

# **Therapeutische Wirkung CD95-L- und TNF- $\alpha$ - blockierender Substanzen auf das Wachstum von Primär- und Rezidivtumoren des Pankreaskarzinoms im SCID Maus-Xenotransplantationsmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Olena Seipp**

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Gerhard Schultheiss  
und  
Institut für Experimentelle Tumorforschung  
Sektion für Molekulare Onkologie  
Medizinische Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel  
Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff

**Therapeutische Wirkung CD95-L- und TNF- $\alpha$ - blockierender  
Substanzen auf das Wachstum von Primär- und  
Rezidivtumoren des Pankreaskarzinoms  
im SCID Maus-Xenotransplantationsmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Olena Seipp**  
geb. Korniienko

Tierärztin aus Kiew, Ukraine

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Schultheiß

Prof. Dr. Kalthoff

Prüfer: Prof. Dr. Kressin

Tag der Disputation: 8. Juli 2016

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
1.1. Das Pankreaskarzinom in der Humanmedizin	10
1.1.1. Epidemiologie	10
1.1.2. Diagnose und Therapie	11
1.1.3. Prognose	12
1.2. Das Pankreaskarzinom in der Veterinärmedizin	12
1.2.1. Definition und Symptomatik	12
1.2.2. Diagnose und Therapie	13
1.3. Die Rolle von CD95/CD95L und TNF- $\alpha$ Systemen beim Pankreaskarzinom	13
1.4. Tiermodelle in der Onkologie	18
1.4.1. Mutationsmodelle in der Pankreastumorforschung	20
1.4.2. Transplantationsmausmodelle in der Tumorforschung	26
1.4.2.1. Experimentelles Pankreaskarzinom im murinen orthotopen Xenotransplantationsmodell	27
1.4.2.2. Versuchstiere für das murine orthotope Xenotransplantationsmodell	28
1.4.2.3. Monitoring der Tumore	29
1.5. Ziele der Arbeit	32
2. Material und Methoden	33
2.1. Material	33
2.1.1. Material für <i>in vitro</i> -Versuche	33
2.1.2. Material für <i>in vivo</i> -Versuche	35
2.1.3. Verwendete Zelllinien	36
2.1.4. Material für Histologie	38
2.2. Tierversuche	40
2.2.1. Tiere	40
2.2.2. Tierhaltung	40
2.2.3. Vorbereitung der Zellinjektion	41
2.2.4. Anästhesie	41
2.2.5. Orthotopes Xenotransplantationsmodell und Pankreatektomie	

## Inhaltsverzeichnis

des Pankreaskarzinoms (Resektionsmodell) .....	42
2.2.6. Postoperative Phase .....	43
2.2.7. Sektion, Organentnahme .....	43
2.3. Bildgebende Verfahren .....	44
2.3.1. Lumineszenzmessung der Zellen in situ mittels optischer Kammer .....	44
2.3.2. Kleintierultraschall .....	47
2.4. Histologie .....	48
2.4.1. Gewebeaufarbeitung .....	48
2.4.2. Hämalaun-Eosin-Färbung .....	49
2.4.3. Immunhistologische Färbungen .....	50
2.4.4. Bearbeitung des zytologischen Materials .....	53
2.4.5. Mikroskopische Auswertung .....	53
2.5. Zellkulturbedingungen bei der Kultivierung der Pankreaskarzinomzelllinien .....	54
2.5.1. Kryokonservierung von Zellen .....	54
2.5.2. Bestimmung der Zellzahl .....	55
2.5.3. Zellwachstumsuntersuchung .....	55
2.6. Zellbiologische Testverfahren .....	56
2.6.1. Durchflusszytometrie (FACS) .....	56
2.6.2. ELISA Human CD95L .....	57
2.6.3. Zellvitalitätsassay (EZ4U) .....	57
2.6.4. Vitalitätsassay (Kristallviolettassay) .....	58
2.6.5. Tumorzellinvasionsassay .....	59
2.7. Statistische Analyse .....	60
3. Ergebnisse .....	62
3.1. Therapieverfahren und Behandlung der Tiere .....	65
3.2. Tierversuchsplanung .....	64
3.3. <i>In vivo</i> -Untersuchungen der palliativen Therapie .....	71
3.3.1. Lumineszenzmessung .....	71
3.3.2. Sonographie .....	74
3.3.3. Heterogenität des Tumorwachstums bei palliativem Therapieansatz .....	77

## Inhaltsverzeichnis

3.4. Adjuvante Therapie mit subtotaler Pankreatektomie und Resektion des Pankreaskarzinoms (Resektionsmodell) ... ..	79
3.4.1. Lumineszenzmessung bei adjuvanter Therapie ... ..	80
3.4.2. Sonographie bei adjuvanter Therapie ... ..	81
3.4.3. Heterogenität des Rezidivwachstum bei adjuvanter Therapie ...	86
3.4.4. Auswertung der Metastasierung ... ..	88
3.5. Palliativer Therapieansatz bei orthotoper Inokulation der PancTu1 <i>Luc</i> , PancTu1- und Panc1- Zelllinien ... ..	90
3.5.1. Heterogenität des Tumorwachstums und die Auswertung der Metastasierung ... ..	90
3.6. Immunhistologische Färbungen ... ..	98
3.7. Medikamentöse Wirkung von den palliativen und adjuvanten Therapieansätzen ... ..	101
3.8. Korrelationen der manuellen Messungen mit bildgebenden Verfahren ... ..	110
3.9. Ergebnisse <i>in-vitro</i> ... ..	112
3.9.1. Einfluss von Matrigel auf die Tumorzellen ... ..	112
3.9.2. Lumineszenzintensität in Abhängigkeit von Zellkonzentrationen ... ..	113
3.9.3. FACS Untersuchungen zur Detektion von CD95 und CD95L ...	114
3.9.4. ELISA (Human CD95L) ... ..	115
3.9.5. Vitalitätsassay (Kristallviolett-Assay) ... ..	117
3.9.6. Zellwachstumsuntersuchung ... ..	120
3.9.7. Zellvitalitätsassay (EZ4U) ... ..	121
3.9.8. Tumorzellinvasionsassay ... ..	122
3.9.9. Bearbeitung des zytologischen Materials ... ..	124
4. Diskussion ... ..	126
4.1. Bildgebende Verfahren für das experimentelle orthotope Pankreaskarzinomtransplantationsmodell, mögliche Korrelationen mit der manuellen Messung ... ..	125
4.2. Entwicklung des Tumorwachstums und der Metastasenbildung ... ..	130
4.2.1. Palliative und adjuvante präklinische Tumormodelle ... ..	130
4.2.2. Orthotope Inokulation der PancTu1 <i>Luc</i> -, PancTu1- und Panc1- Zelllinien ... ..	132

## Inhaltsverzeichnis

4.3. Medikamentöse Wirkung von CD95L- und TNF- $\alpha$ - blockierenden Substanzen auf das Tumorwachstum in der Behandlungsgruppen ...	134
4.3.1. Therapeutische Wirkung auf das Tumorwachstum in den Behandlungsgruppen ... .. .	134
4.3.2. Vergleich der palliativen und adjuvanten Therapieansätze ... ..	136
4.4. Vergleich der Wirkung von CD95L- und TNF- $\alpha$ - blockierenden Substanzen auf das Wachstum von Pankreaszelllinien in <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> - Versuchen ... .. .	138
Zusammenfassung ... .. .	141
Literaturverzeichnis ... .. .	145
Anhang ... .. .	168
Abbildungsverzeichnis ... .. .	168
Tabellenverzeichnis ... .. .	172
Protokollbeschreibung ... .. .	173
Abbildungen ... .. .	176
Publikation ... .. .	183
Danksagung ... .. .	184
Erklärung ... .. .	186
Lebenslauf ... .. .	187

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Aktivator-Protein 1, Transkriptionsfaktor
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large, mitochondriales Transmembranmolekül
BSA	Bovine Serum Albumin
cts	Counts
CD95L	CD95-Ligand (Fas-Ligand)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DD	Death Domain, Todesdomän
DED	Death Effector Domain
DISC	Death Inducing Signalling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	extrazelluläre regulierte Kinase 1/2
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated Death Domain, intrazelluläres Adaptorprotein
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetales Kälberserum
Fc-Teil	fragment crystallizable
FLIP	FLICE-inhibitory protein
h	Stunde
hv	Lichtquant
i.p.	Intraperitoneal
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
KGW	Körpergewicht

## Abkürzungsverzeichnis

LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode
HRP	horseradish peroxidase
MCP1	monocyte chemoattractant protein-1, Chemokin
Mean Grey	Graustufenwert bezogen auf die Fläche
MMP-2/MMP-9	Matrixmetalloproteinasen (-2/-9)
mTNF- $\alpha$	membranständiges TNF- $\alpha$
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
MWTest	Mann-Whitney-U-Test
NF-kappaB	nuclear factor 'kappa-light-chain- enhancer' of activated B-cells, Transkriptionsfaktor
NK- Zellen	natürliche Killerzellen
OP	Operation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PFA	Paraformaldehyd
Ph	Photon
PKC	Proteinkinase C
POD	Postoperativer Tag
PTEN	phosphatase and tensin homolog, Negativregulator des PI3-K Signalweges
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
s.c.	subcutan
SD	Standardabweichung
SSC	Seitwärtsstreulicht
sTNF	soluble (lösliches) TNF- $\alpha$
Streptavidin-HRP	Streptavidin konjugiert mit Meerrettich- Peroxidase
Sum Grey	Summe Graustufenwert
SCID-bg	Severe Combined Immune Deficiency- beige

## Abkürzungsverzeichnis

TNF-R1	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ Rezeptor 1
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TRADD	tumor necrosis factor [TNF]-receptor associated death domain
TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
FSC	Vorwärtsstreulicht
wb	weiblich
GFP	green fluorescent protein (fluoreszierender Farbstoff)

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Pankreaskarzinom in der Humanmedizin

Das Pankreasadenokarzinom zeichnet sich durch aggressives Wachstum und einen hochmalignen Phänotyp mit früher Metastasierung aus. Pankreastumore haben unterschiedliche Auslöser, die letztlich alle zu einer Störung des Gleichgewichts von Wachstum der Zelle und Zelltod (Apoptose) führen (Lillemoe, K. D. et al., 1995).

Die exokrinen Tumore werden histomorphologisch in drei Pankreaskarzinomtypen unterschieden (Löhr, J. M. et al., 2008):

- I. Pankreasgangepithelkarzinome. Mehr als ca. 85 % aller Pankreastumore wurden als tubuläre Adenokarzinome klassifiziert und entstehen im exokrinen Teil des Organs. Zu diesem Typ gehören auch pleomorphe duktale Karzinome (ca. 5 %) und duktale zystische Adenokarzinome (ca. 1 %) (Lillemoe, K. D. et al., 1995). Davon befinden sich 70 % im Bereich des Pankreaskopfes, 20 % im Pankreaskörper und 10 % im Pankreasschwanz.
- II. Azinäre Karzinome des Pankreas. Die Karzinome entwickeln sich aus dem exokrinen Pankreasazinusepithel bei weniger als 1 % aller Patienten.
- III. Papillärzystische Karzinome, Pankreatoblastome und kleinzellige pleomorphe Karzinome, die ihren Ursprung ebenfalls im exokrinen Teil des Pankreas haben. Die Karzinome haben eine unklare Histogenese und sind sehr selten.

Die Metastasierung der Karzinome des Pankreas erfolgt hauptsächlich portogen in die Leber (66 %), lymphogen in die Lymphknoten (22 %) und Lunge (10 %) (Li, S. et al., 2002, Löhr, J. M. et al., 2008, Siegel, R.L. et al., 2015).

#### 1.1.1. Epidemiologie

Von allen erkrankten Personen in den USA wurde nur bei <5 % eine fünfjährige Überlebensrate nachgewiesen (Schneider, G. et al., 2005; Jemal, A. et al., 2008, Hidalgo, M. 2010; Siegel, R.L. et al., 2015). In Deutschland wurden laut Statistiken des Robert Koch-Instituts (RKI) jährlich etwa 390.000 Krebserkrankungen festgestellt, davon 6 % männliche und 7,3 % weibliche Patienten mit einem

bösartigen Tumor des Pankreas (Husmann, G. et al., Robert Koch-Institut, 2010). Ohne medizinische Behandlung beträgt die Überlebenszeit beim Pankreaskarzinom ca. 3,5 bis 6 Monate (Li, S. et al., 2002). Nach erfolgreicher Resektion erhöht sich die Lebenserwartung auf 3 Jahre bei ca. 30 % und bei ca. 20 % der Patienten steigt sie auf eine 5-jährige Überlebensrate (Magistrelli, P. et al., 2000; Jemal, A. et al., 2008, Siegel, R.L. et al., 2015).

### **1.1.2. Diagnose und Therapie**

Das Pankreaskarzinom wird typischerweise von chronischer Pankreatitis begleitet. Wenn der Tumor im Pankreaskopf in der Nähe des Gallengangs liegt, kann oft ein obstruktiver, schmerzloser Ikterus auftreten. Befindet sich der Tumor aber im Corpus, klagen die Patienten über starke Oberbauchschmerzen. Die Patienten haben ein reduziertes Allgemeinbefinden, Anorexie und Gewichtsverlust (Li, S. et al., 2002).

Zur Erkennung von Frühformen sind Endosonographie, Röntgen und Computertomographie die wichtigsten Diagnostikformen. Aber sowohl die Labordiagnostik zum Nachweis des Pankreaskarzinoms als auch Tumormarker wie CA19-9 oder DU-PAN2 zur Feststellung dieser Krankheit haben keine ausreichende Sensitivität und Spezifität (Yeo, T. P. et al., 2002). Bei der Gewebegewinnung für histologische Untersuchungen ist die Zytologie in ca. 20 % ungenau. Die molekulargenetischen Untersuchungen des Pankreassekrets ergeben in nur 70-80 % der Fälle einen Karzinomnachweis (Li, S. et al., 2002).

Bei frühzeitiger Erkennung könnte eine operative Therapie erfolgreicher sein als bei späterer Tumorprogression, da sich bei den Patienten schnell Lokalrezidive und Fernmetastasen entwickeln (Yeo, T. P. et al., 2002). Um den Tumor operativ zu entfernen, sind mehrere Methoden etabliert. Bei der Entfernung des Tumors nach Whipple (Kausch-Whipple-Operation) wird z. B. der Pankreaskopf und das Umgebungsgewebe bzw. ein Teil des Dünndarms reseziert. Bei totaler Pankreatektomie wird das gesamte Pankreas, teilweise der Dünndarm, die Gallengänge, die Gallenblase und die regionalen Lymphknoten entfernt. Bei distaler Pankreatektomie spricht man nur über Pankreaskörper- und Pankreasschwanzentfernung (Lillemoe, K. D. et al., 1995). Bei der Magenausgangs-

oder Duodenalstenose wird eine palliative Operation durchgeführt, um die bestehenden Komplikationen und Symptome zu minimieren und möglichst lange die Lebensqualität zu erhalten. Neben der operativen Therapie wird die Strahlentherapie mit hochenergetischen Röntgenstrahlen oder eine präoperative (neoadjuvante), postoperative (adjuvante) und kombinierte prä- und postoperative (erweitert neoadjuvante) Chemotherapie eingesetzt. Eine weitere Möglichkeit zur Behandlung ist eine Kombination der Strahlentherapie und der Chemotherapieansätze (Zytostatika), die sogenannte Radiochemotherapie (Vincent, A. et al., 2011).

### **1.1.3. Prognose**

Insgesamt gesehen ist die Prognose bei der Behandlung des Pankreaskarzinoms heute immer noch nicht erfolgversprechend (Vincent, A. et al., 2011). Ein Grund für die schlechte Prognose ist, dass das Pankreaskarzinom keine spezifischen klinischen Symptome in Frühstadien aufzeigt und somit keine frühzeitige Diagnose möglich ist. Der Tumor ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung häufig metastasiert und die therapeutischen Möglichkeiten sind begrenzt (Yeo, T. P. et al., 2002).

## **1.2. Das Pankreaskarzinom in der Veterinärmedizin**

### **1.2.1. Definition und Symptomatik**

Das Pankreas bei Katzen und Hunden besteht wie beim Menschen aus einem endokrinen und exokrinen funktionellen Teil. Für die selten vorkommenden Tumore des endokrinen Pankreas ist eine unkontrollierte Hormonfreisetzung bei Insulinomen typisch (insulinproduzierende  $\beta$ -Zelltumore). Bei Neubildungen des exokrinen Pankreas sind bösartige Tumore am häufigsten, die aus duktalem (Adenokarzinome) oder azinären Zellen (azinäre Karzinome) des zentralen Teils des Pankreas (Corpus) entstehen (Dahme, E. et al., 2007). Das Pankreaskarzinom verläuft meistens mit der Symptomatik einer Pankreatitis und einer Gallenblasenausführungsgangsobstruktion in Verbindung mit Gewichtsverlust, Anorexie, Erbrechen, Ikterus und Aszites. Das Krankheitsbild erscheint erst im fortgeschrittenen Stadium, wenn sich die Gallengänge bzw. der Drüsengang der Bauchspeicheldrüse verschließen oder bei der Metastasierung. Die am häufigsten von Metastasen betroffenen Organe bei den

Einleitung

mit Pankreaskarzinom erkrankten Hunden sind Leber, Lymphknoten, Zwerchfell, Knochen, Niere und Nebenniere (Kessler, M., 2005).

### **1.2.2. Diagnose und Therapie**

Es erkranken meistens ältere Hunden und Katzen zwischen 5 und 17 Jahren. Pankreaskarzinome sind tierartspezifisch mit Geschlechts- und Rassenprädisposition (Kessler, M., 2005).

In der Veterinärmedizin ist es problematischer eine Diagnose zu stellen als in der Humanmedizin, da die Tiere unspezifische klinische Symptomatik zeigen, so dass oft zunächst entweder die chronische Pankreatitis oder die Obstruktion diagnostiziert ist. Die Laborwerte sind unspezifisch und haben eine große Variationsbreite für eine Diagnosestellung (Nelson, R.W. et al., 2010). Eine operative Therapie hat in der Tiermedizin wie in der Humanmedizin eine geringe Erfolgsrate (Kessler, M., 2005).

### **1.3. Die Rolle von Fas/Fas Ligand (CD95/CD95L) und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) Systemen beim Pankreaskarzinom**

In dieser Arbeit wurde die Hemmung von zwei zelltodvermittelnden Liganden CD95L/FASL und TNF- $\alpha$  untersucht. Im Vordergrund stand dabei die Regulierung der Entstehung des Entzündungsprozesses in der Tumorzelle und eines Wirkmechanismus von Signalkaskaden, welche schließlich zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen. Beide Todesliganden gehören mit ihren Rezeptoren zu der Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie (Locksley, R. M. et al., 2001; Bodmer, J. L. et al., 2002).

**CD95L (CD95 Ligand/FasL)** befindet sich entweder auf der Zellmembran oder wird in löslicher Form durch die Aktivität einer Metalloprotease erzeugt (Kayagaki, N. et al., 1995; Mariani, S. M. et al., 1995; Tanaka, M. et al., 1998). Der membranständige Ligand (mCD95L) ist ein Transmembranprotein mit einer molekularen Masse von 40 kDa (Nagata, S. & Golstein, P., 1995; Tanaka, M. et al., 1995). Die lösliche Form (sCD95L) mit einer molekularen Masse von 26 kDa besteht aus der extrazellulären

## Einleitung

Region des Proteins (Tanaka, M. et al., 1996). CD95L wird auf natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), T-Zellen (Arase, H. et al., 1995; O'Connell J. et al., 1999) und auch in Tumorzellen (Hahne, M. et al., 1996; O'Connell J. et al., 1999; Lee, H. O. & Ferguson, T. A., 2003) exprimiert. CD95L übt seine Wirkung über die Bindung an seinen Rezeptor CD95 aus (s. Abb. 1) (Suda, T. et al., 1993; Takahashi, T. et al., 1994).

**CD95 (APO-1, Fas)** ist ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 36 kDa. Das CD95 ist ein Todesrezeptor der TNF-Superfamilie, welches durch die Bindung von CD95L zu der Entstehung des „death-inducing signaling“ Komplexes (DISC; Adapter-Molekülen und Initiator-Caspasen) führt und die Apoptose-Induktion vermittelt (s. Abb.1) (Wajant, H. 2002; Peter, M. E. et al., 2007).

CD95 hat eine extrazelluläre (157 Aminosäuren), eine transmembrane (17 Aminosäuren) sowie eine zytoplasmatische Domäne (aus 145 Aminosäuren) (Itoh N. et al., 1991). Viele Gewebe können CD95 exprimieren. Die Bindung von CD95L an CD95 (s. Abb.1A) spielt eine proapoptotische Rolle in der Zelle unter bestimmten Bedingungen, kann aber auch in einigen Zelltypen zu Proliferation führen (Trauzold, A. et al., 2001; Barnhart, B. C. et al., 2004; Peter, M. E. et al., 2007).

**Tumor-Nekrose-Faktor (TNF- $\alpha$ )** ist ein 212-Aminosäure - langes Typ II - Transmembranprotein, welches aus drei identischen Polypeptidketten besteht und zur TNF- Superfamilie gehört. Jede Polypeptidkette hat ein Molekulargewicht von 26 kDa (Tang, P. et al., 1996; Balkwill F., 2006).

TNF- $\alpha$  existiert als lösliches (sTNF- $\alpha$ ) und als membranständiges (mTNF- $\alpha$ ) Molekül (Wallach, D. et al., 1999). TNF- $\alpha$  ist ein Zytokin, das von mehreren Zelltypen z. B. T-Zellen, Mastzellen und NK-Zellen, aber hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Monozyten gebildet wird (Higuchi, M. et al., 1990). TNF- $\alpha$  spielt eine entscheidende Rolle als pro-inflammatorischer Faktor bei der Immunantwort. Deshalb können durch TNF-Fehlregulationen Entzündungen wie z. B. Sepsis bei bakterieller Infektion oder Autoimmunerkrankungen, z. B. Multiple Sklerose und rheumatische Arthritis (Firestein, G. S. et al., 1997; Brennan, F. M. et al., 1998) entstehen. Im Jahr 1985 wurde TNF- $\alpha$  auch als biologischer Mediator der Kachexie –

„Cachectin“ beschrieben, welches in einem Tiermodell mit der Trypanosomen-Infektion auftrat (Beutler, B. et al., 1985).

### TNF-R1- und TNF-R2- Rezeptor-Moleküle

TNF- $\alpha$  kann an zwei membranständige Rezeptoren TNF-R1 mit dem Molekulargewicht 55-60 kDa und TNF-R2 mit dem Molekulargewicht 70-80 kDa binden (Brockhaus, M. et al., 1990; Schall, T. J. et al., 1990). Die TNF-Signalisierung entsteht durch die TNF-R1 - Bindung hauptsächlich mit dem mTNF- $\alpha$  aber auch mit sTNF- $\alpha$  (Grell, M. et al., 1995; Wajant, H. et al., 2003).

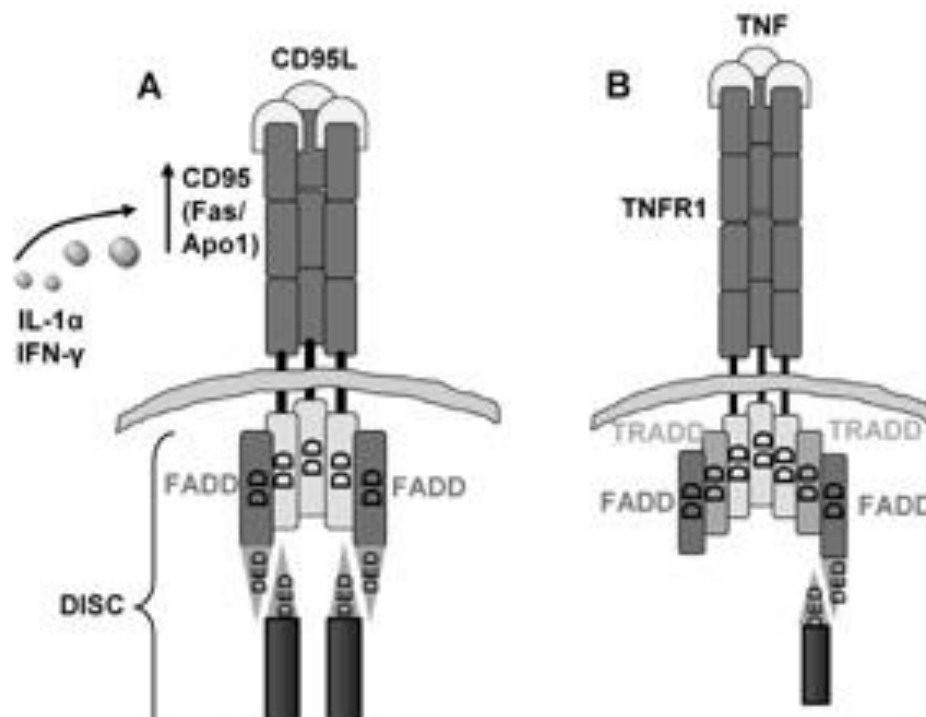


Abb.1: Ligand-Rezeptor-Bindung in Tumorzelle. A.: Ligation von CD95L und CD95. B.: Aktivierung des TNF-R1-TNF- $\alpha$ -Komplexes (Sia,C. et al., 2006)

Apoptose kann entweder über *extrinsische* oder *intrinsische* Signalwege in Tumorzellen ausgelöst werden (s. Abb. 2) (Deng, Y. et al., 2003; Boatright, K. M. & Salvesen, G. S., 2003).

Bei der Aktivierung des *extrinsischen* Signalweges über membranständige Todesrezeptoren (s. Abb. 2A) werden die Caspasen in sogenannten Typ I-Zellen direkt aktiviert. Zu den Typ I-Zellen gehören auch mesenchymale Tumorzellen

## Einleitung

(Algeciras-Schimmich, A. et al., 2003; Scaffidi, C. et al., 1999). Nach der Ligation von CD95L und CD95 wird über die Todesdomäne (DD) das intrazelluläre Adapterprotein FADD (Fas-associated Death Domain) aktiviert (Earnshaw, W. C. et al., 1999). Dies führt zur DISC-Bildung (Peter, M. E. & Krammer, P. H., 2003), bei der große Mengen aktiver Caspase-8, unabhängig von den Mitochondrien, gespalten werden (s. Abb. 2A). Die Menge von Caspase-8 reicht, um die Effektor-Caspasen direkt zu aktivieren (Krammer, P. H., 2000).

Für die Aktivierung des TNF-R1-Komplexes wird noch ein zusätzlicher Schritt mit TRADD (TNF-Rezeptor assoziiertes Protein mit Todesdomäne) benötigt (s. Abb. 1B). Auf die Bindung von TNF- $\alpha$  an TNF-R1 folgt die Molekülbindung von TRADD und FADD. Das Adaptermolekül FADD besteht aus zwei Domänen: der DD und der Death Effektor Domain (DED), an die sich im Folgenden die Pro-Caspase-8 mit ihrer DED anlagert. Pro-Caspase-8 wird aktiviert und bildet aktive Heterotetramer Caspase-8 (Muzio, M. et al., 1998). Das wiederum führt zur Bildung des Apoptose induzierenden Signal-Komplexes DISC und zur Aktivierung der Effektor-Caspasen-3 und -7, die die Apoptose induzieren (Peter, M. E. & P. H. Krammer, 2003).

Der zweite apoptotische Weg ist der *intrinsische* Signalweg, der z.B. durch Virusinfektion oder anderen intrazellulären Stress verursacht wird und den *mitochondrialen* Weg involviert (s. Abb.2B). Die Todesliganden-Systeme, wie z. B. das CD95L- oder TNF- $\alpha$ - System, führen in Typ II-Zellen nur zu einer schwachen Aktivierung des DISC und benutzen den proapoptotischen, mitochondrialen Signalweg zur Verstärkung (Scaffidi, C. et al., 1998). Die Typ II-Zellen haben epithelialen Charakter (Algeciras-Schimmich, A. et al., 2003). In epithelialen Typ II-Zellen entsteht im DISC eine geringe Menge aktiver Caspase-8, die ein Mitochondrienmembran integriertes Bid-Protein spaltet (Li, H. et al., 1998). Als Folge wird die Mitochondrienmembran durchlässig, was zur Cytochrom C Freisetzung führt (Gross, A., J. M. et al., 1999; Luo, X. et al., 1998). Danach folgt die Caspase-9- und -3- Aktivierung, die in der Zelle zur Apoptose führen (Krammer, P. H. 2000). Es ist bekannt, dass die Blockierung der mitochondrialen Aktivität durch Bcl-2 oder Bcl-xL nur bei Typ II-Zellen die Caspaseaktivität verhindert, was dann die Zellen apoptoseresistent macht (Abb. 2B) (Scaffidi, C. et al., 1998).

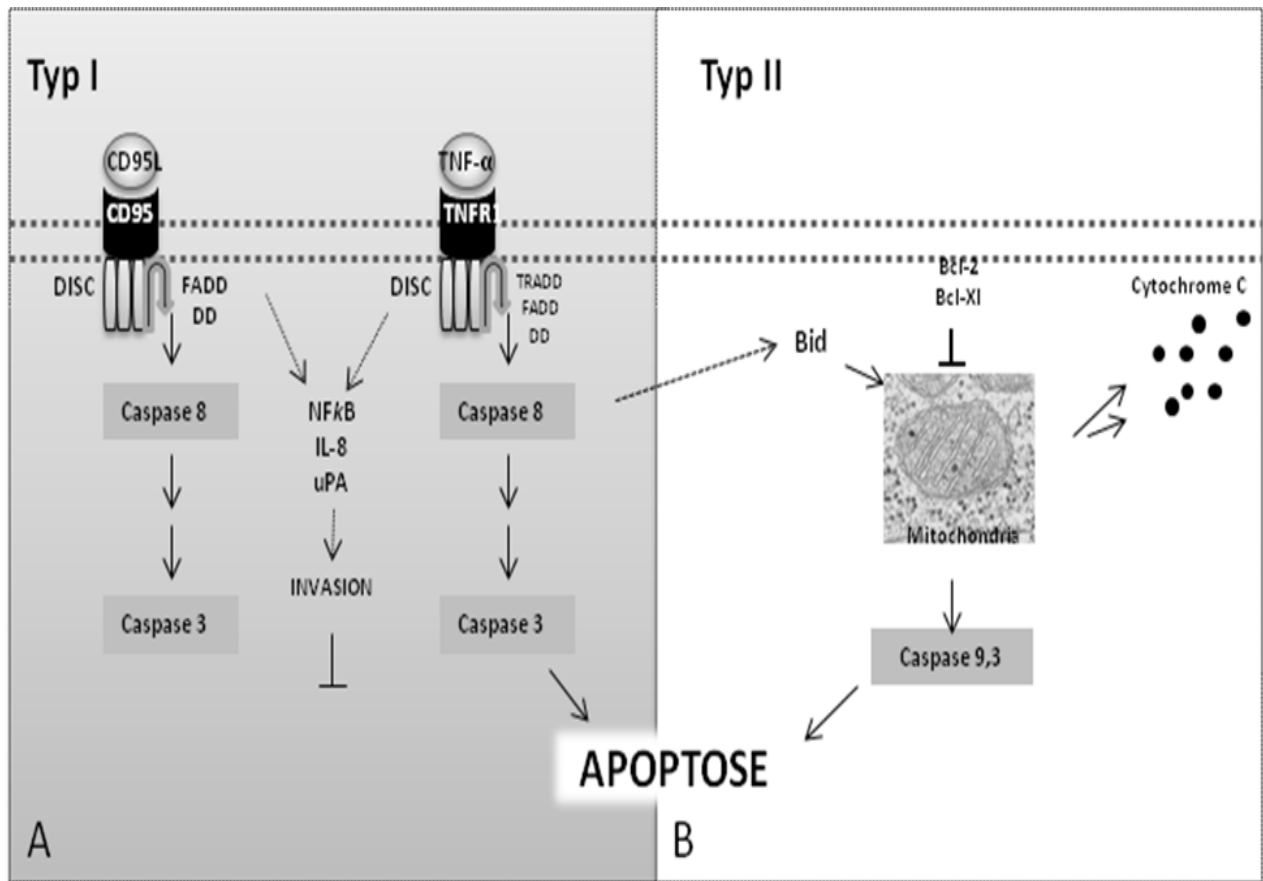


Abb. 2: Modell von zwei verschiedenen Signalwegen: extrinsischer Signalweg in Typ I-Zellen (A); intrinsischer Signalweg in Typ II-Zellen (B) (Moduliert nach Scaffidi, C. et al., 1998; Scaffidi, C. et al., 1999).

Es wurde von mehreren Autoren bereits die therapeutische Wirkung durch eine medikamentöse Hochregulation von CD95L oder TNF- $\alpha$  und deren Rezeptoren *in vitro* beschrieben. Schon in 1996 wurde von Friesen vermutet, dass eine CD95L-Hochregulation die Tumorzellen zur Apoptose bringt (Friesen, C. et al., 1996). Es wurde später festgestellt, dass viele etablierte Zelllinien auf ihrer Zelloberfläche CD95 exprimieren (Ungefroren, H. et al., 1998).

Interessanterweise bleiben trotzdem viele Tumorzellen nach medikamentöser Hochregulation von CD95L oder TNF- $\alpha$  und deren Rezeptoren gegenüber Apoptose resistent (Friesen, C., S. et al., 1999; Ramp, U. et al., 2000; Egberts, J. H. et al. 2008), und eine Reihe von Entzündungsmediatoren und anti-apoptotische Faktoren, wie z. B. die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC), NF-kappaB, uPA, eine TRAF2-Expression und Sekretion von einem inflammatorischen Zytokin IL-8, werden dabei aktiviert (Trauzold, A. et al., 2001). Die Vielzahl von neueren Studien hat gezeigt,

dass die Ligandierung von CD95 in vielen Tumorzellen nicht zum apoptotischen sondern zum inflammatorischen Weg (Aktivierungsweg des NF-kappaB) führt (Matsumoto, R. et al., 2007).

Die Aktivierung des NF-kappaB Transkriptionsfaktors hat eine wichtige Bedeutung bei der Tumorentstehung als anti-apoptotischer, proinflammatorischer Faktor (Rayet, B. & Gelinas, C., 1999), da dessen indirekte Aktivierung die Zellen vor Apoptose schützt (Dudley, E. et al., 1999; Ponton, A. et al., 1996; Ravi, R. et al., 1998) und dadurch das Tumorstadium durch die Expression einer Reihe von proliferativ bzw. anti-apoptotisch wirkender Gene gefördert wird (Lin, A. und Karin, M., 2003). Es wurde bereits gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor NF-kappaB in ca. 67-90% der Pankreaskarzinome aktiviert ist (Muerkoster, S. et al., 2004). Eine erhöhte NF-kappaB Aktivität kann zur Ausprägung einer klinischen Chemoresistenz in Pankreaskarzinomzellen beitragen (Arlt, A. et al., 2001). Auch die Hochregulation von NF-kappaB durch die Behandlung der Tumorzellen mit CD95L- oder TNF- $\alpha$ -Liganden führt zur Invasivität der apoptoseresistenten Tumorzellen (Barnhart, B. C. et al., 2004; Egberts, J. H. et al., 2008). Die Hemmung von NF-kappaB fördert die Sensibilisierung der Zellen und führt damit zu TNF- $\alpha$  vermittelter Apoptose (Barkett, M. & Gilmore, T. D., 1999; Beg, A. A. & Baltimore, D., 1996) und zum besseren Ansprechen von Pankreaskarzinomzellen auf Chemotherapeutika und Bestrahlung (Arlt, A. et al., 2001; Muerkoster, S. et al., 2003).

### **1.4. Tiermodelle in der Onkologie**

Die Voraussetzung für die Entwicklung von erfolgreichen Therapiestrategien ist das Verständnis der molekularen Mechanismen der Tumorentstehung. Für die experimentelle Forschung wurden in neuerer Zeit vielfältige Tiermodelle mit möglichst kliniknahen Eigenschaften erzeugt. Der Erfolg des Tierversuches und die Übertragung der Daten auf den Menschen hängt jedoch von der Wahl des richtigen Tiermodells ab. Schon im Jahr 1983 wurden von Drew die Tiermodelle des Pankreaskarzinom an Mäusen, Hamstern und Ratten beschrieben (Drew, R. T. et al., 1983). Die Tumore des Pankreas wurden bei diesen Modellen mit Hilfe verschiedener Karzinogene oder chirurgischen Manipulationen induziert. Alle diese Modelle weisen jedoch verschiedene Nachteile auf (Hall, P.A. et al., 1993). Das

**Hamstermodell** des Bauchspeicheldrüsenkrebses wurde beim syrischen Hamster (*Mesocricetus auratus*) im Jahr 1974 von der Arbeitsgruppe Parviz Pour beschrieben. Die duktales Adenokarzinome des Pankreas wurden durch subkutane Injektionen von 2,2'-Dihydroxy-di-N-propylnitrosamin (DIPN) erzeugt. Ein großer Nachteil dieses Modells ist jedoch, dass dabei Metastasen in Respirationstrakt, Leber und Niere aufgetreten sind (Pour, P.M. et al., 1981). Egami induzierte durch Nitrosamin ein duktales Pankreasadenokarzinom beim Hamstermodell. Der Mechanismus, über welchen Nitrosamin nach einer kurzen Zeit von ca. 7 Monaten zu einer 90 - 100%igen Induktion duktales Pankreasadenokarzinome im Syrischen Hamster führt (Pour, P. M. et al., 1981), ist weitgehend ungeklärt (Appel, M. J. et al. 1994). Das Hamstermodell des Bauchspeicheldrüsenkrebses hat große Ähnlichkeiten in der Morphologie und im allgemeinen klinischen Krankheitsverlauf (wie Gewichtsverlust, Ikterus, vaskuläre Thrombosen, Diarrhoe und Diabetes mellitus) mit dem humane Bauchspeicheldrüsenkarzinom, jedoch ist der Mangel an erhältlichen Reagenzien ein sehr bedeutender Faktor für die geringe Verwendung des Hamstermodells in der Forschung (Egami, H. et al., 1991).

Das **Rattenmodell** des Bauchspeicheldrüsenkrebses wurde durch intraperitoneale Injektion von Azaserin in Lewis- und Wistar- Ratten erzeugt. Nach Literaturangaben beträgt ein Unterschied zum humanen Pankreaskarzinom: im Rattenmodell wurden ausschließlich azinäre und nicht duktales Adenokarzinome des Pankreas (wie in >90% der Fälle in der humanen Medizin) festgestellt, damit ist dieses Tiermodell für Studien weniger geeignet (Hall, P.A. et al., 1993).

Für die experimentelle Forschung wurden in neuerer Zeit vielfältige **Mausmodelle** mit möglichst kliniknahen Eigenschaften erzeugt. In der Onkologie werden die Versuchstiermodelle in zwei Gruppen eingeteilt (s. Tabelle 1): *Mutationsmodelle* sind transgene (genetischveränderte), induzierte, autochthone (spontane) Modelle (s.1.4.1.) und *Transplantationsmodelle* sind syngene und xenogene Modelle (s.1.4.2.).

Mutationsmodelle				Transplantationsmodelle		
transgene		induzierte		autochthone	syngene (für die allogene Transplantation entwickelt)	xenogene (für die Xenotransplantation entwickelt)
Darstellung der Onkogenüberexpression	Darstellung der Tumorsuppressor-Geninaktivierung	physikalisch	chemisch		(sporadische Tumorentwicklung)	orthotope und heterotope Modelle (unterscheiden sich nach dem Applikationsort)

Tab. 1: Klassifikation der Tiermodelle in der Onkologie

### 1.4.1. Mutationsmodelle in der Pankreastumorforschung

Zu den komplett immunkompetenten Mutationsmodellen zählen die folgenden drei Gruppen: *transgene*, *induzierte* und *autochthone* Modelle (s. Tabelle 1) (Berns, A., 2001).

Die transgenen Mäuse gehören zu den *Mutationsmodellen*. Deren Genom trägt eine gezielte Mutation. Diese Tiere vererben die Mutation stabil an ihre Nachkommen weiter (Schenkel, J., 2006). *Transgene* Tumormodelle zeigen dieselben chromosomalen Veränderungen (s.unten), die auch in humanen Tumoren vorhanden sind. Die Tierversuche konnten deswegen mit dem entsprechenden Modell die Entstehung und das Tumorwachstum des humanen PDAC i.d.R. der Expression eines transgenen Onkogens beim Mensch widerspiegeln (Hann, B. und Balmain, A., 2001). Für die Erzeugung genetisch veränderter Mausmodelle werden mehrere Verfahren verwendet, oft ist ein hoher Zeitaufwand notwendig, um dieses Tiermodell zu etablieren (Killion et al., 1998). Entweder wird ein zusätzliches Gen eingefügt, um die Onkogenüberexpression darzustellen oder aber ein Gen und dessen Funktion soll inaktiviert werden. Zum Beispiel wurde ca. vor 30 Jahren in der Arbeitsgruppe Capecchi mit Hilfe der gezielten Geninaktivierung das Knockout-Mausmodell entwickelt (Capecchi, 1989). Dafür wurden identische DNA-Bereiche zwischen homologen Chromosomen ausgetauscht (homologe Rekombination). Das selektierbare Gen, durch das die zwei DNA-Bereiche des zu inaktivierenden Zielgens getrennt sind, zeigt eine Resistenz gegen Aminoglykosid-Antibiotika. So ist es durch

## Einleitung

Antibiotikagabe möglich, die „defekt-Gen-tragenden“ embryonalen Stammzellen (markierte ES-Zellen) zu selektieren. Diese Zellen werden kultiviert und in Blastozysten der Maus injiziert. Die entwickelten Chimären tragen einen heterozygoten Gendefekt (Mosaik-Maus). Die Nachkommen aus der Kreuzung einer C57BL/6J-Maus und einer Chimäre besitzen beispielsweise entweder eine braune Fellfarbe, wenn sie die genetisch veränderten ES-Zellen tragen, oder sie sind schwarz, wenn sie das Erbgut der Blastozysten tragen. Der gewünschte *knockout*-Mäusenachwuchs entsteht nach der heterozygoten Tierkreuzung. Die Erzeugung des *knockout*-Mausmodells ist in Abbildung 3 dargestellt (Graw, J., 2007). Für die Pankreastumorforschung wurde das *PTEN-knockout* (*PTEN*, Negativregulator des PI3-K Signalweges) erzeugt. Das Mausmodell entwickelt eine fortgeschrittene Produktion von Muzinen und Expression von zwei embryonalen Pankreas-Vorläuferzellen-Marker PDX1 und HES1 in veränderten proliferativen duktalem Strukturen der Azinus-Zellen. Diese Tiere entwickeln duktales Pankreaskarzinome (Stanger, B. Z., et al., 2005).

Derzeit steht für viele Gene im Rahmen des "European Conditional Mouse Mutagenesis Program" die entsprechende *knockout*-Maus zur Verfügung ([www.eucomm.org](http://www.eucomm.org)) (Braun, R. & Willnow, E. 1996). Dies bietet die Möglichkeit die molekularen Mechanismen von Krankheiten und einen medikamentösen Effekt zu erforschen.

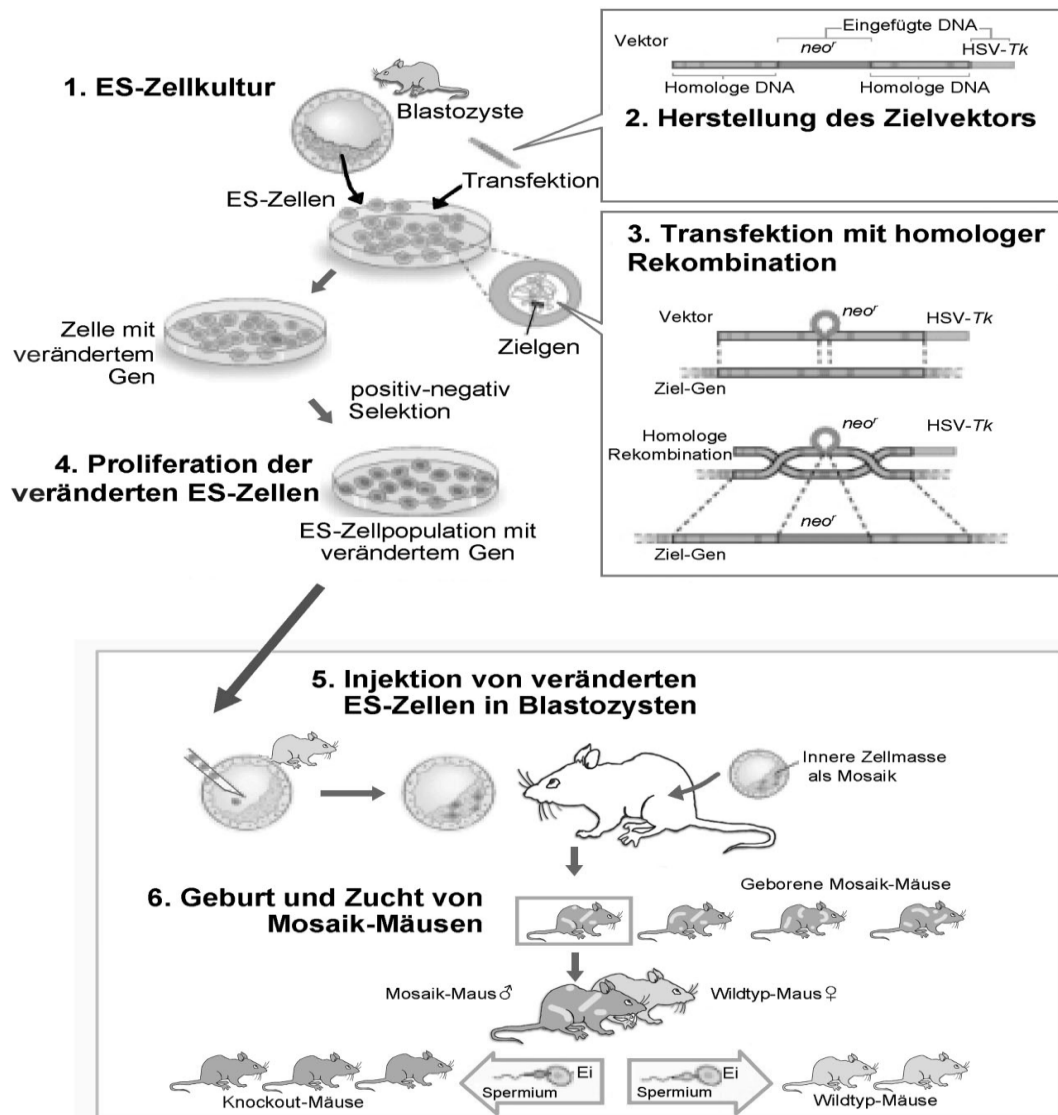


Abb. 3: Erzeugung von *knockout*-Mausmodell

Die schematisch dargestellte Erzeugung von *knockout*-Mausmodellen umfasst folgende Schritte:

1. Embryonale Stammzellen wurden aus Präimplantationsembryonen (Blastozysten) der Maus gewonnen.
2. Der Zielvektor enthält längere DNA-Fragmente, die zu dem Zielgen homolog sind.
3. Der Zielvektor wurde in die ES-Zellen transferiert.
4. Positiv-negativ-selektierte Zellen wurden auf die Neomycin-Resistenz-Marker überprüft.
5. Die veränderten ES-Zellen wurden in Blastozysten injiziert und bilden ein Mosaik (Chimären) der inneren Zellmasse. Diese Blastozysten wurden einer weiblichen Maus implantiert. Die Mosaik-Embryonen entwickelten sich und wurden als Mosaik-Mäuse (Chimären) geboren.
6. Die Kreuzung von Mosaik- mit Wildtyp-Mäusen erzeugt eine *Knockout*-Mauslinie mit den veränderten ES-Zellen und teilweise Wildtyp-Mäuse (Graw J., 2007, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).

## Einleitung

Durch das *Einbringen* eines zusätzlichen fremden Gens bei der Erzeugung des *transgenen* Mausmodells (s. Abb. 4) können dessen *Expression* und die *Auswirkungen* sowie andere Genfunktionen untersucht werden. Aus diesem Grund sind so erzeugte Onkogenüberexpression oder Inaktivierung von Tumorsupressor-Genen der *transgen* induzierten Mausmodelle für die Tumorforscher besonders interessant (Resor, L. et al., 2001).

Als klassisches Mausmodell für die Pankreastumorforschung wurde das KPC-Mausmodell bekannt (Olive, K.P. & Tuveson, D.A. 2006). Das Modell wurde im Jahr 2005 von D. Tuveson und S. Hingorani entwickelt. Die Doppelmutation der KRAS und p53 Gene, die im KPC-Mausmodell entsteht, ist bereits in ca. 90% der Tumore des Pankreas vorhanden. Alle Mäuse mit diesen KRAS/p53-Mutationen entwickeln von Anfang bis in die fortgeschrittenen Stadien gleiche Symptome wie bei dem Bauchspeicheldrüsenkrebs in der Humanmedizin (Hingorani, S. R. et al., 2003 (1; 2); Grippo, P. J. et al., 2003; Tuveson, D. A. et al., 2006).

Weitere maligne Veränderungen des Pankreas des transgenen TGF $\alpha$ -Mausmodells wurden von Sandgren im Jahr 1990 beschrieben. Die transgenen TGF $\alpha$ -Mäuse entwickelten nach ca. 300 Tagen maligne Veränderungen des Pankreas (Sandgren, E. P. et al., 1990). Die Nachkommen der Kreuzung von TGF- $\alpha$  mit p53-defizienten Mausstämmen bildeten schon nach 100 Tagen ein duktales Pankreaskarzinom (Wagner, M. et al., 1998). Die Mausmodelle ELA-PRSS1-, Ela-Kras G12D- (Grippo, P. J. et al., 2003) und Mist1-Kras G12D- Mausmodelle entwickeln die azinär-duktales Metaplasie, bilden zystische acinäre Neoplasmen, die sich zu weiteren Karzinomen entwickeln können (Tuveson, D. A. et al., 2006).

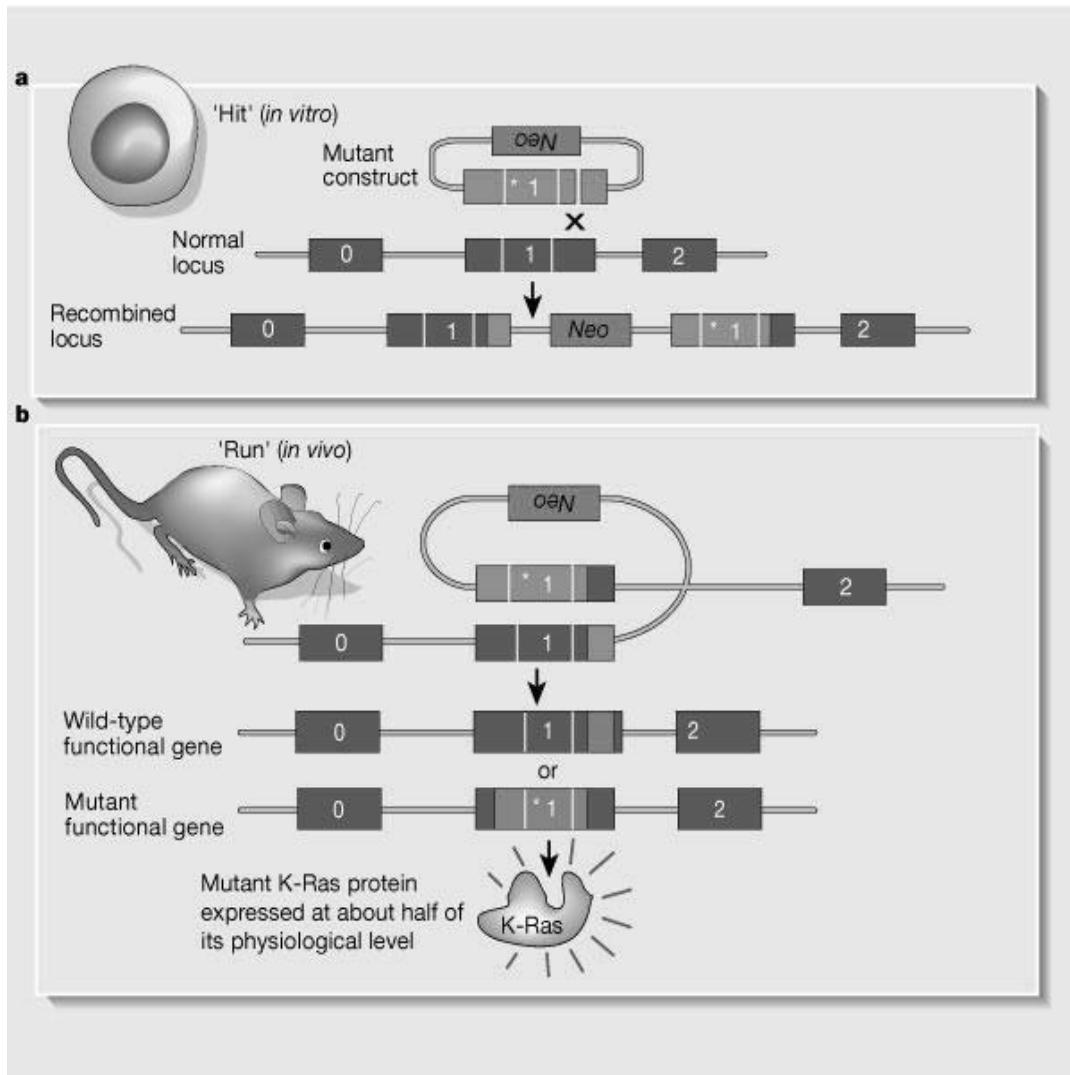


Abb.4: Entstehung eines *transgene* Tumormodells

- A. Ein mutiertes K-ras Gen (Onkogen) wurde in den Ort (locus) des normalen K-ras-Gens in embryonalen Stammzellen der Maus eingefügt. Die veränderten Stammzellen wurden dann verwendet, um Mäuse zu erzeugen. (Der Stern steht für die Mutation. Neo (Neomycin-Gen) ermöglicht untersuchte Zellen, die sowohl dieses Gen auch das angrenzende K-ras-Onkogen haben, zu identifizieren. 0-, 1- und 2- Stellen sind die Protein-kodierende Abschnitte des K-ras Gens).
- B. In der Maus tritt während der Zellteilung eine spontane Rekombination entweder innerhalb oder zwischen den Chromosomen auf. Die aktive Mutante des K-Ras-Proteins fördert das Tumorwachstum (Berns A., 2001).

In der onkologischen Forschung wurde mit chemisch und physikalisch induzierten Tumoren bei Maus und Ratte experimentiert (Malakoff, D., 2000). Abhängig von den entsprechenden Therapieverfahren wurden für die Erzeugung induzierter Tiermodelle die mutagen-wirkenden aktiven Chemikalien oder eine Bestrahlung verwendet. Die genetischen Veränderungen entstehen durch chemische Karzinogene wie Benzol, Aflatoxin, Phenol. Ein Beispiel ist die karzinogene Wirkung bei dem Azoxymethan-

## Einleitung

Natriumdextranmodell (AOM/ DSS-Modell), dabei erhalten die Tiere Azoxymethan, welches kolorektale Adenokarzinome verursacht (Neufert, C. et al., 2007). So wurde auch durch Pristan in suszeptiblen BALB/c-Mäusen eine Bildung von Plasmazytomen entwickelt. Die kanzerogenen Substanzen wie Safrol oder Vinylchlorid führen zur Bildung von hepatozellulärem Karzinom (HCC) (Lipsky, M. M. et al., 1981, Emmerich, K. H. & Norpoth, K., 1981). Allerdings spielen diese Maustumormodelle in den Pankreastumorforschung eine weit untergeordnete Rolle (Herrerros-Villanueva, M. et al. 2012).

Seit 1920 wurde mit Mausstämmen, die besonders anfällig sind für die *autochthone* (*spontane*) Entstehung von Tumoren, experimentiert. Die *autochthonen* (*spontanen*) Tumormodelle in der Maus von bestimmten genetisch modifizierten Inzuchtlinien neigen zur spontanen Tumorbildung (Wagner, Ch. & Müller, O., 2009). Es kommt nicht zur Proliferationsaktivität in kompletten Geweben, sondern zu einer *spontanen* Entwicklung der transformierten Zellen zu Tumoren. Dabei erfolgt die Tumorentstehung in *autochthonem* System auf zellulärer Ebene mit Hilfe dreier Faktoren: 1. In einer multiplen Genmutation in der transformierenden Zelle; 2. Eines exprimierten Onkoproteins. 3. In der mitotisch-aktiven Zelle (Jonkers, J und Berns, A., 2002). Rachagani und Kollegen beschreiben in ihrer Studie eine *knockout*-Maus  $Kras^{G12D}$  (B6.129-Kras<sup>tm4Tyj</sup> (01XJ6) mit einem autochthon entwickelten Pankreaskarzinom als Ergebnis einer langanhaltenden Entzündung. Im Alter von 50 Wochen waren bis zu 70% des Stammes von diesem Karzinom befallen (Rachagani, S. et al. 2012). In suszeptiblen Mausstämmen wie B6C3F1 oder C3H treten spontane Lebertumore auf, die Tumorentwicklung verläuft aber sehr langsam und die Frequenz ist zu niedrig, um damit reproduzierbare Experimente durchführen zu können (Tarone, R. E. et al., 1981, Ward, E et al., 1979). Auch eine von Mukherjee beschriebene entstehende Muc1-Induktion im transgenen MET-Mausmodell führt zu einer spontanen Pankreasadenokarzinombildung (Mukherjee, P. et al., 2000).

Ein Vorteil dieser *autochthonen* Systeme liegt nicht nur darin, dass sie große Ähnlichkeit der Tumorentstehung mit dem Menschen haben, sondern auch in der Möglichkeit, im adulten Tier zu jedem beliebigen Zeitpunkt die Onkogenexpression gewebsspezifisch zu entwickeln (Berns, A. et al. 2001, Meuwissen, R. et al. 2001). Die autochthonen Modelle weisen allerdings auch deutliche Nachteile auf, wie eine

lange Latenzzeit sowie weitere Tumorbildung auch in anderen Organen (Drew, R. T. et al., 1983) und ein polyätiologischer Charakter des Karzinoms (Dexter, D. L. et al., 1993).

#### **1.4.2. Transplantationsmausmodelle in der Tumorforschung**

Die Transplantationsmodelle sind für die Tumorforschung effizient und weit verbreitet (Ostrand-Rosenberg, S., 2004). Die syngenen Tiermodelle erlauben allogene Transplantationen, somit die Übertragungen von Organen bzw. Geweben oder Zellen nur zwischen gleichen Spezies. Das xenogene Modell basiert auf Gewebstransplantationen von Organen, Geweben oder Zellen zwischen verschiedenen Arten. Dieses Mausmodell ist besonders für die onkologische Forschung interessant. Der Grund dafür ist, dass ein murines, orthotopes Xenotransplantationsmodell des Pankreaskarzinoms aus einer Injektion humaner Tumorzellen in den Pankreaskörper einer immundefizienten Maus besteht, und somit der Entwicklung des Tumors bzw. einem Krankheitsverlauf bei inoperablen Patienten entspricht (Tepel, J. et al., 2004).

Die Transplantationsmausmodelle unterscheiden sich nach dem Applikationsort injizierter Tumorzellen/Tumoren. Bei *heterotopen* Modellen ist das Zielorgan nicht gleichen Ursprungs wie das Entnahmeorgan bzw. die von dort stammenden Zellen. Oft ist dann der Applikationsort *subkutan*. So können z. B. Pankreaskarzinomzellen nach subkutaner Injektion unter der Haut auswachsen und einen subkutanen Tumor bilden. Das erste subkutane Xenotransplantationsmodell wurde Ende der 60er Jahre von Rygaard und Povlsen beschrieben (Rygaard, J. & Povsen, C. O., 2007). Verschiedene Studien beschreiben die Verwendung der subkutanen Tumorexotransplantation in der Nacktmaus, um die mögliche Reaktion auf eine Chemotherapie wie Gemcitabin (Garrido-Laguna, I. et al., 2011) oder neuere pharmakologische Blocker (Feldmann, G. et al., 2011) zu erforschen. Solche Tumore können in *heterotopen* Modellen sehr unproblematisch injiziert, gemessen, seziert und protokolliert werden (s. Tabelle 2). Ein Nachteil der *heterotopen* Modelle ist die i.d.R. fehlende Fernmetastasenbildung (Talmadge, E. J. et al., 2007(2)). Ein *orthotopes* Modell hat den gleichen Ursprung des Applikations- und Zielorganes,

somit bleibt das Xenotransplantationmausmodell näher an der Klinik (s. 1.4.2.1.) (Hoffman, R. M., 1999).

Um die Metastasenentwicklung zu erforschen, wurde eine große Vielfalt an *Metastasenmodellen* als Transplantationsmausmodell entwickelt. Die Metastasenbildung ist vom anatomischen Ort der Tumorzellimplantation abhängig, weil das metastatische Potential der humanen Tumorzellen in verschiedenen Geweben und Organen unterschiedlich sein kann (Talmadge, E. J. et al., 2007(1)). Die Lungenmetastasierung entsteht z. B. nach einer intravenösen Applikation von humanen B16-F10 Melanomzellen (Fidler, I. J. & Hart, I. R., 1982) oder auch nach der Applikation von A549-Lungenadenokarzinomzellen in die Leber (Harris, J. E., et al., 2011). Eine Knochenmetastasenentwicklung entsteht z. B. durch eine Injektion von hoch metastatischen MDA-MB-435 humanen Mammakarzinom-Zellen in den linken Ventrikel des Herzens (Harms, J. F. und Welch, D. R., 2003); oder auch nach der intraventrikulären Injektion der humanen B16M und A375 Melanomzellen (Valcarcel, M. et al., 2011).

### **1.4.2.1. Experimentelles Pankreaskarzinom im murinen orthotopen Xenotransplantationsmodell**

#### Orthotopes murines Xenotransplantationsmodell

Im orthotopen murinen Pankreasxenotransplantationsmodell werden humane Pankreastumorzellen direkt ins Pankreas der Maus injiziert, die sich in der Maus i. d. R. zu einem sehr aggressiven schnellwachsenden Tumor (Primärtumor) mit Frühmetastasen in naheliegenden Organen entwickeln. Zu diesem Modell wurden von B. Sipos viele Pankreaskarzinomzelllinien beschrieben (Sipos, B. et al. 2003).

#### Resektionsmodell

Die weitere Entwicklung des murinen, orthotopen Xenotransplantationsmodells ermöglicht neue Wege der adjuvanten Therapie. Das Resektionsmodell des humanen Pankreastumors aus Pankreasgewebe einer SCID Beige Maus (s. 1.4.2.2.) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Kalthoff erfolgreich im Jahr 2006 etabliert (Tepel, J. et al., 2006). Die durchgeführte subtotale Pankresektomie spiegelt eine klinische Situation nach einer kompletten Primärtumorresektion (R0-Resektion) in dem Resektionsmodell wider, so dass die Wirkung der adjuvanten oder

neo-adjuvanten Therapie auf die nach der Resektion entstehenden Rezidive sowie auf die Metastasenentwicklung, mit der in der Klinik nach Resektion des Primärtumors vergleichbar erscheint (Tepel, J. et al., 2006). Nachteile des Modells sind, dass orthotope Tumorxenotransplantate arbeitsintensiv, technisch anspruchsvoll und teuer sind (Killion, J.J. et al., 1998). Weiterhin erfordert die postoperative Phase eine relativ lange Zeit der Wundheilung (s. Tabelle 2).

Mausmodellen	Kosten	Zeitaufwand	klinischer Ansatz	Klinische Reproduzierbarkeit (human)
Transgene Modelle	++++	++++	+	++++
Heterotope Xenograftmodelle	+	+	++++	+
Orthotope Xenograftmodelle	++	++	+++	++

Tab. 2: Vergleich von Mausmodellen für den klinischen Ansatz bei Bauchspeicheldrüsenkrebs. +: gering; ++: mittlere; +++: hoch; ++++: sehr hoch (Herrerros-Villanueva, M. et al. 2012).

