

Aus der Klinik für Hämatologie und Medizinische Onkologie

(Prof. Dr. med. L. Trümper)

Der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Expression von Genen des WNT-Signalwegs in humanen Makrophagen nach MCF-7 Ko-Kultivierung und in murinen Makrophagen nach Mikrovesikel-Stimulation**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Mathias Pantke**

aus

Kędzierzyn-Koźle (Polen)

Göttingen 2019

---

**D e k a n:**

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referentin:

Prof. Dr. med. C. Binder

Ko-Referentin:

Prof. Dr. med. Heidi Eva Hahn

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2019

---

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Expression von Genen des WNT-Signalwegs in humanen Makrophagen nach MCF-7 Ko-Kultivierung und in murinen Makrophagen nach Mikrovesikel-Stimulation" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den ..... ..

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>III.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Epidemiologie und Biologie des Mammakarzinoms .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Das Tumor-<i>Microenvironment</i> .....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Mikrovesikel-vermittelte Kommunikation im Tumor .....	3
1.2.2	Das Tumor- <i>Microenvironment</i> im Mammakarzinom .....	4
<b>1.3</b>	<b>Die Tumor-assoziierten Makrophagen .....</b>	<b>5</b>
1.3.1	Physiologische Eigenschaften von Makrophagen.....	5
1.3.2	Die Tumor-assoziierten Makrophagen im Mammakarzinom.....	6
<b>1.4</b>	<b>Der WNT-Signalweg .....</b>	<b>8</b>
1.4.1	Der kanonische WNT-Signalweg .....	10
1.4.2	Die nicht-kanonischen WNT-Signalwege .....	13
1.4.2.1	Der <i>Planar-Cell-Polarity</i> -Signalweg.....	14
1.4.2.2	Der WNT/ $Ca^{2+}$ -Signalweg.....	15
1.4.3	Die Rolle der WNT-Signalwege im Mammakarzinom.....	16
1.4.4	Tumor-assoziierte Makrophagen und <i>WNT-Signaling</i> .....	19
<b>1.5</b>	<b>Die Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>21</b>
2.1.1	Verwendete Zelllinien .....	21

---

2.1.2	Chemikalien, Zellmedien, Proteine und Lösungen .....	21
2.1.3	Kommerziell erwerbbaare Systeme.....	23
2.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.5	Geräte.....	24
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.2.1	Zellkultur .....	26
2.2.1.1	Allgemeine Zellkulturmethoden .....	26
2.2.1.2	Zellzahlbestimmung.....	26
2.2.1.3	Isolation von humanen Monozyten aus peripherem Blut .....	27
2.2.1.4	Isolation von murinen Monozyten aus NMRI-Mäusen.....	28
2.2.1.5	Isolation von Mikrovessikeln aus dem Überstand von MCF-7-Zellen .....	29
2.2.1.6	Ko-Kulturversuche von humanen Makrophagen und MCF-7-Zellen .....	30
2.2.1.7	Mikrovessikel-Stimulation von murinen Makrophagen.....	31
2.2.2	RNA-Isolation .....	33
2.2.2.1	Einführung .....	33
2.2.2.2	Aufarbeitung der Makrophagen .....	34
2.2.2.3	<i>Single-Step</i> -Methode nach Chomczynski und Sacchi .....	34
2.2.2.4	<i>High Pure RNA Isolation Kit</i> .....	35
2.2.2.5	Absorptionsspektrometrie zur Bestimmung der RNA-Konzentration .....	36
2.2.2.6	RNA-Integritätsanalyse .....	36
2.2.3	Reverse Transkription .....	38
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion .....	39
2.2.4.1	Einführung .....	39
2.2.4.2	<i>Primer</i> -Erstellung .....	40
2.2.4.3	Qualitative PCR .....	41
2.2.4.4	Agarosegel-Elektrophorese .....	42
2.2.4.5	Quantitative PCR.....	42

---

2.2.5	Proteinanalytik .....	47
2.2.5.1	Proteinbestimmung nach Lowry.....	47
2.2.5.2	Bestimmung des Makrophagen-Phänotyps mittels <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i> .....	48
2.2.5.3	Immunfluoreszenzfärbung gegen TNF $\alpha$ in humanen Makrophagen.....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuche mit humanen Makrophagen .....</b>	<b>50</b>
3.1.1	Genexpressionsuntersuchung von <i>WNT5a</i> mRNA nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen.....	50
3.1.2	Genexpressionsanalysen der weiteren untersuchten Komponenten des WNT-Signalwegs.....	51
3.1.3	Genexpressionsanalysen der untersuchten Komponenten nach Stimulierung mit Lipopolysaccharid.....	54
3.1.4	Kein synergistischer Effekt der Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen und Stimulierung mit Lipopolysacchariden.....	55
3.1.5	Immunfluoreszenz gegen TNF $\alpha$ in humanen Makrophagen nach Stimulierung mit Lipopolysacchariden.....	56
<b>3.2</b>	<b>Versuche mit murinen Makrophagen und Mikrovesikeln.....</b>	<b>57</b>
3.2.1	Genexpressionsanalysen in murinen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen mittels <i>RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Array</i> .....	57
3.2.2	Genexpressionsanalysen in murinen Makrophagen nach Stimulierung mit Mikrovesikeln aus MCF-7-Zellen mittels <i>RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Array</i> .....	58
3.2.3	Zytokinanalyse muriner Makrophagen mittels ELISA .....	60
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>

---

4.1	Induktion eines pro-inflammatorischen Phänotyps nach Stimulierung mit Lipopolysacchariden .....	63
4.2	Regulierung des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs in humanen Makrophagen nach Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen.....	64
4.3	Unterschiede in der Aktivierung muriner Makrophagen nach Ko-Kultur mit MCF-7 und Stimulation mit Mikrovesikeln .....	65
4.4	Bedeutung der zeitlichen Auflösung von Proteinaktivität und Genexpression nach Stimulierung durch WNT5a.....	66
5	Zusammenfassung .....	68
6	Literaturverzeichnis .....	69

---

## I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Sekretion der WNT-Proteine.....	9
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung des kanonischen WNT-Signalwegs in Drosophila .....	12
Abb. 1.3:	vereinfachte Darstellung des <i>Planar-Cell-Polarity</i> -Signalwegs.....	15
Abb. 2.1:	Modell eines Napfes mit hängendem Insert.....	30
Abb. 2.2:	Versuchsaufbau humane Makrophagen.....	31
Abb. 2.3:	Versuchsaufbau murine Makrophagen .....	33
Abb. 2.4:	Ausschnitt Bestückung der 384-Napf-Platte.....	45
Abb. 3.1:	<i>WNT5a</i> mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Ko- Kultivierung mit MCF-7-Zellen .....	51
Abb. 3.2 a-f:	Expressionsanalyse der mRNA weiterer WNT-Komponenten in humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen. ....	52
Abb. 3.3 a-b:	Expression der mRNA von <i>WNT5a</i> (a) und <i>TNF<math>\alpha</math></i> (b) in humanen Makrophagen nach Stimulierung mit LPS.....	55
Abb. 3.4:	Immunfluoreszenzfärbung gegen <i>TNF<math>\alpha</math></i> in Makrophagen .....	56
Abb. 3.5:	Verminderte Genexpression von WNT-abhängigen Komponenten nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen .....	58
Abb. 3.6:	Genexpression von WNT-abhängigen Komponenten nach Stimulierung mit MCF-7 <i>derived</i> Mikrovesikeln.....	59
Abb. 3.8 a-h:	Konzentration proinflammatorischer Proteine im Überstand.....	60



---

## II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: RNA-Konzentration und Integrität der verwendeten Proben .....	37
Tabelle 2.2: humane <i>Primer</i> .....	40
Tabelle 2.3: <i>Master Mix</i> für <i>Real-Time</i> PCR ohne cDNA.....	44
Tabelle 2.4: Genliste des <i>RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Arrays</i> .....	46
Tabelle 3.1: p-Werte berechnet aus $\Delta\text{Ct}$ und aufgeteilt nach Zielgen und Bedingung .....	54

---

### III. Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Activator Protein-1
APC	Adenomatous-polyposis-coli-Protein
BCL9	<i>B Cell CLL/Lymphoma 9 Protein</i>
BMDM	<i>Bone Marrow Derived Macrophages</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CCND3	<i>Cyclin D3</i>
CD	<i>Cluster Of Differentiation</i>
CDC42	<i>Cell Division Control Protein 42</i>
CK1 $\gamma$	Casein Kinase 1 $\gamma$
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CXCL12	CXC Chemokin-Ligand 12
CXCR4	CXC Chemokin-Rezeptor 4
DAAM	<i>Dishevelled-Associated Activator of Morphogenesis</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKK	Dickkopf
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSH	<i>Dishevelled</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DVL2	<i>Dishevelled Segment Polarity Protein 2</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix, <i>Extracellular Matrix</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases</i>
FBXW11	<i>F-Box And WD Repeat Domain Containing 11</i>

---

FCS	Fetales Kälberserum, <i>Fetal Calf Serum</i>
FGF4	<i>Fibroblast Growth Factor 4</i>
FZD	<i>Frizzled Class Receptor</i>
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen- <i>Colony Stimulating Factor</i>
GNB2I1	<i>Guanine Nucleotide-Binding Protein Subunit beta-2-like 1</i>
GSK3	Glycogen-Synthase-Kinase 3
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor - 2</i>
HIF-1/2	Hypoxie-induzierter Faktor 1/2
IL	Interleukin
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Jun	Jun Onkogen
Ktl	Kontrolle
LEF	<i>Lymphoid Enhancer-Binding Factor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein</i>
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation - 7</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein - 1</i>
MIP-1 $\alpha/\beta$	<i>Major Intrinsic Protein</i>
MMP	Matrix-Metalloproteasen
NHS	<i>Normal Horse Serum</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCP	<i>Planar Cell Polarity</i>
Pen	Penicillin
PK	<i>Prickle</i>
PORCN	<i>Porcupine</i>
PYGO1	<i>Pygopus Family PHD Finger 1</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>

---

RAC	<i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate</i>
RANTES	<i>Regulated Upon Activation, Normally T-Expressed, And Presumably Secreted</i>
rh MCSF	rekombinanter humaner <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
RHOA	<i>Ras Homolog Gene Family Member A</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
ROR2	Rezeptor-Tyrosin-Kinase 2
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SEN2	<i>SUMO Specific Peptidase 2</i>
STBM	Strabismus
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCF	<i>T-Cell Specific Transcription Factor</i>
TLE1	<i>Transducin-Like Enhancer Protein 1</i>
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TMV	<i>Tumor-Derived Microvesicles</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WLS	<i>Wntless</i>
WNT	<i>Wingless Type MMTV Integration Site</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Biologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Neoplasie des weiblichen Geschlechts in Deutschland. Laut dem „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016“ des Robert Koch-Instituts lag die Anzahl der neuerkrankten Frauen in 2013 hierzulande bei ca. 71600. Nach histologischen Gesichtspunkten unterscheidet die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) in der vierten Edition ihrer Klassifikation von Tumoren der Brust unterschiedliche Formen. Mit 70-80% ist das invasive duktales Mammakarzinom der weitaus häufigste Typ. Es geht aus Epithelzellen der terminalen Ausführungsgänge der Brustdrüse hervor und entsteht über ein duktales Carcinoma in situ. Des Weiteren existieren seltenere Formen wie z. B. das lobuläre, das medulläre oder das tubuläre Karzinom (Lakhani et al. 2012). In der Ätiologie des Mammakarzinoms spielen exogene Faktoren wie das Alter, Adipositas, eine frühe Menarche oder späte Menopause eine Rolle. Daneben existieren einige Keimbahnmutationen, die für ein Karzinom prädisponieren. Vor allem die *breast cancer* Gene *BRCA1* und *BRCA2* sind in diesem Zusammenhang von Bedeutung (Boulton 2006).

Insgesamt stellt das Mammakarzinom in Bezug auf Überlebenszeit und Prognose eine sehr heterogene Erkrankung dar. Insbesondere mit Hinblick auf eine mögliche Über- oder Untertherapie wird jedoch die Bedeutung einer guten Prognoseeinschätzung deutlich. Üblicherweise werden zur Abschätzung der Prognose außer dem histologischen Typ verschiedene weitere Faktoren herangezogen. Hierzu zählen zum Beispiel das Alter, das pTNM (Tumor Nodus Metastasen)-Stadium, die Östrogen- und Progesteronrezeptor-Expression, der HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*)-Status und die Proliferationsaktivität gemäß Ki-67 (Leitlinie Mammakarzinom 2017). In den letzten Jahren rückte zunehmend auch eine molekulargenetische Einteilung in den Fokus der Aufmerksamkeit. Demnach lassen sich entsprechend dem genetischen Profil fünf Subtypen differenzieren, welche mit einem unterschiedlichen klinischen Verhalten einhergehen: Luminal-A, luminal-B, HER2-overexpressing, basal-like und normal-breast-like (Perou et al. 2000; Parker et al. 2009). Zudem wurden verschiedene Scores zur Risikostratifizierung entsprechend dem molekulargenetischen Expressionsprofil entwickelt. Als Beispiel sei der *PAM50 risk-of-recurrence score* genannt, mit dessen Hilfe sich Hormonrezeptor-positive Patientinnen in eine Niedrigrisikogruppe klassifizieren lassen konnten, bei denen auf eine adjuvante konventionelle Chemotherapie

verzichtet werden konnte (Gnant et al. 2014). In die Ende 2017 veröffentlichte interdisziplinäre S3-Leitlinie zum Mammakarzinom hat der Multigentest zur Entscheidung über eine adjuvante Chemotherapie bei Hormonrezeptor-positiven, HER2- und nodal-negativen Patientinnen in der niedrigen Risikogruppe mit einer „kann“-Empfehlung bereits Einzug gehalten. In diesem Kontext konnte auch gezeigt werden, dass der WNT-Signalweg eine Rolle in der Progression des Mammakarzinoms spielt (Howe und Brown 2004).

Ein weiteres stark beforschtes Gebiet stellt das *Tumor-Microenvironment* dar, welches keineswegs nur aus inerten Zellen besteht. Auch wenn sich bislang keine Implikationen für das klinische Handeln ergeben haben, so deuten die Forschungsarbeiten der letzten Jahre darauf hin, dass das *Tumor-Microenvironment* eine bedeutende Stellung insbesondere im Fortschreiten und in der Metastasierung des Mammakarzinoms und verschiedener weiterer Neoplasien einnimmt (Mantovani et al. 2008; Place et al. 2011).

In den folgenden Kapiteln wird die Bedeutung der WNT (*wingless type MMTV integration site*) - Signalwege im Mammakarzinom sowie speziell in der Kommunikation zwischen Tumorzellen und Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) erläutert werden. Überdies wird auf Mikovesikel als bedeutende Komponente dieser interzellulären Kommunikation eingegangen werden.

## 1.2 Das Tumor-Microenvironment

In seiner *Seed and Soil*-Theorie beschrieb der englische Chirurg Stephen Paget schon 1889 eine Interaktion der malignen Zellen (*seeds*) mit dem sie umgebenden *Microenvironment* (*soil*) und dessen Rolle in der Metastasierung (Fidler 2003). 100 Jahre später fanden sich zunehmend Hinweise, die Stephen Pagets Theorie untermauerten. In den letzten 20 Jahren konnten die Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellpopulationen und die promigratorischen und proinvasiven Auswirkungen genauer untersucht und bestätigt werden (Witz und Levy-Nissenbaum 2006; Mantovani et al. 2008; Place et al. 2011).

Neben den eigentlichen Karzinom-Zellen gehören noch eine Reihe weiterer Zellpopulationen sowie die extrazelluläre Matrix (ECM) zum Gewebeverband des Tumors. Es finden sich Fibroblasten, Endothelzellen und Zellen des Immunsystems sowie, in der tumorspezifischen ECM eingebettet, verschiedene lösliche Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine. Die Komposition aus diesen Bestandteilen und weiteren milieubestimmenden Eigenschaften, wie Hypoxie, niedriger extrazellulärer pH-Wert und niedri-

ge Konzentration an Nährstoffen, bildet das Tumor-*Microenvironment* (Witz und Levy-Nissenbaum 2006).

Auch die Verwandtschaft von Tumor und Entzündung wurde schon 1863 durch Rudolf Virchow entdeckt, indem er ein "lymphoretikuläres Infiltrat" in neoplastischem Gewebe beschrieb (Balkwill und Mantovani 2001). Nachdem diese Beobachtung lange Zeit in Vergessenheit geraten war, häuften sich Ende des 20. Jahrhunderts biologische und epidemiologische Daten, welche diese These wieder in den Fokus brachten (Mantovani et al. 2008). Das biologische Korrelat des von Virchow beschriebenen lymphoretikulären Infiltrats sind infiltrierende Leukozyten. Deren wichtigste Vertreter sind neben den neutrophilen Granulozyten, den Lymphozyten und den dendritischen Zellen vor allem die Makrophagen (Place et al. 2011). Gerade die Makrophagen können durch ihre spezielle Polarisierung die Inflammation lenken, tumorizide Reaktionen unterdrücken und so die Progression des Tumors fördern (Hao et al. 2012).

### 1.2.1 Mikrovesikel-vermittelte Kommunikation im Tumor

Mikrovesikel zählen neben Exosomen und *apoptotic bodies* zu den extrazellulären Vesikeln. Sie gehen aus der Plasmamembran diverser Zellen hervor und haben im Durchschnitt einen Durchmesser von 0,1 – 1  $\mu\text{m}$  (Holme et al. 1994). Sie bestehen aus einer Zellmembran sowie Anteilen des Zytoskeletts und des Zytoplasmas (Shet 2008). Durch den Transport bioaktiver Moleküle und ihr Repertoire an Membranproteinen sind sie an der interzellulären Kommunikation beteiligt. Eine wachsende Anzahl an Studien deutet seit einigen Jahren auf die Bedeutung der Mikrovesikel in der Tumorforschung hin. Im Folgenden soll insbesondere auf aus Tumorzellen stammende Mikrovesikel Bezug genommen werden (*Tumor-Derived Microvesicles*; TMV).

Die TMV-vermittelte Kommunikation kann autokrin oder parakrin mit den umgebenden Zellen des Tumor-*Microenvironments* erfolgen. Die Partikel werden von der Zielzelle entweder über Endozytose oder über Fusion mit der Zellmembran aufgenommen (Pluskota et al. 2008; Gasser et al. 2003). Auch können TMVs mit der ECM reagieren. Die Freisetzung des Inhalts in die ECM wird maßgeblich durch die  $\beta$ 1-Integrine und durch das charakteristisch saure Milieu des Tumors getriggert (Giusti et al. 2008).

TMVs sind wichtige Werkzeuge in der Bildung und Beeinflussung des Tumor-*Microenvironments*, indem sie die Immunantwort modulieren, die Angiogenese fördern, die ECM umstrukturieren und die Metastasierung unterstützen (Taraboletti et al. 2002; Al-Nedawi et al. 2009; Muralidharan-Chari et al. 2010; Grange et al. 2011).

Überdies repräsentieren sie durch horizontalen Transfer genomischer Informationen im Sinne von Nukleinsäuren einen neuen Weg der interzellulären Kommunikation innerhalb des Tumorgewebes (Skog et al. 2008).

### 1.2.2 Das Tumor-*Microenvironment* im Mammakarzinom

Insbesondere im Mammakarzinom ist die Rolle des Tumor-*Microenvironments* gut untersucht: Die Arbeitsgruppe um Minna Allinen konnte 2004 zeigen, dass sich nicht nur das Genexpressionsprofil der malignen Zellen zwischen normalem Brustgewebe und duktalem Carzinoma in situ sowie zwischen duktalem Carzinoma in situ und invasiv duktalem Karzinom verändert, sondern auch das der Zellen des *Microenvironments* (Allinen et al. 2004). Während Myoepithelzellen einen inhibitorischen Effekt auf die Tumorprogression haben (Hu und Polyak 2008), sind Fibroblasten über den CXC Chemokin-Liganden 12 (CXCL12) und den Rezeptor CXC chemokin-receptor 4 (CXCR4) in der Lage, die Proliferation der malignen Zellen zu unterstützen (Orimo et al. 2005). Durch die Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen in das Gewebe des Tumors tragen sie außerdem zur Angiogenese bei.

Auch im Mammakarzinom spielen infiltrierende Leukozyten eine herausragende Rolle. CD4+ Typ 1 T-Helfer-Lymphozyten (TH1) induzieren generell ein proinflammatorisches Milieu und wirken im Tumor eher tumorizid. TH2-Lymphozyten dagegen wirken regulatorisch auf die Entzündungsreaktion und können dem Tumor helfen, der Immunantwort zu entkommen (Place et al. 2011). Einen besonderen Stellenwert unter den Tumor-assoziierten Stromazellen haben die Tumor-assoziierten Makrophagen. Diese werden im Anschluss ausführlicher behandelt werden.

Die malignen Zellen des Mammakarzinoms beeinflussen jedoch nicht nur das *Microenvironment* der Brust. Ebenfalls sind sie im Zuge der Metastasierung in der Lage, über in den Blutkreislauf sezernierte Zytokine und Chemokine eine prämetastatische Nische im jeweiligen Zielorgan zu bilden. Im Zielorgan der Metastasierung bildet sich nun ein eigenständiges *Microenvironment*, welches den zirkulierenden Tumorzellen erlaubt, sich dort einzunisten (Qian et al. 2009; Place et al. 2011).



## 1.3 Die Tumor-assoziierten Makrophagen

### 1.3.1 Physiologische Eigenschaften von Makrophagen

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Unter dem Einfluss von Granulozyten/Makrophagen-*colony stimulating factor* (GM-CSF) und Makrophagen-*colony stimulating factor* (M-CSF) entwickeln sich aus myeloischen Progenitorzellen im Knochenmark Monoblasten. Während ihrer Auswanderung in die peripheren Blutgefäße entwickeln sie sich weiter zu Monozyten. Diese tragen in den verschiedenen Geweben durch Ausdifferenzierung zur Erhaltung der residenten Makrophagenpopulationen bei (Gordon und Taylor 2005). Durch die Erkennung körperfremder Proteine und Glykoproteine auf z. B. Viren oder Bakterien, wird die Phagozytose eingeleitet. Je nach Reiz und Kontext wird nun durch sezernierte Zytokine und Chemokine eine Entzündungsreaktion initiiert. Eine essentielle Komponente dieser Entzündungsreaktion ist die Rekrutierung weiterer Zellen des Immunsystems. Die körperfremden Proteine werden mit Hilfe von *major histocompatibility complex-II* (MHC-II)-Molekülen auf der Oberfläche der Makrophagen präsentiert und können so das erworbene Immunsystem - z. B. durch T-Zellen repräsentiert - aktivieren. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Erhaltung und Regulierung der Inflammation. Anschließend tragen sie durch Gewebe-Umstrukturierung und Förderung der Angiogenese zur Wundheilung bei (Hao et al. 2012).

Als Antwort auf verschiedene Stimuli, wie z. B. Verletzungen oder das Eindringen von pathogenen Partikeln, sind Makrophagen dazu in der Lage, sich weiter zu spezialisieren. In Analogie zur Subklassifizierung der CD4+ T-Lymphozyten in TH1 und TH2, lassen sich auch Makrophagen grob in einen M1- und einen M2-Phänotyp unterteilen. Allerdings ist zu erwähnen, dass diese Unterteilung nur die beiden Enden eines Kontinuums an verschiedenen Expressionsprofilen darstellt (Sica und Mantovani 2012).

Die diversen Phänotypen unterscheiden sich maßgeblich in der Expression verschiedener Proteine. M1-Makrophagen sezernieren proinflammatorische Zytokine zur Abwehr viraler oder bakterieller Pathogene. Stimuli, welche diesen Phänotypen fördern, sind das von TH1-Zellen produzierte Interferon- $\gamma$ , Lipopolysaccharide (LPS) in der Wand gramnegativer Bakterien oder der proinflammatorische Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Charakteristisches Merkmal ist die regelmäßige Expression des IL-12, wogegen IL-10 nur selten sezerniert wird (IL-10<sup>low</sup>/IL-12<sup>high</sup>-Typ). Im Gegensatz dazu sezernieren M2-Makrophagen regelmäßig IL-10, dafür nur selten IL-12 (IL-10<sup>high</sup>/IL-12<sup>low</sup>-Typ). Des Wei-

teren liegt die Funktion der M2-polarisierten Zellen in der Unterdrückung und Regulation der Entzündungsreaktion, in der Wundheilung und Gewebeumstrukturierung sowie in der Abwehr parasitärer Infektionen (Mantovani et al. 2002; Hao et al. 2012). Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der Unterteilung in M1- und M2-Phänotypen um ein Kontinuum. Besonders deutlich wird dies bei den M2-Makrophagen, welche aus weiteren verschiedenen Subpopulationen bestehen. Diese spiegeln die Plastizität der Makrophagen in Anbetracht der verschiedenen Kompositionen aus Stimuli wider. Aus diesem Grund und in Anlehnung an einschlägige Arbeiten in diesem Gebiet, wird im Folgenden nochmals zwischen dem M2- sowie dem M2-like Phänotyp unterschieden werden (Sica und Mantovani 2012).

### **1.3.2 Die Tumor-assoziierten Makrophagen im Mammakarzinom**

Die Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) nehmen verschiedene Rollen im Mammakarzinom ein. Sie fördern Zellproliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung (Laoui et al. 2011; Hao et al. 2012). Gleichzeitig sind sie an Umbauprozessen des umgebenden Gewebes und an der Suppression des Immunsystems beteiligt (Lin und Pollard 2007). Dementsprechend geht eine hohe Dichte an TAMs mit einer ungünstigen Prognose einher (Volodko et al. 1998; Tsutsui et al. 2005).

Das Gesamtbild der Stimuli im Mammakarzinom fördert die Differenzierung zu Makrophagen mit typischen Eigenschaften der M2-like-Polarisierung (Sica et al. 2002; Puig-Kröger et al. 2009). Allerdings deuten einige aktuelle Arbeiten darauf hin, dass die Gruppe der TAMs aus verschiedenen Subpopulationen besteht, die in ihren Eigenschaften teilweise auch Proteine sezernieren, welche sonst typisch für den M1-Phänotypen sind (van Ginderachter et al. 2006; Movahedi et al. 2010). So wird das dichotome M1/M2-Denken der komplexen Realität hier nicht gerecht.

#### **Rekrutierung**

Da TAMs sich aus medullären Monozyten differenzieren, ist die initiale Rekrutierung inflammatorischer Monozyten aus dem Knochenmark eine Grundvoraussetzung für die Etablierung einer TAM-Population im Tumor-Microenvironment. Die malignen Zellen des Mammakarzinoms sowie einige benigne Zellen des Tumor-Microenvironments sind über die Sekretion verschiedener Proteine dazu in der Lage. Das zentrale Chemokin in diesem Zusammenhang ist das *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1). Hohe MCP-1-Spiegel zeigen eine positive Korrelation mit einer hohen TAM-Dichte und mit einer

ungünstigen Prognose in verschiedenen Tumoren und insbesondere im Mammakarzinom (Siveen und Kuttan 2009; Steiner und Murphy 2012; Zollo et al. 2012). Tumorintern werden TAMs bevorzugt in Areale mit einem niedrigen Sauerstoff-Partialdruck rekrutiert. Die Hypoxie induziert die Produktion von weiteren Chemokinen wie Endothelin-2 in betroffenen Tumorzellen (Grimshaw et al. 2002).

### **Effekte der Tumor-assozierten Makrophagen**

Die bevorzugt M2-polarisierte Natur der TAMs erzeugt eine tumorprotektive und antiinflammatorische Umgebung (Laoui et al. 2011; Hao et al. 2012). IL-10 verhindert durch auto- und parakrine Inhibition des IL-12 die Differenzierung in TH1-Lymphozyten. Außerdem stört es die Ausreifung der dendritischen Zellen und supprimiert so die Antigen-Präsentation (Allavena et al. 2008). Durch *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) sind die TAMs in der Lage, die Antigen-Präsentation zu unterdrücken und die Anti-Tumor-Aktivität von Natürlichen Killerzellen (NK)-Zellen durch Inhibition des Rezeptors NKp30 zu stören (Castriconi et al. 2003).

Eine herausragende Rolle spielen TAMs auch im Prozess der Angiogenese (Lin und Pollard 2007). Die hypoxieinduzierten Transkriptionsfaktoren HIF-1 und HIF-2 führen in diesem Milieu zu einer vermehrten Produktion von proangiogenetischen Proteinen wie *vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A) oder *urokinase-type plasminogen activator*. Außerdem können TAMs unter diesen Umständen Chemokine wie CXCL12 produzieren, welche in der Lage sind Endothelzellen in das hypoxische Gewebe zu rekrutieren (Lewis und Murdoch 2005). Überdies fördern TAMs das Wachstum der Gefäße auch durch die Beeinflussung der ECM und durch die Freisetzung darin enthaltener Zytokine. Dieser Effekt ist vor allem den Matrix-Metallo-Proteasen-2 und -9 (MMP-2 und -9) sowie *urokinase-type plasminogen activator* zuzuschreiben (Krecicki et al. 2001; Lin und Pollard 2007; Vérollet et al. 2011).

Nicht nur durch Förderung der Angiogenese tragen TAMs zur Steigerung von Invasivität und Metastasierung bei. Durch einen parakrinen Regelkreis, der die Faktoren *epidermal growth factor* (EGF) und *colony stimulating factor-1* (CSF-1) beinhaltet, sind TAMs dazu befähigt die Motilität von Tumorzellen zu steigern, wenn sie in direkter Nachbarschaft zueinander liegen. CXCL12 kann diesen Mechanismus zusätzlich unterstützen (Coffelt et al. 2009; Hernandez et al. 2009). Ebenso fördert die direkte Nachbarschaft von Mammakarzinom-Zellen zu TAMs die Intravasationsfähigkeit der Tumorzellen (Wyckoff et al. 2007). Die Umgestaltung der ECM durch die TAM-produzierten Proteasen MMP2 und MMP9 unterstützt die Motilität und Metastasierung zusätzlich

(Guruvayoorappan 2008). Die Rolle des WNT-Signalweges in der Kommunikation zwischen TAMs und Tumorzellen soll nachfolgend genauer erörtert werden.

