

5 Diskussion

Das Pankreasadenokarzinom ist eine der aggressivsten Tumorarten mit einer durchschnittlichen Überlebensrate von unter 3% in den ersten fünf Jahren (Jemal et al., 2005). Bereits in einem frühen Stadium treten in nahezu allen Pankreaskarzinomen genetische Veränderungen in dem Proto-Onkogen *K-Ras* auf, mit fortschreitender Tumorprogression akkumulieren weitere Mutationen in den verschiedensten Genen, zu denen auch der Tumorsuppressor *p53* gehört. Sowohl genetisch verändertes *K-Ras* als auch der Funktionsverlust von *p53* tragen zur abnormen Zellproliferation und Apoptoseresistenz in den Tumorzellen des Pankreasadenokarzinoms bei (Bardeesy and DePinho, 2002; Hruban et al., 2000; Schneider and Schmid, 2003). Die genetischen Veränderungen begünstigen darüber hinaus Metastasierung und Tumorangiogenese (Rak et al., 2000). In dieser hier vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe der Kombination eines Tetrazyklin induzierbaren Systems mit dem orthotopen Mausmodell ein neuer Ansatz zur Untersuchung der biologischen Bedeutung bestimmter genetischer Veränderungen für die komplexen Aspekte der Tumorbilogie des Pankreaskarzinoms aufgezeigt werden.

5.1 Das induzierbare System

Das Tetrazyklin induzierbare System konnte in drei von den sechs ausgewählten Pankreaskarzinom-Zelllinien etabliert werden, DanG, MiaPaCa-2 und Panc-1. Vorexperimente mit der jeweiligen Wildtypzelllinie im orthotopen Mausmodell ergaben, dass DanG- und MiaPaCa-2-Zellimplantation zu einem ausgeprägten Tumorwachstum in Nacktmäusen führte. Dagegen wuchs nach wt Panc-1-Zellimplantation im Pankreas der nu/nu Maus kein Tumor heran (unveröffentlichte Daten). Aus diesem Grund wurden die weiteren Klonierungen und Untersuchungen auf den DanG TReX9-Zellklon sowie auf die MiaPaCa-2 TReX10- bzw. pTeton4-Varianten beschränkt. Obschon letztendlich erfolgreich, erwies sich die Etablierung der tetrazyklinresponsiven Ausgangszelllinien als außerordentlich aufwändig, wozu mehrere Faktoren beitrugen:

Erstens wurde insgesamt nur eine niedrige Ausbeute gut induzierbarer Zellklone erzielt und zweitens wurden unerwarteterweise sehr deutlich Unterschiede in der Ausbeute induzierbarer Klone zwischen den beiden verwendeten Systemen (Clontech und Invitrogen) beobachtet. Darüber gehören die hier verwendeten Pankreaskarzinom-Zelllinien zu den Zelllinien mit sehr geringer Transfizierbarkeit.

Infolge dieser ungünstigen Konstellation mussten einige der Zelllinien wiederholt transfiziert werden und es war nachfolgend unerlässlich, eine große Anzahl individueller Klone zu

überprüfen (Tabelle 4). Für die Zelllinie DanG wurden beispielsweise je vier Transfektionen für jedes System durchgeführt; dennoch konnten insgesamt nur 28 Klone bezüglich ihrer Dox-Induzierbarkeit getestet werden. Dagegen wurde für die Zelllinien MiaPaCa-2 und Panc-1 jeweils nur eine Transfektion durchgeführt, aus der genügend testbare Klone generiert werden konnten.

Für die unterschiedliche Ausbeute im Vergleich der beiden verwendeten Vektorsysteme könnten zusätzlich auch Unterschiede in der Konstruktion der Vektoren verantwortlich sein. Das pTet-on-System basiert auf einem reversen Transaktivator (rTA), einem Hybridprotein aus dem bakteriellen TetR und der viralen VP16-Domäne. Eine starke Expression des rTAs ist toxisch für Zellen, was möglicherweise durch die VP16-Domäne verursacht wird (Chi et al., 2005). Bei dem T-RExTM-System wurde die virale Domäne aus dem rTA entfernt, somit besteht dieses nur noch aus dem bakteriellen Tet-Repressorprotein, welches sich nach Dox-Zugabe ablöst. Den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit zufolge könnte dieser Aspekt bei der stabilen Transfektion der hier ausgewählten Pankreasadenokarzinom-Zelllinien eine Rolle spielen. Denn mit dem T-RExTM-System waren im Trend mehr Klone und vor allem Klone mit deutlich stärkerer Induzierbarkeit erzielbar. Das spiegelte sich in den ca 10- bis 20-fach höheren Luziferaseausbeuten bei den transienten Transfektionen wider, in denen identische Luziferasekonstrukte Verwendung fanden (Abb. 9). Im direkten Vergleich der Ausbeuten und Induzierbarkeit der beiden Systeme von Clontech und Invitrogen blieb als Ergebnis festzuhalten, dass die Verwendung des T-RExTM-Systems in Pankreasadenokarzinom-Zelllinien von Vorteil war.

