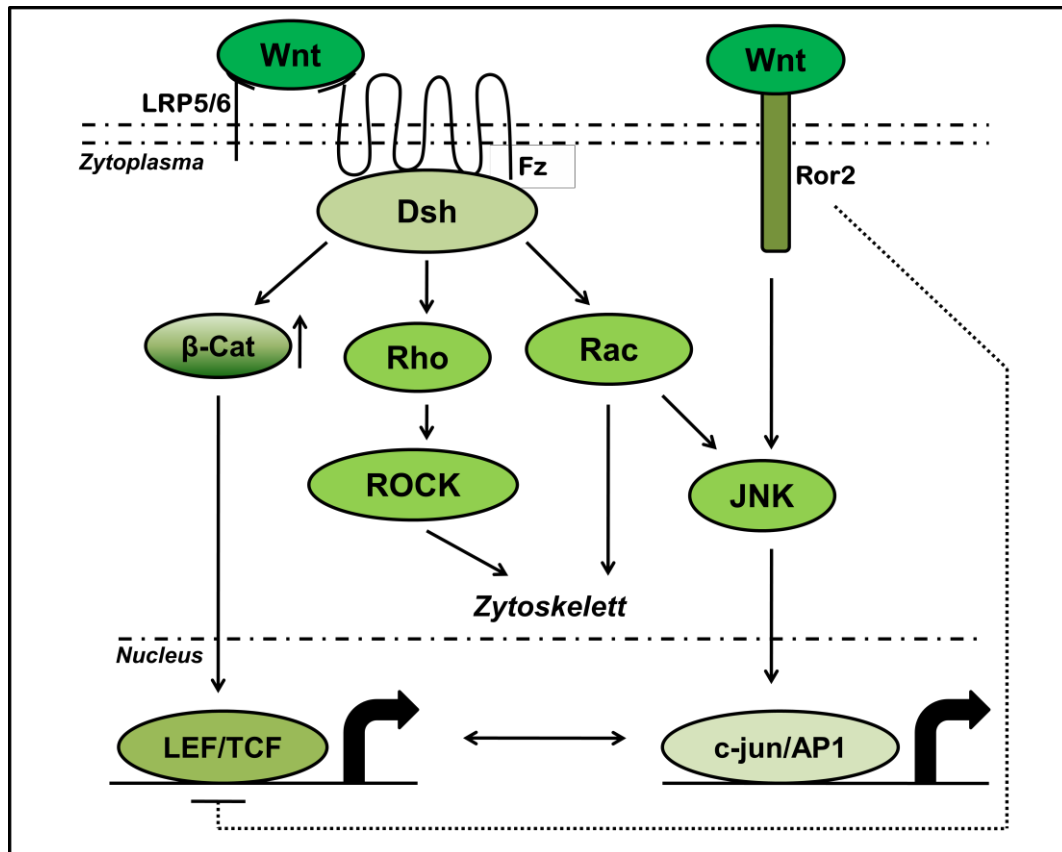


Abbildung 5 Drei der vier im Text beschriebenen Wnt-Signalwege und ihre möglichen Verknüpfungen/ Verschaltungen/ Interaktionen im Überblick: kanonischer Wnt-Signalweg, PCP-Signalweg sowie Signalweg über Ror (nach Pukrop und Binder 2008, Seite 2).

Das ursprüngliche Konzept der verschiedenen und voneinander unabhängig funktionierenden Wnt-Signalwege ist somit nicht mehr aktuell. In den letzten Jahren zeichnete sich immer deutlicher ab, dass viele der einzelnen Wnt-Mediatoren in mehreren Pfaden des Wnt-Signalweges parallel aktiv sind und miteinander interagieren (Rao und Kuhl 2010).

1.7 ANTAGONISTEN DES WNT-SIGNALING: DIE DICKKOPF-PROTEINE

Um das sensible Gleichgewicht des Wnt-Signaling aufrechtzuerhalten und zu kontrollieren, existiert eine Reihe von natürlichen, in die ECM sezernierten Wnt-Inhibitoren. Die beiden Gruppen der *secreted Frizzled-related Proteins* (sFRP) sowie der *Wnt Inhibitory Factors* (WIF) binden dabei direkt an die Wnt-Proteine, um deren Bindung an ihre Rezeptoren zu verhindern. Mitglieder der Familie der *Dickkopf* (Dkk)-Proteine hingegen binden an den Ko-Rezeptor LRP5/6 und unterbinden auf diese Weise die Bildung von Ligand-Rezeptor-Komplexen (Kawano und Kypta 2003; Niehrs 2006).

Es gibt vier Hauptmitglieder der Dkk-Familie, wobei Dkk-1 als „Gründungsmitglied“ angesehen wird, welches zuerst als ein Wnt-Antagonist in der frühen Embryogenese des Krallenfroschs (*Xenopus*) identifiziert wurde. Hier erhielt es seinen Namen dadurch, dass bei der Überexpression des Dkk1-Gens Kaulquappen mit stark vergrößerten Köpfen entstanden (Glinka 1998). Beim Menschen kommen neben dem am besten erforschten Dkk1-Gen noch drei weitere Dickkopf-Gene (Dkk-2, -3, und -4) vor. Sie sind wahrscheinlich nicht an der Kopfbildung beteiligt, sondern für die Organentwicklung zu einem späteren Zeitpunkt wichtig. (Niehrs 2006). Die Dickkopf-Proteine sind eine Familie von sezernierten Glykoproteinen. Dkk-1 und auch Dkk-2 antagonisieren in Säugetier-Zellen vor allem den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Pfad über die Bindung an den Ko-Rezeptor LRP5/6. Sie sind außerdem hoch-affine Liganden für die Transmembranproteine *Kremen* (Krm), welche ebenfalls Wnt signaling modulieren (Bafico et al. 2001; Mao et al. 2001; Semenov et al. 2001; Mao und Niehrs 2002; Mao et al. 2002). Jedoch fanden Mikheev et al. in Untersuchungen an der humanen Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa, dass eine tumorsuppressive Wirkung von Dkk-1 nicht über die Antagonisierung des β -Catenin-Weges erfolgte (Mikheev et al. 2004). Die Dickkopf-Proteine spielen eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung von Vertebraten, wo sie lokal Wnt-regulierte Prozesse inhibieren, wie z. B. die antero-posteriore Achsenausbildung, die Entwicklung der Gliedmaßen und der Augen. Im adulten Organismus sind sie an Knochen(neu)bildung und –krankheiten sowie an Krebsentstehung und an der Alzheimer-Erkrankung beteiligt (Krupnik et al. 1999; Matsui et al. 2009). Sowohl Dkk-1 als auch das weniger gut erforschte Protein Dkk-2 haben zum Teil gegensätzliche Effekte auf die Wnt-Signalwege, jeweils abhängig von der die Zellen einschließenden Mikroumgebung (Brott und Sokol 2002).

1.8 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

In der vorliegenden Arbeit sollte das Migrationsverhalten von Mammakarzinom-Zellen untersucht werden. Der Vorgang der Migration wird als Teilvorgang und wesentliche Voraussetzung für die Invasion von Tumorzellen und damit für deren Metastasierungspotenzial gesehen. Migration wurde von Invasion abgegrenzt betrachtet und als eigene Facette näher untersucht.

Bisherige Untersuchungen der Arbeitsgruppe zu den Effekten von Wnt5a und Dkk-1 in Migrationsassays haben gezeigt, dass diese deutlich abhängig waren vom Untergrund, auf dem man die Zellen migrieren ließ. Die teilweise gegensätzlichen Wirkungen der untersuchten Proteine ließen auf einen stärkeren Einfluss der ECM schließen als bisher angenommen. Bei einigen der beobachteten Effekte zeigte sich der β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg unbeteiligt, vielmehr gab es Hinweise auf die Signaltransduktion über den

nicht-kanonischen PCP-Signalweg, welcher zu zytoskelettalen Umgestaltungen durch RhoA und JNK führte (Podleschny 2006). Auch anhand von Immunfluoreszenzfärbungen des Aktin-Zytoskeletts der Zellen gewonnene Erkenntnisse der Arbeitsgruppe wiesen auf eine unterschiedliche Wirkweise der Proteine Dkk-1 und Wnt5a in Abhängigkeit vom Zelluntergrund hin (Schindler 2010).

Daran anknüpfend sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung der beiden für die Tumorprogression ebenso wesentlichen Proteine Wnt5b und Dkk-2 auf den Teilaspekt der Migration hin näher untersucht werden. Der bereits innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelte modifizierte Migrationsassay auf Extrazellulärer Matrix wird noch näher beschrieben.

Methodisches Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines verbesserten *In-Vitro*-Modells zu übertragbaren Untersuchungen auf die epitheliale Wundheilung. Durch Weiterführung der seit langem etablierten Scratchassay-Methode auf Plastikuntergrund sollte im Rahmen dieser Arbeit ein physiologischerer *In-Vitro*-Konfrontationstest auf neu eingesetzter Extrazellulärer Matrix konzipiert werden. Schließlich wurde der Einfluss von Wnt5b und Dkk-2 auf die Migration von Mammakarzinom-Zellen vergleichend im Migrationsassay auf ECM sowie im neu etablierten Wundheilungs-/ Konfrontationsassay auf ECM untersucht. Es erfolgten in beiden Modellen Messungen der Migrationsaktivität der eingesetzten Tumorzellen unter Stimulation mit Wnt5b und Dkk-2. Die schwach invasive Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 eignete sich dabei sowohl für Untersuchungen im *In-Vitro*-Tumormodell als auch für das *In-Vitro*-Assaymodell zur epithelialen Wundheilung.

2 MATERIAL

2.1 ZELLINIE

MCF-7: Epitheliale Tumor-Zelllinie aus dem Pleuraerguss eines humanen Mamma-Adenokarzinoms (HTB-22™, American Type Cell Collection (ATCC®), Rockville, Maryland, USA) (Soule et al. 1973).

Bezogen wurde diese Zelllinie über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig.

2.2 REKOMBINANTE PROTEINE

Tabelle 1 Rekombinante Proteine

Protein	Hersteller
Rekombinantes Maus Dkk-2	R&D Systems, Minneapolis USA
Rekombinantes Maus Wnt5b	R&D Systems, Minneapolis USA

2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Nicht aufgeführte Plastik-Verbrauchswaren wurden von den Firmen Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, oder Greiner Bio-One GmbH, Solingen, bezogen.

Tabelle 2 Verbrauchsmaterialien

Firma	Verbrauchsmaterialien
Brand GmbH & Co. KG, Wertheim	Neubauer improved Zählkammer Parafilm „M“
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Deckgläser Ø 10mm und 12mm
Knittel GmbH, Braunschweig	Objektträger 76x26mm
Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	6-Loch-Platten 24-Loch-Platten Einfrierbox für Kryoröhrchen Kryoröhrchen 1,8ml PP/SI Lab-Tek™ Chamber Slides, Glas, 2 Wells Zellkulturflaschen 25cm ² und 75cm ²
WU Mainz	Pasteurpipetten 230mm

2.4 VERWENDETE GERÄTE

Tabelle 3 Geräte

Geräte	Hersteller
CO ₂ -Inkubatoren	Binder GmbH, Tuttlingen Sanyo Sales & Marketing Europe GmbH, München
Dampfsterilisator	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Elektronische Pipettierhilfe	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
ELISA Reader Sunrise	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Kühlschrank 4 °C	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Magnetrührer	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskope	Inverses Mikroskop mit Fluoreszenzlampe Axiovert 200M und Digitalkamera, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena Inverses Durchlichtmikroskop Telaval 31, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Mikroskopie-Kamera	CCD-Kamera AxioCam MRm, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Sicherheitswerkbank	<i>LaminAir</i> [®] HB 2448, Heraeus Instruments, Hanau
Tiefkühltruhe -150 °C	Sanyo Sales & Marketing Europe GmbH, München
Tiefkühlschrank -80 °C	Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze
Wipp-Taumel-Tisch	Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen
xCELLigence™ System	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Zentrifugen	Universal 30 RF, Hettich, Tuttlingen Multifuge 3 L-R, Heraeus Instruments, Hanau

2.5 ANALYSESOFTWARE

Tabelle 4 Analysesoftware

Software	Hersteller
AxioVision 4.6	Zeiss, Jena
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, San Diego, USA
Statistica 9	StatSoft, Tulsa, USA
xCELLigence RTCA 1.2.0.0909	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

2.6 VERWENDETE CHEMIKALIEN, PUFFER UND SUBSTANZEN

Tabelle 5 Chemikalien, Puffer und Substanzen

Substanzen	Hersteller
Ameisensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
ECM	Cultrex [®] Basement Membrane Extract without Phenol Red, Trevigen, Gaithersburg, USA
MTT-Lyse-Puffer	75 % (v/v) Ameisensäure 25 % DMSO, Merck KGaA, Darmstadt
MTT-Reagenz	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in 5 mg/ml PBS, Sigma, Deisenhofen

2.7 PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Tabelle 6 Zellkultur-Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung, Hersteller
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline (ohne Kalzium und Magnesium), gebrauchsfertige Lösung, PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach
DMSO	Dimethylsulfoxid, Merck KGaA, Darmstadt
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure, Merck KGaA, Darmstadt
Einfriermedium	RPMI 1640, PAA, Paching, Austria 50 % (v/v) FKS 5 % (v/v) DMSO
FKS	Fötiales Kälberserum, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Standardzellkulturmedium	RPMI 1640 10 % (v/v) FKS
Trypsin-EDTA	0,05 % Trypsin, 0,02 % Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA) in PBS, Biochrom AG, Berlin

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Medien für die Zellkultur vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C angewärmt.

3 METHODEN

3.1 ZELLKULTURMETHODEN

3.1.1 STANDARDKULTIVIERUNG FÜR MCF-7-ZELLEN

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsvorgänge der Zellkultivierung, -isolierung und -bearbeitung erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank der Sicherheitsstufe II und wurden schon in mehreren Arbeiten beschrieben (u. a. Klemm 2010; Klemm et al. 2011).

Sämtliche Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Kulturmedien wurden - sofern nicht vom Hersteller steril verpackt geliefert - bei 121 °C und 1 Bar Überdruck mit Wasserdampf autoklaviert oder vier Stunden bei 180 °C Kerntemperatur hitzesterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden steril filtriert.

Die aus dem Pleuraerguss einer Patientin mit metastasiertem Mamma-Adenokarzinom etablierte, wenig invasive Zelllinie MCF-7 hat epithelialen Charakter. Ihr Zelleib ist abgeflacht und polygonal, der Zellkern liegt zentral. Die Zellen wachsen einschichtig und bilden im konfluenten Zustand ein pflastersteinartiges Relief (Soule et al. 1973).

Die Zelllinie wurde in RPMI 1640-Medium, versetzt mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS), bei 37 °C mit 5 % CO₂-Begasung und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % im Brutschrank kultiviert. Die Zellen wuchsen adhärent auf dem Boden von Schrāghals-Zellkulturflaschen mit 75 cm² Bodenfläche in insgesamt 10 ml Nährmedium. Für den Einsatz in Migrationsassays wurden 1-2 x 10⁵ Zellen in Zellkulturflaschen ausgesät. Alle drei Tage wurde das Nährmedium erneuert. Bei Erreichen eines zu 70-80 % konfluenten Zellrasens wurden die Zellen, wie im Folgenden beschrieben, im Verhältnis 1:10 geteilt (Klemm et al. 2011; Podleschny 2006; Schindler 2010). Hierbei wurde das verbrauchte Medium zuerst abgesaugt, der einschichtige Zellrasen vorsichtig mit 10 ml PBS-Lösung (ohne Zusatz divalenter Kationen) gespült, das PBS wieder abgesaugt, die Zellen mit 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung pro Kulturflasche überschichtet und für 5 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die sich nun abrundenden abgelösten Zellen wieder in 10 ml Kulturmedium, versetzt mit 10 % FKS, aufgenommen, um die Reaktion des Protease-Enzyms Trypsin abzustoppen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 400 x g wurde der Überstand abgenommen und das geformte Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen. Durch diesen Schritt konnte sichergestellt werden, dass sich nahezu kein Trypsin mehr in der Zellsuspension befand. Die Zellen wurden schließlich im Teilungsverhältnis 1:10 bzw. je nach geplantem Einsatz und Bedarf in neue Zellkulturflaschen überführt.

Einmal im Monat erfolgte die Überprüfung der Zellen auf Mycoplasmen-Kontamination mithilfe des Venor[®] GeM Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR von Minerva Biolabs, Berlin.

3.1.2 KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN

Zur Herstellung eines Einfriermediums wurde das Standardkulturmedium der Zellen mit 50 % FKS und 5 % DMSO versetzt und bei 4 °C gelagert. Die einzufrierenden Zellen wurden wie oben beschrieben abgelöst und in Standardkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für zehn Minuten bei 400 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert und in einer Zelldichte von 1×10^6 /ml in 1,8 ml Kryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden anschließend in eine dafür vorgesehene Einfrierbox gesetzt. Der Mantel dieser Box wurde mit 200 ml Isopropanol gefüllt, wodurch der Abkühlungsvorgang verlangsamt wurde. Die Einfrierbox wurde zunächst für zwei Nächte in der -80 °C-Truhe gelagert, anschließend zur dauerhaften Lagerung in die -150 °C-Truhe überführt.

