

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Karl-Walter Jauch)

Das Tumorstroma als Angriffspunkt einer stammzellbasierten
CCL5-Promoter/HSV-TK Suizidgentherapie in einem murinen
Pankreastumormodell

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Christoph Zischek
aus München
2011

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christiane J. Bruns

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Elfriede Nößner

Mitberichterstatte: Prof. Dr. Dolores J. Schendel

Prof. Dr. Maria-Christina Jung

Betreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Peter J. Nelson

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2011

Meinen Eltern

Inhalt

Inhalt.....	5
Zusammenfassung.....	7
Einleitung	9
Die Bedeutung des Stromas für die Tumorbiologie.....	11
Mesenchymale Stammzellen.....	14
Die Rolle von Zytokinen in der Tumorbiologie.....	21
Suizidgentherapie	25
Das Pankreaskarzinom	29
Ziele der Studie	33
Experimentelle Schritte	34
Methoden.....	35
Methoden im Rahmen der Zellkultur	35
Methodik der Klonierung	43
Methoden zur RNA-Analyse.....	50
Methodik des Tierversuches.....	57
Histologische Verfahren.....	60
Umgang mit Humangewebe.....	62
Klonierstrategie	63
Klonierung des Vorläufervektors pDNA3-CCL5Pro-Hind III	63
Klonierung von pCMV/Bsd-CCL5Pro-RFP	66
Klonierung von pCMV/Bsd-CCL5Pro-eGFP	67
Klonierung von pCMV/Bsd -CCL5Pro-TK.....	68
Materialien	69
Ergebnisse	76
MSC fördern das Tumorwachstum und die Metastasierung	76
MSC als Quelle einer gesteigerten Ccl5 Expression im Tumormilieu	79
Klonierung von CCL5-Promoter Reporterzelllinien	81
Stromale Aktivierung des CCL5-Promoters in MSC in-vivo	83
Klonierung einer CCL5-Promoter/HSV-TK Suizidzelllinie	89
Wirkung des HSV-TK/Gcv Systems in vitro.....	92
CCL5Pro-TK MSC verringern das Wachstum von panc02 Tumoren	95
CCL5 Expression ist im humanen PDA hochreguliert	101
Diskussion	105

Neuer Therapieansatz zur Behandlung maligner Erkrankungen.....	105
MSC migrieren in-vivo in das tumorassoziierte Stroma	105
MSC zeigen eine tumorspezifische Genexpression	108
MSC eignen sich zum Transport therapeutischer Gene	109
Gewebespezifischer Ansatz einer stammzellbasierten und promoterregulierten Suizidgentherapie	110
Aufgrund seiner biologischen Merkmale eignet sich das PDA als Modellerkrankung ...	111
Das syngene orthotope panc02- PDA Modell als Tumormodell.....	112
MSC steigern die Aggressivität und die Metastasierung von panc02-Tumoren.....	113
MSC wirken auf parakrine Art und bilden keine eigenen Tumore	114
Die p53-Deletion ist nicht Ursache der Tumorprogression durch MSC	116
MSC zeigen keine tumoradversen Effekte im panc02-Modell	117
MSC aktivieren unter Tumorbedingungen den CCL5-Promoter	118
CCL5Pro-TK MSC reduzieren die Tumorstadiumsrate	120
CCL5Pro-TK MSC reduzieren die Metastasierung	121
Besonderheiten des verwendeten panc02-Modells	122
CCL5 wird im humanen Pankreaskarzinom hochreguliert	123
Die direkte CCL5-Inhibition ist nicht attraktiv	124
Bedeutung stammzellbasierter Therapieansätze für die Zukunft.....	125
Abkürzungsverzeichnis	128
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	132
Literaturverzeichnis.....	133
Curriculum Vitae.....	148

