

---

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

---

# **Einfluss von Mifamurtid auf die Makrophagen- induzierte Invasion von Brustkrebszellen**

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

vorgelegt von  
**Jonas Jautz**  
aus Freiburg im Breisgau

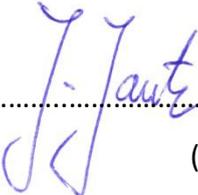
**Göttingen 2019**

Dekan: Prof. Dr. H. K. Kroemer  
Referent: Prof. Dr. T. Pukrop  
Ko-Referent: Prof. Dr. Holger Reichard  
Drittreferentin: Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 31.07.2019

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Der Einfluss von Mifamurtid auf die Makrophagen-induzierte Invasion von Brustkrebszellen“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 06.07.2019

  
.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Brustkrebs .....	1
1.2 Tumormetastasierung .....	3
1.3 Tumormikromilieu.....	6
1.3.1 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs).....	6
1.3.2 Die Rolle der Makrophagen bei der malignen Invasion und Metastasierung ....	8
1.4 Makrophagen als Therapieansatz .....	10
1.4.1 Stimulation der Makrophagen durch Mifamurtid .....	10
1.4.2 Molekularer Wirkungsmechanismus von Mifamurtid .....	12
1.4.2.1 <i>Toll-like</i> -Rezeptoren .....	12
1.4.2.2 Nod2-Rezeptor .....	16
1.5 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg .....	17
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	19
<b>2 Material</b> .....	<b>21</b>
2.1 Verwendete Zellmaterialien .....	21
2.1.1 Eukaryotische Zelllinien.....	21
2.1.2 Mausstämme.....	21
2.2 Zellkulturmedien und Zusätze .....	22
2.3 Verbrauchsmaterialien .....	23
2.4 Puffer und Lösungen .....	24
2.5 Chemikalien, Proteine und Größenstandards .....	26
2.6 Geräte.....	27
2.7 Oligonukleotide .....	28
<b>3 Methoden</b> .....	<b>29</b>
3.1 Zellbiologische Methoden .....	29
3.1.1 Zellkultur .....	29
3.1.2 Zellzahl-Bestimmung .....	29
3.1.3 Isolation von Monozyten aus dem Blut.....	29
3.1.4 Isolation von Knochenmarksmakrophagen aus der Maus .....	31
3.1.5 Isolation von Mikrogliazellen aus der Maus.....	31
3.2 Messung der Viabilität und Proliferation eukaryotischer Zellen.....	33
3.2.1 MTT-Assay .....	33
3.2.2 Proliferationsmessung mittels xCELLigence .....	34

3.3	Zell-Invasions-Assay in einer modifizierten Boyden-Kammer .....	35
3.4	Nachweis von Nitrit in Zellkulturüberständen .....	37
3.5	Genexpressionsanalysen .....	38
3.5.1	RNA-Isolation von eukaryotischen Zellen.....	38
3.5.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	38
3.5.3	Reverse Transkription .....	38
3.5.4	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR).....	39
3.5.4.1	Etablierung von Primern für die qRT-PCR .....	41
3.5.4.2	Visualisierung der qRT-PCR-Produkte auf Agarosegel.....	41
3.6	Statistik.....	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
4.1	Charakterisierung der TLR- und Nod2-Rezeptorexpression in Brustkrebszellen und Makrophagen .....	43
4.2	Die Rolle der Makrophagen bei der Invasion und Metastasierung von Brustkrebszellen .....	45
4.2.1	Toxizität von Mifamurtid gegenüber Brustkrebszellen und Makrophagen .....	45
4.2.2	Direkter Einfluss von Mifamurtid auf die Invasion von Brustkrebszellen .....	51
4.2.3	Einfluss von Mifamurtid auf die Makrophagen-induzierte Tumorinvasion von Brustkrebszellen .....	52
4.3	Makrophagenaktivierung nach Behandlung mit Mifamurtide.....	56
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>59</b>
5.1	Genexpression von Nod2 und TLRs in Makrophagen und Tumorzellen .....	59
5.2	Direkter Einfluss von Mifamurtid auf die Invasivität von Brustkrebszellen.....	62
5.3	Unterschiede MTP-PE und L-MTP-PE .....	64
5.4	Einfluss von Mifamurtid auf die Makrophagen-induzierte Invasivität von Brustkrebszellen .....	65
5.5	Verleich der Ergebnissen mit <i>in-vivo</i> -Therapiestudien von Mifamurtid bei Brustkrebs .....	67
5.6	Wirkung von Mifamurtid auf die MG-induzierte Tumorinvasion.....	70
5.7	Einfluss von Mifamurtid auf die NO-Sekretion von Makrophagen .....	71
5.8	Einfluss von Mifamurtid auf die VEGFa- und WNT5a-Expression von Makrophagen .....	74
<b>6</b>	<b>Fazit.....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>92</b>
8.1	Europäischer Öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) für Mepact® .....	92
8.2	Erkrankungs- und Sterberisiko für Brustkrebs in Deutschland.....	95

## Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Aktivator-Protein
BAFF	<i>B-cell activating factor for the TNF family</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
bidest.	Bidestilliertes Wasser
BMDM(s)	Knochenmarksmakrophagen
bp	Basenpaare
BRCA	<i>Breast-Cancer-Gen</i>
CARD(s)	<i>N-terminal caspase recruitment domain(s)</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CpG-DNA	<i>Cytosin-phosphatidyl-Guanin-DNA</i>
CREB	<i>cyclic AMP-responsive element-binding protein</i>
CSF-1-(R)	<i>Colony-stimulating factor-1-receptor</i>
ctl	Kontrolle
DC(s)	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(-R)	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	<i>Epithelial mesenchymal transition</i>
EPAR	<i>European Public Assessment Reports</i> (Europäischer Öffentlicher Beurteilungsbericht)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER-positiv	Östrogen-Rezeptor positiv
ERK	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
EtOH	Ethanol
FEP	<i>Fluorinated ethylene propylene</i>

---

GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
gm-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GNB2L1	<i>Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1</i>
GSK	<i>Glycogen synthase kinase</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HPRT1	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1</i>
hs	<i>Homo sapiens</i>
IFN(s)	Interferone
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B-Kinase</i>
IL	Interleukine
IRAK(s)	<i>IL-1-receptor-associated kinase(s)</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
JNK	<i>JUN-N-terminale kinase</i>
LLR	<i>Leucin rich repeats</i>
L-MDP	Liposomales MDP
LMP	<i>Latent membrane protein</i>
L-MTP-PE	Liposomales MTP-PE
LPS	Lipopolysaccharide
M $\Phi$	Humane Makrophagen des peripheren Bluts
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MD	<i>Myeloid differentiation factor</i>
MDP	Muramyl-dipeptid
MG	Mikroglia
MKK	<i>MAP-kinase kinase</i>
mm	<i>Mus musculus</i>
MMP(s)	Matrix-Metalloproteasen
mRNA	<i>Messenger RNA</i>

---

MTP-PE	Muramyltripeptid phosphatidylethanolamin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
NIK	<i>NF-<math>\kappa</math>B inducing kinase</i>
NK	Natürliche Killerzelle
NLR(s)	<i>Nod-like receptor(s)</i>
NO	Stickoxid
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
Nod	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein</i>
PAMP(s)	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PGD	Prostaglandin D
PGE	Prostaglandin E
PKC	<i>Protein kinase C</i>
RHD	<i>Rel-homology domain</i>
RICK	<i>RIP-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein kinase</i>
RIP	<i>Receptor-interacting protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SERM	Selektive-Östrogen-Rezeptor-Modulatoren
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA</i>
TAK	<i>TGF<math>\beta</math>-activated kinase</i>
TAM(s)	Tumor-assoziierte Makrophagen

TBK	<i>TANK-binding kinase</i>
TBP	<i>TATA-binding protein</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIR	<i>Toll-IL1-receptor</i>
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor protein</i>
TLR(s)	<i>Toll-like receptor(s)</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAF(s)	<i>TNF-receptor-associated factor(s)</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Metastasierungsschritte.....	4
Abb. 1.2: Makrophagenpolarisierung.....	8
Abb. 1.3: L-MTP-PE. ....	11
Abb. 1.4: Der TLR-Signalweg.....	15
Abb. 1.5: Der NF- $\kappa$ B-Signalweg.....	18
Abb. 3.1: MTT-Reaktion.....	33
Abb. 3.2: Modifizierte Boyden-Kammer.....	36
Abb. 4.1: TLR- und Nod2-Genexpression in Tumorzelllinien und M $\Phi$ .....	44
Abb. 4.2: Stoffwechselaktivität der Tumorzelllinien.....	46
Abb. 4.3: xCELLigence-Messung der Tumorzelllinien während der Behandlung mit MTP-PE.....	48
Abb. 4.4: Stoffwechselaktivität der Makrophagen.....	49
Abb. 4.5: xCELLigence-Messung von Makrophagen während der Behandlung mit MTP-PE. ....	50
Abb. 4.6: Invasion von MDA-MB-231 nach Behandlung mit MTP-PE.....	51
Abb. 4.7: Makrophagen-induzierte Invasion von MCF-7 nach Behandlung mit MTP-PE. ....	53
Abb. 4.8: MG-induzierte Invasion von MCF-7 nach Behandlung mit L-MTP-PE. ....	54
Abb. 4.9: MG-induzierte Invasion von E0771LG (A) und 410.4 (B) nach Behandlung mit L-MTP-PE. ..	55
Abb. 4.10: Aktivierung von Makrophagen nach Behandlung mit MTP-PE. ....	58

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Eukaryotische Zelllinien .....	21
Tab. 2.2: Zellkulturmedien und Zusätze .....	22
Tab. 2.3: BMDM-Medien .....	23
Tab. 2.4: Verbrauchsmaterialien .....	23
Tab. 2.5: Puffer und Lösungen.....	24
Tab. 2.6: Lösungen bei der Monozytenisolation .....	25
Tab. 2.7: Chemikalien, Proteine und Größenstandards.....	26
Tab. 2.8: Geräte .....	27
Tab. 2.9: Oligonukleotide .....	28
Tab. 3.1: Für die reverse Transkription.....	38
Tab. 3.2: Standard qRT-PCR-Protokoll .....	40
Tab. 3.3: <i>SYBR-Green</i> -Mastermix.....	40
Tab. 3.4: PCR-Reaktionsmix .....	40
Tab. 8.1: Erkrankungs- und Sterberisiko für Brustkrebs in Deutschland .....	95

# 1 Einleitung

## 1.1 Brustkrebs

Brustkrebs (Mammakarzinom) ist weltweit mit Abstand die häufigste maligne Erkrankung der Frau. In Deutschland beträgt das Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu erkranken 12,9 %, so dass hierzulande jährlich ca. 70.000 Neuerkrankungen diagnostiziert werden (Robert Koch Institut 2013). Dabei ist jede vierte Frau jünger als 55 Jahre und jede zehnte Frau sogar jünger als 45 Jahre, womit Brustkrebs im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen auch in relativ jungem Alter häufig auftritt. Bei 6 % - 10 % der Frauen, die sich erstmals klinisch vorstellen, finden sich bereits Metastasen in Knochen, Lunge, Leber oder Gehirn (Cardoso *et al.* 2010).

Mammakarzinome lassen sich histologisch klassifizieren. Dabei wird anhand ihres Ursprungsgewebes zwischen duktalem und lobulären Tumoren unterschieden. Duktales Karzinome gehen von den Milchgangepithelien aus, während der Ursprungsort der lobulären Tumoren in den Drüsenläppchen liegt (Müller *et al.* 2014). Des Weiteren lassen sich die Mammakarzinome anhand ihres Genexpressionsprofils immunhistochemisch in verschiedene Subtypen unterteilen. Das Tumorexpressionsprofil spielt neben der Tumorphistologie und dem Metastasierungsgrad eine zentrale Rolle für die Prognose und den möglichen Therapieerfolg (Sorlie *et al.* 2001). Demnach wird immunhistochemisch zwischen folgenden Subtypen unterschieden:

- Östrogen- und Progesteron-Rezeptor-positiv
- HER2/neu (*Human epidermal growth factor receptor 2*)-, auch c-erb-B2-Rezeptor-positiv
- Triple-negativ = Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptor-negativ

Die Subtypen unterscheiden sich in ihrer Aggressivität, ihrem Krankheitsverlauf sowie der Therapieantwort. So zeichnet sich der Hormonrezeptor-positive Subtyp durch einen eher weniger aggressiven Krankheitsverlauf und ein längeres beschwerdefreies/symptomfreies Intervall aus (Dunnwald *et al.* 2007; Guarneri und Conte 2009). Bei allen Patienten mit positivem Östrogen-Rezeptorstatus ist, unabhängig von der Chemotherapie, eine antihormonelle Therapie je nach menopausalem Status, z. B. mit Tamoxifen aus der Gruppe

der Selektiven-Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) oder einem Aromatasehemmer indiziert (Senkus *et al.* 2013).

Sowohl der triple-negative als auch der HER2/neu-positive Brustkrebs sind aggressive Subtypen, die eine höhere Inzidenz an Viszeral- und Hirnmetastasen aufweisen. HER2/neu ist ein transmembraner Tyrosinkinase-Rezeptor der zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) gehört. Eine Überexpression von HER2/neu findet sich in 25 % - 30 % aller Patienten mit Brustkrebs (Slamon *et al.* 1989). Bei den HER2/neu-positiven Tumoren hat die Entwicklung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab wesentlich zur Verbesserung der Prognose beigetragen (Dawood *et al.* 2010). Trastuzumab bindet an den HER2/neu-Rezeptor, wodurch es zu einer Hemmung der intrazellulären Signalweiterleitung kommt (Albanell *et al.* 1996). Dies resultiert zum einen in der Hemmung der Proliferation und zum anderen in der Zellapoptose (Valabrega *et al.* 2007). Triple-negative Tumoren finden sich vor allem bei jüngeren Patienten und sind mit häufigen Rezidiven und einer schlechten Prognose verbunden (Dunnwald *et al.* 2007; Guarneri und Conte 2009).

In den letzten Jahren wurden die Therapiemöglichkeiten ständig weiterentwickelt und optimiert. Dennoch kommt es bei 25 % - 40 % der Patienten, bei denen Brustkrebs im Frühstadium diagnostiziert wurde, im Krankheitsverlauf zur Metastasierung und somit zur Ausbreitung des Tumors (Guarneri und Conte 2009).

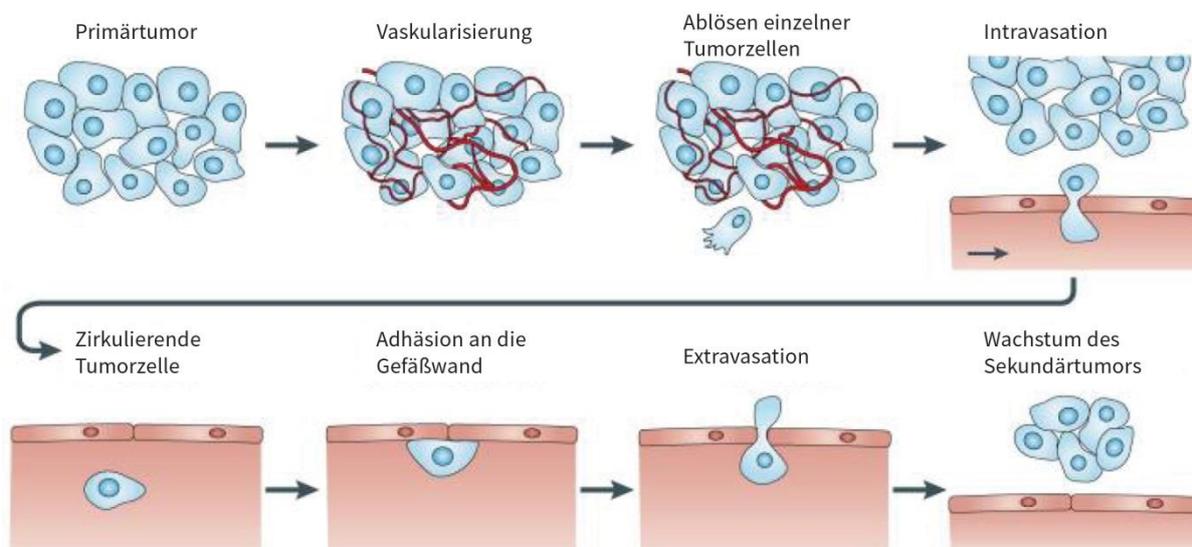
## 1.2 Tumormetastasierung

Als Metastasierung wird der komplexe, mehrschrittige Prozess der Tumorausbreitung vom Ursprungsherd (dem Primärtumor) hin zur Bildung eines oder mehrerer Sekundärtumoren bezeichnet. Dabei können sich die Tumorzellen über verschiedene Wege ausbreiten, wie zum Beispiel über den Lymph- oder Blutweg. Generell sind Metastasen in 90 % der Fälle die Todesursache bei Krebspatienten mit soliden Tumorerkrankungen (Nguyen und Massague 2007).

Der Tumormetastasierung gehen im Allgemeinen die progressive Proliferation und die Vaskularisierung des Primärtumors voraus. Durch genetische Transformation und Aktivierung verschiedener komplexer Signalwege wird anschließend die Metastasierungskaskade eingeleitet, die sich aus mehreren Schritten zusammensetzt (Wirtz *et al.* 2011).

Im ersten Schritt kommt es durch reduzierte interzelluläre Adhäsion und morphologische Veränderungen zum Ablösen einzelner maligner Tumorzellen vom Primärtumor (Wirtz *et al.* 2011). Mit Hilfe von Matrixmetalloproteasen (MMPs) erfolgt bei epithelialen Tumoren wie Brustkrebs anschließend die Invasion der Basalmembran (Hotary *et al.* 2006). Durch die Interaktion mit der extrazellulären Matrix (ECM) und der Ausbildung von Pseudopoden wird die weitere Invasion in umliegendes Gewebe gefördert (Wirtz *et al.* 2011). Um den Eintritt (Intravasation) oder den Austritt (Extravasation) von Tumorzellen in oder aus den Blut- oder Lymphgefäßen zu ermöglichen, kommt es zu einer ausgeprägten Veränderung des Zytoskelettes. Dies erlaubt den Tumorzellen die Penetration zwischen die endothelialen Zellverbindungen (Wirtz *et al.* 2011). Während der Ausbreitung der Tumorzellen über das Blut- bzw. Lymphsystem sind die Zellen sowohl mechanischen Kräften, wie den Scherkräften in der Blutzirkulation, als auch dem Immunsystem vermehrt ausgesetzt. Dadurch überleben nur wenige Tumorzellen den Transport im Blut- bzw. Lymphsystem, was die Wahrscheinlichkeit der Tumormetastasierung reduziert. Damit die überlebenden Tumorzellen anschließend die Blut- bzw. Lymphzirkulation wieder verlassen können, müssen sie erst an die Gefäßwand binden. Dieser Arrest in den Blutgefäßen kann durch zwei Mechanismen erfolgen. Zum einen können sich die Tumorzellen in kleinen Kapillaren, die einen geringeren Durchmesser als die Tumorzelle aufweisen, festsetzen und zu deren Verschluss führen. Zum anderen kann es durch rezeptorvermittelte Adhäsion zum Arrest der Tumorzellen kommen. Nachdem die Zellen arretiert sind, kommt es zur Extravasation aus

dem Blut- bzw. Lymphsystem und zur Migration in das umliegende Gewebe. Durch anschließende Proliferation und Angiogenese der Mikrometastase entsteht der Sekundärtumor (Wirtz *et al.* 2011).



**Abb. 1.1: Metastasierungsstadien.**

Nach der Proliferation und Vaskularisierung des Primärtumors kommt es zum Ablösen einzelner Tumorzellen. Durch Invasion und Intravasation gelangen diese Tumorzellen in das Blut- bzw. Lymphsystem, wo sie in kleinen Gefäßen arretieren. Nach der Extravasation aus dem Blut- bzw. Lymphsystem migrieren die Tumorzellen in umliegendes Gewebe und bilden dort einen Sekundärtumor. Adaptiert aus Wirtz *et al.* 2011. Mit Genehmigung der Nature Publishing Group.

Prinzipiell kann ein Primärtumor in viele unterschiedliche Organe streuen. Jedoch neigen viele Tumoren dazu, in Abhängigkeit von ihrer Entität, bevorzugt in bestimmten Organen Metastasen zu bilden. So metastasiert das Mammakarzinom am häufigsten in das Knochenmark, die Lunge, die Leber oder das Gehirn, wohingegen Pankreaskrebs und Darmkrebs vor allem in die Leber und die Lunge metastasieren (Wirtz *et al.* 2011). Zur Erklärung der Metastasierungsmuster wurden zwei bedeutende Hypothesen entwickelt.

Die erste Hypothese, auch bekannt als *Seed-and-Soil-Theorie*, wurde bereits 1889 von Stephen Paget entwickelt. Bei der Untersuchung von Brustkrebspatienten fiel auf, dass die Patienten vermehrt Lebermetastasen bildeten, während andere Organe wie die Milz weniger häufig betroffen waren. Da beide Organe Ähnlichkeiten in der Blutversorgung aufweisen, postulierte Stephen Paget, dass der Ort der Metastasierung nicht vom Zufall abhängt. Stattdessen stellte er die Hypothese auf, dass eine erfolgreiche Interaktion zwischen den Tumorzellen (*seed*) und dem Mikromilieu des Organgewebes (*soil*) zur Bildung von Metastasen führt und somit das Metastasierungsmuster hervorruft (Paget 1989). Die zweite

oder auch mechanische Hypothese postuliert, dass der Ort der Metastasierung von der Blutzirkulation abhängig ist (Weiss 2000). Demnach verfangen sich die Tumorzellen am häufigsten in dem nächsten Kapillarnetz und führen dort zur Bildung von Metastasen. Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass sowohl die anatomischen Voraussetzungen des Blutsystems als auch die Interaktion zwischen Tumorzelle und Mikromilieu des Organs für das Metastasierungsmuster verantwortlich sind (Vanharanta und Massague 2013; Wirtz *et al.* 2011).

In aktuelleren Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass die Metastasierung ein sehr ineffizienter Prozess ist, bei dem die meisten Tumorzellen, die den Primärtumor verlassen, sterben. Während noch viele Tumorzellen die ersten Schritte der Tumormetastasierung durchlaufen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass zirkulierende Tumorzellen fremde Organe infiltrieren und Mikrometastasen bilden, relativ gering. Es ist bislang unklar, weshalb gerade die letzten Schritte der Metastasierung das Nadelöhr der Tumorprogression darstellen. Da davon ausgegangen werden muss, dass die ersten Schritte der Metastasierung bei Diagnosestellung bereits stattgefunden haben, ist es von besonderem Interesse die hemmenden Mechanismen der Invasion und Kolonisation von Tumorzellen in entfernte Organe besser zu verstehen (Vanharanta und Massague 2013).

Es wurde lange angenommen, dass es zunächst zu einer Tumorproliferation und erst anschließend durch spät disseminierte Tumorzellen zur Metastasenbildung kommt. Seit einiger Zeit häufen sich jedoch die Hinweise darauf, dass die Metastasierung bereits früh in der Tumorprogression stattfindet. So konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie im Mausmodell zeigen, dass früh disseminierte Brustkrebszellen für mindestens 80 % der Metastasenbildung verantwortlich sind (Hosseini *et al.* 2016). Das bessere Verständnis der Metastasierungsprozesse ist daher für die Entwicklung neuer Therapieansätze von essentieller Bedeutung.

### 1.3 Tumormikromilieu

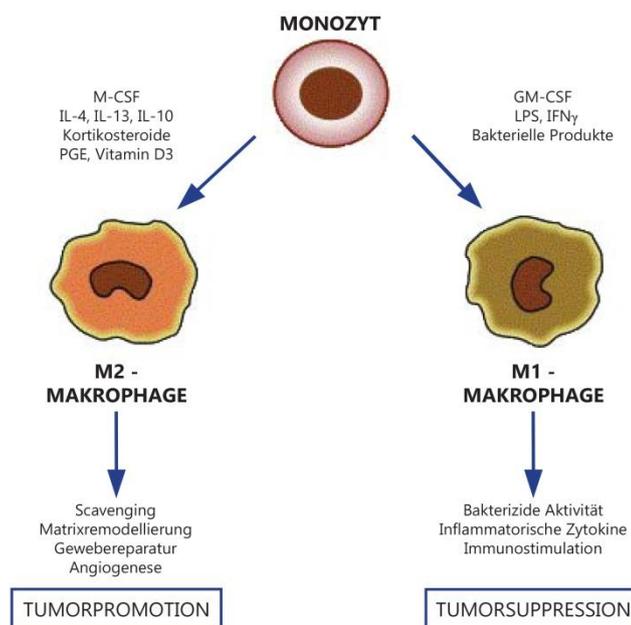
Ein maligner Tumor setzt sich nicht nur aus neoplastischen Tumorzellen sondern, auch aus dem Tumormikromilieu zusammen. Dies wird durch nicht-neoplastische Elemente gebildet, die beispielsweise benigne Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen sowie ECM beinhalten (Mantovani 1994). Lange Zeit lag der Fokus in der Krebsforschung auf den Tumorzellen. Erst in den siebziger Jahren wurde die Bedeutung des den malignen Tumors umgebenden Mikromilieus hervorgehoben. Judah Folkman konnte mit ihrer Arbeit erstmals zeigen, welche bedeutende Rolle das Tumormikromilieu für die Vaskularisierung und somit das Tumorwachstum hat (Folkman 1985). Heutzutage wird der Interaktion zwischen den neoplastischen Zellen und ihrer Umgebung eine wichtige Rolle sowohl bei der Tumorgenese als auch in mehreren Schritten der Metastasierung zugeschrieben (Wernert 1997).

#### 1.3.1 Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs)

Bereits 1863 wurden von Rudolf Virchow Leukozyteninfiltrate innerhalb von Tumorgewebe bei verschiedenen Krebserkrankungen beobachtet. Lange Zeit wurde angenommen, dass dies auf die Entstehung von Krebs aus chronischen Entzündungsherden oder auf die Abwehrreaktion des Körpers gegen die Tumorzellen zurückzuführen sei. Erst nach und nach stellte sich heraus, dass die Leukozyten sowohl das Tumorwachstum als auch die Tumordinvasion fördern. So konnte beispielsweise bei Patienten mit Brustkrebs gezeigt werden, dass eine vermehrte Makrophageninfiltration in das Tumorgewebe mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Leek *et al.* 1996; Steele *et al.* 1984). Der Hauptbestandteil des Leukozyteninfiltrates wird durch Makrophagen ausgemacht, welche aufgrund ihrer Lokalisierung im Tumorgewebe als Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) bezeichnet werden (Mantovani 1989). Bottazzi *et al.* konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass TAMs im Primärtumor von Blutmonozyten abstammen. Diese werden durch Chemokine und Zytokine angelockt, die von dem malignen Tumor sekretiert werden. Anschließend infiltrieren die Monozyten das Tumorgewebe und differenzieren sich im Tumormikromilieu zu TAMs. Als TAMs interagieren sie direkt mit den Tumorzellen (Bingle *et al.* 2002; Bottazzi *et al.* 1983).

Im Allgemeinen können Makrophagen, abhängig von ihrem Umfeld, unterschiedliche Eigenschaften und Funktionen aufweisen. In Anlehnung an die Dichotomie von T-

Helferzellen wird dabei der klassisch inflammatorisch aktivierte M1-Subtyp vom alternativ aktivierten M2-Subtyp unterschieden, wobei dieser wiederum in mehrere Subpopulationen (M2a, M2v und M2c) unterteilt werden kann (Mantovani *et al.* 2004; Verreck *et al.* 2004). Die Einteilung in die beiden polarisierten Subtypen M1 und M2 stellt allerdings nur eine enorme Vereinfachung des komplexen, biologischen Sachverhalts dar (Sica *et al.* 2006). In welchen der verschiedenen Subtypen sich ein Monozyt differenziert, hängt dabei von den stimulierenden Signalen der Umgebung ab. So führen *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Lipopolysaccharide (LPS) und andere bakterielle Produkte zu einer Differenzierung in einen M1-Makrophagen. Der M1-Subtyp ist unter anderem durch eine erhöhte Produktion von Interleukin-12 (IL-12) und IL-23 sowie toxischen Zwischenprodukten wie Stickstoffmonoxid (NO) und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gekennzeichnet (Verreck *et al.* 2004). Dies führt zu einer gesteigerten Tumorzytotoxizität, weshalb Makrophagen vom M1-Subtyp somit tumorsuppressiv wirken (Sica *et al.* 2006). Im Gegensatz dazu führt die Anwesenheit von *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), IL-4, IL-13, IL-10 und immunsuppressiven Wirkstoffen (Kortikosteroide, Vitamin D3, Prostaglandin) zu einer Differenzierung in einen M2-Subtyp. M2-Makrophagen unterstützen Gewebeumbau, Gewebereparatur und die Angiogenese, wodurch das Tumorwachstum und die Ausbreitung von Tumorzellen in das umliegende Gewebe gefördert werden (Sica *et al.* 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Zytokinexpression der TAMs weitgehend mit dem Expressionsprofil der M2-Makrophagen übereinstimmt. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass TAMs die spezifischen tumorfördernden Eigenschaften von M2-Makrophagen aufweisen, weshalb sie als eine eigene Subpopulation der M2-Makrophagen angesehen werden (Sica *et al.* 2006).