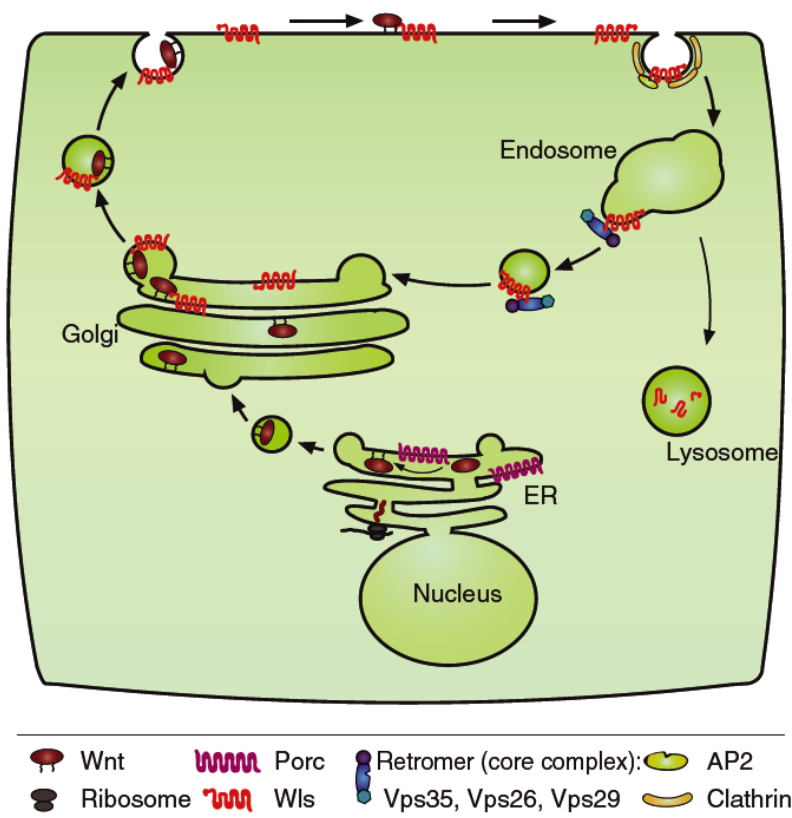
#### 1.4 Der WNT-Signalweg

Die Familie der WNT-Liganden stellt eine Gruppe hochkonservierter Gene dar. Die Tatsache, dass sie selbst in Seeanemonen wie *Nematostella vectensis* und Poriferen wie *Amphimedon queenslandica* zu identifizieren sind, unterstreicht ihre evolutionäre Bedeutung (Kusserow et al. 2005; Petersen und Reddien 2009). Als extrazelluläre Signalmoleküle spielen sie eine wichtige Rolle in Prozessen der Zelldifferenzierung und Gewebeorganisation, im Lebenszyklus von Stammzellen und in der Entstehung von Krankheiten (ten Berge et al. 2011; van Amerongen et al. 2012).

Durch Nusse und Varmus wurde 1982 erstmals das *WNT1*-Gen - damals *integration site-1 (Int-1)* benannt - beschrieben. Es wurde durch das *mouse mammary tumor virus* (MMTV) im murinen Genom transkriptionell aktiviert und konnte so als Proto-Onkogen identifiziert werden (Nusse und Varmus 1982). Fünf Jahre später konnte die Forschergruppe um Rijsewijk herausarbeiten, dass es sich bei *Int-1* um ein Homolog des bereits 1980 in der Taufliege *Drosophila melanogaster* identifizierten *wingless (wg)*-Gens handelte, woraus der heute übliche Name *wingless type mouse mammary tumor virus integration site (WNT)* resultierte (Nüsslein-Volhard und Wieschaus 1980; Rijsewijk et al. 1987).

Das menschliche Genom umfasst 19 *WNT*-Gene in zwölf Subgruppen (Kusserow et al. 2005). Sie kodieren sezernierte Glykoproteine, die zahlreiche hochkonservierte Cysteine enthalten und in einem Größenbereich von ca. 40 kDa liegen (Tanaka et al. 2002). Ihr hydrophober Charakter beruht auf posttranslationalen Lipidmodifikationen durch die membranständige O-acetyltransferase *porcupine* (PORCN) im endoplasmatischen Retikulum. Diese Eigenschaft ist unabdingbar für die Sekretion und Aktivität dieser Proteine (Galli et al. 2007; Kurayoshi et al. 2007). Im weiteren Verlauf der Exozytose werden die WNTs aus dem endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat transportiert. Dort werden sie durch das ebenfalls stark konservierte und hochspezifische Protein *wntless* (WLS; auch bekannt unter Evi, Sprinter und mig-14) zur Zellmembran weitertransportiert. Die Abbildung 1.1 verdeutlicht die beschriebenen Mechanismen. An der Zellmembran angekommen, entfalten WNT-Proteine ihre Wirkung in aller Regel autokrin und parakrin. Die Gegebenheit, dass WNTs durch ihren hydrophoben Charakter membrangebunden sind, bedingt besondere Mechanismen der Signalübertragung. Bislang konnten folgende Wege erarbeitet werden:

Abbildung 1.1: Sekretion der WNT-Proteine (entnommen aus Port und Basler 2010)



Im endoplasmatischen Retikulum werden die WNTs durch das Transmembranprotein PORCN palmitoyliert, um dann in den Golgi-Apparat transportiert zu werden. Dort angekommen, findet der Weitertransport mit Hilfe des WLS statt. Der Retromer-Komplex verhindert den lysosomalen Abbau des WLS und führt es wieder dem Golgi-Apparat zu.

1. Nach dem Modell der lateralen Diffusion binden WNTs an Heparansulfat-Proteoglykane in der Zellmembran oder in der extrazellulären Matrix und können so über Zell-Zell-Kontakte und Diffusion einen Konzentrationsgradienten ausbilden (Yan und Lin 2009).
2. Die Löslichkeit der WNT-Proteine kann durch eine Komplexbildung mit Lipoproteinen erreicht werden (Panáková et al. 2005).
3. Eine weitere Möglichkeit stellt der Transport auf extrazellulären Vesikeln dar (Korkut et al. 2009; Menck et al. 2013).
4. Im Jahr 2012 konnten Mulligan et al. das Protein *secreted wingless-interacting molecule* (SWIM) als Bindungspartner lipidmodulierter *wingless*-Proteine identifizieren. Erstaunlicherweise agiert *wingless* in diesem Zusammenhang im Flügel von *Drosophila* als Signalmolekül auch über längere Distanzen (Mulligan et al. 2012).

Der Effekt, den die WNT-Proteine auf die Zelle haben, hängt maßgeblich von den entsprechenden Liganden und Rezeptoren ab. Man unterscheidet hierbei den kanonischen von den nicht-kanonischen Signalwegen.

#### 1.4.1 Der kanonische WNT-Signalweg

Der kanonische-(WNT/ $\beta$ -Catenin)-Signalweg ist der am gründlichsten untersuchte WNT-Pfad. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei der Akkumulation des  $\beta$ -Catenins im Zytoplasma sowie dessen Übertritt in den Nukleus zu. Dort leitet es zusammen mit Proteinen der *T-cell specific transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor* (TCF/LEF)-Familie eine Expressionsänderung der WNT-Zielgene ein (Hoppler und Kavanagh 2007).

#### Liganden und Rezeptoren des kanonischen WNT-Signalwegs

Am Anfang dieser Signalkaskade stehen ein WNT-Ligand und ein heterodimerer Rezeptorkomplex bestehend aus einem Protein der *frizzled* (FZD)-Familie und einem *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) 5/6 als Ko-Rezeptor. Als klassische kanonische WNT-Liganden seien zum Beispiel WNT1 und WNT3A genannt. Im humanen Genom finden sich zehn FZD-Proteine. Sie bestehen aus sieben Transmembrandomänen und einer extrazellulär gelegenen *cystein-rich-domain* (CRD), welche für die Bindung der lipidmodifizierten WNTs ausschlaggebend ist (Bhanot et al. 1996; Janda et al. 2012). LRP5 und LRP6 wirken in diesem Zusammenhang als Ko-Rezeptoren.

Die Dimerisierung von FZD und LRP5/6 erfolgt in Anwesenheit von WNT. Der LRP-Ko-Rezeptor wird an Prolin-Prolin-Prolin-Serin-Prolin (PPPSP)- Motiven seines zytoplasmatischen Anteils durch die membrangebundene Casein-Kinase 1 $\gamma$  (CK1 $\gamma$ ) und Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) phosphoryliert, woraufhin Axin an den Rezeptor binden kann (Liu et al. 2002; Tamai et al. 2004). Die FZD-Rezeptoren rekrutieren nach ihrer Aktivierung ein *dishevelled* (DSH)-Protein an ihr zytoplasmatisches Ende und phosphorylieren dieses (Chen et al. 2003). Beide, Axin und DSH, besitzen eine 85 Aminosäuren lange ähnliche DIX (Dishevelled/axin)-Domäne, mit der sie einander binden und so die Dimerisierung von FZD und LRP triggern können (Kishida et al. 1999; Fiedler et al. 2011).

Als Regulatoren spielen die sezernierten Proteine der *secreted frizzled-related proteins* (sFRP)- und *WNT inhibitory factor* (WIF)- Familien an dieser Stelle eine entscheidende

Rolle. Sie sind in der Lage, die WNT-Liganden noch im Extrazellulärraum zu binden und somit zu inaktivieren (Leyns et al. 1997; Hsieh et al. 1999). Andere extrazelluläre WNT-Inhibitoren umfassen die Dickkopf (DKK)- und Sclerostin (SOST)/Wise-Familien. Hierbei führt vor allem DKK1 zu einer Dissoziation der WNT induzierten FZD/LRP5/6 Dimerisierung, welche für die Aktivität der Signalkaskade ausschlaggebend ist (Semënov et al. 2001).

### **Der Degradationskomplex**

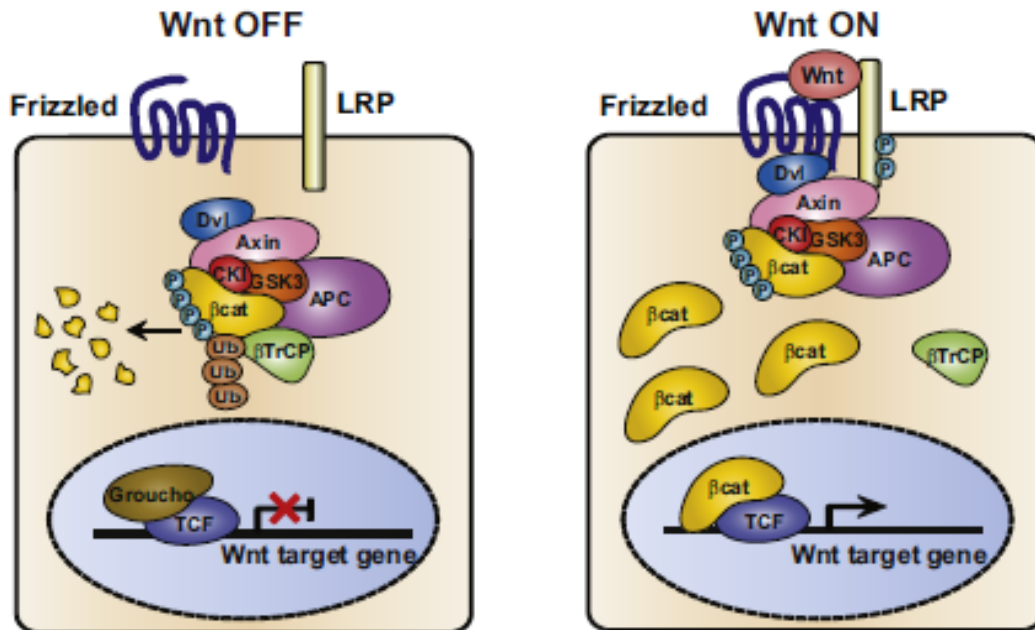
In Abwesenheit von WNTs liegt der sogenannte Degradationskomplex, der aus den gerüstbildenden Proteinen Axin und APC sowie aus den Serin/Threonin-Kinasen GSK3 und CK1 $\gamma$  besteht, frei im Zytoplasma vor. In ihm findet sich durch die genannten Kinasen phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin. Mit Hilfe dieses Komplexes und der assoziierten E3 Ligase  *$\beta$ -transducin repeats-containing protein* ( $\beta$ -TrCP) wird das  $\beta$ -Catenin ubiquitiert und so den Proteasomen zum Abbau zugeführt (Li et al. 2012).

Die Aktivierung der Signalkaskade führt zur Hemmung des Degradationskomplexes. Dabei wird dieser an die Zellmembran rekrutiert und bildet mit FZD, LRP 5/6 und DSH einen heteropolymeren Proteinkomplex. Durch die fehlende Ubiquitinierung des phosphorylierten  $\beta$ -Catenins im Degradationskomplex kommt es zügig zu einem Sättigungseffekt. Neu synthetisiertes  $\beta$ -Catenin kann somit im Zytoplasma akkumulieren und in den Nukleus wandern (MacDonald et al. 2009).

### **$\beta$ -Catenin und TCF/LEFs als Aktivatoren der WNT-Zielgene**

Bis zur Mitte der 90er Jahre war  $\beta$ -Catenin ausschließlich als Adhäsionsmolekül bekannt, welches in Epithelien an den zytoplasmatischen Schwanz von Cadherinen bindet. Molenaar et al. konnten jedoch 1996 zeigen, dass es im Nukleus mit Proteinen der TCF/LEF-Familie interagiert und auf diese Weise die Transkription beeinflussen kann. In Säugetieren sind vier Proteine dieser Familie bekannt: TCF1, LEF1, TCF3 und TCF4. Allen gemeinsam ist die *high mobility group* sowie die Bindung an einen spezifischen Abschnitt der DNA, welcher *WNT responsive element* genannt wird (Hoppler und Kavanagh 2007). In Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin wirken die TCF/LEF-Proteine zusammen mit dem *Transducin-like enhancer protein 1* (TLE1; humanes Homolog zu Groucho in Drosophila) zunächst als Repressoren der WNT-Zielgene.  $\beta$ -Catenin verdrängt TLE1 aus seiner Bindung und führt so zusammen mit den TCF/LEFs zu einer Aktivierung der Zielgene (Daniels und Weis 2005; Arce et al. 2006; Hoppler und Kavanagh 2007).

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des kanonischen WNT-Signalwegs in *Drosophila* (entnommen aus Li et al. 2012)



Durch Bindung des WNT-Liganden und Dimerisierung der FZD- und LRP-Rezeptoren, wird der Degradationskomplex (bestehend aus APC, Axin, GSK3, CK1 $\gamma$  und  $\beta$ -TrCP) über *Dishevelled* an den Rezeptorkomplex gebunden. Dadurch wird der Abbau von  $\beta$ -Catenin gestört, sodass dieses im Zytosol akkumulieren und in den Zellkern übertreten kann.

Weitere  $\beta$ -Catenin-assoziierte Proteine sind *B Cell CLL/Lymphoma 9 Protein* (BCL9) und *Pygo*, welche an das N-terminale Ende des  $\beta$ -Catenins binden (Brembeck et al. 2004; Sampietro et al. 2006). Die Abbildung 1.2 bietet eine schematische Darstellung des eben Beschriebenen.

### Die Zielgene des kanonischen WNT-Signalwegs

Die Zielgene des kanonischen WNT-Signalwegs sind zell- und kontextspezifisch (Logan und Nusse 2004). Sie regulieren essentielle physiologische Mechanismen der Zelle, wie Wachstum, Differenzierung oder Zellzyklus. Einige Beispiele sind die Hochregulation des Onkogens *c-myc* (He et al. 1998), der Zellzyklus-Kinase *cyclin-d1* (Shtutman et al. 1999) oder des *vesicular endothelial growth factors* (VEGF) sowie die Herunterregulation des Adhäsionsmoleküls E-cadherin (ten Berge et al. 2008). Der WNT-Signalweg reguliert sich über positive bzw. negative Regulationsschleifen so auch selbst. Dabei ist das Ausmaß der jeweiligen Regulationsschleife sowie die letztendliche



Summation zu einem eher inhibitorischen oder potenzierenden Effekt abhängig vom jeweiligen Gewebe und dem Kontext (MacDonald et al. 2009). Typische Beispiele für eine negative Regulation sind die Suppression von FZD oder die Induktion von DKK1 (Cadigan et al. 1998; Niida et al. 2004). Auf der anderen Seite konstituiert z. B. die Induktion von *TCF/LEF* einen positiven Regulationsmechanismus (Filali et al. 2002). Eine aktuelle und ausführliche Liste der WNT-Zielgene ist auf der WNT-Homepage ([https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target\\_genes](https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes)) zu finden.

#### 1.4.2 Die nicht-kanonischen WNT-Signalwege

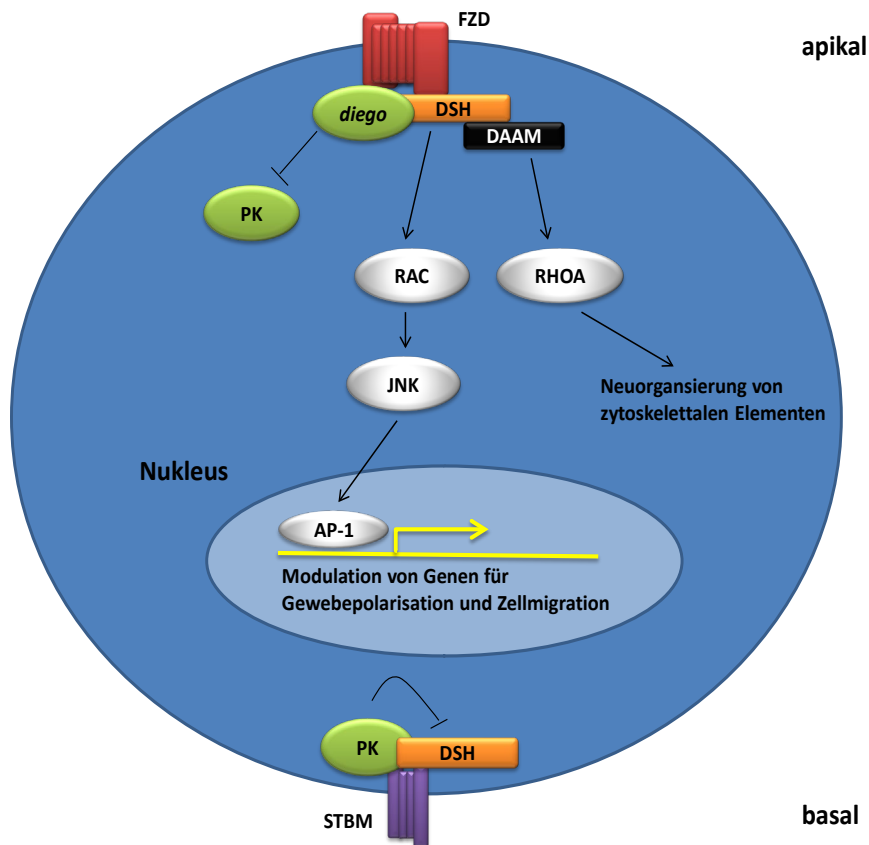
Im Rahmen der Suche nach weiteren WNT1-Homologen stellte sich in den 90er Jahren heraus, dass WNT5a sich eines anderen Mechanismus als die restlichen damals bekannten WNTs bediente. Insbesondere involvieren diese Mechanismen kein  $\beta$ -Catenin. Aufbauend auf diesen Beobachtungen wurden alternative,  $\beta$ -Catenin unabhängige WNT-Pfade postuliert (Christian et al. 1991; Moon et al. 1993; Slusarski et al. 1997). Diese begründeten letztendlich die Gruppe der nicht-kanonischen Signalwege.

Die nicht-kanonischen WNT-Signalwege haben ihre Bedeutung vor allem in der Ausbildung der Körperachse, der Wanderung von Zellen und Zellverbänden, der Homöostaseerhaltung in Geweben sowie der Aufrechterhaltung von hämatopoetischen Stammzellpopulationen (Nemeth und Bodine 2007; Piters et al. 2008). Ursprünglich wurde angenommen, dass die WNT-Liganden spezifisch für bestimmte WNT-Signalwege sind. So zählte man vor allem WNT5a und WNT11 zu den nicht kanonischen Liganden (van Amerongen et al. 2008). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass diese strikte Trennung den komplexen zu Grunde liegenden Mechanismen nicht gerecht wird. Denn auch WNT5a und WNT11 können den WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg aktivieren (Tao et al. 2005; Mikels und Nusse 2006). Ebenso konnte für den klassischen kanonischen Liganden WNT1 eine Funktion im nicht-kanonischen Bereich belegt werden (Smit et al. 2004). Zudem spielt der Rezeptorkontext des jeweiligen Gewebes eine herausragende Rolle. Neben den zehn FZD-Proteinen konnten weitere Rezeptoren und Ko-Rezeptoren identifiziert werden. In diesem Zusammenhang sind neben LRP5/6 vor allem die Rezeptor-Tyrosin-Kinase (ROR2) und die *related-tyrosine-kinase* (RYK) zu benennen (Oishi et al. 2003; Harris und Beckendorf 2007). Insgesamt ergibt sich ein Bild, welches die Liganden/Rezeptor-Paarung als zentrales Kriterium in der Entscheidung des WNT-Signalwegs konstatiert.

#### 1.4.2.1 Der *Planar-Cell-Polarity*-Signalweg

Der *Planar-Cell-Polarity* (PCP)-Signalweg beschreibt einen Mechanismus, dessen physiologische Folgen vor allem die apikal-basale Polarisierung epithelialer Zellen sowie Modulationen am Zytoskelett sind. Insgesamt wird ein promigratorischer Phänotyp geschaffen. Im humanen System scheint dieser Signalweg besondere Bedeutung in der Entwicklung verschiedener Organsystemen zu haben. So haben Störungen dieses Pfades Erkrankungen des Innenohrs (Wang et al. 2005), des Herzens (Phillips et al. 2007), der Lunge (Laumanns et al. 2009) und der Nieren (Fischer und Pontoglio 2006) zur Folge. Außerdem spielt er eine wichtige Rolle in der Invasion und Metastasierung von malignen Zellen (Weeraratna et al. 2002).

Der PCP-Signalweg wurde vor allem in *Drosophila melanogaster* studiert. Die Asymmetrie der Zelle wird durch Positionierung verschiedener Proteinkomplexe an die basale und apikale Seite erreicht. Der Mechanismus dieser Antagonisierung ist bislang kaum verstanden, beinhaltet allerdings eine komplexe Feedback-Regulation zwischen dem FZD/DSH/*diego*- und dem *strabismus* (STBM)/*prickle* (PK)-Komplex. Während FZD/DSH/*diego* über DSH das Signal weiter ins Zellinnere leiten, wird die Aktivität von DSH über STBM/PK gehemmt (Seifert und Mlodzik 2007). DSH ist nun in der Lage, über *Dishevelled-associated activator of morphogenesis* (DAAM) die kleine GTPase *Ras homolog gene family member A* (RHOA) zu aktivieren. RHOA bewirkt seinerseits eine Reorganisation des Zytoskeletts zu Gunsten von Polarisierung und Migration der Zelle, indem die Polymerisation von Aktinfilamenten sowie die Entwicklung von Lamellipodien und Filopodien an der migratorischen Front gefördert werden (Wehrle-Haller und Imhof 2003). Desweiterem aktiviert DSH ein Protein der *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (RAC)-Familie, welches über die *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) *c-Jun* phosphoryliert. Zusammen mit *c-Fos* kann *c-Jun* so den Heterodimeren Transkriptionskomplex *activator protein-1* (AP-1) bilden und seine Wirkung auch auf Genebene entfalten. Die erläuterten Mechanismen sind in Abbildung 1.3 nochmals grafisch dargestellt. Auch der kanonische WNT-Signalweg kann durch den PCP-Signalweg beeinflusst werden. So kann z. B. phosphoryliertes *c-Jun* als Transkriptionsverstärker am TCF-4 wirken und so den kanonischen Signalweg unterstützen (Chinenov und Kerppola 2001; Katoh und Katoh 2007).

Abbildung 1.3: vereinfachte Darstellung des *Planar-Cell-Polarity*-Signalwegs

Durch komplexe Feedback-Mechanismen wird eine entgegengesetzte Positionierung der Proteinkomplexe FZD/DSH/*diego* und STBM/PK erreicht. Diese konstituiert die basal-apikale Polarisierung der Zelle. DSH ist nur in Gegenwart von FZD und *diego* aktiv. PK hingegen hemmt DSH. Über DAAM wird die kleine GTPase RHOA aktiviert, welche eine zytoskelettale Neuorganisation induziert. Dies geschieht vor allem über vermehrte Polymerisation von Aktinfilamenten und über Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien an der migratorischen Front. Eine weitere kleine GTPase namens RAC wird ebenfalls von DSH aktiviert und führt über die JNK zur Dimerisierung von c-Jun und c-Fos und somit zur Bildung des Transkriptionskomplexes AP-1.

#### 1.4.2.2 Der WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg

Der WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg führt über WNT5a und die FZD-Rezeptoren zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums. Dieses steuert seinerseits die Zellmotilität, Zelladhäsion, Gewebetrennung und interferiert mit dem kanonischen WNT-Pfad (Komiya und Habas 2008; Naillat et al. 2010). Die Ligandenbindung führt in diesem Fall zur Aktivierung heterotrimerer G-Proteine, welche über die Phospholipase C (PLC) aus Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) das Inositol 1,4,5-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) sowie Diacylglycerol (DAG) freisetzen. Durch Aktivierung der  $\text{IP}_3$ -abhängigen Rezeptoren des

endoplasmatischen Retikulums wird Kalzium aus den internen Speichern freigesetzt und aktiviert seinerseits die *specific store-operated calcium channels* (CRAC) der Zellmembran um den intrazelluläre Kalziumspiegel weiter anzuheben (Medyouf und Ghysdael 2008). Der hohe intrazelluläre Kalziumspiegel hat verschiedene Effekte auf die Zelle:

1. Über die Protein-Kinase C (PKC) wird eine weitere kleine GTPase der Rho-Familie namens *cell division control protein 42* (Cdc42) aktiviert. Dieses reguliert, ähnlich den Mechanismen des PCP-Signalwegs, die Aktin-Polymerisation an der migratorischen Front der Zelle (Schlessinger et al. 2007).
2. In der Bindung mit Calmodulin kann Kalzium die *calcium/calmodulin-dependent kinase II* (CamKII) aktivieren. CamKII führt über die *nemo like kinase* (NLK) zu einer Inhibierung des, für den kanonischen WNT-Signalweg zentralen,  $\beta$ -Catenin/TCF-Transkriptionskomplexes (Ishitani et al. 1999).
3. Ein weiteres Ziel des  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplexes ist Calcineurin. Diese Serin/Threonin Phosphatase dephosphoryliert zytoplasmatisches *nuclear factor of activated t-cells* (NFAT), sodass es in den Nukleus übertreten und dort als Transkriptionsfaktor agieren kann. Ziele von NFAT sind Gene der Proliferation, Zellteilung oder auch der Zelldifferenzierung (Medyouf und Ghysdael 2008).

Auch eine Rolle als Inhibitor des  $\beta$ -Catenin/TCF-Transkriptionskomplexes ist seit längerem bekannt. 2011 konnte die chinesische Arbeitsgruppe um Huang zeigen, dass diese Inhibition auf einer Bindung des nuklearen DSH beruht. DSH steht so nicht mehr zur Stabilisierung des  $\beta$ -Catenin/TCF-Komplexes zu Verfügung (Huang et al. 2011).

### 1.4.3 Die Rolle der WNT-Signalwege im Mammakarzinom

Betrachtet man die herausragende Rolle der WNT-Signalwege in der Zelldifferenzierung, der Migration und der Stammzellerneuerung, so verwundert es nicht, dass Fehlregulationen zu neoplastischen Erkrankungen führen können (Willert et al. 2003; Clevers und Nusse 2012). Seither wurde die Bedeutung der WNT-Signalwege in der Entstehung verschiedener Tumoren, wie dem Melanom, dem Kolonkarzinom oder dem Hepatozellulären Karzinom stark beforscht (Morin et al. 1997; Breuhahn et al. 2006; Larue und Delmas 2006). Im Folgenden soll der Fokus auf dem Mammakarzinom liegen.

Bereits für die physiologische Entwicklung der Brustdrüse sind die WNT-Signalwege, vor allem der kanonische WNT-Pfad, unerlässlich. Beispielsweise bleibt in LEF1 *Knock-*

*Out* Mäusen die Anlage der Mamma gänzlich aus (van Genderen et al. 1994). Im adulten Brustgewebe kommen die WNTs erst zur Reorganisation der Drüsenstruktur während der Schwangerschaft wieder in den Fokus (Weber-Hall et al. 1994; Brisken et al. 2000).