Zusammenfassung

Maligne Zellen wachsen in einem komplexen zellulären und extrazellulären Umfeld, welches die Initiierung und Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps bedeutend beeinflusst. Tumore bestehen zum einen aus den Tumorzellen, zum anderen aus dem unterstützenden Stroma, das Fibroblasten, Endothelien, Perizyten, Lymphgefäße, ein mononukleäres Infiltrat und die Extrazellulärmatrix einschließt. Dieses Tumor-Mikromilieu hat einen großen modulierenden Einfluss auf das Tumorwachstum, die Invasivität und das Metastasierungspotential. Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind pluripotente Vorläuferzellen, die an der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Gewebeintegrität beteiligt sind. Geschädigtes Gewebe führt zur Mobilisation von MSC und deren Rekrutierung an den Ort der Schädigung. Tumore werden vom Organismus als nicht-heilende Wunden angesehen, so dass MSC in das tumorassoziierte Stroma rekrutiert werden. Dort tragen die Zellen zu verschiedenen Aspekten des Tumorwachstums bei, indem sie als Progenitorzellen für die Tumorgefäße und stromale fibroblastenartige Zellen dienen. Im Rahmen dieses Ausdifferenzierungsprozesses werden gewebespezifische Gensets wie das CC-Chemokin CCL5 in den mesenchymalen Stammzellen aktiviert und zur Expression gebracht. Das Pankreasadenokarzinom ist eines der aggressivsten soliden Malignome des Menschen und ist gekennzeichnet durch eine ausgeprägte Proliferation des Stromas. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum einen die Rolle mesenchymaler Stammzellen im Stroma des Pankreaskarzinoms zu evaluieren und zum anderen eine gewebespezifische stammzellbasierte und promoterkontrollierte Suizidgentherapie mit dem Stroma als Angriffspunkt zu etablieren.

Mesenchymale Stammzellen wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6 p53^{-/-} Mäusen isoliert und sowohl mit den Reportergenen des rot fluoreszierendem Proteins (RFP) und des grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) als auch mit dem Suizidgen der Herpes Simplex I Thymidinkinase (HSV-TK) unter Kontrolle des CCL5-Promoters transfiziert. Die HSV-TK führt zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der Prodrug Ganciclovir, welches zytotoxisch auf Thymidinkinase-positive (TK⁺) Zellen und über den sogenannten „Bystander-effect“ auf umgebende Thymidinkinase-negative (TK⁻) Zellen wirkt. Diese Stammzellen wurden C57BL/6 Mäusen intravenös injiziert, die orthotope und syngene panc02-Pankreastumore trugen.

Die i.v. Applikation von nativen MSC führte zu einer Verdopplung der Tumormasse und einer gesteigerten lokalen Aggressivität im Sinne einer Peritonealkarzinose im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei zeigten sich erhöhte Ccl5-Expressionsniveaus im Tumorgewebe von

Tieren, die MSC erhalten hatten. In-vitro konnte gezeigt werden, dass MSC bei adäquater Stimulation zur Ccl5 Expression angeregt werden und somit als Quelle des beobachteten Ccl5-Anstiegs in Frage kommen. Die stromale Aktivierung des CCL5-Promoters in den mesenchymalen Stammzellen konnte durch Verwendung von CCL5-Promoter/Reporter gen Stammzellen direkt nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich spezifisch im Tumorgewebe Fluoreszenzsignale, die sich in der Immunhistochemie morphologisch genauer darstellen ließen. Eine Reporter genexpression war spezifisch im stromalen Kompartiment der panc02-Tumore nachweisbar, andere untersuchte Organe mit Ausnahme der Milz zeigten keine Reporter genexpression. Der Einsatz der therapeutischen CCL5-Promoter/HSV-TK MSC in Kombination mit der intraperitonealen Gabe von Ganciclovir führte zu einer Tumormassenreduktion um 50%. Darüberhinaus konnte die Therapie die Metastasierungsrate in Milz, Leber und Peritoneum signifikant senken. Es wurden keine systemischen Nebenwirkungen beobachtet. Bei der Untersuchung von humanen Pankreaskarzinomen und korrespondierenden Pankreasnormalgeweben aus den gleichen Patienten zeigte sich bei der Mehrheit eine Hochregulation von CCL5-mRNA. Im immunhistochemischen Nachweis konnte die CCL5 Expression auf Proteinebene im Tumorstroma gezeigt werden, entsprechendes Normalgewebe zeigte bis auf vereinzelte Zellen keine CCL5 Produktion.

Das Tumorstroma stellt aufgrund seiner vitalen Bedeutung für die Tumorprogression einen vielversprechenden Ansatzpunkt künftiger therapeutischer Interventionen dar. Mesenchymale Stammzellen eignen sich hierbei im Rahmen einer Suizidtherapie als zellbasierte Vehikel. Dank der gezielten Migration und des Einsatzes gewebespezifischer Promoter kann dabei eine hohe Selektivität der Genexpression im Tumorgewebe mit Minimierung der systemischen Nebenwirkungen erreicht werden. Der CCL5-Promoter wird im stromalen Kompartiment des murinen pankreatischen Adenokarzinoms aktiviert und eignet sich daher für die selektive und spezifische Expression von therapeutischen Genen wie der HSV-TK. Dieser Ansatz kann eine mögliche Therapieoption des ansonsten therapieresistenten humanen Pankreaskarzinoms darstellen.