### Abb. 1.2: Makrophagenpolarisierung.

Monozyten differenzieren, je nach Stimulation, zu unterschiedlich polarisierten Makrophagen. In Anwesenheit von M-CSF, IL-4, IL-13, IL-10, Kortikosteroiden, PGE und Vitamin D3 differenzieren die Monozyten zu M2-Makrophagen. M2-Makrophagen haben eine hohe *scavenging*-Aktivität, fördern Matrixremodellierung, Gewebereparatur sowie Angiogenese und fördern somit die Tumorprogression. Die Anwesenheit von GM-CSF, LPS, IFN- $\gamma$  sowie bakterieller Bestandteile führt hingegen zu einer M1-Differenzierung. M1-Makrophagen weisen eine hohe bakterizide Aktivität, immunstimulatorische Funktion sowie Tumorzytotoxizität auf. Adaptiert aus Sica *et al.* 2006. Mit Genehmigung von Elsevier.

### 1.3.2 Die Rolle der Makrophagen bei der malignen Invasion und Metastasierung

Schon 1987 konnte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden, dass Makrophagen eine wichtige Rolle in den ersten Schritten der Metastasierung spielen und sich die Invasionskapazität von Tumorzellen signifikant erhöht, wenn diese zuvor auf einem Nährboden mit Makrophagen ko-kultiviert wurden (Mukai *et al.* 1987). Ein weiteres Indiz für einen Zusammenhang zwischen Makrophagen und maligner Tumorprogression sowie Tumorzellinvasion wurde von Lin *et al.* geliefert (Lin *et al.* 2001). In einem transgenen Mausmodell konnten sie zeigen, dass es unter Abwesenheit des Makrophagenwachstumsfaktors *colony-stimulating factor-1* (CSF-1) zu einer verringerten Makrophageninfiltration in das Tumorgewebe kommt. Dies wiederum war mit einer verzögerten malignen Tumorprogression und Tumormetastasierung assoziiert, wobei das Wachstum des Primärtumors unbeeinträchtigt blieb (Lin *et al.* 2001). Um den Einfluss der TAMs auf die Tumorinvasivität von Brustkrebszellen besser zu verstehen, haben Hagemann *et al.* die

Auswirkung einer Ko-Kultivierung von Makrophagen mit verschiedenen Brustkrebszelllinien näher analysiert. Hierbei zeigte sich in den Makrophagen eine Steigerung der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-abhängigen Expression von MMPs. Die Invasivität der malignen Zelllinien wurde hierdurch verstärkt, wohingegen die benigne Zelllinie weder in noch ohne Kokultur mit Makrophagen ein invasives Verhalten zeigte. Interessanterweise führte eine Stimulation der Makrophagen mit LPS zu einer Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasivität (Hagemann *et al.* 2004).

Einen weiteren entscheidenden Hinweis für das Verständnis der Interaktion zwischen TAMs und Brustkrebszellen erbrachten Wyckoff *et al.* Sie konnten mit Hilfe eines transgenen Mausmodells zeigen, dass die parakrine Kommunikation mit EGF und CSF-1 zwischen Makrophagen und Tumorzellen eine wichtige Rolle in der Tumordinvasion spielt (Wyckoff *et al.* 2004). Dieselbe Forschungsgruppe konnte später zeigen, dass Makrophagen auch an der Intravasation von Brustkrebszellen beteiligt sind. Mit Hilfe von intravitraler multiphotoner Bildgebung konnte die Interaktion zwischen Tumorzellen, perivaskulären Makrophagen und Blutgefäßen während der Intravasation visuell dargestellt werden. Hierdurch konnte zum einen nachgewiesen werden, dass die Intravasation der Tumorzellen von den Makrophagen abhängig ist und zum anderen konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess ebenfalls durch CSF-1 und EGF vermittelt wird (Wyckoff *et al.* 2007).

Bei den letzten Schritten der Metastasierung spielen vor allem residente, organspezifische Makrophagen eine wichtige Rolle. Gordon *et al.* konnten nachweisen, dass leberspezifische Makrophagen, die Kupffer-Zellen, zu der Etablierung von Lebermetastasen und deren Wachstum beitragen (Gordon *et al.* 2007). Auch Mikroglia, die residenten Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS) interagieren mit den Tumorzellen und fördern so die Invasion in umliegendes Hirngewebe (Markovic *et al.* 2005; Sliwa *et al.* 2007; Wesolowska *et al.* 2008). Bei Brustkrebszellen konnten Pukrop *et al.* zeigen, dass Mikroglia die Metastasierung und Invasion in Hirngewebe fördern. Im Vergleich zu den TAMs konnten dabei keine M2-typischen Zytokinprofile beobachtet werden. Jedoch kam es nach Stimulation der Mikroglia mit LPS zu einer Reaktion mit einem M1-ähnlichen Profil. Mikroglia, die zuvor die Tumordinvasion förderte, zeigte nun eine klassische inflammatorische Antwort, was mit dem Verlust der proinvasiven Funktionen einherging (Pukrop *et al.* 2010).

## 1.4 Makrophagen als Therapieansatz

Wie im vorangegangenen Abschnitt erläutert, tragen Makrophagen wesentlich zu der Tumorprogression und Metastasierung bei. Deshalb eröffnen die Rekrutierung von Makrophagen und die Interaktion der TAMs mit den Tumorzellen Möglichkeiten der therapeutischen Intervention. Beispielsweise bieten Chemokine und Chemokinrezeptoren, die an der Makrophagenrekrutierung und der Makrophagen-induzierten Tumordinvasion beteiligt sind, Angriffspunkte um die Makrophageninfiltration und somit die Tumorprogression zu unterdrücken (Robinson *et al.* 2003). Die Makrophagenaktivierung durch Immunmodulatoren zu einem klassischen tumorzytotoxischen M1-Typ bietet einen weiteren vielversprechenden Therapieansatz, für den bereits in der Vergangenheit eine Tumorzelleradikation sowie eine Reduktion der Metastasierungsrate gezeigt werden konnte (Fidler *et al.* 1982).

Eine neuere Hypothese ist, dass durch Immunmodulatoren, nicht nur Makrophagen rekrutiert und aktiviert werden, sondern vermutlich auch ein Phänotypwechsel der TAMs von einem tumorfördernden M2-Typ hin zu einem tumorsuppressiven M1-Typ möglich ist. Dies würde mit einer erhöhten Zytotoxizität der TAMs gegenüber Tumorzellen und einer Verminderung der Metastasierung einhergehen (Sica *et al.* 2006).

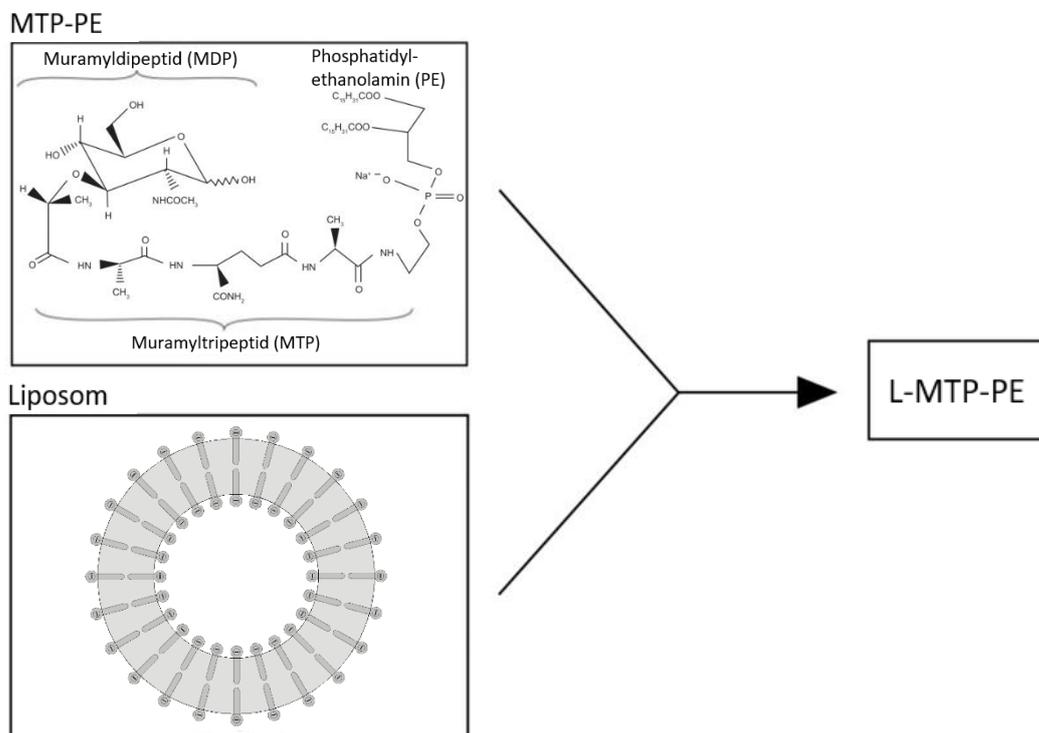
Ein Immunmodulator, der Makrophagen stimuliert und bereits klinisch bei der Behandlung des Osteosarkoms eingesetzt wird ist liposomales Mifamurtid.

### 1.4.1 Stimulation der Makrophagen durch Mifamurtid

Liposomales Mifamurtid (L-MTP-PE, Handelsname: Mepact®) wird von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) als *orphan*-Arzneimittel eingestuft und hat 2009 die Zulassung zur Therapie hochmaligner Osteosarkome erhalten (s. 8.1: Europäischer Öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) für Mepact®). Dabei wird Mifamurtid in Kombination mit anderen Chemotherapeutika eingesetzt, wobei es bei einer kombinierten Anwendung die klinische Prognose verbessert (Meyers *et al.* 2008).

Mifamurtid (Muramyltri-peptid phosphatidylethanolamine, MTP-PE) ist ein Glykopeptid und ein synthetisch hergestellter Abkömmling von Muramyl-dipeptid (MDP). Bei MDP handelt es sich um einen natürlich vorkommenden immunstimulatorischen Zellwandbestandteil von grampositiven und gramnegativen Bakterien (Nardin *et al.* 2006). MTP-PE besitzt im

Gegensatz zu MDP zwei zusätzliche Lipidsäurestrukturen, wodurch es stärker ausgeprägte lipophile Eigenschaften aufweist. Dies führt zu einer vermehrten passiven Aufnahme durch Makrophagen und Monozyten und hat dadurch einen stärkeren Effekt auf die inflammatorische Aktivierung (Fogler und Fidler 1987). Um die Effektivität von MTP-PE weiter zu steigern, wurde der Wirkstoff in die Lipidschicht von multilaminaren Liposomen integriert. Dabei handelt es sich um kleine Vesikel, die aus einer Doppellipidschicht bestehen und eine Größe von 2 – 3  $\mu\text{m}$  besitzen. Dieses liposomale Mifamurtid bzw. L-MTP-PE zeigt gegenüber MTP-PE eine stärkere Aktivierung der Makrophagen, eine schnellere Elimination aus dem Blutkreislauf durch Phagozytose sowie eine geringere Toxizität (Fogler und Fidler 1985; Gay *et al.* 1993).



**Abb. 1.3: L-MTP-PE.**

Durch die Integration von MTP-PE in die Lipidschicht von multilaminaren Liposomen entsteht liposomales MTP-PE (L-MTP-PE). Darstellung einer MTP-PE-Skizze aus Kager *et al.* 2010 und einer Liposomen-Skizze von Wikipedia (hochgeladen von Robert Kropf). *Mit Genehmigung einer Common Licence sowie einer Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported Licence.*

Es konnte gezeigt werden, dass sich L-MTP-PE nach intravenöser Injektion vor allem in Leber, Lunge und Milz anreichert, wo es von Makrophagen phagozytiert wird (Fogler und Fidler 1987; Poste *et al.* 1982). Die Aktivierung durch Mifamurtid führt generell zu einer

verstärkten Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8; IL-1, NO sowie Prostaglandin E-2 (PGE-2) und PGD-2 und ist mit einer erhöhten Tumoreradikation verbunden (Asano *et al.* 1994; Dieter *et al.* 1995; Fogler und Fidler 1985; Kleinerman *et al.* 1983; Kurzman *et al.* 1999). In einem Mausmodell mit einem malignen Melanom und Lungenmetastasen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Mifamurtid die Metastasierungsrate verringert. Dieser Effekt konnte durch eine simultane Behandlung mit einem Wirkstoff, der selektiv die Funktion der Makrophagen schädigt, aufgehoben werden. Dahingegen hatte eine Depletion von natürlichen Killerzellen (NK) oder T-Zellen keine Auswirkung auf die verringerte Metastasierungsrate. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verringerte Metastasierungsrate direkt auf die aktivierten Makrophagen zurückzuführen ist (Fidler *et al.* 1982).

#### **1.4.2 Molekularer Wirkungsmechanismus von Mifamurtid**

Der molekulare Wirkungsmechanismus von Mifamurtid konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass es nach Aufnahme des Wirkstoffs durch die Makrophagen zur Aktivierung der Isoenzyme *extracellular regulated kinase-1* (ERK-1) und ERK-2 kommt, die der Gruppe der *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinasen angehören. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) und *activator protein-1* (AP-1) aktiviert werden. Dies ist mit der Synthese von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , NO und PGE-2 assoziiert und resultiert in einer erhöhten Tumortoxizität (Dieter *et al.* 1999). Interessanterweise induziert LPS, ebenfalls Bestandteil von bakteriellen Zellwänden, die Aktivierung gleicher Signalproteine. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass LPS und Mifamurtid zu einer ähnlichen Zytokinproduktion in Kupffer-Zellen führen, was zumindest zum Teil einen ähnlichen molekularen Wirkungsmechanismus vermuten lässt (Dieter *et al.* 1995).

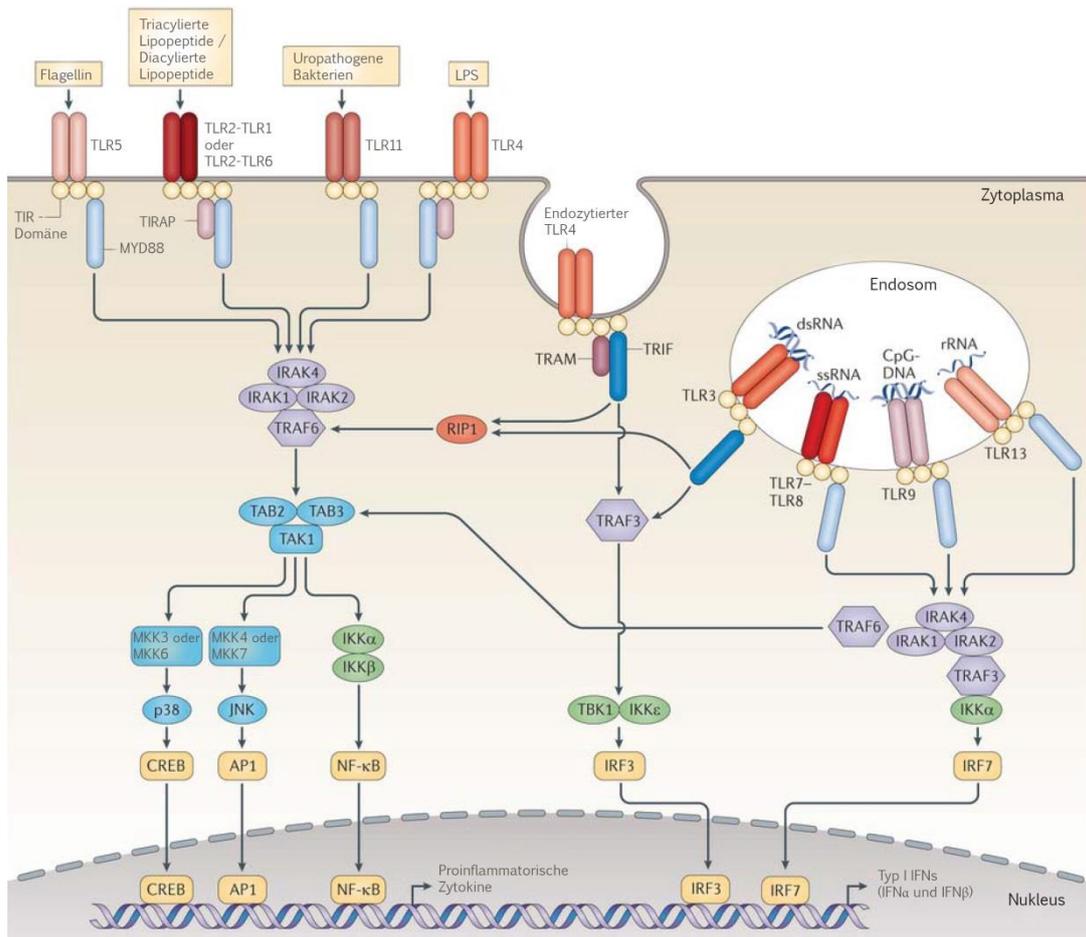
##### **1.4.2.1 Toll-like-Rezeptoren**

Bakterielle Strukturen oder sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) werden häufig von den *toll-like receptors* (TLRs) erkannt (Akira *et al.* 2001). Da es sich bei Mifamurtid um einen bakteriellen Zellwandbestandteil handelt, ging man lange Zeit davon aus, dass die Substanz auch über die Aktivierung von TLRs wirkt. Bisher konnte eine direkte Interaktion jedoch nicht

nachgewiesen werden (Nardin *et al.* 2006). TLRs sind Transmembranproteine, welche extrazellulär eine *leucin rich repeats* (LLR)-Domäne tragen und eine intrazelluläre *toll-IL1-receptor* (TIR)-Domäne zur Signaltransduktion besitzen (Kawai und Akira 2010). Bisher wurden 10 TLR im Menschen und 12 TLR in Mäusen identifiziert (Kawai und Akira 2010). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 sind auf der Zelloberfläche exprimiert. Sie erkennen mikrobielle Membranstrukturen wie Lipide und Lipoproteine. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind ausschließlich in intrazellulären Membranen lokalisiert. Sie kommen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie in Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen vor, wo sie mikrobielle Nukleinsäuren erkennen (Kawai und Akira 2010). Die Signaltransduktion und somit die biologische Antwort variiert unter den TLRs und hängt von spezifischen Adapterproteinen ab. Diese besitzen eine TIR-Domäne, was ihnen die Interaktion mit spezifischen TLRs ermöglicht. Zu den Adapterproteinen gehören *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), *TIR-domain-containing adaptor protein* (TIRAP), *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) (Kawai und Akira 2010). Jeder TLR rekrutiert unterschiedliche Adapterproteine und aktiviert somit spezifische Signalkaskaden. Diese können allgemein in zwei TLR-Signalwege eingeteilt werden. Zum einen den MyD88-abhängigen und zum anderen den TRIF-abhängigen Signalweg.

Der MyD88-abhängige Signalweg führt über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und MAP-Kinasen zur Induktion von inflammatorischen Zytokinen (Akira *et al.* 2006). In Makrophagen und klassischen dendritischen Zellen rekrutiert MyD88, je nach TLR, alleine oder zusammen mit anderen Adapterproteinen, *IL-1-receptor-associated kinases* (IRAKs) und *TNF-receptor-associated factors* (TRAFs), welche wiederum mit *TAK1-binding proteins* (TABs) und *TGF $\beta$ -activated kinases* (TAKs) interagieren. Dies führt über die MAP-Kinasen JUN-N-terminale Kinase (JNK) und p38 sowie dem I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplex zu der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *cyclic AMP-responsive element-binding protein* (CREB), AP-1, NF- $\kappa$ B und *interferon regulatory factor-7* (IRF-7). Der TRIF-abhängige Signalweg führt hingegen über *receptor-interacting protein-1* (RIP-1) und TRAF-6 sowie TRAF-3 und *TANK-binding kinase-1* (TBK-1)/IKK zu der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IRF-3. Dies resultiert sowohl in der Induktion von Typ I Interferon als auch in der vermehrten Expression von inflammatorischen Zytokinen (Akira *et al.* 2006; O'Neill *et al.* 2013). Eine Ausnahme bildet TLR4, welcher mit allen vier Adapterproteinen interagiert und beide Signalwege aktiviert (Kawai und Akira 2010). Es

konnte gezeigt werden, dass TLR4 auf der Zellmembran einen Komplex mit dem *myeloid differentiation factor-2* (MD-2) bildet. Dieser Komplex ist in der Lage den Zellwandbestandteil LPS von gramnegativen Bakterien zu erkennen (Akashi-Takamura und Miyake 2008; Akira *et al.* 2006; Medzhitov *et al.* 1997; Poltorak *et al.* 1998). Der TLR2-Rezeptor ist als Heterodimer ebenfalls auf der Zelloberfläche exprimiert und dient der Erkennung von Zellwandbestandteilen von grampositiven Bakterien, Mykobakterien, Pilzen und Parasiten (Akira *et al.* 2006). Es konnte nachgewiesen werden, dass TLR2 Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 bildet (Kawai und Akira 2010). Das TLR2-TLR1-Heterodimer erkennt dabei spezifisch Triacyl-Lipoproteine von gramnegativen Bakterien und Mykoplasmen (Kawai und Akira 2010).



**Abb. 1.4: Der TLR-Signalweg.**

TLR5, TLR11, TLR4 und die Heterodimere TLR2-TLR1 oder TLR2-TLR6 sind auf der Zellmembranoberfläche lokalisiert, wohingegen TLR3, TLR7-9 und TLR13 in den Endosomen lokalisiert sind. Eine Ausnahme bildet TLR4, welcher sowohl auf der Zellmembran als auch in den Endosomen lokalisiert ist. Jeder TLR rekrutiert dabei unterschiedliche Adapterproteine, wie beispielsweise *TIR-domain-containing adaptor protein* (TIRAP), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM), *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88), *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF) und aktiviert somit spezifische Signalkaskaden.

Die TLR-Signalwege werden generell in einen MyD88-abhängigen und einen TRIF-abhängigen Signalweg eingeteilt. Der MyD88-abhängige Signalweg wird von allen TLR-Rezeptoren, ausgenommen TLR3, genutzt. Der TRIF-abhängige Signalweg wird von TLR3 und TLR4 genutzt. Im MyD88-abhängigen Signalweg rekrutiert MyD88 *IL-1-receptor-associated kinases-4* (IRAK-4), IRAK-1, IRAK-2 und *TNF-receptor-associated factor-6* (TRAF-6) und stimuliert über MAP-Kinase-Kinasen (MKKs) die MAPKs p38 und JUN-N-terminale Kinase (JNK) sowie den  $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase (IKK)-Komplex. Dadurch werden wiederum die Transkriptionsfaktoren *cyclic AMP-responsive element-binding protein* (CREB), *activator protein-1* (AP-1), *interferon regulatory factor-7* (IRF-7) und NF- $\kappa\text{B}$  aktiviert, was in eine inflammatorischen Immunantwort resultiert. TRIF wiederum rekrutiert über *receptor-interacting protein-1* (RIP-1) TRAF-6 sowie TRAF-3, was über die Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$  und IRF-3 sowohl in der Induktion von Typ I Interferon als auch in der vermehrten Expression von inflammatorischen Zytokinen resultiert. Adaptiert aus O'Neill *et al.* 2013. Mit Genehmigung der Nature Publishing Group.

#### 1.4.2.2 Nod2-Rezeptor

Neben der Aktivierung von TLRs konnte für Mifamurtid auch eine rezeptorunabhängige Aufnahme durch Makrophagen gezeigt werden, was die Aktivierung eines intrazellulären Rezeptors vermuten lässt (Fogler und Fidler 1987). So konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass L-MTP-PE vor allem von Zellen des myeloiden Systems phagozytiert wird. Die phagozytierten Vesikel verschmelzen anschließend mit Lysosomen zu Phagolysosomen. In diesen werden die MTP-PE-enthaltenden Lysosomen aufgespalten. Dadurch wird der Wirkstoff freigesetzt und gelangt ins Zytosol, wo er mit intrazellulären Rezeptoren interagieren kann (Dieter *et al.* 1999; Fogler und Fidler 1987). Eine direkte Interaktion mit einem intrazellulären Rezeptor konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde gezeigt, dass MDP, der natürliche Vorläufer von Mifamurtid, an den intrazellulären Rezeptor *nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2* (Nod2) bindet. Dies resultiert in der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges und initiiert damit eine inflammatorische Antwort (Girardin *et al.* 2003; Inohara und Nunez 2003). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass auch Mifamurtid über den Nod2-Rezeptor wirkt.

Der Nod2-Rezeptor wird zur Familie der *nod-like receptors* (NLRs) gezählt und dient wie die TLRs der Erkennung von PAMPs (Franchi *et al.* 2009). Dieser intrazelluläre Rezeptor wird vor allem in myeloiden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Granulozyten exprimiert (Gutierrez *et al.* 2002). Strukturell ist er durch zwei *N-terminal caspase recruitment domains* (CARDs), einer zentralen Nod-Domäne und einer C-terminale LRR-Domäne gekennzeichnet. Die LRR-Domäne dient zur Erkennung der Liganden, was zur Rezeptoraktivierung und zur Oligomerisierung über die Nod-Domäne führt. Anschließend erfolgt die Signaltransduktion durch Interaktion der CARD-Domänen mit dem Adapterprotein *RIP-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein kinase* (RICK) (Chin *et al.* 2002; Park *et al.* 2007). Diese Interaktion führt zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges und resultiert in der Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Werts *et al.* 2006; Werts *et al.* 2007).

## 1.5 Der NF- $\kappa$ B-Signalweg

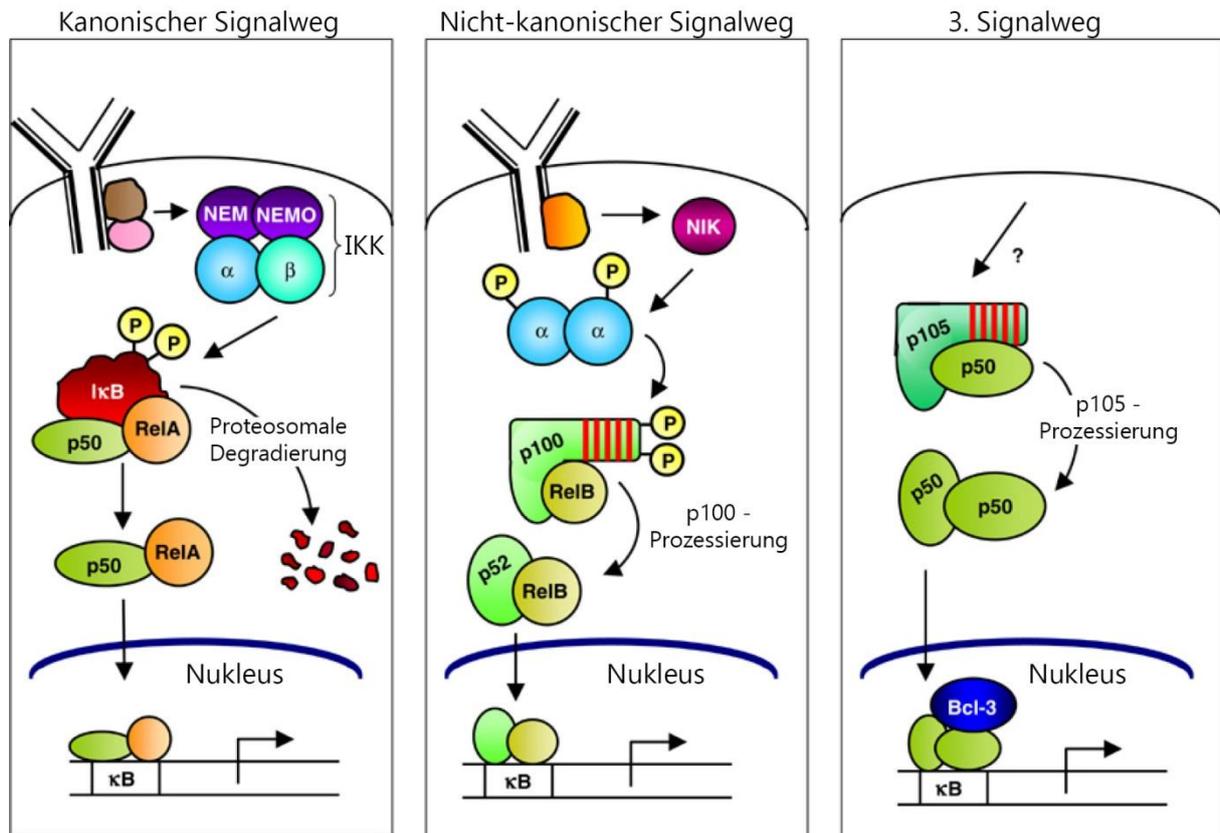
Sowohl TLR-Rezeptoren als auch der Nod2-Rezeptor spielen eine zentrale Rolle in der Immunantwort. Dabei führt die Stimulation dieser Rezeptoren zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs und resultiert in der Produktion von inflammatorischen Zytokinen. Dementsprechend ist der NF- $\kappa$ B-Signalweg generell von besonderer Bedeutung für die Aktivierung von Immunzellen und die Regulierung der inflammatorischen Antwort (Barnich *et al.* 2005; Inohara und Nunez 2003; Takeda und Akira 2004). Darüber hinaus nimmt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B eine Hauptrolle in der krebsbezogenen Entzündungsreaktion der TAMs sowie der Tumorprogression neoplastischer Zellen ein (Solinas *et al.* 2009).

