

# 1 Material und Methoden

## 1.1 Orthotopes Nacktmausmodell

### 1.1.1 Zelllinien und Zellkultur

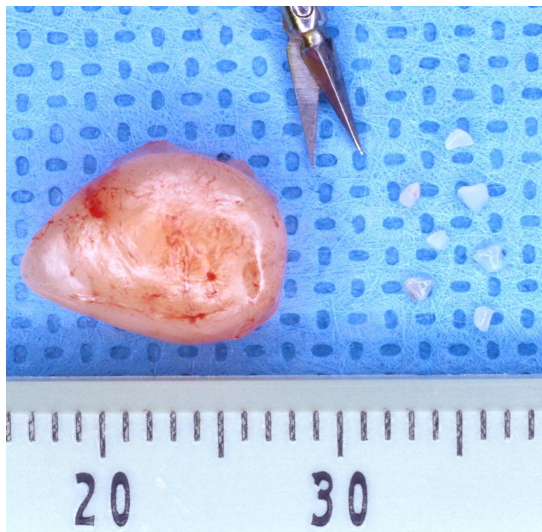
Die folgenden humanen Pankreas-Adenokarzinom-Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) beschafft: MIAPaCa-2 (undifferenziert [141]), AsPC-1 (schlecht differenziert [142]), HPAF-2 (mittelgradig differenziert [143, 144]) und Capan-1 (gut differenziert [145]). MIAPaCa-2 und Capan-1 Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle's Medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY, USA) kultiviert, AsPC-1 Zellen in RPMI-1640 (Gibco) und HPAF-2 in Minimum Essential Medium (MEM; Gibco). Alle Zellkulturmedien wurden mit 10 % Hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FBS; Gibco), Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) supplementiert. Die Zellen wurden bei 37°C in angefeuchteter Luft mit 5 % CO<sub>2</sub> (AsPC-1, HPAF-2, Capan-1), oder 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde zweimal pro Woche ausgetauscht und die Kulturen in serieller Passage nach jeweiliger Trypsinisierung mit 0,1 % Trypsin aufrechterhalten.

### 1.1.2 Nacktmäuse

Vier Wochen alte männliche Nacktmäuse (CrI:NU/NU-nuBR) mit einem Gewicht von 20 bis 22 Gramm wurden von den Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) erworben. Die Tiere wurden in Mikro-Isolierkäfigen mit autoklaviertem Streu, Futter und Wasser gehalten und unterlagen einem 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus. Alle Versuche wurden nach den gültigen Richtlinien bezüglich Haltung und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt; die Studien wurden vom Chancellor's Animal Research Committee der Universität von Kalifornien, Los Angeles bzw. dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigt.