3.1.3 REVITALISIERUNG KRYOKONSERVIERTER ZELLEN

Die Kryoröhrchen mit Zellen wurden der -150 °C-Truhe entnommen und auf Eis gelagert. In einem 15 ml-Röhrchen wurde 10 ml Kulturmedium vorgelegt. Anschließend wurde das Kryoröhrchen unter der Sterilwerkbank aufgetaut. Hierzu wurde das Röhrchen in ein Bad aus erwärmtem sterilem Wasser gestellt. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in das 15 ml-Röhrchen mit vorgelegtem Kulturmedium pipettiert und bei 400 x g für zehn Minuten pelletiert. Das Medium wurde abgesaugt, das Pellet in 6 bzw. 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in die entsprechende Zellkulturflasche überführt. Je nach Zellzahl wurden die Zellen in eine 25 cm²- bzw. 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

3.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauer improved-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurde ein 10 µl-Aliquot Zellsuspension entnommen und in 90 µl PBS 1:10 verdünnt. Diese Suspension wurde auf die Zählkammer gegeben und alle innerhalb der Leukozyten-Zählfelder liegenden Zellen unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt. Anschließend wurde über die Bildung des Mittelwertes sowie die Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die Konzentration pro Volumeneinheit (Zellzahl/ml) berechnet.

3.3 MIGRATIONSASSAY AUF ECM

Um eine möglichst tumorgetreue Umgebung nachzuempfinden, sollten die Zellen vollständig eingebettet in extrazelluläre Matrix in einem zunächst dreidimensionalen Modell, später zweidimensional, zur Migration angeregt werden. Zu diesem Zweck wurde Basalmembran (BM)-Extrakt aus dem murinen Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)-Sarkom verwendet (Kleinman et al. 1982, Orkin et al. 1977; Albini et al. 1987). Der Extrakt wurde, entsprechend den Angaben des Herstellers, über Nacht auf Eis lagernd bei 4 °C Umgebungstemperatur aufgetaut. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde er 1:4 mit 4 °C kaltem, serumfreien Zellkulturmedium verdünnt. Während der Versuchsvorbereitung wurden runde Deckgläser mit einem Durchmesser von 12 mm in 24-Loch-Platten ausgelegt und mit dem flüssigen BM-Extrakt beschichtet. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur war das ECM-Gel polymerisiert und konnte verwendet werden. In der Zwischenzeit wurden die kultivierten Tumorzellen trypsinisiert und gezählt und schließlich in einer Ziel-Konzentration von jeweils 300.000 Zellen pro Deckglas in die Vertiefungen auf die mit ECM beschichteten Deckgläser in 1 ml Standardmedium suspendiert ausgesät. Die Zellen wurden im Brutschrank für 72 Stunden auf den ECM-Deckgläsern inkubiert. Bei einer anschließenden optischen Kontrolle unter dem Mikroskop sollten die Zellen adhärent und dicht aneinander sitzend bis an den Rand des Deckglases gewachsen sein. Nach 72 Stunden Inkubation wurde wiederum ECM-Gel 1:4 mit serumfreiem Medium verdünnt; in 6-Loch-Platten wurden pro Vertiefung 100 µl pipettiert und mit Hilfe eines sterilen Zellschabers zu einer glatten Schicht ausgestrichen. Die ECM-Schicht polymerisierte in 10 Minuten bei Raumtemperatur. In jede der Vertiefungen der 6-Loch-Platte wurden nun 2ml Standardzellkulturmedium gegeben, die Platte wurde anschließend unter der Sterilwerkbank gelagert. Die 24-Loch-Platten mit den darin liegenden Tumorzell-Deckgläschen wurden nun zunächst einige Male vorsichtig hin- und her geschwenkt um lose Zellen aufzuwirbeln. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch neues, 10 % FKS-haltiges RPMI-Medium ersetzt. Die mit Tumorzellen auf ECM bewachsenen Deckgläser wurden mit Hilfe einer sterilen Pinzette aus der 24er-Platte herausgenommen. Nach einmaligem Spülen durch Eintauchen des Deckglases in serumfreies Medium ließ man das Deckgläschen vorsichtig mit der Zellseite nach unten auf die mit ECM beschichtete Fläche der 6-Loch-Platte absinken. Dadurch waren die Tumorzellen vollständig von extrazellulärer Matrix umgeben. Damit die Zellen wieder adhärent anwachsen konnten, wurden die Platten für wiederum 72 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend unter dem inversen Durchlicht-Mikroskop bei zehnfacher Vergrößerung betrachtet. Bei 40facher Vergrößerung wurden im Folgenden Stellen ausgemacht, an denen die Tumorzellen pflastersteinartig, gleichmäßig und dicht unter dem Rand des Deckglases hervor zu wachsen begannen. Um Vergleichbarkeit zwischen unabhängigen Experimenten herzustellen, wurde hierfür an der in die Mitte der

Plattenvertiefung zeigenden Deckglaskante gesucht. Es war zudem darauf zu achten, dass vor der hervor gewachsenen Zellfront keine Zellen einzeln verstreut oder in kleinen Konglomeraten angesiedelt auf der ECM-Fläche lagen. Nach Titration in vorhergehenden Experimenten der Arbeitsgruppe wurde eine Standardkonzentration der rekombinanten Proteine Wnt5b und Dkk-2 von jeweils 100ng/ml in Zellkulturmedium etabliert.

Das alte Medium der Zellen wurde abgesaugt und jeweils 1 ml Stimulationsmedium in jede 6-Loch-Platten-Vertiefung pipettiert. Bei der unstimulierten Kontrolle wurde lediglich 1 ml Medium in die Vertiefung gegeben. Die zuvor beschriebenen Standardbereiche am Deckglasrand wurden mit einem wasserfesten Stift von unten außen am Boden der 6-Loch-Platte markiert. Eine Markierung senkrecht zur Deckglaskante sollte im Folgenden helfen die entsprechenden Bereiche zu beobachten und das Migrationsverhalten der dort hervor wachsenden Zellen zu verfolgen und die entsprechende Stelle exakt wieder zu finden. Definiert als Tag 1 war der Tag, an dem mit der Stimulation der Tumorzellen begonnen wurde. Nach Markierung der optimalen Stellen und Zugabe des Stimulationsmediums wurden die markierten Bereiche an Tag 1 unter dem Mikroskop abfotografiert und anschließend ausgemessen. Hierfür wurde der Bereich der zuvor markierten Stellen erfasst. Über einen 400 μm breiten Abschnitt entlang des Deckglasrandes wurde die Strecke bestimmt, die die Zellen ausgehend vom Deckglasrand innerhalb der ECM zurückgelegt hatten. Zur größeren Messgenauigkeit wurde der Abschnitt von 400 μm in fünf einzelne Punkte im Abstand von jeweils 100 μm unterteilt. Von jedem der fünf Punkte ausgehend wurde nun die Distanz in μm gemessen, welche von den auf ECM wandernden Zellen überwunden wurde. Aus diesen fünf Werten wurde anschließend ein Mittelwert erhoben. Zuletzt wurde mit Hilfe der AxioVision-Software die dem 400 μm breiten Abschnitt des Deckglasrandes vorgelagerte ECM-Gesamtfläche berechnet, die (ausgehend von/bezogen auf dem/den 400 μm breiten Abschnitt) mit migrierten Zellen besetzt war.

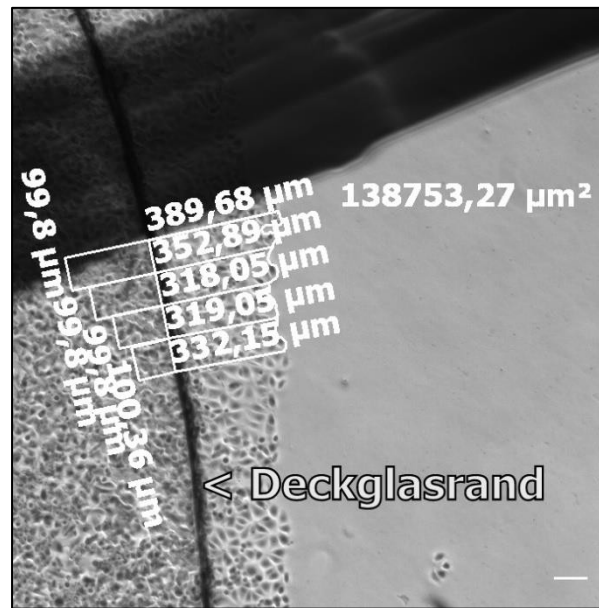


Abbildung 6 MCF-7-Zellen wanderten aus einer 3D-Zone (linkes Bilddrittel) hervor und konnten anschließend hinsichtlich ihrer Wanderungsstrecke und -fläche auf der ECM (weiße Markierungen rechts des schwarzen Deckglasrandes) standardisiert analysiert werden. Die Abbildung zeigt die erste Messung bei Stimulationsbeginn (= Tag 1) eines unstimulierten Kontrollansatzes (V 37). Der Maßstabsbalken rechts unten zeigt 100 μm an.

Das Stimulationsmedium wurde nach 48 Stunden erneuert. Die Auswertung fand an Tag 5 nach 96 Stunden Inkubation unter Stimulation statt. Dabei wurden an den zuvor markierten Stellen die ausgewachsenen Zellfronten am Mikroskop wiederum fotografisch dokumentiert und mit Hilfe des Scaling-Werkzeugs der AxioVision-Software von Zeiss standardisiert ausgemessen. Die Werte der Startpunktmessung von Tag 1 wurden zuletzt von denen der Endpunktmessung an Tag 5 abgezogen, die Differenzwerte zeigen jeweils die migrierte Strecke der Zellen bzw. die Zunahme der Migrationsfläche an. Die Mittelwerte der Migrationsstrecken und -flächen aus den Versuchsansätzen wurden jeweils im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle betrachtet. Berechnungen zur Signifikanz wurden mit dem einseitigen Student'schen t-Test mit Hilfe des Programms Statistica 9 (StatSoft) durchgeführt.

3.4 NEU ETABLIERTE METHODE MODIFIZIERTER KONFRONTATIONSASSAY AUF ECM

Wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Konzipierung eines Assaymodells, welches die konfrontative Zellmigration ermöglichen und Rückschlüsse auf Vorgänge bei der epithelialen Wundheilung zulassen sollte. Näheres zu Idee und Aufbau des entwickelten Modells findet sich daher im Ergebnisteil dieser Arbeit (Kap. 5) sowie in Klemm et al. 2011.

Im Folgenden soll jedoch die rein methodische Vorgehensweise detailliert beschrieben werden.

Wie bereits im Migrationsassay auf ECM eingesetzt, wurde auch bei diesem neu entwickelten Konfrontationsassay BM-Extrakt verwendet und 1:4 mit serumfreiem Kulturmedium gebrauchsfertig verdünnt. Runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm wurden in die Vertiefungen von 24-Loch-Platten gelegt und mit Matrix-Extrakt überzogen. Innerhalb von 10 Minuten polymerisierte die ECM-Schicht bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit wurden die kultivierten Tumorzellen vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und gezählt. In einer Ziel-Konzentration von jeweils 300.000 Zellen pro Deckglas wurde die Zellsuspension in Standardkulturmedium in die Vertiefungen auf die mit ECM beschichteten Deckgläser pipettiert. Die Zellen wurden für 72 Stunden im Brutschrank belassen, um auf den ECM-Deckgläsern anwachsen zu können. Bei der anschließenden Betrachtung unter dem Mikroskop sollten die Zellen dicht gewachsen auf dem ECM-Deckglas sitzen und es bis an seinen Rand ausfüllen. War dies gegeben, konnte weiter verfahren werden. ECM-Gel wurde 1:4 mit serumfreiem RPMI 1640 verdünnt und der Boden einer 6-Loch-Platte mit verdünntem ECM-Gel überzogen. Nach Polymerisierung der ECM-Schicht bei Raumtemperatur wurde 2 ml Kulturmedium in jede Kammer vorgelegt, die 6-Loch-Platte anschließend etwas schräg gestellt. Mit der sterilen Pinzette wurden schließlich die Deckgläser mit den angewachsenen Tumorzellen auf ECM aus der 24-Loch-Platte entnommen und zum Entfernen von noch anhaftendem Zelldebris kurz in einem 50 ml-Röhrchen mit Kulturmedium gespült. Jetzt wurde das Deckgläschen um 180° gewendet mit der Zellseite nach unten behutsam auf den ECM-beschichteten Boden der 6-Loch-Platte absinken gelassen. Auf diese Weise war wiederum eine dreidimensionale Einbettung der Zellen in Matrix gegeben. Diese Deckgläschen wurden nun für mindestens eine Stunde unter der Sterilbank in Schräglage belassen, um die Zellen ein Stück weit anhaften zu lassen und ein sofortiges „Abschwimmen“ der Deckgläschen bei kleinster Erschütterung zu verhindern. Dann erst wurde das zweite Deckgläschen im Abstand von 3 mm zum ersten aufgebracht. Um den Abstand zwischen den beiden Deckgläschen standardisiert in immer derselben Millimeterzahl zu erreichen, wurde eine Schablone entworfen, welche unter der sterilen Sicherheitswerkbank verblieb. Diese wurde jeweils vor dem Auflegen der Deckgläschen auf die ECM-Schicht unter dem durchsichtigen Boden der 6-Loch-Platte platziert und war anschließend durch diesen hindurch gut zu erkennen.

Zum adhärennten Anwachsen folgte der vorsichtige Transfer der 6-Loch-Platte mit den Deckgläschen in den Brutschrank zur Inkubation für wiederum 72 Stunden. Anschließend wurden die Deckgläser unter dem inversen Durchlicht-Mikroskop inspiziert. Es wurden wieder Stellen ausgemacht, an denen die Tumorzellen gleichmäßig und dicht unter dem

Rand des Deckglases hervorzuwachsen begannen. Hierbei wurde jeweils an der zum gegenüberliegenden Deckglasrand zeigenden Deckglaskante gesucht. Es wurden Aufnahmen mit dem 2,5er-Objektiv gemacht. Rechts und links am Bildrand waren die Deckglaskanten und die darunter hervorkommenden Zellfronten zu sehen. Die rekombinanten Proteine Wnt5b und Dkk-2 wurden in der bereits erprobten Konzentration von jeweils 100ng/ml in RPMI-10 % FKS zugesetzt. Das alte Medium der Zellen wurde abgesaugt und jeweils 1 ml Stimulationsmedium in jede 6-Loch-Platten-Vertiefung pipettiert. Bei der stets mitgeführten unstimulierten Kontrolle wurde lediglich 1 ml Medium ohne rekombinante Proteine in die Vertiefung gegeben. Die engste Stelle zwischen den beiden sich gegenüberliegenden Deckgläsern war mikroskopisch gut auszumachen und wurde stets in die Mitte des Blickfeldes gerückt. Von nun an wurde der Spalt zwischen den beiden Deckglasrundungen täglich am Mikroskop abfotografiert, um das Wachstum der Tumorzellen im weiteren Verlauf sicher zu erfassen.

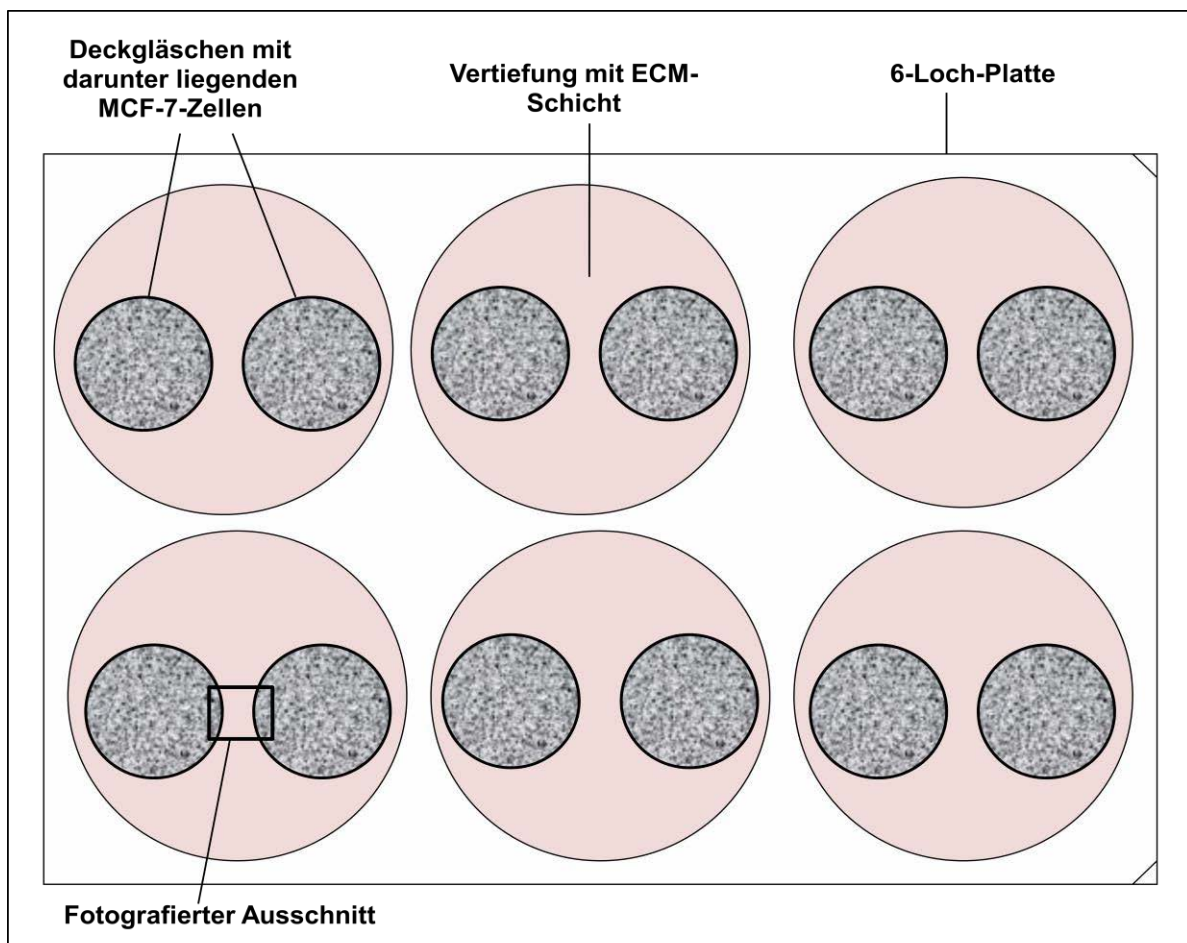


Abbildung 7 Schema eines in der 6-Loch-Platte angesetzten Konfrontationsassays von oben gesehen. Auf die in den Vertiefungen ausgestrichene ECM-Schicht wurden pro Vertiefung je zwei Deckgläser mit MCF-7-Zellen einander gegenüberliegend in standardisiertem Abstand aufgebracht. Die Zellen würden nun beginnen kollektiv unter den Deckgläsern hervor zu wandern und den Spalt zwischen den Deckgläsern nach und nach schließen.