NF- $\kappa$ B wurde erstmals 1986 als Nuklearfaktor beschrieben, welcher für die Transkription der leichten Kette kappa von Immunglobulinen in B-Zellen benötigt wird (Sen und Baltimore 1986). Heute zählen zu der NF- $\kappa$ B-Familie RelA (auch p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (auch p50 bzw. p105) und NF- $\kappa$ B2 (auch p52 bzw. p100), die untereinander sowohl Hetero- als auch Homodimere bilden (Ghosh *et al.* 1998).

Die Familie der NF- $\kappa$ B-Proteine ist durch eine ungefähr 300 Aminosäuren lange *Rel-homology domain* (RHD) charakterisiert, die für die Dimerisierung, die DNA-Bindung sowie der Interaktion mit dem inhibitorischen *inhibitor of kappa B* (I $\kappa$ B)-Protein verantwortlich ist. Die Rel-Proteine (RelA, RelB und c-Rel) besitzen im Gegensatz zu NF- $\kappa$ B1 und NF- $\kappa$ B2 eine Transaktivierungsdomäne. Dadurch können Dimere, die ein Rel-Protein besitzen, die Transkription aktivieren, während Dimere ohne ein Rel-Protein sich inhibitorisch auf die Transkription auswirken. P105 bzw. p100 können auch als Vorläuferproteine von p50 und p52 auftreten, wobei die zusätzliche Domäne die Translokation des Dimers in den Zellkern unterbindet (Ghosh *et al.* 1998). Es wurden verschiedene Signalwege beschrieben, die zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Dementsprechend wird heutzutage zwischen dem kanonischen (auch klassischen) NF- $\kappa$ B-Signalweg und dem nicht-kanonischen (auch alternativen) NF- $\kappa$ B-Signalweg unterschieden (Bonizzi und Karin 2004; Gilmore 2006; Hayden und Ghosh 2004; Perkins 2007).

Die Meinungen bezüglich der genauen Signalwegaktivierung von NF- $\kappa$ B durch Mifamurtid sind widersprüchlich. Es wird vermutet, dass Muramylpeptide durch Interaktion mit NLR-Rezeptoren den kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg aktivieren, jedoch konnten Pan *et al.*

zeigen, dass MDP über Nod2 vor allem den nicht-kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalweg aktiviert (Meshcheriakova *et al.* 2010; Pan *et al.* 2006).



**Abb. 1.5: Der NF- $\kappa$ B-Signalweg.**

Die NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion wird eingeteilt in einen kanonischen (klassischen) und einen nicht-kanonischen (alternativen) Signalweg. Bei der Initiierung des kanonischen Signalweges kommt es nach Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplexes zu einer proteosomalen Degradation von *inhibitor of kappa B* (I $\kappa$ B), wodurch es dem p50/RelA Dimer ermöglicht wird, in den Nucleus zu translozieren und die entsprechenden Zielgene zu aktivieren. Beim nicht-kanonischen Signalweg wird die NF- $\kappa$ B induzierende Kinase (NIK) aktiviert, welche wiederum einen IKK $\alpha$ -Komplex aktiviert. Der aktivierte IKK $\alpha$ -Komplex initiiert die partielle Proteolyse von p100 zu p52. Das p52/RelB Heterodimer transloziert anschließend in den Nucleus um dort die Genexpression zu regulieren. Es steht außer Frage, dass es noch weitere Signalwege zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B gibt. Bisher konnten diese jedoch nicht genau geklärt werden. Es wird lediglich eine Interaktion zwischen p50 Homodimeren und *B-cell lymphoma-3* (Bcl-3) vermutet (3. Signalweg). Adaptiert aus Gilmore 2006. *Mit Genehmigung der Nature Publishing Group.*

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Metastasierung von fortgeschrittenem Brustkrebs. Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen je nach umgebendem Mikromilieu unterschiedlich aktiviert werden und somit verschiedene Funktionen erfüllen (Sica *et al.* 2006). Der Wirkstoff Mifamurtid, der als liposomale Form zur Behandlung von hochmalignen, fortgeschrittenen Osteosarkomen in Europa zugelassen ist, greift vermutlich genau an diesem Punkt an. Es konnte bereits beim metastasiertem Melanom nachgewiesen werden, dass Mifamurtid zu einer zytotoxischen Aktivierung der Makrophagen führt, was sowohl in einer erhöhten Tumoreradikation als auch in einer geringeren Metastasierungsrate resultiert (Fidler *et al.* 1982). Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob Mifamurtid als Therapieansatz auch bei Brustkrebs in Frage kommt. Dazu soll der Einfluss des Wirkstoffes auf die Makrophagen-induzierte Tumoreradikation von Brustkrebszellen untersucht werden.

Dazu erfolgte im ersten Abschnitt die Charakterisierung der potentiellen Zielrezeptoren. Da ein direkter Effekt des Wirkstoffes auf die Tumorzellen bisher nicht komplett ausgeschlossen werden konnte, wurde die Genexpression der potentiellen Zielrezeptoren sowohl in Makrophagen als auch in Tumorzellen analysiert.

Im nächsten Schritt wurde zuerst eine direkte Wirkung von Mifamurtid auf die Tumoreradikation von Brustkrebszellen untersucht. Anschließend wurde der Einfluss von Mifamurtid in Bezug auf die Makrophagen-induzierte Invasion von Brustkrebszellen genauer betrachtet. Dabei sollte analysiert werden, ob der Wirkstoff zu einer Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasion von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) sowie von residenten Makrophagen (Mikroglia) führt.

Es gibt bereits mehrere Hinweise darauf, dass eine erhöhte Tumoreradikation und eine verringerte Metastasierungsrate durch Mifamurtid mit einer Aktivierung der Makrophagen zusammenhängen. Entsprechend der Unterteilung der Makrophagen anhand ihres Aktivierungsmusters in unterschiedliche Subtypen nach Sica *et al.* könnte die Makrophagenaktivierung durch Mifamurtid am ehesten dem klassischen zytotoxischen Makrophagentyp (M1-Subtyp) zugeordnet werden (Fidler *et al.* 1982; Sica *et al.* 2006). Um zu klären, ob für die Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumoreradikation von Brustkrebszellen tatsächlich eine klassisch inflammatorische Aktivierung der Makrophagen

durch Mifamurtid verantwortlich ist, sollte das Aktivierungsprofil von Makrophagen nach Stimulation mit Mifamurtid näher betrachtet werden. Dabei stellt sich die Frage, ob das Zytokin- und Genexpressionsprofil der durch Mifamurtid stimulierten Makrophagen zu dem tumorzytotoxischen Profil des M1-Subtyps passt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen zu einem verbesserten Verständnis der Wirkung von Mifamurtid beitragen und wichtige Erkenntnisse über den Einfluss des Wirkstoffes auf Tumorprogression und Metastasierung bei fortgeschrittenem Mammakarzinom liefern. Ein besseres Verständnis der Wirkungsweise auf die Interaktion zwischen Makrophagen und Tumorzellen kann neue Therapienansätze aufdecken und damit eine verbesserte Behandlung von Brustkrebspatienten ermöglichen.

## 2 Material

### 2.1 Verwendete Zellmaterialien

#### 2.1.1 Eukaryotische Zelllinien

Tab. 2.1: Eukaryotische Zelllinien

<i>Name</i>	<i>Spezies/Ursprung</i>	<i>Merkmal/Mausstamm</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Referenz</i>
MCF-7	Humane Mamma-Adenokarzinom-Zelle	ER-positiv	DSMZ, Braunschweig	(Soule <i>et al.</i> 1973)
MDA-MB-231	Humane Mamma-Adenokarzinom-Zelle	ER-negativ, PR-negativ, Her2/neu-negativ	ATCC, Wesel	(Cailleau <i>et al.</i> 1974)
SK-BR-3	Humane Mamma-Adenokarzinom-Zelle	Her2/neu-positiv	ATCC, Wesel	(Trempe 1976)
410.4	Murine Mamma-Adenokarzinom-Zelle	BALB/c	Prof. F. Balkwill, London, UK	(Miller <i>et al.</i> 1983)
E0771LG	Murine Mamma-Adenokarzinom-Zelle	C57BL/6	Prof. J. Pollard Edinburgh, UK	(Kitamura <i>et al.</i> 2015)
L929	Murine Fibroblasten des subkutanen Bindegewebes	C3H/An	Prof. U.-K. Hanisch, Göttingen	(Sanford <i>et al.</i> 1956)

#### 2.1.2 Mausstämme

Verwendet wurden Mäuse des Stammes NMRI, die aus der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen stammten oder von der Firma Charles River (Hannover) bezogen wurden. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Standardbedingungen mit einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus.

## 2.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Tab. 2.2: Zellkulturmedien und Zusätze

<i>Medien/Mediensupplemente</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Firma</i>
Fetales Kälber-Serum	FCS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	HBSS	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Pen/Strep	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	DMEM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI-1640-Medium		PAA, Cölbe, Deutschland
Trypsin-EDTA (10×)		Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<i>Sodium Pyruvate</i>		Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Normal Horse Serum</i>	NHS	Invitrogen, Carlsbad , USA
L-Glutamin		Biochrom AG, Berlin, Deutschland
β-2-Mercaptoethanol	β2ME	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Lipopolysaccharid	LPS	Enzo Life Science (Alexis), Lörrach, Deutschland
Mepact® (liposomales Mifamurtid)	L-MTP-PE	Takeda Pharma GmbH, Berlin, Deutschland
Mifamurtid (muramyltripeptide phosphatidylethanolamine)	MTP-PE	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
<i>Recombinant human macrophage colony-stimulating factor</i>	M-CSF	R&D Systems, Minneapolis, USA

**Tab. 2.3: BMDM-Medien**

<i>Medien</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Konditioniertes L929-Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 x 10<sup>6</sup> L929-Zellen in 100ml RPMI + 10 % FCS (oder DMEM + 10 % FCS) aussäen</li> <li>• 7 Tage inkubieren, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub></li> <li>• Medium runter zentrifugieren, steril filtrieren (bottle top filter)</li> <li>• 45 ml Aliquots bei -20 °C lagern</li> </ul>
Pluznik-Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM mit L-Glutamin</li> <li>+ 10 % FCS</li> <li>+ 5 % Horse Serum</li> <li>+ 30 % L929 Kond. Medium</li> <li>+ 1 % Sodium pyruvat (11 mg/l stock)</li> <li>+ 1 % Pen/Strep (optional)</li> <li>+ 1 ml β2ME (Vorverdünnt 1000x)</li> </ul>

## 2.3 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2.4: Verbrauchsmaterialien**

<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Firma</i>
6-Napf-Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
10-cm-Zellkultur-Petrischalen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
unbeschichtete 10-cm-Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
21,5-cm <sup>2</sup> -Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
25-cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
75-cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
24-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
6-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
384-Well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<i>E-Plate 16</i> für xCELLigence	Roche, Mannheim, Deutschland
TC-Flasche T75 mit Belüftungskappe	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturinserts	BD, Heidelberg, Deutschland
1,5-ml-Eppendorfcups	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

230-mm-Glaspasteurpipetten	WU Laborglaswaren, Mainz, Deutschland
25-ml-Serologische-Auslaufpipette, 2/10 Gradierung	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
10-ml-Serologische-Auslaufpipetten, 1/10 Gradierung	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
5-ml-Serologische-Auslaufpipetten, 1/10 Gradierung	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Insulinkanüle Gr. 17	Braun, Melsungen, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50-ml-Spritzen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<i>VueLife Cell Culture Bags</i>	CellGenix, Freiburg, Deutschland

## 2.4 Puffer und Lösungen

**Tab. 2.5: Puffer und Lösungen**

<i>Puffer, Lösungen</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Elektrophorese-Puffer	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS Ad 1 l Aqua dest
Entwicklungslösung	6,25 g Natriumcarbonat 0,2 ml Formaldehyd 37 % (w/v) Ad 250 ml Mili-QTM Wasser
Fixierungslösung	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Eisessigsäure
Konservierungslösung	75 ml Ethanol 11,5 ml Glycerol 87 % (w/v) Ad 250 ml Mili-QTM Wasser
MTT-Stammlösung	5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid in PBS

MTT-Lysepuffer	33 % (v/v) DMSO 67 % Ameisensäure 5 % (v/v) in Isopropanol
PFA	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
Sammelgel 5 %	3,45 ml Aqua dest. 630 µl 1,5 M Tris 2 % (w/v) SDS pH 6,8 830 µl Acrylamid-Bisacrylamid 30 % 50 µl APS 10 % (w/v) 5 µl TEMED
Trenngel 10 %	7,9 ml Aqua dest. 5 ml 1,5 M Tris 2 % (w/v) SDS pH 8,8 6,7 ml Acrylamid-Bisacrylamid 30 % 200 µl APS 10 % (w/v) 20 µl TEMED
10x PCR-Puffer	0,75 M Tris-HCl pH 8,8 0,2 M Ammoniumsulfat 0,1 % (v/v) Tween-20
10x TAE-Puffer:	0,4 M Tris 0,2 M Acetacetat 0,01 M EDTA (pH 8,5)

**Tab. 2.6: Lösungen bei der Monozytenisolation**

<i>Lösungen</i>	<i>Zusammensetzung</i>
a) Iso-osmotische Percoll-Lösung	46,26 ml Percoll + 3,74 ml 10x PBS
b) 46 % iso-osmotische Percoll-Lösung	46 ml iso-osmotische Percoll-Lösung von a) + 54 ml RPMI-1640 + 10 % FCS

## 2.5 Chemikalien, Proteine und Größenstandards

Tab. 2.7: Chemikalien, Proteine und Größenstandards

<i>Chemikalien, Proteine und Größenstandards</i>	<i>Firma</i>
Ameisensäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Accutase-Lösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Agarose HEEO Ultra	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNase	Cell Systems, Troisdorf, Deutschland
ECM-Gel	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Ethanol absolut	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll/Biocoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Griess-Reagenz	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>High Pure RNA Isolation Kit</i>	Roche, Mannheim, Deutschland
<i>iScript cDNA-Synthese-Kit</i>	Bio-Rad, München, Deutschland
Laemmli Probenpuffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma, München, Deutschland
Percoll-Lösung	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
<i>SERVA DNA Stain G</i>	Serva, Heidelberg, Deutschland
<i>SYBR-Green</i>	Roche, Mannheim, Deutschland
Trypsin-EDTA (10×)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
6× Ladepuffer	Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland
<i>1 kb DNA-Ladder</i>	NEB, Frankfurt a.M., Deutschland
<i>100 bp-DNA-Ladder</i>	NEB, Frankfurt a.M., Deutschland

## 2.6 Geräte

Tab. 2.8: Geräte

<i>Geräte</i>	<i>Firma</i>
CO <sub>2</sub> incubator CB150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
CCD camera for transilluminator	Intas, Göttingen, Deutschland
FACS Canto II flow cytometer	BD, Heidelberg, Deutschland
FEP Teflon-coated cell culture bags, small/large	CellGenix, Freiburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Heizblock Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Horizontale Elektrophorese-Kammer	Biotec-Fischer, Reiskirchen, Deutschland
Horizontale Agarosegel-Elektrophorese-Kammer Horizon58	Gibco, Heidelberg, Deutschland
Kühltischzentrifuge Hettich Universal 30 RF	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Laminar-Flow Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Microplate Reader Model 680	Bio-Rad, München, Deutschland
Photometer infinite F50	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Mikroskop Telaval 31	Zeiss, Göttingen, Deutschland
MilliQ water purification system	Millipore, Schwalbach, Deutschland
NanoDrop ND-1000 spectrophotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Neubauer-Improved-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Optima <sup>TM</sup> LE-80K Ultrazentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transferapparat Fastblott B34	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
UV-Transilluminator Biometra TI 3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vertikale SDS-Elektrophorese-Kammer Minigel Twin	Biometra, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Großburgwedel, Deutschland
Waage MC1 Analytic AC 210 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland

xCELLigence RTCA DP-System

Roche, Mannheim, Deutschland

Zentrifuge Universal 16

Hettich, Bäch, Deutschland

Zytozentrifuge Cytospin 2

Shandon, Runcorn, Cheshire, UK

## 2.7 Oligonukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide wurden bei der Firma Iba (Göttingen) bezogen. Die Auswahl der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net>).

**Tab. 2.9: Oligonukleotide**

Name	Gene Symbol	Official Gene Name	FW Primer 5' -> 3'	RV Primer 5' -> 3'	T(melt) °C fw	T(melt) °C rev	SIZE cDNA	SIZE gDNA (<15K)
hsTNF $\alpha$ _fw78/rev176	TNF $\alpha$	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TCT CTA ATC AGC CCT CTG G	CTA CAA CAT GGG CTA CAG G	59,43	59,15	78	266
hsVEGF-A_fw/rev125	VEGF $\alpha$	vascular endothelial growth factor A	CTG AGG AGT CCA ACA TCA C	GTC TTG CTC TAT CTT TCT TTG G	59,07	58,75	125	1272
hs Wnt5a Ex4 fw/Ex5 rv	WNT5a	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	AGG GCT CCT ACG AGA GTG CT	GAC ACC CCA TGG CAC TTG	60	60	109	3895
hsTLR4 (110)	TLR4	toll-like receptor 4	CAAGAACCTGGACCTGAG	ATTGTCTGGATTCACACCT	59,25	59,43	110	3770
hs-DKK1	Dkk1	dickkopf homolog 1	CAT AGC ACC TTG GAT GGG TA	ATG ACC GGA GAC AAA CAG AA	60		95	212
hs-MYD88-74	MYD88	MYD88 myeloid differentiation primary response 88	GCAGAGCAAGGAATGTGAC	ATCAGTCGCTTCTGATGGG	59,28	59,64	74	358
hs-TLR1 (90)	TLR1	toll-like receptor 1	CAGGATAACAAGGCATATTGG	CATTCTAAAGGTAGAAGCTG	59,75	58,36	90	2049
hs-TLR2 (114)	TLR2	toll-like receptor 2	CTCTTCACTGCTTCAACTG	GAGGATTCTCCTTGAGAG	59,96	59,37	114	-
hs-Nod2 (129)	Nod2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2	CATGTTCAGGAATTACCAGTC	TCTCTGCTCCATCATAGGT	58,92	59,49	129	2727

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Zellkultur

Die Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, in RPMI-1640-Medium, welches mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS (56 °C, 30 min) versetzt wurde, in 175-cm<sup>2</sup>- oder 75-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Zum Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Da es sich bei den eingesetzten Mammakarzinom-Zelllinien um adhärente Zellen handelt, wurden sie im Anschluss durch 5 minütige Inkubation bei 37 °C mit einer 10 %igen Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst und anschließend zur Neutralisation des Trypsins in 10 ml serumhaltigem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden dann 1:5 bzw. 1:10 verdünnt ausgesät.

#### 3.1.2 Zellzahl-Bestimmung

Für eine Zellzahl-Bestimmung wurden die Zellen trypsiniert und in 10 ml Medium aufgenommen. Ein Aliquot von 10 µl wurde entnommen und die Zellzahl in einer Neubauer-Improved-Zählkammer ermittelt. Dazu wurden die Zellen in den vier Großquadraten ausgezählt, das Ergebnis gemittelt und anschließend die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

Mittelwert der Zellen in einem Großquadrat × Verdünnungsfaktor × 10<sup>4</sup> = Zellzahl/ml

#### 3.1.3 Isolation von Monozyten aus dem Blut

Das Ausgangsmaterial zur Isolation von peripheren Monozyten aus dem Blut, wie sie von Seager *et al.* beschrieben wurde, stellten die *buffy coats* gesunder Blutspender dar (Seager *et al.* 2004). Den sogenannten *buffy coat*, welcher neben Resten von Erythrozyten zu einem Großteil Thrombozyten und Leukozyten enthält, gewinnt man neben den Erythrozytenkonzentraten und den Blutplasmaanteilen aus Vollblutspenden. Die Auftrennung der Vollblutspende in diese verschiedenen zellulären und humoralen

Fraktionen erfolgte durch Zentrifugation in der Abteilung Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Göttingen. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Gradientenzentrifugation mit zwei unterschiedlichen Dichtegradienten.

Dabei wurde der *buffy coat* in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS + 1 mM EDTA versetzt und anschließend 33 ml dieser Suspension vorsichtig auf 15 ml Ficoll/Biocoll-Lösung geschichtet. Die Dichte des Trennmediums Ficoll/Biocoll-Lösung beträgt 1,077 g/ml, wodurch bei anschließender Zentrifugation bei 400×g für 30 min ohne Bremse Zellen gleicher oder geringerer Dichte sich oberhalb des Trennmediums abschieden und eine Interphase bildeten, während Zellen höherer Dichte, d. h. Erythrozyten und Granulozyten, sedimentierten. Die Interphase wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen, mit PBS + 1 mM EDTA in einem Verhältnis von 1:1 versetzt und gevortexet.

Im folgenden Schritt der Thrombozytendepletion wurden die mononukleären Zellen von den mitüberführten Thrombozyten und Blutplasmaanteilen abgetrennt. Dazu wurde die Lösung bei 200×g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das gewonnene Zellpellet erneut mit PBS + 1 mM EDTA im Verhältnis 1:1 gewaschen und danach erneut bei 300×g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden alle Zellpellets in RPMI-1640-Medium (ohne Phenolrot) aufgenommen und vereinigt, damit sie ihm letzten Schritt der Monozytenisolation über 25 ml einer 46 % iso-osmotischen Percoll-Lösung geschichtet und bei 550×g für 30 min ohne Bremse zentrifugiert werden konnten. Die dabei entstandene Monozyten-Interphase wurde abgenommen, mit PBS + 1 mM EDTA im Verhältnis 1:1 versetzt und anschließend bei 400×g für 10 min zentrifugiert.

Für die Makrophagendifferenzierung wurden die Zellpellets in 20 ml RPMI + 10 % FCS aufgenommen, sorgfältig resuspendiert und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Danach wurden jeweils  $1,0 - 1,5 \times 10^8$  Monozyten in einen großen und  $3 - 5 \times 10^7$  Monozyten in einen kleinen Zellkulturbeutel (*VueLife Cell Culture Bags*) nach Zusatz von 2,5 ng/ml M-CSF ausgesät. In den aus Fluor-Ethylen-Propylen (FEP) bestehenden, teflonbeschichteten Zellkulturbeutel wurden die Zellen für sieben Tage bei 37 °C und bei 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Pellet mit den differenzierten Makrophagen in RPMI-1640 Medium + 1 % FCS kultiviert. Die Makrophagen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und entsprechend dem Versuchsaufbau ausgesät.

### 3.1.4 Isolation von Knochenmarksmakrophagen aus der Maus

Die Isolation der Knochenmarksmakrophagen (BMDM, *bone marrow-derived macrophages*) aus der Maus erfolgte nach einer modifizierten Methode, wie von Reiling *et al.* beschrieben (Reiling *et al.* 2001).

Zur Isolation der BMDM wurden 8 - 12 Wochen alte NMRI-Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden getötet, mit Ethanol (EtOH) desinfiziert und auf einer Styroporplatte fixiert. Anschließend wurden die Femora präpariert und von anhaftenden Geweberesten befreit und das Knochenmark durch Abschneiden der Femurepiphyse eröffnet. Danach wurde unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Insulinkanüle Gr. 17 das Knochenmark mit 10 ml Pluznik-Medium ausgespült und über Nacht in einer 10-cm-Zellkultur-Petrischale bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium in ein neues Gefäß überführt, wodurch die BMDM von den restlichen Zellen des Knochenmarks, welche über Nacht am Boden der beschichteten Petrischale adhärirt waren, getrennt wurden. Um die BMDM von den übrigen Knochenmarksresten zu trennen, wurde das Kulturmedium bei 2000×g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in 40 ml Pluznik-Medium aufgenommen. Die daraus entstandene Zellsuspension wurde in vier unbeschichteten 10-cm-Petrischalen ausgesät. Die Zellen wurden anschließend für sechs Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei nach drei Tagen ein Mediumwechsel erfolgte. Danach wurden die Zellen mit Accutase-Lösung von den Petrischalen gelöst, erneut in Pluznik-Medium aufgenommen und bei 2000×g für 10 min zentrifugiert. In Vorbereitung für die Experimente wurde das Zellpellet in 15 - 20 ml DMEM + 10 % FCS + 15 % konditioniertes L929 aufgenommen. Anschließend wurden die BMDM in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Zellen, je nach Versuchsaufbau ausgesät. Dabei wuchsen die BMDM in Anwesenheit von M-CSF, welches von L929-Zellen sekretiert und in Form des konditionierten L929-Mediums genutzt wurde (Pfannes *et al.* 2001).

### 3.1.5 Isolation von Mikrogliazellen aus der Maus

Mikrogliazellen wurden von der Arbeitsgruppe um U.-K. Hanisch aus der Abteilung Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Die Isolation der

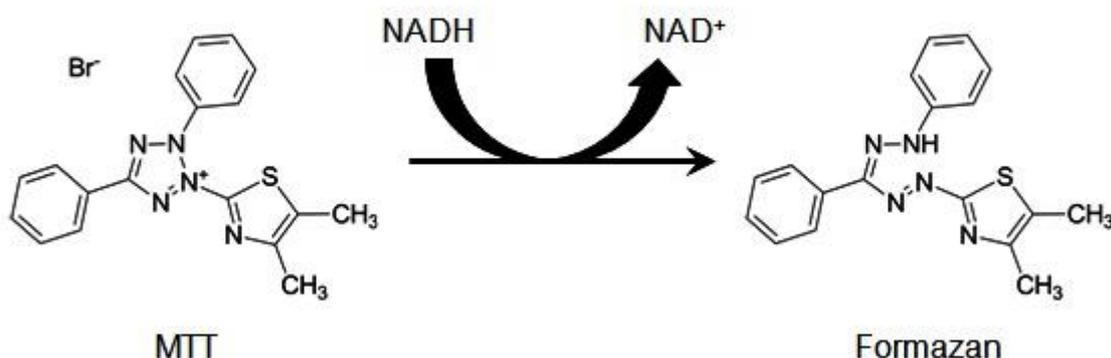
Mikrogliazellen aus der Maus erfolgte nach dem folgenden Protokoll (Giulian und Baker 1986; Regen *et al.* 2011):

Das Gehirn von neugeborenen (P0) NMRI-Mäusen wurde freipräpariert und unter dem Mikroskop vorsichtig von Hirnhäuten und Blutgefäßen befreit. Anschließend wurden die fertigpräparierten Gehirne gewaschen und zur Auflösung in 2,5 % Trypsin-EDTA bei 37 °C für 10 min inkubiert. Die Suspension wurde dabei vorsichtig geschüttelt. Zum Stoppen der Reaktion, wurde 0,4 mg/ml DNase zugefügt und die Zellsuspension für weitere 5 min inkubiert. Abschließend wurde die Zellsuspension für 10 min und 900 rpm bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 10 - 14 Tage in Zellkulturflaschen, die mit 200 µg/ml Poly-L-Lysin beschichtet waren, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dabei erfolgte ein täglicher Mediumwechsel. Durch sequentielle Adhäsion wurden die Mikroglia von den Astrozyten isoliert. Diese Methode basiert auf einem unterschiedlichen Adhäsionsverhalten von Mikroglia und Astrozyten.

## 3.2 Messung der Viabilität und Proliferation eukaryotischer Zellen

### 3.2.1 MTT-Assay

Zur Messung der Viabilität der Zellen wurde ein MTT-Assay benutzt (Mosmann 1983). Dabei wird der gelbe Farbstoff 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch Reduktion in den blau-violetten Farbstoff Formazan umgewandelt. Diese Reduktion wird durch NAD(P)H-abhängige Enzyme im endoplasmatischen Retikulum katalysiert und ist somit nur in viablen Zellen mit einem aktiven Metabolismus möglich (Berridge *et al.* 1996). Dabei ist die Menge an Formazan direkt proportional zu der Anzahl an viablen Zellen.



**Abb. 3.1: MTT-Reaktion.**

Darstellung der Struktur des MTT-Moleküls und des Farbstoffes Formazan sowie der Umwandlungsreaktion. Aus Sittampalam *et al.* 2004. Mit Genehmigung einer Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported Lizenz.

Für das MTT-Assay wurden Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in 24-Well-Platten ausgesät. Je nach Zelllinie wurden dabei für MDA-MB-231, SK-BR-3, MCF-7 und für 410.4  $5 \times 10^4$  Zellen/Well in 1 ml DMEM + 10 % FCS, für BMDMs  $1 \times 10^5$  Zellen/Well in 1 ml DMEM + 10 % FCS + 15 % L929 sowie für humane Makrophagen  $1,5 \times 10^5$  Zellen/Well in 1 ml RPMI + 1 % FCS ausgesät.

Die Platten wurden für 4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, damit die Zellen am Plattenboden adhären konnten und anschließend mit der zu testenden Substanz behandelt. Danach wurden die Platten für weitere für 96 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und 500 µl MTT-

Gebrauchslösung (1:10 verdünnte Stammlösung in jeweiligem Medium) auf die Zellen gegeben und die Zellen für weitere 4 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Da das Formazan als unlösliches Präzipitat innerhalb der Zellen vorliegt, wurde danach die MTT-Gebrauchslösung abgesaugt und 500 µl MTT-Lysepuffer auf die Zellen in jedes Well gegeben und mit einer Pipette gut durchmischt, bevor eine Mikrotiterplatte mit je 3 x 100 µl aus jedem Well befüllt wurde, wobei die MTT-Lyselösung als Leerwert diente. Abschließend wurde der Gehalt des umgesetzten Substrats im Plattenphotometer bei 550 nm gemessen.