Ein entscheidendes Kriterium für die Klonauswahl war die Hintergrundexpression des TetRs bzw. des rTAs ohne Dox-Gabe, die sich in den doppelt transfizierten Zelllinien später als „Leakiness“ des Systems widerspiegelt und unter Umständen in biologisch relevanter Expression des induzierbaren Targetgens unter Kontrollbedingungen resultiert (Abb. 9). Diese Problematik bietet auch eine plausible Erklärung für die Schwierigkeit, Klone der Pankreaskarzinom-Zelllinien, hier speziell von DanG-Zellen, mit induzierbarer *K-Ras*-siRNA zu isolieren. Sofern aufgrund von Leakiness keine exakte Regulation der siRNA-Expression gewährleistet werden kann, kann die siRNA auch ohne Induktion in geringer Kopienzahl abgelesen werden, wodurch aber bei diesem Ansatz bereits ein erheblicher mRNA-Abbau des mutierten *K-Ras* ausgelöst werden kann. So ist denkbar, dass dieser Mechanismus das klonogene Wachstum der transfizierten Zellen verhinderte. Wang und Kollegen zeigten eine sehr starke Erhöhung der Apoptoserate nach einem Knockdown von mutiertem *K-Ras* in MiaPaCa-2-Zellen (Wang et al., 2003). Eine solche vermehrte Apoptoseneigung könnte die Ursache bilden für die hohen Absterberaten bei dem Versuch, die DanG-Klone zu passagieren. In Unterstützung dieser Hypothese wurde bei dem DanG TREx9-Zellklon nach

der Transfektion des pcDNA4/TOWtp53Flag-Konstruktes eine erheblich „Leck“-Expression in Abwesenheit von Dox festgestellt (Abb. 18), jedoch war in diesem Fall die Expansion und Passagierbarkeit der Zellen nicht beeinträchtigt. Da das siRNA-Konstrukt bei den MiaPaCa-2-Zellen aufgrund der anderen *K-Ras*-Mutation nicht eingesetzt werden konnte, fehlt leider der direkte Vergleich in dem MiaPaCa-2 TReX10-Klon, bei dem „Leck“-Expression nahezu nicht zu beobachten war (vergleiche Abb. 9, Abb. 14 und Abb. 18). Trotz der den induzierbaren Systemen eigenen Problematik der Leckexpression wurde der regulierbare Gen-Knockdown mittels siRNA-Technologie aber bereits erfolgreich an β -Catenin/TCF4 in kolorektalen Krebszellen gezeigt (van de et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde erstmals der Vergleich für Etablierung und Induzierbarkeit der Systeme von Clontech und Invitrogen so deutlich erbracht und zeigte, dass die Verwendung des T-REXTM-Systems in Pankreasadenokarzinom-Zelllinien von Vorteil ist.

5.2 Die *in vitro*-Auswirkungen der wt p53-Rekonstitution in Pankreasadenokarzinom-Zellen

Die induzierbare wt p53-Rekonstitution stellt den Kern der vorliegenden Arbeit dar. Der Ansatz der wt p53-Reexpression *in vitro* wurde bereits von mehreren verschiedenen Arbeitsgruppen auf unterschiedliche Art und Weise verfolgt und die Auswirkungen in verschiedenen Tumorzelllinien charakterisiert (Lang et al., 1998; Moretti et al., 1997; Tilleray et al., 2006). Dabei wurde nach wt p53-Reexpression für Panc-1-Zellen Zellzyklusarrest und Apoptose, für ARO-Zellen Zellzyklusarrest und Zunahme der Reaktion auf physiologische Stimulanzen und in H1299-Zellen Zellzyklusarrest in Abwesenheit von Apoptose beobachtet. In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Pankreaskarzinom-Zelllinien mit induzierbarer wt p53-Expression, DanG p53-3 und Mia p53-10, im Hinblick auf den *in vivo*-Einsatz im orthotopen Mausmodell etabliert, bei dem eine kontrollierte wt p53-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorprogression beabsichtigt war. Entsprechend diente unsere *in vitro*-Charakterisierung der Zelllinien auch in erster Linie der Bestätigung der kontrollierten und regulierten Expression eines funktionell intakten wildtypischen p53-Proteins.

Da in den Pankreaskarzinom-Zelllinien das mutierte p53 ebenso exprimiert wird und die kommerziell erhältlichen anti-p53-Antikörper sowohl mutiertes als auch wt p53 erkennen, war es erforderlich, das induzierte wt p53-Protein von dem endogenen Protein zu unterscheiden. Durch den Einbau einer kurzen *Flag*-Sequenz an das 3'-Ende des offenen Leserahmens der wt p53-Sequenz stand ein Mittel zur sicheren Unterscheidung der beiden Proteine zur Verfügung. Diese *Flag*-Sequenz kommt nicht in humanen Zellen vor und ist mit Hilfe eines

sehr spezifischen anti-Flag-Antikörpers detektierbar (Einhauer and Jungbauer, 2001). Wt p53 wurde bereits von Overholt und Kollegen erfolgreich mit der *Flag*-Sequenz getaggt, wobei die biologischen Effekte des wt p53-Proteins sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch die *Flag*-Sequenz nicht verändert wurden (Overholt et al., 1997). Diese Ergebnisse können durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden. Bei der Untersuchung der Effekte der wt p53-Induktion auf die Proliferation wurde eine ausgeprägte und anhaltende Inhibierung des Zellwachstums in den beiden Zellklonen DanG p53-3 und Mia p53-10 festgestellt (Abb. 15 und Abb. 17). Diese Beobachtung legte nahe, dass in den Zellsystemen funktionell intaktes wt p53 induziert wurde, und die Zellen damit für weitere Experimente verwendet werden konnten.

