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

**Veränderungen der Morphologie und des Migrationsverhaltens unter dem
Einfluss von Wnt5a und DKK-1 bei Brustkrebszellen**

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

vorgelegt von
Sabrina Schindler
aus Northeim

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

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

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2010

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1 Das Mamma-Karzinom und seine Umgebung	3
1.2 Der Mechanismus von Invasion und Metastasierung	4
1.3 Tumor-assoziierte Makrophagen und ihre Rolle bei der Invasion und Metastasierung	5
1.4 Die Wnt-Signalwege und ihre Antagonisten	6
1.5 Wnt-Gene und Karzinome	9
1.6 Zellmigration und die Voraussetzungen des Zytoskeletts	10
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	11
2. Material und Methoden	13
2.1 Zelllinien	13
2.2 Verwendete Substanzen	13
2.3 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung	15
2.4 Geräte und Materialien	15
2.5 Verwendete Puffer und Stammlösungen	16
2.6 Die Zellkultur	18
2.6.1 Vorbereitung der Zellen für die Versuche	18
2.6.2 Die Co-Kultivierung von MCF-7 mit Fibroblasten	18
2.7 Durchführung der konventionellen Scratch-Assays auf Kunststoffuntergrund	19
2.8 Migrationsassays auf extrazellulärer Matrix (ECM)	20
2.9 Die Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie	22
2.9.1 Vorbehandlung der Zellen für die Immunfluoreszenz- färbung	22
2.9.2 Direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung	23
2.9.3 Durchführung der direkten Immunfluoreszenzfärbung am Beispiel des Phalloidin	24

2.9.4 Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung	25
2.9.5 Die Fluoreszenzmikroskopie	25
2.10 Der colorimetrische MTT-Test zur Messung der Viabilität	26
3. Ergebnisse	28
3.1 Scratch-Assays – konventionelle „Wundheilungstests“ auf Kunststoffuntergrund	28
3.1.1 „Wundheilung“ auf Kunststoffuntergrund	28
3.1.2 MTT-Test auf Kunststoff	32
3.1.3 „Wundheilung“ auf ECM	33
3.2 Der neue Migrationsassay auf ECM	33
3.2.1 Migrationsaktivität unter Stimulation mit rekombinantem Wnt5a und DKK-1	33
3.2.2 Migrationsaktivität unter Co-Kultur mit Wnt5a-exprimierenden Fibroblasten und das Phänomen der gerichteten Migration	38
3.3 Beurteilung der morphologischen Veränderungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie unter Stimulation mit Wnt5a und DKK-1	43
3.3.1 Beurteilung des Aktinzytoskeletts auf Kunststoffuntergrund	44
3.3.2 Beurteilung des Aktinzytoskeletts auf ECM	48
3.4 Beurteilung des β -Catenin in der Immunfluoreszenzfärbung unter Stimulation mit rekombinantem Wnt5a und DKK-1	51
3.5 Beurteilung des Rho-A in der Immunfluoreszenzfärbung unter Stimulation mit rekombinantem Wnt5a und DKK-1 auf Kunststoffuntergrund	53
3.6 Zusammenfassung der Beobachtungen aus den Migrationsversuchen, den Scratch-Assays und der Morphologie unter Einwirkung von Wnt5a und DKK-1	55

4. Diskussion	57
4.1 Bedeutung von Wnt5a bei der Tumorzellinvasion und Migration	57
4.1.1 Wnt5a steigert die Migrationsaktivität der Mamma- Karzinomzelllinie MCF-7	57
4.1.2 Bisherige Erkenntnisse zu Wnt5a und Migration	58
4.1.3 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	59
4.2 Gerichtete Migration von Tumorzellen durch Wnt5a	60
4.2.1 Wnt5a wirkt direktional auf die MCF-7 Tumorzellen	60
4.2.2 Bisherige Erkenntnisse zu gerichteter Migration in Zusammenhang mit Wnt5a	60
4.3 Bedeutung von DKK-1 bei der Tumorzellinvasion und Migration	61
4.3.1 DKK-1 wirkt abhängig vom Untergrund hemmend oder steigernd auf die Tumorzellmigration	61
4.3.2 Bisherige Erkenntnisse zu DKK-1 und Migration	62
4.3.3 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	63
5. Zusammenfassung	66
6. Literaturverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	Activator Protein
ATCC	American Type Culture Collection
CamKII	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II
CBP	Cyclic AMP Response Element Binding Protein
c-Jun	Proto-Onkogen
DAPI	4', 6' diamino-2' phenylindol
DKK-1	Dickkopf-Protein 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleic acid)
Dvl	Dishevelled in Vertebraten
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl. extra cellular matrix)
EDTA	Ehtylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	fötales Kälber Serum
Fzd	Frizzled-Rezeptor
°C	Grad Celsius
GSK-3β	Glycogen Synthase Kinase-3β
h	Stunde(n)
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Krm	Kremen
l	Liter
LEF	Lymphoid enhancer-binding protein
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
M	molar (mol/l) (Molarität)
MCP-1	Monocyte Chemotactic Proteine 1
MMP	Matrix-Metalloproteasen

m	Meter
m-	milli (1×10^{-3})
μ -	mikro (1×10^{-6})
min	Minute
PBS	Phosphat buffered Saline
PCP	engl. Planar Cell Polarity
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Protein-Kinase C
Rac	Ras like protein
Rho	Ras homology gene family
ROCK	Rho associated coiled-coil domain protein kinase
RPMI 1640	am Roswell Park Memorial Institute etabliertes Medium
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TCF	engl. T-Cell Specific Transcription Factor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wg	wingless protein
Wnt	wingless type MMTV integration site family

1. Einleitung

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau in den westlichen Industriestaaten. In Deutschland erkrankt statistisch etwa jede achte bis zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mamma-Karzinom, die Zahl der Neuerkrankungen liegt bei 45.000 bis 50.000 Frauen jährlich (Schätzung des Robert-Koch-Institutes, www.rki.de/Krebs).

Wie auch bei allen anderen Tumorentitäten bestimmt beim Mamma-Karzinom das Stadium der Erkrankung und insbesondere das Vorliegen von Metastasen die Prognose der Patientin. Daher ist in den letzten Jahrzehnten die Erforschung von Invasions- und Metastasierungsmechanismen vermehrt in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Arbeiten gerückt.

1.1 Das Mamma-Karzinom und seine Umgebung

Das Ursprungsgewebe der Mamma-Karzinome ist das Epithel, das die milchproduzierenden Läppchen (lobuläre Karzinome) bzw. die Milchgänge der weiblichen Brustdrüse (duktale Karzinome) auskleidet. Im Falle invasiver Karzinome ist die Basalmembran als physiologische Barriere zwischen den Epithelzellen und dem umgebenden Stroma durchbrochen. Dies ist der entscheidende Schritt für die Invasion in das gesunde umliegende Gewebe mit Eindringen in das Blut- und Lymphgefäßsystem und nachfolgender disseminierter Streuung der Tumorzellen in entfernte Körperregionen. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das den Tumor umgebende physiologische Stroma aus extrazellulärer Matrix und die dort befindlichen Zellen, wie z.B. Fibroblasten, Makrophagen und Lymphozyten, durch Ausschüttung bestimmter Wachstumsfaktoren die Proliferation, Differenzierung, Invasivität und Angiogenese der Krebszellen sowie die Neo-Angiogenese beeinflussen. Dazu gehören FGF (Fibroblast Growth Factor) und VEGF (Vascular Epithelial Growth Factor), die sowohl Einfluss auf den Primärtumor als auch auf die metastatischen Absiedelungen haben (Wernert 1997).

1.2 Der Mechanismus von Invasion und Metastasierung

Zur Invasion und Metastasierung eines Tumors in andere Gewebe kommt es, wenn sich die Tumorzellen aus ihrer Verbindung, d.h. aus dem Primärtumorverband lösen, in umliegendes Gewebe einwandern, Anschluss an das lokale Gefäßbett bekommen, in einem anderen Organ den Blutkreislauf verlassen und als sekundäre Kolonie proliferieren. Dies erfolgt in vielen Einzelschritten, beinhaltet Mechanismen wie Zellmigration, Wachstumsfaktorsekretion und Proteolyse und wird durch ein komplexes Netzwerk von Aktivatoren und Inhibitoren geregelt (Liotta et al. 1991). Der entscheidende Schritt für den Einbruch einer Neoplasie in gesundes Gewebe ist die Zerstörung der natürlichen biologischen Barrieren zwischen den Geweben, wie zum Beispiel der Basalmembran. Dies erfordert die Aktivierung proteolytisch wirksamer Enzyme, wie z.B. Matrixmetalloproteasen (MMPs). Sie gehören zur Familie der mehr als zwanzig homologen zink-abhängigen Proteasen, die extrazelluläre Matrix abbauen können (Westermarck et Kähäri 1999). Sie spielen ebenfalls eine wichtige Rolle als Wegbereiter der Tumorangiogenese und der Metastasierung. Einige dieser Matrix-Metalloproteasen, insbesondere MMP-9 und auch MMP-2, sind direkt in den Invasionsprozess der Krebszellen einbezogen und konnten bei klinisch aggressiven Mamma-Karzinomen mit kurzen Überlebenszeiten und ungünstiger Prognose in hoher Konzentration nachgewiesen werden (Crawford et Matrisian 1994). Die Synthese und Aktivierung dieser Matrix-Metalloproteasen ist von verschiedenen Zytokinen abhängig, in besonderem Maße allerdings vom Tumornekrosefaktor- α (Robinson et al. 2002). MMPs werden einerseits von den Tumorzellen selbst, andererseits auch von Zellen des umgebenden Stromas, wie z.B. Fibroblasten, produziert (Wernert 1997). Auch sogenannte Tumor-assoziierte Makrophagen synthetisieren verschiedene MMPs, unter anderem auch MMP-2 und MMP-9 (Robinson et al. 2002).

1.3 Tumor-assoziierte Makrophagen und ihre Rolle bei der Invasion und Metastasierung

Makrophagen stellen den größten Anteil der lymphoretikulären Zellen im Tumorstroma. Es ist vielfach belegt, dass aktivierte Makrophagen in der Lage sind, neoplastische Zellen zu zerstören und damit im Rahmen der unspezifischen Abwehr Tumorerkrankungen einzudämmen (Hibbs 1976). Makrophagen im Tumorstroma, sog. Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM), können jedoch auch progressionsfördernde Effekte ausüben. TAM werden durch bestimmte Botenstoffe, wie z.B. Chemokine und Zytokine angelockt und infiltrieren das Tumorstroma. Diese Chemokine, darunter das MCP-1, werden von verschiedenen Tumoren gebildet, erstmalig nachgewiesen in verschiedenen epithelialen Malignomen (Ovarial, Mamma) sowie Gliomen und Sarkomen (Mantovani et al. 1992). Weitere Untersuchungen ergaben Hinweise, dass die TAM durch ihre Zytokinausschüttung von IL-6, IL-1 und TNF- α die Proliferation maligner Tumore unterstützen können (Mantovani 1994). Obwohl diese Makrophagen auch eine gegen den Tumor gerichtete Aktivität aufweisen, korreliert dennoch das Ausmaß der Infiltration des Tumors durch Makrophagen mit der Invasivität der Tumorzellen und ihrer Fähigkeit zur Gefäßneubildung und Metastasierung (Leek et Harris 2002). Eindrücklich unterstützt werden diese Ergebnisse von Untersuchungen in einem Mikroinvasions- und Co-Kulturmodell, das von der Arbeitsgruppe Hagemann et al. etabliert wurde (Hagemann et al. 2004). Die Co-Kultivierung von Makrophagen und wenig invasiven Mamma-Karzinom-Zellen der Linie MCF-7 führte zu einer Induktion von MMP-2, -7 und -9 in den Makrophagen sowie zu einer signifikanten Steigerung der Invasivität der Tumorzellen. Durch die gezielte Blockade der migrationssteigernden Faktoren an Hand der Zugabe von MMP- und TNF- α -Antagonisten in die Co-Kultur konnte die Invasivität der MCF-7-Zellen wieder auf niedriges Niveau gesenkt werden. Ungeklärt blieb in diesem Modell jedoch, über welche Signalwege die invasionsfördernde Interaktion zwischen Makrophagen und Tumorzellen getriggert wurden.

1.4 Die Wnt-Signalwege und ihre Antagonisten

In den letzten Jahrzehnten konnten mittels zahlreicher Studien bestimmte Signaltransduktionswege entschlüsselt werden, die nicht nur im Rahmen der embryonalen Entwicklung bei der Zelldifferenzierung, Gewebeaufteilung und Zellmigration eine tragende Rolle spielen, sondern auch in der Onkogenese. Zu den Protagonisten gehören dabei die sogenannten Wnt-Gene, die erstmalig in *Drosophila* beschrieben wurden. Ihr Defekt führt zur fehlerhaften Entwicklung der Flügel, was auch die Namensgebung begründete. Wnt steht für die zusammengesetzte Form aus *wingless* (wg) und *int* (Nusse et al. 1991). Die Wnt-Gene bilden eine Familie aus 19 Mitgliedern, die alle für cysteinreiche Glykoproteine gleicher Größe und sehr ähnlicher Struktur kodieren (Miller 2002). Sie üben wichtige Funktionen während der Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen über verschiedene Signaltransduktionswege aus.

Am besten untersucht ist der kanonische Wnt-Weg (Polakis 2000). Dabei binden die Wnt-Proteine als Liganden an zwei Komponenten der Zelloberfläche. Zum einen an den 7-Domänen-Transmembran-Rezeptor Frizzled und zum anderen an die Lipoproteinrezeptoren Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) 5 und 6. Daraus bildet sich ein Ligand-Rezeptor-Komplex, der das Protein Dishevelled (Dsh) aktiviert. Dishevelled hemmt die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β), deren Aufgabe im Komplex mit Axin und APC die Kontrolle des zytosolischen β -Catenin-Spiegels durch dessen Serin/Threonin-Phosphorylierung und anschließenden Abbau ist. Nach Bindung der Wnt-Proteine wird β -Catenin nicht mehr phosphoryliert und abgebaut, es akkumuliert im Zytoplasma und transloziert vermehrt in den Zellkern. Dort tritt es in Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren T-Zell-Faktor (TCF) und Lymphoid enhancer-binding protein (LEF). Durch die Bildung des Komplexes aus β -Catenin und TCF sowie LEF und seine Bindung an die DNA kommt es zur gesteigerten Transkription verschiedener Zielgene (Eastman et Grosschedl 1999). Der beschriebene Signalweg ist in der folgenden Abbildung 1 dargestellt.