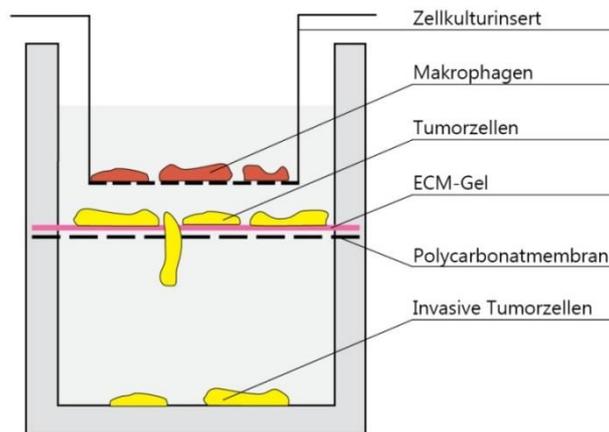
### **3.2.2 Proliferationsmessung mittels xCELLigence**

Das xCELLigence erlaubt ein dynamisches Monitoring und wurde als zusätzliche Methode zur Messung von Zellproliferation und Viabilität in Echtzeit genutzt. Das System nutzt eine elektronische Impedanzmessung, um nicht-invasiv die Proliferation und Viabilität von adhärennten Zellen in Echtzeit zu messen. Die Interaktion der Zellen mit goldbeschichteten Mikrosensoren im Boden der Platten generiert eine elektrische Impedanzänderung, welche sowohl mit der Zellviabilität als auch der Anzahl der Zellen korreliert. Die Messung der Impedanz wird als sogenannter Zell-Index angezeigt.

Für die Experimente wurden, je nach Zelllinie, Zellen in einer Dichte von  $1 \times 10^3$  –  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well in E16-Platten ausgesät und für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz stimuliert.

### 3.3 Zell-Invasions-Assay in einer modifizierten Boyden-Kammer

Der Zell-Invasions-Assay wurde mit Hilfe einer erstmals von Hagemann *et al.* beschriebenen, modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt (Hagemann *et al.* 2004). Im Wesentlichen besteht die Kammer aus zwei Kompartimenten. Dabei wurde der untere Teil der Kammer, welcher mit RPMI-1640 + 10 % FCS (1 % für Kokultur-Experimente bzw. + L929 bei BMDM-Versuchen) gefüllt war von einer, mit ECM-Gel (1:4 verdünnt in serumfreien RPMI-1640) beschichteten, Polycarbonatmembran (Porendurchmesser: 10  $\mu\text{m}$ , Pieper Filter) vom oberen Teil der Kammer getrennt. In den oberen Teil der Kammer, wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Tumorzellen von MDA-MB-231, MCF-7, 410.4, EO771LG ausgesät. Durch die Membranporen ist ein Flüssigkeitsaustausch zwischen den zwei Kompartimenten zwar möglich, Zellen können die Membran jedoch nur durch aktive Invasion überwinden. Zur Messung der Tumordinvasion wurden die Tumorzellen gezählt, welche durch die künstliche Membran in den unteren Teil invadierten. Um den Einfluss von Makrophagen auf die Tumordinvasion zu beurteilen, wurden jeweils  $1,5 \times 10^5$  Zellen BMDM oder MG in Zellkulturinserts ausgesät, mit MTP-PE oder L-MTP-PE stimuliert und in den oberen Teil der Kammer für 96 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> ko-kultiviert. Dabei besteht die Möglichkeit parakriner Kommunikation zwischen den Tumorzellen und den Makrophagen, ohne dass es dabei zu einem Zell-zu-Zell-Kontakt kommt. Anschließend wurde das Zellkulturinsert entnommen und das Medium mit adhären und flottierenden Zellen im unteren Teil der Kammer resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1000  $\mu\text{l}$  PBS aufgelöst und die Zellen unter einem Mikroskop (10x Vergrößerung) mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dabei wurden die medikamentös behandelten Kammern mit einer unbehandelten Kammer als Kontrolle verglichen.



**Abb. 3.2: Modifizierte Boyden-Kammer.**

Die Tumorzellen wurden in den oberen Teil der modifizierten Boyden-Kammer ausgesät und je nach Experiment mit oder ohne Makrophagen ko-kultiviert. Bei der Kokultur mit Makrophagen ist durch die Zellinserts kein Zell-zu-Zell-Kontakt, sondern lediglich eine parakrine Kommunikation möglich. Gezählt wurden die Tumorzellen, welche nach 96 h durch die ECM-Membran in den unteren Teil der Kammer invadierten.

### 3.4 Nachweis von Nitrit in Zellkulturüberständen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger physiologischer Botenstoff in vielen biologischen Systemen. Unter anderem setzen auch aktivierte Makrophagen, als Bestandteil des immunologischen Systems, NO frei.

Die Messung von Nitrit (NO<sub>2</sub>) als Abbauprodukt von NO ermöglicht es, Rückschlüsse auf die NO-Bildung zu ziehen. Der Nachweis beruht auf der Diazotierungsreaktion, welche erstmals von Griess 1879 beschrieben wurde (Griess 1879). Dabei reagiert das Nitrit im Zellkulturüberstand mit dem Griess-Reagenz, wodurch es zu einem rosa Farbumschlag im Zellkulturüberstand kommt.

Für den Griess-Test wurden Makrophagen mit der zu testenden Substanz für 24 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 15.000×g für 1 min zentrifugiert. Von den dabei entstandenen Überständen wurden 100 µl/Well auf eine Mikrotiterplatte pipetiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Standard im Bereich von 0 - 80 µM mit Hilfe einer Verdünnungsreihe generiert. Hierfür wurde Medium des Kulturversuches mit Na-Nitrit-Stocksolution (= 80 µM) verdünnt und jeweils 100 µl/Well auf dieselbe Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von 100 µl/Well des Griess-Reagenzes wurde die Menge der umgesetzten Substanz mit einem Plattenphotometer bei 550 nm gemessen.

## 3.5 Genexpressionsanalysen

### 3.5.1 RNA-Isolation von eukaryotischen Zellen

Zur RNA-Isolation aus eukaryotischen Zellen wurde das *high pure RNA isolation kit* (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Für die RNA-Isolation wurden jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen/Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Nach 4 h Inkubation, wodurch die Zellen adhären konnten, wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit der zu testenden Substanz stimuliert. Für die RNA-Isolation aus humanen Makrophagen wurde vor der Zellaussaat ein Coating mit ECM durchgeführt. Hierfür wurden 80 µl ECM (in Verdünnung 1:16 in Serumfreien RPMI-1640) in jedes Well gegeben, mit einem Zellschaber verteilt und für 30 min bei Raumluft getrocknet. Anschließend wurden ebenfalls  $1 \times 10^6$  Makrophagen pro Well ausgesät, nach 4 h Inkubation mit 1 ml PBS gewaschen und mit der zu behandelten Substanz stimuliert.

### 3.5.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren wurde mit dem NanoDrop ND-1000 durchgeführt.

### 3.5.3 Reverse Transkription

Für die Analyse der Genexpression wurde die RNA mit Hilfe der reversen Transkription in die komplementäre DNS (cDNA) transkribiert. Dazu wurde das iScript cDNA-Synthese-Kit nach Herstellerangaben genutzt. Der Reaktionsmix wurde wie folgt hergestellt:

**Tab. 3.1: Für die reverse Transkription**

<i>Der Reaktionsansatz wurde wie folgt vorbereitet:</i>	
5x iScript <i>reaction mix</i>	4 µl
iScript <i>reverse transcriptase</i>	1 µl
RNA <i>template</i> (1 µg)	x µl
Nukleasefreies Wasser	y µl
Totales Volumen	20 µl

Der gesamte Reaktionsmix wurde anschließend in dem Thermocycler für 5 min bei 25 °C, dann für 30 min bei 42 °C, gefolgt von 5 min bei 85 °C, inkubiert. Zur Aufbewahrung wurde jede Probe in einem Verhältnis von 1:5 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### 3.5.4 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Veränderungen der Genexpression wurden in der quantitativen *real-time* PCR (qRT-PCR) analysiert. Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), ermöglicht jedoch zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR-Green*. Die Messung der Fluoreszenz wird in Echtzeit durchgeführt, weshalb die Methode den Beinamen *real-time* trägt.

Nach Aktivierung der *Hot-Start*-Polymerase wurde das zu untersuchende Gen (*gene of interest*, GOI) in 40 Zyklen amplifiziert, wobei nach jedem Zyklus das Fluoreszenzsignal von *SYBR-Green* gemessen wird. Dabei lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green* durch Interkalierung in doppelsträngige DNA, wodurch das Fluoreszenzsignal von Zyklus zu Zyklus proportional mit der Menge der gefärbten PCR-Produkte zunimmt. Der Zyklus, in welchem das Fluoreszenzsignal exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt und einen Schwellenwert (*threshold*) überschreitet, wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) bezeichnet und von den Referenzwerten der *Housekeeper*-Gene abgezogen (=ΔCt Wert). Anschließend wurden die ΔCt-Werte der stimulierten Proben mit dem ΔCt-Wert einer unstimulierten Kontrolle verglichen (=ΔΔCt Wert). Der ΔΔCt Wert wurde genutzt, um mit folgender Gleichung die relative Genexpression des zu untersuchenden Genes zu berechnen:

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Die benutzten Primer wurden wie unter 3.5.4.1 beschrieben, designed und sind in Tab. 2.7 aufgelistet. Im humanen System wurde die Expression der Proben auf die Expression der *Housekeeping*-Gene HPRT1 und GNB2L1 und im murinen System auf GAPDH- und TBP-Expressionen genormt. Für jedes Gen wurde aus dem vorbereiteten PCR-Reaktionsmix 8 µl als technisches Triplikat in eine 384-Well-Platte pipettiert. Zudem wurde in jedes Well 2 µl der in nukleasefreiem Wasser verdünnten cDNA (10 ng/µl) hinzugegeben.

**Tab. 3.2: Standard qRT-PCR-Protokoll**

<i>Standard qRT-PCR Protokoll:</i>			
Aktivierung der Taq-Polymerase	95 °C	12 min	40 Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 sec	
Primerhybridisierung und Elongation	60°	1 min	
Analyse der Schmelzkurve	95 °C	15 sec	
	60 - 95 °C	2 °C/min	

**Tab. 3.3: SYBR-Green-Mastermix**

<i>SYBR-Green-Mastermix:</i>	
Alle Lösungen wurden mit nukleasefreiem Wasser vorbereitet, abgesehen von Trehalose-Lösung, welche in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert wurde.	
10x PCR-Puffer	2,5 ml
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 ml
SYBR-Green (1:100)	31.3 µl
20 mM dNTP mix	250 µl
5 U/µl Taq-Polymerase	100 µl
10 % Triton X-100	652 µl
1 M Trehalose	7,5 ml

**Tab. 3.4: PCR-Reaktionsmix**

<i>PCR-Reaktionsmix:</i>	
SYBR-Green-Mastermix	5,6 µl
fw-primer (10 µM)	0,3 µl
rv-primer (10 µM)	0,3 µl
Nukleasefreies Wasser	1,8 µl

Die qRT-PCR wurde mit dem Programm SDS-Version 2.4 (Applied Biosystems) ausgewertet und  $\Delta\text{Ct}$ -Werte oder relative  $\Delta\text{Ct}$ -Werte als Graphiken mit GraphPad Prism für Windows (Version 5.04, GraphPad software) dargestellt.

#### 3.5.4.1 Etablierung von Primern für die qRT-PCR

Die Primerpaare für die qRT-PCR wurden mit PerlPrimer-Version 1.1.21 kreiert (Marshall 2004). Da für die Analyse der relativen Genexpression mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode eine vergleichbare Amplifikationseffizienz von 100 % wichtig ist, wurden die selbstkreierten Primer anschließend auf ihre Effizienz getestet. Hierfür wird zunächst eine geeignete Positivkontrolle benötigt, wozu die Expression des gewünschten Gens in den verschiedenen Geweben/Zelllinien aus der BioGPS-Datenbank herausgesucht wurde (Wu *et al.* 2009). Aus der ausgewählten Positivkontrolle wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Zur Austestung der Primer-Effizienz wurde eine Standardreihe der Kontroll-cDNA benötigt. Dazu wurde eine Verdünnungsserie mit bekannten cDNA-Konzentrationen vorbereitet.

Nach erfolgter qRT-PCR konnten mit Hilfe des Programms SDS-Version 2.4 die Ct-Werte ermittelt und eine Standardkurve erstellt werden. Anhand der Steigung der Standardkurve konnte die Primer-Effizienz entsprechend folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$$

Bei einer Steigung von -3,32 ergibt sich dabei eine Effizienz von 100 %. Für die weitere Analyse mittels qRT-PCR wurden nur Primer mit einer Effizienz zwischen 90 – 110 % genutzt.

Des Weiteren wurde die Schmelzkurve der zu testenden Primer auf Primer-Dimere oder unspezifische Signale überprüft und die PCR-Produkte zur Bestätigung auf 2% Agarosegel visualisiert.

#### 3.5.4.2 Visualisierung der qRT-PCR-Produkte auf Agarosegel

Die Agarosegel-Elektrophorese eignet sich besonders zur Visualisierung der genspezifischen PCR-Produkte, da aufgrund der negativen Ladungen die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Dazu wurden 2 % (w/v) Agarose HEEO Ultra in TAE-Puffer (1x) durch Aufkochen gelöst und nach 2 - 5 minütigem Abkühlen wurde ca. 0,1 % (v/v) *SERVA DNA Stain G* zugesetzt. Der Farbstoff interkaliert in DNA, was zur Emission eines grünlichen Fluoreszenzsignals führt. Die Agarosegel-Lösung wurde in eine horizontale Elektrophorese-

Kammer gegossen und für 30 min inkubiert, bis die Polymerisation abgeschlossen war. Das Agarosegel wurde nach vollständigem Aushärten in der Laufkammer mit TAE-Puffer überschichtet.

Nach erfolgter qRT-PCR wurden die technischen Triplikate eines amplifizierten Genes gepoolt und in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurden 10 µl jeder DNA-Probe mit 2 µl 6x Ladepuffer versetzt und anschließend eine Laufkammer damit beladen. Um die korrekte Größe des amplifizierten Genprodukts bestimmen zu können, wurde ein Größenstandard hinzugefügt. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V für 45 min durchgeführt und anschließend unter einem UV-Transilluminator betrachtet.

### **3.6 Statistik**

Bei allen Experimenten wurden die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) aus mindestens drei biologischen Replikaten dargestellt. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten t-Test berechnet. Ergebnisse mit einem p-Wert  $< 0,05$  wurden als signifikant angesehen. Die Grafiken wurden mit Hilfe von GraphPad Prism (Version 5.04, GraphPad software) dargestellt.

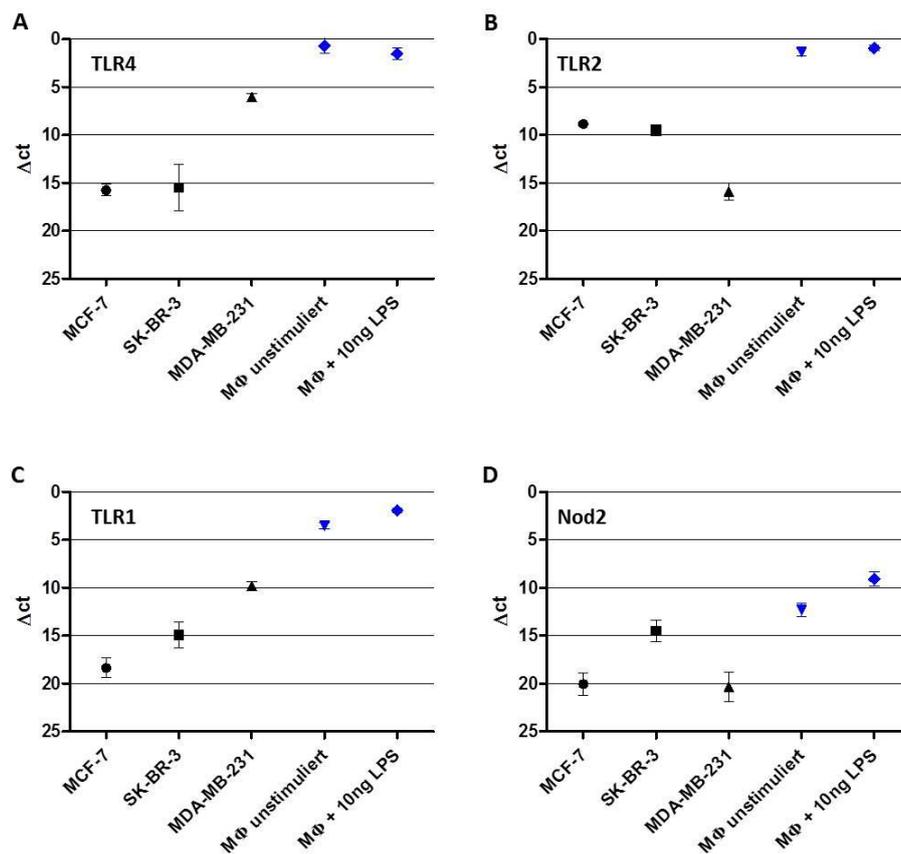
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der TLR- und Nod2-Rezeptorexpression in Brustkrebszellen und Makrophagen

Der Wirkstoff Mifarmutid ist ein Immunmodulator, der zur Aktivierung von Monozyten und Makrophagen führt (Fogler und Fidler 1987). Bislang konnte der Wirkungsmechanismus noch nicht vollständig geklärt werden. Verschiedene Studien lassen jedoch vermuten, dass Mifamurtid entweder über einen TLR-Rezeptor oder über den Nod2-Rezeptor wirkt (Girardin *et al.* 2003; Meshcheriakova *et al.* 2010). Es konnte bereits generell gezeigt werden, dass die Stimulation beider Rezeptorarten zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs führt, was in der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen resultiert (Takeda und Akira 2004). Trotz verschiedener Hinweise, dass die Wirkung von Mifamurtid auf die Aktivierung der Makrophagen zurückzuführen ist, konnte auch ein direkter Einfluss des Wirkstoffes auf Mammakarzinomzellen bislang nicht vollständig ausgeschlossen werden (Barnich *et al.* 2005; Fidler *et al.* 1982; Inohara und Nunez 2003). In der Literatur gibt es unterschiedliche Ergebnisse zum Expressionsprofil dieser Rezeptoren in Brustkrebszelllinien (Xie *et al.* 2009; Yang *et al.* 2010). Aus diesem Grund soll das Expressionsprofil der Rezeptoren, die für die Wirkung von Mifamurtid verantwortlich sein könnten, hier zunächst näher analysiert werden. Dazu wurde die Genexpression der *Toll-like*-Rezeptoren TLR1, TLR2 und TLR4 sowie des Nod2-Rezeptors in verschiedenen Brustkrebszelllinien sowie in stimulierten und unstimulierten Makrophagen mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene untersucht. Entsprechend der Unterteilung von Mammakarzinomen in Her2-positive, ER-positive und tripel-negative Karzinome wurde die Her2-positive SK-BR-3 Zelllinie, die ER-positive MCF-7 Zelllinie und die tripel-negative MDA-MB-231 Zelllinie für diese Analysen verwendet.

Um die mRNA Expression der Rezeptoren in den verschiedenen Zelllinien vergleichen zu können, wurde der  $\Delta$ Ct-Wert ermittelt. Dieser Wert ergibt sich aus der Differenz des Ct-Wertes des zu untersuchenden Gens (GOI) und dem Referenzwert der *housekeeper*-Gene. Somit repräsentiert ein  $\Delta$ Ct-Wert von 0 eine hohe Expression, während ein  $\Delta$ Ct-Wert von 20 eine geringe Genexpression darstellt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 4.1 dargestellt und zeigen eine hohe Expression aller untersuchten TLRs bei den humanen Makrophagen (M $\Phi$ ) sowie eine hohe Expression von TLR4 und TLR1 bei den hochmalignen triple-negativen MDA-MB-231. Die Her2-positiven SK-BR-3 und die ER-positiven MCF-7 zeigten gegenüber den MDA-MB-231 eine erhöhte Expression von TLR2. Die SK-BR-3 zeigen gegenüber den anderen Brustkrebszelllinien wiederum eine erhöhte Expression von Nod2. Wie zu erwarten, sind alle untersuchten Rezeptoren bei den Makrophagen am stärksten exprimiert, wobei generell in allen Zelllinien Nod2 schwächer exprimiert ist als die TLR-Rezeptoren.



**Abb. 4.1: TLR- und Nod2-Genexpression in Tumorzelllinien und M $\Phi$ .**

qRT-PCR von **hs-TLR4 (A)**, **hs-TLR2 (B)**, **hs-TLR1 (C)** und **hs-Nod2 (D)** in den auf der x-Achse gekennzeichneten Zellen. Auf der y-Achse ist der  $\Delta$ ct –Wert als Mittelwert von drei Experimenten  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Insgesamt haben die qRT-PCR Analysen gezeigt, dass die Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR4 und Nod2 in unterschiedlichem Ausmaß auch in den verschiedenen Mammakarzinomzelllinien exprimiert werden.

## 4.2 Die Rolle der Makrophagen bei der Invasion und Metastasierung von Brustkrebszellen

Innerhalb von drei Jahren nach Diagnosestellung entwickeln bis zu 15 % aller Brustkrebspatienten mit fortgeschrittenem Verlauf Metastasen (Weigelt *et al.* 2005). In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass Makrophagen nicht nur in den ersten Schritten der Tumorprogression eine kritische Rolle spielen, sondern auch an der Tumormetastasierung beteiligt sind (Fidler *et al.* 1982; Hagemann *et al.* 2004; Lin *et al.* 2001; Wyckoff *et al.* 2004). Zuletzt konnten Pukrop *et al.* nachweisen, dass nicht nur TAMs, sondern auch die residenten Makrophagen im Gehirn, die Mikroglia, die Invasion von Mammakarzinomzellen ins Hirngewebe unterstützen (Pukrop *et al.* 2010).

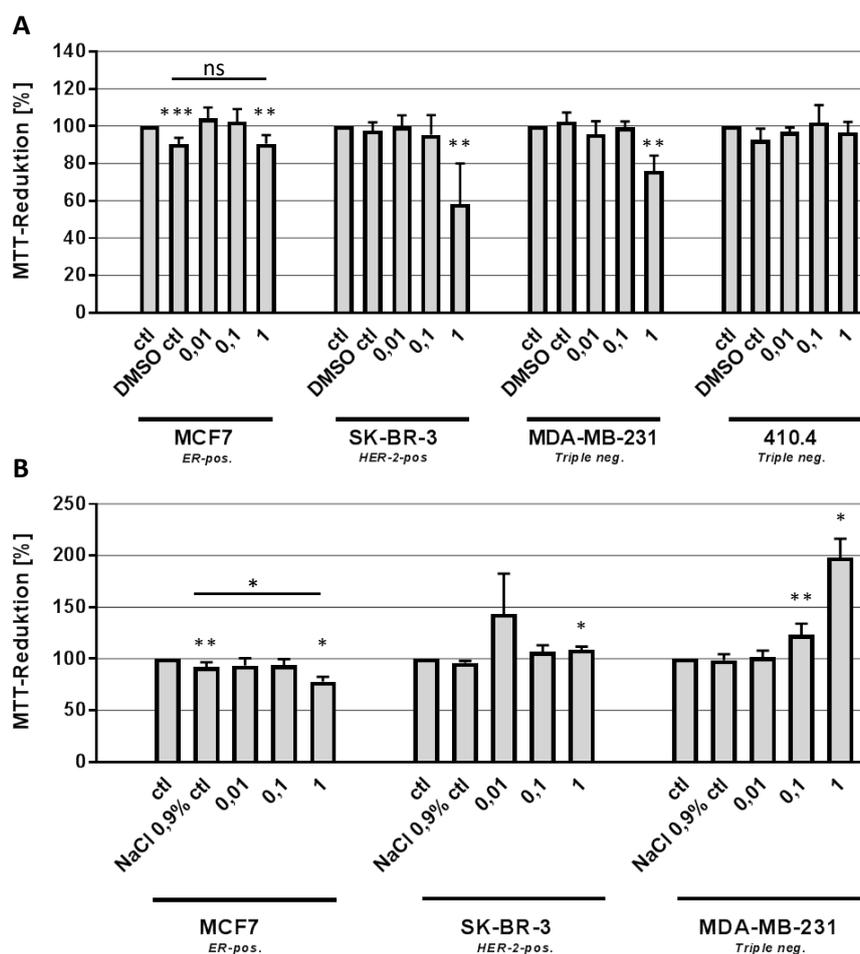
Für die Analyse der Wirkung von Mifamurtid auf die Makrophagen-induzierte Tumordinvasion sollte zuerst eine therapeutische Konzentration eruiert werden, welche die Makrophagen möglichst stimuliert, jedoch nicht toxisch wirkt. Da bei der Charakterisierung der Rezeptoren gezeigt werden konnte, dass auch Brustkrebszellen die potentiellen Rezeptoren auf mRNA-Ebene exprimieren, sollte anschließend der direkter Einfluss auf die Tumorzellen durch Mifamurtid untersucht werden. Abschließend sollte der Einfluss von Mifamurtid auf die Makrophagen-induzierte Invasion von Brustkrebszellen durch humane Makrophagen (MΦ), als TAMs, sowie der residenten Makrophagen im Gehirn, der Mikroglia, analysiert werden. Generell sollte hier die Frage geklärt werden, ob der Wirkstoff direkt auf die Mammakarzinomzellen wirkt oder die Wirkung über eine Stimulation der Makrophagen hervorgerufen wird.

### 4.2.1 Toxizität von Mifamurtid gegenüber Brustkrebszellen und Makrophagen

Um einen Einfluss von freiem und liposomalem Mifamurtid (MTP-PE und L-MTP-PE) auf die Tumordinvasion nachzuweisen, musste zuerst ein toxischer Effekt des Wirkstoffes auf Tumorzellen und Makrophagen abgegrenzt werden. Dazu wurde durch Viabilitätstests eine Konzentration von MTP-PE und L-MTP-PE bestimmt, welche die Makrophagen stimuliert, jedoch keine toxischen Effekte auf die Tumorzellen zeigt. Dies gelang durch Toxizitätsmessungen mit Hilfe von MTT-Assays (s. Abb. 4.2 und Abb. 4.4) und Proliferationsmessungen unter Verwendung von xCELLigence (s. Abb. 4.3 und Abb. 4.5). Dabei wurden die humanen Tumorzelllinien MCF-7, SK-BR-3 und MDA-MB-231, die murine triple-negative

Tumorzelllinie 410.4, die murinen Makrophagen (BMDM), sowie humane Makrophagen (MΦ), für 96 h mit unterschiedlichen MTP-PE- und L-MTP-PE-Konzentrationen behandelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.2 - Abb. 4.5 dargestellt.

Um eine Toxizität des Lösungsmittels auf die Zellen auszuschließen, wurden die Zellen in der Kontrolle mit der höchsten hier verwendeten Konzentration der jeweiligen Trägerlösung (DMSO bzw. NaCl 0,9 %) behandelt. Bei den Experimenten mit MTP-PE wurde dementsprechend eine Konzentration von 1 µg/ml DMSO und bei den Versuchen mit L-MTP-PE wurde 10 µg/ml NaCl 0,9 % als Kontrolle verwendet.



