

4 Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das induzierbare System in Pankreasadenokarzinom-Zelllinien etabliert, welches sich eignet, die Expression bestimmter Gene gezielt und zu gewünschten Zeitpunkten zu induzieren. Dabei wurden die Auswirkungen der Inaktivierung der onkogenen K-Ras-Aktivität mit Hilfe der siRNA-Technologie bzw. die Rekonstitution der wt p53-Funktion in induzierbaren Pankreaskarzinom-Zellen untersucht.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit den biologischen Effekten von wt p53, wofür ein orthotopes Mausmodell zur Anwendung kam. Dabei wurden wt p53 induzierbare Zellen in den Pankreaskopf von Nacktmäusen implantiert. Die wt p53-Expression wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung induziert und die Auswirkungen auf Tumorigenität, Tumorwachstum und -größe, Invasivität, Metastasierung und Vaskularisierung untersucht.

4.1 Das induzierbare System

Kommerziell erhältlich sind verschiedene induzierbare Systeme, mit denen eine zeitliche und quantitative Kontrolle der Genexpression erzielbar ist. Dadurch eignen sich diese Systeme für Untersuchungen von Genprodukten, da eine stabile Überexpression bzw. Depletion zum Zelltod führt bzw. die Expansion stabil transfizierter Klone verhindert. Idealerweise ist von diesen Systemen eine hohe Amplitude der Induktion bei geringer oder fehlender basaler Expression sowie ein hochselektiver und nebenwirkungsfreier Induktor zu fordern. Unter diesen Gesichtspunkten ist das inzwischen gut etablierte Tetrazyklin regulierte Expressionssystem für Säugerzellen günstig, bei dem Antibiotika die Genexpression regulieren. Nach Tetrazyklinzugabe wird die Transkription der DNA entweder freigegeben (Tet-on) oder unterdrückt (Tet-off), wobei diese Systeme den Vorteil besitzen, dass sie im Tierexperiment angewendet werden können.

Zur Anwendung kamen Tet-on-Systeme von Clontech (Tet-on) und Invitrogen (T-RExTM). Diese Systeme bestehen aus zwei Vektoren, die in einer Zelle vorhanden sein müssen. Nachfolgend wird der Mechanismus näher anhand des T-RExTM-Systems erläutert:

Der erste Vektor pcDNA6/TR exprimiert das Tet-Repressor(TetR)-Protein, das Homodimere bildet. Im zweiten Expressionsplasmid pcDNA4/TO steht die cDNA des gewünschten Gens unter Kontrolle eines CMV-Promotors, in dem zwei Kopien der *TetOperator2(TetO₂)*-Sequenz integriert sind. An eine *TetO₂*-Sequenz bindet je ein Dimer des TetR mit hoher Affinität, so dass keine Transkription des Gens stattfindet. Zugegebenes Tetrazyklin oder

eines seiner Derivate wie das Dox bindet in einem Verhältnis von 1:1 an den Repressor, die daraus resultierende Konformationsänderung führt zur Ablösung des TetR von der *TetO₂*-Sequenz und das gewünschte Gen wird exprimiert (Abb. 8).

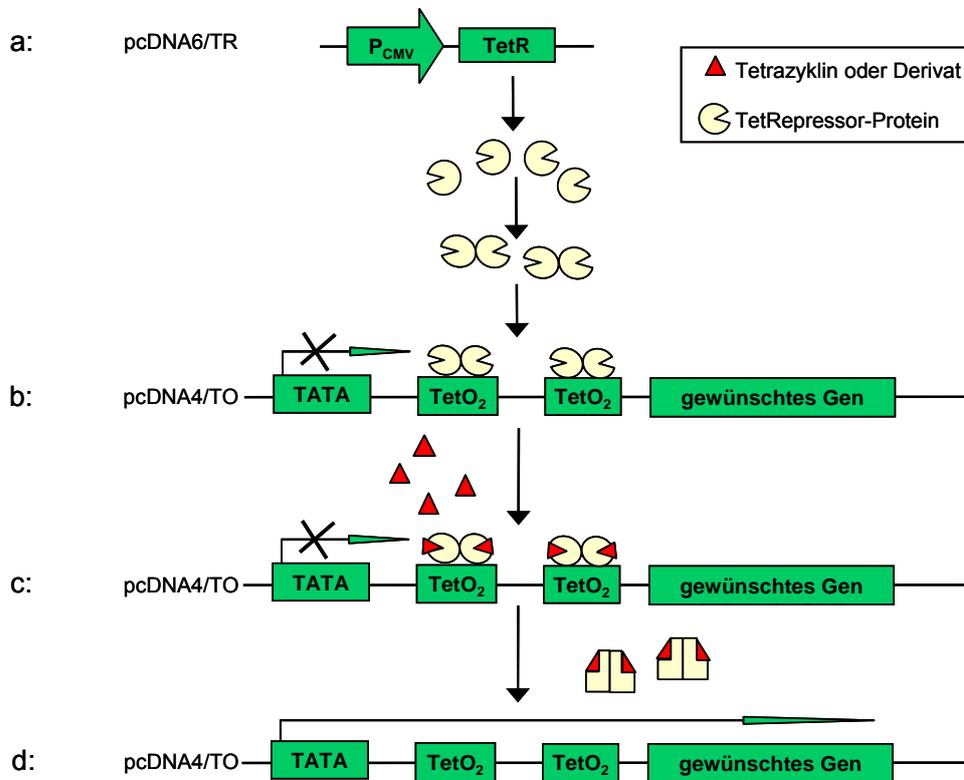


Abb. 8: Induzierbares System (T-REx™, Invitrogen)

a: Das TetRepressor-Protein (TetR) wird vom pcDNA6/TR-Vektor exprimiert und bildet Homodimere. b: TetR Homodimere binden an die *TetO₂* im induzierbaren Vektor (pcDNA4/TO), der das gewünschte Gen enthält. c: Zugegebenes Tetrazyklin bindet an die TetR-Homodimere. d: Die Tetrazyklinbindung verursacht eine Konformationsänderung des Repressors und eine damit verbundene Ablösung von der *TetO₂*-Sequenz, Transkription des gewünschten Gens erfolgt.

Beide Tetrazyklin induzierbaren Systeme nutzen die regulatorischen Elemente des Tetrazyklin Resistenz Operons (Tn10) aus *E. coli* (Hillen and Berens, 1994), wobei sie einige Unterschiede hinsichtlich Konstruktion und Mechanismus aufweisen. Das Tet-on-System besitzt im Gegensatz zum T-REx™-System sieben *TetO₂*-Sequenzen im CMV-Promotor und nutzt ein Hybrid aus dem regulatorischen Element Tn10 von *E. coli* und der viralen Transaktivierungsdomäne V16 (Gossen and Bujard, 1992). Dieses Hybridprotein löst sich nach Tetrazyklinzugabe nicht ab, sondern die Expression des gewünschten Gens wird allein durch die Konformationsänderung ermöglicht.

4.1.1 Etablierung induzierbarer Pankreaskarzinom-Zelllinien

Da Pankreasadenokarzinom-Zelllinien mit stabiler Expression des Tet-Repressors (pcDNA6/TR bzw. pTet-on) nicht kommerziell erhältlich sind, mussten stabile, gut

induzierbare Zellklone generiert werden. Für diese Arbeit wurden Pankreasadenokarzinom-Zelllinien ausgewählt, die eine aktivierende *K-Ras*-Mutation und/oder eine zum Funktionsverlust führende Mutation im *p53*-Gen besitzen. Hierfür kamen die Zelllinien Aspc-1, BxPc-3, Capan-1, DanG, MiaPaCa-2 und Panc-1 in Frage. Dabei weisen alle aufgeführten Zelllinien außer BxPc-3, welche nur eine *p53*-Mutation besitzt, in beiden Genen eine Mutation auf (Moore et al., 2001; p53_database, 2007; Sipos et al., 2003).

Für die verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien ist bekannt, dass nur eine sehr geringe Transfektionseffizienz zu erzielen ist, weshalb zunächst die Transfektionsbedingungen optimiert wurden. Danach wurden die Zelllinien mit dem Erstvektor pTet-on bzw. pcDNA6/TR stabil transfiziert und anschließend mit einem Tetrazyklin regulierten Luziferase-Reporterkonstrukt hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit geprüft. Die Ergebnisse zur Etablierung der Pankreasadenokarzinom-Zelllinien mit stabiler Expression sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Ausbeute der stabil transfizierten Pankreaskarzinom-Zelllinien mit den Erstvektoren pTet-on oder pcDNA6/TR

Zelllinie	Transfizierter Vektor	Anzahl der Transfektionen	Getestete Klone	Stabile Klone mit Expression des Tet-Repressors
Aspc-1	pTet-on	3	63	0
	pcDNA6/TR	2	41	0
BxPc-3	pTet-on	1	22	0
Capan-1	pTet-on	4	25	0
	pcDNA6/TR	3	30	0
DanG	pTet-on	4	8	0
	pcDNA6/TR	4	20	2
MiaPaCa-2	pTet-on	1	30	2
	pcDNA6/TR	1	30	14
Panc-1	pTet-on	1	20	1
	pcDNA6/TR	1	45	5

Dabei zeigte sich eine höhere Klonausbeute für das T-REXTM-System als für das pTet-on-System. Für die Zelllinien Aspc-1, BxPc-3 und Capan-1 konnten trotz teilweise mehrmaliger Transfektion keine stabilen, gut induzierbaren Zellklone generiert werden. Somit standen für die Transfektion der Tetrazyklin responsiven Zweitvektoren Klone aus drei verschiedenen Zelllinien, DanG, MiaPaCa-2 und Panc-1, zur Verfügung.

In Abb. 9 sind Ergebnisse des Luziferase-Reporterassays für einige Zellklone der Zelllinien Aspc-1 und MiaPaCa-2 aufgezeigt. Der Vergleich der beiden Systeme zeigte, dass nach Transfektion mit dem T-REXTM-System generell höhere *relative light units* gemessen werden konnten als für das pTet-on-System.