Abb. 1: Kanonischer Wnt-Signalweg (a) in Abwesenheit, (b) in Anwesenheit des spezifischen Liganden

APC = adenomatous polyposis coli, β -cat = β -Catenin, CBP = CREB-binding protein, CK1 = casein kinase 1, DKK = dickkopf, DSH = dishevelled, GSK3 = glycogen synthase kinase 3, LRP 5/6 = LDL receptor-related protein, TCF = T cell factor

(Entnommen aus Moon et al. 2005, (691))

Es sind zwei weitere, nicht-kanonische Signalwege der Wnt-Proteine bekannt. Einer davon ist der ebenfalls über den Frizzled-Rezeptor und die anschließende Aktivierung des Dishevelled ablaufende Planar-Cell-Polarity-Signalweg (PCP-Signalweg). Dieser führt nicht zur Anreicherung des β -Catenin, sondern zu gesteigerter Phosphorylierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) durch das Zusammenwirken von Dishevelled und Rho A bzw. Rac 1. Das sind GTPasen, die bei der Regulation von Zellteilung, Ausformung von Lamellopodien, der Reorganisation des Zytoskeletts und Zell-Adhäsion mitwirken (Guizhong et al. 2003).

Der dritte bekannte Wnt-Signalweg ist der Wnt/Calcium-Signalweg, der über eine Mobilisierung des intrazellulären Calciums und die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II, Calcineurin und die Proteinkinase C abläuft (Kühl 2004). Die Aktivierung dieses Signalweges erfolgt durch die Wnt-Gene 4, 5a und 11. Schematisch dargestellt wird dies in der folgenden Abbildung 2.

Abb. 2: Nicht-kanonischer Wnt/ Ca^{2+} - sowie „Planar Cell Polarity“-Pfad

CAMKII = calmodulin-dependent kinase II, CDC42 = cell division cycle, DSH = dishevelled, DAAM = dishevelled-associated activator of morphogenesis, JNK = Jun-N-terminal kinase, PKC = protein kinase C, Rac/ Rho = small GTP-binding proteins, ROK = Rho kinase

(Entnommen aus Moon et al. 2005, (691))

Die Wnt-Proteine unterliegen der Kontrolle verschiedener physiologischer Inhibitoren. Diese sind die sezernierten Frizzled-related-proteins (sFRP), der Wnt-Inhibitor-Faktor (WIF) und die Dickkopf (DKK)-Proteine. Die humanen Dickkopf (DKK)-Proteine entstammen einer strukturell und funktionell sehr heterologen Proteinfamilie. Diese Familie wird gebildet aus DKK-1, DKK-2, DKK-3, DKK-4 und Soggy (Sgy), einem DKK-3 verwandten Protein (Niehrs 2006). Das DKK-1 hat während der embryonalen Entwicklung von Vertebraten die Funktion, die Bildung des Kopfes zu induzieren, indem es Wnt-Signalwege antagonisiert. So inhibiert DKK-1 auch die Wnt-induzierte Achsenverdopplung in *Xenopus laevis*. DKK-1 bindet an die LRP-5- und 6 – Co-Rezeptoren und verhindert dadurch die Wnt-induzierte Bildung des Komplexes mit dem Frizzled-Rezeptor (Bafico et al. 2001; Semenov et al. 2001). DKK-1 besitzt eine pro-apoptotische Wirkung und spielt eine entscheidende Rolle beim programmierten Zelltod während der Embryonalentwicklung (www.usbio.net). Außerdem konnte bewiesen werden, dass DKK-1 auch die β -Catenin-unabhängigen nicht-kanonischen Wnt-Wege antagonisieren kann (Mikheev et al. 2004).

1.5 Wnt-Gene und Karzinome

Besonders gut untersucht wurde der kanonische Wnt-Weg und die Veränderungen des β -Catenins am Colon-Karzinom, bei dem in 90% der Fälle Mutationen des β -Catenin-Signalweges vorliegen, ähnlich wie bei hepatozellulären Karzinomen und dem Magen-Karzinom (Birchmeier et al. 2006).

Bereits 1982 wurde das Wnt1-Gen im Maus-Modell als Mamma-Onkogen entdeckt (Nusse et al. 1991). Physiologischerweise werden in der Brustdrüse die Wnt-Gene Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7b und Wnt10b je nach Entwicklungsstufe in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert (Brown 2001). In einem erheblichen Anteil untersuchter Mamma-Karzinome wurde eine Überexpression von Wnt2, Wnt4, Wnt5a, Wnt7b, Wnt10b und Wnt13 nachgewiesen (Bergstein et Brown 1999). Das Ausmaß der Expression der Wnt-Proteine korreliert dabei positiv mit der Wandlung von normalen in maligne entartete Zellen (Smith et al. 1999), während die Sekretion der physiologischen Wnt-Antagonisten DKK-1, Wnt-inhibierender Faktor und sFRP in Tumoren häufig vermindert ist (Lee et al. 2004).

Insbesondere das Wnt5a wird in den verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten in seiner Wirkung bei malignen Erkrankungen kontrovers diskutiert. Im Gegensatz zu den stark zelltransformierend wirkenden Wnt-Genen 1, 3a und 7a (Wong et al. 1994), wurde Wnt5a eher als gar nicht bis allenfalls schwach transformierend wirkend eingeordnet. Die Ergebnisse anderer Untersuchungen lassen bei einigen Tumorarten sogar eine supprimierende Wirkung vermuten. Es fördert wohl die GSK3 β -unabhängige β -Catenin-Degradierung (Topol et al. 2003), verstärkt die Zell-Zell-Adhäsion auf Collagen-Matrix und vermindert einigen Studien nach scheinbar die Migrationsaktivität bestimmter Brustkrebszelllinien (Jönsson et Andersson 2001).

Eine Arbeitsgruppe sah laut retrospektiver Analysen von Brusttumoren mittels immunhistochemischer Wnt5a-Darstellung eine negative Korrelation zwischen Wnt5a-Expression und der Metastasenbildung sowie den Überlebensraten (Dejmek et al. 2005). Daraus ließe sich bei hoher Wnt5a-Expression auf eine verminderte Metastasenbildung und somit bessere Überlebensraten schließen. In anderen Studien wurde jedoch nachgewiesen, dass Wnt5a in diversen malignen Tumoren hochreguliert ist. Insbesondere ist dies auch in Mamma-Karzinomen der Fall (Bergstein et Brown

1999). Darüber hinaus gilt Wnt5a als ein zuverlässiger Marker in Melanomen für aggressives Verhalten, wo es vor allem in invasiven Zellen nachgewiesen wurde (Bittner et al 2000). Auch in malignen Urothel-Zelllinien wurden mittels RT-PCR hohe Konzentrationen von Wnt5a gefunden, während in normalem Urothel und in renalen Fibroblasten vergleichsweise wenig Wnt5a nachweisbar war (Zhuang et al. 1999).

In dem bereits beschriebenen Co-Kultur-Modell zwischen Makrophagen und Tumorzellen der MCF-7-Linie konnte eine Hochregulation von Wnt5a in den Makrophagen gezeigt werden, die in Monokultur kein Wnt5a exprimieren. Die invasionsfördernde Wirkung der Makrophagen in der Co-Kultur konnte über die Gabe von rekombinantem Wnt5a in die Tumorzell-Monokultur simuliert werden. Wnt5a führte dabei zu einer Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges und der JNK. Eine Hemmung der Wnt5a-induzierten Invasionssteigerung gelang mit dem Antagonisten DKK-1. Sowohl in der Co-Kultur, die zur Hochregulation von Wnt5a in den Makrophagen führte, als auch unter Gabe von rekombinantem Wnt5a zu den Tumorzellen war eine deutliche Überexpression von MMP-2 und -9 sowie von TNF- α feststellbar (Pukrop et al. 2006).

1.6 Zellmigration und die Voraussetzungen des Zytoskeletts

Wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts menschlicher und tierischer Zellen ist das Aktin. Nicht nur die Formgebung, sondern auch die Fortbewegung der Zelle erfolgt durch rasche gerichtete Kontraktion und Polymerisation der Aktinfilamente mit Ausbildung von Zellfortsätzen wie z.B. Filopodien in Bewegungsrichtung und Retraktion im entgegen gesetzten Teil der Zelle (Machesky et Hall 1997). Die Zellform ist bei Bewegungsvollzug von langgezogener Gestalt. Die Aktinfilamente sind etwa 8 nm breite helikale Strukturen aus gleichmäßig angeordneten Aktinmolekülen. Die Filamente sind polar, das heißt, sie haben ein Plus-Ende, das schnell wachsend ist und ein Minus-Ende, welches eher langsam wachsend ist. Eukaryonten besitzen mehrere Aktine. Das α -Aktin findet man meist in Muskelzellen während das β -Aktin in Nicht-Muskelzellen vorliegt. Die Polymerisation des Aktins benötigt unter anderem ATP, welches in der Mitte des Aktinmoleküls gebunden ist. In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Rho und Rac, den zwei GTP-bindenden

Proteinen des Rho-Rac/JNK-Wnt-Signalweges, durch Wachstumsfaktoren zu gesteigerter Aktin-Polymerisation führt und damit zu gesteigerter Motilität, sowie zur vermehrten Ausbildung fokaler Adhäsionen (Ridley et Hall 1992). Spätere Untersuchungen haben ergeben, dass Rho die Ansammlung kontraktile Aktin-Myosin-Filamente reguliert, während Rac die Polymerisation des Aktins zu peripheren Lamellopodien- und Filopodien-ähnlichen Ausstülpungen voran treibt (Raftopoulou et Hall 2004). Zur Beurteilung der Zelle hinsichtlich ihrer Migrationsaktivität spielt die Morphologie und die strukturelle Organisation des Aktinzytoskeletts demnach eine wichtige Rolle.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit baut auf den früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe auf, in denen gezeigt wurde, dass Wnt5a die Invasivität von wenig invasiven Mammakarzinom-Zelllinien deutlich steigert. Im Rahmen dieser Arbeit soll die migratorische Aktivität der Tumorzellen als Teilaspekt der Invasion näher betrachtet werden. Dazu wird das Migrationsverhalten von Brustkrebszellen unter dem Einfluss von Wnt5a und dem Antagonisten DKK-1 untersucht. Da das Migrationsverhalten entscheidend von den Bedingungen des Tumorstromas, insbesondere der extrazellulären Matrix, beeinflusst wird, sind die üblicherweise für Migrationsuntersuchungen eingesetzten sogenannten „Wundheilungs“-Assays auf Kunststoffuntergrund für die Fragestellungen dieser Arbeit nur bedingt geeignet. Methodisches Ziel der Arbeit ist somit die Entwicklung eines in-vitro- Zellkulturmodells, welches weitgehend physiologische Bedingungen, vergleichbar mit der Tumorumgebung in vivo, bietet.

Begleitend zur Untersuchung der migratorischen Aktivität erfolgt die Beobachtung der morphologischen Veränderungen der beteiligten Zellen.

In diesem neuen Zellkulturmodell sollen am Beispiel der niedrig malignen und wenig invasiven Brustkrebszelllinie MCF-7 insbesondere folgende Fragen geklärt werden:

1. Hat Wnt5a neben seiner nachgewiesenen invasionssteigernden Wirkung auch eine migrationssteigernde Wirkung auf Brustkrebszellen?

2. Gibt es das Phänomen gerichteter Migration von Brustkrebszellen zu einer feststehenden Wnt5a-Quelle?
3. Vermindert DKK-1 neben der Invasivität auch die Migrationsaktivität von MCF-7?
4. Besteht im Migrationsverhalten und der Wirkung von Wnt5a sowie DKK-1 auf die Tumorzellen ein Unterschied in Abhängigkeit vom Untergrund, auf dem die Zellen sich befinden?
5. Verändert sich die Zellmorphologie unter Wnt5a- bzw. DKK-1-Behandlung der Zellen und Einbeziehung der Tumorzellumgebung und welche Veränderungen sind das im Einzelnen?

2. Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Name	Herkunft
MCF-7	American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, USA; DMZ HTB-22
3T3-NIH-Fibroblasten, Wnt5a- überexprimierende Fibroblastenzelllinie	Zur Verfügung gestellt von M. Kühl, Universität Ulm
3T3-NIH-Fibroblasten LacZ	Zur Verfügung gestellt von M. Kühl, Universität Ulm

2.2 Verwendete Substanzen

Fetales Rinderserum (FCS) Biochrom, Berlin

Trypsin/EDTA (0,05-0,02 %) Biochrom, Berlin

Mowiol Farbwerke Hoechst, Frankfurt

Paraformaldehyd Merck, Darmstadt

Mammary Epithelial Cell Growth Medium PromoCell, Heidelberg

Wnt5a, rekombinant, Maus R&D Systems, Minneapolis, USA

DKK-1, rekombinant, Human R&D Systems, Minneapolis, USA

PBS (Phosphat gepufferte
Kochsalzlösung) Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Triton X-100 Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Phalloidin-FITC (Fluorescein) Sigma-Aldrich, Taufkirchen

DAPI-Stammlösung Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Fitc-Bleichschutz Sigma-Aldrich, Taufkirchen

ECM Gel, Engelbreth
Holm-Swarm Mouse Sarcoma Sigma, Deisenhofen, Deutschland

MTT -(3-(4,5-dimethylthiazol-
2-yl) 2,5-diphenyl -Tetrazolium
Bromid Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Lithium-Chlorid 8M Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.3 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 2: Primäre Antikörper

Rho-A (26C4) mouse monoclonal AB sc-418	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Phalloidin-FITC P5282	Sigma-Aldrich, München
β -Catenin (E-5) mouse monoclonal AB sc-7963	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Tabelle 3: Sekundäre fluoreszenzfarbstoffmarkierte Antikörper

Anti-Mouse-IgA (a-chain-specific) FITC F	Sigma-Aldrich, München
Anti-Rabbit-IgG (whole molecule) FITC F	Sigma-Aldrich, München
Anti-Mouse-IgG (Fab specific) TRITC	Sigma-Aldrich, München
Anti-Rabbit IgG (whole molecule) TRITC	Sigma-Aldrich, München
Anti-Goat IgG (whole molecule) FITC	Sigma-Aldrich, München

2.4 Geräte und Materialien

Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL Großburgwedel, Deutschland
Zentrifuge Universal 16	Hettich Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
6-Well-Platte aus Kunststoff	Nunc International, Dänemark

24-Well-Platte aus Kunststoff	Nunc International, Dänemark
50 ml Falcon-Gefäß	Becton/Dickinson, Bedford, USA
Zellkulturflaschen, 56cm³	Nunc International, Dänemark
Serologische Pipetten, 10ml	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.5 Verwendete Puffer und Stammlösungen

Mowiol	4-88 in 80 ml PBS pH 7,3 lösen und über Nacht rühren; 40 ml Glycerin (Fluoreszenzmikroskopiegeeignet, Sigma G 9012) dazu und über Nacht rühren (bei Raumtemperatur) 1 h zentrifugieren, Überstand abpipettieren 3-ml-Aliquots bei 4° C lagern
Paraformaldehyd	24 g in 540 ml Aqua dest. von 60° C 6-9 Tropfen 1M NaOH 60 ml 10xPBS 1M NaOH bis pH 7,3 eingestellt ist
PBS	500 ml Aqua dest. 4 g NaCl 0,1 g KCl 0,58 g Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O, pH 8 einstellen
Triton X-100	0,2 % Triton x-100 in PBS gelöst

Phalloidin-FITC (Fluorescein)	0,1 mg/ml Methanol 10 µl vor Gebrauch mit 500-750 µl PBS verdünnen
DAPI-Stammlösung	1 mg 4', 6-Diamino-2-Phenylindol in 5 ml dest. H ₂ O lösen
DAPI-Färbelösung	4',6'-Diamino-2'-Phenylindol (DAPI 200 µg/ml) 3 µl Stammlösung auf 1 ml 1xPBS
FITC-Bleichschutz	2,5 g n-Propylgallat in 50 ml PBS lösen, pH neutral 50 ml Glycerin zugeben, über Nacht rühren Stammlösung bei 4 ° C lagern 3 Teile Mowiol-Lösung und ein Teil FITC- Bleichschutz werden vor der Verwendung zusammen gegeben
MTT -(3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl) 2,5-diphenyl -Tetrazolium Bromid	gelöst in 5 mg/ml PBS
MTT-Lyse Puffer	75% (v/v) Ameisensäure, 25% (v/v) DMSO

2.6 Die Zellkultur

Die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 wird entsprechend den Empfehlungen bei 37° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 % im Brutschrank (Biocenter 2001, Integra Biosciences, Fernwald) unter endotoxinfreien Bedingungen kultiviert. Als Nährmedium wird RPMI 1640-Medium, versetzt mit 10 % fetalem Rinderserum verwendet. Die Wnt5a überexprimierenden 3T3-NIH-Fibroblasten sowie die Kontroll-3T3-Fibroblasten (LacZ) werden ebenfalls unter den oben genannten Bedingungen kultiviert.

2.6.1 Vorbereitung der Zellen für die Versuche

Die Tumorzellen werden vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu erfolgt zunächst der Waschschrift der Zellen mit 10 ml PBS. Anschließend werden 1,5 ml Trypsin/EDTA (0,05-0,02 %) zugesetzt und die Zellkulturflasche anschließend für 5 min. im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden 10 ml RPMI-Medium mit 10 % FCS zugegeben, um die Enzymwirkung des Trypsin/EDTA zu stoppen. Die Zellsuspension wird in ein 50-ml-Falcon-Gefäß aufgenommen und 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen, das Pellet danach in frischem Medium resuspendiert. Dann erfolgt die Entnahme eines 20-µl-Aliquots, die Ermittlung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer und die anschließende Suspension in geeigneten Verdünnungen, die in neue Kulturgefäße überführt (in der Regel 1:10) bzw. für die Experimente eingesetzt werden.

2.6.2 Die Co-Kultivierung von MCF-7 mit Fibroblasten

Die Co-Kultivierung der MCF-7-Zelllinie und der Fibroblasten erfolgt in 6-Well-Platten mit speziellen Einsätzen (Nunc Inserts, Nunc International, Dänemark).

Je Well werden zwischen 2×10^5 und 3×10^5 MCF-7-Zellen ausgesät. Dann werden ca. 4×10^5 Fibroblasten in den beweglichen Einsatz ausgesät, dessen Boden aus

einer für Flüssigkeiten, aber nicht für Zellen durchlässigen Membran besteht, deren Porengröße 0,4 μm beträgt. Dieser Einsatz wird in die Kammer mit den MCF-7-Zellen gestellt. Die Kultivierung erfolgt für 24 h, 72 h, 96 h oder 144 h, je nach gewünschtem Betrachtungszeitraum. Bei dieser Form der Co-Kultivierung besteht zu keiner Zeit direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen den Fibroblasten und MCF-7.

2.7 Durchführung der konventionellen Scratch-Assays auf Kunststoffuntergrund

Für die konventionellen Scratch-Assays werden die MCF-7-Tumorzellen in unbeschichteten 6-Well-Kunststoffplatten ausgesät und dort bis zum Erreichen der Konfluenz mindestens 24 h wachsen gelassen.

Anschließend wird mit einer 10- μl -Pipettenspitze ein glatter Spalt durch den Zellrasen gezogen. Das Well wird dann zweimal mit Medium gespült, um die abgelösten Zellen zu entfernen. Lichtmikroskopisch erfolgt anschließend die Überprüfung, ob ein glattrandiger zellfreier Wundbereich im Zellrasen entstanden ist. Optimale Bereiche werden markiert, um auch hier stets den Ausgangspunkt beurteilen zu können. Die Breite des Spaltes wird dann am Mikroskop unter standardisierten Bedingungen in μm ausgemessen. Dieser markierte Bereich wird dann in regelmäßigen Zeitabständen erneut beobachtet und ausgemessen. Im Rahmen dieser Versuche erfolgt die Zugabe von Wnt5a und DKK-1 und die Beurteilung der Auswirkungen im Vergleich zur Kontrolle. Die Messwerte werden tabellarisch erfasst und die Mittelwerte aus den einzelnen Versuchsergebnissen gebildet. Zudem wird der künstliche Wundspalt bildlich dokumentiert. Veranschaulicht wird die Ausgangssituation durch die folgende, für alle jeweils mindestens dreimal durchgeführten Versuche, beispielhafte Abbildung.

Abb. 3: Ausgangssituation nach Setzen des Wundspaltes und Zugabe von Wnt5a bei MCF-7

2.8 Migrationsassays auf extrazellulärer Matrix (ECM)

Konventionelle Scratch-Assays wie unter 2.7 finden auf unphysiologischen Oberflächen statt, auf denen Adhäsions- und Migrationsverhalten der Tumorzellen nicht der in-vivo-Situation entsprechen. Es musste daher ein Assay entwickelt werden, der die Beurteilung der Migration auf ECM-beschichteten Unterlagen erlaubt. Eine einfache Übertragung der konventionellen Methodik auf beschichtete Oberflächen ist nicht möglich, da das Setzen eines Scratches mit der Pipette immer auch die Beschichtung verletzt und somit die Wanderung der Zellen behindert. Nach längeren Versuchsreihen erwies sich die folgende, neu entwickelte Methodik als am besten geeignet.

Zunächst wird eine 6-Well-Platte mit extrazellulärer Matrix beschichtet. Dafür werden 250 µl bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefrorene ECM-Aliquots aufgetaut und mit 750 µl serumfreien RPMI suspendiert. In jeder der sechs Kammern werden 150 µl dieser ECM-Lösung mit Hilfe eines Zellschabers gleichmäßig ausgestrichen und ca. fünf Minuten trocknen gelassen. Die im Versuch eingesetzten Tumorzellen werden drei bis vier Tage zuvor auf einem gleichmäßig mit ECM beschichteten Deckgläschen ausgesät,

bis die Konfluenz bis an den Rand erreicht ist. Dann werden die Deckgläschen in einer Art „Sandwich-Technik“ mit der Zellseite nach unten auf die ECM-Schicht in der 6-Well-Kammer gelegt und leicht angedrückt. So wird die komplette Einbettung der Tumorzellen in ECM erreicht, weitgehend entsprechend der physiologischen Situation in vivo. Die 6-Well-Platte wird dann zweimal mit Medium gespült, um abgelöste Zellen zu entfernen. Dann werden 2,5 ml RPMI mit 10 % FCS in die Wells gegeben und die präparierten Platten für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Im Verlauf dieser 24 Stunden bilden die Tumorzellen eine relativ gleichmäßige Zellfront am Deckglasrand. Diese ist in der Regel zweireihig und reicht mit einer Breite von 20 bis 30 μm in die ECM. Sie wird als geeignete Ausgangsbasis für den Versuch genutzt. Ein regelmäßiger und mikroskopisch gut beurteilbarer Randbereich des Deckgläschens wird markiert und im Verlauf der Versuche beobachtet, unter standardisierten Bedingungen vermessen und bildlich dokumentiert. In der folgenden Abbildung ist die Ausgangssituation des Versuches sowohl schematisch als auch als repräsentative Abbildung einer Versuchssituation dargestellt.

Abb. 4: Schema des Migrationsassays auf ECM

Abb. 5: Darstellung der Ausgangssituation des Versuches mit MCF-7 auf ECM

Es erfolgt die Ausmessung der Migrationsstrecke in μm vom Deckglasrand entlang eines insgesamt $400\text{ }\mu\text{m}$ großen Bereiches am Rand des Deckglases, der zur größeren Messgenauigkeit in fünf Einzelabschnitte á $80\text{ }\mu\text{m}$ aufgeteilt wird. An diesen fünf Einzelabschnitten erfolgt die Messung der Distanz, die von den Tumorzellen in der ECM des Wells zurück gelegt wurde. Zusätzlich ermittelt die verwendete Software die ECM-Gesamtfläche, die bezogen auf den $400\text{ }\mu\text{m}$ - Abschnitt als Bezugsgröße, komplett mit migrierten Zellen besetzt ist. Die Beobachtung, Messung und bildliche Dokumentation erfolgt im zeitlichen Verlauf von 24, 48, 96 und 144 Stunden unter den jeweiligen Bedingungen des Versuches (Kontrolle, + rekombinantes Wnt5a, + rekombinantes DKK-1).

2.9 Die Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie

2.9.1 Vorbehandlung der Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenz werden $2-3 \times 10^5/\text{ml}$ Zellen in den Kavitäten einer speziellen Kunststoff- 6- Well-Platte auf Glasdeckgläschen für mindestens 24 h bis zu 96 h ausgesät. Die Experimente mit den MCF-7-Zellen erfolgen unter Zugabe von 100 ng rekombinantes Wnt5a je ml Medium. Die Einwirkzeit des Wnt5a beträgt für die Zell-

reihen im Langzeitstimulationsversuch jeweils 4 h, 2 h, 1 h, und 30 min., um unterschiedliche Effekte im zeitlichen Verlauf beobachten zu können.

Die Langzeitstimulation wird für die eher verzögert reagierenden Strukturprotein-Betrachtungen, wie die des β -Catenin, des α -Tubulin, der Protein-Kinase C (PKC), des Aktins und des Zytokeratins angewandt. Für das eher kurzfristig reagierende Protein Rho-A kommt die Kurzzeitstimulation mit Wnt5a für jeweils 15 min., 10 min., 2 min. und 1 min. zur Anwendung.

Außer der Wirkung des Wnt5a wird im Rahmen dieser Experimente auch die Wirkung des rekombinanten Proteins DKK-1 an beiden Zellreihen untersucht. Zu diesem Zweck werden im Vergleich zur Kontrolle und den mit rekombinantem Wnt5a behandelten Zellen immer auch Zellen mit 100 ng DKK-1 je ml Medium inkubiert. Im Rahmen der Langzeitstimulation erfolgt die Inkubation der Zellen mit DKK-1 für 4 h, bei der Kurzzeitstimulation für 15 min.

Die ersten Arbeitsschritte erfolgen in den Kavitäten der 6-Well-Platte. Zunächst werden die Mediumrückstände durch mehrere Waschschriffe mit PBS von den Zellen entfernt. Dazu wird das Medium aus den sechs Wells abgesaugt und mit je 2 ml PBS gewaschen. Nach dem dritten Waschschriffe wird das PBS abgesaugt und anschließend je 2 ml 4 %iges Paraformaldehyd in jedes Well pipettiert. Es dient zur Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen, die Einwirkzeit beträgt 20 min. Alternativ kann zur Fixierung auch Aceton verwendet werden. Nach Ablauf der Zeit müssen die Zellen erneut dreimal auf die oben beschriebene Weise mit PBS gewaschen und danach mit je 2 ml 0,2 %igem Triton-x 100 für 10 min. behandelt werden. Dies dient der Permeabilisierung der Zellmembran, um eine gute Aufnahme der Antikörper und des Farbstoffes in die Zellen zu gewährleisten. Nach Ablauf der 10 min. erfolgt wieder der Waschschriffe mit PBS. Anschließend verbleiben die Plättchen im PBS.

2.9.2 Direkte und indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Immunfluoreszenzfärbung werden zwei Verfahren unterschieden. Bei der direkten Immunfluoreszenzfärbung erfolgt die Anfärbung der Zellstrukturen durch die Behandlung mit einer fluoreszierenden Substanz, in diesem Fall durch FITC-gekoppeltes Phalloidin. Dieses bindet als fluoreszierender Farbstoff spezifisch an ein

Zellstrukturprotein. Das Phalloidin bindet an Aktinfilamente und stabilisiert diese gegen Depolymerisation. Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wird im ersten Schritt ein primärer Antikörper aufgetragen, der spezifisch an das gesuchte Strukturprotein bindet. Im zweiten Schritt wird der sekundäre Antikörper aufgetragen. Dieser ist gegen den ersten Antikörper gerichtet und mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Durch dieses Verfahren ist es möglich, mehrere Strukturproteine gleichzeitig und spezifisch in verschiedenen Farben darzustellen.

