

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

Technische Universität München

(Ärztlicher Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

**RCAS-TVA-vermittelter retroviraler  
Gentransfer zur funktionellen Genanalyse in  
einem murinen Pankreaskarzinommodell**

Ulrich Georg Mayr

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. D. K. M. Saur  
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 25.08.2009 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.12.2009  
angenommen.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>S.</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Genetik des humanen Pankreaskarzinoms</b>	<b>8</b>
1.2.1 Grundlagen der Zellzyklus-Regulation	9
1.2.2 Rolle der Onkogene	11
1.2.3 Wichtige Tumorsuppressorgene	12
1.2.4 Seltenerer Veränderungen beim Pankreaskarzinom	15
1.2.5 Humane Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2	15
<b>1.3 Murine Pankreaskarzinomzelllinie TD-2</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Molekulare Bildgebung</b>	<b>17</b>
1.4.1 Fluoreszenz-Imaging (FLI)	18
1.4.2 Biolumineszenz-Imaging (BLI)	19
<b>1.5 RCAS-TVA-basierter retroviraler Gentransfer</b>	<b>20</b>
<b>1.6 Herabregulation der Genexpression durch RNA-Interferenz (RNAi)</b>	<b>23</b>
<b>1.7 Expressionsplasmid für EGFP-fluc und TVA</b>	<b>25</b>
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Klonierungsmethoden, Transformation von Bakterien und Plasmidpräparation</b>	<b>29</b>
3.1.1 Klonierung von cDNA- und shRNA-Kassetten	29
3.1.1.1 Vorbereitung der cDNA-Kassetten	29
3.1.1.2 Herstellung der shRNA-Kassetten	30
3.1.1.3 Verwendete Vektoren	32
3.1.1.3.1 pENTR / D-TOPO	32
3.1.1.3.2 pENTR / H1 / TO	32
3.1.1.3.3 RCAS-Vektor	33
3.1.1.4 Klonierung von cDNA und ds shRNA in die Entry-Vektoren	34
3.1.1.5 Rekombination	34

---

3.1.2	Transformation von kompetenten E.coli Bakterien	34
3.1.2.1	Verwendete Bakterien, Nährmedien und Kultivierung	34
3.1.2.2	Transformation der klonierten Plasmide	35
3.1.3	Screening transformierter Bakterien	36
3.1.3.1	Bakterien-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)	36
3.1.3.2	Analyse der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese	37
3.1.4	Plasmidpräparation	39
3.1.4.1	Isolierung der Plasmid-DNA	39
3.1.4.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	39
3.1.4.3	Enzymatischer Verdau der Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen	40
3.1.4.4	Sequenzierung der klonierten DNA-Abschnitte	41
<b>3.2</b>	<b>Zellkultur, Proteinernte und Proteinanalyse</b>	<b>42</b>
3.2.1	Allgemeines	42
3.2.1.1	Verwendete Materialien	42
3.2.1.2	Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen	43
3.2.1.2.1	DF-1	43
3.2.1.2.2	MIA PaCa-2	43
3.2.1.2.3	TD-2	44
3.2.1.3	Herstellung von Dauerkulturen	44
3.2.2	Retrovirale Infektion <i>in vitro</i>	44
3.2.2.1	Transiente Transfektion von DF-1-Zellen mit Hilfe von Superfect	44
3.2.2.2	Virusernte und Infektion der Zelllinien	45
3.2.2.3	$\beta$ -Galactosidase-Färbung nach Infektion mit RCAS lacZ	46
3.2.2.4	Quantifizierung der Luziferaseaktivität <i>in vitro</i>	46
3.2.2.5	BrdU-Zellproliferations-Assay	47
3.2.3	Induzierte Expression retroviral transferierter Gene	48
3.2.3.1	Retrovirale Infektion mit dem Tet-Repressor	48
3.2.3.2	Prinzip der tetrazyklin-gesteuerten Expression	49
3.2.4	Proteinernte, Proteinkonzentrationsbestimmung und Western-Blot-Analyse	49
3.2.4.1	Zellernte und Proteinextraktion	50
3.2.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	50
3.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51

3.2.4.4	Western-Blot-Analyse und immunologische Detektion	52
<b>3.3</b>	<b><i>In vivo</i>-Versuche</b>	<b>54</b>
3.3.1	Verwendeter Mausstamm und Tierhaltung	54
3.3.1.1	Nacktmausstamm Swiss nu / nu, Charles River	54
3.3.1.2	Haltung der Mäuse	54
3.3.2	Tierexperimentelle Methoden	54
3.3.2.1	Verwendete Apparaturen, Narkotika und Analgetika	55
3.3.2.2	Orthotope Implantation von Tumorzellen in das Pankreas	56
3.3.2.2.1	Vorbereitung der Zellen	56
3.3.2.2.2	Lagerung, Anästhesie und Analgesie der Mäuse	56
3.3.2.2.3	Intrapankreatische Injektion der Tumorzellen	57
3.3.2.3	Intraperitoneale Injektion von DF-1-Zellen	58
3.3.3	<i>In vivo</i> -Biolumineszenz-Imaging (BLI)	58
3.3.3.1	Injektionsnarkose der Mäuse (VAA)	59
3.3.3.2	Verwendete Materialien und Aufnahmetechnik	59
3.3.3.3	Auswertung der BLI-Aufnahmen	60
3.3.4	Ablauf der Versuchsreihen	60
3.3.4.1	Gruppierung der Mäuse	61
3.3.4.2	Tötung der Tiere, Tumorentnahme und Gewichtsbestimmung	61
3.3.4.3	$\beta$ -Galactosidase-Färbung entnommener Gewebe	62
3.3.5	Statistische Methoden	63
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Etablierung des RCAS-TVA-vermittelten retroviralen Gentransfers <i>in vitro</i></b>	<b>64</b>
4.1.1	Infektion TVA-exprimierender Zelllinien mit RCAS lacZ	64
4.1.2	Knockdown der Reportergene <i>EGFP</i> und <i>fluc</i>	65
4.1.3	Tetrazyklin-regulierte Genexpression <i>in vitro</i>	67
<b>4.2</b>	<b>Korrelation von Biolumineszenzsignal <i>in vivo</i> und Tumorgewicht <i>ex vivo</i></b>	<b>69</b>
<b>4.3</b>	<b>Wachstumsverhalten orthotop implantierter Pankreaskarzinomzellen</b>	<b>73</b>

---

<b>4.4</b>	<b>Etablierung des RCAS-TVA-basierten retroviralen Gentransfers <i>in vivo</i></b>	<b>74</b>
4.4.1	Prinzip der <i>in vivo</i> -Infektion	74
4.4.2	Retroviraler Gentransfer des <i>lacZ</i> -Reportergens <i>in vivo</i>	75
4.4.3	Knockdown der <i>fluc</i> -Expression mittels RNAi <i>in vivo</i>	76
<b>4.5</b>	<b>Funktionelle Genanalyse mittels RCAS-TVA-vermitteltem retroviralem Gentransfer <i>in vitro</i></b>	<b>79</b>
4.5.1	Proliferationsanalyse nach Rekonstitution von <i>p53</i> , <i>p16<sup>INK4a</sup></i> und <i>p19<sup>ARF</sup></i> bzw. Knockdown von <i>EGF-R</i> und <i>c-myc</i>	79
4.5.2	Western-Blot-Analyse der <i>p53</i> -, <i>p16<sup>INK4a</sup></i> - und <i>p19<sup>ARF</sup></i> - bzw. <i>EGF-R</i> - und <i>c-myc</i> -Expression nach RCAS-TVA-vermitteltem retroviralem Gentransfer	81
<b>4.6</b>	<b>Funktionelle Genanalyse in einem murinen Transplantationsmodell des Pankreaskarzinoms</b>	<b>83</b>
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
5.1	RCAS-TVA-vermittelter retroviraler Gentransfer	89
5.2	Validität der Methode des Biolumineszenz-Imaging zur longitudinalen Verlaufsbeobachtung von Tumoren <i>in vivo</i>	91
5.3	Funktionelle Genanalyse <i>in vivo</i>	94
5.3.1	Reexpression des Tumorsuppressorgens <i>p53</i>	95
5.3.2	Herabregulation der EGF-Rezeptor-Expression durch RNAi	97
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>100</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>111</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>117</b>
<b>11.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>118</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Das duktales Adenokarzinom des Pankreas

Das duktales Adenokarzinom ist der häufigste bösartige Tumor des Pankreas. Es handelt sich um einen hochmalignen epithelialen Tumor, dessen Inzidenz in den westlichen Ländern bei ca. 10 pro 100000 Einwohnern liegt. Das Karzinom rangiert mit einem Anteil von 2 % aller Malignome an 10. Stelle in der Rangfolge der häufigsten Krebserkrankungen, stellt jedoch bei Männern und Frauen jeweils die vierthäufigste tumorassoziierte Todesursache dar. Die Mortalitätsrate des Pankreaskarzinoms entspricht mit 10 pro 100000 Einwohner nahezu der Inzidenzrate, was gemeinsam mit der niedrigen 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von unter 5 % die schlechte Prognose der Erkrankung unterstreicht. Das Hauptmanifestationsalter liegt jenseits des 65. Lebensjahres, sodass die steigende Lebenserwartung zu einer Erhöhung der absoluten Häufigkeit in der westlichen Welt beiträgt. Trotz neuer Behandlungsmodalitäten und detaillierter Kenntnisse über die molekularen und genetischen Vorgänge der Karzinogenese haben sich die Überlebenszeiten der Erkrankten während der letzten 20 Jahre nicht wesentlich verbessert (Jemal et al., 2007; Schneider et al., 2005; Verslype et al., 2007; Parkin et al., 2001; Rosewicz et al., 1997; Hezel et al., 2006).

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist unzureichend geklärt. Als etablierte Risikofaktoren gelten Nikotinkonsum, zunehmendes Alter, hoher Body-mass-Index sowie langjährige chronische oder hereditäre Pankreatitis (Lowenfels et al., 2002). Aktuell wird geschätzt, dass bis zu 10 % aller Patienten eine positive Familienanamnese mit  $\geq 2$  erstgradigen Verwandten mit Pankreaskarzinom aufweisen (Verslype et al., 2007). Darunter fallen u.a. bekannte genetische Syndrome wie die hereditäre BRCA2-Mutation, das Peutz-Jeghers-Syndrom, das Lynch-Syndrom (HNPCC), die familiäre Polyposis Coli (FAP) oder das familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanom-Syndrom (FAMMM) (Petersen et al., 2006).

Da das Pankreas durch keine Kapsel abgegrenzt ist, infiltriert der Tumor direkt in das Retroperitoneum und die großen Gefäße; dies begünstigt eine frühzeitige lymphogene, perineurale und hämatogene Metastasierung mit daraus folgender Irresektabilität (Böcker, 2004). Neben der Tendenz zur raschen lokalen Ausbreitung

und Fernmetastasierung liegt ein weiterer Grund für die schlechte Prognose der Erkrankung in der häufig späten Erstdiagnose aufgrund fehlender Frühsymptome. Beschwerden entstehen meist durch das fortschreitende Wachstum des Tumors mit Kompression benachbarter Strukturen, was zu Verschlussikterus, Rückenschmerzen, Appetitlosigkeit, epigastrischen Beschwerden, Malabsorption mit Gewichtsverlust oder Pankreatitis führen kann (Li et al., 2004).

Zum Zeitpunkt der Diagnose zeigen ca. 40 % der Patienten ein lokal fortgeschrittenes bzw. nicht mehr resektables Tumorstadium und ca. 40 % bereits viszerale Metastasen, in erster Linie Leberfiliae und peritoneale Absiedelungen. Eine chirurgische Resektion als kurative Therapieform stellt demnach nur für 10-20 % aller Patienten eine primäre Behandlungsoption dar (Verslype et al., 2007). Rezidive nach Resektion sind häufig, was zu einer niedrigen 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate nach Operation von 10-25 % führt (Pisters et al., 2005).

Die Prognose von Patienten im nicht-resektablen Tumorstadium ist unter Best-supportive-care-Behandlung mit einem medianen Überleben von 3-6 Monaten sehr schlecht (Sener et al., 1999). Die Behandlung der Wahl für diese Patienten ist die palliative systemische Chemotherapie mit Gemcitabine, die zu einer geringgradigen Verlängerung des medianen Überlebens führt, vor allem aber die Lebensqualität der Patienten verbessern kann (Verslype et al., 2007).

Gemcitabine ist das Standard-Chemotherapeutikum in der Behandlung des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms und zeichnet sich v.a. durch einen Benefit der Lebensqualität mit Verminderung der krankheitsassoziierten Symptome aus (Burris et al., 1997). Die Prognose der Patienten lässt sich allerdings nur gering beeinflussen, mit einem medianen Überleben von 5,65 Monaten gegenüber 4,41 Monaten unter Chemotherapie mit 5-FU sowie einer 1-Jahres-Überlebensrate von 18 % gegenüber 2 % unter 5-FU (Burris et al., 1997). In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche weitere Substanzen in Studien mit Gemcitabine verglichen oder kombiniert. Dabei war jedoch bisher keine Substanz der Monotherapie von Gemcitabine überlegen (Saif, 2007).

Trotz der mäßigen Erfolge der letzten Jahre zeigten zwei vor kurzem durchgeführte Studien mit Kombinationstherapien eine marginale Verbesserung der medianen Überlebenszeiten. Die zusätzliche Gabe von Capecitabine gegenüber der standardmäßigen alleinigen Gabe von Gemcitabine resultierte bei einer Subgruppe

von Patienten mit sehr gutem Allgemeinzustand in einem geringen, aber statistisch signifikanten Anstieg des medianen Überlebens (Herrmann et al., 2007).

Ein neuerer Angriffspunkt in der palliativen Therapie des Pankreaskarzinoms ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R), welcher durch den Einsatz moderner Antikörper oder „small molecules“ gezielt blockiert werden kann. Während die zusätzliche Gabe von Cetuximab in Phase III-Untersuchungen die vielversprechenden Ergebnisse aus Voruntersuchungen nicht bestätigen konnte (Saif, 2007), zeigte eine aktuelle Studie Vorteile einer Kombination aus Gemcitabine mit dem small molecule EGF-R-Inhibitor Erlotinib bzgl. des Überlebens von Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung. Die zusätzliche Gabe von Erlotinib resultierte in einer Verlängerung des medianen Überlebens auf 6,24 Monate gegenüber 5,91 Monaten unter Gemcitabine plus Placebo sowie einer Erhöhung der 1-Jahres-Überlebensrate auf 24 % gegenüber 19 % (Moore et al., 2007).

Das Pankreaskarzinom ist weiterhin eine Erkrankung mit schlechter Prognose aufgrund der ausgeprägten Tendenz zur Lokal- und Fernmetastasierung. Trotz der Fortschritte bei der chirurgischen Behandlung und unterstützender Therapie sowie ermutigender Ergebnisse neuer Substanzen in der palliativen Chemotherapie sind die Verbesserungen bzgl. der Überlebenszeiten gering. Die Hoffnung bei der Erforschung wirksamer Behandlungsmodalitäten ruht v.a. auf Multikinaseinhibitoren, die mehrere tumorrelevante Signalwege inhibieren. Durch eine verbesserte prätherapeutische Selektion sollten zudem diejenigen Erkrankten frühzeitig identifiziert werden, welche von neuen individualisierten Therapieregimen mit höherer Wahrscheinlichkeit profitieren (Saif, 2007; Rocha-Lima et al., 2007).

## **1.2 Genetik des humanen Pankreaskarzinoms**

Im Zentrum der Karzinogenese des Pankreas steht die Deregulation des Zellzyklus. Die Ursache für die Entartung der Zellen liegt dabei nicht in der Fehlsteuerung eines einzelnen Gens sondern vielmehr in der stufenweise ablaufenden, fortschreitenden Akkumulation von genetischen Veränderungen, mit Überexpression von Wachstumsfaktoren, Onkogen-Aktivierung und Verlust von Tumorsuppressorgenen (Schneider und Schmid, 2003). Die sequenzielle Akquisition von genetischen Mutationen drückt sich aus in der schrittweisen Entwicklung von Vorläuferläsionen, den pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN), welche in 3 Grade unterteilt



werden und schließlich in ein invasives Karzinom übergehen (Hruban et al., 2001). Dieses Tumor-Progressions-Modell aus der Kombination von genetischen und morphologischen Veränderungen ähnelt der Adenom-Karzinom-Sequenz des Kolonkarzinoms (siehe Abbildung 1; Hruban et al., 2000). Die initiale Läsion in dieser „multi-hit“-Hypothese der Tumorgenese ist die Mutation des Onkogens *K-Ras*. Zu den häufigen darauf folgenden Veränderungen zählen Verluste der Tumorsuppressoren *p16<sup>Ink4a</sup>*, *p53*, *Smad4 (DPC4)* und *BRCA2*, welche histologisch mit Stadien zunehmender intraepithelialer Neoplasie bis hin zum invasiven Karzinom korrelieren (Hruban et al., 2001; Saif et al., 2007; Schneider und Schmid, 2003).

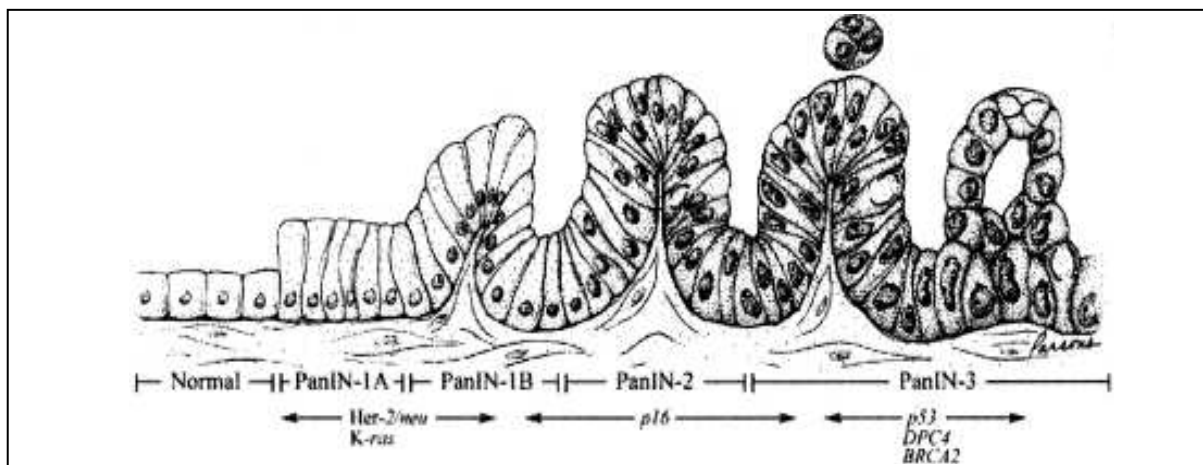


Abbildung 1: Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms (Hruban et al., 2000)

### 1.2.1 Grundlagen der Zellzyklus-Regulation

Die Regulation des Zellzyklus ist das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels vieler Proteine, welche in die Gruppen Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) und CDK-Inhibitoren (CKI) unterteilt werden können (Saif et al., 2007). Dieses Netzwerk kontrolliert die Zellteilung am G1-„checkpoint“ vor Eintritt in die S-Phase und Beginn der DNA-Replikation. Entscheidend für diesen G1 / S-Übergang ist die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins Rb durch aktive Komplexe aus CDKs mit ihren entsprechenden Cyclinen als regulatorischen Einheiten. Durch die Phosphorylierung erfolgt eine Dissoziation des Transkriptionsfaktors E2F von Rb und damit der Übertritt in die S-Phase (Sherr, 1996).

Während in der frühen G1-Phase v.a. D-Cycline gemeinsam mit ihren katalytischen Einheiten CDK4 und CDK6 die Zellteilung vorantreiben, ist in der späteren G1-Phase v.a. der Komplex aus Cyclin E mit CDK2 aktiv. Gerade die Synthese der D-Cycline

wird direkt und indirekt durch verschiedene Mitogene induziert, zu denen u.a. auch aktiviertes Ras, das Onkogen *c-myc* oder die Signalkaskade des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGF-R) zu zählen sind (Ghaneh et al., 2007).

Der hemmende Effekt der CKIs auf die Progression des Zellzyklus beruht auf der Inhibition der Komplexe aus Cyclinen und CDKs mit Blockade der Phosphorylierung von Rb (Saif et al., 2007). Zu den wichtigsten direkten CKIs zählen p15, p16, p21 und p27. Das Tumorsuppressorgen *p53* vermittelt seine inhibierenden Effekte u.a. durch Stimulation der p21-Synthese. *Smad4* (*DPC4*) ist ein wichtiger Bestandteil in der Signaltransduktion des Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), welche den Fortgang des Zellzyklus u.a. über Transkription von CKIs sowie durch Inhibition von *c-myc* bremst. Abbildung 2 veranschaulicht die wichtigsten genetischen Alterationen beim humanen Pankreaskarzinom mit ihren Auswirkungen auf den Zellzyklus.

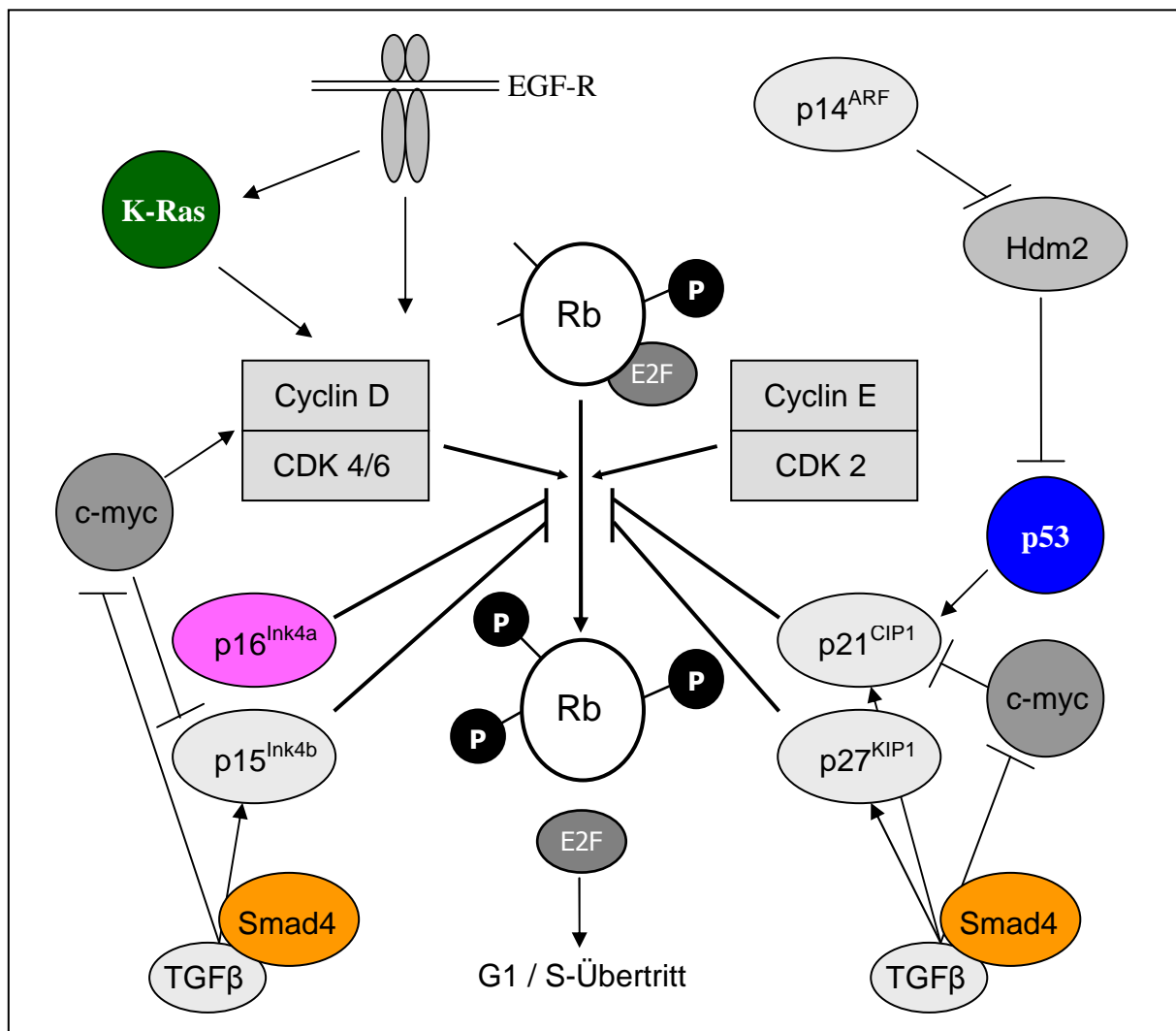


Abbildung 2: Zusammenspiel der wichtigsten genetischen Veränderungen beim humanen Pankreaskarzinom am G1 / S-Übergang

## 1.2.2 Rolle der Onkogene

Als Onkogene werden Gene bezeichnet, deren Aktivierung die Karzinogenese initiieren kann (Saif et al., 2007).

Die Mitglieder der Ras-Familie gehören zu den GTP-bindenden Proteinen und übernehmen eine Vielzahl von Funktionen bzgl. Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zelle (Malumbres et al., 2003). Das Pankreaskarzinom ist der humane Tumor mit der höchsten Inzidenz an aktivierenden Mutationen von *K-Ras* (Almoguera et al., 1988). Dabei handelt es sich typischerweise um Punktmutationen in Codon 12 von *K-Ras*, welche mit einer Häufigkeit von 30 % bereits in PanIN-Läsionen auftreten und in 100 % aller fortgeschrittener Tumoren nachgewiesen werden können (Klimstra und Longnecker, 1994; Hezel et al., 2006). Durch die Mutation verbleibt K-Ras in seiner GTP-bindenden, aktiven Form mit andauernder Stimulation multipler Signalkaskaden, zu denen vorrangig der Raf/MAP-Kinase (ERK)-, der Phosphoinositol-3-Kinase- und der Ral-GDS-Signaltransduktionsweg zu zählen sind (Campbell et al., 1998).

Die Familie der ErbB-Rezeptoren besteht aus 4 Mitgliedern von Wachstumsfaktor-rezeptoren mit intrinsischer Tyrosin-Kinase-Aktivität, die als Her-1 oder epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R) im engeren Sinne, Her-2/neu, Her-3 und Her-4 bezeichnet werden (Yarden et al., 2001). Die Interaktion mit Liganden wie EGF oder TGF $\alpha$  bewirkt eine Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden wie des Ras-Raf-MAPK (ERK)- oder des PI3K-Akt-pathways mit proliferationsfördernden und apoptosehemmenden Effekten (Mendelsohn und Baselga, 2003). Abbildung 3 erläutert die wichtigsten „downstream“-Kaskaden nach Stimulation des Rezeptors. Eine Überexpression von *EGF-R* in Brust-, Darm- oder Lungenkarzinomen ist bereits bekannt und häufig mit aggressiverem Wachstum sowie schlechterer Prognose assoziiert (Saif et al., 2007). Zudem weist auch ein signifikanter Anteil von Patienten mit Pankreaskarzinom eine Überexpression von *EGF-R* mit Aktivierung der entsprechenden Signalkaskaden auf (Korc et al., 1992; Lemoine et al., 1992; Tzeng et al., 2007). Ein weiterer in der Genese vieler Tumoren involvierter Wachstumsfaktorrezeptor ist Her-2 / neu (ErbB2); eine Amplifikation findet sich in 10-60 % aller Fälle von Pankreaskarzinomen. Sie zählt neben der *K-Ras*-Mutation offenbar auch zu den frühzeitig im Verlauf der Tumorgenese auftretenden genetischen Veränderungen (Talar-Wojnarowska et al., 2006).

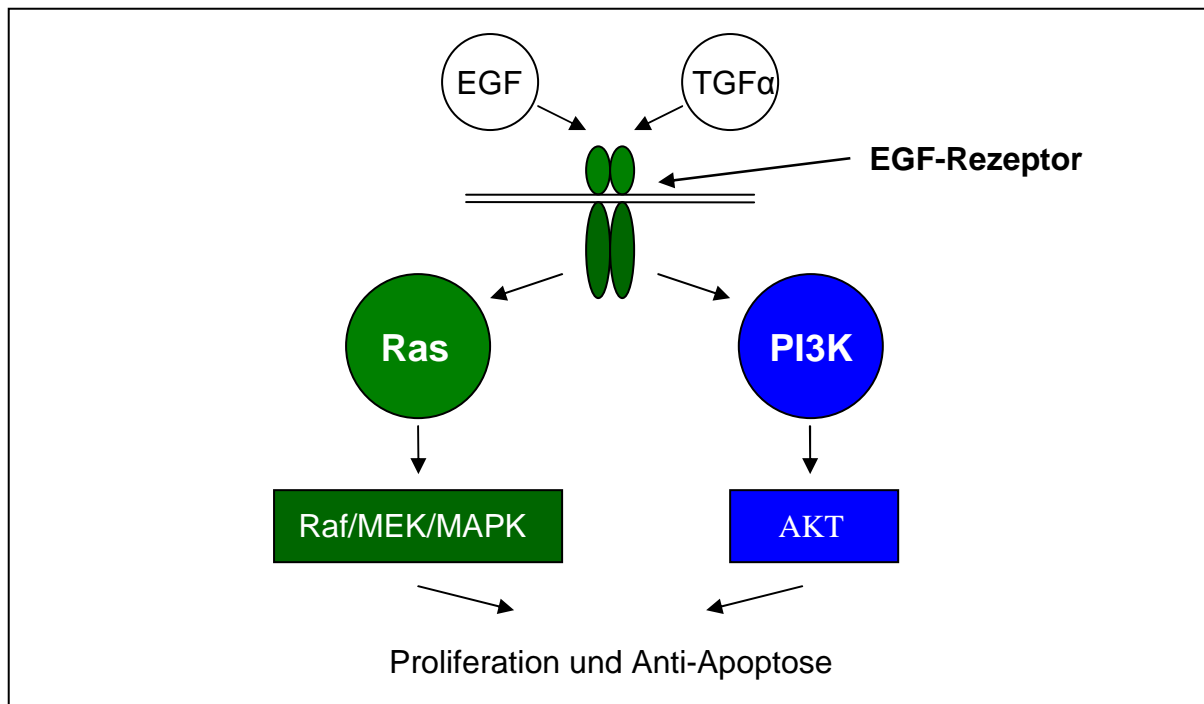


Abbildung 3: Wichtige Signalkaskaden von EGF-R

Das Onkogen *c-myc* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der über viele Zielgene direkt und indirekt an der Progression des Zellzyklus beteiligt ist (Dang, 1999). Die Induktion der G1-spezifischen Cycline und CDKs bei gleichzeitiger Inhibition von CKIs wie  $p15^{\text{Ink4b}}$  und  $p21^{\text{CIP1}}$  fördert die Progression des G1 / S-Übertritts im Zellzyklus (Amati et al., 1998). Die Deregulation von *c-myc* stellt ein zentrales Element in der malignen Transformation bei zahlreichen humanen Karzinomen dar (Adhikary und Eilers, 2005). Auch in bis zu 70 % aller Pankreaskarzinome findet sich eine Überexpression von *c-myc*, wofür nach derzeitigem Stand v.a. transkriptionelle Deregulationen verantwortlich sein sollen (Li et al., 2005; Buchholz et al., 2006).

### 1.2.3 Wichtige Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene kodieren für Faktoren mit protektiver Funktion gegen eine maligne Transformation der Zelle. Ihr Verlust sowie eine gestörte Balance zwischen Tumorsuppressoren und Onkogenen sind wichtige Schritte in der Initiierung und Progression der Karzinogenese (Saif et al., 2007).

*p53* ist das am häufigsten mutierte Gen in malignen Tumoren des Menschen (Toledo et al., 2006). Es ist in 50-75 % aller Fälle fortgeschrittener Pankreaskarzinome inaktiviert oder mutiert (Talar-Wojnarowska et al., 2006). Das auf Chromosom 17 ge-

legene „Genomwächterprotein“ kodiert für einen nukleären Transkriptionsfaktor mit zentraler Rolle in der Zellzyklusregulation. Die wichtigsten Funktionen bestehen in einer Blockade des Zellzyklus am G1 / S-Checkpoint durch Stimulation der p21-Synthese sowie in der Erhaltung der genomischen Stabilität (Lane, 1992). Während der Transkriptionsfaktor unter normalen Bedingungen aufgrund der raschen Degradation durch die Ubiquitin Ligase Hdm2 funktionell inaktiv ist, führen Stresssignale zu einer Akkumulation des p53-Proteins durch Inhibierung des Hdm2-gesteuerten Abbaus (Hayon und Haupt, 2002). Zu den bekanntesten Stressoren zählt die direkte Schädigung der DNA durch z.B. Strahlenbelastung oder oxidativen Stress, was zu einer Aktivierung des *p53*-Gens mit DNA-Reparatur oder aber Apoptose der Zelle führt (Sherr, 2004). Nach Erkenntnissen aus neueren Mausmodellen jedoch scheint diese p53-Antwort bzgl. der tumorsuppressiven Funktion von geringerer Bedeutung zu sein, da *p53*-defiziente Zellen auf direkte DNA-Schädigung mit anderen Formen des Zelltodes reagieren können (Christophorou et al., 2006). Entscheidend für die protektive Wirkung ist vielmehr die auf onkogene Stimulation frühzeitig folgende Antwort von *p53*, welche durch intaktes ARF vermittelt wird und die Vermehrung von Zellen mit Mutationen bremst bzw. deren Apoptose einleitet. Die Integrität der ARF-Funktion könnte daher den entscheidenden Faktor für die tumorsuppressive Funktion von *p53* darstellen (Efeyan und Serrano, 2007; Voudsen und Lane, 2007). Abbildung 4 fasst die wichtigsten Faktoren der p53-Antwort schematisch zusammen.

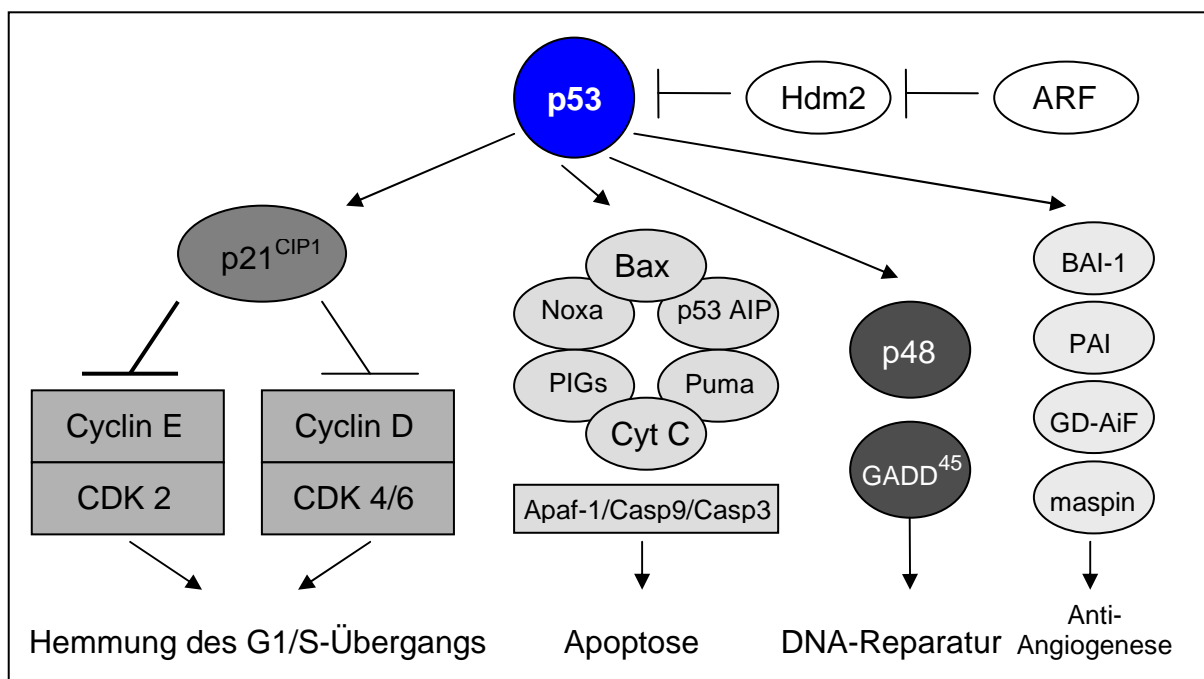


Abbildung 4: Übersicht über die Funktionen von p53

Ein wichtiger Abschnitt auf Chromosom 9 beinhaltet die überlappenden Sequenzen Ink4a und ARF, welche für die Tumorsuppressoren  $p16^{Ink4a}$  und  $p14^{ARF}$ , das humane Analogon zum murinen  $p19^{ARF}$ , kodieren. Ink4a hemmt die Progression des Zellzyklus durch direkte Inhibierung des Cyclin D / CDK4/6- Komplexes, wodurch die funktionell aktivierende Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins verhindert wird. ARF ist wie bereits erwähnt ein entscheidender Faktor für die tumorsuppressive Wirkung von p53, da es die Ubiquitin Ligase Aktivität von Hdm2 blockiert und somit das „Genomwächterprotein“ vor der raschen Degradation durch Hdm2 bewahrt (Sherr, 2001). Die indirekte Regulation von Rb durch Ink4a ist ebenso wie die indirekte Stabilisierung von p53 durch ARF in Abbildung 5 verdeutlicht dargestellt (Schneider und Schmid, 2003). Für die Genese des humanen Pankreaskarzinoms scheint der Verlust der  $p16^{Ink4a}$ -Funktion entscheidend zu sein, welcher durch Promotor-Hypermethylierung, Deletion oder Mutation bedingt sein kann und sich bei 80-95 % aller Fälle von Pankreaskarzinom findet (Rozenblum et al., 1997).

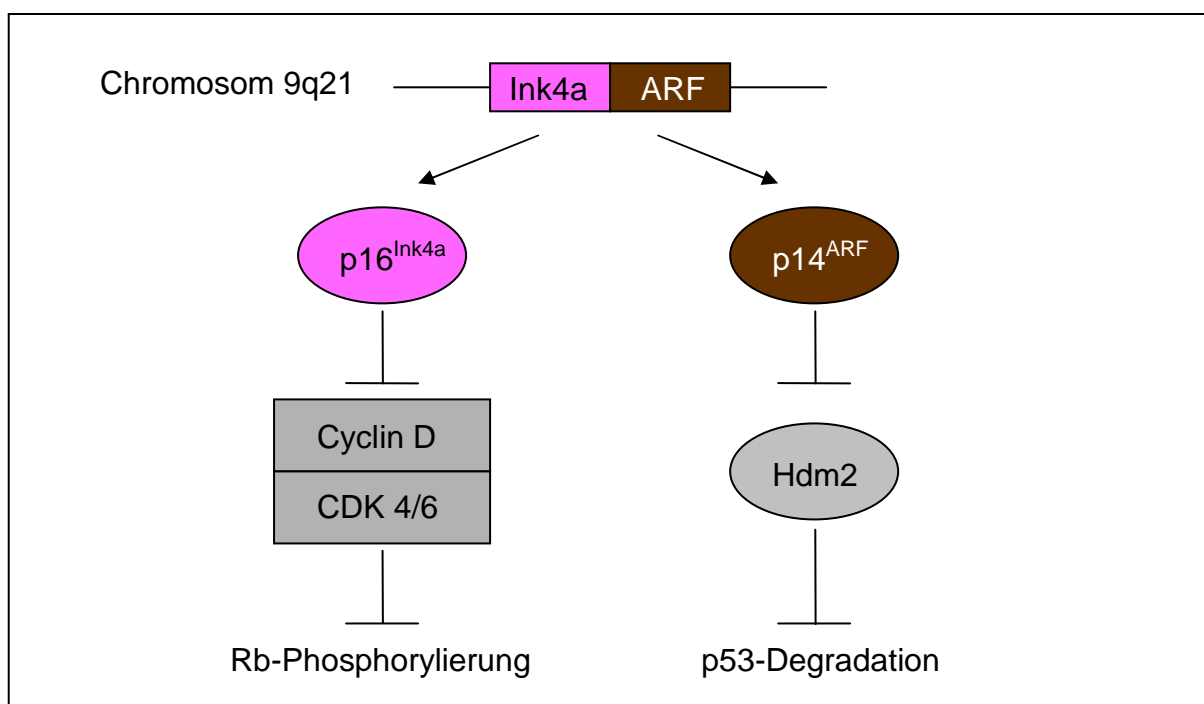


Abbildung 5: Tumorsuppressive Funktion des Ink4a / ARF - Lokus

Das Tumorsuppressorgen *Smad4*, das auch als *DPC4* (deleted in pancreatic cancer locus 4) bezeichnet wird und auf Chromosom 18 lokalisiert ist, kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit besonderer Bedeutung in der Signalkaskade des Transforming Growth Factor Beta (TGF $\beta$ ) (Hahn et al., 1996). Die Stimulation des TGF-Rezeptors durch TGF $\beta$  bewirkt eine Aktivierung von weiteren Smad-Proteinen,

welche mit Smad4 aktive Komplexe bilden und als Transkriptionsfaktoren die inhibierende Wirkung der Kaskade auf die Progression des Zellzyklus vermitteln (ten Dijke und Hill, 2004). Der tumorsuppressive Effekt dieser TGF $\beta$ -Kaskade findet in der G1-Phase statt durch Induktion von CKIs wie z.B. p15<sup>Ink4b</sup>, p21<sup>Cip1</sup> und p27<sup>Kip1</sup> bei gleichzeitiger Suppression von Onkogenen wie *c-myc* (Truty und Urrutia, 2007). Ein Verlust der Smad4-Funktion durch Deletion oder Mutation ist bei ca. 50 % aller Patienten mit Pankreaskarzinom nachweisbar und scheint den Verlauf sowie die Prognose der Erkrankung zusätzlich zu verschlechtern (Saif et al., 2007).