Das Medium und die gegebenenfalls zugesetzten stimulierenden Faktoren wurden nach 48 Stunden ersetzt. Die Auswertung fand nach 96 Stunden Inkubation statt. Dabei wurden an den zuvor markierten Stellen die ausgewachsenen Zellfronten am Mikroskop mit 2,5-facher Vergrößerung fotografisch dokumentiert und mit Hilfe des Scaling-Werkzeugs der AxioVision-Software von Zeiss ausgemessen. Analog zur Methode Migrationsassay auf ECM erfolgte der Start der Messung am definierten Tag 1, dem Beginn der Stimulation. An Tag 5 wurde die Endpunktmessung vorgenommen. Von diesem Wert wurde schließlich der Startmesswert abgezogen um die zurückgelegte Migrationsstrecke der Zellen zu ermitteln.

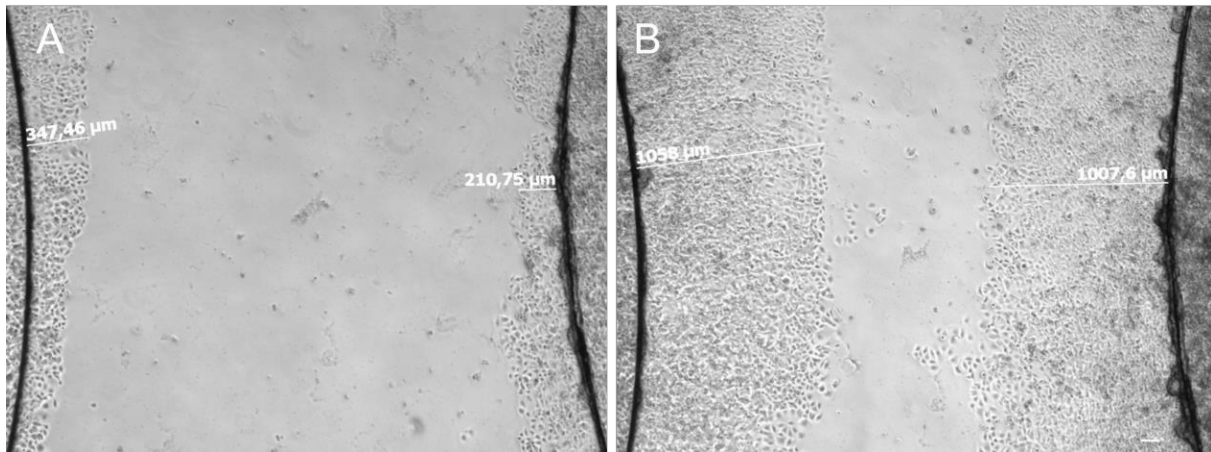


Abbildung 8 In der 6-Loch-Platte sich gegenüber liegende Deckgläser mit als Migrationsfront heraus wachsenden MCF-7-Zellen. **A** Definierter Tag 1 eines Versuchsansatzes ohne zugesetzte Stimulationsfaktoren. Start der Messung. **B** Die Tumorzellfronten waren an Tag 4 des unstimulierten Versuchsansatzes aufeinander zugewachsen und waren dabei den Spalt zwischen den Deckglasrändern nach und nach zu schließen. Stopp der Messung. Maßstabsbalken 100 µm.

Es gelang im Assaymodell nicht vollständig, den Abstand zwischen den beiden Deckgläsern zu standardisieren, da es bei nahezu jedem Versuchsaufbau zu minimalem Verrutschen der von Kulturmedium umgebenen Deckgläschen bei deren Aufbringen auf die ECM-Schicht kam. Jedoch wurden letztendlich stets die Ausgangsstrecke und die Endstrecke der gewanderten Zellen gemessen und voneinander subtrahiert. So erhielt man am Ende immer die effektiv zurückgelegte Distanz der Zellen, wodurch die Messergebnisse untereinander vergleichbar waren.

3.5 MIKROSKOPIE

Die Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie erfolgte am Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss). Zur Bilddokumentation wurde die angeschlossene CCD-Kamera AxioCam MRm (Zeiss) verwendet. Bearbeitet wurden die Bilder mit Hilfe des Scaling-Werkzeugs der Software AxioVision Version 4.6 (Zeiss).

3.6 DER COLORIMETRISCHE MTT-TEST ZUR MESSUNG DER ZYTOTOXIZITÄT

Der Nachweis der Zellvitalität mittels MTT-Test beruht auf der Reduktion des hellgelben, wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) über das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System in das dunkelblauviolette, wasserunlösliche Formazan. Da der Farbstoff nur von vitalen Zellen umgesetzt wird, ist die gemessene Absorption direkt proportional zur Menge der vitalen Zellen. (Im MTT-Test werden Zellen in vitro mit dem namensgebenden Farbstoff, dem gelben Tetrazolium-Salz, behandelt, um die Lebensfähigkeit beziehungsweise den Anteil der aktiven, lebenden Zellen im Vergleich zu einer Kontrollprobe der Zellen zu messen.) Dieser Test kann von Nutzen sein, wenn Zellen mit einer für sie möglicherweise toxischen Substanz versetzt werden, die sie in ihrer Vitalität beeinflusst.

Es wurden je 1×10^5 Tumorzellen pro Vertiefung auf ECM-beschichtete Deckgläschen in 24-Loch-Platten in Triplikaten ausgesät und über Nacht adhärent werden gelassen. Nach 16 Stunden wurden die zu untersuchenden Substanzen Wnt5b und Dkk-2 zugegeben und entsprechend der Laufzeit im Migrations- bzw. Wundheilungs-Assay für 96 Stunden im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und in alle Vertiefungen 50 μ l MTT-Reagenz (5mg/ml in PBS), verdünnt mit 450 μ l Standardzellkulturmedium, hinzugegeben. Die Zellen wurden für weitere vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Innerhalb dieser Zeit wurde das MTT-Reagenz von vitalen Zellen aufgenommen und durch die mitochondriale Succinat-Reduktase in das kristalline Formazan umgesetzt, welches nicht abgebaut werden kann und somit in den Zellen verbleibt (Mosmann 1983). Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei RT wurde das MTT-Reagenz-Medium-Gemisch abgesaugt und durch jeweils 500 μ l MTT-Lyse-Puffer ersetzt. Nach sorgfältigem Durchmischen wurden jeweils 100 μ l des Lysats in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte überführt. Bei 562 nm wurde mit einem ELISA-Reader der Extinktionswert der Zellysate bestimmt. Aus den Tripel-Ansätzen ergab sich ein Mittelwert der gemessenen Extinktion, der ins Verhältnis zu den Messwerten der unstimulierten MCF-7-Kontrolle gesetzt wurde. So würde sich gegebenenfalls zeigen, ob unter Stimulation mit den rekombinanten Faktoren im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine veränderte Zellproliferation, etwa im Sinne einer verminderten Anzahl vitaler Zellen, oder aber einer Verminderung der Zellzahl insgesamt stattgefunden hat.

3.7 MARKIERUNGSFREIE ZELLANALYSE DURCH IMPEDANZMESSUNG

Das xCELLigence-System basiert auf einer Technologie, welche Echtzeit-Beobachtungen in der Zellkultur ermöglicht (Abassi et al. 2004; Solly et al. 2004). Das zugrunde liegende

Prinzip der nicht-invasiven und markierungsfreien xCELLigence-Methode ist die Messung des Wechselstromwiderstandes (Impedanz) von Zellen. Dieser ändert sich je nach Anzahl, Adhäsion und Form der Zellen. Die xCELLigence Real-Time-Cell-Analyzer(RTCA)-Geräte verfolgen ohne exogene Markierungen kontinuierlich die Reaktion der Zellen durch Messung der Impedanz. In den Boden von eigens konstruierten Gewebekulturplatten mit 16 Vertiefungen, sogenannten E-Plates, sind Mikroelektroden integriert, die über die Messung der Impedanzänderung quantitative Informationen über den Zellstatus und über Veränderungen der Zellzahl, der Zelladhäsion, der Zellviabilität und der Zellmorphologie liefern. Die Veränderungen während des Versuchsablaufs können live beobachtet und aufgezeichnet werden und erlauben im Gegensatz zur Endpunktanalyse Aussagen über den kompletten Verlauf eines Versuchsansatzes. Durch seine geringe Größe kann das RTCA-Gerät mit den E-Plates in einem gewöhnlichen CO₂-Inkubator platziert werden, was das Erreichen optimaler Standard-Zellkulturbedingungen möglich macht. Der angezeigte Status der Zellen in der Kulturplatte wird durch den sogenannten Zellindex (CI) dargestellt.

$$CI = \max_{i=1, \dots, N} \left(\frac{R_{cell}(f_i)}{R_0(f_i)} - 1 \right)$$

Dabei ist N die Anzahl der Frequenzen, bei denen die Impedanz gemessen wird (z.B. N=3 für 10 kHz, 25 kHz und 50 kHz) und der Widerstand an der Elektrode bei entsprechender Frequenz durch $R_0(f)$ und $R_{cell}(f)$ für zellfreie und bewachsene Vertiefungen (Atienza et al. 2005). Je größer der Zellindex ist, desto intensiver ist die Interaktion zwischen den Zellen und dem Boden der Vertiefung, was durch die Anzahl der Zellen, ihre Größe und die Stärke der Interaktionen mit dem Gefäßboden beeinflusst wird. Auf diese Weise können Einflüsse auf Zellen wie Apoptose-Induktion, Virusinfektion oder aber ein verändertes Proliferationsverhalten der Zellen unmittelbar und in Echtzeit beobachtet werden.

In Vorversuchen musste für die Zelllinie MCF-7 eine Wachstumskurve inklusive dazugehörigem CI ermittelt werden, wobei durch eine Zelltitration die optimale Zelldichte pro Vertiefung bestimmt wurde. Ein Ansatz für MCF-7-Zellen von 80.000 Zellen pro Vertiefung wurde vom Hersteller empfohlen und innerhalb der Vorversuchsreihe schließlich als optimale Zelldichte bestätigt. Grundsätzlich wurde vor jedem Versuchsansatz eine Hintergrundmessung mit 50 µl Zellkulturmedium durchgeführt um die Qualität der Mikrotiterplatte zu testen und den Hintergrund bei allen Messungen abziehen zu können. Messungen unbehandelter Zellen und Positivkontrollen waren für eine Quantifizierung der Messwerte unerlässlich, um Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen zu kompensieren.

3.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm Statistica 9 (StatSoft) durchgeführt. Von sämtlichen *In-Vitro*-Daten wurden die Mittelwerte (MW) und die entsprechenden Standardabweichungen (SD) ermittelt. Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test berechnet, ein p-Wert von $< 0,05$ gilt als signifikant. Die Erstellung der Säulendiagramme erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 6. (GraphPad Software). Für das System xCELLigence von Roche wurde die dazugehörige Software RTCA 1.2.0.0909 zur Auswertung und Erstellung der Diagramme verwendet.

4 ERGEBNISSE DER MIGRATIONSUNTERSUCHUNGEN AUF ECM

Vorausgehende Versuche der Arbeitsgruppe zum Einfluss der Proteine Wnt5a und Dkk-1 auf die Zellmigration haben gezeigt, dass dieser sich änderte in Abhängigkeit vom Untergrund, auf dem die Zellen wanderten. Teilweise konträre Wirkweisen des in erster Linie als Wnt-Inhibitor bekannten Proteins Dkk-1 ließen auf einen stärkeren Einfluss der ECM schließen als bisher vermutet: Dkk-1 verstärkte, genau wie der Aktivator Wnt5a, sowohl bei alleiniger Zugabe als auch in kombiniertem Einsatz mit Wnt5a die Migration von MCF-7-Zellen auf ECM-beschichtetem Untergrund. An dieser Steigerung des Migrationsverhaltens ist der β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg anscheinend nicht unmittelbar beteiligt. Parallele Anfärbungen des Proteins β -Catenin zeigten weder unter Stimulation mit Wnt5a noch mit Dkk-1 eine Translokation von zytosolischem β -Catenin in den Zellkern (Podleschny 2006).

Auch die anhand von Immunfluoreszenzfärbungen des Aktin-Zytoskeletts der Zellen gewonnenen Ergebnisse der Arbeitsgruppe wiesen auf die unterschiedliche Wirkweise des Proteins Dkk-1 in Abhängigkeit vom Zelluntergrund hin: auf ECM entwickelten die Tumorzellen unter Stimulation mit Dkk-1 Membranausläufer und eine unregelmäßige Zellform, vergleichbar mit Zellen, die mit Wnt5a stimuliert wurden. Die morphologischen Umbauvorgänge des Aktin-Zytoskeletts erfolgten offenbar über eine Aktivierung der durch Immun-Färbungen sichtbar gemachten Mediatoren des *nicht*-kanonischen PCP-Signalweges RhoA und JNK/c-jun (Schindler 2010).

Nun wurde weiterführend innerhalb der Arbeitsgruppe mittels Wnt-spezifischem cDNA-Microarray gesehen, dass in der hochinvasiven humanen Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231 Wnt5a und in noch viel stärkerem Maße Wnt5b überexprimiert wird. In der nur schwach invasiven epithelialen MCF-7-Zelllinie konnte dagegen kein Wnt überexprimiert nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch nach Zugabe von rekombinantem Wnt5b im Mikroinvasionsassay in modifizierten Boyden-Kammer-Versuchen eine deutlich gesteigerte Invasion der MCF-7-Zellen (Klemm et al. 2011). Darüber hinaus haben in der Boyden-Kammer durchgeführte Invasionsversuche mit Mikroglia- und MCF-7-Zellen gezeigt, dass die Mikroglia-induzierte Invasion von MCF-7-Zellen durch Dkk-2 nahezu komplett aufgehoben wird (Pukrop et al. 2010).

An diese Beobachtungen anknüpfend sollten nun die an der Ausbreitung epithelialer Zellen beteiligten Proteine Wnt5b und Dkk-2 auf den Teilvorgang der Migration hin näher untersucht werden. Darüber hinaus sollte ein verbessertes *in vitro*-Modell zur Übertragung von beobachteten Migrationsphänomenen auf die epitheliale Wundheilung etabliert werden. Ausgehend von der seit langem etablierten Methode des Scratchassays auf Plastikuntergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein modifizierter Konfrontationstest auf extrazellulärer Matrix entworfen. Schließlich wurde der Einfluss von Wnt5b und Dkk-2 auf die

Migration von Mammakarzinom-Zellen vergleichend im Migrationsassay sowie im neu etablierten Konfrontationsassay auf ECM untersucht. In beiden Modellen wurden Messungen der Migrationsgeschwindigkeit der eingesetzten epithelialen Zellen unter Stimulation mit den Faktoren Wnt5b und Dkk-2 vorgenommen.

Beobachtet wurde bereits bei der Etablierung des Migrationsassays auf ECM, dass hierbei eine gerichtete Migration der MCF-7-Zellen vorlag.

Die schwach invasive epitheliale Zelllinie MCF-7 schien im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl für Untersuchungen im *In-Vitro*-Tumormodell als auch für das *In-Vitro*-Assaymodell zur epithelialen Wundheilung gut geeignet.

4.1 KEIN EINFLUSS VON WNT5B UND DKK-2 AUF DIE VIABILITÄT DER ZELLEN IM MTT-ASSAY AUF ECM

Um auszuschließen, dass im Folgenden beobachtete zelluläre Effekte im Migrationsassay auf ECM sowie im entwickelten Konfrontationsassay auf ECM lediglich auf einer unterschiedlichen Proliferationsaktivität beruhen bzw. die zugegebenen rekombinanten Faktoren Wnt5b und Dkk-2 in den eingesetzten Konzentrationen die MCF-7-Zellen schädigen, wurden Viabilitätsanalysen mittels MTT-Tests unter den entsprechenden Assay-Bedingungen durchgeführt. Die Viabilitätsmessungen der MCF-7-Zellen nach Stimulation mit Dkk-2 zeigte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass sämtlichen beobachteten Migrationsphänomenen Veränderungen der Viabilität der Zellen bzw. möglicherweise induzierte Proliferation zugrunde liegen.

4.2 KEIN EINFLUSS VON WNT5B UND DKK-2 AUF DIE ZELLPROLIFERATION IN DER ANALYSE MIT DEM XCELLIGENCE SYSTEM

Um den Einfluss der eingesetzten rekombinanten Faktoren Wnt5b und Dkk-2 auf die Proliferation der MCF-7-Zellen zu eruieren, erfolgte die Zellanalyse mit dem RTCA-Gerät. Durch Messung der Proliferation war es möglich zu zeigen, dass eine verminderte Migration der MCF-7-Zellen nicht aufgrund einer verminderten Zellviabilität beobachtet wurde. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zwischen unstimulierter Kontrolle und mit Wnt5b bzw. Dkk-2 stimulierten MCF-7-Zellen. Im nachfolgend abgebildeten Diagramm wird dies noch einmal ersichtlich.