2.9.3 Durchführung der direkten Immunfluoreszenzfärbung am Beispiel des Phalloidin

Eine feste, mit Parafilm bezogene Unterlage wird vorbereitet, um einen glatten und nicht feuchtigkeitsresorbierenden Untergrund zu erhalten. Anschließend werden die einzelnen Positionen für die entsprechenden Deckgläschen mit den zu färbenden Zellen beschriftet. Auf diese markierten Positionen wird ein 40- μ l-Tropfen der Phalloidin-FITC-Lösung pipettiert. Danach werden die noch in den sechs PBS-haltigen Wells befindlichen Deckgläschen mit einer Pinzette entnommen, das restliche PBS abgetupft und mit der Zellseite nach unten auf die vorbereiteten Tropfen gelegt. Dann werden die Gläschen lichtgeschützt für 45-60 min. inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit erfolgt die dreimalige Waschung mit PBS in 24-Loch-Wells, die so mit PBS angefüllt sind, dass sich ein konvexer Flüssigkeitsspiegel bildet. Die Deckgläser werden anschließend vorsichtig mit der Zellseite nach unten auf dem PBS schwimmen gelassen. Nach ca. zwei Minuten wird jedes Deckglas in ein zweites Well mit PBS und nach weiteren zwei Minuten in ein drittes Well mit PBS gewechselt. Nach diesen drei Waschschritten wird das Deckglas vorsichtig abgetupft und mit Mowiol auf Objektträgern fixiert für die Mikroskopie.

2.9.4 Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzfärbung

Bei der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wird zunächst der primäre Antikörper, der gezielt an das gewünschte Zellprotein bindet, benötigt. Als bestes Konzentrationsverhältnis von Antikörper zu PBS hat sich für die optimale Darstellung 1:50 erwiesen. 40 µl dieser Lösung werden auf die wie oben beschrieben vorbereitete Unterlage pipettiert und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten darauf gelegt. Dieser primäre Antikörper muss über Nacht in einer feuchten Kammer im Kühlschrank inkubieren. Im zweiten Schritt erfolgt am nächsten Tag das Auftragen des sekundären Antikörpers. Zuvor wird der primäre Antikörper abgewaschen und zwar wie zuvor beschrieben im 24-Loch-Well mit PBS in drei Waschschritten. Während dieser Waschschrritte wird die Färbung mit dem zweiten Antikörper, der im Verhältnis 1:400 in PBS angesetzt wird, wie oben beschrieben mit 40-µl-Tropfen vorbereitet. Da der sekundäre Antikörper sehr lichtempfindlich ist, müssen sämtliche Arbeitsschritte lichtgeschützt erfolgen. Die Inkubation erfolgt für 45 bis 60 min. lichtgeschützt in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Einwirkzeit werden die Reste der Färbelösung vorsichtig vom Unterrand der Deckgläschen getupft. Dann werden die Deckgläschen mit der Pinzette und der Zellseite nach unten auf dem PBS in der 24-Loch-Platte erneut für dreimal je zwei Minuten gewaschen und anschließend vorsichtig abgetupft. Die Deckgläschen werden nach dem Waschen mit der Zellseite nach oben auf die Unterlage gelegt. Darauf gibt man je Deckglas 20-40 µl DAPI-Lösung und lässt diese für fünf Minuten einwirken. Die DAPI-Färbung dient der Anfärbung des Zellkerns. Nach vorsichtigem Abspülen der DAPI-Lösung mit PBS fixiert man die Deckgläschen mit Mowiol auf Objektträgern für die Mikroskopie.

2.9.5 Die Fluoreszenzmikroskopie

Die direkt und indirekt gefärbten Zellen werden anschließend am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Hierzu wird das AxioVert-200-M-Mikroskop mit Fluoreszenz- und Durchlichteinrichtung sowie integrierter Kamera AxioCam MRm (ZEISS, Göttingen) verwendet. Zur Auswertung wurden die Aufnahmen vorwiegend mit dem A-Plan 100 x 1,25 Öl-Immersionsobjektiv erstellt, für einige Übersichtsaufnahmen zur Beurtei-

lung von Proliferations- und Adhäsionsverhalten der Zellen wurde das LD Achroplan 40 x /0,60 Korr Ph2 (DIC III)-Objektiv verwendet. Die Belichtungszeit wurde automatisch je nach Intensität der Färbung reguliert und lag zwischen 0,1 und einer Sekunde. Bearbeitet, verwaltet und archiviert wurden die Bilder mit der zum Mikroskop gehörenden Software KarlZeiss AxioVision und mit CorelPhotoshop 10.

2.10 Der colorimetrische MTT-Test zur Messung der Viabilität

Dieser Test beruht auf dem Umsatz des Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazoliumbromid) über das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System zu einem wasserunlöslichen Formazan-Farbstoff. Da der Farbstoff nur von vitalen Zellen umgesetzt wird, ist die gemessene Absorption direkt proportional zur Menge der vitalen Zellen. Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte und die Verbreiterung der Zellfronten im Migrationsassay und im Scratch-Assay lediglich auf einer unterschiedlichen Proliferationsaktivität der Zellen beruhen, werden MTT- Aufnahme-Tests unter den verschiedenen angewandten Bedingungen durchgeführt. Je dreimal erfolgt die Testdurchführung mit auf ECM ausgesäten MCF-7-Zellen und dreimal auf Kunststoff und außer unter Kontrollbedingungen auch mit rekombinantem Wnt5a, DKK-1, Wnt5a-sezernierenden Fibroblasten und mit Wnt5a-negativen LacZ-Fibroblasten. Dazu werden die MCF-7-Zellen unter den jeweiligen Bedingungen in einer 24-Well-Kunststoffplatte für 24 h bei 37° C und 5 % CO₂-angereicherter Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Dann werden die Einsätze entfernt und das Medium (10 % FCS RPMI-Medium) gewechselt. Anschließend werden 20 µl des MTT-Reagenz in jedes Well gegeben und die Zellen dann unter o.g. Bedingungen im Brutschrank für weitere vier Stunden inkubiert. Innerhalb dieser vier Stunden wandeln alle lebenden Zellen das aufgenommene MTT-Reagenz in Formazan um, welches die Zellen nicht mehr verlassen kann. Nach Ablauf der 4 h werden 200 µl saures Isopropanol (0,04 N HCl) in die Wells pipettiert und vorsichtig vermischt, um die dunkelblauen Formazankristalle aus den Zellen zu lösen, die während der vierstündigen intrazellulären Umwandlung aus dem

MTT entstanden sind. Die Formazan-Quantifizierung erfolgt mit dem Automatic Plate Reader (Titertek Multiscan 2, Flow Laboratories, Irvine, Ayrshire, Scotland) bei 562 nm Wellenlänge. Die photometrische Messung der Absorptionsrate zeigt dann, ob unter der Behandlung mit Wnt5a, DKK-1 und den Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolle eine veränderte Zellproliferation stattgefunden hat. Diese Methode geht zurück auf Mosmann (1983) und wird auch von Ferrari et al. (1990) beschrieben.

3. Ergebnisse

3.1 Scratch-Assays - konventionelle „Wundheilungs“-Tests auf Kunststoffuntergrund

3.1.1 „Wundheilung“ auf Kunststoffuntergrund

Zur Untersuchung der migratorischen Aktivität der Tumorzellen wurden zunächst konventionelle Migrationstests der Tumorzellen in 6-Loch-Platten durchgeführt. Durch die darin ausgesäten MCF-7-Brustkrebszellen wird nach Erreichen der Konfluenz ein artifizierter Wundspalt gezogen. Im Lauf der folgenden 24 Stunden wird der Verschluss dieser Wunde durch Migration der Tumorzellen in den Spalt beobachtet und dokumentiert.

Abb. 6: MCF-7-Kontrolle zu Beginn 0 h

Abb. 7: MCF-7-Kontrolle nach 24 h

Im Vergleich zur Startsituation in Abbildung 6 sind nach Ablauf von 24 Stunden einige Zellen in den Wundspalt vorgewandert. Die Wundränder haben sich gleichmäßig mit ihrer gesamten Fläche einander angenähert von im Mittel 729,94 µm auf 472,53 µm.

Im Folgenden wurden Vergleichsversuche unter Zugabe von 100 ng Wnt5a je ml Medium durchgeführt. Die Ausgangsbedingungen waren bezüglich der Breite des Wundspaltes mit 767,24 μm im Mittel vergleichbar. Der Wundspalt war zu Beginn völlig frei von Tumorzellen (s. Abbildungen 8 und 9).

Abb. 8: MCF-7 + Wnt5a zu Beginn

Abb.: 9: MCF-7 + Wnt5a nach 24 h

Das Ergebnis nach 24 Stunden zeigt, dass sich die Wundränder im Vergleich zur Kontrolle insgesamt nur wenig in ihrer Gesamtfläche aufeinander zu bewegt haben. Die Breite des Wundspaltes betrug nach 24 Stunden im Mittel 644,12 μm .

Auffallend ist aber, dass sich im Vergleich zur Kontrolle viel mehr einzelne Zellen aus dem Wundrandbereich gelöst haben und in den Wundspalt eingewandert sind. Bereits auf diesen Abbildungen ist angedeutet zu erkennen, dass die Wundränder unter Wnt5a-Zugabe unregelmäßig und aufgelockert wirken, während man bei der Kontrolle eher kompakte und geschlossene Wundränder beobachtet. Unter der Wnt5a-Wirkung erscheinen die Tumorzellen beginnend morphologisch verändert in Form und Größe.

Im Versuch unter Behandlung der Tumorzellen mit 100 ng DKK-1/ml Medium lagen bereits zu Beginn einige Zellen im Wundspalt, die sich beim Setzen des Scratch aus dem Zellverband gelöst haben und sich trotz Mediumwechsel nicht komplett entfernen ließen. Dieses wurde jedoch bei der Beurteilung des Versuchsergebnisses nach

24 Stunden berücksichtigt. Die folgenden Abbildungen 10 und 11 stellen das Ergebnis dar.

Abb. 10: MCF-7 + DKK-1 zu Beginn 0 h

Abb. 11: MCF-7 + DKK-1 nach 24 h

Vergleichbar mit der Kontrolle hat unter der Anwendung von DKK-1 eine gleichmäßige Verschmälerung der Wundränder stattgefunden von 718,05 µm auf 556,14 µm. Eine Migration von einzelnen Tumorzellen in den Wundspalt wie beim Versuch mit Wnt5a war hier nicht in dem Ausmaß nachweisbar. Damit scheint die Zugabe von DKK-1 keine signifikanten Unterschiede zu bewirken im Vergleich zur Kontrolle. Die in den Versuchen ermittelten Werte lassen eine allenfalls geringfügig verzögerte Wundheilung unter Zugabe von DKK-1 vermuten, signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle ergaben sich jedoch nicht.

Unter kombinierter Gabe von Wnt5a und DKK-1 kam es in jeweils insgesamt dreimal durchgeführten Versuchen zu einer Verschmälerung des Wundspaltes. Jedoch war diese unter Zugabe von Wnt5a am geringsten ausgeprägt. Dafür kam es unter Wnt5a-Zugabe zu einer vermehrten Einzelzellmigration in den Wundspalt. Die kombinierte Gabe von Wnt5a und DKK-1 zeigte eine gleichmäßige Verschmälerung des Wundspaltes ohne Einzelzellmigration.

In numerischen Werten stellt sich das im Diagramm folgendermaßen dar:

Abb. 12: Distanz zwischen den Wundrändern im konventionellen Scratch-Assay

Die Werte der Distanzabnahme zwischen den Wundrändern spiegeln scheinbar eine verlangsamte Wundheilung unter Zugabe von Wnt5a im Vergleich zur Kontrolle wider. Morphologisch scheint es sich jedoch um eine andere Form der Wundheilung zu handeln, die durch das Einwandern zahlreicher einzelner Tumorzellen in den Wundspalt erfolgt. Die Tumorzellen sind durch Wnt5a scheinbar in der Lage den Zellverband am Wundrand zu verlassen und rasch in den Wundspalt zu wandern, während unter Gabe von DKK-1 und unter Kontrollbedingungen die flächig-kontinuierliche Migration des Zellverbandes vom Wundrand aus in Richtung Wundbereich erfolgt.

3.1.2 MTT-Test auf Kunststoff

Der zum Vergleich der Stoffwechselaktivität/Viabilität durchgeführte MTT-Test mit den MCF-7-Zellen unter der Stimulation mit den rekombinanten Faktoren Wnt5a und DKK-1 zeigte, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Viabilität zwischen den stimulierten Zellen und der unstimulierten Kontrolle gibt. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die beobachteten Migrationsphänomene nicht auf Verschiebungen der Viabilität bzw. Apoptose-Induktion zurück zu führen sind. Im folgenden Diagramm sind die für die stimulierten MCF-7-Zellen gemessenen Absorptionen in Prozent der unstimulierten Kontrolle dargestellt.

Abb. 13: Diagramm mit den ermittelten Absorptionsraten im MTT-Test in % der Kontrolle (n=3)

%	Kontrolle	+ Wnt5a	+ DKK-1
Absorptionsrate	100	102,34	102,71
Standardabweichung	0	2,77	2,28

3.1.3 „Wundheilung“ auf ECM

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der ECM sollten die initial auf Kunststoffplatten durchgeführten Scratch-Assays nun auf mit ECM beschichteten Platten erfolgen. Dabei erwies sich jedoch schon das Setzen des Scratches mit der Pipettenspitze als problematisch, da dabei bereits große Teile der ECM Defekte erlitten und kein glatter Wundrand für reproduzierbare Messungen zur Verfügung stand. Zudem war die ECM-Beschichtung im Bereich des Scratches nahezu vollständig entfernt, so dass die gewünschten Versuchsbedingungen so nicht hergestellt werden konnten. Es liegen daher keine Bilder und Auswertungen zu diesen Versuchen vor.