Die weitere Charakterisierung der etablierten DanG p53-3- und Mia p53-10-Zellklone beinhalteten deshalb Zellzyklusanalyse bzw. Apoptosenachweis zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion der wt p53-Expression. Hierbei war in beiden induzierbaren Zelllinien ein prägnanter G1-Arrest nach wt p53-Induktion (Abb. 17) festzustellen. Allerdings ergaben weder die hier durchgeführten Zellzyklusanalysen noch die Darstellung des mitochondrialen Potentials Hinweise auf Apoptoseinduktion *in vitro*. Auch konnten nach Behandlung der Zellen mit Dox über 96h keine der apoptosetypischen Poly (ADP-Ribose)-Polymarase(PARP)-Spaltprodukte (Leist and Nicotera, 1997) nachgewiesen werden. (Abb. 19). In den bereits publizierten Untersuchungen wurde wt p53 sowohl als Regulator des Zellzyklus wie auch als Initiator von Apoptose ausführlich beschrieben (Ginsberg et al., 1991; Hall et al., 1996; Mack et al., 1993). In der Arbeit von D. Lang und Kollegen (1998) wurde mittels Temperatur-sensitiver Methode in Panc-1-Zellen gezeigt, dass durch die wt p53-Induktion zu einem frühen Zeitpunkt (bis 12 h nach Induktion) in 60-70% der Zellen Apoptose induziert wurde und in nur 30-40% der Zellen ein stabiler nichtreversibler Wachstumsarrest stattfand. Im Unterschied zu diesen Beobachtungen wurde für das hier gewählte System keine Apoptoseinduktion beobachtet, was möglicherweise auf einer unterschiedlichen Apoptoseneigung der beiden Zelllinien oder aber auch auf Unterschiede in der Menge des reexprimierten p53-Proteins beruhen könnte. Ergebnisse von V. Tilleray und Kollegen (2006) belegten nach wt p53-Rekonstitution in Lungenkrebszellen analog zu den hier vorgelegten Daten nur Zellzyklusarrest und keine Apoptoseinduktion. Die Daten von Moretti et al. (1997), der wt p53 in humanen Thyroidkarzinom-Zellen reexprimiert hatte, legten ebenfalls einen Zellzyklusarrest und keine Apoptose nahe.

Interessant war die Tatsache, dass es sich bei dem hier klonierten wt p53 um die Wildtypvariante mit dem Polymorphismus Prolin in Kodon 72 handelte. Die Daten anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass genau diese Variante einen G1-Zellzyklusarrest verursachte, während in Saos-2- und H1299-Zellen durch die Wildtypvariante Arginin des wt p53-Proteins

eher Apoptose induziert wurde (Buckbinder et al., 1994; Sullivan et al., 2004). Der in dieser Arbeit gezeigte G1-Arrest der Pankreasadenokarzinom-Zelllinien DanG und MiaPaCa-2 nach wt p53-Induktion (Abb. 17) zeigte somit gute Übereinstimmung mit diesem Modell differentieller Effekte der beiden Wildtypvarianten, das dem Polymorphismus Prolin im Kodon 72 einen G1-Arrest zuschreibt. Die unterschiedliche Anbindung der natürlich vorkommenden wt p53-Varianten mit Arginin oder Prolin in Kodon 72 an *downstream* liegende Effektoren ist von großer Relevanz für die Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika, was an Proben von Patienten mit Kopf- und Nackentumoren (HNSCC) untersucht wurde (Sullivan et al., 2004). In dieser Studie hatten Patienten, welche die Wildtypvariante p53 Arginin exprimierten, bei Behandlung mit einer auf Cisplatin-basierender Chemo-Radiotherapy eine deutlich längere Überlebenszeit als Patienten, die in den Allelen des wt p53-Protein Arginin/Prolin oder Prolin allein exprimierten.

Bei der Untersuchung von wt p53-Effektoren in den induzierbaren Zelllinien wurde eine Induktion der p21-Expression festgestellt (Abb. 18). P21 ist ein Zellzyklusregulator und blockiert durch Bindung an die Zyklin/CDK-Komplexe die ATP-Kopplung (Coqueret, 2003). Da die Zellzyklusanalyse in den DanG p53-3- und Mia p53-10-Zellen nach wt p53-Induktion das Bild eines klaren und ausgeprägten G1-Arrests ergab, konnte die Untersuchung der p21-Induktionspartner und -effektoren auf Zyklin/CDK-Komplexe der G1-Phase beschränkt werden. Dabei wurde eine Inhibierung des Zyklin A und der CDK2 festgestellt, wohingegen sich die Zykline D1 und E bzw. der CDK4 jedoch unbeeinflusst zeigten (Abb. 18). Der Komplex Zyklin A/CDK2 ist am Fortgang der Zelle durch die S-Phase beteiligt (Vermeulen et al., 2003), so dass Inhibierung des Komplexes zur Inhibierung der DNA-Replikation führt. Entsprechend zeigten die DNA-Histogramme auch einen nahezu vollständigen Verlust der S-Phase. Insgesamt entspricht das Regulationsmuster am besten zu einem späten G1-Arrest. Nach DNA-Schädigung kann auf diese Art Zeit zur DNA-Reparatur bereitgestellt werden (Gottlieb and Oren, 1998; Prives and Hall, 1999).

Einer ausgeprägten Induktion von p21 wird in der Literatur oftmals auch eine Hemmung der p53-abhängigen Apoptose zugeschrieben (Bissonnette and Hunting, 1998; Zhang et al., 1999). Hier konnte für die DanG- und MiaPaCa-2-Zellen bestätigt werden, dass durch p53-Induktion in der Tat die IFN- γ vermittelte Apoptose (Detjen et al., 2001) unterbunden wird. Verantwortlich für die Apoptoseinhibierung könnte hier in den Pankreaskarzinom-Zelllinien die nachgewiesene p21-Expression sein.

Zum Abschluss der Charakterisierung der induzierbaren Zelllinien wurde der wt p53-Einfluss auf die Proteinase MMP-2 und -9 untersucht. Diese Gelatinasen spielen eine pro-angiogene Rolle in der Entstehung von Gefäßen (Stetler-Stevenson, 1999). Sie werden in Pankreaskarzinom-Patienten von allen MMPs am häufigsten nachgewiesen (Bloomston et

al., 2002). Ihr inhibitorischer Gegenspieler Tsp-1 gehört der Gruppe der wt p53 induzierten Effektoren an (Bornstein et al., 2004; Dameron et al., 1994). Allerdings ließ die Darstellung der MMP-9-Aktivität im Zymogramm-Gel (Leber and Balkwill, 1997) hier keine Regulation durch wt p53-Induktion erkennen. MMP-2-Aktivität wurde für die Pankreaskarzinom-Zellen nicht beobachtet (Abb. 20). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten für die in Kultur gehaltenen Capan-2- bzw. PancTu-1-Zellen ebenfalls keine MMP-2-Aktivität nachweisen (Alves et al., 2001a; Uchima et al., 2004). Allerdings wurde bei PancTu-1-Zellen eine MMP-2-Expression in orthotopen Tumoren von SCID-Mäusen beobachtet, was eine besondere Bedeutung der Tumor-Stroma-Interaktion für die Induktion der MMP-2-Ausschüttung nahe legt (Alves et al., 2001b). Entsprechend könnte das Fehlen dieses Kontexts hier eine Ursache für das Fehlen der MMP-2-Aktivität in den Pankreasadenokarzinom-Zelllinien DanG und MiaPaCa-2 *in vitro* bieten.