### 1.2.4 Seltene Veränderungen beim Pankreaskarzinom

Das auf Chromosom 13 lokalisierte Tumorsuppressorgen *BRCA2* kodiert für ein Protein, das bei DNA-Reparatur-Prozessen und damit für die Stabilität des Genoms eine wichtige Rolle spielt (Venkitaraman, 2002). Die erbliche *BRCA2*-Mutation stellt nicht nur einen prädisponierenden Faktor für die Entstehung von familiären Mamma- oder Ovarialkarzinomen dar; eine Inaktivierung findet sich auch bei etwa 7-10 % aller Fälle von Pankreaskarzinomen (Schneider und Schmid, 2003).

Auch Verluste der Serin-Threonin-Kinase LKB1/STK11 erhöhen das Risiko für die Tumorentstehung im Pankreas. Das autosomal-dominant vererbte Peutz-Jeghers-Syndrom zeichnet sich durch eine Mutation von LKB1/STK11 aus und ist mit einer erhöhten Inzidenz von Pankreaskarzinomen assoziiert (Giardiello et al., 2000).

Das Onkogen *AKT2* zeigt bei ca. 20 % aller Pankreaskarzinome eine Amplifikation oder Überexpression (Schneider und Schmid, 2003). AKT ist ein wichtiges Glied in der PI3K-/AKT-Kaskade mit Inhibition apoptotischer Proteine sowie einer Aktivierung proliferationsfördernder Faktoren wie mTOR oder NFkappaB (Ghaneh, 2007).

Das autosomal-dominante Lynch-Syndrom (HNPCC) zeichnet sich aus durch Mutationen von DNA mismatch repair Genen wie hMLH1, hMSH2 oder hMSH6. Begünstigt ist v.a. die Entstehung von Kolon-, Mamma- oder Ovarialmalignomen, während Pankreaskarzinome deutlich seltener vorkommen (Aarnio et al., 1995).

### 1.2.5 Humane Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2

Die Tumorzelllinie MIA PaCa-2 wurde aus einem undifferenzierten, duktalem Adenokarzinom eines 65-jährigen kaukasischen Mannes isoliert (Yunis et al., 1977).

Zu den molekularbiologisch charakterisierten genetischen Alterationen zählt v.a. eine Punktmutation im Codon 12 des Onkogens *K-Ras* (Dammann et al., 2003). An Veränderungen wichtiger Tumorsuppressorgene sind die Expression eines stabilisierten, mutierten p53-Proteins, die Mutation von *Rb-1* sowie die Deletion von *p16<sup>Ink4a</sup>* beschrieben (Ruggeri et al., 1992; Caldas et al., 1994).

### 1.3 Murine Pankreaskarzinomzelllinie TD-2

Um bessere Einsichten in die vielfältigen molekularen und genetischen Veränderungen im Rahmen der Tumorentstehung sowie der Tumorausbreitung und Metastasierung zu ermöglichen, ist die Etablierung eines murinen Tumorprogressionsmodells für das duktales Adenokarzinom des Pankreas wünschenswert. Ein entscheidender Fortschritt war die Einführung eines transgenen Mausmodells, das die Charakteristiken des humanen Pankreaskarzinoms bzgl. genetischer Alterationen und der duktales zellulären Differenzierung rekapituliert (Wagner et al., 1998). In diesem Modell erfolgt in den azinären Zellen des Pankreas eine Überexpression des Transforming Growth Factor Alpha (TGF $\alpha$ ) unter der Kontrolle des Elastasepromotors. Dieser führt u.a. zu einer Aktivierung der Ras/Raf/Erk-Kaskade und zu einer acinär-duktales Transdifferenzierung (Sandgren et al., 1990; Wagner et al., 2001). Die lange Latenzzeit von über einem Jahr bis zur Tumorentstehung wird deutlich reduziert durch eine Kreuzung mit heterozygoten *p53<sup>+/-</sup>*-Mäusen, bei denen ein *p53*-Allel deletiert wurde. Die Analyse von Tumoren dieser TGF $\alpha$ /*p53<sup>+/-</sup>*-transgenen Mäuse zeigt neben der bereits erwähnten Ras/ERK-Aktivierung zusätzlich einen Verlust des zweiten *p53*-Allels sowie häufig eine homozygote Deletion des *Ink4a/ARF*- und *Smad4*-Lokus im Rahmen der Tumorgenese (Wagner et al., 2001). Aus einem primären Tumor einer TGF $\alpha$ /*p53<sup>+/-</sup>*-transgenen Maus wurde die murine Pankreaskarzinomzelllinie TD-2 generiert, welche den gleichen Phänotyp und die identischen genetischen Veränderungen aufweist wie der Primärtumor (Greten et al., 2002). Diese Zelllinie wurde mittels molekular-zytogenetischer Methoden bzgl. ihrer sekundären genetischen Veränderungen, die im Laufe der Tumorgenese auftraten, genau charakterisiert (Schreiner et al., 2003). Die auffälligste Veränderung betrifft Chromosom 11 mit einem Zugewinn am proximalen Abschnitt mit 2-3-facher Amplifikation des *EGF-R*-Lokus sowie einer Deletion am distalen Ende mit Verlust des zweiten *p53*-Allels.



Zudem ist die auf Chromosom 4 gelegene Sequenz für Ink4a hypermethyliert, sodass die Deletion bzw. Inaktivierung von *p53* und *p16<sup>Ink4a</sup>* kombiniert auftreten. Zu den weniger häufigen genetischen Alterationen zählen eine Amplifikation des auf Chromosom 15 gelegenen Abschnitts von *c-myc* oder, alternativ, eine Deletion des Tumorsuppressorgens *Rb-1* auf Chromosom 14 (Schreiner et al., 2003). Die wichtigsten Veränderungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Mit TD-2 steht eine murine Tumorzelllinie zur Verfügung, deren genetische Veränderungen den humanen Tumoren ähneln und welche daher ein hilfreiches *in vitro*- und *in vivo*-Modell für das Pankreaskarzinom darstellt.

Tabelle 1: Sekundäre genetische Veränderungen der murinen Zelllinie TD-2

Chromosom	Genlokus	Veränderung
11 proximal	EGF-R	2-3 fache Amplifikation
11 distal	p53	Deletion
4	Ink4a	Hypermethylierung
15	c-myc	15-fache Amplifikation
oder 14	Rb-1	Deletion

## 1.4 Molekulare Bildgebung

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche nichtinvasive Techniken entwickelt, um Tumore in Tiermodellen zu erfassen und um Wachstum sowie Metastasierung *in vivo* zu verfolgen. Der Einsatz von Kernspintomographie (MRT) und Computertomographie (CT) bietet eine Darstellung der anatomischen Verhältnisse, während die Techniken der Positronen Emissions Tomographie (PET) oder der Single Photon Emissions Computertomographie (SPECT) physiologische Prozesse erkennen und damit funktionelle Zustände abbilden (Klerk et al., 2007). Zwei weitere nichtinvasive Methoden gewinnen zunehmend an Bedeutung, da sie die Detektion von Tumoren *in vivo* mit „molekularer Spezifität“ ermöglichen: Fluoreszenz-Imaging (FLI) und Biolumineszenz-Imaging (BLI) (Weissleder und Ntziachristos, 2003).

Vor der Einführung dieser bildgebenden Techniken wurden die *in vivo*-Versuche überwiegend mit einer subkutanen Injektion der Tumorzellen durchgeführt, was

jedoch viele Tumoreigenschaften wie Wachstum oder Therapieansprechen ungenügend rekapituliert. Die Verwendung nichtinvasiver Methoden zur Beurteilung der Tumorprogression erlaubt eine orthotope Implantation der Tumoren, wodurch die klinische Situation der jeweiligen Tumorentität deutlich besser imitiert werden kann. Außerdem ermöglicht das nichtinvasive *in vivo*-Imaging ein longitudinales Monitoring der Tumoren über viele Wochen im Verlauf (Klerk et al., 2007).

### 1.4.1 Fluoreszenz-Imaging (FLI)

Das Prinzip beruht auf der Exzitation von fluoreszierenden Substanzen durch Licht einer externen Quelle, welches reemittiert und von einer hochsensitiven Kamera detektiert wird (Ntziachristos et al., 2002). Die Tumorzellen werden hierfür mit dem Grün fluoreszierenden Protein (GFP) oder verwandten fluoreszierenden Proteinen, wie z.B. EGFP (enhanced green fluorescent protein), transfiziert. Ein großer Nachteil besteht in der unzureichenden Darstellung tiefer gelegener Tumoren aufgrund der starken Absorption des von GFP emittierten Lichtes im Gewebe und der großen Anfälligkeit für störende Autofluoreszenzsignale. Deshalb ist die Bilderfassung *in vivo* auf wenige Millimeter der Oberfläche begrenzt (Weissleder und Ntziachristos, 2003). Eine wichtige Anwendung des FLI ist die Tumoranalyse *ex vivo*, da GFP-exprimierende Zellen nach Laparotomie der Mäuse exakt lokalisiert (siehe Abbildung 6) und anschließend z.B. durch FACS-Analyse von anderen Zelltypen isoliert werden können (Lyons, 2005).

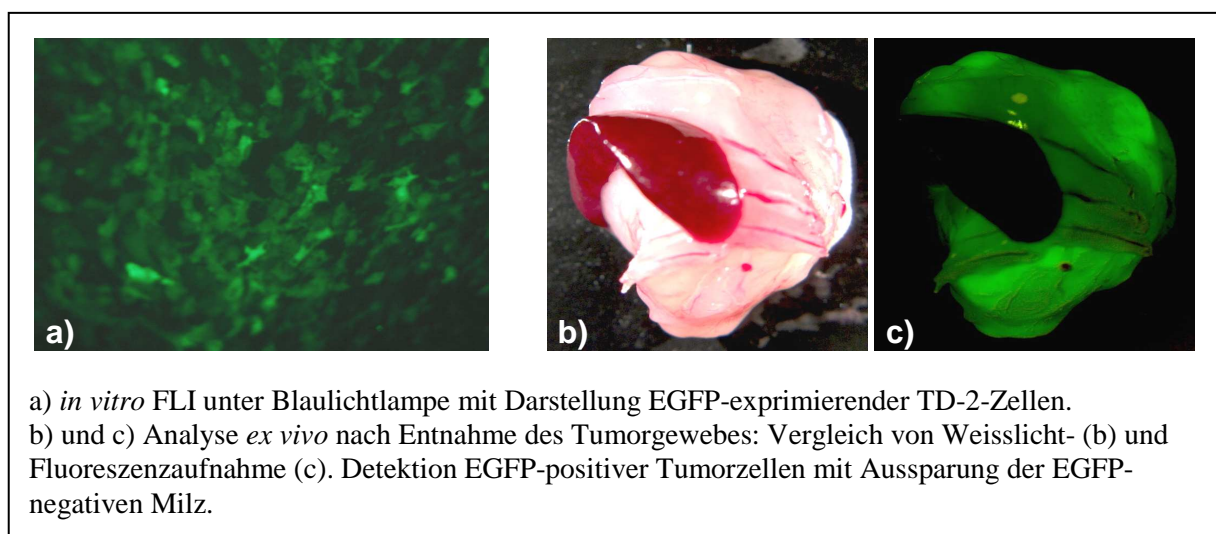


Abbildung 6: FLI mit Analyse des EGFP-Signals

### 1.4.2 Biolumineszenz-Imaging (BLI)

Biolumineszenz entsteht durch eine Licht-emittierende chemische Reaktion innerhalb des Organismus; im Gegensatz zum FLI bedarf es dabei keiner externen Lichtquelle zur Exzitation (Weissleder und Ntziachristos, 2003). Die ATP- und O<sub>2</sub>-abhängige chemische Reaktion von D-Luziferin zu Oxyluziferin - katalysiert durch das Luziferaseenzym - erzeugt Licht, welches von einer hochsensitiven charged-coupled-device (CCD)-Kamera registriert wird (Klerk et al., 2007). Von den zahlreichen in der Natur bei Bakterien und Lebewesen vorkommenden Typen des Enzyms Luziferase eignet sich v.a. der Einsatz der „firefly“-Luziferase (*fluc*), die aus *Photinus pyralis* stammt. Das emittierte Licht hat einen proportional höheren Anteil am nahen infraroten Wellenlängenbereich als GFP oder andere natürlich vorkommende Luziferasearten und kann daher Gewebe besser penetrieren (Lyons, 2005).

Das Biolumineszenz-Imaging ist eine einfach durchzuführende Methode, um *fluc*-transfizierte Zellen nach intraperitonealer Injektion des Substrats D-Luziferin im gesamten Körper des Tieres detektieren zu können. Es bietet eine „molekulare Spezifität“ für die Erkennung *fluc*-exprimierender Tumorzellen *in vivo* und ermöglicht eine Implantation der Zellen auch in tiefer gelegenen Lokalisationen. Zudem handelt es sich um eine Technik mit hoher Sensitivität, die im Gegensatz zum FLI keiner Exzitation durch eine externe Lichtquelle bedarf. Der Hauptvorteil besteht in der Möglichkeit einer nichtinvasiven, longitudinalen Verlaufsbeobachtung von Tumorklassifikation, Progression und Metastasierung (siehe Abbildung 7). Nachteilig sind die bisher geringe räumliche Auflösung der Signalerfassung sowie die Notwendigkeit einer genetischen Modifikation der Zellen für die Expression des Enzyms Luziferase. Aufgrund der ATP- und O<sub>2</sub>-Abhängigkeit der Reaktion entsteht Biolumineszenz nur in metabolisch aktiven Tumorzellen, während nekrotische Bezirke nicht zum gemessenen Signal beitragen. Außerdem gestattet die Methode bisher keine absolute Quantifizierung, sondern „nur“ eine Angabe in relativen Lichteinheiten. Für valide Aussagen über das Wachstum und die Größe von Tumoren in Tiermodellen ist es daher zwingend notwendig, dass das *in vivo* gemessene Biolumineszenzsignal und die Tumorzellmasse gut miteinander korrelieren (Klerk et al., 2007).

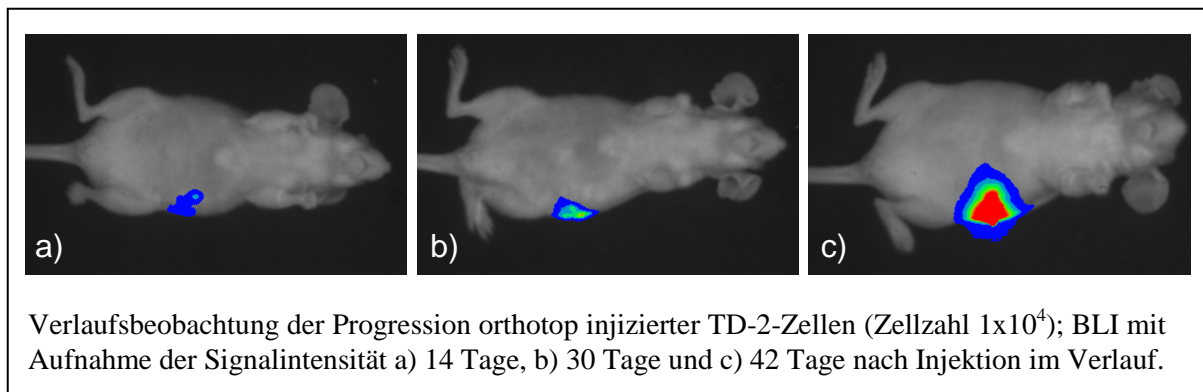


Abbildung 7: BLI mit Analyse der „firefly“-Luziferase-Expression in vivo

## 1.5 RCAS-TVA-basierter retroviraler Gentransfer

Der Lebenszyklus von Retroviren zeichnet sich durch zwei spezifische Ereignisse aus: Die reverse Transkription durch das entsprechende virale Enzym bewirkt eine Umschreibung des einzelsträngigen Virus-Genoms in doppelsträngige DNA, welche anschließend in das Wirtszellgenom integriert wird. Während die reverse Transkription ein für Rekombinationen anfälliger Vorgang ist, stellt die Integration der viralen DNA einen potentiell mutagenen Effekt dar, da Wirtsgene in ihrer Expression oder Struktur verändert werden können. In der Wissenschaft sind Retroviren ein gebräuchliches Hilfsmittel, u.a. auch, weil sie nach entsprechender Modifikation Vektoren darstellen, mit denen Gene in Zellen eingeschleust und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* exprimiert werden können (Hughes, 2004).

Ein für die Technik des retroviralen Gentransfers häufig eingesetzter retroviraler Vektor ist der RCAS-Vektor. Er gehört zur Familie der vom Geflügel abstammenden aviären Leukose-Viren (ALV) und leitet sich ab vom Replikations-kompetenten Rous Sarkoma Virus (RSV). Um Genexpressionskassetten in den Vektor inserieren und exprimieren zu können, wurde das *scr*-Onkogen von RSV ersetzt durch eine Restriktionssequenz für die Endonuklease Cla I und gleichzeitig der „splice acceptor“ Abschnitt des *scr*-Gens beibehalten (Hughes und Kosik, 1984; Hughes et al., 1987). Dadurch entstand ein retroviraler Vektor mit einer Klonierungsstelle für die Insertion von DNA, deren Expression durch die viralen LTR-Abschnitte (long terminal repeat) gesteuert wird (siehe Abbildung 8). Die Promotor-Aktivität der LTR-Region wurde zusätzlich gesteigert durch Einbau einer Bryan-DNA-Polymerase-Genexpressionskassette (pol). Durch diese Modifikationen entstand das Plasmid mit dem Namen

RCAS BP (Replication competent ALV LTR with splice acceptor and bryan polymerase) (Hughes, 2004). Wird das Hüllprotein A (env A) exprimiert, nennt man die entsprechenden RCAS-Vektoren RCAS BP (A); env A ermöglicht eine spezifische Infektion von Zellen mit dem Tumor-Virus-A (TVA)-Rezeptor.

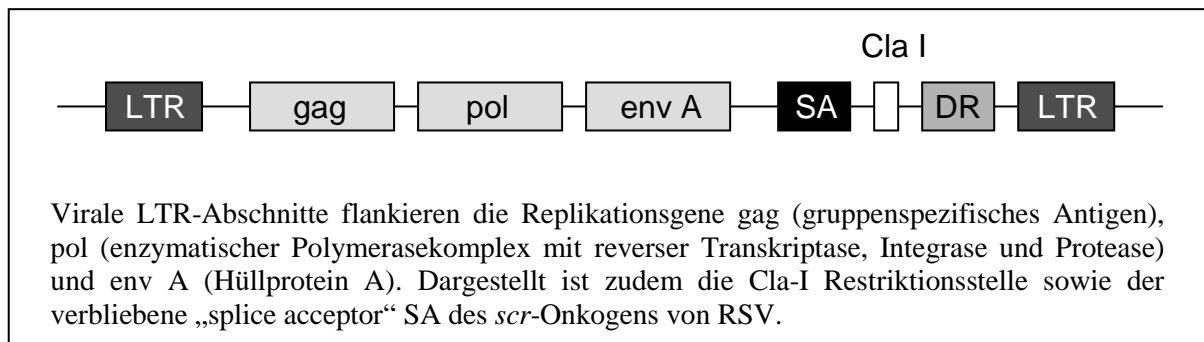


Abbildung 8: Struktur des RCAS-Vektors

Als Derivat der ALV-Viren ist der RCAS-Vektor für seinen Vermehrungszyklus ebenfalls auf Zellen mit Geflügel-Ursprung angewiesen. Hierzu wurden ursprünglich Fibroblasten aus Geflügelembryonen verwendet, welche allerdings in ihrem Genom endogene Proviren enthalten, die dem RCAS-Vektor ähneln und damit Rekombinationsprozesse während des retroviralen Lebenszyklus begünstigen (Hughes, 2004). Aus diesem Grunde wurde von D. N. Foster der von Proviren freie Geflügelstamm EV-O entwickelt, aus dem die permanente Fibroblasten-Zelllinie DF-1 generiert werden konnte. Mit DF-1 steht eine Zelllinie zur Verfügung, die nach erfolgreicher Transfektion mit dem RCAS-Plasmid eine effiziente Replikation des Virus gewährleistet und damit die Produktion hoher Titer von RCAS-Virus gestattet (Himly et al., 1998; Schaefer-Klein et al., 1998). Während Geflügelzellen wie DF-1 somit eine effiziente Vermehrung ermöglichen, ist der RCAS-Vektor in Säugetierzellen nicht zur Replikation befähigt (Hughes, 2004).

Der Prozess der retroviralen Infektion beginnt mit der Interaktion von Proteinen der Virushülle mit entsprechenden Rezeptoren der Zellen, wodurch bei geeignetem niedrigem pH-Wert eine Fusion von Virus- und Zielzellmembran ausgelöst und das Nukleokapsid ins Zytoplasma eingeschleust wird (Hughes, 2004). Der passende Rezeptor für ALV-Viren der Untergruppe A wie das RCAS BP (A)-Virus ist der TVA-Rezeptor. Er ist das Produkt des *tv-a*-Gens und zeigt bzgl. Sequenz und Struktur Homologien zum LDL (low density lipoprotein)-Rezeptor (Bates et al., 1993). Da allerdings Säugetierzellen normalerweise das *tv-a*-Gen fehlt und sie damit den

Rezeptor nicht auf ihrer Oberfläche exprimieren, können sie nicht durch Retroviren der ALV-A-Gruppe infiziert werden. Die ektope Expression von TVA in Säugerzellen jedoch ermöglicht die Interaktion von ALV-A-Viren mit dem TVA-Rezeptor und somit die Einschleusung und chromosomale Integration des viralen Genoms. Auf diese Art werden u.a. humane oder murine Zellen empfänglich für einen retroviralen Transfer von genetischer Information (Federspiel et al., 1994). Von besonderem Nutzen ist die RCAS-TVA-vermittelte Infektion in transgenen Mausmodellen, da eine gewebespezifische ektope TVA-Expression durch Einsatz spezifischer Promotoren erreicht werden kann (Fischer et al., 1999; Orsulic, 2002).

Für eine erfolgreiche retrovirale Infektion mit chromosomaler Integration des viralen Genoms ist neben der TVA-Expression auch die Proliferation der Zielzellen nötig. Da die virale DNA nur unzureichend die Kernmembran passieren kann, verläuft die Infektion von Zellen, die sich nicht teilen, mit deutlich reduzierter Effektivität (Katz et al., 2002). Wie bereits erwähnt sind infizierte Säugerzellen im Gegensatz zu Geflügelzellen nicht zur Virusreplikation im Stande, sodass sich die retrovirale Infektion nicht horizontal von Zelle zu Zelle ausbreiten kann (Hughes, 2004). Aufgrund der sehr geringen Produktion viraler Proteine entwickelt der Wirt nur mit geringer Wahrscheinlichkeit eine Immunreaktion gegen infizierte Zellen (Pinto et al., 2000). Die spärliche Expression des viralen env A-Gens vermindert eine Besetzung der TVA-Rezeptoren durch Hüllproteine, wodurch bereits infizierte Zellen empfänglich bleiben für erneute Infektionen (Orsulic, 2002); folglich besteht die Möglichkeit des sequenziellen Transfers multipler Gene in TVA-exprimierende Zielzellen (Holland et al., 1998; Murphy und Leavitt, 1999).

In Abbildung 9 ist sowohl die Produktion von RCAS-Viren durch die Geflügel-Fibroblasten-Zelllinie DF-1 als auch der retrovirale Transfer genetischer Information nach Infektion von Säugetierzellen mit ektope TVA-Expression verdeutlicht.

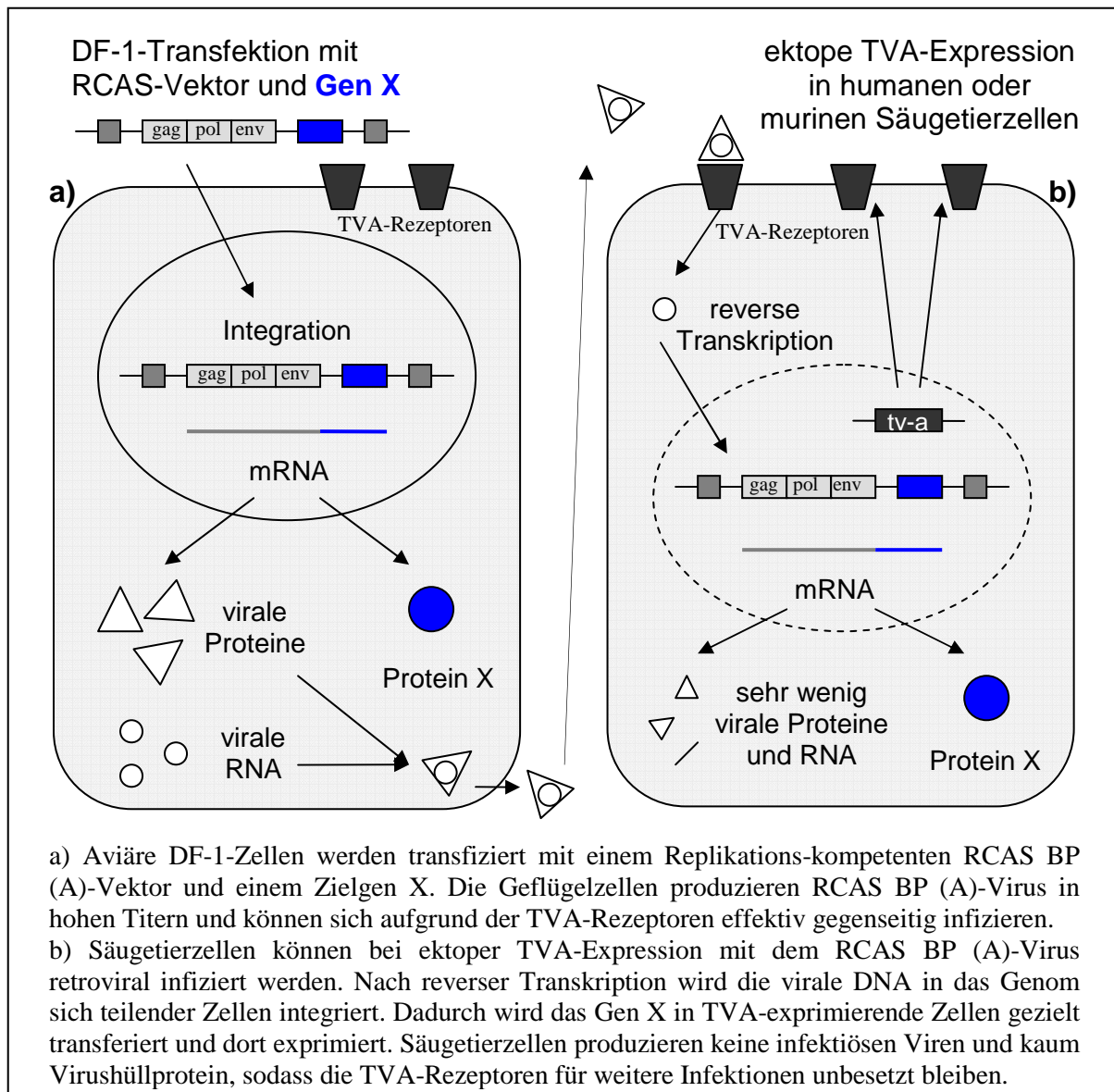


Abbildung 9: Retrovirale Infektion TVA-exprimierender Säugetierzellen

## 1.6 Herabregulation der Genexpression durch RNA-Interferenz (RNAi)

RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt die spezifische Hemmung der Genexpression, indem doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) komplementäre mRNA sequenzspezifisch erkennen und degradieren (McManus und Sharp, 2002). Dieser Mechanismus des sog. post-transcriptional gene silencing (PTGS) wurde erstmals während Forschungen an *Caenorhabditis elegans* eingesetzt als effektive Methode für eine Blockade von Genen mit jeweils homologer Sequenz zur dsRNA (Fire et al.,

1998). Seit der Entdeckung ist das RNAi-Prinzip ein vielseitig eingesetztes Hilfsmittel in der Wissenschaft und dient u.a. als Möglichkeit für den gezielten „Knockdown“ von Genen in wissenschaftlicher und therapeutischer Hinsicht.

Die detaillierte Beschreibung der RNAi-Technologie unterscheidet als 1. Schritt die Herstellung der sequenz-spezifischen RNA. Arbeiten an Pflanzen der Gattung *Arabidopsis* enthüllten als Agens des PTGS kurze RNA-Moleküle mit einer Länge von 21-25 Basenpaaren, welche sich von langen dsRNA-Vorläufermolekülen ableiten (Hamilton und Baulcombe, 1999). Forschungen an *C. elegans* und *Drosophila* bestätigten die Anwesenheit dieser kurzen RNA-Moleküle, welche eine spezifische Struktur mit 21-23 Basenpaaren und Überhängen von 2-3 Nukleotiden aufweisen (Yang et al., 2000; Hammond et al., 2000; Elbashir et al., 2001). Sie wurden als short interfering RNAs (siRNAs) bezeichnet und stehen im Zentrum der RNA-Interferenz. Die Prozessierung von langen doppelsträngigen RNAs zu den kurzen siRNAs wird katalysiert durch das Enzym Dicer, eine Endonuklease der RNase III Familie (Bernstein et al., 2001; Ketting et al., 2001) (siehe Abbildung 10). Bei den in der Wissenschaft häufig eingesetzten short hairpin RNAs (shRNAs) handelt es sich um artefiziell exprimierte Moleküle, welche zwischen den vom Zielgen abgeleiteten Sequenzen einen kurzen loop-Abschnitt aufweisen; shRNAs werden wie natürlich vorkommende dsRNAs durch Dicer in doppelsträngige siRNA-Moleküle ohne loop-Abschnitt umgewandelt.

Der 2. Schritt des PTGS durch RNAi beginnt mit der Inkorporation der sequenz-spezifischen siRNAs in den Enzymkomplex RISC (RNA-induced silencing complex). Der RISC-Komplex benutzt den antisense-Strang der siRNA für die Identifizierung homologer Sequenzen der mRNA und degradiert diese spezifisch durch seine Nukleasen (Hammond et al., 2000; Zamore et al., 2000; Nykanen et al., 2001).



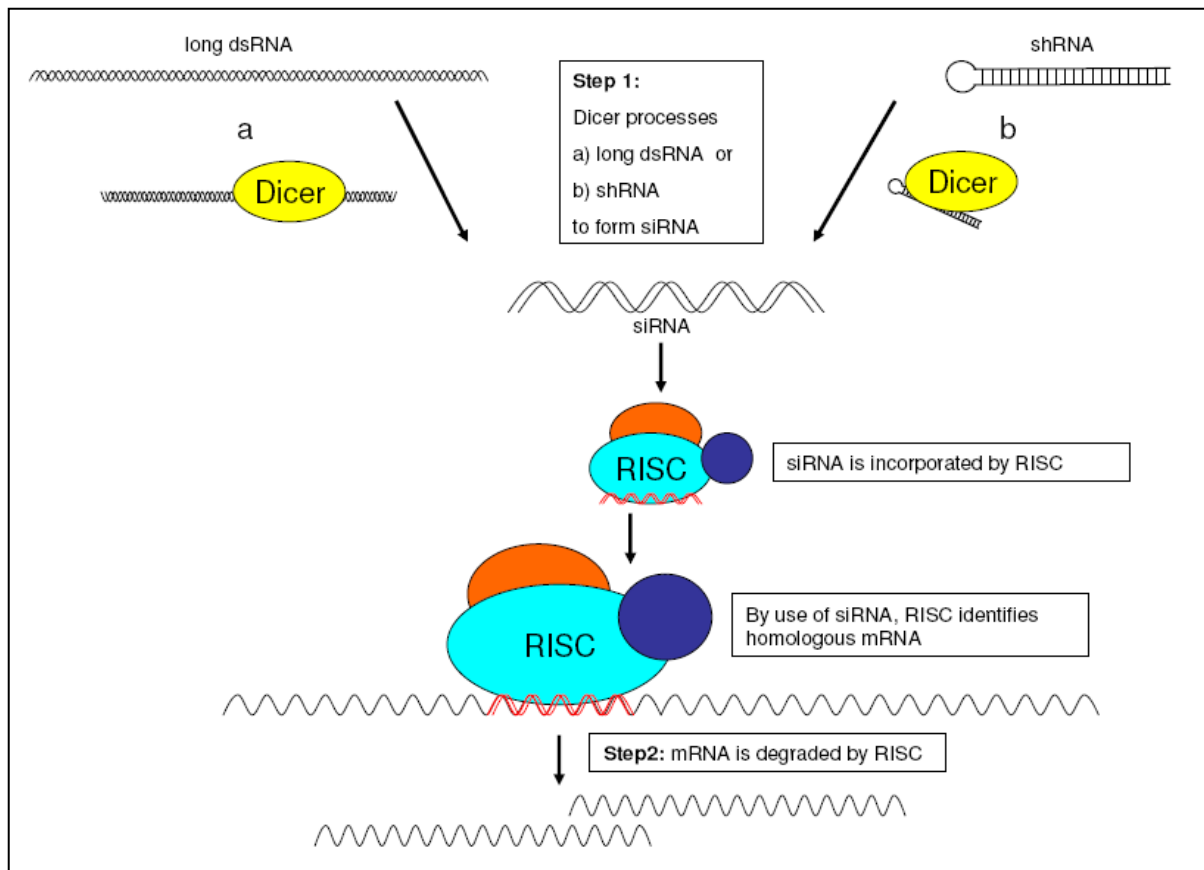


Abbildung 10: Darstellung des RNAi-Mechanismus (Zamore et al., 2000)

Der Einsatz artefiziell hergestellter siRNAs für den spezifischen Knockdown von Genen wurde in den vergangenen Jahren erfolgreich vorangetrieben (Elbashir et al., 2001); ein großer Nachteil der Transfektion von Zellen mit siRNAs bestand allerdings in der transienten Natur der Reduktion der Genexpression. Eine elegante Lösung dieses Problems besteht in der Einführung spezieller Expressionsvektoren, mit denen die Expression von shRNAs unter die Kontrolle eines RNA Polymerase III Promotors gestellt werden kann (Paule und White 2000; Brummelkamp et al., 2002; Paul et al., 2000; McManus und Sharp, 2002).

## 1.7 Expressionsplasmid für EGFP-fluc und TVA

Für die Methode des *in vivo*-Biolumineszenz- bzw. Fluoreszenz-Imaging benötigen Tumorzellen die Reportergene „firefly“-Luziferase (*fluc*) sowie ein fluoreszierendes Protein, wie z.B. das enhanced green fluorescent protein (*EGFP*). Um außerdem eine retrovirale Infektion mit dem RCAS-Virus zu gestatten, muss eine ektopische Expression des TVA-Rezeptors erreicht werden. Zu diesem Zweck wurde in den

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ein Plasmid konstruiert, das die Expression der für das *in vivo*-Imaging notwendigen Reportergene *EGFP* und *fluc* ermöglicht und gleichzeitig transfizierte Zellen mit dem TVA-Rezeptor ausstattet.

Als Grundbaustein für das Plasmid diente der Vektor pIRES der Fa. Clontech (siehe Abbildung 11). Er ist mit einer internen Ribosomen Eintrittsstelle (IRES) ausgestattet und erlaubt dadurch die gleichzeitige Translation zweier Zielgene von einem mRNA-Transkript.

Für die Koexpression von *EGFP* und *fluc* wurde die für „firefly“-Luziferase kodierende cDNA-Sequenz *fluc* aus dem Vektor pGL3-basic der Fa. Promega mittels Restriktionsverdau isoliert und anschließend in eine Schnittstelle des Plasmids EGFP-C1 der Fa. Clontech ligiert, wodurch ein EGFP/*fluc*-Fusionsprotein exprimiert werden kann. Nach Überprüfung der korrekten Integrität mittels Sequenzierung konnte das Plasmid in den pIRES-Vektor an der Klonierungsstelle multiple cloning site A (MCS A) eingefügt werden. Die für den TVA-Rezeptor kodierende Sequenz *tv-a* wurde von der Arbeitsgruppe von P. Bates zur Verfügung gestellt (Bates et al., 1993) und in die MCS B des pIRES ligiert. Als Promotor für die beiden inserierten Gene wurde alternativ zum CMV-Promotor von pIRES der  $\beta$ -actin-Promotor verwendet. Um erfolgreich transfizierte Zellen *in vitro* selektionieren zu können, enthält der pIRES-Vektor zudem ein Resistenzgen für das Antibiotikum Geneticin (siehe Abbildung 11). Nach Fertigstellung des Expressionsplasmids wurden von der Arbeitsgruppe sowohl humane MIA PaCa-2- als auch murine TD-2-Pankreaskarzinomzellen mit dem Plasmid stabil transfiziert. Nach Selektionierung konnten für die langfristige Aufbewahrung der Zellen zahlreiche Dauerkulturen angefertigt werden.

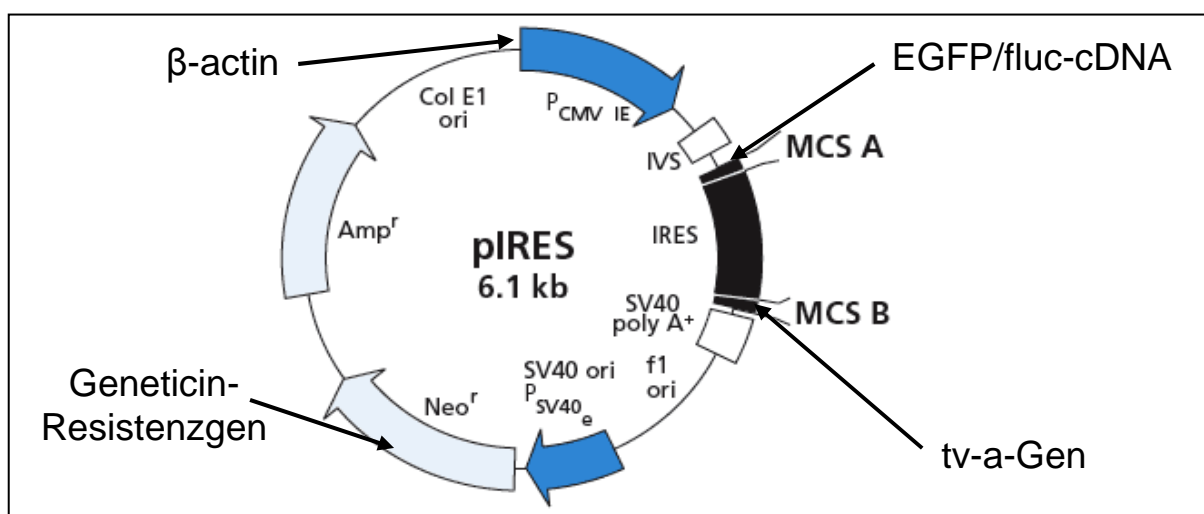


Abbildung 11: Konstruktion des EGFP/*fluc*-IRES-tv-a-Expressionsplasmides

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Das Pankreaskarzinom ist eine hochmaligne Tumorerkrankung des Menschen mit schlechter Prognose und insgesamt geringen Therapieansprechraten. Die Hoffnung ruht daher v.a. auf der Entwicklung neuer Behandlungsoptionen in der Therapie der Erkrankung (siehe Kapitel 1.1). Mit TD-2 steht eine murine Tumorzelllinie zur Verfügung, welche die genetischen Veränderungen der humanen Tumorgenese weitgehend rekapituliert und ein hilfreiches *in vitro*- und *in vivo*-Modell für das Adenokarzinom des Pankreas darstellt (siehe Kapitel 1.3). Durch stabile Transfektion muriner TD-2- sowie humaner MIA PaCa-2-Zellen mit Expressionsvektoren für die Reportergene *EGFP* und *fluc* wird eine nichtinvasive Detektion der Zellen *in vivo* mittels Fluoreszenz- bzw. Biolumineszenz-Imaging ermöglicht. Aufgrund der besonderen photochemischen Eigenschaften der „firefly“-Luziferase kann das BLI auch in tiefergelegenen Gewebeschichten der Versuchstiere erfolgen und gestattet damit die Methode der orthotopen Implantation der Tumorzellen (siehe Kapitel 1.4). Mit Einfügung der *tv-a*-Sequenz in das Expressionsplasmid werden die transfizierten MIA PaCa-2- bzw. TD-2-Zellen zudem „empfindlich“ für eine retrovirale Infektion mit dem von ALV-A-abstammenden Retrovirus RCAS BP (A) (siehe Kapitel 1.5, 1.7).

In der vorliegenden Arbeit werden folgende wichtige Aspekte behandelt:

Ein entscheidendes Ziel ist die Entwicklung eines RCAS-TVA-basierten, induzierbaren Systems für einen retroviralen Transfer von Gen- bzw. shRNA-Kassetten in TVA-exprimierende Tumorzellen. Für die Experimente mit dem RCAS-TVA-System sowohl *in vitro* als auch in einem murinen Transplantationsmodell des Pankreaskarzinoms werden eine ektope Expression des Reportergens *lacZ* sowie eine spezifische Herabregulation der Gene *EGFP* bzw. *fluc* verwendet.

Zweitens wird eine Etablierung des *in vivo*-Biolumineszenz-Imaging (BLI) angestrebt, um v.a. bei longitudinaler Verlaufsbeobachtung in einem murinen Transplantationsmodell des Pankreaskarzinoms valide Aussagen über therapeutische Effekte treffen zu können.