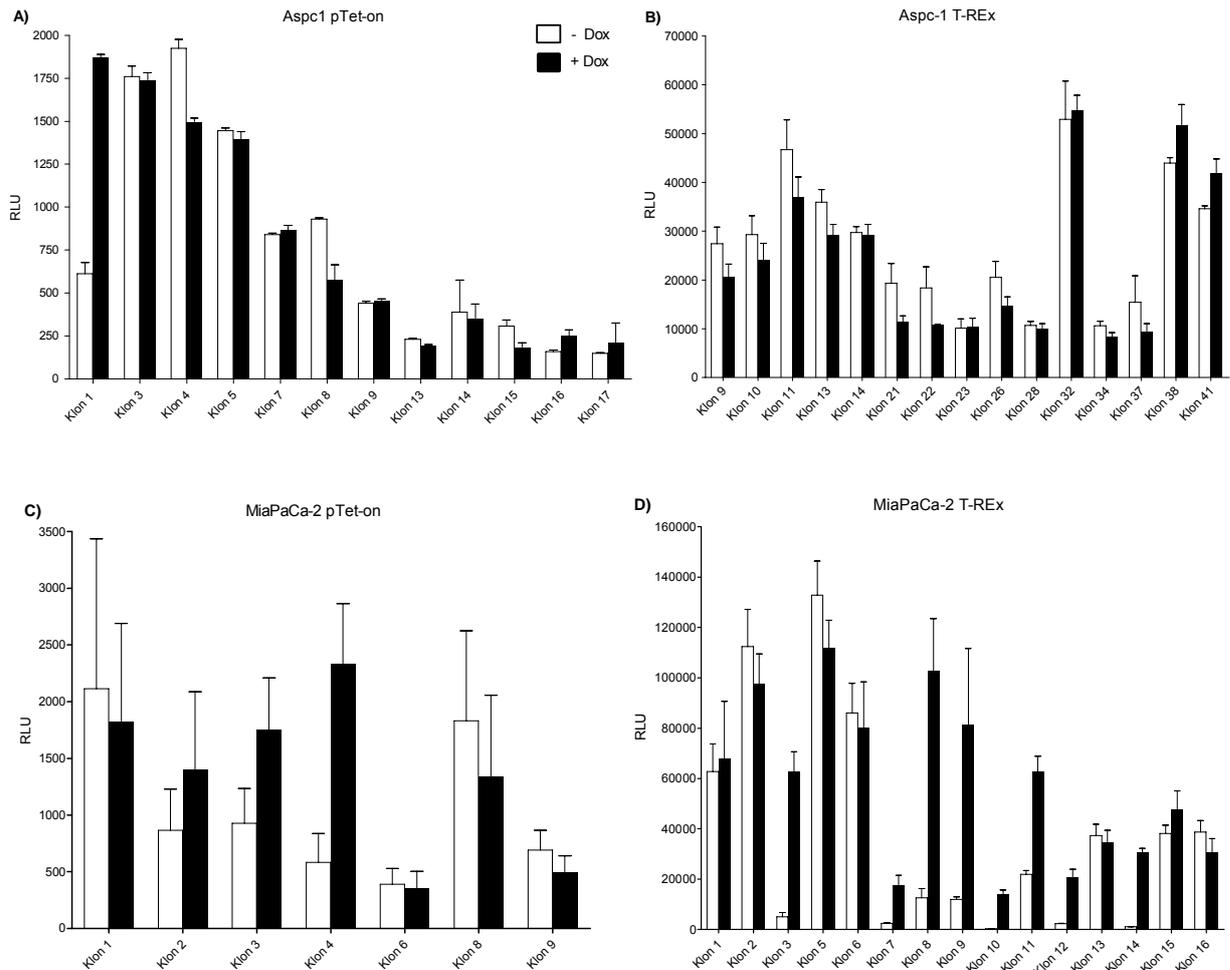


Abb. 9: Etablierung Tetrazyklin regulierbarer Genexpression in Pankreaskarzinom-Zelllinien (pTet-on- und T-REx™-System)

Dargestellte *relative light units* (RLU) von Beispielklonen der Pankreaskarzinom-Zelllinie A) und B) Aspc-1, C) und D) MiaPaCa-2; Zur Identifikation von Klonen mit guter Induktion des Tet-Repressors wurden die Tet-responsiven Luziferase-Reporter-Konstrukte pTre2Hyg-Luziferase (A und C) bzw. pcDNA4/TO-Luziferase (B und D) transient in die Zellen transfiziert. Die Luziferase-Expression wurde nach 48 h mit und ohne 1 µg/ml Dox-Inkubation der Zellen mit Hilfe des Luziferase-Assay-Systems von Promega gemessen.

Die Auswahl stabiler Klone erfolgte nach zwei Kriterien: gute Induzierbarkeit sowie keine bis geringe Basisexpression der Luziferase ohne Dox-Zugabe. Diese Kriterien erfüllten sowohl die Klone DanG TREx9, MiaPaCa-2 pTet-on4 und TREx10 als auch Panc-1 TREx28.

Wegen der Einsetzbarkeit im orthotopen Tiermodell wurden für die weiteren Arbeiten zunächst die DanG- und MiaPaCa-2-Klone ausgewählt. In diese Klone sollten im nächsten Schritt Konstrukte zur Reexpression von wt p53 und zur Inaktivierung von K-Ras eingebracht werden.

4.1.2 Konstruktion und Transfektion eines Konstruktes zur induzierbaren Expression von wt p53 in Pankreaskarzinom-Zelllinien

Um eine induzierbare Expression von wt p53 nach Dox-Zugabe zu ermöglichen, wurde das offene Leseraster der wt p53-Sequenz in die *multicloning sites* der induzierbaren Expressionsplasmide pTre2Hyg und pcDNA4/TO kloniert. Zusätzlich wurde in den *open reading frame* von wt p53 eine Flag-Sequenz an den C-Terminus eingefügt, die eine hochselektive Detektion des wt p53-Proteins durch Flag-spezifische Antikörper sowohl im Immunoblot als auch in der Immunhistochemie ermöglichen sollte. Diese Vorgehensweise erschien notwendig, da die kommerziell erhältlichen p53-Antikörper sowohl Wildtyp als auch mutiertes p53 erkennen. Das in den Pankreaskarzinom-Zellen exprimierte mutierte p53-Protein besitzt im Vergleich zur Wildtypform eine höhere Stabilität.

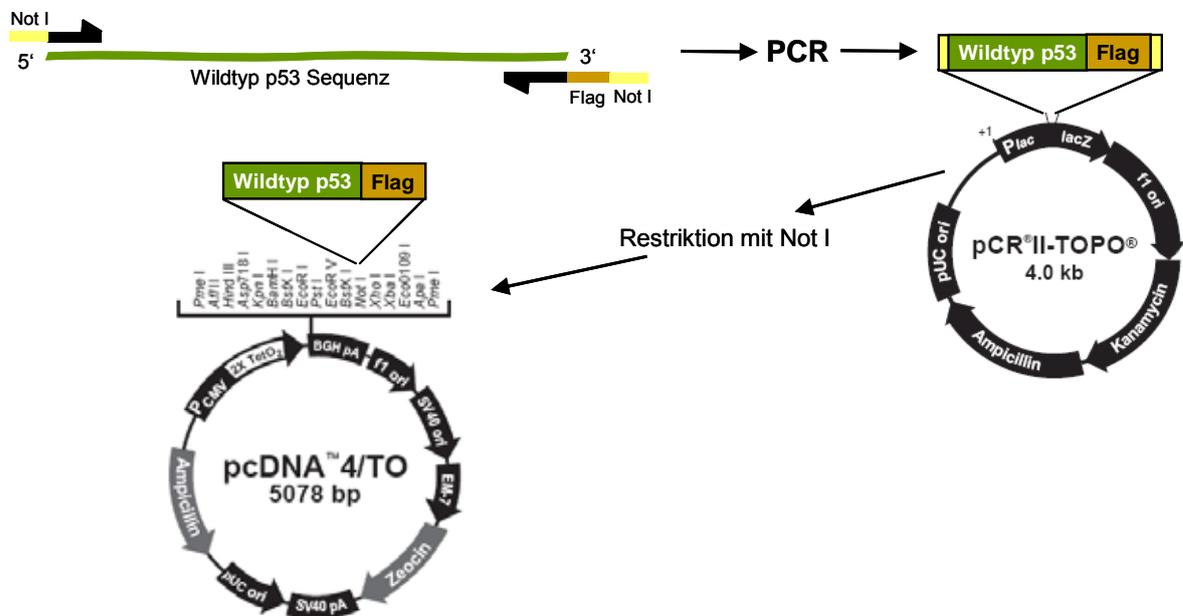


Abb. 10: Klonierungsstrategie von wt p53 in pcDNA4/TO

Die Primer wurden so ausgewählt, dass sie eine Not I-Schnittstelle enthielten und der reverse Primer zusätzlich eine Flag-Sequenz. Diese Primer wurden in einer PCR vom pcDNA3.1⁺wt p53-Vektor mit einer Pfu-Polymerase eingesetzt. Das Produkt erhielt durch die Behandlung mit einer Taq-Polymerase (0,5 µl in 25 µl Ansatz, Inkubation 30 min bei 72°C) einen 3'-Adenosin-Überhang, der für den Klonierungsschritt in den pCRII-TOPO-Vektor nötig war. Die wt p53-Flag-Sequenz wurde mit dem Restriktionsenzym Not I ausgeschnitten und in die *multicloning site* des pcDNA4/TO-Vektors kloniert.

Die Klonierungsstrategie von wt p53-Flag in den Vektor pcDNA4/TO ist in Abb. 10 dargestellt und wurde gleichermaßen so für den Vektor pTre2Hyg verfolgt. Die Richtigkeit der Sequenz und Orientierung wurde mit Hilfe einer Sequenzierung festgestellt. Dabei handelt es sich um die Wildtypvariante mit dem Polymorphismus in Kodon 72. Dieser hat den Austausch der Aminosäure Arginin zu Prolin zur Folge (Ara, S. et al., 1990).

Dieses wt p53-Flag-Konstrukt wurde stabil in die Zellklone DanG TReX9, MiaPaCa-2 pTeton4 und MiaPaCa-2 TReX10 transfiziert und die herangezogenen Klone hinsichtlich der

Kultivierung der Klone als schwierig, so dass eine weitere *in vitro*- bzw. *in vivo*-Charakterisierung nicht aussichtsreich erschien.

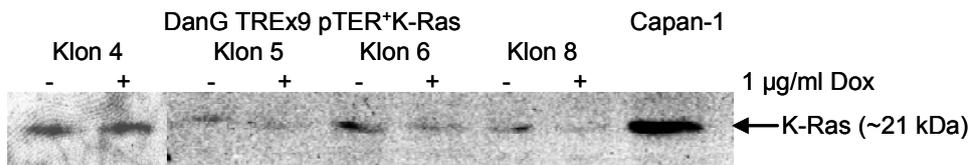


Abb. 13: Induzierbare K-Ras-siRNA hemmt K-Ras-Expression in DanG-Zellen

Western Blot-Analyse der K-Ras-Expression zum Nachweis der Dox induzierten Transkription von K-Ras-siRNA am Beispiel verschiedener DanG-Zellklone, die für 48 h mit (+) bzw. ohne (-) Zugabe von 1 µg/ml Dox im Vollmedium kultiviert wurden. Als Kontrolle wurde Proteinlysate der K-Ras exprimierenden wt Capan-1-Zelllinie mitgeführt.

4.1.5 Biologische Effekte der wt p53-Expression *in vitro*

4.1.5.1 Charakterisierung der MiaPaCa-2- und DanG-Zellklone mit induzierbarer wt p53-Expression

Nachdem unter 4.1.2 die induzierbare Expression von wt p53 erfolgreich gezeigt werden konnte, galt es als nächstes, die Funktionalität des induzierten Proteins in den Zellklonen zu überprüfen. Das funktionelle Protein wirkt als Transkriptionsfaktor und schaltet nach seiner Aktivierung verschiedene gut charakterisierte biologische Effekte wie DNA-Reparatur, G1-/G2-Zellzyklusarrest und/oder Apoptose an (Ginsberg et al., 1991; Hall et al., 1996; Mack et al., 1993). Zur Prüfung der Funktionalität des Dox induzierten wt p53-Proteins wurden die Parameter Proliferation und Zellzyklusprogression beurteilt.