Zusammenfassend lieferten die in dieser Arbeit erhobenen *in vitro* Daten eine ausführliche Charakterisierung der Zellklone als Voraussetzung für deren Verwendung *in vivo* und spiegelten dabei wesentliche vorbeschriebene Funktionen des Tumorsuppressors wider.

5.3 Die *in vivo*-Auswirkungen der wt p53-Rekonstitution in Pankreasadenokarzinom-Zellen

5.3.1 Orthotopes Mausmodell des Pankreasadenokarzinoms

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die orthotope Zellimplantation die Tumorbiologie und Erkrankungssymptome des jeweiligen humanen Tumors besser abbildet als die weitverbreiteten subkutanen Modelle. Dies wurde nicht nur für Pankreaskarzinom-Zellen, sondern auch für kolorektale Karzinomzellen, Nierenkarzinomzellen, Melanomzellen und Lungentumorzellen gezeigt (Fidler et al., 1991; Fidler, 1991; Kameya et al., 1976; Outzen and Custer, 1975; Sharkey and Fogh, 1984; Stanbridge and Perkins, 1976).

Kennzeichnend für das humane Pankreasadenokarzinom sind schnelles, aggressives und invasives Wachstum, frühe Metastasierung, schwache antigene Reaktion und häufige Therapieresistenz bekannt (Hermanek, 1998; Hruban et al., 2000; Jura et al., 2005; Laheru and Jaffee, 2005; Rosewicz and Wiedenmann, 1997). Einige dieser Aspekte können durch einen orthotopen Ansatz abgebildet werden. So wurde nach der orthotopen Zellimplantation in den Pankreas ein extensives Tumorwachstum, Invasion in das umliegende Gewebe und sowohl lokale als auch distale Metastasierungen beobachtet (Alves et al., 2001b; Tan and Chu, 1985). Hierbei dürften Interaktionen der Tumorzellen mit den organotypischen

mesenchymalen und endothelialen Zellen eine bedeutsame Rolle spielen. So zeigte sich nach PancTu-1-Zellimplantation in den Pankreas von immundefizienten Mäusen (SCID) eine starke Expression der MMP-2, die zur Tumorinvasion beitrug. Im Gegensatz dazu wurde in den subkutan implantierten PancTu1-Zellen nur eine schwache MMP-2-Expression festgestellt. In der Zellkultur konnte für diese Zelllinie keine MMP-2-Immunreaktion detektiert werden. Somit stellen ortstypische Tumor-Stroma-Interaktionen wichtige Faktoren für das invasive und metastasierende Wachstumsverhalten von Tumoren dar (Alves et al., 2001b). Die Daten von Fidler (1995) legten darüberhinaus nahe, dass die Organ-Mikroumgebung wichtig ist und einen Einfluss auf die Reaktion des Tumors auf Chemotherapeutika haben könnte.

Wegen der besseren Vergleichbarkeit der pathophysiologischen Situation im Tiermodell zum humanen Karzinom (Alves et al., 2001b; Bruns et al., 1999; Mohammad et al., 1998) wurde in der vorgelegten Arbeit das orthotope Mausmodell gewählt, das jedoch erheblich aufwendiger und schwieriger zu etablieren war als eine subkutane Zellimplantation.

5.3.2 Kombination des orthotopen Mausmodells des Pankreaskarzinoms mit wt p53 induzierbaren MiaPaCa-2-Zellen

Orthotope Xenograftmodelle des Pankreaskarzinoms sind bislang nicht zur Prüfung der Funktion von p53 eingesetzt worden. Der in der vorgelegten Arbeit verfolgte Ansatz der Kombination des orthotopen Tiermodells mit einem induzierbaren System konnte hier neue Aspekte beleuchten. Vordaten bezüglich der Expression von wt p53 in *in vivo* lagen aber für die hier verwendeten MiaPaCa-2-Zellen an subkutanen Tumoren bereits vor, wobei von Ghaneh und Kollegen (2001) ein adenovirales Expressionssystem eingesetzt wurde. Diese Untersuchungen beschrieben ein deutlich reduziertes Tumorwachstum, konnten aber naturgemäß keine Aussagen zu Metastasierung treffen (Ghaneh et al., 2001).

Da für die induzierbaren Zelllinien mehrfache Transfektionen erforderlich waren, galt es zu prüfen, ob diese Manipulationen per se einen bedeutsamen Einfluß auf die Wachstumscharakteristika der orthotopen Tumore hatten. Erfreulicherweise war aber bei den genetisch modifizierten MiaPaCa-2-Zellen ein gutes Tumorwachstum zu beobachten (Abb. 21), wobei nach acht Wochen das Gewicht des Primärtumors in unbehandelten Tieren in etwa den Gewichten nach Implantation von wt MiaPaCa-2-Zellen oder einer anderen genetisch modifizierten MiaPaCa-2-Variante mit induzierbarem wt p16 im T-RExTM-System entsprach (unveröffentlichte Daten). Weiterhin wiesen die unbehandelten Kontrolltiere auch makroskopische Metastasen auf (Abb. 22). Diese Beobachtungen legen eine gute Reproduzierbarkeit der tumorbiologischen Charakteristika unabhängig von klonaler Variation nahe und untermauern die Eignung des Systems zur Bearbeitung der hier gestellten Fragen.