Ein besonderes Augenmerk liegt schließlich auf der Evaluation potentieller therapeutischer Targets sowohl in der Zellkultur als auch in einem murinen Transplantationsmodell des Pankreaskarzinoms. Hierfür werden beispielhaft *in vitro* und *in vivo* bestimmte Tumorsuppressorgene (*p53*, *p16<sup>Ink4a</sup>* und *p19<sup>ARF</sup>*) bzw.

shRNA-Kassetten gegen wichtige Onkogene (*EGF-R*, *c-myc*) verwendet. Der therapeutische Effekt einer Reexpression der Tumorsuppressoren soll ebenso wie der einer gezielten Herabregulation von Onkogenen nach dem Prinzip der RNA-Interferenz zunächst durch Proliferationsanalysen *in vitro* sowie anschließend in einem murinen Transplantationsmodell in longitudinalen Interventionsstudien bewertet werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Klonierungsmethoden, Transformation von Bakterien und Plasmidpräparation

#### 3.1.1 Klonierung von cDNA- und shRNA-Kassetten

In dieser Arbeit wurden cDNA-Kassetten für die Reportergene *lacZ* und die Tumorsuppressoren humanes *p53*, murines *p16<sup>Ink4a</sup>* und *p19<sup>ARF</sup>* sowie shRNA-Kassetten gegen die Reportergene *EGFP*, *fluc*, die Onkogene *EGF-R* und *c-myc* sowie eine Kontroll-shRNA (shRNA Co) eingesetzt. Die Klonierung in den Zielvektor RCAS erfolgte dabei in zwei Schritten: Die entsprechenden DNA-Abschnitte wurden zunächst in einen geeigneten „Entry“-Vektor (pENTR / D-TOPO bzw. / H1 / TO) gebracht und hierauf nach dem Prinzip der lokalisationspezifischen Rekombination in den RCAS- bzw. „Destination“-Vektor mit Hilfe des Gateway-Systems der Fa. Invitrogen integriert.

##### 3.1.1.1 Vorbereitung der cDNA-Kassetten

Die in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Kassetten kodieren für das Reportergen *lacZ* sowie die Tumorsuppressoren humanes *p53*, murines *p16<sup>Ink4a</sup>* und murines *p19<sup>ARF</sup>*. Sie wurden in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mittels geeigneter PCR-Methoden vervielfältigt und für die Klonierung in den Entry-Vektor pENTR / D-TOPO angepasst. Die Polymerase-Ketten-Reaktion PCR stellt ein einfaches und schnelles Verfahren zur selektiven Amplifikation von Nukleinsäuren mit definierter Länge und Sequenz dar. Die Spezifität beruht auf dem Einsatz von Oligonukleotid-Primern, welche an bestimmte Abschnitte des kodierenden bzw. nicht-kodierenden DNA-Stranges komplementär binden. Sie können nach der Hitzedenaturation an die Einzelstränge der DNA binden (Annealing) und damit die Ergänzung beider Einzel- zu Doppelsträngen initiieren, welche durch DNA-Polymerase und Nukleotide vollzogen wird (Extension). Unter geeigneten Reaktionsbedingungen ermöglicht die zyklische Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Extension eine exponentielle Amplifikation doppelsträngiger DNA (Bloch, 1991).

Für die direkte Klonierung der amplifizierten cDNA-Kassetten ist der Einsatz spezieller Primer essentiell, welche sämtlich von der Fa. MWG-Biotech AG bezogen wurden. Die „Vorwärts“-Primer benötigen hierzu am 5´-Ende die 4 Nukleotide CACC komplementär zu den 4 überstehenden Nukleotiden GTGG an der Klonierungsstelle des pENTR / D-TOPO. Mit diesem Design und geglätteten Enden ohne überstehende Nukleotide („blunt-end“) wurden die PCR-Produkte für die folgenden Klonierungen übernommen.

### 3.1.1.2 Herstellung der shRNA-Kassetten

Für die Herstellung einer doppelsträngigen shRNA wurden jeweils 2 einzelsträngige Oligonukleotid-DNA-Sequenzen verwendet; ein sogenannter „top strand“ mit der Sequenz für die entsprechende shRNA sowie ein zu diesem Strang komplementärer „bottom strand“. Sämtliche Einzelstränge wurden mit den gewünschten Sequenzen von der Fa. MWG-Biotech AG produziert.

Um die Klonierung in den verwendeten pENTR H1 / TO Vektor der Fa. Invitrogen zu ermöglichen, wurden dem 5´-Ende beider Einzelstränge jeweils 4 Nukleotide angefügt: Dem 5´-Ende des top strand die Nukleotide CACC als komplementäre Überhang-Sequenz zum GTGG im H1 Promotor des Entry-Vektors, sowie die Nukleotide AAAA dem 5´-Ende des bottom strand komplementär zur Überhang-Sequenz TTTT am Pol III Terminator des Entry-Vektors.

Die zwei Einzelstränge konnten anschließend mit den Materialien des Sets von Invitrogen ( Block-iT<sup>®</sup> Inducible H1 RNAi Entry-Vector Kit) gemäß der Anleitung zu einer doppelsträngigen shRNA zusammengefügt werden („Annealing“, siehe Abbildung 12). Tabelle 2 zeigt die Sequenzen der verwendeten shRNA-Stränge.

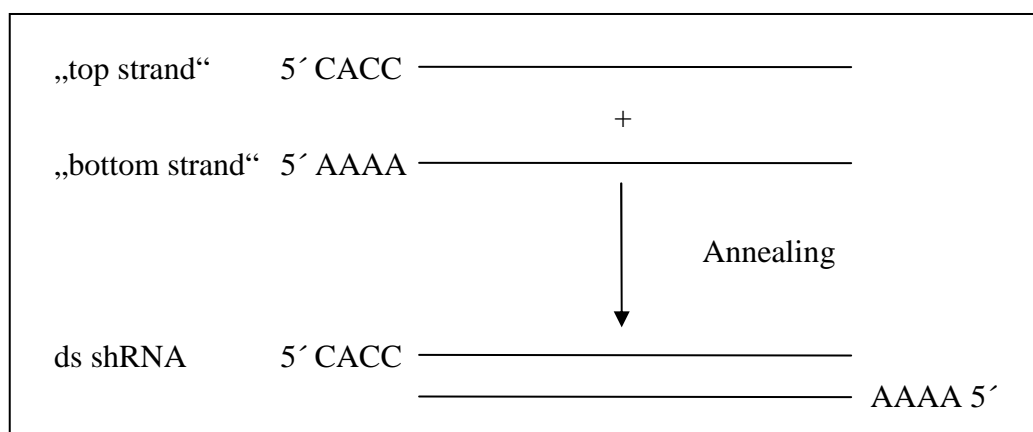


Abbildung 12: Herstellung doppelsträngiger shRNA (Fa. Invitrogen)

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten shRNA-Einzelstränge

shRNA-Einzelstränge	Nukleotidsequenz
shRNA-Co-top	5'-CAC-CAA-TTC-TCC-GAA-CGT-GTC-ACG-TGA-GAA-CGT-GAC-ACG-TTC-GGA-GAA-3'
shRNA-Co-bottom	5'-AAA-ATT-CTC-CGA-ACG-TGT-CAC-GTT-CTC-ACG-TGA-CAC-GTT-CGG-AGA-ATT-3'
shRNA-fluc-top	5'-CAC-CAC-TTA-CGC-TGA-GTA-CTT-CGA-CGA-ATC-GAA-GTA-CTC-AGC-GTA-AG-3'
shRNA-fluc-bottom	5'-AAA-ACT-TAC-GCT-GAG-TAC-TTC-GAT-TCG-TCG-AAG-TAC-TCA-GCG-TAA-GT-3'
shRNA-EGFP-top	5'-CAC-CGA-ACG-GCA-TCA-AGG-TGA-ACG-AGA-GTT-CAC-CTT-GAT-GCC-GTT-C-3'
shRNA-EGFP-bottom	5'-AAA-AGA-ACG-GCA-TCA-AGG-TGA-ACT-CTC-GTT-CAC-CTT-GAT-GCC-GTT-C-3'
shRNA-EGFR-490-top	5'-CAC-CGC-AAA-GGA-ATT-ACG-ACC-TTT-CCG-AAG-AAA-GGT-CGT-AAT-TCC-TTT-GC-3'
shRNA-EGFR-490-bottom	5'-AAA-AGC-AAA-GGA-ATT-ACG-ACC-TTT-CTT-CGG-AAA-GGT-CGT-AAT-TCC-TTT-GC-3'
shRNA-EGFR-801-top	5'-CAC-CGC-AAC-ATG-TCA-ATG-GAC-TTA-CCG-AAG-TAA-GTC-CAT-TGA-CAT-GTT-GC-3'
shRNA-EGFR-801-bottom	5'-AAA-AGC-AAC-ATG-TCA-ATG-GAC-TTA-CTT-CGG-TAA-GTC-CAT-TGA-CAT-GTT-GC-3'
shRNA-cmyc-680-top	5'-CAC-CGC-GAC-GAG-GAA-GAG-AAT-TTC-TCG-AAA-GAA-ATT-CTC-TTC-CTC-GTC-GC-3'
shRNA-cmyc-680-bottom	5'-AAA-AGC-GAC-GAG-GAA-GAG-AAT-TTC-TTT-CGA-GAA-ATT-CTC-TTC-CTC-GTC-GC-3'
shRNA-cmyc-755-top	5'-CAC-CGG-AAG-AAA-TTC-GAG-CTG-CTT-CCG-AAG-AAG-CAG-CTC-GAA-TTT-CTT-CC-3'
shRNA-cmyc-755-bottom	5'-AAA-AGG-AAG-AAA-TTC-GAG-CTG-CTT-CTT-CGG-AAG-CAG-CTC-GAA-TTT-CTT-CC-3'

## 3.1.1.3 Verwendete Vektoren

## 3.1.1.3.1 pENTR / D-TOPO

Der pENTR / D-TOPO ermöglicht zusammen mit den weiteren Materialien des pENTR Directional TOPO<sup>®</sup> Cloning Kits der Fa. Invitrogen eine einfache und schnelle Klonierung von PCR-Produkten zur Herstellung von Entry-Vektoren. Die direkte Klonierung von doppelsträngiger DNA basiert auf einem Überhang der 4 Nukleotide GTGG am pENTR / D-TOPO Vektor, der direkt mit dem komplementären 5'-Ende der klonierten PCR-Produkte verknüpft wird. Weitere wichtige Bestandteile des Vektors sind die beiden attL1 bzw. -L2 Sequenzen für die lokalisationspezifische Rekombination in den Ziel-Vektor, Bindungsstellen für den M13 forward und M13 reverse Primer, sowie ein Kanamycin-Resistenzgen (siehe Abbildung 13).

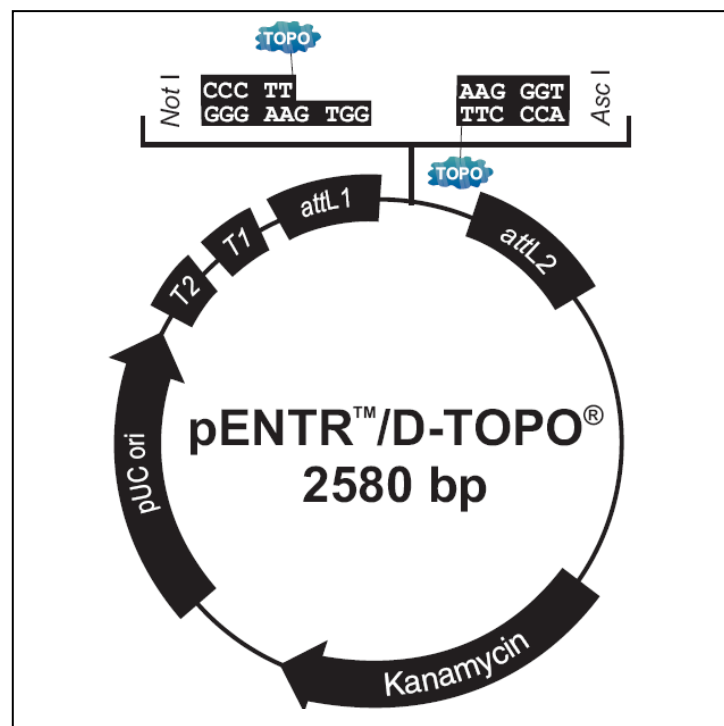


Abbildung 13: Vektorkarte pENTR™ / D-TOPO<sup>®</sup> (Fa. Invitrogen)

## 3.1.1.3.2 pENTR / H1 / TO

Der pENTR / H1 / TO ist Bestandteil des BLOCK-iT<sup>®</sup> Inducible H1 RNAi Entry-Vector Kit der Fa. Invitrogen zur Herstellung eines Entry-Vektors mit den notwendigen Elementen für eine RNA-Polymerase III abhängige, tetrazyklin-regulierte shRNA-Expression. Er enthält eine Klonierungsstelle mit Überhängen der 4 Nukleotide



GTGG am Ende des H1/TO-Promotors sowie TTTT zu Beginn des Pol III-Terminators für die direkte Klonierung doppelsträngiger shRNA. Der H1/TO-Promotor ist ein modifizierter humaner H1-Promotor, welcher die beiden prokaryotischen Tet Operator Sequenzen als Grundlage für eine tetrazyklin-regulierte shRNA-Expression enthält (siehe Kapitel 3.2.3) sowie eine eigene Bindungsstelle für den H1 forward Primer. Weitere wichtige Elemente sind wie beim pENTR / D-TOPO die beiden attL1 bzw. -L2 Sequenzen für die lokalisationsspezifische Rekombination in den Ziel-Vektor, Bindungsstellen für den M13 forward und M 13 reverse primer, sowie ein Kanamycin-Resistenzgen (siehe Abbildung 14).

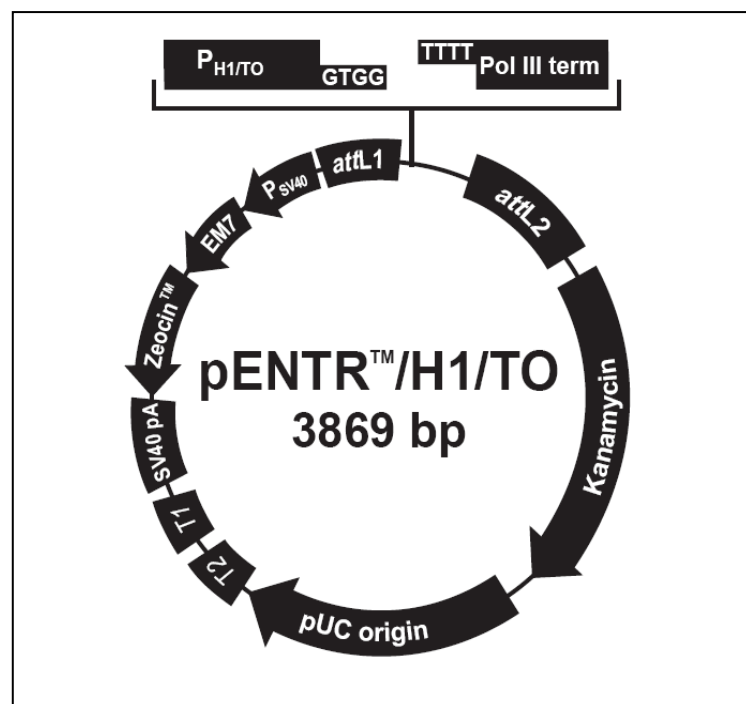


Abbildung 14: Vektorkarte pENTR™ / H1 / TO® (Fa. Invitrogen)

### 3.1.1.3.3 RCAS-Vektor

Der RCAS BP (A)-Vektor wurde uns von S. Hughes (National Cancer Institute, Frederick, MD) zur Verfügung gestellt. Um eine Rekombination der klonierten cDNA- und shRNA-Sequenzen aus den Entry-Vektoren in den Destination-Vektor RCAS zu ermöglichen, musste der RCAS-Vektor mit den Sequenzen für attR1 bzw. -R2 versehen werden. Diese Konstruktion erfolgte in Vorarbeiten durch Einsatz des Gateway® Vector Conversion Systems von Invitrogen mit Verwendung der Reading Frame Kasette A. Die in der Kasette enthaltenen Abschnitte attR1 und -R2 erlauben eine lokalisationsspezifische Rekombination mit den attL1/-L2-Sequenzen

der Entry-Vektoren entsprechend den Eigenschaften des Bakteriophagen Lambda (Landy, 1989). Für eine getrennte Selektionierung transformierter Bakterien wurde der RCAS-Vektor zudem mit einem Resistenzgen für Ampicillin ausgestattet.

#### 3.1.1.4 Klonierung von cDNA und ds shRNA in die Entry-Vektoren

Die direkte Verknüpfung der doppelsträngigen PCR-Produkte mit dem pENTR / D-TOPO Entry-Vektor (Invitrogen) geschieht durch eine Aufspaltung des 5'-Endes der cDNA-Kassette durch den korrespondierenden Überhang des Vektors und nachfolgenden stabilen Einbau des PCR-Produktes an der korrekten Stelle.

Die Klonierung der doppelsträngigen shRNA in den pENTR / H1 / TO Entry-Vektor erfolgte mit den Materialien des BLOCK-iT<sup>®</sup> Inducible H1 RNAi Entry-Vector Kit entsprechend der Anleitung des Herstellers Invitrogen. Der Einbau in das Plasmid geschieht durch Ligation der überhängenden, komplementären Enden von Vektor und ds shRNA, katalysiert durch das Enzym T4-DNA-Ligase.

#### 3.1.1.5 Rekombination

Die Übertragung der in die Vektoren pENTR / D-TOPO bzw. pENTR / H1 / TO klonierten cDNA und shRNA Kassetten auf den RCAS-Vektor erfolgt als lokalisationspezifische Rekombination zwischen Entry- und Ziel- bzw. „Destination“-Vektor (RCAS-Plasmid). Hierfür eingesetzt wurde die Gateway Technologie des Gateway<sup>®</sup> LR Clonase Enzyme Mix der Fa. Invitrogen, basierend auf der Eigenschaft des Bakteriophagen Lambda zur lokalisationspezifischen Rekombination der Sequenzen zwischen den attL-Abschnitten des Entry-Vektors und den attR-Stellen des Destination-Vektors RCAS (Landy, 1989).

### 3.1.2 Transformation von kompetenten E.coli Bakterien

#### 3.1.2.1 Verwendete Bakterien, Nährmedien und Kultivierung

In dieser Arbeit wurden kompetente One Shot TOP 10 E.coli sowie kompetente One Shot Stbl3 E.coli der Fa. Invitrogen verwendet, welche sich durch eine hohe Transformationseffizienz von  $> 1.0 \times 10^9$  CFU (Colony forming units) /  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA auszeichnen. Die Eigenschaft „kompetent“ bezeichnet dabei die Fähigkeit zur

Aufnahme von DNA in das Innere der Bakterien. Sowohl TOP 10 als auch Stbl3 E.coli Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

Die Bakterien haben optimale Wachstumsbedingungen durch aerobe Kultivierung in dem Vollmedium Luria-Bertani LB, welches durch Lösung von 10 g LB-Medium (Fa. Roth) auf 500 ml Aqua dest. hergestellt und bei 121 °C und 2 bar autoklaviert wurde. Zur Selektion transformierter, plasmidtragender Bakterien wurde dem Medium nach dem Autoklavieren je nach erworbener Resistenz Kanamycin 50 µg / ml bzw. Ampicillin 100 µg / ml zugefügt.

Für die Herstellung von Agarplatten zur Bakterienanzucht wurden 15 g LB-Agar (Fa. Roth) in 500 ml Aqua dest. gelöst und ebenfalls autoklaviert. Anschließend konnte das Medium nach Abkühlung und Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in keimarme Petrischalen gegossen werden. Fertige Agarplatten und überschüssige LB-Medien wurden luftdicht verschlossen bei 4 °C aufbewahrt.

Zur langfristigen Aufbewahrung bereits transformierter Bakterien diente die Konservierung der E.coli als Glycerinkulturen. Dazu wurden je 500 µl Bakterienkultur mit 400 µl Glycerin vermischt und bei -80 °C tiefgefroren.

#### 3.1.2.2 Transformation der klonierten Plasmide

Transformation bezeichnet das Einschleusen von DNA in Bakterien. In dieser Arbeit wurden die verwendeten Plasmide durch Hitzeschock in kompetente TOP 10 bzw. Stbl3 E.coli transformiert. Durch Zugabe von Antibiotika erhalten erfolgreich transformierte Bakterien einen Selektionsvorteil aufgrund des Erwerbs einer Resistenz durch das aufgenommene Plasmid, welches sie stabil an Tochterzellen weitergeben.

Für die Transformation der Entry-Vektoren wurden die tiefgefrorenen TOP 10 E.coli auf Eis aufgetaut und jeweils 2 µl der zuvor klonierten Plasmid DNA mit der Pipettenspitze vorsichtig eingerührt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis erfuhren die Bakterien einen Hitzeschock bei genau 42 °C für 30 Sekunden als Voraussetzung für die Plasmidaufnahme. Der erneuten Inkubation auf Eis für 2 Minuten folgte die Zugabe von jeweils 250 µl S.O.C. Medium, das gemäß den Empfehlungen des Herstellers Invitrogen bei Raumtemperatur gelagert worden war. Die Bakterien wurden dann 60 min bei 37 °C unter Schütteln mit 180 rpm (Thermoshake, Fa. Gerhardt) kultiviert und danach auf jeweils 2 antibiotikahaltige

LB-Agarplatten ausgestrichen. Auf den Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank die Anzucht von Bakterieneinzelkolonien, welche anschließend näher charakterisiert werden konnten.

Für die lokalisationspezifische Rekombination zwischen pENTR- und RCAS-Vektor wurden gemäß den Anweisungen von Invitrogen jeweils 100 ng Entry- mit 150 ng Destination-Vektor kombiniert, mit 4 µl LR Clonase Enzyme Mix versetzt und vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei 25 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von je 2 µl Proteinase K terminiert und eine Lagerung bei 37 °C für 10 min angeschlossen. Die weiteren Schritte der Transformation in die Stbl3 E.coli geschahen weitgehend identisch zur Transformation der pENTR-Plasmide in TOP 10-Zellen; Unterschiede bestanden in der zugegebenen Menge von 450 µl S.O.C. Medium pro Ansatz nach dem Hitzeschock sowie einer Anzucht der ausgestrichenen Bakterien auf Agarplatten bei 30 °C.

### **3.1.3 Screening transformierter Bakterien**

Nach der Transformation durch Hitzeschock wurden die Bakterien, wie bereits erwähnt, 60 min bei 37 °C in S.O.C. Medium (Invitro gen) kultiviert. Während dieser Zeit exprimierten erfolgreich transformierte Zellen das entsprechende Kanamycin- bzw. Ampicillin-Resistenzgen, wodurch bei der folgenden Anzucht auf antibiotikahaltigen Agarplatten ein selektives Wachstum der plasmidhaltigen E.coli ermöglicht wurde. Für eine frühzeitige gezielte Weiterzüchtung derjenigen Bakterien, welche das transformierte Plasmid mit korrekt inserierter DNA enthalten, erfolgte neben diesen Selektionsmechanismen zusätzlich eine „Screening-PCR“ der auf den Agarplatten gewachsenen Einzelkolonien. Eine abschließende Analyse der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese charakterisierte Bakterienklone mit korrekt transformierten Plasmid-Vektoren.

#### **3.1.3.1 Bakterien-PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)**

Für das Screening der Bakterien wurden pro Transformationsansatz je 8 Proben von Einzelklonen von den Agarplatten mit sterilen Holzstäbchen gepickt, in geeigneten Reaktionsgefäßen mit jeweils 50 µl Aqua dest. versehen und zu einer Suspension aufgeköcht. Nach Zentrifugation konnten die Überstände mit dem Ansatz des Red-

Taq-DNA-Polymerase-Reaktionsmixes (Fa. Sigma) vermischt und die Amplifizierung gestartet werden (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: PCR-Ansatz Red-Taq-DNA-Polymerase-Reaktionsmix (Fa. Sigma)

<b>PCR-Reaktionsansatz pro Einzelklon</b>	<b>30</b>	<b><math>\mu</math>l</b>
dNTP (Nukleotidtriphosphate)	0,6	$\mu$ l
"Forward"-Primer	1,2	$\mu$ l
"Reverse"-Primer	1,2	$\mu$ l
RedTaq-DNA-Polymerase	0,9	$\mu$ l
10 x PCR-Puffer	3	$\mu$ l
Aqua dest.	18,1	$\mu$ l
Aufgekochte Bakterien-Suspension	5	$\mu$ l

Sämtliche für die Screening-PCR hergenommen Primer wurden von der Fa. MWG-Biotech AG synthetisiert. Ihre Sequenz orientierte sich an den Erkennungssequenzen der pENTR-Vektoren und des RCAS-Vektors (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Für die Screening-PCR verwendete Oligonukleotidprimer

<b>Oligonukleotidprimer</b>	<b>Sequenz</b>
M13 forward	5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-G-3'
M13 reverse	5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-AC-3'
H1 forward	5'-TGT-TCT-GGG-AAA-TCA-CCA-TA-3'
pBroad lacZ-2904-LP	5'-CAG-CAG-TGT-GCA-GCT-CCA-C-3'
RCAS BP(A) UP	5'-CAC-GGA-ATA-TAA-GAA-GCT-GCA-AAA-G-3'
RCAS BP(A) LP	5'-CGA-TCA-TGG-CGA-CCA-CAC-3'

### 3.1.3.2 Analyse der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese

Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen können DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Molekulargewichte voneinander aufgetrennt werden. Eine geeignete Möglichkeit besteht in der Auftrennung durch Agarosegele

mit anschließender Detektion der DNA-Banden unter UV-Licht durch Zugabe des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid sowie vergleichende Größenanalyse mit standardisierten DNA-Längen.

In dieser Arbeit geschah die Auftrennung der DNA-Fragmente aus der Screening-PCR mit 1,5 % Standard-Agarose-Gelen. Dazu wurden entsprechende Mengen Agarose (Peq GOLD Universal Agarose) in 1 x TAE-Puffer (siehe Tabelle 5) durch Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst und dann in einer Dicke von ca. 0,5 cm in geeigneten Einrichtungen gegossen.

Tabelle 5: Verwendeter TAE-Puffer

<b>50 x TAE-Puffer</b>
Tris pH 8,2 40mM
EDTA 2mM
Essigsäure 20mM
Verdünnung mit Aqua dest. zu 1 x TAE-Puffer

Die gegossenen Agarosegele schwammen in einer Elektrophoresekammer (Gelkammer Sunrise, Fa. Life Technologies) mit 1 x TAE als Laufpuffer und dem fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 2,5 µg / ml Puffer. Die PCR-Produkte konnten nach Zugabe von jeweils 5 µl Loading-Puffer in die Geltaschen gefüllt und unter einer konstanten Spannung von 1 bis 5 V pro cm Abstand zwischen den Elektroden der Kammer aufgetrennt werden. Dabei ermöglichten die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol des Loading-Puffers eine ständige Kontrolle des Elektrophoreseverlaufs. Für die nötige Größenbestimmung wurden die in die Geltaschen pipettierten PCR-Produkte von dem DNA-Längenstandard PeqGold Range DNA-Leiter Mix (Peq-Lab) flankiert. Anhand der Orientierung an der Front des Loading-Puffers wurde die Auftrennung der DNA-Fragmente durch UV-Detektion des interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar gemacht und durch Vergleich mit dem standardisierten DNA-Leiter-Mix bzgl. des Molekulargewichts analysiert. Das Ergebnis wurde anschließend durch ein Geldokumentationssystem der Fa. MWG-Biotech digitalisiert.

### 3.1.4 Plasmidpräparation

Nach dem Ergebnis der „Screening-PCR“ wurden diejenigen Einzelklone, welche das gewünschte Insert korrekt aufgenommen hatten, in präparativem Maßstab kultiviert. Aus diesen Zellen konnte die Plasmid-DNA durch Einsatz des Qiagen Mini- bzw. Midi-Kit isoliert und darauf in ihrer Konzentration spektralphotometrisch bestimmt werden. Die Überprüfung der Integrität der Plasmid-DNA wurde vervollständigt durch enzymatischen Restriktionsverdau und kommerzielle Sequenzierung. Kurzfristig konnten die Plasmide bei -4 °C gelagert werden; zur längerfristigen Aufbewahrung wurden sie bei -20 °C eingefroren.

#### 3.1.4.1 Isolierung der Plasmid-DNA

Von jedem erfolgreich in Bakterien transformiertem Plasmid mit korrekter Integrität wurden jeweils 2 plasmidtragende Einzelklone nach Einimpfen in flüssiges LB-Medium bei 37 °C aerob kultiviert. Die E.coli vermehrten sich unter Schütteln mit 180 rpm und konnten bei ausreichender Bakteriendichte der Flüssigkultur in geeigneten sterilen Reaktionsgefäßen zentrifugiert werden. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Pellets bei -20 °C eingefroren oder sofort weiter verarbeitet.

Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit den Qiagen Mini- bzw. Maxi Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Fa. Qiagen), beruhend auf dem Prinzip einer alkalischen Lyse der Bakterien und chromatographischen Reinigung der Zellbestandteile über eine Anionenaustauschersäule (Birnboim und Doly, 1979). Bei geeignetem pH-Wert und ausreichender NaCl-Konzentration werden u.a. Proteine, RNA und Nukleotide am Säulenmaterial zurückgehalten, während ausschließlich gereinigte Plasmid-DNA in EB-Puffer (Qiagen) eluiert wird.

#### 3.1.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Für die weitere Verwendung der Plasmid-DNA ist eine Bestimmung der Konzentration der im EB-Puffer eluierten DNA essentiell. Dazu wurden jeweils 7 µl DNA-Lösung mit Aqua dest. auf 70 µl gemäß einem Verhältnis von 1:10 verdünnt und in Quarzküvetten eine Extinktionsmessung im Spektralphotometer bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gestartet. Dabei bestimmen die aromatischen Purin-

und Pyrimidinringe die Absorption bei 260 nm, während die Extinktion bei 280 nm v.a. durch die aromatischen Reste von Proteinverunreinigungen bewirkt wird. Durch die Relation beider Werte lassen sich somit Rückschlüsse auf die Reinheit der DNA-Präparation ziehen: Ein Quotient von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  von  $\geq 1,8$  gilt dabei als Richtwert für einen hohen Reinheitsgrad der Probe. Die Konzentrationsberechnung selbst geschieht durch das Photometer nach der Formel in Tabelle 6:

Tabelle 6: Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

<b>Konzentrationsberechnung:</b>		<b><math>c = OD_{260} * e_{DNA} * v</math></b>
C	Konzentration der DNA-Lösung	( $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ )
$OD_{260}$	Extinktion bei 260 nm	
$e_{DNA}$	Extinktionskoeffizient von Nukleinsäuren ( $0,05 \text{ cm}^2 / \text{mol}$ )	
v	Verdünnungsfaktor	

#### 3.1.4.3 Enzymatischer Verdau der Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, welche eine jeweils spezifische, meist palindromische Sequenz doppelsträngiger DNA erkennen und die DNA dort schneiden können. Da bei diesem „DNA-Verdau“ Fragmente unterschiedlicher Länge gemäß einem Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus entstehen, ist eine Analyse der Spaltstücke durch Agarose-Gelelektrophorese möglich.

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen stammen alle von New England Biolabs (NEB) und unterscheiden sich in Erkennungssequenz sowie jeweils optimalen Reaktionsbedingungen (siehe Tabelle 7). Je nach untersuchtem Plasmid wurden zwischen 300 und 500 ng DNA mit empfohlenen Mengen von Enzymen, Puffern und eventuell BSA sowie Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  zusammenpipettiert und bei geeigneten Temperaturen für 4 Stunden inkubiert. Die Ansätze wurden hierauf gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 3.1.3.2); eine Beurteilung der Anzahl und Länge an DNA-Fragmenten ließ hierbei Rückschlüsse auf die korrekte Integration der cDNA- bzw. shRNA-Kassetten in die Vektoren zu.



Tabelle 7: Verwendete Restriktionsendonukleasen (Fa. NEB)

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Puffer
Afl II	5'-C/TTAAG-3'	NEB2 + BSA
Asc I	5'-GG/CGCGCC-3'	NEB4
Bgl II	5'-GC/TNAGG-3'	NEB3
BssH II	5'-G/CGCGC-3'	NEB3
Cla I	5'-AT/CGAT-3'	NEB4 + BSA
EcoN I	5'-CCTNN/NNNAGG-3'	NEB4
EcoR V	5'-GAT/ATC-3'	NEB3 + BSA
Mlu I	5'-A'/CGCGT-3'	NEB3
Not I	5'-GC/GGCCGC-3'	NEB3 + BSA
Pst I	5'-CTGCA/G-3'	NEB3 + BSA
Sac II	5'-CCGC/GG-3'	NEB4
Sal I	5'-G/TCGAC-3'	NEB3 + BAS
Xba I	5'-T/CTAGA-3'	NEB2 + BSA

#### 3.1.4.4 Sequenzierung der klonierten DNA-Abschnitte

Die Überprüfung der Integrität und korrekten Klonierung der Kassetten in Entry- bzw. RCAS-Vektor vervollständigte eine Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente. Die Ergebnisse konnten hierauf mit den Sequenzdaten der EMBL (European Molecular Biology Laboratories) Datenbank in Heidelberg verglichen werden.

## 3.2 Zellkultur, Proteinernte und Proteinanalyse

### 3.2.1 Allgemeines

#### 3.2.1.1 Verwendete Materialien (siehe Tabelle 8)

Tabelle 8: Für die Zellkulturexperimente verwendete Materialien

<b>Medien: Gibco, Fa. Invitrogen</b>	
Gibco DMEM 1 x	DF-1 und MIA PaCa-2
Gibco RPMI 1640 + GlutaMAX-I 1 x	TD-2
Gibco Recovery Freezing Medium	Dauerkulturen

<b>Supplemente: Gibco, Fa. Invitrogen</b>	
Gibco BRL Foetal Bovine Serum	10 % Endkonzentration
Gibco Tet approved FBS	10 % Endkonzentration
Gibco Penicillin Streptomycin 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin-Sulfat	1 % Endkonzentration
Gibco Geneticin	1000 µg / ml
Invitrogen Tetrazyklin	1 µg / ml

<b>Zusätzliche Materialien</b>	
InvivoGen Puromycin	3 µg / ml
Gibco Trypsin-EDTA 0,05 %	1 % Endkonzentration
Gibco D-PBS 1 x	
Qiagen SuperFect Transfection Reagent	3 mg / ml
Invitrogen β-Gal Staining Kit	

Das FBS wurde zur Inaktivierung von Komplementbestandteilen für 30 min im Wasserbad auf 65 °C erhitzt und anschließend in 50 ml Falcon-Reaktionsgefäßen aliquotiert bei -20 °C tiefgefroren gelagert.

Die Zellkulturmedien wurden nach Supplementation mit FBS, P/S und weiteren Zusätzen bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad mit 37 °C angewärmt.

### 3.2.1.2 Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen

#### 3.2.1.2.1 DF-1

Bei DF-1 handelt es sich um eine Fibroblasten-Zelllinie, die sich aus dem Gewebe eines Geflügel-Embryos spontan entwickelte und von der ATCC (American Type Culture Collection) zur Verfügung gestellt wurde. DF-1-Zellen sind als Geflügel-Fibroblasten empfänglich für die Infektion mit AVL-abstammigen Viren und eignen sich ausgezeichnet für die Produktion hoher Titer von RCAS-Viren (Himly et al., 1998; Schaefer-Klein et al., 1998). Die Kultivierung erfolgte in Gibco DMEM-Medium mit 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) im Brutschrank bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes. Für die standardmäßige Passage wurden Kulturflaschen (Polysterol, Falcon) je nach Bedarf in den Größen 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, und 175 cm<sup>2</sup> verwendet. Im Stadium der Konfluenz wurden die DF-1 für 2 Tage zur Virusproduktion hergenommen und dann im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 in neue Kulturgefäße umgesetzt. Dazu wurde der Zellrasen gründlich mit ca. 5 ml Gibco D-PBS gewaschen und mit Gibco Trypsin-EDTA - mit PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt - für ca. 3 min inkubiert (0,5 ml Trypsin-EDTA pro 25 cm<sup>2</sup>, 1 ml pro 75 cm<sup>2</sup>, 2 ml pro 175 cm<sup>2</sup>-Flasche). Nach Termination der Reaktion durch die Zugabe von serumhaltigem Medium konnten die Zellen durch wiederholte Resuspension vollständig abgelöst und dann für 5 min bei 1000 rpm und 25 °C zentrifugiert werden. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und bei Bedarf die Zelldichte der Suspension durch Einsatz von Neubauer-Zählkammern exakt ermittelt. Hierauf konnten entsprechende Mengen Zellsuspension dem Medium frischer Kulturflaschen zugesetzt werden.

#### 3.2.1.2.2 MIA PaCa-2

Die humane Tumorzelllinie MIA PaCa-2 hat ihren Ursprung in einem undifferenzierten duktalem Pankreaskarzinom eines 65-jährigen männlichen Kaukasiers (Yunis et al., 1977). Sie wurde uns vom ATCC zur Verfügung gestellt und in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe stabil mit einem Plasmid für das Fusionprotein EGFP-„firefly“-Luziferase, dem *tv-a*-Rezeptorgen und einer Geneticin-Resistenz transfiziert (siehe Kapitel 1.7). Die Kultivierung erfolgte in Gibco-DMEM-Medium mit 10 % FBS, 1 % P/S und 1000 µg / ml Geneticin bei 37 °C im Brutschrank. Im

Stadium der Konfluenz wurden die Zellen entsprechend den Erläuterungen bei den DF-1-Zellen im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 gesplittet; für die Aussaat exakter Zellzahlen wurde die Zelldichte in Neubauer-Zählkammern ermittelt.

#### 3.2.1.2.3 TD-2

Aus dem Pankreaskarzinom einer TGF $\alpha$ /p53<sup>+/-</sup>-transgenen Maus konnte die murine Zelllinie TD-2 generiert werden (Wagner et al., 2001; Greten et al., 2002), deren Genom auf chromosomale Zugewinne und Verluste mittels komparativer genomischer Hybridisierung genau charakterisiert wurde (Schreiner et al., 2003). Die TD-2-Zelllinie wurde ebenso wie MIA PaCa-2 in Vorarbeiten mit einem Expressionsvektor für das EGFP-„firefly“-Luziferase-Fusionsprotein, für das *tv-a*-Rezeptorgen und für eine Geneticin-Resistenz stabil transfiziert. Die Zellen wurden kultiviert in Gibco RPMI 1640, supplementiert mit 10 % FBS, 1 % P/S und 1000  $\mu$ g / ml Geneticin bei 37 °C. Im Stadium der Konfluenz wurde n sie im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 in frische Kulturgefäße umgesetzt.

#### 3.2.1.3 Herstellung von Dauerkulturen

Für die Herstellung von Dauerkulturen wurden die Zellen durch Trypsin von den Kulturgefäßen abgelöst, in serumhaltigem Medium resuspendiert und bei 1000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet konnte dann in gekühltem Gibco Freezing Medium gelöst werden, und die Zellsuspension wurde zu je ca. 0,5 ml auf spezielle Gefrieröhrchen verteilt und rasch bei -80 °C tiefgefroren. Nach 2-3 Tagen wurden die Dauerkulturen zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Aussaat wurden die Röhren aus dem Stickstofftank genommen, im Wasserbad bei 37 °C erhitzt und die Zellsuspension nach vollständiger Verflüssigung sofort in ein mit Medium vorbereitetes Kulturgefäß gegeben.

### 3.2.2 Retrovirale Infektion *in vitro*

#### 3.2.2.1 Transiente Transfektion von DF-1-Zellen mit Hilfe von Superfect

Die DF-1-Zellen wurden in einer Anzahl von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro 25 cm<sup>2</sup> Flasche ausgesät und 24 Stunden kultiviert. Am Tag 2 der Transfektion wurden die Zellen

zunächst mit ca. 2 ml serumhaltigem Medium gewaschen. Danach erfolgte der Ansatz der Transfektionslösung: 5 µg Plasmid-DNA wurden mit serumfreiem Medium auf eine Menge von 150 µl verdünnt, gemixt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurden 25 µl Superfect Transfection Reagenz (Qiagen) zugegeben, die Lösung für 10 sec gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das alte Medium von den Zellen entfernt, der Transfektionsansatz mit 1000 µl frischem Medium versetzt und nach dreimaligem Auf- und Abpipettieren rasch zu den DF-1-Zellen in den 25 cm<sup>2</sup> Flaschen gegeben. Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 37 °C im Brutschrank wurde das Transfektionsgemisch vollständig entfernt und die Zellen nochmals mit Medium gewaschen. Nach 3 bis 4 Tagen Anzucht konnten die konfluenten Zellen gesplittet und in größeren Flaschen weitergezogen werden.

#### 3.2.2.2 Virusernte und Infektion der Zelllinien

Etwa 1 Woche nach Transfektion waren sämtliche DF-1-Zellen mit dem RCAS-Virus infiziert und konnten schrittweise in größere 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen umgesetzt werden. Um möglichst hohe Virustiter im Zellüberstand zu erhalten, mussten die DF-1-Zellen auch in den großen Flaschen konfluent gewachsen sein. Dann wurden geringe Mengen Medium von ca. 10-15 ml pro 175 cm<sup>2</sup> Flasche zugesetzt und der virushaltige Überstand jeweils nach ca. 10-12 Stunden gewonnen. Nach Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min zur Entfernung verbliebener Zellen wurde dieser Überstand steril filtriert (Sarstedt Filter 0,45 µm) und konnte danach zur Infektion aller TVA-Rezeptor-exprimierenden Zellen verwendet werden. Der überschüssige Überstand wurde bei -80 °C tiefgefroren aufbewahrt; da beim Einfrieren ein deutlicher Aktivitätsverlust auftritt, empfiehlt sich für eine effiziente Infektion mit hoher Infektionsrate jedoch die Verwendung frisch filtrierten Mediums. Die Produktion und Gewinnung von RCAS-Virus-haltigem Zellüberstand erfolgte jeweils nur für den beschränkten Zeitraum von ca. 1 Woche, da retrovirale ALV-Viren häufig mutieren und dadurch auch das zu exprimierende Gen verloren gehen kann. Eine einfache Abhilfe bot die Anfertigung und Aufbewahrung von Dauerkulturen der frisch transfizierten DF-1-Zellen (siehe Kapitel 3.2.1.3). Sie konnten bei Bedarf ausgesät und bereits ab der zweiten Passage nach dem Auftauen zur effizienten Virusproduktion hergenommen werden.

### 3.2.2.3 $\beta$ -Galactosidase-Färbung nach Infektion mit RCAS lacZ

Das bakterielle Gen *lacZ* eignet sich gut als Reporter gen für Transfektionsversuche in eukaryotischen Zellen, da sein Genprodukt,  $\beta$ -Galactosidase, in Zelllysaten stabil bleibt und seine Aktivität leicht analysiert werden kann.  $\beta$ -Galactosidase katalysiert die Hydrolyse der  $\beta$ -Galactoside unter einer gut sichtbaren Blaufärbung.