Die Dox-Zugabe induziert in den DanG p53-3- und Mia p53-10-Zellen eine ausgeprägte, persistente Expression von wt p53, die in Abb. 14 über 96 h anhand einer Western Blot-Analyse mit dem anti-Flag-Antikörper dargestellt werden konnte. Dabei wurde das Expressionsmaximum in den DanG- und MiaPaCa-2-Zellklonen nach 48 h erreicht. Die Verwendung des anti-p53-Antikörpers ließ eine Unterscheidung zwischen dem endogenen, mutierten und dem induzierten wt p53-Protein durch unterschiedliche elektrophoretische Mobilität im denaturierenden Acrylamidgel zu.

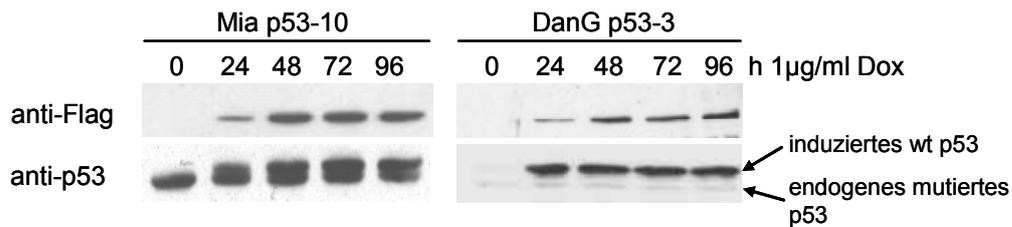


Abb. 14: Stabile wt p53-Expression nach Dox-Zugabe in den Zellklonen DanG p53-3 und Mia p53-10

Zeitabhängiger wt p53-Flag-Expressionsnachweis über 96 h für die induzierbaren Zellen DanG p53-3 und Mia p53-10 durchgeführt mittels anti-Flag- und anti-p53-Antikörpern in Western Blot-Analyse. Dafür wurden die Zellen mit 1 µg/ml Dox über 96 h behandelt und in 24 h-Intervallen RIPA-Proteinlysate hergestellt.

Um die Effekte der wt p53-Induktion auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurde der alamarBlue™-Assay durchgeführt. Dieser Assay quantifizierte die Umsetzung des Farbstoffes als indirektes Maß für die Zellzahl. Die ausgewählten Klone DanG p53-3 und Mia p53-10 zeigten *in vitro* nach Dox-Zugabe eine massive, zeitabhängige Wachstumsinhibition. Nach bereits 24 h wt p53-Expression wiesen beide Zellklone eine geringe Hemmung der Proliferation auf, die nach 48 h stark zunahm. Die DanG-Zellen zeigten auch in Gegenwart anhaltender wt p53-Induktion (Western Blot-Analyse) ein leichtes Zellwachstum, wo hingegen die Zellzahlen bei dem MiaPaCa-2-Klon sogar unter das Ausgangsniveau abnahmen (Abb. 15).

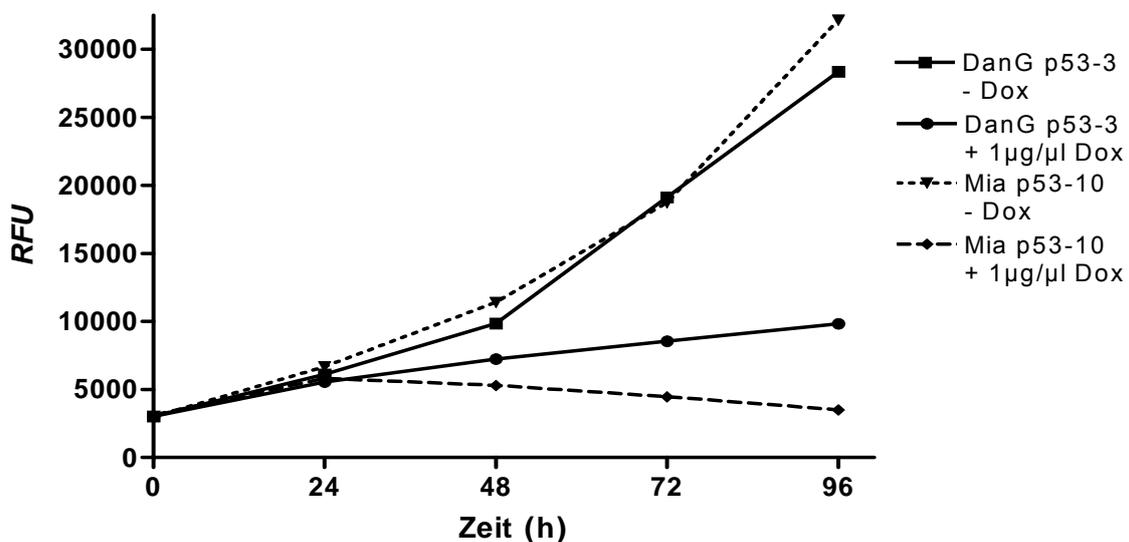


Abb. 15: Induziertes wt p53 inhibiert das Zellwachstum

Proliferationskurve erstellt mittels alamarBlue™-Assay, wobei die Zellklone DanG p53-3 und Mia p53-10 nach 24 h Anwachsen mit und ohne Dox über 96 h behandelt wurden. In 24 h-Intervallen wurde die RFU gemessen.

Zur Untersuchung der Zellzyklusprogression nach wt p53-Induktion wurden FACS-Analysen der Klone durchgeführt. Da die Zellzahlen bereits bei 24 h reduziert erschienen, wurde zunächst der Zellzyklus von DanG p53-3- und Mia p53-10-Zellen nach 6, 8, 10 und 12 h Inkubation mit Dox untersucht. Aus den FACS-Histogrammen war zu erkennen, dass zu diesen Zeitpunkten die wt p53-Expression im DanG-Zellklon noch keinen Einfluss auf den

Zellzyklus hatte. Im Zellklon Mia p53-10 konnte bereits nach 12 h Dox-Inkubation eine geringe Zellzunahme in der G1-Phase und eine Zellabnahme in der G2-Phase verzeichnet werden (Abb. 16).

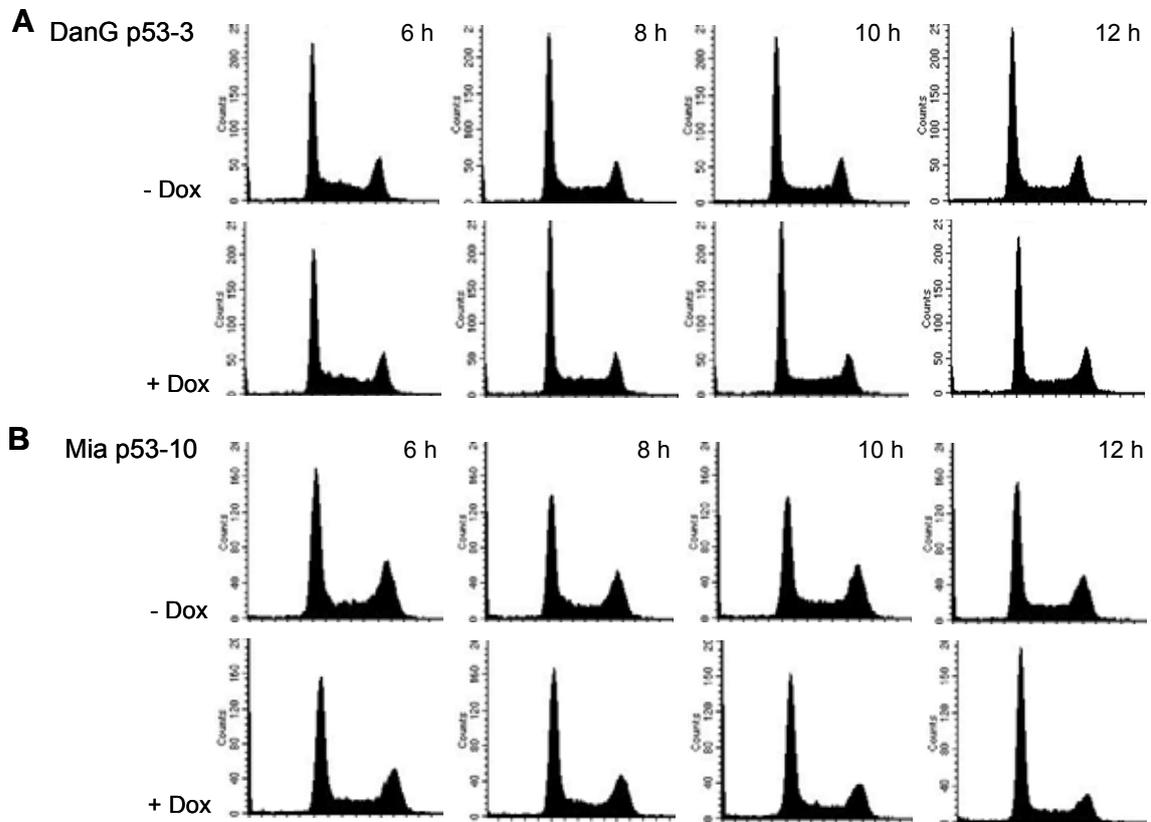


Abb. 16: Zellzyklusanalyse der Zellklone zu frühen Zeitpunkten der induzierten wt p53-Expression

Die Zellen A) DanG p53-3 und B) Mia p53-10 wurden nach 24 h Anwachsen mit und ohne 1 μ g/ml Dox im Vollmedium behandelt und die DNA der Zellen nach den Zeitpunkten 6, 8, 10 und 12 h mit Propidiumjodid gefärbt. Gezeigt sind repräsentative FACS-Histogramme.

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse wurden die weiteren Zellzyklusuntersuchungen nach 24, 48, 72 und 96 h Dox-Inkubation durchgeführt, um die Wirkung des induzierten wt p53 in einem längeren Zeitraum in den Zellen zu untersuchen. Beide Zelllinien zeigten nach der Dox-Behandlung eine deutliche und anhaltende Zellzunahme in der G1-Phase und eine Zellabnahme in der S- und G2-Phase. Das exogene wt p53 war somit in der Lage, einen G1-Zellzyklusarrest zu induzieren. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der FACS-Histogramme aus drei unabhängigen Experimenten gemittelt und sind in Abb. 17 dargestellt.