### **Der $\beta$ -Catenin-abhängige kanonische WNT-Signalweg im Mammakarzinom**

Bereits 1988 konnten Tsukamoto et al. in San Francisco einen Zusammenhang zwischen dem kanonischen WNT-Liganden WNT1 (damals INT-1) und dem vermehrten Auftreten von Adenokarzinomen der Brustdrüse bei Mäusen demonstrieren. Auch im humanen System besteht eine positive Korrelation zwischen der Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-abhängigen kanonischen WNT-Signalwegs in Mammakarzinom-Zellen und aggressiverem Verhalten der entsprechenden Neoplasien. Eine Akkumulation des  $\beta$ -Catenin in Zytoplasma und Zellkern als Hinweis auf eine Aktivierung findet sich in ca. 50% der humanen Mammakarzinom-Fälle. Diese Aktivierung betrifft vor allem Zellen des *basal-like* Subtyps und geht mit einer ungünstigen Prognose, also einem geringeren Überleben, einher (Lin et al. 2000; Khramtsov et al. 2010). Insbesondere besteht ein Zusammenhang von WNT/ $\beta$ -Catenin-Aktivierung und Metastasierung in Lunge und Hirn (Dey et al. 2013). Dabei sind im Gegensatz zu anderen WNT-assoziierten humanen Tumoren direkte Mutationen von Bestandteilen der WNT-Pfade in Mammakarzinomen eher selten (Brennan und Brown 2004). Als oft zitiertes Beispiel sei hier die *Loss-of-Function* Mutation des APC-Gens im kolorektalen Karzinom genannt, welche zu einer konstitutionellen Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs führt (Vermeulen et al. 2010). Im Mammakarzinom hingegen scheinen andere Mechanismen eine Aktivierung zu verursachen, die hier beispielhaft Erwähnung finden sollen:

Auf autokrinem Wege können Tumorzellen sich selbst mit Hilfe von kanonischen WNT-Liganden wie WNT3a stimulieren (Bafico et al. 2004; Benhaj et al. 2006). Dies kann auch parakrin durch Expression von WNT2 in Zellen des umliegenden Gewebes erfolgen (Dale et al. 1996). Für das APC-Gen konnten aberrante Methylierungsmuster in der Promoterregion identifiziert werden. Diese sind hoch-spezifisch für das Mammakarzinom und finden sich häufiger in fortgeschrittenen Tumorstadien (Zhou et al. 2016). Für die Mikro-RNA miRNA-1229 konnte demonstriert werden, dass eine Überexpression mit erhöhter Proliferation von Mammakarzinomzellen *in vitro* und ungünstiger Prognose *in vivo* einhergeht. Dabei spielt die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalwegs über eine Inhibition von zum Beispiel APC und GSK-3 $\beta$  eine tragende Rolle (Tan et al. 2016). Nicht zuletzt kann eine Aktivierung auch über die Inaktivierung

eines Inhibitors erzielt werden. Dieses Phänomen wurde zum Beispiel für den WNT-Antagonisten DKK3 gut untersucht. Auch hier führt aberrante Methylierung des Promotors zur Stilllegung des Gens mit konsekutiver  $\beta$ -Catenin-Stabilisierung. Veeck et al. konnten weiterhin einen signifikanten Vorteil bezüglich des *Overall-Survivals* und des *Disease-Free-Survivals* für Patientinnen ohne DKK3-Methylierung demonstrieren (Veeck et al. 2009).

### **Die $\beta$ -Catenin-unabhängigen nicht-kanonischen WNT-Pfade im Mammakarzinom**

Die Studienlage bezüglich der  $\beta$ -Catenin-unabhängigen nicht-kanonischen WNT-Signalwege im Mammakarzinom ist zum aktuellen Zeitpunkt widersprüchlich. Wesentlicher Ligand in diesem Kontext ist WNT5a. Sicherlich auch auf Grund der heterogenen weiteren Signaltransduktion in das innere der Zelle in Abhängigkeit von Kontext und Liganden/Rezeptorpaarung werden sowohl onkogene als auch tumorsuppressive Effekte gesichtet und publiziert:

Eine Wirkung als Tumorsuppressor wurde bereits 2002 beschrieben, als dargestellt werden konnte, dass ein Verlust der WNT5a-Protein-Expression in primär invasiven duktalem Mammakarzinomproben mit einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit einherging (Jönsson et al. 2002). Dabei wurden in den letzten Jahren vor allem inhibitorische Effekte auf die Metastasierung, auf die Invasion und, *via* Verbesserung der Zell-Adhäsion, auf die Migration postuliert (Jönsson und Andersson 2001; Jauliac et al. 2002; Hansen et al. 2009). Neben diversen anderen Wirkmechanismen wird in der Literatur eine WNT5a-induzierte Antagonisierung des  $\beta$ -Catenin-abhängigen kanonischen Signalwegs als wesentlicher Treiber dieser Effekte diskutiert (Roarty et al. 2009; Jang et al. 2015).

Im Gegensatz dazu deuten andere Studien auf eine promigratorische und proinvasive Rolle des WNT5a hin (Pukrop et al. 2006; Bayerlová et al. 2017). Insbesondere die WNT/PCP-, WNT/ $\text{Ca}^{2+}$ /CDC42- und WNT/ROR2-Module scheinen einen erheblichen Einfluss auf die Wirkung des WNT5a im Mammakarzinom zu haben (Prasad et al. 2013). Außerdem scheint die Interaktion der Tumorzellen mit dem umliegenden Gewebe eine zentrale Bedeutung zu haben. TAMs produzieren in Ko-Kultur mit Mammakarzinom-Zellen zusätzlich erhöhte Mengen an WNT5a, was letztendlich *in vitro* zu einer Invasionssteigerung führt (Pukrop et al. 2006). Für CXCR4 ist in der Literatur ein proinvasiver und migrationsfördernder Effekt über den WNT-Signalweg für das Mammakarzinom beschrieben worden (Song et al. 2015). In diesem Zusammenhang ist auch iNOS interessant, welches seinerseits ein WNT-Signaling induzieren kann. Es be-

stehen Hinweise darauf, dass dies über die Hemmung von DKK-Proteinen geschieht (Du et al. 2013). *In vivo* konnten Zusammenhänge zwischen der Überexpression des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs und Hirnmetastasen festgestellt werden (Klemm et al. 2011). Auch in Lebermetastasenproben von Mammakarzinomem geht die Überexpression des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs mit einer ungünstigen Prognose einher (Bleckmann et al. 2016).

Einen Versuch die widersprüchliche Datenlage bezgl. der Stellung des WNT5a im Mammakarzinom aufzulösen, unternahm die Arbeitsgruppe um Chandra Prakash Prasad in Schweden. Sie konnte 2013 zeigen, dass zumindest bezogen auf die Achse WNT5a/Ca<sup>2+</sup>/CDC42/ERK1, die Dauer der Exposition gegenüber WNT5a ein maßgeblicher Faktor ist. So kam es nach 1h zu einem Anstieg des promigratorischen Proteins ERK1/2, der sich in den folgenden Stunden jedoch zu einem signifikanten Abfall unter die ursprüngliche *baseline* mit konsekutiv reduzierter Tumorzellmigration umkehrte (Prasad et al. 2013).

Zusammenfassend läßt sich im Mammakarzinom also insbesondere eine klare proinvasive Rolle für den kanonischen WNT-Signalweg postulieren. Die Situation bezüglich des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs mit seinem Liganden WNT5a erscheint noch unübersichtlich und bedarf weiterer Forschungsbemühungen.

#### **1.4.4 Tumor-assoziierte Makrophagen und WNT-Signaling**

Eine der ersten Arbeiten, die eine Rolle der WNTs in Zusammenhang mit TAMs konstatierte, wurde 1999 veröffentlicht. Die Arbeitsgruppe um K. Smith konnte eine Überexpression der WNT-Liganden WNT2 und WNT5a in humanen Kolonkarzinomen nachweisen, wobei nicht die malignen Zellen, sondern die benachbarten Makrophagen die WNT-Proteine produzierten (Smith et al. 1999).

Auch im Mammakarzinom ist dieser Mechanismus bekannt. Ko-Kultivierung von Makrophagen und Mammakarzinom-Zelllinien führt zu vermehrter Produktion von WNT5a in Makrophagen. Dieses induziert  $\beta$ -catenin-unabhängig die Produktion von MMP-7 in Tumorzellen und die daraus resultierende Freisetzung von TNF $\alpha$ . Die Folge ist ein proinvasiver Phänotyp der malignen Zellen. Auch *in vivo* konnte eine vermehrte Produktion von WNT5a in humanen TAMs des Mammakarzinoms sowie in dessen lymphogenen Metastasen nachgewiesen werden (Hagemann et al. 2004; Pukrop et al. 2006). Weitere Autoren demonstrierten überdies eine Überexpression des WNT7b in

TAMs des Mammakarzinoms. Es besteht eine positive Korrelation zwischen WNT7b und vermehrten lymphogenen Metastasen (Ojalvo et al. 2010).

Aktuelle Arbeiten berichten von einer Bedeutung des Makrophagen-produzierten WNT5a in der Regulation der Angiogenese. Obgleich proklamiert wurde, dass WNT5a in der Entwicklung der murinen Retina inhibierend auf die Vaskularisierung wirkt (Stefater et al. 2011), deuten andere Untersuchungen auf einen proangiogenetischen Effekt hin (Masckauchán und Kitajewski 2006; Goodwin et al. 2007). Wie bereits beschrieben, ist die Signalantwort jedoch, gerade im Bereich der WNT-Signalwege, stark kontextabhängig.

## 1.5 Die Zielsetzung dieser Arbeit

Vorrausgehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten einen invasionssteigernden Effekt auf die ansonsten wenig invasive MCF-7-Mammakarzinom-Zelllinie durch die Ko-Kultur mit Makrophagen zeigen. Dieser Effekt beruht auf der Induktion von WNT5a in den Makrophagen und parakriner Aktivierung des nicht-kanonischen PCP-Signalwegs in den Tumorzellen. Es ist jedoch noch unklar, welche weiteren Gene sowohl auf regulatorischer als auch auf Zielgen-Ebene an der Polarisierung der TAMs in diesem speziellen Setting beteiligt sind. Diese Fragestellung soll nun unter folgenden verschiedenen Konditionen untersucht werden:

1. Genexpressionsanalysen in humanen Makrophagen nach Kokultur mit Mammakarzinom-Zelllinien sowie vergleichend unter Stimulation mit LPS. Dazu werden aus Vorarbeiten bereits bekannte Gene wie *WNT5a*, *TNF $\alpha$* , *VEGF $\alpha$* , *CXCR4*, *DKK2*, *iNOS* und *TCF7L2* mittels *real-time* PCR untersucht werden.
2. Genexpressionsanalysen in murinen Makrophagen nach Stimulation mit Tumor-Mikrovesikeln von Mammakarzinom-Zelllinien. Dies soll die Frage beantworten, ob die Stimulierung muriner Makrophagen mit MCF-7-TMVs das Expressionsprofil der Makrophagen in anderer Weise als die alleinige Ko-Kultur beeinflusst und inwieweit Gene des WNT-Signalwegs von dieser Expressionsänderung betroffen sind. Es soll der Wnt-Pfad-spezifische *RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Array* der Firma Qiagen zum Einsatz kommen.



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verwendete Zelllinien

In den Ko-Kulturen wurde die humane Tumorzelllinie MCF-7 verwendet (*American Type Cell Collection*-Nummer: HTB-22, *American Type Cell Collection*, Rockville, Maryland, USA). Es handelt sich hierbei um Zellen eines humanen duktales Mamma-Adenokarzinoms. Die 1972 von Herbert Soule in Detroit etablierte Zelllinie wurde erstmals 1970 aus dem malignen Pleuraerguss einer 69-jährigen kaukasischen Frau isoliert. MCF-7-Zellen exprimieren sowohl den Östrogen- als auch den Progesteron-Rezeptor und weisen keine HER-2-Überexpression auf (Levenson und Jordan 1997).

Diese Zelllinie wurde über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen erworben (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland).

#### 2.1.2 Chemikalien, Zellmedien, Proteine und Lösungen

- |   |  |
|---|--|
| • Accutase                                      | Sigma, Deisenhofen, Deutschland            |
| • Agarose HEEO <i>Ultra-Quality</i> Pulver      | Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland          |
| • Biocoll                                       | Biochrom AG, Berlin, Deutschland           |
| • BSA   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland            |
| • Chloroform                                    | 99,9%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland   |
| • DAPI  | 5 mg/ml, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland |
| • dATP, dCTP, dGTP, dTTP                        | 100 mM, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland |
| • DMEM mit 1 g/l Glucose ( <i>Low glucose</i> ) | Biochrom AG, Berlin, Deutschland           |
| • ECM   | Sigma, Deisenhofen, Deutschland            |
| • Ethanol                                       | 99,9%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland   |

- FCS Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- *Glycoblue* 15 mg/ml Glykogen mit blauem Marker, Life Technologie GmbH, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
- Isopropranol 99,9%, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- LPS von E. coli Serotyp R515, 1 mg/ml, Alexis Corp., Lausen, Schweiz
- Mowiol-Eindeckmedium Hoechst, Frankfurt am Main, Deutschland
- NHS Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- PBS PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
- Pen/Strep 10000 U/ml Pen. und 10 mg/ml Strep. in 0,9% NaCl, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Percoll GE Healthcare, München, Deutschland
- PFA Paraformaldehyd 4% in PBS, Molecular Probes, Eugene, USA
- Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Verhältnis: 25:24:1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- rekombinantes humanes M-CSF von E. coli, Immuno Tools GmbH, Friesoythe, Deutschland
- rekombinantes murines Wnt-5a R&D-Systems, Minneapolis, USA
- RNaseOUT™ 40 U/μl, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
- RPMI 1640 mit L-Glutamin, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
- Sekundärer Antikörper Fluoresceinisothiocyanat konjugierter Maus IgG-Antikörper, Molecular Probes, Eugene, USA
- Sodium Pyruvat 11 mg/ml, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- TNFα-Antikörper anti-TNFα, Maus-IgG, R&D-Systems, Minneapolis, USA

- TRIzol Reagenz  
monophasische Lösung aus Phenol, Guanidinium-Thiocyanat und weiterem, Life Technologies GmbH, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
- TritonX-100  
Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Trypsin-EDTA  
0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS  
Biochrom, Berlin, Deutschland
- B-Mercaptoethanol  
98+%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 2.1.3 Kommerziell erwerbbaare Systeme

- *Agilent RNA 6000 Nano Kit*  
Katalognummer: 5067-1511, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
- *Dc Protein Assay Kit II*  
Katalognummer: 500-0112, Bio-Rad, München, Deutschland
- *DNase I Amplification Grade*  
Katalognummer: 18068-015, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
- *GeneRuler 100 bp DNA Ladder*  
Katalognummer: SM0241, Fermentas, Bremen, Deutschland
- *High Pure RNA Isolation Kits*  
Katalognummer: 11828665001, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
- *iScript Advanced cDNA Synthesis Kit*  
Katalognummer: 170-8842, Bio-Rad, München, Deutschland
- *PCR Buffer Set*  
Katalognummer: 11699121001, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
- *RT<sup>2</sup> First Strand cDNA Kit*  
Katalognummer: 330401, Qiagen, Hilden, Deutschland
- *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Mouse WNT Signaling Pathway)*  
Katalognummer: PAMM-043Z, Qiagen, Hilden, Deutschland
- *RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR Mastermix*  
Katalognummer: 330521, Qiagen, Hilden, Deutschland

- *SYBR Advantage qPCR PreMIX* Katalognummer: 639676, Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

#### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

- 15-ml-Röhrchen Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- 21,5-cm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen beschichtet HydroCell<sup>TM</sup>, Nunc, Wiesbaden, Deutschland
- 21,5-cm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen unbeschichtet Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- 50-ml-Röhrchen Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- 6-Napf-Zellkulturschalen Millipore, Eschborn, Deutschland
- 6-Napf-Zellkulturschalen Nunc, Wiesbaden, Deutschland
- Glaspasteurpipetten 230 mm WU Laborglaswaren, Mainz, Deutschland
- Serologische Auslaufpipetten 10 ml Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Serologische Auslaufpipetten 25 ml Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Serologische Auslaufpipetten 5 ml Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Teflonbeutel VueLife<sup>®</sup> American fluoroseal corporation, Gaithersburg, USA
- Zellkultureinsätze (hängend, 24 mm Ø, 0,4 µm Porengröße) Millipore, Eschborn, Deutschland
- Zellkulturflaschen 175 cm<sup>2</sup> Fläche Standard, Greiner-One, Frickenhausen, Deutschland
- Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> Fläche Standard, Greiner-One, Frickenhausen, Deutschland
- Zellschaber Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

#### 2.1.5 Geräte

- Agilent 2100 *Bioanalyzer* Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
- CCD Kamera AxioCam MRM Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
- CO<sub>2</sub>-Inkubator MCO-17 AC Sanyo, Etten-Leur, Niederlande
- Elektrophoresekammer Horizon 58 Gibco, Heidelberg, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

- Fluorospektrometer NanoDrop Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
- Heizblock Thermomixer 5437 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Kühlischzentrifuge Hettich Universal 30 RF Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Laborzentrifuge Multifuge 3 L-R Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
- Mikroskop, invers Telaval 31 Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
- Neubauer Zählkammer, *improved* Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Steril-Werkbank Hereaus HB 2448 Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
- Steril-Werkbank MCS-Advantage Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
- Steril-Werkbank Technoflow 2F120-II GS Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
- *Tecan Sunrise Microplate Reader* Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz
- Thermozykler Trio Biometra, Göttingen, Deutschland
- Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Transilluminator-CCD-Kamera Intas, Göttingen, Deutschland
- Ultrazentrifuge Optima XPN-80 Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
- Ultrazentrifuge Optima CE-80K Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
- UV-Transilluminator Biometra TI3 Biometra, Göttingen, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Die Arbeit in der Zellkultur erfolgte stets unter sterilen Bedingungen und unter einer Werkbank der Sicherheitsstufe II. Die verwendeten Materialien, wie z. B. Pipettenspitzen, Eppendorf-Reaktionsgefäße, Pasteur-Pipetten, 6-Napf-Platten oder Inserts, wurden vor dem Gebrauch autoklaviert oder waren bereits vom Hersteller steril verpackt.

Die Zellkultivierung der MCF-7-Zellen erfolgte in Kulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> Fläche in 10 ml eines RPMI 1640 Nährmediums, welches zuvor mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde, bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt. Bei Erreichen eines Zellrasen auf 70-80% der Kulturfläche erfolgte das Ablösen mittels Trypsin-EDTA und Splitten der Zellen.

Zum Ablösen der Zellen wurden diese, nach Entfernen des Medium, zuerst mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen. Hiermit wurde einerseits Zelldebris ausgewaschen, andererseits wurde ein Milieu geschaffen, welches möglichst frei von zweiwertigen Kationen, wie Mg<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup> oder Sr<sup>++</sup> war, da diese die Aktivität des Trypsins hemmen. Auch das EDTA diente diesem Zwecke. Bei einer Fläche der Kulturflasche von 75 cm<sup>2</sup> wurde 1 ml des Trypsin/EDTAs eingesetzt und darauf geachtet, dass der Boden vollständig benetzt war. Die Zellen wurden daraufhin zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 9 ml RPMI 1640 mit 10% FCS wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension konnte nun auf verschiedene Flaschen aufgeteilt werden.

#### 2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Nach Resuspension der abgelösten Zellen wurde eine mit 10 µl bestückte Neubauer-*improved*-Zählkammer zur Zellzählung benutzt. Die Anzahl der Zellen pro µl berechnet sich aus dem arithmetischen Mittel der Zellzahlen der einzelnen Zählquadrate von 1 mm<sup>2</sup> Fläche multipliziert um den Faktor zehn.

### 2.2.1.3 Isolation von humanen Monozyten aus peripherem Blut

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung humaner mononukleärer Zellen dienten humane *buffy coats* gesunder Blutspender. Der *buffy coat* ist neben dem Erythrozytenkonzentrat und dem Blutplasmaanteil ein Produkt der Vollblutspende. Er entsteht durch Auftrennung der Spende mittels Zentrifugation und beinhaltet neben Erythrozytenresten vor allem Thrombozyten und Leukozyten. Die weitere Aufspaltung der einzelnen Bestandteile geschah mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation mit Biocoll (#L6115, Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Die Biocoll-Trennlösung besteht vor allem aus dem hydrophilen Polymer Polysucrose. Es weist eine Dichte von 1,077 g/ml auf.

Der *buffy coat* wurde auf zwei 50 ml Röhren aufgeteilt. Jedes dieser Röhren wurde sodann mit einer PBS-EDTA-Lösung (1 mM EDTA) auf 30 ml aufgefüllt. Parallel wurden ebenfalls zwei 50 ml Röhren mit je 15 ml Biocoll bestückt. Anschließend wurden 30 ml des *buffy coats* sehr vorsichtig auf 15 ml Biocoll geschichtet und bei 400 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Granulozyten und Erythrozyten, welche eine höhere Dichte als 1,077 g/ml aufwiesen, sedimentierten. Zellen und andere Bestandteile mit einer niedrigeren Dichte siedelten sich oberhalb des Trennmediums an. Somit enthielt die separierte weiße Bande auf dem Trennmedium alle mononukleären Zellen. Vorsichtig wurde diese abpipettiert und in ein 50 ml Röhren überführt. Sodann wurde dieses mit der PBS-EDTA-Lösung auf 50ml aufgefüllt. Zur Depletion der Thrombozyten wurde die Probe bei 200 g für 10 min mit einer maximalen Bremse zentrifugiert. Es bildete sich ein unscharfes Pellet am Boden, welches die mononukleären Zellen enthielt. Das Röhren wurde bis auf 5ml abgesaugt, wieder auf 50 ml aufgefüllt und nochmals zentrifugiert. Um nun auch die Lymphozyten zu separieren, wurde parallel ein zweiter Gradient mit einer unterschiedlichen Dichte vorbereitet. Hierzu wurden zu 11,57 ml Percoll (#17-0891-02, GE Healthcare, München, Deutschland) 0,935 ml 10x PBS hinzugefügt. Das Pellet wurde nach der Zentrifugation in RPMI 1640 ohne Phenolrot resuspendiert. Anschließend konnte mit 11,5 ml der zuvor angesetzten Percoll/PBS-Lösung der zweite Gradient pipettiert und bei 550 g für 30 min ohne Bremse zentrifugiert werden. Der Monozytenring wurde abpipettiert und in einem neuen Röhren wieder mit PBS-EDTA auf 50 ml aufgefüllt. Nun folgte ein Waschschrift, bei welchem die Probe zuerst bei 400 g für 10 min mit maximaler Bremse pelletiert wurde, um dann in 20 ml eines zuvor angefertigten Serumansatzes mit RPMI + 1% Pen/Strep + 2% humanes AB-Serumpool resuspendiert zu werden. Um die Zellen gleichmäßig auf Teflonbeutel zu verteilen, wurden sie einmalig gezählt. In einem Beutel sollten ungefähr 45-60 min Monozyten sein. Dementsprechend wurden die Zellen verteilt und die

Beutel auf 180 ml des Serumansatzes aufgefüllt. Um die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen zu gewährleisten, wurden jedem Ansatz 10 µl rekombinanter humaner *Makrophage-Colony-Stimulating-Factor* (rh M-CSF; Immuno Tools GmbH, Friesoythe, Deutschland) in einer Konzentration von 50 ng/µl hinzugefügt. Die Monozyten wurden so eine Woche im Inkubator aufbewahrt und konnten dann in den Experimenten eingesetzt werden.

#### 2.2.1.4 Isolation von murinen Monozyten aus NMRI-Mäusen

Für die Versuche mit den murinen Makrophagen, wurden Zellen von Mäusen eines Zuchtstamms benutzt, welcher nach dem *Naval Medical Research Institute* (NMRI) benannt wurde. Es wurden acht bis zwölf Wochen alte Mäuse verwendet. Die Monozyten wurden in Pluznik-Medium (Pluznik und Sachs 1966) gehalten und ausdifferenziert. Dieses Medium wurde vorab aus folgenden Substanzen zubereitet: 52,8% DMEM + 30% L929-konditioniertes Medium + 10% FCS + 5% *Normal Horse Serum* (NHS) + 1% Natrium-Pyruvat + 1% Pen/Strep + 0,2% 1:1000 beta-Mercaptoethanol. Nach der Präparation der Mäuse wurde der Markraum des Femurs eröffnet und mit einer 21G Kanüle und 5 ml Pluznik-Medium gespült. Das Knochenmark und das Medium wurden in einer beschichteten Petrischale (Nunc HydroCell™) aufgefangen. Daraufhin wurden die Zellen für 24 h in den CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C gestellt. Am nächsten Tag befanden sich die Monozyten in Suspension. Das Medium aus den beschichteten Petrischalen wurde, möglichst ohne feste Partikel, aufgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Petrischale wurde noch zwei Mal mit 10 ml Pluznik-Medium gewaschen um auch Reste der Monozyten mit aufzunehmen. Die Endmenge im 50 ml Röhrchen betrug somit 30 ml. Dieses wurde für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert um die Monozyten zu pelletieren. Nachdem die Zellen in 40 ml Pluznik resuspendiert wurden, konnten sie auf vier unbeschichtete Petrischalen je 10 ml verteilt werden. Es folgte eine weitere Inkubationsphase von 72 h. Um den rh M-CSF Nachschub zu gewährleisten, musste am vierten Tag nochmals das Pluznik-Medium gewechselt werden. Nach weiteren 72 h im Inkubator wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit warmem PBS gewaschen. Zum Ernten der nun ausdifferenzierten Makrophagen wurden 1,5 ml Accutase benutzt. Dieses Gemisch aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen bietet den Vorteil, dass es auch bei längeren Einwirkzeiten kaum zellschädigend wirkt. Da die murinen Makrophagen besonders stark am Boden der Petrischalen haften, wäre ansonsten eine hohe Konzentration bzw. eine lange Einwirkzeit des Trypsin/EDTAs nötig gewesen, was zwangsläufig zur Schädigung der Zellen geführt hätte.



Nach 10 min im Inkubator wurden die gelösten Makrophagen in einem Medium bestehend aus 75% DMEM, 10% FCS und 15% L929-konditioniertem Medium aufgenommen und bei 1200 rpm für 10 min in der Zentrifuge pelletiert. Das alte Medium wurde abgesaugt und die Zellen wieder in 20 ml resuspendiert. Nun wurden die Makrophagen in einer Neubauer-*improved*-Kammer gezählt und standen zum Experimentieren bereit.

#### **2.2.1.5 Isolation von Mikrovesikeln aus dem Überstand von MCF-7-Zellen**

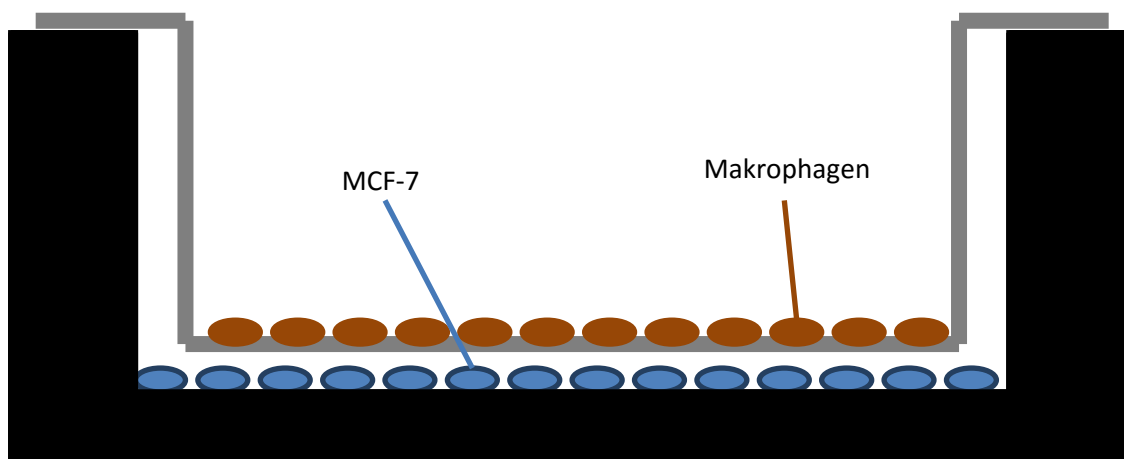
Die Mikrovesikelisolation erfolgte durch Ultrazentrifugation des aufgearbeiteten MCF7-Überstands. Dazu wurden MCF-7-Zellen in sechs großen Zellkulturflaschen mit einer Fläche von jeweils 175 cm<sup>2</sup> kultiviert. Des Weiteren wurde partikelfreies fetales Kälberserum (pf FCS) benutzt um Verunreinigungen mit physiologisch bereits im FCS vorhandenen Mikrovesikeln vorzubeugen. Dieses wurde durch Ultrazentrifugation bei 100000 g über Nacht aus normalem hitzeinaktiviertem FCS gewonnen.

Im Status einer 60-80% Konfluenz der MCF-7-Zellen wurde der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und jede Zellkultur-Flasche wurde mit 25 ml RPMI + 10% partikelfreies FCS aufgefüllt. Nach 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator wurde der nun mit Mikrovesikeln der MCF-7-Zellen versetzte Überstand nochmals abgenommen und in 50 ml Röhrchen gepoolt. Um intakte Zellen in Suspension und Zelldebrity zu pelletieren, wurden die Proben zuerst für 5 min bei 750 g und dann nochmals für 15 min bei 1500 g zentrifugiert. Die Pellets wurden jeweils verworfen. Der so aufgearbeitete Überstand wurde in die Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und in die entsprechenden Einsätze eingeführt. Die Proben wurden mit Hilfe einer Feinwaage Gegeneinander bis auf 0,002 g mit PBS austariert. Die Ultrazentrifugation erfolgte für 35 min bei 14000 g und 4 °C. Nachdem der Überstand abgeschüttet wurde, konnten die Mikrovesikel durch Schaben am Boden der Ultrazentrifugen-Röhrchen in 200 µl kaltem PBS resuspendiert und in 1,5 ml-Cups überführt werden. Um die Reinheit der Probe zu erhöhen, erfolgte ein Waschschrift, bei welchem die Proben nochmals bei 14000 g und 4 °C für 35 min zentrifugiert wurden und der Überstand abgesaugt wurde. Abschließend wurden die Mikrovesikel in 100 µl PBS in einem 1,5 ml-Cup gepoolt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Zur Quantifizierung der Menge an Mikrovesikeln in der Probe wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt.