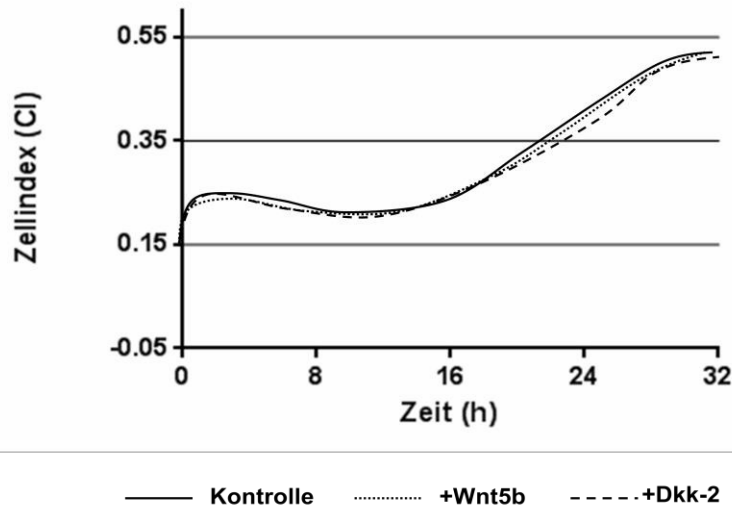


Abbildung 9 Proliferationspotenzial der Zelllinie MCF-7 mit dem xCELLigence-System. 80.000 MCF-7-Zellen wurden in eigens dafür vorgesehenen 16er-Platten ausgesät und die Zellproliferation für 32 h (vor Einsetzen einer Kontaktinhibierung) aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit der RTCA 1.2.0.0909-Software der Firma Roche, Penzberg. Dargestellt ist ein beispielhaftes Ergebnis von n=4 Versuchen.

4.3 KEIN EINFLUSS VON WNT5B UND DKK-2 AUF DIE ZELLMIGRATION IM MIGRATIONSASSAY AUF ECM

Nachdem sich die herkömmliche Methode Scratchassay auf Kunststoffuntergrund zur funktionellen Analyse des Migrationsverhaltens von Tumorzellen in ihrer Mikroumgebung als unzureichend erwiesen hatte, wurde innerhalb der Arbeitsgruppe ein Assay zur Durchführung von Migrationstests auf ECM entwickelt (siehe Kap. 3.3). Dieser Migrationsassay auf ECM entspricht eher dem physiologischen Untergrund im Vergleich zu den Oberflächen der Petrischalen, die gewonnenen Ergebnisse können somit eher auf die Situation *in vivo* übertragen werden. In den Migrationsuntersuchungen zeigte sich reproduzierbar in sämtlichen durchgeführten Experimenten auf ECM kein Unterschied in der Migrationsaktivität der MCF-7-Zellen, weder unter Zugabe von Wnt5b noch unter Dkk-2. Die folgenden beispielhaft ausgewählten Abbildungen zeigen jeweils die Messergebnisse am definierten Tag 1 des Versuchs, dem Beginn der Messung, sowie die Ergebnisse an seinem Endpunkt nach Ablauf von 96 Stunden (Tag 5). Die folgenden Abbildungen zeigen repräsentative Versuche aus mindestens drei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchsansätzen.

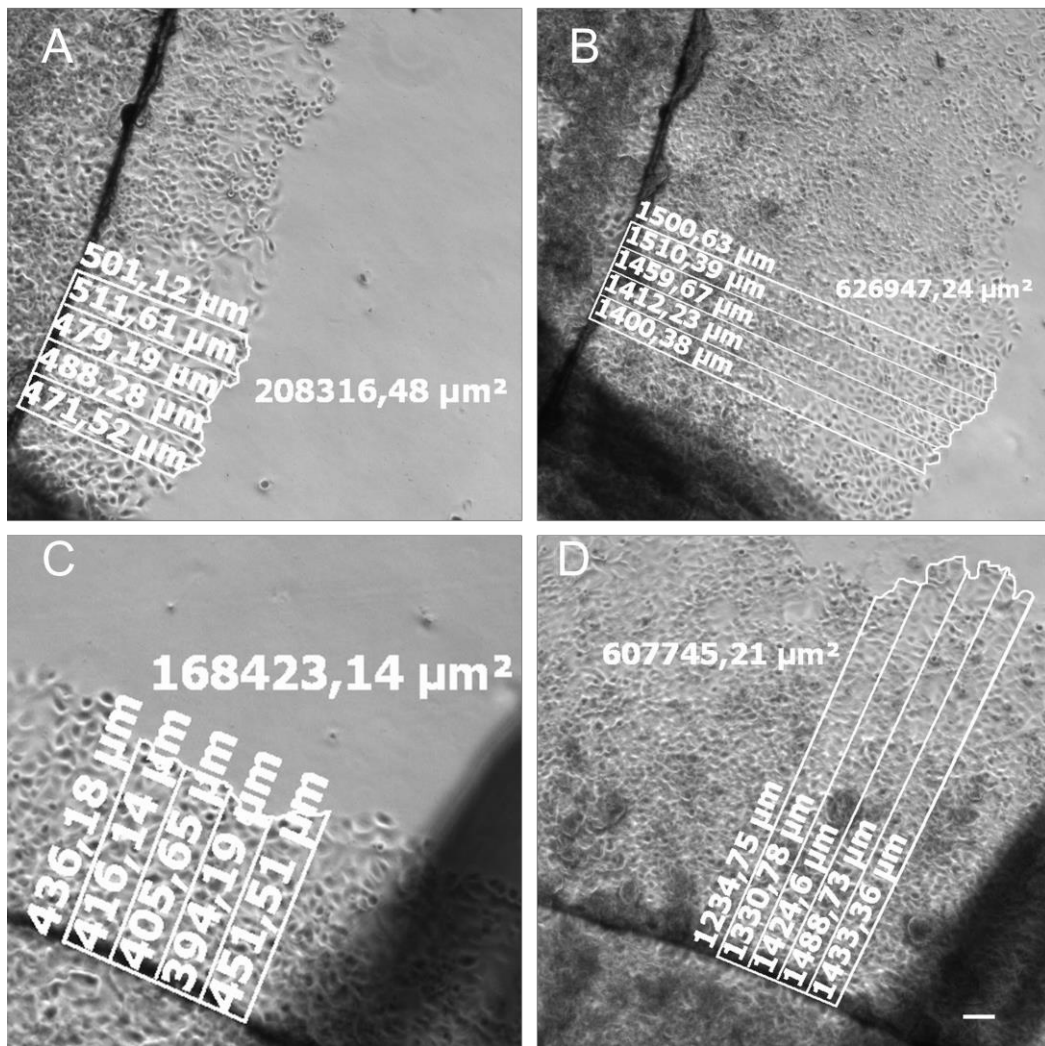


Abbildung 10 MCF-7-Migrationsfronten **A** Ausgangsfront vor Zugabe von Wnt5b an Tag 1 **B** nach 96 Stunden unter Stimulation mit 100 ng/ml Wnt5b an Tag 5 **C** Ausgangsfront des Kontrollansatzes an Tag 1 und **D** Kontrollansatz nach 96 Stunden an Tag 5. Maßstabsbalken (auch in der folgenden Abbildung) 100 µm.

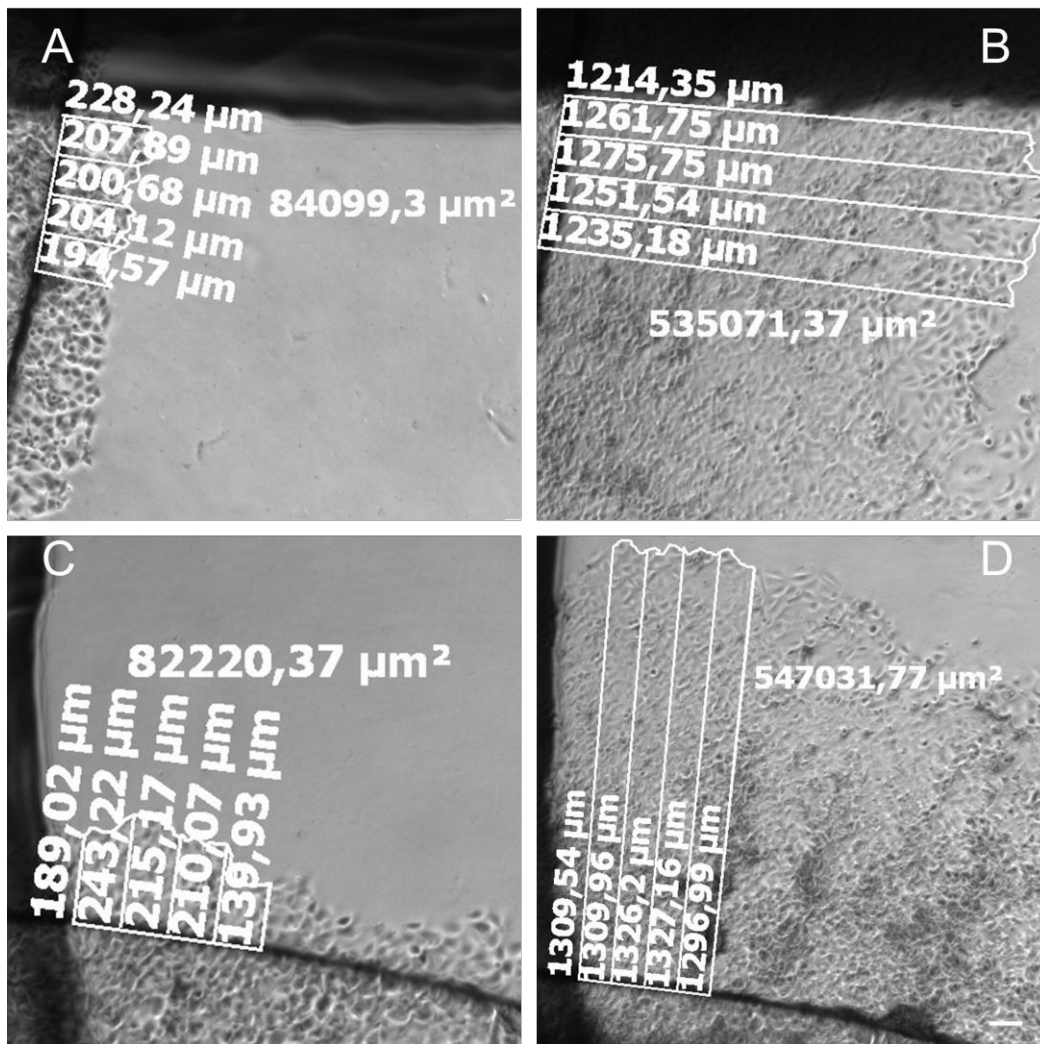


Abbildung 11 MCF-7-Migrationsfronten **A** Ausgangsfront vor Zugabe von Dkk-2 an Tag1 **B** nach 96 Stunden unter Stimulation mit 100 ng/ml Dkk-2 an Tag 5 **C** Ausgangsfront des Kontrollansatzes an Tag 1 und **D** Kontrollansatz nach 96 Stunden an Tag 5.

Die gemessenen Distanzen der Tumorzellen zeigen keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen. In allen zwölf durchgeführten Versuchen konnte weder eine Steigerung der migratorischen Aktivität der Tumorzellen noch eine Hemmung derselben unter Wnt5b und Dkk-2 im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle beobachtet werden. Auch konnte im Hinblick auf die Morphologie und Größe der Zellen oder auf die Art des Migrationsverhaltens (Einzelzell- vs. Migration im Zellverband), soweit unter dem Lichtmikroskop erkennbar, keine Unterschiede beobachtet werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der verschiedenen Messungen der Migrationsaktivität noch einmal zusammengefasst und anhand zweier Diagramme veranschaulicht. Zuerst werden die von den Tumorzellen zurückgelegten Distanzen nebeneinander gezeigt, in der zweiten Abbildung werden die mit migrierten MCF-7-Zellen besetzten Flächen vergleichend unter den jeweiligen Versuchsbedingungen dargestellt.

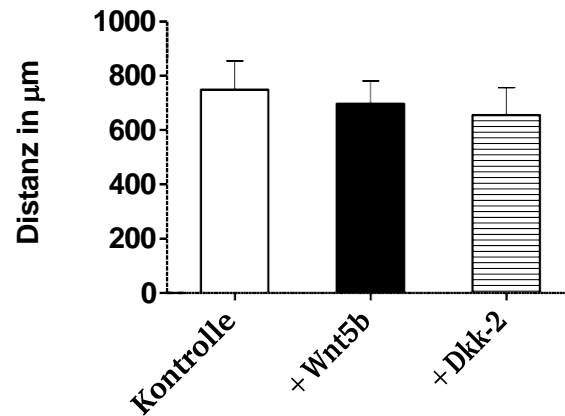


Abbildung 12 Messung der Distanzen der Migrationsfront nach Stimulation mit Dkk-2 und Wnt5b. Für die einzelnen Ansätze im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle wurden Signifikanzen mittels t-Test berechnet. Es ergaben sich keinerlei Signifikanzen, die gemessenen Werte glichen sich trotz unterschiedlicher Stimulationsbedingungen. (Mittelwerte und Standardabweichungen) n=12 für jeweils Kontrolle, Wnt5b und Dkk-2.

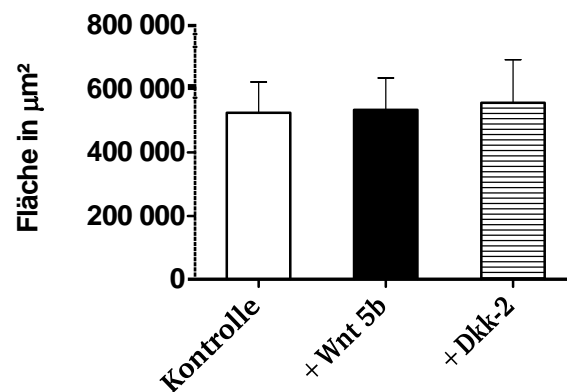


Abbildung 13 Messung der Flächenzunahme im Migrationsassay nach Stimulation der MCF-7-Migrationsfront mit Dkk-2 und Wnt5b. Für die einzelnen Ansätze wurden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle Signifikanzen mittels t-Test berechnet. Es ergaben sich auch hier keinerlei Signifikanzen. (Mittelwerte und Standardabweichungen) n=12.

5 ERGEBNISSE DER METHODENENTWICKLUNG KONFRONTATIONSASSAY AUF ECM

Im folgenden Abschnitt wird die Weiterentwicklung des oben verwendeten Migrationsassays zu einem Konfrontationsassay beschrieben. Hintergrund dieser Weiterentwicklung war die Überlegung, einen direkten Vergleich zweier Migrationsfronten, ggf. perspektivisch auch zweier unterschiedlicher Zelltypen, auf ECM darstellen zu können. Zudem konnte das Verhalten der Zellarten sowie verschiedener Proteine vor, während und nach der Konfrontation/ dem „Wundschluss“ untersucht werden. Das vorläufige Ergebnis dieser Methodenentwicklung wird im Folgenden erläutert und anhand von Schemata und Beispielfotos veranschaulicht.

5.1 DREIDIMENSIONALER START UND KONFRONTATION

In Anknüpfung an das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Tumormodell Migrationsassay auf ECM und an Überlegungen zu Parallelen bei der epithelialen Wundheilung sollte nun ein Konfrontations-/ Wundheilungsassay auf ECM entworfen werden. Es wurden zunächst zwei auf ECM-beschichteten Deckgläschen (DG) mit adhären MCF-7-Zellen einander gegenüberliegend in standardisiertem Abstand auf eine ECM-Schicht aufgebracht. In sich anschließenden Versuchsreihen wurde untersucht, wie viel Zeit benötigt wird bis der Wundspalt durch das migrierende Wachstum der Zellen verschlossen ist.