### 1.1.3 Orthotope Implantationstechnik bei Nacktmäusen

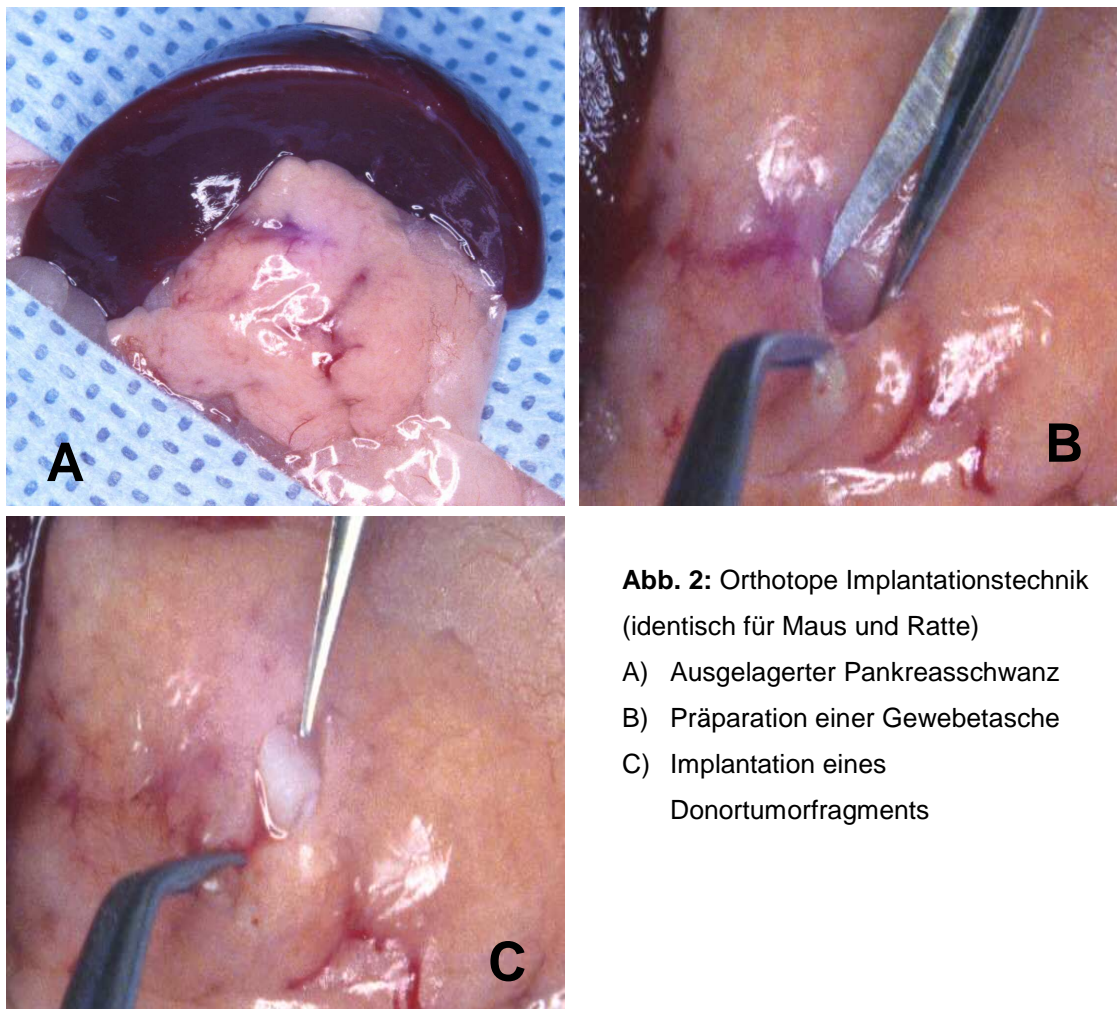
Donor-Nacktmäuse wurden mit Isofluran (Metofane; Malinckrodt Veterinary, Mundelein, IL, USA) betäubt. Jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen jeder humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie wurden subkutan in die Flanken der Tiere injiziert. Die Tötung der Mäuse erfolgte 3 bis 4 Wochen nach der Tumorzell-Injektion durch eine letale Dosis von Pentobarbital (0,5 mg/g Körpergewicht), nachdem die subkutanen Donor-Tumore eine Größe von 1 cm im größten Durchmesser erreicht hatten. Die Donor-Tumore wurden unter strikt aseptischen Bedingungen entnommen und mit einem Skalpell (Nr. 11) in kleine Fragmente von  $1 \text{ mm}^3$  Größe unterteilt (Abb. 1). Um die Entnahme von nekrotischem Tumorgewebe aus zentralen Tumorarealen zu vermeiden, wurde nur makroskopisch solides und vitales Gewebe von den Außenbezirken der Donor-Tumoren für die orthotope Implantation verwendet.



**Abb. 1:**  
Subkutaner Donortumor und  
Donortumorfragmente zur orthotopen  
Implantation.

Die für die orthotope Tumourimplantation verwendeten Nacktmäuse wurden zunächst durch Isofluran-Inhalation, dann durch intraperitoneale Injektion von Natrium-Pentobarbital (Nembutal; Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA; 0,05 mg/g KG) anästhesiert. Dann erfolgte eine Medianlaparotomie unter aseptischen Bedingungen an einer Laminar-Airflow Arbeitsbank. Entweder die Duodenalschlinge mit dem Pankreaskopf, oder aber der Pankreasschwanz mit der Milz wurden atraumatisch ausgelagert (Abb. 2A,

Seite 22). Dann wurden mit einer Mikroschere (RS-5610 VANNAS; Roboz, Rockville, MD, USA) zwei kleine Taschen in das Pankreasparenchym als Implantationsbett für Donor-Tumorfragmente präpariert (Abb. 2B). Jeweils ein Donor-Tumorfragment wurde in jede Parenchymtasche platziert, so daß es komplett von Pankreasparenchym umgeben war (Abb. 2C). Weder Nähte, noch Fibrinkleber waren erforderlich, um die Fragmente im Empfänger-Pankreas zu fixieren. Das Pankreas wurde dann in die Abdominalhöhle zurückverlagert, welche in zwei Schichten mit 5-0 resorbierbarem Nahtmaterial (DEXON „S“; Davis+Geck, Manati, PR) verschlossen wurde.



**Abb. 2:** Orthotope Implantationstechnik (identisch für Maus und Ratte)

- A) Ausgelagerter Pankreasschwanz
- B) Präparation einer Gewebetasche
- C) Implantation eines Donortumorfragments

#### 1.1.4 Orthotope Injektionstechnik bei Nacktmäusen

Nacktmäuse wurden wie oben beschrieben anästhesiert und laparotomiert.  $10^7$  Zellen jeder humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert (Endvolumen: 50  $\mu$ l). Dann erfolgte die orthotope Injektion der Zellsuspension mit einer 25-G Kanüle in den Pankreasschwanz. Eine technisch erfolgreiche Injektion zeigte sich durch die Bildung einer sichtbaren Blase innerhalb des Pankreasparenchyms. Die Injektionsnadel wurde langsam entfernt, um eine makroskopische Zellverschleppung, ausgehend von der Injektionsstelle, zu vermeiden. Wie oben beschrieben erfolgte nach Relokation des Pankreas der Verschluss der Abdominalhöhle.