### 2.2.1.6 Ko-Kulturversuche von humanen Makrophagen und MCF-7-Zellen

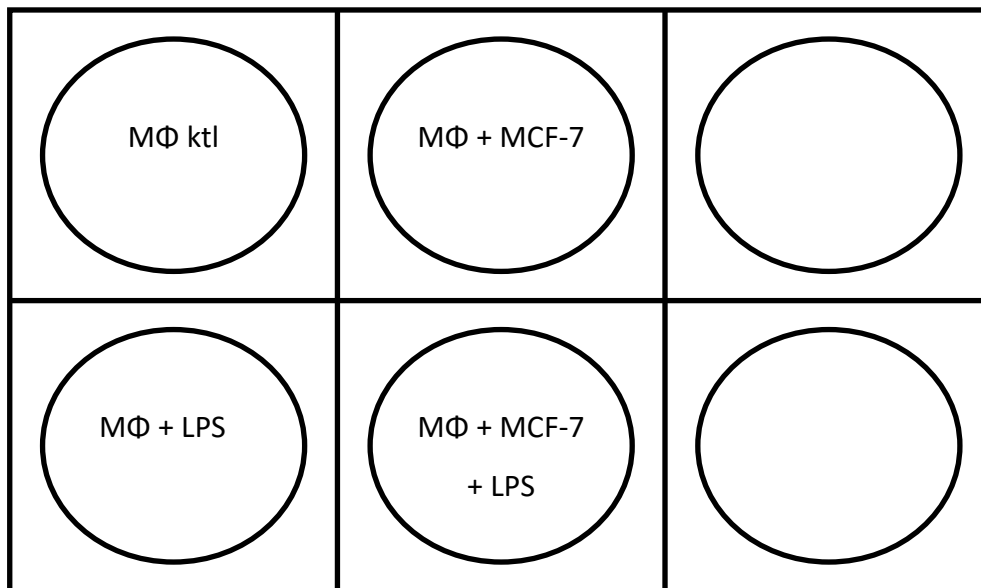
Zur späteren Analyse des Expressionsmusters via *Real-Time*-PCR erfolgte zuerst eine Ko-Kultivierung der humanen Makrophagen mit der Tumorzelllinie MCF-7. Das Verhältnis von Makrophagen zu MCF-7 betrug stets 2:1. Die absoluten Zellzahlen variierten zwischen  $1,5 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^6$  auf  $3,14 \text{ cm}^2$  bei den Makrophagen und  $7,5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  auf  $9,6 \text{ cm}^2$  bei den MCF-7-Zellen. Alle Versuche fanden in 6-Napf-Platten und in einem RPMI Nährmedium mit 1% FCS statt. Die humanen Makrophagen befanden sich in hängenden Zellkultureinsätzen mit einer Porengröße von  $0,4 \mu\text{m}$ , sodass eine Kommunikation nur durch sezernierte Faktoren stattfinden konnte und eine getrennte Aufarbeitung der Zellen möglich war (siehe Abbildung 2.1)

**Abbildung 2.1: Modell eines Napfes mit hängendem Insert**



Auf dem Boden des Napfes sind MCF-7-Zellen zu sehen. Darüber, am Boden des Inserts, befinden sich die Makrophagen. Somit ist gewährleistet, dass eine Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen nur durch sezernierte Faktoren stattfinden kann.

Um auch den zeitlichen Ablauf der Regulationen beurteilen zu können, wurden die Experimente so ausgelegt, dass RNA aus Zellen nach 2 h, 20 h, 32 h und 96 h nach Versuchsstart isoliert werden konnte. Neben einer Kontrolle, welche nur aus Makrophagen bestand, wurden folgende Bedingungen getestet: humane Makrophagen + 100 ng LPS/ml Medium, humane Makrophagen + MCF-7, humane Makrophagen + MCF-7 + 100 ng LPS/ml Medium (siehe Abbildung 2.2).

**Abbildung 2.2: Versuchsaufbau humane Makrophagen**

Schematische Darstellung der Bedingungen der humanen Makrophagen: Makrophagen Kontrolle; LPS Stimulation der Makrophagen; Makrophagen in Ko-Kultur mit MCF-7; LPS Stimulation der Makrophagen in Ko-Kultur mit MCF-7

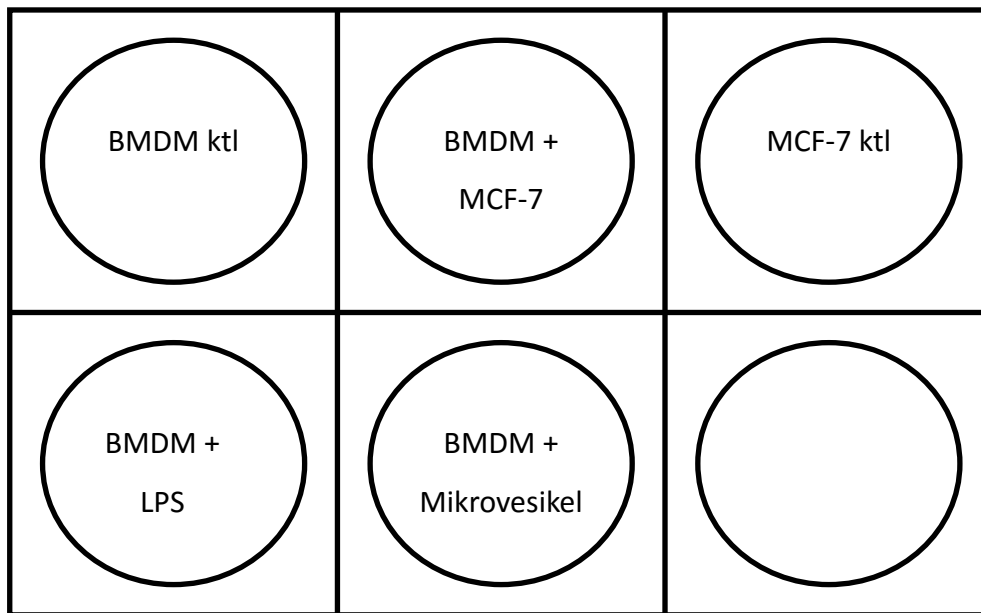
Initial wurde der Boden eines jeden am Experiment beteiligten Napfes mit 100 µl einer 25 µg/µl ECM-Lösung beschichtet. Nachdem die ECM-Lösung getrocknet war, wurden die Platten entsprechend dem Versuchsaufbau mit MCF-7-Zellen bestückt. Nach 3 h erfolgte ein Waschschrift und das Umstellen der Zellen von zuvor RPMI 10% FCS auf RPMI 1% FCS. In getrennten 6-Napf-Platten wurden parallel die humanen Makrophagen in den Zellkultureinsätzen ausgesät und ebenfalls nach 3 h einmalig gewaschen.

Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht, wurden die Zellen am Folgetag bis spätestens 24 h nach dem Zeitpunkt des Aussäens gemäß dem Versuchsprotokoll (siehe Abbildung 2.2) zusammengestellt und entsprechend mit LPS bestückt. Eine Kontrolle der Makrophagen zum Startzeitpunkt wurde nach zwei Waschschriften in TRIzol-Reagenz lysiert und bei -80 °C konserviert. Nach je 2 h, 20 h, 32 h und 96 h wurden die entsprechenden Makrophagen ebenfalls in TRIzol-Reagenz lysiert und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung weggefroren.

### 2.2.1.7 Mikrovesikel-Stimulation von murinen Makrophagen

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte das Expressionsverhalten diverser Gene des WNT-Signalwegs in murinen aus dem Knochenmark gewonnenen Makrophagen (*bone*

*marrow derived makrophages*; BMDM) während einer Ko-Kultur mit MCF-7 sowie während einer Mikrovesikel-Stimulation untersucht werden. Das Verhältnis der Zellen betrug dabei  $2 \times 10^6$  Makrophagen zu  $1 \times 10^6$  MCF-7. Die Mikrovesikel-Stimulation erfolgte mit einer Konzentration von  $25 \mu\text{g/ml}$ . Alle Versuche fanden in 6-Napf-Platten statt. Ähnlich den Ansätzen in den Ko-Kulturen der humanen Makrophagen, befanden sich die BMDM auch hier in Zellkultureinsätzen mit einer Porengröße von  $0,4 \mu\text{m}$ , sodass eine Kommunikation nur durch sezernierte Faktoren erfolgen konnte. Als Medium diente bei allen Bedingungen DMEM + 10% FCS + 15% L929-konditioniertes Medium. Die Länge der Ko-Kultivierung und der Mikrovesikel-Stimulation betrug 24 h. Neben der Ko-Kultur und der Stimulation wurden folgende weitere Kontrollbedingungen getestet: BMDM Kontrolle, BMDM + 100 ng LPS/ml, MCF-7 Kontrolle. Der Boden eines jeden Napfes wurde, analog zu den Ko-Kultur Versuchen mit den humanen Makrophagen, mit einer ECM-Lösung beschichtet. Dieses Mal wurden jedoch  $80 \mu\text{l}$  einer ECM-Lösung mit einer Konzentration von  $6,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  benutzt, da Experimente unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass diese Konzentration gleichwertig war. Nachdem die ECM-Lösung getrocknet war, wurden die MCF-7-Zellen gemäß dem Versuchsaufbau (siehe Abbildung 2.3) in DMEM + 10% FCS + 15% L929-konditioniertem Medium in die Platten ausgesät. In einer weiteren 6-Napf-Platte wurden parallel die murinen BMDM ausgesät. Nach 24 h im Inkubator bei  $37^\circ\text{C}$  wurden die MCF-7-Zellen sowie die Zellkultureinsätze, welche die BMDM enthielten, einmal mit warmem PBS gewaschen und zusammengestellt. Um extreme lokale Spitzenkonzentrationen und Akkumulationen der Mikrovesikel zu vermeiden, wurde zuvor das Medium für die Stimulation separat vorbereitet und mit  $25 \mu\text{g/ml}$  aus MCF-7-Zellen gewonnenen Mikrovesikeln versetzt. Dabei war besonders darauf zu achten, die Mikrovesikel vorher gut zu resuspendieren. Nachdem die Platten wieder mit DMEM + 10% FCS + 15% L929-konditioniertem Medium bestückt waren, wurde auch das LPS in einer Konzentration von  $100 \text{ ng/ml}$  hinzugefügt. Nach weiteren 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  im Inkubator wurde der Versuch gestoppt. Der Überstand wurde zur späteren Proteinanalyse mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen und zur RNA-Werkbank transportiert. Dort wurden sie in  $200 \mu\text{l}$  PBS und  $400 \mu\text{l}$  *Lysis-/Binding-Buffer* des *High Pure RNA Isolation Kits* lysiert und in ein  $1,5 \text{ ml-Cup}$  überführt. Nun wurde entweder direkt die RNA der Probe mit dem *High Pure RNA Isolation Kit* isoliert oder die Probe wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  weggefroren.

**Abbildung 2.3: Versuchsaufbau murine Makrophagen**

Schematische Darstellung der Bedingungen der murinen Makrophagen: BMDM-Kontrolle; LPS-Stimulation der BMDM; BMDM in Ko-Kultur mit MCF-7; Mikrovesikel-Stimulation der BMDM; MCF-7-Kontrolle

### Sterilkontrollen

Um sicher zu gehen, dass die Ergebnisse nicht durch Verunreinigungen der Proben verfälscht wurden, sind nach dem abstoppen der Versuche diverse Sterilkontrollen angelegt worden. Es wurden ca. 200 µl einer jeden Bedingung für weitere drei bis vier Tage in einem Flachboden-Röhrchen inkubiert. Die Probe galt als steril wenn sie makroskopisch weiterhin klar und rötlich erschien, es mikroskopisch keine Hinweise auf Bakterien gab und eine durchgeführte Mycoplasmen-PCR negativ ausfiel.

## 2.2.2 RNA-Isolation

### 2.2.2.1 Einführung

Um die Gesamt-RNA aus den Makrophagen der Ko-Kulturen zur Weiterverwendung für die qRT-PCR zu gewinnen, wurde die Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Methode nach Chomczynski und Sacchi benutzt (Chomczynski und Sacchi 1987). Zur Vermeidung einer Kontamination mit Ribonukleasen (RNasen) fanden alle Arbeitsschritte an einem

RNA-Arbeitsplatz unter Verwendung von Einmalhandschuhen, sterilen Pipettenspitzen und sterilen Reaktionsgefäßen statt.

### **2.2.2.2 Aufarbeitung der Makrophagen**

Das Überführen der *Inserts* in neue sterile 6-Napf-Platten sowie das einmalige Waschen der Makrophagen mit PBS wurde noch in der Zellkultur durchgeführt. Daraufhin wurden die Zellen trocken gelegt und zügig zum RNA-Arbeitsplatz transportiert. Um den restlichen Ablauf nicht zu beeinflussen, war besonders darauf zu achten, dass sich zuletzt kein Medium oder PBS unter den Zellkultureinsätzen befand.

### **2.2.2.3 Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi**

Zur Lyse der Zellwand und Denaturierung störender Proteine, wie z. B. RNasen, wurde 1 ml Trizol-Reagenz pro Zellkultureinsatz zu den Makrophagen pipettiert. Hauptbestandteile des Trizol-Reagenz sind Guanidinium-Thiocyanat und Phenol. Das chaotrope Thiocyanat-Salz des Guanidins wirkt vor allem über eine Zunahme der Entropie und eine damit einhergehende Störung der H<sub>2</sub>O-Käfigstruktur lysierend und denaturierend (Chirgwin et al. 1979). Durch Auf- und Abpipettieren sollte die Homogenisierung beschleunigt werden. Daraufhin wurde das Lysat in 1,5 ml-Cups überführt. Im Rahmen der Phasenseparation wurde dem Lysat, zusätzlich zu dem im Trizol-Reagenz enthaltenden Phenol, 200 µl Chloroform beigefügt. Nach kurzem manuellem Mischen und einer 3- bis 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur trat bereits eine Phasenbildung ein. Die vollständige Dreischichtung war nach einer Zentrifugation über 15 min bei 15000 g und 4 °C zu beobachten. Dabei enthielt die oberste wässrige Phase RNA, wohingegen die dünne mittlere Phase DNA und die organische untere Phase Proteine beinhalteten. Zur RNA-Präzipitation wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5 ml-Cup überführt und mit 500 µl Isopropanol zur Ausfällung sowie 1 µl 1:100 (150 ng/ml) *Glycoblue* zur besseren Darstellung des späteren RNA-Pellets behandelt. Dabei war sehr genau darauf zu achten die DNA-Phase nicht zu beschädigen um eine Verunreinigung der Probe zu vermeiden. Auf eine 10-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgte eine Zentrifugation über 30 min bei 13000 g und 4 °C, sodass ein RNA-Pellet am Boden der 1,5 ml-Cups zu erkennen war. Nun schloss sich ein Waschschriff mit Abnehmen des Überstands und Wiederauffüllen der Probe mit 1 ml 75% Ethanol an. Anschließend erfolgte ein kurzes Vortexen und schließlich die Repelletierung mittels erneuter Zentrifugation über 10 min bei 15000 g und 4 °C. Zur Erhöhung der Reinheit der

Probe wurde dem ursprünglichen Protokoll ein DNA-Verdau-Schritt hinzugefügt. Dazu wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet in 43,5 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O, 5 µl 10x Inkubations-Puffer, 1 µl DNase I (10 U/µl) und 0,5 µl RNaseOUT (40 U/µl) resuspendiert und 20 min bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert. Nachdem der RNA-Lösung zur erneuten Phasenseparation nochmals 150 µl RNase freies H<sub>2</sub>O sowie 200 µl einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung hinzugegeben wurden und die Probe für 15-30 sek gevortext wurde, trübte sich diese erneut milchig. Nach einer 2-minütigen Zentrifugation bei 15000 g und 4 °C konnte wieder einer Schichtung beobachtet werden. Die RNA-haltige obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Um nun wieder die RNA auszufällen, wurde der Probe das 0,1x des Volumens der wässrigen Phase (ca. 20 µl) 3M Na-Acetat mit einem pH-Wert von 4,8, das 1x Volumen Isopropanol (ca. 200 µl) und 1 µl 1:100 *Glycoblu*e beigefügt. Durch eine Inkubation über 30 min bei 4 °C und eine Zentrifugation über 30 min bei 15000 g und 4 °C konnte wieder ein RNA-Pellet am Boden der 1,5 ml-Reaktionsgefäße sichtbar gemacht werden. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 75% Ethanol wurde das Pellet bei 37 °C und offenem 1,5 ml-Reaktionsgefäß im Wärmeblock getrocknet, bis es leicht glasig erschien. Die RNA wurde daraufhin in 15-20 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Um eine komplette Lösung der RNA zu erreichen, wurde die Probe für weiter 10 min bei 42 °C im Thermoschüttler behandelt.

#### **2.2.2.4 High Pure RNA Isolation Kit**

Die Isolation der RNA aus den Zellen der murinen BMDM und MCF-7 Ko-Kultur-Versuche sowie aus den Mikrovesikel-Stimulationen erfolgte mit Hilfe des *High Pure RNA Isolation Kits* (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Alle Arbeitsschritte entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Die Isolation erfolgte durch selektive Bindung von Nukleinsäuren an ein Glas-Faser-Fleece in Anwesenheit des chaotropen Salzes Guanidiniumchlorid.

Vor der Nutzung des *Kits* wurden der *Washing-Buffer-I* mit 20 ml 100% Ethanol und der *Washing-Buffer-II* mit 40 ml 100% Ethanol aktiviert. Die DNase-I wurde in 0,55 ml des *Elution-Buffer* gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Im ersten Arbeitsschritt erfolgten die Aufspaltung der Zellen und die Inaktivierung der RNasen mit Hilfe von 200 µl warmem unsterilem PBS und 400 µl *Lysis-/Binding-Buffer* je Probe. Das Zelllysat wurde sodann in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in welchem es für 15 sek auf dem Vortex geschüttelt wurde um die Lyse weiter zu unterstützen und die Lösung zu homogenisieren. Im nächsten Schritt wurden die Proben nun auf die *High Pure-Filter-*

Säulen aufgetragen, welche zuvor in die mitgelieferten *Collection-Tubes* eingepasst wurden. Durch eine Zentrifugation für 15 sek bei 8000 g wurden die Proben durch den Filter gepresst, sodass die Bindung der Nukleinsäuren an das Glas-Faser-Fleece in den Filtern stattfinden konnte. Der Durchfluss wurde entsorgt, und auf die Filter wurden jeweils 90  $\mu\text{l}$  *DNase-Incubation-Buffer* sowie 10  $\mu\text{l}$  der DNase-I Lösung aufgetragen. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit wurden die Filter mit 500  $\mu\text{l}$  des *Washing-Buffer-I*, welcher nochmals das Guanidiniumchlorid enthielt, und einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15 sek bei 8000g gewaschen. Durch zwei weitere Waschschriffe mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  und 200  $\mu\text{l}$  des *Washing-Buffer-II* und einer Zentrifugation für 2 min bei ca. 13000g sollten alle Reste der *Washing-Buffer* entfernt werden. Abschließend wurden die Filter in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit Hilfe von 50  $\mu\text{l}$  des *Elution-Buffer* und einer letzten Zentrifugation für 1min bei 8000g in RNase freiem Wasser eluiert.

#### 2.2.2.5 Absorptionsspektrometrie zur Bestimmung der RNA-Konzentration

Um die Konzentration der RNA zu bestimmen, wurde eine Absorptionsspektrometrie durchgeführt. Es wurde das Fluorospektrometer *NanoDrop* der Firma Thermo Fisher Scientific benutzt. Hierfür wurde 1  $\mu\text{l}$  der Probe in die Messkammer des Geräts pipettiert. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ). Das Produkt aus der  $A_{260}$  und dem Extinktionskoeffizienten für einzelsträngige DNA und RNA, welcher bei einer Küvettenweite von 10 mm bei 40 liegt, entspricht der Konzentration der RNA in ng/ $\mu\text{l}$ . Da es sich um relativ geringe RNA-Konzentrationen handelte, wurde auf eine vorherige Verdünnung verzichtet. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm ( $A_{280}$ ), sodass über die Bestimmung des Quotienten aus  $A_{260}$  und  $A_{280}$  eine Aussage über die Proteinkontamination getroffen werden konnte. Dabei entspricht ein Wert zwischen 1,7 und 2,0 einer proteinarmen Probe. Entsprechend den Standards unseres Labors, wurde keine RNA mit einem  $A_{260/280} < 1,8$  benutzt.

#### 2.2.2.6 RNA-Integritätsanalyse

Die RNA der murinen Makrophagen wurde in *RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Pathway PCR Arrays* eingesetzt. Um valide Ergebnisse zu gewährleisten und Wiederholungen zu vermeiden, wurde diese vorher einer weiteren Qualitätskontrolle unterzogen. Bei der RNA Integritätskontrolle wird mit Hilfe der *Lab-on-Chip-Technologie* des Agilent 2100



*BioAnalyzers* eine Kapillar-Elektrophorese der Gesamt-RNA durchgeführt. Da die ribosomale RNA (rRNA) mit 85-90% die größte Fraktion darstellt und sich aus einer 18S- und einer 28S-Untereinheit aufbaut, kann das Verhältnis dieser beiden Untereinheiten für die Qualitätskontrolle herangezogen werden. Ein optimales Verhältnis läge bei  $28S/18S=2$ . Bei fortschreitender Degradierung der RNA finden sich vermehrt kleinere Produkte in der Elektrophorese. Um dieses Verfahren weiter zu standardisieren, berechnet die Agilent 2100 *BioAnalyzer* Software eine virtuelle Zahl mit der Bezeichnung *RNA Integrity Number* (RIN). Die RIN liegt zwischen 1 und 10, wobei 10 einer RNA mit sehr hoher Qualität und 1 einer vollständigen Degradierung entspricht. Entsprechend den Anforderungen des benutzten *RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays* wurde keine RNA mit einem RIN < 7 benutzt (siehe Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1: RNA-Konzentration und Integrität der verwendeten Proben**

Sample			ng/ $\mu$ l	RIN
1	A	BMDM ktl	208,3	9,3
2	A	BMDM + lps	185,6	9,0
3	A	BMDM + mcf7	175,4	9,2
4	A	BMDM + mv	208,5	9,2
5	B	BMDM ktl	207,9	8,6
6	B	BMDM + lps	146,2	8,8
7	B	BMDM + mcf7	152,4	8,9
8	B	BMDM + mv	181,2	8,8
9	C	BMDM ktl	107,0	8,1
10	C	BMDM + lps	201,3	9,4
11	C	BMDM + mcf7	156,8	8,8
12	C	BMDM + mv	219,5	9,2
13	D	BMDM ktl	61,5	7,7
14	D	BMDM + lps	139,0	8,9
15	D	BMDM + mcf7	196,3	9,1
16	D	BMDM + mv	191,1	8,6

### 2.2.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist ein Verfahren, um RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Im Unterschied zu genomischer DNA enthält die cDNA somit keine Introns. Da die hitzestabilen Polymerasen, welche in den Polymerase-Kettenreaktionen Anwendung finden, DNA-abhängig sind, ist dieser Schritt notwendig. Hierzu wurden Oligo-(dT)-*Primer* benutzt, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden sowie eine reverse Transkriptase aus dem *Moloney Mouse Leukemia Virus* (M-MLV).

Für die RNA der humanen Makrophagen wurde das *iScript Advanced cDNA Synthesis Kit* (#170-8842, Bio-Rad, München, Deutschland) benutzt. Alle Arbeitsschritte entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Es wurde jeweils 1 µg RNA umgeschrieben. Zu jeder Probe mit 1 µg RNA wurden 4 µl des Reaktion-Puffers und 1 µl der reversen Transkriptase hinzugefügt. Daraufhin wurde die Probe mit DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Im *Thermocycler* durchliefen die Proben folgende Phasen: 1. 5 min bei 25 °C, 2. 30 min bei 42 °C, 3. 5 min bei 85 °C und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C. Schlussendlich wurden die Proben auf 0,01 µg/µl RNA Äquivalent verdünnt und bei -20 °C weggefroren.

Zur Weiterverwendung der RNA der murinen Makrophagen in den Qiagen *PCR Arrays* wurde das *RT<sup>2</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit* (#330401, Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Alle Arbeitsschritte entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Es wurde jeweils 1 µg RNA umgeschrieben. Um Reste der genomischen DNA aus den Proben zu entfernen, wurden zu Beginn der Synthese zu 1 µg RNA 2 µl GE-Puffer hinzugefügt. Die Proben wurden mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt und 5 min bei 42 °C inkubiert. Sodann wurden sie für mindestens 1 min auf Eis gelegt. Für die eigentliche cDNA-Synthese wurde nun ein *Master Mix* angelegt. Dieser enthielt pro zu analysierender Probe 4 µl Puffer BC3, 1 µl Control P2, 2 µl RE3 Reverse Transkriptase Mix und 3 µl RNase freies H<sub>2</sub>O. Davon wurden 10 µl zu jeder Probe pipettiert. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 15 min bei 42 °C und für 5 min bei 95 °C. Zuletzt wurden zu den Proben jeweils 91 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O hinzupipettiert. Bis zur Weiterverarbeitung in den *PCR Arrays* wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

## 2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

### 2.2.4.1 Einführung

Die gewonnene cDNA wurde im weiteren Verlauf in Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzt (*Polymerase Chain Reaction*; PCR). Die PCR ist ein sensitives Verfahren zum Nachweis einer spezifischen Gensequenz in der Ausgangsprobe. Zum Ablauf der Reaktion wurden, neben der cDNA der Ausgangsprobe, eine thermostabile DNA-Polymerase, die Nukleotide Adenin, Guanin, Cytosin und Thyrosin sowie entsprechende *Primer* und ein *Thermocycler* benötigt. Da die eingesetzten DNA-Polymerasen bei Temperaturen bis 95 °C arbeiten müssen, ist eine hohe Thermostabilität essentiell wichtig. Hierzu konnte die heutzutage weitverbreitete Taq-Polymerase aus einem physiologisch in heißen Quellen lebenden Mikroorganismus namens *Thermus aquaticus* isoliert werden. Um der Taq-Polymerase optimale Arbeitsbedingungen zu bieten, wird ein leicht alkalisches und Mg<sup>2+</sup>-reiches Milieu erzeugt. Als *Primer* werden synthetische Oligonukleotide bezeichnet, welche der DNA-Polymerase mit ihrer Hydroxygruppe am 3'-OH-Ende als Angriffspunkt dienen. Sie sind komplementär zu den flankierenden Sequenzen des zu untersuchenden Zielbereichs. Durch den zyklischen Ablauf dreier Teilschritte kann auf diese Weise der zu untersuchende Zielbereich stark vervielfältigt werden.

Im Detail handelt es sich bei den drei Teilschritten, welche im *Thermocycler* ablaufen, um die Denaturierungs-, die *Annealing*- oder Hybridisierungs- und die Elongationsphase. Der *Thermocycler* erhitzt oder kühlt die Proben dabei innerhalb kürzester Zeit auf die gewünschten Temperaturen. Während der Denaturierungsphase werden bei 95 °C die DNA- oder cDNA-Doppelstränge aufgetrennt. In der *Annealing*- oder Hybridisierungsphase binden die *Primer* an die nun einzeln vorliegenden DNA- oder cDNA-Stränge. Die optimale Temperatur dieser Phase hängt maßgeblich von der Sequenz der *Primer* ab und liegt in der Regel zwischen 54 °C und 70 °C. Eine Abschätzung ermöglicht die Wallace-Regel: *Annealing*temperatur  $\approx 4x(G+C)+2x(A+T)$  (Thein et al. 1986). Eine zu hohe Temperatur in dieser Phase würde zu einer ungenügenden, eine zu niedrige zu einer unspezifischen *Primer*bindung führen. Letztendlich beginnen bei 72 °C in der Elongationsphase die DNA-Polymerasen an das 3'-OH-Ende der *Primer* zu binden und von diesem ausgehend einen komplementären Strang zu bilden. Die Länge dieser Phase ist abhängig von der Anzahl der Basenpaare des gewünschten Produkts. Man geht von ungefähr 1 min für 1000 Basenpaare aus. Typischerweise laufen diese drei Phasen

bis zu 45 mal ab. In der fertigen Probe kann nun zum Beispiel mit Hilfe der Gelelektrophorese das gewünschte Produkt indirekt nachgewiesen werden.

### 2.2.4.2 Primer-Erstellung

Bei der Erstellung neuer *Primer* wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

1. Es wurde darauf geachtet, dass das Produkt möglichst spezifisch war. Das heißt, dass es nur ein Genprodukt gab.
2. Die Länge des Produkts sollte nicht über 250 Basenpaaren liegen.
3. Die *Annealing*temperatur sollte ungefähr 60 °C betragen. Auch sollte die Differenz der *Annealing*temperaturen der *Sense*- und *Antisense-Primer* nicht über 2 °C liegen.
4. Da in unserem Fall ausschließlich cDNA verwendet wurde, wurden bevorzugt *Primer* erstellt, welche ein Intron der Gensequenz einschlossen. Auf Grund der Tatsache, dass cDNA keine Introns enthält, konnte auf diese Weise verhindert werden, dass Reste der genomischen DNA falsch positive Ergebnisse lieferten.

**Tabelle 2.2: humane *Primer***

<i>Gen</i>		<i>Sequenz</i>	<i>Amplicon</i>	<i>Quelle</i>	<i>AT</i>
<b><i>CXCR4</i></b>	sense	CCTATGCAAGGCAGTCCATGT	86 Bp	RTPrimerDB ID: 597	60 °C
	antisense	GGTAGCGGTCCAGACTGATGA			
<b><i>DKK2</i></b>	sense	TCG AAA CCA CGG TCA TTA CT	119 Bp	Arbeitsgruppen intern	60 °C
	antisense	CAG TCT GAT GAT CGT AGG CA			
<b><i>GNB2I1</i></b>	sense	GAGTGTGGCCTTCTCTCTG	224 Bp	Eur Respir J. 2006 Feb; 27(2): S. 300-6	60 °C
	antisense	GCTTGCAAGTCCAGGTTTC			
<b><i>HPRT1</i></b>	sense	TGACACTGGCAAAACAATGCA	93 Bp	GenomeBiology 2002; 3(7): S. 1-12	60 °C
	antisense	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT			
<b><i>iNOS</i></b>	sense	TGGTGCTGTATTTCTTACGAGGCGAAGAAGG	258 Bp	Arbeitsgruppen intern	60 °C
	antisense	GGTGCTACTTGTAGGAGGTCAAGTAAAGGGC			
<b><i>TCF7I2</i></b>	sense	TCTAACAAAGTGCCAGTGGT	187 Bp	Arbeitsgruppen intern	60 °C
	antisense	GCGATAGTGGGTAATACGGG			
<b><i>TNF<math>\alpha</math></i></b>	sense	GCCCAGGCAGTCAGATCATCTTC	181 Bp	RTPrimerDB ID: 2706	60 °C
	antisense	TGAGGTACAGGCCCTCTGATGG			
<b><i>VEGF<math>\alpha</math></i></b>	sense	CTGAGGAGTCCAACATCAC	125 Bp	Arbeitsgruppen intern	60 °C
	antisense	GTCTTGCTCTATCTTTCTTTGG			
<b><i>WNT5a</i></b>	sense	AGGGCTCTACGAGAGTGCT	109 Bp	Cancer Cell 2002 Apr; 1(3): S. 279-88	60 °C
	antisense	GACACCCCATGGCACTTG			

Zur Gegenprüfung der Komplementarität der *Primer* sowie der Länge des Amplicons wurde die öffentliche Datenbank *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) bemüht. Die Synthesierung wurde nach unseren Vorgaben durch die Firma IBA (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Tabelle 2.2 zeigt eine Liste der verwendeten humanen *Primer*.