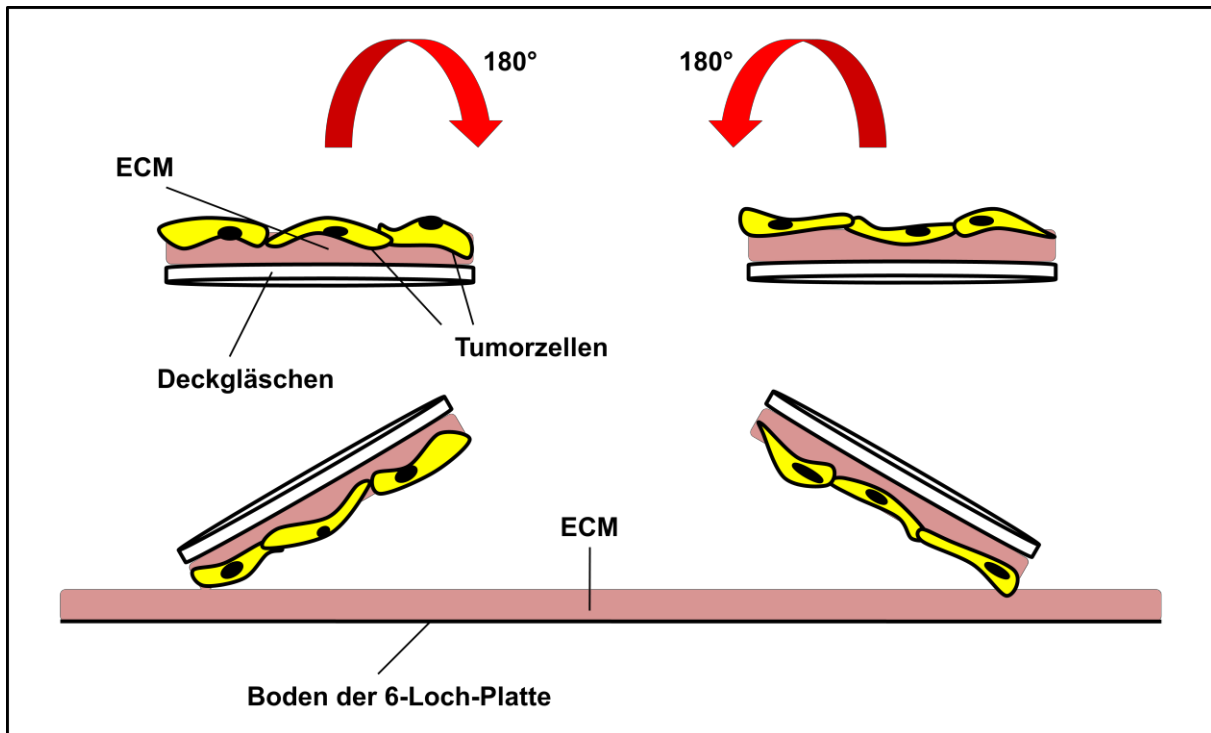


Abbildung 14 Prinzip der Konstruktion eines Konfrontationsassays. Die ECM-Deckgläschen mit den konfluent adhären gewordenen Tumorzellen wurden mit einer Pinzette aufgenommen, um 180° gewendet und auf dem wiederum mit ECM beschichteten Boden der 6-Loch-Platte einander gegenüberliegend im standardisierten Abstand von 3 mm aufgebracht. Schematische Darstellung, von der Seite betrachtet.

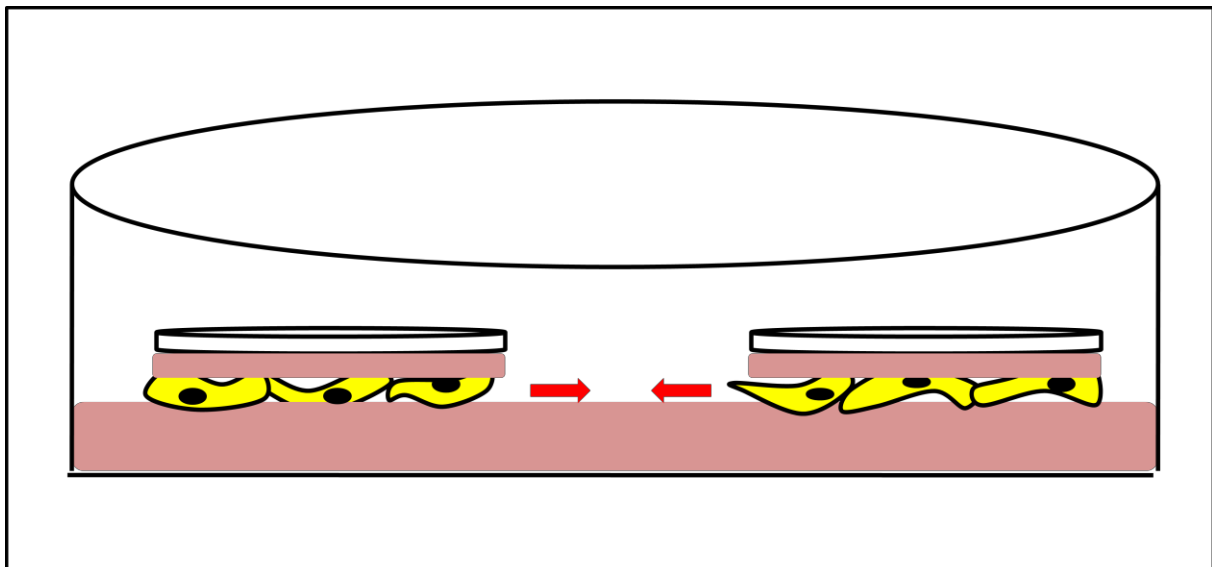


Abbildung 15 Blick von der Seite in eine Vertiefung der 6-Loch-Platte mit zwei einander gegenüber liegenden Deckgläschen. Epitheliale MCF-7-Zellen migrieren nun (vollständig in ECM eingebettet) im Verband unter diesen hervor und anschließend auf der ECM-Schicht aufeinander zu, um den Spalt zu schließen. Schematische Darstellung.

5.2 MIGRATIONSFRONTEN WANDERN UMGEBEN VON ECM AUF EINANDER ZU

In den Konfrontationsassays mit der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 zeigte sich in wiederholten Ansätzen, dass in der Regel an Tag 5 nach Versuchsstart die beiden Migrationsfronten kurz vor der Konfrontation waren (Abb. 17 B). Der Spalt war nun nahezu vollständig durch migrierte Tumorzellen verschlossen.

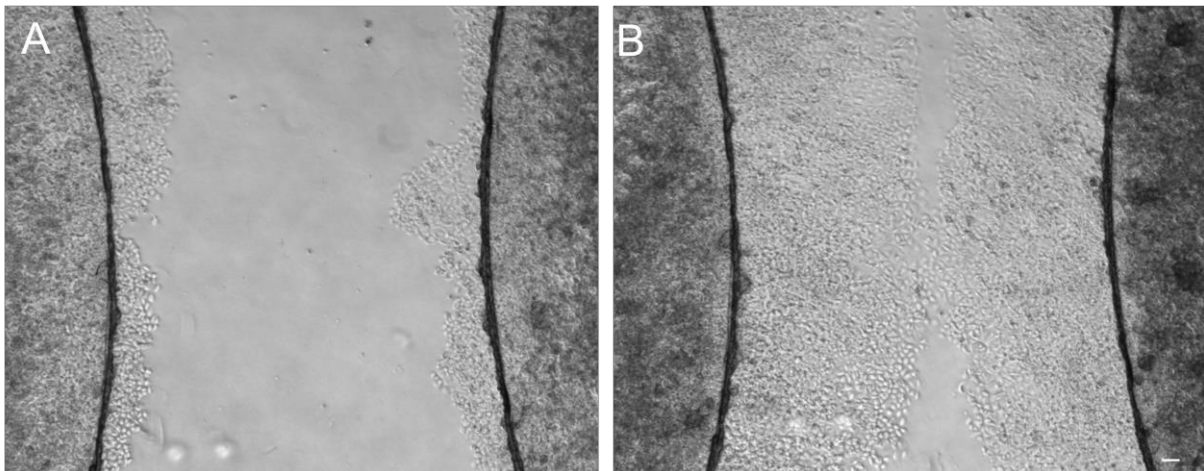


Abbildung 16 **A** MCF-7-Zellen begannen auf der zellfreien ECM-Schicht als Fronten aufeinander zu zu migrieren. Als Tag 1 des Versuches definiert. **B** Die MCF-7-Zellen haben den Wundspalt beinahe vollständig verschlossen. Dieses Bild zeigte sich in der Regel an Tag 5 nach Start des Migrationsvorganges. 2,5-fache Vergrößerung. Maßstabsbalken 100 μm .

5.3 MESSUNG DER ZURÜCKGELEGTEN DISTANZEN DER MIGRATIONSFRONTEN

Die zurückgelegte Distanz beider Migrationsfronten konnte nun analog zur oben beschriebenen Methode des Migrationsassay ausgemessen werden. Die Ausbildung einer Migrationsfront wurde als Tag 1 gewertet und dokumentiert. Sobald die beiden Zellfronten jedoch den Spalt vollständig verschlossen hatten und somit nicht mehr voneinander zu unterscheiden waren, konnte keine Messung der einzelnen Strecken mehr erfolgen. Daher musste der Endpunkt des Versuches kurz vor dem Aufeinandertreffen der beiden Zellfronten gewählt werden. In mehreren Vorversuchen war dies zumeist an Tag 4 bzw. 5 der Fall. Um schließlich die Gesamtdistanz zu erhalten, die von den Tumorzellen zurückgelegt wurde, wurde die an Tag 1 gemessene Distanz von der am Endpunkt des Versuches abgezogen. So erhielt man die effektiv zurückgelegte Distanz der MCF-7-Zellen auf ECM in Richtung des „Wundspaltes“. Dieser war zu Beginn komplett frei von Tumorzellen.

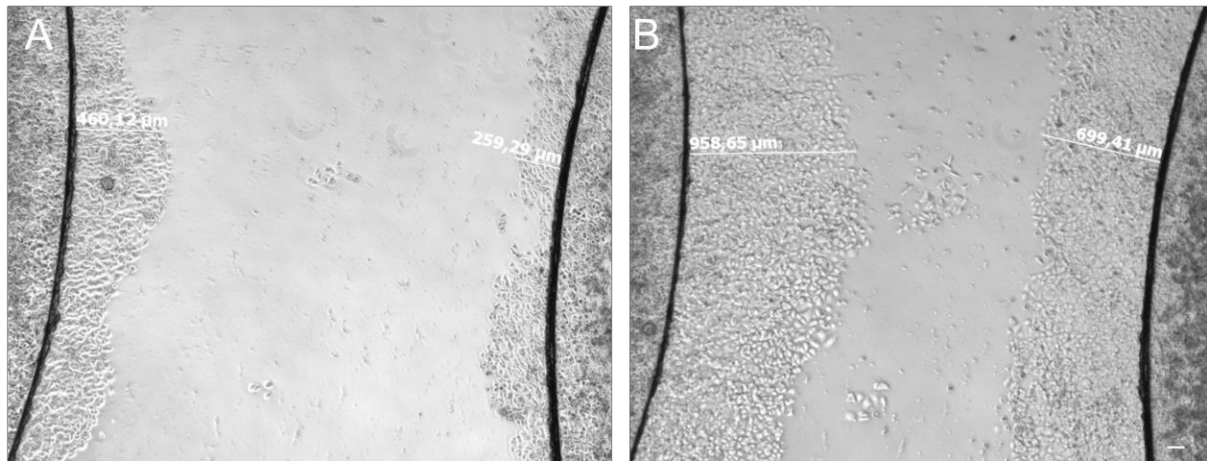


Abbildung 17 **A** Kontrolle MCF-7-Migrationsfront, Start der Messung (Tag 1). **B** Messung der zurückgelegten Distanz der MCF-7-Migrationsfront an Tag 4. Maßstabsbalken (auch in den folgenden zwei Abbildungen) 100 µm.

5.4 ZUGABE DER FAKTOREN WNT5B UND DKK-2 INNERHALB DES KONFRONTATIONSASSAYS AUF ECM

Es wurden nun Folgeversuche unter Zugabe der bereits im Migrationsassay auf ECM eingesetzten Substanzen Wnt5b und Dkk-2 durchgeführt. Genau wie in diesem wurden die beiden Substanzen in der Konzentration von 100 ng je ml Kulturmedium zugegeben. Wiederum wurde für jeden Versuchsansatz mit Stimulationsfaktoren in derselben 6-Loch-Platte ein Kontrollansatz nur mit Kulturmedium als Kontrolle mitgeführt. Für die Abbildungen wurden repräsentative Beispiele verwendet. Alle Versuche unter Zugabe von Wnt5b und Dkk-2 wurden mindestens drei Mal wiederholt mit konstanten, untereinander vergleichbaren Ergebnissen.

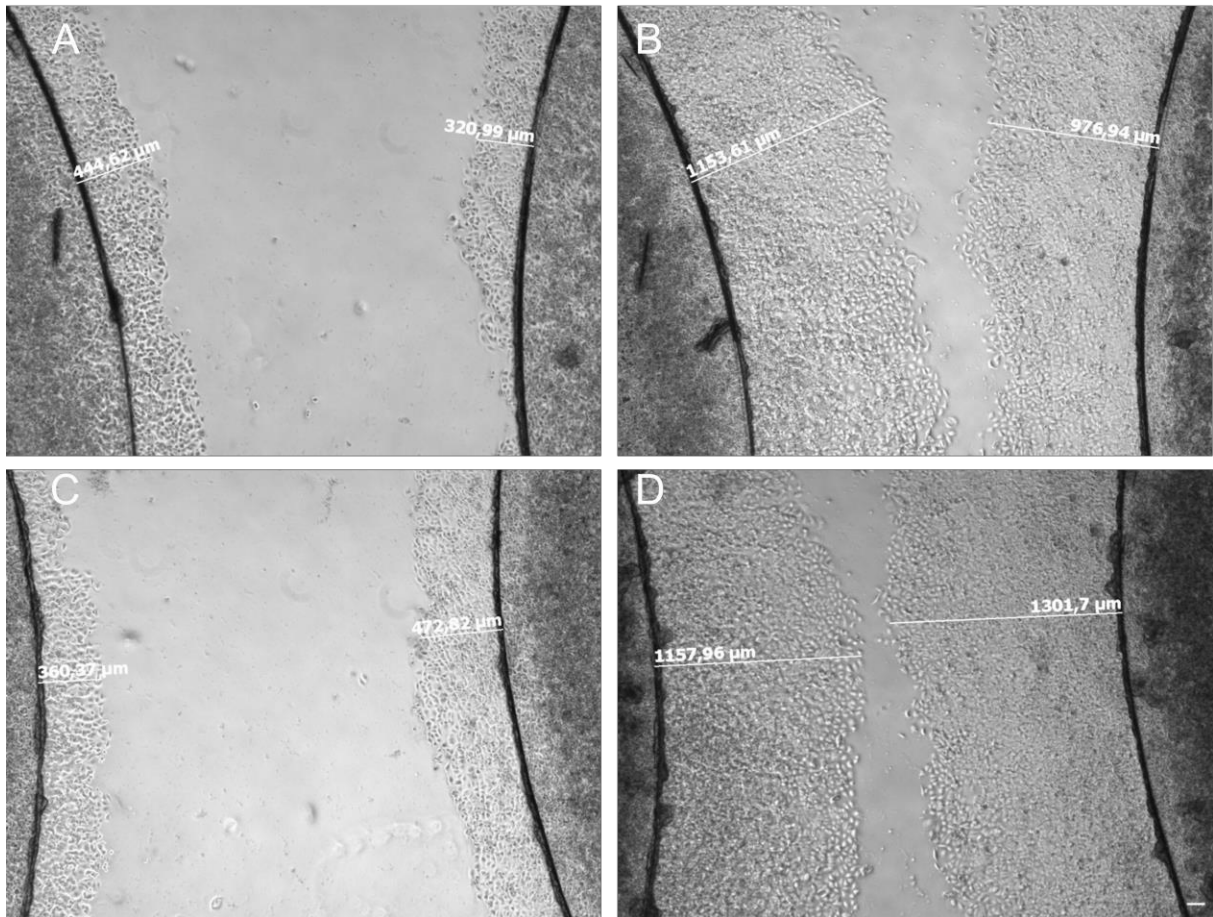


Abbildung 18 MCF-7-Migrationsfronten **A** an Tag 1 vor der Stimulation und **B** an Tag 4 nach Stimulation mit Wnt5b sowie **C** an Tag 1 und **D** an Tag 4 der mitgeführten Kontrolle im Konfrontationsassay auf ECM.

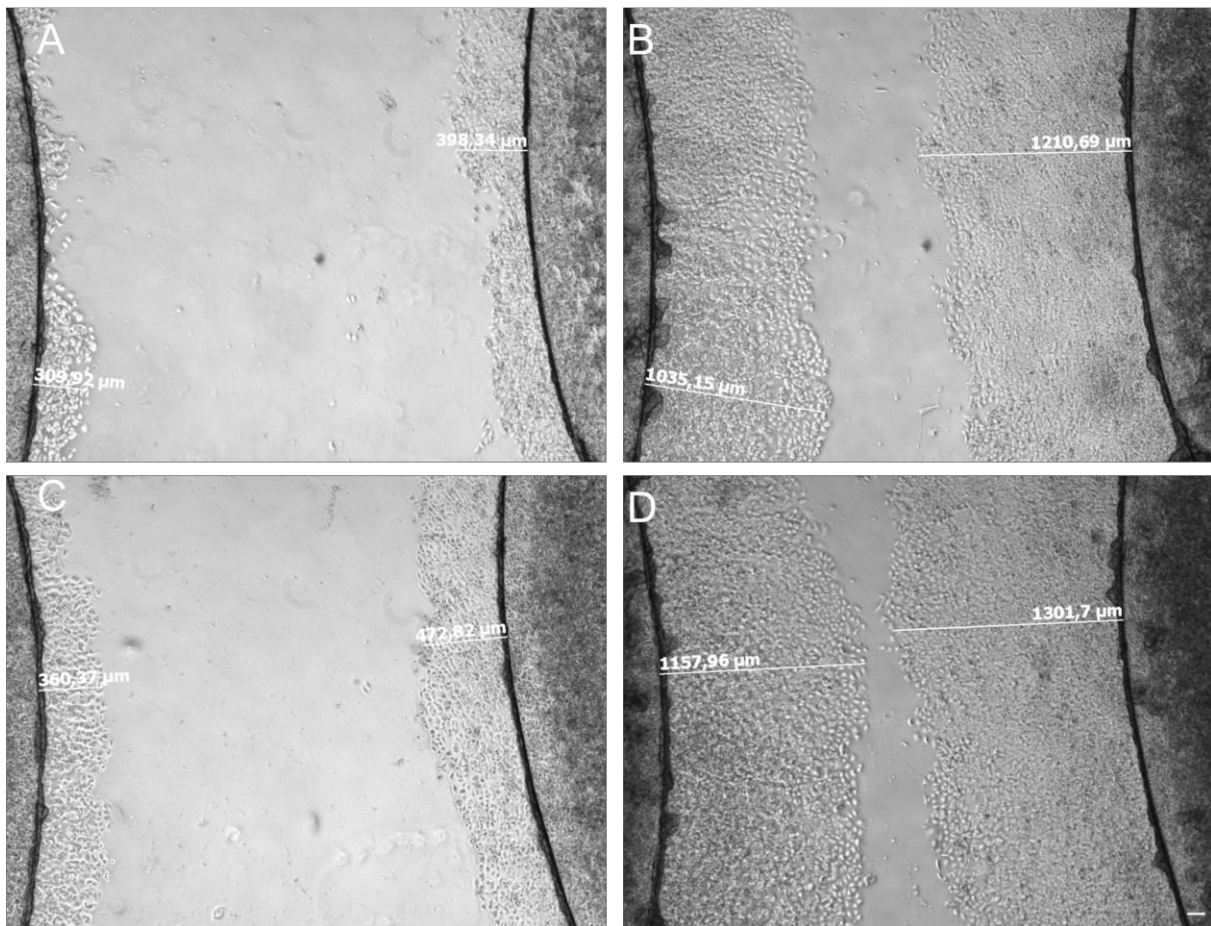


Abbildung 19 MCF-7-Migrationsfronten **A** an Tag 1 vor der Stimulation und **B** an Tag 4 nach Stimulation mit Dkk-2 sowie **C** an Tag 1 und **D** an Tag 4 der mitgeführten Kontrolle im Konfrontations-Assay auf ECM.