Um sicherzustellen, dass die Dox-Behandlung bei allen Tieren der Behandlungsgruppe tatsächlich zur Reexpression von wt p53 geführt hatte, sollte der Flag-Nachweis genutzt werden, der in entsprechenden Kontrollexperimenten *in vitro* erfolgreich etabliert war. Im Unterschied zu den Kontrollen konnten in den angefertigten Tumorschnitten der Dox behandelten Mäuse Zellen mit einem positiven Flag-Signal beobachtet. Allerdings zeigte nur ein Teil der Tumorzellen dabei eine positive Färbung, was ganz besonders in Gruppe II mit später Induktion von wt p53 auffällig erschien (Abb. 24). Ein negativer Selektionsdruck gegenüber Zellen mit hohem Expressionsniveau des Tumorsuppressors bietet hier eine mögliche Erklärung. Darüber hinaus könnten Störungen der Perfusion in den größeren Tumoren auch zu ungenügender Zufuhr von Dox geführt haben. Anhand der vorhandenen Tumorproben zum Zeitpunkt der Autopsie bleibt offen, ob vielleicht zu einem früheren Zeitpunkt eine ausgeprägtere wt p53 in der Mehrzahl der Tumorzellen vorlag und wie die genaue Kinetik der *in vivo*-Geneinduktion einzuschätzen ist.

Obwohl die wt p53-Rekonstitution nicht in allen Tumorzellen dokumentiert werden konnte, waren die biologischen Effekte der erzielbaren Reexpression erheblich. Im Ergebnis zeigten die hier erhobenen Daten eine deutliche Verringerung des Tumorwachstums nach Dox-Stimulation. Weiterhin konnten bei den Dox behandelten Tieren beider Gruppen keine makroskopischen Metastasen beobachtet werden.

Diese Befunde konnten für beide Behandlungsmodalitäten, die frühe und die späte Induktion des Tumorsuppressors, bestätigt werden. Das Progressionsmodell nach Hruban et al. (2000) ordnet den wt p53-Funktionsverlust durch Mutation den fortgeschritteneren PanINs zu, so dass eine Beteiligung am Transformationsprozeß und bei der Tumorprogression anzunehmen ist. In dieser Arbeit wurde die wt p53-Expression zu zwei verschiedenen Zeitpunkten induziert, von Beginn des Tumorwachstums und in bereits gut etablierten Tumoren.

Die frühe wt p53-Rekonstitution in den Tumoren zielte auf die Frage der wt p53-Funktion im Rahmen des Transformationsprozesses und somit für die Tumorentstehung ab. Dabei fand die Reexpression von wt p53 in MiaPaCa-2-Zellen vor dem Hintergrund einer aktivierenden Mutation im *K-Ras*-Gen und einer funktionellen Inaktivierung von p16 (Moore et al., 2001) statt. Durch dieses frühe Induktionsprotokoll wurden besonders ausgeprägte Effekte erzielt. In drei der Tiere konnte kein Tumor nachgewiesen werden und das mittlere Tumorgewicht in den behandelten Tieren war um ca. das Siebenfache verringert (Abb. 21). Bei einer Anwachsrate der Tumorzellen von > 96% (25 von 26 Tieren) in den Kontrollen lässt sich das Fehlen der Tumorinduktion bei insgesamt drei Tieren nicht als zufälliges Ereignis erklären, so dass in diesen Fällen durch wt p53 die Tumorbildung offenbar vollständig unterbunden

wurde. Trotz der Mutation im *K-Ras* und p16-Deletion konnte durch wt p53 also das Tumorstadium stark bzw. vollständig unterdrückt werden.

Die Induktion der wt p53-Expression in bereits etablierten Tumoren zielte eher auf die therapeutische Fragestellung ab. Der überwiegende Teil der Pankreaskarzinome wird in einem späten Stadium diagnostiziert (Laheru and Jaffee, 2005) und ist nur schwer zu therapieren (Hruban et al., 2000; Rosewicz and Wiedenmann, 1997). Die Rekonstitution der Wildtypfunktion von wichtigen Tumorsuppressoren wie dem wt p53 bietet neue Ansatzpunkte (Wang et al., 2003), jedoch ist die Wirksamkeit in fortgeschrittenen Tumorstadien nicht immer experimentell geklärt. Das Tumorgewicht der Tiergruppe II der hier angefertigten Arbeit mit der späteren Dox-Behandlung reduzierte sich um das 1,7fache im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Abb. 21). Wird davon ausgegangen, dass das Tumorgewicht der Tiergruppe II bei Behandlungsbeginn im Durchschnitt dem der unbehandelten Mäuse der Tiergruppe I entsprach, so könnten die Ergebnisse auch anders ausgedrückt werden: Die etablierten Tumore nahmen so ohne Behandlung das Vierfache ihres Gewichtes zu. Im Gegensatz dazu erhöhte sich das Tumorgewicht der behandelten Tumore nur um ca. das 2,4fache zum Ausgangsgewicht. Der Sachverhalt, dass die *in vitro* wt p53 induzierten Pankreaskarzinom-Zellen einen prägnanten G1-Arrest und keine Apoptose zeigten, könnte auch eine Erklärung für das geringere Tumorgewicht in den Dox behandelten Mäusen sein. Dazu trägt die Tatsache bei, dass wie erwähnt die Tumore der behandelten Mäuse der Tiergruppe II in etwa so groß waren wie die Tumore der unbehandelten Mäuse aus Gruppe I und nicht wesentlich kleiner. Letzteres würde demzufolge ein Hinweis auf Apoptose sein.

Diese Inhibition des Tumorstadiums durch wt p53-Induktion bestätigt die Ansätze, wt p53-Rekonstitution als Therapiemöglichkeit zu erforschen (Wang et al., 2003). Dies wird später in dieser Arbeit ausführlicher beschrieben.