#### 1.4.2.2. Versuchstiere für das murine orthotope Xenotransplantationsmodell

Die ersten immundefizienten, haarlosen Mausmodelle stammen aus einer Spontanmutation des FOXP1-Genes aus den 60er Jahren. Die ersten Nacktmäuse hatten eine Thymusaplasie und deshalb keine reifen funktionellen T-Lymphozyten bei der normalen Anzahl an B-Zellen (Rygaard, J., 1969). Durch den erheblichen Mangel an T-Lymphozyten hat die Nacktmaus ein stark eingeschränktes Immunsystem und keine Abstoßungsreaktion, was sie zu einem idealen Wirt für homologe und xenogene Transplantationen macht. Erstmals wurde in 1971 von Rygaard und Povlsen eine erfolgreiche Transplantation eines humanen Kolonkarzinoms in die Nacktmaus durchgeführt (Rygaard, J. & Povlsen, C. O., 1969, Rygaard, J. & Povlsen, C. O., 1971) und dann im Jahr 1972 in einer Zellkultur gewachsene Tumorzelllinien in die Nacktmaus transplantiert (Giovanella, B. C., 1972). Diese Versuche haben einen neuen Weg in der präklinischen Entwicklung von therapeutischen Studien ermöglicht.

Später wurde die SCID-Mutation gefunden. Der Begriff „*Severe Combined Immuno Deficiency*“ (SCID) beinhaltet eine rezessiv, autosomal vererbte Mutation, welche das Prkcd-Gen auf Chromosom 16 betrifft. Alle Tiere mit diesem Immundefekt haben eine

## Einleitung

T-, B-Zelldefizienz und zeigen eine Lymphopenie sowie eine Hypogammaglobulinämie (Bosma, G. et al., 1983). Es ist auch die humorale Abwehr betroffen. Ein Immunglobulinnachweis ist nur bei 2 - 10 % der Tiere möglich. Je nach verwendetem Mausstamm können die NK-Zellen (natürliche Killerzellen) ebenfalls betroffen sein. *SCID*-Tiere zeigen eine reduzierte Aktivität des Komplementsystems. Die Tiere mit Gendefekt besitzen unterentwickelte lymphatische Organe (Custer, R. et al., 1985).

Eine weitere autosomal-rezessive *Beige Mutation* ist auf Chromosom 13 lokalisiert und betrifft das *Lyst*-Gen. Sie entstand in der Inzuchtmauslinie C57BL/6J(bgJ) spontan. *Beige*-Mäuse haben eine NK-Zellzytolyse-Störung und einen Mangel an Thrombozyten, wodurch es zu einer Blutgerinnungsstörung kommt.

### C.B-17 *SCID Beige* Mausmutanten

In unseren Versuchen wurde das xenogene Transplantationsmodell C.B-17 *SCID Beige* Mausmutante (von Harlan-Winkelmann, USA) verwendet (Nomenklatur: C.B-b 17/lcrHsd-*Prkdc*<sup>*scid*</sup>*Lyst*<sup>*bg*</sup>). Harlan-Winkelmann erwarb 1991 die *SCID Beige* Mausmutante vom Fox Chase Cancer Center (Philadelphia, Pennsylvania, USA). Dieses Mausmodell besitzt sowohl die genetisch autosomal-rezessive Mutation *SCID* (*Prkdc*<sup>*scid*</sup>), einen Einzel-Nukleotid-Polymorphismus auf Chromosom 16 als auch die *Beige* (*Lyst*<sup>*bg*</sup>) rezessive Mutation auf Chromosom 13. Die *SCID*-Mutation führt zu B- und T-Lymphozyten-Mangel, zusätzlich führt die *Beige-Mutation* zu einem Mangel an natürlichen Killerzellen. Die Tiere haben einen rudimentären Thymus und sind für virale und bakterielle Infektionen sehr anfällig. Aufgrund der schweren Immuninkompetenz ist eine Abstoßungsreaktion kaum möglich, deswegen ist das Modell für orthotope Xenotransplantationen sehr gut geeignet ist. Die C.B-17 *SCID Beige* Mäuse wurden im Alter von 5-6 Wochen mit einem Körpergewicht von ca. 18-19 g operiert.

#### **1.4.2.3. Monitoring der Tumore**

Die Messungen der subkutanen Tumore (*heterotope* Modelle) können sehr unproblematisch mit der Schieblehre durch Palpation erfolgen. Der Nachteil des heterotopen Modells ist, dass man die vollständigen Informationen in der klinischen

## Einleitung

Situation von Tumorentstehung, Tumorentwicklung und Metastasierung nicht aufzeigen konnte (s. Tabelle 2). Die kliniknahen orthotopen Modelle haben den Mangel an Möglichkeiten manuelle Messungen durchführen zu können, um den Krankheitsverlauf zu erforschen. Um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten, ist auch eine höhere Anzahl von Tieren nötig. Die Tumor- und Metastasenuntersuchungen sind nur nach Sektion möglich. Deswegen ist es für das orthotope xenogene Transplantationsmodell sehr wichtig, zusätzliche morphologische Informationen durch klassische radiologische Bildgebung im lebenden Tier über den gesamten Krankheitsverlauf zu bekommen. Zur Verfügung stehen mehrere bildgebende Techniken wie Röntgen, die Computertomographie, die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), die Kernspintomographie (MRT), Ultraschall und optische Verfahren (Biolumineszenz und Fluoreszenz) (s. Tabelle 3).

Imaging-Verfahren	Vorteile	Nachteile
Sonographie (Ultraschallwellen) (Graham, K. C. et al., 2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 3D-Rekonstruktion</li> <li>• keine Nebenwirkungen</li> <li>• geringer apparativer Aufwand</li> <li>• Kostengünstig</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• stark untersucherabhängig</li> <li>• Ganzkörper-darstellung nicht möglich</li> </ul>
Positronenemissionstomographie (PET, Radioaktive Metaboliten)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ganzkörper-Darstellung</li> <li>• Darstellung von Stoffwechselfvorgängen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strahlenbelastung</li> <li>• kostenaufwändig</li> <li>• zeitaufwendig</li> </ul>
Magnetresonanztomographie (MRT) (Kobayashi, H. et al., 2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ganzkörper-Darstellung</li> <li>• sehr hohe Auflösung</li> <li>• keine Nebenwirkungen</li> <li>• 3D-Rekonstruktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kontrastmittel notwendig</li> <li>• kostenaufwändig</li> <li>• zeitaufwendig</li> </ul>
Computertomographie (CT, Röntgenstrahlung) (Weber, S. M. et al., 2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ganzkörper-Darstellung</li> <li>• gute Auflösung von Knochenstrukturen</li> <li>• 3D-Rekonstruktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Strahlenbelastung</li> <li>• Kontrastmittel notwendig</li> <li>• kostenaufwändig</li> <li>• zeitaufwendig</li> </ul>
Fluoreszenz (GFP-, RFP-Signale) (Yang, M. et al. 2000)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kostengünstig</li> <li>• sehr hohe Auflösung</li> <li>• molekulares Imaging durch lokale Anregung</li> <li>• kurze Messzeiten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gentransfer notwendig</li> <li>• Background durch Autofluoreszenz</li> </ul>
Lumineszenz (Photonenemission)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kostengünstig</li> <li>• gute Auflösung</li> <li>• sehr hohe Spezifität (kein Background)</li> <li>• Metastasierungsevaluation</li> <li>• keine Nebenwirkungen</li> <li>• kurze Messzeiten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gentransfer notwendig</li> <li>• begrenzte Ausdringtiefe des Lichtes</li> </ul>

Tabelle 3: Bildgebende Techniken für die Tiermodell-Studien.

## Einleitung

In seiner Studie erklären Fleming, J. B., dass die Magnetresonanztomographie (MRT-), Computertomographie (CT-) und Positronenemissionstomographie (PET-) Imaging-Verfahren hochauflösend sind und besonders aussagekräftige Information liefern und es erlauben, das Tumorwachstum im Verlauf der ganzen Studie in Tiermodellen zu verfolgen. Jedoch sind sie auch sehr kosten- und zeitaufwändig (Fleming, J. B. & Brekken, R. A., 2003). MRT, CT und Ultraschall und produzieren anatomische Bilder von Strukturen im Körper, während das PET-Bild physiologische Prozesse abbildet und so funktionelle Bilder erzeugt. Nicht-invasive Bildgebung, wie Fluoreszenz- und Biolumineszenz- Imaging basieren auf der Emission von Licht (mit respektive ohne externe Lichtquellen) und sind in der tierexperimentellen Forschung auf zellulärem Gebiet weit verbreitet (Chishima, T. et al., 1997; Jenkins, D. E. et al., 2003(2)). Wie schon von Haseloff, J. in 1999 ausführlich erläutert wurde, konnte mit fluoreszenzbasiertem Imaging eine hohe Bildauflösung auf molekularer Ebene erreicht werden (Haseloff, J., 1999). Mehrere Experimente wurden mit einem fluoreszierenden Protein (GFP) in Mausmodellen beschrieben, wie zum Beispiel die Endometriose oder Lungenmetastasen mit GFP-exprimiertem Gewebe, orthotope Transplantation mit fluoreszenzprotein-exprimierenden Krebszellen usw. (Chishima, T. et al., 1997; Hoffman, R. M., 1999; Fortin M. et al., 2004; Hirata T. et al., 2005). Es wurde allerdings berichtet, dass die Verwendung dieses Fluoreszenz-Systems wegen der gravierenden Nachteile wie Eigenfluoreszenz und Hintergrundstrahlung beschränkt ist (Fortin M. et al., 2003; Rogers, K. L. et al., 2005).

Durch nicht-invasives Monitoring der Tumore mit Ultraschall und optischer Bildgebung ist es möglich, wertvolle Daten über die Entwicklung ein und desselben Tumors in ein und demselben Tier im Verlauf des Versuches zu gewinnen. Die sonographischen Daten liefern morphologische Informationen und ermöglichen die Differenzierung zwischen Tumorgewebe und postoperativem Narbengewebe sowie die Detektion kleiner Metastasen. Durch optische Verfahren bekommt man ggf. auch funktionelle Informationen über den Zustand der Tumorzellen/Tumore.

## 1.5. Ziele der Arbeit

Wie bereits erwähnt und in der Literatur beschrieben, handelt es sich beim Pankreasadenokarzinom um eine seltene, aber sehr gefährliche Krebsart mit äußerst schlechter Prognose für die betroffenen Patienten. Umso wichtiger ist die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen, um daraus langfristig Strategien zu entwickeln, die einer Verbesserung der Behandlung des Pankreasadenokarzinoms dienen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem humanen, orthotopen Pankreaskarzinommodell in der Maus, um die Mechanismen des Krankheitsverlaufs zu erforschen. Hierzu wurden zwei klinische Situationen, die palliative (der Primärtumor verbleibt *in situ*) und adjuvante (der Primärtumor wurde entfernt) Therapie untersucht und miteinander verglichen.

Ein Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob parallel durchgeführte Messungen mittels Bildgebungstechniken von NightOwl (Lumineszenzmessung) und Sonographie mit den Sektionsdaten (Tumorgewicht, Tumolvolumen, Histologie) korrelieren können.

Es ist bereits bekannt, dass die Bindung von CD95L an seinen Oberflächenrezeptor CD95 eine große Rolle bei der Erhöhung von Motilität und Invasivität in CD95-Apoptose-resistenten Pankreastumorzellen unter *in vitro*-Bedingungen spielen kann. Mittels *in vitro*- und *in vivo*-Studien sollte untersucht werden, welche Wirkung eine CD95L-blockierende Substanz (ein lösliches Fusionsprotein sCD95Fc) auf apoptotische und pro-inflammatorische Signaltransduktionen bei PDAC-Zellen hat. Daraus ergibt sich auch die Frage, ob die therapeutische Wirkung durch eine Kombinationstherapie aus CD95L-Hemmung und gleichzeitiger Hemmung anderer Todesliganden (TNF- $\alpha$ ) verbessert werden könnte, was ebenso Gegenstand dieser Arbeit war.

Des Weiteren war von Interesse, ob sich die Zelllinien PancTu1*Luc*, PancTu1 und Panc1 unter therapeutischem Einfluss im Tumorwachstum unterscheiden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Material für *in vitro*-Versuche

##### Chemikalien

0,2 % Trypanblau

10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

10 % Trypsin

70% Ethanol

Accutase

Casyton-Salzlösung

Fetales Kälberserum (FCS)

Kollagen I

Kristallviolett

L-Glutamin

Lysis-Puffer

Methanol

Natrium-Pyruvat

PBS

PenStrep

Proteinkinase

RMPI-1640 Kulturmedium

##### Geräte

Autostainer

Brutschrank

Casyton-Zählgerät

Centrifuge 5415R

##### Bezugsquelle

Invitrogen, Karlsruhe

SIGMA-Aldrich, München

GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

PAA, Österreich

Schärfe System GmbH,  
Reutlingen

Pan Biotech GmbH,  
Aidenbach

BD Biosciences, Heidelberg

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Invitrogen, Karlsruhe

Biomedicals, USA

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe

GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe

Pan Biotech GmbH,  
Aidenbach

Merck, Darmstadt

GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe

##### Bezugsquelle

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Hanau

Schärfe System GmbH,  
Reutlingen

Eppendorf, Hamburg

## Material und Methoden

Digitalkamera

Kleintierultraschall (Vevo 770<sup>®</sup>)

Lichtmikroskop

Magnetrührer, IkaMag<sup>®</sup>

Mikroliterpipetten (0,1 - 1000 µl)

Mikrotom-Kryostat HM 500 OM

optische Kammer Berthold LB983 NightOwl

pH-Meter; inoLab pH Level 1

Photometer Tecan, Type: Sunrise

Saugpipette

Schallköpfe RMV706 (20-60 MHz) und RMV708 (22-83 MHz)

Vortex-Schüttelgerät

Waage

Wasserbad

### ***In vitro*-Zellkulturmaterial**

25cm<sup>2</sup>-, 75cm<sup>2</sup>-, 175cm<sup>2</sup> - Zellkulturflaschen

6-Well-, 24-Well-, 96-Well-Platten

Transwell-Einsätze (24-Well-Platte, 8- µm Porengröße,)

2ml-Kryoröhrchen

Isopropanolhaltige Einfrierbox

Neubauer-Zählkammer

Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)

### **Kits**

DuoSet ELISA human CXCL8/IL-8 (Katalog, DY994 )

ELISA Human Fas Ligand/TNFSF6 Immunoassay

EZ4U - Testkit,

Axiocam, Carl Zeiss, Jena

VisualSonics, Toronto, Kanada

Müller, Erfurt

Janke & Kunkel, Staufen

Eppendorf, Hamburg

Microm, Heidelberg

EG&G Berthold, Bad Wildbad

WTW, Weilheim

Remote, Österreich

Pipetboy, Baar, Schweiz

VisualSonics, Toronto, Kanada

Vortex Genie 2, Zürich, Schweiz

Sartorius BP 310S

Haake, Karlsruhe

Sarstedt, USA

Sarstedt, USA

Greiner GmbH, Solingen

MikroSchraubröhre, Sarstedt, Nürnberg

Roth, Karlsruhe

Zeiss, Jena

Eppendorf, Hamburg

### **Bezugsquelle**

R&D Systems, Wiesbaden

R&D Systems, Wiesbaden

Biomedica, Wien, Österreich

Mykoplasmentest (PCR Mycoplasma Detection Set,) TaKARa, Roche, USA

### 2.1.2. Material für *in vivo*-Versuche

#### Material

Insulinspritzen U-40, 1ml, 29,5 GA/0,33 x 12,7 mm

Bepanthen<sup>®</sup>

Kodan<sup>®</sup>

Mikro-Nadelhalter nach Müller FM 061 R

Mikro-Pinzette mit 1 x 2 Zähnen nach Müller FM034R

Mikro-Pinzetten mit Ring (Durchmesser 1,2 mm)

nach Müller FM 035 R

Mullkompressen 10 x 10 cm

Mullkompressen 6 x 6 cm

Schere, fein, gerade, BC 060 R

sterile Wattestäbchen

Vicryl 6/0

#### Bezugsquelle

Becton Dickinson, USA

Bayer Vital, Leverkusen

Schülke&Mayr GmbH,

Norderstedt

Aesculap, Tuttlingen

Aesculap, Tuttlingen

Aesculap, Tuttlingen

Hartmann, Heidenheim

NOBA Verbandmaterial,

Wetter

Aeskulap, Tuttlingen

Beese, Barsbüttel

Ethicon, Hamburg

#### Tierhaltung

##### Material

Einstreu

Laminar-Airflow Schrank

Makrolonkäfige Typ III mit Filtertops

Mäusefutter

Trinkflaschen 250 ml

##### Bezugsquelle

Rettenmeier Holding AG,

Wilburgstetten

Scanbur, Koge, Dänemark

Scanbur, Koge, Dänemark

Altromin, Soest

Scanbur, Koge, Dänemark

##### Tiere

fünf Wochen alte, weibliche, SCID Beige Mäuse des Stammes C.B.-17/IcrHsd-Prkdc-scidLystbg SCID/SCID beige/beige (Harlan-Winkelmann, Borchten)

## Applikationslösungen für *in vivo*-Versuche

### Applikationslösungen

5 % Glucoselösung

Anexate<sup>®</sup> (Flumazenil, 0,1 mg/ml)

Antisedan<sup>®</sup> ( Atipamezol, 5 mg/ml)

D-Luciferin Firefly ( XR-1001)

Dormitor<sup>®</sup> ( Medetomidin, 1 mg/ml)

Fentanyl<sup>®</sup> (0,05 mg/ml)

Remicade<sup>®</sup>

Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %

Matrigel<sup>®</sup>

Midazolam<sup>®</sup> (1 mg/ml)

Naloxon<sup>®</sup> (0,4 mg/ml)

sCD95Fc

Temgesic<sup>®</sup> (0,324 mg Buprenorphinhydrochlorid)

### Bezugsquelle

Braun, Melsungen

Roche, Grenzach-Wyhen

Pfizer, Karlsruhe

Xenogen Corporation, USA

Pfizer, Karlsruhe

Janssen-Cilag, Neuss

Infliximab, ESSEX PHARMA  
GmbH

Braun, Melsungen

Becton Dickinson, USA

Roche, Grenzach-Wyhen

CuraMed, Karlsruhe

Zur Verfügung gestellt von

Prof. Dr. H. Kalthoff im

Rahmen eines

Kooperationsprojektes

Boehringer, Mannheim

### 2.1.3. Verwendete Zelllinien

Frühere Studien zeigten, dass die von uns verwendeten Tumorzellen sowohl *in vitro* ein stabiles Wachstum haben als auch *in vivo* erfolgreich nach Inokulation in präklinische Tumormodelle anwachsen und somit standardisierte Bedingungen für das Erforschen neuer Substanzen erlauben (Trauzold, A. et al., 2001; Tepel, J. et al., 2004; Trauzold, A. et al., 2005). Da das Pankreaskarzinom über eine außerordentliche Heterogenität und Vielfalt der Tumore bzw. Tumorzellen verfügt, wurden in mehreren Publikationen die Faktoren beschrieben, die die Heterogenität ausmachen, wie z.B. die unterschiedliche Morphologie oder eine Expression verschiedener Tumormarker (Moore, P. S. et al. 2001). Aus dem Grund wurden in unseren *in vitro*- und *in vivo*- Versuchen mehrere humane Pankreastumorzelllinien (PancTu1Luc, PancTu1 und Panc1) verwendet (Abb. 5). Für den Invasionassay

wurde die Vorhautfibroblastenzelllinie Kif-5 benutzt.

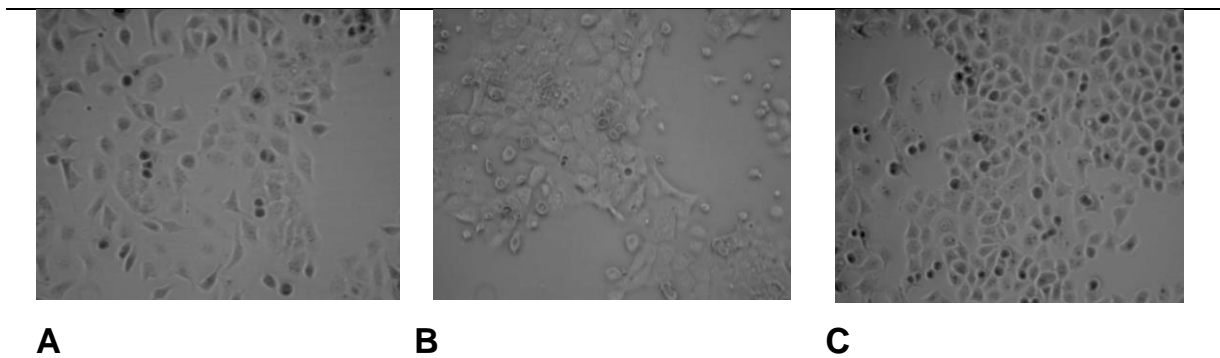


Abb. 5: Verwendete Zelllinien: PancTu1*Luc* (A); PancTu1 (B) und Panc1(C)

### **PancTu1*Luc***

Für die Zelltransfektion mit dem Luciferase-Reporter-Gen wurde ein molekulares Konstrukt (Plasmid) hergestellt. Das Plasmid enthält als Selektionsmarker das Neomycin-Resistenzgen. Der Plasmidvektor wurde durch kationische Lipide transferiert.

Die Transfektion der humanen Pankreastumorzellen PancTu1 mit dem Luciferase-Reporter-Gen wurde von Dr. Sanjay Tiwari in der Sektion für molekulare Onkologie durchgeführt.

Das transferierte Zell-Reporter-Gen mit einem Vektor dient nicht nur der Überwachung des Tumorwachstums, sondern auch schon früh der Kontrolle, ob die humanen Tumorzellen nach orthotoper Xenotransplantation in der Maus angewachsen sind. Eine Expression des Reportergens ist nur in lebenden Zellen möglich.

### **PancTu1**

Die Zelllinie PancTu1 (s.Abb. 5B) stammt aus einem humanen duktalem Pankreaskarzinom. Es wurde festgestellt, dass die PancTu1-Zellen einen chemoresistenten, anti-apoptotischen Phänotyp im Zusammenhang mit erhöhter NF-kappaB-Aktivität haben (Sipos, B. et al., 2003; Kalthoff, H. et al., 1993).

### **Panc1**

Panc1-Zellen (s.Abb. 5C) entsprechen einer epitheloiden Zelllinie, die aus einem humanen malignen Pankreaskarzinom stammt (Sipos, B. et al., 2003) Die Zelllinie

wurde zum ersten Mal im Jahr 1975 von der Arbeitsgruppe Lieber erwähnt (Lieber, M. et al., 1975).

### **Kif-5**

Die Vorhautfibroblastenzelllinie Kif-5 wurde im Institut für Experimentelle Tumorforschung, Sektion für Molekulare Onkologie etabliert und beschrieben (Kapischke, M. et al., 2005).

#### **2.1.4. Material für Histologie**

##### **Kits**

Dako REAL™ APAAP Immunocomplex (APAAP)

EnVision™ G|2 Doublestain System, Rabbit/Mouse  
(DAB+/Permanent Red, Code K5361)

LSAB+ System-HRP Kit (Code K0679)

Mouse Dako REAL™ Detektion System (K5000)

##### **Antikörper**

Monoklonaler, muriner Antikörper Zytokeratin (Klon KL1,  
DakoCytomation)

Monoklonaler, muriner Ki-67 Antikörper (Klone MIB-1,  
DakoCytomation)

##### **Allgemeine Reagenzien**

Antibody Diluent

Aceton

Eosin für die Mikroskopie

Essigsäure 96%

Ethanol

Fetales Kälberserum (FCS)

##### **Bezugsquelle**

Dako, Glostrup,  
Dänemark

Dako, Glostrup,  
Dänemark

Dako, Glostrup,  
Dänemark

Dako, Glostrup,  
Dänemark

##### **Bezugsquelle**

Dako, Glostrup,  
Dänemark

Dako, Glostrup,  
Dänemark

##### **Bezugsquelle**

Dako, Glostrup,  
Dänemark

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

PAN Biotech GmbH

## Material und Methoden

Methanol

Natriumchlorid (NaCl)

Saure Hämalaunlösung nach Mayer

Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)

Wasserstoffperoxid (2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

### Verbrauchsmaterialien

0,5 % Tween

Aquatex<sup>®</sup>

CryoPure Gefäß, 1,8 ml

Deckgläser 24mm x 50mm

DePex<sup>®</sup>

Einbettmedium Jung<sup>®</sup>

Eosin

Fettstift, Dako Pen<sup>®</sup>

Glaspipetten

Mayers Hämalaunlösung

Objektträger, SuperFrost Plus

Paraformaldehyd-Lösung

Protein Block Serum-Free

### PC-Programme für die statistische Auswertung

GraphPad Prism 4<sup>®</sup>

WinLight 32-Software<sup>®</sup> von NightOWL II LB 983

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Sigma-Aldrich,

Deisenhofen

Merck, Darmstadt

Dako, Glostrup,

Dänemark

### Bezugsquelle

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Sarstedt AG & Co,

Nümbrecht

Menzel-Gläser,

Braunschweig

Leica Microsystems

GmbH, Nussloch

Merck, Darmstadt

Dako, Glostrup,

Dänemark

Sarstedt AG & Co,

Nümbrecht

Merck, Darmstadt

Menzel-Gläser,

Braunschweig

Dako, Glostrup,

Dänemark

Serva Elektrophoresis

GmbH

### Bezugsquelle

San Diego, USA

EG&G Berthold, Bad

Wildbad

## **2.2. Tierversuche**

In dieser Arbeit wurde mit einem murinen orthotopen Pankreaskarzinommodell versucht, die Mechanismen des Krankheitsverlaufs zu erforschen, um neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

Hierzu imitieren wir zwei klinische Situationen. In einer verbleibt der Primärtumor in situ (palliative Therapiesituation) und in der anderen wurde eine subtotale Pankreatektomie, entsprechend einer kompletten R0-Resektion (kein Resttumor mikroskopisch vorhanden), durchgeführt. Durch die Resektion des Primärtumors war es möglich, eine Situation zu simulieren, in der die adjuvante und palliative Chemotherapie untersucht werden konnte. Nach der Laparotomie wurde eine postoperative Schmerztherapie angewendet. Bei auftretenden Komplikationen wie Kachexie, Vitalitätsverlust oder einer Gewichtsreduktion um mehr als 20 % wurde die sofortige Euthanasie durchgeführt.

### **2.2.1. Tiere**

Die Tierversuche werden an fünf Wochen alten, weiblichen SCID-bg Mäusen des Stammes C.B.-17/lcrHsd-Prkdc-scidLystbg SCID/SCID beige/beige durchgeführt (Abb. 57 A).

Der Genehmigungsantrag wurde beim Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume (MELUR) des Landes Schleswig-Holstein gestellt und dort unter der Nr. V312-72241.121-17 (28-3/09) geführt.

Die Tierversuche wurden in der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt.

### **2.2.2. Tierhaltung**

Die gelieferten 3 – 4 Wochen alten Tiere (s. Abb. 57 A) wurden in sterilen Käfigen bei  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  und  $55 \pm 10$  % relativer Luftfeuchtigkeit im S1-Labor der zentralen Tierhaltung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel gehalten. Gemäß den Tierschutzvorschriften wurde im Tierhaltungsraum eine „12h Licht- und 12h Dunkelphase“ eingehalten. Futtermittel, Trinkwasser und Käfige wurden

autoklaviert, so dass definierte hygienische Verhältnisse (spezifisch pathogen frei nach FELASA-Richtlinien) gegeben waren. Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen des Typs III mit Filtertops in Lamina-Flow-Schränken (Scanbur, Dänemark) in Gruppen bis zu 4 Tieren gehalten. Es wurde zweimal pro Woche eine Gewichts- und Vitalitätskontrolle durchgeführt. Zur Vermeidung eines Einflusses durch Transportstress bei der Anlieferung der Tiere auf die Ergebnisse, wurde eine Periode von 7-10 Tagen zur Adaptation an die neuen Bedingungen eingehalten, dann erst wurden die Versuche durchgeführt.

### **2.2.3. Vorbereitung der Zellinjektion**

Für die Vorbereitung der Zellinjektion wurde von BD Matrigel™ eine Basalmembran Matrix für die Suspension der Tumorzellen verwendet. Das Matrigel™ wurde auf Eis vorbereitet. Die Pipettenspitzen und die Insulinspritzen wurden kalt gelagert. Die Pankreaskarzinomzellen wurden unter sterilen Bedingungen kultiviert (Details siehe Pkt. 2.5.) und trypsinisiert. Die Zellsuspension wurde bei 1420 rpm für 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und in einer Neugebauer-Zählkammer gezählt.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in Eppendorfgläsern aliquotiert und bei 1420 rpm 4 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Danach wurde ständig auf Eis gearbeitet. Auf  $1 \times 10^6$  Zellen wurden 30  $\mu$ l Matrigel™ gegeben, gemischt und in eine Insulinspritze pipettiert. Die Spritzen mit den Zellen wurden auf Eis gelagert, da bei einer Temperaturerhöhung das Matrigel™ fest wird, was ein Injizieren unmöglich macht. Beim Aufziehen der Spritzen war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen in der Zellsuspension bilden.

### **2.2.4. Anästhesie**

Alle Injektionsnarkotika werden unter sterilen Bedingungen in einer Mischspritze aufgezogen und als Kombinationsnarkose intraperitoneal appliziert:

- Midazolam (1 mg/ml) in der Dosierung: 5 mg/kg KGW
- Fentanyl (0,05 mg/ml) in der Dosierung: 0,05 mg/kg KGW
- Dormitor® (Medetomidin, 1 mg/ml) in der Dosierung: 0,5 mg/kg KGW .

Die Narkosedauer dieser Injektionsanästhesie beträgt ca. 50 min.

### **2.2.5. Orthotopes Xenotransplantationsmodell und Pankreatektomie des Pankreaskarzinoms (Resektionsmodell)**

Ein murines orthotopes Xenotransplantationsmodell des Pankreaskarzinoms besteht aus einer Tumorzellinjektion in den Pankreaskörper einer immundefizienten (SCID) Maus (s. Abb 57 B, C, D im Anhang). Dies führt nach einiger Zeit zu einer Tumorentwicklung und entspricht einer palliativen Situation bei einem inoperablen Patienten. Durch die subtotale Pankreatektomie ist es möglich eine klinische Situation nach der kompletten Primärtumorresektion (R0-Resektion) zu simulieren, so dass mit diesem Modell eine adjuvante Therapie durchgeführt werden kann. Beide Tiermodelle helfen unterschiedliche klinische Situationen zu erforschen (Tepel, J. et al., 2004; Tepel, J. et al., 2006).

#### **Orthotope Tumorzellinokulation (murines orthotopes Xenotransplantationsmodell)**

Narkotisierte Tiere wurden vor der Operation gewogen und rasiert. Bei der Operation wurde immer kontrolliert, dass die Tiere nicht auskühlen. Die Cornea wurde mit Hilfe von Bepanthen<sup>®</sup> - Salbe abgedeckt. Die OP-Fläche wurde zunächst rasiert und dann sorgfältig mit Kodan<sup>®</sup> - Spray desinfiziert. Die Tiere wurden in Rückenlage fixiert. In der Linea alba erfolgte erst ein ca. 10 mm langer Hautschnitt, danach ein Bauchdeckenschnitt. Nach der Magenvorlagerung wurde der Pankreaskörper mit einem feuchten Watteträger fixiert und die Tumorzellsuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen in 30  $\mu$ l Matrigel) unter die Kapsel im Bereich des Duodenums langsam orthotop injiziert (Tepel, J. et al., 2004; Liu, J. et al., 2006). Die Kanüle wurde einen Augenblick im Pankreasgewebe belassen, damit das Matrigel sich erwärmen und aushärten konnte. Dadurch bildet sich eine Matrigelkugel im Pankreasgewebe und ein Herausfließen der Zellen wird so verhindert (s. Abb. 57 B-D im Anhang). Die Bauchdecke und die Haut wurde zweischichtig mit fortlaufender Naht mit Vicryl<sup>®</sup> 6-0 verschlossen. Nach einer Ohrenmarkierung wurden die Tiere in Gruppen eingeteilt.

### **Subtotale Pankreatektomie und Resektion eines Pankreaskarzinoms (Resektionsmodell)**

Die Resektion eines Pankreaskarzinoms erfolgte 10 Tage nach der Zelinokulation. Der initiale Teil der OP erfolgte wie eben beschrieben. Nach der Magenvorlagerung wurde der vor 10 Tagen gesetzte Tumor (4-5 mm größer) entdeckt, dann vorsichtig ligiert und vollständig abgesetzt (s. Abb. 57 E im Anhang). Die Bauchdecke und die Haut wurde zweischichtig mit fortlaufender Naht mit Vicryl 6-0 verschlossen (Tepel, J. et al., 2006).

#### **2.2.6. Postoperative Phase**

Nach der Operation wurden die Tiere stabil gelagert, um innere Blutungen zu vermeiden. Die operierten Tiere wurden gegen Schmerzen mit Buprenorphin (Temgesic<sup>®</sup>) in der Dosierung 0,1 mg/kg KGW subkutan alle 8 Stunden über 2 Tage und mit 0,5 ml einer 5 % Glucose- Lösung in der Dosierung 0,5 ml pro Tier (ca. 20 g) versorgt. 50 Minuten nach der Narkoseeinleitung wurden diese mittels subkutan applizierter Antagonisten antagonisiert.

#### Antagonistvorbereitung :

Alle Medikamente werden unter sterilen Bedingungen in einer Mischspritze aufgezogen und subkutan appliziert.

- Anexate<sup>®</sup> (Flumazenil, 0,1 mg/ml), in der Dosierung: 0,5 mg/kg KGW
- Naloxon (0,4 mg/ml) in der Dosierung: 1,2 mg/kg KGW
- Antisedan<sup>®</sup> ( Atipamezol, 5 mg/ml) in der Dosierung: 2,5 mg/kg KGW

#### **2.2.7. Sektion**

Die Tiere wurden narkotisiert (wie in Pkt. 2.2.4. beschrieben) und getötet. Die getöteten Mäuse wurden auf den Rücken gelegt und fixiert. Das Abdomen wurde auf der Linea alba geöffnet. Die entnommenen Gewebe: Tumor, zu erkennende Metastasen, Leber, Pankreas, Nieren und Milz wurden makroskopisch betrachtet, vermessen, gewogen und in Einbettmedium in 1,8 ml NuncRöhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Die pathologischen Befunde wurden protokolliert und fotodokumentiert (s. Abb. 57 F, 60 im Anhang).

Die manuelle Messung des Tumolvolumens erfolgte nach der Ellipsoidformel:

$$\text{Tumolvolumen (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Tumurlänge (mm)} \times \text{Tumorbreite (mm)} \times \text{Tumortiefe (mm)}}{2}$$

## 2.3. Bildgebende Verfahren

### 2.3.1. Lumineszenzmessung mittels optischer Kammer

Die in unserem Versuch verwendete Biolumineszenz ist eine natürlich vorkommende Reaktion, die durch das Enzym Luciferase die Oxidation von Luciferin katalysiert (Jenkins, D. E. et al., 2003(2)). Die Biolumineszenz-Bildgebung wurde für viele Mausmodelle in der Krebsforschung verwendet, zum Beispiel in einem Prostatakrebsmodell (Jenkins, D. E. et al., 2003(1)), einem Lymphommodell (Shu, S.T. et al., 2007), einem Leberkarzinommodell (Wang, Y. et al., 2007), einem Nierenzellkrebsmodell (Yuasa, T. et al., 2005), einem Fibrosarkommodell (Wu, C. C., 2010), einem Glioblastommodell (Dinca, E.B., et al., 2007) auch für den Nachweis von Lebermetastasen im *vivo*-Modell (Smakman, N. et al., 2004). Das Licht emittieren nur lebensfähige Tumorzellen im Lumineszenz-Imaging, dies hat den Nachteil, dass die Information über einen nekrotischen Tumor nicht vollständig wurde (Chishima, T. et al., 1997).

Durch das optische Verfahren bekommt man funktionelle Informationen über den Zustand der Tumorzellen durch steuerbare Lumineszenz-Reportergene (Abb. 6, 7). Diese Methode wird verwendet, um bei der Tumorzellinokulation oder bei anderen Formen der Transplantation festzustellen, ob die Transplantation gelungen ist. Wenn ein optisches Signal sichtbar wird, sind die markierten Zellen vorhanden. Das Prinzip „wenn ein Signal erscheint, sind Tumorzellen (Metastasen) vorhanden“ verbessert die diagnostische Detektion von Tumoren und deren Metastasen. Man bekommt mehr Informationen *in vivo* über die Tumorentwicklung und die therapeutische Wirkung eines neuen Medikaments (Abb. 9).

Zur Herstellung der Biolumineszenz ist die Verwendung von Luciferin nötig, welches in Anwesenheit von Luciferase ein solches Signal emittiert. Die Zelllinie

PancTu1Luc liegt als stabil transfizierte, das Enzym Luciferase exprimierende Variante vor und gibt in der Zelle 15 min nach einer Injektion von D-Luciferin (s. Abb. 6, 7) (Xenogen Corporation, USA, 10 µl/g KGW) ein Signal ab. Dies erlaubt eine Lumineszenzmessung der Zellen und der Tumoren *in situ* mit der optischen NightOwl Kammer LB 983 (EG&G Berthold Technologies, Bad Wildbad).

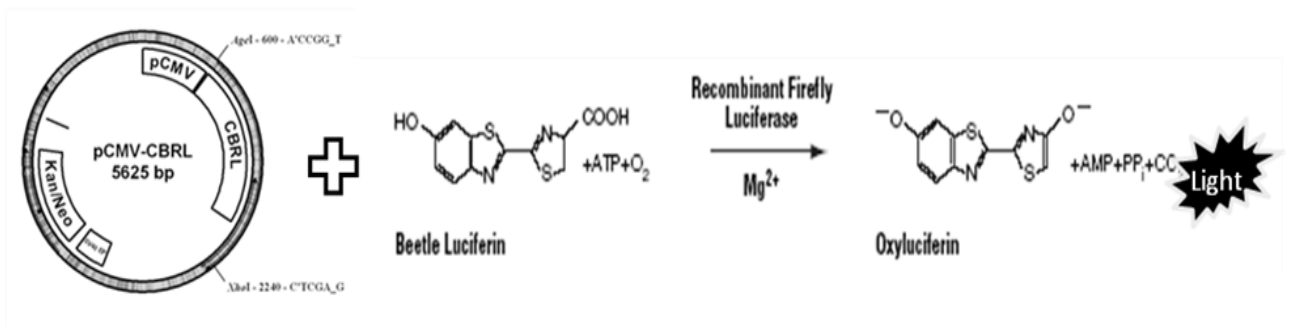


Abb. 6: Die Luciferase bewirkt in Gegenwart von Sauerstoff und ATP das Leuchten von D-Luciferin (nach [www.enzyklo.de/Begriff/Luciferase](http://www.enzyklo.de/Begriff/Luciferase) abgebildet)

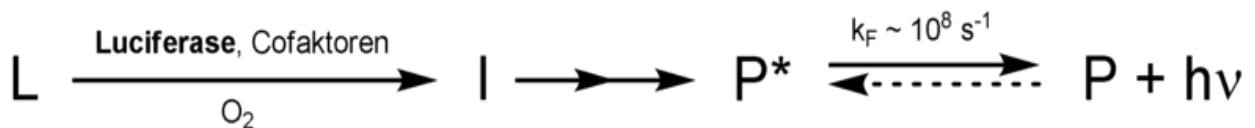


Abb. 7: Luciferine werden durch Luciferase unter Verbrauch von Sauerstoff umgesetzt, wodurch ein Molekül in den elektronisch angeregten Zustand  $P^*$  übergeht. Nach einer kurzen Lebenszeit wird ein Photon emittiert, und das angeregte Molekül  $P^*$  gelangt wieder in den Grundzustand  $P$ . Dabei wird ein Lichtquant ( $h\nu$ ) emittiert (nach [www.de.wikipedia.org/wiki/Luciferin](http://www.de.wikipedia.org/wiki/Luciferin) abgebildet).

Das *in vivo* Imaging System NightOwl III LB 983 von Berthold Technologies (Abb.62) verfügt über höchst sensitive CCD-Kameras (16-bit, gekühlt auf  $-80^\circ\text{C}$ ). Das Gerät enthält eine beleuchtete CCD-Kamera (2184 x 1472 Pixel), die sich in einem gekühlten, lichtdichten Gehäuse befindet. Die Anregungsquelle ist ein Ringlicht für die eingesetzte Aufsicht-Beleuchtung und lässt sich individuell einstellen.

D-Luciferin wurde in der Menge 10 µl/g KGW in die narkotisierte Maus intraperitoneal injiziert. Nach 15 Minuten wurde die Maus in die optische Kammer der NightOwl gelegt (Abb.62). Zunächst wurde ein Bild gemacht, um die Lage der Maus in der Kammer zu dokumentieren. Zur Anregung wurde ein 550 nm Filter und für die Emission 605 nm verwendet. Als Belichtungszeiten wurden 2 Sekunden und 1

Minute ausgewählt (s. Abb. 8).

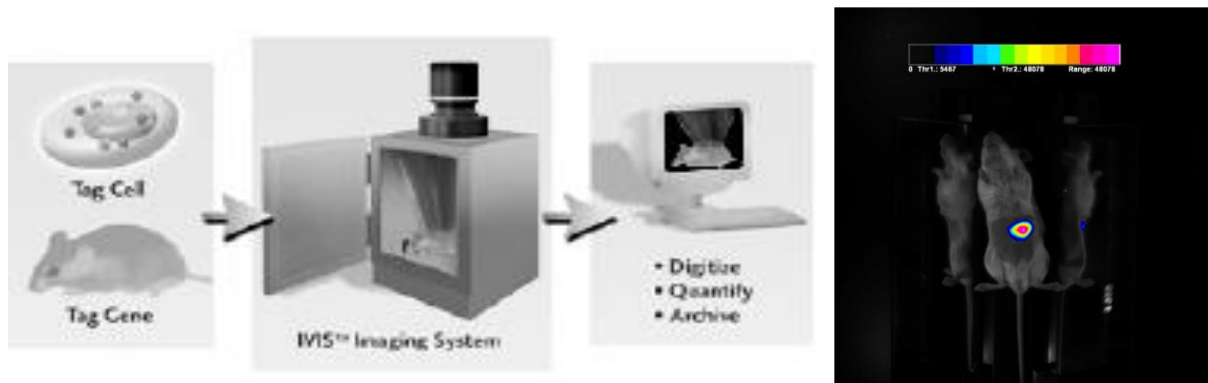


Abb. 8: Nach einer Injektion von D-Luciferin (10  $\mu$ l/g KGW) emittiert die Luciferase Photonen. Dies erlaubt eine Lumineszenzmessung der Zellen *in situ* mittels der optischen Kammer.

Mit der WinLight 32-Software wurden Signale aus dem Lumineszenz-Bereich berechnet. Die Signale wurden in ph/s gemessen. Die Lumineszenzbilder wurden von der Software WinLight mit dem Kontrollbild vom selben Tier überlagert (s. Abb. 9).

Das Signal aus der NightOwl lässt sich auf folgende Weisen auswerten:

- Summe Graustufenwert (Sum Grey);
- Graustufenwert bezogen auf die Fläche (Mean Grey);
- Fläche.

In der Arbeit werden Mean Grey Werte (Graustufenwert bezogen auf die Fläche, cts/mm<sup>2</sup>s) präsentiert.

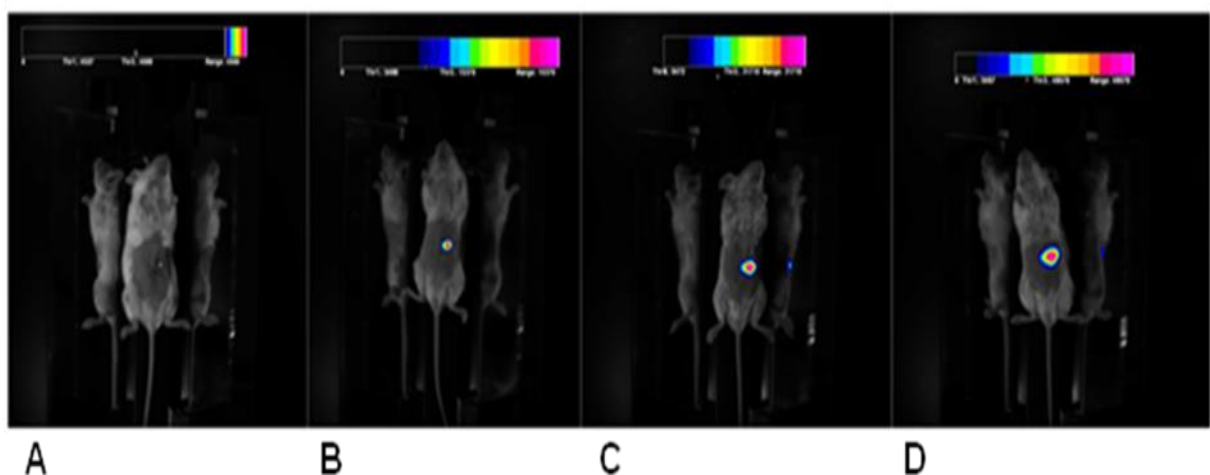


Abb. 9: Die Entwicklung eines Pankreastumors *in situ*, Lumineszenzmessung: am postoperativen Tag 7 (A); am postoperativen Tag 12 (B); am postoperativen Tag 17 (C); am postoperativen Tag 21 (D).

### 2.3.2. Kleintierultraschall

Die nicht invasiven Mikro-Ultraschall-Eigenschaften (wie die Schmelzverfahren und Breitband) erlauben fast für jede klinische Anwendung die Frequenzwahl. In unserer Studie wurde das Hochfrequenz-Kleintierultraschall von VisualSonics Vevo® 770 Imaging System (Toronto, Canada) angewendet, welches eine Auflösung von 30 µm besitzt.

Für die Arbeit wurde der Schallkopf RMV706 (20-60 MHz) verwendet (s. Abb. 58). Die Aufnahmen wurden in sagittaler und transversaler Richtung bei 100 µm regelmäßigen Abständen aufgenommen (s. Abb. 10).

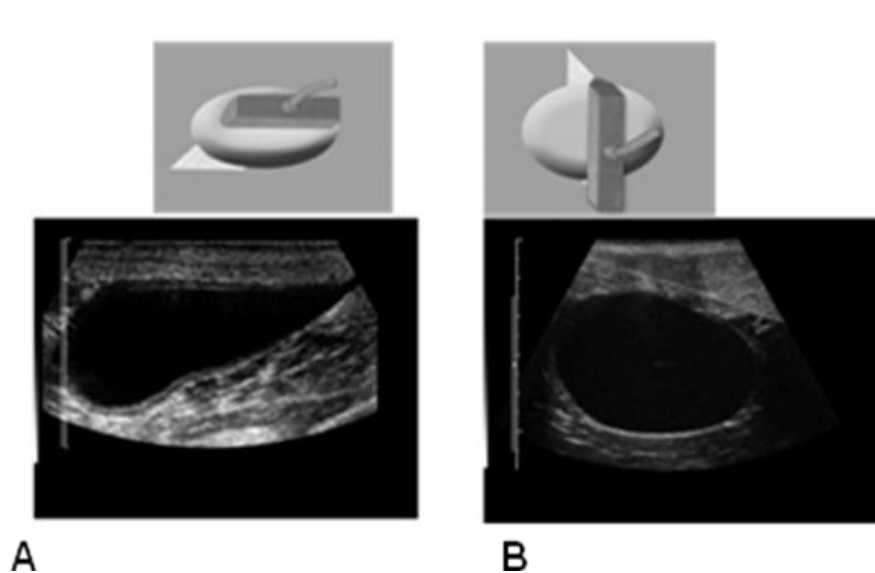


Abb.10: Unterschied bei sagitalen und transversalen Ultraschallaufnahmen einer Harnblase: Sagitalaufnahme (A); Transversalaufnahme (B).

Nach einer 3D-Bildaufnahme durch VisualSonics Vevo® 770 Imaging System wurden die Tumore mit Hilfe der Vevo®-Software volumetriert (s. Abb.11).

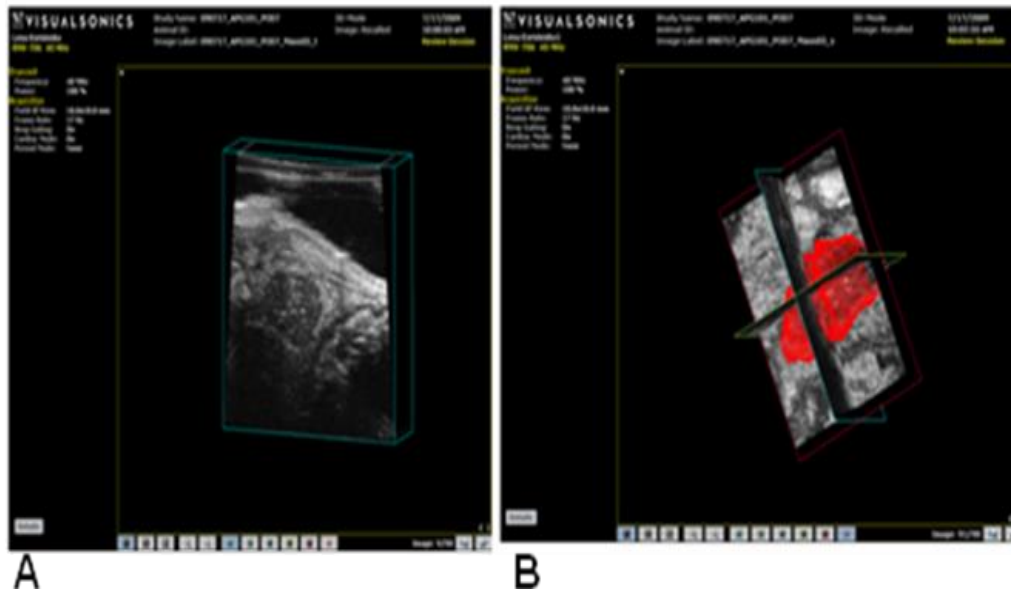


Abb. 11: Ultraschall-Imaging von VisualSonics Vevo® 770 Imaging System (Toronto, Canada): 3D-Tumoraufnahme (A); ein mit Hilfe der Vevo®-Software volumetrierter Tumor (B).

Für die regelmäßig durchzuführenden Untersuchungen (Sonographie und Lumineszenzmessung) wurden die Tiere ebenfalls mittels der bereits beschriebenen Methode narkotisiert (s. 2.2.4.). Die Untersuchungsdauer beträgt für die Ultraschalluntersuchungen ca. 20 min (Abb. 58, 59) und für die Lumineszenzmessung in der NightOwl ca. 30 min.

## 2.4. Histologie

### 2.4.1. Gewebeaufarbeitung

Nach der Sektion wurde eine Kryofixierungsmethode verwendet. Die entnommenen Organe (Tumor, Metastasen, Leber, Pankreas, Nieren und Milz) wurden mit dem Einbettmedium in 1,8 ml NuncRöhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert und danach in eine -80°C - Tiefkühltruhe umgelagert.

In einem Mikrotom-Kryostat HM 500 OM befindet sich eine Gefrierkammer, in der die Temperatur in einem Bereich von -10 bis -60°C konstant bleibt. Für jedes Gewebe wurde eine individuelle Temperatur auf dem Objektträger und in der Kammer eingestellt. Es wurden verschiedene Temperaturen für unterschiedliche Gewebe

empfohlen, z. B.:

- Bereich A -10 bis -20°C: Leber, Niere, Milz, Lymphknoten
- Bereich B -20 bis -30°C: Lunge, Pankreas, Muskel, Nebennieren
- Bereich C -30 bis -60°C: Fettgewebe

Die Gewebeschnitte wurden in ca. 4-5 µm Stärke hergestellt und auf den Objektträger aufgebracht. Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach wurden die Objektträger in einem Kunststoffbehälter unter Vakuum (-0,6 bar) in Kunststoffbeutel eingeschweißt und anschließend bei -20°C gelagert. Zur Analyse wurden die Gewebeschnitte eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut, getrocknet und entsprechend der Fragestellung gefärbt.

#### **2.4.2. Hämalaun-Eosin-Färbung**

Das Prinzip der HE-Färbung besteht darin, dass Hämalaun alle sauren Strukturen blau färbt. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der alle acidophilen bzw. basischen Strukturen rot färbt. Ergebnis einer HE-Färbung ist, dass die basophilen Zellstrukturen z. B. Kerne blau und basischen (eosinophilen) Strukturen wie Zytoplasmaproteine das Zytoplasma rot erscheinen. Um morphologische Gewebestrukturen zu erkennen, wurde eine HE-Färbung durchgeführt.

Aufgetaute Schnitte wurden 7 Min in Aceton fixiert und 10 Min getrocknet, dann kurz in Aqua dest. rehydriert.

Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

- 1) 2 Min Hämatoxylin
- 2) mit Aqua dest. spülen
- 3) 1 Min in 1 % HCl in 70 % Alkohol differenzieren
- 4) 5 Min mit Leitungswasser, dann kurz mit Aqua dest abspülen
- 5) 1 Min Eosinlösung (1 % Eosin in 50 % Alkohol)
- 6) schnell in aufsteigender Alkoholreihe 70 % - 96 % - 100 % entwässern
- 7) 5 Min Xylol-Alkohol 1:1
- 8) 5 Min Xylol

9) Eindeckeln mit DePex

### **2.4.3. Immunhistologische Färbung**

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die Proteine (Antigene) werden mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Der Antikörper, der an ein Antigen (Epitop) bindet, wird als ein Primärantikörper bezeichnet.

In dieser Arbeit wird mit Hilfe der immunochemischen Färbetechnik das Proliferationsvorkommen mit dem Zellzyklus-Marker Ki-67 in mit Zytokeratin (KL 1)-markiertem Humangewebe in experimentellen, orthotopen Tumoren untersucht. Für die Einzelfärbungen von KL 1 und Ki-67 wurde die Meerrettichperoxidase-Methode und für die Doppelfärbung (KL 1 & Ki-67) wurde eine simultane Verwendung von Alkalischer Phosphatase und Meerrettichperoxidase verwendet.

#### **Ki-67-Protein**

Das Antigen Ki-67 ist ein nukleäres Protein mit einem Molekulargewicht von 395 und 345 kDa und wurde als ein „Proliferationsmarker“ bekannt (Schluter, C. et al., 1993). Das Ki-67 Antigen wird während aller aktiven Zellzyklusphasen (G1-, S-, G2-Phase) im Zellkern und während der Mitose meistens an der Oberfläche der Chromosomen mit der Immunfärbung nachgewiesen. Man beobachtete, dass Ki-67 während der G1-Phase auch extranukleär vorkommt (Bridger, J. M. et al., 1998), wodurch bei den teilungsaktiven Zellen phasenabhängig eine starke Kern- oder teilweise auch eine Zytoplasmafärbung vorhanden ist. Die Zellen in der G0-Phase werden nicht markiert, da in ruhenden Zellen das Ki-67-Protein fehlt (Scholzen, T. und J. Gerdes, 2000). Routinemäßig werden Ki-67 Protein-Antikörper in der Diagnostik humaner Tumore benutzt. Ki-67-positive Tumorzellen korrelieren oft mit dem klinischen Verlauf der Krebserkrankung (Scholzen, T. und J. Gerdes, 2000).

In dieser Arbeit wird für die Markierung des Ki-67-Proteins der monoklonale, murine Ki-67-Antikörper (Klon MIB-1) verwendet. Man erstellt und ermittelt mit dem Ki-67-Antikörper einen Markierungsindex proliferierender Zellen im Gewebe (Gerdes, J. et

al., 1992; Cattoretti, G. et al., 1992).

### **Breitspektrumantizytokeratin (Klon KL 1)**

In der Zytokeratingruppe sind mindestens 29 verschiedene Proteine spezifisch für epitheliale Zellen. Es gibt zwei Arten von Zytokeratinen: die Zytokeratine mit saurem pH-Wert werden als Typ-I, basische oder neutrale als Typ-II Zytokeratine bezeichnet. Die Typ-II- Zytokeratine sind 8 kDa größer als ihre Typ-I - Gegenstücke (Kim, K.H. et al., 1983; Moll, R., et al., 1982).

Der Antikörper Klon KL 1, ein Breitspektrumantizytokeratin, hat eine positive Reaktion auf humanem epitheliale Gewebe (Thymus, Schilddrüse, Bronchien, Magen und Darm) und deren Neoplasien. Die immunhistologische Färbung von Epithelkarzinomen zeigt ein intensives Reaktionsmuster mit Klon KL 1 (Fukushima, S. et al., 1987). Der Antikörper markiert die plattenepitheltypischen (humane Zytokeratine mit einen MW von 52, 54, 56, 58, 65,5 und 68 kDa) und zylinderepitheltypischen Polypeptide (humane Zytokeratine: MW 40, 45, 46, 48, 50 und 56 kDa) und zeigt damit ein sehr breites Spektrum (Ansai, S.I. et al., 1993). Deswegen wird das Zytokeratin (Klon KL 1) in der Humanmedizin und in der Forschung als Werkzeug für die Tumoridentifikation und Klassifikation eingesetzt (Chosia, M. A. et al., 1989).

### **Optimale Verdünnung des Primärantikörpers**

Es wird eine optimale Arbeitsverdünnung hergestellt und eine genaue Inkubationszeit für den Primärantikörper festgelegt. Bei einer optimalen Arbeitsverdünnung wird der Antikörper in einer Menge eingesetzt, mit welcher die Zellen/Schnitte eine klare spezifische Färbung ohne Hintergrundfärbung erreichen. Dabei wurden die Empfehlungen der Antikörperhersteller berücksichtigt.

### **Antikörper**

In dieser Arbeit wurden folgende Primärantikörper verwendet:

Mit dem *monoklonalen, murinen Zytokeratin Antikörper* (Klon KL 1, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) gegen ein humanes Zytokeratin wurden humane epitheliale Zellen nachgewiesen. Die empfohlene Verdünnung ist 1:100.

Der *monoklonale, murine Ki-67-Antikörper* (Klon MIB-1, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) wurde gegen humanes Ki-67-Protein, als Proliferationsmarker in den humanen Zellen verwendet. Die empfohlene Verdünnung ist 1:80.

Als sekundärer Antikörper (anti-Maus und anti-Kaninchen) wurden von Dako REAL™ APAAP Immunocomplex (APAAP) und LSAB + System-HRP Kit (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) verwendet.

### **Kontrollen**

In den Untersuchungen wurde das Verdünnungsreagenz des Antikörpers ohne diesen als Negativ-Kontrolle einzusetzen verwendet. Die Kontrollfärbungen wurden parallel zur spezifischen Färbung durchgeführt.

### **Allgemeiner Ablauf der immunhistochemischen Färbung**

Die immunhistochemische Färbung wurde bei einer Raumtemperatur von 20 - 25°C durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Proben während der Färbung nicht austrockneten.

Die bei -20°C gelagerten und Vakuum-verschweissten Schnitten wurden 30 Min bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Schnitte wurden auf dem Objektträger mit dem Markierstift umrandet und anschließend fixiert. Um die freien Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte zuerst 10 Min in 2 % PFA in PBS bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ein Mal in PBS gewaschen. Dann wurden sie 7 Min in eiskalter Methanol-Aceton-Lösung fixiert und zwei Mal 5 Min in TBS-T gewaschen. Um unspezifische Färbungen und Hintergrundfärbungen beim immunhistochemischen Antigennachweis zu vermeiden, wurden die Schnitte mit serumfreien Proteinblockingreagenz für 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Färbungen (s. Protokollbeschreibung im Anhang) durchgeführt.

#### **2.4.4. Bearbeitung des zytologischen Materials**

Runde Deckgläschen wurden autoklaviert. Dann wurde ein Deckgläschen pro Well in 12-Wellplatten unter sterilen Bedingungen gelegt.

Von PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen wurden je  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well auf Deckgläschen mit RPMI 1640 Kulturmedium (10 % FCS) ausgesät und über Nacht im Brutschrank wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen über 24 h mit 3 µg/ml, 30 µg/ml, 300 µg/ml sCD95Fc, 10 µg/ml Infliximab und einer Kombination aus 30 µg/ml sCD95Fc und 10 µg/ml Infliximab behandelt. Die Kontrolle wurde nicht mit Therapeutika behandelt.

Die Deckgläschen mit angewachsenen Zellen wurden mit PBS zwei Mal gewaschen und direkt im Well mit Methanol-Aceton (1:1) fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen auf dem Deckgläschen mit der LSAB-Methode (s. Protokollbeschreibung im Anhang) gefärbt.

#### **2.4.5. Mikroskopische Auswertung**

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde die Zahl der angefärbten Tumorzellen oder Zellkerne quantitativ ausgewertet.

Fünf Gesichtsfelder des Schnittes wurden unter Verwendung einer 10- und 20-fachen Vergrößerung des Lichtmikroskopes angesehen und mit einer Digitalkamera fotodokumentiert. Danach wurden die arithmetischen Mittelwerte und die Standardabweichung der Ergebnisse einer Behandlungsgruppe (einer Färbeserie) ausgerechnet. Die Gesamtzahl der gezählten Objekte wurde prozentual bewertet.

## **2.5. Zellkulturbedingungen bei der Kultivierung der Pankreaskarzinom-Zelllinien**

In der Arbeitsgruppe wurden die Zellkulturen regelmäßig auf Kontaminationen mit Mykoplasmen getestet (PCR Mycoplasma Detection Set, TaKARa, Roche, USA), da die Mykoplasmen in der Zellkultur die Zelleigenschaften verändern können.

Für die Zellkultivierung wurde Kulturmedium aus RPMI 1640 versetzt mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin 1mM Natrium-Pyruvat und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin verwendet. Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) bestand 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2.

Die Zellkultivierung wird nur unter keimfreien Bedingungen durchgeführt. In 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 10 % FCS/RPMI-1640 Kulturmedium wurde ca. 1x10<sup>6</sup> Zellen ausgesät. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt (bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank kultiviert und täglich mikroskopisch kontrolliert. Das Medium wurde zwei Mal wöchentlich ausgetauscht. Waren die Zellen zu ca. 80 % konfluent gewachsen, wurden sie passagiert. Verbrauchtes RMPI-Medium wurde verworfen und die toten Zellen mit Hilfe von PBS entfernt.

Zum Ablösen der Zellen wurde 10% iges Trypsin eingesetzt. Wenn die Zellen sich im Brutschrank (bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>) vollständig abgelöst hatten, wurden sie aus der Flasche abpipettiert. Zu einem Teil der Zelltrypsinlösung wurden ca. drei Teile FCS-haltiges RMPI-1640 Medium zur Neutralisation des Trypsins dazupipettiert und 4 min bei 1.420 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, und das Zellpellet in RMPI-1640 Medium resuspendiert. Für Versuche wurde eine Zellzahlbestimmung durchgeführt und die benötigte Zellmenge in eine neue Zellkulturflasche mit frischem RMPI-1640 Medium ausgesät.

### **2.5.1. Kryokonservierung von Zellen**

Einfriermedium bestand aus:

90 % FCS

10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)

Für eine Kryokonservierung der Zellen wurden zu einem Zellpellet ca. drei Teile Einfriermedium dazupipettiert und mit je 1 ml in 2 ml Kryoröhrchen resuspendiert. Die gefüllten Kryoröhrchen wurden 24 Stunden in speziellen isopropanolhaltigen Einfrierboxen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend zur längeren Lagerung in Stickstoff eingefroren.

### 2.5.2. Bestimmung der Zellzahl

Jeder *in vitro*-Versuch schließt eine Zellzählung ein. Die Zellzahlbestimmung kann entweder mit der Neubauer-Zählkammer, oder mit einem elektronischen Zählgerät (Casyton) durchgeführt werden.

#### Zählkammer:

Die Neubauer-Zählkammer und das Deckglas wurden mit 70 % Alkohol gereinigt. Danach wurde die Zählkammer befeuchtet und das Deckglas leicht angedrückt, bis man Newtonsche Ringe sieht. 10  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurde mit 10  $\mu\text{l}$  4 %-Trypan-Blau-Lösung versetzt, und 10  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension wurden in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Durch Trypan-Blau werden tote Zellen, deren Membran durchlässig ist, blau-grau angefärbt. Lebende Zellen mit intakter Membran dagegen bleiben ungefärbt. Um die durchschnittliche Zellzahl pro Milliliter zu berechnen, wurde der Mittelwert der gezählten Zellen in vier Großquadraten verwendet.

Die Zellzahl wurde pro 1 ml nach folgender Formel berechnet:  
 $\text{Zellen} \times 10^4 \text{ pro ml} = \text{Mittelwert der Zellen in vier Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ .

#### Zellzahlmessung mit dem Casyton-Zählgerät

50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension werden in 5 ml isotoner Casyton-Salzlösung resuspendiert. Es ist drauf zu achten, dass die Zellproben keine Luftblasen haben und frei von Schaum sind. Vor dem Messbeginn durchlief das Gerät mehrere Reinigungszyklen.