### 2.2.4.3 Qualitative PCR

Um selbst erstellte *Primer* auszutesten und zu optimieren und um Proben auf Mycoplasmen zu untersuchen wurden qualitative PCRs mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurden die Substrate der Hersteller Roche (*PCR Buffer Set*, *FastStart Taq-Polymerase*) sowie Invitrogen (dNTPs; Desoxynukleotidtriphosphate) benutzt.

#### **Primer-Testung und -Optimierung**

Zuerst wurde an der PCR-Werkbank ein *Master Mix* angelegt. Pro Probe wurden 2,5 µl 10x PCR Buffer, 2,5 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl dNTP Mix, 0,25 µl Taq-Polymerase, 16,8 µl H<sub>2</sub>O sowie je 1 µl des *Sense-* und *Antisense-Primers* angesetzt. Jeweils 24,5 µl des *Master Mix* wurden in ein dünnwandiges PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurden 0,5 µl der entsprechenden cDNA (0,01 µg/µl RNA Äquivalent) zu den Proben hinzugefügt. Die PCR-Reaktionsgefäße wurden sodann kurz gevortext, zentrifugiert und in dem *Thermocycler* platziert. Folgendes Programm wurde benutzt:

1. Initial Denaturierung bei 94 °C für 3 min
2. Denaturierungsphase bei 94 °C für 15 sek
3. Hybridisierungsphase bei 58 °C für 30 sek
4. Elongationsphase bei 72 °C für 2 min
5. Abschließende Elongationsphase bei 72 °C für 5 min

Die Phasen 2 - 4 wurden 45 mal wiederholt. Zur Beurteilung der Amplifikate wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt.

#### 2.2.4.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde zur Detektion und Auftrennung der PCR-Amplifikate verwendet. Hierbei wandern die mit Ethidiumbromid gekennzeichneten Nukleinsäuren je nach ihrer Größe durch das Gitternetz des Agarosegels entlang einer angelegten Spannung hin zur Anode. Es wurden 3%ige Agarosegele benutzt. Zur Identifikation der Größe lief stets eine 100 bp-DNA Leiter mit. Zur Herstellung der Gele wurden Laufgitter für 50 ml verwendet. Je nachdem wie viele Proben zu untersuchen waren, konnten durch unterschiedliche Kämme bis zu zwölf Taschen geformt werden. Für das Agarosegel selbst wurden 50 ml 1x Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure(TAE)-Puffer für 10 min in den Kühlschrank gestellt. Dann wurden 2,5 mg Agarose *HEEO Ultra-Quality* Pulver für ein 3%iges Gel abgewogen und in dem gekühlten TAE-Puffer gelöst. Daraufhin wurde das Agarosegel vorsichtig bei 350 W in einem Mikrowellenherd erwärmt. Zwischendurch wurde es aus dem Mikrowellenherd genommen und vorsichtig geschwenkt um ein gleichmäßiges Gel zu erhalten. Um letzte Blasen zu entfernen, wurde es am Ende mehrmals kurz aufgekocht. Während der Abkühlphase wurden 50 µl einer 1:1000 Ethidiumbromidlösung zum Gel gemischt. Im Laufgitter brauchte das Agarosegel etwa 30 min zum fest werden. Parallel wurden je 5 µl der zu analysierenden Proben mit je 5 µl des 6x Proben-Puffers (Fermentas, Bremen, Deutschland) versetzt. Ebenfalls wurde 1 µl der DNA Leiter *GeneRuler 100bp DNA Ladder* (#SM0241, Fermentas, Bremen, Deutschland) mit 1,6 µl 6x Probe-Puffer und 7,4 µl H<sub>2</sub>O angesetzt. Der Kamm wurde aus dem festen Gel entfernt. Das Gel im Laufgitter wurde in die Elektrophorese Kammer gelegt und mit 1x TAE-Puffer benetzt. Jeweils 10 µl der angesetzten Proben wurden in die entsprechenden Taschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V über 45 min. Nach dem Lauf wurde das Agarosegel auf einen UV-Transilluminator gelegt und mit Licht mit einer Wellenlänge von 302 nm bestrahlt. Die nun sichtbaren Banden wurden mit Hilfe einer *Charge-coupled device* (CCD)-Kamera aufgenommen. Die Geräte wurden am Ende gesäubert und das ethidiumbromidhaltige Agarosegel in einem speziellen Abfall entsorgt.

#### 2.2.4.5 Quantitative PCR

Diese Methode ermöglicht es, die Menge an cDNA abzuschätzen, welche in der Ausgangsprobe vorhanden war. Vor allem Unterschiede zwischen cDNA aus verschiedenen behandelten Zellen können somit gut sichtbar gemacht werden. Heutzutage hat sich die Echtzeit quantitative PCR (*Real-Time* PCR) auf Grund der weitaus höheren Genauigkeit im Vergleich zB zur kompetitiven PCR durchgesetzt. Hierbei wird ein fluoreszie-

render Farbstoff verwendet, welcher nach jedem Zyklus gemessen werden kann. In unseren Experimenten wurde der Cyanin-Farbstoff SYBR *Green* I verwendet. Dieser interkaliert mit doppelsträngiger DNA, bildet einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex und emittiert nach Anregung grünes Licht der Wellenlänge  $\lambda_{\max} = 521$  nm. Dieses wird von einem *Light-Cycler* nach jedem Zyklus gemessen und ist direkt proportional zur amplifizierten DNA-Menge. In unseren Experimenten wurde der ABI Prism 7900ht (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA) benutzt. Als Schnittstelle diente die SDS-Software in den Versionen 2.1 - 2.4 von *Applied Biosystems*. Da die Ausgangsfluoreszenz des SYBR *Green* I von der Optik des *Light-Cyclers* nicht detektiert werden kann, war der Farbstoff ROX notwendig um das Gerät am Beginn der Methode zu kalibrieren.

### **Real-Time PCR aus humanen Makrophagen**

Die Genexpressionsanalysen der humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen fanden mit dem *SYBR Advantage qPCR Premix* (# 639676, Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) statt. Alle Arbeitsschritte entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Es wurde die Expression von folgenden Genen untersucht: *CXCR4*, *DKK2*, *iNOS*, *TCF7I2*, *TNF $\alpha$* , *VEGF $\alpha$* , *WNT5a*. Um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen wurde das *Housekeeping*-Gen *GNB2I1* benutzt. *Housekeeping*-Gene sind in der Zelle nicht regulierte Gene. Typischerweise handelt es sich um Gene, die für Strukturproteine oder Proteine des Grundstoffwechsels kodieren. Zusätzlich wurden Positivkontrollen mit cDNA aus humaner Plazenta, Hirn und einer Kolon-Karzinom Zellreihe (hct116) durchgeführt. Im Sinne von Negativkontrollen wurde in einigen Näpfen kein *Primer* bzw keine cDNA verwendet. Neben den Positivkontrollen für die eingesetzten *Primer*, wurde auch eine Stimulierung der Makrophagen mit LPS durchgeführt, als Kontrolle der Plastizität der humanen Makrophagen selbst.

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Anfertigung des *Master Mix* ohne cDNA fand an einem speziellen PCR-Arbeitsplatz statt. Initial wurden 25  $\mu$ l der ROX (LSP)-Lösung zu 625  $\mu$ l SYBR *Green* I Lösung pipettiert. Sodann wurde der *Master Mix* nach folgendem Schema angesetzt:

**Tabelle 2.3: Master Mix für Real-Time PCR ohne cDNA**

Reagenz	Konzentration	Volumen/ Template+1
iTag SYBR + ROX MM	2x	15 $\mu$ l
Primer sense	0,01 nmol/ $\mu$ l	0,6 $\mu$ l
Primer antisense	0,01 nmol/ $\mu$ l	0,6 $\mu$ l
Nukleasen freies H <sub>2</sub> O		10,8 $\mu$ l
Gesamtvolumen		27 $\mu$ l

Dabei wurde pro zu untersuchendem Gen ein *Master Mix* pipettiert und ein angemessener Pipettierfehler berücksichtigt. Da in jeder *Real-Time* PCR eine Kontrolle ohne cDNA und eine Kontrolle ohne *Primer* mitlief, wurde ein *Master Mix* ohne *Primer* und mit entsprechend mehr Nuklease freiem H<sub>2</sub>O angesetzt. Ebenfalls wurde die Endmenge eines jeden *Master Mix* entsprechend einer zusätzlichen Probe ohne cDNA angesetzt. Nun wurden 0,5 ml Reaktionsgefäße vorbereitet, beschriftet und mit 30  $\mu$ l des entsprechenden *Master Mix* bestückt. Das benutzen von verschiedenen angefärbten Reaktionsgefäßen erleichterte die Orientierung und verhinderte Pipettierfehler. Außerhalb des PCR-Arbeitsplatzes wurden 3  $\mu$ l der cDNA mit einer Konzentration von 0,01  $\mu$ g/ $\mu$ l RNA-Äquivalent zu jedem Reaktionsgefäß hinzugefügt. Das Bestücken der 384-Napf-Platte fand in technischen Replikaten zu jeweils drei Nöpfen statt (siehe Abbildung 2.4). Pro Napf wurden 10  $\mu$ l *Master Mix* + cDNA benutzt. Vor dem Bestücken der Platte wurde diese mit Alufolie bedeckt um die Orientierung beim Pipettieren zu erleichtern sowie Querkontaminationen zu vermeiden und auf Eis gestellt. Nach dem Bestücken wurde sie mit *Heat Seal*-Folie beklebt und kurz bei 1000g zentrifugiert. So konnten Bläschen am Boden der Nöpfe eliminiert werden. Im *Light-Cycler* wurden folgende Phasen durchlaufen:

1. Initiale Denaturierungsphase 10 sek bei 95 °C

2. 45 Zyklen:

2.1 Denaturierungsphase 5 sek bei 95 °C

2.2 Hybridisierungsphase 15 sek bei 60 °C

2.3 Extensionsphase 30 sek bei 72 °C

3. Bestimmung der Dissoziationskurven

Die fertigen Platten wurden beschriftet bei -20 °C gelagert. Die Auswertung der Ergebnisse fand mit der *SDS-Software* sowie mit Excel-Kalkulationstabellen statt.



Abbildung 2.4: Ausschnitt Bestückung der 384-Napf-Platte

		0h mac ktl			32h mac ktl			32h mac+ips			32h mac+mcf7			32h mac+mcf7+ips			nt			pos. Kontrolle		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
wnt5a	A	wnt5a _1	wnt5a _1	wnt5a _1	wnt5a _2	wnt5a _2	wnt5a _2	wnt5a _3	wnt5a _3	wnt5a _3	wnt5a _4	wnt5a _4	wnt5a _4	wnt5a _5	wnt5a _5	wnt5a _5	wnt5a _nt	wnt5a _nt	wnt5a _nt	wnt5a _pos _ctl	wnt5a _pos _ctl	wnt5a _pos _ctl
dkk2	B	dkk2 _1	dkk2 _1	dkk2 _1	dkk2 _2	dkk2 _2	dkk2 _2	dkk2 _3	dkk2 _3	dkk2 _3	dkk2 _4	dkk2 _4	dkk2 _4	dkk2 _5	dkk2 _5	dkk2 _5	dkk2 _nt	dkk2 _nt	dkk2 _nt	dkk2 _pos _ctl	dkk2 _pos _ctl	dkk2 _pos _ctl
cxcr4	C	cxcr4 _1	cxcr4 _1	cxcr4 _1	cxcr4 _2	cxcr4 _2	cxcr4 _2	cxcr4 _3	cxcr4 _3	cxcr4 _3	cxcr4 _4	cxcr4 _4	cxcr4 _4	cxcr4 _5	cxcr4 _5	cxcr4 _5	cxcr4 _nt	cxcr4 _nt	cxcr4 _nt	cxcr4 _pos _ctl	cxcr4 _pos _ctl	cxcr4 _pos _ctl
tnfsf2	D	tnfsf2 _1	tnfsf2 _1	tnfsf2 _1	tnfsf2 _2	tnfsf2 _2	tnfsf2 _2	tnfsf2 _3	tnfsf2 _3	tnfsf2 _3	tnfsf2 _4	tnfsf2 _4	tnfsf2 _4	tnfsf2 _5	tnfsf2 _5	tnfsf2 _5	tnfsf2 _nt	tnfsf2 _nt	tnfsf2 _nt	tnfsf2 _pos _ctl	tnfsf2 _pos _ctl	tnfsf2 _pos _ctl
iNOS	E	iNOS _1	iNOS _1	iNOS _1	iNOS _2	iNOS _2	iNOS _2	iNOS _3	iNOS _3	iNOS _3	iNOS _4	iNOS _4	iNOS _4	iNOS _5	iNOS _5	iNOS _5	iNOS _nt	iNOS _nt	iNOS _nt	iNOS _pos _ctl	iNOS _pos _ctl	iNOS _pos _ctl
vegfa	F	vegfa _1	vegfa _1	vegfa _1	vegfa _2	vegfa _2	vegfa _2	vegfa _3	vegfa _3	vegfa _3	vegfa _4	vegfa _4	vegfa _4	vegfa _5	vegfa _5	vegfa _5	vegfa _nt	vegfa _nt	vegfa _nt	vegfa _pos _ctl	vegfa _pos _ctl	vegfa _pos _ctl
tcf712	G	tcf712 _1	tcf712 _1	tcf712 _1	tcf712 _2	tcf712 _2	tcf712 _2	tcf712 _3	tcf712 _3	tcf712 _3	tcf712 _4	tcf712 _4	tcf712 _4	tcf712 _5	tcf712 _5	tcf712 _5	tcf712 _nt	tcf712 _nt	tcf712 _nt	tcf712 _pos _ctl	tcf712 _pos _ctl	tcf712 _pos _ctl
gnb211	H	gnb211 _1	gnb211 _1	gnb211 _1	gnb211 _2	gnb211 _2	gnb211 _2	gnb211 _3	gnb211 _3	gnb211 _3	gnb211 _4	gnb211 _4	gnb211 _4	gnb211 _5	gnb211 _5	gnb211 _5	gnb211 _nt	gnb211 _nt	gnb211 _nt			
np	I	np_1	np_1	np_1	np_2	np_2	np_2	np_3	np_3	np_3	np_4	np_4	np_4	np_5	np_5	np_5						
	J																					

Die Abbildung zeigt exemplarisch die Bestückung der 384-Napf-Platte in technischen Dreierreplikaten der zu untersuchenden Gene mit Positiv- und Negativkontrollen sowie dem *Housekeeping*-Gen.

### Qiagen PCR Arrays

In den murinen Makrophagen wurde mit Hilfe des *RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Arrays* (# PAMM-043Z, Qiagen, Hilden, Deutschland) ein Expressionsmuster wichtiger Gene des WNT-Signalwegs erstellt. Es wurden 384-Napf-PCR Platten pipettiert, welche 84 Gene, fünf *Housekeeping* Gene sowie diverse Kontrollen in vierer Replikaten enthielten. Die Tabelle 2.4 zeigt eine Liste der Gene, die untersucht wurden. Die RNA der murinen Makrophagen wurde, wie im Protokoll der Firma Qiagen dargestellt, mittels des *RT<sup>2</sup> First Strand cDNA Kits* umgeschrieben. Für die *Real-Time PCR* wurde der *RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR Mastermix* (#330521, Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Zuerst wurde pro zu untersuchender cDNA Probe ein *Master Mix* vorbereitet. Hierzu wurden zu 102 µl der cDNA Probe, 650 µl 2x*RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX Mastermix* und 548 µl RNase freies Wasser hinzugefügt. Um Querkontaminationen zu vermeiden und das Pipettieren zu vereinfachen wurden die 384-Napf-Platten vor dem Bestücken mit Alufolie überzogen. Daraufhin konnten zur weiteren Vereinfachung des Pipettiervorgangs die mitgelieferten Schablonen auf die PCR-Platten gestülpt werden, sodass immer nur ein Napf der vier Replikate frei war. Das Bestücken der Platte geschah auf Eis. Da eine 8-Napf-Pipette benutzt wurde, wurden je 150 µl des *Master Mix* in einen Napf einer Spalte einer 96-Napf-Platte vorgelegt. Nach jedem Schritt wurden die Pipetten gewechselt. Nachdem die Platte fertig bestückt war, wurde sie mit der mitgelieferten transparenten *Heat Seal*-Folie bedeckt und bei 1000g 2 min zentrifugiert um letzte Bläschen am Boden der Nöpfe zu entfernen.

**Tabelle 2.4: Genliste des  $RT^2$  Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Arrays**

Nr.	Gen	Nr.	Gen	Nr.	Gen	Nr.	Gen	Nr.	Gen	Nr.	Gen
1	Aes	15	Ctnnb1	29	Frzb	43	Lrp5	57	Sfrp2	71	Wnt16
2	Apc	16	Daam1	30	Fshb	44	Lrp6	58	Sfrp4	72	Wnt2
3	Axin1	17	Dixdc1	31	Fzd1	45	Myc	59	Slc9a3r1	73	Wnt2b
4	Bcl9	18	Dkk1	32	Fzd2	46	Nkd1	60	Sox17	74	Wnt3
5	Btrc	19	Dvl1	33	Fzd3	47	Nlk	61	T	75	Wnt3a
6	Ctnnbip1	20	Dvl2	34	Fzd4	48	Pitx2	62	Tcf7l1	76	Wnt4
7	Ccnd1	21	Ep300	35	Fzd5	49	Porcn	63	Tcf7	77	Wnt5a
8	Ccnd2	22	Fbxw11	36	Fzd6	50	Ppp2ca	64	Tle1	78	Wnt5b
9	Ccnd3	23	Fbxw2	37	Fzd7	51	Ppp2r1a	65	Tle2	79	Wnt6
10	Csnk1a1	24	Fbxw4	38	Fzd8	52	Ppp2r5d	66	Wif1	80	Wnt7a
11	Csnk1d	25	Fgf4	39	Gsk3b	53	Pygo1	67	Wisp1	81	Wnt7b
12	Csnk2a1	26	Fosl1	40	Jun	54	Rhou	68	Wnt1	82	Wnt8a
13	Ctbp1	27	Foxn1	41	Kremen1	55	Senp2	69	Wnt10a	83	Wnt8b
14	Ctbp2	28	Frat1	42	Lef1	56	Sfrp1	70	Wnt11	84	Wnt9a

Im *Light Cycler* ABI Prism 7900ht wurden folgende Phasen durchlaufen:

1. Initiale Denaturierungsphase sowie Aktivierung der *HotStart* Taq-Polymerase für 10 min bei 95 °C.
2. 40 Zyklen:
  - 2.1 Denaturierungsphase für 15 sek bei 95 °C
  - 2.2 Hybridisierungsphase für 1 min bei 60 °C
3. Bestimmung der Dissoziationskurven

Die fertigen Platten wurden beschriftet bei -20 °C gelagert. Die Auswertung der Ergebnisse fand mit der SDS-Software sowie mit Excel-Kalkulationstabellen statt.

### **Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Quantitativen PCRs erfolgte mittels der  $\Delta\Delta C_t$  Methode und dem t-Test. Als *cycle threshold* ( $C_t$ ) wird der Zyklus bezeichnet, bei dem die Fluoreszenz eines Amplifikats während einer *Real-Time* PCR über die Hintergrundfluoreszenz steigt und ein exponentielles Wachstum beginnt. Je mehr zu untersuchende DNA in der Ausgangs-Probe vorhanden ist, umso früher wird dies geschehen. Also beschreibt ein niedriger  $C_t$ -Wert eine große Menge der entsprechenden DNA in der Ausgangsprobe. Bei der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode wird nun zuerst das  $\Delta C_t$  aus der Differenz zwischen dem  $C_t$ -Wert des zu untersuchenden Gens und dem des *Housekeeping*-Gens errech-

net. Da dieses in der Zelle keiner Regulation unterworfen ist, erreicht man somit eine Normalisierung seiner Ziel-Gene. Das  $\Delta\Delta Ct$  entspricht der Differenz zwischen der Kontrollbedingung und der behandelten Bedingung eines Gens. Es gibt wider ob und inwieweit das Gen durch die Behandlung einer Regulation unterliegt. Eine einfachere Darstellung dieses Sachverhalts erhält man durch den *Fold Change* der durch die Gleichung  $Fc = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  errechnet wird. Ein *Fold Change* von 1 bezeichnet keine Veränderung zum Kontrollwert, ein Wert von 2 spiegelt eine Verdopplung wider und ein Wert von 0,5 eine Halbierung. Das Signifikanzniveau wurde auf einen Wert von  $\alpha=5\%$  ( $p<0,05$ ) festgelegt. Der p-Wert wurde mit Hilfe des *Student's t-Tests* und der Microsoft Excel-Kalkulationssoftware berechnet.

## 2.2.5 Proteinanalytik

### 2.2.5.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Bei der Proteinbestimmung nach Lowry handelt es sich um ein kolorimetrisches Verfahren. In einem ersten Schritt bilden sich im Rahmen einer Biuretreaktion in alkalischem Milieu Komplexe aus Peptidbindungen und zweiwertigen Kupfer-Ionen. Daraufhin werden die zweiwertigen Kupfer-Ionen zu einwertigen reduziert, welche ihrerseits das gelbe Folin-Ciocalteau-Reagenz zu Molybdänblau reduzieren (Lowry et al. 1951).

Es wurde das *D<sub>C</sub> Protein Assay Kit II* (#500-0112, Bio-Rad, München, Deutschland) benutzt. Alle Arbeitsschritte entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Initial wurde eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500  $\mu\text{g/ml}$ ) angesetzt. 10  $\mu\text{l}$  wurden jeweils in einen beschrifteten 1,5 ml-Cup überführt. Von den zu analysierenden Proben wurden unter einer sterilen Werkbank je 2  $\mu\text{l}$  in ein 1,5 ml-Cup pipettiert und mit 8  $\mu\text{l}$  MilliQ H<sub>2</sub>O verdünnt. Zu jeder Probe wurden 400  $\mu\text{l}$  der Lösung B sowie 50  $\mu\text{l}$  der Lösung A' zugesetzt. Die Lösung A' wurde zuvor mit 49  $\mu\text{l}$  Lösung A und 1  $\mu\text{l}$  Lösung S je Probe angesetzt. Aus jedem 1,5 ml Cup wurden sodann 2x 150  $\mu\text{l}$  in eine 96-Napf-Platte als Doppelbestimmung pipettiert. Nach einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde photometrisch die Extinktion bei 700 nm mit Hilfe des *Tecan Sunrise<sup>TM</sup> microplate reader* (Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz) gemessen. Durch Auftragen der optischen Dichte gegen die BSA-Konzentration der Verdünnungsreihe konnte eine Eichgerade mit der Form  $y=mx+t$  angegeben werden. Die Konzentration der zu analysierenden Proben konnte somit durch  $x=(y-t)/m$  errechnet werden.

### 2.2.5.2 Bestimmung des Makrophagen-Phänotyps mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Freundlicherweise wurde der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) auf Grund eines gut etablierten Protokolls durch eine Arbeitsgruppe der Abteilung für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Bei dem ELISA handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Dabei steigt die Intensität der Farbe mit der Konzentration des zu bestimmenden Antigens, sodass der ELISA auch zu quantitativen Nachweisen verwendet werden kann. In dieser Arbeit wurde ein *Panel* an Antikörpern zur Detektion eines M1- oder M2-Phänotypen der murinen Makrophagen verwendet. Eingesetzt wurde dabei der Überstand der murinen Makrophagen alleine, nach Stimulierung mit LPS, nach Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen und nach Stimulierung mit MCF-7-TMVs. Untersucht wurde die Expression von  $Tnf\alpha$ ,  $Il-6$ ,  $Il-10$ ,  $Il-12$ , RANTES,  $Mcp-1$ ,  $Mip-1\alpha$  und  $Mip-1\beta$ .

### 2.2.5.3 Immunfluoreszenzfärbung gegen $TNF\alpha$ in humanen Makrophagen

Auch bei der Immunfluoreszenzfärbung handelt es sich um ein antikörperbasiertes Verfahren mit anschließender Farbreaktion. Im Gegensatz zum ELISA befindet sich das Antigen bei der Immunfluoreszenzfärbung aber noch in oder an der intakten Zelle bzw. im Zellverbund. Dadurch ist eine Aussage über die Lokalisation des Antigens in der Zelle möglich. Somit erhält man durch die Immunfluoreszenzfärbung auch eine Aussage über funktionelle Aspekte.

Zu Beginn wurden vorbereitend 6-Napf-Platten mit sterilen 12mm Deckgläschen bestückt. Auf diesen wurden humane Makrophagen ausgesät. Die Zellen wurden nach Aspiration des Nährmediums mit PBS gewaschen und anschließend für 20 min mit 37 °C warmen 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach Entfernung des PFA wurden die Zellmembranen durch 10-minütige Inkubation in warmer TritonX-Lösung aufgeschlossen. Weitere Waschschrte schlossen sich an. Die Deckgläschen wurden daraufhin invertiert und mit dem fixierten Zellrasen nach unten in einen 40  $\mu$ l-Tropfen der primären Antikörperlösung (anti- $Tnf\alpha$ , Maus-IgG, R&D-Systems) gelegt und so über Nacht inkubiert. Nach gründlichem Auswaschen der primären Antikörperlösung wurden die Deckgläschen unter lichtreduzierten Bedingungen für 1 h in der sekundären Antikörperlösung (Fluoresceinisothiocyanat konjugierter Maus IgG-Antikörper, Molecular Probes) inkubiert, welche bereits mit dem Färbesubstrat Fluoresceinisothiocyanat (FITC) versetzt war. Anschließend erfolgten - nach erneuten Waschschrten - die Kerngegenfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur sowie

die Einbettung der Deckgläschen auf Objektträgern mit dem Eindeckmedium Mowiol. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland). Zur Dokumentation benutzten wir die CCD-Kamera AxioCam MRM (Zeiss). Bearbeitung und Speicherung geschahen mit Hilfe der Software Axiovision Version 3.1 (Zeiss).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Versuche mit humanen Makrophagen

Nach Ko-Kultivierung der humanen Makrophagen mit MCF-7-Zellen und Stimulierung mit LPS, wie im Methoden-Teil beschrieben, erfolgten die RNA-Isolation nach 2 h (n=3), 20 h (n=3), 32 h (n=3) und 96 h (n=2) und das Umschreiben dieser in cDNA mittels der reversen Transkriptase. Die so gewonnene cDNA wurde dann mit Hilfe der *Real-Time* PCR weiteruntersucht. Um sicherzustellen, dass eine Aktivierung des WNT-Signalwegs vorhanden war, wurde als Positivkontrolle erneut die Expression des *WNT5a* gemessen. Hier ist eine Überexpression nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen bereits beschrieben (Pukrop et al. 2006; Menck et al. 2013). Die LPS-Stimulierung erfolgte zur Erzeugung eines inflammatorischen M1-Phänotypen als Kontrolle. Die zu untersuchenden Gene waren *CXCR4*, *DKK2*, *iNOS*, *TCF712*, *TNF $\alpha$*  und *VEGF $\alpha$*  und wurden in der Einleitung bereits näher erläutert. Die eingesetzten *Primer* mit Sequenzen und Fragmentlängen der Amplicons sind in der Tabelle 2.2 angegeben.

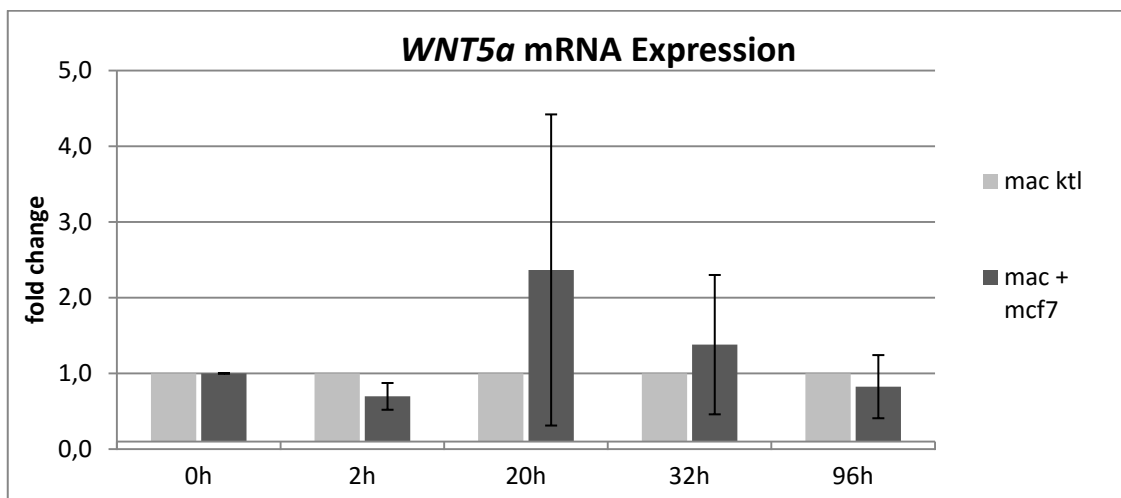
Zusammenfassend konnte in den humanen Makrophagen keine signifikante Regulation der zu untersuchenden Gene nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen festgestellt werden. Da sich lediglich ein Trend zur Überexpression von *WNT5a* darstellte, ohne jedoch die Signifikanz-Grenze zu erreichen, muss davon ausgegangen werden, dass es zu keiner wesentlichen Aktivierung des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs kam. Im Gegensatz dazu konnten Gene entsprechend einem proinflammatorischen Phänotyp, nach Stimulierung mit LPS induziert werden.

#### 3.1.1 Genexpressionsuntersuchung von *WNT5a* mRNA nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen

Als Indikator für eine Aktivierung des WNT-Signalwegs wurde die *WNT5a* mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen untersucht. *WNT5a* diente somit primär als Positivkontrolle. Letztendlich zeigte sich zwar ein Anstieg der Expression von *WNT5a* mRNA auf das 2,4fache im Vergleich zu den unbehandelten Makrophagen nach 20 h, jedoch konnte das Signifikanzniveau nicht erreicht werden (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.1). Eine wesentliche Aktivierung des non-kanonischen WNT-Signalwegs erscheint somit unwahrscheinlich. Zu beachten ist je-

doch, dass die Standardabweichung insbesondere betreffend den 20 h Wert sehr groß ist. Dies ist auch aus der Abbildung 3.1 ersichtlich.