3.2 Der neue Migrationsassay auf ECM

Da die bisherige konventionelle Methode der Scratch-Assays zur Migrationsuntersuchung bei Tumorzellen ungeeignet war, um funktionelle Analysen zur extrazellulären Matrix durchzuführen, wurde eine neue Methode zur Durchführung von Migrations-tests unter physiologischeren Bedingungen mit ECM entwickelt (s. Methoden, Kap. 2.6, 20). Diese neue Methode ermöglicht es, das Migrationsverhalten von in ECM eingebetteten Tumorzellen zu untersuchen, was eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Situation in vivo erlaubt.

Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft repräsentative Versuche aus mindestens drei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Untersuchungen.

3.2.1 Migrationsaktivität unter Stimulation mit rekombinantem Wnt5a und DKK-1

In den Migrationstests zeigte sich reproduzierbar in allen durchgeführten Experimenten eine gesteigerte Migrationsaktivität der Tumorzellen unter Zugabe von Wnt5a und DKK-1 auf ECM. Dieses veranschaulichen die folgenden beispielhaften Abbildungen aus den Versuchen mit vergleichender Darstellung der Ausgangssituation zu Versuchsbeginn und dem Ergebnis nach Ablauf von 144 Stunden. Gezeigt werden re-

präsentative Versuche, die mindestens dreimal in identischer Weise durchgeführt wurden.

Abb. 14: MCF-7-Kontrolle Ausgangsfront

Fläche : 13.012,03 μm^2

Abb. 15: MCF-7-Kontrolle nach 144 h

Fläche: 99.626,75 μm^2

In Abbildung 14 ist eine exemplarisch für alle Versuchsdurchführungen geforderte Ausgangszellfront am Rand des Deckglases dargestellt. Eine solche Zellfront bildete sich reproduzierbar innerhalb von 24 Stunden nach dem Auslegen der Deckgläschen mit den Tumorzellen auf der extrazellulären Matrix. Nur Versuche, die nach 24 Stunden eine solche Ausgangszellfront boten, wurden ausgewertet. Ebenfalls ist die Methode des Ausmessens im Bild dargestellt. Man sieht den gewählten 400 μm langen Abschnitt der Zellfront, der zur Messung der Fläche in μm^2 und zur Bestimmung der zurückgelegten Migrationsstrecke an fünf Abschnitten zwischen dem Deckglas und der äußersten Zellschicht am Rand der Zellfront in der extrazellulären Matrix genutzt wurde. Dieses Ergebnis ist beispielhaft für die in allen Versuchsreihen untersuchten Kontrollen. Zum Vergleich nachfolgend zwei repräsentative Abbildungen für die mit Wnt5a stimulierten Tumorzellen.

Abb. 18: MCF-7-Ausgangsfront vor DKK-1-Zugabe

Fläche: 18.884,70 μm^2 / 19.213,52 μm^2

Abb. 19: MCF-7 nach 144 h mit 100 ng/ml DKK-1

Fläche: 220.760,55 μm^2

Ein auffallender morphologischer Unterschied in den Versuchen mit DKK-1 im Vergleich zum Wnt5a war die Struktur der in die ECM vorgewanderten Zellfront. Unter der Stimulation mit Wnt5a wurde ein mehrschichtiger Aufbau der Zellfront beobachtet, während die Zellfront unter DKK-1-Gabe eher flach in einschichtigem Aufbau migrierte. Im Rahmen dieser Versuche und ihrer Auswertung konnte immer nur ein bestimmter Abschnitt abgebildet werden, was hier beispielhaft die zur Messung heran gezogene Ausgangszellfront war. Es fand aber auch in allen anderen Bereichen des Deckglasrandes eine vergleichbare Migration von Tumorzellen in die ECM statt.

Um die Unterschiede des Migrationsverhaltens zwischen Wnt5a-Stimulation und der Beobachtungen bei DKK-1-Zugabe darzustellen, folgen die nachstehenden Abbildungen, die den mehrschichtigen Aufbau der Zellfront bei Wnt5a im Gegensatz zum flachen und einschichtigen Aufbau der Zellfront unter DKK-1-Stimulation zeigen sollen.

Abb. 20: MCF-7 auf ECM + 100ng/ml Wnt5a nach 144 h

Pfeile = Mehrschichtung

Fläche: 211.560,45 μm^2

Die Pfeile deuten auf übereinanderliegende Zellen; die Migration erfolgt unter Wnt5a-Stimulation nicht nur in der flächenmäßigen Ausdehnung sondern auch im mehrschichtigen Aufbau.

Unter DKK-1-Stimulation imponiert in erster Linie das flächige Vorwandern, der mehrschichtige Aufbau der migrierenden Zellfront war dabei weniger stark ausgeprägt. Die Zellfront bewegte sich eher planar in die ECM vor. Das soll durch die folgende Abbildung beispielhaft für die insgesamt sechs durchgeführten Versuche veranschaulicht werden.

Abb. 21: MCF-7 nach 144 h unter DKK-1-Stimulation

Fläche: 187.700,52 μm^2

Abb. 24: MCF-7 und die Migration zum Wnt5a-Fibroblasteneinsatz nach 144 h

Pfeil=Fibroblasten-Einsatz

In diesem insgesamt dreimal unter identischen Bedingungen durchgeführten Versuch wurde der Einsatz mit den Fibroblasten nur ca. 5 mm vom Deckglas mit den MCF-7-Zellen entfernt aufgestellt, was die bildliche Dokumentation der Versuchssituation mit Darstellung der Tumorzellmigration zum Fibroblasten-Einsatz hin ermöglichte. Eine Tumorzelle, die auf der Abbildung nur schemenhaft zu erkennen ist, hat eine Distanz von 740,9 μm zurückgelegt und liegt direkt zentral unter dem Fibroblasteneinsatz. Dieses Ergebnis liefert deutliche Hinweise auf das Vorliegen gerichteter Migration unter bestimmten Bedingungen, ein sicherer Beweis müsste jedoch durch weitere Untersuchungen erfolgen.

Parallel insgesamt fünf Mal durchgeführte Versuche mit LacZ-Fibroblasten unter sonst gleichen Versuchsbedingungen zeigten eine geringfügig höhere, aber den Kontrollen vergleichbare Migrationsaktivität nach Ablauf von 144 Stunden ohne Hinweise auf eine gerichtete Migration.

Abb. 25: MCF-7 in Co-Kultur mit LacZ-Fibroblasten nach 144 h

Fläche: 138.108,74 μm^2

Die Mittelwerte der nach Ablauf von 144 Stunden in den verschiedenen Versuchen (n=6) gemessenen Flächen, die mit migrierten Zellen besetzt waren, bezogen auf den 400 μm -Ausgangsabschnitt in μm^2 , sind in der folgenden Abbildung in Diagrammform zum direkten Vergleich aufgeführt. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede (s. p-Wert) zwischen den Kontrollen und den mit rekombinantem Wnt5a und DKK-1 stimulierten Tumorzellen, sowie den mit Wnt5a-überexprimierenden 3T3-NIH-Fibroblasten kultivierten MCF-7-Zellen.

Abb. 26: Migrationsflächen in μm^2 , Mittelwerte (n=6) +/- Standardabweichung, p-Wert bezogen auf die Differenz zur Kontrolle (Signifikanz = $p < 0,05$)

Im Ergebnis lässt sich sowohl für rekombinantes Wnt5a als auch für DKK-1 eine deutliche migrationssteigernde Wirkung auf die Tumorzellen feststellen, da ihre Migrationsaktivität im Vergleich zur Kontrolle mehr als verdoppelt wird. Ähnlich ist das Ergebnis bei der Co-Kultivierung mit Wnt5a-exprimierenden Fibroblasten. Die Migrationsaktivität wird auch in diesen Experimenten im Vergleich zur Kontrolle mehr als verdoppelt. Die Co-Kultur mit LacZ-Fibroblasten weist eine etwas höhere Migrationsaktivität der Tumorzellen auf als die Kontrolle, das Ausmaß ist jedoch nicht signifikant ($p=0,05325$).

In sechs Versuchen erfolgte die kombinierte Stimulation mit rekombinantem Wnt5a und DKK-1. Dabei war die Migrationsaktivität der MCF-7-Zellen etwas geringer als die in den Versuchen unter Gabe der Einzelsubstanzen, jedoch im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls signifikant höher.

3.3 Beurteilung der morphologischen Veränderungen in der Immunfluoreszenzmikroskopie unter Stimulation mit Wnt5a und DKK-1

Die mittels β -Aktin-Immunfluoreszenzfärbung gefärbten Zellen wurden mikroskopisch betrachtet. Beurteilt wurden nur einzeln liegende, d.h. nicht im Zellverbund befindliche Zellen. Es wurden je Experiment zwanzig Einzelzellen ausgezählt und nach ihrer Form und ihrer Anzahl von Zellausläufern klassifiziert. In den Tabellen angegeben sind jeweils die Aufteilung der pro Versuch gezählten 20 Zellen in einzelne Untergruppen. Zur Einordnung in die morphologischen Gruppen wurden deutlich ausgebildete und von der Membran abgrenzbare Membranausläufer herangezogen. Hatten die Zellen mehr als fünf deutlich erkennbare Ausläufer, wurden sie der Kategorie mit vielen Zellausläufern zugerechnet. Besaßen die Zellen weniger oder genau fünf Ausläufer, wurden sie in die Kategorie mit wenigen Zellausläufern eingeordnet. Eine weitere Kategorie waren Zellen ohne jegliche Membranausläufer.

Bei der Beurteilung der Zellform insgesamt gab es die Gruppe der regelmäßig rund geformten Zellen. Zellen mit einer entrundeten, also eher unregelmäßigen Form wurden entsprechend in die Gruppe der unregelmäßig geformten Zellen eingeordnet. Alle Versuche mit anschließender Immunfluoreszenzfärbung wurden mindestens dreimal unter identischen Bedingungen durchgeführt. Zur Verdeutlichung der Verteilung der Zellen innerhalb der morphologischen Gruppen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen sollen die zugehörigen Diagramme mit Angabe von Mittelwert und Standardabweichung dienen. Siehe auch die beispielhaften Abbildungen 27, 28 und 29 zur morphologischen Einordnung:

Abb. 27 Runde MCF-7-Zelle ohne Ausläufer in β -Aktinfärbung

Abb. 28: Unregelmäßig geformte MCF-7-Zelle mit wenigen Ausläufern in β -Aktinfärbung

Abb. 29: Unregelmäßig geformte MCF-7-Zelle mit vielen Ausläufern in β -Aktinfärbung

3.3.1 Beurteilung des Aktinzytoskeletts auf Kunststoffuntergrund

Die Auswertung der durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen mit Phalloidin zur Anfärbung des β -Aktin innerhalb der Zellen und in der Membran erfolgte mittels der beschriebenen Einzelzellbetrachtung. Die Zellen wurden in je drei Versuchen mit 100ng/ml Medium Wnt5a und in drei Versuchen mit 50 ng DKK-1 je ml Medium für 1 h, 2 h und 4 h behandelt. Ausgeprägte morphologische Veränderungen der Zellen waren bereits nach einstündiger Stimulation mit Wnt5a fest zu stellen. Diese Veränderungen wurden mit zunehmender Stimulationsdauer nicht mehr signifikant ausgeprägter. In den folgenden Diagrammen sind die Auswertungen der morphologischen Veränderungen der Zellen nach einstündiger Stimulation dargestellt.

Abb. 30 und 31: MCF-7 Phalloidinfärbung des β -Aktin, Kontrolle, $n=3$

Abb. 32 und 33: MCF-7-Phalloidininfärbung des β -Aktin mit Zugabe von Wnt5a 100 ng/ml Medium nach 1 h, n=3

Abb. 34 und 35: MCF-7-Phalloidininfärbung des β -Aktin mit Zugabe von 50 ng/ml DKK-1 nach 1 h, n=3

Die folgenden mikroskopischen Abbildungen zeigen beispielhaft die morphologischen Veränderungen der Zellen unter Stimulation mit Wnt5a und DKK-1 nach einer Stunde, n=3.

Abb. 36 MCF-7-Kontrolle

Abb. 37 MCF-7 + Wnt5a 100 ng/ml

Abb. 38: MCF-7-Kontrolle

Abb. 39: MCF-7 + Wnt5a 100 ng/ml

Abb. 40: MCF-7 + DKK-1 50 ng/ml

Abb. 41: MCF-7 + DKK-1 50 ng/ml

3.3.2 Beurteilung des Aktinzytoskeletts auf ECM

Um zu untersuchen, ob sich die Zellmorphologie auf einem Untergrund aus extrazellulärer Matrix in anderer Form darstellt, als auf reinem Kunststoff- bzw. Glasuntergrund, wurden die Versuche mit Wnt5a und DKK-1 zum Vergleich auch auf mit ECM beschichteten Deckgläschen durchgeführt.

Dazu wurden die MCF-7-Zellen auf mit ECM beschichteten Deckgläschen ausgesät und dann jeweils für 1 h, 2 h und 4 h mit 100 ng/ml Wnt5a bzw. DKK-1 behandelt. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung des β -Aktin mit Phalloidin und die Betrachtung der Zellen unter dem Mikroskop.

Die Zellen der Kontrolle wiesen dabei morphologisch eine runde kompakte Form auf und besaßen keine bis wenige Zellausläufer. Die mit Wnt5a behandelten Zellen waren nach 1 h mit Wnt5a stark formverändert und wiesen zahlreiche Zellausläufer auf. Dieser Effekt war nach 2 h und 4 h Einwirkzeit des Wnt5a nicht mehr steigerbar.

Die mit DKK-1 behandelten Zellen auf ECM zeigten im Gegensatz zu den Vorexperimenten auf Glas starke morphologische Veränderungen, jedoch erst nach 4 h Inkubationszeit mit 100 ng/ml DKK-1. Die Zellform war unregelmäßig und langgezogen und die Tumorzellen besaßen zahlreiche und ausgeprägte Zellausläufer.

Auch die Färbungen auf ECM wurden mit der o.g. Zählmethode ausgewertet. Die folgenden Abbildungen stellen das Ergebnis dar. Alle Versuche mit anschließender Immunfluoreszenzfärbung wurden jeweils einmal durchgeführt.