### 2.5.3. Zellwachstumsuntersuchung

Die Wirkung von sCD95Fc, Infliximab (Remicade<sup>®</sup>) und die Kombination von

Infliximab und sCD95Fc wurden auf PADC (Zelllinien PancTu1*Luc*, PancTu1 und Panc1) untersucht. Dafür wurde eine bestimmte Zellzahl ( $1 \times 10^5$  auf 6-Well-Platten) in RPMI-1640 Kulturmedium mit 10 % FCS ausgesät und über Nacht zum Anwachsen bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium mit der notwendigen Medikamentenkonzentration eingesetzt und verbrauchtes Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeitspannen bei 37°C inkubiert. Für die Auswertungen wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Alle behandelten Zellen wurden mit Accutase abgelöst und mit Medium (1:2) bei 1.420 rpm und Raumtemperatur für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in Medium resuspendiert. Die Zellzahl lebender Zellen der Kontrollgruppe wurde mit verschiedenen Behandlungsgruppen verglichen.

## **2.6. Zellbiologische Testverfahren**

### **2.6.1. Durchflusszytometrie (FACS)**

Das Prinzip der FACS- Messung basiert ebenfalls auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei wird für den Nachweis von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen ein fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet. Bei Zellzyklus- und Apoptoseanalysen wurde ein RNA/DNA- bindender Farbstoff (Propidiumiodid und DAPI) eingesetzt. Die einzeln durch eine Kapillare gesaugten Zellen wurden im Sensor modul mit einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Die von den Zellen abgegebenen optischen Signale wurden mittels Photodetektoren nachgewiesen. Die Stärke des detektierten Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge an gebundenem Antikörper.

Nach der durchflusszytometrischen Messung wurden die Ergebnisse in einer Graphik, dem sog. Dot-Plot dargestellt, in dem jeder Punkt einer Zelle entspricht. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, Licht im flachen Winkel) charakterisiert das Zellvolumen und das Seitwärtsstreulicht (SSC, Licht im rechten Winkel) die Zellgranularität, die Nukleusgröße und deren Struktur.

### **2.6.2. ELISA**

In dieser Arbeit basieren die durchgeführten ELISA (enzyme-linked immunosorbent Assay) auf der quantitativen Sandwich- Enzymimmunoassay-Technik. Es wurden zwei spezifische Antikörper verwendet, die beide an unterschiedlichen Stellen am Antigen binden. Mit dem Capture Antikörper wurde zuerst eine 96-Well-Platte beschichtet und über Nacht inkubiert. Das Antigen aus der zugebenen Probe bindet an den vorhandenen Antikörper. Jede Probe wurde doppelt eingesetzt. Es wurde parallel immer eine Standardkurve mit angesetzt. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Platte mit einem vom Hersteller angebotenen Puffer gewaschen. Ein Detektions-Antikörper bindet an ein anderes Epitop des Antigens, so entsteht ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, an den ein Enzym gekoppelt ist. Im nächsten Schritt wurde ein Chromogensubstrat an das Enzym gebunden, was zu einer Farbreaktion führt. Nach der im Kit angegebenen Zeit wurde die Farbreaktion mit 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und im Photometer gemessen.

#### **Human CD95L**

Um zu messen, ob humaner CD95L in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten vorhanden ist, wurde ein ELISA für CD95L durchgeführt.

Die Zelllinien PancTu1*Luc*, PancTu1 und Panc1 wurden in der Menge von  $1 \times 10^5$  in 6-Well-Platte über 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h mit RPMI-1640 Kulturmedium 10 % FCS kultiviert. Nach den Inkubationen wurden die Überstände eingesammelt, und die Zellen jedes Wells gezählt.

Der ELISA wurde mit dem „Human Fas Ligand/TNFSF6 Immunoassay“ (R&D Systems, Wiesbaden) durchgeführt. Kit-Reagentienvorbereitung und Assaydurchführung wurden nach den Angaben des Herstellers gemacht.

### **2.6.3. Zellproliferationsassay (EZ4U)**

Für das Zellproliferationsassay wurde ein EZ4U Kit (Biomedica, Wien, Österreich) verwendet. Zellproliferations- und Zytotoxizitätstest werden verwendet, um mitochondriale Aktivitäten in den „behandelten“ Zellen zu messen. Die wasserlöslichen schwachgefärbten Tetrazoliumsalze diffundieren durch die

Zellmembran von lebenden Zellen und bilden ein intensiv rot gefärbtes Formazanderivat. Vitale Zellen werden gefärbt und photometrisch bestimmt.

$1 \times 10^4$  Zellen/Well wurden in einer 96-Well Mikrotiterplatte in 100  $\mu$ l RPMI 1640-Kulturmedium ausgesät und im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ ) über Nacht inkubiert. Danach wurde verbrauchtes Medium verworfen und 100  $\mu$ l RPMI 1640-Kulturmedium mit 10 % FCS hinzugeben. Nach der Behandlung und Inkubation über 24 und/oder 48 Stunden wurde 10  $\mu$ l EZ4U-Farbstofflösung (Substrat) zu 100  $\mu$ l Zellkultur zugegeben und 2 und 4 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Absorption wurde photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Ergebnisse aus verschiedenen Behandlungsgruppen wurden mit der Kontrollgruppe verglichen.

### **2.6.4. Vitalitätsassay (Kristallviolett Assay)**

Im Assay wurde die relative Dichte von wachsenden Zellen nach der Behandlung photometrisch gemessen. Die nach der Behandlung gestorbenen Zellen verlieren ihre Adhärenz und werden mit einem Waschschrift entfernt. Die Nuklei von verbliebenen adhären Zellen nehmen das Kristallviolett auf. Danach wurden die Zellen mit Methanol lysiert und photometrisch gemessen.

Dieser Assay wurde in 96-Well-Platten mit verschiedenen Zellzahlen, mit den Zelllinien PancTu1*Luc*, PancTu1 und Panc1 mit Therapeutikabehandlungen durchgeführt. Die Zellen wurden ( $1 \times 10^4$ /Well) in 96-Well-Platten ausgesät und über Nacht mit 10 % FCS-Medium kultiviert. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und mit 100  $\mu$ l Therapeutikumansatz (3  $\mu\text{g/ml}$ , 30  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$  von sCD95Fc, 10  $\mu\text{g/ml}$  von Infliximab und einer Kombination aus 30  $\mu\text{g/ml}$  sCD95Fc und 10  $\mu\text{g/ml}$  Infliximab) im Medium mit 0,5 % FCS auf die Zellen für 24 h, 48 h, 72 h gegeben. Nach diesen Inkubationen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. 50  $\mu$ l/Well Kristallviolett-Lösung wurde für 30 min hinzupipettiert. Danach wurde die Kristallviolett-Lösung komplett abgesaugt und 3-4 Mal mit Aqua dest. gewaschen. Über Nacht wurde die Platte bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Anschließend wurden 200  $\mu$ l Methanol in jede Vertiefung gegeben, mit dem Deckel vergeschlossen und für 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt (bis der Farbstoff vollständig gelöst war). Die optische Dichte wurde bei 590 nm mit einem Photometer

bestimmt. Um die Wirkung einer spezifischen Behandlung festzustellen, wurden die Ergebnisse von Kontrollgruppen mit behandelten Gruppen verglichen.

### 2.6.5. Tumorzellinvasionsassay

Das Prinzip des Assays ist es, die Invasion von Tumorzellen durch eine und/oder Verdauung einer Fibroblasten-Schicht zu bestimmen. Die mit DMSO getöteten, fixierten Fibroblasten wurden mit Trypan-Blau angefärbt. Das invasive Tumorzellpotential entspricht in Anzahl und Größe der ungefärbten Regionen, sogenannter „verdauter Löcher“, in der blauen Fibroblastenschicht.

Die Fibroblasten, Typ KiF-5 ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/Well) wurden in einer 24 Well-Platte mit Medium, welches 10 % FCS enthält, ausgesät. Nach 4 Tagen im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ ) wurden die Fibroblasten mit 200 $\mu\text{l}$  DMSO pro Well für eine Stunde inkubiert, wodurch diese getötet wurden. Die abgetöteten Fibroblasten wurden 3 – 4 Mal mit PBS gewaschen (Kapischke, M. et al., 2008).

Für die Zellzahloptimierung wurde erst ein Vorversuch mit verschiedenen Zellzahlen ohne Behandlung durchgeführt. Die Zelllinien PancTu1*Luc*, PancTu1 und Panc1 wurden mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well ausgesät. Der Vorversuch wurde erst ohne Behandlung der Zellen nur mit Medium durchgeführt. Es wurden jeweils 2 ml Medium mit 0,5 % FCS oder mit 10 % FCS pro Well hinzugegeben und im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$ ) 24 h inkubiert. 100  $\mu\text{l}$  0,2 % Trypan-Blau wurden je Well dazupipettiert und nach 30 min Inkubation mit PBS gewaschen. 1 ml PBS wurde in jede Vertiefung gegeben und jedes Well fotografiert.

Nach der Zellzahloptimierung wurden die Tumorzellen in mit einer „Fibroblasten-Schicht“-vorbereitete 24-Well-Platte ausgesät. Die Behandlung wurde über 24 h, 48 h, 72 h im Medium mit 0,5 % FCS mit sCD95Fc in den Konzentrationen von 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und in Kombinationstherapie aus 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Remicade<sup>®</sup> und 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sCD95Fc, sowie einer unbehandelten Kontrolle durchgeführt. Dann wurde 100  $\mu\text{l}$  0,2 % Trypan-Blau je Well dazu pipettiert, und nach 30 min Inkubation mit PBS gewaschen. 1 ml PBS pro Well wurde dazugegeben und fotomikroskopiert. Die Tumorzellinvasivität entspricht der Größe der ungefärbten Regionen in der blauen

Fibroblastenschicht (Trauzold A. et al. 2005). Für die Auswertung wurde die Fläche der ungefärbten Regionen halbquantitativ abgeschätzt: ++++ sehr stark invasiv (100%); +++ stark invasiv ( $\leq 75\%$ ); ++ mittelgradig ( $\leq 50\%$ ); + wenig invasiv ( $\leq 25\%$ ); - keine Invasivität.

## 2.7. Statistische Analyse

Die Originaldaten der *in vivo*- und *in vitro*- Versuche wurden mit dem Softwareprogramm Graph Pad Prism 4<sup>®</sup> (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) statistisch ausgewertet. Die Normalverteilung wurde mit dem D'Agostino und Pearson-Test untersucht. Zur Testung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten mit Normalverteilung wurde der Student's t-Test verwendet. Bei normalverteilten Daten wurden Mittelwert und Standardabweichung (SD) als Säulendiagramm, Linien- und Streudiagramm dargestellt. Die Höhe der Säulen zeigt die Mittelwerte und die Fehlerbalken/säulen die Standardabweichungen an. Zur Übersichtlichkeit wurden die Fehlerbalken nur in einer Richtung dargestellt.

Die nicht-normalverteilten Daten wurden als Box-Plot mit Median angegeben und mit Mann-Whitney-U-Test (MWT) geprüft. Dadurch werden die Ergebnisse von asymmetrisch verteilten Werten (Ausreißern) praktisch kaum beeinflusst. Die Box wird durch einen Balken geteilt, der den Median widerspiegelt. Der Beginn der Box wird durch die unteren 25% der Werte, und das Ende der Box durch die oberen 75% der Werte (das 25. und 75. Perzentil) gekennzeichnet.

Die n-Zahlen beziehen sich auf die Anzahl der untersuchten Proben oder gemessenen Tumoren. Das Statistikprogramm Graph Pad Prism 4<sup>®</sup> ermittelt bei der Berechnung der Korrelation den dazugehörige Signifikanzwert (p-Wert). Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Drei wesentliche Signifikanzniveaus wurden mit Sternchen ausgedrückt (1, 2 und 3 Sterne):

- \*\*\*: p-Wert  $\leq 0,001$ , höchst signifikant;
- \*\* :  $0,001 \geq$  p-Wert  $\leq 0,01$ , hoch signifikant;
- \* :  $0,01 \geq$  p-Wert  $\leq 0,05$ , signifikant;
- n.s.: p-Wert  $> 0,05$ , nicht signifikant.

Mit der Korrelation lässt sich der Zusammenhang zwischen zwei Variablen quantifizieren und wird somit von Graph Pad Prism 4<sup>®</sup> Programm (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) präziser untersucht. Die Korrelation wird durch ein Bestimmtheitsmaß von zwei Variablen, den Korrelationskoeffizienten  $r$ , beschrieben. Das entsprechende statistische Verfahren zwischen den Variablen X und Y wird als lineare Regression vorausgesetzt. Ein Zusammenhang zwischen den untersuchten Werten wird jeweils in Wertepaaren beschrieben, dann erhält man eine Punktwolke in einer zweidimensionalen Graphik. Jedes Paar stellt hier einen Punkt dar, wobei ein Wert auf der Abszisse (X-Achse) und der zweite Wert auf der Ordinate (Y-Achse) aufgetragen werden. Die Werte der Korrelation können zwischen 1 und -1 sein. Bei einem Korrelationskoeffizient  $> 0$  besteht ein positiver linearer Zusammenhang zwischen den betrachteten Variablen. Wenn der Koeffizient den Wert 0 aufweist, hängen die beiden Variablen überhaupt nicht linear voneinander ab. Ein Wert  $< 0$  kennzeichnet einen negativen linearen Zusammenhang. Je höher die Korrelation zwischen den beiden Variablen ist, desto näher liegt der Korrelationskoeffizient  $r$  an 1, je schwächer die Korrelation ist, desto näher liegt  $r$  bei 0. Die Stärke der Korrelation kann wie folgt kategorisiert werden:

<b>Betrag des Korrelationskoeffizienten</b>	<b>Mögliche Interpretation</b>
0	Keine Korrelation
$\pm 0$ bis $\pm 0,2$	Sehr schwache Korrelation
$\pm 0,2$ bis $\pm 0,4$	Schwache Korrelation
$\pm 0,4$ bis $\pm 0,6$	Mittlere Korrelation
$\pm 0,6$ bis $\pm 0,8$	Starke Korrelation
$\pm 0,8$ bis unter $\pm 1$	Sehr starke Korrelation
1	Perfekte Korrelation

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Therapieverfahren und Behandlung der Tiere

Die Bindung des CD95-Liganden an seinen Oberflächenrezeptor kann eine große Rolle bei der Erhöhung von Motilität und Invasivität in Apoptose resistenten Pankreastumorzellen spielen (Matsumoto, K. et al., 1995; Miwa, K. et al., 1998; Tsutsui, H. et al., 1999; Trauzold, A., et al., 2005), weil das in vielen Tumorzellen nicht zum apoptotischen sondern zum inflammatorischen Weg führt (Matsumoto, R. et al., 2007). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob es durch das humane lösliche Fusionsprotein sCD95Fc (s. Abb. 12) möglich ist, die Aktivierung von CD95 zu kontrollieren und die Entzündungsmechanismen zu steuern, um ein Tumorwachstum bzw. die die Ausbreitung zu minimieren.

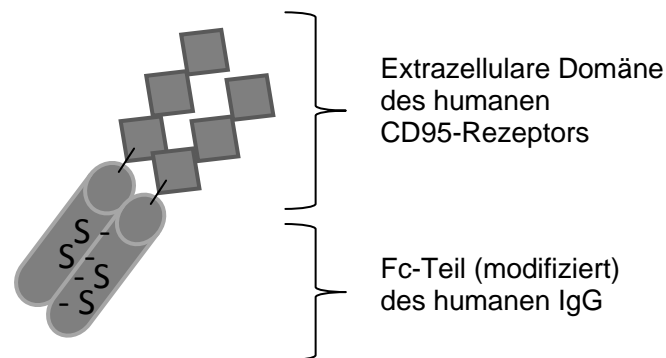


Abb.12: Molekulare Struktur des Fusionsproteines.

Der Inhibitor verhindert die CD95L-vermittelten Apoptose-Signalwege durch Blockade des CD95L, so dass das CD95-System und damit auch der nicht-apoptotische inflammatorische Signalweg inaktiviert wird (s. Abb. 13).

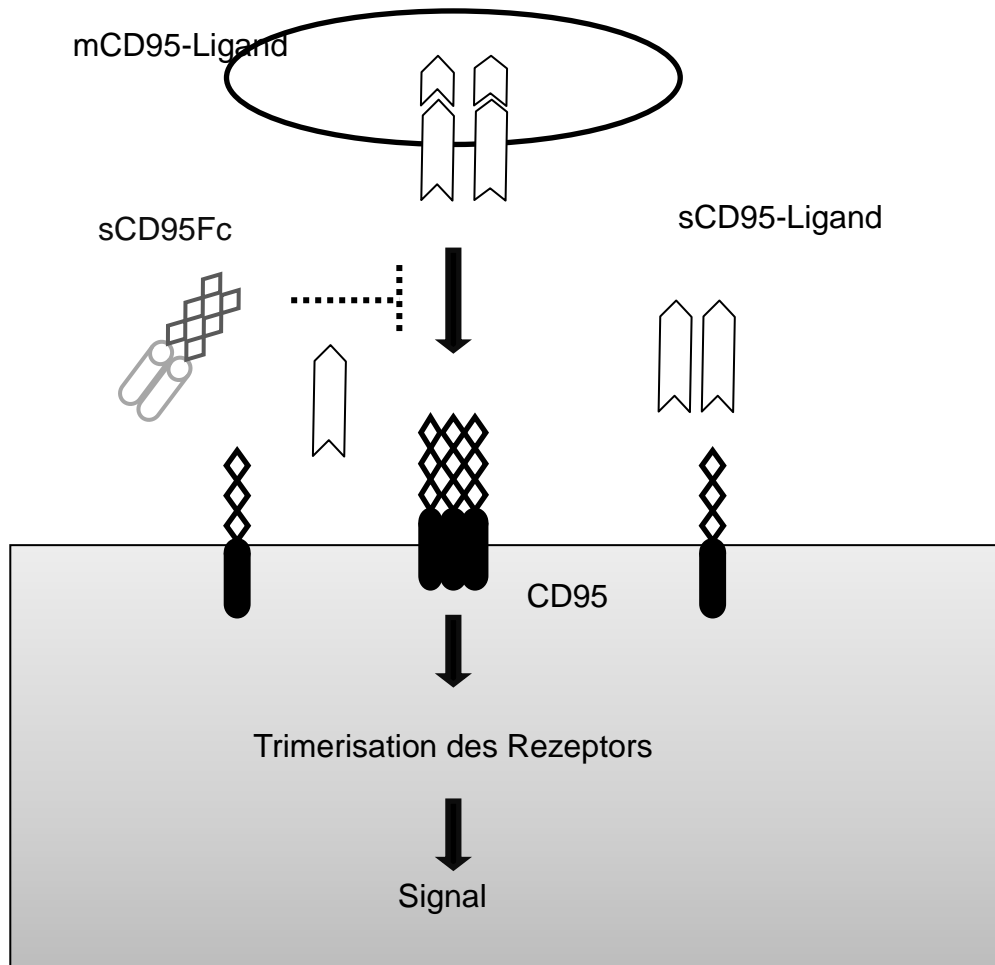


Abb.13: Wirkung des humanen, löslichen Fusionsproteins sCD95Fc. Das humane, lösliche Fusionsprotein des sCD95Fc besteht aus der extrazellulären Domäne des CD95-Rezeptors und der modifizierten (mutierten) Fc-Domäne eines IgG-Antikörpers.

In unserer Arbeitsgruppe war bereits *in vitro* und *in vivo* gezeigt worden, dass ein monoklonaler Antikörper mit murinen variablen Regionen und menschlichen IgG1-Isotyp (s. Abb. 14) gegen TNF- $\alpha$  eine starke Hemmung der Aktivität der Transkriptionsfaktoren NF-kappaB und AP-1 ausübt. Dadurch wird eine Abnahme von uPA- und IL-8-Aktivität entwickelt, was die Metastasenanzahl und das lokale Wachstum reduziert (Scallon, B. et al., 2002; Egberts, J. H. et al., 2008). Infliximab (Remicade<sup>®</sup>) wurde in dieser Arbeit als Vergleichstherapie eingesetzt.

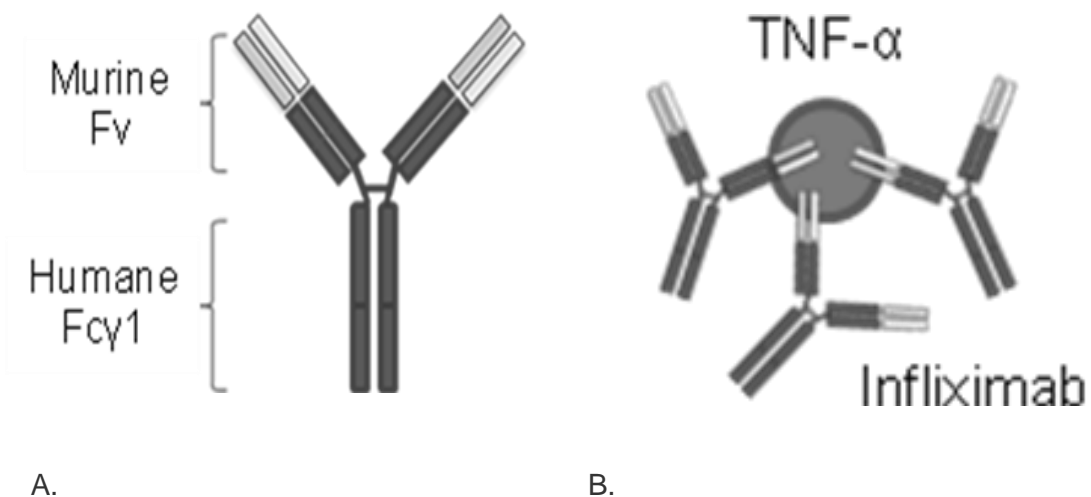


Abb. 14: Molekulare Struktur Infliximab (Remicade<sup>®</sup>): das Protein enthält zu ca. 25 % einen murinen (Maus) Anteil und zu ca. 75 % einen humanen Aminosäureanteil (A) (Moduliert nach Tracey et al., 2008). Infliximab bindet stabile Komplexe sowohl Monomer- und Trimer-Formen des löslichen TNF (sTNF). Überschuss gegenüber TNF kann drei Moleküle von Infliximab für jeden TNF-Trimer binden (B) (Moduliert nach Scallon, B. et al., 2002).

Es wurde eine Kombinationstherapie aus Infliximab (Remicade<sup>®</sup>) und sCD95Fc eingesetzt, so dass gleichzeitig sowohl die Rezeptoren für TNF- $\alpha$  als auch die für CD95L blockiert wurden (s. Tabelle 4).

### 3.2. Tierversuchsplanung

**In der ersten Phase** wurden die adjuvanten und palliativen Behandlungsverfahren an den Versuchstieren in insgesamt vier Behandlungsgruppen durchgeführt. Der Therapiebeginn erfolgte am postoperativen Tag 3 (POD 3) der orthotopen Injektion von PancTu1Luc-Tumorzellen bei der palliativen oder am postoperativen Tag 3 nach Primärtumorresektion bei der adjuvanten Therapie für eine Zeitdauer von je 21 Tagen. Die geplanten Versuche wurden in zwei Phasen durchgeführt. Dafür wurden insgesamt 144 SCID Mäuse benötigt.

Durch eine Gruppengröße von 12 Tieren und 4 Gruppen ergab sich ein Gesamteinsatz von 48 Tieren für die erste Phase (je palliativen und je adjuvanten Behandlungsverfahren, s. Tabelle 4):

## Ergebnisse

- Gruppe 1 (n=12 Tiere, als Kontrollgruppe) wurde mit NaCl (10 µl/g KGW) im 7-tägigen Intervall durch i.p. Injektion entsprechend der Versuchsplanung behandelt.
- Die Tiere der Gruppe 2 (n=12 Tiere) erhielten sCD95Fc (100 µg/g KGW pro Behandlung) durch i.p. Injektion im 7-tägigen Intervall.
- Die Tiere der Gruppe 3 (n=12 Tiere) erhielten Infliximab (Remicade<sup>®</sup>, 10 µg/g KGW pro Behandlung) durch i.p. Injektion im 7-tägigen Intervall.
- Die Tiere der Gruppe 4 (n=12 Tiere) erhielten eine Kombination („Kombi“ aus sCD95Fc (100 µg/g KGW pro Behandlung) und Infliximab (Remicade<sup>®</sup>, 10 µg/g KGW pro Behandlung) durch i.p. Injektion im 7-tägigen Intervall.

Adjuvante Behandlungsverfahren					Palliative Behandlungsverfahren				
Gruppe	Behandlung	Dosis	Art und Dauer der Behandlung	Tierzahl	Gruppe	Behandlung	Dosis	Art und Dauer der Behandlung	Tierzahl
Gruppe 1	0,9 % NaCl	10 µl/g KGW	i.p., wöchentlich	12	Gruppe1	0,9 % NaCl	10 µl/g KGW	i.p., wöchentlich	12
Gruppe 2	sCD95Fc	<u>100 µg/g</u> KGW	i.p., wöchentlich	12	Gruppe 2	sCD95Fc	<u>100 µg/g</u> KGW	i.p., wöchentlich	12
Gruppe 3	Infliximab (Remicade®)	10 µg/g KGW	i.p., wöchentlich	12	Gruppe 3	Infliximab (Remicade®)	10 µg/g KGW	i.p., wöchentlich	12
Gruppe 4	Kombination sCD95Fc + Infliximab (Remicade®)	<u>100 µg/g</u> KGW + 10 µg/g KGW	i.p., wöchentlich	12	Gruppe 4	Kombination sCD95Fc + Infliximab (Remicade®)	<u>100 µg/g</u> KGW + 10 µg/g KGW	i.p., wöchentlich	12

Tab. 4: Schematische Darstellung behandelte Gruppen bei den palliativen und adjuvanten Behandlungsverfahren in der ersten Phase des Tierversuchsvorhabens.

**In der zweiten Phase** wurden drei Pankreaskarzinomzelllinien PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen verwendet (s. Tabelle 5). Die Tiere wurden nur palliativ behandelt. Die intraperitoneale Applikation von NaCl und sCD95Fc wurde drei Tage nach der orthotopen Tumorzellinokulation ins Pankreas (am POD 3) begonnen und erfolgte im 3-tägigen Intervall. Durch eine Gruppengröße von 8 Tieren und 6 Gruppen ergab sich ein Gesamteinsatz von 48 Tieren für diese Phase:

***PancTu1Luc Zellen:***

Die Tiere der Gruppe 1 (n=8 Tiere, als Kontrollgruppe) wurde mit NaCl (10 µl/g KGW) im 3-tägigen Intervall durch i.p. Injektion behandelt.

Die Tiere der Gruppe 2 (n=8 Tiere) erhielten sCD95Fc (10 µg/g KGW pro Behandlung) durch i.p. Injektion im 3-tägigen Intervall.

***PancTu1 Zellen:***

Die Tiere der Gruppe 3 (n=8 Tiere, als Kontrollgruppe) wurde mit NaCl (10 µl/g KGW) im 3-tägigen Intervall durch i.p. Injektion behandelt.

Die Tiere der Gruppe 4 (n=8 Tiere) erhielten sCD95Fc (10 µg/g KGW pro Behandlung) durch i.p. Injektion im 3-tägigen Intervall.

***Panc1 Zellen:***

Die Tiere der Gruppe 5 (n=8 Tiere, als Kontrollgruppe) wurde mit NaCl (10 µl/g KGW) im 3-tägigen Intervall durch i.p. Injektion behandelt.

Die Tiere der Gruppe 6 (n=8 Tiere) erhielten sCD95Fc (10 µg/g KGW pro Behandlung) durch i.p. Injektion im 3-tägigen Intervall.

Palliative Behandlungsverfahren					
Gruppe	Zelllinie	Behandlung	Dosis	Art und Dauer der Behandlung	Tierzahl
Gruppe 1	PancTu1 <i>Luc</i>	0,9 %NaCl	10 µl/g KGW	i.p., 3-Tage Intervall	8
Gruppe 2	PancTu1 <i>Luc</i>	sCD95Fc	10 µg/g KGW	i.p., 3-Tage Intervall	8
Gruppe 3	PancTu1	0,9 % NaCl	10 µl/g KGW	i.p., 3-Tage Intervall	8
Gruppe 4	PancTu1	sCD95Fc	10 µg/g KGW	i.p., 3-Tage Intervall	8
Gruppe 5	Panc1	0,9 % NaCl	10 µl/g KGW	i.p., 3-Tage Intervall	8
Gruppe 6	Panc1	sCD95Fc	10 µg/g KGW	i.p., 3-Tage Intervall	8

Tab. 5: Schematische Darstellung behandelte Gruppen in der zweiten Phase des Tierversuchsvorhabens (bei palliativem Therapieansatz bei orthotoper Inokulation der PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zelllinien).

Die Tiere können unter dem Wachstum der Tumore leiden, daher sind die Tumorschmerzen als erheblich einzustufen. Bei evtl. auftretenden Komplikationen, wie Kachexie, Vitalitätsverlust oder einer Gewichtsreduktion um mehr als 20 % war die Euthanasie geplant. Zur Überwachung wurden zweimal pro Woche eine Gewichtskontrolle und eine Vitalitätskontrolle vorgenommen.

### Durchführung der palliativen Therapie

Den SCID Mäusen wurden humane Pankreaskarzinomzellen PancTu1*Luc* orthotop ins Pankreas inokuliert (Tepel, J. et al., 2004; Liu, J. et al., 2006). Die palliative Therapie erfolgte am dritten, postoperativen Tag (POD 3) für eine Zeitdauer von 21 Tagen. Bei dem palliativen Therapieansatz wurden insgesamt drei Behandlungen am POD 3, POD 10 und POD 17 nach einer orthotopen Zellinokulation durchgeführt. Die sCD95Fc-Dosis pro 3 Behandlungen enthält ca. 300 µg/g KGW (oder 100 µg/g KGW je Behandlung), insgesamt ca. 6 mg/Tier (s. Abb. 15, Tab. 4).

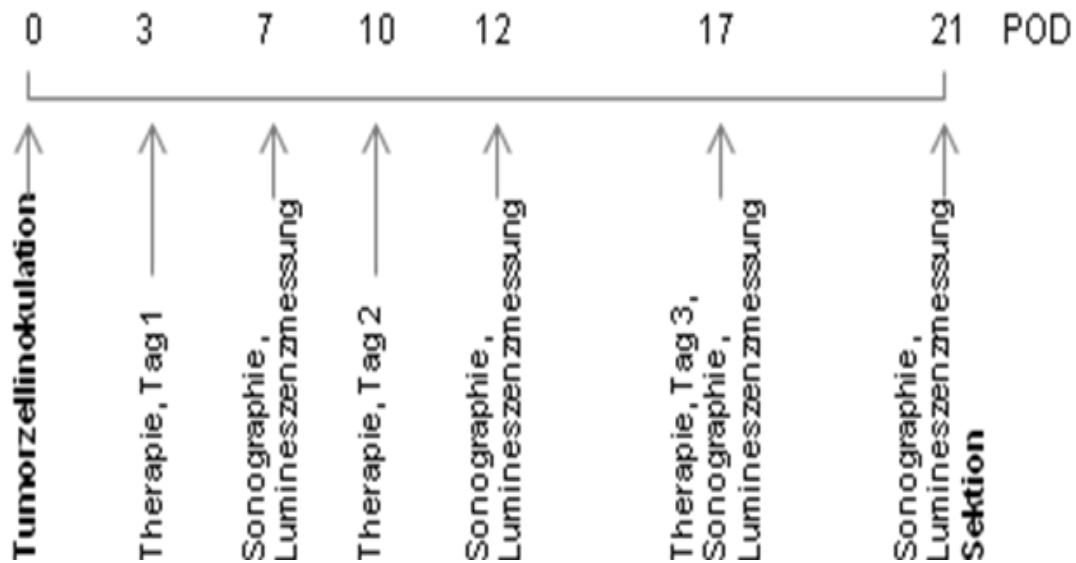


Abb.15: Schematische Abbildung behandelter Gruppen bei dem palliativen Therapieansatz im Pankreaskarzinommodell nach der orthotopen Inokulation der humanen Pankreaskarzinomzellen PancTu1Luc.

### Durchführung der adjuvanten Therapie

10 Tage nach der orthotopen Inokulation der humanen Pankreaskarzinomzellen PancTu1Luc erfolgte eine Relaparotomie mit subtotaler Pankreatektomie und eine Resektion der inokulierten Tumore (Tepel, J. et al., 2006). Die intraperitoneale Applikation erfolgte am POD 13 nach Zellinokulation oder POD 3 nach Primärtumorresektion und dauerte 21 Tage. Insgesamt wurden drei Behandlungen am POD 3, POD 10 und POD 17 wie oben beschrieben durchgeführt. Die sCD95Fc-Dosis pro 3 Behandlungen enthält ca. 300 µg/g KGW (oder 100 µg/g KGW je Einzelbehandlung), insgesamt also ca. 6 mg/Tier (s. Abb. 16, Tab. 4).

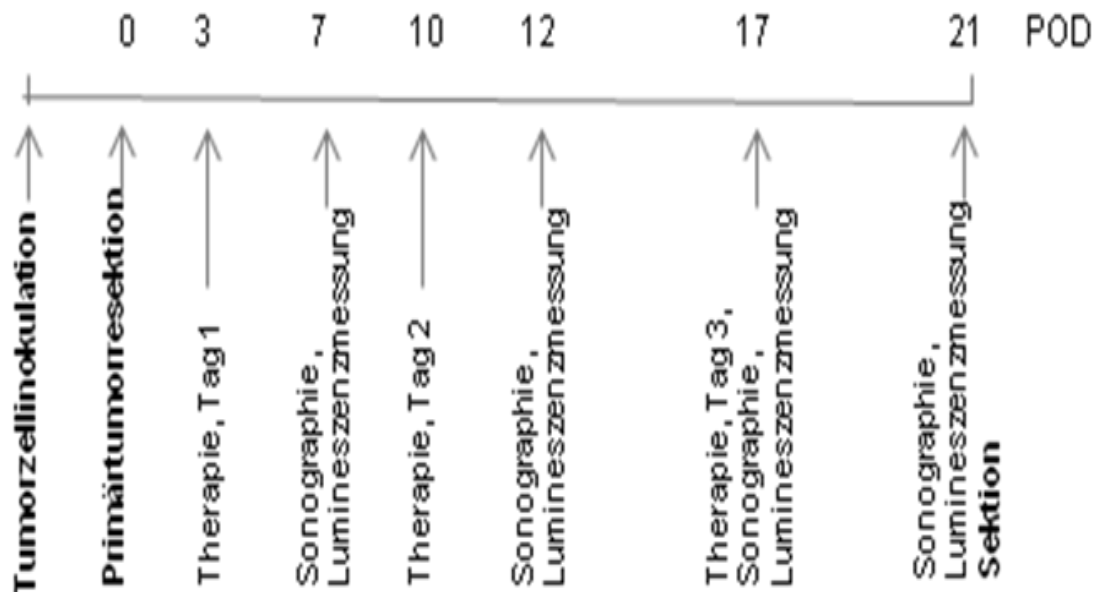


Abb.16: Schematische Abbildung behandelter Gruppen bei dem adjuvanten Therapieansatz im Pankreaskarzinommodell nach der orthotopen Inokulation der humanen Pankreaskarzinomzellen PancTu1Luc.

### Durchführung der palliativen Therapie bei orthotoper Inokulation der PancTu1Luc-, PancTu1- und Panc1- Zelllinien

Den SCID Mäusen wurden humane Pankreaskarzinomzellen PancTu1Luc-, PancTu1- und Panc1- Zelllinien orthotop ins Pankreas inokuliert (Tepel, J. et al., 2004; Liu, J. et al., 2006). Die palliative Therapie erfolgte am dritten, postoperativen Tag (POD 3) für eine Zeitdauer von 27 Tagen in den Gruppen mit den PancTu1Luc-, PancTu1- Zellen und 34 Tagen in den Panc1-Gruppen. Bei dem palliativen Therapieansatz wurden insgesamt sieben Behandlungen am POD 3, 7, 10, 14, 18, 21, 24 und neun Behandlungen in den Panc1-Gruppen auch POD 27, 30 nach einer orthotopen Zellinokulation durchgeführt (s. Abb. 17, Tab. 5).

## Ergebnisse

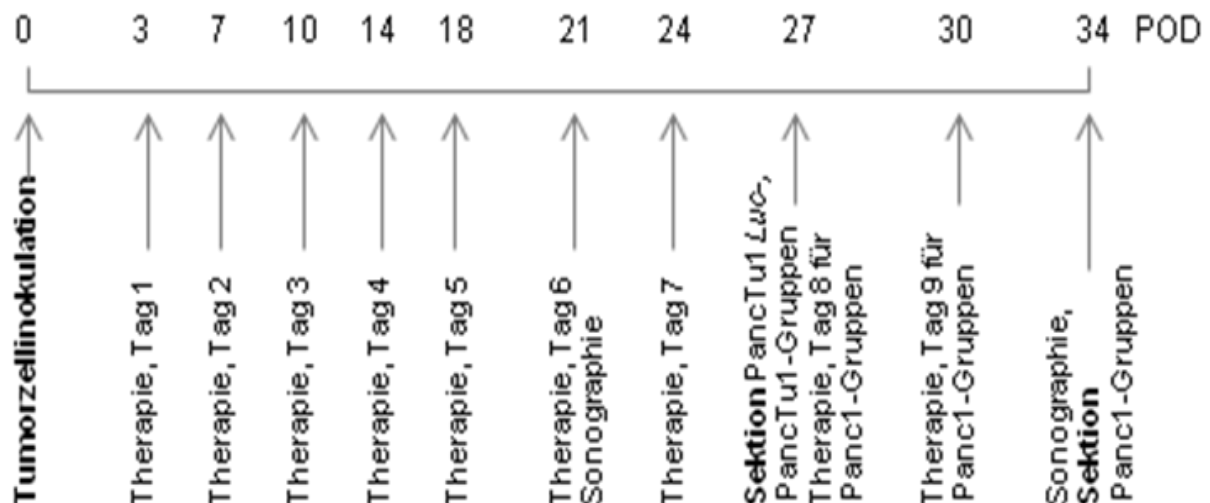


Abb. 17: Schematische Abbildung behandelter Gruppen bei palliativem Therapieansatz im Pankreaskarzinommodell mit PancTu1Luc-, PancTu1- und Panc1-Zelllinien.

Die sCD95Fc-Dosis pro 7 Behandlungen enthält ca. 70 µg/g KGW (oder 10 µg/g KGW je Behandlung, Tab. 5).

### 3.3. *In vivo*-Untersuchungen bei der palliativen Therapie

#### 3.3.1. Lumineszenzmessung

Durch das optische Verfahren der Lumineszenzmessung erhalten wir funktionelle Informationen über den Zustand und die Entwicklung der mit einem Luziferase-Reporter gen transfizierten Tumorzellen und der entstehenden Tumore bei dem palliativen Therapieansatz. Die Grafik (Abb.18) zeigt an, dass die Primärtumore schon am POD 7 sichtbar waren (ca.  $1 \times 10^5$  cts/mm<sup>2</sup>s). Am POD 21 wurden die Tiere der Kontrollgruppe (n=9), der sCD95Fc-Gruppe (n=10), der Kombinations-therapiegruppe (n=11) und der Infliximabgruppe (n=12) vor der Sektion untersucht. Im Laufe der Zeit steigen am POD 21 die Mean Grey-Werte bis ca. 300 % in der Kontrollgruppe und bis ca. 240 % in der Infliximabgruppe an. Die erhaltenen Lumineszenzwerte zwischen zwei Behandlungsgruppen bzw. Kontrollgruppen an einem Messtag haben keinen statistisch signifikanten Unterschied aufgezeigt,  $p \geq 0,05$  (s. Abb. 18, 19). Aus diesem Grund ist es schwierig, die Reaktion der Mean Grey-Werte auf experimentelle Therapeutika zu beurteilen.

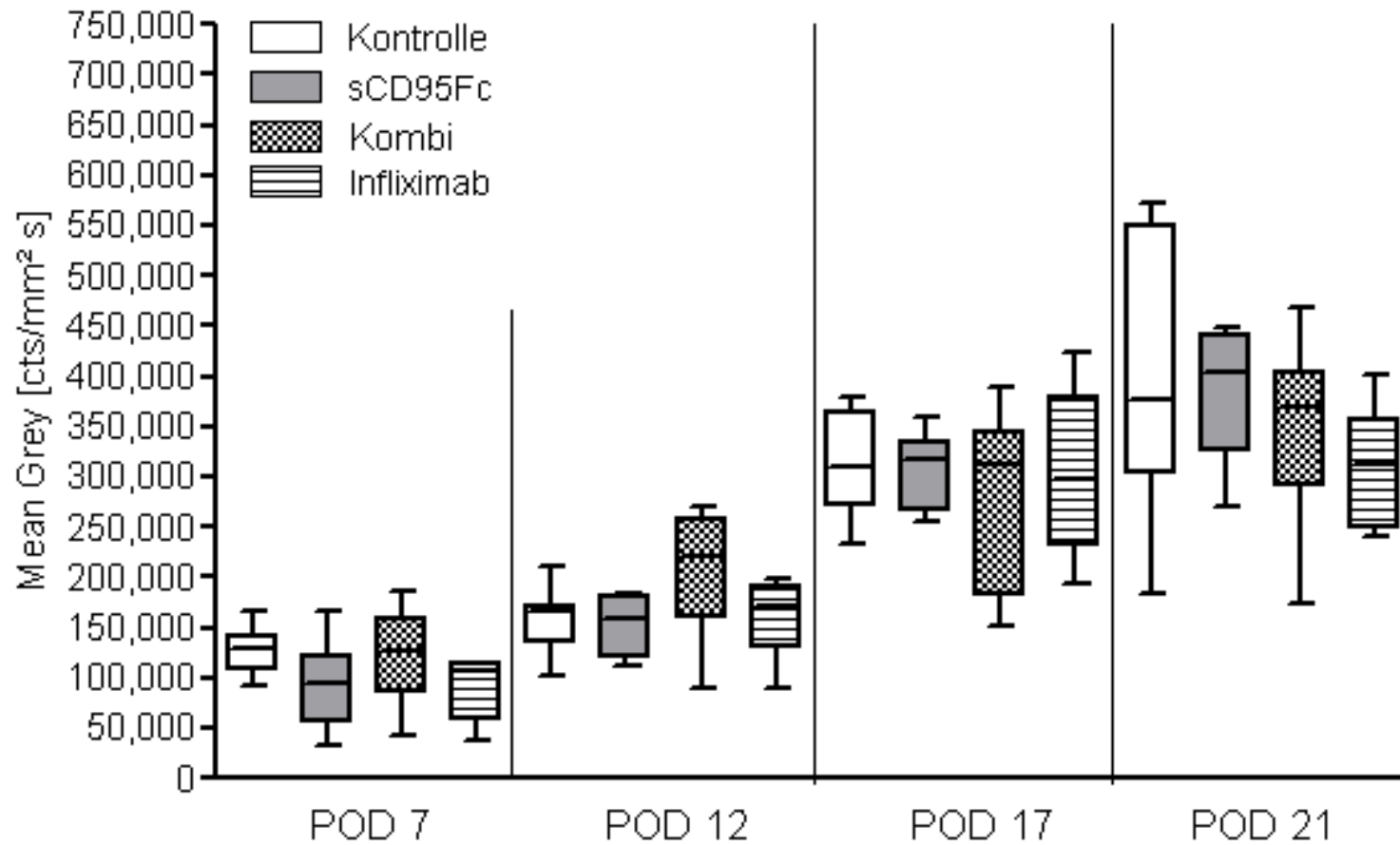


Abb.18: Die mittlere Helligkeit (Mean Grey) für jedes Messfeld über die ganze Behandlungszeit in den Gruppen bei palliativem Therapieansatz gemessen (Kontrollgruppe (n=9), sCD95Fc-Gruppe (n=10), Kombinationstherapiegruppe (n=11) und Infliximabgruppe (n=12)). Es wurde die PancTu1Luc- Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe ist nicht vorhanden (nach MW Test).

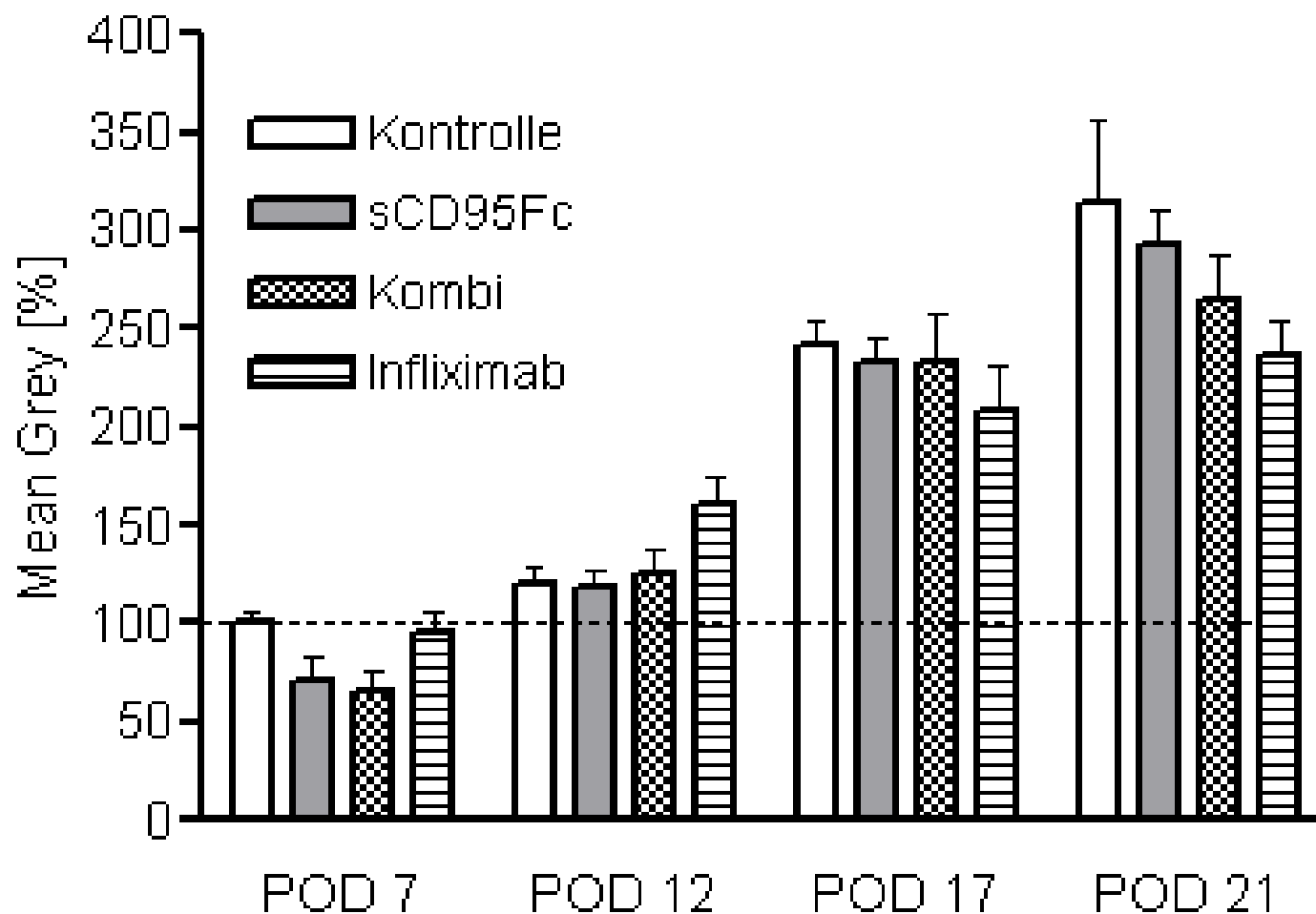


Abb.19: Die mittlere Helligkeit (Mean Grey) für jedes Messfeld in den Gruppen bei dem palliativen Therapieansatz prozentual berechnet (Kontrollgruppe (n=9), sCD95Fc-Gruppe (n=10), Kombinationstherapiegruppe (n=11) und Infliximabgruppe (n=12)). Die Berechnung von 100 % wurde auf die unbehandelte Kontrollgruppe am Tag 7 bezogen. Es wurde die *PancTu1Luc*- Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Abgebildet sind Mediane. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und Kontrollgruppe sind nicht vorhanden (MW Test).

### 3.3.2 Sonographie

In unserer Studie wurde das Hochfrequenz-Ultraschall-Imaging von VisualSonics Vevo<sup>®</sup> 770 Imaging System (Toronto, Kanada) angewendet. Das Tumorwachstum bis zum Tag 17 nach der orthotopen Tumorzellinjektion ins Pankreas (bei palliativem Therapieansatz, PancTu1*Luc*-Pankreaskarzinomzelllinie) zeigt eine ähnliche Entwicklung in den Gruppen. Die Primärtumorgröße erreicht am POD 17 in allen Gruppen ca. 200 mm<sup>3</sup>. Am POD 21 wurden die Tiere der Kontrollgruppe (n=9), der sCD95Fc-Gruppe (n=10), der Kombinationstherapiegruppe (n=11) und der Infliximabgruppe (n=12) zum letzten Mal untersucht. An diesem Tag wurde die signifikante therapeutische Wirkung in der Infliximabgruppe (213,1 mm<sup>3</sup>, Median) im Vergleich zur Kontrollgruppe (362,9 mm<sup>3</sup>, Median) mit \*\*p-Wert ≤ 0,01 und auch zwischen der sCD95Fc- und der Infliximabgruppe mit \*\*\*p-Wert ≤ 0,001 beobachtet. Andere erhaltene Werte waren statistisch nicht signifikant (Abb. 20, 21).

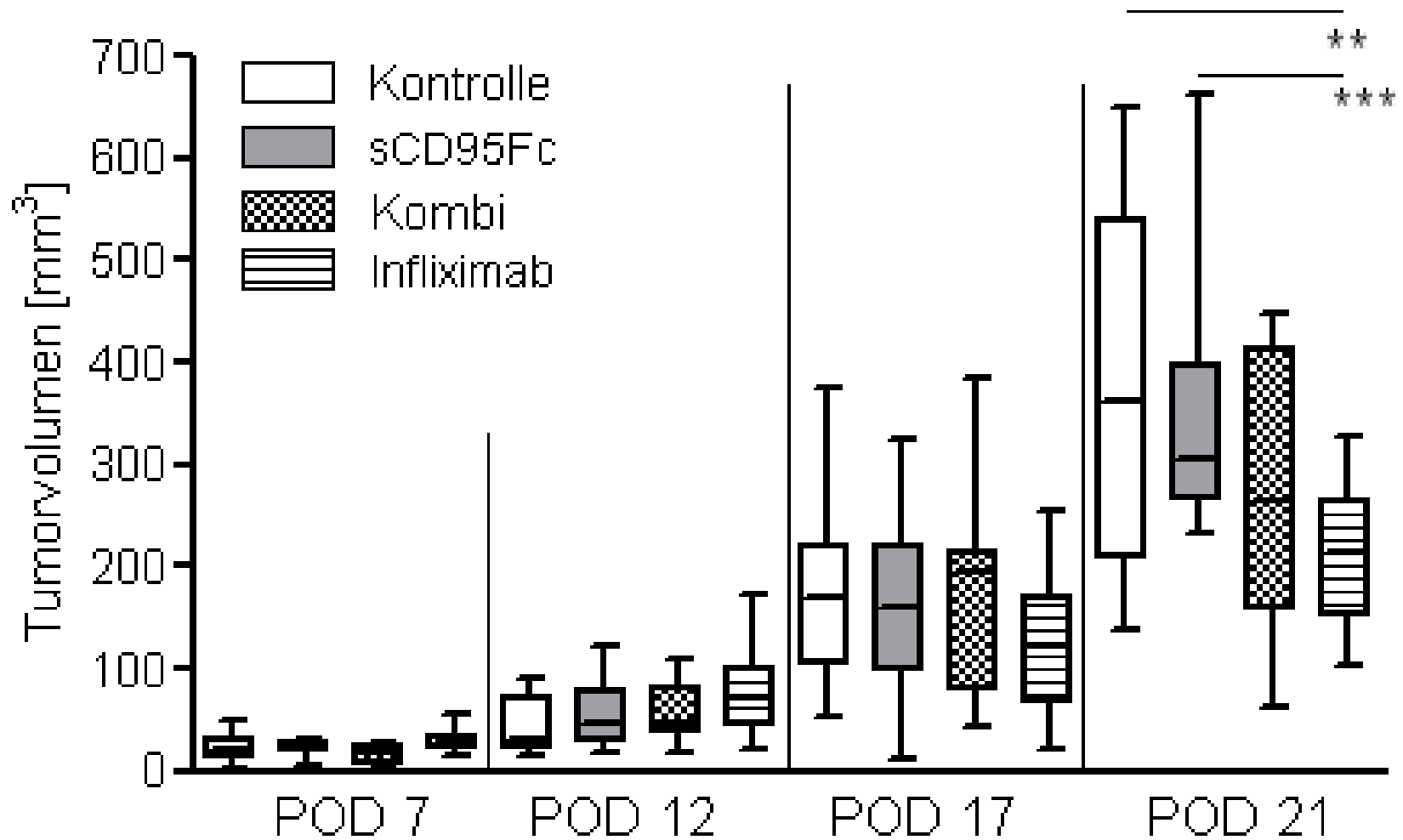


Abb. 20: Ultraschalluntersuchung über die ganze Behandlungszeit in den Gruppen bei palliativem Therapieansatz (Kontrollgruppe (n=9), sCD95Fc-Gruppe (n=10), Kombinationstherapiegruppe (n=11) und Infliximabgruppe (n=12)). Es wurde die PancTu1Luc-Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied am POD 21 ist zwischen der Kontroll- und der Infliximabgruppe mit \*\*p-Wert ≤ 0,01 und auch zwischen der sCD95Fc- und der Infliximabgruppe mit \*\*\*p-Wert ≤ 0,001 vorhanden (MW Test).

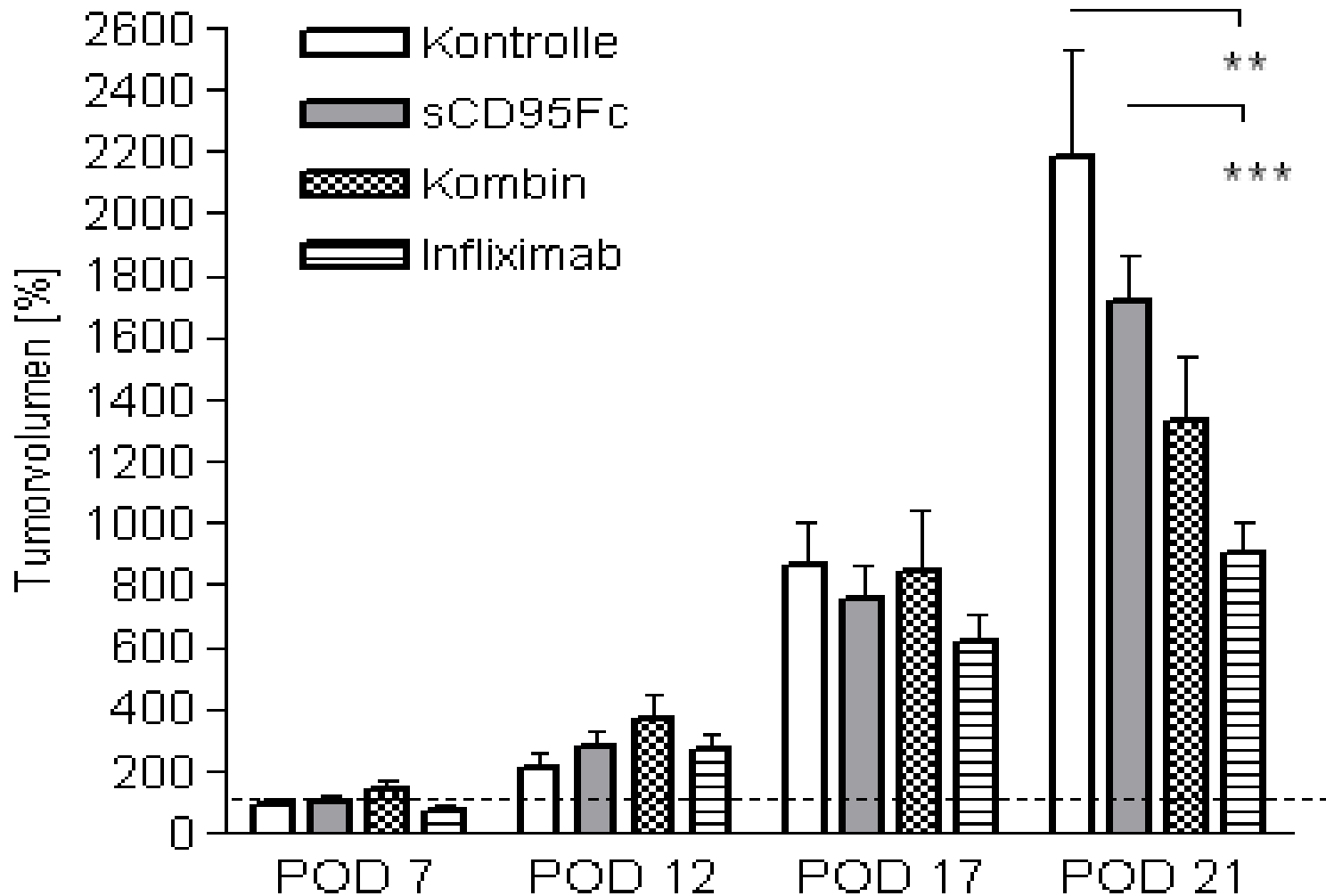


Abb. 21: Die prozentuale Berechnung der Tumolvolumen nach der Ultraschalluntersuchung über die ganze Behandlungszeit in den Gruppen bei palliativem Therapieansatz (Kontrollgruppe (n=9), sCD95Fc-Gruppe (n=10), Kombinationstherapiegruppe (n=11) und Infliximabgruppe (n=12)). Die Berechnung von 100 % wurde auf die Kontrollgruppe am Tag 7 bezogen. Es wurde die PancTu1Luc- Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Abgebildet sind Mediane. Es ergab sich am POD 21 ein statistisch signifikanter Unterschied ist zwischen der Kontroll- und der Infliximabgruppe mit \*\*p-Wert  $\leq 0,01$  und auch zwischen der sCD95Fc- und der Infliximabgruppe mit \*\*\*p-Wert  $\leq 0,001$  (MW Test).

### 3.3.3. Heterogenität des Tumorwachstums bei palliativem Therapieansatz

Am POD 21 wurden die Tiere narkotisiert, gewogen und getötet. Die entnommenen Primärtumore des Pankreas (PancTu1*Luc*-Zelllinie) hatten eine feste Konsistenz, waren ellipsoid geformt und morphologisch sehr gut abgrenzbar. Die Tumore wurden manuell gemessen und gewogen.

Das Primärtumorgewicht betrug in der Kontrollgruppe (n=9) 462 mg, in der sCD95Fc-Gruppe (n=10) 417 mg und in der Kombinationstherapiegruppe (n=11) 373 mg. Das Gewicht in allen drei Gruppen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Der therapeutische Ansatz von Infliximab (n=12) hat im Vergleich mit der Kontrollgruppe einen statistisch signifikanten Unterschied mit einem \*p-Wert  $\leq 0,05$  und einem Median von 262,5 mg (Abb. 22).

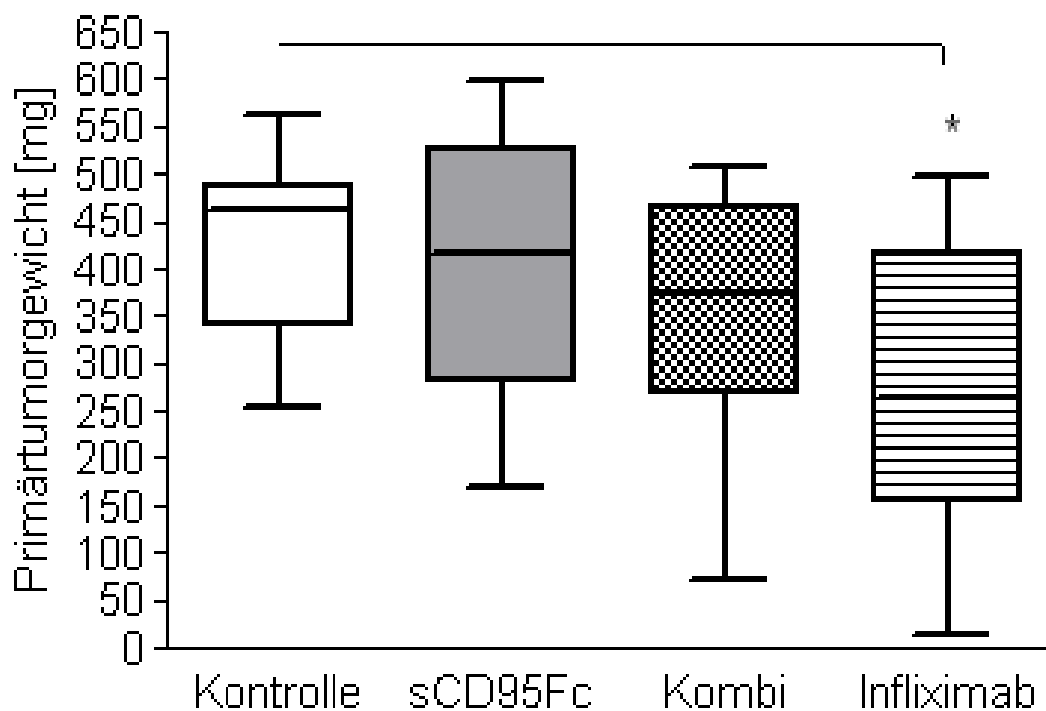


Abb. 22: Primärtumorgewicht bei der palliativen Therapie (Kontrollgruppe (n=9), sCD95Fc-Gruppe (n=10), Kombinationstherapiegruppe (n=11)) und Infliximabgruppe (n=12) am POD 21. Es wurde die PancTu1*Luc*-Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied ist nur in zwischen der Kontrollgruppe und der Infliximabgruppe vorhanden \*p-Wert  $\leq 0,05$  (MWT-Test).

Die manuelle Bestimmung des Tumorummens erfolgte nach der Ellipsoid Formel (wie in 2.2.7. beschrieben). Das Primärtumorummen hat in der Kontrollgruppe 220 mm<sup>3</sup>, in der sCD95Fc-Gruppe 239,8 mm<sup>3</sup> und in der Infliximabgruppe 215,3 mm<sup>3</sup>, in

## Ergebnisse

Median erreicht, die Tumorzellen in allen drei Gruppen ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 23). Das Primärtumorzellen in der Kombinationstherapiegruppe hat im Vergleich zu der Kontrollgruppe einen statistisch signifikanten \*p-Wert  $\leq 0,05$  und betrug  $294 \text{ mm}^3$ , Median.

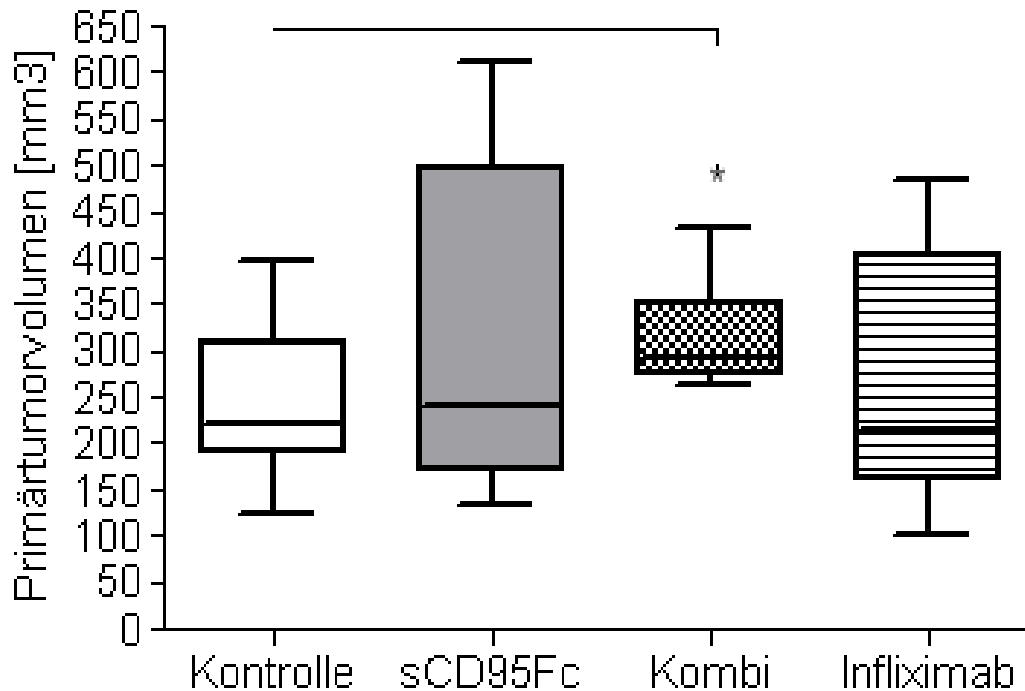


Abb. 23: Primärtumorzellen manuell gemessen bei der palliativen Therapie am POD 21. Es wurde die *PancTu1Luc*-Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (n=9) und der Kombinationstherapie (n=11) besteht beim \*p-Wert  $\leq 0,05$ . Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den sCD95Fc-, Infliximabbehandlungsgruppen und Kontrollgruppe sind nicht vorhanden,  $p \geq 0,05$  (MWTTest).