**Abbildung 3.1: *WNT5a* mRNA-Expression in humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen**



Aufgetragen ist die Expression der *WNT5a* mRNA nach 2 h (n=3), 20 h (n=3), 32 h (n=3) und 96 h (n=2) gegen den Fold Change im Vergleich zu einer Makrophagen-Kontrolle (mac ktl). Untersucht wurde diese Expression in humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7 (mac+mcf7). Es zeigt sich zwar eine Induktion der *WNT5a* mRNA nach Ko-Kultur nach 20 h und 32 h, jedoch ist diese nicht signifikant (20 h: p=0,73; 32 h: p=0,90).

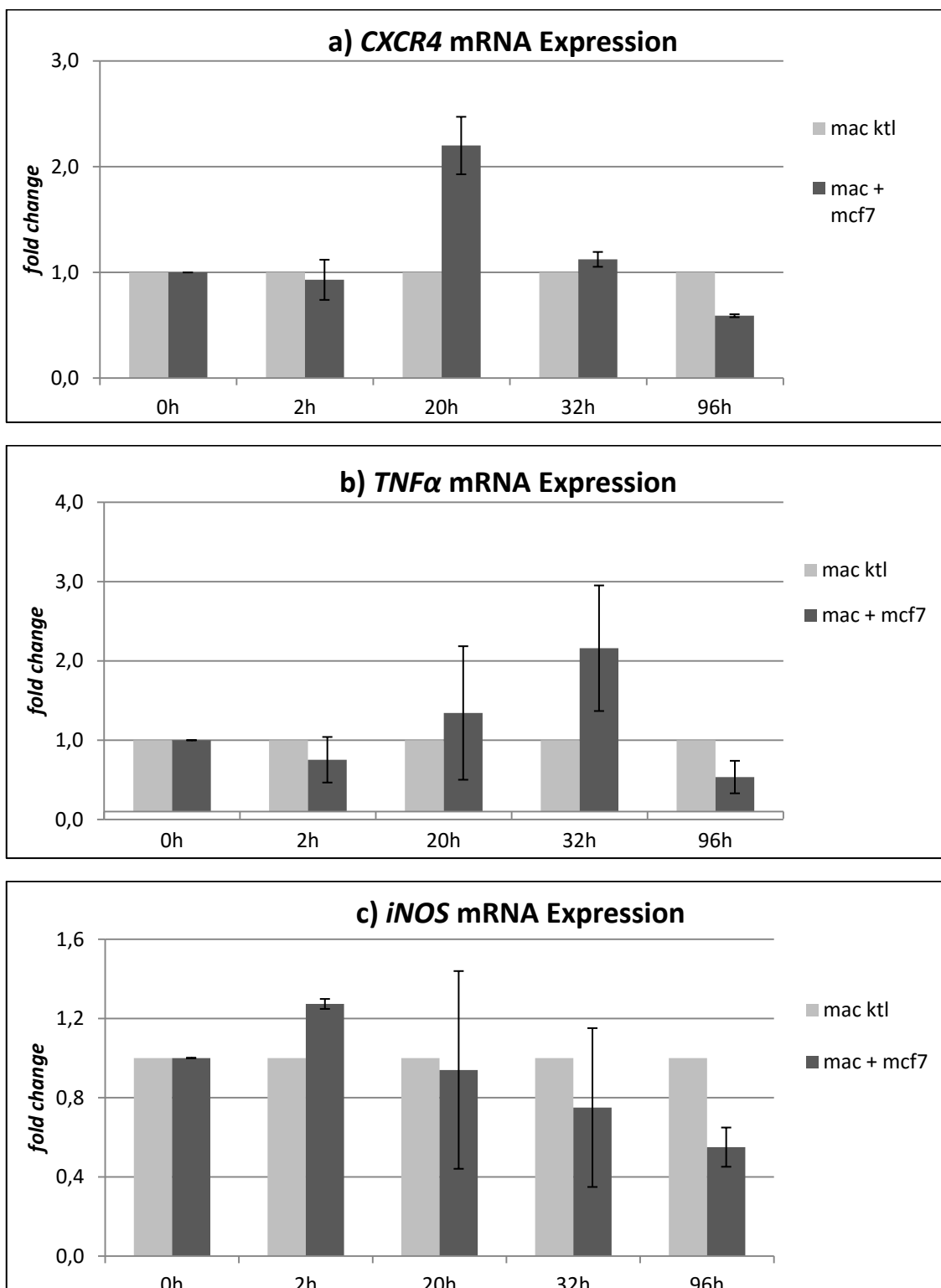
### 3.1.2 Genexpressionsanalysen der weiteren untersuchten Komponenten des WNT-Signalwegs

Um weitere WNT-abhängige Gene in humanen Makrophagen zu identifizieren, welche durch eine Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen reguliert werden, wurde ein Kanon von zu untersuchenden Genen erstellt. Zu diesen gehörten *CXCR4*, *DKK2*, *iNOS*, *TCF712*, *TNF $\alpha$*  und *VEGF $\alpha$* . Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen als *Fold Change* zu einer unbehandelten Makrophagen-Kontrolle dargestellt und zwar jeweils nach 2 h (n=3), 20 h (n=3), 32 h (n=3) und 96 h (n=2). Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=0,05$  gesetzt. Zur genaueren Berechnung der statistischen Signifikanz wurden im T-Test direkt die  $\Delta$ Ct-Werte (*cycle threshold*) aus den RT-PCR Untersuchungen verwendet. Die Tabelle 3.1 gibt einen Überblick der p-Werte aufgeteilt nach untersuchtem Gen und Bedingung.

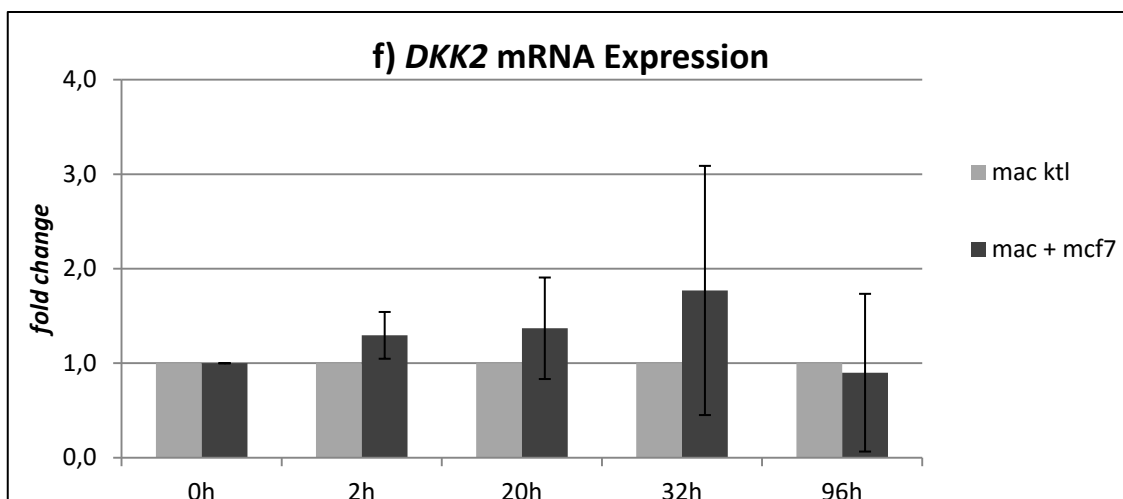
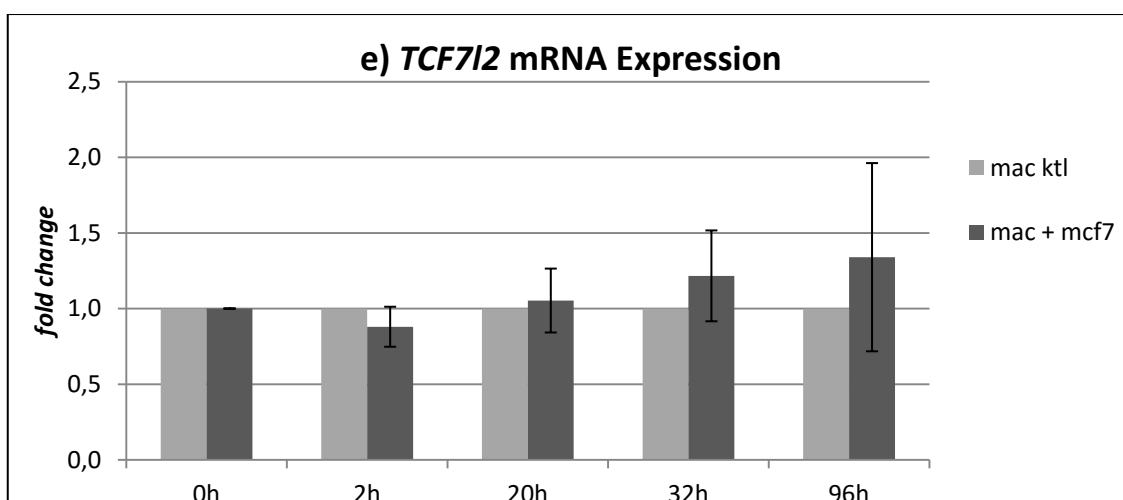
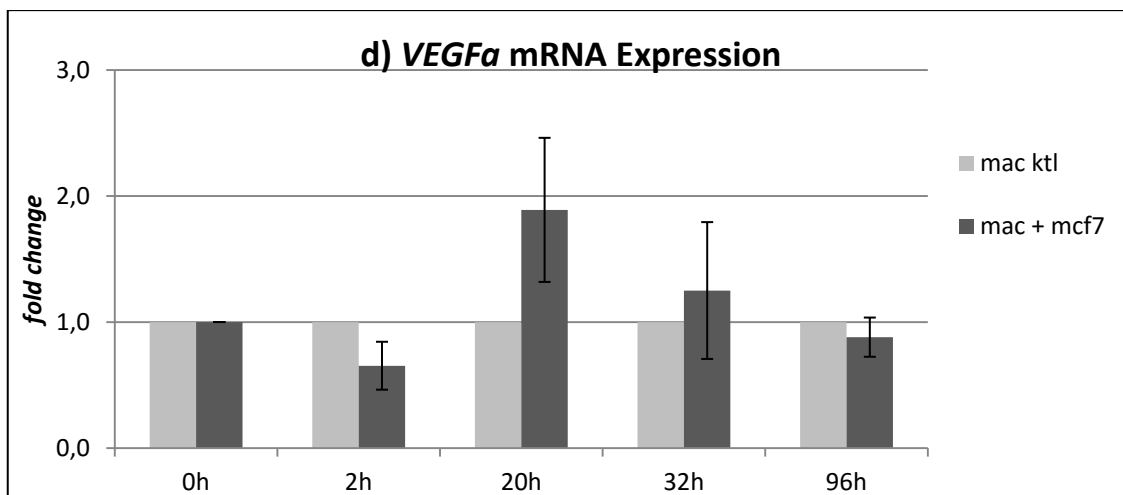
In der Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen zeigte sich letztendlich keine signifikante Regulation der eben genannten untersuchten Gene (Abbildung 3.2a-f). Eine Aussage über die Be-

deutung der untersuchten Komponenten im WNT-Signalweg ist letztlich nicht möglich, da eine wesentliche Aktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs nicht nachgewiesen werden konnte.

**Abbildung 3.2 a-f:** Expressionsanalyse der mRNA weiterer WNT-Komponenten in humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen.







Aufgetragen ist die Expression der mRNA weiterer WNT-Komponenten nach 2 h (n=3), 20 h (n=3), 32 h (n=3) und 96 h (n=2) gegen den *Fold Change* im Vergleich zu einer Makrophagen Kontrolle (mac ktl). Untersucht wurde diese Expression in humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7 (mac+mcf7). Eine signifikante Regulation konnte nicht beobachtet werden.

**Tabelle 3.1: p-Werte berechnet aus  $\Delta Ct$  und aufgeteilt nach Zielen und Bedingung**

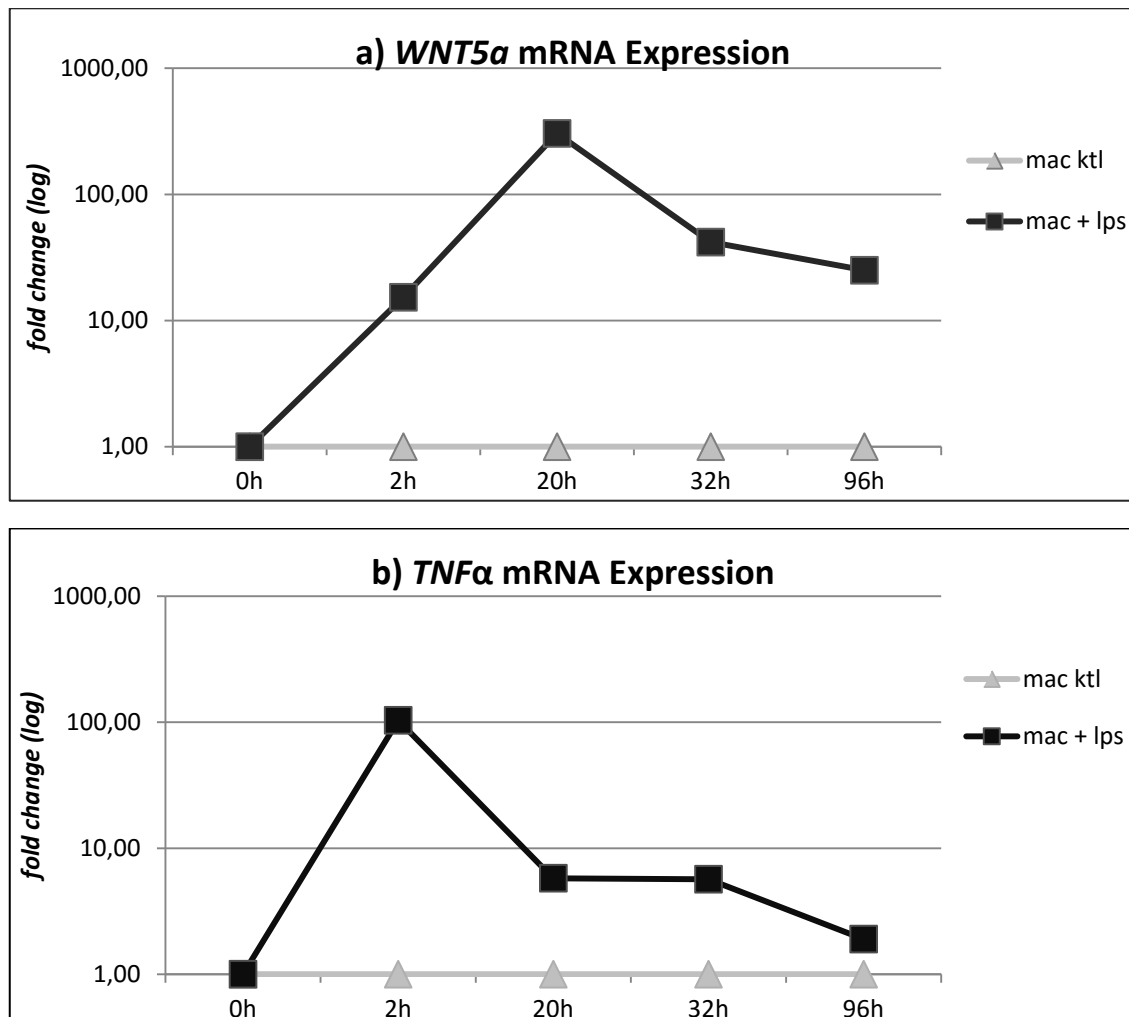
	p-Wert ( $\Delta Ct$ )						
	wnt5a	cxcr4	dkk2	iNOS	tcf7l2	tnf $\alpha$	vegfa
2h ktl/ml	0,1437	0,0069	0,9018	0,2043	0,8588	0,0074	0,6812
2h ktl/mm	0,9314	0,8935	0,5339	0,3208	0,5988	0,3699	0,2218
2h ktl/mml	0,0264	0,0108	0,4583	0,3106	0,9674	0,0004	0,3656
20h ktl/ml	0,0347	0,2476	0,8729	0,7779	0,1470	0,0479	0,1913
20h ktl/mm	0,7261	0,2155	0,8792	0,8482	0,9492	0,5782	0,4355
20h ktl/mml	0,0215	0,4253	0,8330	0,3605	0,1301	0,0060	0,0562
32h ktl/ml	0,0337	0,2908	0,7501	0,8493	0,0709	0,0692	0,1287
32h ktl/mm	0,9031	0,8541	0,6305	0,6539	0,6339	0,4706	0,7049
32h ktl/mml	0,0277	0,6387	0,4205	0,7050	0,0439	0,1515	0,0606
96h ktl/ml	0,2439	0,8526	0,4799	0,3231	0,9314	0,3875	0,1226
96h ktl/mm	0,8638	0,2886	0,6508	0,1639	0,5968	0,3048	0,6665
96h ktl/mml	0,2426	0,4715	0,0222	0,0464	0,8796	0,1959	0,0454
2h ml/mml	0,4042	0,3759	0,6404	0,1498	0,9032	0,6195	0,6339
20h ml/mml	0,8382	0,1149	0,9968	0,4018	0,5554	0,6922	0,6221
32h ml/mml	0,4279	0,1427	0,6300	0,5701	0,4768	0,4834	0,2226
96h ml/mml	0,8559	0,0774	0,2244	0,1992	0,9665	0,1365	0,1706

Die Tabelle zeigt die p-Werte berechnet aus dem  $\Delta Ct$  und aufgeteilt nach Zielen und Bedingung (ktl=Kontrolle, ml=Makrophagen+LPS, mm=Makrophagen+MCF-7, mml=Makrophagen+MCF-7+LPS). Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha=0,05$  gesetzt. Hervorgehoben sind die signifikanten Werte. Man kann der Tabelle entnehmen, dass keines der Zielgene nach Ko-Kultivierung von humanen Makrophagen mit MCF-7-Zellen signifikant reguliert ist. Sehr wohl zeigt sich jedoch eine Regulation nach Stimulierung mit LPS bzw nach Ko-Kultivierung mit MCF-7 und Stimulierung mit LPS.

### 3.1.3 Genexpressionsanalysen der untersuchten Komponenten nach Stimulierung mit Lipopolysaccharid

Eine weitere untersuchte Bedingung war die Stimulation mit 100 ng Lipopolysaccharid/ml Medium. Im Gegensatz zu den Ko-Kultur-Versuchen konnte hier eine Veränderung des Expressionsprofils der mRNA der untersuchten Komponenten in den Makrophagen dargestellt werden. Es präsentierte sich, wie erwartet, ein Muster entsprechend einem proinflammatorischen Phänotyp. Insbesondere lag eine starke und signifikante Überexpression der *TNF $\alpha$*  mRNA nach 2 h auf das 100fache ( $p=0,007$ ) und nach 20 h auf das 6fache ( $p=0,044$ ) im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle vor. Zudem zeigte sich die *WNT5 $\alpha$*  mRNA nach 20 h um das 300fache ( $p=0,035$ ) und nach 32 h weiterhin um das 40fache (0,034) hochreguliert. Außerdem konnte eine verminderte Expression der *CXCR4* mRNA nach 2 h auf das 0,1fache ( $p=0,007$ ) nachgewiesen werden. Diese Befunde passen zu einem proinflammatorischen Phänotyp (Cassol et al 2010). Weitere proinflammatorische Gene wie *iNOS* oder *VEGF $\alpha$*  zeigten zwar einen Trend zur Überexpression, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

Abbildung 3.3 a, b: Expression der mRNA von *WNT5a* (a) und *TNF $\alpha$*  (b) in humanen Makrophagen nach Stimulierung mit LPS



Die Abbildungen zeigen die Expression der mRNA von *WNT5a* (a) und *TNF $\alpha$*  (b) in humanen Makrophagen im Zeitverlauf nach Stimulierung mit 100 ng Lipopolysaccharid/ml Medium. In (a) präsentiert sich eine signifikante Hochregulation nach 20 h ( $p=0,035$ ) und nach 32 h ( $p=0,034$ ), in (b) nach 2 h ( $p=0,007$ ) und nach 20 h ( $p=0,044$ ). Diese Konstellation ist gut vereinbar mit dem erwarteten proinflammatorischen Phänotyp.

### 3.1.4 Kein synergistischer Effekt der Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen und Stimulierung mit Lipopolysacchariden

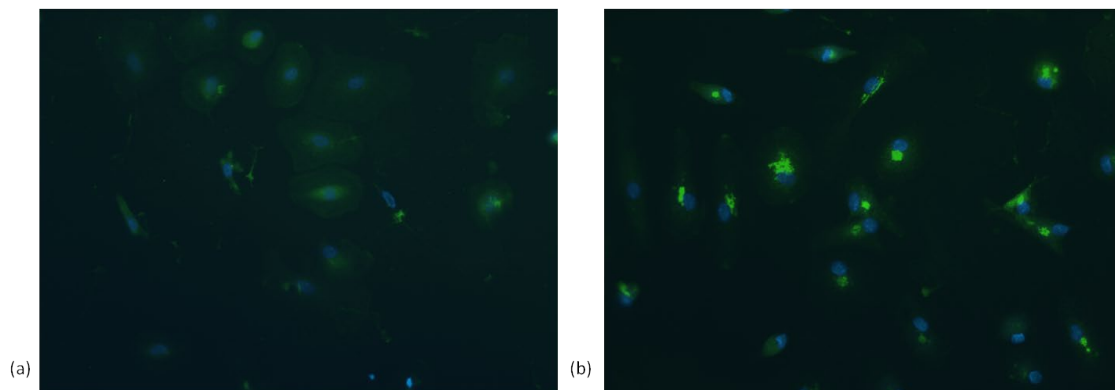
Um einen möglichen synergistischen Effekt einer MCF-7-Ko-Kultur und einer Stimulierung mit LPS zu untersuchen, wurde auch diese Bedingung getestet. Bei der Expression der *VEGF $\alpha$*  mRNA zeigt sich nach 96 h eine Tendenz zur Überexpression unter MCF-7-Ko-Kultur und LPS-Stimulierung im Gegensatz zur alleinigen Stimulierung mit LPS. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch für kein untersuchtes Gen errechnet werden.

Die p-Werte können der Tabelle 3.1 (insbesondere die Zeilen 2 h ml/mml, 20 h ml/mml, 32 h ml/mml und 96 h ml/mml) entnommen werden.

### 3.1.5 Immunfluoreszenz gegen TNF $\alpha$ in humanen Makrophagen nach Stimulierung mit Lipopolysacchariden

Die in den qRT-PCR-Untersuchungen erzielten Ergebnisse sollten auch auf Proteinebene validiert werden. Dazu wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen TNF $\alpha$  durchgeführt, da dies in den Genexpressionsanalysen am deutlichsten reguliert war. Die Makrophagen wurden analog den Versuchen zur qRT-PCR mit 100 ng LPS/ml Medium behandelt. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Makrophagen-Population. Die Abbildung 3.4 zeigt jeweils repräsentative Ausschnitte bei einer 40x Vergrößerung von (a) der Negativkontrolle mit unbehandelten humanen Makrophagen und (b) humanen Makrophagen nach Behandlung mit LPS. In Einklang mit den in Kapitel 3.1.3 beschriebenen Ergebnissen zeigt sich eine deutliche Anfärbung von TNF $\alpha$  in zytoplasmatischer Lokalisation.

**Abbildung 3.4: Immunfluoreszenzfärbung gegen TNF $\alpha$  in Makrophagen**



Abgebildet sind jeweils repräsentative Ausschnitte einer Immunfluoreszenzfärbung gegen TNF $\alpha$ , Vergrößerung 40x, in (a) unbehandelten humanen Makrophagen als Kontrolle und (b) 32 h nach Stimulierung mit LPS. Konsekutiv zu den in Kapitel 3.1.1.3 beschriebenen Ergebnissen, ist auch auf Proteinebene nach Stimulierung mit LPS eine Zunahme von TNF $\alpha$  in Makrophagen zu verzeichnen.

## 3.2 Versuche mit murinen Makrophagen und Mikrovesikeln

In einem zweiten Versuchsaufbau erfolgte die Untersuchung unreiferer Makrophagen aus dem Knochenmark der Maus (*bone marrow-derived macrophages*, BMDM). Untersucht wurden - neben einer unbehandelten Kontrolle - eine Population in Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen und eine Population nach Stimulierung mit LPS (je n=4). Zudem wurde eine Makrophagen-Population mit Mikrovesikeln aus MCF-7-Zellen stimuliert (n=4), da in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass Mikrovesikel in der Aktivierung des WNT-Signalwegs in Makrophagen durch MCF-7-Zellen eine kritische Rolle spielen (Menck et al. 2013). Der Aufbau der Ko-Kultur-Versuche erfolgte analog zu den Versuchen mit humanen Makrophagen. Die Makrophagen wurden jeweils nach 24 h geerntet.

Um nun in diesem System ein Expressionsmuster regulierter Gene herauszustellen, wurde der *RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Array* (#PAMM-043Z, Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Eine Auflistung der untersuchten Gene bietet die Tabelle 2.4. Des Weiteren wurden aus dem Überstand Zytokinanalysen mittels ELISA durchgeführt

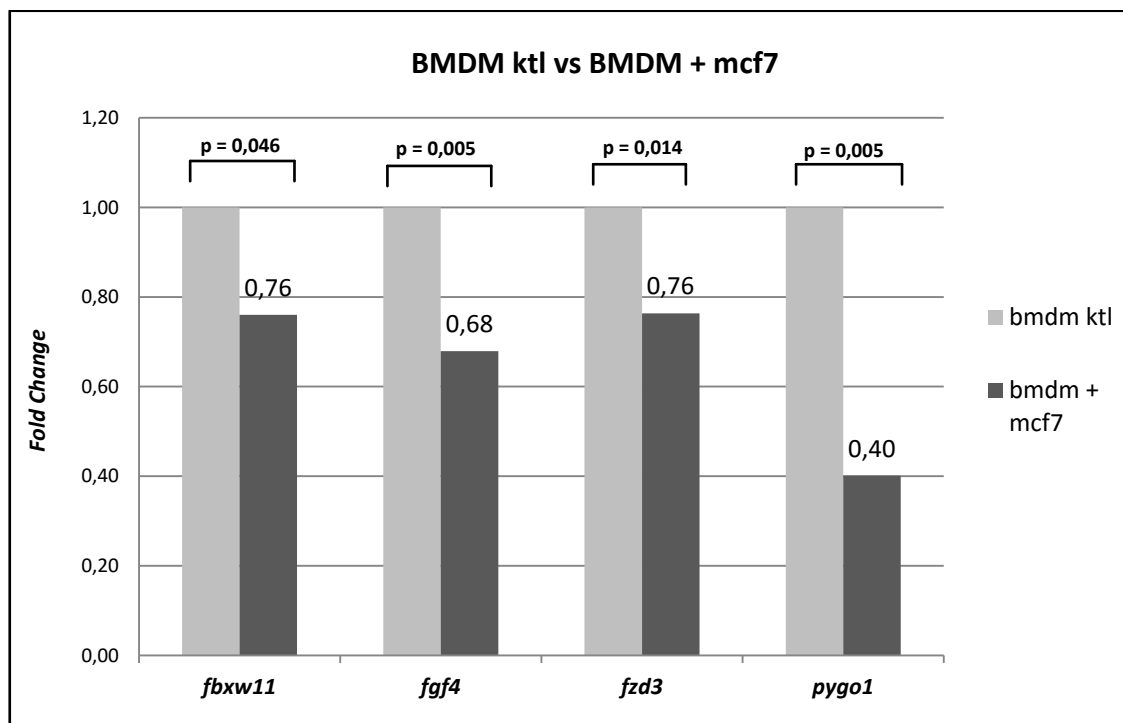
### 3.2.1 Genexpressionsanalysen in murinen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen mittels *RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Array*

Nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen zeigte sich in den murinen Makrophagen eine Expressionsänderung der mRNA der WNT-Zielgene *F-Box And WD Repeat Domain Containing 11 (Fbxw11)*, *Fibroblast Growth Factor 4 (Fgf4)*, *Frizzled Class Receptor 3 (Fzd3)* und *Pygopus Family PHD Finger 1 (Pygo1)*. Pygo1 ist beteiligt an dem intranukleären Transkriptionskomplex mit  $\beta$ -Catenin und BCL9 (Brembeck et al. 2004). Fzd3 gehört zu einer Gruppe von Rezeptoren für WNT-Moleküle. *Fgf4* ist ein weiteres Zielgen des WNT-Signalwegs und ansonsten vor allem beteiligt am Sonic Hedgehog-Signalweg. Fbxw11 ist ein Teil des *ubiquitin protein ligase*-Komplexes mit dem Namen SCFs (*Skp1-Cul1-F-box protein*) und spielt eine Rolle im Abbau verschiedener phosphorylierter Moleküle des WNT-Signalwegs (Spiegelman et al. 2002). Eine graphische Präsentation mit Darstellung der p-Werte bietet die Abbildung 3.5.

Da alle Gene herunterreguliert sind, obwohl es sich zum Teil um kritische Komponenten des WNT-Signalwegs handelt, kann somit keine Aktivierung des selbigen proklamiert werden. Auch konnte zwar eine Expression der WNT-mRNA *Wnt2b*, *Wnt4a*,

*Wnt6* und *Wnt16* in den Makrophagen nachgewiesen werden, eine signifikante Regulation war jedoch in keiner der Bedingungen zu messen.