Eine Wachstumsinhibition durch wt p53 zeigte Ghaneh und Kollegen (2001), jedoch war in der Arbeit das Tumorstadium mit durchgängiger wt p53-Rekonstitution im Vergleich zu Tumoren ohne wt p53 nach drei Wochen um das ca. 3,2fache und nach 7,5 Wochen nur um das ca. 2,4fache reduziert. Diese Reduktion des Tumorstadiums nach wt p53-Reexpression ist im Vergleich zu den hier vorliegenden Daten geringer, wohlgleich diese Gegenüberstellung durch zu viele unterschiedliche Komponenten in der Methodik nur eine Tendenz zu lässt. Sie zeigt aber auch, dass die orthotop erhobenen Daten wesentlich realistischer in Bezug auf die humane Krankheit sein können.

Eine Limitation, die sowohl den subkutanen als auch den orthotopen Ansatz betrifft, liegt in der Verwendung immundefizienter Tiere, so dass die Immunzellen als wichtiger Bestandteil des Tumors hier nicht abgebildet werden. Die relative Bedeutung dieser Limitation bei

Pankreaskarzinom-Modellen wird kontrovers diskutiert. Ältere Arbeiten belegen, dass der Pankreastumor in immundefizienten Mäusen wie das humane Karzinom wächst und metastasiert (Giovannella et al., 1972; Sharkey and Fogh, 1984; Shimosato et al., 1976). Des Weiteren verglichen Giovannella und Kollegen das Tumorwachstum und Metastasierungspotential in unterschiedlich immundefizienten Mäusen und fanden, dass das Metastasierungspotential nicht mit einer höheren Immundefizienz anstieg. Neuere Xenograft-Untersuchungen zeigten jedoch, dass orthotop implantierte Pankreaskarzinome in SCID-Mäusen stärker metastasierten als in Nacktmäusen (Alves et al., 2001b). Die Daten der hier vorgelegten Arbeit wurden lediglich in Nacktmäusen erhoben und somit ist kein Vergleich möglich. Jedoch wiesen die Tiere insgesamt eine relativ geringe makroskopische Metastasierung auf und die Anwendung dieser hier etablierten Pankreaskarzinom-Zellen in SCID-Mäusen könnte zu einem aussagekräftigeren Ergebnis führen. Das humane Pankreaskarzinom zeigt klinisch nur eine schwache antigene Reaktion und löst kaum Immunreaktion im menschlichen Körper aus (Laheru and Jaffee, 2005). Deshalb könnte die Anwendung des orthotopen Pankreaskarzinom-Modells in immundefizienten Mäusen kaum an Aussagekraft und Vergleichbarkeit in Bezug auf die Immunreaktion zur humanen Krankheit verlieren.

5.3.3 Folgen der wt p53-Induktion auf Tumorangiogenese und Metastasierung *in vivo*

Zur Klärung der Fragestellung des wt p53-Einflusses auf Tumorangiogenese und Metastasierung *in vivo* stand mit dem verwendeten orthotopen Mausmodell des Pankreaskarzinoms ein System zur Verfügung, das es erlaubt, diese Parameter in einem physiologisch relevanten Kontext zu messen. Spezifisch wurden hier Gefäßdichte und Tumorzellmetastasierung in Lymphknoten beurteilt.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass wt p53 *in vitro* indirekt über eine Tsp-1-Aktivierung die Angiogenese hemmte (Bornstein et al., 2004; Dameron et al., 1994). In letzter Zeit wurde zudem berichtet, dass wt p53 durch Bindung von Co-Faktoren, z.B. Sp-1, die VEGF-Expression in Zellen inhibierte (Mukhopadhyay and Datta, 2004; Neid et al., 2004). Dagegen fördert mutiertes p53 sogar die VEGF-Expression mit Folge einer erhöhten Vaskularisierung im Tumor (Cadwell and Zambetti, 2001; Joo et al., 2002). Die Studie schloss eine Gruppe mit 30 Pankreaskarzinom-Patienten ein, bei der Joo und Kollegen (2002) eine Signifikanz zwischen p53-Mutation und erhöhter VEGF-Expression feststellen konnten. In verschiedenen Arbeiten wurde eine erhöhte Gefäßdichte in Tumoren beschrieben, die mit einem invasiveren Wachstum bzw. geringerem Überleben der Patienten

einherging (Joo et al., 2002; Moon et al., 2003; Niedergethmann et al., 2002; Sedivy et al., 2003).

In der hier vorgelegten Arbeit wurde die Analyse der Gefäßdichte anhand verschiedener Endothelzellspezifischer Marker vorgenommen. Dabei detektiert der anti-CD31-Antikörper ein allen Endothelzellen gemeinsames Epitop, CD31 oder auch PECAM-1, der anti-Lyve-1-Antikörper den spezifisch in Lymphgefäßen exprimierte Hauptrezeptor für extrazelluläre Matrix-Glycosaminoglycan-Hyaluronan und der anti-CD34-Antikörper erkennt das spezifisch in den Endothelzellen der Blutkapillaren exprimierte CD34-Glycoprotein (Baumhueter et al., 1994; Delisser et al., 1993; Mouta et al., 2001). In den Tumoren der Mäuse, bei denen die wt p53-Induktion unmittelbar nach Tumorzellimplantation eingeleitet worden war, erhöhten sich die mit Hilfe von anti-CD31- und anti-Lyve-1-Antikörpern ermittelten MVD- bzw. LVD-Werte gegenüber denen der Tumore unbehandelter Tiere (Abb. 25 und Abb. 26). Gleichzeitig lag in den behandelten Tumoren eine ausgeprägte Wachstumsinhibition vor, die auch die Funktionalität von wt p53 im Tiermodell bestätigte. Die erhöhte Gefäßdichte in den wt p53 exprimierenden Tumoren passte jedoch zu der ebenfalls signifikant gesteigerten Metastasierung in die Lymphknoten des Leberhilus, die in den behandelten Mäusen aus Gruppe I beobachtet wurde (Abb. 29). Im Unterschied zur gesteigerten lymphogenen Metastasierung in den Tieren dieser Gruppe war aber makroskopisch keine vermehrte intraabdominelle Metastasierung zu verzeichnen, wobei der frühe Zeitpunkt auch hier keine aussagekräftige makroskopische Beurteilung von Metastasen zulässt. Andere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass eine Invasion in umliegende Gewebe und Metastasierung in den Tieren erst nach 21 Tagen nachgewiesen und ab mehr als 40 Tagen Tumorstadium eine ausgeprägte Metastasierung in den Tieren beobachtet wurde (Alves et al., 2001a). Die Sektion nach 28 Tagen war vermutlich zu früh für die Beurteilung der makroskopischen Metastasierung in den hier verwendeten nu/nu Mäusen. Die bereits zum frühen Zeitpunkt stattgefundenen lymphogenen Metastasen in den Leberhilus-Lymphknoten bestätigte den Vergleich zur humanen Krankheit, bei der die Tumorzellen sich schnell vom Verband ablösen und in umliegende Gewebe und Lymphknoten infiltrieren (Hermanek, 1998; Jura et al., 2005).