Abb. 42 und 43 : MCF-7-Kontrolle auf ECM-Deckgläschen mit Phalloidin gefärbt

Abb. 44 und 45: MCF-7 auf ECM-Deckgläschen + Wnt5a 1 h

Abb. 46 und 47: MCF-7 auf ECM-Deckgläschen + DKK-1 4 h

Beispielhaft für die morphologischen Veränderungen sind folgende Abbildungen der MCF-7-Zellen auf ECM-beschichteten Deckgläschen:

Abb. 48: MCF-7-Kontrolle

Abb. 49: MCF-7 + Wnt5a 1 h

Abb. 50: MCF-7 + DKK-1 4 h

Während sich die mit rekombinantem Wnt5a behandelten Zellen und die Kontrolle auf ECM morphologisch vergleichbar zu den Versuchen auf Kunststoffuntergrund darstellten, fiel das Ergebnis der über vier Stunden mit rekombinantem DKK-1 stimulierten MCF-7 auf ECM anders aus als auf Kunststoffuntergrund. Auf ECM entwickelten die Tumorzellen viele Membranausläufer und wiesen eine unregelmäßige Zellform auf, vergleichbar mit den Tumorzellen, die unter Stimulation mit Wnt5a standen. Demnach wird die Wirkung von DKK-1 offenbar durch die extrazelluläre Matrix beeinflusst. Daraus lässt sich schließen, dass DKK-1 auf unphysiologischem Kunststoffuntergrund die Zytoskelettorganisation nicht verändert, im physiologischen Milieu auf ECM hingegen eher aktivierend auf das Zytoskelett und seine Reorganisation wirkt.

3.4 Beurteilung des β -Catenin in der Immunfluoreszenzfärbung unter Stimulation mit rekombinantem Wnt5a und DKK-1

Die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung des β -Catenin erfolgte zur Überprüfung, über welchen Signalweg die Wirkung des Wnt5a und des DKK-1 erfolgt. Die Versuche wurden auf Kunststoffuntergrund unter den Bedingungen durchgeführt, wie bereits oben beschrieben. Es erfolgte die Zugabe von rekombinantem Wnt5a und alternativ DKK-1, jeweils 100 ng/ml Medium. Alle Versuche und die anschließende Anfärbung des β -Catenin erfolgten insgesamt dreimal unter identischen Bedingun-

gen. Die Auswertung der Zellen erfolgte hinsichtlich einer eventuellen Translokation des β -Catenin unter Stimulation. Die Zellkerne wurden zur besseren Abgrenzung mit DAPI angefärbt.

Die folgenden Abbildungen der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen stellen beispielhaft die Ergebnisse aus diesen Versuchen dar.

Abb. 51: MCF-7-Kontrolle

Abb. 52: MCF-7 + Wnt5a 100 ng/ml

Abb. 53: MCF-7 + DKK-1 50 ng/ml

Eine Translokation des zytosolischen β -Catenin von der Zellmembran zum Zellkern lässt sich weder unter Wnt5a-Stimulation, noch unter DKK-1 beobachten. Damit scheint die Beteiligung des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges bei der beobachteten migrationssteigernden Wirkung des Wnt5a und des DKK-1 weitgehend ausgeschlossen.

3.5 Beurteilung des Rho-A in der Immunfluoreszenzfärbung unter Stimulation mit rekombinantem Wnt5a und DKK-1 auf Kunststoffuntergrund

Rho-A ist ein sehr schnell reagierendes Protein in der c-jun-terminalen Kinase-Signalkette, wo es in seiner aktivierten Form eine wichtige Rolle bei der Aktin-Polymerisation spielt und zu gesteigerter Motilität führt. Daher soll dieses Protein und eventuelle Veränderungen seiner Lokalisation, die durch Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Weges über JNK zu erwarten wären, in den Tumorzellen unter Stimulation mit rekombinantem Wnt5a und DKK-1 beobachtet werden. Aufgrund seiner raschen Reaktion erfolgten die Versuche in kurzen Zeitabständen von zwei, fünf und zehn Minuten. Dargestellt werden im Folgenden beispielhafte Abbildungen zu den Versuchsergebnissen aus insgesamt drei unter identischen Bedingungen durchgeführten Experimenten. Die Zellkerne wurden zur besseren Abgrenzung mit DAPI angefärbt.

Abb. 54 und 55: MCF-7-Kontrolle Rho-A, n=3

In der Kontrolle ist Rho-A im Zytosol nur schwach angefärbt und liegt dort diffus verteilt vor. Im Bereich des Zellkerns sieht man rundliche und dichte Ansammlungen von Rho-A.

Abb. 56 und 57: MCF-7 Rho-A + Wnt5a 2 Minuten, n=3

Nach zwei Minuten unter Stimulation mit Wnt5a scheint Rho-A deutlich stärker angefärbt, zudem ist neben einer auffälligen Akkumulation runder Rho-A-Konglomerate im Zellkern eine zunehmende Rho-A-Anfärbung im Bereich der Zellmembran erkennbar.

Abb. 58 und 59: MCF-7 Rho-A + Wnt5a 10 Minuten, n=3

Nach zehnminütiger Einwirkzeit des rekombinanten Wnt5a kann man eine Translokation des Rho-A in die äußeren Bereiche des Zytoplasmas entlang der Zellmembran beobachten (siehe Pfeile). Die Zellmembran wirkt unregelmäßig mit kleinen Ausstülpungen. Das im Zellkern liegende Rho-A ist weiterhin in dichten runden Strukturen organisiert.

Abb. 60 und 61: MCF-7 Rho-A + Wnt5a 15 Minuten

Nach 15 Minuten dauernder Stimulation mit Wnt5a sieht man keine weitere Steigerung des Effektes mehr. Vielmehr zeigt das Rho-A bereits eine Rückverlagerung vom Membranbereich ins Zytosol und in Richtung Zellkern. Die Beobachtung der Wnt5a-Effekte war in Langzeitversuchen mit ein-, zwei- und vierstündiger Stimulation nicht

zu beobachten, so dass von einer kurzfristigen Rho-A-Aktivierung mit Translokation durch Wnt5a ausgegangen werden muss.

Abb. 62 und 63: MCF-7 Rho-A + DKK-1 nach 1 h

Da während der Stimulation mit rekombinantem DKK-1 im zeitlichen Verlauf von einer, zwei, zehn und fünfzehn Minuten keine Veränderungen des Rho-A in den Tumorzellen zu beobachten waren, wurde die Inkubationszeit weiter verlängert. Nach schließlich vier Stunden waren Veränderungen sichtbar. Die rundlich dichten Rho-A-Konglomerate, die zuvor im Zellkern lagen, waren nach vier Stunden nicht mehr nachweisbar, die Verteilung des Rho-A im Zytoplasma war hingegen unverändert zur Kontrolle. Demnach bewirkt DKK-1 scheinbar einen Verlust/Abbau von Rho-A.

Aufgrund der bereits zuvor aufgezeigten unterschiedlichen Wirkungen von DKK-1 auf die Morphologie und die migratorische Aktivität von Tumorzellen in Abhängigkeit vom Untergrund, mussten hier vergleichende Experimente auf ECM erfolgen.

3.6 Zusammenfassung der Beobachtungen aus den Migrationsversuchen, den Scratch-Assays und der Morphologie unter Einwirkung von Wnt5a und DKK-1

Die Stimulationen der Tumorzellen aus der wenig invasiven MCF-7-Linie mit Wnt5a in seiner rekombinanten Form und auch durch von Wnt5a-Fibroblasten sezerniertes Protein zeigten unabhängig vom Untergrund eine deutliche Steigerung der migratorischen Aktivität der Tumorzellen. Auf Kunststoffuntergrund wurde dabei jedoch eher ein vermehrtes Auftreten von Einzelzellen beobachtet, die sich aus dem Tumorzell-

verband gelöst haben, um in den artifiziellen Wundbereich zu migrieren. Auf ECM stellte sich die gesteigerte Migration der MCF-7-Zellen durch ein flächiges Wandern der Tumorzellen in mehrschichtigem Aufbau dar. Dieses ließ sich durch die gleichzeitige Gabe des als Wnt-Antagonisten beschriebenen DKK-1-Proteins nur ganz geringfügig vermindern. Wnt5a bewirkt demnach eine stärkere Migrationsaktivität der Tumorzelllinie MCF-7, die sich durch die gleichzeitige fluoreszenzmikroskopische Beurteilung des Aktinzytoskeletts verifizieren ließ. Die morphologisch deutlich erkennbare Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts erfolgt scheinbar über eine Aktivierung des Rho-A durch den c-jun-terminale Kinase-Signalweg, wie es die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen des Rho-A nahelegen. Die Untersuchungen zum β -Catenin, das, wie die Experimente zeigen konnten, durch Wnt5a nicht verändert wird, belegen, dass der kanonische Wnt-Signalweg dabei nicht beteiligt ist.

Sehr eindrücklich waren die Ergebnisse des als Wnt-Antagonist bekannten Proteins DKK-1. In Abhängigkeit vom jeweiligen Untergrund fielen diese unterschiedlich aus. Auf Kunststoffuntergrund zeigte DKK-1 eine hemmende Wirkung auf die Tumorzellmigration. Sowohl der Wundverschluss im konventionellen Scratch-Assay als auch Beobachtungen zur Zellmorphologie mittels Immunfluoreszenzfärbung auf Kunststoffuntergrund zeigten runde kompakte Zellen mit fehlendem fibrillär organisiertem Aktin. Auf ECM-Untergrund wiesen die Tumorzellen hingegen eine ähnlich stark ausgeprägte Migrationsaktivität auf, wie unter Wnt5a-Stimulation. Auch die Immunfluoreszenzfärbungen der auf ECM ausgesäten Tumorzellen wiesen mit organisierten Aktinstrukturen und vermehrter Lamello- bzw. Filopodienbildung auf eine hohe migratorische Aktivität unter DKK-1-Stimulation hin. Das bedeutet, dass DKK-1 eine gegensätzliche Wirkung im Wnt-Signalweg haben kann, abhängig von der jeweiligen Mikroumgebung.

4. Diskussion

4.1 Bedeutung von Wnt5a bei der Tumorzellinvasion und Migration

In der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Wnt5a, ein Mitglied der Wnt-Familie, die Invasivität von gering invasiven Mamma-Karzinomzelllinien steigert. Wnt5a konnte in tumorassoziierten Makrophagen nachgewiesen werden (Pukrop et al. 2006). DKK-1 hingegen inhibierte die invasionssteigernde Wirkung von Wnt5a.

In zahlreichen Arbeiten zum Thema Tumordinvasion wurden bereits Migrationsassays durchgeführt, um Rückschlüsse auf die ablaufenden Regulationsmechanismen ziehen zu können. Inhalt dieser Arbeit war es, gezielt das Migrationsverhalten der Tumorzellen als Teilaspekt der Invasion auf extrazellulärer Matrix zu untersuchen. Eventuelle Unterschiede zu Beobachtungen und Ergebnissen auf konventionellem Untergrund sollten herausgearbeitet werden, da die neuen Migrationsassays eher den physiologischen Bedingungen ähneln und besser auf die in-vivo- Situation übertragbar sind.

4.1.1 Wnt5a steigert die Migrationsaktivität der Mamma-Karzinomzelllinie MCF-7

In den konventionellen „Wundheilungs“-Tests (Scratch-Assays) auf Kunststoffuntergrund wurde unter Stimulation mit rekombinantem Wnt5a eine verstärkte Migration der Tumorzellen in den Wundspalt beobachtet. Im Vergleich zur Kontrolle, die ein flächiges Aufeinander-Zu-Bewegen der Wundränder zeigt, kam es unter Gabe von Wnt5a zu einem vermehrten Auftreten einzelner Tumorzellen, die sich vom Wundrand gelöst haben und in den Wundbereich migriert sind. In den Migrationsversuchen mit dem neuen Versuchsmodell auf ECM war unter Stimulation mit Wnt5a im Vergleich zur Kontrolle eine etwa doppelt so stark ausgeprägte migratorische Aktivität mit mehrschichtiger Tumorzellinvasion der ECM-Schicht zu beobachten. Dieses zeigte sich reproduzierbar sowohl unter Stimulation mit rekombinantem Wnt5a als auch in speziellen Co-Kulturmodellen auf ECM mit Wnt5a exprimierenden 3T3-NIH-Fibroblasten.

Verifiziert wurden diese Beobachtungen durch die Immunfluoreszenzfärbungen des Aktinzytoskeletts der MCF-7-Zellen unter Stimulation mit Wnt5a. Es war nach Stimulation der Tumorzellen mit Wnt5a ein organisiertes Zytoskelett mit bis in die vermehrt entstandenen Membranausläufer reichenden Aktinfilamenten nachweisbar, was als morphologisches Kriterium verstärkter migratorischer Aktivität interpretiert wurde. Diese Veränderung war bei den auf Kunststoffuntergrund ausgesäten Tumorzellen ebenso ausgeprägt wie bei den auf ECM ausgesäten Tumorzellen. Demnach scheint der Untergrund für die intrazellulären Veränderungen der Tumorzellen unter Wnt5a-Stimulation keinen Unterschied zu bewirken, das Migrationsverhalten ist jedoch nach den Versuchsergebnissen, abhängig von der Mikroumgebung.

Die Färbung des Proteins Rho-A, dass eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Aktinzytoskeletts spielt (Hall 2005), ergab unter Wnt5a-Stimulation eine Translokation des Rho-A im Zytoplasma vom Zellkern hin zu den Bereichen der Zellmembran. Das spricht für die Aktivierung des nicht-kanonischen JNK-Signalweges durch Wnt5a mit Translokation des Rho-A und anschließender verstärkter Aktinzytoskelettorganisation und Migration. Dieses Ergebnis passt zu einer früheren Veröffentlichung der Arbeitsgruppe, bei der eine Steigerung der Invasivität von MCF-7-Tumorzellen durch Wnt5a-Stimulation beobachtet wurde mit paralleler Konzentrationserhöhung des c-jun (Pukrop et al. 2006). Dieses war durch Zugabe des Wnt-Antagonisten DKK-1 inhibierbar. Gleichzeitig wurde β -Catenin und auch die PKC untersucht. Ihre intrazelluläre Lokalisation bzw. Konzentration und Phosphorylierung veränderten sich unter Wnt5a und DKK-1 nicht, was für die ausschließliche Aktivierung des JNK-Signalweges durch Wnt5a bei Invasion und Migration spricht.