Einleitung

Maligne Erkrankungen nehmen in westlichen Gesellschaften stetig an Bedeutung zu. So belegen sie in der Todesursachenstatistik mit 22,8% den zweiten Platz hinter Herz- und Kreislauferkrankungen, in der Altersgruppe 60-79 Jahre sogar den ersten Platz. Die Wahrscheinlichkeit, im Leben an Krebs zu erkranken, beträgt derzeit circa 45%, das heißt fast jeder zweite Mensch in westlichen Gesellschaften wird im Laufe des Lebens eine maligne Erkrankung entwickeln. Zudem zeigte sich in den vergangenen Jahren, dass maligne Erkrankungen in der Todeshäufigkeit deutlich zu den Herz- und Kreislauferkrankungen aufgeholt haben, da letztere inzwischen durch verbesserte Therapiestrategien in einer Vielzahl von Fällen beherrschbar geworden sind (Jemal, Siegel et al. 2008).

Die multimodalen Ansätze hingegen, die heute in der Therapie der Tumorerkrankungen angewendet werden, konnten in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert werden und so eine Steigerung der Überlebenschancen bewirken. Dennoch gelangen diese Strategien bestehend aus Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie an ihre Grenzen. Besonders in metastasierten Stadien ist oft nur noch eine palliative Zielsetzung möglich. Gerade die kurzen Halbwertszeiten der Therapeutika und die toxischen systemischen Nebenwirkungen verlangen dringend nach effektiveren und tumorspezifischeren Therapien (Sasportas, Kasmieh et al. 2009).

Zur Entwicklung neuer Therapien ist eine bessere Kenntnis der Tumorbiologie notwendig. Denn nur so können wichtige neue Angriffspunkte entdeckt werden, die spezifisch für die verschiedenen Tumore sind, aber im Normalgewebe nicht vorkommen. Lange Zeit hat man sich vor allem auf die maligne entarteten Tumorzellen konzentriert. Hierbei stand die Akkumulation von genetischen Aberrationen durch Mutationen im Vordergrund, die letztlich zur Fehlsteuerung von wichtigen Prozessen innerhalb der Zelle führten. So kann es durch „gain of function“ in Onkogenen oder „loss of function“ in Tumorsuppressorgenen zur Zellzyklusdysregulation kommen, die DNA-Reparatursysteme können ausfallen und die Interaktion im Gewebeverband kann gestört sein, nur um einige Beispiele zu nennen. Es war zwar bekannt, dass die Tumorzellen im Tumor selbst mit einer Vielzahl von nicht malignen Zellen vorliegen, dieses Stroma wurde jedoch lediglich als passiver und reaktiver Partner angesehen. Erst in der letzten Zeit mehren sich die Hinweise, welche entscheidende Rolle das Tumorstroma bei der Tumorinitiation, der Aufrechterhaltung und der Metastasierung von Tumoren hat. Inzwischen ist bekannt, dass Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Tumorerkrankungen rekrutiert werden können und im Tumorstroma diverse Funktionen

durch Differenzierung übernehmen können. Die verschiedenen Komponenten eines Tumors stehen in reger Kommunikation und beeinflussen sich gegenseitig.

In diesem Rahmen kommt es zur Aktivierung spezifischer Signalwege und zur Hochregulation von bestimmten Genprodukten in den verschiedenen Zelltypen, die sich von Vorgängen im Normalgewebe unterscheiden. Dieses Tumormilieu ist reich an Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Neben den Tumorzellen und den verschiedenen ausdifferenzierten Komponenten des Stromas tragen mesenchymale Stammzellen ebenfalls zu diesem Milieu bei. In einem Mammakarzinom-Modell, das eine erhebliche stromale Komponente aufweist, konnte die erhöhte Sekretion des CC Chemokins CCL5 (RANTES) durch mesenchymale Stammzellen nachgewiesen werden. Die CCL5 Sekretion führte dabei zu einer erhöhten Metastasierungsrate.

Das Pankreaskarzinom stellt einen der aggressivsten soliden Tumore des Menschen dar und imponiert durch eine besonders ausgeprägte stromale Reaktion. Durch die Proliferation der nicht malignen Bestandteile wird ein Umfeld geschaffen, das den Tumorzellen einen Überlebensvorteil bietet (Farrow and Evers 2002). Auf diese Weise erhält das Pankreaskarzinom sein aggressives lokales Wachstum, die frühe Metastasierungsfähigkeit und die hartnäckige Resistenz gegenüber den gängigen Chemotherapeutika und der Strahlentherapie. Daher verlangen zukünftige Therapiestrategien des Pankreaskarzinoms neben der gezielten Elimination der Tumorzellen ebenfalls die Erfassung des Stromas.