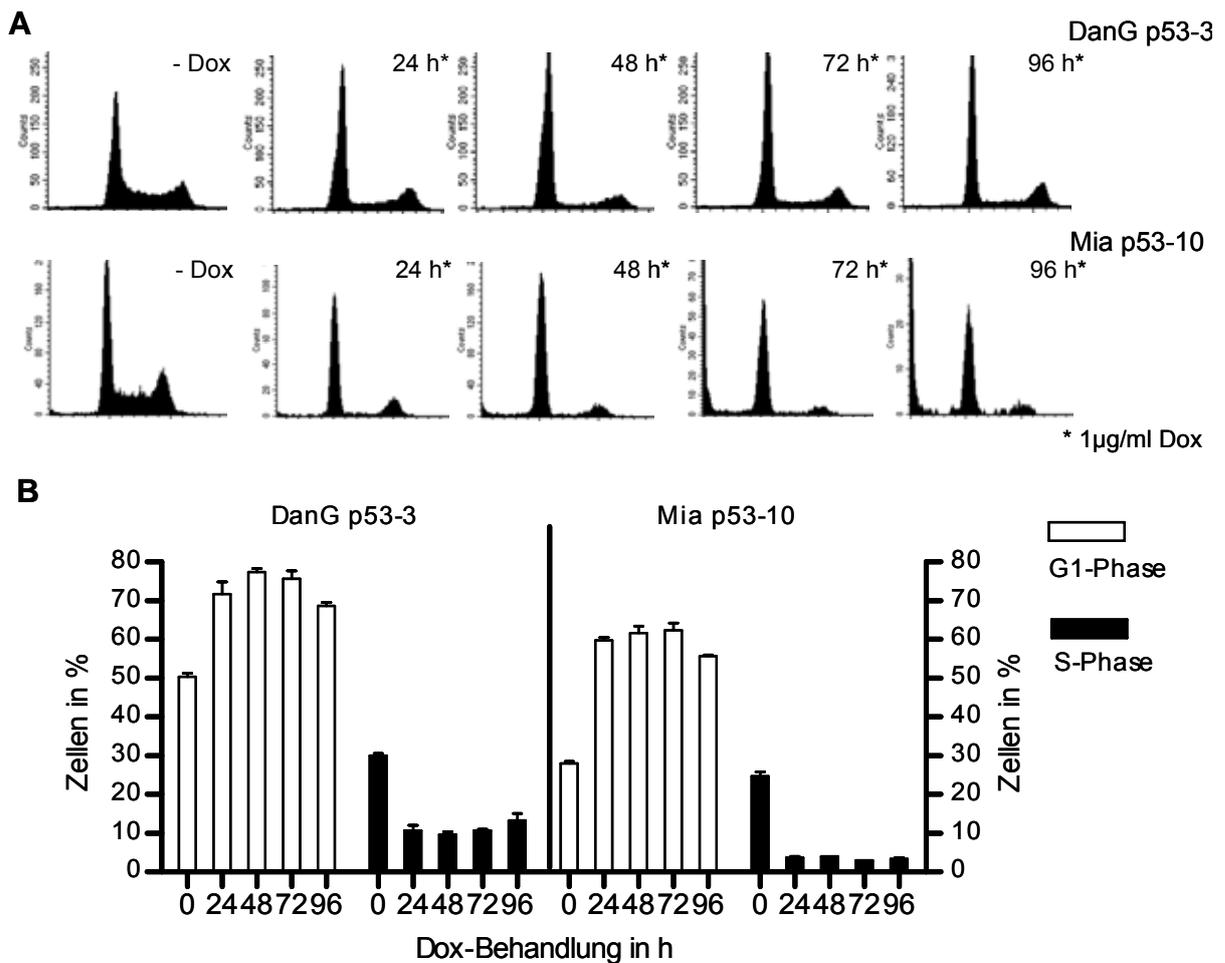


Abb. 17: Induktion von wt p53 führt zu G1-Zellzyklusarrest

A) FACS-Histogramme von DanG p53-3 und Mia p53-10 mit wt p53-Induktion über 96 h. Dafür wurden die Zellen ausgesät, nach 24 h Anwachsen mit und ohne 1 µg/ml Dox im Vollmedium behandelt und die DNA der Zellen nach der jeweiligen Zeit mit Propidiumjodid gefärbt. Gezeigt sind repräsentative FACS-Histogramme. B) Quantitative Auswertung der FACS-Histogramme von DanG p53-3 und Mia p53-10; hier dargestellt als % ±SEM der Zellen in den G1- und S-Phasen des Zellzyklus, n=3.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Induktion von wt p53 in beiden Pankreasadenokarzinom-Zelllinien zu einer Wachstumsinhibition auf der Grundlage eines G1-Zellzyklusarrests führte. Die Auswirkungen der wt p53-Induktion waren dabei in den DanG-Zellen später erkennbar und zeigten eine weniger starke Ausprägung bezüglich Wachstum und Zellzyklusarrest als in den MiaPaCa-2-Zellen.

4.1.5.2 Effekt des induzierten wt p53 auf Zellzyklus regulierende Proteine

Die Mechanismen der wt p53 vermittelten Zellzyklusinhibition sind auf zellulärer Ebene recht gut charakterisiert und beruhen zu einem wesentlichen Teil auf der p21-Induktion, einem Inhibitor zyklinabhängiger Kinasen (Coqueret, 2003; Sherr and Roberts, 1995).

Zur Prüfung der wt p53 vermittelten Induktion von p21 und zur Darstellung der Regulation der Zyklin abhängigen Kinasen (CDKs) bzw. Zykline in den hier etablierten Klonen wurden

Proteinlysate von Dox behandelten Zellen hergestellt und im Western Blot analysiert. In Abb. 18 sind die Ergebnisse der Immunoblots für die Zellklone DanG p53-3 und Mia p53-10 dargestellt. Dabei war die Verwendung des anti-p53-Antikörpers eine Bestätigung der wt p53-Induktion in den Zellen nach Dox-Zugabe. In den DanG-Zellen wurde eine geringe wt p53-Expression ohne Dox-Zugabe beobachtet, was für eine leichte „Leakiness“ des Expressionssystems spricht. Nach der Induktion der wt p53-Expression konnte eine deutliche Zunahme der p21-Expression in den Zellen beobachtet werden, die danach wieder abnahm. Die Kinetik der p21-Expression zeigte in dem DanG-Klon ihr Maximum bei 24 h und war damit schneller als in dem Mia p53-10-Zellklon, der das Maximum erst nach 48 h erreichte.

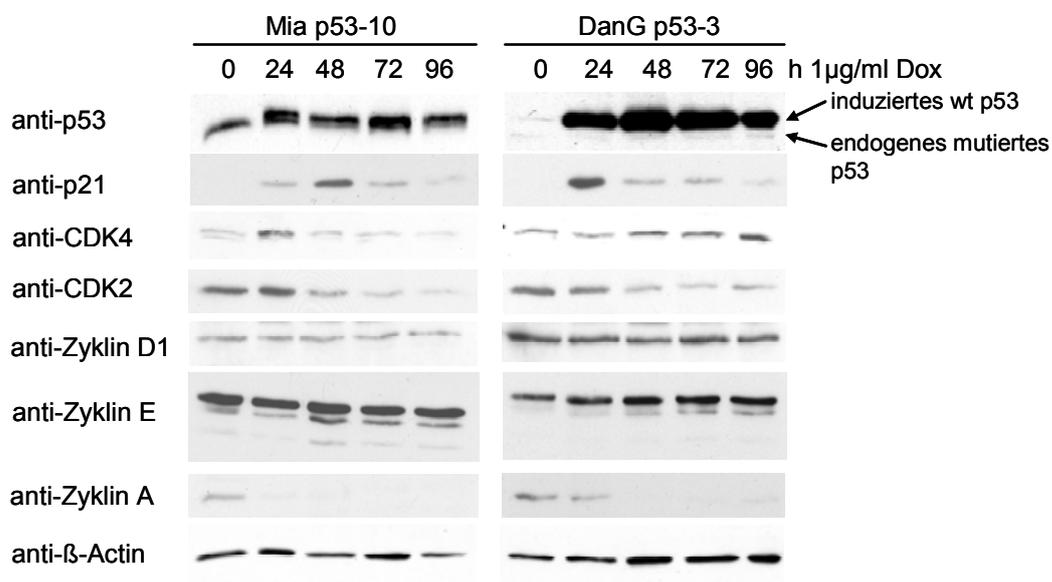


Abb. 18: Western Blot-Analyse verschiedener Effektoren in den wt p53 induzierbaren Pankreaskarzinom-Zelllinien

DanG p53-3- und Mia p53-10-Zellen wurden über 96 h mit 1 µg/ml Dox im Vollmedium behandelt. Alle 24 h wurden RIPA-Lysate hergestellt. Je nach Größe des nachzuweisenden Proteins wurden die Proteinlysate (15 µg Protein für p53-, p21- und β-Aktin-Nachweis und 30 µg Protein für CDK4-, CDK2-, Zyklin D1-, E- und A-Nachweis) in 10-15%igen Acrylamidgelen aufgetrennt. Diese Experimente wurden mindestens drei Mal unabhängig von einander durchgeführt und die Bandenintensität optisch zueinander ausgewertet.

Als Zellzyklusregulator inhibiert p21 die Aktivität der Zyklin/CDK-Komplexe in den verschiedenen Phasen der Zellzyklusprogression (Morgan et al., 1995; Pines et al., 1995). Aufgrund der FACS-Analysen mit einem deutlichen G1-Zellzyklusarrest war zu erwarten, dass regulierende CDKs und Zykline der G1- und der frühen S-Phase von der p21-Expression beeinflusst werden. Zu diesen gehören CDK4, 6 und 2 sowie die Zykline D, E und A. Wie aus der Abb. 18 zu entnehmen ist, konnte weder für Zyklin D noch für Zyklin E eine Regulation beobachtet werden. Erwartungsgemäß zeigte sich auch keine reproduzierbare Änderung der CDK4-Menge. Hingegen wurde eine deutliche Inhibierung von

CDK2 und Zyklin A gesehen. Zur Kontrolle wurde β -Aktin als unreguliertes und von Dox unbeeinflusstes Protein bestimmt und zeigte eine konstante Expression in beiden Zelllinien.

4.1.5.3 Einfluss der wt p53-Induktion auf Apoptose

Neben der Induktion des Zellzyklusarrestes ist wt p53 in der Lage, die Apoptosemaschinerie in Zellen mit irreparabler Schädigung zu aktivieren. Auf diesem Mechanismus beruht die Wirksamkeit einer Reihe gegenwärtig eingesetzter Chemotherapeutika.

In den FACS-Analysen in Abschnitt 4.1.5.1 war nach Dox-Zugabe keine prä-G1-Population und somit kein Hinweis auf eine Induktion von Apoptose erkennbar (Abb. 16 und Abb. 17). Zur Bestätigung dieser Befunde wurde zu frühen Zeitpunkten zusätzlich das mitochondriale Potential mit Hilfe einer JC-1-Färbung untersucht. Auch mit diesem Ansatz konnte keine Apoptose infolge der wt p53-Expression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Als zweites Verfahren zum Ausschluss wt p53 vermittelter Apoptose zu späteren Zeitpunkten (72 und 96 h) wurde die Apoptose spezifische Spaltung des Enzyms Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) im Western Blot untersucht. PARP ist ein hoch konserviertes Kernenzym, das in die DNA-Reparatur und in die Apoptoseantwort involviert ist. Dieses Enzym wird unter Apoptosebedingungen in der Zelle durch Caspase-3 gespalten, was mit der Chromatinkondensation korreliert und somit als Apoptosemarker gilt (Leist and Nicotera, 1997). Der im Western Blot verwendete anti-PARP-Antikörper erkennt das vollständige Enzym bei 116 kDa und das 85 kDa Apoptose bedingte, geschnittene PARP-Fragment. Im Gegensatz dazu entstehen unter Nekrosebedingungen veränderte Bandenmuster im Western Blot (89 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa). Die Analyse der PARP-Spaltung ist ebenfalls als relativ sensitive Nachweismethode der Apoptosereaktion einzustufen. Interferon(IFN)- γ induziert Apoptose (Detjen et al., 2001) und das Proteinlysate der damit behandelten Zellen wurde als Positivkontrolle verwendet. Für die Untersuchungen erhielten DanG p53-3- und Mia p53-10-Zellen Dox, IFN- γ und eine Kombination beider Behandlungen. Nach 72 h bzw. 96 h wurden SDS-Proteinlysate hergestellt und die PARP-Spaltung im Immunoblot untersucht. Dabei war die PARP-Spaltung lediglich in Zellen, die IFN- γ erhalten hatten, erkennbar (Pfeil in Abb. 19 Blot (I)). Das nach Dox-Zugabe exprimierte wt p53-Protein induzierte somit keine Apoptose und inhibierte sogar die INF- γ induzierte Apoptosereaktion. Erfolgreiche wt p53-Expression wurde in einem parallel geführten Western Blot gesichert und ist in Blot (II) Abb. 19 dargestellt.