Das  $\beta$ -Gal Staining Kit der Firma Invitrogen verwendet als Substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), welches in einer Konzentration von 20 mg / ml in N,N-Dimethylformamid (DMF) gelöst wird und so lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahrt werden kann. Die  $\beta$ -Galactosidase-Färbung der mit RCAS lacZ transfizierten Zellen erfolgte in 6-Well-Platten. Nach Absaugen des Mediums und gründlichem Waschen mit PBS-Puffer wurden die Zellen mit der im  $\beta$ -Gal Staining Kit enthaltenen Fixative Solution für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Während dieser Zeit konnte die Färbelösung entsprechend den Anweisungen des Herstellers Invitrogen hergestellt werden, welcher erst kurz vor Beendigung der Fixation das lichtempfindliche Substrat X-Gal zugefügt wurde. Als der Fixiervorgang abgeschlossen war, wurden die Wells nochmals gründlich gereinigt und anschließend nach Zugabe der Färbe- und Substratlösung bei 37 °C inkubiert. Etwa 3 Stunden später konnte die von der  $\beta$ -Galactosidase der transfizierten Zellen ausgelöste Blaufärbung durch Umsetzung des Substrats X-Gal lichtmikroskopisch beurteilt werden.

### 3.2.2.4 Quantifizierung der Luziferaseaktivität *in vitro*

Die Analyse erfolgte an Zellen, die in 6-Well-Platten ausgesät und herangewachsen waren. Nach Entfernung des Kulturmediums und Waschen der Wells mit PBS-Puffer wurden die Zellen mit der Methode der passiven Lyse gewonnen. Der Homogenisierungspuffer Passive Lysis Buffer (PLB, Promega) erlaubt eine rasche und effiziente Lyse der adhären Zellen ohne zusätzliche mechanische Hilfsmittel. Die bei -20 °C gelagerte 5 x PBL Stammlösung wird mit PBS-Puffer auf 1 x PBL verdünnt und anschließend zu 500  $\mu$ l pro Well den Zellen zugesetzt. Nach einer Inkubation von ca. 15 min bei Raumtemperatur unter Zuhilfenahme einer Schwenkplattenform (Polymax 1040, Fa. Heidolph) werden die Lysate durch Pipettieren homogenisiert, lichtgeschützt auf Eis gelagert und mittels geeigneten

Bioluminometers (Lumat LB 9507, EG&G Berthold) analysiert. Dazu werden in einem Polypropylen-Messröhrchen 100 µl eines Luziferase Assay Reagent, welches das entsprechende Substrat der „firefly“-Luziferase enthält, mit 5 µl des homogenisierten Zelllysates versetzt. Die automatische Analyse im Bioluminometer misst das Biolumineszenzsignal in relativen Luziferaseeinheiten (Saur et al., 2000).

Um die Luziferaseaktivität einzelner Proben miteinander vergleichen zu können, ist ein Bezug zur Gesamtproteinkonzentration in den jeweiligen Zelllysaten zwingend erforderlich. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Colombel et al., 2005) mit Rinderserumalbumin als Standard gemessen, beruhend auf dem Prinzip einer Änderung des Absorptionsmaximums von Coomassie Blau von 465 nm nach 595 nm durch Proteinbindung. Biorad Bradford Reagenz wurde mit sterilem destilliertem Wasser (Fa. Delta Select) 1:5 verdünnt und steril filtriert. Anschließend konnten in einer 96-Well-Platte je 200 µl dieser Reagenz mit 50 µl Standardlösung bzw. mit einem Gemisch aus je 40 µl destilliertem Wasser und 10 µl Lysatprobe zusammen pipettiert werden. Der Elisa-Reader Anthos 2001 der Fa. Bio-Rad ermöglicht die Proteinkonzentrationsbestimmung durch Absorptionmessung bei 595 nm und Vergleich der Lysatprobe mit der Absorption von Standardproben mit bekanntem Proteingehalt (Ausubel et al., 1995).

#### 3.2.2.5 BrdU-Zellproliferations-Assay

Die BrdU-Zellproliferations-Analyse (Cell proliferation Elisa BrdU, Fa. Roche) ist eine einfache und schnelle Methode zur Messung der Proliferationsaktivität. Sie basiert auf der Inkorporation des Pyrimidin-Analogons 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) anstelle der Base Thymidin in die DNA proliferierender Zellen und anschließender Detektion und Quantifizierung des BrdU-Einbaus mittels geeigneter BrdU-Antikörper als Enzyme Immunoassay, ELISA (Porstmann et al., 1985).

Zur Überprüfung des inhibierenden Einflusses der retroviralen Infektion mit bestimmten Genen wurden MIA PaCa-2- und TD-2 Zellen in 96-Well-Platten zu 1000 Zellen pro Well ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen in Gruppen von jeweils 5 Wells mit 100 µl RCAS-Virus-haltigem Überstand infiziert. 96 Stunden nach Aussaat erfolgte die Zugabe von 10 µl BrdU-Inkorporationslösung pro Well und Reinkubation für 4

Stunden bei 37 °C. Das weitere Vorgehen mit Immunoassay durch Antikörper-Detektion erfolgte anhand der Anleitungen des Herstellers.

Zur Auswertung wurde der Elisa-Reader Anthos 2001 der Fa. Bio-Rad verwendet mit photometrischer Absorptionmessung bei 370 nm 5, 15 bzw. 30 Minuten nach Zugabe des Reaktionssubstrats. Die 5 Absorptionswerte einer jeden Gruppe dienten zur Ermittlung eines Mittelwertes als relatives Maß für die Proliferationsaktivität und für den Vergleich mit der Aktivität von nicht-infizierten Zellen bzw. von Kontrollen.

### 3.2.3 Induzierte Expression retroviral transferierter Gene

Die Expression proliferationshemmender Faktoren durch retrovirale Infektion behindert das weitere Wachstum transfizierter Zellen bis hin zur Apoptose bereits *in vitro*. Ein derartiger Effekt mit Proliferationsblockade gerade der effizient infizierten Zellen verhindert somit die weitere Verwendung im Mäuseversuch, da die weniger gut oder gar nicht infizierten Zellen das weitere Tumorstadium dominieren würden. Aus diesem Grund wäre ein System ideal, welches die Expression retroviral transfizierter Gene *in vitro* vollständig inhibiert und ein gezieltes An- bzw. Abschalten erst nach der Zellinjektion in Mäuse gestattet.

Eine Möglichkeit bietet die Etablierung eines Systems mit effektiver Blockade der Genexpression und tetrazyklin-regulierter Expression. Der H1 Promoter des pENTR / H1 / TO Entry-Vektors (Invitrogen) verfügt über 2 sogenannte Tet Operator Sequenzen, die aus dem prokaryotischen Tetrazyklin Resistenz Operon von E.coli entwickelt wurden (siehe Kapitel 3.1.1.3). Für die Unterdrückung der Expression wird ein sogenannter Tet-Repressor benötigt, welcher jeweils als Homodimer mit großer Affinität an die beiden Tet Operator Sequenzen bindet und damit die Transkription der darauffolgenden Genabschnitte unterbindet (Hillen und Berens, 1994).

#### 3.2.3.1 Retrovirale Infektion mit dem Tet-Repressor

In diesen Experimenten wurde als Tet-Repressor die *rtTA*-Sequenz (reverse tetracycline transcriptional transactivator) verwendet, welche in den RCAS-Vektor zusammen mit einem Resistenzgen gegen das Antibiotikum Puromycin kloniert wurde. Mit diesem RCAS-Plasmid wurden DF-1-Zellen entsprechend der Methode mit Superfect transfiziert und der entsprechende virushaltige Überstand zur Infektion von



MIA PaCa-2- bzw. TD-2-Zellen hergenommen. Nach Infektion der Tumorzellen erfolgte eine Selektion der *rtTA*-exprimierenden Zellen durch Zugabe des Antibiotikums Puromycin in einer Konzentration von 10 µg / ml Medium. Da Rinderserum Spuren von Tetrazyklin enthalten kann, wurde zu diesem Zeitpunkt umgestellt auf spezielles, komplett von Tetrazyklin befreites FBS. Durch die Selektion *rtTA*-exprimierender MIA PaCa-2- und TD-2-Zellen konnten diese für *in vitro* Versuche zur induzierten tetrazyklin-regulierten Expression von Reportergenen verwendet werden.

### 3.2.3.2 Prinzip der tetrazyklin-gesteuerten Expression

In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der Tet-Repressor, das Genprodukt von *rtTA*, jeweils als Homodimer mit großer Affinität an jede der beiden Tet Operator Sequenzen im H1 Promotor des pENTR / H1 / TO Entry-Vektors (Hillen und Berens, 1994); in dieser Konfiguration wird die Expression der in den Entry-Vektor klonierten Gene unterdrückt. Nach Zugabe von Tetrazyklin zum Medium in der empfohlenen Konzentration von 1 µg / ml (Tetracycline, Invitrogen) bindet Tetrazyklin hochaffin an den Tet-Repressor in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1; diese Bindung verändert die Konformation des Tet-Repressors, sodass er von den Operator-Sequenzen abdissoziiert und die Transkription der Genabschnitte nach dem H1-Promotor stattfinden kann. Wird Tetrazyklin entfernt, kann der Tet-Repressor wieder an die Operator-Sequenzen binden und die Expression nachfolgender Genabschnitte somit erneut „abschalten“.

### 3.2.4 Proteinernte, Proteinkonzentrationsbestimmung und Western-Blot-Analyse

Die Analyse erfolgte an retroviral infizierten MIA PaCa-2- sowie TD-2-Zellen, welche in 10 cm Schalen kultiviert wurden. Die Zellen wurden insgesamt 3-mal im Abstand von ca. 10 Stunden mit je 10 ml virushaltigem Überstand von transfizierten DF-1-Zellen infiziert und weitere 24 Stunden nach der letzten Infektion zur Proteinanalyse abgeerntet. Im Anschluss an Bestimmung und Angleichung des Proteingehaltes erfolgte eine Western-Blot-Analyse zum Nachweis spezifischer Proteine mit bestimmtem Molekulargewicht nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Interaktion. Die Proteine wurden über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und dort durch Vergleich mit einem Standard-Proteingemisch und durch Antikörperdetektion nachgewiesen.

#### 3.2.4.1 Zellernte und Proteinextraktion

Vor der Ernte der Zellen aus den Kulturschalen wurde der Lysispuffer nach der folgenden Anleitung in Tabelle 9 auf Eis hergestellt:

Tabelle 9: Herstellung von Lysispuffer

<b><i>Lysispuffer</i></b>		
Tris 100 mM pH 7,6	2,5	ml
Aqua dest.	1,9	ml
Triton X 100	550	µl
EDTA 0,5 M	10	µl
Protease-Inhibitor-Cocktail	50	µl
β-Mercaptoethanol	4,2	µl
PMSF 100 mM	50	µl

Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen gründlich mit je 10 ml gekühltem PBS-Puffer pro Schale gewaschen. Anschließend konnten je 400 µl des auf Eis gelagerten Lysispuffers den Zellen zugegeben und der Zellrasen mit einem Schaber mechanisch abgelöst werden. Die Lysate wurden mit einer 2 ml Spritze vollständig in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für mindestens 2-3 Stunden bei -80 °C eingefroren. Nach vorsichtigem Auftauen auf Eis mussten die Lysatproben vor Beginn der weiteren Schritte zur Proteinkonzentrationsbestimmung für 10 Minuten mit 16000 rpm bei 4 °C zentrifugiert werden.

#### 3.2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate erfolgte nach der Methode von Bradford mit Rinderserumalbumin als Standard (Colombel et al., 2005). Nach diesem Prinzip bewirkt die Proteinbindung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Blau von 465 auf 595 nm; ein Vergleich mit Absorptionwerten einer

Standardprobe mit bekanntem Proteingehalt ermöglicht dann die Konzentrationsbestimmung in den Lysatproben (Ausubel et al., 1995).

Das mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnte und steril filtrierte Biorad Bradford Reagenz wurde zu je 250 µl in die benötigten Wells einer 96-Well-Platte gegeben. Zugefügt wurden die entsprechenden Mengen der Standardreihe mit 0,5 bis 6 µg / ml Protein bzw. je 1 µl der nach dem Auftauen zentrifugierten Lysate. Nach Absorptionsmessung im Anthos 2001 Elisa Reader und daraus abgeleiteter Konzentrationsbestimmung konnte der Proteingehalt sämtlicher Proben durch entsprechende Verdünnung mit Lysispuffer exakt angeglichen werden.

### 3.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor der Auftrennung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die in ihrem Proteingehalt angeglichenen Lysatproben durch Zugabe des Ladepuffers Roti-Load 1 (Fa. Roth) im Verhältnis 1:4 und Erhitzen bei 95 °C für 5 min denaturiert. Das Prinzip der SDS-PAGE beruht auf der Bindung des stark anionischen Detergenz Natriumdodecylsulphat (SDS) an die denaturierten Proteine, was eine Auftrennung der dadurch negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld ermöglicht. Die verwendeten Polyacrylamidgele wurden nach Tabelle 10 hergestellt:

Tabelle 10: Herstellung von Gelen und Puffern für die SDS-PAGE

<b>Trenngel</b>	7,5 %	9 %	12 %	15 %
Aqua dest.	4,9 ml	4,7 ml	3,4 ml	2,5 ml
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml
Acrylamid 30 %	2,5 ml	2,7 ml	4,0 ml	5,0 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS (Ammoniumpersulfat) 10 %	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

<b>Trenngelpuffer</b>	
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) 1,5 M	36,3 g
HCl auf pH 8,9 einstellen	

<b>Sammelgel</b>		<b>Sammelgelpuffer</b>	
Aqua dest.	3,0 ml	TRIS 0,5 M	12,1 g
Sammelgelpuffer	1,3 ml	(Tris(hydroxymethyl)-	
Acrylamid 30 %	750 µl	aminomethan)	
SDS 10 %	50 µl	HCl auf pH 6,8	
APS (Ammoniumpersulfat) 10 %	25 µl	einstellen	
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	10 µl		

Das Trenngel wurde nach Initiierung der Polymerisation durch die Zugabe von TEMED zügig in eine BioRad Minigel Apparatur gegossen und zur Erzeugung einer horizontal geraden Oberfläche mit 1 ml 100 % Ethanol überschichtet. Während der Polymerisation konnten die Substanzen für das Sammelgel entsprechend der Anleitung zusammenpipettiert werden. Nach ca. 30 min Aushärtung des Trenngels konnte der Ethanol entfernt und die Reaktion des Sammelgels durch TEMED gestartet werden. Das Sammelgel wurde rasch auf das auspolymerisierte Trenngel gefüllt und für die Erzeugung von Taschen ein Kamm mit 10 Zähnen eingesetzt.

Das fertig gegossene und gehärtete Gel konnte dem Gießstand entnommen und in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer fixiert werden, welche mit Laufpuffer gefüllt war (Glycin 0,2 M; TRIS 0,025 M; SDS 0,1 %). Anschließend wurden die Kämme aus den Sammelgelen entfernt und die Taschen mit je 40 µl der denaturierten Lysatproben gefüllt; dabei flankierte der Marker Precision Plus Protein All blue Standard (Fa. BioRad) die Proben. Die Auftrennung der Proteine wurde durch Anlegen einer Spannung von 120 mV gestartet und der Verlauf der Gelelektrophorese anhand der blau gefärbten Front ständig kontrolliert.

#### 3.2.4.4 Western-Blot-Analyse und immunologische Detektion

Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine vom Gel mittels Elektroblothing auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Fa. BioRad) übertragen. Der Transfer erfolgte in der Apparatur Protean II (Fa. BioRad) unter der Verwendung von Transferpuffer (Glycin 0,04 M; TRIS 0,05 M; Ethanol 20 %; SDS 0,04 %) (Towbin et al., 1979; Burnette et al., 1981). Die kurz in Methanol aktivierte und in Aqua dest. gewaschene PVDF-Membran wurde auf drei in Transferpuffer

getränkte Whatman-Papiere platziert und mit dem Polyacrylamidgel luftblasenfrei bedeckt. Nach Überschichtung mit nochmal drei in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren wurde das Elektroblothing mit 150 mA pro Gel für 20 min (p16<sup>Ink4a</sup> und p19<sup>ARF</sup>), 1 Stunde (p53, c-myc) bzw. 2 Stunden (EGF-R) begonnen.

Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran für 45 min in Odyssey Blocking-Puffer (Fa. Li-Cor) geschwenkt, um durch Blockierung von Proteinbindungsstellen an der Membran einer unspezifischen Antikörperdetektion vorzubeugen. Danach wurde die Membran mit dem jeweiligen, in Blocking-Puffer verdünnten primären Antikörper (siehe Tabelle 11) über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Am folgenden Tag musste die Membran mit TBS-Puffer (TRIS 200 mM; NaCl 1,37 M; HCl auf pH 7,6 einstellen; NP-40 0,1 %) in drei Schritten für jeweils 15 min gründlich gewaschen werden. Die Inkubation mit dem ebenfalls in Blocking-Puffer verdünnten sekundären Antikörper erfolgte lichtgeschützt für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Eingesetzt wurden Alexa680-gekoppelte (Fa. Molecular Probes) bzw. IRDeye800-gekoppelte (Fa. Rockland) sekundäre Antikörper. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal 15 min mit TBS-Puffer gereinigt und die Membran unter Verwendung des Odyssey Infrared Imaging System (Fa. Li-Cor) gescannt. Das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion beruht auf der Detektion eines an den sekundären Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes. Die gescannte Detektion wurde mit Hilfe der Software Odyssey R 1.2 ausgewertet.

Tabelle 11: Für Western-Blot-Analyse verwendete primäre Antikörper

Produktname	Firma	Ursprung	Verdünnung
anti-p53 554166	BD PharMingen	Maus	1:1000
anti-p16 (M-156): sc-1207	Santa Cruz Biotechnology	Hase	1:200
anti-p19 556426	BD PharMingen	Maus	1:1000
anti-EGF-R #2232	Cell Signaling Technology	Hase	1:1000
anti-c-myc (C-19): sc-788	Santa Cruz Biotechnology	Hase	1:200
anti-β-actin A5316	Sigma	Maus	1:2000

### **3.3 *In vivo*-Versuche**

#### **3.3.1 Verwendeter Mausstamm und Tierhaltung**

##### 3.3.1.1 Nacktmausstamm Swiss nu / nu, Charles River

Bei den Tieren in den *in vivo*-Experimenten handelte es sich um ausschließlich weibliche Nacktmäuse der Gattung Swiss nu / nu, welche von Charles River (Sulzbach, Deutschland) aus spezifisch pathogenfreier Zucht zur Verfügung gestellt wurden. Die immunodefizienten Mäuse sind aufgrund einer autosomal-rezessiven Mutation des Nude-Gens haarlos, athym und T-Zell-defizient.

##### 3.3.1.2 Haltung der Mäuse

Die bei ihrer Ankunft etwa 6 Wochen alten weiblichen Nacktmäuse wurden zu je 3-5 Tieren in artgerechten Käfigen des ZPF-Tierstalls des Klinikums rechts der Isar untergebracht. Die Haltung erfolgte bei ca. 26 °C und 50-60 % Luftfeuchtigkeit, mit einer Versorgung der Tiere durch Leitungswasser und das Standardfuttermittel Altromin 1314. Die Versuche wurden frühestens 14 Tage nach der Einstallung begonnen, als die Mäuse ein Gewicht von ca. 18-22 g erreicht hatten.

#### **3.3.2 Tierexperimentelle Methoden**

Die Tiere wurden im Alter von 8-10 Wochen für die *in vivo*-Versuche hergenommen. Die orthotope Injektion der Tumorzellen erfolgte unter Inhalationsnarkose mit Isofluran sowie begleitender Analgesie. 5 Tage nach der Operation wurden die Mäuse unter Injektionsnarkose erstmals mit einer Charged Coupled Device (CCD) - Kamera der Firma Hamamatsu auf das *in vivo*-Biolumineszenzsignal der Tumorzellen untersucht und anschließend in Versuchsgruppen eingeteilt. Die retrovirale Infektion der Tumorzellen *in vivo* erfolgte durch intraperitoneale Injektion der RCAS-Virus-produzierenden DF-1-Zellen. Danach konnte die Progression der Tumoren in den Nacktmäusen durch Biolumineszenz-Imaging longitudinal im Verlauf analysiert werden. Im Stadium der ausgeprägten Tumorausdehnung mit Aszitesbildung wurden die Tiere getötet und das Gewicht der gewachsenen Tumoren bestimmt. Die

Auswertung geschah durch vergleichende Analysen von Ausgangs- und Endwert des Biolumineszenzsignals unter der Bedingung einer aussagekräftigen Korrelation zwischen *in vivo*-Signalstärke und dem Gewicht der isolierten Tumoren.

### 3.3.2.1 Verwendete Apparaturen, Narkotika und Analgetika

Tabelle 12: Materialien und Substanzen für die Mausnarkose

<b><i>Inhalationsnarkose</i></b>
Narkosegerät mit Verdampfer, Fa. Völker, Kaltenkirchen
Ventilator Voltcraft PS 152 A
Reiner Sauerstoff O <sub>2</sub> -Medica (SW Sauerstoffwerk Friedrichshafen)
Isofluran Forene <sup>®</sup> (Fa. Abbott) 250 ml Flasche
Atemkalk Drägersorb <sup>®</sup> Free (Fa. Dräger)

<b><i>Schmerzmittel und andere Substanzen</i></b>
Metamizol (Novalgin <sup>®</sup> ) 10 µl / g KG 30 min präoperativ
Meloxicam (Metacam <sup>®</sup> ) 10 µl / g KG unmittelbar postoperativ
Dexpanthenol (Bepanthen <sup>®</sup> ) Augensalbe
NaCl 0,9% Gebrauchslösung DeltaSelect

Vollständig antagonisierbare Anästhesie (VAA) bei der Maus (Henke et al., 2002):

<b><i>Injektionsnarkotikum MMF</i></b>	
Medetomidin (Domitor <sup>®</sup> )	0,5 mg / kg KG
Midazolam (Dormicum <sup>®</sup> )	5,0 mg / kg KG
Fentanyl (Fentanyl Curamed <sup>®</sup> )	0,05 mg / kg KG

<b><i>Antagonisierung AFN</i></b>	
Atipamezol (Antisedan <sup>®</sup> )	2,5 mg / kg KG
Flumazenil (Anexate <sup>®</sup> )	0,5 mg / kg KG
Naloxon (Naloselect <sup>®</sup> )	1,2 mg / kg KG

### 3.3.2.2 Orthotope Implantation von Tumorzellen in das Pankreas

Die orthotope Injektion beschreibt die intrapankreatische Injektion der MIA PaCa-2- bzw. TD-2-Zellen in Nacktmäuse. Die Operation der Versuchstiere erfolgt als laterale Laparotomie unter Inhalationsnarkose mit Isofluran und begleitender Analgesie. Injiziert wurde jeweils ein Volumen von 25 µl der in serumfreiem Medium resuspendierten Zellen.

#### 3.3.2.2.1 Vorbereitung der Zellen

Für die orthotope Injektion wurden die Tumorzellen als Dauerkulturen frisch ausgesät und über 2 Passagen in große 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen umgesetzt. Im Stadium der Konfluenz konnten die Zellen mit Trypsin-EDTA geerntet werden. Nach Resuspension mit frischem Medium und Zentrifugation für 5 min mit 1000 rpm bei 25 °C wurde die Zellzahl der Suspension durch Einsatz von Neubauer-Zählkammern ermittelt. Danach konnte die gewünschte Anzahl Tumorzellen in jeweils entsprechenden Mengen serumfreien Mediums gelöst werden: MIA PaCa-2 wurden in einer Anzahl von  $1 \times 10^6$  bzw.  $5 \times 10^6$  Zellen pro 25 µl Zellsuspension verwendet, die TD-2 in der deutlich geringeren Menge von  $1 \times 10^4$  Zellen pro 25 µl Suspension.

#### 3.3.2.2.2 Lagerung, Anästhesie und Analgesie der Mäuse

Eine für operative Eingriffe an kleinen Nagern geeignete Form der gut steuerbaren Anästhesie ist die Inhalationsanästhesie, welche sich zudem durch eine reduzierte Mortalität auszeichnet (Wixson, 1994). Verwendet wurde hierfür ein geschlossenes Kreissystem mit vorgeschaltetem Präzisionsverdampfer der Fa. Völker GmbH.

Das volatile Anästhetikum Isofluran Forene<sup>®</sup> (Fa. Abbott) wird aufgrund seines niedrigen Blut/Gas-Verteilungskoeffizienten schnell an- bzw. abgeflutet und erlaubt eine gute Steuerbarkeit der Narkose bei geringer Toxizität sowie vernachlässigbarer Mutagenität und Teratogenität (Eger, 1981).

Reiner Sauerstoff dient als Trägergas und wird über ein geeignetes Flowmeter dem Verdampfer zugeführt. Das erzeugte Trägergas-Anästhetikum-Gemisch gelangt über die Gebläse-Einheit des Ventilators und den Inspirationsschlauch zur Kopfkammer, in welche die Schnauze des Tieres platziert wird. Die Ausatemluft wird nach CO<sub>2</sub>-



Absorption im Atemkalkbehälter mit Frischgas vermischt und erneut dem Inspirationsschenkel zugeführt (Ginder, 2000).

Der Einsatz einer Kopfkammer gewährleistet bei guter Lage der Tierschnauze eine effiziente Inhalation des Anästhetikums bei gleichzeitig freiem Zugang zum Körper der Maus. Die Tiere sind für die Operation auf dem Rücken gelagert und an den Extremitäten durch Klebestreifen ausreichend an der Unterlage fixiert.

Die begleitende Analgesie der Mäuse setzt sich zusammen aus der i.p.-Injektion von Metamizol (Novalgin<sup>®</sup>) 10 µl / g KG ca. 30 min vor Beginn der Operation sowie der raschen postoperativen Gabe von Meloxicam (Metacam<sup>®</sup>) 10 µl / g KG.

#### 3.3.2.2.3 Intrapankreatische Injektion der Tumorzellen

Die Operation beginnt bei ausreichender Narkose mit einer lateralen Laparotomie von ca. 1 cm Länge knapp unterhalb des linken Rippenbogens. Nach sorgfältiger Präparation des subkutanen Gewebes wird das Peritoneum auf einer Länge von ca. 0,6 cm ventral der durchschimmernden Milz eröffnet. Bei leichtem Zug an der Milz mit einer Pinzette kann nun die bei Mäusen intraperitoneal gelegene Bauchspeicheldrüse dargestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt werden 25 µl Zellsuspension in einer geeigneten Injektionsspritze (Hamilton Microliter Syringus, Gastight 0,05 ml) aufgezogen und anschließend bei leichtem ventralem Zug am Pankreasgewebe mit einer stumpfen Pinzette möglichst senkrecht von oben injiziert. Als direktes Zeichen der erfolgreichen Injektion entsteht dabei häufig eine sichtbare kleine intrapancreatische Blase. Dennoch besteht das größte Problem in der schwierigen Beurteilung der korrekten intrapancreatischen Injektion der Zellsuspension ohne Durchspießung des Pankreas mit folgender intraperitonealer Zellaussaat. Um die Gefahr dieser Zelldissimination zu verringern, wird die Nadel der Spritze nach Injektion noch ca. 1 min in der entsprechenden Position belassen. Danach wird das Operationsgebiet mit steriler Kochsalzlösung gespült, der natürliche Situs von Pankreas und Milz wiederhergestellt und das Peritoneum mit 2 Einzelnähten verschlossen. Der Hautverschluss erfolgt als Kombination von 3-4 Klammern mit Einzelnähten zur Prophylaxe offener Wunden nach Wiedererwachen der Tiere. Die vom übrigen Wundverschluss getrennte, eigene Naht des Peritoneums vermindert die Rate an postoperativen Nachblutungen erheblich. Nach Beendigung von Operation und Narkose wird jeder Maus 300 µl sterile 0,9 % NaCl-Lösung s.c.

injiziert. Im Falle einer stärkeren Nachblutung aus der Wundgegend muss das Operationsfeld umgehend revidiert und die Wunde effizient verschlossen werden.

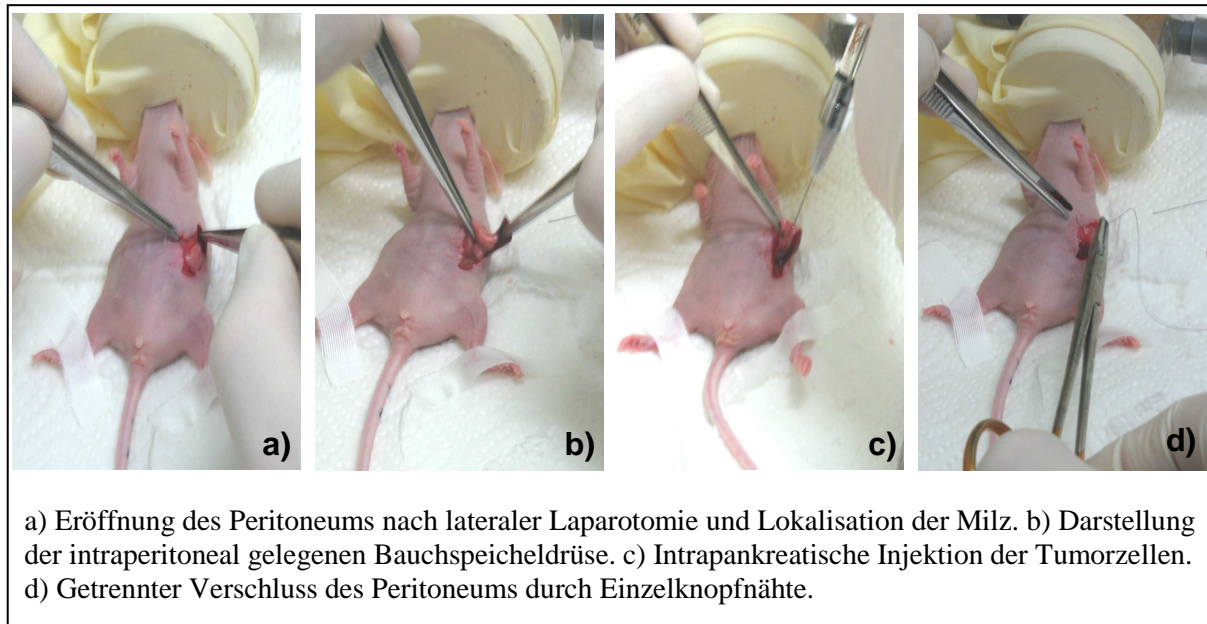


Abbildung 15: orthotope Injektion der Tumorzellen unter Inhalationsnarkose

### 3.3.2.3 Intraperitoneale Injektion von DF-1-Zellen

Die intraperitoneale Injektion von RCAS-Virus-produzierenden DF-1-Zellen ist eine Alternative zur retroviralen Infektion bereits *in vitro* mit induzierter, tetrazyklinregulierter Expression. Das Prinzip beruht auf einer „*in vivo*-Infektion“ der zuvor orthotop injizierten Tumorzellen. Dazu werden die mit einem bestimmten RCAS-Plasmid transfizierten DF-1-Zellen (siehe Kapitel 3.2.2.1) in großen Mengen kultiviert, mit Trypsin-EDTA geerntet und in frischem Medium resuspendiert; durch Analyse der Zelldichte mit Neubauer-Zählkammern können die DF-1-Zellen dann in einer Anzahl von insgesamt  $2 \times 10^7$  Zellen pro 500  $\mu\text{l}$  serumfreien DMEM-Mediums gespritzt werden. Die i.p.-injizierten DF-1-Zellen produzieren den entsprechenden RCAS-Virus weiter als Bedingung für eine erfolgreiche retrovirale Infektion *in vivo*.

### 3.3.3 *In vivo*-Biolumineszenz-Imaging (BLI)

Das BLI beruht auf einer Lichtemission durch enzymatische Reaktion von Luziferase mit seinem Substrat D-Luziferin. Dazu wurde den Mäusen D-Luziferin in einer Konzentration von 150 mg / kg KG zusammen mit den Injektionsnarkotika injiziert

und das Biolumineszenzsignal der enzymatischen Reaktion nach ca. 10 min nichtinvasiv analysiert. Die emittierten Lichtsignale konnten durch eine hochsensitive CCD-Kamera detektiert und mittels geeigneter Computer-Software direkt dargestellt und verarbeitet werden (Saur et al., 2005).

### 3.3.3.1 Injektionsnarkose der Mäuse (VAA)

Die Narkose der Mäuse für die Detektion des Biolumineszenzsignals unter der CCD-Kamera erfolgte als vollständig antagonisierbare Injektionsanästhesie (VAA). Die als MMF bezeichnete Kombination des  $\alpha^2$ -Agonisten Medetomidin (Domitor<sup>®</sup>), des Benzodiazepins Midazolam (Dormicum<sup>®</sup>) und des Opioids Fentanyl (Fentanyl Curamed<sup>®</sup>) mit den in Kapitel 3.3.1.2 angegebenen Dosierungen (Henke et al., 2002) wird gemeinsam mit D-Luziferin in einer 1 ml Tuberkulin-Spritze aufgezogen und i.p. injiziert. Vorteil der VAA durch MMF ist die Möglichkeit der einfachen und vollständigen Antagonisierung durch AFN, eine Kombination aus Atipamizol (Antisedan<sup>®</sup>), Flumazenil (Anexate<sup>®</sup>) und Naloxon (Naloselect<sup>®</sup>). Nach Beendigung des BLI wird AFN ebenfalls i.p. injiziert, und die Mäuse werden für die Aufwachphase in eine Wärmekammer (Fa. Heraeus) gebracht.

### 3.3.3.2 Verwendete Materialien und Aufnahmetechnik

<b><i>Biolumineszenz-Imaging</i></b>
Cc4742 - LAG-2 CCD-Kamera, Fa. Hamamatsu Photonics K.K, Herrsching D-Luziferin (Fa. Synchem, Kassel) 150 mg / kg KG

Als Substrat für die Luziferase-Reaktion *in vivo* diente D-Luziferin (Fa. Synchem). Es wurde den Mäusen in einer Dosierung von 150 mg / kg KG gemeinsam mit dem Kombinationsanästhetikum MMF mindestens 10 min vor Beginn der Aufnahmen i.p. injiziert, um eine ausreichende Verteilung im Körper zu gewährleisten.

Die Analyse des Biolumineszenzsignals mit Bildaufnahme erfolgte mit dem Gerät Cc4742 – LAG-2 der Fa. Hamamatsu Photonics K.K. Diese CCD (charged coupled device) Kamera mit back-thinned Technologie ermöglicht eine hochsensitive und effektive Bilddetektion in einem großen Wellenlängenbereich vom nahen Infrarot- bis

zum UV-Spektrum. Zudem zeichnet sich das Gerät durch ein großes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aus, was die Sensitivität des BLI erhöht. Eine Kühlung auf bis zu -80 °C erlaubt den Einsatz auch bei geringer äußerer Lichtintensität. Die Aufnahmen konnten anschließend direkt an einen angeschlossenen PC übermittelt und mit Hilfe des Software-Programms Simple PCI von Compix C. imaging Systems dargestellt und verarbeitet werden.

#### 3.3.3.3 Auswertung der BLI-Aufnahmen

Die Darstellung der Bildaufnahmen am angeschlossenen Computer erfolgte als Grauwerte entsprechend der Intensität und Lokalisation des detektierten Biolumineszenzsignals. Das Programm Simple PCI ermöglichte eine Projektion dieser Grauwerte auf Leerbilder der Maus mit einer graphischen Darstellung in Pseudofarben. Außerdem erlaubte die Software eine semiquantitative Analyse der Signalintensitäten durch Erfassung der Grauwert-Intensität mit Angabe als relative Luziferaseaktivität. Dazu wurde die Stärke der dem Biolumineszenzsignal entsprechenden Flächen der Aufnahme gemessen und von dieser der Leerwert des nicht lumineszierenden Hintergrundes subtrahiert.

#### 3.3.4 Ablauf der Versuchsreihen

Ziele der *in vivo*-Versuche sind eine Verlaufsbeobachtung des Wachstums orthotop implantierter Pankreaskarzinomzellen mit der Methode des BLI sowie die retrovirale Expression von Genen durch Einsatz des RCAS-TVA-Systems. Außerdem sollen durch Infektion mit unterschiedlichen RCAS-Plasmiden proliferationshemmende Faktoren *in vivo* charakterisiert werden. Die nötige Einteilung der Mäuse in Versuchsgruppen kann dabei entweder vor oder nach der ersten BLI-Analyse vorgenommen werden. Anschließend wird das Tumorstadium der Tiere durch BLI longitudinal im Verlauf nichtinvasiv verfolgt und gegenüberstellend ausgewertet. Im Stadium der fortgeschrittenen Tumorerkrankung werden die Tiere getötet, gefolgt von einer Gewichtsbestimmung der Tumoren, Visualisierung des EGFP-Signals sowie einer  $\beta$ -Galactosidase-Färbung nach Infektion mit RCAS lacZ.

### 3.3.4.1 Gruppierung der Mäuse

Die mit MIA PaCa-2-Zellen injizierten Mäuse wurden bereits vor der orthotopen Injektion in einzelne Versuchsgruppen aufgeteilt, wobei die Tiere einer Gruppe alle genau denselben Zellklon aus der jeweiligen Kulturflasche erhielten. Für die Untersuchung der Effekte einer retroviralen Infektion mit RCAS p53, p16<sup>Ink4a</sup>, p19<sup>ARF</sup> und lacZ (Kontrolle) wurden 3 Gruppen mit jeweils 4 Tieren gebildet. Aufgrund der Wachstumseigenschaften humaner MIA PaCa-2-Zellen in Nacktmäusen konnte die *in vivo*-Infektion jedoch erst sehr spät durchgeführt werden (siehe Kapitel 4.3).

In den Experimenten mit orthotop injizierten TD-2-Zellen wurden die einzelnen Mäuse erst nach der ersten BLI-Analyse am 5. postoperativen Tag auf die Versuchsgruppen aufgeteilt. Ziel war die Gruppierung von Mäusen mit möglichst ähnlichen BLI-Signalintensitäten für eine besser zu beurteilende Verlaufsbeobachtung innerhalb der Gruppen, da die Ausgangswerte trotz gleicher Anzahl von orthotop implantierten Zellen z.T. erheblich variierten. Überprüft wurden die Effekte einer retroviralen Infektion mit RCAS p16<sup>Ink4a</sup>, p19<sup>ARF</sup> und lacZ (Kontrolle) mit 3 Gruppen zu je 3 Mäusen, eine Gegenüberstellung von RCAS p53 und lacZ (Kontrolle) in 2 Gruppen zu je 6 Mäusen sowie der knockdown mit RCAS shRNA EGF-R, shRNA c-myc und shRNA Co (Kontrolle) in 3 Gruppen zu je 3 Mäusen.

### 3.3.4.2 Tötung der Tiere, Tumorentnahme und Gewichtsbestimmung

Bei weit fortgeschrittenem Tumorstadium mit starker Aszitesbildung wurden die Mäuse unter ausreichender Injektionsnarkose mit MMF durch mechanischen Genickbruch getötet. Für eine abschließende Erfassung des Luziferasesignals der Tumoren war den Tieren 10 min vor dem Exitus D-Luziferin gemeinsam mit den Narkotika verabreicht worden. Hierdurch konnten noch einmal *in vivo*-Aufnahmen mit Analyse des Biolumineszenzsignals vorgenommen werden. Danach wurde das Abdomen der getöteten Mäuse mit einer langen medianen Laparotomie eröffnet und der Primärtumor sowie eventuell makroskopisch sichtbare metastatische Absiedelungen entsprechend der BLI-Bilder lokalisiert. Sämtliche Tumoranteile wurden mit Pinzette und Skalpell entnommen, von anderen Geweben, wie Anteilen der Milz, isoliert und mit einer Feinwaage gewogen, um das Gewicht des Gesamttumors als relatives Maß für seine Ausdehnung zu erhalten.

Ergänzend zum BLI wurde *ex vivo* das EGFP-Signal der resezierten Tumoren unter einer Blaulicht-Lampe bei einer Wellenlänge von ca. 480 nm detektiert. Die EGFP-Analyse ermöglichte die exakte Lokalisation der Tumoren und eventuell vorhandener größerer Absiedelungen im Abdomen aufgrund des Fluoreszenzsignals der stabil mit EGFP transfizierten Zellen. Zudem erleichterte sie eine Abpräparation tumorfremder Gewebe, wie z.B. von Anteilen der Milz, vor der Gewichtsbestimmung der Tumoren.

### 3.3.4.3 $\beta$ -Galactosidase-Färbung entnommener Gewebe

Eine retrovirale Infektion der Tumorzellen *in vivo* mit RCAS lacZ ermöglicht eine Kontrolle der Infektionseffizienz durch  $\beta$ -Galactosidase-Färbung *ex vivo* entnommener Gewebe. Das Prinzip beruht wie bei der *in vitro*-Färbung einzelner Zellen auf der Umsetzung des Substrates X-Gal durch das von lacZ exprimierte Enzym  $\beta$ -Galactosidase mit sichtbarer Blaufärbung (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Lösungen und Puffer für die  $\beta$ -Galactosidase-Färbung von Geweben

<b><i>lacZ-Fixationslösung</i></b>	<b>25</b>	<b>ml</b>
Gibco D-PBS	21,9	ml
Magnesium-Chlorid-Lösung MgCl <sub>2</sub> 1M	2,5	ml
Glutaraldehyd 50 %	0,1	ml
EDTA 250 mM	0,5	ml
<b><i>lacZ-Waschpuffer</i></b>	<b>125</b>	<b>ml</b>
Gibco D-PBS	122,5	ml
Magnesium-Chlorid-Lösung MgCl <sub>2</sub> 1M	250	$\mu$ l
Natrium-Deoxycholat 1 %	1,25	ml
NP-40 2 %	1,25	ml
<b><i>lacZ-Färbelösung</i></b>	<b>25</b>	<b>ml</b>
lacZ Waschpuffer	23,5	ml
X-Gal 20 mg / ml in DMF gelöst	1	ml
Kalium-Ferrocyanid K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 500 mM	250	$\mu$ l
Kalium-Ferricyanid K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] 500 mM	250	$\mu$ l

Die aus den getöteten Tieren resezierten Tumoren wurden gemeinsam mit Anteilen von Leber oder Milz gründlich mit Gibco-PBS gewaschen und mit dem Skalpell zur Schaffung einer Schnittfläche durch den gesamten Tumor halbiert. Danach konnten die Proben durch Zugabe von lacZ-Fixationslösung für mindestens 4 Stunden unter Schütteln bei 4 °C fixiert werden. Anschließend wurden die Gewebe dreimal je 20 min gründlich in lacZ-Waschpuffer gewaschen und dann über Nacht lichtgeschützt in lacZ-Färbelösung bei Raumtemperatur gelagert. Am folgenden Tag konnte das Ergebnis anhand der Blaufärbung beurteilt werden.