In den vorliegenden Studien wurde die Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen in das Tumorstroma und die konsekutive Aktivierung des CCL5-Promoters in diesen Zellen mittels transfizierter CCL5-Promoter Reportergenkonstrukte in einem murinen Pankreaskarzinom-Modell untersucht. Die Aktivierung konnte zur lokalen Therapie des Karzinoms durch Kopplung eines Suizidgenes an den CCL5-Promoter in mesenchymalen Stammzellen unter Ausnutzung der Tumorbiologie genutzt werden. Darüberhinaus wurde an humanen Tumorproben die Expression von CCL5 im Tumorgewebe untersucht, um die Relevanz der Ergebnisse des murinen Modells zu zeigen. Die so erhaltenen Erkenntnisse könnten einerseits neue spezifische Therapieansätze für maligne Erkrankungen aufzeigen, andererseits tragen sie zum grundsätzlichen Verständnis der Tumorbiologie bei.

Die Bedeutung des Stromas für die Tumorbologie

Tumorzellen existieren in einem komplexen nicht entarteten Umfeld, dem sogenannten Tumorstroma. Dazu gehört eine Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelien, Perizyten, Lymphendothelien und ein mononukleäres Infiltrat, genauso wie eine an Zytokinen und Wachstumsfaktoren reiche Extrazellulärmatrix. Die verschiedenen Bestandteile des Tumors stehen über lösliche Faktoren und über Zell-Zellkontakt in Verbindung und schaffen so aktiv ein Milieu, das essentiell für die Tumorentstehung, das Tumorwachstum und die Tumorprogression ist. Aufgrund dieser Eigenschaften rückt das Stroma vermehrt in das Interesse der Tumorforschung und bietet zukünftigen therapeutischen Interventionen potentielle neue Ziele.

Bereits in der embryonalen Entwicklung spielt das Mesenchym durch parakrine Signale eine entscheidende Rolle bei der Proliferation von Epithelien (Cunha and Hom 1996). Im Rahmen der Reifung kommt es zu einer verminderten Produktion von Wachstumsfaktoren und es wird ein neues Gleichgewicht zwischen den Zelltypen hergestellt. In Tumoren kommt es durch Entartung von Zellen zu Tumorzellen und durch damit ausgelöste Milieuveränderungen zur Reaktivierung der induzierenden Rolle des Mesenchyms (Bhowmick and Moses 2005).

Das Tumorstroma setzt sich aus verschiedenen Schlüsselkomponenten zusammen. Die Tumorgefäßversorgung ist dabei eine von den bedeutenden stromalen Bestandteilen. Mit dem Wachstum des Tumors kommt es zu einem Angebotsdefizit an Sauerstoff, da die bestehenden Gefäße nicht ausreichend sind (Mueller and Fusenig 2004). Dadurch kommt es zu einer Hochregulation von verschiedenen proangiogenen Faktoren wie VEGF, CXCL12 und MMP9 durch Tumorzellen und stromale Zellen (Olumi, Grossfeld et al. 1999). Auf diese Weise wird in Tumoren die Neoangiogenese zur Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen erreicht, die überlebenswichtig für die Tumorprogression ist. Diese neu gebildeten Gefäße sind jedoch anormal, sie sind unter anderem fenestriert und erlauben den vermehrten Durchtritt von Flüssigkeiten und Molekülen (Li, Fan et al. 2007; Mahadevan and Von Hoff 2007).

Der Zusammenhang zwischen Entzündung und Krebs ist für diverse maligne Erkrankungen bekannt. So können Kolonkarzinome auf dem Boden von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen entstehen, hepatozelluläre Karzinome durch Infektion mit Hepatitis B und C Viren und Magenkrebs durch *Helicobacter pylori* Besiedelung (Coussens and Werb 2002). Entzündung ist jedoch nicht nur auf die Entstehung von Karzinomen beschränkt, sondern auch in den Tumoren selber aktiv (Coussens and Werb 2002). Durch Sekretion von Zytokinen wie TNF α wird ein Milieu geschaffen, in dem es unter anderem durch verminderte Apoptose

zu weiterer DNA Schädigung und Epithelproliferation kommt (Balkwill 2004; Bhowmick and Moses 2005).