#### 1.1.5 Beobachtungszeitraum und Sakrifizierungskriterien

Die Nacktmäuse wurden täglich bezüglich ihres klinischen Zustandes beurteilt und wöchentlich gewogen. 14 Wochen nach orthotoper Tumor-Implantation bzw. Tumorzell-Injektion erfolgte die Sakrifizierung der Tiere durch eine letale Dosis von Pentobarbital (0,5 mg/g Körpergewicht). Gemäß den Richtlinien der Tierschutzbestimmungen mußten die Tiere zu einem früheren Zeitpunkt euthanasiert werden, wenn eines der folgenden Kriterien vorlag: 1) große Tumormasse mit einer sichtbaren Tumorgöße von mehr als 1,5 cm; 2) Aszitesbildung mit sichtbarer abdomineller Distension; 3) Entwicklung eines Ikterus und/oder einer Kachexie mit sichtbarer klinischer Verschlechterung des Tieres.

#### 1.1.6 Bestimmung der Primärtumorgöße und des Disseminierungs-Scores

Alle Tiere wurden am Ende des Beobachtungszeitraums autopsiert. Tiere ohne etablierten Tumor wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die drei größten rechteckigen Tumordurchmesser wurden mit einem Meßschieber ausgemessen und das Volumen mit folgender Formel berechnet:  $\text{Volumen} = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Tiefe} / 2$  [146]. Zur Quantifizierung von lokaler Tumordinfiltration und Fernmetastasierung erfolgte die Entwicklung eines Disseminierungs-Scores. Die lokale Infiltration wurde an folgenden Stellen

bestimmt: Milz, Magen, Leberhilus, Nierenhilus, Retroperitoneum, Zwerchfell, Mesenterium, Darmschlingen und Bauchdecke. Isolierte Tumorknoten ohne anatomische Verbindung zum Primarius wurden als Fernmetastasen erfaßt. Die gezielte Metastasensuche erfolgte in Leber, Nieren, Milz, Lunge, Zwerchfell, Mesenterium, Retroperitoneum, Mediastinum und der Laparotomienarbe. Die Tumor-Disseminierung wurde wie folgt quantifiziert: jede Manifestation von Tumordinfiltration oder Metastasierung erhielt einen Punkt. Zusätzliche Punkte wurden bei massiver lokaler Infiltration (z.B. Ummauerung von mehr als der Hälfte der Milzzirkumferenz), bei multiplen Metastasenknötchen (> 1 in parenchymatösen Organen, > 10 auf Zwerchfell, Mesenterium, Retroperitoneum), oder für Tumorknoten größer 50 mm<sup>3</sup> vergeben. Die klinischen Manifestationen der Tumorkrankheit wurden ebenfalls in dieses Scoring-System eingeschlossen: so wurden auch Punkte für Aszitesbildung (2, falls > 5 ml), Entwicklung eines Ikterus, Ileus oder von Kachexie vergeben.

Der Primärtumor und alle Organe mit potentieller Infiltration oder Metastasierung wurden entnommen, in Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Hieraus erfolgte die Anfertigung von Gewebeschnitten (5 µm), welche dann mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden. Die Gewebeschnitte wurden von einem Pathologen mitbeurteilt, um die makroskopischen Ergebnisse des Disseminierungs-Scores zu bestätigen bzw. zu ergänzen.

## **1.2 Orthotopes Rattenmodell**

### **1.2.1 Zelllinien und Zellkultur**

Die duktale Ratten-Pankreaskarzinom-Zelllinie DSL-6A/C1 [50] wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) erworben und in Waymouth's MB 752/1 Medium (Gibco) kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde mit 10 % Hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FBS; Gibco), Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) supplementiert. Die Zellen wurden bei 37°C in angefeuchteter Luft mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde zweimal pro Woche ausgetauscht und die Kulturen in

serieller Passage nach jeweiliger Trypsinisierung mit 0,1 % Trypsin aufrechterhalten.

### 1.2.2 Immunkompetente Lewis-Ratten

Fünf Wochen alte männliche Lewis-Ratten (LEW/CrIBR) mit 100 bis 150 Gramm Gewicht wurden von den Charles River Laboratories erworben. Die Tiere wurden in Mikro-Isolierkäfigen mit autoklaviertem Streu, Futter und Wasser gehalten und unterlagen einem 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus. Alle Versuche wurden nach den gültigen Richtlinien bezüglich Haltung und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt; die durchgeführten Studien wurden vom Chancellor's Animal Research Committee der Universität von Kalifornien, Los Angeles bzw. dem Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigt.

### 1.2.3 Orthotope Implantationstechnik bei Lewis-Ratten

Die Narkose von Donor-Ratten erfolgte durch Inhalation mit Äther (VWR Scientific Products, West Chester, PA, USA); dann wurden  $10^7$  DSL-6A/C1 Zellen subkutan in beide Flanken der Tiere injiziert. Nach 8 Wochen wurden die Donor-Ratten durch eine letale Dosis von Pentobarbital (50 mg, intraperitoneal) euthanasiert, wenn die subkutanen Donor-Tumore eine Größe von 15 mm im größten Durchmesser erreicht hatten. Die Donor-Tumore wurden unter strikt aseptischen Bedingungen entnommen und mit einem Skalpell (Nr. 11) in kleine Fragmente von  $1\text{ mm}^3$  Größe unterteilt. Um die Entnahme von nekrotischem Tumorgewebe aus zentralen Tumorarealen zu vermeiden, wurde nur makroskopisch solides und vitales Gewebe von den Außenbezirken der Donor-Tumoren für die orthotope Implantation verwendet.