4.1.2 Bisherige Erkenntnisse zu Wnt5a und Migration

Auch in früheren Untersuchungen zur Wirkung von Wnt5a auf Mamma-Karzinomzellen konnte eine invasionssteigernde Wirkung gezeigt werden (Pukrop et al. 2006). Diese Versuchsergebnisse sprechen dafür, dass die durch Wnt5a bewirkte Steigerung der Invasion auch auf einer größeren Migrationsfähigkeit beruhen könnte und diese beiden Prozesse zusammenhängen.

Innerhalb der Arbeitsgruppe erhobene Daten in durchgeführten Migrationstests mit der Brustkrebszelllinie SK-BR-3 haben unter Stimulation der Tumorzellen mit Wnt5a ebenfalls eine gesteigerte Migration der Tumorzellen gezeigt und unterstützen somit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Neuere Studien haben sich verstärkt mit dem Migrationsverhalten von Tumorzellen unter dem Einfluss von Wnt5a beschäftigt. Bei Magen-Karzinomen wurde eine starke Korrelation zwischen Aggressivität des Tumors und Vorliegen von Wnt5a beschrieben. Auch dort wurde eine stimulierende Wirkung des Wnt5a auf die Zellmigration und Invasion beobachtet (Kurayoshi et al. 2006).

Untersuchungen an Melanomen zeigten eine Motilitätssteigerung der Tumorzellen durch Wnt5a via Inhibition Metastasen-supprimierender Faktoren (Dissanayake et al. 2007). In diesen Zellen mesenchymalen Ursprungs war allerdings der PKC-Signalweg entscheidend, was darauf hindeutet, dass Wnt5a-getriggertes Signaling vom zellulären Kontext abhängig ist.

4.1.3 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Insgesamt scheinen die genauen Auswirkungen des Wnt5a im Rahmen von Tumorerkrankungen trotz zahlreicher Untersuchungen noch unklar. Die vorliegende Arbeit belegt, wie zahlreiche Studien zuvor, eine progressionsfördernde Wirkung des Wnt5a durch Steigerung der Invasion und Migration. Die Zusammenhänge in den einzelnen Signalkaskaden und das Zusammenspiel der beteiligten Rezeptoren sowie verschiedener äußerer Einflüsse sind derart komplex, dass künftig noch viele Untersuchungen zur weiteren Klärung notwendig sein werden. So könnten beispielsweise weitere Migrationstests auf ECM bei gleichzeitiger Co-Kultivierung mit stromalen Zellen wie Makrophagen erfolgen, um eine weitere Annäherung an das physiologische Tumormikromilieu zu erreichen und auch die Wirkung dieser Zellen auf das Migrationsverhalten zu untersuchen.

4.2 Gerichtete Migration von Tumorzellen durch Wnt5a

4.2.1 Wnt5a wirkt direktional auf die MCF-7-Tumorzellen

In den Migrationsversuchen auf ECM zeigte sich bei der Co-Kultivierung der MCF-7-Tumorzellen mit Wnt5a-exprimierenden 3T3-Fibroblasten tendenziell das Phänomen der gerichteten Migration der Tumorzellen zu der feststehenden Wnt5a-Quelle hin. Das deutet darauf hin, dass Wnt5a neben einer migrations- und invasionssteigernden Wirkung auf Zellen auch eine direkte Wirkung besitzt.

4.2.2 Bisherige Erkenntnisse zu gerichteter Migration in Zusammenhang mit Wnt5a

Dass Wnt5a und seine Signalwege die differenzierte Ausbildung von Zellen und Geweben regulieren, wurde bereits in früheren Studien gezeigt. Neben der Ausbildung des Achsenskeletts und der Proliferationsförderung embryonaler Progenitorzellen wird auch die anschließende gerichtete Migration dieser Zellen in die Körperperipherie bei Vertebraten durch Wnt5a gefördert. Eine Funktionsverlust-induzierende Mutation des Wnt5a führte zu mangelhafter Ausbildung von Fingern, Ohren, Genitalien und Gesicht (Yamaguchi et al. 1999).

Studien zur Untersuchung einer möglichen direkten Wirkung von Wnt5a auf Tumorzellen lagen bislang nicht vor. Zur Sicherung und weiteren Abklärung des hier beobachteten Wnt5a-Effektes bietet sich das neu entwickelte Migrationsmodell auf ECM an, um die direkte Migration in unterschiedlichen Kontexten (Co-Kultivierungen mit Makrophagen, rekombinantem Wnt5a in feststehenden Einsatz) und unterschiedlichem Untergrund zu erforschen. Insbesondere Makrophagen spielen als stromale Zellen mit ihrer Expression von Wnt5a eine wichtige Rolle, was sich in diversen Untersuchungen bereits gezeigt hat. Im Rahmen einer Untersuchung zur Aktivierung des APC- β -Catenin-Signalweges wurden normale Gewebeschnitte, adenomatöse und maligne kolorektale Gewebeschnitte auf die Konzentration von Wnt-Genen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass in den malignen Geweben Wnt2 und Wnt5a signifikant hochreguliert waren und dass diese Überexpression vor allem

im Grenzbereich zwischen Tumorstroma und Lamina propria nachweisbar war. Mittels einer zusätzlich durchgeführten CD68-Färbung konnten die Wnt2 und Wnt5a exprimierenden Zellen als Makrophagen identifiziert werden (Smith et al. 1999). In einer früheren Studie dieser Arbeitsgruppe (Hagemann et al. 2004) wurde bereits gezeigt, dass die Co-Kultur von Makrophagen mit niedrigmalignen Brustkrebszellen deren Invasivität über die Hochregulation von MMP-2, -3, -7, und -9, und die damit verbundene Freisetzung von TNF- α steigert. Es wird vermutet, dass MMP-7 die Abspaltung von TNF- α aus seiner membrangebundenen Form induziert. MMP-7 ist ein Zielgen des Wnt-Signalings. Neben TNF- α ist auch die Beteiligung weiterer Chemokine, wie z.B. Interleukin-10 (IL-10) denkbar, welches ebenfalls von tumorassoziierten Makrophagen gebildet wird. Daher sollte die Untersuchung der directionalen Migration von Tumorzellen auch im Zusammenhang mit Makrophagen erfolgen.

4.3 Bedeutung von DKK-1 bei der Tumorzellinvasion und Migration

4.3.1 DKK-1 wirkt abhängig vom Untergrund hemmend oder steigernd auf die Tumorzellmigration

In den konventionellen Wundheilungsversuchen (Scratch-Assays) auf Kunststoffuntergrund hat das Protein DKK-1 eine hemmende Wirkung auf die Zellmigration. Im Vergleich zur Kontrolle näherten sich die Wundränder langsamer einander an und die bei Wnt5a beobachtete verstärkte Einzelzellmigration blieb unter DKK-1 aus. Da DKK-1 ein Wnt-Inhibitor ist, erscheint dies nicht überraschend. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich auch in den morphologischen Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz. Unter der Wirkung von DKK-1 war die Zellform rund und kompakt mit vermehrter Bildung von Adhäsionen zu großen Zellverbänden, was die Kontrolle in geringerem Maße aufwies. Das β -Aktin lag weitgehend unstrukturiert im Zytosol. In den Rho-A-Färbungen waren die in der Kontrolle nachweisbaren Rho-A-Bündel im Zellkern nach einstündiger Einwirkzeit von DKK-1 nicht mehr nachweisbar, was für eine Migrationshemmung durch DKK-1 über den JNK-Signalweg mit Deaktivierung von Rho-A sprechen könnte. Die Zahl der hierzu durchgeführten Färbungen war jedoch zu gering, um daraus wegweisende Schlüsse zu ziehen.

In den Versuchen auf ECM stellte sich die Wirkung von DKK-1 genau gegenteilig dar. In den Migrationsversuchen bewirkte die Zugabe von DKK-1 überraschenderweise eine Steigerung der Zellmigration vergleichbar mit der Wirkung von Wnt5a. Unter DKK-1 wanderte das Epithel jedoch eher planar in einer einzelnen Schicht, während unter Wnt5a eine mehrschichtige Migration in die ECM (Invasion) erfolgte. Diese erhöhte Migrationsaktivität der Tumorzellen unter DKK-1 auf ECM spiegelte sich auch in den Immunfluoreszenzfärbungen wider. Die Tumorzellen hatten unter der DKK-1-Behandlung zahlreiche Membranausläufer ausgebildet mit bis in die äußersten Membranbereiche organisierten Aktinfilamenten bei insgesamt länglich-unregelmäßiger Zellform. Auch dies war vergleichbar mit den Zellen unter Wnt5a-Behandlung. Es ist also wahrscheinlich, dass das Protein DKK-1, abhängig vom Untergrund, unterschiedliche Auswirkungen auf die Zellmigration hat. Auf physiologischem Boden wie der ECM steigert es die Migration von Zellen, auf Kunststoff und Glas hält es die Zellen verstärkt im Verband und hemmt ihre Wanderungsaktivität.

4.3.2 Bisherige Erkenntnisse zu DKK-1 und Migration

In der Literatur ist im Zusammenhang mit Migration nur sehr wenig über DKK-1 zu finden. Es wird vor allem als Inhibitor des kanonischen Wnt-Weges beschrieben, da es an den LRP5/6-Rezeptor bindet und die Bildung des Co-Rezeptorkomplexes zwischen Frizzled und LRP5/6 verhindert, die nach Anlagerung von Wnt an den Frizzled-Rezeptor erst die Aktivierung der Signalwege über das Protein Dishevelled ermöglicht (Semenov et al. 2001, Mao et al. 2001, Ai et al. 2005). Eine andere diskutierte Theorie zur inhibitorischen Wirkung des DKK-1 ist, dass es mit bestimmten Transmembranproteinen namens Kremen (Krm) 1 und 2 synergistisch die Internalisierung von LRP6 weg von der Zelloberfläche bewirkt und auf diese Weise die Wnt-Signalwegaktivierung durch den Frizzled- und LRP6-Co-Rezeptorkomplex verhindert (Mao et al. 2002).

DKK-1 hat wichtige Funktionen im Rahmen der Embryonalentwicklung, z.B. bei der Entwicklung des Kopfes, wie es in *Xenopus* nachgewiesen werden konnte (Glinka et al. 1998). In gezielten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass DKK-1 die invasionssteigernde Wirkung von Wnt5a auf Zellen inhibieren kann (Pukrop et al. 2006). Darüber hinaus wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass DKK-1 im Rahmen maligner Prozesse in vermindertem Umfang exprimiert wird (Kuphal et al. 2006) bzw. transkriptionell inaktiviert wird (Aguilera et al. 2006). In einer Studie zu Hepatoblastomen und Wilms-Tumoren wurde dagegen eine Überexpression von DKK-1 festgestellt (Wirths et al. 2003). Dabei vermutet man einen Feedback-Mechanismus durch die gesteigerte Wnt-Aktivität in den Tumoren, die offenbar auch eine kompensatorisch gesteigerte Synthese des Wnt-Antagonisten bewirkt. Insgesamt wird DKK-1 über den Wnt-inhibitorischen Effekt bislang eine tumorsupprimierende Wirkung zugeschrieben.

4.3.3 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Migrationstests auf extrazellulärer Matrix bewirkte die Zugabe von rekombinantem DKK-1-Protein unerwarteterweise eine fast genauso große Steigerung der Migrationsaktivität wie Wnt5a. Das war sowohl bei Zugabe der Einzelsubstanz DKK-1, als auch in Kombination mit Wnt5a, wo es dessen migrationssteigernde Wirkung offensichtlich nicht inhibierte, zu beobachten. Das zeigt, dass Invasion und Migration zwei verschiedene Mechanismen sind, die auf unterschiedliche Weise reguliert werden. Invasion beruht größtenteils auf der gesteigerten Induktion von Matrixmetalloproteasen, die Zielgene des Wnt-Signalweges darstellen und vermehrt transkribiert werden. Es wäre denkbar, dass dieser Effekt durch DKK-1 inhibiert wird. Die Wirkung des Wnt5a auf das Zytoskelett und dessen Reorganisation beruht hingegen auf einer Aktivierung des Planar-Cell-Polarity-Pfades, der nicht transkriptionsabhängig ist. Dies könnte möglicherweise die fehlende Hemmung durch DKK-1 erklären.

In einer Untersuchung zum Wnt3a und zu seinen Auswirkungen auf die Zellmotilität, konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von Rho-A den entscheidenden Schritt zur Aktinzytoskelett-Reorganisation darstellt, und dass dem Protein Dishevelled

dabei über seine Phosphorylierung durch das Wnt3a die regulatorische Aufgabe zukommt (Endo et al. 2004). Am Beispiel der mesenchymalen Zelllinie CHOC (Ovarzellen des chinesischen Hamsters) wurden Migrationsversuche auf Fibronectin durchgeführt und ganz ähnliche Beobachtungen zu Wnt3a und DKK-1 gemacht, wie im Rahmen dieser Arbeit zu Wnt5a und DKK-1. Auch dabei steigerten Wnt3a und DKK-1 die Migrationsaktivität der Zellen auf Fibronectin als physiologischen Untergrund und auch dort wurde gezeigt, dass der kanonische Wnt-Signalweg lediglich eine permissive Aufgabe hat. Bei Migration und morphologischer Anpassung der Zellen spielt er jedoch keine Rolle. Dieses wird über Rho-A und die c-jun-N-terminale Kinase (JNK) reguliert. Diese Beobachtungen wurden an einer benignen mesenchymalen Zelllinie gemacht, die per se migratorische Aktivität besitzt, während mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass Wnt5a und DKK-1 eine epitheliale und wenig invasive Brustkrebszelllinie auf physiologischem Untergrund zu gesteigerter Migration stimulieren.