Durch eine Vielzahl chemotaktischer Proteine wie CCL2 und CSF1 kommt es zu einer ausgeprägten Invasion des Tumorgewebes durch Immunzellen wie Lymphozyten, dendritische Zellen, Neutrophile, Eosinophile, Mastzellen und Monozyten (Mueller and Fusenig 2004). Die Immunantwort des Körpers führt jedoch nicht zum Untergang des Tumors, im Gegenteil wird sie vom Tumor zur eigenen Progression genutzt (Coussens and Werb 2002; Mueller and Fusenig 2004; Condeelis and Pollard 2006). Eine wichtige Stellung in diesem Prozess haben die tumorassoziierten Makrophagen (TAM). Diese besitzen zwar ein Arsenal an tumorschädigenden Proteinen, exprimieren aber auch Wachstumsfaktoren wie VEGF, HGF, PDGF, TGF β und Zytokine wie TNF α , IL8 und IL10 (Mueller and Fusenig 2004; Bhowmick and Moses 2005; Li, Fan et al. 2007). Das anti-inflammatorische Zytokin IL10 inhibiert gleichzeitig die Lymphozytenfunktion, sodass zytotoxische T-Lymphozyten keine Immunantwort zeigen (Whiteside 2008). Über die Sekretion von matrix-modellierenden Proteinen wie MMP2 und MMP9 haben TAM zudem eine proangiogenetische und prometastatische Wirkung (Li, Fan et al. 2007; Gao and Mittal 2009). Tumore mit geringerem TAM Infiltrat zeigten in in-vivo Experimenten eine geringere Metastasierungsrate (Karnoub and Weinberg 2006). Immunzellen stellen durch Schaffung dieses komplexen Zytokinnetzwerkes einen wichtigen Beitrag zur Progression von malignen Erkrankungen, sind aber nicht die einzigen Stromalen Zellen, die neben den Tumorzellen am promalignen Milieu beteiligt sind.

Fibroblasten stellen einen Großteil des Tumorstromas und werden in diesem Kontext auch als „carcinoma associated fibroblasts“ CAF oder „tumor associated fibroblasts“ TAF bezeichnet. Phänotypisch treten CAF als Myofibroblasten, also als aktivierte Fibroblasten, in Erscheinung und exprimieren die Fibroblastenmarker FSP und FAP und die Myofibroblastenmarker Desmin und α -SMA (Spaeth, Dembinski et al. 2009). Als Ursprung dieser Populationen werden zwar auch ortsständige Stammzellen, epitheliale zu mesenchymale Transition (EMT) und rekrutierte Fibroblasten vermutet, in aktuellen Arbeiten kristallisiert sich allerdings zunehmend die bedeutende Beteiligung des Knochenmarks heraus (Mishra, Humeniuk et al. 2008; Spaeth, Dembinski et al. 2009).

CAF nehmen verschiedene Funktionen innerhalb des Tumorstromas wahr. Zunächst führen sie durch die Produktion von Kollagenen zum Aufbau einer derben Extrazellulärmatrix, die eine physische Barriere gegenüber Effektorzellen oder Chemotherapeutika darstellen kann (Li, Fan et al. 2007). CAF sezernieren eine Reihe von tumorfördernden Faktoren und

stimulieren damit das Tumorentstehung und -wachstum und die Progression (Olumi, Grossfeld et al. 1999; Hayward, Wang et al. 2001). Dazu gehören Wachstumsfaktoren wie IGF, TGF β , HGF, EGF, FGF aber auch proangiogene Faktoren wie VEGF, CXCL12 und MMP9 (Olumi, Grossfeld et al. 1999; Bhowmick, Neilson et al. 2004; Orimo, Gupta et al. 2005; Orimo and Weinberg 2006).