5.5 ERGEBNIS DER UNTERSUCHUNGEN MIT DER METHODE KONFRONTATIONSASSAY AUF ECM: KEIN EINFLUSS VON WNT5B UND DKK-2 AUF DAS MIGRATIONSVERHALTEN

Im Konfrontationsassay zeigten die gemessenen Distanzen, welche die Tumorzellen zurücklegten, keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen. In allen zwölf durchgeführten Versuchsansätzen konnte weder unter Wnt5b noch unter Dkk-2 im Vergleich zur mitgelaufenen Kontrolle eine gesteigerte oder gehemmte migratorische Aktivität der Tumorzellen wahrgenommen werden. Das Migrationsverhalten der MCF-7-Zellen war unter allen drei getesteten Versuchsbedingungen vergleichbar. Wie im Migrationsassay auf ECM konnten auch im Konfrontationsassay keine Unterschiede hinsichtlich der Zellmorphologie, -größe oder des Verhaltens der Zellen im Zellverband beobachtet werden. Es zeigten sich reproduzierbar gleiche Ansichten bei der täglichen mikroskopischen Begutachtung und Dokumentierung der einzelnen Versuchsansätze. Im folgenden Diagramm sind die mit der Methode Konfrontationsassay gewonnenen

Distanzmessungen noch einmal veranschaulichend dargestellt. Aufgrund der sich in der Gesamtauswertung nahezu exakt angleichenden Messwerte unter den verschiedenen Bedingungen sowie im Vergleich zur Kontrolle ließ sich auch kein tendenzieller Einfluss auf das Migrationsverhalten ausmachen.

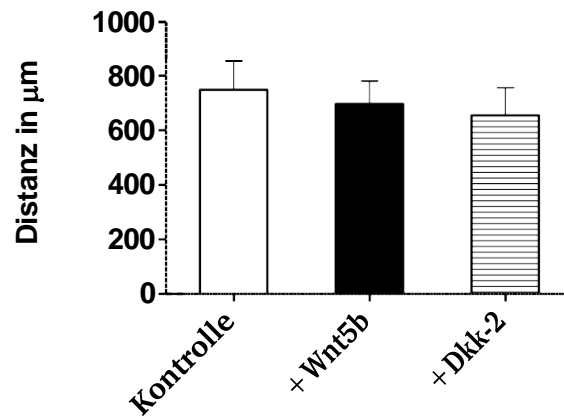


Abbildung 20 Zusammenfassung der Konfrontations-Ergebnisse: abgebildet sind die Mittelwerte Migrationsstrecke mit und ohne Stimulation mit Wnt5b und Dkk-2. Für die einzelnen Ansätze wurden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle Signifikanzen mittels t-Test berechnet. Es ergaben sich keinerlei Signifikanzen. (Mittelwerte und Standardabweichung) n=12.

6 DISKUSSION DER ERGEBNISSE

6.1 BISHERIGE BEOBACHTUNGEN ZUR BEDEUTUNG VON WNT5B UND DKK-2 FÜR DIE AUSBREITUNG EPITHELIALER ZELLEN

6.1.1 AKTIVIERUNG DER INVASION EPITHELIALER ZELLEN DURCH WNT5B

In Genexpressionsanalysen mit Hilfe eines Wnt-spezifischen cDNA-Microarrays entdeckten Klemm et al., dass in der hochinvasiven humanen Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231 Wnt5a und in noch viel stärkerem Maße Wnt5b überexprimiert wird. In der schwach invasiven MCF-7-Zelllinie konnte dagegen kein Wnt überexprimiert nachgewiesen werden. Bei dieser zeigte sich jedoch nach Zugabe von rekombinantem Wnt5b im Mikroinvasionsassay in modifizierten Boyden-Kammer-Versuchen eine deutlich gesteigerte Invasion, welche durch Wnt- und JNK-Antagonisten aufgehoben wurde. Die Expression sowie die zelluläre Verteilung von β -Catenin blieb dabei unbeeinflusst (Klemm et al. 2011). Übereinstimmend damit fanden diese weiterhin in Untersuchungen an 22 menschlichen Hirnmetastasen, dass kein β -Catenin in den Nuclei der Metastasen lokalisiert zu finden war, wohingegen es zu einer starken Anfärbung von nukleärem c-Jun kam. Ebenso wie die Zelllinie MDA-MB-231 zeigten auch die Metastasen eine deutliche Expression von Wnt5a und Wnt5b und der alternativen Wnt-Rezeptoren Ror1 und 2. Dagegen waren sowohl Wnt5a als auch Wnt5b in Mikroglia-Zellen bereits exprimiert, es kam allerdings zu keiner weiteren Hochregulation während Kokultivversuchen mit Brustkrebszellen (Pukrop et al. 2010). Eine Hochregulation von Wnt5a in TAMs in Kokultur mit Brustkrebszellen führte bereits früher zu einer verstärkten, Makrophagen-vermittelten Tumorzellinvasion (Pukrop et al. 2006).

6.1.2 BLOCKIERUNG DER INVASION EPITHELIALER ZELLEN DURCH DKK-2

Kürzlich konnten Pukrop et al. in einem organotypischen Modell an lebenden Hirnschnitten in Kokultur mit MCF-7-Brustkrebszellen zeigen, dass Mikroglia-Zellen, die ortsständigen Makrophagen des Gehirns, die Invasion der Tumorzellen in das Hirngewebe und deren dortige Ansiedelung maßgeblich fördern. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Dkk-2 in Boydenkammer-Versuchen nahezu komplett aufgehoben werden. In diesem Zusammenhang konnte somit eine deutliche Wnt-inhibitorische Wirkung des Proteins Dkk-2 gezeigt werden (Pukrop et al. 2010). Die Mikroglia-induzierte Invasion der MCF-7-Zellen zeigte sich in weiteren Boydenkammer-Untersuchungen abhängig von einer JNK-Aktivierung in den Tumorzellen. In den Versuchen am organotypischen Modell zur Mikroglia-induzierten Invasion der schwach invasiven Zelllinie MCF-7 behielten die Tumorzellen ihre typische epitheliale Morphologie bei, es konnte eine Migration im Zellverband beobachtet werden. Dies lässt die Annahme zu, dass im Verband migrierende Tumorzellen nicht zwangsläufig selbst

mesenchymale Merkmale annehmen müssen, sondern sich von mesenchymalen Zellen wie den Mikroglia-Zellen bei der Invasion unterstützen lassen. Es sollte nun aufgrund der o.g. Ergebnisse untersucht werden, ob die JNK-abhängige gesteigerte Invasion der Tumorzellen auf ein verstärktes Migrationsverhalten der Zellen zurückzuführen sein könnte. Der als mutmaßlicher Inhibitor eingesetzte rekombinante Faktor Dkk-2 sollte weitere Hinweise im Hinblick auf eine mögliche Hemmung des Teilvorganges der Migration geben.

6.2 KEIN EINFLUSS VON WNT5B UND DKK-2 AUF DIE ZELLMIGRATION IN DEN ASSAYMODELLEN AUF ECM

In dieser Arbeit sollte gezielt das Migrationsverhalten der Zellen als möglicher, durch Wnt regulierter Teilaspekt der Invasion auf ECM untersucht werden. Speziell das bisher noch ungenügend bekannte Protein der Wnt-Familie Wnt5b wurde in diesen Versuchen eingesetzt. Dies erfolgte zum einen im innerhalb der Arbeitsgruppe bereits etablierten Migrationsassaymodell auf ECM, zum anderen in dem im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Konfrontationsassay auf ECM.

Weder im bereits etablierten Migrationsassay auf ECM noch im neu entwickelten Konfrontationsassay zeigte sich ein aktivierender Einfluss von Wnt5b auf das Migrationsverhalten der MCF-7-Zellen auf ECM-beschichtetem Untergrund.

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde dabei gleichermaßen durchwegs eine planare, gerichtete Migration im Zellverband gesehen, die epitheliale Morphologie der Zellen änderte sich nicht. Dkk-2 hatte in sämtlichen Assaymodell-Versuchen zur Tumorzellprogression bzw. zur epithelialen Wundheilung keinen inhibitorischen Effekt auf das Migrationsverhalten der MCF-7-Zellen auf ECM-beschichtetem Untergrund.

Lyu und Joo fanden Wnt5b hochreguliert in verletzten Kornealepithelzellen von Ratten 24 Stunden nach vorgenommener Verletzung. Nach drei Tagen wurde wieder die Ausgangskonzentration gemessen. C-jun mRNA zeigte sich ebenfalls erhöht in den Epithelzellen unmittelbar nach Verletzung, allerdings wurden bereits nach 24 Stunden wieder normale Ausgangs-Level nachgewiesen. Interessanterweise wurde β -Catenin 12 Stunden nach Verletzung in den Nuclei der Kornealepithelzellen an der Vorderkante (*leading edge*) der Zellfront gefunden. Drei Tage nach Verletzung war nukleäres β -Catenin schließlich kaum mehr auszumachen (Lyu und Joo 2006). Diese Ergebnisse deuten wiederum auf eine Beteiligung sowohl des kanonischen als auch des nicht-kanonischen PCP-Signalweges bei der epithelialen Wundheilung hin. Möglicherweise wechseln sich beide Signalwege in ihrer Aktivierung ab und/ oder inhibieren sich gegenseitig. Die Beobachtung der Zellen zu

möglichst vielen exakten Zeitpunkten (vor, unmittelbar nach sowie längere Zeit nach Verletzung) und der damit einhergehenden Aktivierung der verschiedenen beteiligten Wnt-Mediatoren rückt damit zukünftig weiter in den Vordergrund.

Wie auch Dkk-1 gehört Dkk-2 zur Familie der sezernierten Wnt-Antagonisten, welche über eine Bindung an den Ko-Rezeptor LRP5/6 und das Membranprotein Kremen in erster Linie den kanonischen, β -Catenin-abhängigen Pfad blockieren (Krupnik et al. 1999). Jedoch wird Dkk-2 häufig eine dem Dkk-1 gegensätzliche Wirkung zugeschrieben: Dkk-2 kann in *Xenopus*-Embryos den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivieren, wobei dieser aktivierende Effekt von Dkk1 blockiert wird. Allerdings ist Dkk-2 kein universaler Aktivator von Wnt/ β -Cat signaling, sondern wirkt bisweilen im Gegenteil inhibierend. Insgesamt scheint ein koordiniertes Zusammenspiel von Dkk-1 und Dkk-2 den Wnt/ β -Catenin-Signalweg zu modulieren (Wu et al. 2000). Im Vergleich zu dem überwiegend als Wnt-Inhibitor fungierenden Protein Dkk-1 ist bei Dkk-2 offenbar sehr viel stärker vom molekularen Kontext der Mikroumgebung abhängig, ob es als Aktivator oder Inhibitor von kanonischem Wnt-Signaling wirkt (Brott und Sokol 2002). Sowohl Dkk-1 als auch Dkk-2 zeigten sich signifikant herunterreguliert in malignen Melanomen (Kuphal et al. 2006). Hingegen fanden Matsui et al. in Expressionsanalysen von humanen kolorektalen Karzinomen sowohl Dkk-4 als auch Dkk-2 stark hochreguliert. Dabei korrelierten die erhöhten Dkk-4-Level mit einer nukleären Akkumulation von β -Catenin und legten somit eine Aktivierung des kanonischen Signalwegs nahe. Für Dkk-2 jedoch konnte kein solcher Zusammenhang mit dem kanonischen Signalweg festgestellt werden (Matsui et al. 2009). Weitere Aufschlüsselungen hinsichtlich der bekannten kontextabhängigen Wirkweise von Dkk-2 als Tumorsuppressor oder aber Tumoraktivator und der involvierten Signalpfade sind daher nötig. Welche Rolle die Dickkopf-Proteine auf dem verwandten Gebiet der Wundheilung spielen, ist bislang noch nicht beschrieben.

6.3 KRITIK DER METHODE MIGRATIONSASSAY AUF ECM

6.3.1 UNTERSCHIEDLICHES MIGRATIONSVERHALTEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM UNTERGRUND EPITHELIALER ZELLEN

Bei der Etablierung der Methode Migrationsassay auf ECM innerhalb der Arbeitsgruppe hatten wir Unterschiede des Migrationsverhaltens der eingesetzten MCF-7-Zellen in Abhängigkeit von ihrem Untergrund beobachten können. Auf Kunststoffuntergrund der 6-Loch-Platte hemmte Dkk-1 die Wanderungsaktivität der MCF-7-Zellen, auf ECM-beschichtetem Boden hingegen zeigte sich unter Dkk-1-Stimulation eine signifikant gesteigerte Migrationsaktivität der Zellen. Auch die Wirkung von Dkk-2 scheint nachgewiesenermaßen wesentlich vom molekularen Kontext abzuhängen (Brott und Sokol

2002). In Invasionsversuchen der Arbeitsgruppe wurde die Mikroglia-induzierte Invasion von MCF-7-Zellen durch die Zugabe von Dkk-2 komplett aufgehoben (Pukrop et al. 2010).

Dies deutet auf eine Abhängigkeit der Wirkung der Proteine von der vorhandenen Mikroumgebung hin und stellt die Bedeutung eines näher an die physiologischen Bedingungen heranreichenden Assaymodells auf ECM-beschichtetem Untergrund heraus.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun daher der Wnt-Ligand Wnt5b und der physiologische Inhibitor Dkk-2 auf die Auswirkungen des Migrationsverhaltens hin im Assaymodell auf ECM untersucht werden. Dabei zeigte sich in den durchgeführten Migrationsversuchen im Migrationsassaymodell kein signifikanter Einfluss weder von Wnt5b noch von Dkk-2 auf das Wanderungsverhalten der MCF-7-Zellen auf ECM

6.3.2 UNTERSCHIED BEI DER ZELLMIGRATION *IN VITRO* UND *IN VIVO* UND INVASION

Der innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelte Migrationsassay auf ECM vereint in sich zweidimensionales und dreidimensionales *In-Vitro*-Modell. Nach dem Umwenden der ECM-Deckgläschen mit adhären Ten Tumorzellen und deren Aufbringen auf die ECM-Schicht, bei Start des Migrationsvorganges, sind die Zellen vollständig umgeben von ECM und müssen sich ihren Weg durch sie hindurch bahnen. Der in diesem Abschnitt nachgeahmte Prozess imitiert ansatzweise eine Invasionsfront eines epithelialen Tumors. Aufgrund des Versuchsaufbaus ist in der Mitte eines Deckgläschens mit hypoxischen Bedingungen zu rechnen, zumindest mit niedrigeren Konzentrationen sowohl des Sauerstoffes als auch anderer nutritiver Komponenten. Sind die Zellen erst einmal als Front unter dem Deckgläschen hervor gewandert, so handelt es sich in der Folge um ein zweidimensionales Migrations-Modell: die Zellen wandern von nun an weiter auf einer ECM-Schicht. *In vivo* migrieren die Tumorzellen immer wieder auch gerichtet im Kontakt mit der Basalmembran bzw. mit interstitieller Matrix um sich auszubreiten. Im modifizierten Migrationsassay auf ECM werden somit sowohl zweidimensionale als auch dreidimensionale Vorgänge integriert und können beobachtet und dokumentiert werden. Nachdem die Tumorzellen auf den mit ECM beschichteten Deckgläschen adhären Ten geworden sind, werden sie vor eigentlichem Versuchsstart um 180 Grad gewendet, das heißt auf den Kopf gedreht. Die Zellen müssen nun ihre baso-apikale Ausrichtung neu definieren und sich insgesamt neu orientieren. Bevor die Epithelzellen beginnen zu migrieren, machen sie stets eine erhebliche Wandlung durch. Sie verlieren ihre Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte und ändern ihre Form (Lauffenburger und Horwitz 1996). Voraussetzung für die Migration ist die Veränderung der Zellkörperstruktur sowie die Ausbildung einer Polarität der Zelle. Die Polarität von Epithelzellen ist durch strukturelle und funktionelle Unterschiede von apikaler und basaler Membran der Epithelzellen geprägt. Außerdem gibt es eine Gesamtpolarität innerhalb des Epithelzellverbandes in der Ebene (Friedl et al. 1995). Die ECM und die ihr immanenten

Zellen stellen wesentliche Umgebungs-Komponenten bei der Tumorzellmigration dar. Indem man Zellen *ex vivo* zweidimensional auf einem Plastikuntergrund wandern lässt, werden wichtige Signale und mögliche Interaktionsstellen zwischen den Zellen und ihrem Kontaktmilieu komplett ausgeschaltet (Bissell et al. 2002; Lee et al. 2007).