Ein Beispiel für die physiologische Bedeutung der beobachteten Wirkung des Wnt5a und der unterschiedlichen vom Untergrund abhängigen Wirkungen des DKK-1 könnte der Wundheilungsprozess sein. In Forschungsarbeiten zum Thema Wundheilung konnte bewiesen werden, dass die Expression von Wnt5a im Gewebe zu Wundverschluss mit differenziertem Gewebe in den einzelnen Hautschichten führt, wie z.B. mit Epithelzellen, Haarfollikeln und Talgdrüsen, während ohne Wnt5a eine reine Defektheilung mit fibrösem Narbengewebe erfolgt. Beim Prozess der Wundheilung spielen vor allem die Aktivatoren des nicht-kanonischen Wnt-Weges Wnt4, Wnt5a und Wnt11 eine wichtige Rolle. Der β -Catenin-Signalweg wird während dessen nur transient und limitiert aktiviert und fördert die Ausreifung epithelialer Haarfollikel am Wundrand. Für die Tiefenheilung oder den oberflächlichen Epithelüberzug der Wunde spielt der β -Catenin-Signalweg jedoch keine Rolle (Fathke et al. 2006).

Von großem Interesse könnte die Klärung der Frage sein, ob der kanonische Wnt-Weg eine kontrollierte Inaktivierung während der Wundheilung durch DKK-1 erfährt, um einen differenzierten Gewebeaufbau aus der Tiefe bis an die Oberfläche unter Beteiligung von Wnt5a zu ermöglichen. Es ist denkbar, dass für die oberflächliche Epithelialisierung der Wunde DKK-1 sogar die entscheidende Weiche stellt, da im

Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass es auf physiologischem Untergrund die planare Gewebeexpansion und Migration epithelialer Zellen fördert, deren Invasion in tiefere Gewebeschichten aber verhindert, und daher höchstwahrscheinlich mit für einen strukturierten Gewebeaufbau verantwortlich ist.

In künftigen Untersuchungen gilt es zu klären, über welchen Signalweg das DKK-1-Protein die Migration steigert. Dazu sind im ersten Schritt Aktivierungsstudien des Rac1 mittels Immunpräzipitation geplant. Außerdem soll untersucht werden, welche Rolle der LRP-6-Rezeptor bei der Migrationssteigerung durch Wnt5a und DKK-1 spielt, indem Zellen transient mit LRP-6-dominant-negativen Konstrukten transfiziert und entsprechend in Migrationsversuchen auf extrazellulärer Matrix eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

Interaktionen zwischen Tumorzellen und den umliegenden Stromazellen spielen eine wichtige Rolle im Prozess der Tumorprogression. Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Co-Kultivierung von Brustkrebszelllinien mit Makrophagen durch die Induktion von Matrixmetalloproteasen und TNF- α zu gesteigerter Invasivität der Tumorzellen führt. Die Hochregulation von Wnt5a in den Makrophagen mit nachfolgender Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signalweges über die JNK ist für diesen Effekt ausschlaggebend.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, dass die invasionssteigernde Wirkung von Wnt5a mit dem Teilaspekt einer Steigerung der migratorischen Aktivität am Beispiel der sonst wenig invasiven Brustkrebszelllinie MCF-7, unabhängig vom Zelluntergrund, einhergeht. Dieses konnte sowohl anhand konventioneller „Wundheilungs“-Assays auf Kunststoffuntergrund als auch im neu entwickelten, den physiologischen Bedingungen besser angepassten Migrationsmodell auf extrazellulärer Matrix reproduzierbar bewiesen werden. Anhand standardisierter Messverfahren wurde sowohl nach Zugabe von rekombinantem Wnt5a als auch nach Co-Kultivierung mit Wnt5a-sezernierenden Fibroblasten eine Verdoppelung der migratorischen Aktivität der Tumorzellen mit Vordringen der Tumorzellen in tiefere Schichten der ECM beobachtet. Zudem konnte durch die Verwendung einer feststehenden Wnt5a-Quelle im neuen Migrationsassay auf extrazellulärer Matrix die gerichtete Migration der Tumorzellen entlang des Wnt5a-Gradienten beobachtet werden, was für eine direktionale Wirkung des Wnt5a im Rahmen migratorischer Prozesse spricht. Unterstützt wurden die Beobachtungen zum Migrationsverhalten durch den gleichzeitigen Nachweis morphologischer Veränderungen der mit Wnt5a behandelten Tumorzellen mittels Immunfluoreszenzfärbung des Zytoskeletts. Eine verstärkte Reorganisation des Aktinzytoskeletts mit Ausbildung von Membranausläufern unter begleitender Translokation des dafür verantwortlichen Rho-A vom Zellkern ins Zytosol spricht für eine Wnt5a-gesteuerte Aktivierung des JNK-Signalweges. Die Migration ist demnach ein Teilaspekt der Invasion und wie diese durch Wnt5a über nicht-kanonische Wnt-Signalwege steigerbar.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte neue Migrationsmodell auf extrazellulärer Matrix konnte im Gegensatz zu bislang angewandten Modellen auf Kunststoff deutliche Unterschiede im Migrationsverhalten der Zellen herausarbeiten. Exemplarisch hierfür ist die migrationssteigernde Wirkung von DKK-1 auf ECM im Gegensatz zur migrationshemmenden Wirkung auf Kunststoffuntergrund. Durch die größere Ähnlichkeit zu den physiologischen Bedingungen in vivo ist zudem eine Übertragung der hier an Tumorzellen gewonnenen Erkenntnisse auf physiologische Prozesse denkbar, die einen differenzierten Gewebeaufbau mit entsprechender Tiefenwirkung durch Wnt5a und kontrollierte oberflächliche Migrationsprozesse durch DKK-1 erfordern, wie zum Beispiel Wundheilungsprozesse. In entsprechenden Studien wurde bereits die Ermöglichung einer differenzierten Regeneration in den verschiedenen Wundschichten mit Ausbildung von Epithel, Haarfollikeln und Talgdrüsen durch Wnt5a über nicht-kanonische Signalwege herausgearbeitet. Die Rolle des DKK-1 könnte in der kontrollierten Hemmung des β -Catenin-Signalweges, der die Bildung von Haarfollikeln bei sonst reiner Defektheilung fördert, und der Aktivierung des abschließenden oberflächlichen Epithelverschlusses von den Wundrändern aus über gesteigerte Migration bestehen. Denkbar wäre demnach künftig zum Beispiel der gezielte therapeutische Einsatz von Wnt5a und DKK-1 bei schlecht heilenden, großflächig verletzten Hautarealen.

6. Literaturverzeichnis

- Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, García JM, Munoz A, Esteller M, González-Sancho JM (2006): Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist Dickkopf-1 (Dkk-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene*, 25, (29), 4116-4121
- Ai M, Holmen SL, van Hul W, Williams BO, Warman ML (2005): Reduced Affinity to and Inhibition by DKK1 Form a Common Mechanism by Which High Bone Mass-Associated Missense Mutations in LRP5 Affect Canonical Wnt Signaling. *Mol Cell Biol*, 25, (12), 4946-4955
- Bafico A, Gazit A, Liu G, Yaniv A, Aaronson AS (2001): Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol*, 3, 683-686.
- Bergstein I, Brown AMC: WNT genes and breast cancer. In: *Breast Cancer: Molecular genetics, Pathogenesis and Therapeutics*. Bowcock AM. Humana Press Inc., Totowa, USA, (1999), 181-198
- Birchmeier W, Brembeck FH, Rosário M (2006): Balancing cell adhesion and Wnt-signaling, the key role of β -Catenin. *Curr Opin Genet Dev*, 16, 51-59.
- Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M et al (2000): Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*, 406, 536-540
- Brown AMC (2001): Wnt-Signaling in breast cancer: have we come full circle? *Breast Cancer Res* 3, 351-355)

-
- Crawford HC, Matrisian, LM (1994): Tumor and stromal expression of matrix metalloproteinases and their role in tumor progression. *Invasion Metastasis*, 14, 234-245
- Dejmek J, Leandersson K, Manjer J, Bjartell SO, Vogel WF, Landberg G, Andersson T (2005A): Expression and Signaling Activity of Wnt-5a/Discoïdin Domain Receptor-1 and Expression and Signaling Activity of Wnt-5a/Discoïdin Domain Receptor-1 and Syk Plays Distinct But Decisive Roles in Breast Cancer Patient Survival. *Clin Cancer Res*, 11, 520-528
- Dejmek J, Jönsson M, J, Bendahl PO, Andersson T (2005B): Loss of Wnt-5a Protein Is Associated with Early Relapse in Invasive Ductal Breast Carcinomas. *Cancer Res*, 62, 409-416
- Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, French AD, Shah KV, Hewitt KJ, Rosenthal DT, Indig FE, Jiang Y, Nickoloff BJ, Taub D, Trent JM, Moon RT, Bittner M, Weeraratna AW (2007): The Wnt5A/Protein Kinase C Pathway Mediates Motility in Melanoma Cells via the Inhibition of Metastasis Suppressors and Initiation of an Epithelial to Mesenchymal Transition. *J Biol Chem*, 282, 17259-17271.
- Eastman Q, Grosschedl R (1999) Regulation of LEF-1/TCF transscription factors by wnt and other signals. *Cell Biol*, 11, 233-240
- Endo Y, Wolf V, Muraiso K, Kamijo K, Soon L, Üren A, Barshishat-Küpper M, Rubin JS (2004): Wnt-3a-dependent Cell Motility Involves RhoA Activation and Is Specifically Regulated by Dishevelled-2. *J Biol Chem*, 280, 777-786

-
- Fathke C, Wilson L, Shah K, Kim B, Hocking A, Moon R, Isik F (2006): Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. *BMC Cell Biol*, 7, (4), 1471-2121
- Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM (1990): MTT colorimetric Assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*, 131, 165-172
- 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
- Guizhong L, Bafico A, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA (2003): A Novel Mechanism for Wnt Activation of Canonical Signaling through the LRP6 Receptor. *Mol Cell Biol*, 23, (16), 5825–5835
- Hagemann T, Robinson S, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C (2004): Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- α dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*, 25, (8), 1543-1549
- Hall A (2005): Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans*, 33, (5), 891-895.
- Hibbs JB Jr. (1976): Role of activated macrophages in nonspecific resistance to neoplasia. *J Reticuloendothel Soc*, 20, (3), 223-231.
- Jönsson M, Andersson T (2001): Repression of Wnt-5a impairs DDR1 phosphorylation and modifies adhesion and migration of mammary cells. *J Cell Sci*, 114, 2043-2053

-
- Kühl M (2004): The Wnt/Calcium Pathway: Biochemical mediators, tools and future requirements. *Front Biosci*, 9, 967-974
- 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, (36), 5027-5036
- Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W, Kikuchi A (2006): Expression of Wnt-5a Is Correlated with Aggressiveness of Gastric Cancer by Stimulating Cell Migration and Invasion. *Cancer Res*, 66, (21), 10439-10448
- Lee AY, He B, You L, Dadfarmay S, Xu Z, Mazieres J, Mikami I, McCormick F, Jablons DM (2004): Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene* 23, 6672-6676
- Leek RD, Harris AL (2002): Tumor-Associated Macrophages in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7, (2), 177-189
- Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG (1991): Cancer Metastasis and Angiogenesis: An Imbalance of positive and negative Regulation. *Cell*, 64, 327-336
- 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, (4), 913-926
- Mantovani A (1994): Tumor-associated macrophages in Neoplastic Progression: A paradigm for the In Vivo Function of Chemokines. *Lab Invest*, 71, 5-16

- Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, and Ruco L (1992): The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 13, 265-270
- 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, (6835), 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/beta-catenin signalling. *Nature*, 417, (6889), 664-667
- Mikheev A, Mikheeva SA, Liu B, Cohen P, Zarbl H (2004): A functional genomics approach for the identification of putative tumor suppressor genes: Dickkopf-1 as suppressor of HeLa cell transformation. *Carcinogenesis*, 25, 47-59
- Miller JR (2002): The Wnts. *Genome Biol.*, 3, 1-15
- Moon R.T., Kohn A.D., De Ferrari G, Kaykas A (2005): Wnt and β -catenin-signaling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*, 5, 689-698
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immunol Methods*, 65, 55-63
- Niehrs C (2006): Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 25, 7469-7481

- Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford GMcMahon A, Moon R, Varmus H. (1991): A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*, 25; (2), 231
- Polakis P (2000): Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*, 14, 1837-1851.
- Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trümper L, Binder C (2006): Wnt5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, (14), 5454-5459
- Raftopoulou M, Hall A (2004): Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, 265, 23-32
- Ridley AJ, Hall A (1992): The small GTP-binding protein Rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibres in response to growth factors. *Cell*, 70, 389-399
- Robinson SC, Scott KA, Balkwill FR (2002): Chemokine Stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha. *Eur J Immunol*, 32, 404-412
- Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kühl M, Sokol S, He X (2001): Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol*, 11, (12), 951-961
- Smith K, Bui TD, Poulsom R, Kaklamanis L, Williams G, Harris AL (1999): Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *Br J Cancer*, 81, 496-502

- Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y (2003) Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent β -catenin degradation. *J Cell Biol* 162, (5), 899-908
- Wernert N (1997): The multiple roles of tumor stroma. *Virch Arch*, 430, 433-443
- Westermarck J, Kähäri VM (1999): Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*, 13, 781-792
- Wirths O, Waha A, Weggen S, Schirmacher P, Kuhne T, Goodyer CG, Albrecht S, Von Schweinitz D, Pietsch T (2003): Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wntless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest*, 38, 429-434
- Wong GT, Gavin BJ, McMahon AP (1994): Differential Transformation of Mammary Epithelial Cells by Wnt Genes. *Mol Cell Biol*, 14, 6278-6286
- Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S (1999): A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development*, 126, 1211-1223
- Zhuang L, Zhang Z, Guo Y, (1999): Aberrant expression of growth factor Wnt-5a in six Urinary malignant cell lines. *Chin Med J*, 112, (3), 251-255

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Claudia Binder für die Ermöglichung dieser Arbeit und die engagierte und stets motivierende Betreuung während der gesamten Zeit unserer Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Tobias Pukrop für seine ansteckende Begeisterung bei den vielen Diskussionen zum Thema Wnt5a und die daraus entstandenen neuen Anregungen für weitere Experimente.

Für die ständige Hilfsbereitschaft im Labor bei der Vorbereitung meiner Versuche und die praktischen Tipps bei der Durchführung danke ich ganz herzlich Herrn Matthias Schulz.

Besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinem Ehemann Carsten Schindler und meiner Familie, die mich nicht zuletzt durch geduldiges Korrektur-Lesen und durch Formulierungsvorschläge unterstützt haben.