**Abbildung 3.5: Verminderte Genexpression von WNT-abhängigen Komponenten nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen**



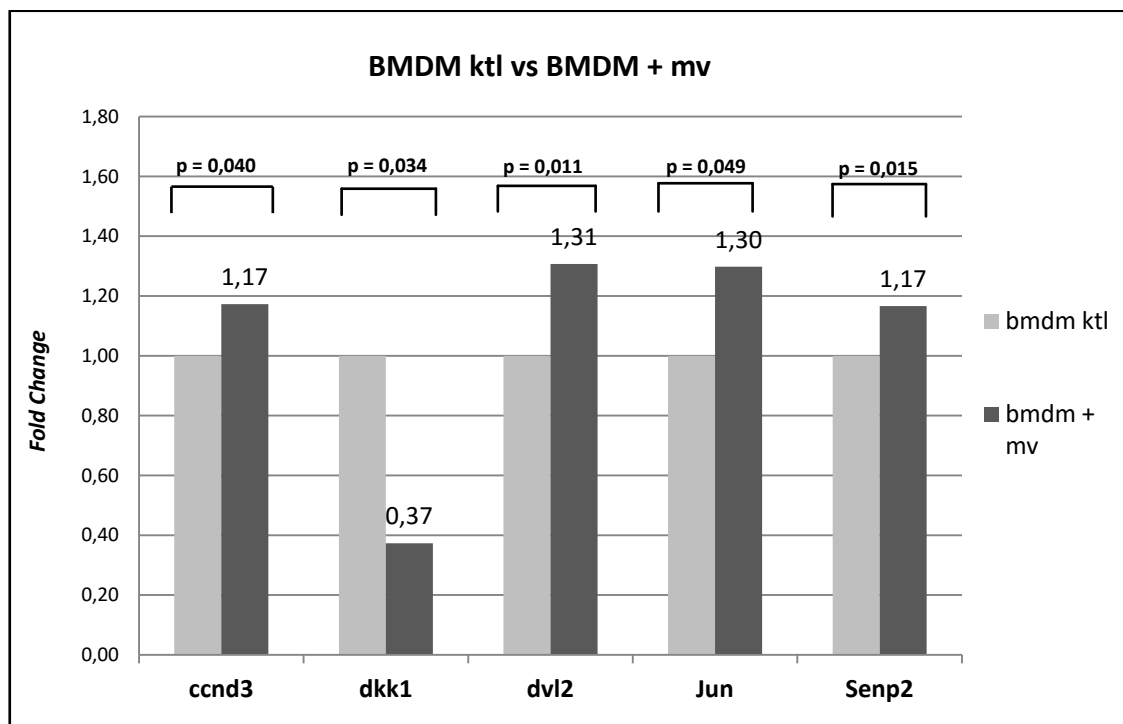
Die Abbildung zeigt den *Fold Change* der mRNA-Expression der regulierten Gene im *RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Array* nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen.

### 3.2.2 Genexpressionsanalysen in murinen Makrophagen nach Stimulierung mit Mikrovesikeln aus MCF-7-Zellen mittels *RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Array*

Eine andere Situation zeigte sich nach Stimulation der murinen Makrophagen mit Mikrovesikeln aus MCF-7-Zellen. Es präsentiert sich eine Expressionsänderung der mRNA der Gene *Dickkopf-related protein 1 (Dkk1)*, *Cyclin D3 (Ccnd3)*, *Dishevelled Segment Polarity Protein 2 (Dvl2)*, *Jun Oncogene (Jun)* und *SUMO Specific Peptidase 2 (Senp2)*. Die p-Werte können der Abbildung 3.6 entnommen werden. Betrachtet man den *Fold Change*, liegt eine wesentliche Regulation vor allem bei *Dkk1* vor (*Fold Change* 0,37 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle). *Dkk1* ist ein bekannter Antagonist des kanonischen WNT-Signalwegs und ein zentraler Bestandteil in dessen Regulation.

Die weiteren regulierten Gene präsentieren zwar ebenfalls einen signifikanten *Fold Change*, jedoch jeweils nur in einem geringen Ausmaß. *Ccnd3* (*Fold Change* 1,17 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) gehört zur Gruppe der Cycline und spielt eine wichtige Rolle im Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt)-Signalweg, welcher seinerseits den WNT-Signalweg verstärkt (Vadlakonda et al. 2013). Die Abbildung 1.3 veranschaulicht die Rolle von *Dvl2* und *Jun* (*Fold Change* 1,31 und 1,30 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) *downstream* der *Fzd*-Rezeptoren. *Senp2* (*Fold Change* 1,17 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) hingegen inhibiert die transkriptionelle Aktivität des TCF/LEF-Komplexes (Shitashige et al. 2008). Die Hochregulation von *Ccnd3*, *Dvl2* und *Jun* sowie insbesondere die Herunterregulation des WNT-Antagonisten *Dkk1* deuten auf einen aktivierten WNT-Signalweg hin. Einzig *Senp2*, dessen Produkt prinzipiell als WNT-Antagonist fungiert, ist entgegen den Erwartungen hochreguliert. Die Beteiligung von *Jun*, welches seinerseits Teil des Transkriptionsfaktors *activator protein-1* (AP-1), legt den Schluss nahe, dass es sich am ehesten um eine nicht-kanonische Signalkaskade handelt. Nichtsdestotrotz konnte auch nach Stimulierung mit Mikrovesikeln aus MCF-7-Zellen keine signifikante Regulierung von *WNT*-mRNA in den murinen Makrophagen dargestellt werden.

**Abbildung 3.6 Genexpression von WNT-abhängigen Komponenten nach Stimulierung mit MCF-7 *derived* Mikrovesikeln**

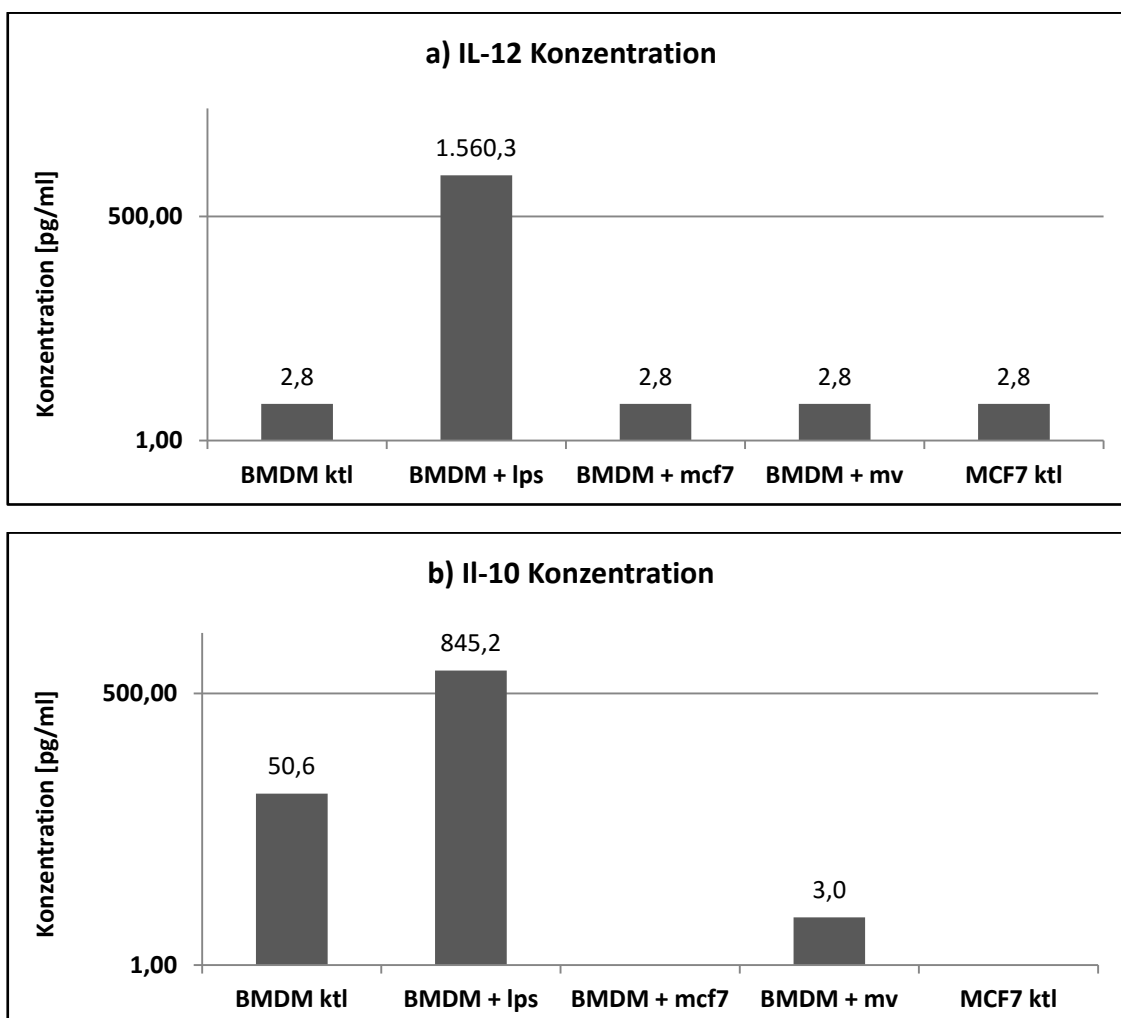


Die Abbildung zeigt den *Fold Change* der mRNA der regulierten Gene im *RT<sup>2</sup> Profiler Mouse WNT Signaling Pathway PCR Array* nach Stimulierung mit Mikrovesikeln aus MCF-7-Zellen.

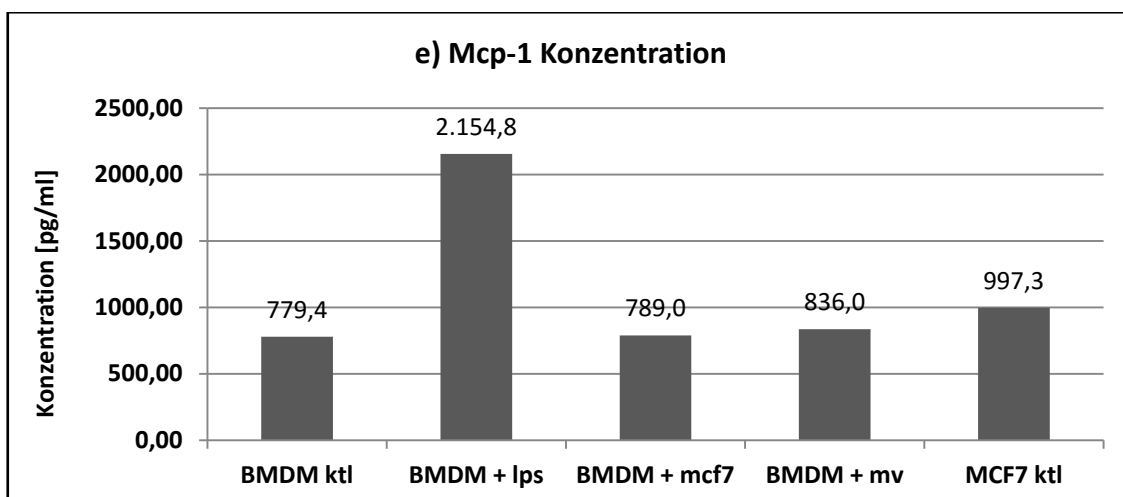
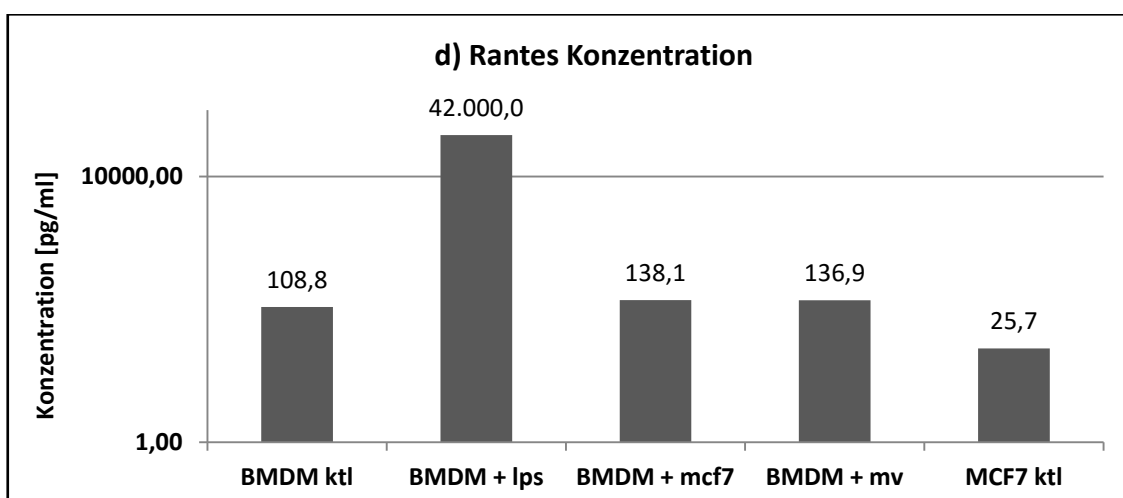
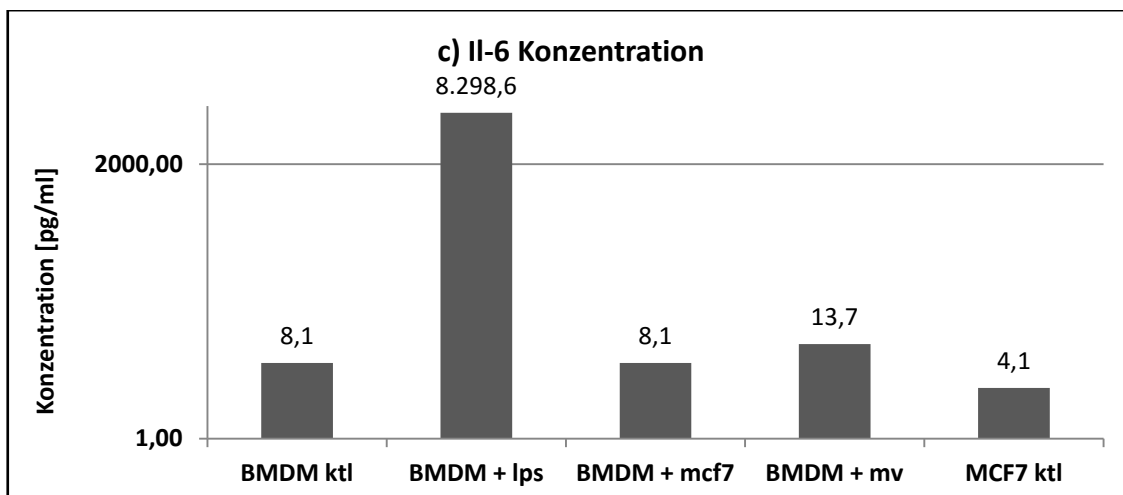
### 3.2.3 Zytokinanalyse muriner Makrophagen mittels ELISA

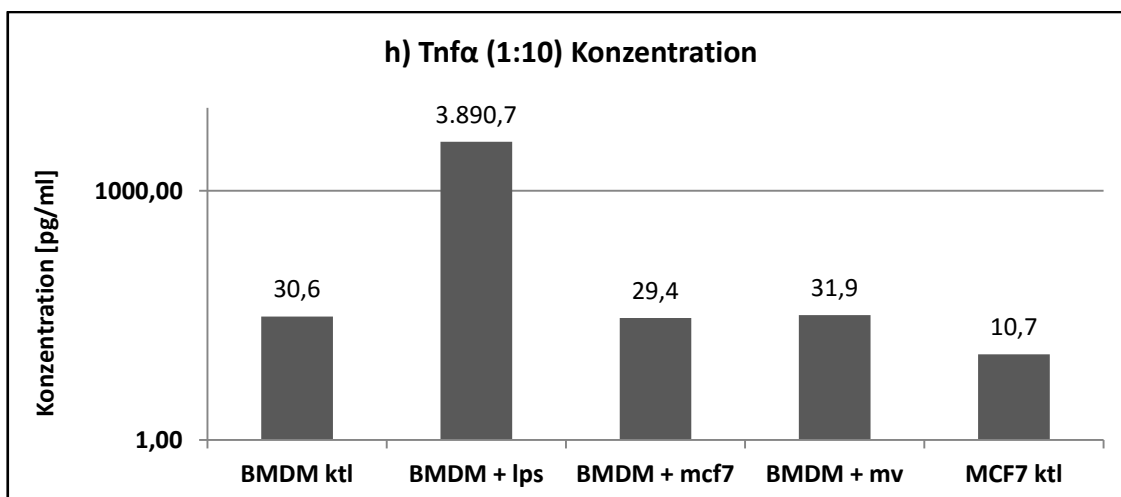
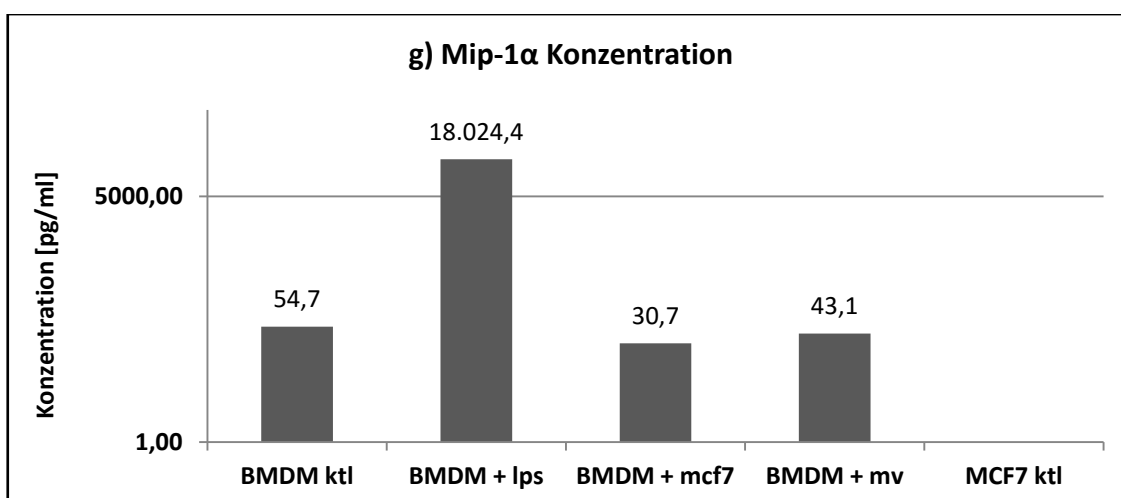
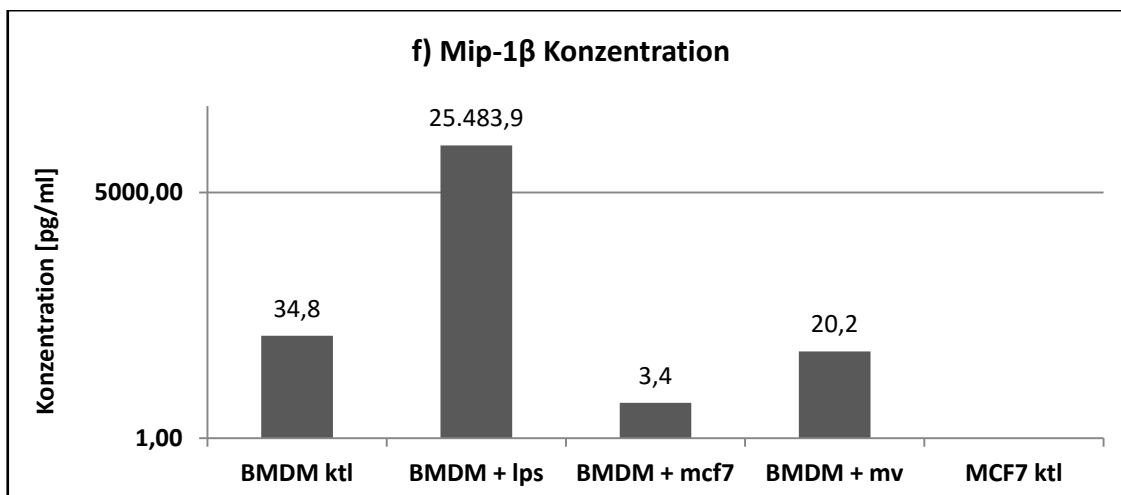
Aus dem Überstand der Versuche mit murinen Makrophagen (n=4) wurden Proteinanalysen mittels ELISA durchgeführt. Es wurden Antikörper gegen die klassischen proinflammatorische Proteine IL-10, IL-12, IL-6, Rantes, Mcp-1, Mip-1 $\beta$ , Mip-1 $\alpha$  und Tnf $\alpha$  eingesetzt und die Konzentration in pg/ml anhand einer Standardkurve extrapoliert. Im Vergleich zu den unbehandelten Makrophagen zeigt sich eine deutliche und signifikante Anreicherung proinflammatorischer Zytokine in den LPS-stimulierten Makrophagen. Einzig die Konzentration von Mip-1 $\alpha$  erreichte nicht das Signifikanzniveau (p=0,09) bei jedoch sehr hoher Standardabweichung. In dem Überstand der Ko-Kultur sowie in dem Überstand der Mikrovesikel-stimulierten Makrophagen konnte hingegen keine Anreicherung von proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden (Abbildung 3.7a-h).

Abbildung 3.7 a-h: Konzentration proinflammatorischer Proteine im Überstand









Die Abbildungen 3.8 a-h zeigen die Konzentration proinflammatorischer Proteine im Überstand der in Kapitel 3.2 beschriebenen Experimente (n=4). Nach LPS-Stimulation zeigt sich ein signifikanter Anstieg nahezu aller untersuchter Komponenten, entsprechend einem proinflammatorischen Phänotyp (a: p=0,007, b: p=0,003, c: p=0,002, d: p<0,001, e: p<0,001, f: p<0,001, g: p=0,09, h: p<0,001).

## 4 Diskussion

Bezüglich der Stellung der Tumor-assoziierten Makrophagen in Tumorprogress und – Metastasierung sind unterschiedliche Rollen denkbar. Durch immunmodulatorische Prozesse können Makrophagen einen tumoriziden Effekt unterstützen. Jedoch konnte andererseits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe auch ein proinvasiver Effekt dargestellt werden. Dieser Effekt beruht auf der Aktivierung eines nicht-kanonischen WNT-Signalwegs. Stellvertretend konnte eine Induktion von *WNT5a* mRNA in Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit einer Brustkrebs-Zelllinie dargestellt werden (Pukrop et al 2006; Menck et al 2013). Ein invasionssteigernder Effekt von *WNT5a* konnte auch für weitere humane Tumore nachgewiesen werden, z. B. für das Osteosarkom oder das Melanom (Sadeghi et al 2018).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung weiterer Zielgene des WNT-Signalwegs in Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit einer Brustkrebs-Zelllinie respektive Stimulation mit Mikrovesikeln.

### 4.1 Induktion eines pro-inflammatorischen Phänotyps nach Stimulierung mit Lipopolysacchariden

Zur Darstellung einer bestehenden Plastizität der eingesetzten Makrophagen wurde, im Sinne einer Positivkontrolle, eine Stimulierung mit LPS durchgeführt. Hier präsentierte sich, wie zu erwarten, ein proinflammatorischer Phänotyp.

In den humanen Makrophagen zeigt sich nach Stimulierung mit LPS eine Regulation der *TNF $\alpha$*  mRNA. Dabei handelt es sich um eine Hochregulation auf etwa das 100fache des Ausgangsniveaus vor allem in der frühen Phase nach ca. 2 h. Auch die *WNT5a* mRNA wird im Vergleich zur unbehandelten Makrophagen-Population um das 300fache überexprimiert mit einem Peak nach 20 h. Im Gegensatz dazu wurde die *CXCR4* mRNA nach 2 h signifikant herunterreguliert. Alle Befunde sind kongruent mit der Ausprägung eines proinflammatorischen Phänotyps.

Auch in den unreiferen murinen Makrophagen konnte insbesondere auf Proteinebene im Überstand der LPS-stimulierten Zellen ein proinflammatorischer Phänotyp nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine starke Sekretion von proinflammatorischen Chemokinen wie Rantes sowie Zytokinen wie Il-6, Il-12 oder *Tnf $\alpha$* , bei nur schwach ausgeprägter Sekretion von Il-10. Diese Konstellation wird in der Literatur als typisch

für eine M1-Polarisation beschrieben (Sicca und Mantovani 2012, Biswas und Mantovani 2010)

#### **4.2 Regulierung des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs in humanen Makrophagen nach Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen**

Pukrop et al. konnten in ausführlichen Versuchen darstellen, dass es zu einer Hochregulation von *WNT5a* mRNA in humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7 kommt. Diese führt im Sinne eines reziproken Feedbacks zu einer Steigerung der Invasivität der Tumorzellen, welche durch den WNT-Inhibitor DKK1 wieder gehemmt wird (Pukrop et al. 2006). Auch andere Arbeitsgruppen konstatieren die Rolle von *WNT5a* in der Kommunikation von Brustkrebszellen und Tumor-assoziierten Makrophagen. Zum Beispiel beschreiben Bergenfelz et al. in einer Arbeit von 2012 eine starke Korrelation zwischen dem Expressionslevel von *WNT5a* mRNA in Brustkrebszellen und dem Auftreten antiinflammatorischer Tumor-assoziiertes Makrophagen im entsprechenden Gewebe.

In der hier vorgelegten Arbeit zeigt sich nun keine signifikante Hochregulation der *WNT5a* mRNA in humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen. Sehr wohl konnte jedoch ein Trend zur Überexpression dargestellt werden. Betrachtet man die zeitliche Auflösung, mit einem Maximum der Hochregulation nach 20 h, so zeigen sich Parallelen zu Ergebnissen anderer Arbeiten unserer Gruppe, in welchen sich eine Hochregulation der *WNT5a* mRNA in humanen Makrophagen nach Stimulierung mit Mikrovesikeln aus Brustkrebszellen nach 24 h manifestiert (Menck et al. 2013). Ähnlich präsentieren auch weitere untersuchte Komponenten lediglich einen Trend zu Hochregulation, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Insbesondere für die *TNF $\alpha$*  mRNA konnte bereits eine wesentliche Rolle in der Steigerung der Invasivität von Brustkrebszellen nachgewiesen werden. *TNF $\alpha$*  wird vermehrt in humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung exprimiert und führt zu einer Hochregulation und Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen (insbesondere MMP-2 und -9), welche ihrerseits zu einer Steigerung der Invasivität von Brustkrebszellen führen (Hagemann et al. 2004).

Es stellt sich letztlich die Frage nach einem methodischen Problem. Betrachtet man die Abbildung 3.1, so fällt die hohe Standardabweichung auf. Eine Ursache könnte in der Heterogenität der eingesetzten humanen Makrophagen liegen. Wie im Methoden-Teil beschrieben, wurden die Makrophagen aus dem *buffy coat* von Spenderblut isoliert. Trotz klar definierter Kriterien für Blutspender ist eine homogene Makrophagen-

Population durch unterschiedliches Alter, Geschlecht, Stress oder Frühphasen einer Infektion, nicht zu erwarten. Dies geht zwangsläufig mit einem differierenden Aktivierungsstatus und somit Expressionsmuster einher. Im Rahmen der Isolation und Ausdifferenzierung der humanen Makrophagen hat sich zudem im Vergleich zu den vorherigen Experimenten der Arbeitsgruppe ein wesentlicher Schritt geändert: die Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen erfolgte in dieser Arbeit in Teflonbeuteln anstelle von Petrischalen (Vgl. Kapitel 2.2.1.3; Menck et al. 2014). In unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe zeigte sich ein Trend zu höheren Expressionsleveln für zum Beispiel *WNT5a* mRNA in ansonsten unbehandelten Makrophagen, welche in Teflon-Beuteln ausdifferenziert wurden, im Gegensatz zu Makrophagen, welche auf Petrischalen ausdifferenziert wurden. Auch dies könnte einen unterschiedlichen Aktivierungsstatus zur Folge haben. Weiterhin wurden bezüglich des Zubehörs zur Aufarbeitung des Spenderbluts durch die Abteilung für Transfusionsmedizin Änderungen vorgenommen, die sich in einer signifikant schlechteren Anzuchtbarkeit der Monozyten äußerten.

Resultierend muss spekuliert werden, ob in diesem Fall ein statistischer Fehler 2. Art vorliegt, also die Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied zwischen den Bedingungen zeigen, obwohl in Wahrheit ein Unterschied existiert. In Anbetracht dessen kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die Anzahl der untersuchten Proben zu gering ausgefallen ist, um einen tatsächlich bestehenden Effekt nachzuweisen.

Eine weitere Problematik liegt in der von einigen Autoren beschriebenen Diskrepanz zwischen *WNT5a*-mRNA und -Protein-Konzentrationen. Dieser Effekt wurde in Brustkrebszellen und auch Zellen anderer Neoplasien, wie zum Beispiel dem Hepatozellulären Karzinom, nachgewiesen (Li et al. 2014). Er kommt durch eine Regulation auf der translationalen Ebene zustande. Diese wird durch Bindung von *Embryonic Lethal Abnormal Vision (ELAV)-like protein 1* oder auch *Human antigen R (HuR)* an hoch-konservierte AU-reiche Sequenzen des *WNT5a* mRNA Moleküls eingeleitet (Leandersson et al. 2006).

### **4.3 Unterschiede in der Aktivierung muriner Makrophagen nach Ko-Kultur mit MCF-7 und Stimulation mit Mikrovesikeln**

Menck et al. konnten 2013 in ihrer Arbeit zeigen, dass der zentrale Transportweg des ansonsten hydrophoben *WNT5a* von der malignen Brustkrebszelle hin zu den Makrophagen über extrazelluläre Partikel, insbesondere Mikrovesikel und Exosomen, ver-

läuft. Der partikelfreie Überstand der malignen Zellen hatte entsprechend keinen invasionssteigernden Effekt zur Folge.

In dieser Arbeit nun konnte weder nach Ko-Kultur mit MCF-7-Zellen noch nach Stimulation mit einer definierten Menge Mikrovessikel aus MCF-7-Zellen eine signifikante Regulation der untersuchten Wnt-Gene demonstriert werden. Insbesondere kam es zu keiner signifikanten Genexpressionsänderung des *Wnt6*, welches in murinen Makrophagen – nach eigenen Vorergebnissen der Arbeitsgruppe - typischerweise stärker exprimiert ist als *Wnt5a* mRNA. Auch wenn die Aufarbeitung der murinen Makrophagen aus dem Knochenmark von NMRI-Mäusen auf Grund des früheren Reifegrades eine homogenere Population verspricht als die humanen peripheren Blutmakrophagen, könnte hier die zu geringe Anzahl der untersuchten Proben ebenfalls zu einem statistischen Fehler geführt haben. Betrachtet man jedoch genauer die weiteren untersuchten WNT-abhängigen Gene, fällt insbesondere die signifikante Herunterregulation des WNT-Inhibitors *Dkk1* nach Stimulation mit Mikrovessikeln aus MCF-7 -Zellen auf. Diese Feststellung kann als Hinweis auf eine mögliche Aktivierung eines WNT-Signalwegs gewertet werden. Die Heraufregulation des *Jun* vervollständigt das Bild eines regulierten nicht-kanonischen WNT-Signalwegs.