### **3.3.5 Statistische Methoden**

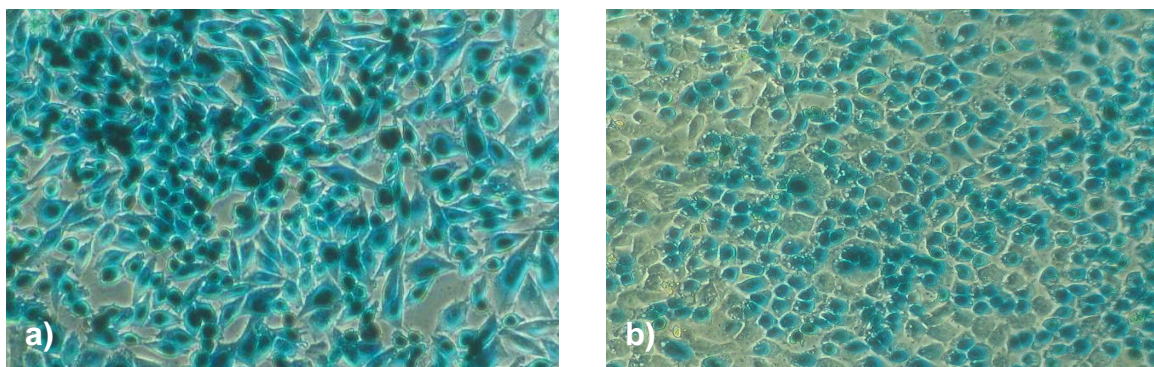
Das gesamte Datenmaterial der *in vivo*-Versuche wurde von jeweils mindestens 3 voneinander unabhängigen Experimenten bezogen. Für die Auswertung und statistische Analyse wurde das Programm Sigma Plot® 8.0 eingesetzt mit Darstellung der Ergebnisse als Mittelwerte sowie Ergänzung durch die jeweiligen Standardabweichungen. Beim Vergleich zweier Mittelwerte wurde zur Berechnung der Signifikanzen nach Varianzanalyse ein zweiseitiger Student's t-Test für unabhängige Stichproben verwendet, wobei Werte von  $p < 0,05$  als statistisch signifikant bewertet wurden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Etablierung des RCAS-TVA-vermittelten retroviralen Gentransfers *in vitro*

#### 4.1.1 Infektion TVA-exprimierender Zelllinien mit RCAS lacZ

Die für das Reportergen *lacZ* kodierende DNA-Sequenz wurde in den Gateway-kompatiblen „destination“-Vektor RCAS BP (A) kloniert und als RCAS lacZ-Plasmid für die Transfektion von DF-1-Zellen verwendet. Etwa 1 Woche nach Transfektion konnte virushaltiger Zellüberstand geerntet werden. Nach Zentrifugation und Filtration diente der RCAS-haltige Überstand zur Infektion der in 6-Well-Platten dünn ausgesäten MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- bzw. TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen. Die retrovirale Infektion erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen mit Zugabe von frisch geerntetem virushaltigen Überstand jeweils im Abstand von ca. 12 Stunden. Abschließend wurden die infizierten Tumorzellen in den 6-Well-Platten fixiert und unter Verwendung des  $\beta$ -Gal Staining Kit der Fa. Invitrogen gefärbt. Die bei der enzymatischen Reaktion auftretende Blaufärbung wurde nach 3-stündiger Inkubation lichtmikroskopisch beurteilt. Sie diente zur Analyse der Infektionseffizienz nach dem Verhältnis blau-gefärbter, erfolgreich retroviral-infizierter Zellen in Relation zur Gesamtzelldichte in den 6-Well-Kulturgefäßen (siehe Abbildung 16).



- a) MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen nach 5-tägiger Infektion mit RCAS lacZ und anschließender  $\beta$ -Galactosidase-Färbung. Die Blaufärbung des Zytoplasmas kennzeichnet erfolgreich infizierte Zellen mit Expression des *lacZ*-Genproduktes  $\beta$ -Galactosidase. Annähernd 100 % aller Zellen exprimieren das retroviral transferierte Reportergen.
- b)  $\beta$ -Galactosidase-Färbung von TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen nach 5-tägiger Infektion mit RCAS lacZ: Geringere Infektionseffizienz als bei MIA PaCa-2. 70-80 % aller TD-2-Zellen exprimieren *lacZ*.



Abbildung 16: Transduktionseffizienz von MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- bzw. TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen nach Infektion mit RCAS lacZ

MIA PaCa-2- zeigen bei diesem *in vitro*-Versuch eine höhere Infektionsrate als TD-2-Zellen. Während nahezu 100 % aller MIA PaCa-2-Zellen eine Blaufärbung als Beweis für eine erfolgreiche retrovirale Infektion mit Expression des Reportergens *lacZ* aufweisen, sind dies bei murinen TD-2-Zellen nur etwa 70-80 % aller Zellen.

#### 4.1.2 Knockdown der Reportergene *EGFP* und *fluc*

Die Blockade der Genexpression von *EGFP* und *fluc* erfolgte nach dem RNAi-Prinzip (siehe Kapitel 1.6). Hierzu wurden doppelsträngige shRNAs, welche Sequenzen für die Erkennung homologer Abschnitte der jeweiligen mRNA beinhalten, in den „destination“-Vektor RCAS BP (A) kloniert und mit Superfect in DF-1-Zellen transfiziert. Nach entsprechender Passagierung wurde virushaltiger Überstand der DF-1-Zellen geerntet. Für die retrovirale Infektion wurden MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen in 6-Well-Gefäßen dünn ausgesät und über einen Zeitraum von 4 Tagen jeweils täglich frisch geernteter und filtrierter Überstand zugesetzt. Für die Beurteilung des Hemmeffektes einer Infektion mit RCAS shRNA EGFP auf die Expression des fluoreszierenden Reportergens wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch unter einer Blaulichtlampe mit ca. 480 nm Wellenlänge angeregt; die emittierte Fluoreszenz wurde bei 530 nm Wellenlänge detektiert. Abbildung 17 zeigt den Effekt des Knockdown nach 4-tägiger Infektion in Relation zur *EGFP*-Expression nach 4-tägiger retroviraler Infektion mit der Kontrolle RCAS shRNA Co. Die Aufnahmen wurden aufgrund der langen spezifischen Halbwertszeit des EGFP-Proteins jeweils 5 Tage nach Abschluss der Infektion angefertigt.

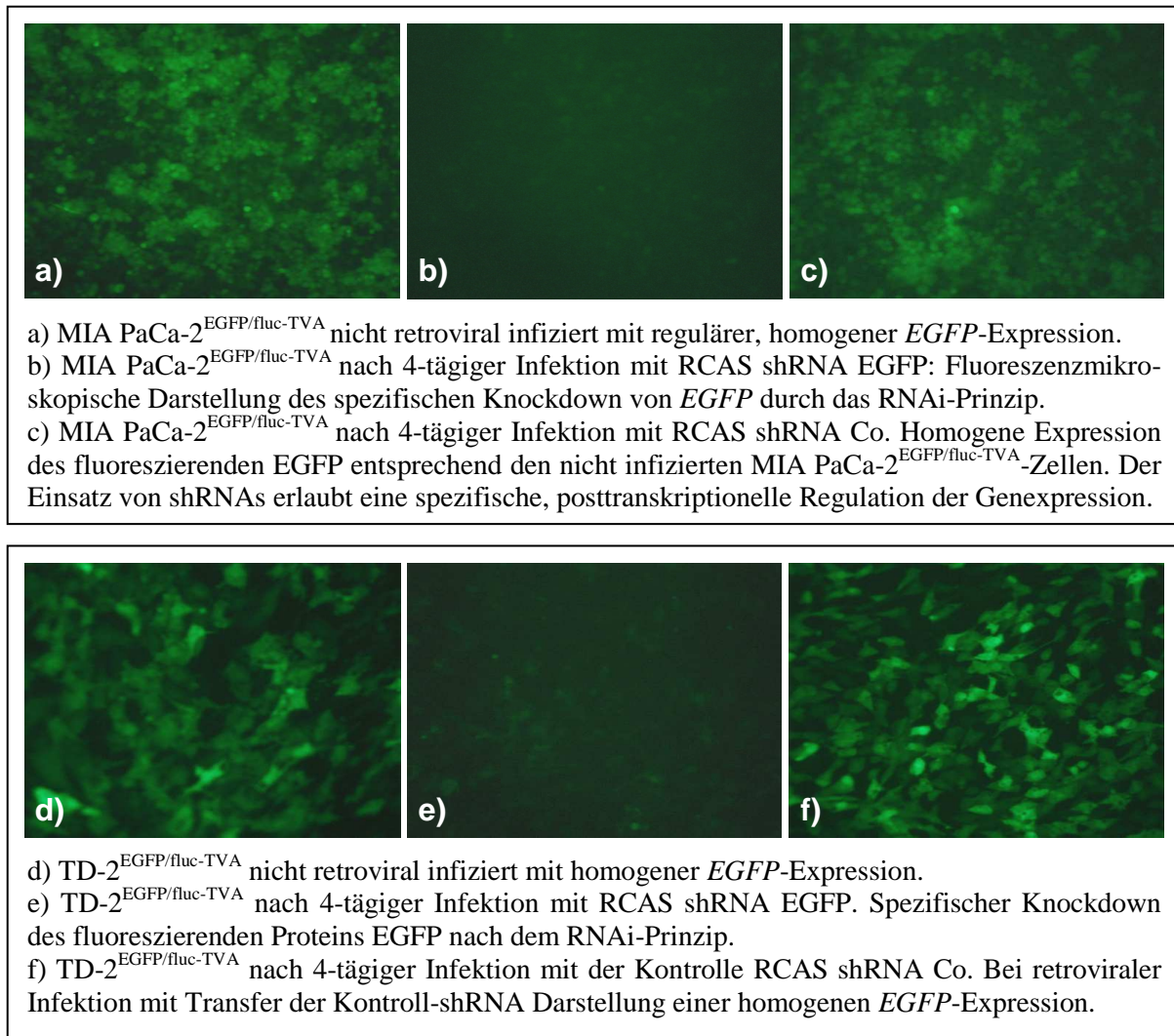


Abbildung 17: Knockdown von *EGFP* in MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen nach Infektion mit RCAS shRNA *EGFP*

Die Beurteilung der Expressionshemmung des Reportergens *fluc* erfolgte durch quantitative Analyse der Luziferaseaktivität infizierter bzw. nicht infizierter Zellen. Hierzu wurden die Zellen nach Abschluss der 4-tägigen Infektion aus den 6-Well-Platten mit passiver Lyse gewonnen und nach Zugabe der Substrate D-Luziferin und ATP im Bioluminometer auf ihre Luziferaseaktivität untersucht. Die Angabe der Aktivität erfolgte nach Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Lysatproben als relative Luziferaseaktivität pro  $\mu\text{g}$  Protein (siehe Abbildung 18).

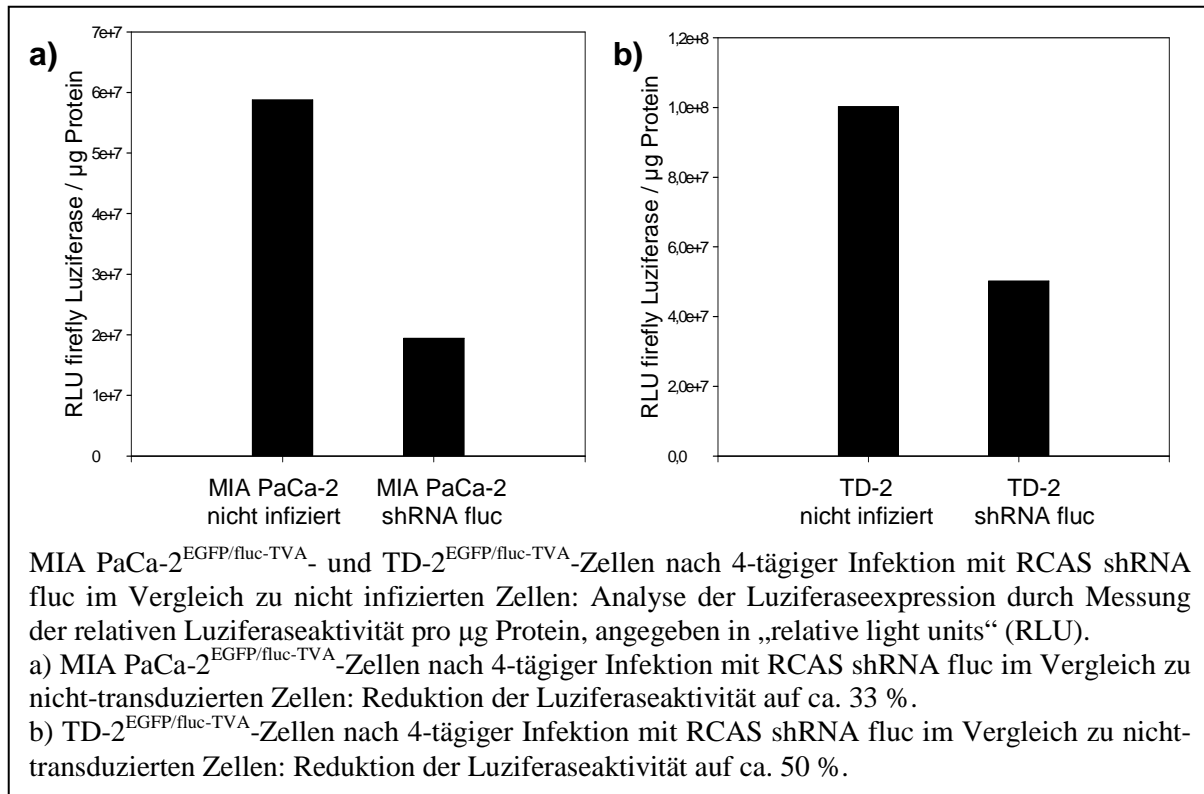


Abbildung 18: Knockdown von *fluc* in MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen nach Infektion mit RCAS shRNA fluc

Die Analyse der *EGFP*-Expression durch Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine bildliche Darstellung des spezifischen Knockdown von *EGFP* durch retrovirale Infektion mit RCAS shRNA *EGFP*; ein Transfer der Kontroll-shRNA vermindert die Genexpression dagegen nicht, erkennbar am homogenen Fluoreszenzsignal der Zellen. Durch Messung der relativen Luciferaseaktivität von MIA PaCa-2- und TD-2-Zellen lässt sich die durch retrovirale Infektion mit RCAS shRNA fluc maximal erreichte Reduktion der Luciferaseexpression quantitativ bestimmen. Dabei ist der maximal erreichbare Knockdown der *fluc*-Expression im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen bei MIA PaCa-2- stärker ausgeprägt als bei TD-2-Zellen, mit einer Reduktion auf ca. 33 % bei MIA PaCa-2 gegenüber einer Reduktion auf ca. 50 % bei TD-2.

#### 4.1.3 Tetrazyklin-regulierte Genexpression *in vitro*

Für die Validierung therapeutischer Targets auf genetischer Ebene *in vivo* ist die Etablierung eines Systems zur gezielten, induzierten Genexpression wünschenswert. In dieser Arbeit wurde hierfür das Prinzip der tetrazyklin-regulierten Genexpression

getestet (siehe Kapitel 3.2.3). Dazu wurde die für den Tet-Repressor kodierende Sequenz *rtTA* (reverse tetracycline transcriptional transactivator) gemeinsam mit einem Puromycin-Resistenzgen in den RCAS BP (A)-Vektor kloniert (RCAS *rtTA* IRES Puromycin) und mit der RCAS-TVA-basierten Methode der retroviralen Infektion in TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen transferiert. Nach Selektionierung erfolgreich infizierter Zellen wurde die Möglichkeit der gesteuerten Expression bei retroviraler Infektion der Zellen mit RCAS CMV Tet-Operator *lacZ* bzw. der Genblockade durch RCAS H1 Tet-Operator shRNA *fluc* überprüft. Der Tet-Repressor in den *rtTA*-positiven TD-2 bindet mit hoher Affinität an die Tet-Operator-Sequenzen im CMV- bzw. H1-Promotor, welche dem *lacZ*-Gen bzw. der shRNA vorgeschaltet sind, und unterdrückt damit deren Expression (Hillen und Berens, 1994; siehe Kapitel 3.2.3). Durch Zugabe von Tetrazyklin wird die Blockade durch den Tet-Repressor aufgehoben und die Genexpression induziert. Abbildung 19 zeigt die Hemmwirkung durch den Tet-Repressor in TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA-rtTA</sup>-Zellen nach 5-tägiger Infektion mit RCAS CMV Tet-Operator *lacZ* und nach  $\beta$ -Galactosidasefärbung. Zudem ist der Effekt der tetrazyklin-regulierten Expression mit gezieltem Knockdown der Luziferaseaktivität nach retroviralem Transfer von RCAS H1 Tet-Operator shRNA *fluc* dargestellt.

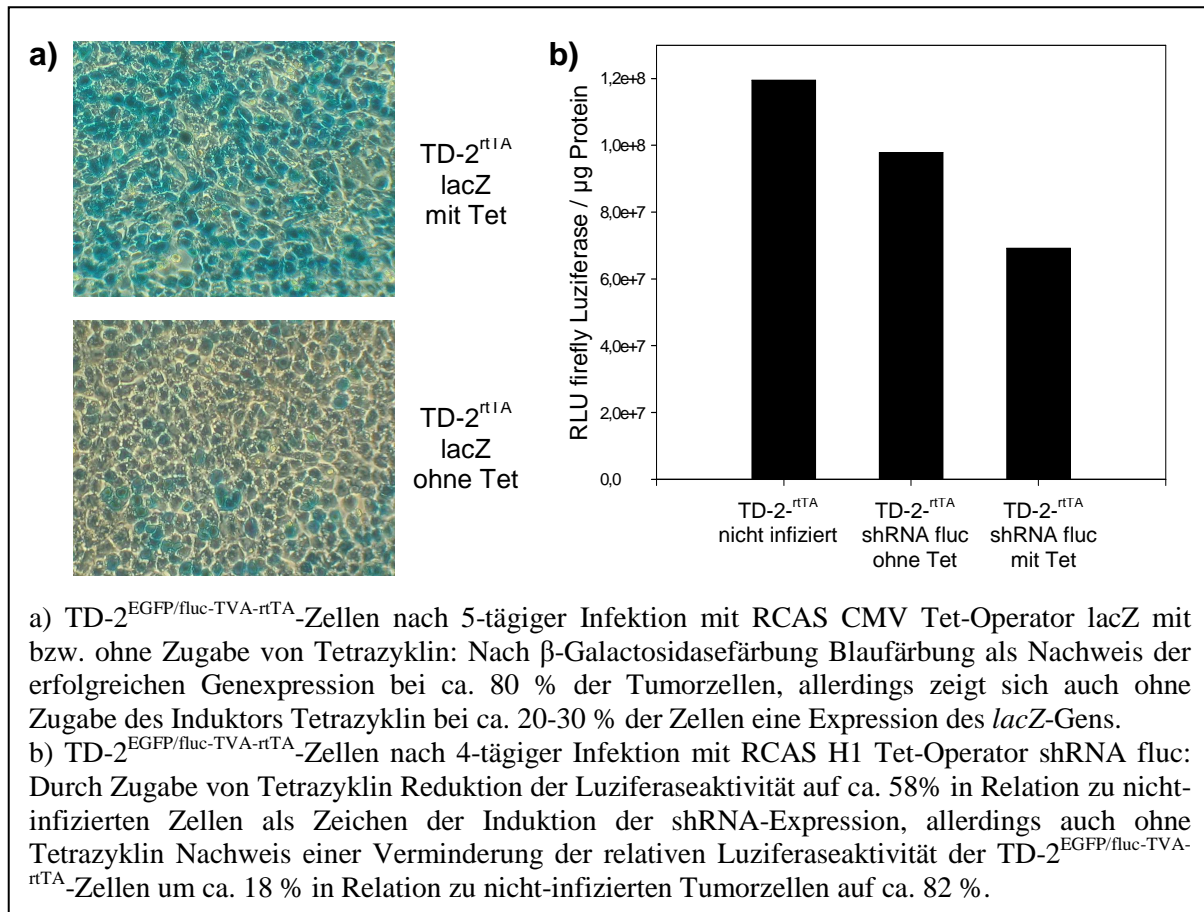


Abbildung 19: Tetrazyklin-regulierte Expression von *lacZ* bzw. shRNA *fluc* *in vitro*

Nach  $\beta$ -Galactosidasefärbung der mit RCAS CMV Tet-Operator *lacZ*-infizierten Zellen weisen trotz *rtTA*- bzw. Repressor-Expression ca. 20-30 % der Tumorzellen eine Blaufärbung als Zeichen für die *lacZ*-Expression auf. Nach Infektion von TD-2<sup>EGFP/*fluc*-TVA-*rtTA*</sup>-Zellen mit RCAS H1 Tet-Operator shRNA *fluc* wird durch Tetrazyklin die relative Luziferaseaktivität auf ca. 58 % vermindert in Relation zu nicht-infizierten Zellen - als Zeichen einer Induktion der shRNA *fluc*-Expression. Jedoch zeigen auch infizierte Zellen ohne Zugabe von Tetrazyklin eine Reduktion der Luziferaseaktivität auf ca. 82 %. Das System ist nicht in der Lage, die Expression von Reportergenen bzw. shRNAs vollständig zu blockieren bzw. zu aktivieren. Aus diesem Grund ist eine Verwendung der Methode mit dem Ziel einer kontrollierten Genexpression in Tumorzelllinien nicht praktikabel, da die Transkription von proliferationshemmenden Faktoren bereits *in vitro* nicht ausreichend gehemmt würde. Die Alternative in der vorliegenden Arbeit ist daher das Prinzip der intraperitonealen *in vivo*-Infektion einige Tage nach der orthotopen Implantation der Tumorzellen in die Versuchstiere.

## 4.2 Korrelation von Biolumineszenzsignal *in vivo* und Tumorgewicht *ex vivo*

Die Methode der nichtinvasiven Biolumineszenzbildgebung (BLI) gestattet eine sensitive Detektion *fluc*-exprimierender Tumorzellen *in vivo*. Allerdings lässt sich die Stärke des Signals nur semiquantitativ bestimmen als Angabe relativer Luziferaseeinheiten (siehe Kapitel 1.4.2). Um aus dem registrierten Signal valide Aussagen über die tatsächliche Tumorausdehnung ziehen und damit therapeutische Effekte während longitudinaler Verlaufsstudien beurteilen zu können, ist eine enge Korrelation zwischen der Intensität des BLI-Signals *in vivo* und dem Tumorgewicht *ex vivo* erforderlich. Aus diesem Grund wurde von insgesamt 23 Versuchsmäusen mit Tumoren unterschiedlicher Größe die Stärke des Biolumineszenzsignals *in vivo* bestimmt und anschließend mit den Parametern Tumorgewicht, Biolumineszenz (BLI) sowie Fluoreszenzsignal (FLI) *ex vivo* korreliert. Nach Tötung der Tiere erfolgte die sorgfältige und vollständige Entnahme des gesamten Tumorgewebes unter

Zuhilfenahme eines Fluoreszenzstereomikroskops zur Detektion der *EGFP*-exprimierenden Tumorzellen. Abbildung 20 verdeutlicht die beiden angewandten Techniken des BLI und FLI an Mäusen mit unterschiedlich großen Tumoren. An den drei beispielhaft dargestellten Fällen wird bereits erkennbar, dass sich aus der Stärke des *in vivo* gemessenen Signals Rückschlüsse auf die Ausdehnung und Masse der Tumoren ziehen lassen. Da jedoch zahlreiche Mäuse besonders im Stadium des fortgeschrittenen Tumorwachstums eine zunehmende Ansammlung von Aszites aufweisen, müssen diese Tiere gesondert betrachtet werden. Insbesondere größere Mengen Aszites erhöhen die Absorption des Biolumineszenzsignals der darunter liegenden Tumoren und vermindern die gemessene Luziferaseaktivität; zudem zeigt der Aszites selbst häufig ein diffuses Signal aufgrund der darin befindlichen lumineszierenden Tumorzellen (siehe Abbildung 21). Daher wurde eine eigene Korrelation für insgesamt 17 Tumoren ohne Aszitesbildung angefertigt mit Gegenüberstellung von relativer Luziferaseaktivität *in vivo* - gemessen in „relative light units“ (RLU) - und dem in Gramm angegebenen Tumorgewicht *ex vivo* (siehe Abbildung 22 a): Sie bestätigt die große Aussagekraft der Biolumineszenzbildgebung bzgl. der tatsächlichen Tumorgröße, insbesondere im kleinen und mittleren Größenbereich mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r^2 = 0,9314$ . Die in diesem Nacktmausmodell erhobenen Daten validieren das Biolumineszenzimaging als aussagekräftige Methode für eine longitudinale Analytik der Progression von orthotop implantierten Pankreaskarzinomzellen *in vivo*.

Werden dagegen Mäuse mit Aszitesbildung in die Berechnung mit einbezogen, so sinkt der Korrelationskoeffizient erheblich (siehe Abbildung 22 b). Da sich Aszites allerdings erst im Endstadium der Tumorerkrankung in Mäusen bildet und die Versuchstiere bei weit fortgeschrittener Tumorprogression getötet werden, ist dieser Umstand in der vorliegenden Arbeit von untergeordneter Bedeutung bei der longitudinalen Verlaufsbeobachtung der Tumorprogression *in vivo*.

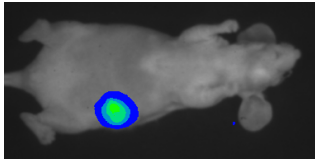

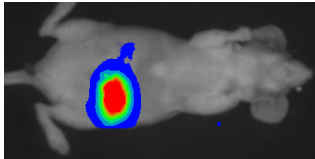

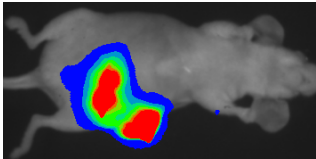
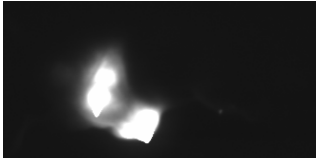
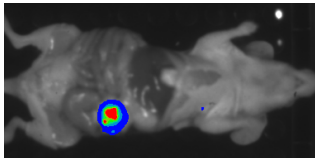

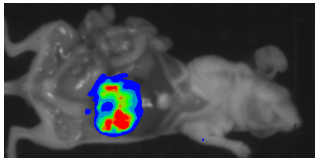
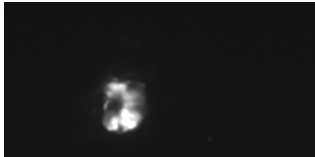
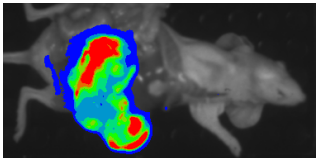
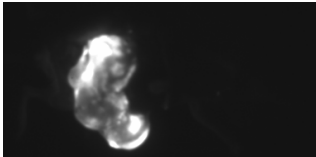
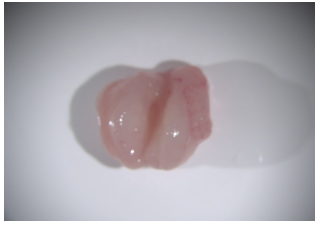
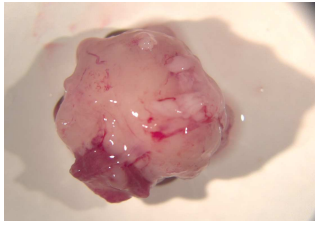
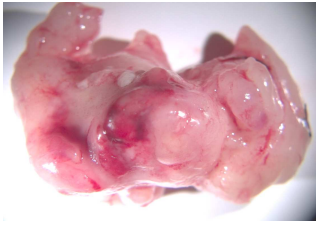
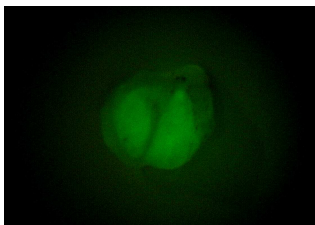
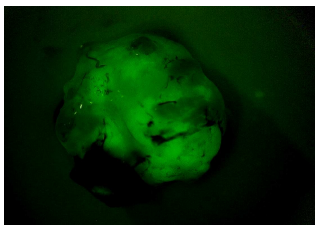
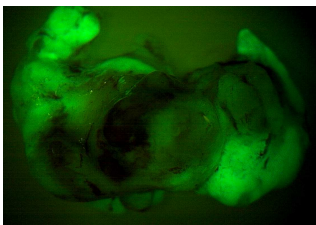
	<b>kleiner Tumor</b>	<b>mittelgroßer Tumor</b>	<b>großer Tumor</b>
<b>BLI <i>in vivo</i></b>	 	 	 
<b>BLI <i>ex vivo</i></b>	 	 	 
<b>Weisslicht <i>ex vivo</i></b>			
<b>FLI <i>ex vivo</i></b>			
<b>Tumor- gewicht</b>	<b>1,7 g</b>	<b>3,9 g</b>	<b>6,7 g</b>
<b>RLU</b>	<b><math>2,99 \times 10^7</math></b>	<b><math>1,19 \times 10^8</math></b>	<b><math>2,47 \times 10^8</math></b>

Abbildung 20: Korrelation von BLI *in vivo* mit BLI, FLI und Tumorgewicht *ex vivo*

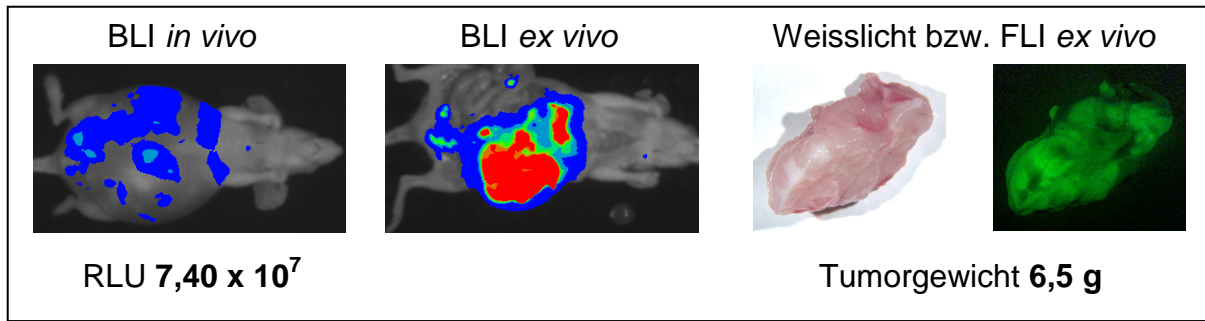
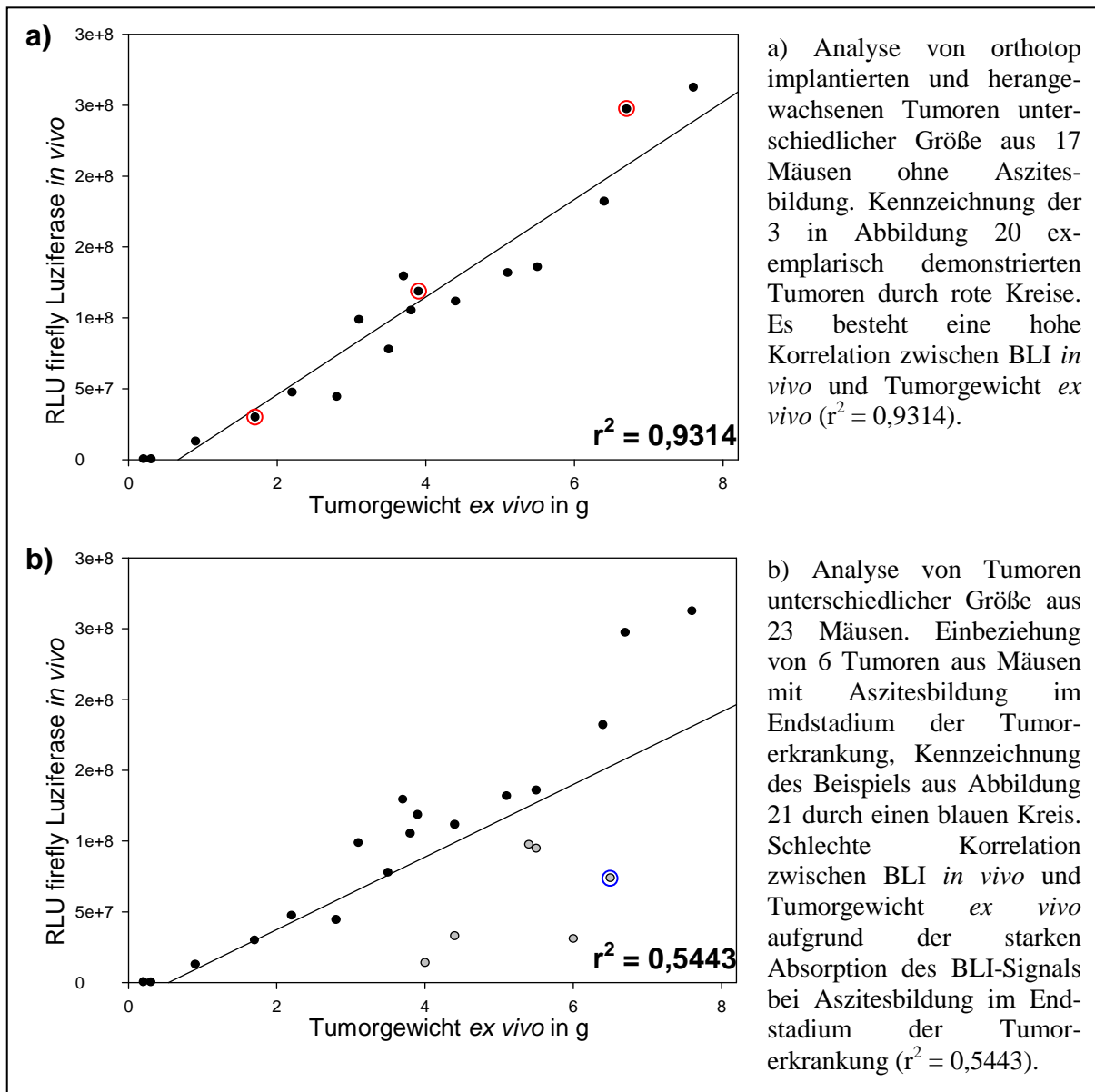


Abbildung 21: BLI und FLI bei Aszitesbildung

Abbildung 22: graphische Darstellung der Korrelation von Biolumineszenzsignal (BLI) *in vivo* und Tumorgewicht *ex vivo*



### 4.3 Wachstumsverhalten orthotop implantierter Pankreaskarzinomzellen

Nachdem bei Versuchstieren ohne Aszitesbildung eine enge Korrelation von BLI-Signalintensität *in vivo* und Tumorgewicht *ex vivo* gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 4.2), sind valide Aussagen über das Wachstum orthotop implantierter Zellen mit longitudinaler Verlaufsbeobachtung durch die Methode des Biolumineszenz-Imaging möglich. Bemerkenswert sind dabei insbesondere Unterschiede in der Progression von Tumoren humaner respektive muriner Zellen. Abbildung 23 zeigt repräsentativ das Wachstum der humanen Pankreaskarzinomzellen MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup> nach orthotoper Injektion von  $5 \times 10^6$  Zellen in Nacktmäusen. Die Intensität des BLI-Signals als Zeichen für Tumorausdehnung bzw. Zellzahl nimmt zunächst über einen Zeitraum von 25-30 Tagen nach der Implantation ab. Dies zeigt, dass nur wenige der implantierten Zellen *in vivo* überleben und die Tumoren erst nach über einem Monat eine kontinuierliche Größenzunahme aufweisen. Die Ursache hierfür ist vermutlich eine Abstoßung humaner MIA PaCa-2-Zellen in den Nacktmäusen. Daher ist der Einsatz der intraperitonealen *in vivo*-Infektion für vergleichende Studien therapeutischer Effekte erst ca. 40-45 Tage nach Implantation im Stadium des kontinuierlichen Tumorwachstums sinnvoll.

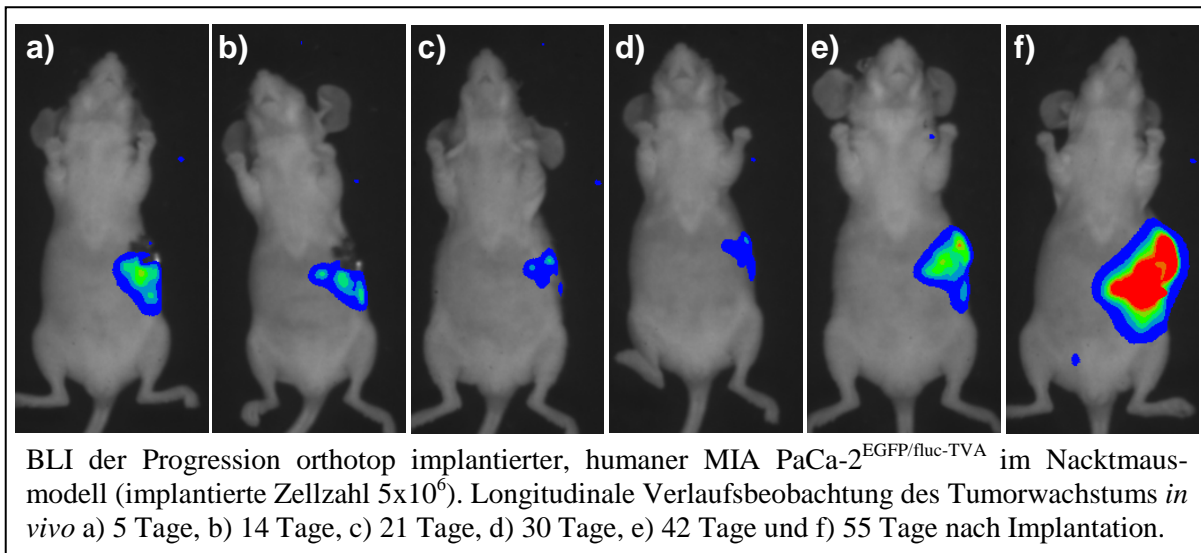


Abbildung 23: Tumorprogression orthotop implantierter MIA PaCa-2 *in vivo*

Das Wachstum der murinen Tumorzellen TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup> in Nacktmäusen nach orthotoper Implantation unterscheidet sich stark von humanen MIA PaCa-2 (siehe

Abbildung 24). Murine TD-2-Zellen können in sehr geringen Mengen mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$  implantiert werden und zeigen dennoch eine kontinuierliche Progression im Verlauf ohne Zeichen der Transplantatabstoßung. Daher erlauben TD-2 im Gegensatz zu MIA PaCa-2 eine frühzeitige *in vivo*-Infektion bereits im Anfangsstadium des Tumorwachstums im Mausmodell.

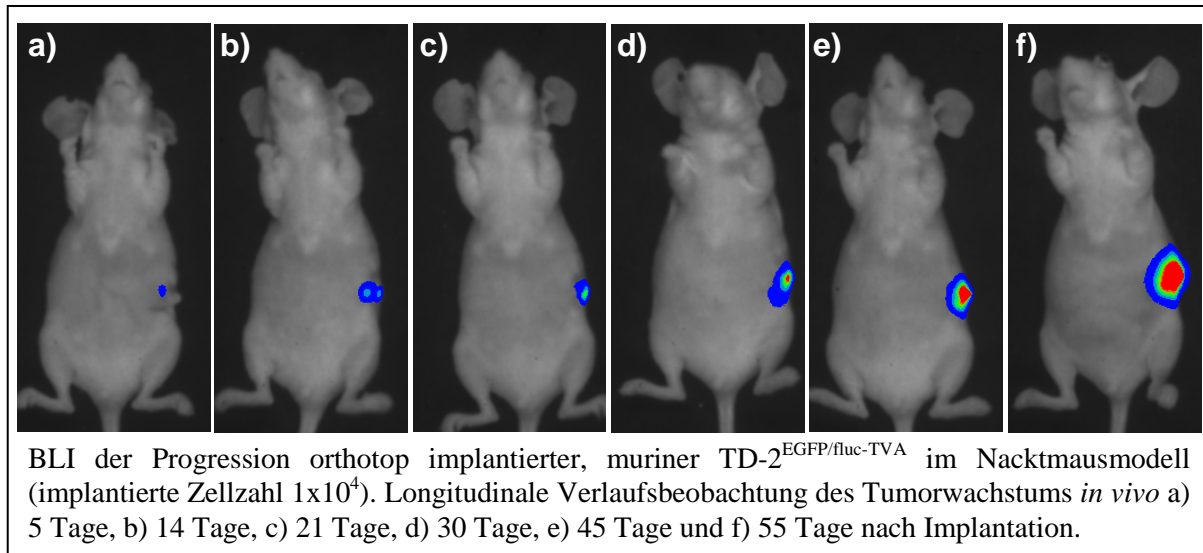


Abbildung 24: Tumorprogression orthotop implantierter TD-2 *in vivo*

## 4.4 Etablierung des RCAS-TVA-basierten retroviralen Gentransfers *in vivo*

### 4.4.1 Prinzip der *in vivo*-Infektion

Die unvollständige Blockade der Expression retroviral transferierter Gene durch den Tet-Repressor verhindert den Einsatz der tetrazyklin-regulierten Expression mit Hilfe des RCAS-TVA-Systems in dem Versuchsansatz der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 4.1.3). Daher kann die retrovirale Infektion der Tumorzellen erst nach orthotoper Implantation der Zellen *in vivo* erfolgen. Zur Produktion der RCAS-Viren *in vivo* dienen DF-1-Zellen, welche *in vitro* mit dem entsprechenden RCAS-Vektor transfiziert wurden und zur Erzeugung hoher Virustiter befähigt sind (siehe Kapitel 1.5). Die Darstellung in Abbildung 25 verdeutlicht, dass intraperitoneal injizierte, aufgrund einer *fluc*-Expression durch BLI detektierbare DF-1-Zellen etwa 1 Woche *in vivo* nachweisbar sind und in den verwendeten, immunodefizienten Nacktmäusen keine Tumoren formieren.