Die entstehenden Bauchnahtmetastasen (Abb. 60 B; 61 E, F im Anhang) hatten eine feste Konsistenz und waren sehr gut geformt. Die Metastasen wurden ebenfalls manuell gemessen und gewogen.

Das Bauchnahtmetastasengewicht hat in der Kontrollgruppe (bei 4 von insgesamt 9 Tieren) 431 mg, in der sCD95Fc-Gruppe (bei 4 von insgesamt 10 Tieren) 144 mg, in der Kombinationstherapiegruppe (bei 3 von insgesamt 11 Tieren) 134 mg und in der Infliximabgruppe (bei 6 von insgesamt 12 Tieren) 141 mg (Median) erreicht. Die manuelle Volumenbestimmung der Bauchnahtmetastasen wurde nach der Ellipsoid

Formel (s. oben) ausgerechnet. Die Bauchnahtmetastasenvolumina waren in der Kontrollgruppe 236 mm<sup>3</sup>, in der sCD95Fc-Gruppe 59 mm<sup>3</sup>, in der Kombinationstherapiegruppe 142 mm<sup>3</sup> und in der Infliximabgruppe 122 mm<sup>3</sup> (Median) groß. Die statistischen Darstellungen/Berechnungen des Gewichtes und Volumens der Bauchnahtmetastasen sind auf Grund der geringen n-Zahl in den Gruppen nicht möglich.

### **3.4. Adjuvante Therapie mit subtotaler Pankreatektomie und Resektion des Pankreaskarzinoms (Resektionsmodell)**

Den SCID Mäusen wurden humane Pankreaskarzinomzellen PancTu1*Luc* orthotop inokuliert. Nach 10 Tagen wurden eine Relaparotomie mit subtotaler Pankreatektomie und eine Resektion der inokulierten Tumore durchgeführt. Die adjuvante Therapie (Blockade von sCD95Fc und Infliximab bzw. die Kombinationstherapie mit Infliximab und sCD95Fc) erfolgt am dritten postoperativen Tag für eine Zeitdauer von insgesamt 21 Tagen nach der subtotalen Pankreatektomie. Durch eine Gruppengröße von 12 Tieren und 4 Gruppen ergab sich ein Gesamteinsatz von 48 Tieren für diese Phase. Die intraperitoneale Applikation von NaCl, sCD95Fc und Infliximab erfolgte im 7-tägigen Intervall ohne Anästhesie; beginnend ab dem dritten Tag nach der subtotalen Pankreatektomie, bzw. 13 Tage nach der orthotopen Tumorzellinjektion in den Pankreas. Es wurden insgesamt drei Behandlungen am POD 13, POD 20 und POD 27 durchgeführt (Abb. 16). Die sCD95Fc-Dosis pro 3 Behandlungen betrug 300 µg/g KGW (oder 100 µg/g KGW pro Behandlung).

In der zweiten Gruppe (adjuvanter Therapieansatz) wurde das Wachstum des Tumors an den Tagen 12, 17 und 21 nach der Primärtumorresektion kontrolliert. Für die regelmäßig durchzuführenden Untersuchungen (Sonographie und Lumineszenzmessung) wurden die Tiere ebenfalls mittels der bereits beschriebenen Methode narkotisiert. Die Untersuchungsdauer beträgt für die Ultraschalluntersuchungen ca. 20 min und für die Lumineszenzuntersuchung ca. 30 min.

### **3.4.1. Lumineszenzmessung bei adjuvanter Therapie**

Die Lumineszenzmessung des Rezidivtumorwachstums (PancTu1*Luc*-Pankreaskarzinomzelllinie) erlaubt eine Beobachtung der Tumorentwicklung über den gesamten Behandlungszeitraum. Die Rezidivtumore waren schon am POD 12 gut sichtbar und zeigten unterschiedliche Größen an. Am POD 12 waren der Mean-Grey-Wert der sCD95Fc- und Infliximab- Behandlungsgruppen ca. 50 % kleiner als der Mean-Grey-Wert der Kontrollgruppe. Die am POD 12 und POD 17 erhaltenen Werte zeigen wegen der großen Standardabweichungen keinen statistisch signifikanten Unterschied. Am Tag 21 wurden die Tiere der Kontrollgruppe (n=10), der sCD95Fc-Gruppe (n=10), der Kombinationstherapiegruppe (n=9) und der Infliximabgruppe (n=8) zum letzten Mal untersucht. Am POD 21 steigen die Mean-Grey-Werte bis ca. 150 - 200 %. Die erhaltenen Lumineszenzwerte in allen Behandlungsgruppen weisen wegen der großen Standardabweichungen keinen statistisch signifikanten Unterschied auf (Abb. 24, 25).

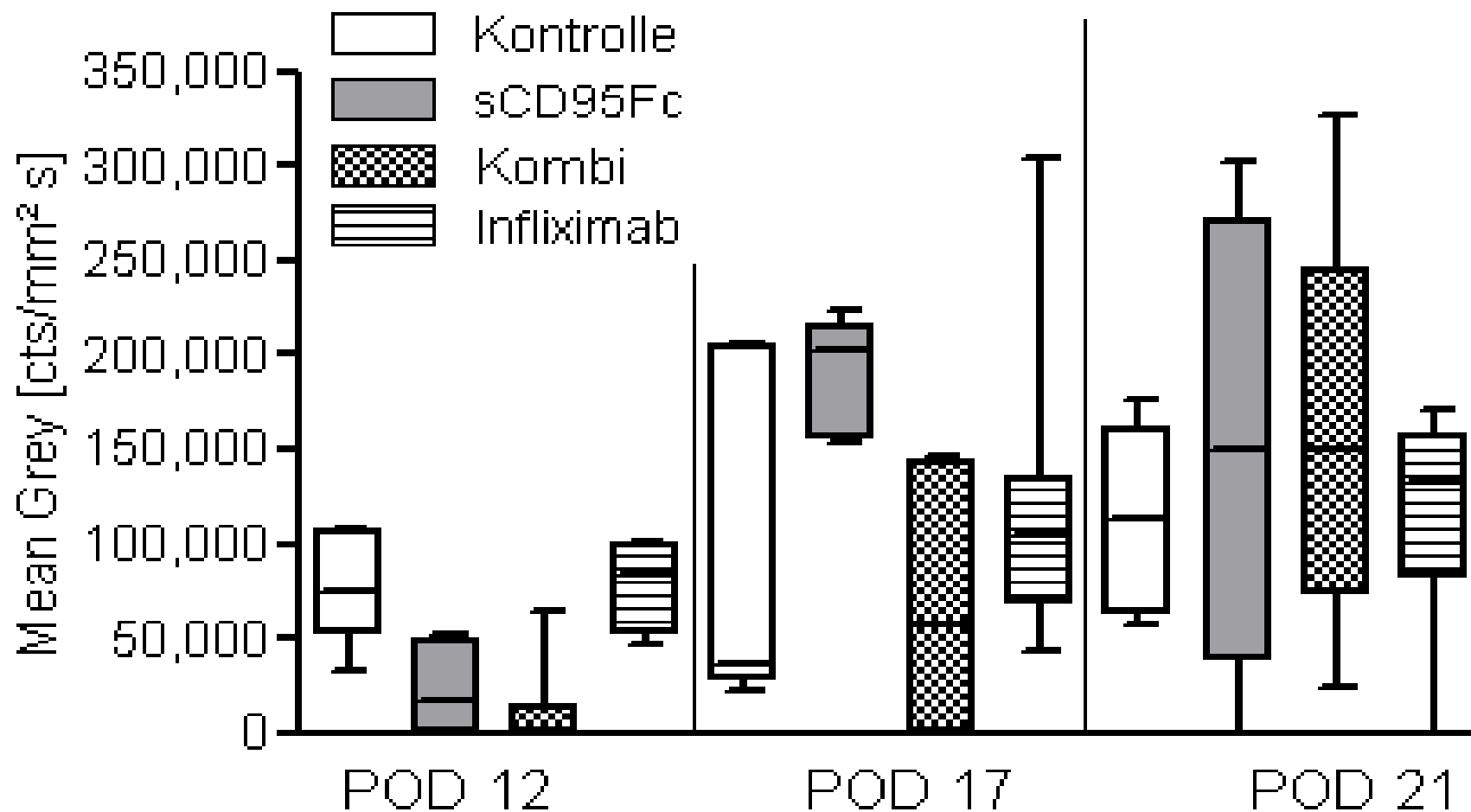


Abb. 24: Die mittlere Helligkeit (Mean Grey) für jedes Messfeld über die ganze Behandlungszeit in allen Gruppen bei adjuvantischem Therapieansatz, verwendet PancTu1Luc-Pankreaskarzinomzelllinie. Abgebildet sind Mediane. Statistisch signifikante Unterschiede am POD 21 zwischen den Behandlungsgruppen (sCD95Fc-Gruppe (n=10), der Kombinationstherapiegruppe (n=9) und der Infliximabgruppe (n=8)) und Kontrollgruppe (n=10) sind nicht vorhanden (MW Test).

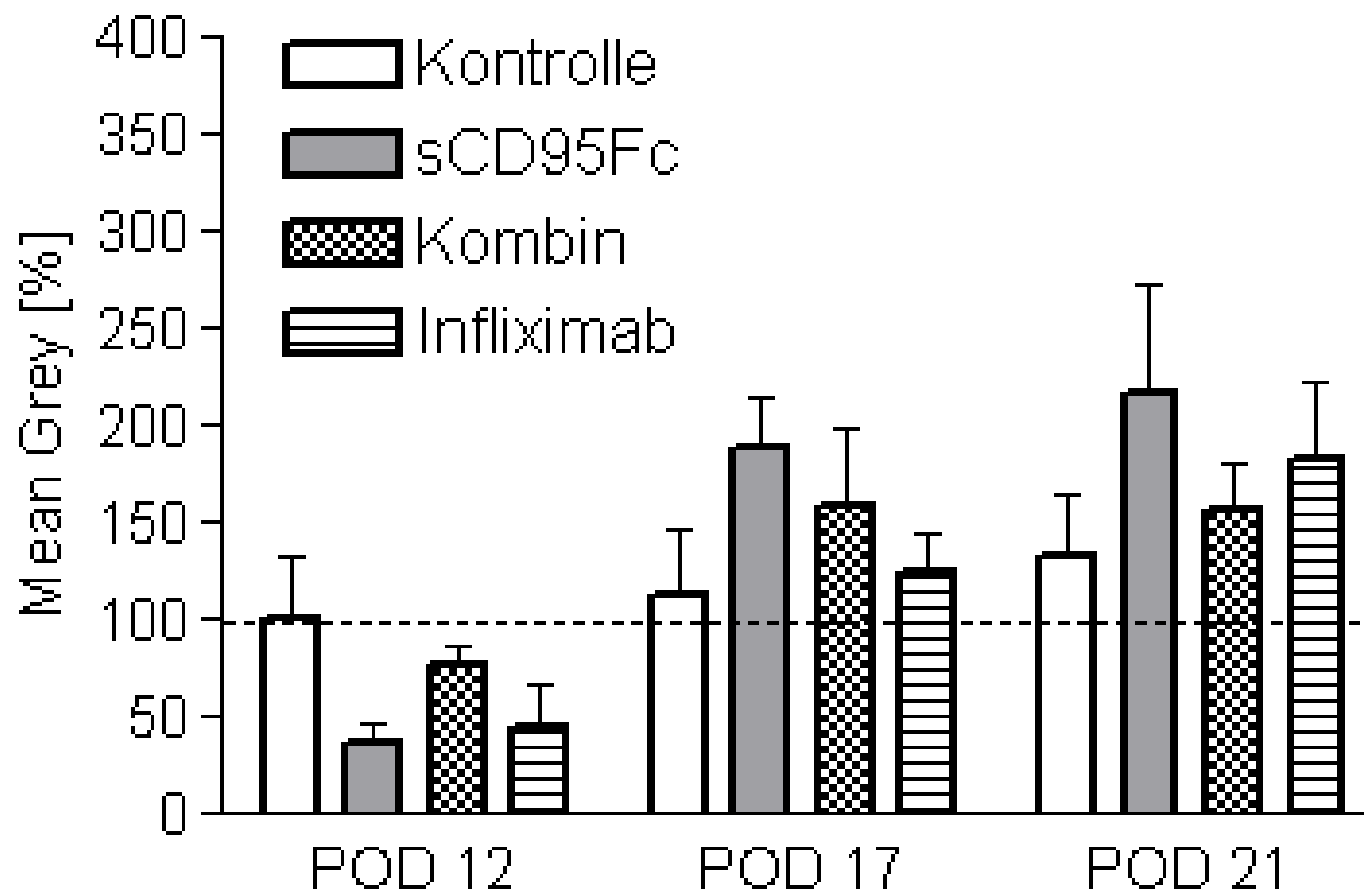


Abb. 25: Die mittlere Helligkeit (Mean Grey) für jedes Messfeld in den Gruppen bei dem adjuvanten Therapieansatz (PancTu1Luc-Pankreaskarzinomzelllinie) prozentual berechnet. Die Berechnung von 100 % wurde auf die Kontrollgruppe am Tag 7 bezogen. Abgebildet sind Mediane. Statistisch signifikante Unterschiede am POD 21 zwischen den Behandlungsgruppen (sCD95Fc-Gruppe (n=10), der Kombinationstherapiegruppe (n=9) und der Infliximabgruppe (n=8)) und Kontrollgruppe (n=10)) sind nicht vorhanden (MW Test).

### 3.4.2. Sonographie bei adjuvanter Therapie

In der zweiten Gruppe (adjuvanter Therapieansatz, PancTu1Luc-Pankreaskarzinomzelllinie) wurde das Wachstum des Rezidivtumors an den Tagen 12, 17 und 21 nach der Primärtumorresektion mittels Kleintierultraschall Vevo<sup>®</sup> 770 Imaging System kontrolliert. Es war schon am POD 17 eine signifikante therapeutische Wirkung in der Infliximabgruppe (n=8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=10) mit \*\*p-Wert < 0,01 und zur Kombinationstherapiegruppe (n=9) mit \*\*\*p-Wert < 0,001 zu sehen. Am POD 21 wurde eine signifikante therapeutische Wirkung in der Infliximabgruppe (191 mm<sup>3</sup>, n=8, Median) im Vergleich zur Kontrollgruppe (482,7 mm<sup>3</sup>, n=10, Median) mit \*\*p-Wert < 0,01 und zur Kombinationstherapiegruppe (1102 mm<sup>3</sup>, n=9, Median) mit \*\*\*p-Wert < 0,001 beobachtet. In der Kombinationstherapiegruppe wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde eine starke Tumorentwicklung (1102 mm<sup>3</sup>, n=9, Median) mit dem \*p-Wert <0,05 beobachtet. In der sCD95Fc-Behandlungsgruppe (549,5 mm<sup>3</sup>, n=10, Median) ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (582,7 mm<sup>3</sup>, n=10, Median) kein therapeutischer Einfluss zu erkennen (Abb. 26, 27).

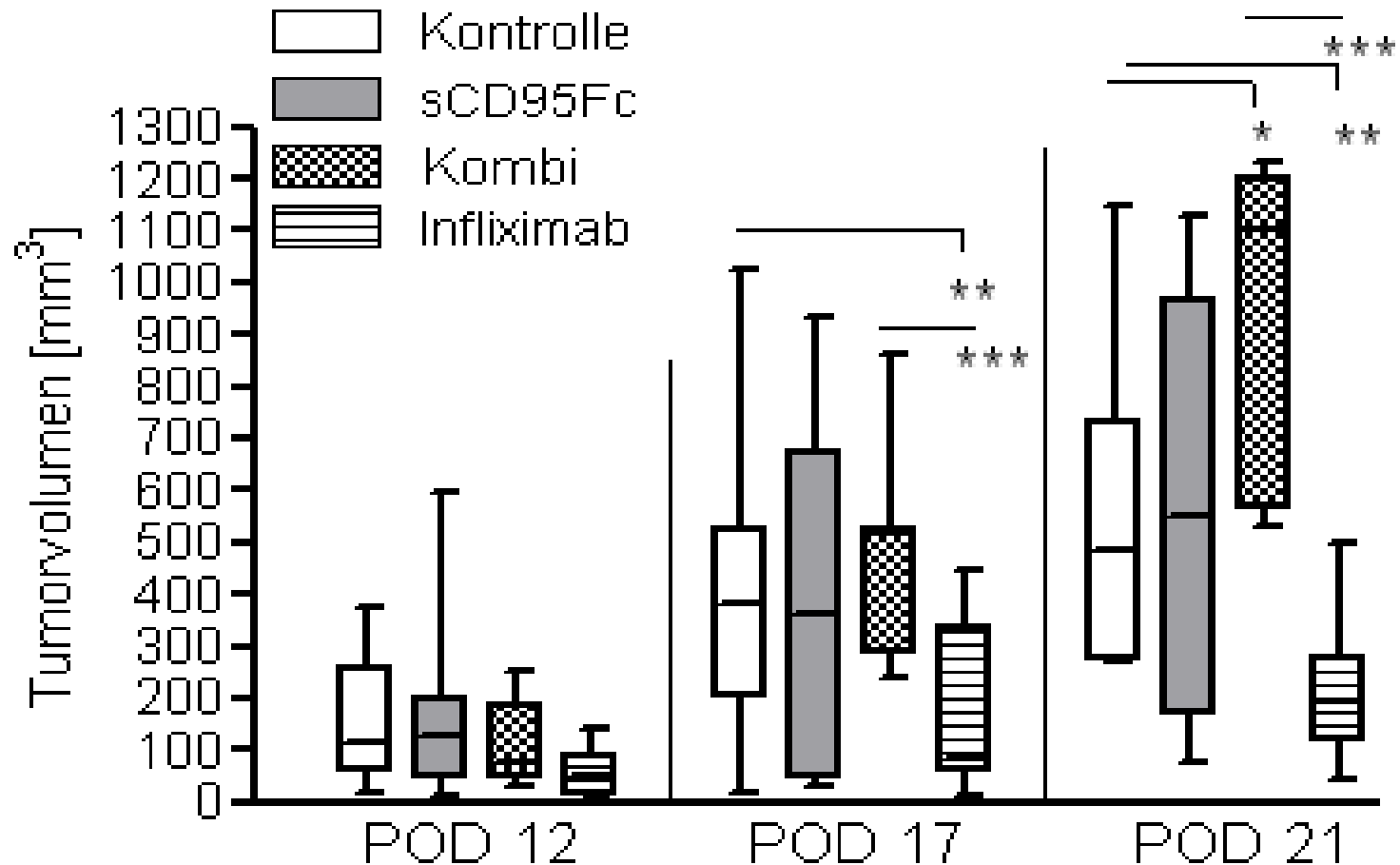


Abb. 26: Ultraschalluntersuchung (Volumenuntersuchung) über die ganze Behandlungszeit in allen Gruppen bei adjuvanten Therapieansatz (PancTu1Luc-Pankreaskarzinomzelllinie). Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied am POD 17 in der Infliximabgruppe (n=8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=10) mit \*\*p-Wert < 0,01 und zur Kombinationstherapiegruppe (n=9) mit \*\*\*p-Wert  $\leq 0,001$  zu sehen. Am POD 21 wurde eine signifikante therapeutische Wirkung in der Infliximabgruppe (n=8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=10) mit \*\*p-Wert  $\leq 0,01$  und zur Kombinationstherapiegruppe (n=9) mit \*\*\*p-Wert  $\leq 0,001$ . In der Kombinationstherapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde eine starke Tumorentwicklung (n=9) mit dem \*p-Wert  $\leq 0,05$  beobachtet. In der sCD95Fc-Behandlungsgruppe (n=10) ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=10) kein therapeutischer Einfluss zu erkennen (WM Test).

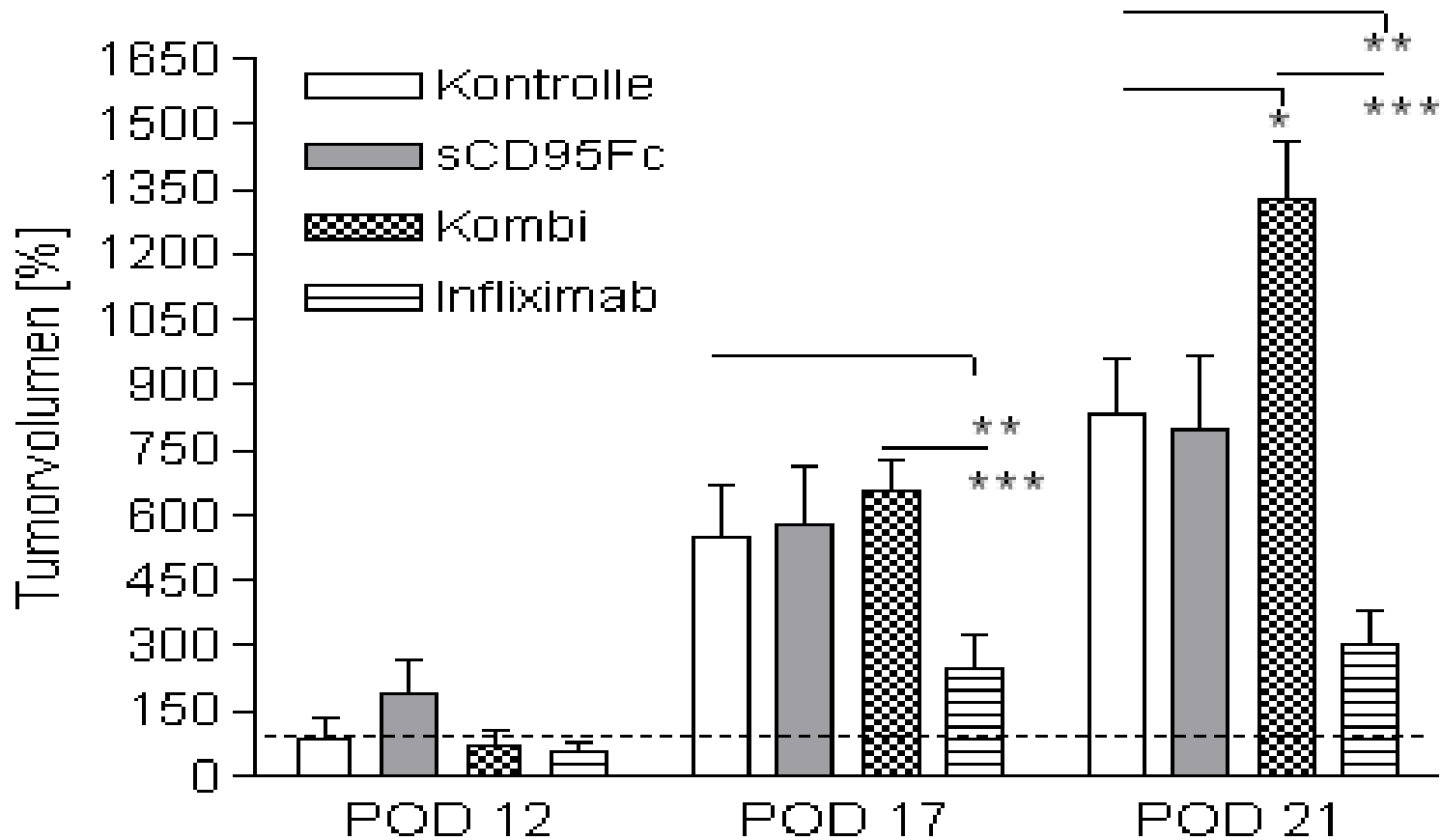


Abb. 27: Tumorstadium nach der Ultraschalluntersuchung über die ganze Behandlungszeit in allen Gruppen bei adjuvanten Therapieansatz (verwendet PancTu1Luc-Pankreaskarzinomzelllinie) prozentual berechnet. Die Berechnung von 100 % wurde auf die Kontrollgruppe (n=10) am Tag 7 bezogen. Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied am POD 17 in der Infliximabgruppe (n=8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=10) mit \*\*p-Wert  $\leq 0,01$  und zur Kombinationstherapiegruppe (n=9) mit \*\*\*p-Wert  $\leq 0,001$  zu sehen. Am POD 21 wurde eine signifikante therapeutische Wirkung in der Infliximabgruppe (n=8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=10) mit \*\*p-Wert  $\leq 0,01$  und zur Kombinationstherapiegruppe (n=9) mit \*\*\*p-Wert  $\leq 0,001$ . In der Kombinationstherapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde eine starke Tumorentwicklung (n=9) mit dem \*p-Wert  $\leq 0,05$  beobachtet. In der sCD95Fc-Behandlungsgruppe (n=10) ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=10) kein therapeutischer Einfluss zu erkennen (WM Test).

### 3.4.3. Heterogenität des Rezidivtumorstwachstums bei adjuvanter Therapie

Am postoperativen Tag 21 wurden die Tiere der Kontrollgruppe (n=10), der sCD95Fc-Gruppe (n=10), der Kombinationstherapiegruppe (n=9) und der Infliximabgruppe (n=8) narkotisiert, zum letzten Mal untersucht, gewogen und getötet. Die entnommenen Rezidivtumore des Pankreas (PancTu1*Luc*-Zelllinie) hatten eine feste Konsistenz, wegen starker Metastasierung in die Bauchnaht und unregelmäßiger Form waren sie jedoch schlecht abgrenzbar. Die Tumore wurden manuell gemessen und gewogen. Das Rezidivtumorgewicht hat in der Kontrollgruppe 437,5 mg, in der sCD95Fc-Gruppe 820 mg, in der Kombinationstherapiegruppe 967,5 mg und in der Infliximabgruppe 374 mg (Median) erreicht. Wenn man das Tumorgewicht in allen Behandlungsgruppen mit der Kontrollgruppe vergleicht, ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Aber wenn man das Gewicht von der Infliximabgruppe 374 mg mit der Kombinationstherapiegruppe 967,5 mg (Median) vergleicht, sehen die Gruppen signifikant unterschiedlich aus, mit einem \*p-Wert  $\leq 0,05$  (Abb. 28).

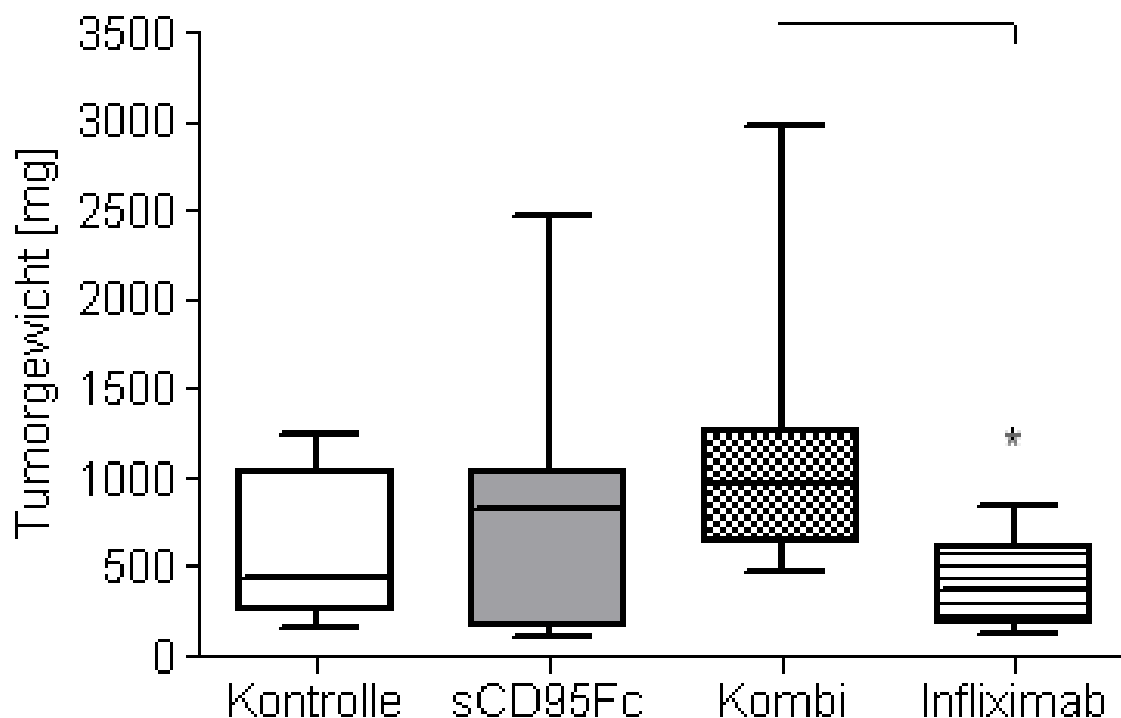


Abb. 28: Gewicht des Rezidivtumores (PancTu1*Luc*-Zelllinie) bei der adjuvanter Therapie wurde am POD 21 gemessen. Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (n=10) und allen weiteren Behandlungsgruppen (sCD95Fc-Gruppe (n=10), der Kombinationstherapiegruppe (n=9) und der Infliximabgruppe (n=8)) ist nicht vorhanden,  $p \geq 0,05$ . Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kombinationstherapiegruppe und der Infliximabgruppe besteht mit dem \*p-Wert  $\leq 0,05$  (MW Test).

## Ergebnisse

Die manuelle Bestimmung des Rezidivtumorvolumens erfolgte nach der Ellipsoid Formel (wie in 2.2.7. beschrieben).

Die Rezidivtumorvolumen (PancTu1*Luc*-Pankreaskarzinomzelllinie) haben in der Kontrollgruppe 425 mm<sup>3</sup>, in der sCD95Fc-Gruppe 584 mm<sup>3</sup>, in der Kombinationstherapiegruppe 629 mm<sup>3</sup> und in der Infliximabgruppe 239 mm<sup>3</sup> (Median) erreicht. Wegen der starken Tumormetastasierung waren die Rezidivtumore nicht gut geformt, deswegen entstehen bei der manuellen Messung große Standardabweichungen. Ein statistisch signifikanter Unterschied (auf die Kontrollgruppe bezogen) ist in allen Behandlungsgruppen nicht signifikant, wie auch beim Tumorgewicht. Ein Unterschied besteht zwischen den Kombinationstherapie- und Infliximabgruppen mit dem \*\*p-Wert  $\leq 0,01$ ; auch zwischen den sCD95Fc- und Infliximabgruppen mit dem \*p-Wert  $\leq 0,05$  (Abb. 29).

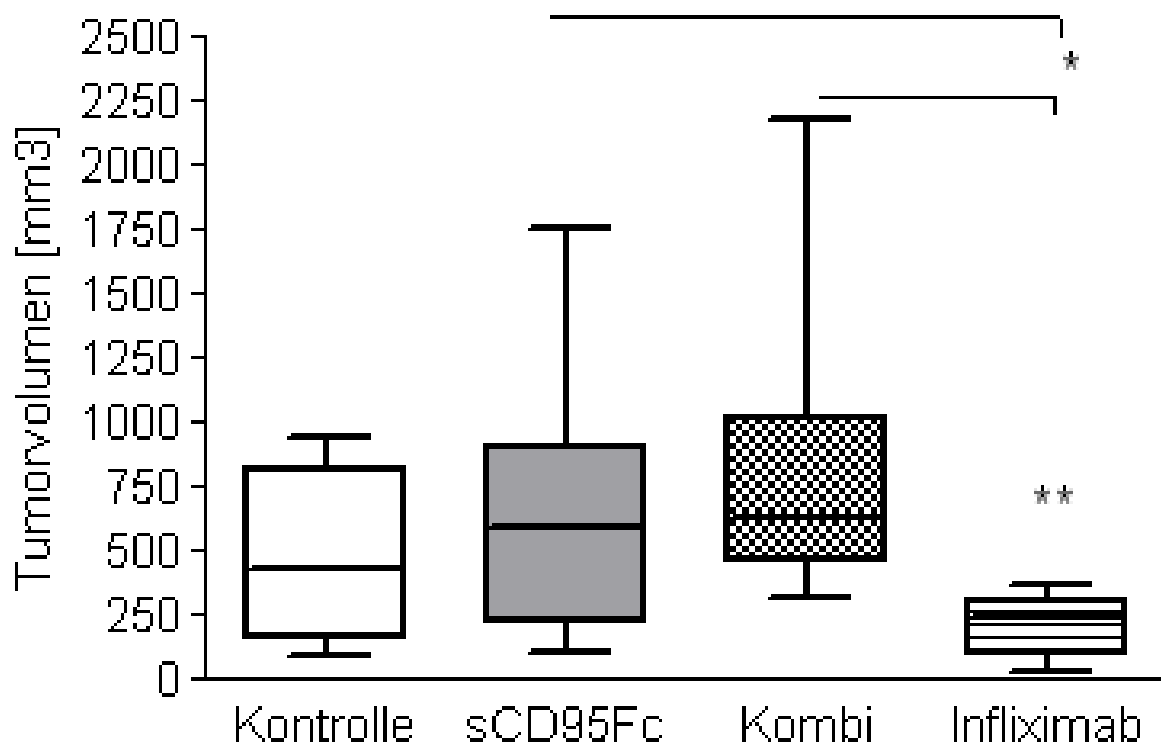


Abb. 29: Volumen der Rezidivtumore (PancTu1*Luc*-Zelllinie) bei der adjuvanten Therapie am POD 21 manuell gemessen. Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kombinationstherapiegruppe (n=9) und der Infliximabgruppe (n=8) besteht beim \*\*p-Wert  $\leq 0,01$ ; sCD95Fc (n=10) und Infliximab (n=8) beim \*p  $\leq 0,05$ . Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (n=10) und allen weiteren Behandlungsgruppen ist nicht vorhanden (MW Test).

### 3.4.4. Auswertung der Metastasierung

Die entnommenen Bauchnahtmetastasen (PancTu1*Luc*-Pankreaskarzinomzelllinie) hatten eine feste Konsistenz, waren unregelmäßig geformt, schlecht abgrenzbar und oft in die naheliegenden Organe eingewachsen. Die Metastasen lassen sich nicht nach Anzahl quantifizieren, sie wurden manuell gemessen und gewogen.

Das Metastasengewicht liegt in der Kontrollgruppe (10 von insgesamt 10 Tieren hatten Metastasen) bei 567 mg, in der sCD95Fc-Gruppe (10 von insgesamt 10 Tieren hatten Metastasen) bei 686,5 mg, in der Kombinationstherapiegruppe (8 von insgesamt 9 Tieren hatten Metastasen) bei 647,5 mg und mit Infliximab (7 von insgesamt 8 Tieren hatten Metastasen) bei 764 mg (alle Werte sind Mediane). Wenn man das Gewicht in allen Behandlungsgruppen mit der Kontrollgruppe vergleicht, besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 30).

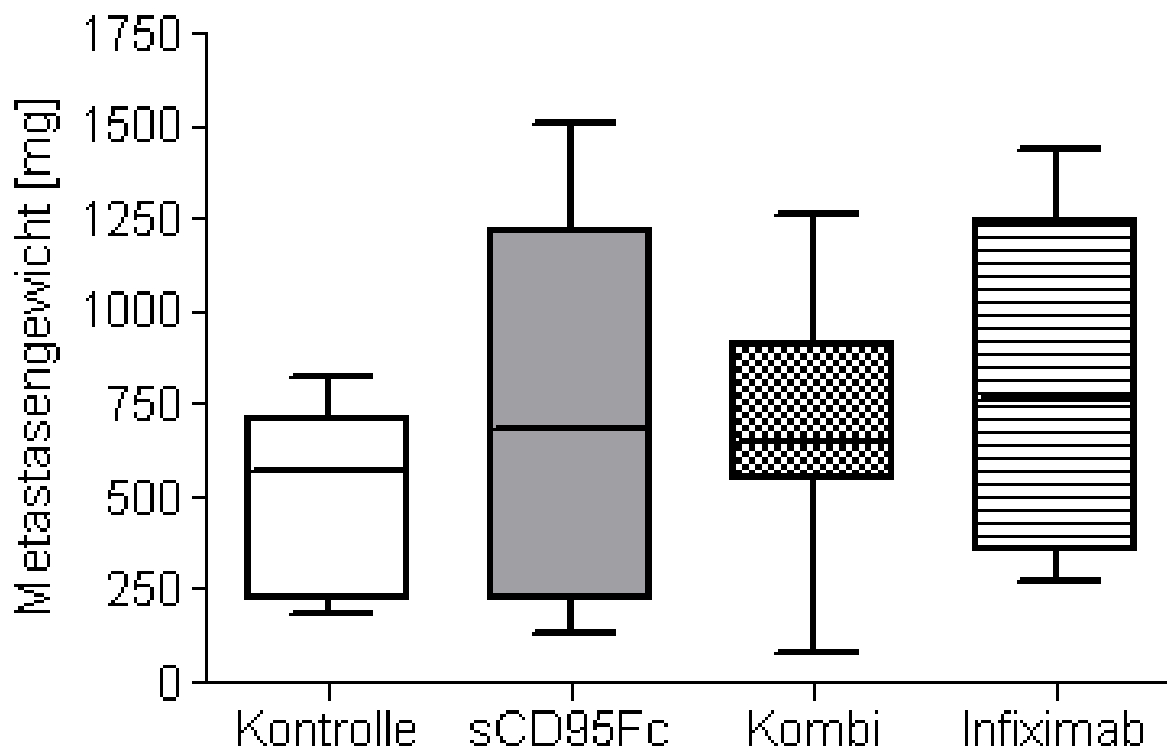


Abb. 30: Das Metastasengewicht bei der adjuvanten Therapie (PancTu1*Luc*-Pankreaskarzinomzelllinie) am POD 21. Abgebildet sind Mediane. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe sind nicht vorhanden (Kontrollgruppe (n=10), sCD95Fc-Gruppe (n=10), Kombinationstherapiegruppe (n=8) und Infliximabgruppe (n=7), MW Test).

Die manuelle Volumenmessung der Bauchnahtmetastasen wurde nach der Ellipsoid Formel (wie in 2.2.7. beschrieben) berechnet. Die Bauchnahtmetastasen waren in der Kontrollgruppe 254,9 mm<sup>3</sup>, in der sCD95Fc-Gruppe 509 mm<sup>3</sup>, in der Kombinationstherapiegruppe 596 mm<sup>3</sup> und in der Infliximabgruppe 218,8 mm<sup>3</sup> (Median). Ein statistisch signifikanter Unterschied bezogen auf die Kontrollgruppe wurde nur in der Kombinationstherapiegruppe (\*p ≤ 0,05) festgestellt. (Abb. 31).

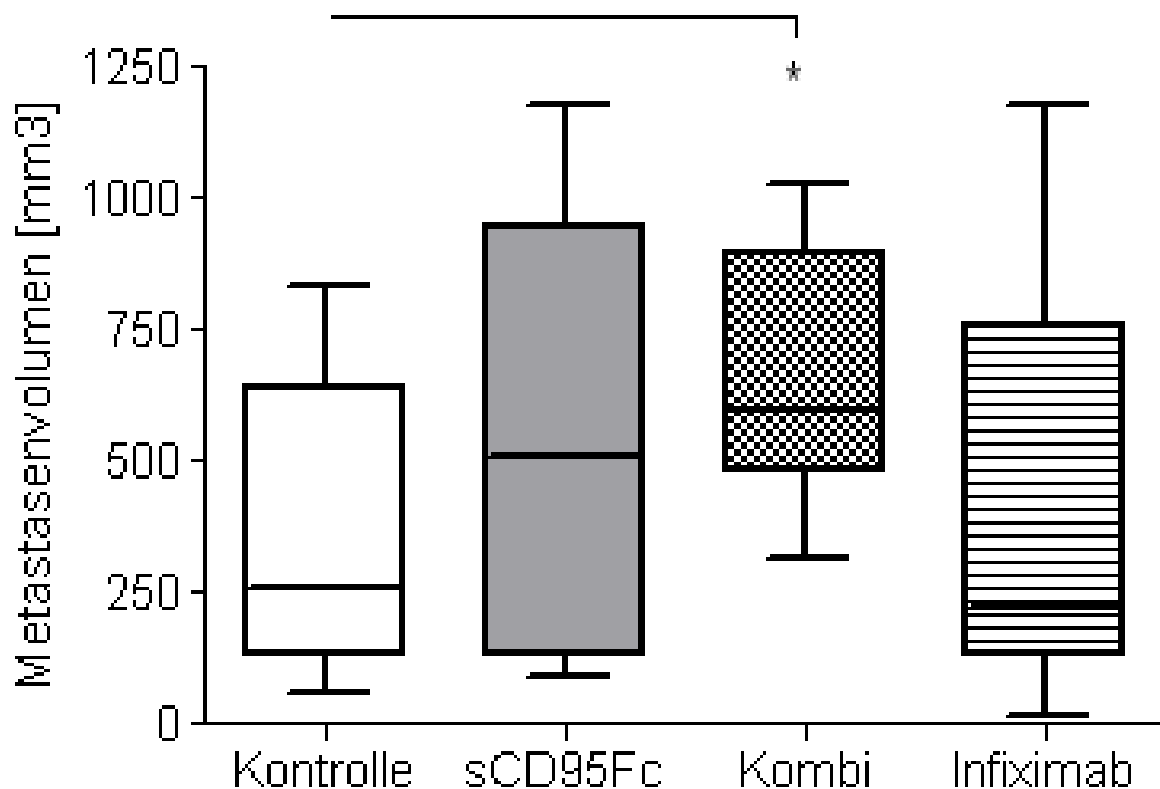


Abb. 31: Metastasenvolumen (PancTu1Luc-Pankreaskarzinomzelllinie) bei der adjuvanten Therapie am POD 21 manuell gemessen. Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kombinationstherapiegruppe und der Kontrollgruppe besteht bei dem \*p-Wert ≤ 0,05 (MW Test). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und allen weiteren Behandlungsgruppen ist nicht vorhanden (Kontrollgruppe (n=10), der sCD95Fc-Gruppe (n=10), der Kombinationstherapiegruppe (n=8) und der Infliximabgruppe (n=7)).

### **3.5. Palliativer Therapieansatz bei orthotoper Inokulation der PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zelllinien.**

#### **3.5.1. Heterogenität des Tumorwachstums und die Auswertung der Metastasierung**

Nach sonographischer Untersuchung des Primärtumors bei palliativer Therapie am POD 27 wurde festgestellt, dass die therapeutischen Behandlungen in den PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Gruppen auf die Kontrollgruppe bezogen nicht signifikant sind.

Die Primärtumorgröße erreicht am POD 27 in der PancTu1*Luc*- Kontrollgruppe (n=8) 234,8 mm<sup>3</sup>, in der PancTu1*Luc*-sCD95Fc-Gruppe (n=5) 177,6 mm<sup>3</sup>; in der PancTu1-Kontrollgruppe (n=7) 94,69 mm<sup>3</sup>, in der PancTu1-sCD95Fc-Gruppe (n=7) 94,33 mm<sup>3</sup>, in der Panc1- Kontrollgruppe (n=7) 10,65 mm<sup>3</sup> und in der Panc1-sCD95Fc-Gruppe (n=8) 17,40 mm<sup>3</sup> (Median). Einen großen Aspekt hat das Tumorwachstum bei verschiedenen Zelllinien. Man unterscheidet schnell wachsende von langsam wachsenden Primärtumoren (s. Kontrollen, Abb. 32) z. B. PancTu1*Luc* und PancTu1 \*p-Wert ≤ 0,05; PancTu1*Luc* und Panc1 \*p-Wert ≤ 0,05; PancTu1 und Panc1 \*\*\*p-Wert ≤ 0,001 (MW Test).

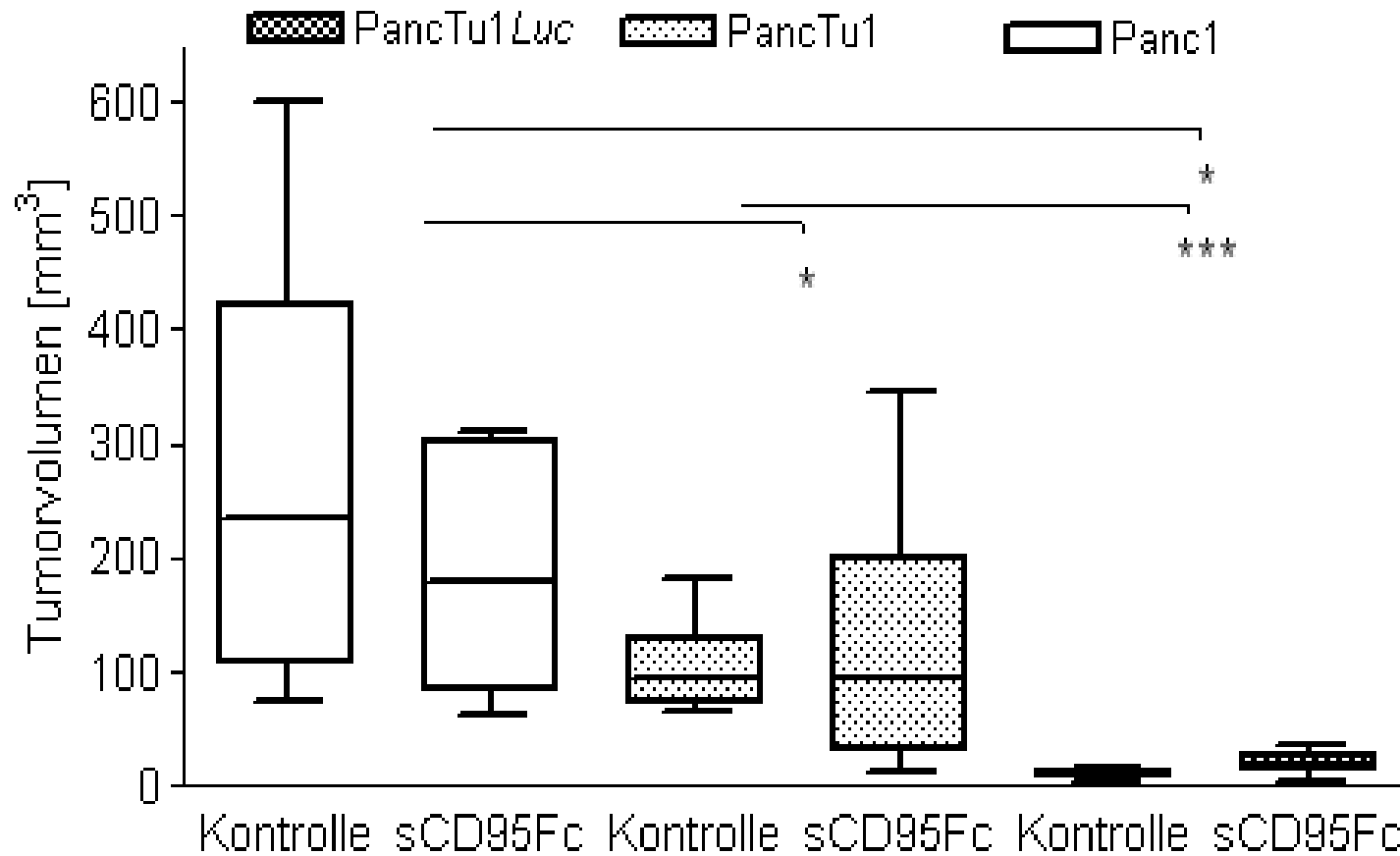


Abb. 32: Ultraschalluntersuchung des Primärtumors bei palliativer Therapie am POD 27 in der PancTu1Luc- Kontrollgruppe (n=8), in der PancTu1Luc-sCD95Fc-Gruppe (n=5), und in der PancTu1- Kontrollgruppe (n=7), in der PancTu1-sCD95Fc-Gruppe (n=7). Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen PancTu1Luc und Panc1 (Kontrollgruppen) beträgt \*p-Wert  $\leq 0,05$ ; PancTu1Luc und PancTu1(Kontrollgruppen) beträgt \*p-Wert  $\leq 0,05$ ; PancTu1 und Panc1 (Kontrollgruppen) besteht bei \*\*\*p-Wert  $\leq 0,001$ . Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und den Behandlungsgruppen ist nicht vorhanden (MW Test).

## Ergebnisse

Aufgrund der Feststellung, dass sich die Tiere aus den Panc1- Kontroll- und Behandlungsgruppen optisch in einem sehr gesunden Zustand befanden und sonographisch kleine Pankreastumore zeigten (Abb. 33), wurde der Sektionstag von POD 27 auf POD 34 umgelegt. Am POD 27 wurden die Tiere aus den Gruppen PancTu1Luc und PancTu1 narkotisiert, gewogen und getötet. Die Tumore wurden manuell gemessen und gewogen (Abb. 34).

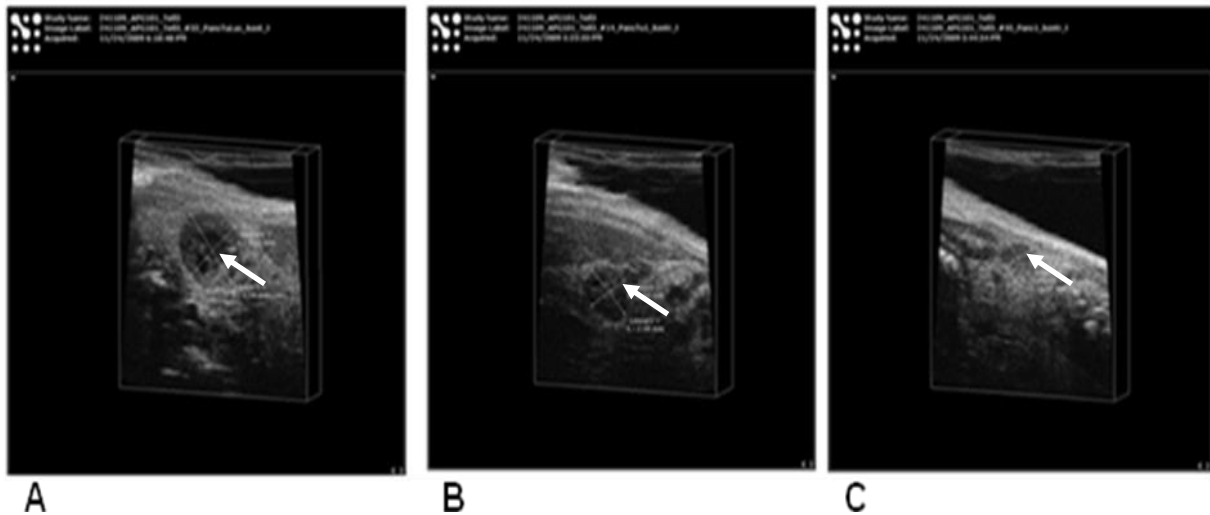


Abb. 33: Ultraschallabbildung des Tumorwachstums in den Kontrollgruppen bei orthotoper Inokulation: PancTu1Luc- (A); PancTu1- (B); Panc1- (C) Zelllinien

Das Primärtumorgewicht hat in der PancTu1Luc- Kontrollgruppe (n=6) 614,5 mg, in der PancTu1Luc-sCD95Fc-Gruppe (n=5) 448,5 mg und in der PancTu1-Kontrollgruppe (n=7) 194 mg, in der PancTu1-sCD95Fc-Gruppe (n=7) 190 mg (Median) erreicht. Die Gewichtsdaten in den PancTu1Luc-Kontroll- und PancTu1Luc-sCD95Fc-Behandlungsgruppen ergeben einen statistisch signifikanten Unterschied mit \*p-Wert  $\leq 0,05$  (Abb. 34).

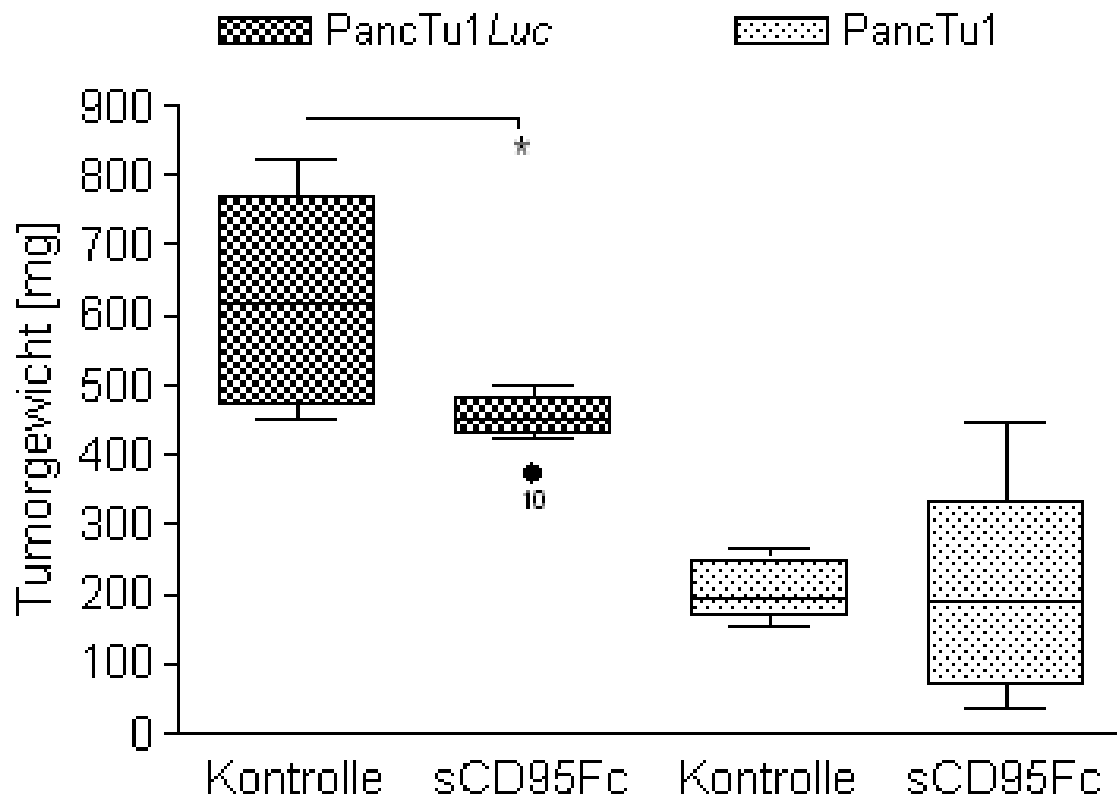


Abb. 34: Das Primärtumorgewicht (bei den PancTu1Luc- und PancTu1- Zelllinien) bei der palliativen Therapie am POD 27 in der PancTu1Luc- Kontrollgruppe (n=6), in der PancTu1Luc-sCD95Fc-Gruppe (n=5), und in der PancTu1- Kontrollgruppe (n=7), in der PancTu1-sCD95Fc-Gruppe (n=7). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der PancTu1Luc- Kontrollgruppe und in der PancTu1Luc-sCD95Fc-Gruppe beträgt \*p-Wert  $\leq 0,05$ . Abgebildet sind Mediane (MW Test).

Das Primärtumorvolumen hat in der PancTu1Luc- Kontrollgruppe (n=6)  $245 \text{ mm}^3$ , in der PancTu1Luc-sCD95Fc-Gruppe (n=3)  $427,5 \text{ mm}^3$  und in der PancTu1- Kontrollgruppe (n=5)  $137,5 \text{ mm}^3$ , in der PancTu1-sCD95Fc-Gruppe (n=5)  $62,50 \text{ mm}^3$  (Median) erreicht. Das Volumen wurde manuell gemessen und nach der Ellipsoid Formel (wie in 2.2.7. beschrieben) berechnet. Das Primärtumorvolumen in den Kontroll- und Behandlungsgruppen ergibt keinen statistisch signifikanten Unterschied (s. Abb. 35). Ein möglicher Zusammenhang des Primärtumorgewichtes mit dem Primärtumorvolumen wird nachstehend diskutiert.

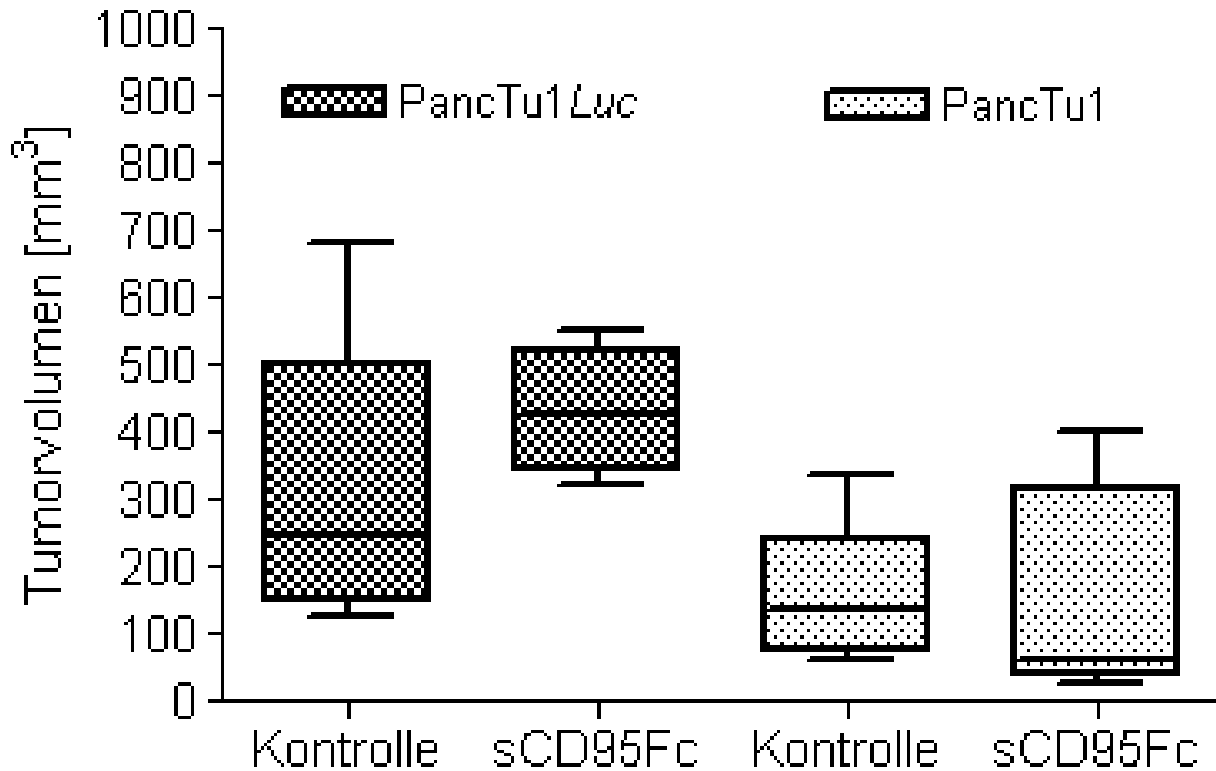


Abb. 35: Primärtumorvolumen (PancTu1Luc- und PancTu1- Zelllinien) manuell gemessen bei der palliativen Therapie am POD 27 in der PancTu1Luc- Kontrollgruppe (n=8), in der PancTu1Luc-sCD95Fc-Gruppe (n=5), und in der PancTu1- Kontrollgruppe (n=7), in der PancTu1-sCD95Fc-Gruppe (n=7). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der PancTu1Luc- Kontrollgruppe und in der PancTu1Luc-sCD95Fc-Gruppe beträgt \*p-Wert  $\leq 0,05$  (MWTTest). Abgebildet sind Mediane.

Die entnommenen Metastasen hatten eine feste Konsistenz, waren unregelmäßig geformt und gut abgrenzbar. Die Metastasen wurden manuell gemessen und gewogen. Das Metastasengewicht hat in der PancTu1Luc- Kontrollgruppe (6 von insgesamt 8 Tieren hatten Metastasen) 761,5 mg, in der PancTu1Luc-sCD95Fc-Gruppe (4 von insgesamt 5 Tieren hatten Metastasen) 300,5 mg, und in der PancTu1- Kontrollgruppe (4 von insgesamt 7 Tieren hatten Metastasen) 147,5 mg und in der PancTu1-sCD95Fc-Gruppe (4 von insgesamt 7 Tieren hatten Metastasen) 135 mg (Median) erreicht. Das Volumen der Bauchnahtmetastasen in den Kontroll- und Behandlungsgruppen ergibt keinen statistisch signifikanten Unterschied. Wie schon in 3.5.1. beschrieben, hat einen großen Aspekt das Tumorwachstum bei verschiedenen Zelllinien. In dem Fall auch wurden schnell wachsende und langsam wachsende Tumorzellen beobachtet.

Das Zellwachstum in den PancTu1Luc- und PancTu1- Kontrollgruppen unterscheidet

sich signifikant mit \*\*p-Wert  $\leq 0,01$  (s. Abb. 36).

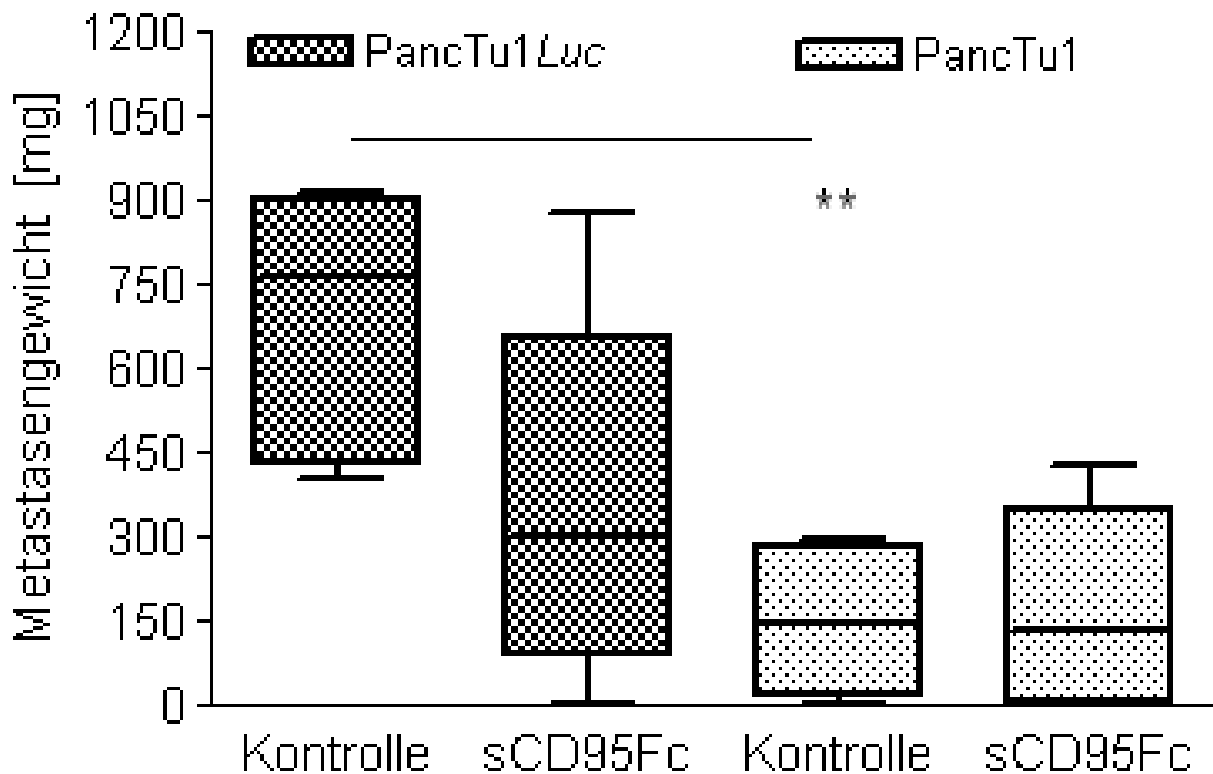


Abb. 36: Metastasengewicht (PancTu1Luc- und PancTu1- Zelllinien) bei der palliativen Therapie am POD 27 in der PancTu1Luc- Kontrollgruppe (n=8), in der PancTu1Luc-sCD95Fc-Gruppe (n=5), und in der PancTu1- Kontrollgruppe (n=7), in der PancTu1-sCD95Fc-Gruppe (n=7). Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe ist nicht vorhanden. Der Zellwachstum in den PancTu1Luc- und PancTu1- Kontrollgruppen unterscheidet sich signifikant mit \*\*p-Wert  $\leq 0,01$  (MW Test).

Aufgrund der Feststellung, dass sich die Tiere aus den oben beschriebenen Panc1-Kontroll- und Behandlungsgruppen (s. 3.5.1.) optisch in einem sehr gesunden Zustand befanden und sonographisch kleine Pankreastumore zeigten, wurde der Sektionstag von POD 27 auf POD 34 gelegt. Am POD 34 wurden die Tiere aus der Gruppe Panc1 narkotisiert, gewogen und getötet. Die entnommenen Primärtumore des Pankreas hatten eine feste Konsistenz, waren ellipsoid-geformt und morphologisch sehr gut abgrenzbar. Die Tumore wurden manuell gemessen und gewogen.