Nach Wiederherstellung der wt p53-Expression blieb die anhand von CD31- und CD34-dargestellte Vaskularisierung in bereits etablierten, gut wachsenden Tumoren unverändert, wohingegen auch in dieser Gruppe wieder eine signifikante Erhöhung der LVD verzeichnet wurde. Da in diesem fortgeschrittenen Tumorstadium sämtliche Kontrolltiere sowie 12/13 Tieren der Behandlungsgruppe eine Infiltration der Leberhilus-Lymphknoten erkennen ließen, konnte hier die Frage nach der funktionellen Relevanz einer derart gesteigerten LVD nicht beantwortet werden. Dafür konnten in der späteren Behandlungsgruppe

aussagekräftige Befunde bezüglich der makroskopischen Metastasierung erhoben werden: Es wurden in 33,3% der unbehandelten Tiere intraabdominelle Läsionen diagnostiziert, wohingegen kein Tier der Dox behandelten Gruppe II makroskopische Metastasen zeigte. Diese Inhibierung der Metastasierung nach wt p53-Induktion korreliert mit den Ergebnissen von Loukopoulos et al. (2004). Diese Arbeitsgruppe untersuchte das *in vivo*-Verhalten verschiedener Pankreaskarzinom-Zelllinien im orthotopen Modellansatz. Dabei konnte festgestellt werden, dass die orthotop implantierten Zelllinien, welche endogenes wt p53 exprimierten, weniger Metastasen in Organen und Lymphknoten aufwiesen bei ähnlichem Tumorwachstum wie die endogen mutiertes p53 exprimierenden Zelllinien (Loukopoulos et al., 2004).

Bei der hier angewendeten immunhistologischen Färbung der Gefäße konnte nicht sichergestellt werden, ob diese Gefäße voll funktionsfähig und an das Gefäßsystem des Organismus angeschlossen waren. Der Frage der Gefäßreifung und der damit verbundenen Funktionsfähigkeit ist Bordel et al. nachgegangen und konnte nachweisen, dass die wt p53-Inhibition während der physiologischen Angiogenese in Hamsterovarien keinen Einfluss auf die Gefäßneubildung hatte, jedoch die Gefäßreifung verzögerte (Bordel et al., 2005). Diese Befunde werfen die Frage auf, ob die Überexpression von wt p53 in den hier untersuchten MiaPaCa-2-Tumoren möglicherweise die Gefäßreifung unterstützt und sich die Steigerung der LVD auf diesem Wege erklären lässt.

Insgesamt ergab sich in der *in vivo*-Situation ein komplexes Bild der biologischen Konsequenzen der wt p53-Expression, wobei die Effekte bei p53-Induktion im fortgeschrittenen Tumorstadium geringer ausgeprägt waren. Diesem Eindruck entsprach der immunhistochemische Nachweis einer geringeren Anzahl wt p53 exprimierender Zellen nach später Induktion. Besonders in dieser Situation, aber auch grundsätzlich erscheint es in der *in vivo*-Situation wichtig, die fortgesetzte Expression des endogenen mutierten p53 zu berücksichtigen, welches neben dem induzierten wt p53 in der Zelle exprimiert wurde. Funktionsfähiges p53 bindet als Tetramer an DNA und vermittelt so seine Funktion als Tumorsuppressor. Jedoch stört die Bindung eines mutierten p53-Monomers im Tetramer die Wildtypfunktion von p53 und überschreibt somit die Funktion von drei wt p53-Monomeren (McLure and Lee, 1998; McLure and Lee, 1999). Das bedeutet, dass wt p53 deutlich überexprimiert werden muss, um ausreichende Mengen von funktionsfähigen wt p53-Tetrameren zu erhalten. Anders als *in vitro*, wo eine maximale Induktion des Wildtyp-Proteins ohne Schwierigkeiten erzielbar war, könnte die *in vivo*-Induktion hier im Schwellenbereich gelegen haben.