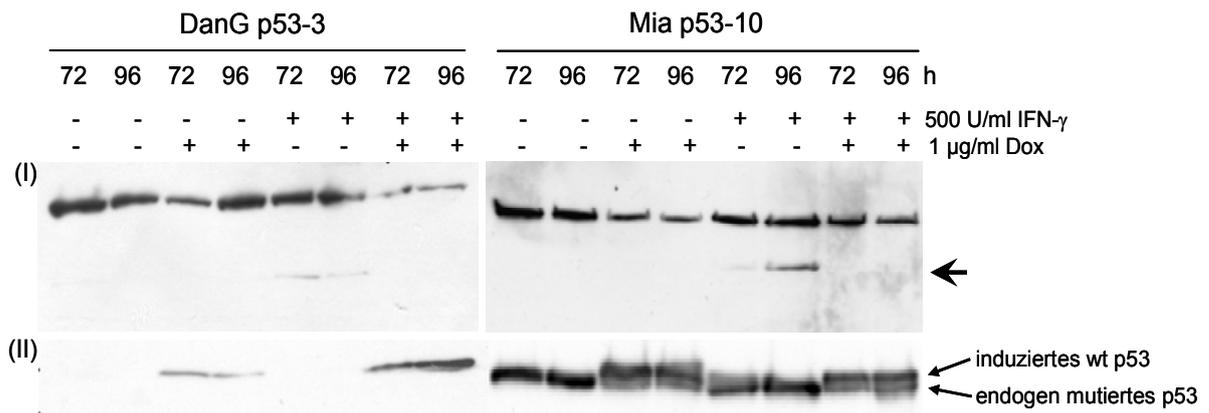


Abb. 19: Induziertes wt p53 inhibiert Apoptose in den Pankreaskarzinom-Zelllinien

Apoptosenachweis durchgeführt mit SDS-Proteinlysaten von DanG p53-3- und Mia p53-10-Zellen (3×10^5 Zellen/200 μ l SDS-Lysepuffer), die über 72 und 96 h mit und ohne 1 μ g/ml Dox und/oder 500 U/ml IFN- γ im Vollmedium behandelt wurden. Je 50 μ l Proteinlysate wurden auf ein 10%iges Acrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mit (I) anti-PARP-Antikörper bzw. (II) anti-p53-Antikörper detektiert.

4.1.5.4 Effekte der wt p53-Induktion auf die Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen

Zu den bekannten Effekten von wt p53, die im Zusammenhang mit der geplanten Verwendung der Zellklone *in vivo* von besonderem Interesse sind, gehört die wt p53-vermittelte Regulation pro-angiogener MMPs. Die Proteinasen bauen die Membran der Endothelzellen ab (Koshiba et al., 1998), was die Blutgefäßbildung und -einspritzung in den Tumor fördert (Itoh et al., 1997) und werden indirekt über eine Tsp-1-Aktivierung durch wt p53 inhibiert (Dameron et al., 1994). Um der Frage nachzugehen, welchen Einfluss die wt p53-Expression in den Pankreasadenokarzinom-Zelllinien auf diese an der Angiogenese beteiligten Faktoren *in vitro* hat, wurde die Aktivität der MMP-2 und -9 untersucht. Für den Aktivitätsnachweis dieser MMPs wurden aufkonzentrierte Kulturüberstände von Dox behandelten und unbehandelten DanG p53-3- und Mia p53-10-Zellen auf ein 10%iges Zymogrammigel aufgetragen. Nach der Entfärbung des Coomassie-Blaus entstehen als Nachweis des Gelatineverdaus durch die MMPs weiße Banden, wobei die aktive MMP-2-Form bei 64 kDa und die aktive MMP-9-Form bei 87 kDa erwartet wurden. In der Abb. 20 konnten bei beiden Zelllinien nur die Banden bei 87 kDa gesehen werden, die im Zeitraum von 48 h an Intensität zunahm. Das bedeutete eine gesteigerte Proteinmenge im Zellüberstand verbunden mit einer Aktivitätszunahme in diesem Zeitraum. Jedoch hat die Induktion von wt p53 weder in DanG noch in MiaPaCa-2 Einfluss auf die Regulation von MMP-9.

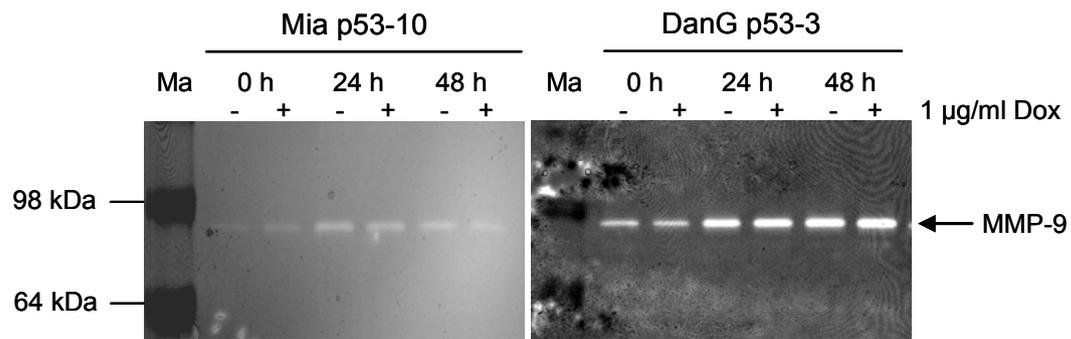


Abb. 20: Induziertes wt p53 zeigte keinen Einfluss auf die MMP-Regulation in den Pankreaskarzinom-Zelllinien

Zellkulturüberstände von Mia p53-10 und DanG p53-3 Zellen bis zu 48 h mit und ohne 1 µg/ml Dox in FBS-freiem Medium behandelt und auf ein Zymogrammgel (10%) aufgetragen. Nachweis der MMP-9 (87 kDa) als weiße Bande sichtbar nach Entfärbung des Coomassie-Blau gefärbten Gels. Ma – SeeBlue 2plus Proteinstandard

4.2 Das orthotope Mausmodell

Um nun die Folgen der wt p53-Reexpression *in vivo* untersuchen zu können, kam hier ein orthotopes Pankreaskarzinom-Modell zur Anwendung. In Anlehnung an die von Alves et al. (2001) publizierte Vorgehensweise wurde bereits in Vorexperiment überprüft, ob durch Implantation von wt MiaPaCa-2-Zellen in das Pankreas von Nacktmäusen orthotope Tumore induzierbar waren (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend spiegelte das hier etablierte orthotope MiaPaCa-2-Modell des Pankreaskarzinoms als tierexperimenteller Ansatz die klinisch relevanten Aspekte des humanen Karzinoms wider. So erlaubt es nicht nur Untersuchungen des Tumorwachstums und der Tumorigenität, sondern auch der Metastasierung und der Vaskularisierung in einem pathophysiologischen Kontext.

Ausgehend von diesen Vordaten konnten dann Untersuchungen mit Verwendung der MiaPaCa-2-Zellen mit induzierbarer wt p53-Expression geplant werden. Zur Untersuchung der wt p53-Effekte *in vivo* wurde der induzierbare Zellklon Mia p53-10 ausgewählt, der *in vitro* zuverlässig nach Dox-Behandlung wt p53-Expression sowie Inhibierung von Proliferation und Zellzyklusprogression zeigte. Nachdem in Vorexperimenten über einen Gesamtzeitraum von 56 Tagen keine schwerwiegenden Organschädigungen festgestellt worden waren, wurde die Gesamtdauer des Experimentes auf acht Wochen festgelegt. Insgesamt wurden 51 Tiere eingesetzt, die in zwei Gruppen geteilt wurden, um so den Einfluss einer frühen wt p53-Induktion und die Folgen der wt p53-Rekonstitution in bereits etablierten Tumoren zu untersuchen. Das Behandlungsschema ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Einteilung der Nacktmäuse für die wt p53-Induktion zu verschiedenen Zeitpunkten und deren Kontrollen

	Zusätze im Trinkwasser		Anzahl der Tiere	Behandlungsbeginn	Behandlungsdauer	Tumorentnahme nach
Gruppe I	2% Saccharose (Kontrolle)	- Dox	13	direkt nach Implantation	28 Tage	28 Tage
	2% Saccharose und 1 mg/ml Dox	+ Dox	12	direkt nach Implantation	28 Tage	28 Tage
Gruppe II	2% Saccharose (Kontrolle)	- Dox	13	28 Tage nach Implantation	28 Tage	56 Tage
	2% Saccharose und 1 mg/ml Dox	+ Dox	13	28 Tage nach Implantation	28 Tage	56 Tage

Nach Abschluss der jeweiligen Behandlungszeit wurden die Tiere schmerzlos getötet und die Primärtumore, suspekte intraabdominelle Läsionen und intraabdominelle Lymphknoten entnommen. Direkt nach der Entnahme wurden die Primärtumore gewogen und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren.

4.2.1 Einfluss der Induktion von wt p53 auf das Primärtumorwachstum

Die Primärtumore wurden nach ihrem Gewicht ausgewertet, das mittlere Gewicht einer Behandlungsgruppe mit der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen und die Signifikanz der Tumorgößenunterschiede berechnet.

In der Gruppe I mit Dox-Behandlung unmittelbar nach der Zellimplantation standen 12 Tiere zu Verfügung. Drei Mäuse dieser Gruppe entwickelten keinen Tumor oder die Tumore waren unterhalb der Nachweisgrenze bei der Sektion (weder sichtbar noch tastbar). Die Primärtumore der restlichen neun Tiere wiesen ein mittleres Tumorgewicht von $50,44 \pm 9,24$ mg auf. In der Kontrollgruppe waren es 13 Tiere mit einem mittleren Tumorgewicht von $343 \pm 65,66$ mg. Damit reduzierte die induzierte wt p53-Expression signifikant das Tumorgewicht und die behandelten Tiere wiesen ein ca. siebenfach geringeres Tumorgewicht als die Kontrollgruppe auf (Abb. 21A).