**Abb. 4.2: Stoffwechselaktivität der Tumorzelllinien.**

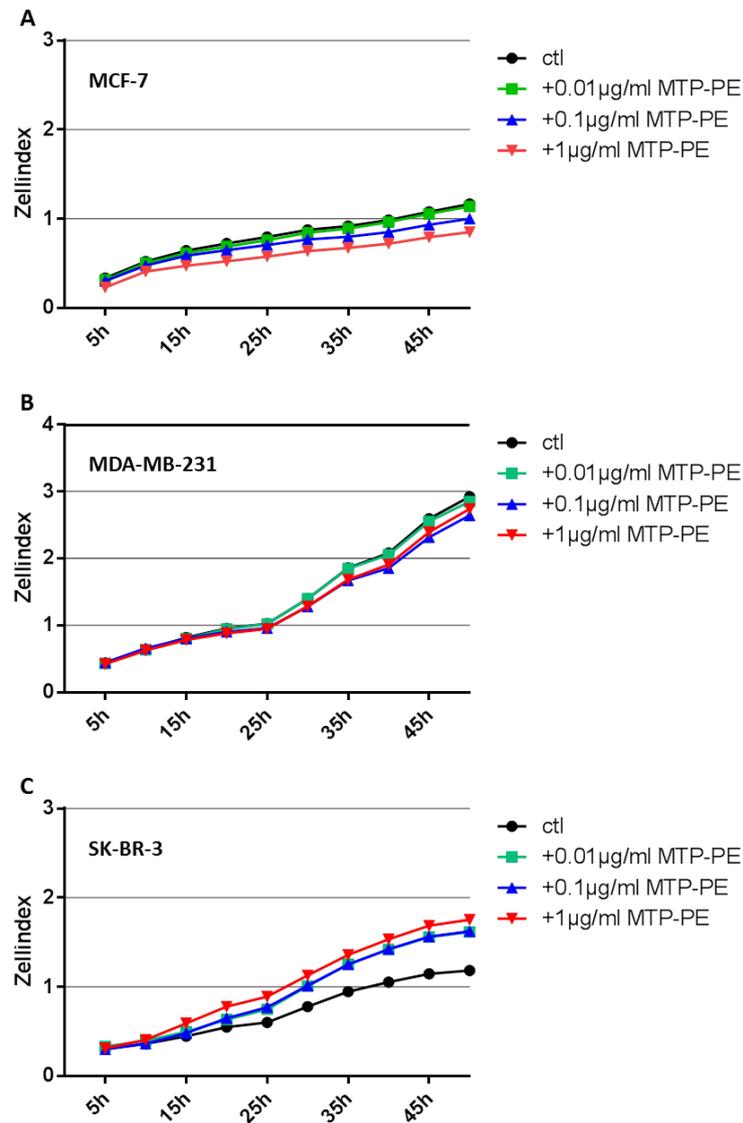
**MCF-7, SK-BR-3, MDA-MB-231 und 410.4 nach MTP-PE Behandlung (A).**

**MCF-7, SK-BR-3 und MDA-MB-231 nach L-MTP-PE Behandlung (B).**

$5 \times 10^4$  Tumorzellen wurden für 96 h mit den auf der x-Achse gekennzeichneten MTP-PE bzw. L-MTP-PE Konzentrationen behandelt, bevor der MTT-Assay durchgeführt wurde. Nicht behandelte Zellen und Zellen mit DMSO bzw. NaCl 0,9 % dienten als Kontrolle (ctl, DMSO ctl, NaCl 0,9 % ctl). Auf der y-Achse ist die relative MTT-Reduktion als Mittelwert von drei Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten dargestellt. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

Wie in Abbildung 4.2 gezeigt, reagieren die Tumorzelllinien SK-BR-3 ( $p = 0,0023$ ) und MDA-MB-231 ( $p = 0,0028$ ) sensitiv auf eine MTP-PE-Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$ , was sich durch eine signifikant reduzierte Viabilität zeigt. Dahingegen konnte bei der murinen Tumorzelllinie 410.4 auch bei der höchsten hier verwendeten Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  MTP-PE keine signifikante Reduktion der Viabilität nachgewiesen werden. Bei MCF-7 konnte bei der Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  MTP-PE bezogen auf die Kontrolle eine signifikante Reduktion ( $p = 0,0039$ ) nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich auch eine signifikante Reduktion ( $p = 0,0009$ ) durch die Trägerlösung. Bezieht man die Viabilität bei der Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  MTP-PE auf die Trägerlösung (DMSO ctl), findet sich auch bei MCF-7 kein signifikanter Unterschied. Bei den MTT-Assays mit L-MTP-PE konnte auch eine signifikante Reduktion der Viabilität von MCF-7 bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  ( $p = 0,0165$ ) sowie der Trägerlösung NaCl ( $p = 0,0043$ ) gezeigt werden. Jedoch fand sich hier auch eine signifikante Reduktion der Viabilität bei der Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  in Bezug auf die Trägerlösung NaCl ( $p = 0,0210$ ). Des Weiteren konnte unter der Stimulation mit L-MTP-PE eine signifikante konzentrationsabhängige Steigerung bei MD-MB-231 ( $p = 0,0013$  bei  $0,1 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,0114$  bei  $1 \mu\text{g/ml}$ ) und eine signifikante Steigerung der Viabilität von SK-BR-3 bei  $1 \mu\text{g/ml}$  L-MTP-PE ( $p = 0,0429$ ) beobachtet werden (s. Abb. 4.1).

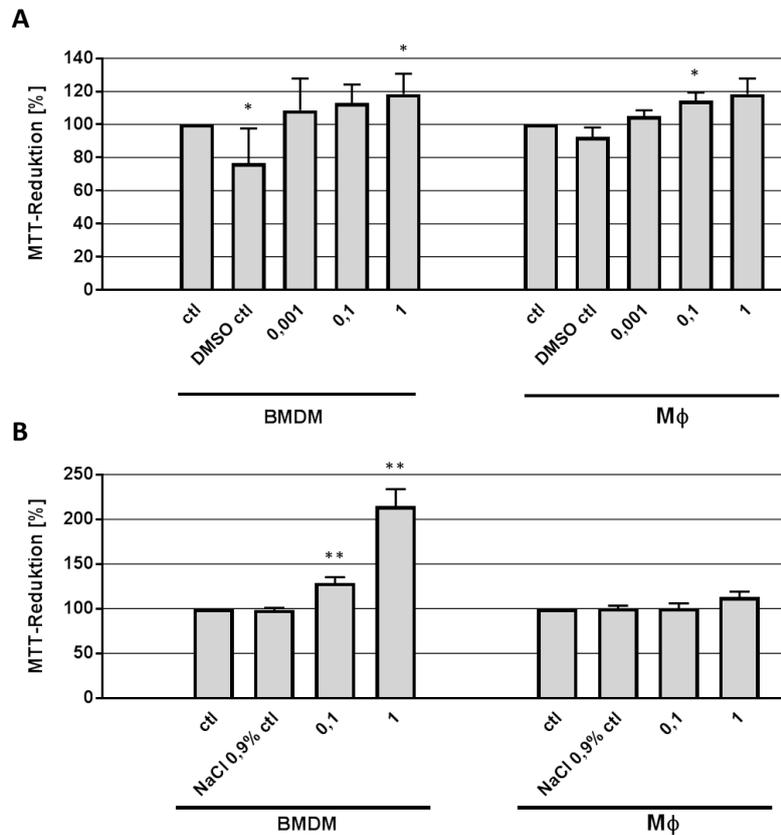
Bei den Proliferationsmessungen mit xCELLigence (s. Abb. 4.3) fand sich bei keiner der getesteten MTP-PE-Konzentrationen eine Inhibition der Tumorzellproliferation. Jedoch konnte bei SK-BR-3 eine Proliferationssteigerung während der Behandlung mit MTP-PE beobachtet werden.



**Abb. 4.3: xCELLigence-Messung der Tumorzelllinien während der Behandlung mit MTP-PE.**

$1 \times 10^4$  MCF-7 (A),  $2,5 \times 10^3$  MDA-MB-231 (B) bzw.  $5 \times 10^3$  SK-BR-3 (C) Tumorzellen wurden ausgesät und für 48 h mit MTP-PE behandelt. Die Proliferation wurde kontinuierlich über die Zeit aufgenommen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden (h) aufgetragen, auf der y-Achse die relative Proliferation in Form des Zell-Indexes. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs.

Abbildung 4.4 zeigt die Analyse der Viabilität von humanen Makrophagen, ausdifferenziert aus Monozyten des peripheren Bluts ( $M\Phi$ ) sowie murinen BMDMs. Weder durch MTP-PE noch durch L-MTP-PE zeigten sich toxische Effekte. Im Gegenteil fand sich insbesondere bei der Stimulation mit L-MTP-PE eine konzentrationsabhängige Viabilitätssteigerung bei den murinen BMDM ( $p = 0,0031$  bei  $0,1 \mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0,0012$  bei  $1 \mu\text{g/ml}$ ).



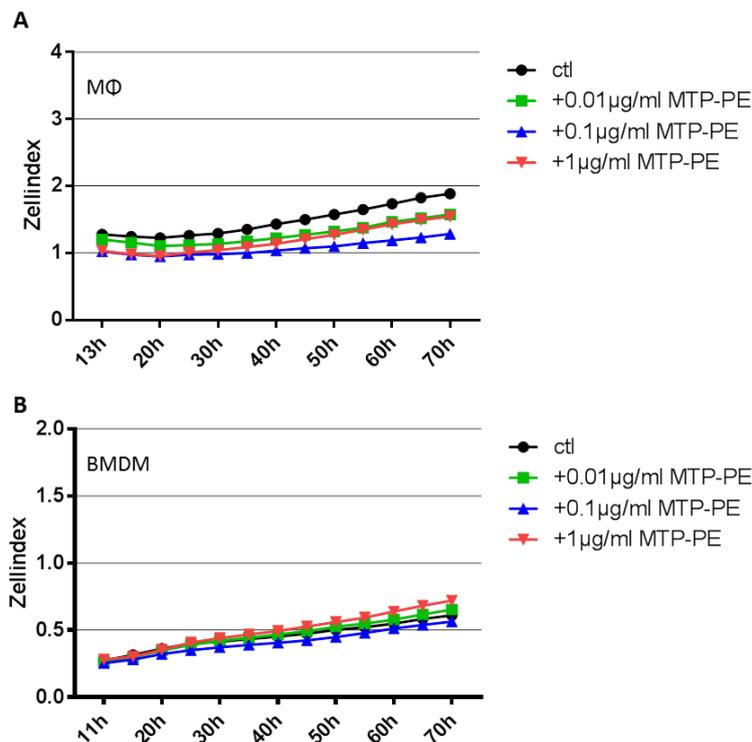
**Abb. 4.4: Stoffwechselaktivität der Makrophagen.**

**BMDM und MΦ nach Behandlung mit MTP-PE (A) und L-MTP-PE (B).**

$1 \times 10^5$  (BMDM) bzw.  $1,5 \times 10^5$  (MΦ) Zellen wurden für 96 h mit den auf der x-Achse gekennzeichneten MTP-PE bzw. L-MTP-PE Konzentrationen behandelt, bevor der MTT-Assay durchgeführt wurde. Nicht behandelte Zellen und Zellen mit DMSO bzw. NaCl 0,9 % dienten als Kontrolle (ctl, DMSO ctl und NaCl 0,9 % ctl). Auf der y-Achse ist die relative MTT-Reduktion als Mittelwert von mindestens drei Versuchen mit jeweils drei technischen Replikaten dargestellt.

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

Wie erwartet zeigen die in Abb. 4.5 dargestellten Ergebnisse, dass es durch die MTP-PE Behandlung zu keiner gesteigerten Proliferation in den ausdifferenzierten BMDM und MΦ kommt.



**Abb. 4.5: xCELLigence-Messung von Makrophagen während der Behandlung mit MTP-PE.**

$1 \times 10^4$  MΦ (A) bzw.  $5 \times 10^3$  BMDM (B) Zellen wurden ausgesät und für 48 h mit MTP-PE behandelt. Die Proliferation wurde kontinuierlich über die Zeit aufgenommen. Auf der x-Achse ist die Zeit in Stunden (h) aufgetragen, auf der y-Achse die relative Proliferation in Form des Zell-Indexes. Gezeigt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs.

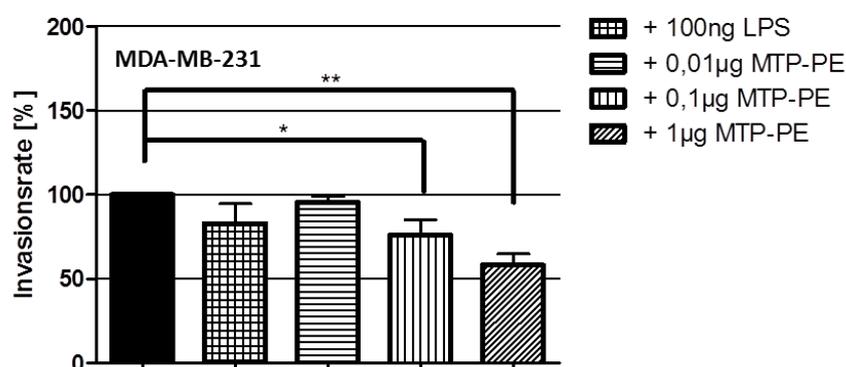
Fasst man zusammen, so findet sich bei der Untersuchung der Viabilität der Tumorzellen, dass SK-BR-3 und MDA-MB-231 sensitiv auf eine MTP-PE Konzentration von 1 µg/ml im MTT-Assay reagieren, sich jedoch in der Proliferation kein Einfluss auf die MDA-MB-231 findet und bei SK-BR-3 im Gegenteil sogar eine Proliferationssteigerung zeigt. Bei der Analyse mit L-MTP-PE wurde lediglich die Viabilität, jedoch nicht die Proliferation, der Tumorzellen untersucht. Hierbei fand sich eine Reduktion bei MCF-7 sowie eine Viabilitätssteigerung bei SK-BR-3 und MDA-MB-231.

Bei den Makrophagen finden sich weder durch MTP-PE noch durch L-MTP-PE toxische Effekte in den Viabilitätsmessungen. Im Gegenteil findet sich hier insbesondere bei der Stimulation von BMDMs mit L-MTP-PE eine konzentrationsabhängige Viabilitätssteigerung. Bei der Proliferation findet sich kein Einfluss von MTP-PE auf die Makrophagen. Die Viabilität und Proliferation von Mikroglia während der Behandlung mit Mifamurtid wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

#### 4.2.2 Direkter Einfluss von Mifamurtid auf die Invasion von Brustkrebszellen

Im weiteren Verlauf sollte ein direkter Einfluss des Wirkstoffes auf die Tumordinvasion untersucht werden. Dafür wurde die Zelllinie MDA-MB-231 ausgewählt. Da diese Zelllinie ein hochinvasives Profil aufweist, ist sie sehr gut zur Analyse der Reduktion der Invasivität durch den Wirkstoff geeignet (Lacroix und Leclercq 2004). Da es sich bei LPS ebenfalls um einen potenten Immunstimulator handelt und in Vorarbeiten der Gruppe bereits eine Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumordinvasion von Brustkrebszellen durch LPS gezeigt werden konnte, erfolgte eine zusätzliche Stimulation mit LPS als positiv-Kontrolle (Hagemann *et al.* 2004).

Die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 4.6, zeigen eine signifikante, konzentrationsabhängige Reduktion der Invasivität von MDA-MB-231 durch Behandlung mit MTP-PE. Dabei wurde die Invasionsrate bei 0,1 µg/ml um ca. 25 % ( $p = 0,0124$ ) und bei 1 µg/ml sogar um ca. 45 % ( $p = 0,0011$ ) gegenüber der Kontrolle reduziert. Da sich bei der MTP-PE-Konzentration von 0,1 µg/ml weder in den Viabilitätsassays noch in den Proliferationsmessungen ein Einfluss auf MDA-MB-231 findet (s. Abb. 4.2 und Abb. 4.3), kann ein toxischer Effekt auf die Tumorzellen als Ursache der Invasionsreduktion ausgeschlossen werden. Es findet sich auch bei LPS tendenziell eine Reduktion der Invasivität von MDA-MB-231. Eine Untersuchung mit L-MTP-PE ist nicht Bestandteil dieser Arbeit.

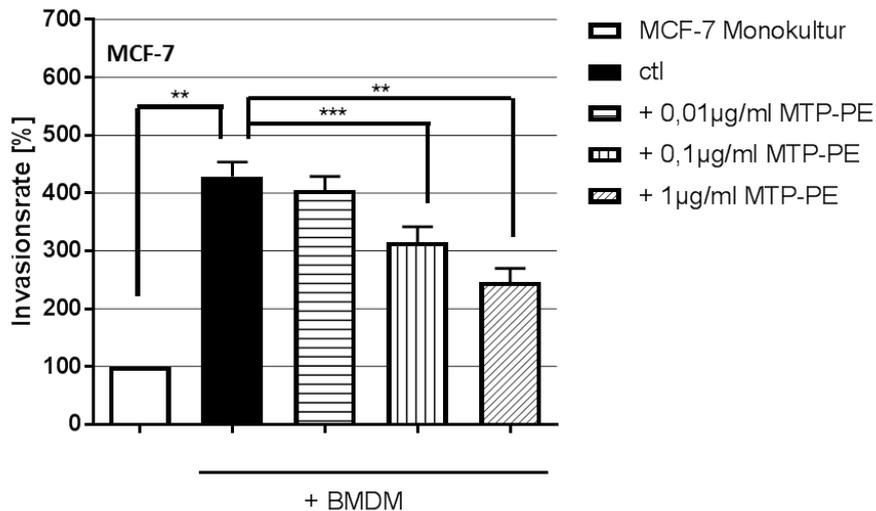


**Abb. 4.6: Invasion von MDA-MB-231 nach Behandlung mit MTP-PE.**

$1 \times 10^5$  MDA-MB-231 Tumorzellen wurden in einer modifizierten Boyden-Kammer für 96 h in Anwesenheit von LPS und MTP-PE kultiviert. Die Invasionsrate ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle dargestellt (ctl), die auf 100 % gesetzt wurde (schwarzer Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

### 4.2.3 Einfluss von Mifamurtid auf die Makrophagen-induzierte Tumorinvasion von Brustkrebszellen

Anschließend wurde der Einfluss des Wirkstoffes auf die Makrophagen-induzierte Tumorinvasion mit unterschiedlichen Makrophagenpopulationen analysiert. Im ersten Teil wurde die Makrophagen-induzierte Invasion mit murinen BMDMs untersucht. Als Tumorzelllinie wurde für diese Untersuchung, im Gegensatz zum vorherigen Experiment, die gering invasive Brustkrebszelllinie MCF-7 ausgewählt. Diese Zelllinie ermöglicht eine Steigerung der Invasivität in der Kokultur durch M $\Phi$ , BMDM und Mikroglia (MG). Im Gegensatz zu den hochinvasiven MDA-MB-231, ist es dadurch möglich, bei MCF-7 die Makrophagen-induzierte Invasivitätssteigerung genauer zu analysieren. Im zweiten Teil wurde die Makrophagen-induzierte Invasion von Mikroglia (MG), als residente Makrophagenpopulation, analysiert. Zur Untersuchung dieser MG-induzierten Tumorinvasion wurden die humane Brustkrebszelllinie MCF-7, sowie die murinen Zelllinien 410.4 und E0771LG genutzt. Bereits durch Vorarbeiten der Gruppe konnte eine gesteigerte Tumorinvasion von Brustkrebszellen in Kokultur mit MG und M $\Phi$  gezeigt werden (Hagemann *et al.* 2004; Pukrop *et al.* 2010). Ziel war es, zu untersuchen, ob die gesteigerte Tumorinvasivität durch Mifamurtid reduziert werden kann. Dazu wurden MCF-7 und BMDM für 96 h unbehandelt oder mit MTP-PE behandelt in einer modifizierten Boyden-Kammer kultiviert. Dabei wurden Konzentrationen von 1  $\mu\text{g/ml}$ , 0,1  $\mu\text{g/ml}$  und 0,01  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Die in Abb. 4.7 dargestellten Ergebnisse zeigen bei der unbehandelten Kokultur von MCF-7 mit BMDM eine signifikante Steigerung ( $p = 0,0019$ ) der Invasivität auf über 400 %. Der Wirkstoff MTP-PE konnte diese gesteigerte Invasivität der Brustkrebszellen konzentrationsabhängig reduzieren. Dabei ergab sich bereits bei einer Zugabe von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  MTP-PE eine signifikante Reduktion ( $p = 0,0002$ ) der BMDM-induzierten Invasivität von MCF-7. Allerdings ist anzumerken, dass die BMDM-induzierte Invasivität auch mit der höchsten hier verwendeten Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  MTP-PE nur reduziert ( $p = 0,0025$ ), jedoch nicht vollständig aufgehoben werden konnte.

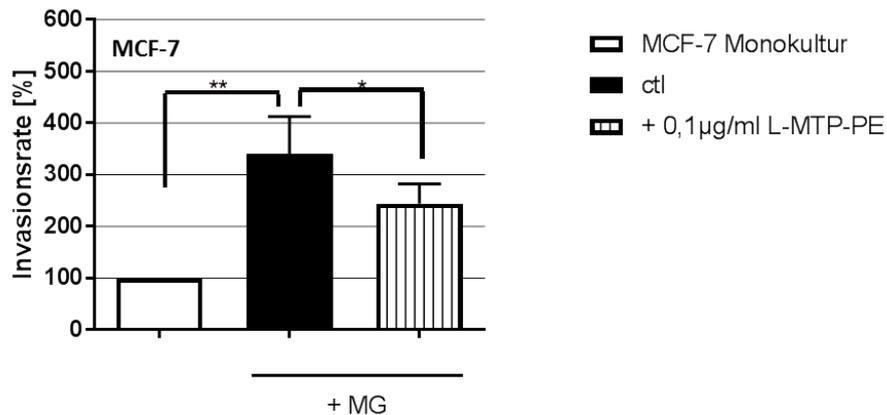


**Abb. 4.7: Makrophagen-induzierte Invasion von MCF-7 nach Behandlung mit MTP-PE.**

Tumorzellen und Makrophagen (BMDM) wurden in einem Verhältnis von 1:1,5 in einer modifizierten Boyden-Kammer für 96 h in Abwesenheit und Anwesenheit von MTP-PE ko-kultiviert. Die Invasionsrate ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle ohne Kokultur dargestellt (MCF-7 Monokultur), die auf 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

In den bisherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass es sowohl bei der direkten Tumorinvasion als auch bei der indirekten Makrophagen-induzierten Tumorinvasion zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Invasivität durch Behandlung mit Mifamurtid kommt. Bei der zerebralen Metastasierung des fortgeschrittenen Mammakarzinoms spielen Mikroglia, als residente Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS), eine wichtige Rolle. Im weiteren Verlauf sollte deshalb untersucht werden, ob der Wirkstoff Mifamurtid auch die MG-induzierte Tumorinvasion reduziert.

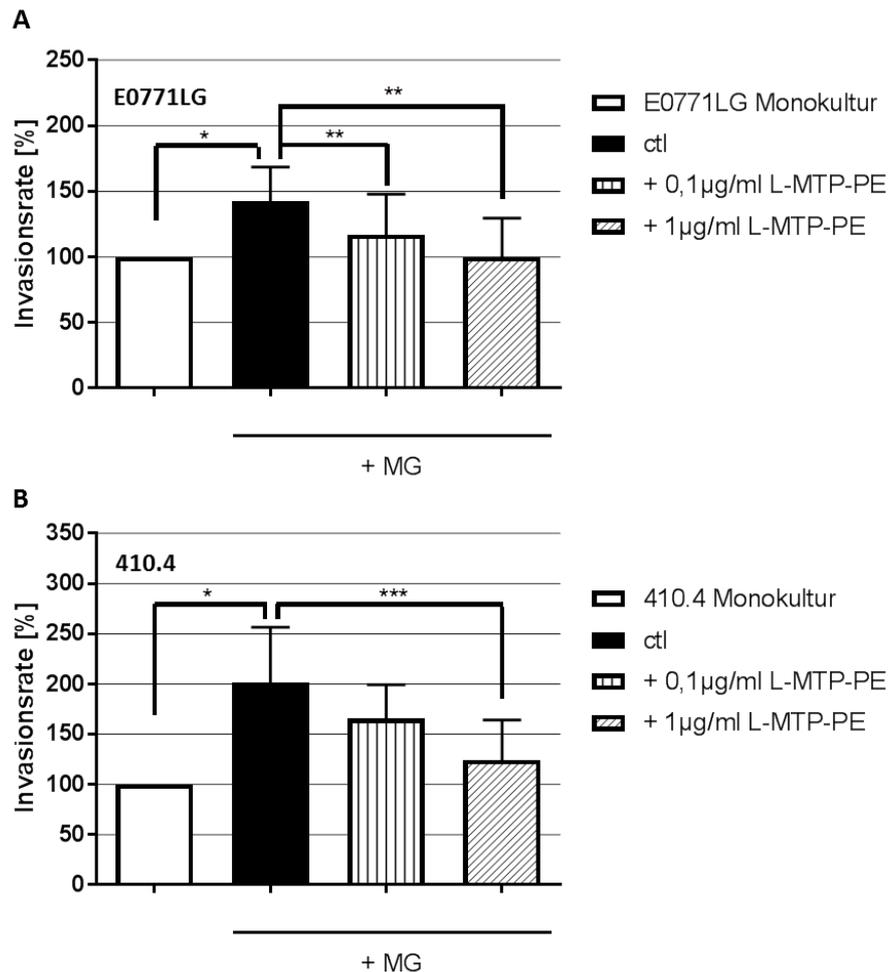
In diesem Experiment wurden die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 sowie die murinen Zelllinien 410.4 und E0771LG für 96 h, unbehandelt oder mit L-MTP-PE behandelt, in einer modifizierten Boyden-Kammer mit MG ko-kultiviert. Dabei wurden Konzentrationen von 1 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,01 µg/ml eingesetzt. Die in Abb. 4.8 dargestellten Ergebnisse zeigen bei der unbehandelten Kokultur von MCF-7 mit MG eine signifikante Steigerung der Invasivität auf über 300 % ( $p = 0,0068$ ). Der Wirkstoff L-MTP-PE konnte diese gesteigerte Invasivität der Brustkrebszellen reduzieren. Dabei ergab sich bereits bei einer Zugabe von 0,1 µg/ml L-MTP-PE eine signifikante Reduktion ( $p = 0,0134$ ) der MG-induzierten Invasivität von MCF-7.



**Abb. 4.8: MG-induzierte Invasion von MCF-7 nach Behandlung mit L-MTP-PE.**

Tumorzellen und Mikroglia (MG) wurden in einem Verhältnis von 1:1,5 in einer modifizierten Boyden-Kammer für 96 h in Abwesenheit und Anwesenheit von L-MTP-PE ko-kultiviert. Die Invasionsrate ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle ohne Kokultur dargestellt (MCF-7 Monokultur), die auf 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

In Abb. 4.9A sind die Ergebnisse, der Ko-Kultivierung der murinen triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinie E0771LG mit MG, unbehandelt oder behandelt mit L-MTP-PE, dargestellt. Dabei zeigt sich bei der unbehandelten Kokultur mit MG, eine signifikante Steigerung ( $p = 0,0447$ ) der Invasivität auf ca. 140 %. Auch hier findet sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der induzierten Invasivität durch L-MTP-PE. Bei der höchsten hier verwendeten Konzentration von 1 µg/ml L-MTP-PE konnte die Invasionsrate sogar signifikant ( $p = 0,0051$ ) auf das Niveau der E0771LG-Monokultur herabgesetzt werden. Bei der Kokultur der murinen triple-negativen Mammakarzinom-Zelllinie 410.4 mit MG zeigt sich, wie in Abb. 4.9B dargestellt, eine signifikante Steigerung der Invasivität auf 200 % ( $p = 0,0145$ ). Der Wirkstoff L-MTP-PE konnte diese gesteigerte Invasivität der Brustkrebszellen konzentrationsabhängig reduzieren. Dabei ergab sich insbesondere bei einer Zugabe von 1 µg/ml L-MTP-PE eine signifikante Reduktion ( $p = 0,0010$ ) der MG-induzierten Invasivität.



**Abb. 4.9: MG-induzierte Invasion von E0771LG (A) und 410.4 (B) nach Behandlung mit L-MTP-PE.** Tumorzellen und Mikroglia (MG) wurden in einem Verhältnis von 1:1,5 in einer modifizierten Boyden-Kammer für 96 h in Abwesenheit und Anwesenheit von L-MTP-PE ko-kultiviert. Die Invasionsrate ist in Relation zur unbehandelten Kontrolle ohne Kokultur dargestellt (E0771LG und 410.4 Monokultur), die auf 100 % gesetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

Zusammenfassend konnte eine BMDM- sowie MG-induzierte Steigerung der Tumorinvasion gezeigt werden. Diese gesteigerte Tumorinvasivität konnte durch Mifamurtid reduziert werden. Es ist weiterhin offen, inwiefern der direkte Einfluss von MTP-PE oder L-MTP-PE auf die Tumorinvasion, der im vorangegangenen Abschnitt nachgewiesen wurde, für diese Reduktion verantwortlich ist.

### 4.3 Makrophagenaktivierung nach Behandlung mit Mifamurtid

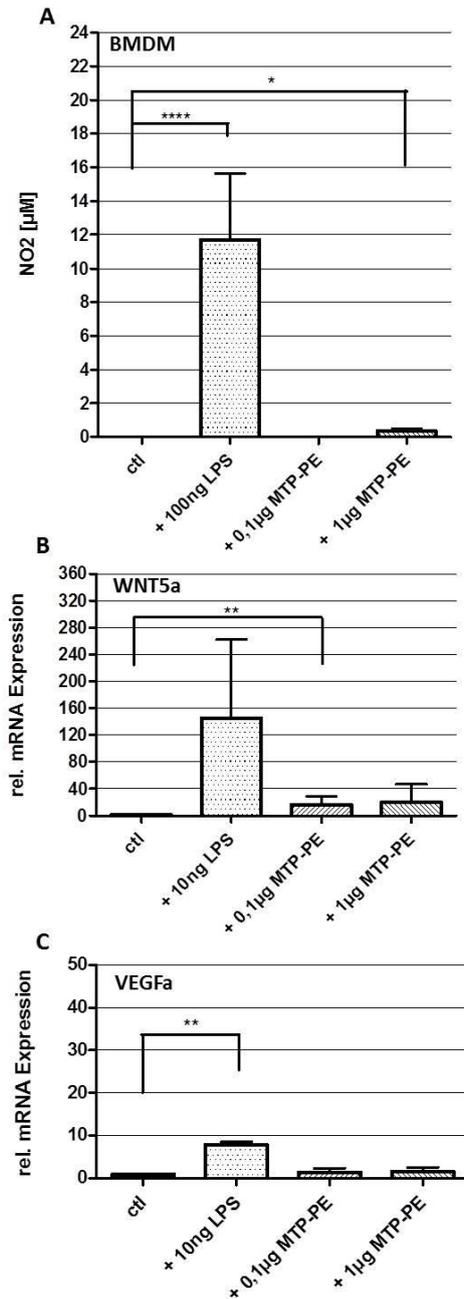
In dem vorangegangenen Experiment konnte nachgewiesen werden, dass der Wirkstoff als freie und liposomale Form zu einer Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumorinvasion von humanen und murinen Brustkrebszellen führt. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine Stimulation der Makrophagen durch Mifamurtid zu einer zytotoxischen Aktivierung führt, welche eine erhöhte Tumoreradikation und eine geringere Metastasierungsrate zur Folge hat (Fidler *et al.* 1982). Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass die hier gezeigte Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumorinvasion durch den Wirkstoff auf eine Stimulation von Makrophagen und somit eine Aktivierung zum klassischen zytotoxischen M1-Subtyp zurückzuführen ist (Sica *et al.* 2006). In den MTT-Assays dieser Arbeit konnte bereits eine Viabilitätssteigerung der Makrophagen durch Mifamurtid beobachtet werden, die eine Aktivierung durch den Wirkstoff vermuten lässt. Um zu untersuchen, ob der Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumorinvasion eine klassische zytotoxische Aktivierung der Makrophagen zu Grunde liegt, wurde das Sekretionsprofil der Makrophagen durch Mifamurtid näher analysiert und mit dem Profil des TLR-Liganden und klassischen Immunstimulators LPS verglichen. Dazu wurden in einem Griess-Versuch (s. Abschnitt 3.4) BMDMs für 24 h mit LPS sowie MTP-PE stimuliert und anschließend die Nitritkonzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Durch die Messung von Nitrit ( $\text{NO}_2$ ) als Abbauprodukt von NO ist es möglich, Rückschlüsse auf die NO-Bildung zu ziehen. Die Ergebnisse in Abb. 4.8A zeigen eine Aktivierung der Makrophagen nach Stimulation mit LPS mit einem signifikanten  $\text{NO}_2$ -Anstieg ( $p < 0,0001$ ) auf über  $10 \mu\text{M}$ . Die Stimulation mit  $1 \mu\text{g/ml}$  MTP-PE führte ebenfalls zu einer signifikanten Aktivierung ( $p = 0,0119$ ), die allerdings deutlich geringer ausfiel als bei der Stimulation mit LPS.