Das Primärtumorgewicht hat in der Panc1- Kontrollgruppe (n=7) 101 mg, Panc1-sCD95Fc-Gruppe (n=8) 133 (Median) erreicht, das Gewicht in den Kontroll- und

## Ergebnisse

Behandlungsgruppen ergibt keinen statistisch signifikanten Unterschied (s. Abb. 37).

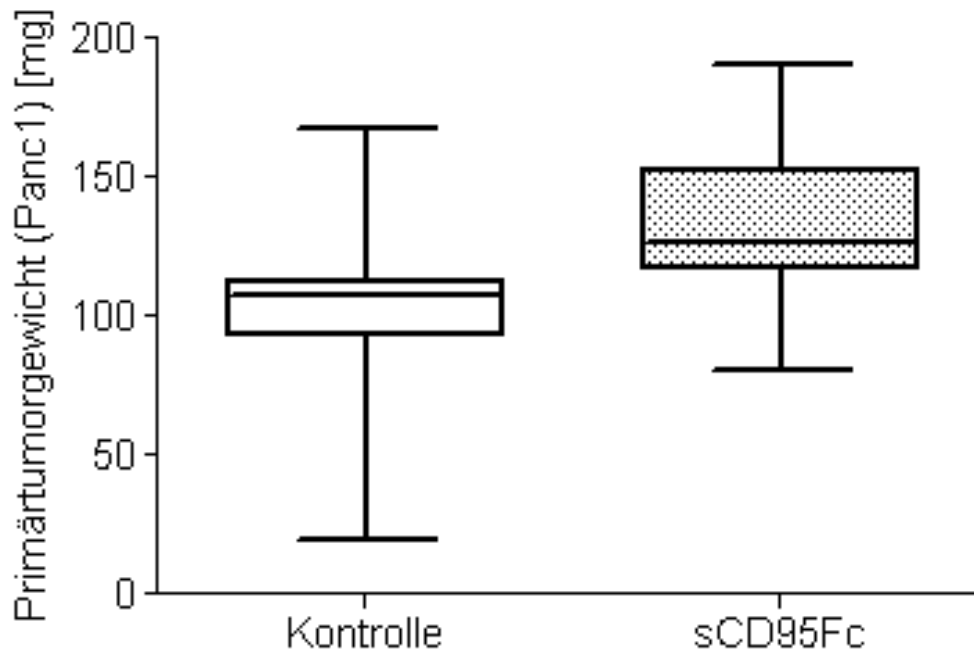


Abb. 37: Primärtumorgewicht (Panc1-Zelllinie) bei der palliativen Therapie am POD 34 gewogen. Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (n=7) und Behandlungsgruppe (n=8) ist nicht vorhanden (MW Test).

Das Primärtumorvolumen hat in der Panc1- Kontrollgruppe (n=7) 55 mm<sup>3</sup>, Panc1-sCD95Fc-Gruppe (n=8) 158 mm<sup>3</sup> (Median) erreicht. Das Volumen wurde manuell gemessen und nach Ellipsoid Formel (s. 2.2.7.) berechnet. Das Primärtumorvolumen in den Kontroll- und Behandlungsgruppen ergibt statistisch einen signifikanten Unterschied mit \*p-Wert ≤ 0,05. (s. Abb. 38).

## Ergebnisse

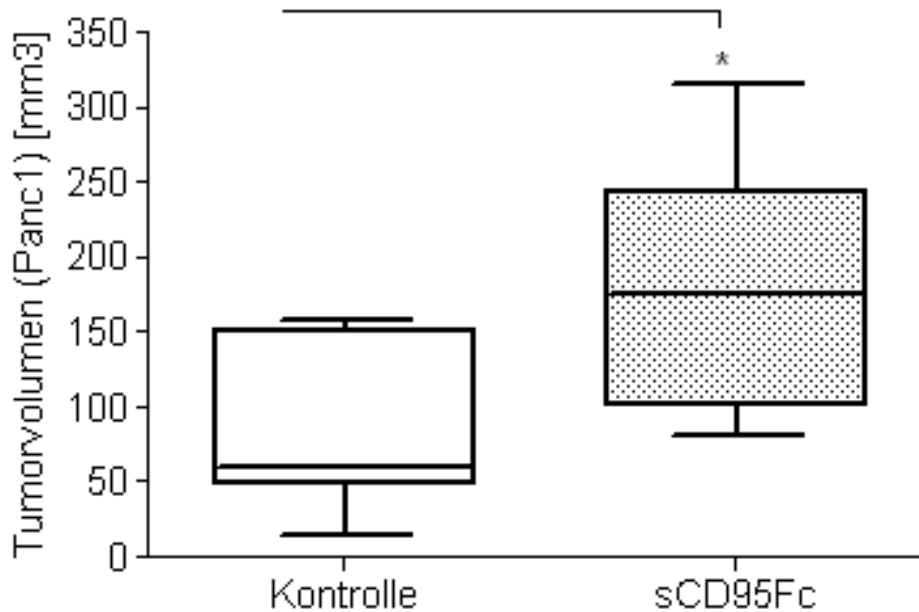


Abb. 38: Primärtumorvolumen (Panc1-Zelllinie) bei der palliativen Therapie am POD 34 gemessen. Abgebildet sind Mediane. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (n=7) und Behandlungsgruppe (n=8) ist vorhanden, \*p-Wert  $\leq 0,05$  (MW Test).

Die entnommenen Metastasen (Bauchnaht-, Leber-, Milz- Metastasen) wurden gezählt und die Ergebnisse in Tabelle 6 zusammengefasst. Die Metastasenanzahl nach dem palliativen Therapieansatz bei orthotoper Inokulation der PancTu1*Luc*-, PancTu1- Zelllinien ist hoch (bei ca. 50% der behandelten Tieren) und Panc1-Zelllinien sehr hoch (bei allen behandelten Tieren).

Gruppe	Tiere, insgesamt	Anzahl der Tieren mit Leber-, Milz-Metastasen	Anzahl Metastasen (insgesamt pro Gruppe)
PancTu <i>Luc</i> /Kontrollgruppe (POD 27)	8	6	16
PancTu1 <i>Luc</i> /sCD95Fc (POD 27)	5	4	4
PancTu1/Kontrollgruppe (POD 27)	7	4	4
PancTu1/sCD95Fc (POD 27)	7	4	4
Panc1/Kontrollgruppe (POD 34)	6	6	26
Panc1/sCD95Fc (POD 34)	7	7	40

Tab. 6: Die Metastasenanzahl nach dem palliativen Therapieansatz bei orthotoper Inokulation der PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zelllinien

### **3.6. Immunhistologische Färbungen**

Sämtliche Primär- und Rezidivtumore wurden geschnitten und da die Breitspektrumzytokeratin- (Klon KL 1) und Ki-67- Antikörper eine positive Reaktion auf humane epitheliale Zellen (Gerdes, J. et al., 1992; Cattoretti, G. et al., 1992; Fukushima, S. et al., 1987) zeigten, wurden alle Primär- und Rezidivtumore gefärbt. Mit der immunochemischen Färbetechnik wurde die Anzahl der proliferierenden Tumorzellen mit dem Zell-Marker Ki-67 (Klon MIB-1) in den experimentellen, orthotopen Tumoren untersucht (s. 2.4.3). KI-67 findet sich in allen proliferierenden Zellen und ist ein exakter Marker für die Wachstumsfraktion einer gegebenen Zellpopulation (Gerdes, J. et al., 1992). Mit Hilfe des humanspezifischen monoklonalen Anti-Zytokeratin (Klon KL 1) Antikörpers wurde der humane Anteil am Tumorgewebe identifiziert und vom murinen Wirtsgewebe differenziert. Die histologischen Schnitte zeigten, dass es sich bei den gemessenen Lichtemissionen tatsächlich um Signale von Tumoren oder Metastasen und nicht um Artefakte handelt. Die immunhistologische Färbung der Pankreaskarzinome aller Behandlungsgruppen zeigt ein intensives charakteristisches Reaktionsmuster das von der Tumordichte abhängig erscheint (Abb.39.1; 39.2).

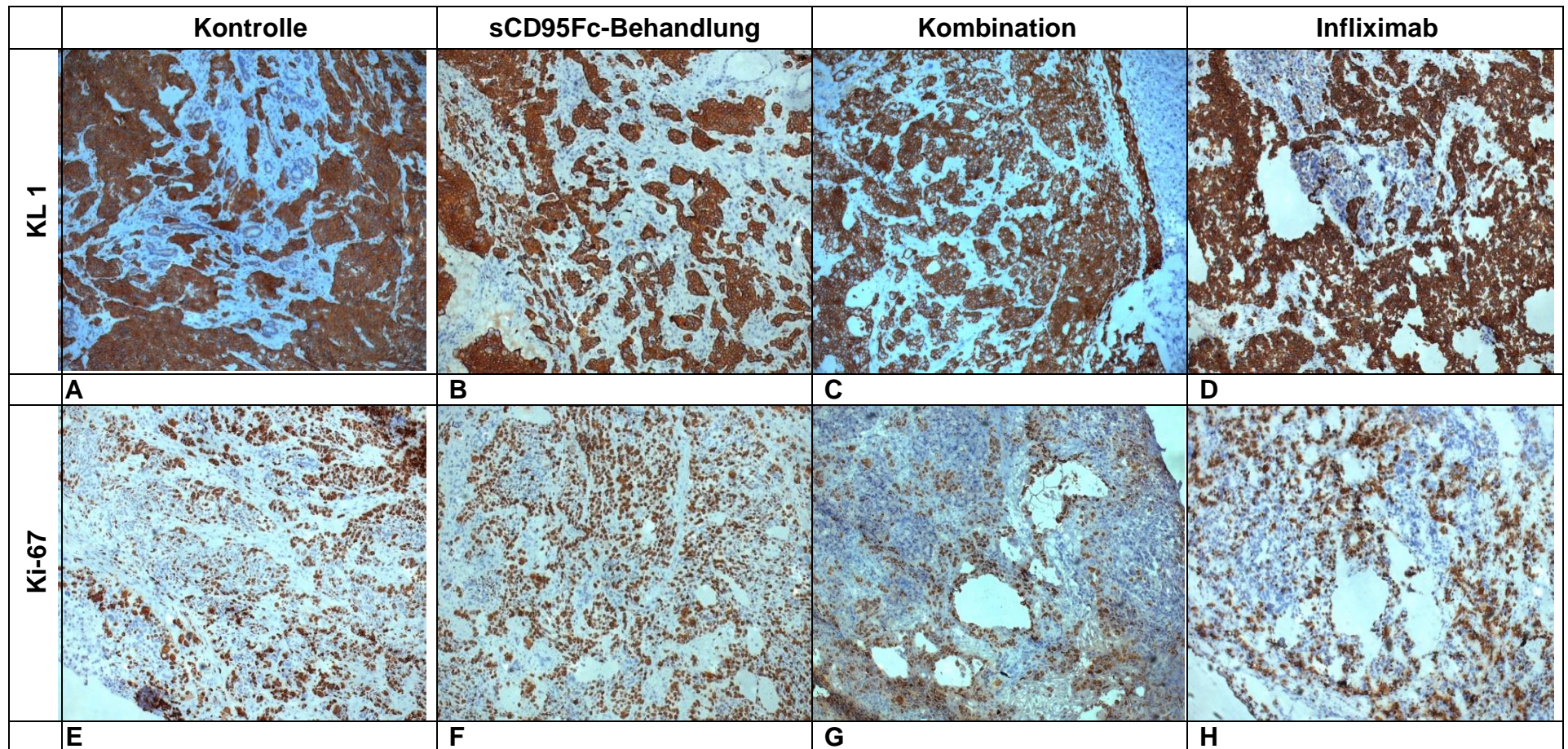


Abb. 39.1: Repräsentative histologische Ausschnitte der Untersuchung der Proliferationsvorkommen mit dem Zell-Marker Ki-67 (Klon MIB-1) und mit Zytokeratin (Klon KL 1) markiertem Humangewebe in experimentellen, orthotopen Pankreastumoren nach der palliativen Therapie in den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Abgebildet sind die immunhistologische Färbungen der positiv braunangefärbten Zellen der Primärtumore des Pankreas (Vergrößerung: x10), mit Zytokeratin- Antikörper (A – D, braungefärbt) mit dem Zell-Marker Ki-67 (E – H, braungefärbt, Zytokeratin (KL 1)- und Zell-Marker Ki-67-Expression ist stark positiv). Murines Pankreasteil ist durch die HE-Gegenfärbung bläulich gefärbt:

A: Kontrolle, KL 1; B: sCD95Fc-Behandlung, KL 1; C: Kombinations-Behandlung, KL 1; D: Infliximab-Behandlung, KL 1; E: Kontrolle, Ki-67; F: sCD95Fc-Behandlung, Ki-67; G: Kombinations-Behandlung, Ki-67; H: Infliximab-Behandlung, Ki-67

Ergebnisse

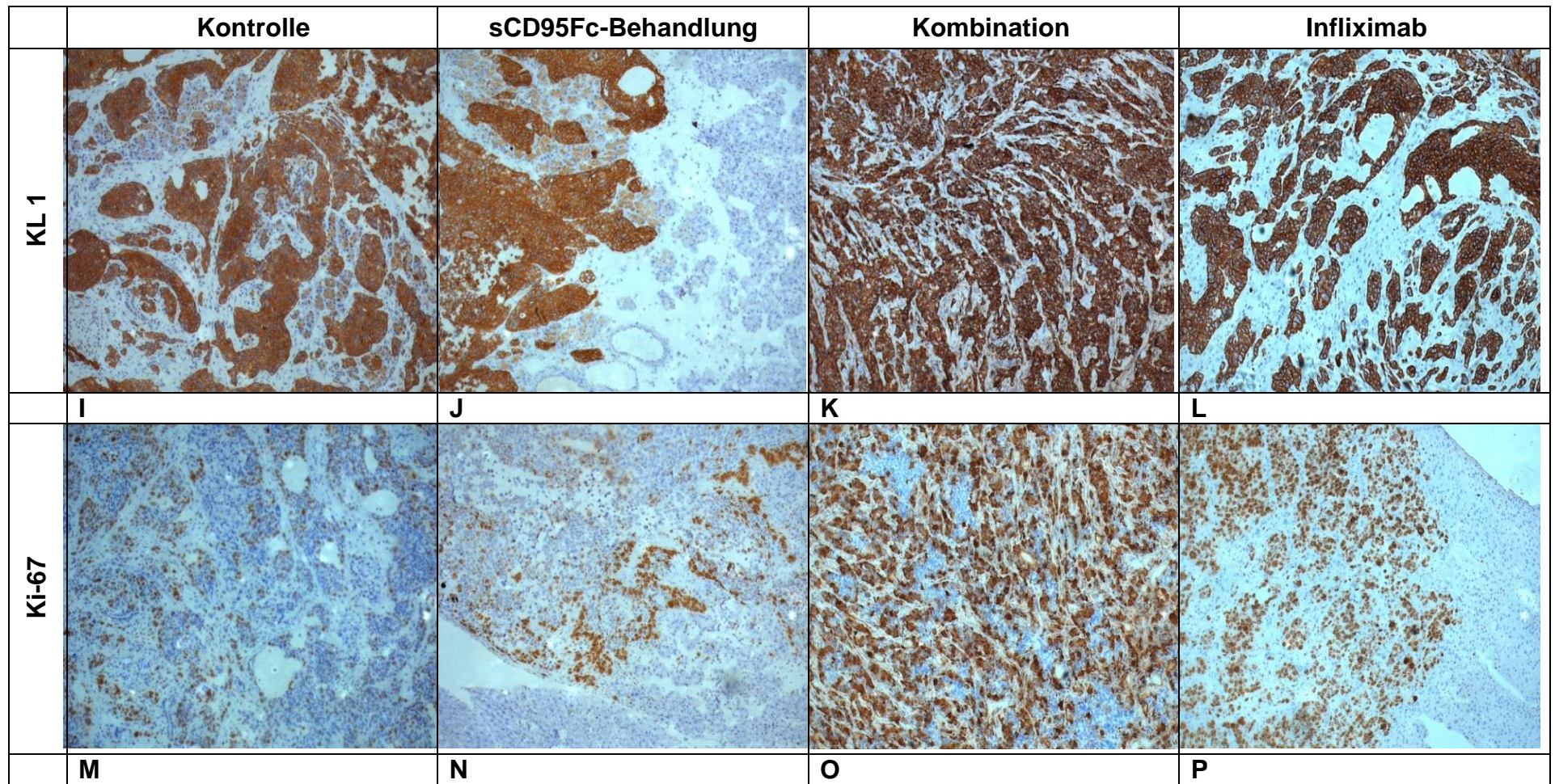


Abb. 39.2: Repräsentative histologische Ausschnitte der Untersuchung der Proliferationsvorkommen mit dem Zell-Marker Ki-67 (Klon MIB-1) und mit Zytokeratin (Klon KL 1) markiertem Humangewebe in experimentellen, orthotopen Pankreastumoren nach der adjuvanten Therapie in den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Abgebildet sind die immunhistologische Färbungen der positiv braunangefärbten Zellen der Rezidivtumore des Pankreas (Vergrößerung: x10), mit Zytokeratin- Antikörper (I – L, braun) mit dem Zell-Marker Ki-67 (M-P, braungefärbt, Zytokeratin (KL 1)- und Zell-Marker Ki-67-Expression ist stark positiv). Murines Pankreasteil ist durch die HE-Gegenfärbung bläulich gefärbt: I: Kontrolle, KL 1; J: sCD95Fc-Behandlung, KL 1; K: Kombinations-Behandlung, KL 1; L: Infliximab-Behandlung, KL 1; M: Kontrolle, Ki-67; N: sCD95Fc-Behandlung, Ki-67; O: Kombinations-Behandlung, Ki-67; P: Infliximab-Behandlung, Ki-67

## Ergebnisse

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde die Zahl der angefärbten Tumorzellen oder Zellkerne (bzw. Größe der Tumorfläche) halbquantitativ ausgewertet. Fünf Gesichtsfelder des Schnittes wurden unter Verwendung einer 10- und 20- fachen Vergrößerung des Lichtmikroskopes angesehen und mit einer Digitalkamera fotodokumentiert (s. 2.4.5.). Nach der Zytokeratin KL 1 - Färbung unterscheiden sich die humanen Tumorzellen (braungefärbt) deutlich von den murinen Zellen, Pankreasazinuszellen oder Tumorstroma (blaugefärbt). Die Tumore auf den Schnitten haben abhängig von der Behandlung verschiedene Zell- und Tumorstromadichte (Abb. 39.1. (A-D), Abb. 39.2. (I-L)). Auch bei dem adjuvanten Therapieansatz nach der Primärtumorresektion steigt der Anteil, der mit Zytokeratin KL 1 - Antikörper markierten humanen Tumorzellen, in den orthotopen Tumoren bis auf ca. 70 % im Vergleich zu dem Anteil, der mit Zytokeratin KL 1- Antikörper markierten humanen Tumorzellen, in den orthotopen Tumoren nach palliativer Therapie. Besonders entwickeltes Tumorstroma (blaugefärbt) mit den Humanzellanteilen (braun gefärbt) wurde in der Kombinationstherapie-Gruppe beobachtet (Abb. 39.2. K).

Das Ki-67 Antigen wird während aller aktiven Zellzyklusphasen (G1-, S-, G2-Phase) im Zellkern während der Mitose mit der Immunfärbung nachgewiesen. Die Zellen in der G0-Phase werden nicht markiert, da in ruhenden Zellen das Ki-67-Protein fehlt. Bei der Verwendung des Ki-67-Antikörpers zeigen die Tumore aller Behandlungsgruppen ebenso wie die unbehandelten Kontrolltumore eine starke heterogene Kern- und teilweise auch eine Zytoplasmafärbung (s. Abbildung 39.1. (E-H), 39.2. (M-P), braun gefärbt). Eine Quantifizierung (Proliferationsindexbestimmung) war wegen der Heterogenität der Kern- und Zytoplasma Färbungen nicht möglich.

### **3.7. Medikamentöse Wirkung bei den palliativen und adjuvanten Therapieansätzen**

Den SCID-bg Mäusen wurden humane Pankreaskarzinomzellen *PancTu1Luc* orthotop ins Pankreas inokuliert, um die klinische Situation der Krebserkrankung abzubilden.

Die palliative Behandlung wurde medikamentös am dritten Tag nach der

## Ergebnisse

Zellinokulation in der ersten Tierversuchsgruppe begonnen. Die Therapie in der ersten Versuchsgruppe erfolgte durch die Applikation von NaCl (10 µl/g KGW, n=12) als Kontrolle, von einem humanen löslichen Fusionsprotein (Abb.12, 13) sCD95Fc (100 µl/g KGW, n=12), von einem monoklonalen Antikörper (Abb.14) Infliximab (Remicade<sup>®</sup>, 10 µg/g KGW, n=12), auch die Kombinationstherapie („Kombi“) aus sCD95Fc (100 µg/g KGW) und Infliximab (Remicade<sup>®</sup>, 10 µg/g KGW), n=12) in die Peritonealhöhle (s. Tabelle 3). Bei dem palliativen Therapieansatz wurden insgesamt drei Behandlungen am POD 3, POD 10 und POD 17 nach einer orthotopen Zellinokulation durchgeführt. Die Studie dauerte 21 Tage (s. Abb. 15).

Die adjuvante Therapie in der zweiten Versuchsgruppe (PancTu1Luc Zellen) wurde nach vollständiger operativer Entfernung aller erkennbaren Tumoranteile und des Pankreas (Relaparotomie mit subtotaler Pankreatektomie und Resektion) angewandt. Die operative Pankreatektomie und Resektion der inokulierten Tumore wurden 10 Tage nach der Zellinokulation durchgeführt, dadurch spiegelt sich hier eine klinische Situation nach einer kompletten Primärtumorresektion (R0-Resektion) wider. Die Therapie in der zweiten Versuchsgruppe erfolgte durch die intraperitoneale Applikation von NaCl (10 µl/g KGW, n=12) als Kontrolle, von einem humanen löslichen Fusionsprotein (Abb.12, 13) sCD95Fc (100 µl/g KGW, n=12), von einem monoklonalen Antikörper (Abb.14) Infliximab (Remicade<sup>®</sup>, 10 µg/g KGW, n=12) und die Kombinationstherapie („Kombi“) aus sCD95Fc (100 µg/g KGW) und Infliximab (Remicade<sup>®</sup>, 10 µg/g KGW, n=12). Die Applikation erfolgte im 7- tägigen (3 Behandlungen) Intervall, am POD 3, POD 10 und POD 17 nach Primärtumorresektion ohne Anästhesie und dauerte 21 Tage (Abb.16).

Beim Gewichtsvergleich der beiden Behandlungsgruppen der palliativen Therapie und der adjuvanten Therapie am POD 21 besteht ein statistischer Unterschied zwischen zwei Kombinationstherapiegruppen mit einem  $**p \leq 0,01$ ; weitere Behandlungsgruppen (Kontroll-, sCD95Fc- und Infliximabbehandlungsgruppen) zeigen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 40).

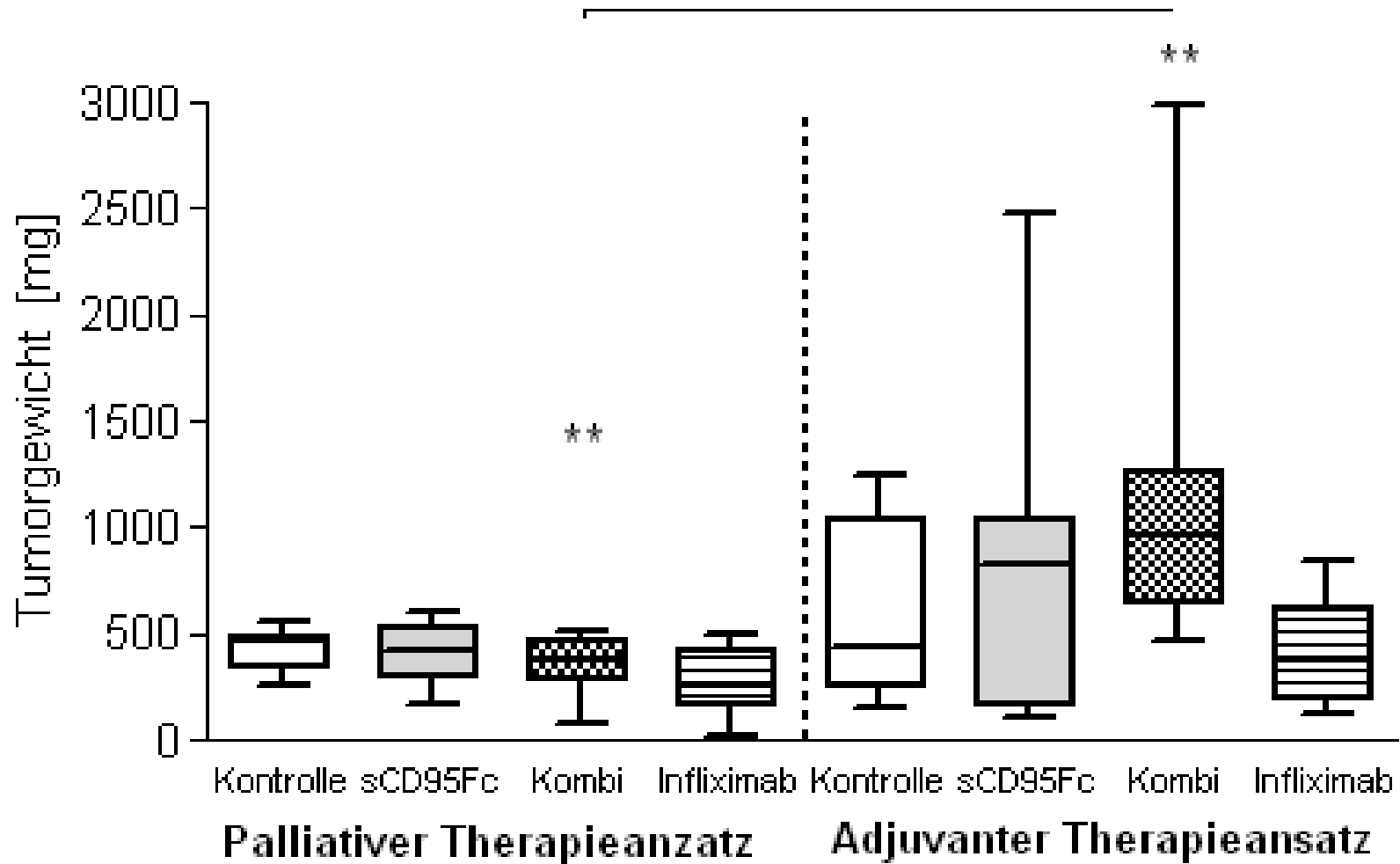


Abb. 40: Gewichtsvergleich der Primärtumore bei der palliativen Therapie und der Rezidivtumore bei der adjuvanten Therapie am POD 21 (mit der Zelllinie PancTu1Luc). Abgebildet sind Mediane. Der statistische Unterschied war zwischen den folgenden Behandlungsgruppen vorhanden: Kombinationstherapiegruppen mit dem \*\*p-Wert  $\leq 0,01$ ; weitere Behandlungsgruppen (Kontroll-, sCD95Fc- und Infliximab-Behandlungsgruppen) unterscheiden sich nicht signifikant (MWTTest).

## Ergebnisse

Am POD 21 wurde das Volumen der Primärtumore bei der palliativen Therapie und der Rezidivtumore bei adjuvanter Therapie (PancTu1Luc Zellen) mittels Kleintierultraschall Vevo<sup>®</sup> 770 Imaging System gemessen und verglichen. Der Vergleich der Tumorumfänge zwischen allen Behandlungsgruppen unterscheidet sich statistisch signifikant nur zwischen zwei Kombinationstherapiegruppen (Kombination aus sCD95Fc und Infliximab s.o.) mit dem \*\*\*p-Wert  $\leq 0,001$ ; weitere Behandlungsgruppen haben keinen signifikanten Unterschied (Abb. 41).

Die Bauchnahtmetastasenzahl sowie das Metastasenvolumen und das Metastasengewicht bei der palliativen Therapie ist deutlich niedriger als bei adjuvanter Therapie in allen Behandlungsgruppen (Abb. 42, 43). Der Vergleich des Metastasenvolumens zwischen der beiden Behandlungsgruppen der palliativen Therapie und der adjuvanter Therapie unterscheidet sich statistisch signifikant zwischen zwei Kombinationstherapiegruppen mit dem \*\*p-Wert  $\leq 0,01$  und sCD95Fc-Gruppen mit dem \*\*p-Wert  $\leq 0,01$  (Abb. 43). Das Metastasengewicht der palliativen Therapie und der adjuvanter Therapie unterscheidet sich statistisch signifikant zwischen Kombinationstherapiegruppen mit dem \*p-Wert  $\leq 0,05$  und Infliximab- mit dem \*\*p-Wert  $\leq 0,01$ , sowie zwischen sCD95Fc-Gruppen mit dem \*p-Wert  $p \leq 0,05$  (Abb. 42).

Am postoperativen Tag 21 wurden alle Tiere sonographisch untersucht, gewogen, danach getötet. Für unsere Fragestellung, ob parallel durchgeführte Messungen bzw. die Ergebnisse der Sonographie mit Kleintierultraschall VisualSonics Vevo<sup>®</sup> 770 mit den Ergebnissen der Sektionsdaten (Tumorgewicht, Tumorumfang, Histologie) korrelieren, wurden die entnommenen Tumore manuell gemessen, nach der Ellipsoid Formel ausgerechnet (s. 2.2.7.) und mit den volumetrierten, sonographischen Daten verglichen. Die zwei Methoden zeigen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppen bei der Untersuchung der Volumina der Primärtumore mit dem \*p-Wert  $\leq 0,05$ . (Abb. 44, 45).

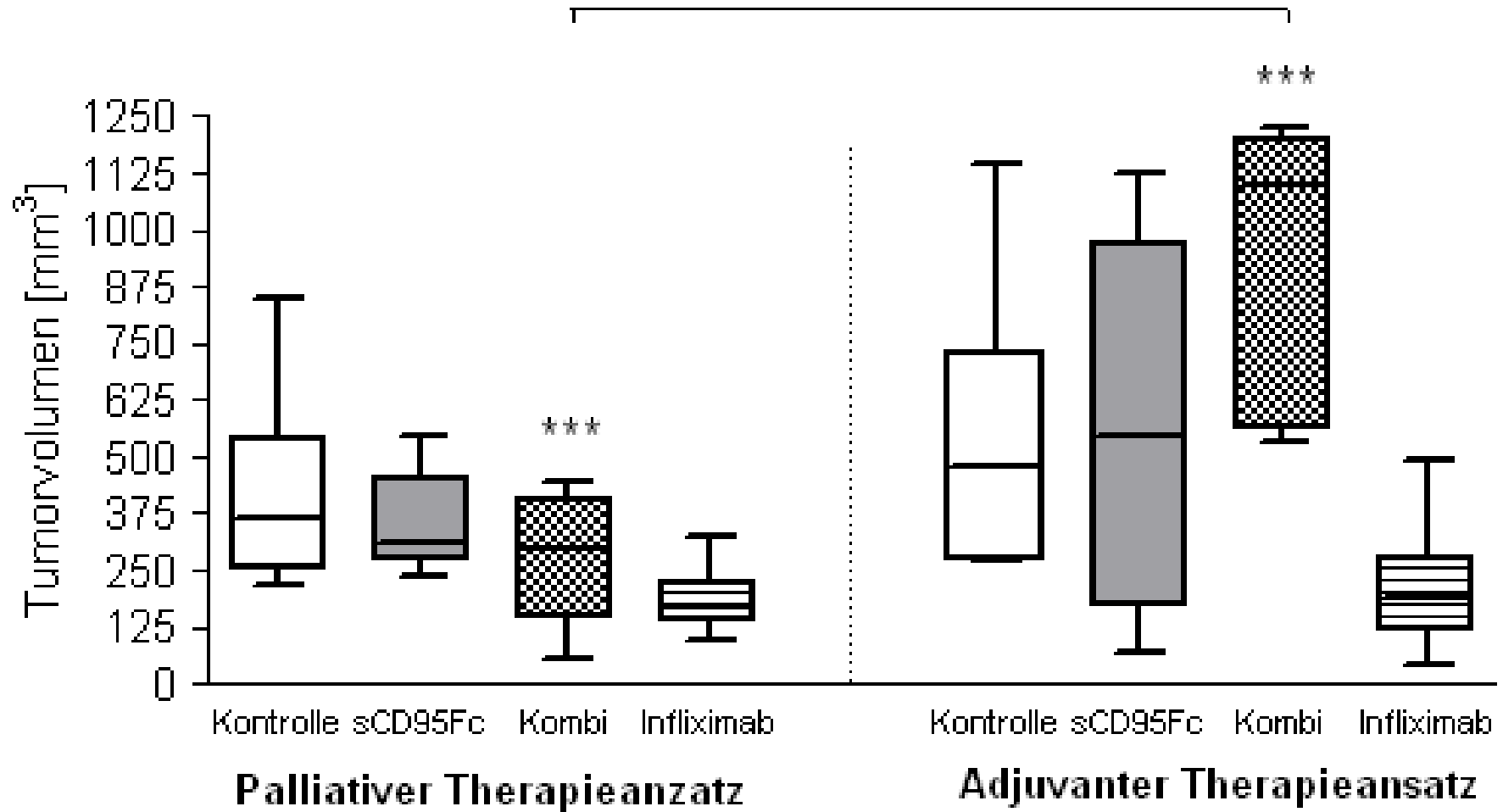


Abb. 41: Vergleich der Tumorzvolumina der Primärtumoren bei palliativer Therapie und der Rezidivtumore bei der adjuvanten Therapie (mit der Zelllinie *PancTu1Luc*) am POD 21 mit der Zelllinie *PancTu1Luc*. Die Messung wurde mittels Ultraschall durchgeführt. Abgebildet sind Mediane. Der statistische Unterschied war zwischen den folgenden Behandlungsgruppen vorhanden: Kombinationstherapiegruppen mit dem \*\*\*p-Wert  $\leq 0,001$ ; weitere Behandlungsgruppen haben keinen signifikanten Unterschied  $p \geq 0,05$  (MW Test).

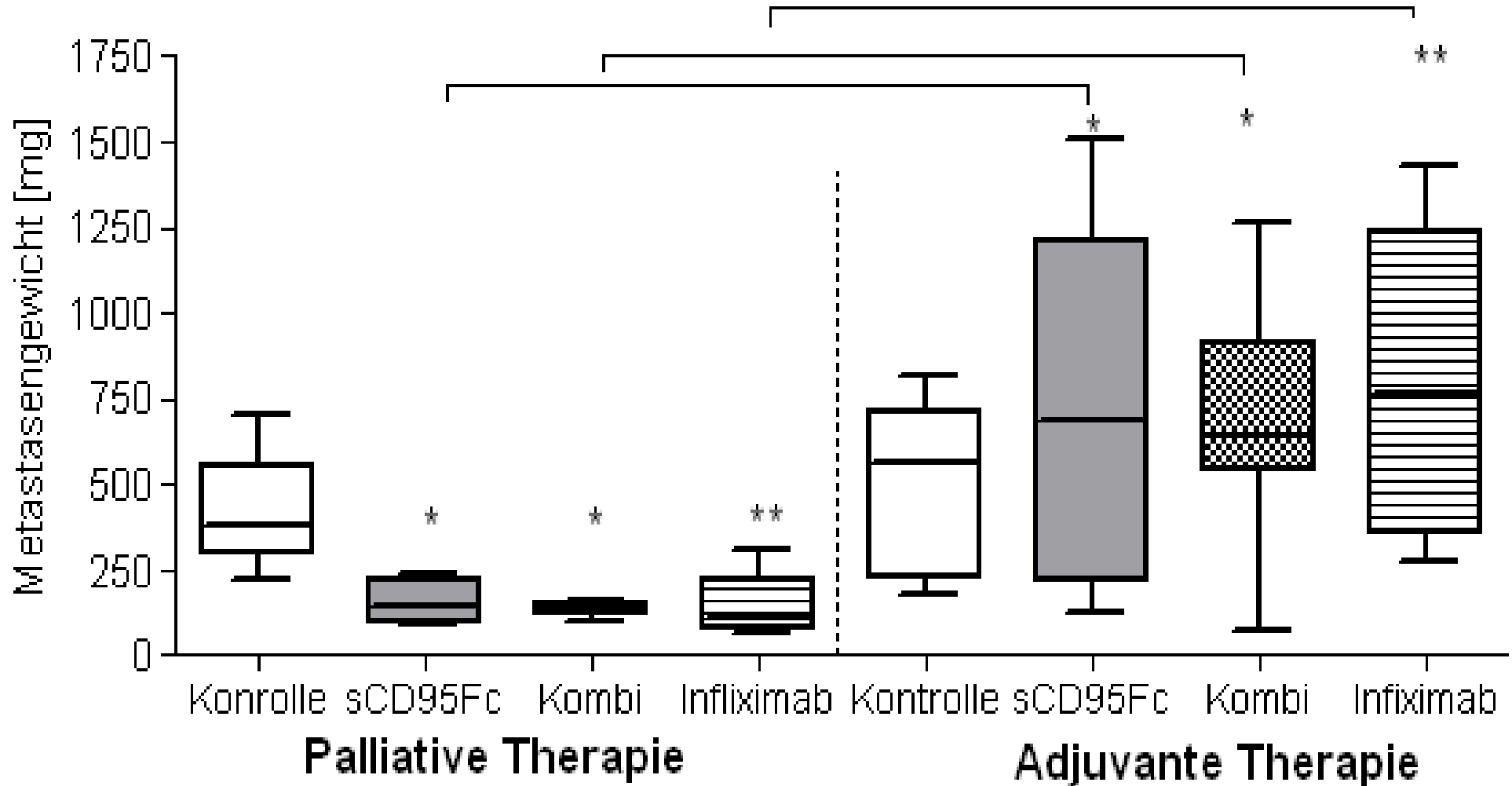


Abb. 42: Vergleich der Metastasengewichte nach der palliativen und der adjuvanten Therapie am POD 21. Es wurde die PancTu1Luc-Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Abgebildet sind Mediane. Ein statistischer Unterschied zwischen Kombinationstherapiegruppen mit dem \*p-Wert  $p \leq 0,05$  und Infliximab mit dem \*\*p-Wert  $p \leq 0,01$ , sowie zwischen sCD95Fc-Gruppen mit dem \*p-Wert  $p \leq 0,05$  ist vorhanden (MW Test).

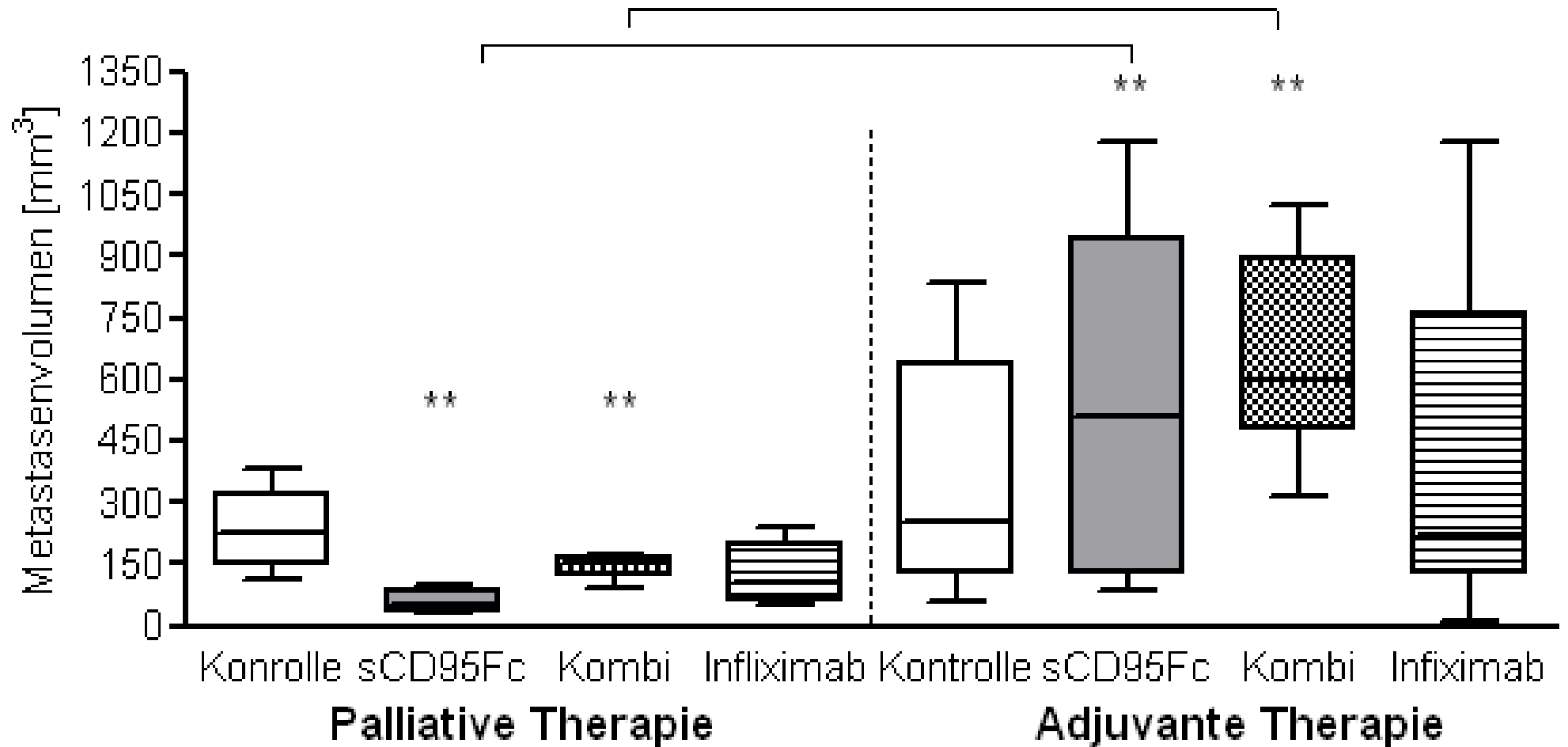


Abb. 43: Vergleich der Metastasenvolumina nach der palliativen und der adjuvanten Therapie am POD 21. Es wurde die PancTu1Luc-Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Die Messung wurde manuell durchgeführt. Abgebildet sind Mediane. Ein statistischer Unterschied zwischen Kombinationstherapiegruppen mit dem \*\*p-Wert  $\leq 0,01$  und sCD95Fc-Gruppen mit dem \*\*p-Wert  $\leq 0,01$  ist vorhanden (MW Test).

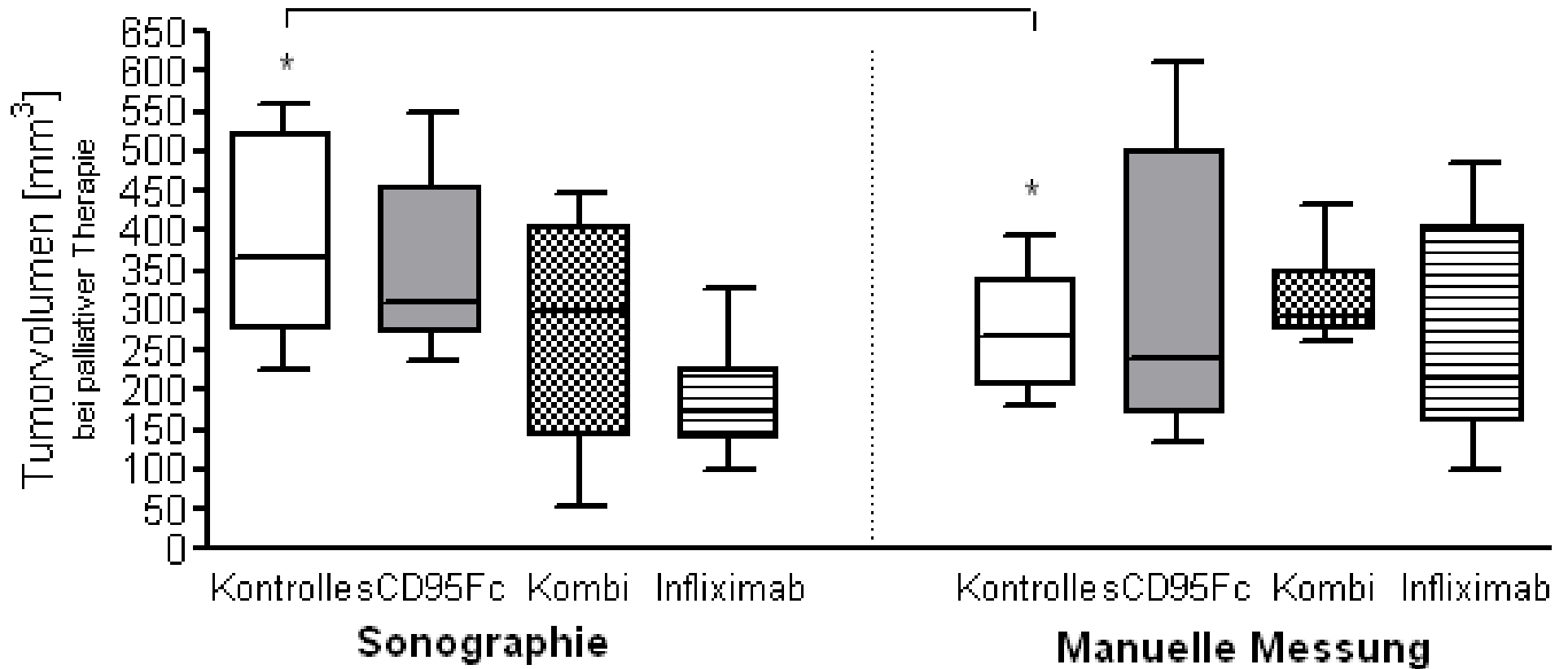


Abb. 44: Untersuchung der Volumina der Primärtumore bei palliativer Therapie am POD 21 mit zwei Methoden: Ultraschallvolumetrie und manuelle Messung nach der Sektion. Es wurde die PancTu1*Luc*- Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Abgebildet sind Mediane. Die zwei Methoden zeigen ein statistischer Unterschied zwischen Kontrollgruppen mit dem \*p-Wert  $\leq 0,05$  (MW Test).

## Ergebnisse

Der Vergleich der beiden Methoden (Ultraschallvolumetrie und manuelle Messung nach der Sektion) ergeben bei dem adjuvanten Therapieansatz am POD 21 keinen statistisch signifikanten Unterschied  $p\text{-Wert} \geq 0,05$  (s. Abb. 45).

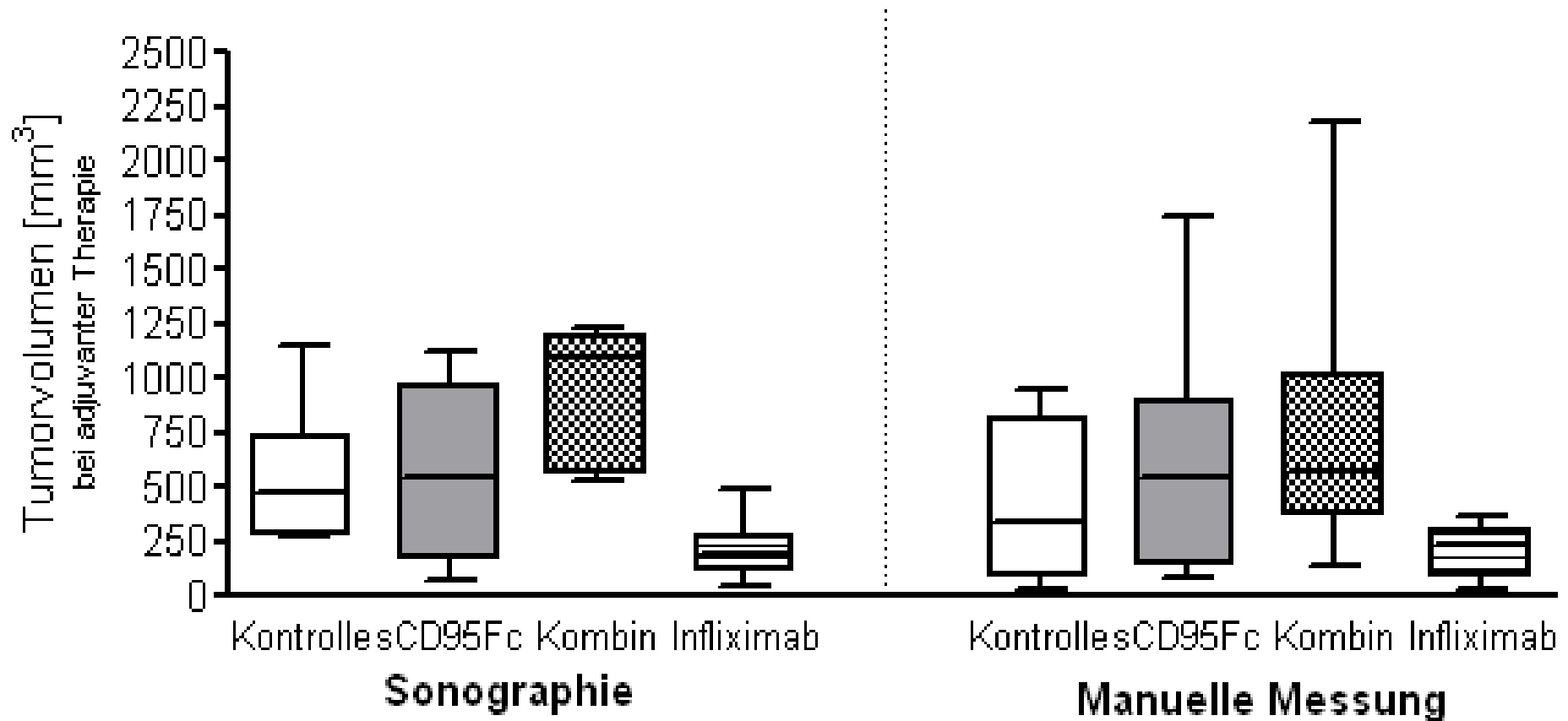


Abb. 45: Untersuchung der Volumina der Rezidivtumore bei dem adjuvanten Therapieansatz am POD 21 durch zwei Methoden: Ultraschallvolumetrie und manuelle Messung nach der Sektion. Es wurde die *PancTu1Luc*-Pankreaskarzinomzelllinie verwendet. Abgebildet sind Mediane. Die zwei Methoden zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied (MW Test).

### 3.8. Korrelationen der manuellen Messungen mit bildgebenden Verfahren

Für unsere Fragestellung, ob parallel durchgeführte Messungen mit der Bildgebungstechnik der optischen Kammer Berthold LB983 NightOwl (Lumineszenzmessung) und der Sonographie mit Kleintierultraschall VisualSonics Vevo<sup>®</sup> 770 auch mit den Sektionsdaten (Tumorgewicht, Tumorumfang) korrelieren, wurden die bildgebenden Messungen parallel durchgeführt. Um für eine Etablierung der optischen Verfahren konstante Bedingungen zu erhalten, wurden die Tumore (PancTu1Luc Zellen) zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und danach miteinander verglichen.

Die Korrelation der bildgebenden Methoden wurde mit GraphPad Prism 4 Grafiken dargestellt. Die Höhe der Korrelation wurde in Form des Korrelationskoeffizienten  $r$  dargestellt (Abb. 46). Am besten korrelieren miteinander die Sektionsdaten (Tumorgewicht und Tumorumfang) mit  $r = 0,9$  (Abb. 46, F). Die Sonographie Messungen zeigen mit den Sektionsdaten eine Korrelation, mit dem Tumorgewicht mit  $r = 0,7$  (Abb. 46, D) und mit dem Tumorumfang mit  $r = 0,7$  (Abb. 46, E). Sehr gering korreliert die Lumineszenzmessung mit den Sektionsdaten, mit dem Tumorumfang nach der Sektion mit  $r = 0,4$  (Abb. 46, B) und mit dem Tumorgewicht nach der Sektion mit  $r = 0,4$  (Abb. 46, C). Die Bildgebungsverfahren der Lumineszenzmessung und der Sonographie zeigen mit  $r = 0,2$  praktisch keine Korrelation zusammen (Abb. 46, A).

## Ergebnisse

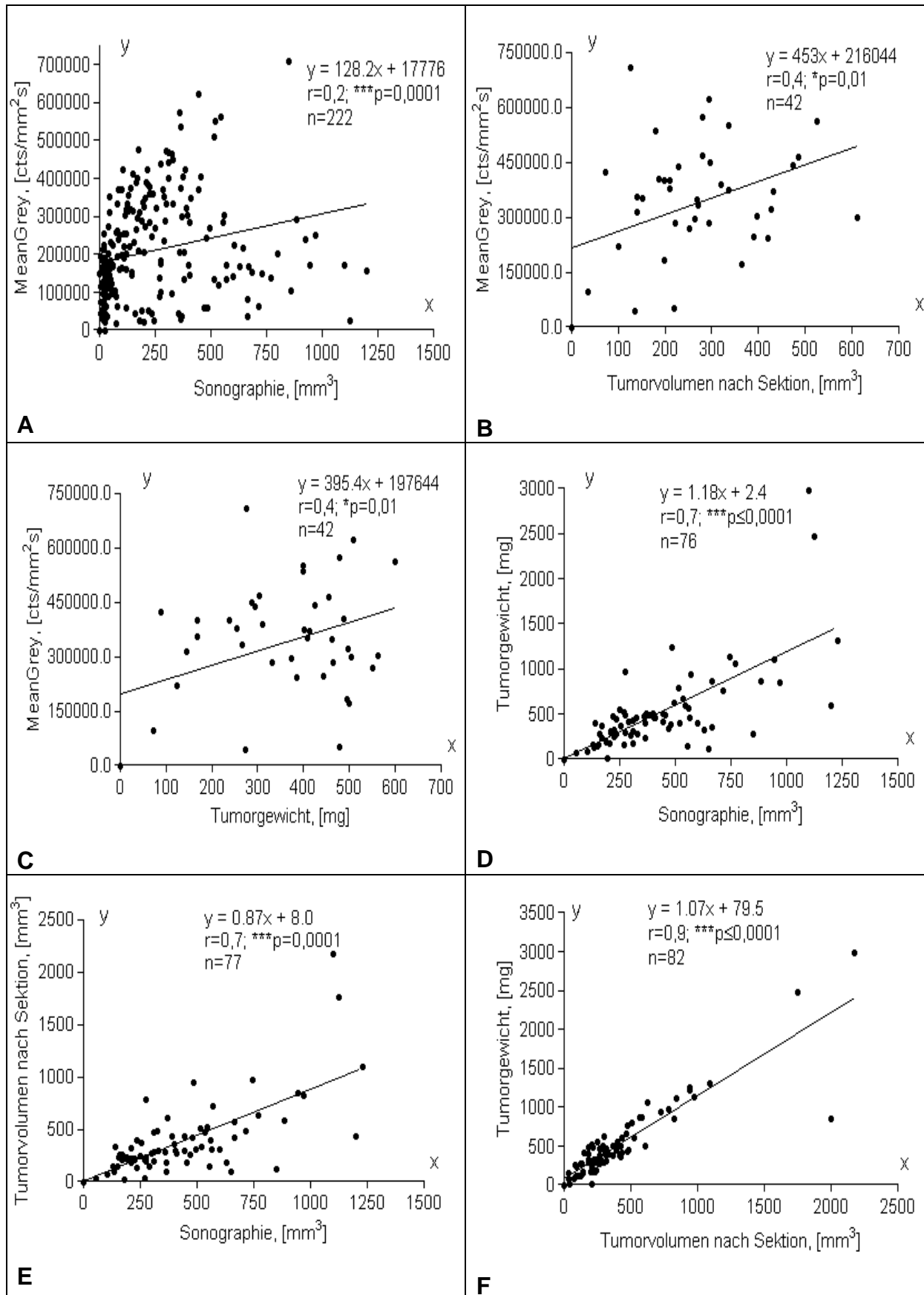


Abb. 46: Korrelation der Bildgebungsverfahren. A: Korrelation der Lumineszenzmessung und Sonographie,  $r = 0.2$ ; B: Korrelation der Lumineszenzmessung und der Tumolvolumen

## Ergebnisse

nach der Sektion,  $r = 0,4$ ; C: Korrelation von der Lumineszenzmessung und des Tumorgewichtes nach der Sektion,  $r = 0,4$ ; D: Korrelation der Sonographie und des Tumorgewichtes nach der Sektion;  $r = 0,7$ ; E: Korrelation der Sonographie und der Tumolvolumen nach der Sektion,  $r = 0,7$ ; F: Korrelation der Sektionsdaten (Tumorgewicht, Tumolvolumen),  $r = 0,9$  (verwendet PancTu1Luc Zellen).

### 3.9. Ergebnisse *in vitro*

#### 3.9.1. Einfluss von Matrigel® auf die Tumorzellen

Um einen möglichen Einfluss von Matrigel®-Komponenten auf PancTu1Luc Zellen zu untersuchen und eventuelle Wachstumsartefakte auszuschließen, wurde ein Zellwachstumsvergleich durchgeführt. PancTu1Luc-Zellen und PancTu1Luc-Zellen in BD Matrigel® wurden in der Menge von  $1 \times 10^6$  in T75 Zellkulturflaschen mit RPMI-1640 Kulturmedium 10% FCS ausgesät. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitspannen von 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h und 144 h bei 37°C inkubiert. Alle Zellen wurden durch Accutase abgelöst und in der Zählkammer gezählt. BD Matrigel® hat keine Stimulation des PancTu1Luc-Zellwachstums ausgelöst (s. Abb. 47).

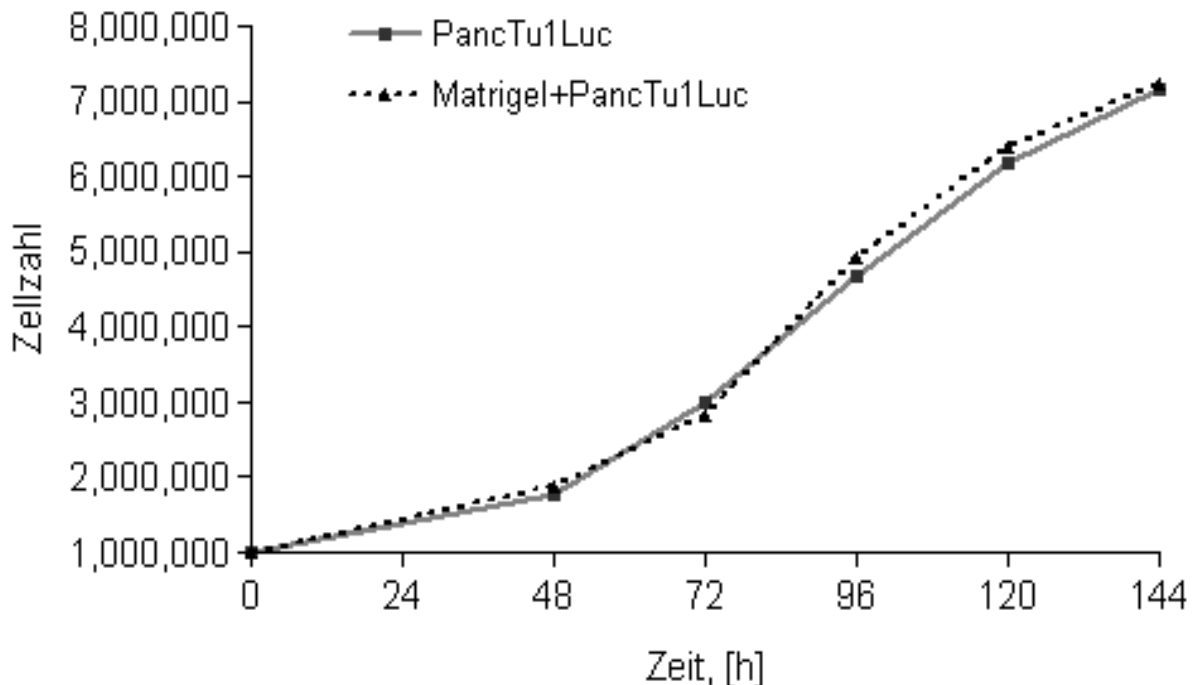


Abb. 47: Einfluss von BD Matrigel® auf die PancTu1Luc-Tumorzellen. Die stärkere Kurve zeigt die Zellzahl der PancTu1Luc-Zellen (Proben, n=6), die dünnere Kurve zeigt die Zellzahl von der PancTu1Luc-Zellen in BD Matrigel® (Proben, n=6). Abgebildet sind die Mittelwerte.

### 3.9.2. Lumineszenzintensität in Abhängigkeit von Zellkonzentrationen

Für die Zellzahloptimierung wurde die Lumineszenzintensität von PancTu1*Luc*-Zellen als Zelleigenschaft in Abhängigkeit von den Zellkonzentrationen gemessen.

PancTu1*Luc*-Zellen wurde in der Menge von  $0,001 \times 10^6$ ,  $0,01 \times 10^6$ ,  $0,1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  und  $4 \times 10^6$  pro Well in 6-Well-Platten in 2 ml RPMI-1640 Kulturmedium mit 10 % FCS ausgesät und über drei Stunden bei 37°C anwachsen gelassen. Danach wurde zu jedem Well 100 µl Luciferin zugegeben und in der NightOwl gemessen (s. Tabelle 7).

Für eine Etablierung der optischen Verfahren wurde die Kalibrierung der Kamerapositionen durchgeführt. Die Tumore wurden mit verschiedenen Kameraabständen gemessen und danach miteinander verglichen. Diese Kalibrierung schließt Ungleichmäßigkeiten durch Schwankungen des optisch verursachten Weges aufgrund der Höhe, Beleuchtung oder Linseneffekte aus. Unabhängig von dem Messabstand zeigte sich eine Proportionalität der mittleren Helligkeit für jedes Messfeld (Mean Grey) mit der Zellzahl, also der Abstand der Kamera spielt in diesem Bereich keine Rolle (s. Abb. 48).

Zellen, [Mio.] / Kameraposition, Abstand, [mm]	100 mm	130 mm	200 mm
0,001	0,331	0,146	0,088
0,01	0,198	0,164	0,056
0,1	1,916	1,603	1,727
1	16,929	15,446	17,712
2	25,298	24,637	24,976
4	59,137	56,96	66,224

Tab. 7: Lumineszenzintensität in Abhängigkeit von Zellkonzentrationen mit verschiedener Kamerapositionen gemessen, [cts/mm<sup>2</sup>s], (Proben je Abstand, n=6). Abgebildet sind die Mittelwerte.

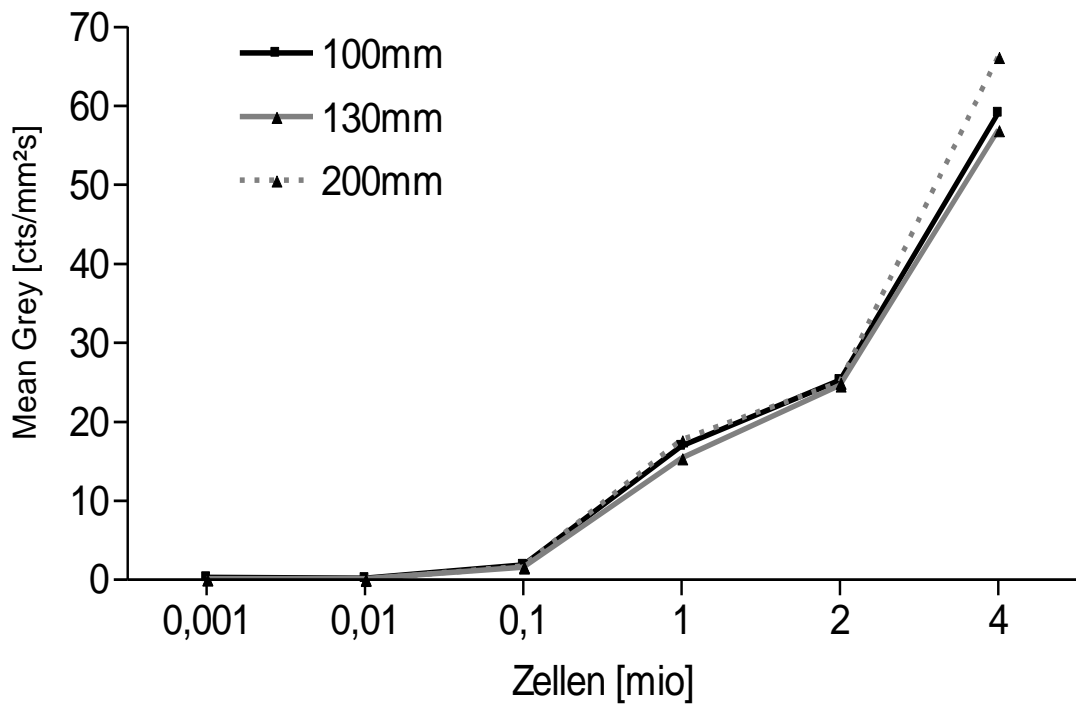


Abb. 48: Korrelation der Zellzahl *PancTu1Luc* und Intensität der mittleren Helligkeit für jedes Messfeld mit 100 mm-, 130 mm-, 200 mm- Abstand der Kamera gemessen (6 Proben je Zellzahl), [cts/mm<sup>2</sup>s]. Abgebildet sind die Mittelwerte.