Die für die orthotope Tumourimplantation verwendeten Lewis-Ratten wurden zunächst mit Äther, dann durch intraperitoneale Injektion von Natrium-Pentobarbital (Nembutal; Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA; 40 mg/kg KG) anästhesiert. Eine Medianlaparotomie erfolgte unter aseptischen Bedingungen an einer Laminar-Airflow Arbeitsbank. Der Pankreasschwanz wurde mit der Milz ausgelagert, dann wurden mit einer Mikroschere (RS-5610 VANNAS; Roboz, Rockville, MD, USA) entweder drei, oder fünf kleine

Taschen (siehe 3.2) in das Pankreasparenchym als Implantationsbett für Donor-Tumorfragmente präpariert (analog Abb. 2B, Seite 22). Jeweils ein Donor-Tumorfragment wurde in jede Parenchymtasche platziert, so daß es komplett von Pankreasparenchym umgeben war (analog Abb. 2C, Seite 22). Weder Nähte, noch Fibrinkleber waren erforderlich, um die Fragmente im Empfänger-Pankreas zu fixieren. Das Pankreas wurde dann in die Abdominalhöhle zurückverlagert, welche in zwei Reihen mit 5-0 resorbierbarem Nahtmaterial (DEXON „S“; Davis+Geck, Manati, PR) verschlossen wurde.

#### 1.2.4 Orthotope Injektionstechnik bei Lewis-Ratten

Lewis-Ratten wurden wie oben beschrieben anästhesiert und laparotomiert.  $10^7$  DSL-6A/C1 Zellen wurden in Matrigel (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, USA) und physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1 in einem Endvolumen von 50 µl suspendiert. Dann erfolgte die orthotope Injektion der Zellsuspension in den Pankreasschwanz mit einer 25-G Kanüle. Eine technisch erfolgreiche Injektion zeigte sich durch die Bildung einer sichtbaren Blase innerhalb des Pankreasparenchyms. Die Injektionsnadel wurde langsam entfernt, um eine makroskopische Zellverschleppung, ausgehend von der Injektionsstelle, zu vermeiden. Wie oben beschrieben erfolgte nach Relokation des Pankreas der Verschuß der Abdominalhöhle.

#### 1.2.5 Beobachtungszeitraum und Sakrifizierungskriterien

Der klinische Zustand der Ratten wurde täglich beurteilt, das Körpergewicht wöchentlich bestimmt. 16 Wochen nach der orthotopen Tumorimplantation oder Tumorzellinjektion erfolgte die Sakrifizierung durch eine intraperitoneale Injektion von 50 mg Natriumpentobarbital. Gemäß den Richtlinien der Tierschutzbestimmungen mußten die Tiere zu einem früheren Zeitpunkt euthanasiert werden, wenn eines der folgenden Kriterien vorlag: 1) große Tumormasse mit einer sichtbaren Tumorgröße von mehr als 1,5 cm; 2) Aszitesbildung mit sichtbarer abdomineller Distension; 3) Entwicklung eines Ikterus und/oder einer Kachexie mit sichtbarer klinischer Verschlechterung des Tieres.

### 1.2.6 Bestimmung der Primärtumorgröße und des Disseminierungs-Scores

Alle Tiere wurden am Ende des Beobachtungszeitraums autopsiert. Tiere ohne etablierten Tumor wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die drei größten rechwinkligen Tumordurchmesser wurden mit einem Meßschieber ausgemessen und das Volumen mit folgender Formel berechnet:  $\text{Volumen} = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Tiefe} / 2$  [146]. Zur Quantifizierung von lokaler Tumordinfiltration und Fernmetastasierung erfolgte die Entwicklung eines Disseminierungs-Scores. Die lokale Infiltration wurde an folgenden Stellen bestimmt: Milz, Magen, Leberhilus, Nierenhilus, Retroperitoneum, Zwerchfell, Mesenterium, Darmschlingen und Bauchdecke. Isolierte Tumorknoten ohne anatomische Verbindung zum Primarius wurden als Fernmetastasen erfaßt. Die gezielte Metastasensuche erfolgte in Leber, Nieren, Milz, Lunge, Zwerchfell, Mesenterium, Retroperitoneum, Mediastinum und der Laparotomienarbe. Die Tumor-Disseminierung wurde wie folgt quantifiziert: jede Manifestation von Tumordinfiltration oder Metastasierung erhielt einen Punkt. Zusätzliche Punkte wurden bei massiver lokaler Infiltration (z.B. Ummauerung von mehr als der Hälfte der Milzzirkumferenz), bei multiplen Metastasenknöten ( $> 1$  in parenchymatösen Organen,  $> 10$  auf Zwerchfell, Mesenterium, Retroperitoneum), oder für Tumorknoten größer  $50 \text{ mm}^3$  vergeben. Die klinischen Manifestation der Tumorkrankheit wurden ebenfalls in dieses Scoring-System eingeschlossen: so wurden auch Punkte für Aszitesbildung (2, falls  $> 10 \text{ ml}$ ), Entwicklung eines Ikterus, Ileus oder von Kachexie vergeben.