Dennoch wäre es nicht korrekt zu behaupten, es handle sich beim o. g. Migrationsassay auf ECM um ein Modell, welches den Gesamtvorgang der Invasion nachahmt. Letztere ist sehr viel komplexer anzusehen, es spielen noch weitaus mehr Vorgänge eine Rolle, welche im Migrationsassay auf ECM unberücksichtigt bleiben. Für den Teilvorgang der Migration unter den im Assaymodell gegebenen Einschränkungen stellt er jedoch eine gute Möglichkeit dar, die initiale Fortbewegung von Tumorzellen im Verband nachzustellen und zu beobachten.

6.4 DISKUSSION DER METHODENENTWICKLUNG KONFRONTATIONSASSAY AUF ECM

6.4.1 KONVENTIONELLE ZWEIDIMENSIONALE SCRATCHASSAYS AUF PLASTIKUNTERGRUND

Sogenannte Scratchassays finden bereits seit langer Zeit Anwendung für die Untersuchung von Zellteilung, Zellproliferation und Zellmigration *in vitro* (Todaro et al. 1965; Vaughan und Trinkaus 1966, Rosen und Misfeldt 1980; Nobes und Hall 1999; Werner und Grose 2002). Bei der Durchführung solcher Assays wird zunächst ein einschichtiger Zellrasen gezüchtet, in welchen anschließend ein artifizieller Spalt mithilfe einer sterilen Pipettenspitze oder eines ähnlich scharfen Gegenstandes gesetzt wird. Zur Dokumentation der Zellen innerhalb des Scratchassays werden unter dem Mikroskop Bilder am Beginn des Versuchs und in der Folge in verschiedenen Zeitintervallen aufgenommen, so lange bis der einschichtige Zellrasen wieder vollkommen konfluent ist (Liang et al. 2007).

6.4.2 VERNACHLÄSSIGUNG DER KOMPONENTE EXTRAZELLULÄRE MATRIX IM SCRATCHASSAY AUF PLASTIKUNTERGRUND

Die Beobachtungen zeigen, dass nach Setzen dieses Kratzers in die zuvor intakte Zellschicht sich die Zellen am Rand der künstlich eingebrachten Lücke beginnen in Richtung des zellfreien Spaltes zu bewegen um ihn zu verschließen. Dies tun sie so lange bis der Spalt vollständig verschlossen ist. Bei der *in vivo* betrachteten Wunde liegen die epithelialen Zellen entlang des Wundspaltes einer Basalmembran auf und sind von extrazellulärer Matrix umgeben. Die Zellen sind hier gleichermaßen in ständigem Kontakt mit Strukturen und Zellen eines sie umgebenden extrazellulären Stromas, welches bei *In-Vitro*-Scratchassays auf beschichtetem zweidimensionalem Plastikuntergrund vernachlässigt wird (Friedl und Gilmour 2009).

6.4.3 KONFRONTATION AUF ECM STATT SCRATCH: DER VERLETZUNGSFREIE ASSAY ALS ALTERNATIVES *IN-VITRO*-MODELL

Eine einfache Übertragung des Scratchassays auf eine mit ECM beschichtete Oberfläche zeigte sich in Vorversuchen innerhalb der Arbeitsgruppe problematisch, da beim Setzen eines Scratches zugleich die ECM-Schicht verletzt und im Scratch-Bereich beinahe komplett abgeschabt wird. Somit wird die Wanderung der Zellen unphysiologisch behindert, da sie im Folgenden auf Plastik weiter wandern müssen. Außerdem kommt es durch das „Scratchen“ in größeren Bereichen der ECM zu Defekten, es entsteht kein glatter Wundrand, um reproduzierbare Messungen durchzuführen. Es wurde nun der innerhalb der Arbeitsgruppe bereits etablierte Migrationsassay auf ECM auf das Scratchassay-Modell übertragen und modifiziert, um sich den *In-Vivo*-Vorgängen bei der physiologischen Wundheilung weiter anzunähern. Wie auch der konventionelle Scratchassay ist der neu konzipierte Wundheilungsassay ein Modell für Migration im Zellverband. Konfluente, einschichtige Zellrasen bewegen sich in Richtung eines Spaltes gerichtet aufeinander zu. Das entwickelte Experiment wird „Konfrontationsassay“ genannt.

Poujade et al. haben in einem vergleichbar aufgebauten, verletzungsfreien Wundheilungsassay gezeigt, dass die freie Oberfläche, welche sich an die Zellrandkante anschließt, ausreicht, um eine Zellmigration anzustoßen (Poujade et al. 2007). Im dort entwickelten Assay bietet sich der konfluenten Epithelzellschicht gleichermaßen eine unberührte, mit ECM beschichtete Oberfläche dar, ohne dass die Zellen im Verband verletzt werden. Von Wundheilungsexperimenten inspiriert, stellt sich die Situation im neu konzipierten Assay anders dar als im klassischen Scratch-Wundheilungsassay. Der Fokus liegt auf dem Einfluss der freien, ECM-beschichteten Fläche auf den Vorgang der Wundheilung und entkoppelt ihn somit von möglichen Miteinwirkungen wie etwa Zellbeschädigung und -permeabilisierung. Laut Poujade et al. ist die plötzliche Freigabe einer verfügbaren Fläche, die sich an die Zellschicht anschließt, ausreichend, um kollektive Zellmotilität zu triggern (Poujade et al. 2007). Der neue Konfrontationsassay auf ECM wurde entwickelt, um den Fokus auf den Teilvergang der Migration zu richten. Eines der wesentlichen Probleme der konventionellen Scratchassays auf Kunststoffuntergrund sollte behoben werden: das unphysiologische Fehlen von ECM-Komponenten. Gleichzeitig sollte das Modell eingegrenzt und eventuelle Störfaktoren weitestgehend ausgeschaltet werden, um das Augenmerk gezielt auf die Wirkung der gewählten Proteine Wnt5b und Dkk-2 richten zu können. Ein weiterer entscheidender Vorteil gegenüber bisherigen *in vitro*-Modellen stellt in der Weiterführung die Möglichkeit zum Vergleich zweier unterschiedlicher eingesetzter Zellarten innerhalb eines Versuchsansatzes dar.

6.4.4 KEIN EINFLUSS VON WNT5B UND DKK-2 AUF DIE MIGRATIONS- GESCHWINDIGKEIT EPITHELIALER ZELLEN IM KONFRONTATIONSASSAY AUF ECM

Die in Kap. 3.4 und Kap. 5 ausführlich beschriebene, im Rahmen der Arbeit etablierte Methode eines Konfrontationsassays auf ECM lieferte im Verlauf der Prozessoptimierung gut reproduzierbare Ergebnisse hinsichtlich einer zu beobachtenden konfrontativen Zellwanderung auf ECM. Die analog zum bereits etablierten Migrationsassay-Modell eingesetzten Stimulationsfaktoren Wnt5b und Dkk-2 zeigten dabei auch im neu entwickelten Konfrontationsassay keinen Einfluss auf das Wanderungsverhalten der eingesetzten MCF-7-Zellen auf ECM.

6.4.5 MÖGLICHKEITEN UND GRENZEN DES *IN-VITRO*-MODELLS ZUR EPITHELIALEN WUNDHEILUNG

In-Vitro-Assays erlauben es, bestimmte interessierende Substanzen unter bewusst eingeschränkten Bedingungen zu testen. Auch Block und Matela haben einen Scratch-losen Wundheilungstest entworfen und auf andere Weise einen Spalt generiert. Dieser wurde durch die eingesetzten cornealen Epithelzellen verschlossen, wobei als triggerndes Ereignis für die Induktion der Motilität der Zellen die plötzliche Verfügbarkeit des freien Oberflächenareals/ „loss of spatial constraints“ -eher als eine eigentliche mechanische Verletzung- postuliert wurde (Block und Matela 2004). Van Horssen et al. sehen darüber hinaus sogar einen entscheidenden Nachteil in der Methode des herkömmlichen Scratchassays. Durch Setzen des Scratches wird den Zellen Schaden zugefügt. Aus den beschädigten Zellen läuft Zytoplasma aus, Wachstumsfaktoren und Zytokine werden sezerniert. Die ECM besteht nun aus von den Zellen sezernierten Matrix-Komponenten, Wachstumsfaktoren und ist durch Zelldebris kontaminiert. Von da an kann sie nur sehr ungenau definiert werden. Im verletzungsfreien Konfrontationsassay bleiben sowohl die Zellen als auch die ECM intakt, die Bestandteile der eingesetzten Matrix sind somit genau bekannt (Van Horssen et al. 2006). Dennoch sind es genügend einflussnehmende Faktoren, die bleiben: zum einen die Komponenten der verwendeten Matrix, außerdem die durch die Zellen generierten Abbaufragmente derselben sowie weitere sezernierte Zellprodukte.

In-Vitro-Wundheilungsmodelle werden auf der einen Seite der Komplexität der Wundheilung freilich sehr viel weniger gerecht als beispielsweise *In-Vivo*-Modelle an Mäusen. Hingegen sind sie wesentlich einfacher in der Durchführung und Analyse, bei der Kultivierung können menschliche Zelllinien verwendet werden. Darüber hinaus lassen sich bestimmte Substanzen, welche von Interesse sind, leichter gezielt zufügen bzw. weg lassen (Wedlich S. 280). Im neu etablierten Konfrontationsassay sind die Wundränder zum einen deutlich markiert durch die Kanten der beiden gegenüberliegenden Deckgläser. Zum anderen laufen die epithelialen Zellen nicht auf unphysiologischem Plastikuntergrund, sondern auf einer

ausgebreiteten ECM-Schicht. Beides entspricht eher den physiologischen Bedingungen in der Wunde, bei der es zu einem Riss durch mehr als nur die Epithelzellschicht kommt. Auch die Basalmembran der Zellen nimmt bei tieferer Verletzung der Haut Schaden, die darunterliegende interstitielle Matrix tritt in Kontakt mit den beschädigten epithelialen Zellen.

Mit Sicherheit bleibt jedoch beim beschriebenen Assay ein nicht geringer Teil der *in vivo* beteiligten Faktoren unberücksichtigt, wohingegen andere, artifiziell erzeugte un-physiologischen Einfluss auf die hervorgebrachten *In-Vitro*-Ergebnisse nehmen.

6.4.6 PERSPEKTIVEN ZUR WEITERENTWICKLUNG DES KONFRONTATIONSASSAYS AUF ECM

Die Methode Konfrontationsassay auf ECM ist inzwischen von der Arbeitsgruppe Binder/Pukrop weiter verwendet worden. Sie wurde genutzt um zwei verschiedene Zellarten vergleichend in ein und demselben Versuchsansatz zu beobachten und um mittels Färbungen Elemente des Zytoskeletts sowie verschiedene andere am Wnt-Signalweg beteiligten Proteine sichtbar zu machen (Klemm et al. 2011). Weiterführend sollen innerhalb der konfrontativen Migrationsversuche Färbungen an unterschiedlichen Stellen der Zellfronten vorgenommen werden. Dies soll im Hinblick auf die Verteilung der Bestandteile des Zytoskeletts (E-Cadherin) sowie der Lokalisierung von Wnt-Mediatorproteinen im Zytosol (β -Catenin) und im Nucleus (c-jun) geschehen. Die Interaktion zweier verschiedener Zellarten kann somit direkt festgehalten und Umbauvorgänge innerhalb des Zytoskeletts beider Zelltypen sichtbar gemacht werden. Aufschlussreich wäre darüber hinaus eine Echtzeit-Beobachtung und –Dokumentation der Methode Konfrontationsassay mithilfe des Timelapse-Mikroskopes.

6.5 BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE UND AUSBLICK

Wnt5b und Dkk-2 spielen *in vitro* eine Rolle beim Gesamtvorgang der Invasion. Sie scheinen jedoch keinen Einfluss auf den Teilvorgang der Migration zu haben. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, dass Ergebnisse aus Invasionsexperimenten nicht ohne Weiteres auf Migrationsexperimente übertragen werden. Umgekehrt sind auch Rückschlüsse aus Migrationsversuchen auf die Gesamtvorgänge Invasion und Metastasierung nur eingeschränkt zu ziehen. Die Ergebnisse unter anderem dieser Arbeit zeigen deutlich, dass Migration und Invasion keinesfalls gleichzusetzen sind, wie mitunter in der Literatur zu finden. Alleine aus Ergebnissen zum Migrationsverhalten von Zellen zu schlussfolgern, wie das Invasions- und Metastasierungsverhalten beeinflusst wird, wäre eine undifferenzierte Betrachtungsweise. Wiederum allein aus Migrationsergebnissen mit der Scratchassay-Methode unter Vernachlässigung von Einflussfaktoren aus der ECM zu schließen, dass

untersuchte Substanzen keine Wirkung auf die Invasion und Metastasierung haben, muss ebenfalls als fragwürdig gelten.

Offenbar gibt es sowohl bei den Wnt-Proteinen als auch bei den Proteinen der Dickkopf-Familie kontextabhängige Unterschiede hinsichtlich ihrer Wirkweise. Verschiedene innerhalb dieser Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente zur Zellmigration erbrachten unterschiedliche Ergebnisse, wobei der Untergrund, auf dem die Zellen zur Migration angeregt wurden, nur einen von vielen wesentlichen Einflussfaktoren auf das Migrationsverhalten der Zellen darstellte. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *In-Vitro*-Versuche zur Migrationsaktivität von MCF-7-Zellen auf ECM zeigten zumindest keinen Einfluss der untersuchten Faktoren Wnt5b und Dkk-2 auf das Migrationsverhalten der eingesetzten Zelllinie MCF-7 auf ECM-beschichtetem Untergrund.

Auch in Zukunft werden nicht zuletzt Negativ-Ergebnisse dazu beitragen die komplexen Zellregulierungsnetzwerke weiter einzugrenzen und die verschiedenen Signalwege von Wnt und seiner Antagonisten besser zu erforschen.

Wnt5b aktiviert sowohl den PCP-Signalweg als auch den kanonischen Signalweg. Wnt-Signalwege sind komplex verschaltet, daher sind weitere Untersuchungen u.a. auf Protein- und Genexpressionsebene nötig um die molekularen Interaktionsvorgänge weiter aufzuschlüsseln. Um in Zukunft die individuelle Schwachstelle eines jeden Tumors gezielt treffen zu können bzw. eine möglichst vollkommen ausgestaltete Wiederherstellung der Haut und ihrer Anhangsgebilde zu erreichen, ist es wichtig die beteiligten Moleküle und Signalkaskaden sowie deren Interaktionen so genau wie möglich zu kennen. Neben Untersuchungen auf molekularer Ebene sind es immer noch genaue Beobachtungen von Zellen in bewährten und neu modifizierten *In-Vitro*-Zellkulturmodellen, die den Weg hin zur Vervollständigung des Signalweg-Mosaiks weiter weisen.

Es ist darüber hinaus erforderlich, entwicklungsbiologische Modelle im Kontext der Tumorentstehung und Wundheilung beim erwachsenen Menschen neu zu beurteilen. Um die zugrunde liegenden gemeinsamen Mechanismen von regenerativer und neoplastischer Zellmigration besser zu verstehen, ist es sinnvoll sich auf molekularer und zellulärer Ebene bei den Grundlagen der Morphogenese umzusehen. Die Gemeinsamkeiten der Bedeutung der Wnt-Proteine und ihrer Signalwege für die Vorgänge bei der Embryogenese, der Tumorgenese sowie der Wundheilung basieren wesentlich auf dem Vorgang der Zellmigration (Friedl und Gilmour 2009).

Die einen nennen die Entstehung und Ausbreitung von Tumoren fehlgeschlagene Wundheilung, die anderen falsch regulierte Morphogenese (Dvorak 1986; Friedl und Gilmour 2009). In jedem Fall sind es diese beiden Gebiete, die man weiter erforschen sollte, um

analoge Steuerungsmechanismen und Signalkaskaden bei der Tumorgenese und Tumormetastasierung im erwachsenen Organismus aufzufindig zu machen. Es bedarf weiterführender Erkenntnisse im Bereich des diesen drei Feldern gemeinsamen Mechanismus der Migration im epithelialen Zellverband. Diese Ergebnisse kann man sich zu Nutze machen und gezielt je nach Bedarf Zellmigration hemmen oder fördern. Zu den übergeordneten Vorgängen Invasion und Metastasierung freilich gehören noch weitaus mehrere Steuerungsmechanismen, Signalwege und komplexe Interaktionen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf dem Teilvorgang der Migration epithelialer Zellen auf physiologischem Matrix-Untergrund. Im Zellkulturmodell wurde die migratorische Aktivität der aus dem humanen Mammakarzinom isolierten, schwach invasiven epithelialen Zelllinie MCF-7 untersucht. Es stellte sich die grundsätzliche Frage, ob eine Wnt-bedingte Invasionssteigerung, welche in vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe gezeigt worden war, durch die gesteigerte migratorische Aktivität der Tumorzellen verursacht ist. An Ergebnisse der Arbeitsgruppe anknüpfend, sollten die an der Tumorprogression (Wnt5b) bzw. an deren Inhibition (Dkk-2) beteiligten Proteine auf den Invasions-Teilvorgang der Migration hin näher beleuchtet werden. Dazu wurden Untersuchungen in einem innerhalb der Arbeitsgruppe bereits entwickelten modifizierten Tumor-Migrationsassaymodell auf extrazellulärer Matrix durchgeführt. In Analogie zu den Vorgängen bei der Wundheilung wurde im Rahmen dieser Arbeit ein in Anlehnung an die bereits seit langem verwendete Methode des Scratchassays sowie an den in der Arbeitsgruppe etablierten Migrationsassay ein Konfrontationsassay auf ECM konzipiert. Der Einfluss von Wnt5b und Dkk-2 auf die Migration der schwach invasiven, epithelialen Zelllinie MCF-7 wurde schließlich im Migrationsassay sowie im neu etablierten Konfrontationsassay auf ECM näher untersucht. Es wurden dazu Messungen zur Migrationsaktivität der eingesetzten Zellen unter Stimulation mit Wnt5b und Dkk-2 erhoben. Jedoch zeigte sich in beiden Assay-Modellen auf ECM kein signifikanter Einfluss der beiden untersuchten Proteine auf das Migrationsverhalten der MCF-7-Zellen. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Beobachtungen zum Teilaspekt der Migration nicht automatisch Rückschlüsse auf die Invasion zulassen. Letztere ist ein komplex zusammengesetzter Gesamtvorgang, dessen einzelne Bestandteile es noch weiter zu erforschen gilt.