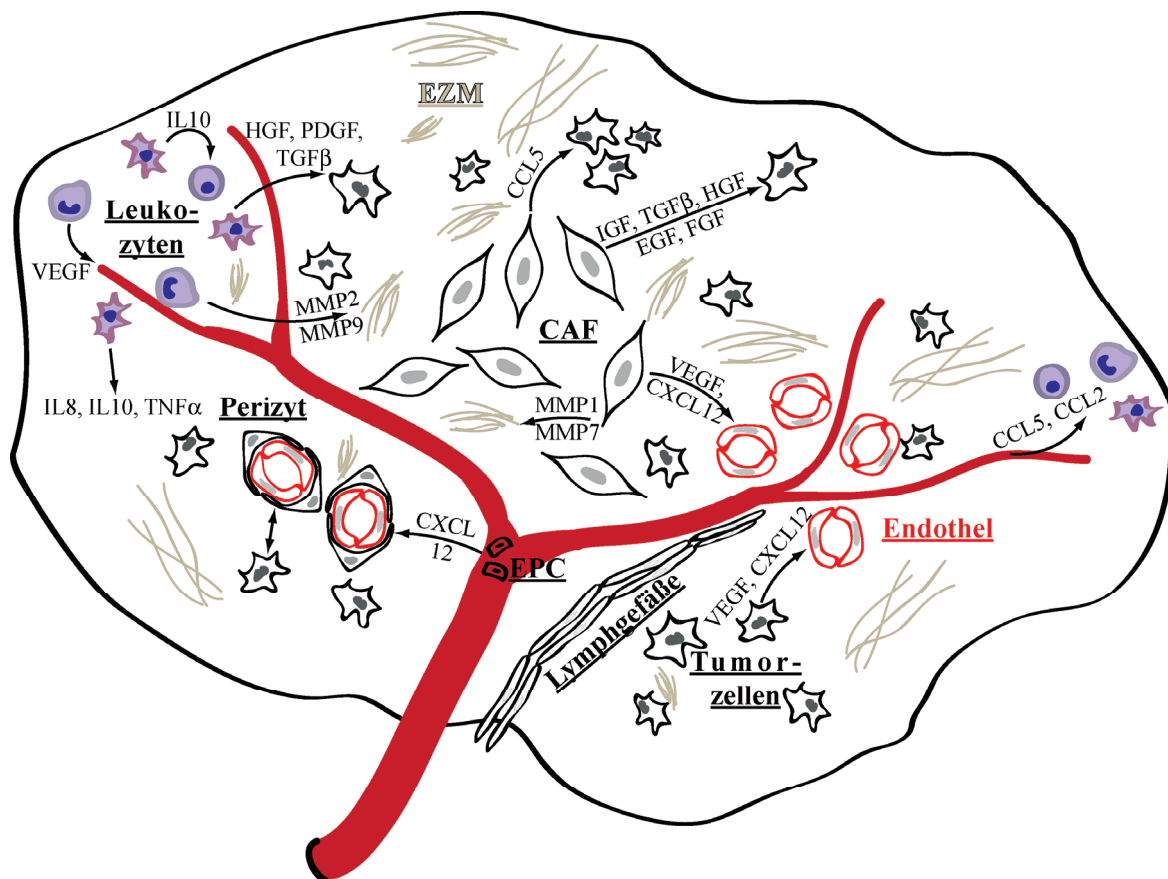


Abbildung 1: Ausgewählte Wechselwirkungen im Tumorstroma

Tumore stellen komplexe Netzwerke aus Tumorzellen, stromalen Zellen und Extrazellulärmatrix dar. Es kommt zu vielseitigen Interaktionen zwischen den verschiedenen Bestandteilen wie Tumorzellen, Fibroblasten, Endothelien, Lymphoendothelien, Perizyten und dem mononukleären Infiltrat. Daran sind u.a. Zytokine (darunter IL8, IL10, CCL2, CCL5, CXCL12, TNF α), Wachstumsfaktoren (wie HGF, PDGF, TGF β , IGF, EGF, FGF, VEGF), matrixmodellierende Proteine (z.B. MMP1, MMP2, MMP7, MMP9) und Zell-Zell-Kontakte beteiligt. Die Wechselwirkungen der verschiedenen Komponenten untereinander sind von größter Bedeutung für das Tumorwachstum und die Metastasierung. Zudem können die verschiedenen Faktoren die Rekrutierung zirkulierender Vorläuferzellen in das Tumorgewebe fördern. **EZM**: Extrazellulärmatrix; **EPC**: Endothelial Progenitor Cells; **CAF**: Carcinoma Associated Fibroblasts.

Tumorassoziierte Fibroblasten führen zu einer Erhöhung des Tumolvolumens und der Tumormasse, die hauptsächlich durch die Tumorzellen getragen wird, und behalten diese Fähigkeit auch nach etlichen in-vitro Passagen (Orimo, Gupta et al. 2005). CXCL12 führt neben parakriner Förderung des Tumorwachstums (Darash-Yahana, Pikarsky et al. 2004; Orimo, Gupta et al. 2005) auch durch die Rekrutierung von zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen zur Anregung der Angiogenese (De Falco, Porcelli et al. 2004; Orimo, Gupta et al. 2005). CAF sind nicht nur die Hauptproduzenten der EZM, sondern auch von matrixmodellierenden Proteinen. Die Sekretion von MMP1 und MMP7 wirkt zudem proangiogen und prometastatisch (Bhowmick, Neilson et al. 2004).

Das Tumorstroma kann auch als prognostischer Faktor genutzt werden. Für Brustkrebs korreliert die stromale Expression bestimmter Gene, die in einem prognostischen Prädiktor zusammengefasst wird, mit einer schlechten Prognose (Finak, Bertos et al. 2008). Ebenso kann die histologische Bewertung der desmoplastischen Reaktion im Lungenadenokarzinom als Prognosefaktor herangezogen werden (Maeshima, Niki et al. 2002).

Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind multipotente Vorläuferzellen, die sich wie undifferenzierte Zellen teilen und die Fähigkeit besitzen, in mesenchymale Gewebe wie Knochen, Knochenmarkstroma, Knorpel, Fett und Muskel und in nicht-mesenchymale Gewebe auszudifferenzieren (Pittenger, Mackay et al. 1999; Kumar, Chanda et al. 2008). MSC spielen eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Gewebeintegrität im Rahmen des normalen Zellturnovers und der Wundheilung. Sie können aus einer Vielzahl von Geweben, wo sie als ortsständige Stammzellen dienen, wie Retina, Leber, Innenohr, Magenschleimhaut und Blut isoliert werden, kommen aber hauptsächlich als kleine Zellpopulation (0,01-0,001% der über Ficoll/Percoll Gradienten aufgereinigten Zellen) im Knochenmark und Fett vor (Korbling, Estrov et al. 2003; Vaananen 2005; Kumar, Chanda et al. 2008). MSC sind in das Interesse gerückt, da sie leicht zu isolieren sind, in der Zellkultur gut expandierbar sind und sie die Möglichkeit der autologen Transplantation ohne nötige Immunsuppression bieten (Aboody, Najbauer et al. 2008). Aufgrund des hohen Selbsterneuerungspotentials, der hohen Proliferationsrate und der breiten Differenzierfähigkeit versprechen mesenchymale Stammzellen neue therapeutische Herangehensweisen für eine Vielzahl von Krankheiten (Sasportas, Kasmieh et al. 2009). Im Folgenden sollen die Eigenschaften von MSC und deren Rolle und therapeutisches Potential in malignen Erkrankungen vorgestellt werden.

Die „International Society for Cellular Therapy“ definiert mesenchymale Stammzellen (MSC) über 3 charakteristische Merkmale. Dazu gehören die Adhärenz an Plastik in der Zellkultur, verschiedene Phänotypmarker und die Differenzierfähigkeit zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten (Dominici, Le Blanc et al. 2006). MSC exprimieren CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 (Endoglin), CD106 und CD166. Sie sind negativ für die hämatopoetischen Marker CD34, CD45 und negativ für CD11 (Von Luttichau, Notohamiprodjo et al. 2005; Kumar, Chanda et al. 2008; Lazennec and Jorgensen 2008). Bis heute ist noch kein einzigartiger Marker bekannt, dessen Expression MSC charakterisiert. Das macht die Charakterisierung der Zellen schwer und führt dazu, dass oftmals keine einheitlichen Populationen verwendet werden (Phinney and Prockop 2007; Kumar, Chanda et al. 2008). Sie exprimieren MHC I, sind jedoch MHC II, CD40, CD80, CD86 und HLA-DR negativ (Von Luttichau, Notohamiprodjo et al. 2005; Kumar, Chanda et al. 2008; Lazennec and Jorgensen 2008).

Dank dieser Charakteristika sind MSC nicht immunogen und bei allogener Transplantation dieser Zellen ist keine Immunsuppression nötig (Mansilla, Marin et al. 2005). MSC sind darüber hinaus nicht sensitiv gegenüber zytotoxischen T-Lymphozyten (Angoulvant, Clerc et al. 2004). Im Gegenteil wurde beschrieben, dass mesenchymale Stammzellen immunsuppressive Wirkungen hervorrufen. Sie können die Formation zytotoxischer T-Lymphozyten wahrscheinlich über lösliche Faktoren inhibieren (Rasmusson, Ringden et al. 2003; Rasmusson, Uhlin et al. 2007; Opitz, Litzemberger et al. 2009). Somit unterdrücken sie eine allogene T-Zell Antwort und können auch die Reifung Antigen-präsentierender Zellen modulieren (Nasef, Mathieu et al. 2007). Auf diese Weise konnten MSC bei Studien zur Unterdrückung der Graft versus Host Reaktion nach Transplantation (Lazarus, Koc et al. 2005) oder in experimenteller Encephalitis (Constantin, Marconi et al. 2009) eingesetzt werden. MSC könnten somit für das Fehlen einer adäquaten Immunantwort des Körpers gegen Tumore mitverantwortlich sein.