Der Primärtumor und alle Organe mit potentieller Infiltration oder Metastasierung wurden entnommen, in Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Hieraus erfolgte die Anfertigung von Gewebeschnitten ( $5 \mu\text{m}$ ), welche dann mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden. Die Gewebeschnitte wurden von einem Pathologen mitbeurteilt, um die makroskopischen Ergebnisse des Disseminierungs-Scores zu bestätigen bzw. zu ergänzen.



### 1.3 Therapeutische Substanzen

#### 1.3.1 Suramin

Das Naphthyl-Harnstoff-Derivat Suramin wurde von der Bayer AG (Leverkusen) entwickelt. Für in vitro Experimente sowie für die intraperitoneale Injektion bei in vivo Versuchen erfolgte die Lösung der Substanz in physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,5).

#### 1.3.2 TNP-470

Der faktorunspezifische Angiogenese-Inhibitor TNP-470 wurde von TAP Pharmaceuticals Inc. (Deerfield, IL, USA) zur Verfügung gestellt. Für in vitro Experimente erfolgte die Lösung in 0,5 % Äthanol und dem jeweiligen Zellkulturmedium. Für die in vivo Anwendung wurde TNP-470 in einer Mischung aus 0,5 % Äthanol, 5 % Gum Arabic und physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

#### 1.3.3 A4.6.1

A4.6.1, ein muriner Antikörper, welcher alle Isoformen des humanen Angiogenesefaktors VEGF(-A) neutralisiert, wurde von Genentech Inc. (South San Francisco, CA, USA) entwickelt. Für in vitro Experimente erfolgte die Lösung im jeweiligen Zellkulturmedium. Die in vivo Applikation von A4.6.1 erfolgte in PBS.

#### 1.3.4 AS-3

Das VEGF Antisense-Oligonukleotid AS-3 wurde von Operon Technologies (Alameda, CA, USA) sowie der Core Facility des Norris Cancer Hospital und Research Institute (Los Angeles, CA, USA) synthetisiert und gereinigt. Die Sequenz und Lokalisation von AS-3 ist wie folgt: 5'-TGG CTT GAA GAT GTA CTC GAT-3'; +261 bis +281. Für in vitro Versuche erfolgte die AS-3 Gabe im jeweiligen Zellkulturmedium; für in vivo Gabe wurde das Antisense Molekül in PBS gelöst.

### 1.3.5 DT-VEGF

Die Herstellung des Diphtherietoxin-VEGF Fusionsproteins wurde von Gill et al. [129, 147] beschrieben. Es besteht aus einem 390 Aminosäuren großen Fragment des Diphtherietoxins, welches die enzymatische sowie die Translokations-Domäne des Toxins enthält. Dieses Fragment wurde an die VEGF<sub>165</sub>-Isoform des VEGF-Proteins gekoppelt. In vitro wurde DT-VEGF im jeweiligen Zellkulturmedium appliziert. Für die in vivo Gabe erfolgte die Lösung von DT-VEGF in PBS.

### 1.3.6 Batimastat

Batimastat, ein Breitspektruminhibitor der Matrix-Metalloproteinasen, wurde von British Biotech (Oxford, UK) zur Verfügung gestellt. Die Lösung der Substanz für die in vitro Applikation erfolgte im Ultraschallbad in PBS und 0,01 % Tween 80 (Sigma Chemical; St. Louis, MO, USA).

## **1.4 In vitro Bestimmung von Zellproliferation und –viabilität**

### 1.4.1 Zelllinien und Zellkultur

Die Kultivierung der untersuchten Pankreaskarzinom-Zelllinien wurde unter 2.1.1 und 2.2.1 beschrieben. Neben den Karzinomzellen wurden humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) den Testsubstanzen ausgesetzt. Die Endothelzellen wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) erworben und in RPMI-1640 Medium kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde mit 10 % Hitze-inaktiviertem fetalem Kälberserum (FBS; Gibco), Penicillin G (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) supplementiert. Die Zellen wurden bei 37°C in angefeuchteter Luft mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde zweimal pro Woche ausgetauscht und die Kulturen in serieller Passage nach jeweiliger Trypsinisierung mit 0,1 % Trypsin aufrechterhalten.

#### 2.4.2 Zellzählung

Um die Wirkung der verschiedenen Substanzen auf die Proliferation der untersuchten Zelllinien zu bestimmen, erfolgte die Aussaat von jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen in 6-Well-Kulturplatten mit 2 ml des jeweiligen Mediums. Das Medium wurde am nächsten Tag (Tag 1) gewechselt und die Testsubstanz hinzugefügt. Eine Aufstellung der eingesetzten Substanzen und Konzentrationen zeigt Tabelle 1. Nach 72 Stunden (Tag 4) wurden die Zellen trypsinisiert und in einem Standard-Hämozytometer gezählt.