Um die unterschiedlichen Auswirkungen von Wnt5b und Dkk-2 beim Vorgang der Invasion zu untersuchen, sind weiterführende Untersuchungen auf molekularer Ebene nötig, welche Aufschlüsse über die an den Wnt-Signalkaskaden beteiligten Faktoren geben.

Die komplexen Verschaltungen der verschiedenen Wnt-Signalwege untereinander sowie deren vielfältige Wirkungsweisen geben weiterhin Anregungen für Forschung auf den verschiedenen Ebenen.

8 LITERATURVERZEICHNIS

Abassi YA, Jackson JA, Zhu J, O'Connell J, Wang X, Xu X (2004): Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelectronic cell sensor arrays. *J Immunol Methods* 292, 195 - 205

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997): beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797 – 3804

Adler PN (1992): The genetic control of tissue polarity in *Drosophila*. *Bioessays* 14, 735 – 741

Adler PN (2002): Planar Signaling and Morphogenesis in *Drosophila*. *Dev Cell* 2, 525 – 535

Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, McEwan RN (1987): A Rapid *in Vitro* Assay for Quantitating the Invasive Potential of Tumor Cells. *Cancer Res* 47, 3239 – 3245

Atienza JM, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi Y (2005): Dynamic Monitoring of Cell Adhesion and Spreading on Microelectronic Sensor Arrays. *J Biomol Screen* 10, 795 - 805

Axelrod JD, McNeill H (2002): Coupling Planar Cell Polarity Signaling to Morphogenesis. *ScientificWorldJournal* 2, 434 - 454

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

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

Bissell MJ, Radisky DC (2001): Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1, 46 - 54

Bissell MJ, Radisky DC, Rizki A (2002): The organizing principle: microenvironmental influences the in the normal and malignant breast. *Differentiation* 70, 537 - 546

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

Bhowmick NA, Moses HL (2005): Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 15, 97 - 101

- Block ER, Matela AR, SundarRaj N, Iszkula ER, Klarlund JK (2004): Wounding Induces Motility in Sheets of Corneal Epithelial Cells through Loss of Spatial Constraints. *J Biol Chem* 279, 24307 - 24312
- Boutros M, Mlodzik M (1999): Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech Dev* 83, 27 - 37
- Brott BK, Sokol SY (2002): Regulation of Wnt / LRP Signaling by Distinct Domains of Dickkopf Proteins. *Mol Cell Biol* 22, 6100 - 6110
- Chiang AC, Massague J (2008): Molecular Basis of Metastasis. *N Engl J Med* 359, 2814 - 2823
- Clevers H (2006): Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469 - 480
- Compagni A, Christofori G (2000): Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer* 83, 1 - 5
- DeNardo DG, Johansson M, Coussens LM (2008): Immune cells as mediators of solid tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 27, 11 - 18
- Djiane A, Riou J, Umbhauer M, Boucaut J, Shi D (2000): Role of Frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* 127, 3091 - 3100
- Dvorak HF (1986): Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315, 1650 – 1659
- Farber E (1984): The Multistep Nature of Cancer Development. *Cancer Res* 44, 4217 - 4223
- Fathke C, Wilson L, Shah K, Kim B, Hocking A, Moon RT, Isik F (2006): Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. *BMC Cell Biol* 7, 4
- Fenteany G, Janmey PA, Stossel TP (2000): Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. *Current Biology* 10, 831 - 838
- Fidler IJ (2003): The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 3, 1 - 6
- Fokas E, Engenhardt-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F, An HX (2007): Metastasis: The seed and soil theory gains identity. *Cancer Metastasis Rev* 26, 705 - 715
- Friedl P (2004): Preshpecification and plasticity: Shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 16, 14 - 23

- Friedl P, Wolf K (2003): Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3, 362 - 374
- Friedl P, Gilmour D (2009): Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 445 - 457
- Friedl P, Noble PB, Walton PA, Laird DW, Chauvin PJ, Tabah RJ, Black M, Zänker KS (1995): Migration of Coordinated Cell Clusters in Mesenchymal and Epithelial Cancer Explants *in Vitro*. *Cancer Res* 55, 4557 – 4560
- Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M (2004): Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* 48, 441 - 449
- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C (1998): Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357 - 362
- Hall A (1998): Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* 279, 509 - 514
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57 – 70
- Hauptmann S, Schnalke T (2001): Rudolf Virchows Sicht der malignen Geschwülste. *Pathologe* 22, 291 – 295
- Heisenberg CP, Tada M, Rauch GJ, Saude L, Concha ML, Geisler R, Stemple DL, Smith JC, Wilson SW (2000): Silberblick/Wnt11 mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76 - 81
- Horwitz AR, Parsons JT (1999): Cell migration – movin' on. *Science* 286, 1102 - 1103
- Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R (1996): Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3 - 10
- Ikeda S, Kishida A, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A (1998): Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J* 17, 1371 - 1384
- Jenny A, Mlodzik M (2006): Planar Cell Polarity Signaling: A Common Mechanism for Cellular Polarization. *Mt Sinai J Med* 73, 738 - 750
- Kalluri R (2003): Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 422 - 433

- Kawano Y, Kypta R (2003): Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116, 2627 - 2634
- Klein TJ, Mlodzik M (2005): Planar Cell Polarization: An Emerging Model Points in the Right Direction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 155 - 176
- Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR (1982): Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparin sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21, 6188 - 6193
- Klemm F: Der Wnt-Signalweg in der Makrophagen-induzierten Invasion von Brustkrebszellen. Med. Diss. Göttingen 2010
- Klemm F, Bleckmann A, Siam L, Chuang HN, Rietkötter E, Behme D, Schulz M, Schaffrinski M, Schindler S, Trümper L, Kramer F, Beissbarth T, Stadelmann C, Binder C, Pukrop T (2011): β -catenin-independent WNT signaling in basal-like breast cancer and brain metastasis. *Carcinogenesis* 32, 434 - 442
- Komiya Y, Habas R (2008): Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68 - 75
- Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K, Chang B, Doung B, Gooderal AD, Gearing DP, Sokol SY, McCarthy SA (1999): Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238, 301 - 313
- Kuhl M, Sheldal LC, Park M, Miller JR, Moon RT (2000): The Wnt/ Ca^{2+} pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16, 279 - 283
- Kuphal S, Lodermeier S, Bataille F, Schuierer M, Hoang BH, Bosserhoff AK (2006): Expression of *Dickkopf* genes is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene* 25, 5027 - 5036
- Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996): Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process. *Cell* 84, 359 - 369
- Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ (2007): Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods* 4, 359 - 365
- Liang CC, Park AY, Guan JL (2007): In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protoc* 2, 329 - 333
- Liotta LA (1984): Tumor Invasion and Metastases: Role of the Basement Membrane. *Am J Pathol* 117, 339 - 348

Liotta LA, Kohn EC (2001): The microenvironment of the tumor-host interface. *Nature* 411, 375 - 379

Liu Y, Rubin B, Bodine PV, Billiard J (2008): Wnt5a induces homodimerization and activation of Ror2 receptor tyrosine kinase. *J Cell Biochem* 105, 497 - 502

Llense F, Martin-Blanco E (2008): JNK signaling controls border cell cluster integrity and collective cell migration. *Curr Biol* 18, 538 - 544

Lyu J, Joo CK (2006): Expression of Wnt and MMP in Epithelial Cells During Corneal Wound Healing. *Cornea* 25, 24 - 28

Machesky LM, Hall A (1997): Role of Actin Polymerization and Adhesion to Extracellular Matrix in Rac- and Rho-induced Cytoskeletal Reorganization. *J Cell Biol* 138, 913 - 926

Mao B, Niehrs C (2002): Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene* 302, 179 - 183

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

Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C (2002): Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signalling. *Nature* 417, 664 - 667

Martin P, Parkhurst SM (2004): Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 131, 3021 - 3034

Matsui A, Yamaguchi T, Maekawa S, Miyazaki C, Takano S, Uetake T, Inoue T, Otaka M, Otsuka H, Sato T, Yamashita A, Takahashi Y, Enomoto N (2009): DICKKOPF-4 and -2 genes are upregulated in human colorectal cancer. *Cancer Sci* 100, 1923 - 1930

Mikels AJ, Nusse R (2006): Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25, 7461 - 7468

Mikheev AM, Mikheeva SA, Liu B, Cohen P, Zarbl H (2004): A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as a suppressor of HeLa cell transformation. *Carcinogenesis* 25, 47 - 59

Mitchison TJ, Cramer LP (1996): Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 84, 371 - 379

Mlodzik M (1999): Planar polarity in the *Drosophila* eye: a multifaceted view of signaling specificity and cross-talk. *EMBO J* 18, 6873 - 6879

- Molenaar M, van de WM, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H (1996): XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391 - 399
- Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N (2002): The Promise and Perils of Wnt Signaling Through β -Catenin. *Science* 296, 1644 - 1646
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55 – 63
- Mueller MM, Fusenig NE (2004): Friends or foes – bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 839 - 849
- Nguyen DX, Massagué J (2007): Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Gen* 8, 341 - 352
- Niehrs C (2006): Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25, 7469 - 7481
- Nobes CD, Hall A (1995): Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53 - 62
- Nobes CD, Hall A (1999): Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* 144, 1235 - 1244
- Nusse R (1999): WNT targets: repression and activation. *TIG* 15, 1 - 3
- Nusse R (2005): Wnt signalling in disease and in development. *Cell Res* 15, 28 - 32
- Nusse R, Varmus HE (1982): Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99 - 109
- Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, Moon R, Varmus H (1991): A New Nomenclature for *int-1* and Related Genes: The Wnt Gene Family. *Cell* 64, 231 - 232
- Nusslein-Vollhard C, Wieschhaus E (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795 – 801
- Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC et al. (2003): The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt 5a/JNK signaling pathway. *Genes Cells* 8, 645 - 654

Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, Martin GR, Valentine T, Swarm R (1977): A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* 145, 204 - 220

Paget S (1889): The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889, 1, 571 - 573

Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH (2000): The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* 6, 324 - 329

Podleschny MC: Untersuchungen zum Einfluss von Wnt 5a und Dkk-1 auf das Migrationsverhalten von Mamma-Karzinom Zelllinien. Bachelorarbeit Molecular Medicine Göttingen 2006

Pollard TD, Borisy GG (2003): Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* 112, 453 - 465

Poujade M, Grasland-Mongrain E, Hertzog A, et al. (2007): Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15988 - 15993

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

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

Pukrop T, Dehghani F, Chuang HN, Lohaus R, Bayanga K, Heermann S, Regen T, van Rossum D, Klemm F, Schulz M, Siam L, Hoffmann A, Trumper L, Stadelmann C, Bechmann I, Hanisch UK, Binder C (2010): Microglia Promote Colonization of Brain Tissue by Breast Cancer Cells in a Wnt-Dependent Way. *Glia* 58, 1477 - 1489

Raftopoulou M, Hall A (2003): Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23 - 32

Rao TP, Kuhl M (2010): An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More. *Circ Res* 106, 1798 - 1806

Reya T, Clevers H (2005): Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843 – 850

Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987): The *Drosophila* Homolog of the Mouse Mammary Oncogene *int-1* is Identical to the Segment Polarity Gene *wingless*. *Cell* 50, 649 - 657

- Robbins Basic Pathology Saunders Elsevier, Philadelphia, PA (2007), S. 65f.
- Rørth P (2009): Collective Cell Migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 407 - 429
- Rosen P, Misfeldt DS (1980): Cell density determines epithelial migration in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4760 - 4763
- Sahai E (2005): Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr Opin Genet Dev* 15, 87 - 96
- Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K (2002): The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* 417, 295 - 299
- Schäfer M, Werner S (2008): Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 628 – 638
- Schambony A, Wedlich D (2007): Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev Cell* 12, 779 - 792
- Schindler S: Veränderungen der Morphologie und des Migrationsverhaltens unter dem Einfluss von Wnt5a und Dkk-1 bei Brustkrebszellen. Med. Diss. Göttingen 2010
- Schwarz MA, Horwitz AR (2006): Integrating Adhesion, Protrusion, and Contraction during Cell Migration. *Cell* 125, 1223 - 1225
- Seifert JR, Mlodzik M (2007): Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* 8, 126 – 138
- Semenov M, Tamai K, Brott BK, Kuhl M, Sokol S, He X (2001): Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 11, 951 – 961
- Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kuhl M, Moon, RT (2003): Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J Cell Biol* 161, 769 - 777
- Sieweke MH, Thompson NL, Sporn MB, Bissell MJ (1990): Mediation of Wound-related Rous Sarcoma Virus Tumorigenesis by TGF-β. *Science* 248, 1656 - 1660
- Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT (1997): Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev Biol* 182, 114 – 120
- Solly K, Wang X, Xu X, Strulovici B, Zheng W (2004): Application of Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) Technology to Cell-based Assays. *Assay Drug Dev Technol* 2, 363 – 372
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409 – 1416

- Thiery JP (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev Cancer* 2, 442 - 454
- Tlsty TD (2001): Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Cancer Biol* 11, 97 - 104
- Tlsty TD, Coussens LM (2006): Tumor Stroma and Regulation of Cancer Development. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 1, 119 - 150
- Todaro GJ, Lazar GK, Green H (1965): The Initiation of Cell Division in a Contact-inhibited Mammalian Cell Line. *J Cell Comp Physiol* 66, 325 - 334
- Tremblay G (1979): Stromal Aspects of Breast Carcinoma. *Exp Mol Pathol* 31, 248 - 260
- Van Horssen R, Galjart N, Rens JAP, Eggermont AMM, ten Hagen TLM (2006): Differential Effects of Matrix and Growth Factors on Endothelial and Fibroblast Motility: Application of a Modified Cell Migration Assay. *J Cell Biochem* 99, 1536 - 1552
- Vaughan RB, Trinkaus JP (1966): Movements of epithelial cell sheets *in vitro*. *J Cell Sci* 1, 407 - 413
- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT (2003): A Second Canon: Functions and Mechanisms of β -Catenin-Independent Wnt Signaling. *Dev Cell* 5, 367 - 377
- Vogelstein B, Kinzler KW (1993): The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9, 138 - 141
- Wallingford JB, Habas R (2005): The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development* 132, 4421 - 4436
- Wallingford JB, Rowning BA, Vogeli KM, Rothbacher U, Fraser SE, Harland RM (2000): Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 405, 81 - 85
- Wallingford JB, Fraser SE, Harland RM (2002): Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev Cell* 2, 695 - 706
- Wedlich D (Ed.) (2005): *Cell Migration in Development and Disease* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim S. 299
- Wehrle-Haller B, Imhof BA (2003): Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 39 - 50
- Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S (2000): arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407, 527 - 530
- Weijer CJ (2009): Collective cell migration in development. *J Cell Sci* 122, 3215 - 3223

- Weinberg RA (1985): The Action of Oncogenes in the Cytoplasm and Nucleus. *Science* 230, 770 - 776
- Werner S, Grose R (2002): Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev* 83, 836 - 870
- Wnt homepage (2007): <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>
- Wodarz A, Nusse R (1998); Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 59 - 88
- Wolenski JS (1995): Regulation of calmodulin-binding myosins. *Trends Cell Biol* 5, 310 - 316
- Wolf K, Wu YI, Liu Y, et al. (2007): Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 9, 893 - 904
- Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP (1994): Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Mol Cell Biol* 14, 6278 – 6286
- Wood W, Jacinto A, Grose R, Woolner S, Gale J, Wilson C, Martin P (2002): Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila* embryos. *Nature Cell Biology* 4, 907 - 912
- Worthley DL, Giraud AS, Wang TC (2010): The Extracellular Matrix in Digestive Cancer. *Cancer Microenviron* 3, 177 - 185
- Wu W, Glinka A, Delius H, Niehrs C (2000): Mutual antagonism between dickkopf1 and dickkopf2 regulates Wnt/ β -catenin signalling. *Curr Biol* 10, 1611 - 1614
- Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J (2005): Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 17, 559 - 564
- Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, Takada S, Nishida E (2002): JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Rep* 3, 69 - 75
- Yang J, Weinberg R (2008): Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818 - 829
- Yilmaz M, Christofori G (2009): EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28, 15 - 33
- Yilmaz M, Christofori G (2010): Mechanisms of Motility in Metastasizing Cells. *Mol Cancer Res* 8, 629 - 642