### 3.9.3. FACS Untersuchungen zu Detektion von CD95 und CD95L

Die Bindung des CD95-Liganden an seinen Oberflächenrezeptor kann eine große Rolle bei der Erhöhung von Motilität und Invasivität in apoptoseresistenten Pankreastumorzellen spielen. Für die Untersuchung, ob es durch das humane lösliche Fusionsprotein sCD95Fc (s. Abb. 12) möglich ist, die Aktivierung von CD95 zu kontrollieren und die Entzündungsmechanismen zu steuern, um ein Tumorwachstum bzw. die Ausbreitung zu minimieren, wurde die Expression von CD95 und CD95L in den *PancTu1Luc*- und *PancTu1*- Pankreaskarzinomzelllinie in Kooperation mit Dr. Heiner Oberg über eine FACS-Analyse im Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein nachgewiesen (s. Abb. 49).

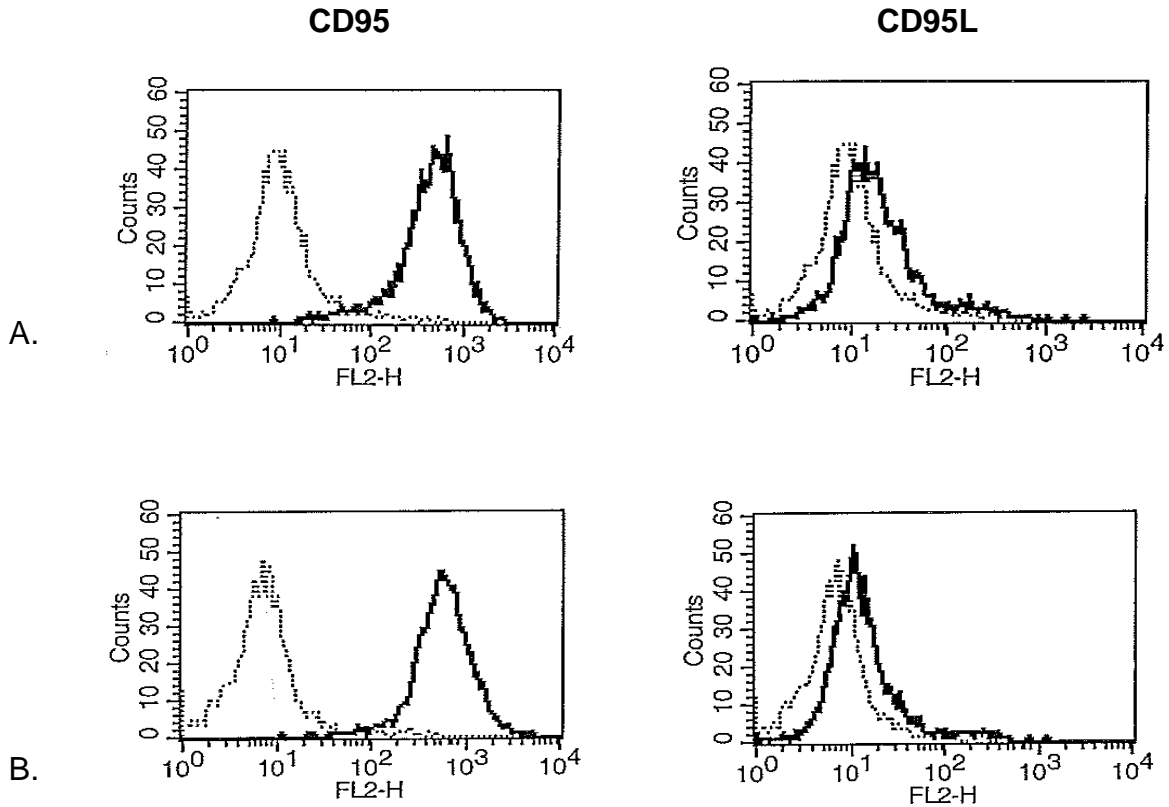


Abb.49: Analyse der Oberflächen-Expression der CD95-Rezeptoren und CD95-Liganden mittels Durchflusszytometrie auf PancTu1Luc (A) und PancTu1 (B)-Zellen. Auf der Ordinate sind die Zell-Counts, auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität (FL2-H) aufgetragen. Die graugezeichnete Kurve zeigt die Isotypkontrolle (IgG1), die schwarzgezeichnete Kurve den jeweiligen CD95-Rezeptor- und CD95-Ligand-Nachweis.

### 3.9.4. ELISA Human CD95L

Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob sich CD95L in der Zelle und/oder auf der Zelloberfläche bzw. in den Zellkulturüberständen befindet. Für die Messung in den Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurde ein ELISA zur Bestimmung von CD95L durchgeführt.

Die Zelllinien PancTu1Luc, PancTu1 und Panc1 wurden in der Menge von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well in 6-well-Platte über 24 h, 48 h, 72 h und 120 h mit RPMI-1640 Kulturmedium 10 % FCS kultiviert. Nach den Inkubationen wurden die Überstände

## Ergebnisse

eingesammelt, und die Zellen jedes Wells in PBS resuspendiert und mit der Neubauer-Zählkammer gezählt. Für die Reagentienvorbereitung und Assaydurchführung (s.2.6.2) wurde der „Human Fas Ligand/TNFSF6 Immunoassay“ (R&D Systems, Wiesbaden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die absolute CD95L-Konzentration wurde in Bezug zur Kontrolle berechnet.

Die Abbildung 50 zeigt, dass CD95L in kleinen Mengen in Zelllysaten von Panc1, PancTu1 und besonders PancTu1*Luc* vorhanden ist.

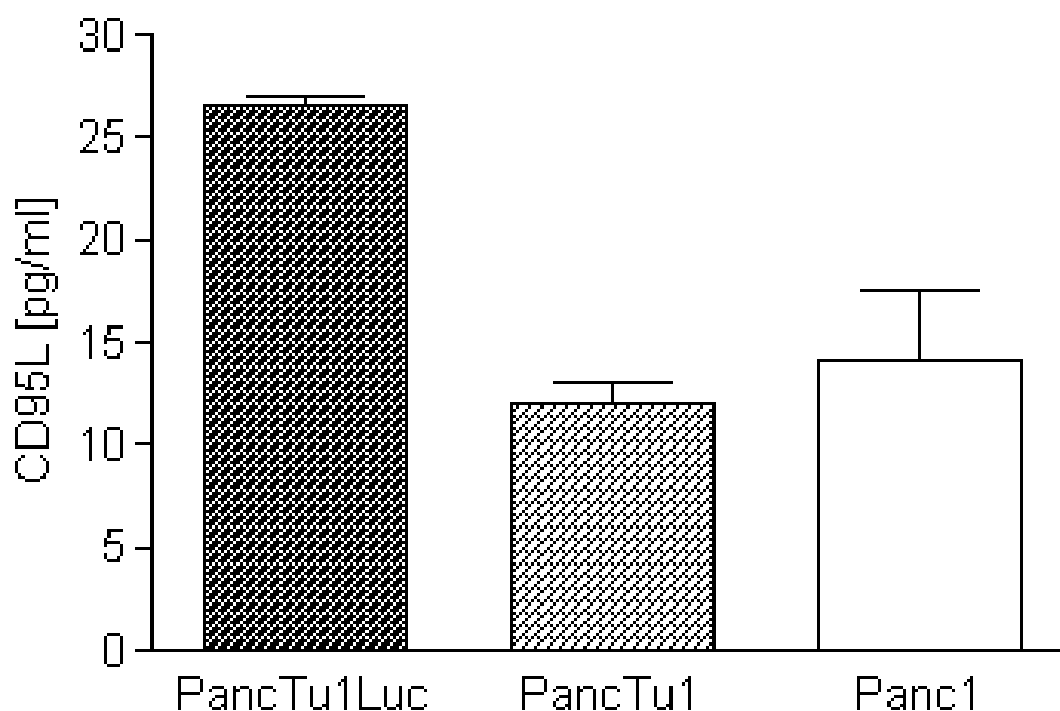


Abb. 50: ELISA CD95L-Bestimmung in Zelllysaten (pg/ml) von PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1 (je Zelllinie, n=11). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SD.

Für die sCD95L-Bestimmung wurden die Zellkulturüberstände der PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen verwendet. Dieser Versuch zeigt den Nachweis von sCD95L in den Zellkulturüberständen und eine Steigerung von CD95L bei Zellwachstum nach 72 h besonders in PancTu1*Luc*- und PancTu1-Zellkulturüberständen (Abb. 51).

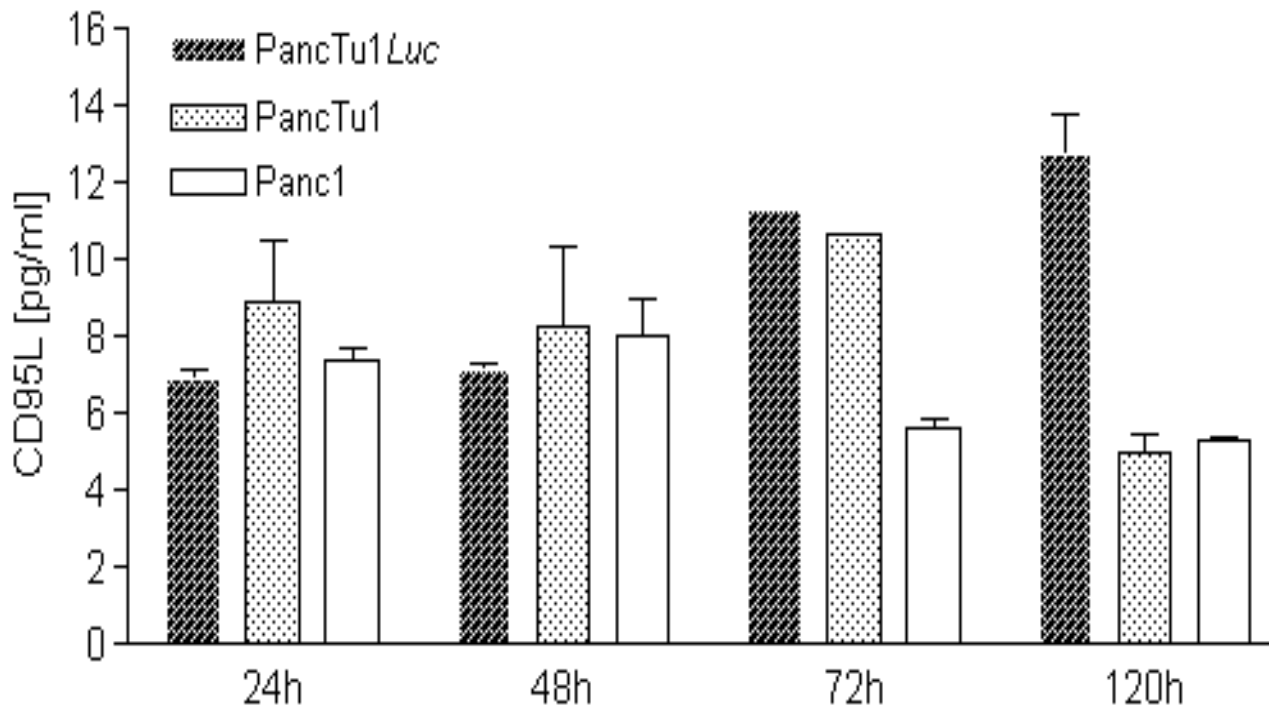


Abb. 51: ELISA CD95L-Bestimmung in der Zellkulturüberständen der PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen in 10 % FCS Zellkulturmedium (n=11). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SD.

### 3.9.5. Vitalitätsassay (Kristallviolettassay)

Im Anschluss an die dargestellten Expressionsexperimente wurden die apoptotische und nicht-apoptotische Antwort nach einer Behandlung in den Pankreaskarzinom-Zelllinien PancTu1*Luc*, PancTu1 und Panc1 untersucht. In diesem Assay wird die relative Menge (optische Dichte) von lebenden Zellen z.B. nach einer Behandlung mit Wirkstoffen bei 590 nm photometrisch gemessen.

Für die Zellzahlkalibrierung wurde ein Vorversuch mit verschiedenen Zellzahlen ohne Behandlung durchgeführt. PancTu1*Luc*, PancTu1 und Panc1 wurden in den Mengen von  $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  pro Vertiefung in die 96 Well Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37°C und 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die optische Dichte wurde nach der Färbung mit Kristallviolett photometrisch gemessen. Es wurde die Zellzahl  $1 \times 10^4$  pro Well als optimal bestimmt (s. Abb. 52).

## Ergebnisse

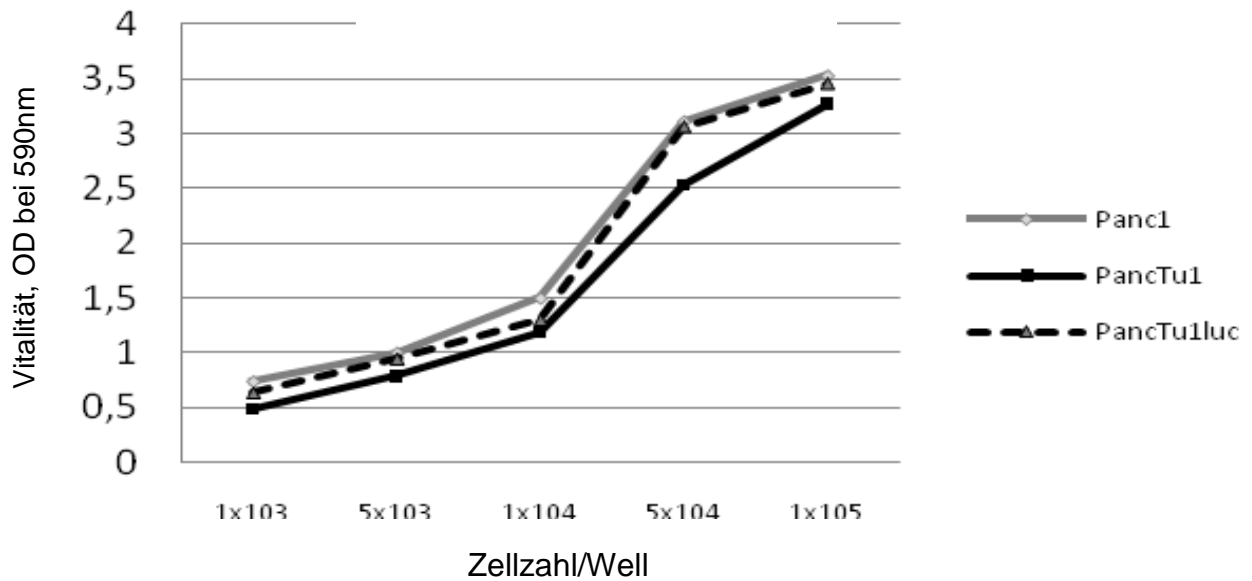


Abb. 52: Zellzahloptimierung von PancTu1Luc, PancTu1 und Panc1 ohne Behandlung, die Zellvitalität wurde mittels Kristallviolettassay bestimmt, gemessen optische Dichte (O.D.). Dargestellt sind die Mittelwerte (je Zelllinie, n=12).

Für die Anwendung von sCD95Fc wurde ein Vorversuch mit verschiedener Konzentration durchgeführt. Es wurden  $1 \times 10^4$  Zellen (PancTu1Luc, PancTu1 und Panc1) pro Well in einer 96 Well Platte mit Medium 10 % FCS ausgesät und über Nacht inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und mit dem neuen Medium mit sCD95Fc - Konzentrationsreihe von 1, 2, 4, 8, 16, 33, 65, 131, 263, 525, 1050  $\mu\text{g/ml}$  über 24h inkubiert (s. Abb. 53).

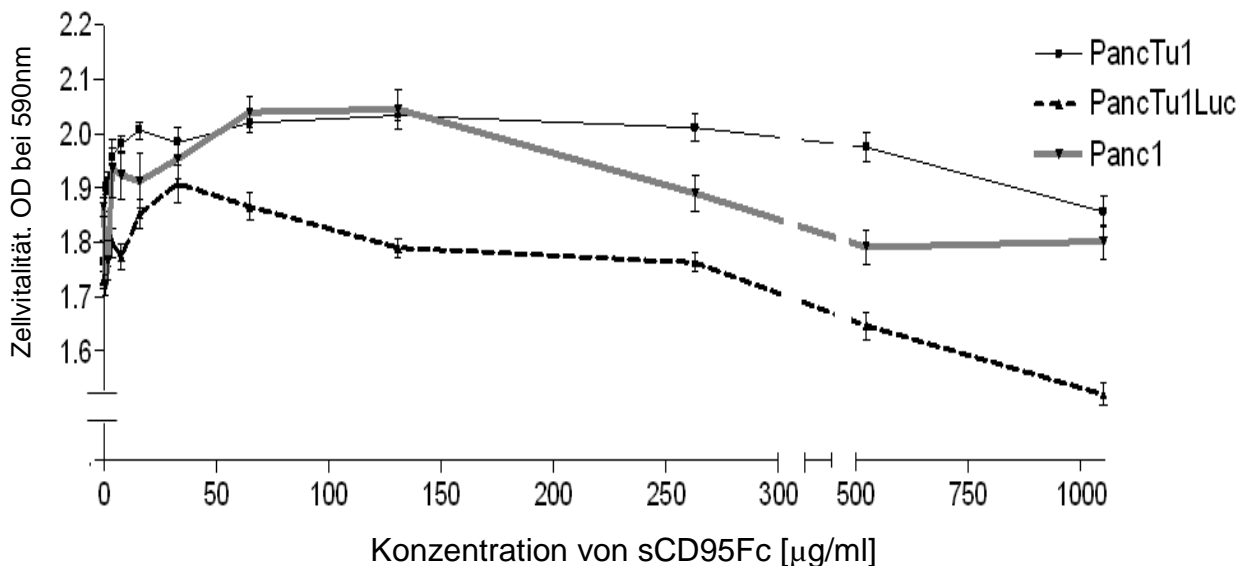


Abb. 53: Untersuchung der therapeutischen Wirkung von verschiedenen Konzentrationen von sCD95Fc bei der Vitalitätsbestimmung, gemessen optische Dichte (OD), bei 590 nm nach 24h (je nach Konzentrationen der sCD95Fc und Zelllinie, n=11). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD.

## Ergebnisse

Die PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen wurden in der Menge von  $1 \times 10^4$  pro Well in 96-Well-Platten ausgesät und über Nacht mit 10 % FCS-Medium inkubiert, danach mit 100  $\mu$ l Therapeutikumansatz aus 3, 30 und 300  $\mu$ g/ml von sCD95Fc, 10  $\mu$ g/ml von Remicade<sup>®</sup> und der Kombination aus 30  $\mu$ g/ml sCD95Fc, 10  $\mu$ g/ml Remicade<sup>®</sup> und 50 ng/ml TNF- $\alpha$  in 0,5 % FCS-Medium (s. Tabelle 9) und in 10 % FCS-Medium (s. Tabelle 8) wie in dem obigen Versuch für 24h behandelt. Die optische Dichte von wachsenden/lebenden Zellen (Zellvitalität) wurde bei 590 nm mit einem Photometer bestimmt. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle dargestellt. Die Standardabweichungen als auch die Prozentangaben beziehen sich auf deren Mittelwert. Um die Wirkung einer spezifischen Behandlung festzustellen, wurden die Ergebnisse von Kontrollgruppen mit behandelten Gruppen verglichen. Obwohl nach der Behandlungszeit von 24 h in allen Behandlungsgruppen die Werte angestiegen sind, konnte im Vergleich mit der Kontrollgruppe kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

	Kontrolle	sCD95Fc 3 $\mu$ g/ml	sCD95Fc 30 $\mu$ g/ml	sCD95Fc 300 $\mu$ g/ml	Kombi	Infliximab 10 $\mu$ g/ml	TNF- $\alpha$ 50 ng/ml
PancTu1 <i>Luc</i>	1,29 ( $\pm$ 6%)	1,4 ( $\pm$ 1%)	1,3 ( $\pm$ 2%)	1,3 ( $\pm$ 5%)	1,2 ( $\pm$ 5%)	1,4 ( $\pm$ 3%)	1,5 ( $\pm$ 1%)
PancTu1	1,2 ( $\pm$ 10%)	1,5 ( $\pm$ 1%)	1,5 ( $\pm$ 4%)	1,5 ( $\pm$ 1%)	1,4 ( $\pm$ 1%)	1,54 ( $\pm$ 1%)	1,5 ( $\pm$ 5%)
Panc1	1,3 ( $\pm$ 5%)	1,4 ( $\pm$ 8%)	1 ( $\pm$ 1%)	1,3 ( $\pm$ 5%)	1,2 $\pm$ (0,1%)	1 $\pm$ (11%)	1,1 ( $\pm$ 6%)

Tab. 8: Optische Dichte von wachsenden/lebenden PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen nach der Behandlung mit 3, 30, 300  $\mu$ g/ml von sCD95Fc, 10  $\mu$ g/ml von Remicade<sup>®</sup> und der Kombination aus 30  $\mu$ g/ml sCD95Fc, 10  $\mu$ g/ml Remicade<sup>®</sup> und 50 ng/ml TNF- $\alpha$  in 10 % FCS-Medium für 24h (n=11). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SD %). Die Standardabweichungen als die Prozentangaben beziehen sich auf deren Mittelwerte.

	Kontrolle	sCD95Fc 3 $\mu$ g/ml	sCD95Fc 30 $\mu$ g/ml	sCD95Fc 300 $\mu$ g/ml	Kombi	Infliximab 10 $\mu$ g/ml	TNF- $\alpha$ 50 ng/ml
PancTu1 <i>Luc</i>	1,5 ( $\pm$ 6%)	1,4 ( $\pm$ 2%)	1,3 ( $\pm$ 1%)	1,4 ( $\pm$ 6%)	1,3 ( $\pm$ 8%)	1,3 ( $\pm$ 5%)	1,4 ( $\pm$ 4%)
PancTu1	1,2 ( $\pm$ 8%)	1,4 ( $\pm$ 5%)	1,5 ( $\pm$ 2%)	1,2 ( $\pm$ 0%)	1,3 ( $\pm$ 1%)	1,2 ( $\pm$ 11%)	1,2 ( $\pm$ 3%)
Panc1	1,1 ( $\pm$ 6%)	1,2 ( $\pm$ 7%)	1,2 ( $\pm$ 4%)	1 ( $\pm$ 10%)	1 ( $\pm$ 13%)	0,8 ( $\pm$ 6%)	1,1 ( $\pm$ 22%)

Tab. 9: Optische Dichte von wachsenden/lebenden PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen nach der Behandlung mit Therapeutikumansatz aus 3, 30, 300  $\mu$ g/ml von sCD95Fc, 10  $\mu$ g/ml von Remicade<sup>®</sup> und der Kombination aus 30  $\mu$ g/ml sCD95Fc, 10  $\mu$ g/ml Remicade<sup>®</sup> und 50 ng/ml TNF- $\alpha$  in 0,5 % FCS-Medium für 24h (n=11). Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SD %). Die Standardabweichungen als die Prozentangaben beziehen sich auf deren Mittelwerte.

### 3.9.6. Zellwachstumsuntersuchung (Zellzahlbestimmung)

Um einen möglichen Einfluss auf das Zellwachstum durch die medikamentöse Behandlung *in vitro* festzustellen, wurden die Zelllinien PancTu1Luc, PancTu1 und Panc1 in der Menge von  $1 \times 10^5$  pro Well (Wachstumsfläche:  $9,6 \text{ cm}^2$ ) in 6-Well-Platten in RPMI-1640 Kulturmedium mit 10 % FCS ausgesät. Das Medium wurde mit der Konzentration von 3, 30 und 300  $\mu\text{g/ml}$  sCD95Fc, 10  $\mu\text{g/ml}$  Remicade<sup>®</sup> und die Kombination aus 30  $\mu\text{g/ml}$  sCD95Fc und 10  $\mu\text{g/ml}$  Remicade<sup>®</sup> eingesetzt. Die Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h bei 37°C inkubiert. Alle Zellen wurden durch Accutase abgelöst und in der Zellkammer gezählt. Die Ergebnisse (Rohdaten, Zellen  $\times 10^3/\text{Well}$ ) sind in der Tabelle 10, 11, 12 dargestellt. Die Standardabweichungen als Prozentangaben (%) beziehen sich auf deren Mittelwerte.

Bei PancTu1Luc- Zellen wurde nach 72 Stunden Behandlung mit 300  $\mu\text{g/ml}$  von sCD95Fc- und die Kombination aus 30  $\mu\text{g/ml}$  sCD95Fc und 10  $\mu\text{g/ml}$  Remicade<sup>®</sup>-Gruppen eine deutliche, bis 350 % Stimulation des Zellwachstums, beobachtet. Die Stimulation des Wachstums von PancTu1- und Panc1- Zellen zeigt keine signifikanten Werte.

	Kontrolle	sCD95Fc 3 $\mu\text{g/ml}$	sCD95Fc 30 $\mu\text{g/ml}$	sCD95Fc 300 $\mu\text{g/ml}$	Kombi	Infliximab 10 $\mu\text{g/ml}$
24h	160 ( $\pm 6\%$ )	150 ( $\pm 11\%$ )	117 ( $\pm 20\%$ )	82,5 ( $\pm 19\%$ )	105 ( $\pm 12\%$ )	77,5 ( $\pm 8\%$ )
48h	205 ( $\pm 0,1\%$ )	182,5 ( $\pm 3\%$ )	277,5 ( $\pm 7\%$ )	250 ( $\pm 8\%$ )	365 ( $\pm 5\%$ )	262,5 ( $\pm 9\%$ )
72h	202,5 ( $\pm 21\%$ )	362,5 ( $\pm 5\%$ )	362 ( $\pm 10\%$ )	540 ( $\pm 22\%$ )	445 ( $\pm 0,1\%$ )	197,5 ( $\pm 10\%$ )

Tab. 10: Untersuchung des Zellwachstums PancTu1Luc. Abgebildet sind Mittelwert ( $\pm$  SD %) (Zellen  $\times 10^3/\text{Well}$ , n=6). Die Standardabweichungen als die Prozentangaben beziehen sich auf deren Mittelwerte.

	Kontrolle	sCD95Fc 3 $\mu\text{g/ml}$	sCD95Fc 30 $\mu\text{g/ml}$	sCD95Fc 300 $\mu\text{g/ml}$	Kombi	Infliximab 10 $\mu\text{g/ml}$
24h	83,3 ( $\pm 10\%$ )	36,8 ( $\pm 19\%$ )	78,7 ( $\pm 30\%$ )	71,2 ( $\pm 6\%$ )	121,8 ( $\pm 14\%$ )	100 ( $\pm 6\%$ )
48h	166,2 ( $\pm 11\%$ )	176,2 ( $\pm 8\%$ )	193,7 ( $\pm 17\%$ )	120 ( $\pm 6\%$ )	278,7 ( $\pm 21\%$ )	326,2 ( $\pm 3\%$ )
72h	300 ( $\pm 3\%$ )	170 ( $\pm 28\%$ )	149,3 ( $\pm 4\%$ )	242,5 ( $\pm 0,1$ )	265,6 ( $\pm 1\%$ )	270 ( $\pm 0,1$ )

Tab. 11: Untersuchung des Zellwachstums PancTu1 (Zellzahl  $\times 10^3$ ). Abgebildet sind Mittelwerte ( $\pm$  SD %) (Zellen  $\times 10^3/\text{Well}$ , n=6). Die Standardabweichungen als die Prozentangaben beziehen sich auf deren Mittelwerte.

## Ergebnisse

	Kontrolle	sCD95Fc 3µg/ml	sCD95Fc 30µg/ml	sCD95Fc 300µg/ml	Kombi	Infliximab 10µg/ml
24h	83,1 (±6%)	105,8 (±9%)	106,9 (±20%)	170 (±0,1)	146,2 (±3%)	150,6 (±10%)
48h	216,2 (±10%)	176,2 (±6%)	143,7 (±6%)	120 (±6%)	278,7 (±6%)	326,2 (±2%)
72h	356,2 (±2%)	255 (±4%)	230,3 (±1%)	251,6 (±1%)	371,7 (±5%)	334,1 (±1%)

Tab. 12: Untersuchung des Zellwachstums (Zellzahl  $\times 10^3$ ) Panc1. Abgebildet sind Mittelwerte ( $\pm$  SD %) (Zellen  $\times 10^3$ /Well, n=6). Die Standardabweichungen als die Prozentangaben beziehen sich auf deren Mittelwerte.

### 3.9.7. Zellvitalitätsassay (EZ4U)

Mit dem Zellproliferationstest wurden mitochondriale Stoffwechselaktivitäten in den behandelten Zellen nach der Behandlungsdauer 24 h und 48 h in 10 % FCS Zellkulturmedium photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Ergebnisse in den Tabellen sind dargestellt. Die Standardabweichungen als Prozentangaben beziehen sich auf deren Mittelwert. Um die Wirkung therapeutischer Behandlungen festzustellen, wurden die Ergebnisse von Kontrollgruppen mit behandelten Gruppen verglichen. Obwohl nach der Behandlung über 48 h mit sCD95Fc (3 µg/ml und 30 µg/ml) bei den PancTu1- und Panc1- Zelllinien eine Zellvitalitätserhöhung beobachtet wurde, sind alle Werte im Vergleich mit der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant angestiegen (s. Tabellen 13, 14, 15).

	Kontrolle	sCD95Fc 3 µg/ml	sCD95Fc 30 µg/ml	sCD95Fc 300 µg/ml	Kombi	Infliximab 10 µg/ml	TNF- $\alpha$ 50 ng/ml
24h	0,54 (±6%)	0,57 (±3%)	0,54 (±5%)	0,52 (±2%)	0,54 (±5%)	0,52±(5%)	0,5 (±5%)
48h	0,65 (±6%)	0,65 (±4%)	0,64 (±6%)	0,63 (±3%)	0,66 (±5%)	0,6±(5%)	0,62 (±8%)

Tab. 13: Bestimmung der mitochondriale Aktivitäten in der PancTu1Luc - Zellen mittels Zellvitalitätsassay (EZ4U). Die Messung wurde nach der Behandlung mit Therapeutikumansatz aus 3, 30, 300 µg/ml von sCD95Fc, 10 µg/ml von Remicade<sup>®</sup>, der Kombination (aus 30 µg/ml sCD95Fc und 10 µg/ml Remicade<sup>®</sup>) und 50 ng/ml TNF- $\alpha$  in 10 % FCS-Zellkulturmedium bei der Behandlungsdauer 24 h und 48 h (Messungsininkubation 2 h, n= 11) durchgeführt. Abgebildet sind Mittelwerte ( $\pm$  SD%). Die Standardabweichungen als die Prozentangaben beziehen sich auf deren Mittelwert.

## Ergebnisse

	Kontrolle	sCD95Fc 3 µg/ml	sCD95Fc 30 µg/ml	sCD95Fc 300 µg/ml	Kombi	Infliximab 10 µg/ml	TNF-α 50 ng/ml
24h	0,47 (±6%)	0,5 (±2%)	0,47 (±4%)	0,45 (±6%)	0,47 (±7%)	0,47 (±4%)	0,47 (±2%)
48h	0,39 (±8%)	0,48 (±4%)	0,52 (±6%)	0,49 (±7%)	0,47 (±4%)	0,43 (±13%)	0,41 (±5%)

Tabelle 14: Bestimmung der mitochondriale Aktivitäten in der PancTu1 - Zellen mittels Zellvitalitätsassay (EZ4U). Die Messung wurde nach der Behandlung mit Therapeutikumansatz aus 3, 30, 300 µg/ml von sCD95Fc, 10 µg/ml von Remicade<sup>®</sup>, der Kombination (aus 30 µg/ml sCD95Fc und 10 µg/ml Remicade<sup>®</sup>) und 50 ng/ml TNF-α in 10 % FCS-Zellkulturmedium bei der Behandlungsdauer 24 h und 48 h (Messungsininkubation 2 h, n=11) durchgeführt. Abgebildet sind Mittelwerte (± SD%). Die Standardabweichungen als die Prozentangaben beziehen sich auf deren Mittelwert.

	Kontrolle	sCD95Fc 3 µg/ml	sCD95Fc 30 µg/ml	sCD95Fc 300 µg/ml	Kombi	Infliximab 10 µg/ml	TNF-α 50 ng/ml
24h	0,54 (±5%)	0,62 (±4%)	0,56 (±4%)	0,51 (±8%)	0,5 (±8%)	0,51 (±4%)	0,53 (±3%)
48h	0,7 (±3%)	0,81 (±5%)	0,75 (±5%)	0,71 (±4%)	0,72 (±6%)	0,7 (±4%)	0,76 (±4%)

Tabelle 15: Bestimmung der mitochondriale Aktivitäten in der Panc1 - Zellen mittels Zellvitalitätsassay (EZ4U). Die Messung wurde nach der Behandlung mit Therapeutikumansatz aus 3, 30, 300 µg/ml von sCD95Fc, 10 µg/ml von Remicade<sup>®</sup>, der Kombination (aus 30 µg/ml sCD95Fc und 10 µg/ml Remicade<sup>®</sup>) und 50 ng/ml TNF-α in 10 % FCS-Zellkulturmedium bei der Behandlungsdauer 24 h und 48 h (Messungsininkubation 2 h, n=11) durchgeführt. Abgebildet sind Mittelwerte (± SD%). Die Standardabweichungen als die Prozentangaben beziehen sich auf deren Mittelwert.

### 3.9.8. Tumorzellinvasionassay

Das Prinzip des hier eingesetzten Tumorzellinvasionassay ist die Invasion und/oder Verdauung einer Fibroblasten-Schicht durch wachsende Tumorzellen. Die mit DMSO getöteten fixierten Fibroblasten wurden mit Trypan Blau angefärbt. Das invasive Tumorzellpotential entspricht in Anzahl und Größe der ungefärbten Region („gefressene Löcher“) in der blauen Fibroblastenschicht (s. 2.6.5.).

Für die Zellzahloptimierung und Standardisierung erfolgte ein Vorversuch mit verschiedenen Zellzahlen ohne Zellbehandlung. Dazu wurden die Zelllinien PancTu1*Luc*, PancTu1 und Panc1 getestet. Es wurden  $0,5 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$

## Ergebnisse

Zellen pro Well ausgesät. Die  $0,5 \times 10^4$  Zellen je Vertiefung sind nach 24 h Inkubation sehr langsam gewachsen, infolgedessen konnte man keine große Auswirkung auf der Fibroblasten-Schicht feststellen. Nach dem Vorversuch wurde für alle Zelllinien PancTu1*Luc*, PancTu1 und Panc1 eine optimale Zellzahl von  $2 \times 10^4$  pro Well festgelegt. Es wurden jeweils 2 ml Medium mit entsprechender Medikamentenkonzentration, bzw. zur Kontrolle das Medium ohne Medikament hinzugeben. Die Behandlung wurde über 24 h mit Therapeutikumansatz im 10 % FCS Zellkulturmedium durchgeführt. Die Zellen wurden mit sCD95Fc in Konzentration von 3, 30 und 300 µg/ml und mit der Kombination aus Remicade® von 10 µg/ml und sCD95Fc von 30 µg/ml behandelt. Die Tumorzellinvasivität entspricht der Größe der ungefärbten Regionen, die durch Tumorzellen in der verdauten Fibroblastenschicht entstehen. Die Auswertung der ungefärbten Regionen wurde semiquantitativ abgeschätzt (s. 2.6.5.) und entspricht dem Invasionspotential der Tumorzellen (Trauzold A. et al. 2005). Die Ergebnisse wurden fotografiert und in einer Tabelle miteinander verglichen (Tab. 16).

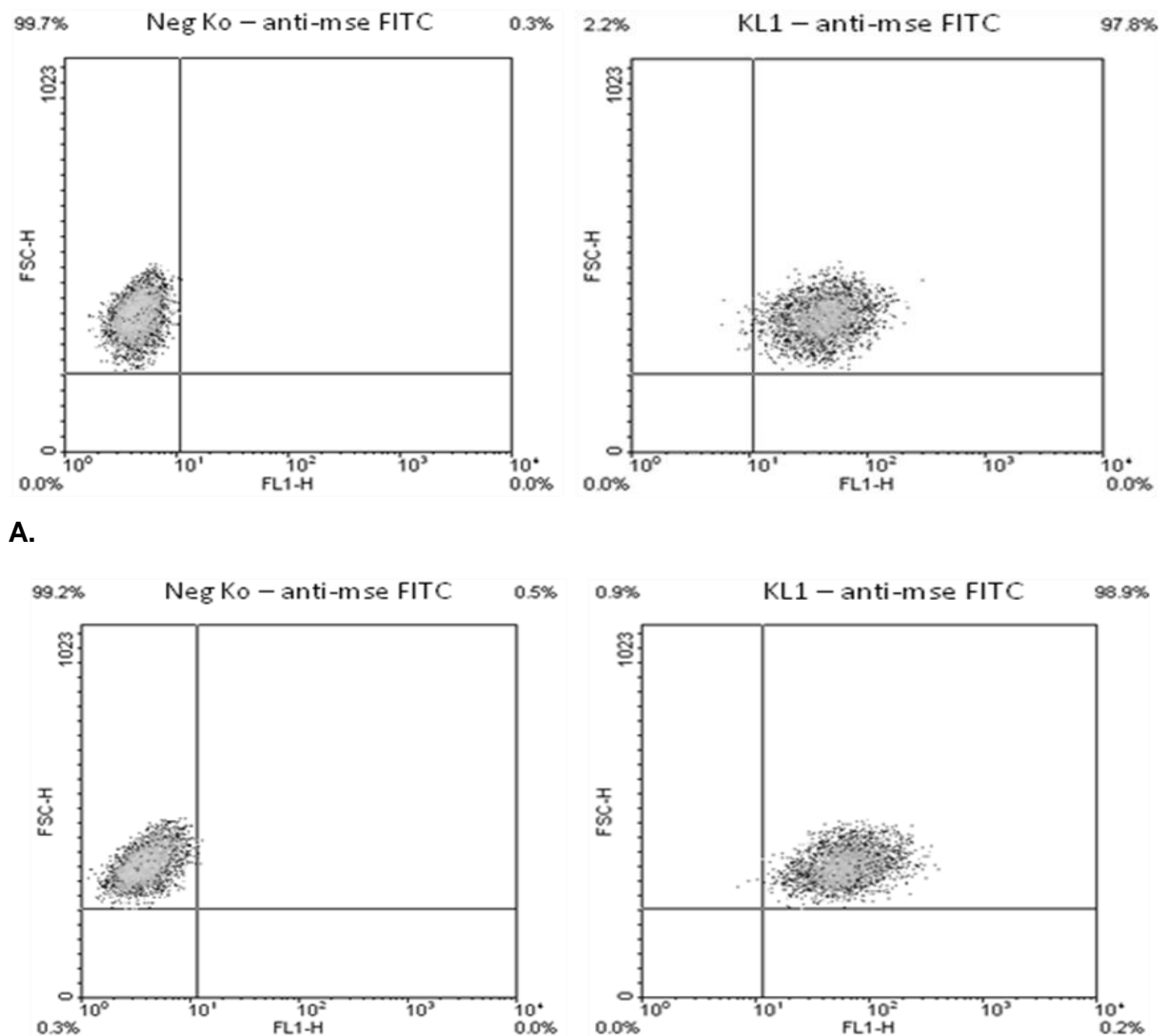
Die PancTu1*Luc*-Zellen zeigen viel mehr invasives Tumorzellpotential als die Zelllinien Panc1 und PancTu1. Bei der PancTu1- Zelllinie scheint die Invasivität auch besonders in der sCD95Fc-Behandlungsgruppe mit der Konzentration von 300 µg/ml entwickelt (s. Tabelle 16). Die Zelllinie Panc1 ist nicht für den Test geeignet, weil die Zellen auf der Fibroblastenoberfläche wachsen ohne in die Fibroblastenschicht zu invadieren. Die Abbildungen sind im Anhang dargestellt.

	Kontrolle	sCD95Fc 3 µg/ml	sCD95Fc 30 µg/ml	sCD95Fc 300 µg/ml	Kombi	Infliximab 10 µg/ml
PancTu1 <i>Luc</i>	+++	++++	++++	++++	++++	+++
PancTu1	++	++	++	+++	++	++
Panc1	-	-	-	-	-	-

Tab. 16: Das semiquantitativ-abgeschätzte Invasionspotential der Tumorzellen bei Tumorzellinvasionassay. Die Behandlung wurde über 24 h (n=6), 48 h (n=6), 72 h (n=6) im Medium mit 0,5 % FCS mit sCD95Fc in den Konzentrationen von 3 µg/ml, 30 µg/ml, 300 µg/ml und in Kombinationstherapie aus 10 µg/ml Remicade® und 30 µg/ml sCD95Fc, sowie einer unbehandelten Kontrolle durchgeführt. Die Tumorzellinvasivität entspricht der Größe der ungefärbten Regionen, die durch Tumorzellen verdauter Fibroblastenschicht entstehen: +++++ sehr stark invasiv (100%); +++ stark invasiv ( $\leq 75\%$ ); ++ mittelgradig ( $\leq 50\%$ ); + wenig invasiv ( $\leq 25\%$ ); - keine Invasivität).

### 3.9.9. Bearbeitung des zytologischen Materials

Die immunhistologische Färbung von Karzinomen mit dem Breitspektrum-Zytokeratin Antikörper (Klon KL 1) zeigt ein intensives Reaktionsmuster bei humanen epithelialen Zellen (Fukushima, S. et al., 1987). Eine solche „Markierung“ mit Zytokeratin unterscheidet das humane Tumorgewebe von Mausgewebe in beispielsweise orthotopen Tumoren. Bevor das Pankreastumorgewebe immunhistologisch gefärbt wurde (s. 3.6.), wurden unbehandelte PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen permeabilisiert und durchflusszytometrisch sowie immunhistologisch (s. 2.4.4.) untersucht. Die FACS-Analyse zeigte eine Expression von Zytokeratin (KL 1) in den PancTu1*Luc*-, PancTu1- Zellen (Abb. 54).



**B.**

Abb. 54: FACS-Analyse PancTu1*Luc*-, PancTu1- Zellen auf Expression von Zytokeratin (KL 1): PancTu1*Luc* (A); PancTu1 (B).

## Ergebnisse

Die für 24 h unbehandelten PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen wurden auf Deckgläschen fixiert und mit immunhistologisch (die LSAB-Färbungprotokolle werden in Anhang beschrieben) gefärbt und mikroskopiert. Mit Hilfe des humanspezifischen monoklonalen Zytokeratin Antikörpers (Klon KL 1) wurden aus dem Humangewebe stammende Tumorzellen identifiziert, damit später innokulierte Zellen vom murinen Wirtsgewebe differenziert werden können. Die immunhistologische Färbung der Pankreaszellen zeigt ein intensives charakteristisches Reaktionsmuster. Allerdings zeigen Panc1-Zellen durchaus variable Anfärbungen, teilweise schwach gefärbte und negative Zellen (Abb. 55).

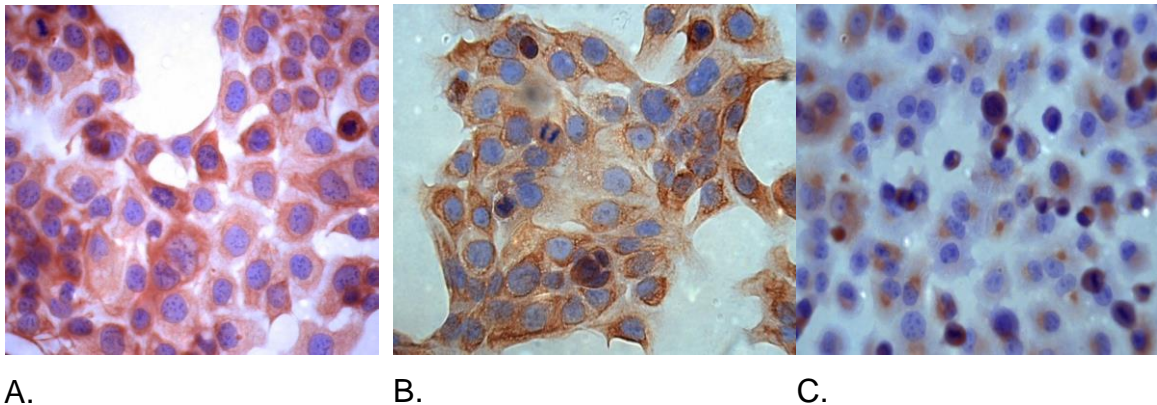


Abb. 55: Anti-humane Zytokeratin (KL 1) - Färbung (LSAB-Methode). Mit dem Zytokeratin spezifischen Antikörper (KL 1) wurden alle Zellen gleichmäßig positiv braunlichgefärbt. Abgebildet sind: PancTu1*Luc*-Zellen (A); PancTu1- Zellen (B); Panc1- Zellen (C) (Vergrößerung: x40).

## 4. Diskussion

### 4.1. Bildgebende Verfahren für das experimentelle orthotope Pankreaskarzinomtransplantationsmodell, Korrelationen mit den manuellen Messungen

Aus den im Kapitel 1.4.2.1. beschriebenen experimentellen Pankreaskarzinomuntersuchungen im murinen orthotopen Xenotransplantationsmodell ergeben sich allerdings einige Schwierigkeiten. Ein Nachteil der orthotopen Modelle besteht in der Durchführung von ausschließlich manuellen Messungen, womit das Wachstum des orthotopen Primärtumors im laufenden Experiment schwer nachvollzogen werden kann. Aus diesem Grund sind Gewichtskurven die einzigen Daten über das Tumorstadium. Erst nach mehreren Tagen kann durch Palpation ausreichend sicher beurteilt werden, ob die orthotope Zellinokulation erfolgreich war. Ein weiterer Nachteil ergibt sich daraus, dass die Tumorstadium und eventuelle Metastasen erst durch Sektion festgestellt werden können. Dies führt dazu, dass die Gruppengrößen im Rahmen von Therapiestudien entsprechend vergrößert werden müssen, um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten (Alves, F. et al., 2001). Es ist deshalb für das orthotope xenogene Transplantationsmodell sehr wichtig, zusätzliche Informationen mittels Bildgebung im lebenden Tier über den gesamten Krankheitsverlauf zu erhalten (Goldbrunner, R. H. et al., 2000; Yang, M. et al., 2001). Zur Verfügung stehen mehrere bildgebende Techniken wie das Röntgen, die Computertomographie (CT), die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), die Kernspintomographie (MRT), Ultraschall und optische Verfahren (Biolumineszenz und Fluoreszenz).

Ein Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob durchgeführte Messungen mittels der Bildgebungstechniken von der optischen Kammer NightOwl (Lumineszenzmessung) und der Sonographie mit den Sektionsdaten (Tumorgewicht, Tumorstadium, Histologie) korrelieren können. In mehreren Studien wurde bereits gezeigt, dass die Biolumineszenz - Imaging - Daten (BLI) mit der Menge der transfizierten Tumorzellen korrelieren (Bhaumik, S. & Gambhir, S. S., 2002) z.B.: mit Tumorstadiummessungen mit Messschieber von subkutan inokulierten Krebszellen (Jenkins, D. E. et al., 2003(1)), mit MRT-Volumenmessungen intrakranial wachsender

Tumoren (Szentirmai, O. et al., 2006; Rehemtulla, A. et al., 2000), mit der Messung des Gewichts von Tumoren (Vooijs, M., et al. 2002; Jenkins, D. E. et al., 2003(2)) und mit der FACS-Analyse von Krebszellen im betroffenen Gewebe (Edinger, M. et al., 2003). In unserer Kleintierbildgebungsstudie wurde der Wachstumsverlauf der Pankreaskarzinome im Xenotransplantationsmodell untersucht. Um eine präzisere *in vivo*-Beobachtung des Wachstums- und Metastasierungsverhaltens sowie eine vollständige Information über die Morphologie des Tumors zu erhalten, wurden die bildgebenden Messungen am selben Tier parallel durchgeführt und die Korrelation der Bildgebungsverfahren ausgerechnet (Abb. 46). Das hat uns ermöglicht, eine Vielzahl von tumorassoziierten Eigenschaften durch *in vivo*-Modelle dynamisch zu visualisieren (Jenkins, D.E. et al., 2003(2); O'Neill, K. et al., 2010). Die Arbeit zeigt, dass die beste Korrelation zwischen den **Sektionsdaten** (Tumorgewicht und Tumorvolumen, mit  $r=0,9$  (Abb. 46 F)) entsteht. Auch die **Sonographiemessungen** zeigten mit den **Sektionsdaten** (Tumorgewicht:  $r=0,7$  (Abb. 46 D) und Tumorvolumen:  $r=0,7$  (Abb. 46 E)) eine gute Korrelation. Allerdings zeigte die Korrelation der **Lumineszenzdaten** mit den **Sektionsdaten** (Tumorvolumen:  $r=0,4$  (Abb. 46 B) und Tumorgewicht:  $r=0,4$  (Abb. 46 C)) im Gegensatz zu der Arbeit von Jenkins, D. E. et al. und Vooijs, M. et al. eine niedrige Korrelation. Die Daten der ebengenannten Autoren berichten, dass in allen Fällen eine gute Korrelation zwischen BLI- Daten und Tumorvolumen sowie Tumorgewichtsdaten (Vooijs, M., et al. 2002; Jenkins, D. E. et al., 2003(2)) entsteht. Die beiden **Bildgebungsverfahren** (Lumineszenzmessung und Sonographie) zeigten mit  $r=0,2$  kaum eine Korrelation (Abb. 46 A). Allerdings zeigte die Arbeitsgruppe Snyder im Jahr 2009 im Gegensatz zu dieser Arbeit eine hohe Korrelation der hochfrequenten Sonographie mit der fluoreszierenden optischen Messung des orthotopen Pankreastumorwachstums in einem orthotopen Mausmodell von humanem Pankreaskarzinom (Snyder, C. S. et al., 2009). Die Gründe für eine solche niedrige Korrelation in unserer Arbeit liegen unter bestimmten kritischen Aspekten in den angewandten Methoden. Obwohl Biolumineszenz Imaging schon in mehreren Studien zur Untersuchung der Metastasierung eingesetzt wurde (Sweeney, T.J. et al., 1999; Edinger, M. et al., 2002; Saur, D. et al., 2005), kann trotzdem ein immer wieder auftretendes Problem der Artefakte entstehen (s. im Anhang Abb. 61). Ich habe bei der Lumineszenzmessung festgestellt, dass durch die Entwicklung von Tumorknötchen in der Nahtreihe bzw.

Bauchnahtmetastasen, die auch Biolumineszenz-Signale erzeugen, die Pankreastumore gar nicht oder schlecht detektiert wurden. Es wurde von mir beobachtet, dass die stark entwickelten Bauchnahtmetastasen mit zunehmender Zeit die „richtigen“ Tumore des Pankreas verdecken, weshalb die Lumineszenzmessung teilweise gestört wurde (s. Abb. 60 B, 61 im Anhang). Auch erscheinen tief in der Bauchhöhle gebildete große Tumore/Metastasen wegen der starken Abschirmung durch das darüber liegende Gewebe im Bild relativ klein, während direkt unter der Bauchdecke lokalisierte kleine Tumore sehr groß erscheinen (Weissleder, R., 2001). Die oben diskutierten Befunde zeigten, dass die Anwendung von Biolumineszenz Imaging zu einem nicht unerheblichen Teil durch die eingeschränkte Durchdringtiefe von Licht durch Gewebe begrenzt wird (Zeamari, S. et al., 2004; Doubrovin, M. et al., 2004). Die Beobachtung, dass die Biolumineszenz-Signale nur von lebenden Krebszellen und nicht von Nekrosen in Tumoren abgeleitet sind, steht im Einklang mit unserer Korrelation der Lumineszenzmessung mit dem Tumolvolumen nach Sektion und Sonographie (da nekrotische Stellen nicht sichtbar sind) (Edinger, M. et al., 2002; Lyons, S.K. 2005). Das erklärt die starken Standardabweichungen bei der Lumineszenzmessung zum späteren Messzeitpunkt am POD 21 (Abb. 60 B, 61). Aus diesem Grund kam es in Pankreastumoren ab einer gewissen Größe durch die Ausprägung einer zentralen Nekrose vereinzelt zu einer merklichen Verlangsamung der Zunahme der Erzeugung der Biolumineszenz-Signale und dementsprechend zur Abflachung der Wachstumskurve. Dieser Effekt war besonders bei der Kombinationstherapie der PancTu1*Luc*-Tumore zu sehen. Eine Lösung wäre ein Versuch mit weniger Zellen. In anderen Studien wurde berichtet, dass mit  $1 \times 10^3$  Zellen die Biolumineszenzmessung (Edinger, M. et al., 2002) oder sogar mit nur 100 Zellen (Edinger, M. et al., 2003) verlässlich nachgewiesen werden konnte. Diese Versuchsergebnisse zeigen, dass die verwendete Zellzahl drastisch die Ergebnisse beeinflussen kann. Dies liegt zum einen auch an der Sensitivität des verwendeten Imaging Systems wie auch an den Kameraeinstellungen und der Belichtungszeit, zum anderen aber auch an den für den Versuch verwendeten transfizierten Zellen und deren Lokalisation im Körper des Versuchstieres (Hastings Wilson, T. & Wilson, D.M. 1998). Trotz dieser Einschränkungen ist BLI eine informative Methode mit kurzen Untersuchungszeiten (Doubrovin, M. et al., 2004) zur Beobachtung der therapeutischen Verfahren in *in vivo*- und *in vitro*- Studien (Welsh,

D.K. und Kay, S.A. 2005).

Im Rahmen unserer Studie wurde die Ultraschallvolumetrie durchgeführt. In der Tumorforschung wird Sonographie meistens in den therapeutischen Studien verwendet, um die zeitliche Dynamik des Krebswachstums zu überwachen. Als Nachteil des Ultraschallimaging wurde die begrenzte Reproduzierbarkeit (keine Ganzkörper-Studie) und auch eine große Qualitätsabhängigkeit vom Untersucher festgestellt (Serkova, N. J. et al., 2009). Die Gründe für die großen Standardabweichungen in unseren Sonographieergebnissen können ebenso wie bei der Lumineszenzbildgebung daran liegen, dass die Differenzierung zwischen Tumorgewebe und Bauchnahtmetastasen genau wie bei den Tumoren, die in den Magen oder andere Organe infiltrieren, die Auswertung der Daten erschwert (Abb. 60 B, 61).

Unsere Versuche konnten nochmals bestätigen, dass jede(s) bildgebende Technik/Verfahren ihre spezifischen Vorteile und Einschränkungen hat. Die genannten Fakten legen dar, dass die Biolumineszenz- und Ultraschall-Bildgebungsmodalitäten ergänzende Ansätze für die Überwachung der Tumorprogression und des Therapieansprechens in präklinischen Studien mit orthotopen Mausmodellen für menschlichen Krebs sind. Da die Biolumineszenz- und Ultraschall- Bildgebungsstudie keine genauen Informationen über Morphologie und Wachstumsmuster der einzelnen Tumore ergibt, dürfen postmortale makroskopische oder mikroskopische Analysen des Gewebes oder der Krebszellen nicht ausgeschlossen bleiben. Die obengenannten Widersprüche zur Literatur könnten die Aussage bestätigen, dass die Bildgebungsmethoden die Verlaufsdaten des Tumorwachstums vervollständigen und als zusätzliche Information dienen, aber sie liefern in der gegenwärtig durchgeführten Form keine so präzisen Daten wie die Sektionsdaten selbst.

## 4.2. Entwicklung des Tumorwachstums und der Metastasenbildung

### 4.2.1. Palliative und adjuvante präklinische Tumormodelle

In unserem Versuch wurden in den orthotopen Tiermodellen hohe Raten bezüglich des Anwachsens der Pankreastumoren bis zu 100 % erreicht. Wegen eines stark eingeschränkten Immunsystems hat die immundefiziente Maus keine Abstoßungsreaktion gegen das Fremdgewebe, was diese Maus zu einem idealen Wirt für homologe und xenogene Transplantationen macht (Ovejera, A. A. & Houchens, D. P., 1981). Zu diesem Modell wurden auch in der Arbeitsgruppe von B. Sipos sehr hohe Anwachsrate mit verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien beschrieben (Sipos, B. et al. 2003). Die immundefizienten Mäuse tolerierten die inokulierten Tumorzellen im Pankreas ohne Zeichen einer Abwehrreaktion. Ähnliche Ergebnisse wurden von Tepel, J. und Egberts J.H. präsentiert (Tepel, J. et al., 2006; Egberts J.H. et al., 2008). Schon etwa 7 Tage nach Implantation nach einer Injektion von D-Luciferin leuchteten die meisten Panc Tu *Luc*- Tumore. Dies erlaubt eine Lumineszenzmessung der Zellen mittels der optischen Kammer (Abb. 18, 19). Dies war für die Qualitätskontrolle der Tumorimplantation sehr wichtig. Sonst könnten Tumore in der Regel erst nach 3 Wochen durch Palpation erkannt werden (Mohammad, R. M. et al., 1998). Mehrere Berichte unterstützen die Verwendung dieses Modells mit der klinischen Vergleichsstudie von Xenograft- und klinischen Tumorbiopsien (Becher, O. J. & Holland, E. C., 2006; Sausville, E. A. & Burger, A. M., 2006). Zum Beispiel beobachteten Scholz C. C. und Fiebig H. H. in ihren Studien eine Korrelation mit den klinischen Ergebnissen für Tumorwachstumshemmung (97%) und Chemosensibilität (90%) (Scholz, C.C. et al., 1990; Fiebig, H.H. et al., 2004).

Obwohl in der Humanmedizin nach erfolgreicher Pankreaskarzinomresektion eine 3 jährige Überlebensrate von ca. 30 % beschrieben wurde (Magistrelli, P. et al., 2000; Jemal, A. et al., 2008; Siegel, R.L. et al., 2015), entwickeln mehr als 70 % der Patienten nach radikaler R0-Resektion Lokalrezidive (Sperti, C. et al., 1997). Das **Resektionsmodell** von humanen Pankreastumoren in SCID Beige Mäusen (s. 1.4.2.2.) wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Kalthoff erfolgreich im Jahr 2006 etabliert und von Egberts J.H. im Jahr 2007 beschrieben (Egberts J.H. et al., 2007). Die durchgeführte subtotale Pankreatektomie (die Entfernung eines Teils des

Pankreas) spiegelt eine klinische Situation nach einer kompletten Primärtumorresektion (R0-Resektion) in dem Resektionsmodell wider, so dass die Wirkung der adjuvanten oder neo-adjuvanten Therapie auf die nach Resektion entstehenden Rezidive, sowie auf die Metastasenentwicklung mit der in der Klinik nach Resektion des Primärtumors vergleichbar erscheint (Tepel, J. et al., 2006). In unserer Studie wurden die Lokalrezidive (bei allen 10 Tieren) nach radikaler R0-Resektion in der adjuvanten klinischen Situation bei allen Tieren in der Kontrollgruppe beobachtet (s. Tab. 18). Auch mehrere *in vivo*-Studien mit verschiedenen Tumorzellen wiesen eine entscheidende Rolle der Entzündungsreaktionen im Gewebe für die lokalen Tumorrezidive auf (van Rossen, M.E. et al., 2001; ten Kate, M. et al., 2004). Aus diesem Grund verdoppelten sich die Anzahl der Bauchnahtmetastasen in der Kontrollgruppe nach der Resektion in dem adjuvanten Modell (10 von insgesamt 10 Tieren) im Vergleich mit dem palliativen (4 von insgesamt 9 Tieren) Ansatz (Abb. 42, 43). Das Ansiedeln von Tumorzellen in den Wundrändern der Laparotomie unterstützt die Hypothese von Tepel, J., dass eine Tumorzellmanifestation bevorzugt dort stattfindet, wo Wundheilungsprozesse ablaufen (Tepel, J. et al., 2004). In der Tat häufen sich klinische und experimentelle Befunde, in denen die Entzündungen die Tumorentstehung, das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren fördern. Des Weiteren wurden drastische Metastasierungen (ca. 67 %) bzw. auch Ansiedeln von Tumorzellen in den Wundrändern der Laparotomie in der Studie von Tepel beschrieben (Tepel, J. et al., 2004). In unserem Versuch des orthotopen Pankreaskarzinommodells ohne Tumorresektion wurden minimale Leber- oder Milzmetastasen nachgewiesen (s. Seite 77). Als Alternative zur chirurgischen orthotopen Injektion kann man eine ultraschallgeführte Injektion betrachten (Schneider, G. et al., 2005). Dieses Verfahren verhindert chirurgisch bediente Komplikationen. Andererseits wurde von Shanks Huynh gezeigt, dass die Tumore aus solch einer Studie nicht nur auf die Bauchspeicheldrüse lokalisiert, sondern überall in der Bauchhöhle verbreitet sind und es ist nicht klar, ob dies eine Folge der Metastasierung ist oder möglicherweise von Zellen, die während des Verfahrens in die Umgebung freigesetzt wurden (Huynh, A.S. et al., 2011).

Am postoperativen Tag 21 unterscheideten sich das Tumor- und Metastasenvolumen (Abb. 41, 43), auch das Tumor- und Metastasengewicht (Abb. 40, 42) in den Kontrollgruppen bei der palliativen Situation im Vergleich zur adjuvanten klinischen Situation nicht signifikant. Dies bedeutet, dass die radikale Resektion (R0-Resektion) auf die Krebsbehandlung in unserem Versuch ohne medikamentöse Behandlung (Kontrollgruppen) keine positive Wirkung hatte. Unsere Ergebnisse entsprechen nicht klinischen Situationen mit radikaler Resektion des humanen Pankreaskarzinoms (Tepel, J. et al., 2004).

#### 4.2.2. Orthotope Inokulation der PancTu1Luc-, PancTu1- und Panc1- Zelllinien

Derzeit ist eine große Anzahl von Pankreastumorzelllinien verfügbar (s. Tabelle 17). Die etablierten Pankreaskrebszelllinien liefern eigene genetische Informationen und entstehen aus Primärtumor, Aszites, Lebermetastasen oder Lymphknotenmetastasen:

Zelllinie	Ursprung	Genetische Mutation	Typ
A818.4	Aszites	K-ras, p53, p16	PDAC
AsPC-1	Aszites	K-ras, p53, p16	PDAC
BxPc3	Primärtumor	p53, p16, DPC4	PDAC
Colo357	Lymphknotenmetastasen	K-ras, DPC4	PDAC
HPAF-2	Aszites	K-ras, p53, p16	PDAC
MiaPaCa-2	Primärtumor	K-ras, p53, p16	PDAC
Panc1	Primärtumor	K-ras, p53, p16	PDAC
Panc89	Lymphknotenmetastasen	p53, p16	PDAC
PancTu 1	Primärtumor	K-ras, p53, p16	PDAC
PT45P1	Primärtumor	K-ras, p53, p16	PDAC

Tabelle 17: Herkunft und genetische Mutation der Pankreaskarzinom-Zelllinien nach Andrew, M. Lowy (transplantiert in der SCID-Maus) (Andrew, M. Lowy, 2008)

Als Basis der durchgeführten Untersuchungen erfolgten Experimente mit den gut etablierten Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie PancTu1, Panc1 (Sipos, B. et al. 2003) (s. Tabelle 17) und PancTu1Luc. Diese Zelllinien zeigten deutliche Unterschiede in ihrer Morphologie (Abb. 5). Die untersuchten Tumore unterschieden sich ebenfalls signifikant in der Größenzunahme, z. B. bei der Ultraschalluntersuchung: Panc1-Tumore entwickelten sich langsamer als PancTu1-Tumore; PancTu1Luc-Tumore wuchsen schneller als Panc1- und schneller als PancTu1-Tumore (Abb. 32). Die einfachste Erklärung dieser Tatsache wurde mehrfach auch in den Projekten beschrieben, wo die ausgewählten

Pankreaskarzinomzelllinien unterschiedliche Eigenschaften haben. Rozenblum E. und Moore, P. S. zeigten ebenfalls, dass durch Aggressivitäts- bzw. Metastasierungsverhalten der Zellen unterschiedliche Tumore hervorgehen (Rozenblum, E. et al., 1997; Moore, P. S. et al., 2001).