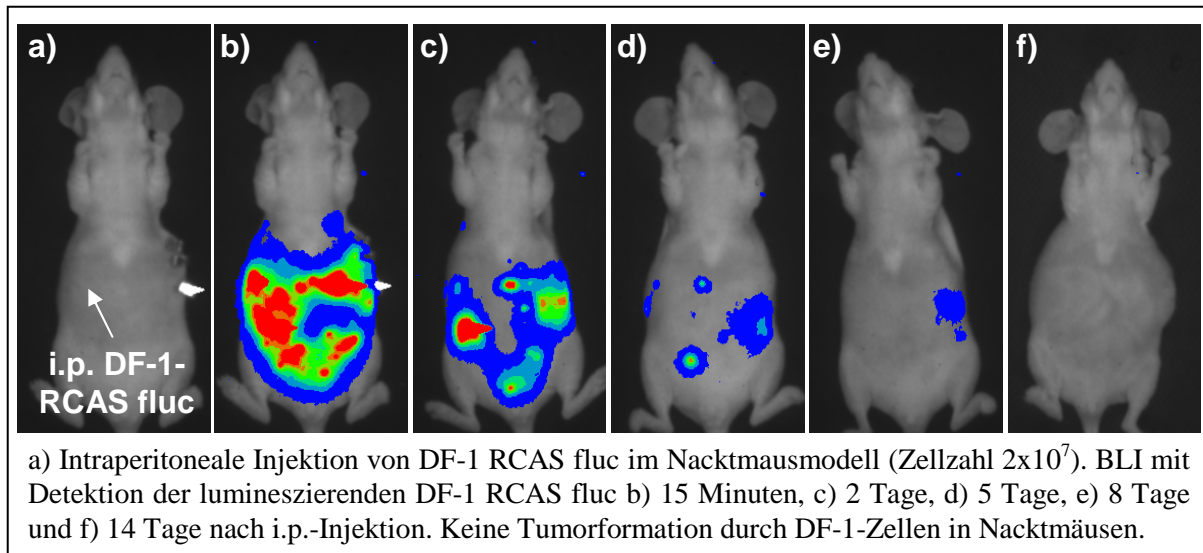


Abbildung 25: *In vivo*-Bildgebung i.p.-injizierter DF-1 RCAS fluc in Nacktmäusen

#### 4.4.2 Retroviraler Gentransfer des *lacZ*-Reportergens *in vivo*

Für die retrovirale Infektion von Tumorzellen mit dem Reporter gen *lacZ in vivo* wurden DF-1-Zellen mit dem Vektor RCAS *lacZ* transfiziert und in einer Anzahl von  $2 \times 10^7$  Zellen pro Nacktmaus i.p. injiziert. Den Tieren waren 5 Tage zuvor  $5 \times 10^6$  MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- bzw.  $1 \times 10^4$  TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen orthotop implantiert worden. Im Stadium der fortgeschrittenen Tumorerkrankung wurden die Versuchstiere getötet und anschließend das isolierte Tumorgewebe durch  $\beta$ -Galactosidasefärbung analysiert (siehe Kapitel 3.3.4.3). Die Abbildungen 26 bzw. 27 zeigen die Infektion von humanen MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- bzw. murinen TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren mit Blaufärbung erfolgreich retroviral infizierter Tumorzellen.

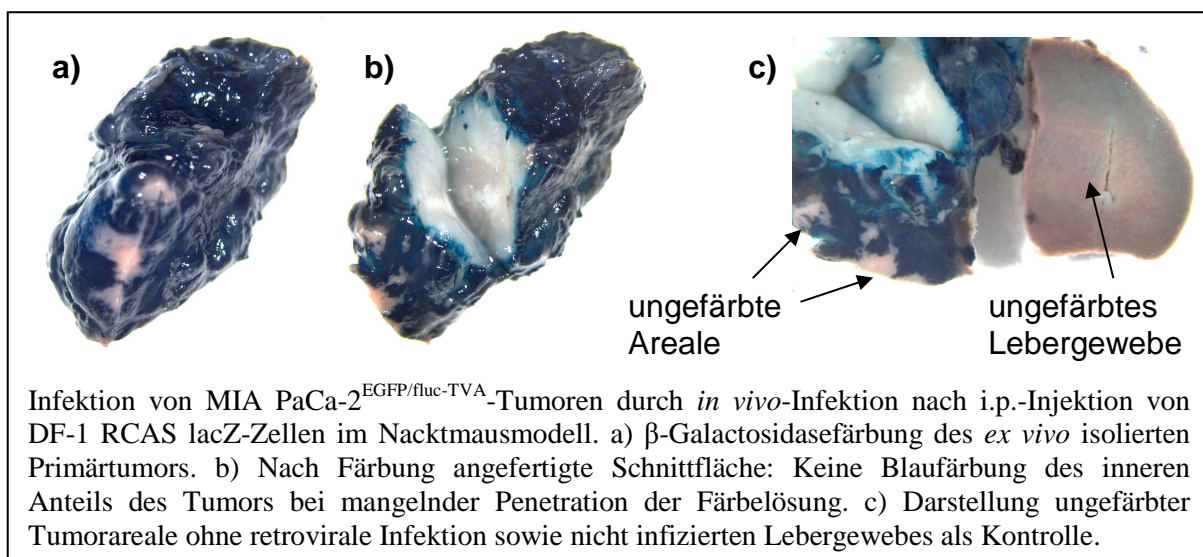
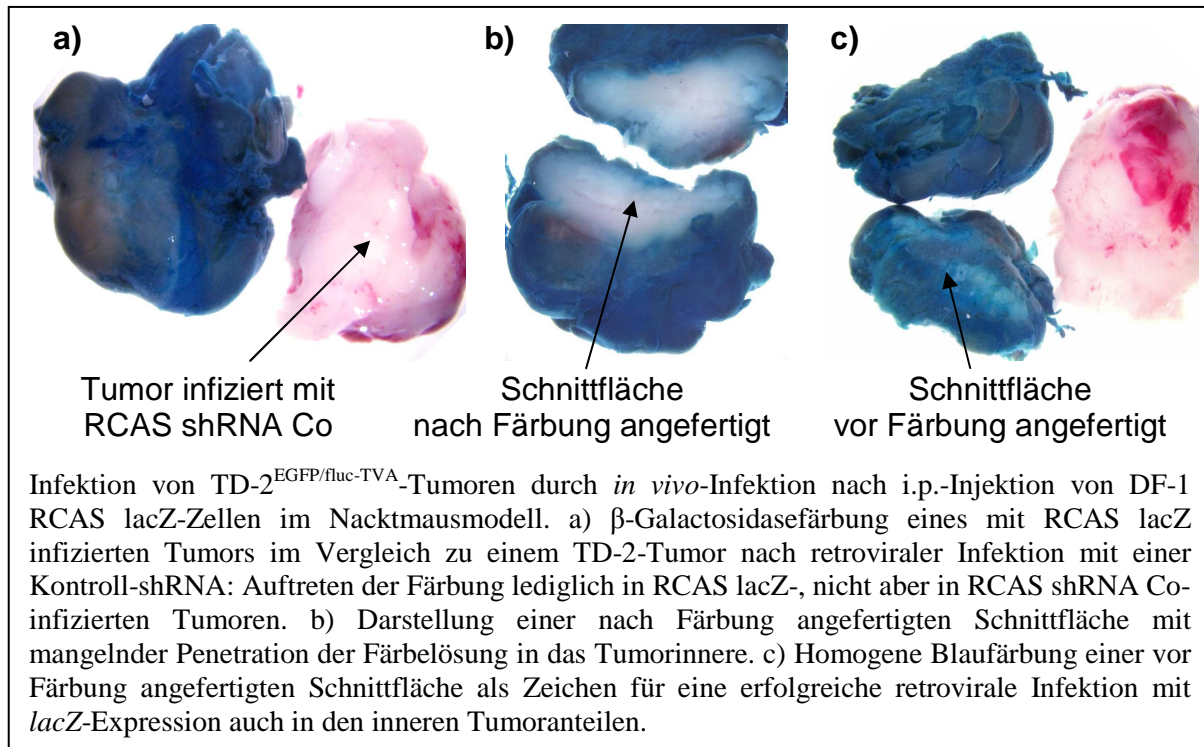


Abbildung 26: *In vivo*-Infektion von MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen mit RCAS lacZAbbildung 27: *In vivo*-Infektion von TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen mit RCAS lacZ

Die Blaufärbung großer Anteile der Tumoren bei fehlender Färbung von Leber oder nicht mit RCAS lacZ infizierten Tumoren zeigt die Effizienz der gezielten retroviralen Infektion von MIA PaCa-2 und TD-2 *in vivo* mit Expression des transferierten Gens.

#### 4.4.3 Knockdown der *fluc*-Expression mittels RNAi *in vivo*

Als „proof of principle“ eines Knockdown der Genexpression *in vivo* wurde die Expression des Reportergens *fluc* in  $1 \times 10^6$  orthotop implantierten MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen durch *in vivo*-Infektion mit i.p.-injizierten DF-1-RCAS shRNA *fluc*-Zellen herabreguliert. Für die Bewertung des durch RNAi erreichbaren Knockdown *in vivo* wurden insgesamt 3 Versuchspaare gebildet mit Gegenüberstellung von jeweils einer retroviral infizierten mit einer nicht infizierten Maus. Dabei geschah die Injektion der RCAS-produzierenden DF-1-Zellen zunächst zu einem frühen Zeitpunkt bereits am 2. Tag nach Implantation, unmittelbar nach der ersten Biolumineszenzbildgebung. Die beiden Bilderreihen in Abbildung 28 verdeutlichen den Effekt der Genblockade an einem repräsentativen Versuchspaar.

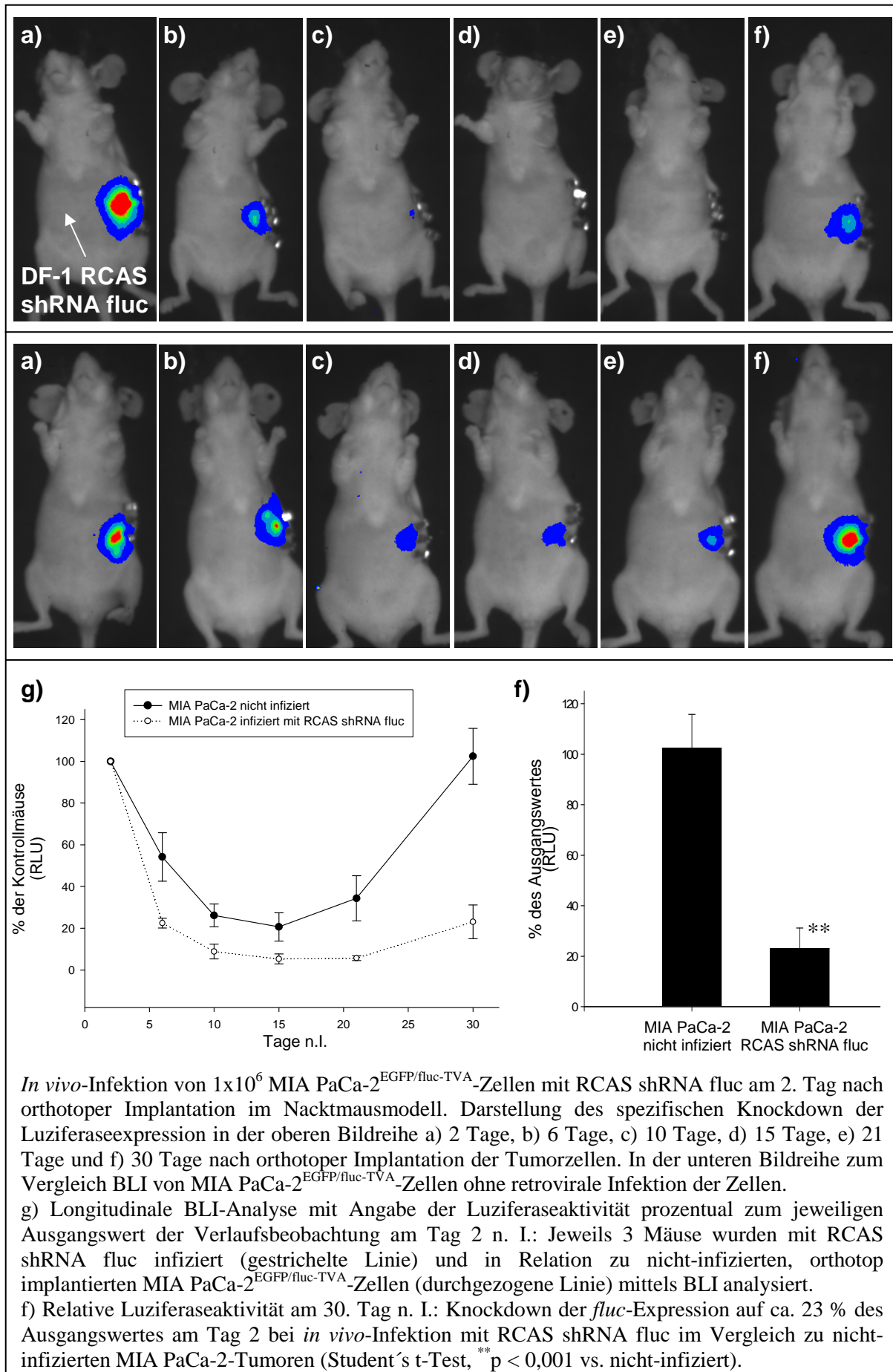


Abbildung 28: Herabregulation der *fluc*-Expression in MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen durch RNAi nach *in vivo*-Infektion mit RCAS shRNA *fluc*

Die spezifische Herabregulation der *fluc*-Expression spiegelt sich wider in der prozentualen relativen Luziferaseaktivität von RCAS shRNA *fluc*-infizierten Tumoren am Tag 30 nach Implantation in Relation zum Ausgangswert am Tag 2. Im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen zeigt sich eine deutliche Reduktion der Luziferaseaktivität auf ca. 23 % des Ausgangswertes (Student's t-Test, \*\*p < 0,001 vs. nicht-infiziert).

Abbildung 29 demonstriert die Blockade der *fluc*-Expression bei später *in vivo*-Infektion von MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren erst am 72. Tag nach orthotoper Implantation der Zellen. Der Vergleich mit einem Versuchstier bei retroviraler Infektion mit einer Kontroll-shRNA bestätigt den spezifischen Knockdown der Luziferaseexpression *in vivo* durch RNAi.

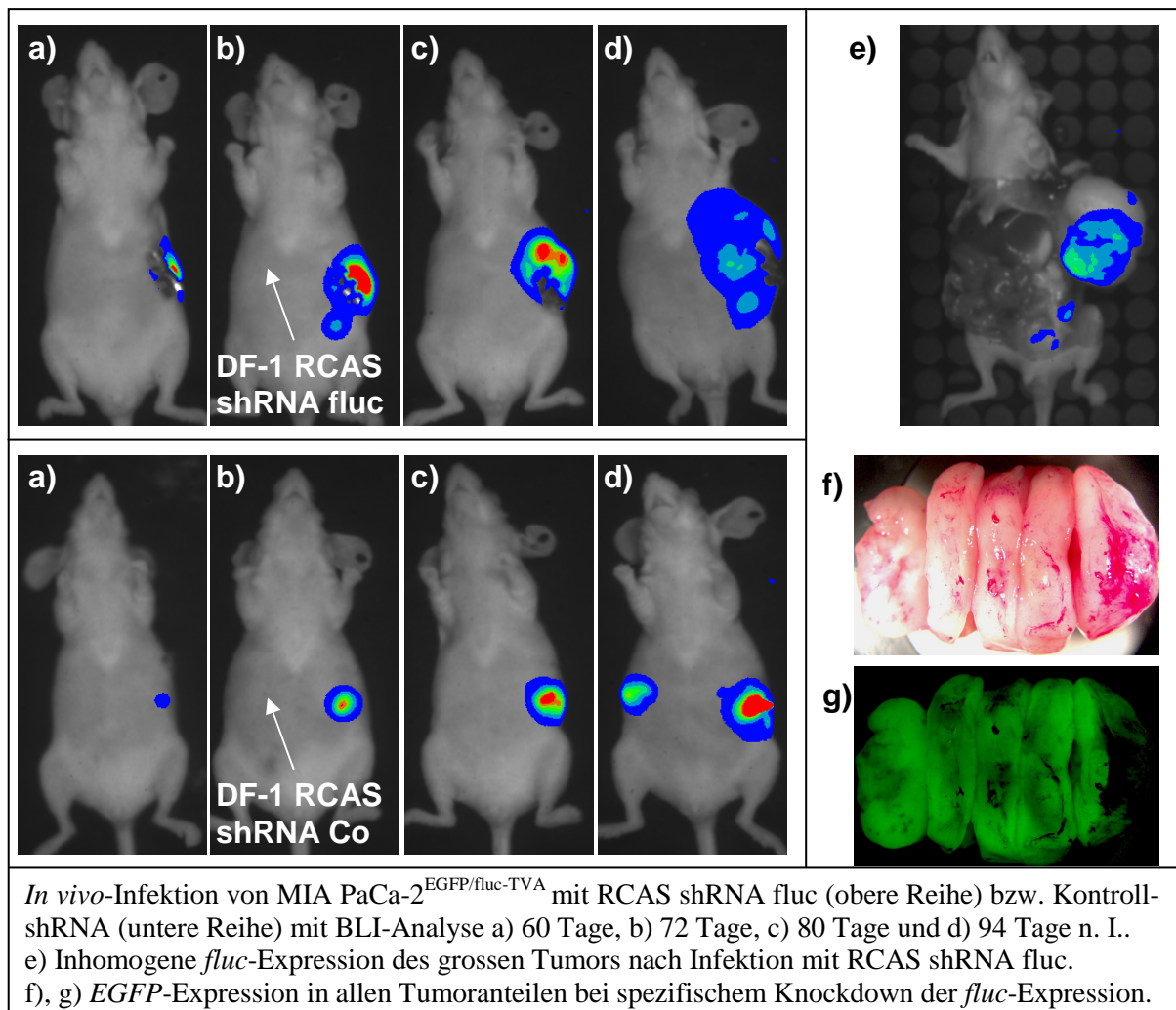


Abbildung 29: Knockdown der *fluc*-Expression in MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup> durch RNAi nach *in vivo*-Infektion mit RCAS shRNA *fluc* am 72. Tag n. I.

## 4.5 Funktionelle Genanalyse mittels RCAS-TVA-vermitteltem retroviralem Gentransfer *in vitro*

### 4.5.1 Proliferationsanalyse nach Rekonstitution von *p53*, *p16<sup>Ink4a</sup>* und *p19<sup>ARF</sup>* bzw. Knockdown von *EGF-R* und *c-myc*

Die Untersuchung der Proliferation von MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen nach retroviraler Infektion mit Expressionskassetten für die Tumorsuppressorgene *p53*, *p16<sup>Ink4a</sup>* und *p19<sup>ARF</sup>* bzw. shRNAs gegen *EGF-R* und *c-myc* erfolgte mittels BrdU-Assay. Für das Experiment wurden die cDNA-Sequenzen bzw. shRNAs sowie die entsprechenden Kontrollen - eine Expressionskassette für *lacZ* bzw. eine Kontroll-shRNA - in den RCAS-Vektor kloniert und für die Transfektion von DF-1-Zellen verwendet. Die Tumorzellen wurden in 96-Well-Platten zu je 1000 Zellen pro Well ausgesät und nach 24, 48 und 72 Stunden mit je 100 µl des von DF-1-Zellen produzierten virushaltigen Überstandes infiziert. In Abbildung 30 ist der proliferationshemmende Effekt bei Infektion von MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen mit RCAS *p53*, *p16<sup>Ink4a</sup>* und *p19<sup>ARF</sup>* sowie RCAS *lacZ* als Kontrolle dargestellt. Die Berechnung erfolgte aus drei unabhängigen Versuchen, wobei für die Analyse eines jeden Einzelversuches der Mittelwert aus 5 Replikaten gebildet wurde. Während die Proliferation bei retroviralem Transfer von *lacZ* unverändert bleibt, nimmt sie bei Expression von *p53* auf 51,7 %, bei *p16<sup>Ink4a</sup>* auf 68,5 % (Student's t-Test, \*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle) und bei *p19<sup>ARF</sup>* auf 80 % (Student's t-Test, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle) in Relation zu nicht-retroviral-infizierten MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen ab.

Die Analyse der Proliferation von murinen TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen wurde zusätzlich bei retroviraler Infektion mit shRNAs gegen *EGF-R* und *c-myc* vorgenommen (siehe Abbildung 31). Der Effekt der Proliferationshemmung durch ektope Expression von *p53*, *p16<sup>Ink4a</sup>* und *p19<sup>ARF</sup>* ist schwächer ausgeprägt als bei humanen MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen, aber ebenso signifikant. Die Infektion mit RCAS *lacZ* oder der Kontroll-shRNA zeigt keine Wirkung im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Die Blockade der Zellproliferation ist am deutlichsten bei retroviraler Infektion mit RCAS *p16<sup>Ink4a</sup>* (75,4 %) und RCAS *p53* (75,9 %) in Relation zur Kontrolle (Student's t-Test, \*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle). Die Expression von *p19<sup>ARF</sup>* vermindert die Proliferation auf

87,6 %. Durch Transfer der beiden shRNAs gegen *EGF-R* wurde die Proliferation auf 86,6 % bzw. 82,3 % vermindert; die beiden shRNAs gegen *c-myc* reduzierten die Proliferation auf 77,2 % bzw. 77,4 % (Student's t-Test, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle).

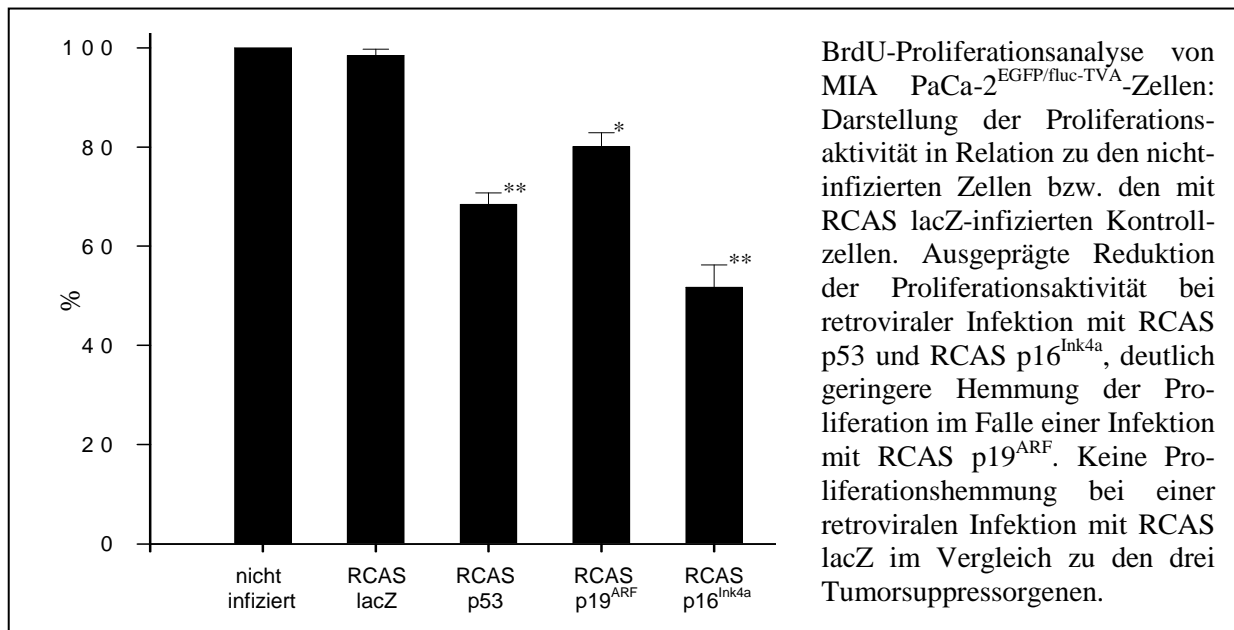


Abbildung 30: BrdU-Proliferationsanalyse nach retroviraler Infektion von MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen mit RCAS p53, p16<sup>Ink4a</sup> und p19<sup>ARF</sup>

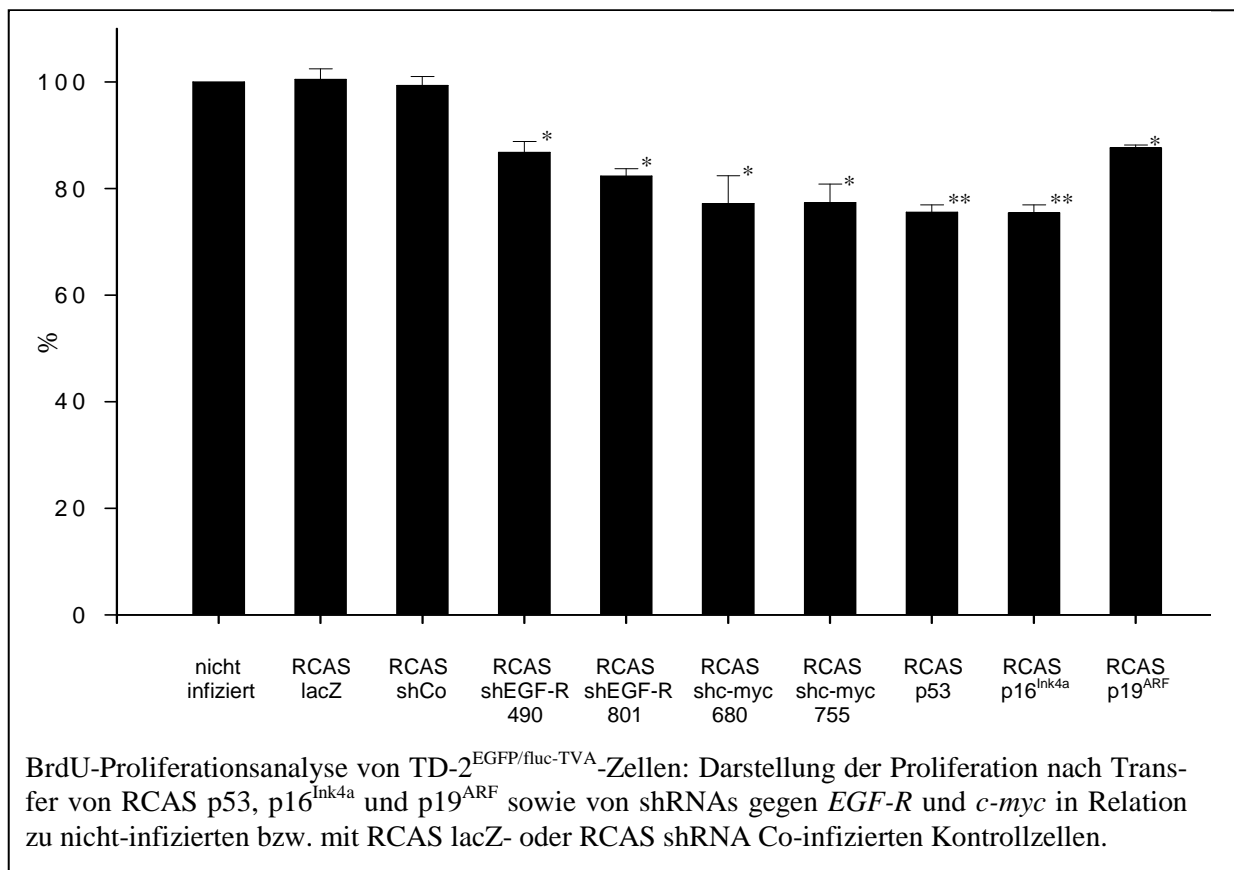




Abbildung 31: BrdU-Proliferationsanalyse nach retroviraler Infektion von TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen mit RCAS p53, p16<sup>Ink4a</sup> und p19<sup>ARF</sup> bzw. shRNAs gegen *EGF-R* und *c-myc*

#### 4.5.2 Western-Blot-Analyse der p53-, p16<sup>Ink4a</sup>- und p19<sup>ARF</sup>- bzw. *EGF-R*- und *c-myc*-Expression nach RCAS-TVA-vermitteltem retroviralem Gentransfer

Der Nachweis einer durch retrovirale Infektion bedingten ektopten Genexpression geschah ebenso wie die Darstellung einer Expressionsblockade durch RNAi mittels Western-Blot-Analyse infizierter MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen. Nach retroviraler Infektion *in vitro* mit Transfer der Tumorsuppressorgene p53, p16<sup>Ink4a</sup> und p19<sup>ARF</sup> sowie shRNAs gegen die Onkogene *EGF-R* und *c-myc* wurden die Zellen geerntet und die Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Kapitel 3.2.4). Nach Übertragung auf geeignete Membranen konnten mittels Antigen-Antikörper-Interaktion einzelne Proteine und damit die Produkte transferierter bzw. blockierter Gene spezifisch nachgewiesen werden. Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse infizierter MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- bzw. TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen und verdeutlicht die Reexpression der Tumorsuppressorgene p53, p16<sup>Ink4a</sup> und p19<sup>ARF</sup> sowie den spezifischen Knockdown der Onkogene *EGF-R* und *c-myc* nach retroviralem Gentransfer mittels RCAS-TVA-System. Als entsprechende Kontrollen wurde eine retrovirale Infektion mit dem Reportergen *lacZ* bzw. der Transfer einer Kontroll-shRNA-Kassette (RCAS shRNA Co) verwendet.

Die humanen Pankreaskarzinomzellen MIA PaCa-2 exprimieren ein stabilisiertes, mutiertes p53-Protein (siehe Kapitel 1.2.5), wodurch der Expressionsnachweis in Kontroll-infizierten Zellen erklärt wird.

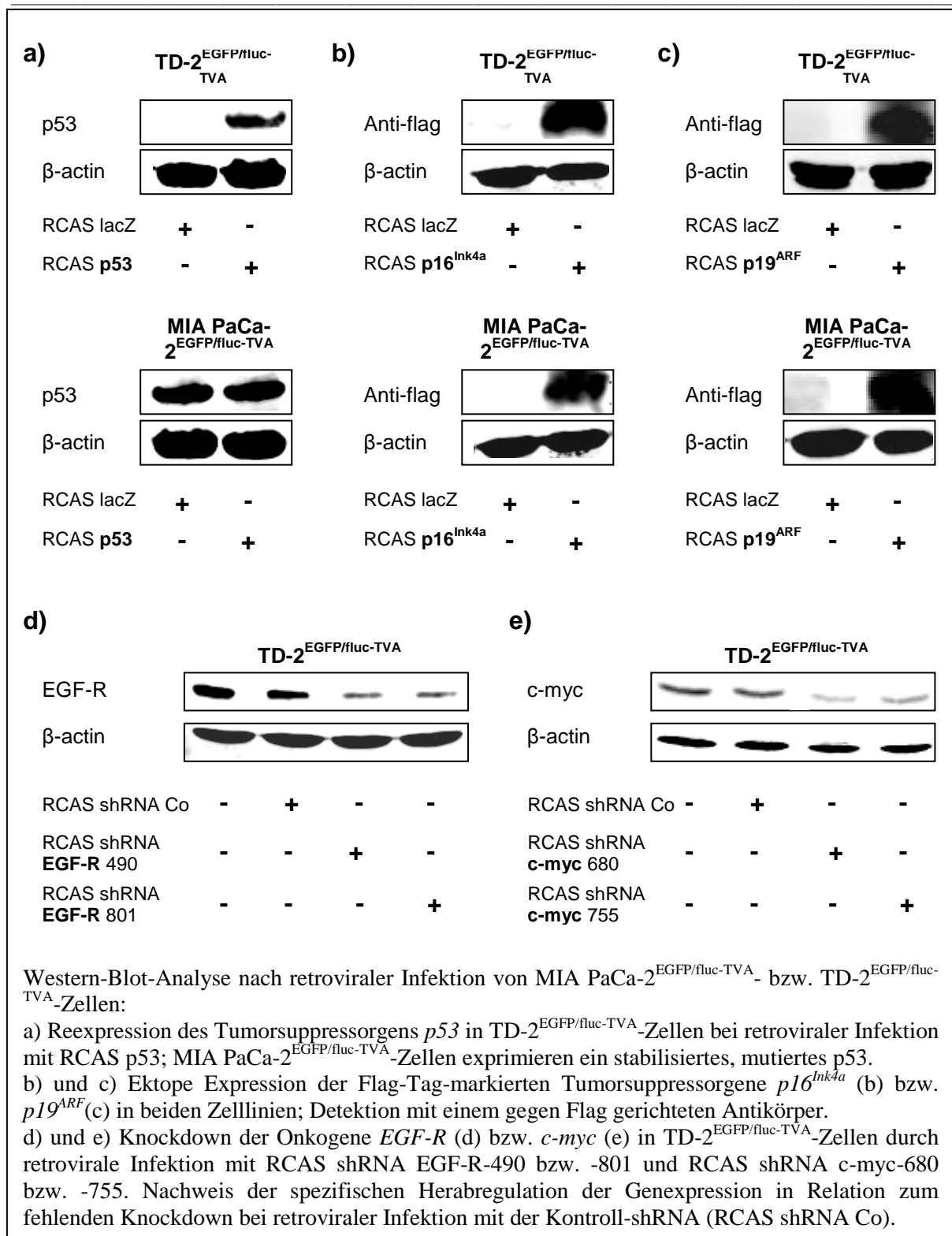


Abbildung 32: Western-Blot-Analyse retroviral infizierter MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- bzw. TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen

## 4.6 Funktionelle Genanalyse in einem murinen Transplantationsmodell des Pankreaskarzinoms

Die in Kapitel 4.3 demonstrierten Vorversuche zum longitudinalen Monitoring der Tumorprogression orthotop implantierter Pankreaskarzinomzellen hatten ein kontinuierliches Tumorwachstum nach Implantation in Nacktmäuse nur für murine TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-, jedoch nicht für humane MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen gezeigt. Für longitudinale Interventionsstudien zur funktionellen Genanalyse *in vivo* wurde daher lediglich die murine Tumorzelllinie verwendet.

In diesen Experimenten wurde der therapeutische Effekt *in vivo* bei retroviralem Gentransfer von Expressionskassetten für *p53*, *p16<sup>Ink4a</sup>* und *p19<sup>ARF</sup>* bzw. shRNA-Kassetten gegen *EGF-R* und *c-myc* mittels RCAS-TVA-System validiert: Insgesamt wurden je 6 Mäuse mit RCAS *p53* und als Kontrolle RCAS *lacZ*, je 3 Mäuse mit RCAS *p16<sup>Ink4a</sup>* und RCAS *p19<sup>ARF</sup>* sowie je 3 Mäuse mit RCAS shRNA *EGF-R*, RCAS shRNA *c-myc* und RCAS shRNA Co (Kontrolle) infiziert. Die TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- wurden in einer Anzahl von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Nacktmaus orthotop implantiert. Die intra-peritoneale *in vivo*-Infektion folgte unmittelbar auf die erste BLI-Analyse am 5. Tag nach Implantation. Das Wachstum der Tumoren wurde mittels BLI longitudinal im Verlauf registriert. Im fortgeschrittenen Tumorstadium bei beginnender Aszitesbildung wurden die Nacktmäuse getötet und das Gewicht der isolierten Tumoren bestimmt. Abschließend wurden die BLI-Signalintensitäten bei jeder Maus semi-quantitativ ermittelt und in Relation zum jeweiligen Ausgangswert am 5. Tag nach orthotoper Implantation gesetzt. Abbildung 33 zeigt Bilder einer repräsentativen Versuchsreihe von RCAS *p53*- und RCAS *lacZ*-infizierten TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren mit Auswertung des therapeutischen Effektes bei Reexpression von *p53*.

Durch *in vivo*-Infektion von orthotopen TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren mit RCAS *p53* lässt sich das weitere Tumorwachstum im Vergleich zu Kontroll-infizierten Tumoren (RCAS *lacZ*) deutlich vermindern. Während die Luziferaseaktivität am 55. Tag nach Implantation bei retroviralem Transfer von *lacZ* das 79,0-fache des Ausgangswertes beträgt, ist der Aktivitätsanstieg bei Reexpression von *p53* signifikant geringer mit dem 6,7-fachen des Ausgangswertes. Die Intensität des BLI-Signals RCAS *p53*-infizierter Mäuse nimmt in Relation zu Kontroll-infizierten Mäusen (RCAS *lacZ*) kontinuierlich ab: Sie sinkt von 93,7 % zu Versuchsbeginn am 5. Tag n. I. signifikant

auf 41,4 %, 18,1 % und schließlich 13,7 % bei der letzten Auswertung am 55. Tag nach Implantation (Student's t-Test, \*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle).

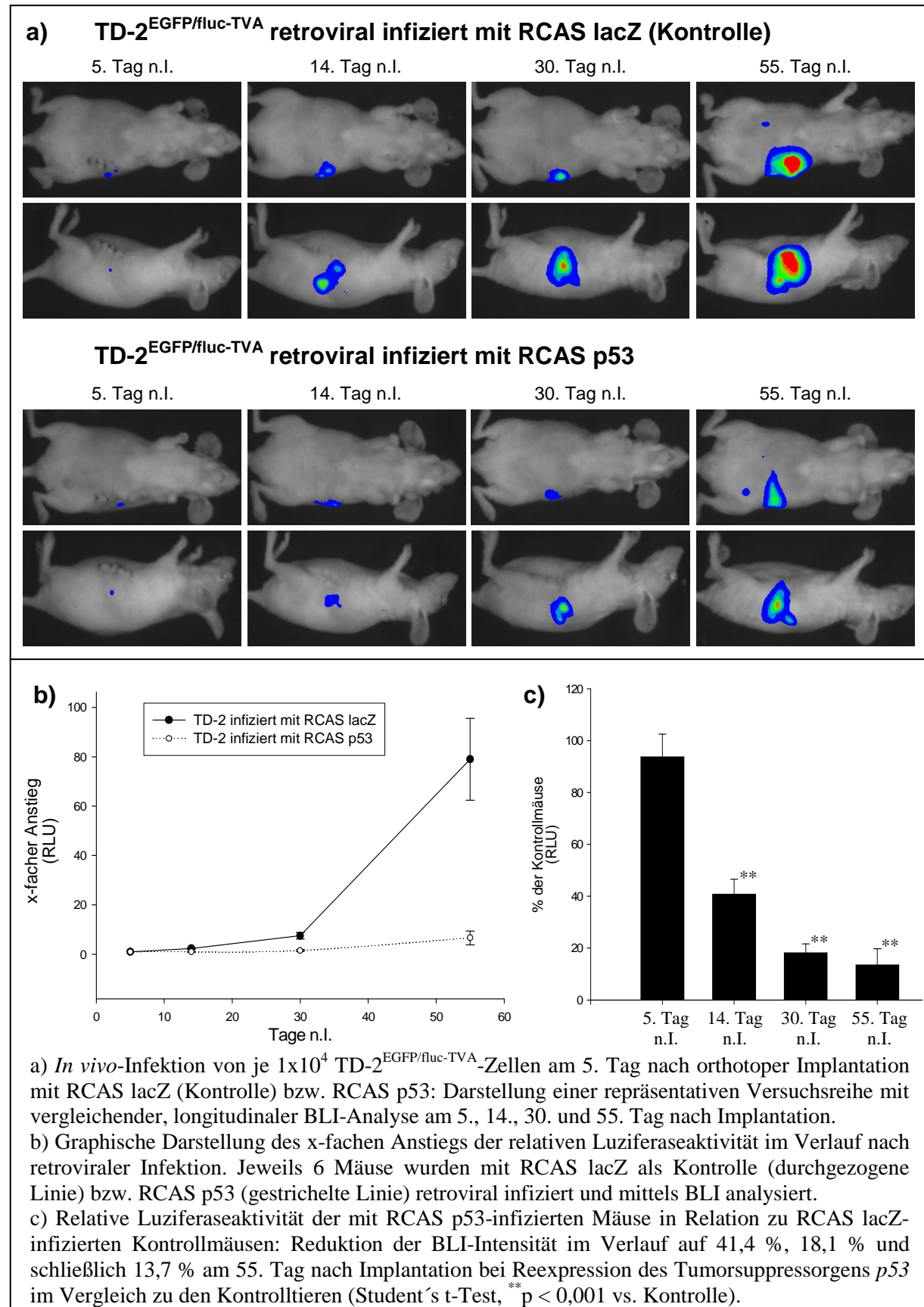


Abbildung 33: *In vivo*-Infektion von TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren mit RCAS p53 bzw. RCAS lacZ als Kontrolle

Im Gegensatz zur retroviralen Infektion mit RCAS p53 zeigt sich weder bei ektopter Expression von  $p16^{Ink4a}$  noch von  $p19^{ARF}$  eine wachstumshemmende Wirkung auf TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren im Nacktmausmodell (siehe Abbildung 34). Zum Zeitpunkt der letzten BLI-Analyse ist die Luziferaseaktivität bei Infektion mit RCAS p16<sup>Ink4a</sup> um das 98,3-fache und bei RCAS p19<sup>ARF</sup> um das 113,3-fache vervielfältigt im Vergleich zu einem 96,7-fachen Anstieg bei den RCAS lacZ-infizierten Kontrollmäusen.