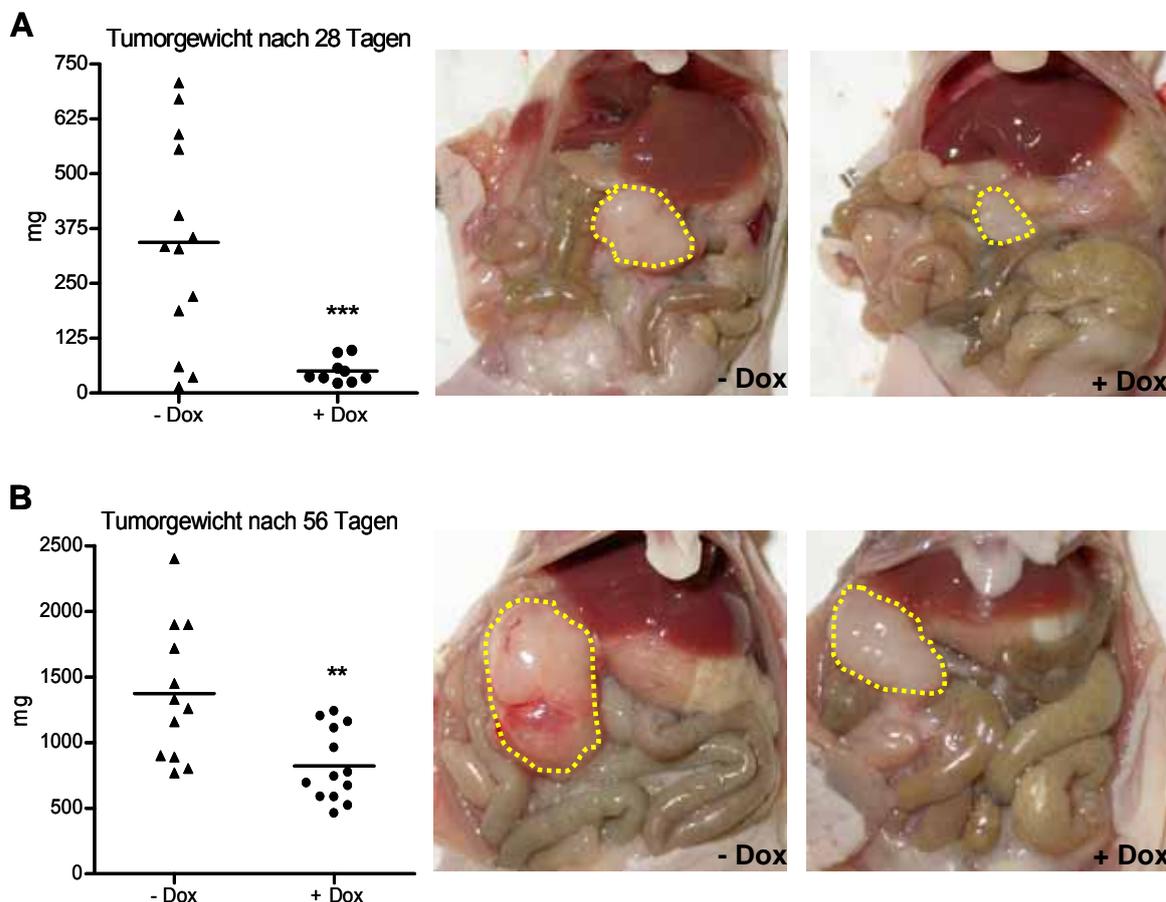


Abb. 21: Primärtumorwachstum ist in Dox behandelten Mäusen inhibiert

Die während der Sektion entnommenen Primärtumore wurden gewogen und die Tumorgewichte graphisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen Beispiele geöffneter Abdomen von Mäusen. Gelb umrandet dargestellt ist der jeweilige Primärtumor. A) Gruppe I behandelt mit +/- Dox im Trinkwasser für 28 Tage von Beginn des Tumorwachstums an. *** $p=0,0015$ B) Gruppe II behandelt mit +/- Dox im Trinkwasser für 28 Tage nach vier Wochen Tumorwachstum. ** $p=0,0027$

In der Gruppe II wurden 13 Tiere ab Tag 28 mit Dox behandelt und damit die wt p53-Expression in bereits etablierten Tumoren induziert. In der Kontrollgruppe ohne Dox-Behandlung standen ebenfalls 13 Tiere zur Verfügung. Die entnommenen Primärtumore der behandelten Gruppe wiesen ein mittleres Tumorgewicht von $822,2 \pm 76,55$ mg auf, was eine signifikante Gewichtsreduktion (1,7fach) in Bezug auf die Kontrollgruppe mit einem mittleren Tumorgewicht von $1374 \pm 149,3$ mg bedeutete (Abb. 21B). In der Kontrollgruppe entwickelte eine Maus keinen Tumor, was hier auf die Zellimplantation zurückzuführen war, und wurde nicht in die Auswertung mit einbezogen.

4.2.2 Einfluss der induzierten wt p53-Expression auf die Ausbildung makroskopischer Läsionen in den Mäusen

Als suspekta intraabdominelle Läsionen werden sichtbare Gewebsauflagerungen auf Darm, Leber, Lunge, Magen, Milz und/oder Nieren betrachtet und gelten auch als makroskopische Metastasen. Bei der Auswertung wurde nicht die Auflagerung eines einzelnen Organs bewertet, sondern nur zwischen Metastasen positiver oder negativer Mäuse unterschieden. Die Tiere mit wt p53-Induktion zu einem frühen als auch zu einem späteren Zeitpunkt wiesen keine makroskopische Metastasierung auf. Dagegen entwickelten eins von 13 Kontrolltieren der Gruppe I und vier von 12 Kontrolltieren der Gruppe II intraabdominelle Läsionen (Abb. 22).

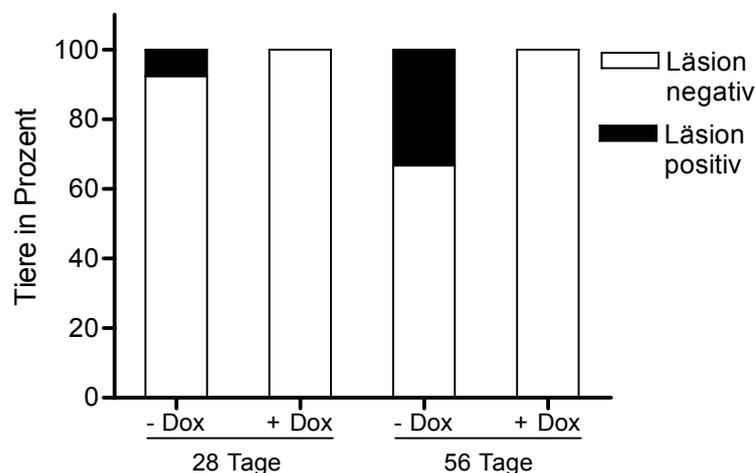


Abb. 22: Mäuse mit Dox-Behandlung wiesen keine intraabdominellen Läsionen auf

Während der Sektion wurden alle suspekten Gewebsauflagerungen auf Darm, Leber, Lunge, Magen, Milz und/oder Nieren entnommen. Dabei wurden die Tiere der einzelnen Behandlungsgruppen nur nach Gewebsauflagerung negativ oder positiv eingeteilt.

4.2.3 Nachweis der wt p53-Flag-Expression in den Dox behandelten Tumoren

Trotz der eindrucksvollen Tumorreduktion in den Dox behandelten Tumoren sowohl zum frühen als auch zum späteren Zeitpunkt sollte die wt p53-Flag-Expression anhand von

immunhistologischen Färbungen gezeigt werden. Da der in Frage kommende anti-Flag-Antikörper aus der Spezies Maus stammt, wurde der Animal Research Kit (ARK) eingesetzt, um eine unspezifische Bindung eines anti-Maus Sekundärantikörpers an das Mausgewebe der Tumorschnitte zu verhindern. Zur Testung des Antikörpers in Verwendung mit dem ARK wurde zunächst die wt p53-Flag-Expression in Dox behandelten Mia p53-10-Zellen immunzytologisch untersucht. Diese zeigten eine deutliche Färbung der Kerne, was der wt p53-Flag-Expression entsprach. Die unbehandelten Mia p53-10-Zellen zeigten keine bis nur leichte Rotfärbung der Kerne (Abb. 23). Damit zeigte sich der anti-Flag-Antikörper auch in Kombination mit dem ARK als geeignet, die Induktion von wt p53-Flag zu prüfen.

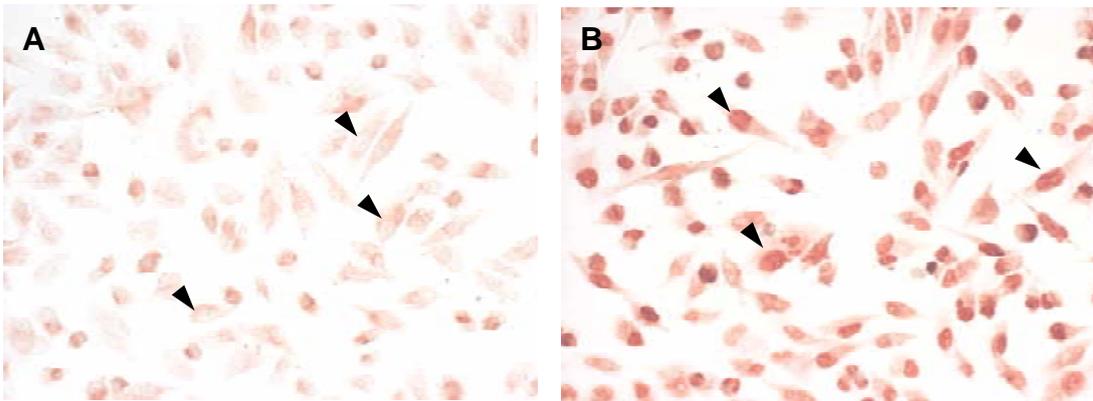
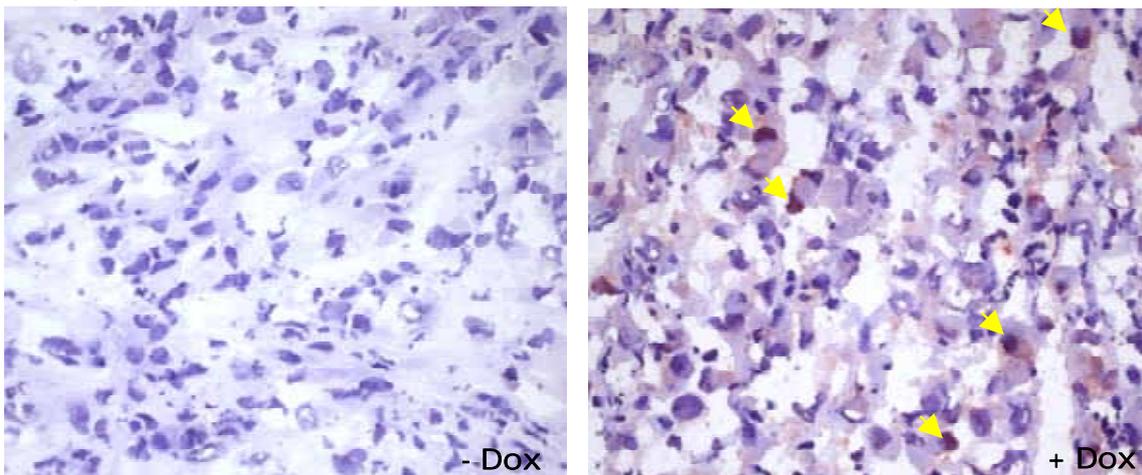
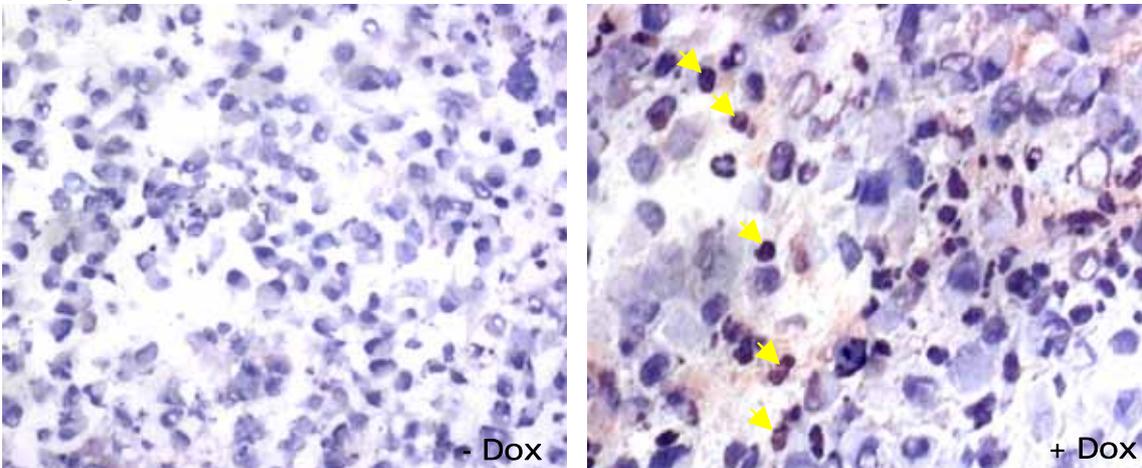


Abb. 23: Immunzytologischer Nachweis von wt p53-Flag in den Zellen Mia p53-10

Für die Darstellung der wt p53-Flag-Induktion wurden die Zellen unter Verwendung des ARK mit dem anti-Flag-Antikörper (7,5 µg) immunzytologisch gefärbt. Zellen wurden zuvor 48 h im Vollmedium A) ohne Dox und B) mit 1 µg/ml Dox behandelt. Pfeile zeigen Zellkerne. Die Zellen sind bei einer 200 x Vergrößerung aufgenommen.