#### 2.4.3 MTT-Assay

Die Bestimmung der Zell-Viabilität erfolgte durch einen Monotetrazolium (MTT) basierten colorimetrischen Assay von Boehringer (Mannheim, [148]). Zunächst wurden  $5 \times 10^3$  Zellen jeder Zelllinie in 200  $\mu$ l des jeweiligen Mediums in 96-Well-Kulturplatten ausgesät. Das Medium wurde am nächsten Tag (Tag 1) gewechselt und die Testsubstanz hinzugefügt. Eine Aufstellung der eingesetzten Substanzen und Konzentrationen zeigt Tabelle 1. Nach 72 Stunden (Tag 4) wurden 10  $\mu$ l der MTT-Lösung (5 mg/ml) hinzugegeben; nach weiteren 4 Stunden Inkubation erfolgte die Zugabe von 100  $\mu$ l 10 % SDS-Lösung. Die Absorption bei 570 nm, welche mit der Zahl viabler Zellen korreliert, wurde nach weiterer Inkubation über Nacht mit einem ELISA-Reader von Biotek Instruments Inc. (Burlington, VT, USA) bestimmt.

| <b>Substanz</b> | <b>Konzentrationen</b>   |
|-----------------|--------------------------|
| Suramin         | 10 – 800 $\mu$ g/ml      |
| TNP-470         | 1 pg/ml – 100 $\mu$ g/ml |
| A4.6.1          | 10 – 5000 ng/ml          |
| DT-VEGF         | 10 – 10000 ng/ml         |

**Tabelle 1:** Eingesetzte Substanzen und Konzentrationen zur in vitro Bestimmung von Zellproliferation und –viabilität.

## **2.5 Bestimmung der VEGF-Konzentration mit ELISA**

### **2.5.1 VEGF im Zellkulturmedium**

Jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen der zu untersuchenden Zelllinien wurden in 2ml ihres Zellkulturmediums in 6-Well-Kulturplatten ausgesät. Nach Austausch des Mediums am nächsten Tag (Tag 1), erfolgte nach 72 Stunden (Tag 4) die Trypsinisierung und das Zählen der Zellen im Hämocytometer. Die Konzentrationsbestimmung des VEGF(-A)-Proteins im Überstand des Zellkulturmediums erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers mit einem Solid-Phasen ELISA-Kit der Firma Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Die Konzentration des Proteins wurde als pg pro  $10^6$  Zellen bzw. pro ml berechnet. Der Assay wurde dreimal durchgeführt; pro Assay erfolgte eine Dreifachbestimmung der Proben.

### **2.5.2 VEGF in Plasma und Aszites**

Von jedem Versuchstier wurde bei der Autopsie Blut und wenn vorhanden Aszites asserviert. 500 µl jeder Probe wurden unverzüglich mit 50 µl EDTA gemischt und anschließend mit 2000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert. Das hierdurch gewonnene Plasma bzw. der Überstand des Aszites wurden dann bis zur Durchführung des ELISAs bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Konzentrationsbestimmung des VEGF(-A)-Proteins erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers mit einem Solid-Phasen ELISA-Kit der Firma Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Die Konzentration des Proteins wurde als pg pro ml berechnet. Der Assay wurde dreimal durchgeführt; pro Assay erfolgte eine Dreifachbestimmung der Proben.

## **2.6 VEGF Immunhistologie**

Zur immunhistologischen Bestimmung der VEGF(-A)-Expression wurden die bei der Autopsie der Versuchstiere gewonnenen Primärtumore unverzüglich in 10 % gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Deparaffinierung und Rehydrierung erfolgte das Autoklavieren von 3

Mikrometer dicken Gewebeschnitten bei 97°C für 30 Minuten in 0,01 mol/l Citratpuffer (pH 6,0). Anschließend wurden die Schnitte zur Blockade der endogenen Aktivität der Alkalischen Phosphatase für 5 Minuten mit 3 % Wasserstoffperoxidlösung behandelt. Die Inkubation der Schnitte bei 4°C über Nacht mit einem gereinigten Kaninchen-Antikörper gegen humanes VEGF(-A) (Oncogene; Cambridge, MA, USA) erfolgte nach 10minütiger Applizierung von Blocking-Medium. Nach sorgfältiger Waschung in Tris-gepufferter PBS/Tween-Lösung wurden die Gewebeschnitte für 20 Minuten mit einem biotinylierten Anti-Kaninchen Sekundär-Antikörper (Santa Cruz; Santa Cruz, CA, USA) inkubiert, gefolgt von einer 15minütigen Inkubation mit Streptavidin-Horseraddish-Peroxidase. Zur Entwicklung der Farbreaktion wurden die Schnitte nun für 5 Minuten mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) behandelt. Das semiquantitative Scoring der VEGF(-A)-Expression in den verblindeten Primärtumor-Schnitten erfolgte durch einen Pathologen.