Die Tierversuche mit orthotop inokulierten PancTu1*Luc*-Zellen bieten verschiedene Untersuchungsmöglichkeiten und liefern zusätzlich mittels Lumineszenzmessung Informationen über das Tumorwachstum. Für den Nachweis des Tumorwachstums wurde Biolumineszenz-Bildgebung durch Messen der Luciferase-Aktivität *in vivo* durchgeführt unter Verwendung eines NightOWL LB 983. Durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass die PancTu1*Luc*-Zellen nicht nur für die Überwachung der Tumorzellen oder des Tumorwachstums sehr gut geeignet sind, sondern auch für die Kontrolle, ob die humanen Tumorzellen nach orthotoper Xenotransplantation in der Maus angewachsen sind (Weissleder, R., 2001). Es zeigte sich, dass die PancTu1*Luc*-Tumore viel schneller und aggressiver wuchsen, im Vergleich zu den PancTu1-Tumoren. In der Literatur gibt es eine Vermutung, dass entweder eine hohe Luciferase-Aktivität oder die Zugabe von Luciferin-Substrat einen Einfluss auf das Tumorzellwachstum hatte (Tiffen, J. C. et al., 2010). Dennoch muss darauf hingewiesen werden, dass solche therapeutischen Studien mit einem murinen, orthotopen Xenotransplantationsmodell mit PancTu1*Luc*-Zellen zwar sehr informativ sind, aber wegen der schnellen Tumorentwicklung zeitlich begrenzt sind, was die medikamentöse Wirkung des therapeutischen Präparates behindert. Außerdem zeigten die PancTu1*Luc*-Tumore, die am POD 27 entnommen wurden, bei den histologischen Untersuchungen nekrotische Stellen.

Aus unserer Studie zeigen wir den Schluss, dass die aus humanem, duktalem Pankreaskarzinom stammende PancTu1-Zelllinie bei orthotoper Inokulation zwar schnellwachsend ist, aber nicht so drastisch wie die PancTu1*Luc*-Zelllinie. Das Ergebnis steht im Einklang mit der Literatur, dass die Verwendung der PancTu1-Zelllinie in dem Tierversuch bis zu 30 Tagen möglich ist und damit ist die PancTu1-Zelllinie für therapeutische Studien gut geeignet (Egberts, J.H. et al. 2008).

Die Tiere aus den Panc1- Gruppen hatten einen optisch sehr gesunden Zustand und zeigten sich sehr langsam entwickelnde kleine Pankreastumore (Abb. 37, 38). Aus diesem Grund wurde ausnahmsweise der Sektionstag von POD 27 auf POD 34 verlegt. Wie schon Fidler I. J. ausführlich erläutert hat, ist der Prozess der Metastasierung hoch spezifisch und sein Ergebnis hängt von der Wechselwirkung von metastatischen Zellen und Umgebung ab (Fidler, I.J., 1995). Bei aggressiv wachsenden Zelllinien finden sich bereits nach 8 Wochen disseminierte Zellen in Lunge und Leber (Fidler, I. J. & Hart, I. R., 1982; Fidler, I.J., 1995). Bei der vorliegenden Studie wurde bei allen Tieren eine hohe Lebermetastasenanzahl beobachtet (Tab. 6), deswegen können die Panc1-Zellen als die Zelllinie mit einem höheren metastasierenden Potential bezeichnet werden (Wang, B. et al., 2001). In den vorliegenden Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass das Modell orthotoper Inokulation mit der Panc1- Zelllinie sich sehr gut für lang andauernde therapeutische Studien zur Metastasierung eignet. Im Gegensatz dazu beobachtet man, dass Mäuse mit Tumoren der Bauchspeicheldrüse von PancTu1*Luc*- und PancTu1-Zelllinien keine Lebermetastasen aufwiesen (s. Tab. 6). Unsere Ergebnisse legen nahe, dass abhängig von der verwendeten Zelllinie verschiedene Krankheitsverlaufsaspekte beobachtet werden können (Moore, P. S. et al., 2001).

### **4.3. Medikamentöse Wirkung von CD95L- und TNF- $\alpha$ - blockierenden Substanzen**

#### **4.3.1. Therapeutische Wirkung auf das Tumorwachstum in den Behandlungsgruppen**

Es wurde festgestellt, dass CD95L zu nicht-apoptotischen Funktionen des CD95/CD95L -Systems beiträgt (Trauzold, A. et al., 2005; Peter M. E. et al., 2007). Es ist bereits bekannt, dass die Bindung von CD95L an seinen Oberflächenrezeptor CD95 (Suda, T. et al., 1993) eine große Rolle bei der Erhöhung von Motilität und Invasivität in CD95-Apoptose-resistenten Pankreastumorzellen spielen kann (Chen, L. et al., 2010). Unsere Ergebnisse bestätigen diese Theorie nur teilweise unter den gegebenen Versuchsbedingungen. Die erhaltenen *in vivo*-Daten nach der CD95L-Hemmung mit löslichem Fusionsprotein sCD95Fc liefern einen signifikanten

Unterschied nur bei der Behandlung (in der Dosis 10 µg/g KGW pro Behandlung) in der palliativen Situation bei orthotoper Inokulation der PancTu1*Luc*- Zelllinien. Dies betraf ausschließlich das Tumorgewicht (Abb. 34), ein relativ hartes read-out-Kriterium, jedoch nicht die entsprechenden Tumorzellenbestimmungen. Weitere sCD95Fc-Behandlungsgruppen bei palliativen und adjuvanten Situationen zeigten beim Einsatz von löslichem Fusionsprotein sCD95Fc keine signifikanten Unterschiede. Dagegen wurde in der 2007 veröffentlichten Arbeit von Peter, M. E. mit einem anderen experimentellen Ansatz gezeigt, dass viele Krebsarten mit CD95-vermittelten Entzündungen verlaufen, was wiederum zum Tumorwachstum beitragen kann. Somit konnte die CD95L-CD95-Bindung zum Tumorwachstum durch die Induktion der chemotaktischen Faktoren beitragen (Peter, M. E. et al., 2007). Die Studie von Chen L. zeigt, dass CD95 eine wachstumsfördernde und tumorentstehende Rolle spielt. Der Verlust von CD95 in den Eierstockkrebs- und Leberkrebs- Mausmodellen reduziert die Inzidenz von Krebserkrankungen sowie die Tumorgröße (Chen, L. et al., 2010).

Die durchgeführten palliativen und adjuvanten Therapien bestätigen eine therapeutische Wirkung der TNF- $\alpha$ -Hemmung in der Infliximabgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei kann die nonapoptotische Funktion des TNF- $\alpha$ -Systems beeinflusst werden (Abb. 20-22, 26, 27). Dies steht im Einklang mit der Literatur (Egberts, J.H. et al. 2008). Dies würde auch die Tatsache erklären, dass obwohl TNF- $\alpha$  die apoptotische Kaskade auslösen kann, unter physiologischen Bedingungen hier TNF- $\alpha$  hauptsächlich proinflammatorische Wirkung erzeugt, was zu Apoptose- bzw. Chemoresistenz führt (Schneider-Brachert, W. et al., 2013). Die Reduktion der Metastasenanzahl und des lokalen Tumorwachstums nach der therapeutischen Wirkung der TNF- $\alpha$ -Hemmung in der Infliximabgruppe (Abb. 20-22, 26, 27) würde sich durch eine Abnahme von uPA- und IL-8-Aktivität erklären (Scallon, B. et al., 2002; Egberts, J. H. et al., 2008; Maier H. J. et al., 2010). Zurzeit existieren auch die entgegengesetzten Publikationen, die anti-tumorwirkende Eigenschaften von TNF- $\alpha$  bestätigen (Murugesan, S. R. et al., 2009; Furukawa, K. et al., 2011).

Die CD95L-Hemmung und die gleichzeitige Hemmung des Todesliganden TNF- $\alpha$  als

Kombinationstherapie zeigte eine Stimulation des Tumorwachstums (Abb. 26-28) und der Metastasierung (Abb. 31). Die Metastasenanzahl (Bauchnaht-, Leber-, Milz-Metastasen) nach dem palliativen Therapieansatz bei orthotoper Inokulation der PancTu1*Luc* - Zelllinien zeigten eine positive therapeutische Wirkung der CD95L-Hemmung (s. Seite 77). Man würde erwarten, dass Infliximab besonders effektiv in Kombination mit weiteren chemotherapeutischen Wirkstoffen wirken würde. Es gibt zwar bislang keine Angaben aus der Literatur hierzu, es scheint aber die Hemmung von CD95L in der Kombinationstherapiegruppe einen positiven Effekt der TNF- $\alpha$ -Hemmung aufzuheben (Abb. 26-28). Dies könnte sich daraus erklären, dass die CD95L-Hemmung und die gleichzeitige Hemmung des Todesliganden TNF- $\alpha$  zu einer unerwarteten Gegenregulation in den Krebszellen führt, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Barnhart, B. C. und Egberts, J. H., wo die Hochregulation von NF-kappaB durch die Behandlung der Tumorzellen mit CD95L- oder TNF- $\alpha$ - Liganden zur Invasivität der apoptoseresistenten Tumorzellen führt (Barnhart, B. C. et al., 2004; Egberts, J. H. et al., 2008).

### 4.3.2. Vergleich der palliativen und adjuvanten Therapieansätze

Die durchgeführten Versuche zeigen unterschiedliche therapeutische Wirkungen **zwischen den palliativen und adjuvanten Ansätzen** in der Infliximabgruppe und Kombinationstherapiegruppe. Es wurde bei palliativer Therapie eine signifikante therapeutische Wirkung in der Infliximabgruppe beobachtet, die bei der adjuvanten Therapie nicht mehr vorhanden ist. Die gleiche therapeutische Wirksamkeit von Infliximab beschreibt Tiwari, S. in seiner Publikation, in der eine 78% Abnahme in der Wachstumsrate des Pankreastumors des Primärtumors in dem Mausmodell beobachtet wurde (Tiwari, S. et al., 2011). Im Gegensatz dazu hat Egberts, J.H. in seinen Ergebnissen gezeigt, dass die Hemmung von TNF-alpha eine vielversprechende Therapieoption, insbesondere in der adjuvanten Therapie nach subtotaler Pankreatektomie, ist (Egberts, J. H., et al. 2008). Dieser Unterschied zu der Studie von Egberts J. H. (2008) bleibt zunächst unerklärt.

Beim Tumorgewichtvergleich zwischen Kombinationstherapiegruppen der palliativen und adjuvanten Ansätze wurde eine Tumorwachsstimulation bei der adjuvanten Therapie zur palliativen Therapie festgestellt (Abb. 40). Ebenfalls unterscheidet sich

mit drastischem Tumorwachstum das Volumen der Kombinationstherapiegruppen bei der palliativen Therapie von der adjuvanten Therapie (Abb. 41). Interessanterweise zeigten die Tumore, besonders die beim adjuvanten Therapieansatz in der Kombinationstherapiegruppe, ein sehr stroma- und bindegewebsreiches histologisches Bild im Vergleich zu den Primärtumoren (Abb. 39). Unser Versuch zeigt einen Einfluss der adjuvanten Therapie auf das Tumorwachstum besonders in der Kombinationstherapiegruppe (Abb. 40, 41). Die Erklärung dieser Tatsache könnten weitere histologische Untersuchungen bringen.

In unserer Studie wurden Lokalrezidive nach radikaler R0-Resektion in der adjuvanten klinischen Situation bei allen Tieren in allen Behandlungsgruppen, also zu 100 %, beobachtet (s. Tabelle 18). Auch Tepel J. und Raa S. T. haben ein verstärktes Wiederauftreten des Tumors an entfernten Stellen nach der Operation beobachtet (Tepel, J. et al., 2006; Raa S. T. et al., 2005). Mehrere *in vitro* - und *in vivo*- Studien mit anderen Tumorentitäten wiesen auch eine entscheidende Rolle der chirurgieassoziierten Entzündungsreaktionen für die lokalen Tumorrezidive auf (van Rossen M. E., et al., 2001; ten Kate, M. et al., 2004).

Behandlungsgruppe	Lokalrezidiv, mg	Metastasen, mg	Metastasen Anzahl
Kontrollgruppe	437,5	567	bei allen 10 Tieren
sCD95Fc	820	686,5	bei allen 10 Tieren
Kombinationstherapie	967,5	647,5	8 von 9 Tieren
Infliximab	374	764	7 von 8 Tieren

Tab. 18: Analyse der Lokalrezidiv- und Metastasenanzahl nach adjuvanter Therapie (PancTu1Luc-Pankreaskarzinomzelllinie)

Die Bauchnahtmetastasenzahl sowie das Metastasenvolumen und das Metastasengewicht bei der palliativen Therapie ist deutlich niedriger als bei adjuvanter Therapie in allen Behandlungsgruppen (Abb. 40, 41). Dies unterstützt die Hypothese von Egberts J. H., dass entzündungsfördernde Mediatoren (z. B. Zytokine) eine wichtige Rolle bei der hämatogenen Metastasierung von Krebszellen, besonders nach dem operativen Eingriff, spielen (Egberts, J. H. et al., 2008). Operations-assoziierte entzündliche Reaktionen sind nicht auf die Resektionsfläche beschränkt, sondern systemisch verteilt (Badia, J. M. et al., 1996; Aosasa, S. et al.,

2000). Zusammenfassend lässt sich basierend auf diesen Ergebnissen sagen, dass die *in vivo*-Versuche im Wesentlichen der Situation in der Humanmedizin entsprechen (Tepel, J. et al., 2004).

Laut Egberts J.H. (2007) sind von einer Fernmetastasierung nach reseziertem Pankreaskarzinom insbesondere Leber und Lunge sowie die regionalen Lymphknoten, das Mesenterium und das Zwerchfell betroffen. Ein adhärentes Wachstum des Rezidivs betrifft häufig Niere, Milz und Ovarien (Egberts, J.H. et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse zeigen die Versuche von Tepel J., die Organmetastasen traten bei 67% bei der adjuvanten Therapie im Vergleich zu 25% der Tiere nach der palliativen Therapie auf (Tepel, J. et al., 2006). Unsere Ergebnisse bestätigen die Aussage, dass die Lokalrezidive und die Metastasierungen in den Tierversuchsstudien vergleichbar sind mit der klinischen Situation in der Humanmedizin.

#### **4.4. Vergleich von *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen**

In dieser Arbeit wurde die Hemmung von zwei zelltodvermittelnden Liganden CD95L und TNF- $\alpha$  durch *in vitro*- und *in vivo*- Studien untersucht. Im Vordergrund stand dabei die Regulierung der Entstehung des Entzündungsprozesses in der Tumorzelle und eines Wirkmechanismus von Signalkaskaden, welche schließlich zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen. Die therapeutischen *in vitro*- und *in vivo*-Wirkungen einer CD95-Ligandenblockierenden Substanz (das Fusionsprotein sCD95Fc), auch die Wirkung der CD95L-Hemmung und gleichzeitig anderer Todesliganden (TNF- $\alpha$ ) wurden als Kombinationstherapie getestet. Als Vergleichstherapie wurde die schon bekannte Therapie mit Infliximab (Remicade<sup>®</sup>) eingesetzt.

In diesem Versuch wurde eine sehr hohe Korrelation der *in vivo*- und *in vitro*-Ergebnisse des Zellwachstums der PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen beobachtet. Obwohl die PancTu1*Luc*-Zellen von der PancTu1- Zelllinie abstammen, wachsen die PancTu1*Luc*-Tumore *in vitro* und auch *in vivo* schneller und invasiver im Vergleich zu PancTu1. Dies kann durch die Selektion nach stabiler Transfektion erklärt werden.

Durchgeführte Tumorzellinvasionassays (invasives Tumorzellpotential in der Kontrollgruppe) zeigten eine erhöhte Invasivität der PancTu1Luc-Zellen, etwas weniger die PancTu1- Zellen, während die Panc1-Zellen aufgrund von langsamen Wachstums nicht für den Test geeignet sind (s. Tabelle 16, Abb. 56). Die *in vitro*-Ergebnisse der PancTu1Luc-, PancTu1- und Panc1- Zellen entsprechen den *in vivo*-Daten. Ein kritischer Punkt ergibt sich bei der semiquantitativ-abgeschätzten Einstufung der therapeutischen Einwirkung. Dies könnte eine Erklärung sein, warum die folgende Daten (Tab.16) nicht den veröffentlichten Ergebnissen von Egberts, J. H. im Jahr 2008 entsprechen (Egberts, J. H. et al., 2008). Das Tumorzellinvasionassay gibt nur eine grobe Vorstellung über die therapeutische Behandlung (s. 3.9.8.).

In einer Grundlagenstudie von Voskoglou-Nomikos, T. wurde darauf hingewiesen, dass abhängig von der Tumorzelllinie bzw. der Zellheterogenität nicht alle *in vitro*- und *in vivo*- Versuche miteinander korrelieren (Voskoglou-Nomikos, T. et al., 2003). In unserem Versuch wurde keine Korrelation zwischen der Geschwindigkeit des *in vitro*- und *in vivo*- Wachstums festgestellt. Dies würde auch die Tatsache erklären, dass für solche Abweichungen unter den einzelnen Zelllinien, z.B. die Abhängigkeit von der jeweiligen Umgebung (bzw. Medium oder Pankreasgewebe SCID-Maus) erheblich ist (Wagner, Ch. & Müller, O., 2009).

Die weiteren Untersuchungen der therapeutischen Wirkung von CD95L- und TNF- $\alpha$ -blockierenden Substanzen auf das Tumorstadium in der *in vitro*- und *in vivo*-Gruppe stützen sich bei allen Zelllinien auf Daten aus mehreren Studien z.B. von Tepel, J. sowie Egberts, J.H.. Dort wurden ähnliche Ergebnisse mit der minimalen Hemmung der Proliferation und Invasivität der PDAC-Zellen *in vitro* und der starken antitumoralen Wirkung *in vivo* nach der Infliximab-Behandlung beschrieben (Tepel, J. et al., 2006, Egberts, J.H. et al. 2008).

Es wurde in *in vitro*- sowie *in vivo*- Untersuchungen mit PancTu1Luc-Zellen in den Kombinationstherapiegruppen eine deutliche Erhöhung der Stimulation des Zellwachstums (bis 350 %) beobachtet. Die erhaltenen Werte der

## Diskussion

Zellwachstumsuntersuchung bei der Stimulation des Wachstums von PancTu1*Luc*-Zellen korrelieren nicht mit der Optischen Dichte von denselben wachsenden/lebenden Zellen (zeigen keine signifikanten Werte, s. Tabelle 8, 9). Aus diesem Grund ist es sinnvoll die Daten nicht zu berücksichtigen und die Zellwachstumsuntersuchung zu wiederholen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass es in der medizinischen Forschung sehr schwierig ist in *in vitro*- Studien eine klinische Situation zu simulieren. So zeigen hauptsächlich *in vivo*- Modelle, ob die *in vitro*-Untersuchungen auf einen komplexen Organismus übertragbar sind. Diese Tiermodelle sind somit unerlässlich, um die Wirksamkeit neuer therapeutischer Strategien hinsichtlich ihrer klinischen Anwendungen bei den bisher als therapieresistent einzustufenden Rezidiven zu untersuchen. Das unterstreicht die Wichtigkeit der *in vivo*-Versuche als notwendigen und wesentlichen Bestandteil der medizinischen Forschung.

## Zusammenfassung

Es handelt sich beim duktalem Pankreasadenokarzinom um eine seltene, aber sehr gefährliche Krebsart mit äußerst schlechter Prognose für die betroffenen Patienten. Es wurde in mehreren Studien bereits aufgezeigt, dass eine erhöhte NF- $\kappa$ B Aktivität in den Pankreaskarzinomzellen zur Ausprägung einer klinischen Chemoresistenz beitragen kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei klinische Situationen, die adjuvante und palliative Therapie, miteinander verglichen werden. Die Lokalrezidive wurden nach radikaler R0-Resektion in der adjuvanten klinischen Situation bei allen Tieren in der Kontrollgruppe beobachtet. Auch die Anzahl der Bauchnahtmetastasen in der Kontrollgruppe verdoppelten sich nach der Resektion bei dem adjuvanten Modell im Vergleich mit dem Palliativen. Es häufen sich klinische und experimentelle Studien, dass chronische Entzündungen die Tumorentstehung, das Wachstum und die Ausbreitung von Tumoren fördern. Ohne Tumorresektion wurden in unserem Versuch mit der Zelllinie PancTu1 keine Leber- oder Milzmetastasen im orthotopen Pankreaskarzinommodell nachgewiesen. Unsere Ergebnisse bestätigen jedoch die Aussage, dass nach Resektion die Lokalrezidive und die Metastasierungen in den Tierversuchsstudien vergleichbar sind mit der klinischen Situation in der Humanmedizin. Man kann deshalb neue Strategien und Techniken für einen neuen adjuvanten Ansatz in dem orthotopen Xenotransplantationsmodell entwickeln.

Es wurde festgestellt, dass die Hochregulation von NF- $\kappa$ B durch die Behandlung der Tumorzellen mit CD95L- oder TNF- $\alpha$ - Liganden zur Invasivität von apoptoseresistenten Tumorzellen führt. In unseren Studien konnte unter den *in vitro*- und *in vivo*- Bedingungen eine begrenzte therapeutische Wirkung (nur auf Tumorgewicht in der PancTu1Luc-sCD95Fc-Behandlungsgruppe) einer CD95L-blockierenden Substanz auf das PDAC-Zellenwachstum beobachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin beobachtet werden, dass sich durch die Kombinationsbehandlung aus CD95L-Hemmung und gleichzeitiger Hemmung anderer Todesliganden (TNF- $\alpha$ ) das Tumorstadium (jedoch) erhöhte. Im Gegensatz dazu wurde eine Tumorreduktion bei der alleinigen Hemmung des TNF- $\alpha$  - Todesliganden (Infliximabtherapie) nachgewiesen.

## Zusammenfassung

Ein Grund für die schlechte Prognose ist, dass das Pankreaskarzinom keine spezifischen klinischen Symptome in Frühstadien aufzeigt. In den vorliegenden Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die höchste Genauigkeit der Daten der Tumoruntersuchung erst nach einer Sektion erreicht wurde. Das bestätigt die Aussage, dass die Bildgebungsmethoden die Verlaufsdaten des Tumorwachstums vervollständigen und als zusätzliche Information dienen, aber sie liefern in der hier durchgeführten Form keine so präzise Daten wie die Sektionsdaten selbst.

In unserem Versuchsansatz verfügt das Pankreaskarzinom über eine außerordentliche Heterogenität und Vielfalt der Tumore bzw. Tumorzellen. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass abhängig von der verwendeten Zelllinie verschiedene Krankheitsverlaufsaspekte beobachtet werden können. Diese Daten rechtfertigen somit die Durchführung weiterer experimenteller Tumorforschungsstudien, um Patienten mit Pankreaskarzinom zu einer besseren Prognose zu verhelfen.

## Summary

The pancreatic carcinoma is a rare, very dangerous type of cancer with an extremely poor prognosis for patients. It has already been shown in several studies that increased NF- $\kappa$ B activity in pancreatic cancer cells may contribute to the severity of clinical chemoresistance. As part of this work, two clinical situations, the adjuvant and palliative chemotherapy, are compared. The local recurrences were observed after radical R0 resection in adjuvant clinical situation in all animals in the control group. The number of ventral suture metastases in the control group doubled after resection in the adjuvant model in comparison with the palliative model. Mounting clinical and experimental studies have shown that chronic inflammation promotes tumor formation, growth and spread of tumors promote. In our experiment or splenic metastases were detected in the orthotopic pancreatic cancer model without tumor resection. Our results confirm the statement that the local recurrence and metastases in the animal studies are similar to the clinical situation in human medicine. One can therefore develop new strategies and techniques for a new adjuvant approach in the orthotopic xenograft model.

It has been found that up-regulation of NF- $\kappa$ B by the treatment of tumor cells with CD95L- or TNF- $\alpha$ - ligands leads to invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. Under our *in vitro* and *in vivo* conditions, a limited therapeutic effect of a CD95L-blocking substance to the PDAC cell growth was observed (only in tumor weight in the treatment group PancTu1Luc-sCD95Fc). It was proven that the tumor growth was even drastically increased by the combination treatment of CD95L inhibition and simultaneous inhibition of other death ligands (TNF- $\alpha$ ). In contrast, just the inhibition of TNF- $\alpha$  (alone) resulted in tumor reduction (therapy with infliximab).

One reason for the poor prognosis is that the pancreas does not show any specific clinical symptoms in early stages. In the present study, it was confirmed that the highest accuracy of the data analysis of the tumor was achieved after section. This confirms the statement that the imaging methods complete the history data of tumor growth and serve as additional information, but they provide, no precise data such as the section data itself.

## Summary

In our experiments, the pancreas has an extraordinary heterogeneity and variety of tumors or tumor cells. Our results suggest that depending on the cell line used different disease aspects can be observed. These data therefore justify the implementation of further tumor research experimental studies to help patients with pancreatic cancer in a better prognosis.

## Literaturverzeichnis

Algeciras-Schimmich, A., Pietras, E. M., Barnhart, B. C., Legembre, P., Vijayan, S., Holbeck, S. L. & Peter, M. E. 2003. Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 11445-11450.

Allegretto, M., Selkaly, H. & Mackey, J. R. 2001. Intraoperative saline and gemcitabine irrigation improves tumour control in human squamous cell carcinoma-contaminated surgical wounds. *J.Otolaryngol.* 30: 121-125.

Alves, F., Contag, S., Missbach, M., Kaspereit, J., Nebendahl, K., Borchers, U., Heidrich, B., Streich, R. & Hiddemann, W. 2001. An orthotopic model of ductal adenocarcinoma of the pancreas in severe combined immunodeficient mice representing all steps of the metastatic cascade. *Pancreas* 23: 227-235.

Andrew, M. Lowy, 2008 Pancreatic Canser. *Spinger*. ISBN-10: 0387692509;

Ansai, S. I., Katagata, Y., Yoshikawa, K. I., Hozumi, Y. & Aso, K. 1993. Keratin specificity analyses of eight anti-keratin monoclonal antibodies, and their immunostaining patterns in normal skin using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue specimens. *Arch.Dermatol.Res.* 285: 6-12.

Aosasa, S., Ono, S., Mochizuki, H., Tsujimoto, H., Osada, S., Takayama, E., Seki, S. & Hiraide, H. 2000. Activation of monocytes and endothelial cells depends on the severity of surgical stress. *World J.Surg.* 24: 10-16.

Appel, M. J., Garderen-Hoetmer, A. & Woutersen, R. A. 1994. Effects of dietary linoleic acid on pancreatic carcinogenesis in rats and hamsters. *Cancer Res.* 54: 2113-2120.

Arase, H., Arase, N. & Saito, T. 1995. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J.Exp.Med.* 181: 1235-1238.

Arlt, A., Gehrz, A., Muerkoster, S., Vorndamm, J., Kruse, M. L., Folsch, U. R. & Schafer, H. 2003. Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 22: 3243-3251.

Arlt, A., Vorndamm, J., Breitenbroich, M., Folsch, U. R., Kalthoff, H., Schmidt, W. E. & Schafer, H. 2001. Inhibition of NF-kappaB sensitizes human pancreatic carcinoma cells to apoptosis induced by etoposide (VP16) or doxorubicin. *Oncogene* 20: 859-868.

Avwioro G. 2011. Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences*. Bd. 1, S. 24-34.

Badia, J. M., Whawell, S. A., Scott-Coombes, D. M., Abel, P. D., Williamson, R. C. & Thompson, J. N. 1996. Peritoneal and systemic cytokine response to laparotomy. *Br.J.Surg.* 83: 347-348.

- Baker, S. J. & Reddy, E. P. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261-3270.
- Balkwill, F. 2006. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 25: 409-416.
- Barkett, M. & Gilmore, T. D. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6910-6924.
- Barnhart, B. C., Legembre, P., Pietras, E., Bubici, C., Franzoso, G. & Peter, M. E. 2004. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *EMBO J.* 23: 3175-3185.
- Barsov, E. V. & Hughes, S. H. 1996. Gene transfer into mammalian cells by a Rous sarcoma virus-based retroviral vector with the host range of the amphotropic murine leukemia virus. *J. Virol.* 70: 3922-3929.
- Becher, O. J. & Holland, E. C. 2006. Genetically engineered models have advantages over xenografts for preclinical studies. *Cancer Res.* 66: 3355-8, discussion.
- Beg, A. A. & Baltimore, D. 1996. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274: 782-784.
- Berns, A. 2001. Cancer. Improved mouse models. *Nature* 410: 1043-1044.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C., Mathison, J., Ulevitch, R. & Cerami, A. 1985. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 316: 552-554.
- Bhaumik, S. & Gambhir, S. S. 2002. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 377-382.
- Boatright, K. M. & Salvesen, G. S. 2003. Mechanisms of caspase activation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15: 725-731.
- Bodmer, J. L., Schneider, P. & Tschopp, J. 2002. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem.Sci.* 27: 19-26.
- Bosma, G. C., Custer, R. P. & Bosma, M. J. 1983. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-530.
- Bouvet, M., Spornyak, J., Katz, M. H., Mazurchuk, R. V., Takimoto, S., Bernacki, R., Rustum, Y. M., Moossa, A. R. & Hoffman, R. M. 2005. High correlation of whole-body red fluorescent protein imaging and magnetic resonance imaging on an orthotopic model of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 65: 9829-9833.
- Braun, R. & Willnow, E. 1996. Die "Knockout"-Maus als Krankheitsmodell: Prinzipien und klinische Relevanz. *Dt Ärztebl*, 93: A-1765–1769 [Heft 26]
- Brennan, F. M., Maini, R. N. & Feldmann, M. 1998. Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin.Immunopathol.* 20: 133-147.

- Bridger, J. M., Kill, I. R. & Lichter, P. 1998. Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. *Chromosome.Res.* 6: 13-24.
- Brockhaus, M., Schoenfeld, H. J., Schlaeger, E. J., Hunziker, W., Lesslauer, W. & Loetscher, H. 1990. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87: 3127-3131.
- Cameron, J. L., Crist, D. W., Sitzmann, J. V., Hruban, R. H., Boitnott, J. K., Seidler, A. J. & Coleman, J. 1991. Factors influencing survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. *Am.J.Surg.* 161: 120-124.
- Capecchi, M.R., The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 1989 Mar;5(3):70-6.
- Casey, R. C., Koch, K. A., Oegema, T. R., Jr., Skubitz, K. M., Pambuccian, S. E., Grindle, S. M. & Skubitz, A. P. 2003. Establishment of an in vitro assay to measure the invasion of ovarian carcinoma cells through mesothelial cell monolayers. *Clin.Exp.Metastasis* 20: 343-356.
- Cattoretti, G., Becker, M. H., Key, G., Duchrow, M., Schluter, C., Galle, J. & Gerdes, J. 1992. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J.Pathol.* 168: 357-363.
- Chen, L., Park, S. M., Tumanov, A. V., Hau, A., Sawada, K., Feig, C., Turner, J. R., Fu, Y. X., Romero, I. L., Lengyel, E. & Peter, M. E. 2010. CD95 promotes tumour growth. *Nature* 465: 492-496.
- Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., Horner, J. W., Cordon-Cardo, C., Yancopoulos, G. D. & DePinho, R. A. 1999. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400: 468-472.
- Chishima, T., Miyagi, Y., Wang, X., Baranov, E., Tan, Y., Shimada, H., Moossa, A. R. & Hoffman, R. M. 1997. Metastatic patterns of lung cancer visualized live and in process by green fluorescence protein expression. *Clin.Exp.Metastasis* 15: 547-552.
- Chosia, M., Gaulier, A. & Marsan, C. 1989. [Initial immunolabelling in the diagnosis of solid tumors undergoing cytologic studies (cytopuncture and imprints)]. *Arch.Anat.Cytol.Pathol.* 37: 99-108.
- Cowey, S., Szafran, A. A., Kappes, J., Zinn, K. R., Siegal, G. P., Desmond, R. A., Kim, H., Evans, L. & Hardy, R. W. 2007. Breast cancer metastasis to bone: evaluation of bioluminescent imaging and microSPECT/CT for detecting bone metastasis in immunodeficient mice. *Clin.Exp.Metastasis* 24: 389-401.
- Custer, R. P., Bosma, G. C. & Bosma, M. J. 1985. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. *Am.J.Pathol.* 120: 464-477.
- Dahme, E., Weiss, E., 2007. Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der

Haustiere. *Enke Verlag, 6. Auflage.* ISBN-10: 3830410484

Decaudin, D., Beurdeley-Thomas, A., Nemati, F., Miccoli, L., Pouillart, P., Bourgeois, Y., Goncalves, R. B., Rouillard, D. & Poupon, M. F. 2001. Distinct experimental efficacy of anti-Fas/APO-1/CD95 receptor antibody in human tumors. *Exp.Cell Res.* 268: 162-168.

Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y. & Wu, X. 2003. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 115: 61-70.

Dexter, D. L., Diamond, M., Creveling, J. & Chen, S. F. 1993. Chemotherapy of mammary carcinomas arising in ras transgenic mice. *Invest New Drugs* 11: 161-168.

Dhein, J., Daniel, P. T., Trauth, B. C., Oehm, A., Moller, P. & Krammer, P. H. 1992. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J.Immunol.* 149: 3166-3173.

Dinca, E. B., Sarkaria, J. N., Schroeder, M. A., Carlson, B. L., Voicu, R., Gupta, N., Berger, M. S. & James, C. D. 2007. Bioluminescence monitoring of intracranial glioblastoma xenograft: response to primary and salvage temozolomide therapy. *J.Neurosurg.* 107: 610-616.

Drew, R. T., Boorman, G. A., Haseman, J. K., McConnell, E. E., Busey, W. M. & Moore, J. A. 1983. The effect of age and exposure duration on cancer induction by a known carcinogen in rats, mice, and hamsters. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 68: 120-130.

Dobrovina M, Serganova I, Mayer-Kuckuk P, Ponomarev V, Blasberg RG. 2004. Multimodality in vivo molecular genetic imaging. *Bioconjug Chem* 15(6):1376-88.

Dudley, E., Hornung, F., Zheng, L., Scherer, D., Ballard, D. & Lenardo, M. 1999. NF-kappaB regulates Fas/APO-1/. *Eur.J.Immunol.* 29: 878-886.

Earnshaw, W. C., Martins, L. M. & Kaufmann, S. H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* 68: 383-424.

Edinger, M., Cao, Y. A., Hornig, Y. S., Jenkins, D. E., Verneris, M. R., Bachmann, M. H., Negrin, R. S. & Contag, C. H. 2002. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur.J.Cancer* 38: 2128-2136.

Edinger, M., Cao, Y. A., Verneris, M. R., Bachmann, M. H., Contag, C. H. & Negrin, R. S. 2003. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* 101: 640-648.

Egami, H., Tomioka, T., Tempero, M., Kay, D. & Pour, P. M. 1991. Development of intrapancreatic transplantable model of pancreatic duct adenocarcinoma in Syrian golden hamsters. *Am.J.Pathol.* 138: 557-561.

Egberts, J. H., Cloosters, V., Noack, A., Schniewind, B., Thon, L., Klose, S., Kettler, B., von Forstner, C., Kneitz, C., Tepel, J., Adam, D., Wajant, H., Kalthoff, H. &

Trauzold, A. 2008. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 68: 1443-1450.

Egberts, J. H., Schniewind, B., Sipos, B., Hinz, S., Kalthoff, H. & Tepel, J. 2007. Superiority of extended neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine in pancreatic cancer: a comparative analysis in a clinically adapted orthotopic xenotransplantation model in SCID beige mice. *Cancer Biol. Ther.* 6: 1227-1232.

Emmerich, K. H. & Norpoth, K. 1981. Malignant tumors after chronic exposure to vinyl chloride. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* 102: 1-11.

Ewald, D., Li, M., Efrat, S., Auer, G., Wall, R. J., Furth, P. A. & Hennighausen, L. 1996. Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen. *Science* 273: 1384-1386.

Federspiel, M. J., Swing, D. A., Eagleson, B., Reid, S. W. & Hughes, S. H. 1996. Expression of transduced genes in mice generated by infecting blastocysts with avian leukosis virus-based retroviral vectors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 4931-4936.

Feldmann, G., Mishra, A., Bisht, S., Karikari, C., Garrido-Laguna, I., Rasheed, Z., Ottenhof, N. A., Dadon, T., Alvarez, H., Fendrich, V., Rajeshkumar, N. V., Matsui, W., Brossart, P., Hidalgo, M., Bannerji, R., Maitra, A. & Nelkin, B. D. 2011. Cyclin-dependent kinase inhibitor Dinaciclib (SCH727965) inhibits pancreatic cancer growth and progression in murine xenograft models. *Cancer Biol. Ther.* 12: 598-609.

Fidler, I. J. 1995. Critical factors in the biology of human cancer metastasis. *Am.Surg.* 61: 1065-1066.

Fidler, I. J. & Hart, I. R. 1982. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 217: 998-1003.

Fiebig, H. H., Maier, A. & Burger, A. M. 2004. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. *Eur.J.Cancer* 40: 802-820.

Firestein, G. S., Echeverri, F., Yeo, M., Zvaifler, N. J. & Green, D. R. 1997. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 10895-10900.

Fisher, G. H., Orsulic, S., Holland, E., Hively, W. P., Li, Y., Lewis, B. C., Williams, B. O. & Varmus, H. E. 1999. Development of a flexible and specific gene delivery system for production of murine tumor models. *Oncogene* 18: 5253-5260.

Fleming, J. B. & Brekken, R. A. 2003. Functional imaging of angiogenesis in an orthotopic model of pancreatic cancer. *J.Cell Biochem.* 90: 492-501.

Fortin, M., Lepine, M., Page, M., Osteen, K., Massie, B., Hugo, P. & Steff, A. M. 2003. An improved mouse model for endometriosis allows noninvasive assessment of lesion implantation and development. *Fertil.Steril.* 80 Suppl 2: 832-838.

Fortin, M., Lepine, M., Merlen, Y., Thibeault, I., Rancourt, C., Gosselin, D., Hugo, P. &

Steff, A. M. 2004. Quantitative assessment of human endometriotic tissue maintenance and regression in a noninvasive mouse model of endometriosis. *Mol. Ther.* 9: 540-547.

Friesen, C., Fulda, S. & Debatin, K. M. 1999. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia* 13: 1854-1858.

Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H. & Debatin, K. M. 1996. Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat. Med.* 2: 574-577.

Fukushima, S., Ito, N., el Bolkainy, M. N., Tawfik, H. N., Tatemoto, Y. & Mori, M. 1987. Immunohistochemical observations of keratins, involucrin, and epithelial membrane antigen in urinary bladder carcinomas from patients infected with *Schistosoma haematobium*. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 411: 103-115.

Furukawa, K., Ohashi, T., Haruki, K., Fujiwara, Y., Iida, T., Shiba, H., Uwagawa, T., Kobayashi, H. & Yanaga, K. 2011. Combination treatment using adenovirus vector-mediated tumor necrosis factor-alpha gene transfer and a NF-kappaB inhibitor for pancreatic cancer in mice. *Cancer Lett.* 306: 92-98.

Garrido-Laguna, I., Uson, M., Rajeshkumar, N. V., Tan, A. C., de Oliveira, E., Karikari, C., Villaroel, M. C., Salomon, A., Taylor, G., Sharma, R., Hruban, R. H., Maitra, A., Laheru, D., Rubio-Viqueira, B., Jimeno, A. & Hidalgo, M. 2011. Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 17: 5793-5800.

Gerdes, J., Becker, M. H., Key, G. & Cattoretti, G. 1992. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J. Pathol.* 168: 85-86.

Giovanella B. C. 1972. Development of invasive tumors in the nude mouse after injection of cultured human melanoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 48/1972, 1531-33.

Giovannini, M., Robanus-Maandag, E., van, d., V, Niwa-Kawakita, M., Abramowski, V., Goutebroze, L., Woodruff, J. M., Berns, A. & Thomas, G. 2000. Conditional biallelic Nf2 mutation in the mouse promotes manifestations of human neurofibromatosis type 2. *Genes Dev.* 14: 1617-1630.

Goldbrunner, R. H., Wagner, S., Roosen, K. & Tonn, J. C. 2000. Models for assessment of angiogenesis in gliomas. *J. Neurooncol.* 50: 53-62.

Gossen, M. & Bujard, H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89: 5547-5551.

Graham, K. C., Wirtzfeld, L. A., MacKenzie, L. T., Postenka, C. O., Groom, A. C., MacDonald, I. C., Fenster, A., Lacefield, J. C. & Chambers, A. F. 2005. Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of liver

metastases in preclinical models. *Cancer Res.* 65: 5231-5237.

Graw, J., 2007. Nobelpreis 2007 in Medizin: Herstellung von knockout-Mäusen. *Biologie in unserer Zeit.* 6/2007/37 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. & Harris, C. C. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855-4878.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83: 793-802.

Grippo, P. J., Nowlin, P. S., Demeure, M. J., Longnecker, D. S. & Sandgren, E. P. 2003. Preinvasive pancreatic neoplasia of ductal phenotype induced by acinar cell targeting of mutant Kras in transgenic mice. *Cancer Res.* 63: 2016-2019.

Gross, A., McDonnell, J. M. & Korsmeyer, S. J. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13: 1899-1911.

Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Canamero, M., Grippo, P. J., Verdaguer, L., Perez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E. P. & Barbacid, M. 2007. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11: 291-302.

Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J. & Tschopp, J. 1996. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274: 1363-1366.

Hall, P. A. & Lemoine, N. R. 1993. Models of pancreatic cancer. *Cancer Surv.* 16: 135-155.

Hann, B. & Balmain, A. 2001. Building 'validated' mouse models of human cancer. *Curr.Opin.Cell Biol.* 13: 778-784.

Harms, J. F. & Welch, D. R. 2003. MDA-MB-435 human breast carcinoma metastasis to bone. *Clin.Exp.Metastasis* 20: 327-334.

Harris, J. E., Jr., Shin, J., Lee, B., Pelosky, K., Hooker, C. M., Harbom, K., Hulbert, A., Zahnow, C., Yang, S. C., Baylin, S., Brayton, C. & Brock, M. V. 2011. A murine xenograft model of spontaneous metastases of human lung adenocarcinoma. *J.Surg.Res.* 171: e75-e79.

Haseloff, J. 1999. GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Methods Cell Biol.* 58: 139-151.

Hastings Wilson, T. & Wilson, D.M. 1998. Evidence for a close association between helix IV and helix XI in the melibiose carrier of Escherichia coli. *Biochim Biophys Acta* 1374(1-2):77-82.

Henne-Bruns, D., Vogel, I., Luttges, J., Kloppel, G. & Kremer, B. 1998. Ductal adenocarcinoma of the pancreas head: survival after regional versus extended lymphadenectomy. *Hepatogastroenterology* 45: 855-866.

Herreros-Villanueva, M., Hijona, E., Cosme, A. & Bujanda, L. 2012. Mouse models of pancreatic cancer. *World J.Gastroenterol.* 18: 1286-1294.

Hidalgo, M. 2010. Pancreatic cancer. *N.Engl.J.Med.* 362: 1605-1617.

Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. & Osawa, T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J.Immunol.* 144: 1425-1431.

Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M. A., Ross, S., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Hitt, B. A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L. A., Crawford, H. C., Putt, M. E., Jacks, T., Wright, C. V., Hruban, R. H., Lowy, A. M. & Tuveson, D. A. 2003 (1). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4: 437-450.

Hingorani, S. R., Petricoin, E. F., Maitra, A. 2003 (2). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4(6):437-450.

Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H. & Ungefroren, H. 2000. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against. *Oncogene* 19: 5477-5486.

Hiramoto, K., Inui, M., Kamei, T., Okumura, K., Nakase, M. & Tagawa, T. 2006. mHFE7A, a newly identified monoclonal antibody to Fas, induces apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays the growth of melanoma xenotransplants. *Oncol.Rep.* 15: 409-415.

Hirata, T., Osuga, Y., Yoshino, O., Hirota, Y., Harada, M., Takemura, Y., Morimoto, C., Koga, K., Yano, T., Tsutsumi, O. & Taketani, Y. 2005. Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein. *Hum.Reprod.* 20: 2092-2096.

Hoffman, R. M. 1999. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs* 17: 343-359.

<http://www.de.wikipedia.org/wiki/Luciferin>

<http://www.de.wikipedia.org/wiki/Lumineszenz>

<http://www.enzyklo.de/Begriff/Luciferase>

[http://www.ihcworld.com/\\_protocols/special\\_stains/h&e\\_ellis.htm](http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/h&e_ellis.htm)

<http://www.pankreaszentrum.de/de/therapien.html#exokriner>

Husmann, G., Kaatsch, P., Katalinic A., Bertz, J., Haberland, J., Kraywinkel, K. 2010. Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut, 7.

*Ausgabe* Berlin

Huynh, A.S., Abrahams, D.F., Torres, M.S., Baldwin, M.K., Gillies, R.J., Morse, D.L. 2011. Development of an orthotopic human pancreatic cancer xenograft model using ultrasound guided injection of cells. *PLoS One* 6(5): 20330.

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. & Tschopp, J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388: 190-195.

Itoh, N. & Nagata, S. 1993. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J.Biol.Chem.* 268: 10932-10937.

Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. & Nagata, S. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233-243.

Izeradjene, K. & Hingorani, S. R. 2007. Targets, trials, and travails in pancreas cancer. *J.Natl.Compr.Canc.Netw.* 5: 1042-1053.

Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T. & Weinberg, R. A. 1994. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr.Biol.* 4: 1-7.

Jacquet, P., Stuart, O. A., Dalton, R., Chang, D. & Sugarbaker, P. H. 1996. Effect of intraperitoneal chemotherapy and fibrinolytic therapy on tumor implantation in wound sites. *J.Surg.Oncol.* 62: 128-134.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. & Thun, M. J. 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J.Clin.* 58: 71-96.

Jenkins, D. E., Oei, Y., Hornig, Y. S., Yu, S. F., Dusich, J., Purchio, T. & Contag, P. R. 2003 (1). Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis. *Clin.Exp.Metastasis* 20: 733-744.

Jenkins, D. E., Yu, S. F., Hornig, Y. S., Purchio, T. & Contag, P. R. 2003 (2). In vivo monitoring of tumor relapse and metastasis using bioluminescent PC-3M-luc-C6 cells in murine models of human prostate cancer. *Clin.Exp.Metastasis* 20: 745-756.

Jonkers, J. & Berns, A. 2002. Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat.Rev.Cancer* 2: 251-265.

Juhl, H., Sievers, M., Baltzer, K., Helmig, F., Wolf, H., Brenner, W. & Kalthoff, H. 1995. A monoclonal antibody-cobra venom factor conjugate increases the tumor-specific uptake of a 99mTc-labeled anti-carcinoembryonic antigen antibody by a two-step approach. *Cancer Res.* 55: 5749s-5755s.

Kalthoff, H., Schmiegel, W., Roeder, C., Kasche, D., Schmidt, A., Lauer, G., Thiele, H. G., Honold, G., Pantel, K., Riethmuller, G. & . 1993. p53 and K-RAS alterations in pancreatic epithelial cell lesions. *Oncogene* 8: 289-298.

- Kamei, T., Inui, M., Nakase, M., Nakamura, S., Okumura, K., Hiramoto, K. & Tagawa, T. 2005. Experimental therapy using interferon-gamma and anti-Fas antibody against oral malignant melanoma cells. *Melanoma Res.* 15: 393-400.
- Kapischke, M., Fischer, T., Tiessen, K., Tschesche, H., Bruch, H. P., Kalthoff, H. & Kruse, M. L. 2008. Characterisation of a novel matrix metalloproteinase inhibitor on pancreatic adenocarcinoma cells in vitro and in an orthotopic pancreatic cancer model in vivo. *Int.J.Oncol.* 32: 273-282.
- Kapischke, M., Prinz, K., Tepel, J., Tensfeldt, J. & Schulz, T. 2005. Precoating of alloplastic materials with living human fibroblasts--a feasibility study. *Surg.Endosc.* 19: 791-797.
- Kaplan, R. N., Riba, R. D., Zacharoulis, S., Bramley, A. H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D. D., Jin, D. K., Shido, K., Kerns, S. A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J. L., Altorki, N., Port, E. R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K. K., Rafii, S. & Lyden, D. 2005. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438: 820-827.
- Kästner, F. Ed. 2004. Crashkurs Innere Medizin, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Kayagaki, N., Kawasaki, A., Ebata, T., Ohmoto, H., Ikeda, S., Inoue, S., Yoshino, K., Okumura, K. & Yagita, H. 1995. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J.Exp.Med.* 182: 1777-1783.
- Kelland, L. R. 2004. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur.J.Cancer* 40: 827-836.
- Kessler, M., Tumorerkrankungen. 2005. Handbuch der Kleintieronkologie. Parey Verlag, Berlin/Wien. (2. Auflage), ISBN 3830441037.
- Killion, J.J., Radinsky, R., Fidler, I.J. 1998. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 17: 279-284.
- Kim, K.H., Rheinwald, J. G., Fuchs E. V. 1983. Tissue specificity of epithelial keratins: differential expression of mRNAs from two multigene families. *Mol Cell Biol.* 3(4):495-502.
- Kleber, S., Sancho-Martinez, I., Wiestler, B., Beisel, A., Gieffers, C., Hill, O., Thiemann, M., Mueller, W., Sykora, J., Kuhn, A., Schreglmann, N., Letellier, E., Zuliani, C., Klussmann, S., Teodorczyk, M., Grone, H. J., Ganten, T. M., Sultmann, H., Tüttenberg, J., von Deimling, A., Regnier-Vigouroux, A., Herold-Mende, C. & Martin-Villalba, A. 2008. Yes and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* 13: 235-248.
- Kobayashi, H., Saga, T., Kawamoto, S., Sato, N., Hiraga, A., Ishimori, T., Konishi, J., Togashi, K. & Brechbiel, M. W. 2001. Dynamic micro-magnetic resonance imaging of liver micrometastasis in mice with a novel liver macromolecular magnetic resonance contrast agent DAB-Am64-(1B4M-Gd)(64). *Cancer Res.* 61: 4966-4970.

- Korc, M. 2007. Pancreatic cancer-associated stroma production. *Am.J.Surg.* 194: S84-S86.
- Krammer, P. H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789-795.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. & Lu, S. D. 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53: 45-53.
- Kuraishy, A., Karin, M. & Grivennikov, S. I. 2011. Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation. *Immunity*. 35: 467-477.
- Lavrik, I. N., Golks, A., Riess, D., Bentele, M., Eils, R. & Krammer, P. H. 2007. Analysis of CD95 threshold signaling: triggering of CD95 (FAS/APO-1) at low concentrations primarily results in survival signaling. *J.Biol.Chem.* 282: 13664-13671.
- Lee, H. O. & Ferguson, T. A. 2003. Biology of FasL. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 325-335.
- Lelekakis, M., Moseley, J. M., Martin, T. J., Hards, D., Williams, E., Ho, P., Lowen, D., Javni, J., Miller, F. R., Slavin, J. & Anderson, R. L. 1999. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin.Exp.Metastasis* 17: 163-170.
- Lembert, N. 1996. Firefly luciferase can use L-luciferin to produce light. *Biochem.J.* 317 ( Pt 1): 273-277.
- Leverkus, M., Walczak, H., McLellan, A., Fries, H. W., Terbeck, G., Brocker, E. B. & Kampgen, E. 2000. Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood* 96: 2628-2631.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. & Yuan, J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501.
- Li, S., Pei, Y. Q., Du, F. T., Zhuang, G. Y., Li, C. Y., Song, Q. H., Ding, W. & Wang, J. L. 2002. Surgical treatment for uncinat process carcinoma of the pancreas. *Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int.* 1: 592-594.
- Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M. & Todaro, G. 1975. Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int.J.Cancer* 15: 741-747.
- Lillemoe, K. D. 1995. Current management of pancreatic carcinoma. *Ann.Surg.* 221: 133-148.
- Lin, A. & Karin, M. 2003. NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin.Cancer Biol.* 13: 107-114.
- Lipsky, M. M., Hinton, D. E., Klaunig, J. E. & Trump, B. F. 1981. Biology of hepatocellular neoplasia in the mouse. I. Histogenesis of safrole-induced hepatocellular carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.* 67: 365-376.

- Liu, J., Costello, P. C., Pham, N. A., Pintillie, M., Jabali, M., Sanghera, J., Tsao, M. S. & Johnston, M. R. 2006. Integrin-linked kinase inhibitor KP-392 demonstrates clinical benefits in an orthotopic human non-small cell lung cancer model. *J.Thorac.Oncol.* 1: 771-779.
- Locksley, R. M., Killeen, N. & Lenardo, M. J. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487-501.
- Löhr, J. M., Heinemann, V., Friess, H. Ed. 2008. Pankreaskarzinom. Bremen, Uni-Med Verlag.
- Los, M., Wesselborg, S. & Schulze-Osthoff, K. 1999. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity.* 10: 629-639.
- Loukopoulos, P., Kanetaka, K., Takamura, M., Shibata, T., Sakamoto, M. & Hirohashi, S. 2004. Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas* 29: 193-203.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-490.
- Lyons, S. K. 2005. Advances in imaging mouse tumour models in vivo. *J.Pathol.* 205: 194-205.
- Lyshchik, A., Hobbs, S. B., Fleischer, A. C., Khabele, D., Son, D. S., Gore, J. C. & Price, R. R. 2007. Ovarian volume measurements in mice with high-resolution ultrasonography. *J.Ultrasound Med.* 26: 1419-1425.
- Magistrelli, P., Antinori, A., Crucitti, A., La Greca, A., Masetti, R., Coppola, R., Nuzzo, G. & Picciocchi, A. 2000. Prognostic factors after surgical resection for pancreatic carcinoma. *J.Surg.Oncol.* 74: 36-40.
- Mai, W., Barraud, L., Lefrancois, L., Scoazec, J. Y., Guerret, S., Vray, D., Merle, P., Vitvitski-Trepo, L., Trepo, C. & Janier, M. F. 2004. Ultrasound detection of spontaneous hepato-cellular carcinomas in X/myc bitransgenic mice. *Liver Int.* 24: 651-657.
- Maier, H. J., Schmidt-Strassburger, U., Huber, M. A., Wiedemann, E. M., Beug, H. & Wirth, T. 2010. NF-kappaB promotes epithelial-mesenchymal transition, migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett.* 295: 214-228.
- Malakoff, D. 2000. Laboratory animals. Researchers fight plan to regulate mice, birds. *Science* 290: 23.
- Mariani, S. M., Matiba, B., Baumler, C. & Krammer, P. H. 1995. Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases. *Eur.J.Immunol.* 25: 2303-2307.

Mason, D. Y. & Sammons, R. 1978. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J.Clin.Pathol.* 31: 454-460.

Masumori, N., Thomas, T. Z., Chaurand, P., Case, T., Paul, M., Kasper, S., Caprioli, R. M., Tsukamoto, T., Shappell, S. B. & Matusik, R. J. 2001. A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential. *Cancer Res.* 61: 2239-2249.

Matsumoto, K., Schleimer, R. P., Saito, H., Iikura, Y. & Bochner, B. S. 1995. Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro. *Blood* 86: 1437-1443.

Matsumoto, N., Imamura, R. & Suda, T. 2007. Caspase-8- and JNK-dependent AP-1 activation is required for Fas ligand-induced IL-8 production. *FEBS J.* 274: 2376-2384.

Meuwissen, R., Linn, S. C., Linnoila, R. I., Zevenhoven, J., Mooi, W. J. & Berns, A. 2003. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell* 4: 181-189.

Meuwissen, R., Linn, S. C., van, d., V, Mooi, W. J. & Berns, A. 2001. Mouse model for lung tumorigenesis through Cre/lox controlled sporadic activation of the K-Ras oncogene. *Oncogene* 20: 6551-6558.

Miwa, K., Asano, M., Horai, R., Iwakura, Y., Nagata, S. & Suda, T. 1998. Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat.Med.* 4: 1287-1292.

Moore, P. S., Sipos, B., Orlandini, S., Sorio, C., Real, F. X., Lemoine, N. R., Gress, T., Bassi, C., Kloppel, G., Kalthoff, H., Ungefroren, H., Lohr, M. & Scarpa, A. 2001. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch.* 439: 798-802.

Mohammad R. M., Dugan, M.C., Mohamed, A. N., Almatchy, V. P., Flake, T. M., Dergham, S. T., Shields, A. F., Al-Kätib, A.A., Vaitkevicius, V. K., Sarkar, F. H. 1998 Establishment of a human pancreatic tumor xenograft model: potential application for preclinical evaluation of novel therapeutic agents. *Pancreas* 16(1):19-25.

Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., Krepler, R. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31(1):11-24.

Muerkoster, S., Arlt, A., Witt, M., Gehrz, A., Haye, S., March, C., Grohmann, F., Wegehenkel, K., Kalthoff, H., Folsch, U. R. & Schafer, H. 2003. Usage of the NF-kappaB inhibitor sulfasalazine as sensitizing agent in combined chemotherapy of pancreatic cancer. *Int.J.Cancer* 104: 469-476.

Muerkoster, S., Wegehenkel, K., Arlt, A., Witt, M., Sipos, B., Kruse, M. L., Sebens, T., Kloppel, G., Kalthoff, H., Folsch, U. R. & Schafer, H. 2004. Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta. *Cancer Res.* 64:

1331-1337.

Mukherjee, P., Ginardi, A. R., Madsen, C. S., Sterner, C. J., Adriance, M. C., Tevethia, M. J. & Gendler, S. J. 2000. Mice with spontaneous pancreatic cancer naturally develop MUC-1-specific CTLs that eradicate tumors when adoptively transferred. *J.Immunol.* 165: 3451-3460.

Murr, M. M., Sarr, M. G., Oishi, A. J. & van Heerden, J. A. 1994. Pancreatic cancer. *CA Cancer J.Clin.* 44: 304-318.

Murugesan, S. R., King, C. R., Osborn, R., Fairweather, W. R., O'Reilly, E. M., Thornton, M. O. & Wei, L. L. 2009. Combination of human tumor necrosis factor-alpha (hTNF-alpha) gene delivery with gemcitabine is effective in models of pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther.* 16: 841-847.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J.Biol.Chem.* 273: 2926-2930.

Nagata, S. 1997. [Apoptosis mediated by Fas and its related diseases]. *Nihon Ika Daigaku Zasshi* 64: 459-462.

Nagata, S. & Golstein, P. 1995. The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456.

Neff, B. A., Voss, S. G., Allen, C., Schroeder, M. A., Driscoll, C. L., Link, M. J., Galanis, E. & Sarkaria, J. N. 2009. Bioluminescent imaging of intracranial vestibular schwannoma xenografts in NOD/SCID mice. *Otol.Neurotol.* 30: 105-111.

Nelson, R. W., Couto C. G., Innere Medizin der Kleintiere. 2010, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 2

Neufert, C., Becker, C., Neurath, M.F. 2007. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc.* 2(8):1998-2004

Nogawa, M., Yuasa, T., Kimura, S., Kuroda, J., Sato, K., Segawa, H., Yokota, A. & Maekawa, T. 2005. Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models. *Cancer Lett.* 217: 243-253.

O'Connell, J., Bennett, M. W., O'Sullivan, G. C., O'Callaghan, J., Collins, J. K. & Shanahan, F. 1999. Expression of Fas (CD95/APO-1) ligand by human breast cancers: significance for tumor immune privilege. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 6: 457-463.

O'Neill, K., Lyons, S. K., Gallagher, W. M., Curran, K. M. & Byrne, A. T. 2010. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research. *J.Pathol.* 220: 317-327.

Olive, P. & Tuveson, D. A. 2006. The Use of Targeted Mouse Models for Preclinical Testing of Novel Cancer Therapeutics. *Clin Cancer Res:* 5277

Ostrand-Rosenberg, S. 2004. Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. *Curr.Opin.Immunol.* 16: 143-150.

Ovejera, A.A. & Houchens, D.P., 1981. Human tumor xenografts in athymic nude mice as a preclinical screen for anticancer agents. *Semin Oncol.* 8 (4): 386-93.

Owen-Schaub, L., Chan, H., Cusack, J. C., Roth, J. & Hill, L. L. 2000. Fas and Fas ligand interactions in malignant disease. *Int.J.Oncol.* 17: 5-12.

Paik, P. S., Misawa, T., Chiang, M., Towson, J., Im, S., Ortega, A. & Beart, R. W., Jr. 1998. Abdominal incision tumor implantation following pneumoperitoneum laparoscopic procedure vs. standard open incision in a syngeneic rat model. *Dis.Colon Rectum* 41: 419-422.

Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G. & Evan, G. 1999. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol.Cell* 3: 565-577.

Peter, M. E. & Krammer, P. H. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death.Differ.* 10: 26-35.

Peter, M. E., Budd, R. C., Desbarats, J., Hedrick, S. M., Hueber, A. O., Newell, M. K., Owen, L. B., Pope, R. M., Tschopp, J., Wajant, H., Wallach, D., Witrout, R. H., Zornig, M. & Lynch, D. H. 2007. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell* 129: 447-450.

Ponton, A., Clement, M. V. & Stamenkovic, I. 1996. The CD95 (APO-1/Fas) receptor activates NF-kappaB independently of its cytotoxic function. *J.Biol.Chem.* 271: 8991-8995.

Pour, P. M., Runge, R. G., Birt, D., Gingell, R., Lawson, T., Nagel, D., Wallcave, L. & Salmasi, S. Z. 1981. Current knowledge of pancreatic carcinogenesis in the hamster and its relevance to the human disease. *Cancer* 47: 1573-1589.

Raa, S. T., Oosterling, S. J., van der Kaaij, N. P., van den Tol, M. P., Beelen, R. H., Meijer, S., van Eijck, C. H., van, d. S., Jr., van Egmond, M. & Jeekel, J. 2005. Surgery promotes implantation of disseminated tumor cells, but does not increase growth of tumor cell clusters. *J.Surg.Oncol.* 92: 124-129.

Rachagani, S., Torres, M. P., Kumar, S., Haridas, D., Baine, M., Macha, M. A., Kaur, S., Ponnusamy, M. P., Dey, P., Seshacharyulu, P., Johansson, S. L., Jain, M., Wagner, K. U. & Batra, S. K. 2012. Mucin (Muc) expression during pancreatic cancer progression in spontaneous mouse model: potential implications for diagnosis and therapy. *J.Hematol.Oncol.* 5: 68.

Ramp, U., Dejosez, M., Mahotka, C., Czarnotta, B., Kalinski, T., Wenzel, M., Lorenz, I., Muller, M., Krammer, P., Gabbert, H. E. & Gerharz, C. D. 2000. Deficient activation of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: a potential factor of multidrug resistance in human renal cell carcinoma. *Br.J.Cancer* 82: 1851-1859.

Ravi, R., Bedi, A., Fuchs, E. J. & Bedi, A. 1998. CD95 (Fas)-induced caspase-

mediated proteolysis of NF-kappaB. *Cancer Res.* 58: 882-886.

Rayet, B. & Gelinas, C. 1999. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18: 6938-6947.

Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M. & Matsuyama, S. 1998. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta* 1366: 127-137.

Rehemtulla, A., Stegman, L. D., Cardozo, S. J., Gupta, S., Hall, D. E., Contag, C. H. & Ross, B. D. 2000. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia.* 2: 491-495.

Resor, L., Bowen, T. J. & Wynshaw-Boris, A. 2001. Unraveling human cancer in the mouse: recent refinements to modeling and analysis. *Hum.Mol.Genet.* 10: 669-675.

Rodicker, F. & Putzer, B. M. 2003. p73 is effective in p53-null pancreatic cancer cells resistant to wild-type TP53 gene replacement. *Cancer Res.* 63: 2737-2741.

Rogers, K. L., Stinnakre, J., Agulhon, C., Jublot, D., Shorte, S. L., Kremer, E. J. & Brulet, P. 2005. Visualization of local Ca<sup>2+</sup> dynamics with genetically encoded bioluminescent reporters. *Eur.J.Neurosci.* 21: 597-610.

Roth, W., Fontana, A., Trepel, M., Reed, J. C., Dichgans, J. & Weller, M. 1997. Immunochemotherapy of malignant glioma: synergistic activity of CD95 ligand and chemotherapeutics. *Cancer Immunol.Immunother.* 44: 55-63.

Rouvier, E., Luciani, M. F. & Golstein, P. 1993. Fas involvement in Ca(2+)-independent T cell-mediated cytotoxicity. *J.Exp.Med.* 177: 195-200.

Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S. A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S. N., Sohn, T. A., Hruban, R. H., Yeo, C. J. & Kern, S. E. 1997. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 57: 1731-1734.