Aus welchen Gründen zeigen sich nun Hinweise auf die Aktivierung des nicht-kanonischen WNT-Signalwegs nach Stimulierung mit Mikrovessikeln und nicht nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen? Ein Grund könnte die Menge der eingesetzten MCF-7-Zellen sein. Die durch die entsprechenden Zellen erzeugte Konzentration an Mikrovessikeln und Exosomen kann in der Ko-Kultur zu gering gewesen sein, um einen messbaren Effekt auszulösen. Eine Messung der Konzentration an Mikrovessikeln wäre eine interessante Folgeuntersuchung.

#### **4.4 Bedeutung der zeitlichen Auflösung von Proteinaktivität und Genexpression nach Stimulierung durch WNT5a**

Prasad et al. veröffentlichten 2013 eine Arbeit zum Thema WNT5a und Mammakarzinom, welche die Heterogenität und Komplexität der WNT-Signaltransduktion sehr schön verdeutlicht. Sie konnten zeigen, dass eine kontinuierliche autokrine Aktivierung einer Mammakarzinom-Zelllinie durch WNT5a zu einer verminderten Invasivität der Tumorzellen führt. Dieser Mechanismus war mit einer Heraufregulation des CDC42 und konsekutiver Aktivitätsminderung von ERK1/2 assoziiert. Im Gegensatz dazu kam es bei externer Hinzugabe von rekombinantem WNT5a in

der Initialphase nach ca. einer Stunde zu einer Calcium-abhängigen Erhöhung der Aktivität von ERK1/2 und erst im Verlauf von mehreren Stunden zu einer Zunahme von CDC42 und damit einhergehend dann auch zu einer anhaltenden Reduktion der ERK1/2 Aktivität nach 6 bis 12 Stunden. Die Konstellation mit niedriger Aktivität von CDC42 und hoher Aktivität von ERK1/2 unmittelbar nach WNT5a Stimulation wird mit einer erhöhten Invasivität in Verbindung gebracht (Zuo et al 2012).

Betrachtet man die hier dargestellte Komplexität der Signaltransduktion nach WNT5a Stimulierung, so kann spekuliert werden, dass in dieser Arbeit die zeitliche Auftrennung ungünstig war und ein möglicher parakrin induzierter und temporärer *WNT5a*-Anstieg so verpasst wurde. Eine höhere zeitliche Auflösung wäre nötig, um diese Thematik weiter aufzuarbeiten.

## 5 Zusammenfassung

Die Interaktion zwischen malignen Zellen und den umgebenden Stromazellen trägt in erheblicher Weise zur biologischen Aktivität dieser Zellen bei. Die Moleküle des WNT-Signalwegs spielen in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle. Im Mammakarzinom ist die Aktivierung des kanonischen Signalwegs mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert. Betrachtet man die Rolle des kanonischen WNT-Pfades in der Entwicklung der Brustdrüse, verwundert diese Tatsache wenig. Anders verhält es sich mit den nicht-kanonischen  $\beta$ -Catenin-unabhängigen WNT-Signalwegen. Ob eine Aktivierung dieser Pfade das Tumorverhalten günstig oder ungünstig beeinflusst, ist in der aktuellen Literatur umstritten. Diese Arbeit beschäftigte sich mit dem Hauptprotagonisten der  $\beta$ -Catenin-unabhängigen WNT-Signaltransduktion *WNT5a* und dessen Rolle in der Kommunikation zwischen Mammakarzinom-Zellen und Tumor-assoziierten Makrophagen.

In den hier vorgestellten Untersuchungen konnte, im Gegensatz zu Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, keine signifikante Regulation der nicht-kanonischen WNT-Pfade in humanen und murinen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen gezeigt werden. Auch nach direkter Exposition gegenüber aus MCF-7-Zellen stammenden Mikrovesikeln, welche ihrerseits als Induktoren einer *WNT5a*-Expression in Makrophagen identifiziert werden konnten, kam es zu keiner signifikanten Regulation der *WNT*-Gene. Indirekte Hinweise, wie zum Beispiel ein deutlicher Trend zur Überexpression von *WNT5a* mRNA in humanen Makrophagen nach Ko-Kultivierung mit MCF-7-Zellen oder eine signifikante Herunterregulation der mRNA des WNT-Gegenspielers *Dkk1* in murinen Makrophagen nach Stimulation mit Mikrovesikeln aus MCF-7-Zellen, sind jedoch vorhanden. Bezogen auf die dargestellten Untersuchungen, wurden kritisch technische und methodische Probleme als Ursachen eines möglichen statistischen Fehlers diskutiert. Ebenso wurden mögliche biologische Ursachen erläutert, die zu einem Ausbleiben des Nachweises einer wesentlichen Aktivierung der nicht-kanonischen WNT-Signalwege führen könnten. Weitere Untersuchungen unter Optimierung der verwendeten Methodik, insbesondere auch hinsichtlich der Zeitpunkte der Stimulation sowie eine Erhöhung der Probenzahl könnten hier etwas Klarheit in die bislang noch diskrepanten Forschungsergebnisse bringen.



## 6 Literaturverzeichnis

- Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2008): The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 222, 155 - 161
- Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers W R, Polyak K (2004): Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 1, 17 - 32
- Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J (2009): Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle* 13, 2014 - 2018
- Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML (2006): Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 57, 7492 - 7504
- Bafico A, Liu G, Goldin L, Harris V, Aaronson SA (2004): An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human Cancer Cells. *Cancer Cell* 5, 497 - 506
- Balkwill F, Mantovani A (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 9255, 539 - 545
- Bayerlová M, Menck K, Klemm F, Wolff A, Pukrop T, Binder C, Beißbarth T, Bleckmann A (2017): Ror2 Signaling and Its Relevance in Breast Cancer Progression. *Front Oncol* 7, 135
- Benhaj K, Akcali KC, Ozturk M (2006): Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast Cancer Cell lines. *Oncol Rep* 3, 701 - 707
- Bergenfelz C, Medrek C, Ekström E, Jirström K, Janols H, Wullt M, Bredberg A, Leandersson K (2012): Wnt5a induces a tolerogenic phenotype of macrophages in sepsis and breast cancer patients. *J Immunol* 11, 5448 - 5458
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R (1996): A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 6588, 225 - 230
- Biswas SK, Mantovani A (2010): Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 10, 889 - 896
- Bleckmann A, Conradi L, Menck K, Schmick NA, Schubert A, Rietkötter E, Middel P, Liersch T, Binder C, Pukrop T (2016):  $\beta$ -catenin-independent WNT signaling and Ki67 in contrast to the estrogen receptor status are prognostic and associated with poor prognosis in breast cancer liver metastases. *Clin Exp Metastasis* 4, 309 - 323

- Boulton SJ (2006): Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans* 5, 633 - 645
- Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W (2004): Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 18, 2225 - 2230
- Brennan KR, Brown AMC (2004): Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2, 119 - 131
- Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P (2006): Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 27, 3787 - 3800
- Brisken C, Heineman A, Chavarria T, Elenbaas B, Tan J, Dey SK, McMahon JA, McMahon AP, Weinberg RA (2000): Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes Dev* 6, 650 - 654
- Cadigan KM, Fish MP, Rulifson EJ, Nusse R (1998): Wingless repression of Drosophila frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. *Cell* 5, 767 - 777
- Cassol E, Cassetta L, Alfano M, Poli G (2010): Macrophage polarization and HIV-1 infection. *J Leukoc Biol* 4, 599 - 608
- Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A (2003): Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 7, 4120 - 4125
- Chen W, Berge D ten, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, Barak LS, Nusse R, Lefkowitz RJ (2003): Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 5638, 1391 - 1394
- Chinenov Y, Kerppola TK (2001): Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 19, 2438 - 2452
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 24, 5294 - 5299
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1, 156 - 159
- Christian JL, McMahon JA, McMahon AP, Moon RT (1991): Xwnt-8, a Xenopus Wnt-1/int-1-related gene responsive to mesoderm-inducing growth factors, may play a role in ventral mesodermal patterning during embryogenesis. *Development* 4, 1045 - 1055

- Clevers H, Nusse R (2012): Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell* 6, 1192 - 1205
- Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE (2009): Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1, 11 - 18
- Dale TC, Weber-Hall SJ, Smith K, Huguet EL, Jayatilake H, Gusterson BA, Shuttleworth G, O'Hare M, Harris AL (1996): Compartment switching of WNT-2 expression in human breast tumors. *Cancer Res* 19, 4320 - 4323
- Daniels DL, Weis WI (2005): Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat Struct Mol Biol* 4, 364 - 371
- Dey N, Barwick BG, Moreno CS, Ordanic-Kodani M, Chen Z, Oprea-Illies G, Tang W, Catzavelos C, Kerstann KF, Leyland-Jones BR (2013): Wnt signaling in triple negative breast cancer is associated with metastasis. *BMC Cancer* 13, 537
- Du Q, Zhang X, Liu Q, Bartels CE, Geller DA (2013): Nitric oxide production upregulates Wnt/beta-catenin signaling by inhibiting Dickkopf-1. *Cancer Res* 21, 6526 - 6537
- Fidler IJ (2003): The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer* 6, 453 - 458
- Fiedler M, Mendoza-Topaz C, Rutherford TJ, Mieszczanek J, Bienz M (2011): Dishevelled interacts with the DIX domain polymerization interface of Axin to interfere with its function in down-regulating  $\beta$ -catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 5, 1937 - 1942
- Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V, Engelhardt J F (2002): Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *J Biol Chem* 36, 33398 - 33410
- Fischer E, Pontoglio M (2006): Polarité planaire et polykystose rénale. *Med Sci (Paris)* 6, 576 - 578
- Galli LM, Barnes TL, Secret SS, Kadowaki T, Burrus LW (2007): Porcupine-mediated lipid-modification regulates the activity and distribution of Wnt proteins in the chick neural tube. *Development* 18, 3339 - 3348
- Gasser O, Hess C, Miot S, Sanchez JC, Schifferli JA (2003): Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res* 2, 243 - 257
- Giusti I, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Taraboletti G, Carta G, Franceschini N, Pavan A, Dolo V (2008): Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia* 5, 481 - 488

- Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, Mlineritsch B, Kwasny W, Knauer M, Nielsen TO (2014): Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol* 2, 339 - 345
- Goodwin AM, Kitajewski J, D'Amore PA (2007): Wnt1 and Wnt5a affect endothelial proliferation and capillary length; Wnt2 does not. *Growth Factors* 1, 25 - 32
- Gordon S, Taylor PR (2005): Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 12, 953 - 964
- Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G (2011): Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res* 15, 5346 - 5356
- Grimshaw MJ, Wilson JL, Balkwill FR (2002): Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur J Immunol* 9, 2393 - 2400
- Guruvayoorappan C (2008): Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? *Integr Cancer Ther* 2, 90 - 95
- Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C (2004): Enhanced invasiveness of breast Cancer Cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 8, 1543 - 1549
- Hansen C, Howlin J, Tengholm A, Dyachok O, Vogel WF, Nairn AC, Greengard P, Andersson T (2009): Wnt-5a-induced phosphorylation of DARPP-32 inhibits breast Cancer Cell migration in a CREB-dependent manner. *J Biol Chem* 40, 27533 - 27543
- Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM (2012): Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol* 2012, 94809
- Harris KE, Beckendorf SK (2007): Different Wnt signals act through the Frizzled and RYK receptors during *Drosophila* salivary gland migration. *Development* 11, 2017 - 2025
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW (1998): Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 5382, 1509 - 1512
- Hernandez L, Smirnova T, Kedrin D, Wyckoff J, Zhu L, Stanley ER, Cox D, Muller WJ, Pollard JW, Segall JE (2009): The EGF/CSF-1 paracrine invasion loop can be triggered by heregulin beta1 and CXCL12. *Cancer Res* 7, 3221 - 3227

- Holme PA, Solum MO, Brosstad F, Roger M, Abdelnoor M (1994): Demonstration of platelet-derived microvesicles in blood from patients with activated coagulation and fibrinolysis using a filtration technique and western blotting. *Thromb Haemost* 72, 666 - 671
- Hoppler S, Kavanagh SL (2007): Wnt signalling: variety at the core. *J Cell Sci* 3, 385 - 393
- Howe LR, Brown A (2004): Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther* 1, 36 - 41
- Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J (1999): A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 6726, 431 - 436
- Hu M, Polyak K (2008): Molecular characterisation of the tumour microenvironment in breast cancer. *Eur J Cancer* 18, 2760 - 2765
- Huang T, Xie Z, Wang J, Li M, Jing N, Li L (2011): Nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins repress canonical Wnt signaling via its interaction with Dishevelled (Dvl) protein and participate in regulating neural progenitor cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 43, 37399 - 37405
- Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Nagai S, Nishita M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibuya H, Matsumoto K (1999): The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* 6738, 798 - 802
- Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC (2012): Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 6090, 59 - 64
- Jang GB, Kim JY, Cho SD, Park KS, Jung JY, Lee HY, Hong IS, Nam JS (2015): Blockade of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling suppresses breast cancer metastasis by inhibiting CSC-like phenotype. *Sci Rep* 5, 12465
- Jauliac S, López-Rodríguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A (2002): The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* 7, 540 - 544
- Jönsson M, Andersson T (2001): Repression of Wnt-5a impairs DDR1 phosphorylation and modifies adhesion and migration of mammary cells. *J Cell Sci* 11, 2043 - 2053
- Jönsson M, Dejmek J, Bendahl PO, Andersson T (2002): Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res* 2, 409 - 416
- Katoh M, Katoh M (2007): AP1- and NF-kappaB-binding sites conserved among mammalian WNT10B orthologs elucidate the TNFalpha-WNT10B signaling loop implicated in carcinogenesis and adipogenesis. *Int J Mol Med* 4, 699 - 703

- Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, Huo D, Olopade OI, Goss KH (2010): Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol* 6, 2911 - 2920
- Kishida S, Yamamoto H, Hino S, Ikeda S, Kishida M, Kikuchi A (1999): DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol Cell Biol* 6, 4414 - 4422
- Klemm F, Bleckmann A, Siam L, Chuang HN, Rietkötter E, Behme D, Trümper L, Binder C, Pukrop T (2011):  $\beta$ -catenin-independent WNT signaling in basal-like breast cancer and brain metastasis. *Carcinogenesis* 3, 434 - 442
- Komiya Y, Habas R (2008): Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2, 68 - 75
- Korkut C, Ataman B, Ramachandran P, Ashley J, Barria R, Gherbesi N, Budnik V (2009): Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell* 2, 393 - 404
- Krecicki T, Zalesska-Krecicka M, Jelen M, Szkudlarek T, Horobiowska M (2001): Expression of type IV collagen and matrix metalloproteinase-2 (type IV collagenase) in relation to nodal status in laryngeal cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 6, 469 - 472
- Kurayoshi M, Yamamoto H, Izumi S, Kikuchi A (2007): Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem J* 3, 515 - 523
- Kusserow A, Pang K, Sturm C, Hroudá M, Lentfer J, Schmidt HA, Technau U, Haeseler A von, Hobmayer B, Holstein TW (2005): Unexpected complexity of the Wnt gene family in a sea anemone. *Nature* 7022, 156 - 160
- Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ (Hrsg.): WHO Classification of Tumours of the Breast. 4. Auflage; IARC Press, Lyon 2012
- Laoui D, Movahedi K, van Overmeire E, van den Bossche J, Schoupe E, Mommer C, Nikolaou A, Morias Y, Baetselier P de, van Ginderachter JA (2011): Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol* 7-9, 861 - 867
- Larue L, Delmas V (2006): The WNT/Beta-catenin pathway in melanoma. *Front Biosci* 11, 733 - 742
- Laumanns IP, Fink L, Wilhelm J, Wolff JC, Mitnacht-Kraus R, Graef-Hoechst S, Stein MM, Bohle RM, Klepetko W, Hoda MAR (2009): The noncanonical WNT pathway is operative in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 6, 683 - 691

- Leandersson K, Riesbeck K, Andersson T (2006): Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells. *Nucleic Acids Res* 14, 3988 - 3999
- Leitlinienprogramm Onkologie 2017: Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Version 4.1: September 2018  
[[https://www.leitlinienprogramm-Onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom\\_4\\_0/Version\\_4.1/LL\\_Mammakarzinom\\_Langversion\\_4.1.pdf](https://www.leitlinienprogramm-Onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.1/LL_Mammakarzinom_Langversion_4.1.pdf)] abgerufen am 12.12.2018
- Levenson AS, Jordan VC (1997): MCF-7: the first hormone-responsive breast Cancer Cell line. *Cancer Res* 15, 3071 - 3078
- Lewis C, Murdoch C (2005): Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 3, 627 - 635
- Leyns L, Bouwmeester T, Kim SH, Piccolo S, Robertis EM de (1997): Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 6, 747 - 756
- Li P, Cao Y, Li Y, Zhou L, Liu X, Geng M (2014): Expression of Wnt-5a and  $\beta$ -catenin in primary hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 6, 3190 - 3195
- Li VSW, Ng SS, Boersema PJ, Low TY, Karthaus WR, Gerlach JP, Mohammed S, Heck AJR, Mahmoudi T, Clevers H (2012): Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* 6, 1245 - 1256
- Lin EY, Pollard JW (2007): Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res* 11, 5064 - 5066
- Lin G, Zang T, Zhang Z, Xing D, Guo Y (2000): Expression of T cell factor 4 in renal cell carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 6, 460 - 461
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (2002): Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 6, 837 - 847
- Logan CY, Nusse R (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781 - 810
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1, 265 - 275
- MacDonald BT, Tamai K, He X (2009): Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 1, 9 - 26

- 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* 11, 549 - 555
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008): Cancer-related inflammation. *Nature* 7203, 436 - 444
- Masckauchán TNH, Kitajewski J (2006): Wnt/Frizzled signaling in the vasculature: new angiogenic factors in sight. *Physiology (Bethesda)* 21, 181 - 188
- Medyouf H, Ghysdael J (2008): The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle* 3, 297 - 303
- Menck K, Klemm F, Gross JC, Pukrop T, Wenzel D, Binder C (2013): Induction and transport of Wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated by two types of extracellular vesicles. *Oncotarget* 11, 2057 - 2066
- Menck K, Behme D, Pantke M, Reiling N, Binder C, Pukrop T, Klemm F (2014): Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in teflon-coated cell culture bags. *J Vis Exp* 91, e51554
- Mikels AJ, Nusse R (2006): Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol* 4, e115
- Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destrée O, Clevers H (1996): XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 3, 391 - 399
- Moon RT, Campbell RM, Christian JL, McGrew LL, Shih J, Fraser S (1993): Xwnt-5A: a maternal Wnt that affects morphogenetic movements after overexpression in embryos of *Xenopus laevis*. *Development* 1, 97 - 111
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997): Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 5307, 1787 - 1790
- Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, Baetselier P de, van Ginderachter JA (2010): Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* 14, 5728 - 5739
- Mulligan KA, Fuerer C, Ching W, Fish M, Willert K, Nusse R (2012): Secreted Wingless-interacting molecule (Swim) promotes long-range signaling by maintaining Wingless solubility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2, 370 - 377



- Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C (2010): Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* 10, 1603 - 1611
- Naillat F, Prunskaitė-Hyyryläinen R, Pietilä I, Sormunen R, Jokela T, Shan J, Vainio SJ (2010): Wnt4/5a signalling coordinates cell adhesion and entry into meiosis during presumptive ovarian follicle development. *Hum Mol Genet* 8, 1539 - 1550
- Nemeth MJ, Bodine DM (2007): Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways. *Cell Res* 9, 746 - 758
- Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T (2004): DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 52, 8520 - 8526
- Nusse R, Varmus HE (1982): Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1, 99 - 109
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E (1980): Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 5785, 795 - 801
- Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Takada S, Minami Y (2003): The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 7, 645 - 654
- Ojalvo LS, Whittaker CA, Condeelis JS, Pollard JW (2010): Gene expression analysis of macrophages that facilitate tumor invasion supports a role for Wnt-signaling in mediating their activity in primary mammary tumors. *J Immunol* 2, 702 - 712
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005): Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 3, 335 - 348
- Panáková D, Sprong H, Marois E, Thiele C, Eaton S (2005): Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature* 7038, 58 - 65
- Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, Perou CM, Bernard PS (2009): Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 8, 1160 - 1167
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Brown PO, Botstein D (2000): Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 6797, 747 - 752

- Petersen CP, Reddien PW (2009): Wnt signaling and the polarity of the primary body axis. *Cell* 6, 1056 - 1068
- Phillips HM, Rhee HJ, Murdoch JN, Hildreth V, Peat JD, Anderson RH, Copp AJ, Chaudhry B, Henderson DJ (2007): Disruption of planar cell polarity signaling results in congenital heart defects and cardiomyopathy attributable to early cardiomyocyte disorganization. *Circ Res* 2, 137 - 145
- Piters E, Boudin E, van Hul W (2008): Wnt signaling: a win for bone. *Arch Biochem Biophys* 2, 112 - 116
- Place AE, Jin Huh S, Polyak K (2011): The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res* 6, 227
- Pluskota E, Soloviev DA, Szpak D, Weber C, Plow EF (2008): Neutrophil apoptosis: selective regulation by different ligands of integrin alphaMbeta2. *J Immunol* 5, 3609 - 3619
- Pluznik DH, Sachs L (1966): The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium. *Exp Cell Res* 3, 553 - 563
- Port F, Basler K (2010): Wnt trafficking: new insights into Wnt maturation, secretion and spreading. *Traffic* 10, 1265 - 1271
- Prasad CP, Chaurasiya SK, Axelsson L, Andersson T (2013): WNT-5A triggers Cdc42 activation leading to an ERK1/2 dependent decrease in MMP9 activity and invasive migration of breast Cancer Cells. *Mol Oncol* 5, 870 - 883
- Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A, Samaniego R, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Ratnam M, Sánchez-Mateos P, Corbí AL (2009): Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res* 24, 9395 - 9403
- Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trümper L, Binder C (2006): Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast Cancer Cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 14, 5454 - 5459
- Qian B, Deng Y, Im JH, Muschel RJ, Zou Y, Li J, Lang RA, Pollard JW (2009): A distinct macrophage population mediates metastatic breast Cancer Cell extravasation, establishment and growth. *PloS One* 8, e6562
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987): The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 4, 649 - 657

- Roarty K, Baxley SE, Crowley MR, Frost AR, Serra R (2009): Loss of TGF-beta or Wnt5a results in an increase in Wnt/beta-catenin activity and redirects mammary tumour phenotype. *Breast Cancer Res* 2, R19
- Sadeghi RS, Kulej K, Kathayat RS, Garcia BA, Dickinson BC, Brady DC, Witze ES (2018): Wnt5a signaling induced phosphorylation increases APT1 activity and promotes melanoma metastatic behavior. *Elife* 7, e34362
- Sampietro J, Dahlberg CL, Cho US, Hinds TR, Kimelman D, Xu W (2006): Crystal structure of a beta-catenin/BCL9/Tcf4 complex. *Mol Cell* 2, 293 - 300
- Schlessinger K, McManus EJ, Hall A (2007): Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J Cell Biol* 3, 355 - 361
- Seifert JRK, Mlodzik M (2007): Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility. *Nat Rev Genet* 2, 126 - 138
- Semënov MV, Tamai K, Brott BK, Kühl M, Sokol S, He X (2001): Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* 12, 951 - 961
- Shet AS (2008): Characterizing blood microparticles: technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag* 4, 769 - 774
- Shitashige M, Satow R, Honda K, Ono M, Hirohashi S, Yamada T (2008): Regulation of Wnt signaling by the nuclear pore complex. *Gastroenterology* 7, 1961-71
- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A (1999): The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 10, 5522 - 5527
- Sica A, Sacconi A, Mantovani A (2002): Tumor-associated macrophages: a molecular perspective. *Int Immunopharmacol* 8, 1045 - 1054
- Sica A, Mantovani A (2012): Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 3, 787 - 795
- Siveen KS, Kuttan G (2009): Role of macrophages in tumour progression. *Immunol Lett* 2, 97 - 102
- Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008): Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 12, 1470 - 1476
- Slusarski DC, Corces VG, Moon RT (1997): Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 6658, 410 - 413

- Smit L, Baas A, Kuipers J, Korswagen H, van de Wetering M, Clevers H (2004): Wnt activates the Tak1/Nemo-like kinase pathway. *J Biol Chem* 17, 17232 - 17240
- Smith K, Bui TD, Poulsom R, Kaklamanis L, Williams G, Harris AL (1999): Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 3, 496 - 502
- Song L, Liu D, Wang B, He J, Zhang S, Dai Z, Ma X, Wang X (2015): miR-494 suppresses the progression of breast cancer in vitro by targeting CXCR4 through the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncol Rep* 1, 525 - 531
- Spiegelman VS, Tang W, Katoh M, Slaga TJ, Fuchs SY (2002): Inhibition of HOS expression and activities by Wnt pathway. *Oncogene* 5, 856 - 860
- Stefater JA, Lewkowich I, Rao S, Mariggi G, Carpenter AC, Burr AR, Fan J, Ajima R, Gerhardt H, Lang RA (2011): Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature* 7352, 511 - 515
- Steiner JL, Murphy EA (2012): Importance of chemokine (CC-motif) ligand 2 in breast cancer. *Int J Biol Markers* 3, e179-85
- Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X (2004): A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 1, 149 - 156
- Tan Z, Zheng H, Liu X, Zhang W, Zhu J, Wu G, Song J, Wu S, Song L, Li J (2016): MicroRNA-1229 overexpression promotes cell proliferation and tumorigenicity and activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in breast cancer. *Oncotarget* 17, 24076 - 24087
- Tanaka K, Kitagawa Y, Kadowaki T (2002): Drosophila segment polarity gene product porcupine stimulates the posttranslational N-glycosylation of wingless in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 15, 12816 - 12823
- Tao Q, Yokota C, Puck H, Kofron M, Birsoy B, Yan D, Asashima M, Wylie CC, Lin X, Heasman J (2005): Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in Xenopus embryos. *Cell* 6, 857 - 871
- Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V (2002): Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* 2, 673 - 680
- ten Berge D, Koole W, Fuerer C, Fish M, Eroglu E, Nusse R (2008): Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell* 5, 508 - 518
- ten Berge D, Kurek D, Blauwkamp T, Koole W, Maas A, Eroglu E, Siu RK, Nusse R (2011): Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat Cell Biol* 9, 1070 - 1075

- Thein SL, Lynch JR, Weatherall DJ, Wallace RB (1986): Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides. *Lancet* 8472, 93
- Tsukamoto AS, Grosschedl R, Guzman RC, Parslow T, Varmus HE (1988): Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* 4, 619 - 625
- Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S (2005): Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. *Oncol Rep* 2, 425 - 431
- Vadlakonda L, Pasupuleti M, Pallu R (2013): Role of PI3K-AKT-mTOR and Wnt Signaling Pathways in Transition of G1-S Phase of Cell Cycle in Cancer Cells. *Front Oncol* 3, 85
- van Amerongen R, Mikels A, Nusse R (2008): Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signaling* 1, re9
- van Amerongen R, Bowman AN, Nusse R (2012): Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/ $\beta$ -catenin-responsive stem cells in the mammary gland. *Cell Stem Cell* 3, 387 - 400
- van Genderen C, Okamura RM, Fariñas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L, Grosschedl R (1994): Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev* 22, 2691 - 2703
- van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, Baetselier P de (2006): Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 6-8, 487 - 501
- Veeck J, Wild PJ, Fuchs T, Schüffler PJ, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E (2009): Prognostic relevance of Wnt-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (DKK3) promoter methylation in human breast cancer. *BMC Cancer* 9, 217
- Vermeulen L, Sousa E Melo F de, van der Heijden M, Cameron K, Jong JH de, Borovski T, Tuynman JB, Todaro M, Stassi G, Medema JP (2010): Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* 5, 468 - 476
- Vérollet C, Charrière GM, Labrousse A, Cougoule C, Le Cabec V, Maridonneau-Parini I (2011): Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough. *Eur J Immunol* 10, 2805 - 2813
- Volodko N, Reiner A, Rudas M, Jakesz R (1998): Tumour-associated macrophages in breast cancer and their prognostic correlations. *Breast* 2, 99 - 105

- Wang J, Mark S, Zhang X, Qian D, Yoo S-J, Radde-Gallwitz K, Zhang Y, Lin X, Collazo A, Wynshaw-Boris A, Chen P (2005): Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway. *Nat Genet* 9, 980 - 985
- Weber-Hall SJ, Phippard DJ, Niemeyer CC, Dale TC (1994): Developmental and hormonal regulation of Wnt gene expression in the mouse mammary gland. *Differentiation* 3, 205 - 214
- Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM (2002): Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 3, 279 - 288
- Wehrle-Haller B, Imhof BA (2003): Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* 1, 39 - 50
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR, Nusse R (2003): Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 6938, 448 - 452
- Witz IP, Levy-Nissenbaum O (2006): The tumor microenvironment in the post-PAGET era. *Cancer Lett* 1, 1 - 10
- Wyckoff JB, Wang Y, Lin EY, Li JF, Goswami S, Stanley ER, Segall JE, Pollard JW, Condeelis J (2007): Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* 6, 2649 - 2656
- Yan D, Lin X (2009): Shaping morphogen gradients by proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a002493
- Zhou D, Tang W, Wang W, Pan X, An HX, Zhang Y (2016): Association between aberrant APC promoter methylation and breast cancer pathogenesis: a meta-analysis of 35 observational studies. *PeerJ* 4, e2203
- Zollo M, Di Dato V, Spano D, Martino D de, Liguori L, Marino N, Vastolo V, Navas L, Biondi G, Guglielmotti A (2012): Targeting monocyte chemotactic protein-1 synthesis with bindarit induces tumor regression in prostate and breast cancer animal models. *Clin Exp Metastasis* 6, 585 - 601
- Zuo Y, Wu Y, Chakraborty C (2012): Cdc42 negatively regulates intrinsic migration of highly aggressive breast Cancer Cells. *J Cell Physiol* 4, 1399 - 1407