Des Weiteren wurde die Sekretion von VEGFa sowie von WNT5a auf mRNA-Ebene untersucht. VEGFa ist ein wichtiges Zytokin für die Angiogenese und WNT-Signalmoleküle scheinen eine wichtige Rolle in der malignen Transformation und in der Tumorprogression zu spielen (Lejeune *et al.* 1995; Nguyen *et al.* 2009).

Zur Analyse der mRNA-Expression von WNT5a und VEGFa in aktivierten BMDM wurden diese für 24 h mit LPS und MTP-PE stimuliert und anschließend die Genexpression mit Hilfe der qRT-PCR gemessen. Die Ergebnisse der mRNA-Expression werden in Abb. 4.8B und Abb. 4.8C gezeigt. Dargestellt ist die relative Genexpression ( $= 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ; s. 3.5.4), in welcher die

$\Delta$ Ct-Werte der stimulierten Proben auf die  $\Delta$ Ct-Werte der nicht behandelte Kontrolle bezogen sind ( $\Delta\Delta$ Ct-Werte). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der relativen Genexpression von WNT5a bei der Stimulation mit 0,1  $\mu$ g/ml MTP-PE ( $p = 0,0063$ ) und ein sehr starker Anstieg der Genexpression durch Stimulation mit LPS. Die Genexpression von VEGFa zeigte nach der Stimulation mit LPS einen geringen signifikanten Anstieg ( $p = 0,0029$ ). Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit MTP-PE keine Auswirkung auf die Genexpression von VEGFa.

Insgesamt konnte nur eine geringe Steigerung der NO-Produktion im Griess-Versuch unter der Behandlung mit MTP-PE gezeigt werden. Auch bei der WNT5a-Expression fand sich lediglich eine geringe Steigerung der Expression. Bei der VEGFa-Expression hingegen konnte kein Einfluss auf die Genexpression durch MTP-PE nachgewiesen werden.



**Abb. 4.10: Aktivierung von Makrophagen nach Behandlung mit MTP-PE.**

**(A) NO<sub>2</sub>-Release-Test.** Aktivierung von BMDM nach Behandlung mit LPS und MTP-PE.  $1,5 \times 10^6$  Zellen wurden für 24 h mit LPS und MTP-PE behandelt. Die Nitritkonzentration, aufgetragen auf der y-Achse in  $\mu$ M, wurde im Kulturüberstand gemessen. **(B) WNT5a Expression** in stimulierten humanen Makrophagen (M $\Phi$ ). qRT-PCR für WNT5a in unbehandelten (schwarzer Balken) und behandelten M $\Phi$ .  $1 \times 10^6$  Zellen wurden für 24 h mit LPS und MTP-PE behandelt. Auf der y-Achse ist der relative Wert dargestellt. **(C) VEGFa Expression** in stimulierten M $\Phi$ . qRT-PCR für VEGFa in unbehandelten (schwarzer Balken) und behandelten M $\Phi$ .  $1 \times 10^6$  Zellen wurden für 24 h mit LPS und MTP-PE behandelt. Auf der y-Achse ist der relative Wert dargestellt. Dargestellt sind die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Versuchen als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

## 5 Diskussion

### 5.1 Genexpression von Nod2 und TLRs in Makrophagen und Tumorzellen

Für die Interaktion mit Mifamurtid kommen sowohl die TLR-Rezeptoren als auch der Nod2-Rezeptor in Frage. Beide potentiellen Rezeptoren für Mifamurtid werden von Makrophagen exprimiert (Ogura *et al.* 2001; Zarembler und Godowski 2002). Im Gegensatz zu den Analysen in Makrophagen gibt es bisher nur wenige und zum Teil widersprüchliche Untersuchungen zu der Rolle der TLR-Rezeptoren und des Nod2-Rezeptors in Brustkrebszellen. So konnte bislang nicht geklärt werden, ob Mifamurtid über diese potentiellen Rezeptoren auch einen direkten Einfluss auf die Tumorzellen hat und wenn ja, ob dieser eine Tumorprogression eher fördert oder inhibiert.

Die qRT-PCR Analysen dieser Arbeit zeigen, dass sowohl TLR1, TLR2 und TLR4 als auch der Nod2-Rezeptor auf mRNA-Ebene in allen hier untersuchten Brustkrebszellen exprimiert werden. Allerdings wird deutlich, dass sich die Expression der Rezeptoren in den verwendeten Brustkrebszelllinien deutlich von einander unterscheidet. So zeigte die hochmaligne Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 eine starke Expression von TLR4 und TLR1 auf mRNA-Level, während die Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3 den TLR2 besonders stark exprimieren. Yang *et al.* konnten anhand von mRNA-Level sowie auf Proteinebene nachweisen, dass in der hochmalignen Zelllinie MDA-MB-231 unter allen TLRs, der TLR4-Rezeptor, der am höchsten exprimierte Rezeptor ist (Yang *et al.* 2010). Dieses Ergebnis konnten wir bei den hier untersuchten TLRs auf mRNA-Level bestätigen. Interessanterweise lag die Expression beinahe in der Höhe der Expression der MΦ.

Da es sich bei den TLR-Rezeptoren um potentielle Bindungsstellen für Mifamurtid handelt, stellt sich die Frage, welche Auswirkungen eine Rezeptoraktivierung auf die Tumordinvasion haben könnte. Generell wird den TLR-Rezeptoren in Tumorzellen eher eine proinvasive Rolle und dadurch eine tumorfördernde Rolle zugeschrieben. So konnte bei Untersuchungen zum Lungenkarzinom, ein TLR2 vermitteltes Tumorstadium *in vivo* nachgewiesen werden (Huang *et al.* 2007). Auch beim Hepatozellulären Karzinom konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass eine Signaltransduktion durch TLR4 die Tumorzellinvasion und Metastasierung fördert (Jing *et al.* 2012). Des Weiteren zeigte eine Stimulation von Tumorzellen durch den

TLR4-Liganden LPS eine erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber zytotoxischen T-Zellen (CTL) sowie eine Immunsuppression *in vitro* (Huang *et al.* 2005). Bestätigt wurde dieser tumorfördernde Einfluss *in vivo* durch Blockade des TLR4-Signalweges, der eine verlängerte Überlebenszeit von tumortragenden Mäusen zur Folge hatte (Huang *et al.* 2005). Insgesamt konnte bisher sowohl für TLR2 als auch TLR4 ein direkter tumorfördernder Einfluss gezeigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen vor allem bei der hochinvasiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 eine starke Expression von TLR4, weshalb die weitere Analyse des direkten Einflusses auf die Tumorinvasion von Mifamurtid im Vergleich zu dem TLR4-Liganden LPS in MDA-MB-231 von Interesse sein könnte.

Weiterhin konnte, übereinstimmend mit ihrer Rolle als *pattern-recognition receptors* (PRRs) im Immunsystem, die höchste Expression von TLR1, TLR2 und TLR4 in dieser Arbeit in den Makrophagen nachgewiesen werden. Bereits Zarembek und Godowski konnten zeigen, dass periphere Blutzellen eine der höchsten TLR-Genexpression aufweisen, sich jedoch innerhalb der Blutzellen unterschiedliche Muster der TLR-Expression finden. Die höchsten Level der TLR2- und der TLR4-Expression wurden in den Monozyten (CD14<sup>+</sup>-Zellen) nachgewiesen, wohingegen die Expression von TLR1 vergleichbar mit den Level von B-Lymphozyten (CD19<sup>+</sup>-Zellen) war (Zarembek und Godowski 2002). Die Stimulation von TLR-Rezeptoren auf Makrophagen führt zu einer klassischen zytotoxischen Aktivierung und ist essentiell für eine inflammatorische Antwort des Immunsystems. Für TLR-Liganden wie LPS konnte bereits gezeigt werden, dass sie zu einer Aktivierung des Immunsystems und somit zu einer vermehrten Tumorzytotoxizität führen (Doe und Henson 1978; Mosser 2003). Zudem konnte in Vorarbeiten der Gruppen nachgewiesen werden, dass eine Stimulation der Makrophagen mit LPS zu einer Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasivität führt (Hagemann *et al.* 2004; Pukrop *et al.* 2010). Dennoch gibt es auch bei den Makrophagen Hinweise auf einen proinvasiven Einfluss der TLR-Rezeptoren in der Interaktion mit Tumorzellen. So konnte gezeigt werden, dass TLR2 über die Aktivierung von myeloiden Zellen die Metastasierung beim Lungenkarzinom fördert (Kim *et al.* 2009). Weiterhin konnten Itaya *et al.* nachweisen, dass es nach Stimulation von Makrophagen mit dem TLR4-Ligand LPS, zu einer vermehrten Produktion von VEGF kommt (Itaya *et al.* 2001). VEGF dient der Angiogenese und kann somit auch die Vaskularisierung im Tumorgewebe und damit die Tumorpheriferation unterstützen.

Insgesamt scheint die Rolle der TLR-Rezeptoren in der Tumorprogression ambivalent zu sein. Auf der einen Seite führt eine Stimulation der TLR-Rezeptoren in Tumorzellen selbst zu einer Tumorprogression und schützt die Zellen vor einer tumorzytotoxischen Immunantwort. Auf der anderen Seite jedoch führt eine Stimulation von Makrophagen über TLR-Rezeptoren zu einer inflammatorischen Immunreaktion, was eine Tumorsuppression zur Folge hat.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Mifamurtid mit dem Vorläufermolekül MDP wird schon seit längerer Zeit eine identische Signalkaskade vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass MDP bei der Signaltransduktion mit dem intrazellulären Rezeptor Nod2 interagiert (Grimes *et al.* 2012; Mo *et al.* 2012). Ob sich diese Erkenntnisse direkt auf die Signaltranslation von Mifamurtid übertragen lassen, ist bisher nicht geklärt. Auch wenn vieles für Nod2 als Zielrezeptor von Mifamurtid spricht, so bleibt weiterhin offen, ob Nod2 tatsächlich als Zielmolekül für den Wirkstoff in Frage kommt, wie eine Interaktion zwischen den Molekülen zustande kommt und welche Signalkaskaden dadurch aktiviert werden und welche Rolle die TLRs spielen.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Nod2 ausschließlich in Monozyten exprimiert wird (Ogura *et al.* 2001). Jedoch konnte gezeigt werden, dass Nod2 auf mRNA-Ebene auch in weiteren Zellen des hämatopoetischen Systems wie Granulozyten, dendritischen Zellen, T-Lymphozyten sowie in epithelialen Zelllinien exprimiert wird (Gutierrez *et al.* 2002). In dieser Arbeit fand sich bei allen untersuchten Brustkrebszelllinien eine geringe Expression des Nod2-Rezeptors auf mRNA-Ebene. Dabei war die Expression in den MDA-MB-231 und in den MCF-7 fast identisch. Die Zelllinie SK-BR-3 wies eine etwas höhere Expression unter den Tumorzelllinien auf. Erwartungsgemäß war die Expression in den M $\Phi$  erneut am höchsten. Tatsächlich wurde auch bereits von anderen die Expression von Nod2 in den Brustkrebszelllinien MCF-7 und SK-BR-3 beschrieben (da Silva *et al.* 2007; Gutierrez *et al.* 2002). Bei MDA-MB-231 findet sich bisher keine vergleichbare Untersuchung. Wie schon bei der TLR-Expression, fehlen auch bei der Nod2-Expression in dieser Arbeit weitere Analysen auf Proteinebene um Rückschlüsse über die Translation des Genproduktes ziehen zu können. Zusammenfassend betrachtet werden sowohl Nod2 als auch die hier untersuchten TLR-Rezeptoren immer am deutlichsten in den M $\Phi$  exprimiert, aber auch in unterschiedlicher Höhe von den Tumorzellen, weshalb ein direkter Einfluss auf die Invasion der Tumorzellen durch den Wirkstoff in Frage kommt und im Folgenden weiter untersucht wurde.

## 5.2 Direkter Einfluss von Mifamurtid auf die Invasivität von Brustkrebszellen

Mifamurtid gilt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als potenter Aktivator von Makrophagen und es konnte mehrfach eine Reduktion der Metastasierungsrate nach Behandlung mit dem Wirkstoff nachgewiesen werden (Bucana *et al.* 1983; Fidler *et al.* 1982; Galligioni *et al.* 1994; Nardin *et al.* 2006). Die Analyse der mRNA-Expression konnte zeigen, dass die potentiellen Rezeptoren für Mifamurtid, die TLR-Rezeptoren als auch der Nod2-Rezeptor, von allen untersuchten Brustkrebszellen in unterschiedlicher Höhe exprimiert werden. Somit ist ein direkter Einfluss auf die Brustkrebszellen durch den Wirkstoff Mifamurtid potentiell möglich.

Die Ergebnisse der Untersuchung mit MDA-MB-231 zeigen, dass der Wirkstoff Mifamurtid tatsächlich einen direkten Einfluss auf die Invasivität von Brustkrebszellen *in vitro* haben kann. Eine systematische Analyse wäre nun erforderlich um zu klären, ob der Wirkstoff Mifamurtid auch die Invasivität von anderen Brustkrebszelllinien *in vitro* direkt beeinflusst und von welchem Rezeptor dieser Einfluss abhängig ist.

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffformen von Mifamurtid sind die freie Form (MTP-PE) sowie die liposomale Form (L-MTP-PE). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnte in früheren Studien nachgewiesen werden, dass die liposomale Form der freien Form von Mifamurtid bei der Makrophagenaktivierung überlegen ist. Des Weiteren konnte zudem gezeigt werden, dass durch L-MTP-PE auch noch Makrophagen aktiviert werden, welche sich zuvor refraktär gegenüber MTP-PE zeigten (Fidler *et al.* 1980; Fidler *et al.* 1981; Poste und Kirsh 1979). Bisher konnte dabei ein direkter Einfluss durch die Liposomen auf die Makrophagenaktivierung ausgeschlossen werden (Fogler und Fidler 1987). Möglicherweise trifft dies nicht nur auf Makrophagen, sondern auch auf Tumorzellen zu, was eventuell den unterschiedlichen Einfluss auf die Viabilität von MDA-MB-231 in dieser Arbeit erklären könnte.

Bei *in-vivo*-Untersuchungen kommen weitere Einflüsse wie systemische, anatomische sowie histologische Gegebenheiten hinzu, wodurch es zu einer veränderten Wirkungsweise von Mifamurtid kommt. So zeigte sich bei Experimenten mit der liposomalen Form *in vivo*, dass sich der Wirkstoff vor allem in den Kapillaren von gut durchbluteten Organen wie der Lunge oder der Leber anreichert, dort von zirkulierenden Blutmonozyten phagozytiert wird und diese anschließend aktiviert (Fogler und Fidler 1985; Fogler und Fidler 1987; Poste *et al.*

1982). Die aktivierten Makrophagen wiederum treten aus den Kapillaren in das Organparenchym über, wo sie das Tumorgewebe infiltrieren (Poste *et al.* 1982). Poste *et al.* konnte zeigen, dass Liposomen die Kapillarwände in der Lunge nicht überwinden können. Die bisherigen Studien lassen daher vermuten, dass liposomales Mifamurtid weder durch transkapillare Diffusion noch durch aktiven Transport in das Tumorgewebe eindringen kann, wodurch eine direkte Wirkung von Mifamurtid auf Tumorzellen *in vivo* eher unwahrscheinlich erscheint. Dies wird auch durch eine Studie von Fidler *et al.* gestützt, in der gezeigt wurde, dass eine Schädigung der Makrophagenfunktion die Metastasierungsrate unter Behandlung von liposomalem Mifamurtid *in vivo* wieder erhöht (Fidler *et al.* 1982). Insgesamt zeigt der Wirkstoff in dieser Arbeit zwar eine signifikante Reduktion der Tumorinvasion, jedoch scheint die hier gezeigte direkte Wirkung von Mifamurtid auf Brustkrebszellen *in vivo*, vermutlich auf Grund der schlechten Penetranz in das Tumorgewebe z. B. bei Lungenmetastasen, vernachlässigbar zu sein. Umso mehr ist die Wirkung auf die eingewanderten Monozyten oder aktivierten Makrophagen von großer therapeutischer Relevanz.

Bereits in Vorarbeiten der Gruppe konnte eine Reduktion der Makrophagen- sowie MG-induzierte Invasivität unter der Behandlung des Immunstimulators LPS beobachtet werden (Hagemann *et al.* 2004; Pukrop *et al.* 2010). Die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts zeigen, dass der TLR4-Rezeptor in der hochinvasiven Tumorzelllinie MDA-MB-231 am stärksten exprimiert ist. Da der TLR4-Rezeptor als potentieller Zielrezeptor für Mifamurtid in Frage kommt, wurde die direkte Wirkung von Mifamurtid auf die Tumorinvasion zudem mit der Wirkung des TLR4-Liganden LPS verglichen. Wie bereits erwähnt, wird die Rolle der TLR-Rezeptoren in der Tumorprogression kontrovers diskutiert, jedoch wurde bisher den TLR-Rezeptoren, zumindest bei der direkten Tumorzellaktivierung, eher eine proinvasive Rolle zugeschrieben (Huang *et al.* 2005; Jing *et al.* 2012). In dieser Arbeit konnte eine Reduktion der Tumorinvasion von MDA-MB-231 durch eine direkte LPS-Stimulation beobachtet werden, jedoch war dieses Ergebnis nicht signifikant. Trotzdem lässt dieses Ergebnis einen tumorhemmenden Effekt des TLR4-Rezeptors in MDA-MB-231 vermuten. Des Weiteren scheint, zumindest bei der direkten Tumorstimulation, eine Stimulation mit Mifamurtid und LPS zu einem ähnlichen Effekt zu führen.

### 5.3 Unterschiede MTP-PE und L-MTP-PE

Für ein besseres Verständnis der unterschiedlichen Eigenschaften von der freien und liposomalen Form von Mifamurtid wurden in den bisherigen Studien häufig Analysen mit der Vorläufersubstanz MDP durchgeführt. Bei der Untersuchung des Aufnahmeverhaltens von liposomalem MDP (L-MDP) und L-MTP-PE *in vitro* konnte gezeigt werden, dass L-MDP zu einer geringeren Aufnahme durch Monozyten führt. Dabei beruhte das Ergebnis nicht auf einem unterschiedlichen Aufnahmeverhalten der Liposomen selbst, sondern war auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Wirkstoffe zurückzuführen. Die vermehrte Dissoziation des hydrophilen MDP aus den Liposomen war der Grund für eine verringerte Aufnahme des Wirkstoffes in die Monozyten. Durch seine hydrophilen Eigenschaften löst sich MDP vermutlich schneller aus seiner Bindung in den Liposomen, wodurch nach der Phagozytose der Liposomen durch die Makrophagen weniger MDP intrazellulär für weitere Interaktion zu Verfügung steht (Fogler und Fidler 1987). Weiterhin zeigte MTP-PE, gemessen an der Tumorzytotoxizität *in vitro*, eine stärkere Makrophagenaktivierung als MDP, und L-MDP zeigte wiederum eine stärkere Aktivierung als L-MTP-PE. Vermutlich ist die stärkere Aktivierung von L-MDP auf die leichtere und somit vermehrte Dissoziation von MDP aus den Liposomen innerhalb der Makrophagen zurückzuführen. Dadurch, dass sich MDP im Vergleich zu MTP-PE besser von den Liposomen löst, steht nach der Phagozytose mehr MDP für die intrazelluläre Interaktion zu Verfügung. Jedoch ist diese Aktivierung von kürzerer Dauer, da der Wirkstoff zu schnell aus den Liposomen dissoziiert. MTP-PE hingegen zeigte zwar eine geringere Aktivierung, verbleibt aber aufgrund seiner lipophilen Struktur länger in den Liposomen, was dem Wirkstoff vor allem *in vivo* den Vorteil verschafft, dass er länger in den Zielorganen verbleibt und zu einer längerfristigen Aktivierung der Makrophagen führt (Fogler und Fidler 1987). Daraus erschließt sich, dass gleiche Konzentrationen an freiem und liposomalem Mifamurtid zu einer unterschiedlichen Aktivierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führen und somit die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar sind.

## 5.4 Einfluss von Mifamurtid auf die Makrophagen-induzierte Invasivität von Brustkrebszellen

Bereits in mehreren Studien konnte ein tumorfördernder Effekt von TAMs nachgewiesen werden (Balkwill *et al.* 2005). Auch bei Brustkrebs findet sich eine Korrelation zwischen der Anzahl der infiltrierenden TAMs und einer schlechteren Prognose. Des Weiteren wurde eine Reduktion der Tumorprogression bei mangelnder Makrophagenrekrutierung zum Tumorgewebe beobachtet (Lin *et al.* 2001). Um den Einfluss von Mifamurtid auf die Makrophagen-induzierte Tumorinvasion von TAMs *in vitro* zu untersuchen, wurde der Einfluss von MTP-PE auf MCF-7 in der Kokultur mit BMDMs untersucht. Die MCF-7 Zelllinie ist eine niedrig invasive Brustkrebszelllinie. Dadurch ist sie besonders geeignet, um die Makrophagen-induzierte Invasivitätssteigerung in An- und Abwesenheit von Mifamurtid zu untersuchen (Lacroix und Leclercq 2004). Bei den BMDMs handelt es sich um murine TAMs. Dabei wurden Monozyten aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert und zu Makrophagen gereift. Sowohl bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml MTP-PE als auch bei einer Konzentration von 1 µg/ml MTP-PE konnte eine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion der BMDM-induzierten Tumorinvasion von MCF-7 nachgewiesen werden. Jedoch sollte die Reduktion bei der Konzentration von 1 µg/ml MTP-PE kritisch betrachtet werden, da sich in den MTT-Assays von MCF-7 eine Reduktion der Viabilität bei der Konzentration von 1 µg/ml MTP-PE, sowie bei der DMSO-Kontrolle zeigte. Auch wenn sich bezogen auf die DMSO-Kontrolle kein signifikanter Unterschied bei der Konzentration von 1 µg/ml MTP-PE fand, so kann ein Einfluss der Trägerlösung auf die Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumorinvasion von MCF-7 nicht sicher ausgeschlossen werden. Interessanter Weise fand sich in den MTT-Assays mit L-MTP-PE bei einer Konzentration von 1 µg/ml auch eine Reduktion der Viabilität. Hier wurde jedoch nicht DMSO als Lösungsmittel verwendet, sondern gemäß den Herstellerangaben der Wirkstoff in 0,9 % NaCl gelöst. Somit lässt sich die Reduktion der Viabilität nicht allein durch das Lösungsmittel DMSO erklären, sondern scheint auf einem direkten Effekt des Wirkstoffes zu beruhen. Allerdings wurde bereits bei 0,1 µg/ml MTP-PE eine Reduktion der BMDM-induzierten Tumorinvasion gemessen, ohne dass sich hier ein Einfluss auf die Proliferation oder Viabilität in den Assays fand, was einen Einfluss von MTP-PE auf die BMDM-induzierten Tumorinvasion von MCF-7 beweist.

Während des Kokulturversuches sind sowohl BMDMs als auch die Tumorzellen den Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt. In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte zwar ein Einfluss des Wirkstoffes auf die Makrophagen-induzierte Tumorinvasion gezeigt werden, jedoch fand sich auch ein direkter Einfluss auf die Tumorinvasion von MDA-MB-231. Somit kann bei der Reduktion der Tumorinvasion, ein indirekter Einfluss durch Stimulation der Makrophagen nicht klar von einem möglichen direkten Effekt auf die Tumorzellen abgegrenzt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen in Bezug auf die Tumorinvasion von Brustkrebszellen die bereits publizierten Ergebnisse. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits eine Makrophagen-induzierte Steigerung der Invasivität der Brustkrebszelllinie MCF-7 durch MΦ *in vitro* nachgewiesen werden (Pukrop *et al.* 2010). Es wird vermutet, dass die Makrophagen-induzierte Steigerung der Invasivität durch einen alternativen M2-Phenotyp der TAMs verursacht wird (Sica *et al.* 2006). Der Grund für die Expression des M2-Phenotyps könnte in der fehlerhaften Aktivierung des NF-κB-Signalweges liegen (Sica *et al.* 2000). Dadurch wird die Wiederherstellung der NF-κB-Aktivität zu einem potentiellen Therapieziel, um einen Phenotypwechsel der TAMs hin zu einem M1-Profil zu erreichen (Sica *et al.* 2006). In Mausversuchen mit Brustkrebs konnte bereits gezeigt werden, dass durch einen mikrobiellen Stimulus (TLR9-Ligand) in Kombination mit einem Antikörper, der den IL-10-Rezeptor blockiert, ein Phenotypwechsel der TAMs vom M2-Typ hin zum M1-Typ *in vivo* möglich ist (Guiducci *et al.* 2005). Vermutlich ermöglicht die Wiederherstellung der NF-κB-Aktivität eine zytotoxische Aktivierung der TAMs und somit ein Phenotypwechsel hin zu einem proinflammatorischen M1-Profil, wodurch wiederum die Tumorprogression gehemmt werden könnte. Da es sich auch bei Mifamurtid um einen mikrobiellen Zellwandbestandteil und einen potentiellen NF-κB-Aktivator handelt, liegt die Vermutung nahe, dass die Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasion auf einer Aktivierung bzw. einem Phenotypwechsel der Makrophagen hin zu einem klassisch inflammatorischen M1-Typ beruht. In dieser Arbeit konnte zwar eine Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumorinvasion von Brustkrebszellen *in vitro* gezeigt werden, jedoch lässt sich nicht sagen, ob dieser Effekt tatsächlich auf eine klassisch inflammatorische Aktivierung der Makrophagen oder gar einem Phenotypwechsel von bisher alternativ aktivierten Makrophagen beruht.

## 5.5 Vergleich der Ergebnissen mit *in-vivo*-Therapiestudien von Mifamurtid bei Brustkrebs

Bisher gibt es nur wenige *in-vivo*-Untersuchungen zur Wirkung von Mifamurtid bei Brustkrebs. Dies liegt vor allem daran, dass der Wirkstoff in früheren Tierversuchen bei der Behandlung von Brustkrebs keinen Effekt auf die Überlebenszeit aufweisen konnte (Fox *et al.* 1995; Teske *et al.* 1998). Eine der ersten Studien zur Analyse dazu fand an Katzen statt und orientierte sich vom Versuchsaufbau her an der erfolgreich durchgeführten Studie mit Osteosarkomen in Hunden unter Behandlung von L-MTP-PE (MacEwen *et al.* 1989). Eine Schwäche dieser Studie ist die Dosierung des Wirkstoffes, sowie die Therapiedauer. Die Katzen erhielten einmal wöchentlich eine Dosis von 2 mg/m<sup>2</sup> L-MTP-PE über einen Zeitraum von 8 Wochen. Die Ergebnisse konnten keine signifikanten Veränderungen des krankheitsfreien Intervalls oder des Gesamtüberlebens zeigen (Fox *et al.* 1995). Bereits Asano und Kleinerman konnten jedoch nachweisen, dass eine Verlängerung der Therapiedauer von 12 Wochen auf 24 Wochen beim rezidivierenden Osteosarkom im Menschen zu einer signifikant verlängerten rezidivfreien Zeit führt (Asano und Kleinerman 1993). Des Weiteren wird auch Dosis-dichter mit 2 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche therapiert. Insgesamt erhalten die Patienten 48 Infusionen über einen Zeitraum von 36 Wochen. Die Infusion wird in den ersten 12 Wochen zweimal wöchentlich verabreicht und anschließend für weitere 24 Wochen einmal wöchentlich (Meyers *et al.* 2008). Sie erhalten somit kürzere Dosisintervalle über einen längeren Zeitraum, weshalb fraglich bleibt, ob die Dosierung und das Dosierungsintervall in der Studie von Fox *et al.* ausreichend war (Fox *et al.* 1995). Eine weitere Studie zur Analyse von Mifamurtid bei Brustkrebs wurde durch Teske *et al.* an Hunden durchgeführt (Teske *et al.* 1998). Diese Studie bestätigte das Ergebnis von Fox *et al.* Hierbei wurden Hunde mit fortgeschrittenem Brustkrebs mit einer Dosis von 2 mg/m<sup>2</sup> L-MTP-PE zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von 8 Wochen behandelt. Die Ergebnisse zeigten auch hier keine signifikante Verbesserung des krankheitsfreien Intervalls oder der Gesamtüberlebenszeit unter der Behandlung mit Mifamurtid. Obwohl bei Hunden mit Osteosarkomen bereits eine L-MTP-PE-Therapie über einen Zeitraum von 8 bis 12 Wochen zu einer signifikanten Reduzierung der Metastasierungsrate führt, könnte auch hier eine unzureichende Dosierung und Therapiedauer der Grund für den fehlenden Effekt von Mifamurtid bei Brustkrebs *in vivo* sein (MacEwen *et al.* 1989). Eine weitere mögliche Erklärung könnte eine Fibrosierung in der Tumorumgebung sein, welche unter der Therapie

mit L-MTP-PE beobachtet wurde und lediglich eine langsame Nekrose der Tumorzellen zur Folge hat (Kleinerman *et al.* 1992). Interessanter Weise wurden, wenn auch nicht signifikant, bei den Hunden unter der Behandlung mit Mifamurtid weniger pulmonale Metastasen beobachtet (Teske *et al.* 1998). Diese Veränderung des Metastasierungsmusters könnte durch die selektive Aktivierung von Makrophagen in den Lungenkapillaren bedingt sein.