Rygaard, J. 1969. Immunobiology of the mouse mutant "Nude". Preliminary investigations . *Acta Pathol Microbiol Scand* 77/1969: S. 761-2.

Rygaard, J. & Povlsen, C. O. 1969. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* 77: 758-760.

Rygaard, J. & Povlsen, C. O. 1971. Heterotransplantation of human adenocarcinoma of the colon and rectum to the mouse of the mutant nude. A study of nine consecutive transplantations. *Acta Pathol Microbiol Scand* 79/1971: S. 159-69.

Rygaard, J. & Povlsen, C. O. 2007. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "nude" mice. *APMIS* 115: 604-606.

Sandgren, E. P., Luetkeke, N. C., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. & Lee, D. C. 1990. Overexpression of TGF alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* 61: 1121-1135.

Sauer, B. 1998. Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14: 381-392.

Saur, D., Seidler, B., Schneider, G., Algül, H., Beck, R., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., Schmid, R.M. 2005. CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 129(4):1237-50.

Sausville, E. A. & Burger, A. M. 2006. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res.* 66: 3351-4, discussion.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H. & Peter, M. E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17: 1675-1687.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H. & Peter, M. E. 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J.Biol.Chem.* 274: 22532-22538.

Scallon, B., Cai, A., Solowski, N., Rosenberg, A., Song, X. Y., Shealy, D. & Wagner, C. 2002. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 301: 418-426.

Scatena, C. D., Hepner, M. A., Oei, Y. A., Dusich, J. M., Yu, S. F., Purchio, T., Contag, P. R. & Jenkins, D. E. 2004. Imaging of bioluminescent LNCaP-luc-M6 tumors: a new animal model for the study of metastatic human prostate cancer. *Prostate* 59: 292-303.

Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H. & . 1990. Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* 61: 361-370.

Schenkel, J. 2006. Transgene Tiere, 2. Aufl. ISBN-10: 354028267X

Schluter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M. H., Key, G., Flad, H. D. & Gerdes, J. 1993. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J.Cell Biol.* 123: 513-522.

Schneider, G., Siveke, J. T., Eckel, F. & Schmid, R. M. 2005. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology* 128: 1606-1625.

Schneider-Brachert, W., Heigl, U. & Ehrenschwender, M. 2013. Membrane trafficking of death receptors: implications on signalling. *Int.J.Mol.Sci.* 14: 14475-14503.

Scholz, C. C., Berger, D. P., Winterhalter, B. R., Henss, H. & Fiebig, H. H. 1990. Correlation of drug response in patients and in the clonogenic assay with solid human tumour xenografts. *Eur.J.Cancer* 26: 901-905.

Scholzen, T. & Gerdes, J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J.Cell Physiol* 182: 311-322.

Serkova, N. J., Garg, K. & Bradshaw-Pierce, E. L. 2009. Oncologic imaging endpoints for the assessment of therapy response. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 4: 36-53.

Shibata, H., Toyama, K., Shioya, H., Ito, M., Hirota, M., Hasegawa, S., Matsumoto, H., Takano, H., Akiyama, T., Toyoshima, K., Kanamaru, R., Kanegae, Y., Saito, I., Nakamura, Y., Shiba, K. & Noda, T. 1997. Rapid colorectal adenoma formation initiated by conditional targeting of the Apc gene. *Science* 278: 120-123.

Shu, S. T., Nadella, M. V., Dirksen, W. P., Fernandez, S. A., Thudi, N. K., Werbeck, J. L., Lairmore, M. D. & Rosol, T. J. 2007. A novel bioluminescent mouse model and effective therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Res.* 67: 11859-11866.

Sia, C. & Hanninen, A. 2006. Apoptosis in autoimmune diabetes: the fate of beta-cells in the cleft between life and death. *Rev.Diabet.Stud.* 3: 39-46.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. 2015. Cancer statistics, 2015: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J.Clin.* 65 (1): 5-29.

Sipos, B., Moser, S., Kalthoff, H., Torok, V., Lohr, M. & Kloppel, G. 2003. A comprehensive characterization of pancreatic ductal carcinoma cell lines: towards the establishment of an in vitro research platform. *Virchows Arch.* 442: 444-452.

Slebos, R. J., Hoppin, J. A., Tolbert, P. E., Holly, E. A., Brock, J. W., Zhang, R. H., Bracci, P. M., Foley, J., Stockton, P., McGregor, L. M., Flake, G. P. & Taylor, J. A. 2000. K-ras and p53 in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 9: 1223-1232.

Smakman, N., Martens, A., Kranenburg, O. & Borel, R., I 2004. Validation of bioluminescence imaging of colorectal liver metastases in the mouse. *J.Surg.Res.* 122: 225-230.

Snyder, C. S., Kaushal, S., Kono, Y., Tran Cao, H. S., Hoffman, R. M. & Bouvet, M. 2009. Complementarity of ultrasound and fluorescence imaging in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *BMC.Cancer* 9: 106.

Sperti, C., Pasquali, C., Piccoli, A. & Pedrazzoli, S. 1997. Recurrence after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *World J.Surg.* 21: 195-200.

Stanger, B. Z., Stiles, B., Lauwers, G. Y., Bardeesy, N., Mendoza, M., Wang, Y., Greenwood, A., Cheng, K. H., McLaughlin, M., Brown, D., Depinho, R. A., Wu, H., Melton, D. A. & Dor, Y. 2005. Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer Cell* 8: 185-195.

Staquet, M. J., Byar, D. P., Green, S. B. & Rozenzweig, M. 1985. Clinical predictivity of transplantable tumor systems in the selection of new drugs for solid tumors: reply to a commentary. *Cancer Treat.Rep.* 69: 1339-1340.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75: 1169-1178.

Sweeney, T.J., Mailänder, V., Tucker, A.A., Olomu, A.B., Zhang, W., Cao, Ya, Negrin,

R.S., Contag, C.H. 1999. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 12;96(21):12044-9.

Szentirmai, O., Baker, C. H., Lin, N., Szucs, S., Takahashi, M., Kiryu, S., Kung, A. L., Mulligan, R. C. & Carter, B. S. 2006. Noninvasive bioluminescence imaging of luciferase expressing intracranial U87 xenografts: correlation with magnetic resonance imaging determined tumor volume and longitudinal use in assessing tumor growth and antiangiogenic treatment effect. *Neurosurgery* 58: 365-372.

Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T. & Nagata, S. 1994. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 76: 969-976.

Talmadge, J. E., Donkor, M. & Scholar, E. 2007 (1). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev*. 26: 373-400.

Talmadge, J. E., Singh, R. K., Fidler, I. J. & Raz, A. 2007 (2). Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. *Am.J.Pathol.* 170: 793-804.

Tanaka, M., Itai, T., Adachi, M. & Nagata, S. 1998. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat.Med.* 4: 31-36.

Tanaka, M., Suda, T., Haze, K., Nakamura, N., Sato, K., Kimura, F., Motoyoshi, K., Mizuki, M., Tagawa, S., Ohga, S., Hatake, K., Drummond, A. H. & Nagata, S. 1996. Fas ligand in human serum. *Nat.Med.* 2: 317-322.

Tanaka, M., Suda, T., Takahashi, T. & Nagata, S. 1995. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J*. 14: 1129-1135.

Tang, P., Hung, M.-C. & Klostergaard, J. 1996. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 35: 8216-8225.

Tarone, R. E., Chu, K. C. & Ward, J. M. 1981. Variability in the rates of some common naturally occurring tumors in Fischer 344 rats and (C57BL/6N x C3H/HeN)F1 (B6C3F1) mice. *J.Natl.Cancer Inst.* 66: 1175-1181.

ten Kate, M., Hofland, L. J., van Grevenstein, W. M., van Koetsveld, P. V., Jeekel, J. & van Eijck, C. H. 2004. Influence of proinflammatory cytokines on the adhesion of human colon carcinoma cells to lung microvascular endothelium. *Int.J.Cancer* 112: 943-950.

Tepel, J., Kruse, M. L., Kapischke, M., Haye, S., Sipos, B., Kremer, B. & Kalthoff, H. 2006. Adjuvant treatment of pancreatic carcinoma in a clinically adapted mouse resection model. *Pancreatology*. 6: 240-247.

Tepel, J., Kruse, M. L., March, C., Fiedler, A., Kapischke, M., Ketterer, T., Sipos, B., Kremer, B. & Kalthoff, H. 2004. Terminally modified oligodeoxynucleotides directed against p53 in an orthotopic xenograft model: a novel adjuvant treatment strategy for pancreatic ductal carcinoma. *Pancreas* 28: 1-12.

Thomas, H. & Balkwill, F. 1995. Assessing new anti-tumour agents and strategies in oncogene transgenic mice. *Cancer Metastasis Rev.* 14: 91-95.

Tiffen, J. C., Bailey, C. G., Ng, C., Rasko, J. E. & Holst, J. 2010. Luciferase expression and bioluminescence does not affect tumor cell growth in vitro or in vivo. *Mol.Cancer* 9: 299.

Tilli, M. T., Parrish, A. R., Cotarla, I., Jones, L. P., Johnson, M. D. & Furth, P. A. 2008. Comparison of mouse mammary gland imaging techniques and applications: reflectance confocal microscopy, GFP imaging, and ultrasound. *BMC.Cancer* 8: 21.

Tiwari, S., Egberts, J.H., Korniienko, O., Köhler, L., Trauzold, A., Glüer, C.C., Kalthoff, H. 2011. Assessment of anti-inflammatory tumor treatment efficacy by longitudinal monitoring employing sonographic micro morphology in a preclinical mouse model. *BMC Med Imaging.* ;11:15. doi: 10.1186/1471-2342-11-15. PMID: 21699694

Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E. H., Salfeld, J. G. & Tak, P. P. 2008. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol.Ther.* 117: 244-279.

Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Möller, P., Falk, W., Debatin, K.M, Krammer, P.H. 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245(4915):301-5.

Trauzold, A., Roder, C., Sipos, B., Karsten, K., Arlt, A., Jiang, P., Martin-Subero, J. I., Siegmund, D., Muerkoster, S., Pagerols-Raluy, L., Siebert, R., Wajant, H. & Kalthoff, H. 2005. CD95 and TRAF2 promote invasiveness of pancreatic cancer cells. *FASEB J.* 19: 620-622.

Trauzold, A., Wermann, H., Arlt, A., Schutze, S., Schafer, H., Oestern, S., Roder, C., Ungefroren, H., Lampe, E., Heinrich, M., Walczak, H. & Kalthoff, H. 2001. CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene* 20: 4258-4269.

Tsutsui, H., Kayagaki, N., Kuida, K., Nakano, H., Hayashi, N., Takeda, K., Matsui, K., Kashiwamura, S., Hada, T., Akira, S., Yagita, H., Okamura, H. & Nakanishi, K. 1999. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity.* 11: 359-367.

Tuveson, D. A., Zhu, L., Gopinathan, A., Willis, N. A., Kachatrian, L., Grochow, R., Pin, C. L., Mitin, N. Y., Taparowsky, E. J., Gimotty, P. A., Hruban, R. H., Jacks, T. & Konieczny, S. F. 2006. Mist1-KrasG12D knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 66: 242-247.

Ungefroren, H., Voss, M., Jansen, M., Roeder, C., Henne-Bruns, D., Kremer, B. & Kalthoff, H. 1998. Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Cancer Res.* 58: 1741-1749.

Valcarcel, M., Mendoza, L., Hernandez, J. J., Carrascal, T., Salado, C., Crende, O. &

Vidal-Vanaclocha, F. 2011. Vascular endothelial growth factor regulates melanoma cell adhesion and growth in the bone marrow microenvironment via tumor cyclooxygenase-2. *J.Transl.Med.* 9: 142.

van der Loos, C. M. 2008. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging. *J.Histochem.Cytochem.* 56: 313-328.

van der Schelling, G. P. & Jeekel, J. 1999. Palliative chemotherapy and radiotherapy for pancreatic cancer: is it worthwhile? *World J.Surg.* 23: 950-953.

van Rossen, M. E., Hofland, L. J., van den Tol, M. P., van Koetsveld, P. M., Jeekel, J., Marquet, R. L. & van Eijck, C. H. 2001. Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumour cell adhesion to the peritoneum. *J.Pathol.* 193: 530-537.

Varney, M. L., Olsen, K. J., Mosley, R. L., Bucana, C. D., Talmadge, J. E. & Singh, R. K. 2002. Monocyte/macrophage recruitment, activation and differentiation modulate interleukin-8 production: a paracrine role of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis. *In Vivo* 16: 471-477.

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H. & Goggins, M. 2011. Pancreatic cancer. *Lancet* 378: 607-620.

Vooijs, M., Jonkers, J., Lyons, S. & Berns, A. 2002. Noninvasive imaging of spontaneous retinoblastoma pathway-dependent tumors in mice. *Cancer Res.* 62: 1862-1867.

Voskoglou-Nomikos, T., Pater, J.L., Seymour, L. 2003. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res.* 15;9(11):4227-39.

Wagner, Ch. & Müller, O. 2009. Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte. Thieme, Stuttgart; Auflage: 3. S: 348

Wagner, M., Greten, F. R., Weber, C. K., Koschnick, S., Mattfeldt, T., Deppert, W., Kern, H., Adler, G. & Schmid, R. M. 2001. A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease. *Genes Dev.* 15: 286-293.

Wagner, M., Luhrs, H., Kloppel, G., Adler, G. & Schmid, R. M. 1998. Malignant transformation of duct-like cells originating from acini in transforming growth factor transgenic mice. *Gastroenterology* 115: 1254-1262.

Wajant, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296: 1635-1636.

Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death.Differ.* 10: 45-65.

Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V. & Boldin, M. P. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms.

*Annu.Rev.Immunol.* 17: 331-367.

Wang, B., Shi, Q., Abbruzzese, J. L., Xiong, Q., Le, X. & Xie, K. 2001. A novel, clinically relevant animal model of metastatic pancreatic adenocarcinoma biology and therapy. *Int.J.Pancreatol.* 29: 37-46.

Wang, Y., Sun, Z., Peng, J. & Zhan, L. 2007. Bioluminescent imaging of hepatocellular carcinoma in live mice. *Biotechnol.Lett.* 29: 1665-1670.

Ward, J. M., Goodman, D. G., Squire, R. A., Chu, K. C. & Linhart, M. S. 1979. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging (C57BL/6N x C3H/HeN)F1 (B6C3F1) mice. *J.Natl.Cancer Inst.* 63: 849-854.

Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Nagata, S. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317.

Weber, S. M., Peterson, K. A., Durkee, B., Qi, C., Longino, M., Warner, T., Lee, F. T., Jr. & Weichert, J. P. 2004. Imaging of murine liver tumor using microCT with a hepatocyte-selective contrast agent: accuracy is dependent on adequate contrast enhancement. *J.Surg.Res.* 119: 41-45.

Weissleder, R., Mahmood, U. 2001. Die molekulare Bildgebung. *Radiology* 219 (2): 316-33.

Welsh, D.K., Kay, S.A. 2005. Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr Opin Biotechnol.* 16(1):73-8.

Wirtzfeld, L. A., Wu, G., Bygrave, M., Yamasaki, Y., Sakai, H., Moussa, M., Izawa, J. I., Downey, D. B., Greenberg, N. M., Fenster, A., Xuan, J. W. & Lacefield, J. C. 2005. A new three-dimensional ultrasound microimaging technology for preclinical studies using a transgenic prostate cancer mouse model. *Cancer Res.* 65: 6337-6345.

Wong, H. H. & Lemoine, N. R. 2008. Biological approaches to therapy of pancreatic cancer. *Pancreatology.* 8: 431-461.

Wu, C. C., Lin, E. H., Lee, Y. C., Tai, C. J., Kuo, T. H., Wang, H. E., Luo, T. Y., Fu, Y. K., Chen, H. J., Sun, M. D., Wu, C. H., Wu, C. W., Leu, S. J. & Deng, W. P. 2010. Identification of a new peptide for fibrosarcoma tumor targeting and imaging in vivo. *J.Biomed.Biotechnol.* 2010: 167045.

Wu, G., Wang, L., Yu, L., Wang, H. & Xuan, J. W. 2005. The use of three-dimensional ultrasound micro-imaging to monitor prostate tumor development in a transgenic prostate cancer mouse model. *Tohoku J.Exp.Med.* 207: 181-189.

Wu, X. & Pandolfi, P. P. 2001. Mouse models for multistep tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* 11: S2-S9.

Xu, X., Wagner, K. U., Larson, D., Weaver, Z., Li, C., Ried, T., Hennighausen, L., Wynshaw-Boris, A. & Deng, C. X. 1999. Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation.

*Nat.Genet.* 22: 37-43.

Yamaguchi, Y., Watanabe, H., Yrdiran, S., Ohtsubo, K., Motoo, Y., Okai, T. & Sawabu, N. 1999. Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with K-ras mutation. *Clin.Cancer Res.* 5: 1147-1153.

Yang, M., Baranov, E., Jiang, P., Sun, F. X., Li, X. M., Li, L., Hasegawa, S., Bouvet, M., Al Tuwaijri, M., Chishima, T., Shimada, H., Moossa, A. R., Penman, S. & Hoffman, R. M. 2000. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 1206-1211.

Yang, M., Baranov, E., Li, X. M., Wang, J. W., Jiang, P., Li, L., Moossa, A. R., Penman, S. & Hoffman, R. M. 2001. Whole-body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 2616-2621.

Yeo, T. P., Hruban, R. H., Leach, S. D., Wilentz, R. E., Sohn, T. A., Kern, S. E., Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Goggins, M., Canto, M. I., Abrams, R. A., Laheru, D., Jaffee, E. M., Hidalgo, M. & Yeo, C. J. 2002. Pancreatic cancer. *Curr.Probl.Cancer* 26: 176-275

Yuasa, T., Nogawa, M., Kimura, S., Yokota, A., Sato, K., Segawa, H., Kuroda, J. & Maekawa, T. 2005. A third-generation bisphosphonate, minodronic acid (YM529), augments the interferon alpha/beta-mediated inhibition of renal cell cancer cell growth both in vitro and in vivo. *Clin.Cancer Res.* 11: 853-859.

Zeamari, S., Rumping, G., Floom, B., Lyons, S., Stewart, F.A. 2004. In vivo bioluminescence imaging of locally disseminated colon carcinoma in rats. *Br J Cancer* 90(6):1259-64.

## Anhang

### Verzeichnis der Abbildungen

Abb.1: Ligand-Rezeptor-Bindung in Tumorzelle ... ..	15
Abb.2: Modell von zwei verschiedenen Signalwegen ... ..	17
Abb.3: Erzeugung von <i>knockout</i> -Mausmodell ... ..	22
Abb.4: Entstehung eines transgenen Tumormodells ... ..	24
Abb.5: Verwendete Zelllinien: PancTu1 <i>Luc</i> ; PancTu1 und Panc1 ... ..	37
Abb.6: Die Luciferasebewirkung von Sauerstoff das Leuchten von D-Luciferin ...	45
Abb.7: Umsetzung der Luciferine durch Luciferase unter Verbrauch von Sauerstoff ... ..	45
Abb.8: Lumineszenzmessung der Zellen <i>in situ</i> mittels der optischen Kammer ...	46
Abb.9: Die Entwicklung des Pankreastumors <i>in situ</i> ... ..	46
Abb.10: Unterschied bei sagittalen und transversalen Ultraschallaufnahmen einer Harnblase ... ..	47
Abb.11: Ultraschall-Imaging von VisualSonics Vevo <sup>®</sup> 770 Imaging System ... ..	48
Abb.12: Molekulare Struktur des sCD95Fc Fusionsproteines ... ..	62
Abb.13: Wirkung des humanen, löslichen Fusionsproteins sCD95Fc ... ..	63
Abb.14: Molekulare Struktur Infliximab (Remicade <sup>®</sup> )... ..	64
Abb.15: Schematische Abbildung behandelter Gruppen bei dem palliativen Therapieansatz im Pankreaskarzinommodell (PancTu1 <i>Luc</i> Zelllinie) ... ..	69
Abb.16: Schematische Abbildung behandelter Gruppen bei dem adjuvanten Therapieansatz im Pankreaskarzinommodell (PancTu1 <i>Luc</i> Zelllinie) ... ..	70
Abb.17: Schematische Abbildung behandelter Gruppen bei palliativem Therapieansatz im Pankreaskarzinommodell mit PancTu1 <i>Luc</i> , PancTu1 und Panc1 Zelllinien ... ..	71
Abb.18: Mittlere Helligkeit (Mean Grey) für jedes Messfeld über die ganze Behandlungszeit in den Gruppen bei palliativem Therapieansatz (PancTu1 <i>Luc</i> Zelllinie) ... ..	72
Abb.19: Mittlere Helligkeit (Mean Grey) für jedes Messfeld in den Gruppen bei	

dem palliativen Therapieansatz prozentual berechnet (PancTu1 <i>Luc</i> Zelllinie) ... .	73
Abb.20: Ultraschalluntersuchung über die ganze Behandlungszeit in den Gruppen bei palliativem Therapieansatz (PancTu1 <i>Luc</i> Zelllinie) ... .	75
Abb.21: Prozentuale Berechnung der Tumolvolumen nach der Ultraschalluntersuchung über die ganze Behandlungszeit in den Gruppen bei palliativem Therapieansatz (PancTu1 <i>Luc</i> Zelllinie) ... .	76
Abb.22: Primärtumorgewicht bei der palliativen Therapie am POD 21 (PancTu1 <i>Luc</i> Zelllinie) ... .	77
Abb.23: Primärtumolvolumen manuell gemessen bei der palliativen Therapie am POD 21 (PancTu1 <i>Luc</i> Zelllinie) ... .	78
Abb.24: Mittlere Helligkeit (Mean Grey) für jedes Messfeld über die ganze Behandlungszeit in allen Gruppen bei adjuvanten Therapieansatz (PancTu1 <i>Luc</i> Zelllinie) ... .	81
Abb.25: Mittlere Helligkeit (Mean Grey) für jedes Messfeld in den Gruppen bei dem adjuvanten Therapieansatz prozentual berechnet (PancTu1 <i>Luc</i> Zelllinie) ...	82
Abb.26: Ultraschalluntersuchung über die ganze Behandlungszeit in allen Gruppen bei adjuvanten Therapieansatz ... .	84
Abb.27: Tumolvolumen nach der Ultraschalluntersuchung über die ganze Behandlungszeit in allen Gruppen bei adjuvanten Therapieansatz prozentual berechnet ... .	85
Abb.28: Gewicht des Rezidivtumores bei der adjuvanten Therapie am POD 21 gemessen ... .	86
Abb.29: Volumen der Rezidivtumore bei der adjuvanten Therapie am POD 21 manuell gemessen ... .	87
Abb.30: Metastasengewicht bei der adjuvanten Therapie am POD 21 ... .	88
Abb.31: Metastasenvolumen bei der adjuvanten Therapie am POD 21 manuell gemessen ... .	89
Abb.32: Ultraschalluntersuchung des Primärtumors bei palliativer Therapie am POD 27 ... .	91
Abb.33: Ultraschallabbildung des Tumorwachstums in den Kontrollgruppen bei orthotoper Inokulation: PancTu1 <i>Luc</i> - (A); PancTu1- (B); Panc1- (C) Zelllinien...	92
Abb.34: Das Primärtumorgewicht (PancTu1 <i>Luc</i> - und PancTu1- Zelllinien) bei der palliativen Therapie am POD 27 ... .	93

Abb.35: Primärtumorvolumen (PancTu1 und PancTu1 <i>Luc</i> -Zelllinien) manuell gemessen bei der palliativen Therapie am POD 27 .....	94
Abb.36: Metastasengewicht (PancTu1 <i>Luc</i> - und PancTu1- Zelllinien) bei der palliativen Therapie am POD 27.....	95
Abb.37: Primärtumorgewicht (Panc1-Zelllinie) bei der palliativen Therapie am POD 34 gewogen .....	96
Abb.38: Primärtumorvolumen (Panc1-Zelllinie) bei der palliativen Therapie am POD 34 gemessen.....	97
Abb.39: Immunhistologische Färbungen der Primär- (39.1) und Rezidivtumore (39.2) .....	99
Abb.40: Gewichtvergleich der Primärtumore bei palliativer Therapie und der Rezidivtumore bei der adjuvanten Therapie am POD 21 .....	103
Abb.41: Vergleich der Tumorumfänge der Primärtumoren bei palliativer Therapie und der Rezidivtumore bei der adjuvanten Therapie am POD 21, mittels Ultraschall durchgeführt .....	105
Abb.42: Vergleich der Metastasengewichte nach der palliativen und der adjuvanten Therapie am POD 21 .....	106
Abb.43: Vergleich der Metastasenumfänge nach der palliativen und der adjuvanten Therapie am POD 21, manuell durchgeführt .....	107
Abb.44: Untersuchung der Volumina der Primärtumore bei palliativer Therapie am POD 21 mit zwei Methoden: Ultraschallvolumetrie und manuelle Messung nach der Sektion .....	108
Abb.45: Untersuchung der Volumina der Rezidivtumore bei dem adjuvanten Therapieansatz am POD 21 durch zwei Methoden: Ultraschallvolumetrie und manuelle Messung nach der Sektion .....	109
Abb.46: Korrelation der Bildgebungsverfahren .....	111
Abb.47: Einfluss von BD Matrigel® auf die PancTu1 <i>Luc</i> Tumorzellen .....	112
Abb.48: Korrelation der Zellzahl PancTu1 <i>Luc</i> und Intensität der mittleren Helligkeit für jedes Messfeld .....	114
Abb.49: Expression von CD95 und CD95L in den Pankreaskarzinomzelllinie PancTu1 <i>Luc</i> (A) und PancTu1 (B) .....	115
Abb.50: ELISA CD95L-Bestimmung in Zelllysaten von PancTu1 <i>Luc</i> -, PancTu1- und Panc1 .....	116
Abb.51: ELISA CD95L-Bestimmung in der Zellenüberstände der Panc1, PancTu1 und PancTu1 <i>Luc</i> Zellen in 10% FCS Zellkulturmedium .....	117

Abb.52: Zellzahloptimierung von Panc1, PancTu1 und PancTu1 <i>Luc</i> ... .. .	118
Abb.53: Untersuchung der therapeutischen Wirkung von verschiedenen Konzentrationen sCD95Fc bei der Vitalitätsbestimmung ... .. .	118
Abb.54: FACS-Analyse PancTu1 <i>Luc</i> -, PancTu1- Zellen auf Expression von Zytokeratin (KL 1) ... .. .	124
Abb.55: Anti-humane Zytokeratin (KL 1) - Färbung (LSAB-Methode) ... .. .	125
Abb.56: Invasionspotential der der PancTu1 <i>Luc</i> -, PancTu1- und Panc1- Zellen bei Tumorzellinvasionassay ... .. .	176
Abb.57: Orthotope Tumorzellinokulation Pankreatektomie des Pankreaskarzinoms (Resektionsmodell) ... .. .	179
Abb.58: Hochfrequenz-Ultraschall-Imaging von VisualSonics Vevo® 770 Imaging System ... .. .	180
Abb.59: Entwicklung des Pankreastumors in situ bei der Maus ... .. .	180
Abb.60: Pankreaskarzinom 21 Tage nach der orthotopen Tumorzellinokulation in einer SCID-Maus ... .. .	180
Abb.61: Ultraschallmessung von VisualSonics Vevo® 770 Imaging System ...	181
Abb.62: Das <i>in vivo</i> Imaging System NightOwlIII LB 983 von Berthold Technologies ... .. .	182

## Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Klassifikation der Tiermodelle in der Onkologie .....	20
Tab. 2: Vergleich von Mausmodellen für den klinischen Ansatz bei Bauchspeicheldrüsenkrebs .....	28
Tab.3: Bildgebende Techniken für die Tiermodell-Studien .....	30
Tab. 4: Schematische Darstellung behandelten Gruppen bei den palliativen und adjuvanten Behandlungsverfahren in die erste Phase des Tierversuchsvorhabens .....	66
Tab. 5: Schematische Darstellung behandelten Gruppen bei palliativer Therapieansatz bei der orthotoper Inokulation der PancTu1 <i>Luc</i> -, PancTu1- und Panc1- Zelllinien in die zweite Phase des Tierversuchsvorhabens .....	68
Tab. 6: Die Metastasenanzahl nach dem palliativen Therapieansatz bei orthotoper Inokulation der PancTu1 <i>Luc</i> -, PancTu1- und Panc1- Zelllinien ...	97
Tab. 7: Lumineszenzintensität der PancTu1 <i>Luc</i> , PancTu1 und Panc1 Zellen in Abhängigkeit von Zellkonzentrationen .....	113
Tab. 8: Die optische Dichte von wachsenden/lebenden PancTu1 <i>Luc</i> , PancTu1 und Panc1 Zellen nach der medikamentösen Behandlung in 10 % FCS- Medium .....	119
Tab. 9: Die optische Dichte von wachsenden/lebenden PancTu1 <i>Luc</i> , PancTu1 und Panc1 Zellen nach der medikamentösen Behandlung in 0,5 % FCS- Medium .....	119
Tab. 10: Untersuchung des Zellwachstums PancTu1 <i>Luc</i> .....	120
Tab. 11: Untersuchung des Zellwachstums PancTu1 .....	120
Tab. 12: Untersuchung des Zellwachstums Panc1 .....	121
Tab. 13: Zellvitalitätsassay (EZ4U) PancTu1 <i>Luc</i> .....	121
Tab. 14: Zellvitalitätsassay (EZ4U) PancTu1 .....	122
Tab. 15: Zellvitalitätsassay (EZ4U) Panc1 .....	122
Tab. 16: Invasionspotential der Tumorzellen bei Tumorzellinvasionassay .....	123
Tab. 17: Herkunft und genetische Mutation des Pankreaskarzinom-Zelllinien ...	132
Tab. 18: Analyse der Lokalrezidiv- und Metastasenanzahl nach adjuvanter Therapie .....	137

## **Protokollbeschreibung**

### **1. APAAP-Färbung**

Die lösliche Enzym-Immunkomplex-APAAP-Methode ist eine indirekte Methode, bei der sich Primärantikörper an im Gewebe liegende Antigene binden. Der entsprechende Sekundärantikörper (Brückenantikörper) lagert sich an den Fc-Teil des Primärantikörpers an. Der APAAP-Komplex (monoklonaler Maus-IgG-Antikörper gegen alkalische Phosphatase) und der Sekundärantikörper verbinden beide zu einer Brücke. Danach wurde mit Hilfe eines APAAP-Enzym-Immunkomplexes und eines Farbstoffes das Antigen sichtbar gemacht. Sowohl der Primärantikörper, als auch der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes müssen für eine Verbindung durch den Brückenantikörper aus der gleichen Spezies stammen. Die Färbung besteht aus folgenden Schritten:

1. Inkubation mit einem optimal verdünnten Maus-Primärantikörper.
2. Inkubation mit Dako REAL™ Link-Sekundärantikörper, der mit Maus-Immunglobulinen aller Isotypen reagiert.
3. Inkubation mit Dako REAL™ APAAP löslichem Enzym-Immunkomplex, der später in der Färbung eine Farbreaktion (Substrat-Chromogenlösung) verursacht.

Die verwendeten Antikörper stammten aus dergleichen Spezies. Durch eine wiederholte Inkubation mit dem Sekundärantikörper und dem APAAP-Komplex wird die Intensivierung der Färbung stärker. Nachteilig bei dieser Methode ist, dass die endogene alkalische Phosphatase nicht vollständig unterdrückt werden kann. Dadurch kann es zu unspezifischen Anfärbungen kommen. Um dies zu vermeiden, wurde die Blockierungssubstanz Levamisol der Chromogenlösung zugesetzt, wodurch die Hemmung der Phosphatase möglich ist.

Die APAAP-Methode ist sehr empfindlich, aber zuverlässig. Die Substrat-Chromogenlösung besteht aus Fast Red-Chromogen. Für die Gegenfärbungen wurde Dako REAL™ Hämatoxylin verwendet.

Mithilfe von Dako-Immunfärbeautomaten wurden die Schnitte mit einem Drei-Schritt-Kit REAL™ Detektion System, APAAP von Dako gefärbt.

REAL™ Detection System, APAAP Reagenzien:

- Verdünnungsmedium Dako Real™ Antibody Diluent
- Dako REAL™ Link, Secondary Antibody (LINK) Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobuline in gepufferter Lösung
- Dako REAL™ APAAP Immunocomplex (APAAP)

Chromogen Red wird max. 20 min vor der Färbung angesetzt (besteht aus Substrat-Arbeitslösung (750 µl), AP Substrate Buffer Chromogen Red 1 (30 µl), Chromogen Red 2 (30 µl) und Chromogen Red 3(30 µL). Für das Blockieren der endogenen alkalischen Phosphatase ist 1 Tropfen Levamisole für je 10 ml AP Substrate Buffer erforderlich.

Eindeckmedium auf wässriger Basis Aquatex (Merck, Darmstadt)

Die primären Antikörper (KL 1 und Ki-67) wurden mit dem Antikörper-Verdünnungsmedium verdünnt.

Die Schnitte wurden nach jedem Schritt zweimal je drei min mit Waschpuffer gespült. Pro Schnitt wurden ca. 100-150 µl Reagenzien pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert.

1. 45 min Inkubation mit primärem Antikörper oder Negativkontrollreagenz
2. 30 min Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper
3. 30 min Inkubation mit Immunokomplex (APAAP)
4. 10 min Inkubation mit dem Chromogen (RED)
5. Gegenfärbung mit Hämatoxylin (2-3 min), anschließend wurden die Schnitte 10 min unter langsam fließendem Leitungswasser gebläut
6. Eindecken der Proben mit einem Eindeckmedium auf wässriger Basis, Aquatex.

## **2. LSAB-Methode**

Für die Färbung wurde LSAB+ System-HRP Kit verwendet

LSAB+ System-HRP Kit Reagenzien:

- 3% Wasserstoffperoxid
- Biotinylierte Anti-Kaninchen-, Anti-Maus- und Anti-Ziegen-Immunglobuline
- Streptavidinperoxidase

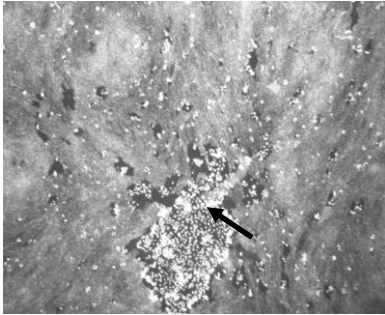
## Anhang

- DAB-Chromogen 3,3 Zoll-Diaminobenzidinchromogenlösung in Substratpuffer, pH 7,5 direkt vor dem Gebrauch angesetzt
  - wasserverdrängendes Einbettmedium Aquatex
- 1) um endogene Peroxidaseaktivität zu verhindern, wurden die Proben mit 3% Wasserstoffperoxid 13 min inkubiert;
  - 2) 45 min wurden die Proben mit primärem Antikörper oder Negativkontrollreagenz inkubiert;
  - 3) 30 min wurde eine Inkubation mit biotinyliertem „Link“-Antikörper durchgeführt;
  - 4) danach wurden die Schnitte mit Streptavidinperoxidase für 30 min bedeckt;
  - 5) 5 min Inkubation mit Substratchromogenlösung DAB erfolgte;
  - 6) zum Schluss wurde 2-3 min eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt und 10 min unter langsam fließendem Leitungswasser gebläut.
- Alle Schnitte wurden mit einem Eindeckmedium auf wässriger Basis eingedeckt.

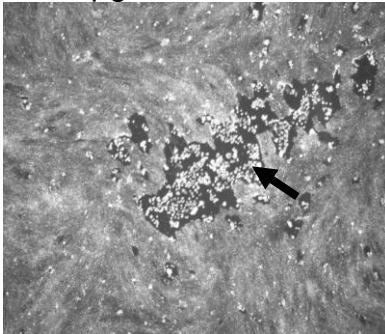
## Abbildungen

### Invasion der PancTu1*Luc*-, PancTu1- und Panc1- Zellen *in vitro*

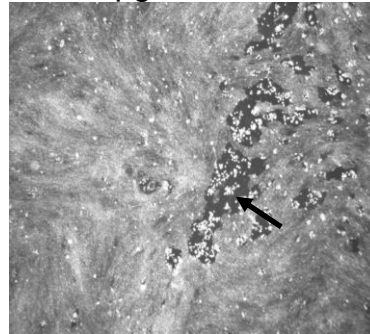
PancTu1  
Kontrolle



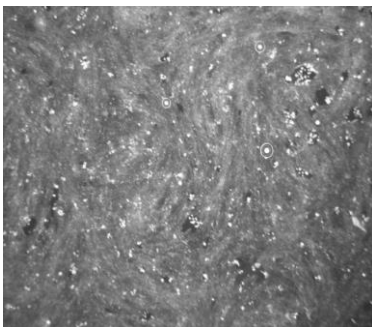
PancTu1  
sCD95Fc in Konzentration  
von 3 µg/ml



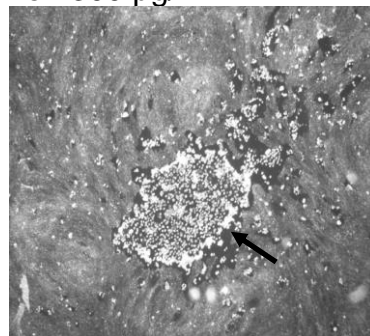
PancTu1  
sCD95Fc in Konzentration  
von 30 µg/ml



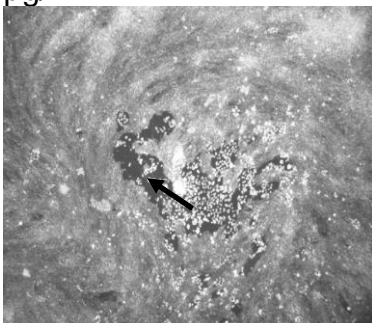
PancTu1  
Kombinationstherapie



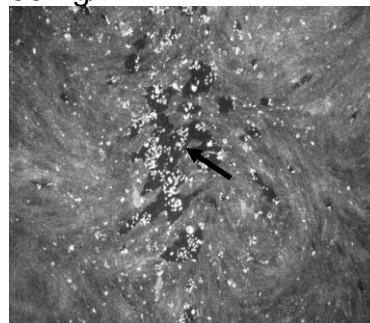
PancTu1  
sCD95Fc in Konzentration  
von 300 µg/ml



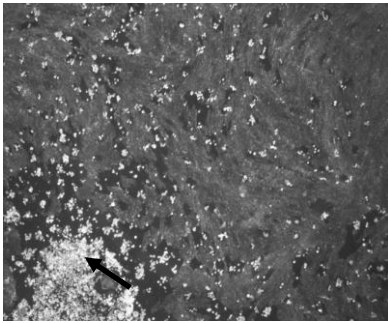
PancTu1  
Remicade® in Konzentration von 10  
µg/ml



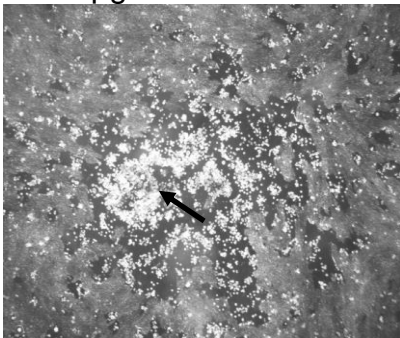
PancTu1  
TNF-α in Konzentration  
50 ng/ml



PancTu1Luc  
Kontrolle



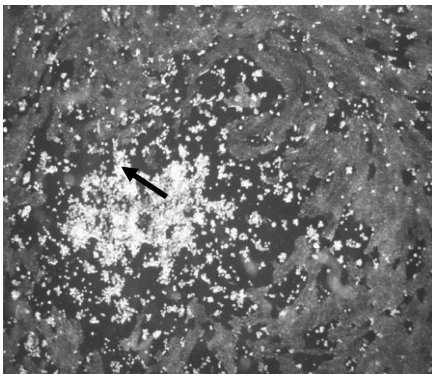
PancTu1Luc  
sCD95Fc in Konzentration  
von 3 µg/ml



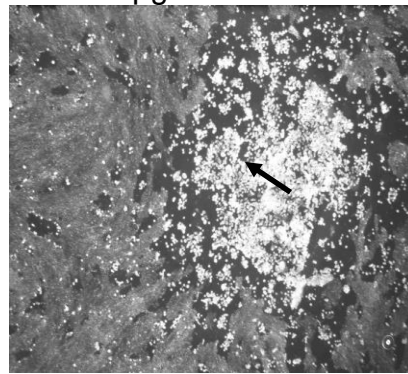
PancTu1Luc  
sCD95Fc in Konzentration  
von 30 µg/ml



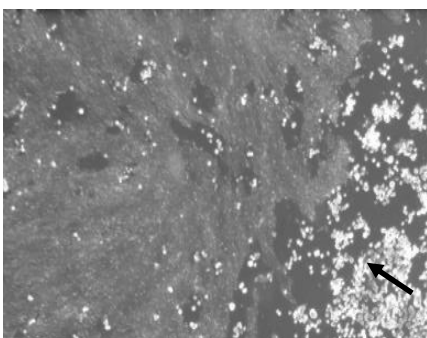
PancTu1Luc Kombinationstherapie



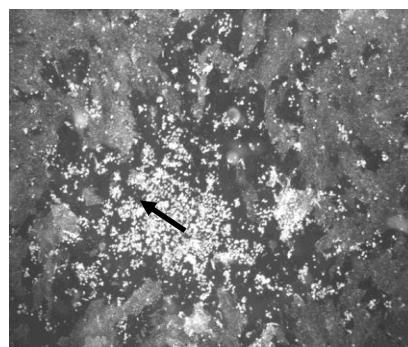
PancTu1Luc  
sCD95Fc in Konzentration  
von 300 µg/ml



PancTu1Luc  
Remicade® in Konzentration  
von 10 µg/ml

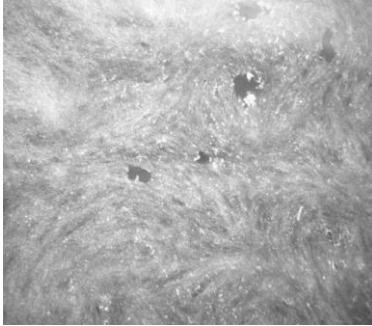


PancTu1Luc  
TNF-α in Konzentration  
von 50 ng/ml

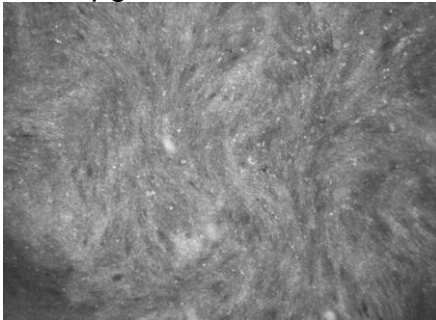


Anhang

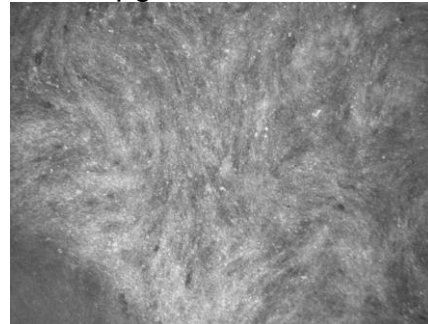
Panc1  
Kontrolle



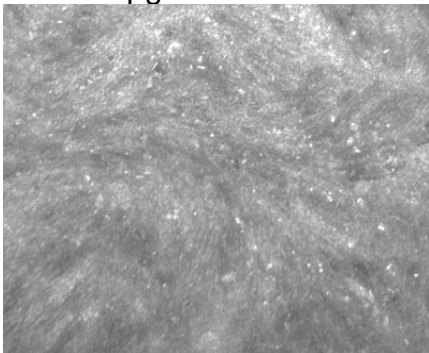
Panc1  
sCD95Fc in Konzentration  
von 3 µg/ml



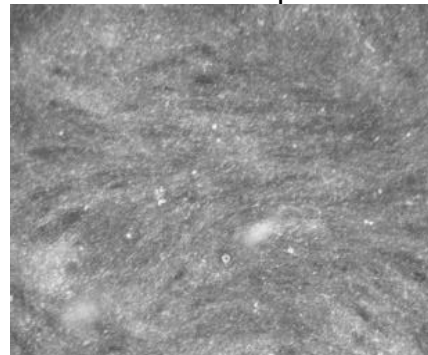
Panc1  
sCD95Fc in Konzentration  
von 30 µg/ml



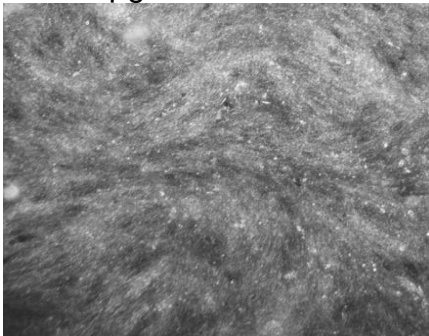
Panc1  
sCD95Fc in Konzentration  
von 300 µg/ml



Panc1  
Kombinationstherapie



Panc1  
Remicade® in Konzentration  
von 10 µg/ml



Panc1  
TNF-α in Konzentration  
50 ng/ml

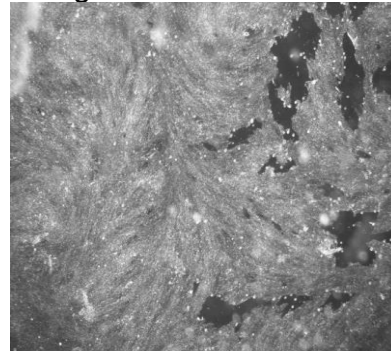
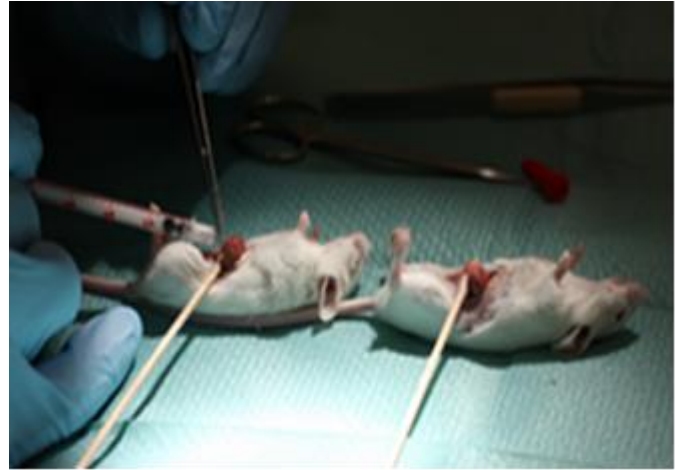


Abb. 56: Invasionspotential der der PancTu1Luc-, PancTu1- und Panc1- Zellen bei Tumorzellinvasionassay



**A:** C.B-17/IcrHsd-Prkdc<sup>scid</sup>Lyst<sup>bg</sup>



**B:** Orthotope Tumorzellinokulation (murines ortho-topes Xenotransplantationsmodell)



**C:** Injektion der Pankreaskarzinomzellsuspension orthotop und subkapsulär ins Pankreas



**D:** Das gesetzte orthotope Pankreaskarzinom

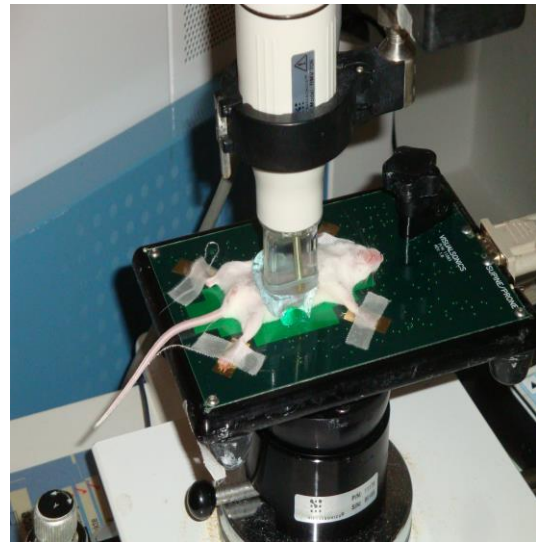


**E:** Resektion eines 10 Tage alten Pankreaskarzinoms in der C.B-17-Maus



**F:** 21 Tage altes Pankreaskarzinom in einer SCID-Maus

Abb.57: Orthotope Tumorzellinokulation/Resektion Pankreatektomie des Pankreaskarzinoms.



**A**

**B**

Abb. 58: Hochfrequenz-Ultraschall-Imaging von VisualSonics Vevo® 770 Imaging System (A); Schallköpfe RMV706 mit 20-60 MHz (B).

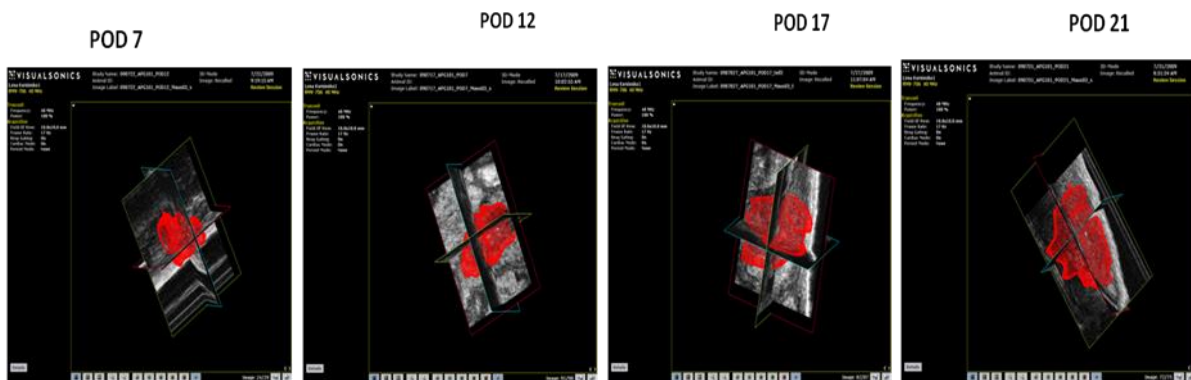
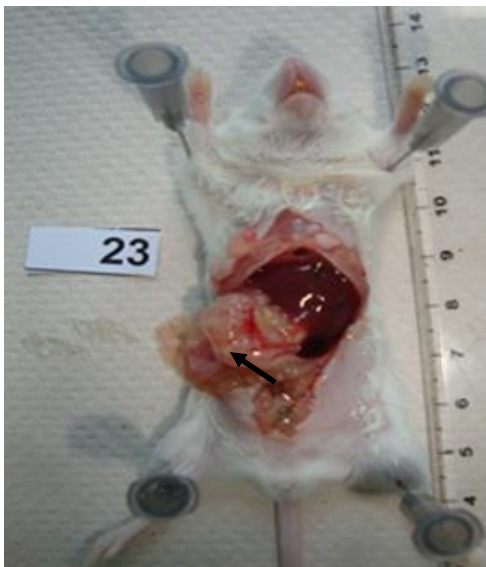


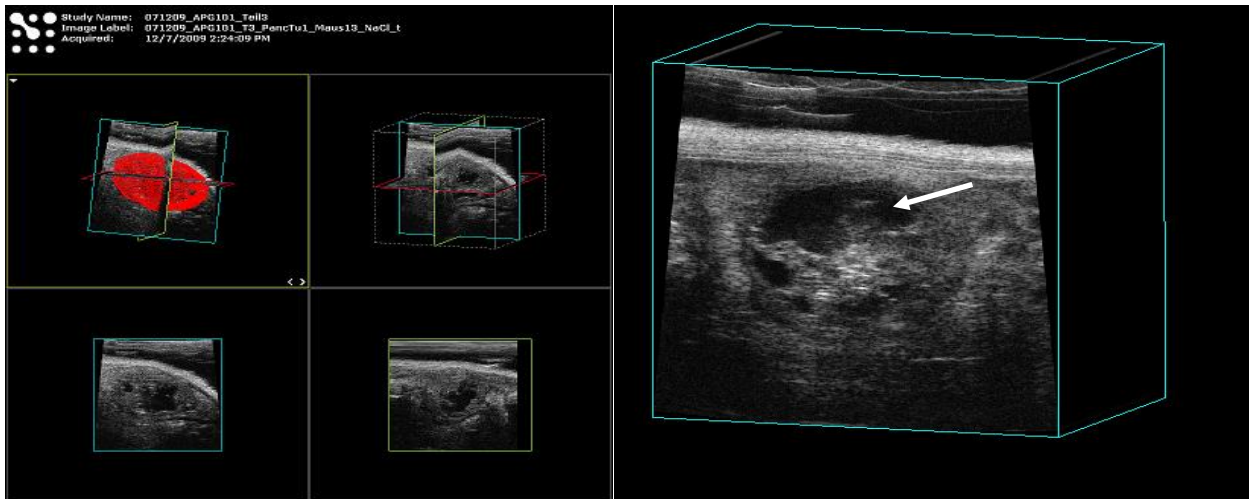
Abb. 59: Entwicklung des Pankreastumors *in situ* bei der Maus.



**A**

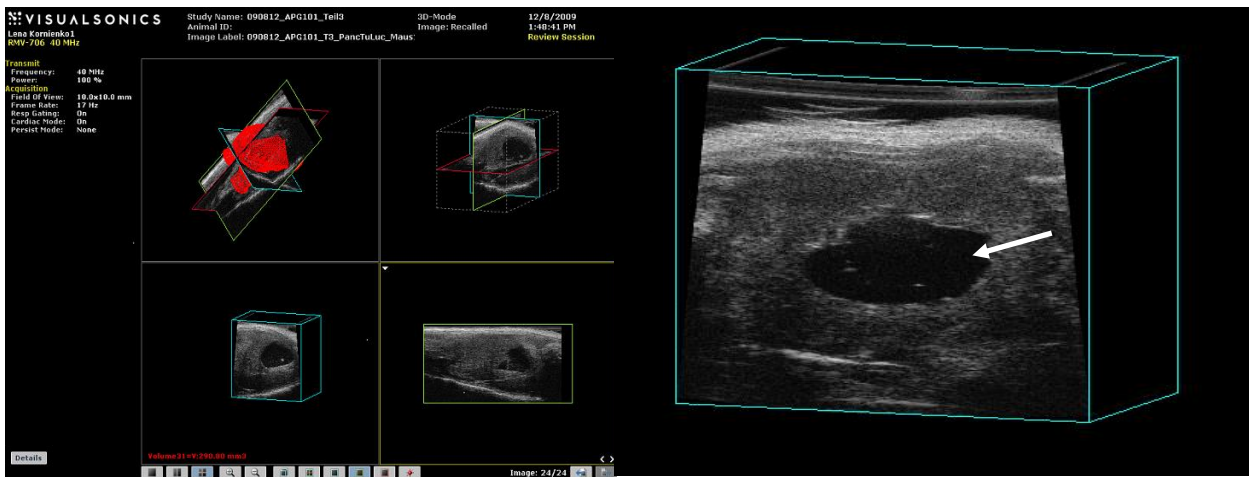
**B**

Abb. 60: Pankreaskarzinom 21 Tage nach der orthotopen Tumorzellinokulation in einer SCID-Maus (A); Bauchdeckenmetastasen 21 Tage nach der orthotopen Tumorzellinokulation in einer SCID-Maus (B).



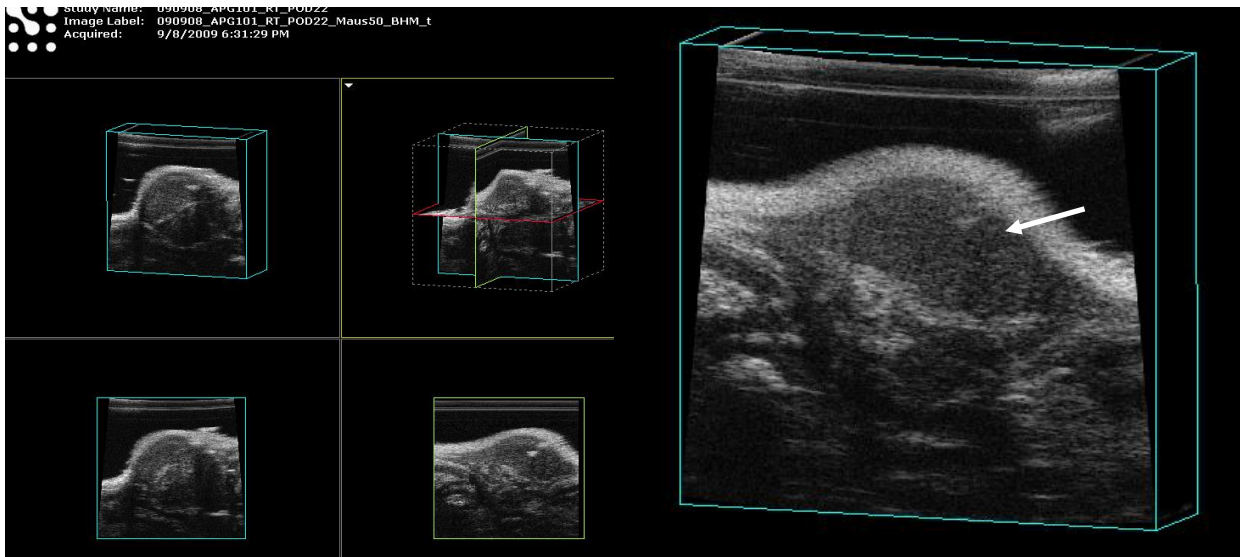
A.

B.



C.

D.



E.

F.

Abb. 61: Ultraschallmessung von VisualSonics Vevo® 770 Imaging System: 3D-Tumoraufnahme von Tumorzysten (A-D); von Bauchnahrmetastasen (E, F).

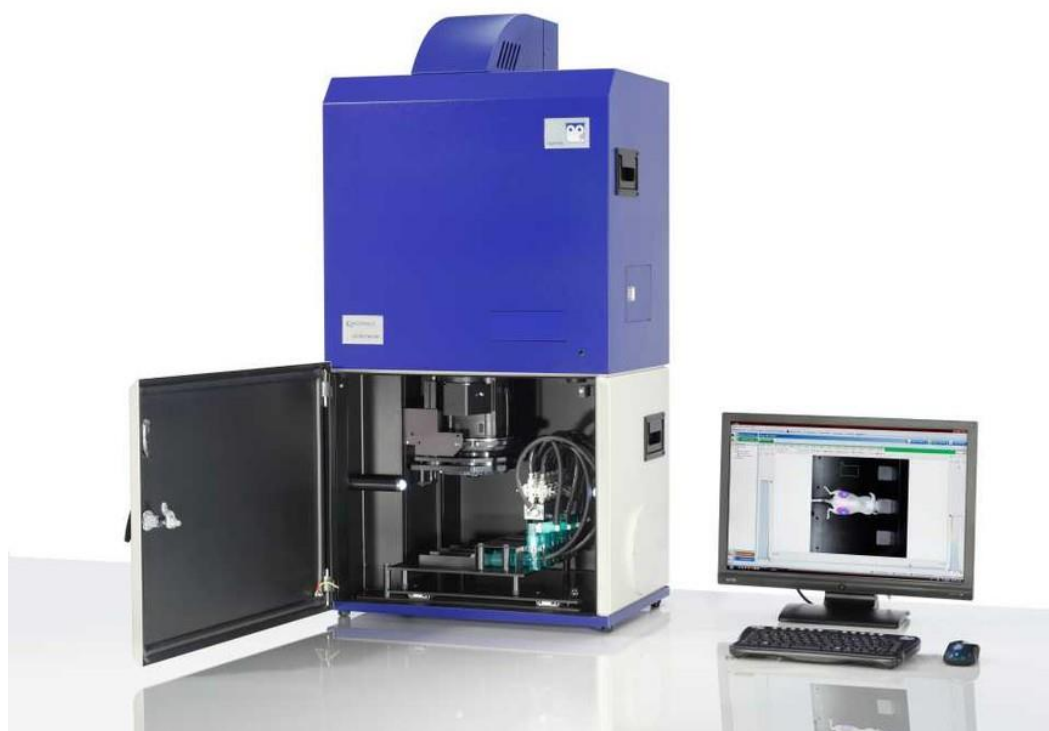


Abb.62: Das *in vivo* Imaging System NightOwl III LB 983 von Berthold Technologies

**Publikation:**

Tiwari S, Egberts JH, **Korniienko** O, Köhler L, Trauzold A, Glüer CC, Kalthoff H. 2011. Assessment of anti-inflammatory tumor treatment efficacy by longitudinal monitoring employing sonographic micro morphology in a preclinical mouse model. *BMC Med Imaging.* ;11:15. doi: 10.1186/1471-2342-11-15. PMID: 21699694

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. vet. Gerhard Schultheiss der Justus-Liebig-Universität Gießen für die Übernahme, Korrekturen und Einreichung meiner Dissertation. Die Gewissheit, jederzeit Hilfe und Rat zu erhalten, der freundschaftliche und persönliche Umgang miteinander machten die gesamte Zusammenarbeit zu einer Freude. Herzlichen Dank dafür!

Ich danke Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff des Institutes für Experimentelle Tumorforschung der Christian-Albrechts-Universität Kiel für die Betreuung dieser Dissertation. Vielen Dank, für die Vergabe des Themas, für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz, das ausgesprochen angenehme Arbeitsklima, das persönliche Vertrauen und für die intensive und persönliche Betreuung während der vier Arbeitsjahre. Vielen Dank!

Für die gewährte Unterstützung richte ich meinen besonderen Dank an alle ehemaligen und jetzigen Mitarbeiter des Institutes für Experimentelle Tumorforschung Sektion für Molekulare Onkologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel.

Im Besonderen geht dieser Dank an Prof. Dr. med. Jan Egberts und Prof. Dr. med. Bodo Schniewind für die Tier-Op- Unterstützung und Durchführung.

Bei Herrn Dr. Christian Röder möchte ich mich ganz herzlich für die überaus interessante und tolle Zusammenarbeit, sowie die bereitwillige Beantwortung aller statistischen Fragen bedanken.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Frau Dr. Carola Heneweer für die geduldige und fachkundige Einarbeitung in die bildgebende Verfahren und die Hilfestellung bei der Interpretation der erhaltenen Daten.

Ich danke Frau Dr. Olga Will und Doris Emme für die Einführung in Op-Techniken beim Versuchstier und die stete Hilfsbereitschaft.

Für die praktische und wissenschaftliche Beratung möchte ich mich auch gerne bei Frau Prof. Ania Trauzold bedanken.

Danken möchte ich auch Dr. Sanjay Tiwari, für deine Publikation und die vorgestellten PancTu1 *Luc*-Zelllinie.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Dr. Heiner Oberg aus dem Institut für Immunologie für die Durchführung der FACS-Analyse.

## Danksagung

Insbesondere geht ein großes Dankeschön an unsere technische Assistentin Frau Angelika Duttmann für Beistand, Rat und Tat rund um die Laborarbeit. Wegen Ihrer ausgezeichneten Unterstützung wurde die Arbeit im Labor besonders angenehm und produktiv.

Kerstin Masur und Gabriella Tompke vielen Dank für freundliche Beratung und praktische Hilfe in der Laborarbeit.

Außerdem möchte ich den Tierpflegern der ZTH der Christian-Albrechts-Universität Kiel für die kompetente Versorgung meiner Versuchstiere, das freundliche Entgegenkommen und das gute unkomplizierte Arbeitsklima danken.

Mein herzlicher Dank geht an meine unmittelbaren Kollegen und Bürogefährten Doris Emme, (Dr.) Reinhild Holmer, (Dr.) Ulf Geisen, (Dr.) Freya Goumas, (Dr.) Verena Hasselman, Gökhan Alp, für eine freundliche und spaßvolle Arbeitsatmosphäre in unserem täglichem Büroleben.

Meinen Freunden möchte ich ganz herzlich für die alltägliche Unterstützung danken. Lieben Dank an Linda und Olaf Köhler, Sebastian Malkusch und Betül Temel für eine wertvolle und inspirierende Freundschaft, welche auf der Basis unserer Zusammenarbeit entstanden ist. Durch die Gemeinschaft mit euch wurde auch eine lange und anstrengende Arbeitsnacht zu einem schönen Erlebnis. Wir waren ein tolles Team!

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Linda Köhler, Angelika Duttmann, Olga und Markus Will für die kompetenten Korrekturen dieser Dissertation bedanken.

Schließlich vielen Dank an meine Eltern für jegliche Unterstützung in diesen vier Jahren, weil sie immer an mich glaubten und mir auch in schwierigen Zeiten stets zur Seite standen.

Schlussendlich möchte ich meinen Ehemann Dieter einen ganz besonderen Dank sagen, der während der Promotion immer an mich glaubte und mir bis heute durch seine motivierenden und aufmunternden Worte stets eine große Unterstützung ist. Dafür danke ich dir!

## Erklärung

Erklärung Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Olena Seipp