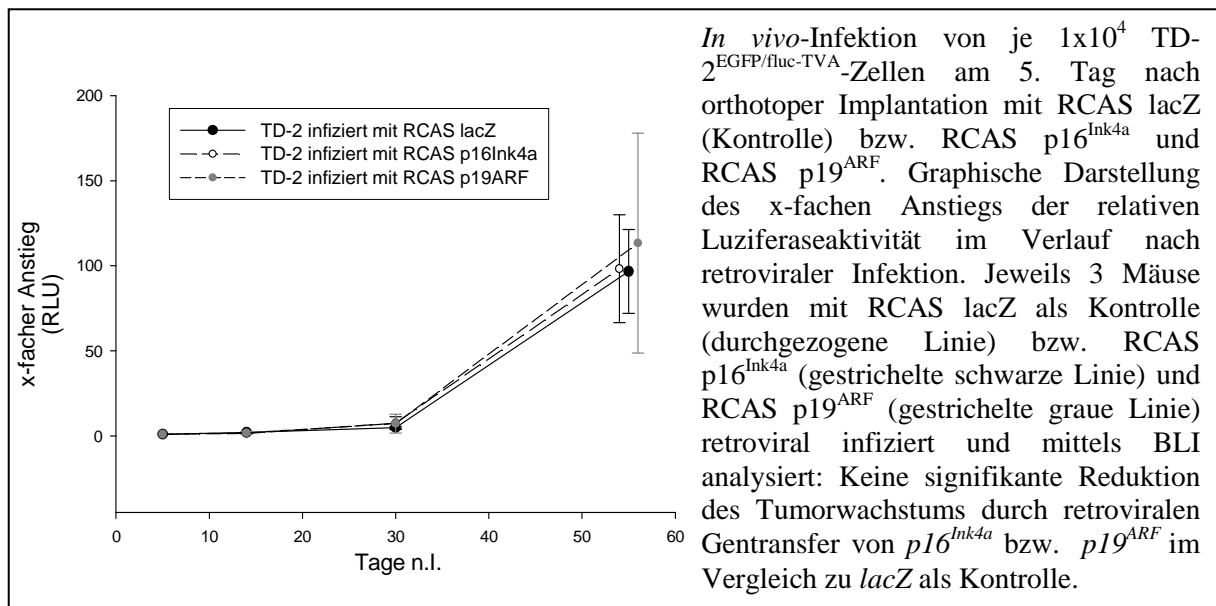


Abbildung 34: *In vivo*-Infektion von TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren mit RCAS p16<sup>Ink4a</sup> bzw. RCAS p19<sup>ARF</sup> sowie RCAS lacZ als Kontrolle

Die Evaluierung der proliferationshemmenden Potenz von shRNAs, welche gegen die Onkogene *EGF-R* und *c-myc* gerichtet sind, erfolgte nach den gleichen Versuchsbedingungen wie bei retroviraler Infektion mit den Tumorsuppressorgenen  $p53$ ,  $p16^{Ink4a}$  und  $p19^{ARF}$ . Mit RCAS shRNA EGF-R 801 und RCAS shRNA c-myc 755 wurden die beiden shRNAs verwendet, die im BrdU-Proliferationsassay *in vitro* jeweils die stärkere Wirkung gezeigt hatten (siehe Kapitel 4.5.1). Die BLI-Aufnahmen einer repräsentativen Versuchsreihe und die zusammenfassenden Berechnungen von je 3 Mäusen, welche mit RCAS shRNA EGF-R bzw. einer Kontroll-shRNA (RCAS shRNA Co) infiziert wurden, sind in Abbildung 35 dargestellt.

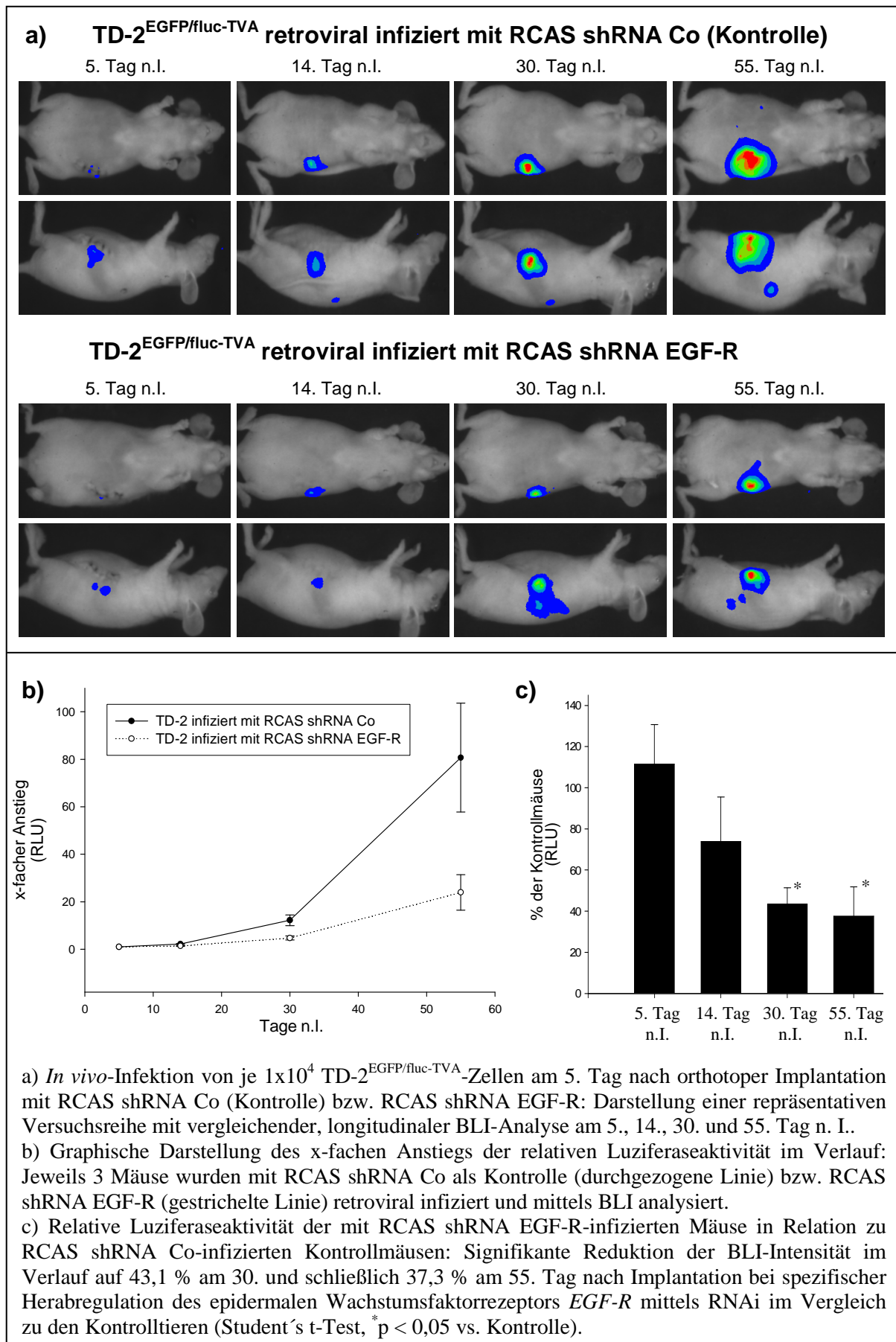
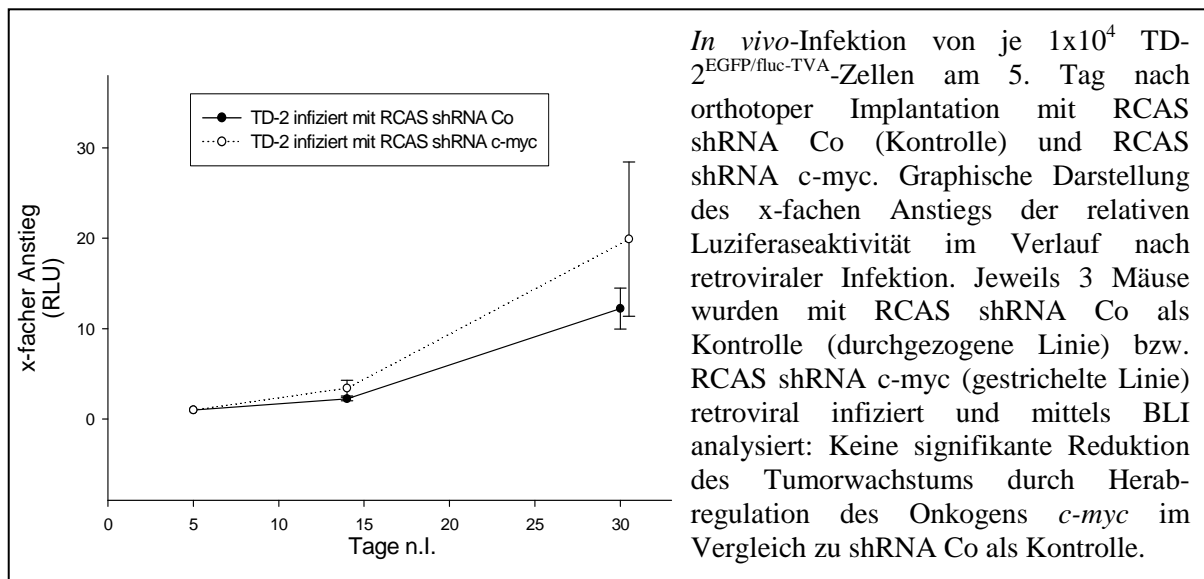


Abbildung 35: *In vivo*-Infektion von TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren mit RCAS shRNA EGF-R bzw. RCAS shRNA Co als Kontrolle

Die Genblockade des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors *EGF-R* durch das RNAi-Prinzip vermindert die Tumorprogression von orthotop implantierten TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup> *in vivo* signifikant in Relation zu den Kontrolltieren. Bis zur Analyse am 55. Tag nach Implantation steigt die relative Luziferaseaktivität der mit RCAS shRNA EGF-R-infizierten Mäuse auf das 23,9-fache des Ausgangswertes am 5. Tag nach Implantation, während bei den Kontrollmäusen ein Aktivitätsanstieg um das 80,7-fache des Ausgangswertes zu verzeichnen ist. Als weitere Verdeutlichung des therapeutischen Effektes nimmt die Intensität des BLI-Signals RCAS shRNA EGF-R-infizierter Mäuse in Relation zu Kontroll-shRNA-infizierten Mäusen (RCAS shRNA Co) kontinuierlich ab: Sie sinkt im longitudinalen Verlauf signifikant auf 43,1 % am 30. Tag und schließlich 37,3 % am 55. Tag n. I. im Vergleich zu RCAS shRNA Co-infizierten Kontrolltieren ab (Student's t-Test, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle).

Bei der retroviralen Infektion von TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren mit RCAS shRNA *c-myc* zeichnet sich dagegen kein wachstumshemmender Effekt gegenüber Kontrollmäusen ab. Valide Daten für jeweils 3 Mäuse, welche mit RCAS shRNA *c-myc* bzw. RCAS shRNA Co infiziert wurden, liegen bis zum 30. Tag nach Implantation vor (siehe Abbildung 36): Zu diesem Zeitpunkt ist anhand der BLI-Analyse die relative Luziferaseaktivität bei Infektion mit RCAS shRNA *c-myc* um das 19,9-fache vervielfältigt im Vergleich zu einem 12,2-fachen Anstieg bei den RCAS shRNA Co-infizierten Kontrollmäusen.



---

Abbildung 36: *In vivo*-Infektion von TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren mit RCAS shRNA *c-myc* bzw. RCAS shRNA Co als Kontrolle

Der proliferationshemmende Effekt auf das Wachstum orthotop implantierter TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen im Nacktmausmodell konnte somit für die retrovirale Infektion mit RCAS *p53* sowie RCAS shRNA *EGF-R* gezeigt werden; bei Transfer der Tumorsuppressorgene *p16<sup>Ink4a</sup>* und *p19<sup>ARF</sup>* war wie bei Herabregulation des Onkogens *c-myc* kein therapeutisch-bedeutsamer Einfluss auf die Progression der Tumoren *in vivo* festzustellen. Bei den Interventionsstudien lässt sich jedoch verzeichnen, dass sowohl durch die ektope Überexpression des Tumorsuppressorgens *p53* als auch durch die spezifische Genblockade von *EGF-R* durch RNA-Interferenz ein statistisch signifikanter therapeutischer Effekt *in vivo* erzielt werden kann. Im Vergleich zu Kontrollmäusen wird das weitere Wachstum der Tumoren im Verlauf zwar nicht aufgehalten, aber signifikant vermindert. Die Wirkung einer Reexpression von *p53* ist dabei stärker ausgeprägt als der proliferationshemmende Effekt bei retroviralem Transfer von RCAS shRNA *EGF-R*.



## 5. Diskussion

Das Pankreaskarzinom ist eine hochmaligne Tumorerkrankung mit zumeist infauster Prognose für die erkrankten Patienten. Die Überlebenszeiten bei palliativer Therapie der Erkrankung sind trotz Erprobung zahlreicher neuer Substanzen in den Behandlungsschemata nach wie vor kurz. Jedoch sind bereits geringe Erhöhungen von Ansprech- und Überlebensraten als ermutigende Schritte in der Verbesserung der Prognose des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms anzusehen (Li et al., 2004; Verslype et al., 2007; Saif, 2007; Ghaneh et al., 2007).

Ein wichtiges Hilfsmittel in der Erforschung und Evaluierung neuer therapeutischer Modalitäten für die Behandlung maligner Erkrankungen ist die Verwendung von Tiermodellen (Frese und Tuveson, 2007). Um das Wachstumsverhalten von Pankreaskarzinomzellen *in vivo* zu beobachten und zu analysieren, bietet sich die Verwendung von immunodefizienten Nacktmäusen an. In dieser Arbeit erfolgten Interventionsstudien an einem murinen Transplantationsmodell des Pankreaskarzinoms unter Verwendung der humanen Zelllinie MIA PaCa-2 (Yunis et al., 1977) sowie der murinen Zelllinie TD-2 (Wagner et al., 1998; Wagner et al., 2001; Greten et al., 2002; Schreiner et al., 2003). Beide Zelllinien waren in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mit einem Expressionsplasmid für die Reportergene *EGFP* und „firefly“ Luziferase (*fluc*) stabil transfiziert worden, um eine nichtinvasive Detektion in Nacktmäusen mittels Biolumineszenzbildgebung bzw. *ex vivo* mittels Fluoreszenz-Imaging zu gewährleisten. Durch die zusätzliche Expression des TVA-Rezeptors wurden MIA PaCa-2- und TD-2-Zellen zudem empfänglich für die Infektion mit dem Retrovirus RCAS und somit für die „Einschleusung“ genetischer Information.

### 5.1 RCAS-TVA-vermittelter retroviraler Gentransfer

Das RCAS-Virus mit dem Hüllprotein A (*envA*) ermöglicht den Transfer von genetischem Material in alle Zellen, welche den korrespondierenden TVA-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Bei ektopter TVA-Expression werden auch Säugertierzellen empfänglich für die Interaktion und nachfolgende Aufnahme des viralen Genoms (Young et al., 1993; Bates et al., 1993; Federspiel et al., 1994; Holland und Varmus, 1998). Das Infektionsprinzip des RCAS-TVA-Systems mit retroviralem Transfer genetischer Information wurde bereits in vielfältiger Weise für Forschungen

an humanen Malignomen *in vitro* sowie in Tiermodellen eingesetzt. Im Mittelpunkt stand dabei die Tumorinduktion durch gewebespezifischen retroviralen Transfer onkogener Faktoren, mit der Entwicklung von Gliomen (Holland et al., 1998), Ovarialkarzinomen (Orsulic et al., 2002), Pankreastumoren (Lewis et al., 2003), Lebermalignomen (Lewis et al., 2005) und zuletzt auch Mammakarzinomen (Du et al., 2006; Du und Li, 2007). Neben der ektopen Expression transferierter Gene in den Zielzellen gestattet das RCAS-TVA-System auch den Einsatz des RNAi-Prinzips mit sequenzspezifischer Blockade der Expression bestimmter Gene (Bromberg-White et al., 2004); allerdings wurde der Hemmeffekt *in vivo* bisher nur an embryonalen Zellen der Geflügelretina gezeigt (Harpavat und Cepko, 2006). Die diversen Vor- und Nachteile bei der Verwendung des RCAS-TVA-Systems mit retroviralem Transfer genetischer Information sind ausführlich dokumentiert (Fisher et al., 1999; Orsulic, 2002). Einschränkungen betreffen u.a. die Größe des in den RCAS-Vektor klonierten Inserts. Die Effizienz der Methode ist an Proliferation der Zielzellen gebunden. Zudem erfolgt die chromosomale Integration der viralen genetischen Information nach heutigem Wissenstand bzgl. der Lokalisation der Integration zufällig. Dies könnte sowohl das Expressionsniveau viraler Gene als auch die Transkription von Wirtsgenen beeinflussen. Auf der anderen Seite bietet das RCAS-TVA-System eine schnelle und einfache Möglichkeit der Übertragung genetischer Information durch retrovirale Infektion. Die Verwendung entsprechender TVA-exprimierender Zelllinien bzw. transgener Mausmodelle ermöglicht damit selektiv den zell- bzw. gewebespezifischen Transfer mit Expression gewünschter Gene. Aufgrund des fehlenden Vermehrungszyklus des RCAS-Virus in Säugetierzellen sind Immunreaktionen des Wirtes bei *in vivo*-Experimenten unwahrscheinlich. Außerdem besteht die Option von Re-Infektionen mit simultaner oder sequentieller Einschleusung von genetischer Information in dieselben Zellen bzw. Gewebe (Orsulic et al., 2002).

Ein Ziel in der vorliegenden Arbeit war die Etablierung der retroviralen Infektion mit dem RCAS-TVA-System an den verwendeten humanen sowie murinen Pankreaskarzinomzellen. Der Transfer des Reportergens *lacZ* in MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- bzw. TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen bestätigte die erfolgreiche Expression eines mittels RCAS-Vektors in die Tumorzellen übermittelten Gens. Neben der Überexpression eines bestimmten Gens wurde auch die spezifische Herabregulation der Reportergene *EGFP* und *fluc* erprobt. Der Einsatz des RNAi-Prinzips mit Transfer entsprechender

shRNAs führte zu einem sichtbaren bzw. quantifizierbaren Knockdown der *EGFP*- bzw. *fluc*-Expression in den humanen sowie auch murinen Tumorzellen.

Auch die darauf folgenden Untersuchungen zur Etablierung der Methode im Tiermodell bestätigten, dass das RCAS-Virus erfolgreich zur retroviralen Infektion von Tumorzellen *in vivo* eingesetzt werden kann. Nach Infektion mit RCAS *lacZ* zeigten große Anteile von MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- bzw. TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren eine ektope Expression von *lacZ* und somit  $\beta$ -Galactosidaseaktivität. Der shRNA-vermittelte, spezifische Knockdown der „firefly“-Luziferaseexpression von MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren *in vivo* konnte anhand longitudinaler Biolumineszenzmessung (BLI) nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit standen daher MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen zur Verfügung, die aufgrund der ektope TVA-Expression einen retroviralen Gen- bzw. shRNA-Transfer mit Hilfe des RCAS-TVA-Systems ermöglichen. Dabei zeigten die *in vitro*-Experimente eine höhere Infektionsrate für humane MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- gegenüber murinen TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen. Die größere Effizienz der Methode bei MIA PaCa-2 war sowohl für die ektope Genexpression als auch bei gezielter Herabregulation eines Gens durch RNAi nachweisbar. Die Verminderung der Luziferaseexpression in Nacktmäusen durch shRNA *fluc* bestätigt, dass RCAS-TVA-System und RNAi-Prinzip auch in Mausmodellen *in vivo* eingesetzt werden können.

## 5.2 Validität der Methode des Biolumineszenz-Imaging zur longitudinalen Verlaufsbeobachtung von Tumoren *in vivo*

Die Methode des Biolumineszenz-Imaging (BLI) stellt ein einfaches und kostengünstiges bildgebendes Verfahren zur Erfassung von Tumorlokalisierung und Tumorprogression in Tiermodellen dar (Klerk et al., 2007). Das Prinzip besteht in der optischen Erfassung Luziferase-exprimierender Tumorzellen aufgrund enzymatischer Umwandlung des i.p.-injizierten Substrats D-Luziferin zu Oxyluziferin und Licht. Wegen der günstigen photochemischen Eigenschaften des Subtyps „firefly“-Luziferase ist die Detektion des Biolumineszenzsignals *in vivo* auch aus tiefer gelegenen Gewebeschichten möglich (siehe Kapitel 1.4.2; Lyons, 2005; Weissleder und Ntziachristos, 2003).

Die Einführung des BLI hat die Analyse von Tumormodellen entscheidend erweitert und verbessert. Die Tumorzellen können durch den Einsatz hochempfindlicher CCD-

Kameras bereits kurz nach Injektion in Versuchstieren detektiert werden, auch bei Verwendung einer geringen Anzahl von 1000 - 10000 Zellen. Unter den verschiedenen nichtinvasiven Imaging-Verfahren besitzt das BLI damit die höchste Sensitivität für die Erfassung von Tumorzellen *in vivo* (Choy et al., 2003; Klerk et al., 2007). Da die Detektion solider Zellansammlungen auch in tieferen Gewebeschichten gelingt, gestattet das BLI orthotope Implantationen der Tumorzellen. Orthotope Modelle imitieren die spezifische klinische Entität der Tumoren akkurater als s.c.- oder i.v.-Zellinjektionen in Bezug auf Tumorprogression, Metastasierung und das Ansprechen auf therapeutische Maßnahmen (Killion et al., 1998; Hoffman, 1999). Der größte Vorzug des BLI besteht in der Möglichkeit einer nichtinvasiven, longitudinalen Verlaufsbeobachtung des Wachstums Luziferase-exprimierender Tumorzellen *in vivo* (Klerk et al., 2007). Die ATP- und O<sub>2</sub>-Abhängigkeit der enzymatischen Reaktion hat zur Folge, dass nur vitales Tumorgewebe erfasst wird und nekrotische Areale nicht zum Signal der Tumoren beitragen. Nachteilig ist u.a. die geringe räumliche Auflösung der Bildregistrierung (Lyons, 2005; Edinger et al., 2002). Ein wichtiges Kriterium in der Bewertung der BLI-Technik ist die Evaluierung der Validität der Methode: Um aus dem registrierten Biolumineszenzsignal zuverlässige Rückschlüsse auf Tumorgröße und Tumorprogression *in vivo* ziehen zu können, muss die Intensität des Signals die tatsächliche Tumorzellmasse repräsentieren (Klerk et al., 2007). Die Überprüfung der Validität erfolgte bisher auf unterschiedliche Art und Weise: Hierzu gehörten u.a. Korrelationen des BLI-Signals mit der Anzahl injizierter Tumorzellen (El Hilali et al., 2002), mit dem messtechnisch, kernspintomographisch bzw. histologisch ermittelten Tumolvolumen (Paroo et al., 2004; Rehemtulla et al., 2000; Hadaschik et al., 2007) oder mit dem postmortal bestimmten Gewicht der Tumoren (Vooijs et al., 2002). Dabei ergab sich bei allen Fällen von umschriebenen, fokalen Läsionen eine gute Korrelation zwischen BLI-Signalintensität und Tumolvolumen bzw. -gewicht. Im Gegensatz zur großen Validität der Methode bei soliden Tumoren sinkt die Korrelation deutlich in Modellen mit disseminierter Erkrankung oder Metastasierung (Klerk et al., 2007).

Eine wichtige Anwendung für die Technik des BLI ist die longitudinale Verlaufsbeobachtung des Tumorwachstums im Zuge von Therapie-Interventionsstudien. Entscheidend ist dabei eine Analyse des BLI-Signals im Verlauf mit Normalisierung der registrierten Werte auf den jeweiligen Referenzwert des Versuchstieres zu Beginn der Intervention. Somit besitzt jedes Versuchstier für den Verlauf der Studie

seine eigene Kontrolle in Form seines eigenen Ausgangswertes. Auf diese Weise werden Unterschiede im Tumorwachstum zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen bei longitudinaler BLI-Analyse erkennbar und die Mäuse trotz Differenzen in den Ausgangsbedingungen vergleichbar. Von großer Wichtigkeit in diesem Zusammenhang ist die Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen, v.a. in Bezug auf Aufnahmetechnik, Entfernung des Versuchstieres zur Kamera sowie Menge des injizierten Substrats D-Luziferin (Klerk et al., 2007).

Eine entscheidende Fragestellung in dieser Arbeit war die Bewertung der Validität des BLI für die Wachstumskontrolle orthotop implantierter Pankreaskarzinomzellen im Nacktmausmodell. Für zuverlässige Aussagen über therapeutische Effekte in Interventionsstudien müssen aus dem registrierten Biolumineszenzsignal Rückschlüsse auf die tatsächliche Tumorausdehnung gezogen werden können (Klerk et al., 2007). Daher wurde eine Korrelation zwischen der Signalintensität *in vivo* und dem daraufhin unmittelbar postmortal bestimmten Tumorgewicht angefertigt. Die Untersuchung erfolgte dabei an MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- Tumoren verschiedener Größe und Ausdehnung. Beide Parameter sind exakt analysierbar und für die Beurteilung der Validität des BLI in longitudinalen Interventionsstudien ausreichend. Es zeigte sich eine lineare Korrelation zwischen der Stärke des Biolumineszenzsignals *in vivo* und dem Tumorgewicht *ex vivo* für alle umschriebenen Tumoren ohne Aszitesbildung, mit einem hohen Korrelationskoeffizienten von  $r^2=0,9314$ . Wurden dagegen auch Versuchstiere mit Aszitesansammlung im fortgeschrittenen Tumorstadium in die Berechnung mit einbezogen, verminderte sich der Korrelationskoeffizient erheblich. Das BLI gestattet demnach valide Aussagen über Tumorgröße und Progression der Tumorerkrankung im Verlauf *in vivo*. Im Endstadium der Erkrankung bei Aszitesbildung können dagegen keine akkuraten Rückschlüsse auf die tatsächliche Größe der Tumoren gezogen werden. Mit dem Biolumineszenz-Imaging stand demnach eine einfache und hochsensitive Methode zur Detektion der Luziferase-exprimierenden MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen im Nacktmausmodell zur Verfügung. Aufgrund der günstigen photochemischen Eigenschaften des Typs „firefly“-Luziferase bestand die Möglichkeit der orthotopen Implantation der Tumorzellen, wodurch die klinische Entität des Pankreaskarzinoms besser imitiert werden kann als in s.c.- oder i.v.-Modellen. Die Tumorzellen ließen sich bereits kurz nach Injektion *in vivo* erfolgreich lokalisieren und konnten in ihrem weiteren Wachstumsverlauf nichtinvasiv longitudinal beurteilt

werden. Aus der Stärke des BLI-Signals waren zu jedem Zeitpunkt der Verlaufsbeobachtung Rückschlüsse auf die tatsächliche Ausdehnung der Tumoren *in vivo* möglich, da eine gute Korrelation zwischen Signalstärke *in vivo* und Tumorgewicht *ex vivo* bestand. Somit eignet sich die Methode des BLI für vergleichende Untersuchungen in longitudinalen Interventionsstudien mit Evaluierung therapeutischer Effekte auf die Progression orthotop implantierter Pankreaskarzinomzellen (Mayr et al., 2008). Hierbei dient jede Versuchsmaus als ihre eigene Kontrolle, da BLI-Messungen im Verlauf auf die jeweilige Ausgangsmessung als Referenzwert bezogen werden.

### 5.3 Funktionelle Genanalyse *in vivo*

Die Interventionsstudien im Nacktmausmodell sollten zunächst mit der humanen Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 durchgeführt werden. Sie hatte sich *in vitro* durch eine sehr hohe Effizienz der retroviralen Infektionsmethode mit dem RCAS-TVA-System ausgezeichnet. Zugleich waren die proliferationshemmenden Effekte im Zuge der BrdU-Analyse bei sämtlichen verwendeten Tumorsuppressoren stärker ausgeprägt als bei der murinen Zelllinie TD-2. Für die *in vivo*-Experimente mussten MIA PaCa-2 in einer sehr großen Anzahl von  $5 \times 10^6$  Zellen pro Versuchstier orthotop implantiert werden. Aufgrund des diskontinuierlichen Tumorwachstums in den ersten 4-5 Wochen nach der orthotopen Implantation jedoch wurden Interventionsstudien schließlich nur mit murinen TD-2-Tumoren vorgenommen.

Die Verwendung der murinen TD-2-Zelllinie für Untersuchungen im Nacktmausmodell hatte entscheidende Vorteile gegenüber Versuchen mit MIA PaCa-2-Tumoren. Sie konnten für die orthotope Implantation in sehr geringen Mengen von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Maus eingesetzt werden und zeigten dennoch von Beginn an ein kontinuierliches Tumorwachstum *in vivo*. Differenzen in den Ausgangsbedingungen zwischen den einzelnen Versuchstieren waren geringer als bei MIA PaCa-2-Tumoren. Wegen des frühen Interventionsbeginns mit retroviraler Infektion bereits am 5. Tag nach Implantation wurde ein langer longitudinaler Beobachtungszeitraum für vergleichende Untersuchungen von annähernd 2 Monaten erreicht. Aufgrund der Implantation geringer Zellzahlen sowie frühzeitiger Infektion waren die Voraussetzungen für die Beobachtung therapeutischer Effekte günstiger als bei MIA PaCa-2. Durch Gruppierung der einzelnen Mäuse vor Intervention anhand der Bio-

lumineszenzintensität wurden Unterschiede in den Ausgangsbedingungen minimiert und die Analyse wachstumshemmender Einflüsse in Relation zu Kontrollmäusen erleichtert. Die Berechnung erfolgte durch semiquantitative Bestimmung des Biolumineszenzsignals im Verlauf, welches auf den jeweiligen Ausgangswert des Tieres zum Zeitpunkt der ersten Messung bezogen wurde. Anhand der Signalwerte konnten Versuchs- und Kontrollmäuse verglichen und damit hemmende Effekte auf die Progression der Tumoren *in vivo* ermittelt werden.

Der retrovirale Transfer des Tumorsuppressorgens *p53* zeigte eine starke Verminderung der weiteren Tumorprogression in den Nacktmäusen gegenüber RCAS lacZ-infizierten Kontrollmäusen. Der Versuch einer ektopten Expression von *p16<sup>Ink4a</sup>* oder *p19<sup>ARF</sup>* in TD-2-Zellen *in vivo* dagegen bewirkte keine Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich mit den Kontrolltieren.

Zugleich ergaben die Interventionsstudien an TD-2-Tumoren auch eine proliferationshemmende Potenz bei sequenzspezifischer Blockade des Wachstumsfaktorzepetors *EGF-R*. Die retrovirale Infektion mit RCAS shRNA *EGF-R* verminderte die Progression orthotop implantierter TD-2-Zellen im Vergleich mit Kontroll-shRNA-infizierten Tumoren, wobei die Reduktion schwächer ausgeprägt war als bei ektopter Expression von *p53*. Die Herabregulation des Onkogens *c-myc* durch das RNAi-Prinzip konnte keine therapeutische Wachstumshemmung *in vivo* nachweisen.

### 5.3.1 Reexpression des Tumorsuppressorgens *p53*

Das „Genomwächterprotein“ *p53* ist von zentraler Bedeutung in der Regulation des Zellzyklus. Als Transkriptionsfaktor nimmt es Einfluss auf die Expression diverser Faktoren und bremst den weiteren Fortgang des Zellzyklus am G1 / S-Checkpoint. Das auf Chromosom 17 gelegene Tumorsuppressorgen ist das am häufigsten mutierte Gen in malignen Erkrankungen des Menschen und in 50-75 % aller Pankreaskarzinome mutiert oder inaktiviert (Toledo et al., 2006; Talar-Wojnarowska et al., 2006; Efeyan und Serrano, 2007; Saif et al., 2007).

Die wichtige tumorsuppressive Rolle des *p53*-Gens bzgl. der Karzinogenese im Pankreas wird auch durch entsprechende Tiermodelle verdeutlicht, in denen die Versuchsmäuse eine Defizienz für intaktes *p53* aufweisen: Ein Verlust der *p53*-Funktion in Mäusen verstärkt die Progression von prämaligen Läsionen zum invasiven Pankreaskarzinom erheblich (Bardeesy et al., 2006). Auch der sequenz-

spezifische Knockdown von *p53* durch RCAS-TVA-vermittelte RNA-Interferenz in tv-a-transgenen Mäusen beschleunigt die weitere maligne Entwicklung dramatisch (Seidler et al., 2008). Zudem kann auch eine ektope Expression der mutierten Variante *Trp53*<sup>R172H</sup> die weitere Karzinogenese von Vorläuferläsionen entscheidend vorantreiben (Hingorani et al., 2005).

Die in dieser Arbeit eingesetzten murinen Pankreaskarzinomzellen TD-2, generiert aus dem Primärtumor einer TGF- $\alpha$ /*p53*<sup>+/-</sup>-transgenen Maus, zeigen u.a. eine Deletion des zweiten *p53*-Allels (Wagner et al., 1998; Wagner et al., 2001; Schreiner et al., 2003). Durch RCAS-TVA-basierten retroviralen Transfer einer *p53*-Expressionskassette konnte die Proliferation infizierter Tumorzellen *in vitro* erfolgreich gehemmt werden. Durch retroviralen Transfer von *p53* in Interventionsstudien im Nacktmausmodell wurde das Wachstum orthotop implantierter TD-2 signifikant vermindert. Der therapeutische Effekt der ektope Expression von *p53* konnte durch die longitudinale Verlaufsbeobachtung der Tumoren *in vivo* mittels Biolumineszenzbildgebung gezeigt werden: Bei nahezu identischen Ausgangsbedingungen von Versuchs- und Kontrolltieren zu Interventionsbeginn betrug die Intensität des Biolumineszenzsignals RCAS *p53*-infizierter Mäuse am 55. Tag nach Implantation lediglich 13,7 % der Aktivität RCAS lacZ-infizierter Kontrollmäuse (Student's t-Test, \*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle). Der Versuch einer Wiederherstellung der tumorsuppressiven *p53*-Funktion konnte das Wachstum der TD-2-Tumoren *in vivo* zwar nicht stoppen, jedoch die weitere Progression erheblich vermindern.

Ein wichtiger Faktor für die protektive Rolle von *p53* ist die Intaktheit des Tumorsuppressors ARF, da es sowohl die *p53*-Antwort auf onkogene Stimulation induzieren kann als auch das *p53*-Protein vor der raschen Degradation durch Hdm2 bewahrt (Sherr, 2001; Efeyan und Serrano, 2007). Durch isolierten retroviralen Transfer von *p19*<sup>ARF</sup> in orthotop implantierte TD-2-Zellen konnte im Nacktmausmodell kein therapeutischer Effekt auf das Tumorwachstum *in vivo* beobachtet werden. Da jedoch der Einsatz des RCAS-TVA-Systems auch simultane bzw. sequenzielle Infektionen derselben Tumorzellen mit unterschiedlicher genetischer Information ermöglicht, könnten auch kooperative oder ergänzende Effekte von mehreren Faktoren erforscht bzw. überprüft werden (Orsulic et al., 2002). Hierfür würden sich beispielsweise vergleichende Untersuchungen zwischen dem gleichzeitigen Transfer der Tumorsuppressorgene *p53* und *p19*<sup>ARF</sup> in Gegenüberstellung mit isolierter *p53*-Reexpression anbieten.



### 5.3.2 Herabregulation der EGF-Rezeptor-Expression durch RNAi

Ein relativ neuer Angriffspunkt in der Therapie maligner Tumorerkrankungen ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGF-R. Er besteht aus einer extrazellulären Bindungsstelle für die Interaktion mit Liganden, einem transmembranären Abschnitt sowie einer intrazellulären Domäne mit Tyrosin-Kinase-Funktion. Die Aktivierung von EGF-R stimuliert Signalkaskaden mit proliferationsfördernder, angiogenetischer und anti-apoptotischer Wirkung. Eine Überexpression des Rezeptors findet sich in zahlreichen soliden Malignomen des Menschen, wie Lungen-, Kolon- sowie Mammakarzinomen, und kann auch bei Patienten mit Pankreaskarzinom häufig festgestellt werden. Bei vielen Tumoren ist die EGF-R-Überexpression mit aggressiveren Verläufen der Erkrankung assoziiert (Korc et al., 1992; Mendelsohn und Baselga, 2003; Lemoine et al., 1992; Saif et al., 2007; Tzeng et al., 2007).

Aus diesen Gründen wurde EGF-R zu einem vielversprechenden Angriffspunkt in der Behandlung maligner Tumoren, wobei für die Therapie spezifische Substanzen für die molekular gezielte Blockade des Rezeptors entwickelt wurden. Bei den bisher eingesetzten Antagonisten von EGF-R handelt es sich zumeist um Antikörper gegen die extrazelluläre Bindungsstelle bzw. Inhibitoren der intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne (Harari et al., 2007; Rocha-Lima et al., 2007).

Cetuximab (Erbix®) ist der am besten untersuchte monoklonale anti-EGF-R Antikörper und der erste für den klinischen Gebrauch zugelassene Vertreter dieser Substanzklasse. Er wurde bedeutsam v.a. für die Behandlung metastasierter Kolonkarzinome sowie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs. Aufgrund erfreulicher präklinischer Ergebnisse wurde Cetuximab bereits in zahlreichen Studien als Monotherapie oder in Kombination mit Standardchemotherapeutika für Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom sowie als Monotherapie bzw. in Kombination mit Bestrahlung für Plattenepithelkarzinome untersucht (Harari et al., 2007; Rocha-Lima et al., 2007). Für Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom konnte eine Phase-III-Studie mit Einsatz von Cetuximab in Kombination mit Gemcitabine ermutigende Resultate aus Voruntersuchungen leider nicht bestätigen (Xiong et al., 2004; Saif, 2007).

Die beiden bekanntesten Mitglieder der Gruppe der Tyrosin-Kinase-Inhibitoren sind Gefitinib (Iressa®) und Erlotinib (Tarceva®). Sie blockieren selektiv die Phosphorylierung der intrazellulär gelegenen Tyrosin-Kinase-Domäne von EGF-R

und zeigen daher antiproliferative, antiangiogenetische und proapoptotische Wirkung (Arteaga et al., 2003). Gefitinib wurde in zahlreichen Studien als Ergänzung zur Chemotherapie nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome verwendet, konnte jedoch nach neuesten Untersuchungen keine signifikanten Fortschritte in der Behandlung der Patienten bewirken (Giaccone et al., 2004; Herbst et al., 2004). Auch der Einsatz von Erlotinib in der Behandlung von Patienten mit Lungenkrebs wurde in vielen Studien untersucht. Dabei konnten für Patienten mit therapierefraktärer Erkrankung Verbesserungen der Überlebenszeiten durch Monotherapie mit Erlotinib als „second-line“- bzw. „third-line“-Therapie gezeigt werden (Shepherd et al., 2005). Die Verwendung von Erlotinib für Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom wurde in einer vor kurzem durchgeführten Phase-III-Studie überprüft. Dabei ergab die zusätzliche Gabe von Erlotinib zu Gemcitabine gegenüber der standardgemäßen alleinigen Gabe von Gemcitabine marginale, wenn auch signifikante Vorteile der Kombination bzgl. der Überlebenszeiten (Moore et al., 2007; Bareschino et al., 2007; siehe Kapitel 1.1). Ein entscheidender Punkt wäre dabei eine Identifikation bzw. Selektion derjenigen Patienten, welche von der gezielten anti-EGF-R-Therapie mit hoher Wahrscheinlichkeit profitieren würden (Rocha-Lima et al., 2007).

Die therapeutische Bedeutung einer Blockade von EGF-R wurde auch bereits in Mausmodellen beurteilt. So konnten durch die Behandlung mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren das Wachstum humaner Pankreaskarzinomzellen in Nacktmäusen reduziert und damit die Überlebenszeiten der Tiere verbessert werden (Yokoi et al., 2005; Durkin et al., 2006). Der erfolgreiche Einsatz des RNAi-Prinzips für Forschungen an nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen mit sequenzspezifischer Hemmung von EGF-R zeigte einen neuen therapeutischen Ansatz für die Blockade des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (Zhang et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden Interventionsstudien mit murinen TD-2-Zellen vorgenommen, zu deren chromosomalen Aberrationen eine Amplifikation des *EGF-R*-Lokus zählt (Schreiner et al., 2003). Durch RCAS-TVA-basierten retroviralen Gentransfer von shRNAs, die gegen *EGF-R* gerichtet sind, wurde ein sequenzspezifischer Knockdown des Rezeptors *in vivo* bewirkt. Dadurch konnte das Wachstum orthotop implantierter TD-2-Zellen im Nacktmausmodell im Vergleich zur retroviralen Infektion mit einer Kontroll-shRNA signifikant vermindert werden. Bei nahezu identischen Ausgangsbedingungen zu Beginn der Untersuchung betrug die BLI-Signalintensität der mit RCAS shRNA EGF-R-infizierten Mäuse am 55. Tag nach

Implantation 37,3 % der bei Kontrollmäusen ermittelten Luziferaseaktivität (Student's t-Test, \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle). Folglich kann die Progression der Tumoren *in vivo* zwar nicht aufgehalten, jedoch signifikant reduziert werden. Die proliferationshemmende Potenz der spezifischen Herabregulation von *EGF-R* war allerdings deutlich schwächer ausgeprägt als die therapeutische Verringerung des Tumorwachstums durch Reexpression des Tumorsuppressorgens *p53*.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Effizienz der retroviralen Infektion von TVA-exprimierenden MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen mit dem RCAS-TVA-System. Die Infektionsmethode gestattet den retroviralen Transfer genetischer Information und eignet sich sowohl für die ektope Genexpression als auch für die gezielte Herabregulation der Genexpression nach dem RNAi-Prinzip. Aufgrund der stabilen Transfektion mit dem Reporter gen „firefly“-Luziferase können MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen *in vivo* mittels BLI detektiert werden. Die semiquantitative Analyse der BLI-Daten erlaubt akkurate Aussagen über die tatsächliche Tumorausdehnung *in vivo*. Aus diesem Grund kann die Methode des BLI in Interventionsstudien zur Beurteilung therapeutischer Effekte bzgl. der Lokalisation und Progression orthotop implantierter Pankreaskarzinomzellen verwendet werden. Hierdurch konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass sowohl die ektope Expression von *p53* als auch der shRNA-vermittelte Knockdown von *EGF-R* einen signifikanten therapeutischen Effekt gegenüber Kontrollmäusen erbringt. Die Progression von TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren in Nacktmäusen kann folglich durch Überexpression von Tumorsuppressoren sowie durch Blockade wachstumsfördernder Faktoren reduziert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte dadurch ein neues, murines Pankreaskarzinommodell zur Erforschung bzw. Bewertung therapeutischer Optionen generiert und validiert werden. Dieses *in vivo*-Modell erlaubt die effiziente Evaluation therapeutischer Targets auf genetischer Ebene; zugleich eröffnet es die Möglichkeit eines sequenziellen oder simultanen Gen- bzw. shRNA-Transfers, um kooperierende Gene bzgl. ihres Einflusses auf die Progression der Tumoren *in vivo* untersuchen zu können.