Alle Tumore wurden immunhistologisch mit dem anti-Flag-Antikörper unter Verwendung des ARK gefärbt, wobei die Auswertung der immunhistologischen Flag-Färbung optisch im Lichtmikroskop erfolgte. Es wurde zwischen positiver und negativer Flag-Expression unterschieden und die positive Färbung zusätzlich graduell abgestuft. Für die Gruppe I konnten Flag-positive Tumorzellen in den Dox behandelten Tieren, nicht aber in den unbehandelten Kontrolltieren beobachtet werden. Jedoch war die Anzahl der wt p53-Flag exprimierenden Zellen sehr gering und ließ graduell kaum Unterschiede zwischen den Tumoren erkennen.

Tiergruppe 1**Tiergruppe 2****Abb. 24: Immunhistologische Untersuchung der wt p53-Flag-Expression in den Tumorzellen**

Für die Darstellung der wt p53-Flag-Expression wurden die Tumorzellen immunhistologisch mit dem anti-Flag-Antikörper unter Verwendung des ARK gefärbt. Abgebildet ist jeweils eine Tumorzelle beider Tiergruppen mit und ohne Dox-Behandlung. Die gelben Pfeile zeigen Beispielzellkerne mit Signal des Flag-Tags. Die Bilder sind bei einer 400fachen Vergrößerung aufgenommen.

In den Dox behandelten Tieren aus Gruppe II konnte ebenfalls in nur wenigen Tumorzellen die wt p53-Flag-Expression nachgewiesen werden. In der unbehandelten Kontrollgruppe waren vereinzelt Tumorzellen mit positivem Flag-Signal zu verzeichnen. Repräsentative Beispielbilder der immunhistologischen Flag-Tag-Färbung der Primärtumore sind in Abb. 24 zu sehen.

4.2.4 Einfluss der induzierten wt p53-Expression auf die Vaskularisierung

Einer der wesentlichen Gründe für die Wahl des orthotopen Mausmodells bestand in der Möglichkeit, im konkreten Organkontext der Tumorzellen den Effekt von wt p53-Induktion auf die Vaskularisierung prüfen zu können.

Die humanen Tumorzellen bilden aufgrund des fortschreitenden Tumorwachstums pro-angiogene Faktoren und Gefäße aus dem umliegenden Mausegewebe werden veranlasst, zur besseren Versorgung in den Tumor einzuwachsen. Um den Einfluss der induzierten wt p53-Expression auf die Vaskularisierung in den Mia p53-10-Tumoren zu untersuchen, wurden Gefäße mit verschiedenen endothelzellspezifischen Markern dargestellt. Die dargestellten Gefäße wurden in drei so genannten Hotspots (Stellen hoher Signaldichte) ausgezählt und ergaben die Gefäßdichte (*vessel density*) eines Tumors, was zur Abschätzung der Vaskularisierung der Tumore herangezogen wurde.

Angiogenese

Der MEC 13.3-Antikörper bindet an CD31, welches auch als PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) bekannt ist und wird auf Endothelzellen exprimiert (Delisser et al., 1993). Die CD31-dargestellten Gefäße ergaben die *micro vessel density* (MVD). Die in Abb. 25 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Induktion von wt p53 zu einem frühen Zeitpunkt die Zahl der CD31-gefärbten Gefäße signifikant gegenüber der unbehandelten Gruppe erhöhte (-Dox:16,78±2,161 vs. +Dox:29,37±5,588; p=0,0196). Die Dox-Behandlung und die damit verbundene wt p53-Expression in den Tieren mit bereits etablierten Tumoren führte im Trend zu einer Abnahme der CD31-gefärbten Gefäße, die jedoch nicht signifikant zur Kontrollgruppe war (-Dox:32,74±4,465 vs. +Dox:26,50±2,586; p=0,2298).

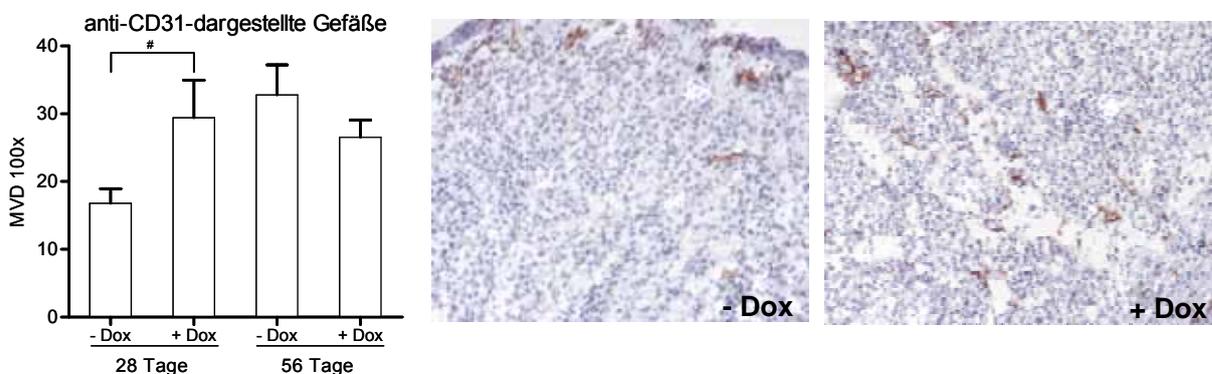


Abb. 25: Effekt des induzierten wt p53 auf die Gefäßbildung in den Primärtumoren

Die Primärtumore der Mäuse wurden immunhistologisch mit einem mausspezifischen anti-CD31-Antikörper gefärbt und die Gefäßdichte bei 100facher Vergrößerung in Hotspots ausgezählt; die ermittelten MVD-Werte graphisch dargestellt und die Signifikanz in den Gruppen mit und ohne Dox-Behandlung anhand Student's-t-Test bestimmt #p=0,0196. Gezeigt sind repräsentative Beispielbilder (100fache Vergrößerung) von Primärtumoren der Gruppe I.

Lymphangiogenese

Lyve-1 wurde identifiziert als Hauptrezeptor für das extrazelluläre Matrix-Glycosaminoglycan-Hyaluronan auf Lymphgefäßen und wird so für die spezifische Detektion von Lymphgefäßen eingesetzt. Die Auszählung der Hotspots ergab die *lymphatic vessel density* (LVD) (Banerji et al., 1999). Die Tumore wiesen eine relativ hohe Lymphgefäßdichte auf. Die in Abb. 26

dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Induktion von wt p53 zu beiden Zeitpunkten die Zahl der Lyve-1-gefärbten Gefäße signifikant zur unbehandelten Gruppe erhöhte (Gruppe I - Dox: $9,292 \pm 1,941$ vs. +Dox: $28,18 \pm 5,617$; $p=0,0011$; Gruppe II -Dox: $23,11 \pm 1,841$ vs. +Dox: $32,15 \pm 3,178$; $p=0,0214$). Somit war die Lymphangiogenese in den Dox behandelten Tieren gegenüber den unbehandelten gesteigert.

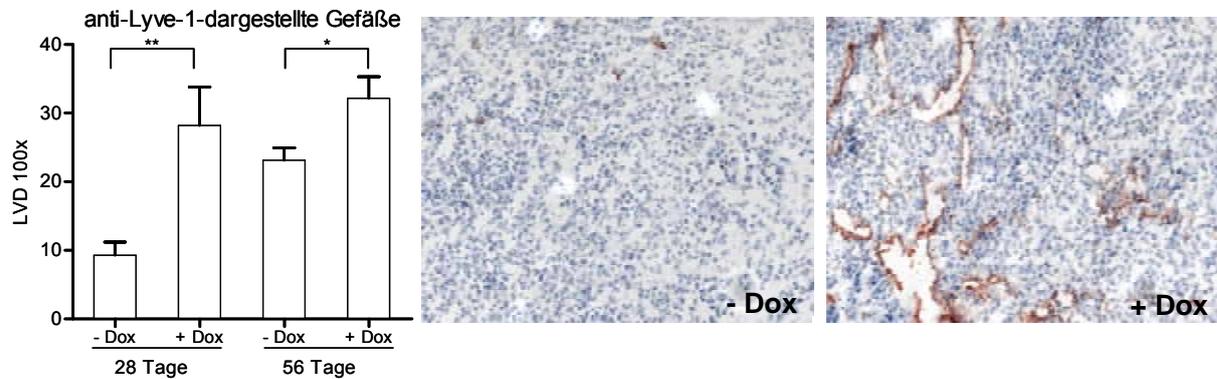


Abb. 26: Effekt des induzierten wt p53 auf die Lymphgefäßbildung in den Primärtumoren

Die Primärtumore der Mäuse wurden immunhistologisch mit einem mausspezifischen anti-Lyve-1-Antikörper gefärbt und die Gefäßdichte bei 100facher Vergrößerung in Hotspots ausgezählt. Die ermittelten LVD-Werte wurden graphisch dargestellt und die Signifikanz in den Gruppen mit und ohne Dox-Behandlung anhand Student's-t-Test bestimmt $**p=0,0011$; $*p=0,0214$. Gezeigt sind repräsentative Beispielbilder (100fache Vergrößerung) von Primärtumoren der Gruppe I.

Hämangiogenese

Bei der Auswertung der Färbungen war auffällig, dass bei der CD31-basierten Färbung relativ niedrige Gefäßdichten ermittelt worden waren. Daher wurde an Tumormaterial der Gruppe II noch zusätzlich Färbungen an Serienschnitten für CD31, Lyve-1 und CD34 durchgeführt (Abb. 28). Der RAM34-Antikörper erkennt das CD34-Glycoprotein, welches auf dem Endothelium von Kapillaren exprimiert wird (Baumhueter et al., 1994). In diesen Serienschnitten erwies sich CD34 als sensitiverer Marker, durch den insgesamt intensivere Färbungen und damit verbunden höhere Gefäßdichten ermittelt wurden. Diese ebenfalls zu einer MVD zusammengefassten CD34-dargestellten Gefäße zeigten wie die CD31-Färbung im Trend eine Abnahme in den Tumoren der Dox behandelten Tiere gegenüber den unbehandelten (Gruppe II -Dox: $64,92 \pm 11,92$ vs. +Dox: $47,60 \pm 4,746$; $p=0,1535$) (Abb. 27).