Der Wirkstoff zeigte in dieser Arbeit sowohl in der freien als auch in der liposomalen Form zwar eine signifikante Reduktion der Tumorinvasion von Brustkrebszellen *in vitro*, jedoch wurde auch ein direkter Effekt von Mifamurtid auf die Invasivität von Brustkrebszellen nachgewiesen. Deshalb ist es fraglich, ob die Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumorinvasion von Brustkrebszellen *in vitro* tatsächlich auf einer Wirkung von Mifamurtid auf die Makrophagen beruht. Eine weitere Analyse der Dosis und längeren Therapiedauer könnten vielversprechende Ansätze sein, um den Einfluss auf die Makrophagen-induzierte Tumorinvasion weiter zu untersuchen.

Ein weiterer Aspekt, den es zumindest *in vivo* zu diskutieren gilt, ist der Einfluss von Mifamurtid auf weitere Zellen des Tumormikromilieus. Denn abgesehen von den TAMs, konnten *in vivo* auch unreife dendritische Zellen (DCs) in Brustkrebstumorgewebe, sowie reife DCs peritumoral, nachgewiesen werden (Bell *et al.* 1999). Diese sogenannten Tumor-assoziierten DCs sind essentiell für die Entwicklung einer Tumormikroimmunität und können als Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem agieren (Guiducci *et al.* 2005). Interessanter Weise konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sich zirkulierende Blutmonozyten, abhängig vom Tumormikromilieu, sowohl in TAMs als auch in Tumor-assoziierte DCs differenzieren können (Chomarat *et al.* 2000). Es wird vermutet, dass die Funktionen der infiltrierenden DCs durch das Tumormikromilieu gestört wird und dass eine Therapie durch Immunstimulatoren diese Funktionen wiederherstellen kann (Guiducci *et al.* 2005). Es ist unklar, ob TAMs *in vivo* längerfristig mit Tumor-assoziierten DCs interagieren und ob DCs zur Tumorzytotoxizität beitragen. Jedoch wird vermutet, dass eine Aktivierung der TAMs auch eine Wiederherstellung der Tumor-assoziierten DCs zur Folge hat, wodurch sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem an der Tumorzelleradikation beteiligt sind (Guiducci *et al.* 2005). Somit könnten auch Tumor-assoziierte DCs *in vivo* eine Rolle bei der Reduktion der Tumorinvasion unter der Therapie mit Mifamurtid spielen.

Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die bereits mehrfach gezeigte Hypothese der Invasivitätssteigerung von Brustkrebszellen durch die TAMs. Darüber hinaus konnte gezeigt

werden, dass Mifamurtid zu einer Reduktion dieser Makrophagen-induzierten Invasivität durch TAMs *in vitro* führt. Jedoch konnten diese Ergebnisse, zumindest bei Brustkrebs, bisher nicht *in vivo* bestätigt werden.

## 5.6 Wirkung von Mifamurtid auf die MG-induzierte Tumorinvasion

Da fortgeschrittener Brustkrebs häufig zerebral metastasiert, wurden zur Untersuchung des Einflusses auf die Metastasierung weiterführende Kokulturversuche mit Mikroglia (MG) als residente Makrophagenpopulation durchgeführt. Dabei wurden die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 sowie die murinen Zelllinien 410.4 und E0771LG mit MG ko-kultiviert. Bei den 410.4 handelt es sich um murine triple-negative invasive Adenokarzinomzellen und bei den E0771LG um eine murine Adenokarzinomzelllinie, welche aus den Lungenmetastasen der Zellelinie E0771 gewonnen wurde (Kitamura *et al.* 2015; Miller *et al.* 1983). Bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte in ZNS-Metastasen bei fortgeschrittenem Brustkrebs eine MG-Akkumulation, sowie eine Interaktion von MG mit Tumorzellen nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen die MG aktivieren und diese wiederum die Invasivität der Tumorzellen fördert. Des Weiteren wurde eine Reduktion der MG-induzierten Invasivität unter der Behandlung des Immunstimulators LPS beobachtet (Pukrop *et al.* 2010). Bei den Experimenten in dieser Arbeit konnten ebenfalls eine Steigerung der Tumorinvasion von Brustkrebszellen in Kokultur mit MG beobachtet werden. Darüber hinaus zeigte sich eine Reduktion der MG-induzierten Tumorinvasion unter der Behandlung mit L-MTP-PE. Jedoch wurden weder bei den murinen Zelllinien 410.4 und E0771LG noch bei der MG Viabilitäts- oder Proliferationsmessungen während der Behandlung mit L-MTP-PE durchgeführt, weshalb ein direkter Effekt des Wirkstoffes auf die Tumorzellen und die MG nicht ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sowohl residente Makrophagen als auch TAMs, die von zirkulierenden Monozyten abstammen, an der Tumorinvasivität beteiligt sind. Des Weiteren führt Mifamurtid sowohl in der Kokultur mit TAMs als auch mit MG zu einer Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasivität der Brustkrebszellen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass weitere Analysen nötig sind, um zu klären, wie genau es zu der Reduktion der Invasivität kommt und welche Mechanismen daran beteiligt sind. Weiterhin bleibt offen, ob sich die Ergebnisse *in vivo* reproduzieren lassen. Interessant wäre auch eine Untersuchung des Wirkstoffes in Kombination mit anderen Immunmodulatoren, die in verschiedenen Publikationen bereits einen positiven Effekt zeigten (Guiducci *et al.* 2005; Pahl *et al.* 2014).

## 5.7 Einfluss von Mifamurtid auf die NO-Sekretion von Makrophagen

Nachdem eine Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumorinvasion nach Stimulation mit Mifamurtid gezeigt werden konnte, sollte die Makrophagenaktivierung durch den Wirkstoff untersucht werden. Dabei stellt sich die Frage, ob eine klassische inflammatorische Makrophagenaktivierung für die Reduktion der Tumorinvasion in Frage kommt. Um dies genauer zu analysieren, wurde ein Griess-Versuch durchgeführt. Dabei wurde die BMDM-Aktivierung unter der Behandlung mit Mifamurtid untersucht und mit der Aktivierung durch den klassischen Immunstimulator LPS verglichen. Im Griess-Versuch wird die Nitritkonzentration im Überstand gemessen, welche wiederum Rückschlüsse auf die NO-Produktion zulässt. NO ist ein proinflammatorisches Molekül und charakteristisch für eine klassisch tumorzytotoxische Makrophagenaktivierung (Sica *et al.* 2006). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine geringe Konzentration von MTP-PE zu keiner Aktivierung der Makrophagen führt, wohingegen die gleiche Konzentration an LPS in einer starken Aktivierung der Makrophagen resultiert. Jedoch findet sich bei höheren Konzentrationen ein Anstieg, welcher darauf hindeutet, dass bei steigenden Konzentrationen von MTP-PE zwar eine Makrophagenaktivierung stattfindet, diese jedoch nicht annähernd so stark ist wie eine klassische Aktivierung durch LPS. Da die NO-Konzentration 24 h nach Stimulation mit MTP-PE gemessen wurde, bleibt offen, ob der maximale Spiegel nach Stimulation gemessen wurde. Dieter *et al.* konnte in Lebermakrophagen nachweisen, dass die Sekretion von NO sowie TNF- $\alpha$  und PGE-2 nach Mifamurtid und LPS Behandlung zeitabhängig ist und ihr Maximum nach 48 h erreicht. Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass die Sekretion von NO auch in den hier analysierten Makrophagen nach 48 h noch weiter ansteigt (Dieter *et al.* 1995).

Ein möglicher Grund für eine fehlende Aktivierung der Makrophagen könnte die Wirkstoffkonzentration sein. Gemessen an der Tumorzytotoxizität wurde bereits in älteren Studien postuliert, dass 0,1 nmol/ml MTP-PE (0,124  $\mu\text{g/ml}$ ) zu keiner Aktivierung von Makrophagen führen würde, weshalb höhere Konzentrationen, wie beispielsweise 50  $\mu\text{g/ml}$  MTP-PE, verwendet werden sollten, um Makrophagen zu stimulieren und deren Aktivität zu analysieren (Fogler und Fidler 1987; Xu und Fidler 1984). Somit ist eine Makrophagenaktivierung über die NO-Sekretion vermutlich erst bei einer höheren Konzentration zu erwarten. Interessanter Weise zeigt sich jedoch bereits bei der geringen Konzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  eine Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumorinvasivität. Diese Beobachtungen

deuten darauf hin, dass nicht allein eine Aktivierung der Makrophagen für die reduzierte Invasivität verantwortlich ist, sondern noch weitere Mechanismen beteiligt sind. So kommt beispielsweise die bereits nachgewiesene direkte Wirkung von Mifamurtid auf die Tumorzellen hierfür in Frage.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um die direkte Wirkung von Mifamurtid klar von der indirekten Wirkung über die Aktivierung der Makrophagen abzugrenzen. Zudem könnten weiterführende Untersuchungen der NO-Produktion über eine längere Zeitspanne und mit höheren Mifamurtid-Konzentrationen zeigen, ob mit steigender Wirkdosis und Wirkdauer die Makrophagenaktivierung zunimmt und die Reduktion der Tumorinvasivität weiter gesteigert werden kann. Des Weiteren könnten Analysen der NO-Sekretion in Makrophagen während der Stimulation sowohl mit MTP-PE als auch L-MTP-PE klären inwieweit sich die beiden Wirkstoffformen in ihrer Stimulation der NO-Produktion und somit in ihrer Aktivierung unterscheiden. Bereits Fogler und Fidler konnten nachweisen, dass MTP-PE im Vergleich zu L-MTP-PE für die maximale Tumorzytotoxizität bei aktivierten Blutmonozyten *in vitro* eine viermal größere Konzentration benötigt (Fogler und Fidler 1987).

Wie bereits zuvor erwähnt, wird ein Zusammenhang zwischen einer unzureichenden NO-Produktion in TAMs und einer defizienten NF- $\kappa$ B Aktivierung vermutet. Diese mangelhafte NF- $\kappa$ B Aktivität wird als Ursache für den tumorfördernden Einfluss der TAMs diskutiert und ist typisch für den alternativen M2-Subtyp (Dinapoli *et al.* 1996; Sica *et al.* 2000; Sica *et al.* 2006). Aus diesem Grund wäre beispielsweise ein Analyse der NO-Sekretion in einer entsprechenden Kokultur in An- und Abwesenheit von Mifamurtid sehr vielversprechend, um zu untersuchen, ob TAMs in Kokultur tatsächlich das Zytokinprofil einer alternativen Aktivierung zeigen und ob eine anschließende Stimulation mit Mifamurtid zu einer klassischen M1-Makrophagenaktivierung und somit zu einem Shift der Subtypen führt.

In neueren Studien mit Osteosarkomzellen wurde untersucht, ob klassisch aktivierte M1-Makrophagen, welche mit Mifamurtid aktiviert wurden, das Tumorstadium inhibieren (Pahl *et al.* 2014). Dabei konnte *in vitro* gezeigt werden, dass mit L-MTP-PE stimulierte M1-Makrophagen für die tumorzytotoxische Aktivierung Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) benötigen. Es wird vermutet, dass IFN- $\gamma$  die Aufnahme der Liposomen in die Makrophagen fördert und zu einer verstärkten Nod2-Expression führt (Pahl *et al.* 2014; Totemeyer *et al.* 2006). *In vivo* konnte die Kombination von IFN- $\gamma$  mit Mifamurtid beim renalen Adenokarzinom eine

Reduktion der Metastasierungsrate und somit eine verbesserte Überlebenswahrscheinlichkeit zeigen (Dinney *et al.* 1992). Deshalb wäre auch in Bezug auf die Makrophagenaktivierung eine Kombination des Wirkstoffes mit anderen Immunmodulatoren ein vielversprechender Ansatz.

## 5.8 Einfluss von Mifamurtid auf die VEGFa- und WNT5a-Expression von Makrophagen

Angiogenese und Neovaskularisierung spielen eine essentielle Rolle beim Tumorwachstum und bei der Tumormetastasierung von invasivem Brustkrebs (Weidner *et al.* 1991). Es konnte gezeigt werden, dass die Förderung der Angiogenese mit Makrophagen vom M2-Typ assoziiert ist. Bei VEGFa handelt es sich um einen potenten angiogenetischen Faktor und somit um einen Hauptakteur der Tumorprogression. VEGFa wird in TAMs exprimiert, und es konnte nachgewiesen werden, dass eine Akkumulation von TAMs im Tumorgewebe wiederum mit einer vermehrten Produktion und Sekretion von VEGFa einhergeht. VEGFa fördert zudem die Rekrutierung von Makrophagen hin zum Tumorgewebe (Mantovani *et al.* 2002). Bei der Analyse der Genexpression von VEGFa auf mRNA-Ebene fand sich bei den Makrophagen nach Stimulation mit LPS eine signifikante Steigerung der Expression. Die Ergebnisse decken sich dabei mit bisher publizierten Studien, welche nach LPS-Stimulation eine Steigerung der VEGFa-Expression auf Proteinebene und mRNA-Ebene in Makrophagen nachweisen konnten (Du *et al.* 2006; Itaya *et al.* 2001; Perez-Ruiz *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu zeigte die Stimulation mit unterschiedlichen MTP-PE-Konzentrationen keinen Einfluss auf die Expression von VEGFa. Dies würde mit den Aussagen von Dieter *et al.* übereinstimmen, die bei der Makrophagenaktivierung zeigten, dass LPS und Mifamurtid zwar Gemeinsamkeiten teilen, sich jedoch in ihrer Zytokinproduktion und ihrer Potenz als Immunstimulatoren unterscheiden (Dieter *et al.* 1995). Gleichzeitig unterstützt dieses Ergebnis die neueren Vermutungen, dass die Signalweiterleitung von Mifamurtid und LPS über unterschiedliche Signalkaskaden erfolgt und ist somit ein weiterer Hinweis darauf, dass die Signalweiterleitung von Mifamurtid vermutlich nicht über den TLR4-Signalweg, sondern über den Nod2-Signalweg erfolgt (Fogler und Fidler 1987; Girardin *et al.* 2003).

Des Weiteren wurde die Expression des WNT-Liganden WNT5a in den Makrophagen untersucht, welcher ein klassischer Aktivator des nicht-kanonischen Signalwegs ist, jedoch auch in der Lage ist, den kanonischen Wnt-Signalweg zu inhibieren oder zu aktivieren (Mikels und Nusse 2006). Lange Zeit galt das Hauptaugenmerk bei der WNT-Expression den Tumorzellen, wobei die Rolle von WNT5a in der Tumorprogression kontrovers diskutiert wurde. Es wurde lange vermutet, dass WNT5a vor allem in der Tumorsuppression eine große Rolle spielt. So konnte eine retrospektive Studie von Brustkrebspatienten zeigen, dass der

Nachweis von WNT5a mit einer verbesserten Prognose von ER-positiven Tumoren korrelierte (Dejmek *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu konnte bei Melanomen gezeigt werden, dass der Nachweis einer WNT5a-Expression als Marker für invasives Wachstum gilt (Bittner *et al.* 2000; Weeraratna *et al.* 2002). Der Nachweis von WNT-Liganden im Tumormikromilieu gelang erstmals Smith *et al.* (Smith *et al.* 1999). Sie konnten eine WNT5a-Expression in TAMs beim Kolonkarzinom zeigen und postulierten, dass die WNT-Expression in TAMs eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression einnimmt. Bestätigt wurde die Vermutung durch Pukrop *et al.*, die nicht nur eine WNT5a-Expression in TAMs und in Lymphknotenmetastasen nachweisen konnten, sondern auch zeigten, dass WNT5a essentiell für die Makrophagen-induzierte Invasivität von Brustkrebszellen ist (Pukrop *et al.* 2006). Andererseits konnte auch eine WNT5a-Expression in aktivierten Makrophagen beobachtet werden, welche an einer inflammatorischen Reaktion gegen mikrobielle Stimuli beteiligt sind (Blumenthal *et al.* 2006; Pereira *et al.* 2008). Zusammenfassend scheint WNT5a unterschiedliche Rollen mit gegensätzlichen Funktionen in Makrophagen einzunehmen (Pukrop und Binder 2008). Zum einen kann es als Teil einer klassisch inflammatorischen Makrophagenaktivierung tumorsuppressiv agieren, zum anderen fördert es in TAMs die Tumorprogression (Binder 2012).

In dieser Arbeit konnte *in vitro* auf mRNA-Ebene ein signifikanter Anstieg der WNT5a-Expression nach der Stimulation mit 0,1 µg/ml MTP-PE gezeigt werden, der mit steigender Konzentration vermutlich zunimmt. Blumenthal *et al.* konnten zeigen, dass die WNT5a-Expression in der klassischen Entzündungsreaktion von Makrophagen durch TLR-Rezeptoren und NF-κB vermittelt wird (Blumenthal *et al.* 2006). Wie bereits zuvor erwähnt, konnte im Griess-Versuch bei derselben Konzentration von MTP-PE kein Anstieg der Makrophagenaktivität beobachtet werden. Es stellt sich somit die Frage, über welchen Signalweg eine mögliche Aktivierung durch Mifamurtid vermittelt wird und ob die WNT5a-Expression Hinweise für alternative Aktivierungswege der Makrophagen liefert. Einerseits konnte in Vorarbeiten der Gruppe gezeigt werden, dass bei der Kokultur von TAMs mit Brustkrebszellen WNT5a auf mRNA- und Proteinebene in den Makrophagen hochreguliert wird und dass sekretiertes WNT5a im Kokulturversuch die Invasivität der Brustkrebszellen steigert (Pukrop *et al.* 2006). Andererseits konnte nachgewiesen werden, dass eine relativ hohe Konzentration an WNT5a die Migration von Brustkrebszellen reduziert (Safholm *et al.* 2006). Dabei wird die Höhe der Sekretion als Ursache für die gegensätzlichen Wirkungen

diskutiert. Jedoch bleibt die genaue Rolle von WNT5a in der Makrophagen-induzierten Tumorinvasion von Brustkrebszellen nach Behandlung durch Mifamurtid weiterhin offen und erfordert weiterführende Analysen.

In der Zusammenfassung verdeutlichen die Ergebnisse der Makrophagenaktivierung, dass sich die Stimulation von Makrophagen durch Mifamurtid und LPS deutlich unterscheidet. Des Weiteren wird deutlich, dass die Aktivierung der Makrophagen von der Konzentration an Mifamurtid abhängt und alternative Signalwege, wie den WNT5a-Signalweg, vermutlich mit einschließt. Dabei gilt es, vor allem die Aktivierung bei höheren Konzentrationen und einer längeren Therapiedauer zu analysieren. Darüber hinaus wäre eine Kombination des Wirkstoffes, beispielsweise mit IFN- $\gamma$ , eine Möglichkeit die Aktivierung der Makrophagen zu steigern und somit die Invasivität von Brustkrebszellen weiter zu senken.

## 6 Fazit

Seit einiger Zeit häufen sich die Hinweise darauf, dass die Metastasierung bereits früh in der Tumorprogression stattfindet, weshalb ein besseres Verständnis der Metastasierungsprozesse für die Entwicklung neuer Therapieansätze essentiell ist (Hosseini *et al.* 2016). Das Tumormikromilieu und insbesondere TAMs spielen eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und in vielen Schritten der Tumormetastasierung. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass zirkulierende Blutmonozyten als TAMs zum Tumorgewebe rekrutiert werden und nach Interaktion mit dem Tumormikromilieu das Wachstum und die Invasion von soliden Tumoren und Tumormetastasen fördern (Fidler *et al.* 1982; Hagemann *et al.* 2004; Lin *et al.* 2001; Wyckoff *et al.* 2004). Ein Wirkstoff, der das Verhalten von Makrophagen beeinflusst und beim fortgeschrittenen Osteosarkom schon erfolgreich eingesetzt wird, ist Mifamurtid. Bisher ist weder die genaue Wirkungsweise noch der molekulare Mechanismus von Mifamurtid genau geklärt. Lange Zeit wurde eine Signaltransduktion über TLRs diskutiert. Seit einiger Zeit verdichten sich jedoch Hinweise, die eine Aktivierung der Makrophagen über den intrazellulären Rezeptor Nod2 vermuten lassen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl TLR1, TLR2, TLR4 als auch Nod2 auf mRNA-Ebene in Brustkrebszellen exprimiert sind und somit auch die Brustkrebszellen das Potential einer direkten Aktivierung durch Mifamurtid aufweisen. Tatsächlich zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Mifamurtid die Invasivität von einer hochinvasiven Brustkrebszelllinie senkt und somit die Tumorzellen direkt beeinflussen kann.

Da in früheren Tierversuchen mit Mifamurtid bei Brustkrebs keine Verbesserung der Überlebenszeit gezeigt werden konnte, gibt es bisher kaum weiterführende Untersuchungen (Fox *et al.* 1995; Teske *et al.* 1998). Jedoch wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass es sich bei Mifamurtid um einen potenten Makrophagenaktivator handelt, der die Immunantwort von TAMs moduliert und eine verstärkte Tumorzytotoxizität zur Folge hat (Asano *et al.* 1994; Dieter *et al.* 1995; Fogler und Fidler 1985; Kleinerman *et al.* 1983; Kurzman *et al.* 1999). Deshalb gilt die Stimulation von Makrophagen als vielversprechender Therapieansatz, um die Makrophagen-induzierte Invasivität von Brustkrebszellen zu reduzieren. In dieser Arbeit konnte eine Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasivität von humanen und murinen Brustkrebszelllinien unter der Behandlung mit MTP-PE und

L-MTP-PE gezeigt werden. Dabei fand sich ein Einfluss sowohl auf TAMs, welche von zirkulierenden Monozyten abstammen, als auch auf Mikroglia als residente Makrophagenpopulation, die vor allem in der ZNS-Metastasierung von Brustkrebs eine große Rolle spielt.

Als Ursache für die Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasion durch Mifamurtid wurde bisher eine klassisch zytotoxische Aktivierung der Makrophagen vermutet. Deshalb wurde abschließend die Makrophagenaktivierung unter der Behandlung mit Mifamurtid untersucht und mit der Aktivierung durch den Immunstimulator LPS verglichen. Neuere Studien zeigen, dass sich aktivierte Makrophagen anhand ihres Sekretionsprofils unter anderem in einen klassischen tumorsuppressiven M1-Typ oder einen tumorfördernden M2-Typ einteilen lassen, wobei TAMs ein M2-Profil aufweisen (Sica *et al.* 2006). In dieser Arbeit fand sich im Vergleich zu LPS lediglich eine schwache Sekretion von NO und somit nur eine schwache klassisch inflammatorische M1-Aktivierung, was darauf hindeutet, dass nicht eine klassische M1-Aktivierung der Makrophagen für die reduzierte Invasivität durch Mifamurtid verantwortlich ist, sondern alternative Mechanismen beteiligt sind.

In bisher veröffentlichten Studien konnten *in vitro* und *in vivo* eine Überlegenheit von Mifamurtid in Kombination mit IFN- $\gamma$  bei der Aktivierung der Makrophagen und der Reduktion der Metastasierungsrate beim Osteosarkom und dem renalen Adenokarzinom gezeigt werden (Dinney *et al.* 1992; Pahl *et al.* 2014). Somit wären auch bei Brustkrebs weitere Untersuchungen von Mifamurtid in Kombination mit IFN- $\gamma$  ein vielversprechender Ansatz, um die Makrophagenaktivierung zu steigern und die daraus folgende Reduktion der Makrophagen-induzierten Invasivität zu verstärken.

Klar ist, dass Mifamurtid zu einer Reduktion der Makrophagen-induzierten Tumordinvasion von Brustkrebszellen führt. Letztendlich bleibt jedoch weiterhin offen, wie genau die Reduktion der Invasivität von Brustkrebszellen *in vitro* zustande kommt, welche Signalwege genau daran beteiligt sind und welche Auswirkungen dies auf die Metastasierung und Tumorprogression der Brustkrebszellen *in vivo* hat. Weitere Untersuchungen von Mifamurtid sind nötig, um ein besseres Verständnis der Wirkungsweise auf die Tumorprogression und Metastasierung von Brustkrebs zu bekommen. Dadurch würden sich neue Therapieansätze zur klinischen Therapie beim fortgeschrittenen Brustkrebs eröffnen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akashi-Takamura S, Miyake K (2008): TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 20, 420-425
- Akira S, Takeda K, Kaisho T (2001): Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801
- Albanell J, Bellmunt J, Molina R, Garcia M, Caragol I, Bermejo B, Ribas A, Carulla J, Gallego O S, Espanol T und Solé L A (1996): Node-negative breast cancers with p53(-)/HER2-neu(-) status may identify women with very good prognosis. *Anticancer Res* 16, 1027-1032
- Asano T, Kleinerman E S (1993): Liposome-encapsulated MTP-PE: a novel biologic agent for cancer therapy. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 14, 286-292
- Asano T, McWatters A, An T, Matsushima K, Kleinerman E S (1994): Liposomal muramyl tripeptide up-regulates interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interleukin-8 gene expression in human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 268, 1032-1039
- Balkwill F, Charles K A, Mantovani A (2005): Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211-217
- Barnich N, Aguirre J E, Reinecker H C, Xavier R, Podolsky D K (2005): Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol* 170, 21-26
- Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb G M, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka K A, Banchereau J (1999): In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190, 1417-1426
- Berridge M, Tan A, McCoy K, Wang R (1996): The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4, 14-19
- Binder C: The Role of Tumour-Associated Macrophages in Malignant Invasion. In: Lawrence T, Hagemann T (Hrsg.): Tumour-Associated Macrophages. Springer, New York 2012, 31-47

- Bingle L, Brown N J, Lewis C E (2002): The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196, 254-265
- Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A *et al* (2000): Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 406, 536-540
- Blumenthal A, Ehlers S, Lauber J, Buer J, Lange C, Goldmann T, Heine H, Brandt E, Reiling N (2006): The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* 108, 965-973
- Bonizzi G, Karin M (2004): The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25, 280-288
- Bottazzi B, Polentarutti N, Acero R, Balsari A, Boraschi D, Ghezzi P, Salmona M, Mantovani A (1983): Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants. *Science* 220, 210-212
- Bucana C D, Hoyer L C, Schroit A J, Kleinerman E, Fidler I J (1983): Ultrastructural studies of the interaction between liposome-activated human blood monocytes and allogeneic tumor cells in vitro. *Am J Pathol* 112, 101-111
- Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves W J, Jr. (1974): Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 53, 661-674
- Cardoso F, Senkus-Konefka E, Fallowfield L, Costa A, Castiglione M (2010): Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5, v15-v19
- Chin A I, Dempsey P W, Bruhn K, Miller J F, Xu Y, Cheng G (2002): Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature* 416, 190-194
- Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka A K (2000): IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 1, 510-514
- da Silva C J, Miranda Y, Leonard N, Hsu J, Ulevitch R J (2007): Regulation of Nod1-mediated signaling pathways. *Cell Death Differ* 14, 830-839
- Dawood S, Broglio K, Buzdar A U, Hortobagyi G N, Giordano S H (2010): Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *J Clin Oncol* 28, 92-98
- Dejmek J, Leandersson K, Manjer J, Bjartell A, Emdin S O, Vogel W F, Landberg G, Andersson T (2005): Expression and signaling activity of Wnt-5a/discoidin domain receptor-1