## 6. Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist eine hochmaligne Tumorerkrankung mit zumeist infauster Prognose für die Betroffenen. Aufgrund der ausgeprägten Tendenz zur Lokal- und Fernmetastasierung sowie unspezifischer Frühsymptomatik erfolgt die Erstdiagnose meist im Stadium der irresektablen oder metastasierten Erkrankung. Die Ergebnisse der palliativen chemotherapeutischen Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom sind trotz Erweiterung der Therapieoptionen bzgl. der Überlebenszeiten schlecht. Die Hoffnung ruht daher v.a. auf der Entwicklung und Einführung neuer medikamentöser Behandlungsmodalitäten.

Ein essentielles wissenschaftliches Element für die Erprobung neuer therapeutischer Optionen und Wirkstoffe in der Behandlung maligner Erkrankungen sind Tiermodelle. Für Forschungen an Entstehung, Wachstum und Metastasierung von Pankreaskarzinomzellen bietet sich die Verwendung athymischer, immunodefizienter Nacktmäuse an. Neben humanen Zelllinien wie z.B. MIA PaCa-2 steht mit TD-2 eine murine Pankreaskarzinomzelllinie zur Verfügung, welche die genetischen Alterationen der humanen Tumorgenese weitgehend rekapituliert und daher ein hilfreiches *in vitro*- und *in vivo*-Modell für das Adenokarzinom des Pankreas darstellt. In dieser Arbeit wurde die Progression von MIA PaCa-2- sowie TD-2-Tumoren an einem murinen Transplantationsmodell des Pankreaskarzinoms untersucht und dabei nach Möglichkeiten der therapeutischen Einflussnahme auf das Tumorstadium *in vivo* geforscht. Durch Vorarbeiten konnten beide Zelltypen mit einem Expressionsvektor für die Reportergene *EGFP* und „firefly“-Luziferase (*fluc*) stabil transfiziert werden, wodurch die Voraussetzung für eine nichtinvasive Detektion der Zellen mittels Biolumineszenz- (BLI) bzw. Fluoreszenzbildgebung (FLI) geschaffen wurde. Außerdem konnte durch Expression des TVA-Rezeptors ein RCAS-TVA-abhängiger retroviraler Gentransfer in die Zellen ermöglicht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Effizienz der Infektionsmethode mit Einsatz des RCAS-TVA-Systems überprüft. Die *in vitro*-Experimente bestätigten den Erfolg des retroviralen Transfers genetischer Information, wobei MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc</sup>-TVA-Zellen eine höhere Infektionsrate aufwiesen als TD-2<sup>EGFP/fluc</sup>-TVA-Zellen. Zudem waren die Zellen auch *in vivo* zur Aufnahme und Integration genetischen Materials im Stande, da die Transduktion und ektope Expression des Reportergens *lacZ* ebenso

nachgewiesen werden konnte wie die Expressionshemmung des Enzyms „firefly“-Luziferase bei Transfer einer gegen *fluc*-gerichteten, spezifischen shRNA. Mit MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen standen daher TVA-exprimierende Tumorzellen zur Verfügung, welche *in vitro* und *in vivo* für retrovirale Infektionen mit Transfer von Gen- bzw. shRNA-Expressionskassetten geeignet sind.

Für die Detektion und exakte Lokalisation von MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>- und TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen in Versuchstieren wurde die hochsensitive Methode des Biolumineszenz-Imaging (BLI) mit Erfassung „firefly“-Luziferase-exprimierender Zellen eingesetzt. Um bei den geplanten Interventionsstudien aus dem registrierten Biolumineszenzsignal valide Aussagen über die tatsächliche Ausdehnung der Tumoren treffen zu können, wurde der Korrelationsgrad zwischen BLI-Intensität *in vivo* und Tumorgewicht *ex vivo* ermittelt. Demnach waren aus der *in vivo* semiquantitativ errechneten Luziferaseaktivität der Tumoren zuverlässige Rückschlüsse auf die Tumorgroße möglich und daher vergleichende Analysen anhand des BLI-Signals bei longitudinalen Verlaufsstudien valide. Bei zunehmender Aszitesbildung der Mäuse im Endstadium der Tumorerkrankung war die Korrelation zwischen BLI-Signal und Tumorgewicht dagegen weniger gut.

Abschließend wurde eine funktionelle Genanalyse der Tumorsuppressorgene *p53*, *p16<sup>Ink4a</sup>* und *p19<sup>ARF</sup>* sowie eine Evaluierung des shRNA-vermittelten Knockdown der Onkogene *EGF-R* und *c-myc* mit Einsatz des RCAS-TVA-Systems durchgeführt. Hierfür erfolgten für diese Arbeit spezielle Proliferationsanalysen *in vitro* sowie Interventionsstudien an orthotop implantierten Tumorzellen im Nacktmausmodell. Das Wachstum der Tumoren *in vivo* wurde mittels longitudinalem Biolumineszenz-Imaging analysiert und Unterschiede in der Progression der Tumoren durch Gegenüberstellung von Versuchs- und Kontrollmäusen ausgewertet. Die humanen MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen mussten in sehr großer Anzahl injiziert werden und konnten letztlich aufgrund des diskontinuierlichen Tumorwachstums zu Beginn in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet werden. Die murine Pankreaskarzinomzelllinie TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup> erwies sich dagegen als geeignet für Interventionsstudien im Nacktmausmodell. Die Zellen konnten in sehr geringer Anzahl orthotop implantiert werden, zeigten ein kontinuierliches Wachstum und ließen sich *in vivo* frühzeitig retroviral infizieren. Differenzen in den Ausgangsbedingungen einzelner Mäuse waren somit deutlich geringer und der longitudinale Zeitraum für die Interventionsstudien länger als bei Verwendung von MIA PaCa-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen. Die Auswertung der BLI-

Daten zeigte die signifikante Verminderung des Wachstums von TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Tumoren *in vivo* durch retroviralen Transfer des Tumorsuppressorgens *p53*, während *p16<sup>Ink4a</sup>* und *p19<sup>ARF</sup>* die Progression der Tumoren nicht beeinflussten. Auch die sequenzspezifische Herabregulation der Expression von *EGF-R* durch Transfer von shRNAs nach dem RNAi-Prinzip konnte das weitere Wachstum der Tumoren *in vivo* verringern, wohingegen der RNAi-vermittelte Knockdown von *c-myc* keine Reduktion der Tumorprogression bewirkte. Der therapeutische Effekt einer Reexpression von *p53* war stärker ausgeprägt als die wachstumshemmende Potenz der Blockade des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors *EGF-R*.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das Wachstum orthotop implantierter TD-2<sup>EGFP/fluc-TVA</sup>-Zellen durch RCAS-TVA-basierten Transfer von *p53* bzw. spezifischen Knockdown von *EGF-R* im Vergleich zu kontroll-infizierten Mäusen signifikant vermindert wird. Die retrovirale Infektion TVA-exprimierender Pankreaskarzinomzellen mit dem RCAS-TVA-System kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für Interventionsstudien an einem murinen Transplantationsmodell des Pankreaskarzinoms erfolgreich eingesetzt werden. Das RCAS-TVA-System erlaubt einerseits die ektopische Expression genetischer Information in Zielzellen, auf der anderen Seite auch eine spezifische Herabregulation der Expression von Genen nach dem Prinzip der RNA-Interferenz. In Kombination mit der hochsensitiven Methode der Biolumineszenzbildgebung steht damit ein hilfreiches und akkurates Tiermodell zur präklinischen Evaluation neuer Targets auf genetischer Ebene zur Verfügung, um die Behandlung des hochmalignen Pankreaskarzinoms zu erweitern und zu verbessern.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, and Jarvinen HJ.** Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 64: 430-433, 1995.
2. **Adhikary S and Eilers M.** Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 635-645, 2005.
3. **Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, and Perucho M.** Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53: 549-554, 1988.
4. **Amati B, Alevizopoulos K, and Vlach J.** Myc and the cell cycle. *Front Biosci* 3: d250-268, 1998.
5. **Arteaga CL.** ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res* 284: 122-130, 2003.
6. **Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** Analysis of Proteins. In: "Current protocols in molecular biology", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995
7. **Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng KH, Lopez LV, Hezel AF, Feng B, Brennan C, Weissleder R, Mahmood U, Hanahan D, Redston MS, Chin L, and Depinho RA.** Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5947-5952, 2006.
8. **Bareschino MA, Schettino C, Troiani T, Martinelli E, Morgillo F, and Ciardiello F.** Erlotinib in cancer treatment. *Ann Oncol* 18 Suppl 6: vi35-41, 2007.
9. **Bates P, Young JA, and Varmus HE.** A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor. *Cell* 74: 1043-1051, 1993.
10. **Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, and Hannon GJ.** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366, 2001.
11. **Birnboim HC and Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523, 1979.
12. **Bloch W.** A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry* 30: 2735-2747, 1991.
13. **Böcker W, Denk H, Heitz PhD.** Pathologie. 2004. Urban & Fischer Verlag. S 815-817
14. **Brummelkamp TR, Bernards R, and Agami R.** A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553, 2002.
15. **Buchholz M, Schatz A, Wagner M, Michl P, Linhart T, Adler G, Gress TM, and Ellenrieder V.** Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca<sup>2+</sup>/calcineurin signaling pathway. *Embo J* 25: 3714-3724, 2006.
16. **Burnette WN.** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203, 1981.
17. **Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, and Von Hoff DD.** Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 15: 2403-2413, 1997.
18. **Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, and Kern SE.** Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8: 27-32, 1994.

19. **Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, and Der CJ.** Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17: 1395-1413, 1998.
20. **Choy G, O'Connor S, Diehn FE, Costouros N, Alexander HR, Choyke P, and Libutti SK.** Comparison of noninvasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging. *Biotechniques* 35: 1022-1026, 1028-1030, 2003.
21. **Christophorou MA, Ringshausen I, Finch AJ, Swigart LB, and Evan GI.** The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* 443: 214-217, 2006.
22. **Colombel M, Filleur S, Fournier P, Merle C, Guglielmi J, Courtin A, Degeorges A, Serre CM, Bouvier R, Clezardin P, and Cabon F.** Androgens repress the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in normal and neoplastic prostate. *Cancer Res* 65: 300-308, 2005.
23. **Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, and Hoang-Vu C.** Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 22: 3806-3812, 2003.
24. **Dang CV.** c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 19: 1-11, 1999.
25. **Du Z and Li Y.** RCAS-TVA in the mammary gland: an in vivo oncogene screen and a high fidelity model for breast transformation? *Cell Cycle* 6: 823-826, 2007.
26. **Du Z, Podsypanina K, Huang S, McGrath A, Toneff MJ, Bogoslovskaja E, Zhang X, Moraes RC, Fluck M, Allred DC, Lewis MT, Varmus HE, and Li Y.** Introduction of oncogenes into mammary glands in vivo with an avian retroviral vector initiates and promotes carcinogenesis in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17396-17401, 2006.
27. **Durkin AJ, Osborne DA, Yeatman TJ, Rosemurgy AS, Armstrong C, and Zervos EE.** EGF receptor antagonism improves survival in a murine model of pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Res* 135: 195-201, 2006.
28. **Edinger M, Cao YA, Hornig YS, Jenkins DE, Verneris MR, Bachmann MH, Negrin RS, and Contag CH.** Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer* 38: 2128-2136, 2002.
29. **Efeyan A and Serrano M.** p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 6: 1006-1010, 2007.
30. **Eger EI, 2nd.** Isoflurane: a review. *Anesthesiology* 55: 559-576, 1981.
31. **El Hilali N, Rubio N, Martinez-Villacampa M, and Blanco J.** Combined noninvasive imaging and luminometric quantification of luciferase-labeled human prostate tumors and metastases. *Lab Invest* 82: 1563-1571, 2002.
32. **Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, and Tuschl T.** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498, 2001.
33. **Elbashir SM, Lendeckel W, and Tuschl T.** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15: 188-200, 2001.
34. **Federspiel MJ, Bates P, Young JA, Varmus HE, and Hughes SH.** A system for tissue-specific gene targeting: transgenic mice susceptible to subgroup A avian leukosis virus-based retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11241-11245, 1994.
35. **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, and Mello CC.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811, 1998.
36. **Fisher GH, Orsulic S, Holland E, Hively WP, Li Y, Lewis BC, Williams BO, and Varmus HE.** *Development of a flexible and specific gene delivery system for production of murine tumor models*, 1999.
37. **Frese KK and Tuveson DA.** Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer* 7: 645-658, 2007.



38. **Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, Natale RB, Schiller JH, Von Pawel J, Pluzanska A, Gatzemeier U, Grous J, Ochs JS, Averbuch SD, Wolf MK, Rennie P, Fandi A, and Johnson DH.** Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol* 22: 777-784, 2004.
39. **Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, Cruz-Correa M, and Offerhaus JA.** Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 119: 1447-1453, 2000.
40. **Ginder M.** Erprobung eines Inhalationskreissystems mit vorgeschaltetem bzw. integriertem Verdampfer für Isofluran unter Minimal-Flow-Bedingungen bei der Ratte. S.6-44
41. **Greten FR, Weber CK, Greten TF, Schneider G, Wagner M, Adler G, and Schmid RM.** Stat3 and NF-kappaB activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology* 123: 2052-2063, 2002.
42. **Hadaschik BA, Black PC, Sea JC, Metwalli AR, Fazli L, Dinney CP, Gleave ME, and So AI.** A validated mouse model for orthotopic bladder cancer using transurethral tumour inoculation and bioluminescence imaging. *BJU Int* 100: 1377-1384, 2007.
43. **Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, and Kern SE.** DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350-353, 1996.
44. **Hamilton AJ and Baulcombe DC.** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952, 1999.
45. **Hammond SM, Bernstein E, Beach D, and Hannon GJ.** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296, 2000.
46. **Harari PM, Allen GW, and Bonner JA.** Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol* 25: 4057-4065, 2007.
47. **Harpavat S and Cepko CL.** RCAS-RNAi: a loss-of-function method for the developing chick retina. *BMC Dev Biol* 6: 2, 2006.
48. **Hayon IL and Haupt Y.** p53: an internal investigation. *Cell Cycle* 1: 111-116, 2002.
49. **Henke J, Müller D.** Die vollständig antagonisierbare Anästhesie bei Kleinsäugetern (Nager, Meerschweinchen, Kaninchen). Enke Verlag Stuttgart, 2002: S. 193-218
50. **Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Oliff I, Reeves JA, Wolf MK, Krebs AD, Averbuch SD, Ochs JS, Grous J, Fandi A, and Johnson DH.** Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* 22: 785-794, 2004.
51. **Herrmann R, Bodoky G, Ruhstaller T, Glimelius B, Bajetta E, Schuller J, Saletti P, Bauer J, Figer A, Pestalozzi B, Kohne CH, Mingrone W, Stemmer SM, Tamas K, Kornek GV, Koeberle D, Cina S, Bernhard J, Dietrich D, and Scheithauer W.** Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 25: 2212-2217, 2007.
52. **Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, and Depinho RA.** Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20: 1218-1249, 2006.
53. **Hillen W and Berens C.** Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48: 345-369, 1994.
54. **Himly M, Foster DN, Bottoli I, Iacovoni JS, and Vogt PK.** The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology* 248: 295-304, 1998.
55. **Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, and Tuveson DA.** Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7: 469-483, 2005.

56. **Hoffman RM.** Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs* 17: 343-359, 1999.
57. **Holland EC, Hively WP, DePinho RA, and Varmus HE.** A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes Dev* 12: 3675-3685, 1998.
58. **Holland EC and Varmus HE.** Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 1218-1223, 1998.
59. **Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J, and Offerhaus GJ.** Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 25: 579-586, 2001.
60. **Hruban RH, Goggins M, Parsons J, and Kern SE.** Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 6: 2969-2972, 2000.
61. **Hruban RH, Wilentz RE, and Kern SE.** Genetic progression in the pancreatic ducts. *Am J Pathol* 156: 1821-1825, 2000.
62. **Hughes S and Kosik E.** Mutagenesis of the region between env and src of the SR-A strain of Rous sarcoma virus for the purpose of constructing helper-independent vectors. *Virology* 136: 89-99, 1984.
63. **Hughes SH.** The RCAS vector system. *Folia Biol (Praha)* 50: 107-119, 2004.
64. **Hughes SH, Greenhouse JJ, Petropoulos CJ, and Suttrave P.** Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *J Virol* 61: 3004-3012, 1987.
65. **Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, and Thun MJ.** Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57: 43-66, 2007.
66. **Katz RA, Greger JG, Darby K, Boimel P, Rall GF, and Skalka AM.** Transduction of interphase cells by avian sarcoma virus. *J Virol* 76: 5422-5434, 2002.
67. **Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, and Plasterk RH.** Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15: 2654-2659, 2001.
68. **Killion JJ, Radinsky R, and Fidler IJ.** Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 17: 279-284, 1998.
69. **Klerk CP, Overmeer RM, Niers TM, Versteeg HH, Richel DJ, Buckle T, Van Noorden CJ, and van Tellinghen O.** Validity of bioluminescence measurements for noninvasive in vivo imaging of tumor load in small animals. *Biotechniques* 43: 7-13, 30, 2007.
70. **Klimstra DS and Longnecker DS.** K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *Am J Pathol* 145: 1547-1550, 1994.
71. **Korc M, Chandrasekar B, Yamanaka Y, Friess H, Buchier M, and Beger HG.** Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest* 90: 1352-1360, 1992.
72. **Landy A.** Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58: 913-949, 1989.
73. **Lane DP.** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.
74. **Lemoine NR, Hughes CM, Barton CM, Poulson R, Jeffery RE, Kloppel G, Hall PA, and Gullick WJ.** The epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer. *J Pathol* 166: 7-12, 1992.
75. **Lewis BC, Klimstra DS, Succi ND, Xu S, Koutcher JA, and Varmus HE.** The absence of p53 promotes metastasis in a novel somatic mouse model for hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Biol* 25: 1228-1237, 2005.
76. **Lewis BC, Klimstra DS, and Varmus HE.** The c-myc and PyMT oncogenes induce different tumor types in a somatic mouse model for pancreatic cancer. *Genes Dev* 17: 3127-3138, 2003.

77. **Li D, Xie K, Wolff R, and Abbruzzese JL.** Pancreatic cancer. *Lancet* 363: 1049-1057, 2004.
78. **Li YJ, Wei ZM, Meng YX, and Ji XR.** Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 11: 2117-2123, 2005.
79. **Lowenfels AB and Maisonneuve P.** Epidemiologic and etiologic factors of pancreatic cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 16: 1-16, 2002.
80. **Lyons SK.** Advances in imaging mouse tumour models in vivo. *J Pathol* 205: 194-205, 2005.
81. **Malumbres M and Barbacid M.** RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3: 459-465, 2003.
82. **Mayr U, von Werder A, Seidler B, Reindl W, Bajbouj M, Schmid RM, Schneider G, and Saur D.** RCAS-mediated retroviral gene delivery: a versatile tool for the study of gene function in a mouse model of pancreatic cancer. *Hum Gene Ther* 19: 896-906, 2008.
83. **McManus MT and Sharp PA.** Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* 3: 737-747, 2002.
84. **Mendelsohn J and Baselga J.** Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 21: 2787-2799, 2003.
85. **Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, and Parulekar W.** Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25: 1960-1966, 2007.
86. **Murphy GJ and Leavitt AD.** A model for studying megakaryocyte development and biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3065-3070, 1999.
87. **Ntziachristos V, Bremer C, and Weissleder R.** Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging. *Eur Radiol* 13: 195-208, 2003.
88. **Nykanen A, Haley B, and Zamore PD.** ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309-321, 2001.
89. **Orsulic S.** An RCAS-TVA-based approach to designer mouse models. *Mamm Genome* 13: 543-547, 2002.
90. **Orsulic S, Li Y, Soslow RA, Vitale-Cross LA, Gutkind JS, and Varmus HE.** Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system. *Cancer Cell* 1: 53-62, 2002.
91. **Parkin DM, Bray FI, and Devesa SS.** Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 37 Suppl 8: S4-66, 2001.
92. **Paroo Z, Bollinger RA, Braasch DA, Richer E, Corey DR, Antich PP, and Mason RP.** Validating bioluminescence imaging as a high-throughput, quantitative modality for assessing tumor burden. *Mol Imaging* 3: 117-124, 2004.
93. **Paul CP, Good PD, Winer I, and Engelke DR.** Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 20: 505-508, 2002.
94. **Paule MR and White RJ.** Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* 28: 1283-1298, 2000.
95. **Petersen GM, de Andrade M, Goggins M, Hruban RH, Bondy M, Korczak JF, Gallinger S, Lynch HT, Syngal S, Rabe KG, Seminara D, and Klein AP.** Pancreatic cancer genetic epidemiology consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 704-710, 2006.
96. **Pinto VB, Prasad S, Yewdell J, Bennink J, and Hughes SH.** Restricting expression prolongs expression of foreign genes introduced into animals by retroviruses. *J Virol* 74: 10202-10206, 2000.

97. **Pisters PW, Wolff RA, Crane CH, and Evans DB.** Combined-modality treatment for operable pancreatic adenocarcinoma. *Oncology (Williston Park)* 19: 393-404, 409; discussion 409-310, 412-396, 2005.
98. **Porstmann T, Ternynck T, and Avrameas S.** Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* 82: 169-179, 1985.
99. **Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, and Ross BD.** Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia* 2: 491-495, 2000.
100. **Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, and Singal R.** EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control* 14: 295-304, 2007.
101. **Rosewicz S and Wiedenmann B.** Pancreatic carcinoma. *Lancet* 349: 485-489, 1997.
102. **Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, and Kern SE.** Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57: 1731-1734, 1997.
103. **Ruggeri B, Zhang SY, Caamano J, DiRado M, Flynn SD, and Klein-Szanto AJ.** Human pancreatic carcinomas and cell lines reveal frequent and multiple alterations in the p53 and Rb-1 tumor-suppressor genes. *Oncogene* 7: 1503-1511, 1992.
104. **Saif MW.** Pancreatic cancer: is this bleak landscape finally changing? Highlights from the '43rd ASCO Annual Meeting'. Chicago, IL, USA. June 1-5, 2007. *Jop* 8: 365-373, 2007.
105. **Saif MW, Karapanagiotou L, and Syrigos K.** Genetic alterations in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 13: 4423-4430, 2007.
106. **Sandgren EP, Luetke NC, Palmiter RD, Brinster RL, and Lee DC.** Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* 61: 1121-1135, 1990.
107. **Saur D, Paehge H, Schusdziarra V, and Allescher HD.** Distinct expression of splice variants of neuronal nitric oxide synthase in the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 118: 849-858, 2000.
108. **Saur D, Seidler B, Schneider G, Algul H, Beck R, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, and Schmid RM.** CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 129: 1237-1250, 2005.
109. **Schaefer-Klein J, Givol I, Barsov EV, Whitcomb JM, VanBrocklin M, Foster DN, Federspiel MJ, and Hughes SH.** The EV-O-derived cell line DF-1 supports the efficient replication of avian leukosis-sarcoma viruses and vectors. *Virology* 248: 305-311, 1998.
110. **Schneider G and Schmid RM.** Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2: 15, 2003.
111. **Schneider G, Siveke JT, Eckel F, and Schmid RM.** Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 128: 1606-1625, 2005.
112. **Schreiner B, Baur DM, Fingerle AA, Zechner U, Greten FR, Adler G, Sipos B, Kloppel G, Hameister H, and Schmid RM.** Pattern of secondary genomic changes in pancreatic tumors of Tgf alpha/Trp53+/- transgenic mice. *Genes Chromosomes Cancer* 38: 240-248, 2003.
113. **Schreiner B, Greten FR, Baur DM, Fingerle AA, Zechner U, Bohm C, Schmid M, Hameister H, and Schmid RM.** Murine pancreatic tumor cell line TD2 bears the characteristic pattern of genetic changes with two independently amplified gene loci. *Oncogene* 22: 6802-6809, 2003.
114. **Seidler B, Schmidt A, Mayr U, Nakhai H, Schmid RM, Schneider G, and Saur D.** A Cre-loxP-based mouse model for conditional somatic gene expression and knockdown in vivo by using avian retroviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10137-10142, 2008.

115. **Sener SF, Fremgen A, Menck HR, and Winchester DP.** Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* 189: 1-7, 1999.
116. **Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, and Seymour L.** Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 353: 123-132, 2005.
117. **Sherr CJ.** Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677, 1996.
118. **Sherr CJ.** The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 731-737, 2001.
119. **Sherr CJ.** Principles of tumor suppression. *Cell* 116: 235-246, 2004.
120. **Talar-Wojnarowska R and Malecka-Panas E.** Molecular pathogenesis of pancreatic adenocarcinoma: potential clinical implications. *Med Sci Monit* 12: RA186-193, 2006.
121. **ten Dijke P and Hill CS.** New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 29: 265-273, 2004.
122. **Toledo F and Wahl GM.** Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6: 909-923, 2006.
123. **Towbin H, Staehelin T, and Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354, 1979.
124. **Truty MJ and Urrutia R.** Basics of TGF-beta and pancreatic cancer. *Pancreatology* 7: 423-435, 2007.
125. **Tzeng CW, Frolov A, Frolova N, Jhala NC, Howard JH, Vickers SM, Buchsbaum DJ, Heslin MJ, and Arnoletti JP.** EGFR genomic gain and aberrant pathway signaling in pancreatic cancer patients. *J Surg Res* 143: 20-26, 2007.
126. **Venkitaraman AR.** Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108: 171-182, 2002.
127. **Verslype C, Van Cutsem E, Dicato M, Cascinu S, Cunningham D, Diaz-Rubio E, Glimelius B, Haller D, Haustermans K, Heinemann V, Hoff P, Johnston PG, Kerr D, Labianca R, Louvet C, Minsky B, Moore M, Nordlinger B, Pedrazzoli S, Roth A, Rothenberg M, Rougier P, Schmoll HJ, Tabernero J, Tempero M, van de Velde C, Van Laethem JL, and Zalcborg J.** The management of pancreatic cancer. Current expert opinion and recommendations derived from the 8th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2006. *Ann Oncol* 18 Suppl 7: vii1-vii10, 2007.
128. **Vooijs M, Jonkers J, Lyons S, and Berns A.** Noninvasive imaging of spontaneous retinoblastoma pathway-dependent tumors in mice. *Cancer Res* 62: 1862-1867, 2002.
129. **Voudsen KH, Lane DP.** p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 275-283, 2007.
130. **Wagner M, Greten FR, Weber CK, Koschnick S, Mattfeldt T, Deppert W, Kern H, Adler G, and Schmid RM.** A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease. *Genes Dev* 15: 286-293, 2001.
131. **Wagner M, Luhrs H, Kloppel G, Adler G, and Schmid RM.** Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor transgenic mice. *Gastroenterology* 115: 1254-1262, 1998.
132. **Weissleder R and Ntziachristos V.** Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* 9: 123-128, 2003.
133. **Wixson SK.** Rabbits and Rodents: Anesthesia and Analgesia. In: Smith AC, Swindle MM. Research animal anesthesia, analgesia and surgery. S. 59-92. Scientists Center for Animal Welfare Greenbelt, Maryland, 1994.
134. **Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A, Schmidt W, Wolff RA, Deutsch J, Needle M, and Abbruzzese JL.** Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial. *J Clin Oncol* 22: 2610-2616, 2004.

- 
135. **Yang D, Lu H, and Erickson JW.** Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* 10: 1191-1200, 2000.
  136. **Yarden Y and Sliwkowski MX.** Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137, 2001.
  137. **Yokoi K, Sasaki T, Bucana CD, Fan D, Baker CH, Kitadai Y, Kuwai T, Abbruzzese JL, and Fidler IJ.** Simultaneous inhibition of EGFR, VEGFR, and platelet-derived growth factor receptor signaling combined with gemcitabine produces therapy of human pancreatic carcinoma and prolongs survival in an orthotopic nude mouse model. *Cancer Res* 65: 10371-10380, 2005.
  138. **Young JA, Bates P, and Varmus HE.** Isolation of a chicken gene that confers susceptibility to infection by subgroup A avian leukosis and sarcoma viruses. *J Virol* 67: 1811-1816, 1993.
  139. **Yunis AA, Arimura GK, and Russin DJ.** Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* 19: 128-135, 1977.
  140. **Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, and Bartel DP.** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33, 2000.
  141. **Zhang M, Zhang X, Bai CX, Song XR, Chen J, Gao L, Hu J, Hong QY, West MJ, and Wei MQ.** Silencing the epidermal growth factor receptor gene with RNAi may be developed as a potential therapy for non small cell lung cancer. *Genet Vaccines Ther* 3: 5, 2005.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AFN	Kombination aus Atipamizol, Flumazenil und Naloxon
ALV	Avian leukosis virus
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BLI	Biolumineszenz-Imaging
BMI	Body mass index
BRCA	Breast cancer
BrdU	5'-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCD	Charged coupled device
CDK	Cycline dependent kinase
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CEF	Chicken embryo fibroblast
CFU	Colony forming units
CKI	Cycline dependent kinase-inhibitor
Co	Kontrolle
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DPC	Deleted in pancreatic cancer
EB	Eluting buffer
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP / GFP	( Enhanced) Green fluorescent protein

EGF-R	Epidermal growth factor receptor
Elisa	Enzyme linked immuno sorbent assay
env	envelope ( Hüllproteine)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAMMM	Familiäres atypisches multiples Melanom- und Muttermal-Syndrom
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FBS	Foetal Bovine Serum
FLI	Fluorescence-Imaging
fluc	„firefly“-Luziferase
5-FU	5`-Fluorouracil
g / mg / µg / ng	Gramm / Milligramm / Mikrogramm / Nanogramm
gag	Gruppenspezifisches Antigen
GTP	Guanosin 5'-Triphosphat
HCl	Salzsäure
HNPCC	Hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom
IRES	Internal ribosome entry site
i.p. / i.v.	intraperitoneal / intravaskulär
KG	Körpergewicht
l / ml / µl	Liter / Milliliter / Mikroliter
LB	Luria-Bertani
LDL-R	Low density lipoprotein receptor
LTR	Long terminal repeat
M / mM / m	molar / millimolar / Mol
cm / mm / µm / nm	Zentimeter / Millimeter / Mikrometer / Nanometer
MCS	Multiple clonig site
MgCl <sub>2</sub>	Magnesium-Chlorid
min	Minute (-n)
MMF	Kombination aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n. l.	nach Implantation
NaCl	Natrium-Chlorid
NP-40	Nonylphenylpolyethylenglycol (nicht ionisches Detergens)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PanIN	Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie



PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PLB	Passive lysis buffer
p.o.	postoperativ
pol	enzymatischer Polymerasekomplex
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTGS	Post transcriptional gene silencing
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RCAS BP	Replication competent ALV LTR with splice acceptor Bryan Polymerase
RISC	RNA-induced silencing complex
RLU	Relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	rounds per minute
RSV	Rous Sarcoma Virus
rtTA	reverse tetracycline transcriptional transactivator
s.c.	subkutan
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde (-n)
shRNA / siRNA	short hairpin RNA / short interfering RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamid
Tet	Tetrazyklin
TGF	transforming growth factor
TRIS	Tris(hydroxy)aminomethan
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem
VAA	vollständig antagonisierbare Injektionsanästhesie
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel
ZPF	Zentrum für Präklinische Forschung

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1	Progressionsmodell des Pankreaskarzinoms (Hruban et al., 2000)	S. 9
Abbildung 2	Zusammenspiel der wichtigsten genetischen Veränderungen beim humanen Pankreaskarzinom am G1 / S-Übergang	S. 10
Abbildung 3	Wichtige Signalkaskaden von EGF-R	S. 12
Abbildung 4	Übersicht über die Funktionen von p53	S. 13
Abbildung 5	Tumorsuppressive Funktion des Ink4a / ARF - Lokus	S. 14
Abbildung 6	FLI mit Analyse des EGFP-Signals	S. 18
Abbildung 7	BLI mit Analyse der „firefly“-Luziferase-Expression <i>in vivo</i>	S. 20
Abbildung 8	Struktur des RCAS-Vektors	S. 21
Abbildung 9	Retrovirale Infektion TVA-exprimierender Säugetierzellen	S. 23
Abbildung 10	Darstellung des RNAi-Mechanismus (Zamore et al., 2000)	S. 25
Abbildung 11	Konstruktion des EGFP/fluc-IRES-tv-a-Expressions- plasmides	S. 26
Abbildung 12	Herstellung doppelsträngiger shRNA (Fa. Invitrogen)	S. 30
Abbildung 13	Vektorkarte pENTR™ / D-TOPO® (Fa. Invitrogen)	S. 32
Abbildung 14	Vektorkarte pENTR™ / H1 / TO® (Fa. Invitrogen)	S. 33
Abbildung 15	orthotope Injektion der Tumorzellen unter Inhalationsnarkose	S. 58
Abbildung 16	Transduktionseffizienz von MIA PaCa-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> - bzw. TD- 2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Zellen nach Infektion mit RCAS lacZ	S. 64
Abbildung 17	Knockdown von <i>EGFP</i> in MIA PaCa-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> - und TD- 2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Zellen nach Infektion mit RCAS shRNA EGFP	S. 66
Abbildung 18	Knockdown von <i>fluc</i> in MIA PaCa-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> - und TD- 2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Zellen nach Infektion mit RCAS shRNA fluc	S. 67
Abbildung 19	Tetrazyklin-regulierte Expression von <i>lacZ</i> bzw. shRNA fluc <i>in vitro</i>	S. 68
Abbildung 20	Korrelation von BLI <i>in vivo</i> mit BLI, FLI und Tumorgewicht <i>ex vivo</i>	S. 71
Abbildung 21	BLI und FLI bei Aszitesbildung	S. 72

Abbildung 22	graphische Darstellung der Korrelation von Biolumineszenz-signal (BLI) <i>in vivo</i> und Tumorgewicht <i>ex vivo</i>	S. 72
Abbildung 23	Tumorprogression orthotop implantierter MIA PaCa-2 <i>in vivo</i>	S. 73
Abbildung 24	Tumorprogression orthotop implantierter TD-2 <i>in vivo</i>	S. 74
Abbildung 25	<i>In vivo</i> -Bildgebung i.p.-injizierter DF-1 RCAS fluc in Nacktmäusen	S. 75
Abbildung 26	<i>In vivo</i> -Infektion von MIA PaCa-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Zellen mit RCAS lacZ	S. 76
Abbildung 27	<i>In vivo</i> -Infektion von TD-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Zellen mit RCAS lacZ	S. 76
Abbildung 28	Herabregulation der <i>fluc</i> -Expression in MIA PaCa-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Zellen durch RNAi nach <i>in vivo</i> -Infektion mit RCAS shRNA fluc	S. 77
Abbildung 29	Knockdown der <i>fluc</i> -Expression in MIA PaCa-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> durch RNAi nach <i>in vivo</i> -Infektion mit RCAS shRNA fluc am 72. Tag n. I.	S. 78
Abbildung 30	BrdU-Proliferationsanalyse nach retroviraler Infektion von MIA PaCa-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Zellen mit RCAS p53, p16 <sup>Ink4a</sup> und p19 <sup>ARF</sup>	S. 80
Abbildung 31	BrdU-Proliferationsanalyse nach retroviraler Infektion von TD-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Zellen mit RCAS p53, p16 <sup>Ink4a</sup> und p19 <sup>ARF</sup> bzw. shRNAs gegen <i>EGF-R</i> und <i>c-myc</i>	S. 80
Abbildung 32	Western-Blot-Analyse retroviral infizierter MIA PaCa-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> - bzw. TD-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Zellen	S. 82
Abbildung 33	<i>In vivo</i> -Infektion von TD-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Tumoren mit RCAS p53 bzw. RCAS lacZ als Kontrolle	S. 84
Abbildung 34	<i>In vivo</i> -Infektion von TD-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Tumoren mit RCAS p16 <sup>Ink4a</sup> bzw. RCAS p19 <sup>ARF</sup> sowie RCAS lacZ als Kontrolle	S. 85
Abbildung 35	<i>In vivo</i> -Infektion von TD-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Tumoren mit RCAS shRNA EGF-R bzw. RCAS shRNA Co als Kontrolle	S. 86
Abbildung 36	<i>In vivo</i> -Infektion von TD-2 <sup>EGFP/fluc-TVA</sup> -Tumoren mit RCAS shRNA c-myc bzw. RCAS shRNA Co als Kontrolle	S. 87

Tabelle 1	Sekundäre genetische Veränderungen der murinen Zelllinie TD-2	S. 17
Tabelle 2	Sequenzen der verwendeten shRNA-Einzelstränge	S. 31
Tabelle 3	PCR-Ansatz Red-Taq-DNA-Polymerase-Reaktionsmix (Fa. Sigma)	S. 37
Tabelle 4	Für die Screening-PCR verwendete Oligonukleotidprimer	S. 37
Tabelle 5	Verwendeter TAE-Puffer	S. 38
Tabelle 6	Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	S. 40
Tabelle 7	Verwendete Restriktionsendonukleasen (Fa. NEB)	S. 41
Tabelle 8	Für die Zellkulturexperimente verwendete Materialien	S. 42
Tabelle 9	Herstellung von Lysispuffer	S. 50
Tabelle 10	Herstellung von Gelen und Puffern für die SDS-PAGE	S. 51
Tabelle 11	Für Western-Blot-Analyse verwendete primäre Antikörper	S. 53
Tabelle 12	Materialien und Substanzen für die Mausnarkose	S. 55
Tabelle 13	Lösungen und Puffer für die $\beta$ -Galactosidase-Färbung von Geweben	S. 62

## 10. Danksagung

Mein Dank gilt allen Menschen, die mir beim Erstellen dieser Arbeit geholfen haben.

In besonderem Maße danke ich:

Herrn Professor Dr. R.M. Schmid für die Arbeitsmöglichkeit und Bereitstellung der technischen Einrichtungen an seinem Lehrstuhl;

Herrn Privatdozent Dr. D. Saur für die Erarbeitung und Überlassung des Dissertationsthemas, für seine exzellente fachliche Betreuung sowie seine zeitintensive Unterstützung bei inhaltlichen und strukturellen Problemen;

Frau Diplom-Biologin B. Seidler für die permanente und freundliche Unterstützung sowie ihre stets kompetente Mitarbeit bei diesem Projekt;

Frau M. Werb, Frau U. Götz und Frau K. Kellnberger für ihre überaus wertvolle und tatkräftige Unterstützung, welche mir bei der Bearbeitung des Themas entscheidend geholfen hat;

Herrn Privatdozent Dr. G. Schneider für seine Bereitschaft zur hilfreichen fachlichen Diskussion;

den Mitarbeitern der II. Medizinischen Klinik für die gute und kollegiale Zusammenarbeit, für das stets angenehme Arbeitsklima sowie für ihre anregenden fachlichen Diskussionen;

den Mitarbeitern der ZPF-Abteilung für die fachgerechte Haltung und Versorgung der Versuchstiere;

meinen Eltern, meiner Schwester Dr. M. Mayr sowie meiner Partnerin S. Geirhos, die mir - wie immer - mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben und damit diese zeitintensive Dissertationsarbeit mit ermöglicht haben.

## 11. Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>	Name: Ulrich Georg Mayr Geburtsdatum: 22.02.1979 Geburtsort: Augsburg Staatsangehörigkeit: deutsch
<b>Schulbildung</b>	1985-1989 Grundschule Mering 1989-1998 Wernher-von-Braun-Gymnasium Friedberg
<b>Hochschulstudium</b>	2000-2003 Medizinstudium an der HU Berlin Universitätsklinikum Charité 2003-2007 Medizinstudium an der TU München Universitätsklinikum Rechts der Isar Mai 2007 Erfolgreicher Abschluss des Studiums an der TU München
<b>Examina</b>	Aug. 2002 Ärztliche Vorprüfung August 2002 Aug. 2003 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung März 2006 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung April 2007 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
<b>Famulaturen</b>	März 2003 Kreiskrankenhaus Mering, chir. Station März 2004 Klinikum Rechts der Isar, II. Med. Klinik Aug. 2005 Klinikum Rechts der Isar, II. Med. Klinik Sept. 2005 Klinikum Rechts der Isar, Radiologie
<b>Wissenschaftliche Tätigkeit</b>	seit Aug. 2004 Promotion im Gastrolabor der II. Med. Klinik des Klinikums Rechts der Isar, unter Leitung von Prof. Dr. R.M. Schmid und Betreuung von PD. Dr. D. Saur
<b>Klinische Tätigkeit</b>	seit März 2008 Assistenzarzt an der II. Med. Klinik des Klinikums rechts der Isar, Innere Medizin