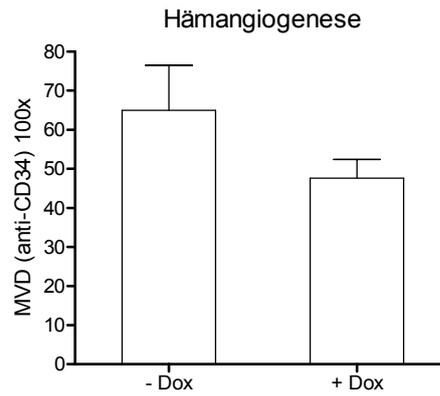
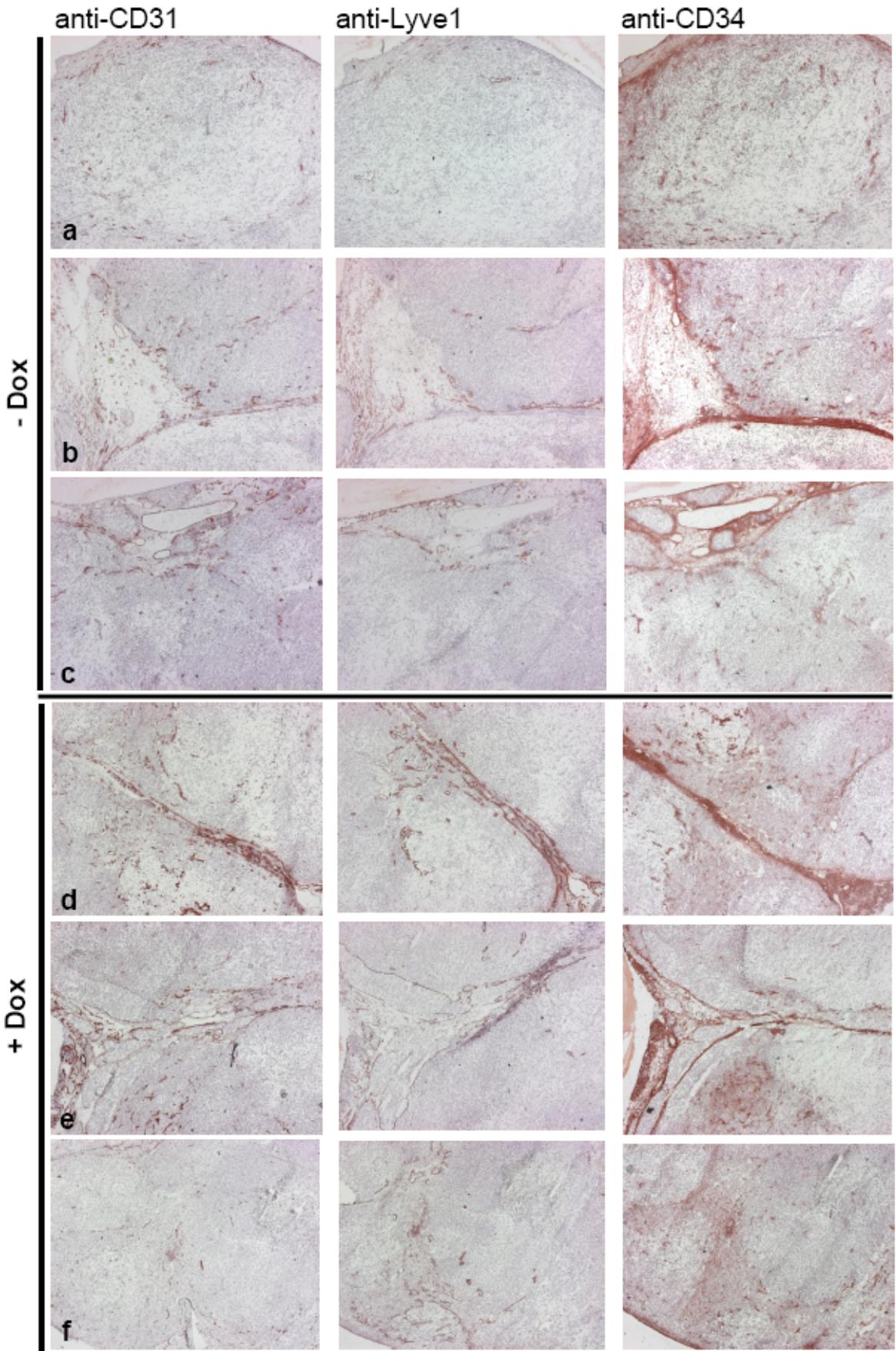


Abb. 27: Effekt des induzierten wt p53 auf die Blutgefäßbildung in den Primärtumoren

Die Primärtumore der Mäuse der Gruppe II wurden immunhistologisch mit einem mausspezifischen anti-CD34-Antikörper gefärbt und die Gefäßdichte bei 100facher Vergrößerung in Hotspots ausgezählt. Die ermittelten MVD-Werte wurden graphisch dargestellt und die Signifikanz zwischen den Dox behandelten und den unbehandelten Tieren ermittelt.

Abb. 28: Tumorserienschnitte von Mäusen der Gruppe II

Tumorserienschnitte immunhistologisch mit den Antikörpern anti-DC31, anti-Lyve-1 und anti-CD34 gefärbt. a – c Tumorschnitte von Tumoren unbehandelter Mäuse; d – f Tumorschnitte von Tumoren Dox behandelter Mäuse; Jeweils das gleiche Blickfeld der Beispieltumore wurde bei einer 25x Vergrößerung aufgenommen (Abbildung folgende Seite).



4.2.5 Einfluss der induzierten wt p53-Expression auf Metastasierung

Das orthotope Mausmodell eignete sich ebenfalls, die Metastasierung der experimentellen Tumore im repräsentativen Organkontext zu beurteilen. Hierzu wurden immunhistologische Färbungen mit dem pan-Zytokeratin-Antikörper an den intraabdominellen Leberhilus-Lymphknoten und am Mesenterium durchgeführt. Dieser Antikörper erkennt spezielle Polypeptide auf humanen Zellen und somit kann die Zelleinwanderung in die Lymphknoten der Maus detektiert werden. Die Auswertung erfolgte optisch im Lichtmikroskop, wobei die Ergebnisse qualitativ gemäß der positiven bzw. negativen Nachweisbarkeit humaner Zellen in den Lymphknoten erfasst und in Prozent dargestellt wurden.

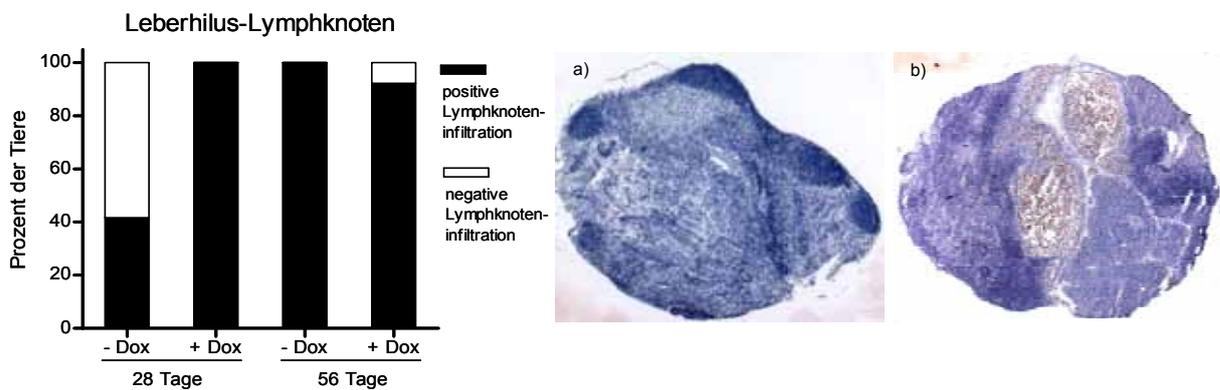


Abb. 29: Einfluss des induzierten wt p53 auf das Metastasierungsverhalten in intraabdominelle Lymphknoten

Die während der Sektion entnommenen Lymphknoten wurden immunhistologisch mit einem pan-Zytokeratin-Antikörper gefärbt und unter dem Lichtmikroskop in positiv oder negativ unterteilt. Es sind die positiven bzw. negativen Tiere in Prozent für den Leberhilus-Lymphknoten dargestellt und Beispiel-Lymphknoten a: negativer Leberhilus-Lymphknoten und b: positiver Leberhilus-Lymphknoten gezeigt. Aufgenommen bei einer Vergrößerung von 250x

In den untersuchten mesenterialen Lymphknoten konnten keine Metastasen festgestellt werden, weder in den unbehandelten Kontrollgruppen noch in den wt p53-induzierten Gruppen zu beiden Zeitpunkten der Dox-Behandlung (Daten nicht gezeigt).

Im Unterschied dazu war die Infiltration der Lymphknoten am Leberhilus ein häufiges Ereignis und es ergaben sich hier deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Gruppe I mit Dox-Behandlung konnten von den neun Tieren mit Primärtumor sieben hinsichtlich des Vorliegens einer Metastasierung in den Leberhilus-Lymphknoten untersucht werden. Alle Lymphknoten dieser Gruppe wiesen Zellen mit einer positiven pan-Zytokeratin-Färbung auf. In der dazugehörigen Kontrollgruppe standen die Leberhilus-Lymphknoten von zwölf Tieren für die immunhistologische Auswertung zur Verfügung und fünf Lymphknoten zeigten eine positive Reaktion auf die Färbung mit dem pan-Zytokeratin-Antikörper. Das bedeutete eine signifikante Erhöhung ($p=0,0174$) der detektierbaren humanen Zellen in den Leberhilus-Lymphknoten. In der Gruppe II wurden von 13 behandelten Tieren die Leberhilus-

Lymphknoten untersucht, und einer zeigte keine Infiltration mit humanen Zellen. Bei der Kontrollgruppe wiesen von den elf untersuchten Tieren alle Lymphknoten metastasierte humane Zellen auf (Abb. 29). Zusammenfassend ließen diese Daten eine vermehrte lymphatische Ausbreitung von Tumorzellen nach wt p53-Induktion in der frühen Phase des Tumorwachstums erkennen.

Abschließend konnte in der hier vorgelegten Arbeit der Ansatz der Kombination eines induzierbaren Expressionssystems mit dem orthotopen Mausmodell des Pankreaskarzinoms erfolgreich umgesetzt werden. Die Induktion des Tumorsuppressors wt p53 resultierte in einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums, die bei der frühen Induktion besonders stark ausgeprägt war. Weiterhin führte die wt p53-Induktion zum frühen Zeitpunkt zu einer Steigerung der lymphatischen Metastasierung, die am ehesten auf der zu diesem Zeitpunkt signifikant erhöhten Lymphangiogenese in diesen Tumoren beruhen dürfte.