## **2.7 VEGF Western Blotting**

Der Effekt der VEGF-Antisense Behandlung auf die VEGF(-A)-Produktion von Pankreaskarzinom Zellen wurde mit der Western Blot Technik analysiert.  $5 \times 10^5$  Zellen der untersuchten Zelllinien wurden für 36 Stunden mit entweder 5  $\mu$ M von AS-3 oder des gescrambelten Oligonukleotids inkubiert. Lysate der Zellen wurden durch Inkubation in Lyse-Puffer (10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1 mM Dithiothreitol; 10% Glycerol) sowie anschließender Zentrifugierung mit 10000 g für 10 Minuten gewonnen. Die Bestimmung des Gesamtproteins erfolgte mit einem Bradford-Assay (Bio-Rad; Richmond, CA, USA): 20  $\mu$ g-Proben wurden in einem 4-20 % Tris-Glyzin Polyacrylamid-Gel fraktioniert und dann mittels Elektroblothing auf Nylonmembranen transferiert. Die Membranen wurden mit 5% H-Milch blockiert und anschließend bei 4°C für 16 Stunden mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen humanes VEGF(-A) (R&D Systems; Minneapolis, MN, USA) sowie gegen Beta-Actin (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) inkubiert. Die Entwicklung der Membranen erfolgte mit einem Immun-Star Ziegen-Anti-

Maus IgG Kit (Bio-Rad; Richmond, CA, USA). Die identische Beladung aller Bahnen wurde durch die gleiche Signalintensität für Beta-Actin dokumentiert.

## 2.8 RT-PCR für VEGF und VEGF-Rezeptoren

Für den quantitativen Nachweis der Expression von VEGF(-A) sowie der VEGF-Rezeptoren 1 (flt-1) und 2 (KDR) erfolgte eine Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR), bei der ein bestimmter Abschnitt auf den jeweiligen Genen mit Hilfe der DNA-Polymerase und spezifischer Primer vervielfältigt wurde. Die aus den untersuchten humanen Pankreaskarzinomzelllinien isolierte RNA wurde mittels der Reversen Transkriptase M<sup>-</sup>MLV und dNTP`s (Promega; Mannheim) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mit dem ReadyMix<sup>TM</sup> Taq PCR Reaction Kit (Sigma-Aldrich; Taufkirchen) amplifiziert. Für einen Reaktionsansatz wurden 2 µl cDNA, 20 pmol des jeweiligen Forward- und Reverse-Primers pro Target (Tabelle 2), 0,2 mM dNTP`s sowie 1,5 U der Taq-Polymerase verwendet.

| Primer                  | Sequenz (5` - 3`)                 |
|-------------------------|-----------------------------------|
| VEGF forward            | CGA AGT GGT GAA GTT CAT G         |
| VEGF reverse            | TTC TGT ATC AGT CTT TCC TGG TGA G |
| VEGFR-1 (flt-1) forward | GAA GGC ATG AGG ATG AGA GC        |
| VEGFR-1 (flt-1) reverse | CAG GCT CAT GAA CTT GAA AGC       |
| VEGFR-2 (KDR) forward   | CAT GTA CGG TCT ATG CCA TTC       |
| VEGFR-2 (KDR) reverse   | CGT TGG CGC ACT CTT CCT           |

**Tabelle 2:** Primersequenzen für VEGF(-A) und die VEGF-Rezeptoren 1 (flt-1) und 2 (KDR).

Zur Amplifikation wurden die Proben in dem Eppendorf MasterCycler (Eppendorf, Hamburg) nach einer Anheizphase von 3 Minuten bei 95 °C mit den folgenden Temperaturzyklen inkubiert: Denaturierung: 1 Minute, 95 °C; Annealing: 1 Minute, 60 °C; Extension: 2 Minuten, 72 °C. Die Zyklen wurden 35 Mal wiederholt. Anschließend wurden die PCR-Produkte auf einem

1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert.