- and Syk plays distinct but decisive roles in breast cancer patient survival. *Clin Cancer Res* 11, 520-528
- Dieter P, Ambs P, Fitzke E, Hidaka H, Hoffmann R, Schwende H (1995): Comparative studies of cytotoxicity and the release of TNF-alpha, nitric oxide, and eicosanoids of liver macrophages treated with lipopolysaccharide and liposome-encapsulated MTP-PE. *J Immunol* 155, 2595-2604
- Dieter P, Hempel U, Kamionka S, Kolada A, Malessa B, Fitzke E, Tran-Thi T A (1999): Prostaglandin E2 affects differently the release of inflammatory mediators from resident macrophages by LPS and muramyl tripeptides. *Mediators Inflamm* 8, 295-303
- Dinapoli M R, Calderon C L, Lopez D M (1996): The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Exp Med* 183, 1323-1329
- Dinney C P, Utsugi T, Fidler I J, von Eschenbach A C, Killion J J (1992): Immunotherapy of murine renal adenocarcinoma by systemic administration of liposomes containing the synthetic macrophage activator CGP 31362 or CGP 19835A in combination with interleukin 2 or gamma-interferon. *Cancer Res* 52, 1155-1161
- Doe W F, Henson P M (1978): Macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharides. I. Cytolytic effect on tumor target cells. *J Exp Med* 148, 544-556
- Du M, Roy K M, Zhong L, Shen Z, Meyers H E, Nichols R C (2006): VEGF gene expression is regulated post-transcriptionally in macrophages. *FEBS J* 273, 732-745
- Dunnwald L K, Rossing M A, Li C I (2007): Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 9, R6
- Fidler I J, Raz A, Fogler W E, Kirsh R, Bugelski P, Poste G (1980): Design of liposomes to improve delivery of macrophage-augmenting agents to alveolar macrophages. *Cancer Res* 40, 4460-4466
- Fidler I J, Raz A, Fogler W E, Hoyer L C, Poste G (1981): The role of plasma membrane receptors and the kinetics of macrophage activation by lymphokines encapsulated in liposomes. *Cancer Res* 41, 495-504
- Fidler I J, Barnes Z, Fogler W E, Kirsh R, Bugelski P, Poste G (1982): Involvement of macrophages in the eradication of established metastases following intravenous injection of liposomes containing macrophage activators. *Cancer Res* 42, 496-501

- Fogler W E, Fidler I J (1985): Nonselective destruction of murine neoplastic cells by syngeneic tumoricidal macrophages. *Cancer Res* 45, 14-18
- Fogler W E, Fidler I J (1987): Comparative interaction of free and liposome-encapsulated nor-muramyl dipeptide or muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (3H-labelled) with human blood monocytes. *Int J Immunopharmacol* 9, 141-150
- Fogler W E, Wade R, Brundish D E, Fidler I J (1985): Distribution and fate of free and liposome-encapsulated [3H]nor-muramyl dipeptide and [3H]muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine in mice. *J Immunol* 135, 1372-1377
- Folkman J (1985): Toward an understanding of angiogenesis: search and discovery. *Perspect Biol Med* 29, 10-36
- Fox L E, MacEwen E G, Kurzman I D, Dubielzig R R, Helfand S C, Vail D M, Kisseberth W, London C, Madewell B R, Rodriguez C O, Jr. (1995): Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine for the treatment of feline mammary adenocarcinoma--a multicenter randomized double-blind study. *Cancer Biother* 10, 125-130
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G (2009): Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 227, 106-128
- Galligioni E, Santarosa M, Favaro D, Spada A, Talamini R, Quiaia M (1994): In vitro synergic effect of interferon gamma combined with liposomes containing muramyl tripeptide on human monocyte cytotoxicity against fresh allogeneic and autologous tumor cells. *Tumori* 80, 385-391
- Gay B, Cardot J M, Schnell C, van H P, Gyax D (1993): Comparative pharmacokinetics of free muramyl tripeptide phosphatidyl ethanolamine (MTP-PE) and liposomal MTP-PE. *J Pharm Sci* 82, 997-1001
- Ghosh S, May M J, Kopp E B (1998): NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-260
- Gilmore T D (2006): Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680-6684
- Girardin S E, Boneca I G, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott D J, Sansonetti P J (2003): Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278, 8869-8872
- Giulian D, Baker T J (1986): Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* 6, 2163-2178

- Gorden D L, Fingleton B, Crawford H C, Jansen D E, Lepage M, Matrisian L M (2007): Resident stromal cell-derived MMP-9 promotes the growth of colorectal metastases in the liver microenvironment. *Int J Cancer* 121, 495-500
- Griess P (1879): Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 12, 426-428
- Grimes C L, Ariyananda L Z, Melnyk J E, O'Shea E K (2012): The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. *J Am Chem Soc* 134, 13535-13537
- Guarneri V, Conte P (2009): Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *Oncologist* 14, 645-656
- Guiducci C, Vicari A P, Sangaletti S, Trinchieri G, Colombo M P (2005): Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Res* 65, 3437-3446
- Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna J L (2002): Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 277, 41701-41705
- Hagemann T, Robinson S C, Schulz M, Trumper L, Balkwill F R, Binder C (2004): Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25, 1543-1549
- Hayden M S, Ghosh S (2004): Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18, 2195-2224
- Hosseini H, Obradovic M M, Hoffmann M, Harper K L, Sosa M S, Werner-Klein M, Nanduri L K, Werno C, Ehrl C, Maneck M *et al* (2016): Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature* 540, 552-558
- Hotary K, Li X Y, Allen E, Stevens S L, Weiss S J (2006): A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev* 20, 2673-2686
- Huang B, Zhao J, Li H, He K L, Chen Y, Chen S H, Mayer L, Unkeless J C, Xiong H (2005): Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* 65, 5009-5014
- Huang B, Zhao J, Shen S, Li H, He K L, Shen G X, Mayer L, Unkeless J, Li D, Yuan Y *et al* (2007): *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res* 67, 4346-4352

- Inohara N, Nunez G (2003): NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 3, 371-382
- Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M *et al* (2003): Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278, 5509-5512
- Itaya H, Imaizumi T, Yoshida H, Koyama M, Suzuki S, Satoh K (2001): Expression of vascular endothelial growth factor in human monocyte/macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Thromb Haemost* 85, 171-176
- Jing Y Y, Han Z P, Sun K, Zhang S S, Hou J, Liu Y, Li R, Gao L, Zhao X, Zhao Q D *et al* (2012): Toll-like receptor 4 signaling promotes epithelial-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma induced by lipopolysaccharide. *BMC Med* 10, 98
- Kager L, Potschger U, Bielack S (2010): Review of mifamurtide in the treatment of patients with osteosarcoma. *Ther Clin Risk Manag* 6, 279-286
- Kawai T, Akira S (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373-384
- Kim S, Takahashi H, Lin W W, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, Luo J L, Karin M (2009): Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 457, 102-106
- Kitamura T, Qian B Z, Soong D, Cassetta L, Noy R, Sugano G, Kato Y, Li J, Pollard J W (2015): CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *J Exp Med* 212, 1043-1059
- Kleinerman E S, Erickson K L, Schroit A J, Fogler W E, Fidler I J (1983): Activation of tumoricidal properties in human blood monocytes by liposomes containing lipophilic muramyl tripeptide. *Cancer Res* 43, 2010-2014
- Kleinerman E S, Raymond A K, Bucana C D, Jaffe N, Harris M B, Krakoff I H, Benjamin R, Fidler I J (1992): Unique histological changes in lung metastases of osteosarcoma patients following therapy with liposomal muramyl tripeptide (CGP 19835A lipid). *Cancer Immunol Immunother* 34, 211-220
- Kurzman I D, Shi F, Vail D M, MacEwen E G (1999): In vitro and in vivo enhancement of canine pulmonary alveolar macrophage cytotoxic activity against canine osteosarcoma cells. *Cancer Biother Radiopharm* 14, 121-128
- Lacroix M, Leclercq G (2004): Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 83, 249-289

- Leek R D, Lewis C E, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris A L (1996): Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 56, 4625-4629
- Lejeune S, Huguet E L, Hamby A, Poulsom R, Harris A L (1995): Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* 1, 215-222
- Lin E Y, Nguyen A V, Russell R G, Pollard J W (2001): Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 193, 727-740
- MacEwen E G, Kurzman I D, Rosenthal R C, Smith B W, Manley P A, Roush J K, Howard P E (1989): Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *J Natl Cancer Inst* 81, 935-938
- Mantovani A (1989): Tumor-associated macrophages. *Curr Opin Immunol* 2, 689-692
- Mantovani A (1994): Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest* 71, 5-16
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002): Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23, 549-555
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686
- Markovic D S, Glass R, Synowitz M, Rooijen N, Kettenmann H (2005): Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 754-762
- Marshall O J (2004): PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20, 2471-2472
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway C A, Jr. (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397
- Meshcheriakova E A, Andronova T M, Ivanov V T (2010): [A protein interaction network and cell signaling pathways activated by muramyl peptides]. *Bioorg Khim* 36, 581-595
- Meyers P A, Schwartz C L, Krailo M D, Healey J H, Bernstein M L, Betcher D, Ferguson W S, Gebhardt M C, Goorin A M, Harris M *et al* (2008): Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival--a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 26, 633-638

- Mikels A J, Nusse R (2006): Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4, e115
- Miller F R, Miller B E, Heppner G H (1983): Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis* 3, 22-31
- Mo J, Boyle J P, Howard C B, Monie T P, Davis B K, Duncan J A (2012): Pathogen sensing by nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) is mediated by direct binding to muramyl dipeptide and ATP. *J Biol Chem* 287, 23057-23067
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63
- Mosser D M (2003): The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73, 209-212
- Mukai M, Shinkai K, Tateishi R, Mori Y, Akedo H (1987): Macrophage potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells. *Cancer Res* 47, 2167-2171
- Müller M, Haag P, Hanhart N: Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis: Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen - 2014/15 . 7. Auflage: Medizinische Verlags- und Informationsdienste. Breisach am Rhein 2014
- Nardin A, Lefebvre M L, Labroquere K, Faure O, Abastado J P (2006): Liposomal muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine: Targeting and activating macrophages for adjuvant treatment of osteosarcoma. *Curr Cancer Drug Targets* 6, 123-133
- Nguyen D X, Massague J (2007): Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* 8, 341-352
- Nguyen D X, Chiang A C, Zhang X H, Kim J Y, Kris M G, Ladanyi M, Gerald W L, Massague J (2009): WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell* 138, 51-62
- O'Neill L A, Golenbock D, Bowie A G (2013): The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 453-460
- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen F F, Yamaoka S, Nunez G (2001): Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 276, 4812-4818
- Paget S (1989): The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 8, 98-101

- Pahl J H, Kwappenberg K M, Varypataki E M, Santos S J, Kuijjer M L, Mohamed S, Wijnen J T, van Tol M J, Cleton-Jansen A M, Egeler R M *et al* (2014): Macrophages inhibit human osteosarcoma cell growth after activation with the bacterial cell wall derivative liposomal muramyl tripeptide in combination with interferon-gamma. *J Exp Clin Cancer Res* 33, 27
- Pan Q, Kravchenko V, Katz A, Huang S, Li M, Mathison J C, Kobayashi K, Flavell R A, Schreiber R D, Goeddel D und Ulevitch R J (2006): NF-kappa B-inducing kinase regulates selected gene expression in the Nod2 signaling pathway. *Infect Immun* 74, 2121-2127
- Park J H, Kim Y G, McDonald C, Kanneganti T D, Hasegawa M, Body-Malapel M, Inohara N, Nunez G (2007): RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* 178, 2380-2386
- Pereira C, Schaer D J, Bachli E B, Kurrer M O, Schoedon G (2008): Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 504-510
- Perez-Ruiz M, Ros J, Morales-Ruiz M, Navasa M, Colmenero J, Ruiz-del-Arbol L, Cejudo P, Claria J, Rivera F, Arroyo V *et al* (1999): Vascular endothelial growth factor production in peritoneal macrophages of cirrhotic patients: regulation by cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Hepatology* 29, 1057-1063
- Perkins N D (2007): Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 49-62
- Pfannes S D, Muller B, Korner S, Bessler W G, Hoffmann P (2001): Induction of soluble antitumoral mediators by synthetic analogues of bacterial lipoprotein in bone marrow-derived macrophages from LPS-responder and -nonresponder mice. *J Leukoc Biol* 69, 590-597
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M Y, Van H C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C *et al* (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088
- Poste G, Kirsh R (1979): Rapid decay of tumoricidal activity and loss of responsiveness to lymphokines in inflammatory macrophages. *Cancer Res* 39, 2582-2590
- Poste G, Bucana C, Raz A, Bugelski P, Kirsh R, Fidler I J (1982): Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery. *Cancer Res* 42, 1412-1422
- Pukrop T, Binder C (2008): The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. *J Mol Med (Berl)* 86, 259-266

- Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trumper L, Binder C (2006): Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5454-5459
- Pukrop T, Dehghani F, Chuang H N, Lohaus R, Bayanga K, Heermann S, Regen T, Van R D, Klemm F, Schulz M *et al* (2010): Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way. *Glia* 58, 1477-1489
- Regen T, Van R D, Scheffel J, Kastriti M E, Revelo N H, Prinz M, Bruck W, Hanisch U K (2011): CD14 and TRIF govern distinct responsiveness and responses in mouse microglial TLR4 challenges by structural variants of LPS. *Brain Behav Immun* 25, 957-970
- Reiling N, Klug K, Krallmann-Wenzel U, Laves R, Goyert S, Taylor M E, Lindhorst T K, Ehlers S (2001): Complex encounters at the macrophage-mycobacterium interface: studies on the role of the mannose receptor and CD14 in experimental infection models with *Mycobacterium avium*. *Immunobiology* 204, 558-571
- RKI (2013): Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe: 68-70. Robert Koch-Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin. 2013
- Robinson S C, Scott K A, Wilson J L, Thompson R G, Proudfoot A E, Balkwill F R (2003): A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res* 63, 8360-8365
- Safholm A, Leandersson K, Dejmek J, Nielsen C K, Villoutreix B O, Andersson T (2006): A formylated hexapeptide ligand mimics the ability of Wnt-5a to impair migration of human breast epithelial cells. *J Biol Chem* 281, 2740-2749
- Sanford K K, Hobbs G L, Earle W R (1956): The tumor-producing capacity of strain L mouse cells after 10 years in vitro. *Cancer Res* 16, 162-166
- Seager D J, Lutz M, Hama S, Cruz D, Castrillo A, Lazaro J, Phillips R, Premack B, Berliner J (2004): Method for large scale isolation, culture and cryopreservation of human monocytes suitable for chemotaxis, cellular adhesion assays, macrophage and dendritic cell differentiation. *J Immunol Methods* 288, 123-134
- Sen R, Baltimore D (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716
- Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, Cardoso F (2013): Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 24 Suppl 6, vi7-23

- Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, van D J, Mantovani A (2000): Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol* 164, 762-767
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006): Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 42, 717-727
- Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H: Assay Guidance Manual (Internet). Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. 2004
- Slamon D J, Godolphin W, Jones L A, Holt J A, Wong S G, Keith D E, Levin W J, Stuart S G, Udove J, Ullrich A *et al* (1989): Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712
- Sliwa M, Markovic D, Gabrusiewicz K, Synowitz M, Glass R, Zawadzka M, Wesolowska A, Kettenmann H, Kaminska B (2007): The invasion promoting effect of microglia on glioblastoma cells is inhibited by cyclosporin A. *Brain* 130, 476-489
- Smith K, Bui T D, Poulosom R, Kaklamanis L, Williams G, Harris A L (1999): Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 81, 496-502
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P (2009): Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86, 1065-1073
- Sorlie T, Perou C M, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen M B, van de Rijn M, Jeffrey S S *et al* (2001): Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874
- Soule H D, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51, 1409-1416
- Steele R J, Eremin O, Brown M, Hawkins R A (1984): A high macrophage content in human breast cancer is not associated with favourable prognostic factors. *Br J Surg* 71, 456-458
- Takeda K, Akira S (2004): TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16, 3-9
- Teske E, Rutteman G R, vd Ingh T S, van N R, Misdorp W (1998): Liposome-encapsulated muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine (L-MTP-PE): a randomized clinical trial in dogs with mammary carcinoma. *Anticancer Res* 18, 1015-1019

- Totemeyer S, Sheppard M, Lloyd A, Roper D, Dowson C, Underhill D, Murray P, Maskell D, Bryant C (2006): IFN-gamma enhances production of nitric oxide from macrophages via a mechanism that depends on nucleotide oligomerization domain-2. *J Immunol* 176, 4804-4810
- Trempe G L (1976): Human breast cancer in culture. *Recent Results Cancer Res* 33-41
- Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M (2007): Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Oncol* 18, 977-984
- Vanharanta S, Massague J (2013): Origins of metastatic traits. *Cancer Cell* 24, 410-421
- Verreck F A, de B T, Langenberg D M, Hoeve M A, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff T H (2004): Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4560-4565
- Weeraratna A T, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent J M (2002): Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1, 279-288
- Weidner N, Semple J P, Welch W R, Folkman J (1991): Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324, 1-8
- Weigelt B, Peterse J L, van 't Veer L J (2005): Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5, 591-602
- Weiss L (2000): Patterns of metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 19, 281-301
- Wernert N (1997): The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch* 430, 433-443
- Werts C, Girardin S E, Philpott D J (2006): TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ* 13, 798-815
- Werts C, le B L, Liu J, Magalhaes J G, Carneiro L A, Fritz J H, Stockinger S, Balloy V, Chignard M, Decker T *et al* (2007): Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol* 37, 2499-2508
- Wesolowska A, Kwiatkowska A, Slomnicki L, Dembinski M, Master A, Sliwa M, Franciszkiwicz K, Chouaib S, Kaminska B (2008): Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor. *Oncogene* 27, 918-930

- Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson P C (2011): The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat Rev Cancer* 11, 512-522
- Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, Hodge C L, Haase J, Janes J, Huss J W, III *et al* (2009): BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol* 10, R130
- Wyckoff J, Wang W, Lin E Y, Wang Y, Pixley F, Stanley E R, Graf T, Pollard J W, Segall J, Condeelis J (2004): A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res* 64, 7022-7029
- Wyckoff J B, Wang Y, Lin E Y, Li J F, Goswami S, Stanley E R, Segall J E, Pollard J W, Condeelis J (2007): Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 67, 2649-2656
- Xie W, Wang Y, Huang Y, Yang H, Wang J, Hu Z (2009): Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF-kappaB in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 1027-1032
- Xu Z, Fidler I J (1984): The in situ activation of cytotoxic properties in murine Kupffer cells by the systemic administration of whole Mycobacterium bovis organisms or muramyl tripeptide. *Cancer Immunol Immunother* 18, 118-122
- Yang H, Zhou H, Feng P, Zhou X, Wen H, Xie X, Shen H, Zhu X (2010): Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J Exp Clin Cancer Res* 29, 92
- Zarembek K A, Godowski P J (2002): Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168, 554-561

## 8 Anhang

### 8.1 Europäischer Öffentlicher Beurteilungsbericht (EPAR) für Mepact®



EUROPEAN MEDICINES AGENCY  
SCIENCE MEDICINES HEALTH

EMA/585594/2013  
EMEA/H/C/802

#### Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit

---

## Mepact

### Mifamurtid

Das vorliegende Dokument ist eine Zusammenfassung des Europäischen Öffentlichen Beurteilungsberichts (EPAR) für Mepact, in dem erläutert wird, wie der Ausschuss für Humanarzneimittel (CHMP) das Arzneimittel beurteilt hat, um zu seinem befürwortenden Gutachten zur Erteilung der Genehmigung für das Inverkehrbringen und seinen Empfehlungen zu den Anwendungsbedingungen für Mepact zu gelangen.

#### Was ist Mepact?

Mepact ist ein Pulver zur Herstellung einer Infusionssuspension (Tropfinfusion in eine Vene). Es enthält den Wirkstoff Mifamurtid.

#### Wofür wird Mepact angewendet?

Mepact wird zur Behandlung hochmaligner nicht metastasierter Osteosarkome (einer Form von Knochenkrebs) bei Patienten zwischen zwei und 30 Jahren angewendet. „Hochmaligne“ bedeutet, dass es sich um eine schwere Form der Krebserkrankung handelt; „nicht metastasiert“ bedeutet, dass sich der Krebs in einem frühen Stadium befindet und noch nicht stark im Körper verbreitet hat. Mepact wird zusammen mit anderen Arzneimitteln gegen Krebs angewendet, nachdem der Tumor zunächst operativ entfernt worden ist.

Da es nur wenige Patienten mit Osteosarkom gibt, gilt die Krankheit als selten, und Mepact wurde am 21. Juni 2004 als Arzneimittel für seltene Leiden („Orphan-Arzneimittel“) ausgewiesen.

Das Arzneimittel ist nur auf ärztliche Verschreibung erhältlich.

#### Wie wird Mepact angewendet?

Die Behandlung mit Mepact sollte von einem Facharzt eingeleitet und überwacht werden, der in der Diagnose und Behandlung des Osteosarkoms erfahren ist.

7 Westferry Circus • Canary Wharf • London E14 4HB • United Kingdom  
Telephone +44 (0)20 7418 8400 Facsimile +44 (0)20 7418 8416  
E-mail info@ema.europa.eu Website www.ema.europa.eu

An agency of the European Union



© European Medicines Agency, 2013. Reproduction is authorised provided the source is acknowledged.

Die Dosierung von Mepact richtet sich nach der Größe und dem Gewicht des Patienten. Es wird zweimal wöchentlich über 12 Wochen und danach einmal wöchentlich über 24 Wochen verabreicht. Mepact wird als langsame Infusion über den Zeitraum von einer Stunde gegeben. Es darf nicht als Bolusinjektion (alles auf einmal) verabreicht werden.

### **Wie wirkt Mepact?**

Der Wirkstoff in Mepact, Mifamurtid, ist ein so genannter Immunmodulator. Er wirkt über eine Aktivierung der Makrophagen und Monozyten (weiße Blutzellen, die Bestandteil des Immunsystems sind). Wie genau Mifamurtid bei Osteosarkom wirkt, ist nicht abschließend geklärt, aber man geht davon aus, dass es die weißen Blutzellen anregt, chemische Stoffe freizusetzen, die die Krebszellen abtöten.

### **Wie wurde Mepact untersucht?**

Mepact wurde im Rahmen einer Hauptstudie untersucht, an der 678 Patienten im Alter von ein bis 31 Jahren mit hochmalignem nicht metastasiertem Osteosarkom teilnahmen. Nach der chirurgischen Entfernung des Tumors erhielten alle Patienten Arzneimittel gegen Krebs in verschiedenen Kombinationen. Die Hälfte der Patienten erhielten außerdem Mepact. In der Studie wurden Patienten, die Mepact erhielten, und Patienten, die kein Mepact erhielten, miteinander verglichen. Hauptindikator für die Wirksamkeit war die Anzahl der Patienten, die überlebten, ohne dass die Krankheit wiederkehrte. Die Patienten wurden über bis zu zehn Jahre lang nachbeobachtet.

### **Welchen Nutzen hat Mepact in diesen Studien gezeigt?**

Mepact verlängerte bei gemeinsamer Anwendung mit anderen Antikrebsmitteln den Zeitraum, den die Patienten überlebten, ohne dass ihre Krankheit wiederkehrte: 68 % der Patienten, die Mepact erhielten (231 von 338) überlebten, ohne dass die Krankheit wiederkehrte. Die entsprechende Zahl bei den Patienten, die kein Mepact erhielten, lag bei 61 % (207 von 340). Bei den Patienten, die Mepact erhielten, war darüber hinaus das Sterberisiko um 28 % verringert.

### **Welches Risiko ist mit Mepact verbunden?**

Die häufigsten Nebenwirkungen von Mepact (beobachtet bei mehr als 1 von 10 Patienten) sind Anämie (niedrige Zahl roter Blutzellen), Appetitlosigkeit, Kopfschmerzen, Schwindel, Tachykardie (beschleunigter Herzschlag), Hypertonie (hoher Blutdruck), Hypotonie (niedriger Blutdruck), Dyspnoe (Atemnot), Tachypnoe (beschleunigte Atmung), Husten, Erbrechen, Diarrhö (Durchfall), Verstopfung, Bauchschmerzen, Übelkeit, Hyperhidrose (vermehrtes Schwitzen), Myalgie (Muskelschmerzen), Arthralgie (Gelenkschmerzen), Rückenschmerzen, Schmerzen in den Extremitäten (Armen und Beinen), Fieber, Schüttelfrost, Müdigkeit, Hypothermie (verringerte Körpertemperatur), allgemeine Schmerzen, Unwohlsein, Asthenie (Schwäche) und Schmerzen in der Brust. Die vollständige Auflistung der im Zusammenhang mit Mepact berichteten Nebenwirkungen ist der Packungsbeilage zu entnehmen.

Mepact darf nicht bei Patienten angewendet werden, die möglicherweise überempfindlich (allergisch) gegen Mifamurtid oder einen der sonstigen Bestandteile sind. Es darf nicht gleichzeitig mit Ciclosporin oder anderen Calcineurin-Hemmern (Arzneimitteln, die das Immunsystem unterdrücken) oder hoch dosierten nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID, zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen) angewendet werden.

**Warum wurde Mepact zugelassen?**

Der CHMP gelangte zu dem Schluss, dass die Vorteile von Mepact in Kombination mit anderen Arzneimitteln gegen Krebs gegenüber den Risiken überwiegen, und empfahl, die Genehmigung für das Inverkehrbringen zu erteilen.

**Weitere Informationen über Mepact:**

Am 6. März 2009 erteilte die Europäische Kommission eine Genehmigung für das Inverkehrbringen von Mepact in der gesamten Europäischen Union. Die Genehmigung für das Inverkehrbringen gilt fünf Jahre und kann anschließend verlängert werden.

Den vollständigen Wortlaut des EPAR für Mepact finden Sie [hier](#). Wenn Sie weitere Informationen zur Behandlung mit Mepact benötigen, lesen Sie bitte die Packungsbeilage (ebenfalls Teil des EPAR) oder wenden Sie sich an Ihren Arzt oder Apotheker.

Die Zusammenfassung des Gutachtens des Ausschusses für Arzneimittel für seltene Leiden zu Mepact finden Sie [hier](#).

Diese Zusammenfassung wurde zuletzt im 09-2013 aktualisiert.

Zusammenfassung des europäischen öffentlichen Beurteilungsberichts (EPAR) für Mepact von der European Medicines Agency (EMA) 2013

[http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR -  
\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000802/WC500026562.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000802/WC500026562.pdf)

## 8.2 Erkrankungs- und Sterberisiko für Brustkrebs in Deutschland

	2009		2010		Prognose für 2014	
	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen
Neuerkrankungen	560	73.340	610	70.340	600	75.200
rohe Erkrankungsrate <sup>1</sup>	1,4	175,7	1,5	168,9	1,5	182,5
standardisierte Erkrankungsrate <sup>1,2</sup>	1,0	125,6	1,1	119,6	1,0	123,3
mittleres Erkrankungsalter <sup>3</sup>	69	64	69	64		
Sterbefälle	131	17.066	107	17.466		
rohe Sterberate <sup>1</sup>	0,3	40,9	0,3	41,9		
standardisierte Sterberate <sup>1,2</sup>	0,2	24,0	0,2	24,0		
5-Jahres-Prävalenz	2.300	301.500	2.300	307.800		
absolute 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) <sup>4</sup>			61 (42-74)	79 (78-80)		
relative 5-Jahres-Überlebensrate (2009-2010) <sup>4</sup>			74 (51-88)	87 (86-88)		

<sup>1</sup> je 100.000 Personen <sup>2</sup> altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung <sup>3</sup> Median <sup>4</sup> in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

Männer im Alter von	Erkrankungsrisiko				Sterberisiko			
	in den nächsten 10 Jahren		jemals		in den nächsten 10 Jahren		jemals	
35 Jahren	<0,1% (1 von 25.000)	0,1% (1 von 800)	<0,1% (1 von 192.000)	<0,1% (1 von 4.200)				
45 Jahren	<0,1% (1 von 15.000)	0,1% (1 von 820)	<0,1% (1 von 108.000)	<0,1% (1 von 4.300)				
55 Jahren	<0,1% (1 von 4.100)	0,1% (1 von 830)	<0,1% (1 von 21.000)	<0,1% (1 von 4.300)				
65 Jahren	<0,1% (1 von 2.300)	0,1% (1 von 930)	<0,1% (1 von 14.000)	<0,1% (1 von 4.800)				
75 Jahren	0,1% (1 von 1.700)	0,1% (1 von 1.200)	<0,1% (1 von 9.900)	<0,1% (1 von 5.800)				
Lebenszeitrisiko	0,1% (1 von 810)		<0,1% (1 von 4.300)					
Frauen im Alter von	in den nächsten 10 Jahren		jemals		in den nächsten 10 Jahren		jemals	
35 Jahren	0,9% (1 von 110)	12,9% (1 von 8)	0,1% (1 von 1.000)	3,5% (1 von 29)				
45 Jahren	2,1% (1 von 47)	12,2% (1 von 8)	0,3% (1 von 370)	3,4% (1 von 30)				
55 Jahren	3,2% (1 von 31)	10,5% (1 von 10)	0,5% (1 von 190)	3,2% (1 von 31)				
65 Jahren	3,7% (1 von 27)	7,8% (1 von 13)	0,9% (1 von 120)	2,8% (1 von 36)				
75 Jahren	3,1% (1 von 32)	4,9% (1 von 21)	1,2% (1 von 84)	2,2% (1 von 46)				
Lebenszeitrisiko	12,9% (1 von 8)		3,4% (1 von 29)					

**Tab. 8.1: Erkrankungs- und Sterberisiko für Brustkrebs in Deutschland**

Aus Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013. S. 68 und S. 70

[http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2013/krebs\\_in\\_deutschland\\_2013.pdf?\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf?_blob=publicationFile)

---

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. med. T. Pukrop für die Betreuung der Arbeit und seine umfassende Unterstützung danken. Er stand mir während der Promotion jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und ermöglichte es mir selbständig das Thema zu bearbeiten.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. med. C. Binder danken, die mir die Promotion erst ermöglicht hat und mich mit konstruktiven Anregungen und Verbesserungsvorschlägen unterstützte. Durch die Arbeit im Labor erlangte ich einen umfassenden Einblick in die medizinische Forschung und lernte wichtige Methoden der experimentellen Arbeit kennen.

Abschließend gilt mein besonderer Dank dem gesamten Laborteam, das mich mit aller Kraft unterstützte und bei Fragen und Problemen half.