Parallel ist bekannt, dass mutiertes p53 die Expression von Genen induziert, die von wt p53 sonst unbeeinflusst sind (Cadwell and Zambetti, 2001). Speziell dabei wurde auch

untersucht, welche Mutation in p53 für welche Genregulation verantwortlich war. Für die in dieser Arbeit verwendeten MiaPaCa-2-Zellen war eine Mutation in Kodon 248 mit Folge eines Aminosäureaustausches zu Tryptophan bekannt (p53_database, 2007). Diese spezielle Mutation hatte eine aktivierende Regulation des EGFR, des Insulin-like Wachstumsfaktor-Rezeptor I, des c-myc, des c-fos und des MDR-1 zur Folge (van Oijen and Slootweg, 2000). Diese Arbeiten zeigten neben dem Wildtypfunktions-Verlust einen nicht ganz unerheblichen regulatorischen Einfluss von mutiertem p53 in Tumoren.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zum Einfluss von wt p53 auf das Pankreaskarzinom *in vitro* und *in vivo* tragen ein Stück zur Klärung der Auswirkungen des wt p53-Funktionsverlustes bei. Sie zeigen gleichzeitig neue Ansätze für die Untersuchung der Gen-Rekonstitution im Pankreaskarzinom auf und weisen auf mögliche Probleme bzw. Ansätze von Therapien hin.

5.4 Die wt p53-Rekonstitution als Therapieansatz und Schlussfolgerungen

Die Strategie der Wiederherstellung der wt p53-Funktion in Tumorzellen wurde bereits für die Anwendung als Krebstherapie verfolgt. Ein Weg der Rekonstitution von wt p53 in den Zellen ist der Gentransport, für den in ersten klinischen Anwendungen bei Kopf- und Nackentumoren so wie Lungen- und Eierstockkrebs eine geringe Reduktion der Tumormasse verzeichnet wurde (Blagosklonny and el Deiry, 1996; Wadler et al., 2002; Wen et al., 2003). Ein Grund dafür ist vermutlich die negative Regulation des exogenen wt p53 durch Mdm2. Durch gleichzeitige Behandlung der Patienten mit Chemotherapie (Schuler et al., 2001) oder Bestrahlung (Higuchi et al., 2003; Huh et al., 2003) könnte eine für wt p53 günstige Mikroumgebung sorgen und so den Effekt der Gentherapie erhöhen. Die direkte Einbringung von p53 stabilisierenden Peptiden (Selivanova et al., 1997; Selivanova et al., 1999) oder Peptiden, die die Mdm2-Bindung unterbinden, gilt als weiterer vielversprechender Therapieansatz (Do et al., 2003; Kim et al., 1999). Weitere Versuche befassten sich mit der Modifikation des mutierten p53-Proteins und somit mit der Wiederherstellung der Tumorsuppressorfunktion sowie mit der selektiven Abtötung von Tumorzellen, die mutiertes p53 exprimieren. Eines der Moleküle, das die DNA-Bindedomäne *in vitro* stabilisiert und somit die wt Funktion des p53-Proteins wiederherstellt, ist CP-31398, jedoch nur bei einzelnen Mutationen (Foster et al., 1999; Pennisi, 1999; Smith and Fornace, Jr., 2002; Takimoto et al., 2002). Ein weiteres Molekül, das die Tumorsuppressorfunktion von p53 in Saos-2-Zellen wiederherstellt, ist PRIMA-1 (Bykov et al., 2002a; Bykov et al., 2002b). Dieses Molekül führt zudem in p53-Null-Tumorzellen ebenso zur Apoptose und induziert vermutlich so einen p53-unabhängigen Apoptose-Signalweg (Wang et al., 2003). Die Ergebnisse der

hier vorgelagten Arbeit zeigten, dass die Rekonstitution der wt p53-Funktion in Tumorzellen zu der therapeutisch gewünschten Wachstumsinhibition führte und mit einer verminderten Häufigkeit makroskopisch erkennbarer intraabdominellen Metastasierung verbunden war. In diesen Aspekten unterstützen die Daten somit p53-basierte therapeutische Ansätze. Gleichzeitig erhöhte sich jedoch die Lymphgefäßzahl mit wt p53-Induktion zu beiden Zeitpunkten. Der Mechanismus, der dieser vermehrten Lymphangiogenese zugrunde liegt, ist gegenwärtig unklar. Bezüglich der Steuerung der Lymphangiogenese im Pankreaskarzinom wurde in den letzten Jahren eine wesentliche Beteiligung der beiden pro-lymphangiogenen Faktoren VEGF-C und VEGF-D postuliert. Beide werden von den Tumorzellen produziert. In diesem Zusammenhang wird wt p53 neben der Regulation von VEGF-A und Tsp-1 auch eine Regulation von VEGF-D zugeschrieben. Ob ihre Expression durch wt p53 in Pankreaskarzinom-Zellen systematisch reguliert wird, ist gegenwärtig nicht bekannt. Die Bestätigung der lymphangiogenen Wirkung von wt p53 und die Aufklärung der Wirkmechanismen stellt aber einen wichtigen Baustein im Verständnis der komplexen Wirkungsweise des Tumorsuppressors *in vivo* dar. Dabei wird es zunächst notwendig sein zu prüfen, ob sich der pro-lymphangiogene Effekt als Eigentümlichkeit der MiaPaCa-2-Tumoren erweist oder auch in anderen Pankreaskarzinom-Modellen eine Rolle spielt. Versuche mit DanG p53-3-Zellen konnten hierzu leider noch keine Klärung liefern, da bei diesen Zellen das Tumorwachstum auch ohne Dox-Behandlung gegenüber den wt Zellen schwerwiegend verzögert war, so dass aufgrund des geringen Wachstums der Kontrolltumoren eine Auswertung nicht möglich war (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit durch die Kombination des *in vivo* induzierbaren Expressionssystem mit einem orthotopen Tumormodell erfolgreich die biologischen Folgen einer Rekonstitution von wt p53 in humanen Pankreaskarzinomzellen in einem pathophysiologisch relevanten Kontext beschrieben werden.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Daten zur p53 vermittelten Wachstumsinhibition von Pankreaskarzinomzellen erstmalig in einem orthotopen und somit klinisch repräsentativen Ansatz. Gleichzeitig werfen sie den neuen Aspekt einer möglichen Steigerung lymphogener Metastasierung nach wt p53-Rekonstitution auf, der vor dem Hintergrund der wichtigen therapeutischen Implikationen einer weiteren Abklärung bedarf.