## **2.9 Immunhistologische Bestimmung der Mikrovaskulären Gefäßdichte**

Als endothelialer Marker zur immunhistologischen Quantifizierung der mikrovaskulären Gefäßdichte (MVD) wurde Anti-CD31 eingesetzt [149-151]. Die bei der Autopsie der Versuchstiere gewonnenen Primärtumore wurden unverzüglich in 10 % gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach Deparaffinierung und Rehydrierung erfolgte das Autoklavieren von 3 Mikrometer dicken Gewebeschnitten bei 97°C für 30 Minuten in 0,01 mol/l Citratpuffer (pH 6,0). Anschließend wurden die Schnitte zur Blockade der endogenen Aktivität der Alkalischen Phosphatase für 5 Minuten mit 3 % Wasserstoffperoxidlösung behandelt. Die Inkubation der Schnitte bei 4°C über Nacht mit einem gereinigten Ziegen-Antikörpers gegen murines CD31 (PECAM-1; Pharmingen; San Diego, CA, USA) erfolgte nach 10minütiger Applizierung von Blocking-Medium. Nach sorgfältiger Waschung in Tris-gepufferter PBS/Tween-Lösung wurden die Gewebeschnitte für 20 Minuten mit einem biotinyliertem Anti-Ziegen Sekundär-Antikörper inkubiert, gefolgt von einer 15minütigen Inkubation mit Streptavidin-Horseraddish-Peroxidase. Zur Entwicklung der Farbreaktion wurden die Schnitte nun für 5 Minuten mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) behandelt. Die mikrovaskuläre Gefäßdichte wurde wie von Weidner und Folkman [152, 153] beschrieben quantifiziert: Areale mit der ausgeprägtesten Neovaskularisation („Hot Spots“) wurden bei niedriger Vergrößerung (40 und 100fach) identifiziert. Die Zählung der Mikrogefäße erfolgte dann bei 200facher Vergrößerung in jeweils 10 Gesichtsfeldern (0,74 mm<sup>2</sup> pro Feld).

## **2.10 In vivo Verabreichung der therapeutischen Substanzen**

Die unterschiedlichen Versuchsgruppen mit Dosierungen und Applikationswegen der in den in vivo Studien eingesetzten Substanzen sind in

Tabelle 3, Seite 35, aufgeführt. In allen Studien erfolgte die Randomisierung der Versuchstiere in Kontroll- und Therapiegruppe vor der Tumorinduktion. In den Gruppen mit *prophylaktischer* Gabe des jeweiligen Therapeutikums wurde die Behandlung (bzw. die Gabe der Trägerlösung in den Kontrolltieren) 3 Tage nach Tumorinduktion begonnen. Der *therapeutische* Versuchsansatz bedeutete einen Therapiebeginn 6 Wochen nach Tumorinduktion.

| <b>Substanz</b> | <b>Dosierungen</b>   | <b>Applikationsweg</b> |
|-----------------|--|------------------------|
| Suramin         | 10 / 60 mg/kg; wöchentlich*<br>(*2x / Woche in den ersten beiden Wochen) | intraperitoneal        |
| TNP-470         | 30 mg/kg; alle 2 Tage  | subkutan               |
| A4.6.1          | 100 µg; 2x / Woche   | intraperitoneal        |
| AS-3            | 10 mg/kg; täglich  | intraperitoneal        |
| DT-VEGF         | 200 µg/kg; alle 2 Tage   | intraperitoneal        |
| Batimastat      | 50 mg/kg; alle 2 Tage  | intraperitoneal        |

**Tabelle 3:** In vivo eingesetzte Substanzen, Dosierungen und Applikationswege

Der klinische Zustand der Tiere wurde täglich evaluiert; das Körpergewicht wöchentlich erfaßt. Nach einer maximalen Beobachtungszeit von 14 Wochen erfolgte die Sakrifizierung der Tiere mit einer letalen intraperitonealen Gabe von Natrium-Pentobarbital (Maus: 0,5 mg/g Körpergewicht). Gemäß den Tierversuchsrichtlinien mußte eine frühere Sakrifizierung durchgeführt werden, sobald eines der folgenden Kriterien erfüllt war: 1) große abdominelle Tumormasse mit einer Größe von mehr als 1,5 cm; 2) Ausbildung von Aszites mit sichtbarer abdomineller Distension; 3) Entwicklung eines Ikterus oder von Kachexie mit signifikanter klinischer Verschlechterung des Tieres.

Alle Tiere wurden nach der Sakrifizierung autopsiert. Die Bestimmung des Primärtumorvolumens sowie des Disseminierungsscores sind unter 2.1.6 beschrieben. Der Primärtumor sowie alle Organe mit potentieller Tumordinfiltration oder Fernmetastasierung wurden asserviert, in Paraformaldehyd fixiert sowie in Paraffin eingebettet. Zur Verifizierung des makroskopischen Disseminierungsscores wurden Gewebeschnitte mit 5 Mikrometer Dicke mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und mikroskopisch



ausgewertet. Für die immunhistologische Bestimmung der VEGF-Expression sowie der Mikrovaskulären Gefäßdichte wurden weitere Schnitte der Primärtumoren angefertigt (siehe 2.6 und 2.9). Von jedem Tier wurden Blut- sowie Aszitesproben wie unter 2.5.2 beschrieben zur Bestimmung der VEGF-Konzentrationen asserviert.

## **2.11 Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Computerprogrammen Excel (Microsoft; Redmond, WA, USA), Sigma Plot (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) und Primer of Biostatistics (McGraw-Hill; Maidenhead, UK). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Kontinuierliche, normalverteilte Variablen (Tumorvolumina, Körpergewichte, Proteinkonzentrationen) wurden mit dem Student-t-Test analysiert. Diskontinuierliche Variablen (Disseminierungsscore, Mikrovaskuläre Gefäßdichte) wurden mit dem Rangsummentest nach Mann und Whitney überprüft. Die Auswertung der Überlebensunterschiede der Versuchstiere erfolgte mit dem Vierfeldertest. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner als 5 % wurden als statistisch signifikant bewertet.