Bei systemischer Gabe von mesenchymalen Stammzellen, zum Beispiel durch intravenöse Injektion im Mausmodell, kann eine bestimmte Verteilung der Zellen im gesunden Körper beobachtet werden. Dieses Verteilungsmuster wird zum einen durch die Zirkulation im Blutkreislauf, zum anderen durch die migratorische Kapazität der Stammzellen bestimmt (Von Luttichau, Notohamiprodjo et al. 2005). Mesenchymale Stammzellen sind nach i.v. Injektion in der Lunge und Milz aufgrund des Blutkreislaufes auffindbar. Zudem zeigen sie eine Migration in den Thymus, in die Lymphknoten, in die Haut, in das Gehirn, in die Speicheldrüsen, in den Darm und zum Teil auch in das Knochenmark (Pereira, O'Hara et al.

1998; Von Lüttichau, Notohamiprodjo et al. 2005). Bei dieser Migration können MSC die endotheliale Barriere überschreiten (Schmidt, Ladage et al. 2006). Es konnte jedoch keine Anreicherung in Leber, Niere und Muskel beobachtet werden (Studený, Marini et al. 2002; Studený, Marini et al. 2004).

Das Migrationsverhalten der mesenchymalen Stammzellen in-vivo verändert sich grundlegend, sobald Tiermodelle diverser Erkrankungen eingesetzt werden. Entzündung und Verletzung von Gewebe stellen starke Migrationsreize für MSC dar (Coffelt, Marini et al. 2009; Mishra, Glod et al. 2009). So zeigen MSC nach intravenöser Gabe einen starken Tropismus in die entzündeten Bezirke in einem Mausmodell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Khalil, Weiler et al. 2007) und in einem Enzephalomyelitis-Modell (Zappia, Casazza et al. 2005). In verschiedenen Modellen von Gewebeverletzung wurde eine Migration der MSC nachgewiesen. Es konnte in einem Hautwundmodell und einem Rückenmarksdurchtrennungs-Modell das Homing der Zellen in die Wundareale mit verbesserter Heilung gezeigt werden (Satoh, Kishi et al. 2004; Mansilla, Marin et al. 2005). Bei einem Ischämie/Reperfusionsschaden der Niere kommt es im Gegensatz zum normalen Tier zu einer Anreicherung von MSC in der geschädigten Niere (Lange, Togel et al. 2005), ähnliches Verhalten konnte in einem Glomerulonephritis-Modell beobachtet werden (Kunter, Rong et al. 2006).

Die Migration von mesenchymalen Stammzellen zu Orten von Gewebsschädigung ähnelt sehr der Leukozytenrekrutierung. Die Expressionsmuster von Zytokinen und Zytokinrezeptoren sind für die selektive Migration der Leukozyten in Entzündungsareale und Wunden von entscheidender Bedeutung. Analog dazu spielt die Expression funktioneller Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von mesenchymalen Stammzellen für die Verteilung im Organismus eine Rolle (Von Lüttichau, Notohamiprodjo et al. 2005; Chamberlain, Fox et al. 2007). Sowohl primäre als auch immortalisierte, humane wie murine Stammzellen exprimieren funktionell CCR1, CCR4, CCR7, CCR10 und CXCR5. Aufgrund dieser Ausstattung konnte das Homing in sekundär lymphatisches Gewebe (CCR7, CXCR5), in die Haut (CCR4, CCR10), in den Darm und in die Speicheldrüsen (CCR10) vorhergesagt werden (von Lüttichau). Ebenfalls wurde die Expression von CCR6, CCR9, CXCR1, CXCR3 und CXCR6 auf primären MSC beschrieben (Chamberlain, Fox et al. 2007; Stagg 2008). Die Expression des Rezeptors CXCR4, der eine Rolle in der Rekrutierung von aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen über seinen Liganden CXCL12 (SDF-1) zu spielen scheint (Orimo, Gupta et al. 2005), wird kontrovers berichtet. Von Lüttichau et al. konnten lediglich CXCR4 auf mRNA-Ebene nachweisen, jedoch in der FACS Analyse keine

funktionelle Expression detektieren (Von Lutichau, Notohamiprodjo et al. 2005). Chamberlain et al. konnten auf murinen MSC ebenfalls keine CXCR4 Expression zeigen, jedoch auf humanen MSC starke Signale in der FACS Analyse erkennen (Chamberlain, Fox et al. 2007). Die Kultivierungsdauer spielt eine Rolle bei der Expression. So kommt es durch häufige Passagierung zu einem Rezeptorenverlust mit Abnahme der CXCR4 Expression (Honczarenko, Le et al. 2006; Stagg 2008). MSC können folglich entsprechend ihres Rezeptorenprofils in Gewebe migrieren, die die korrespondierenden Liganden exprimieren und somit einen adäquaten Reiz darstellen.

Wie bereits erwähnt, zeigen mesenchymale Stammzellen einen ausgeprägten Tropismus in verletztes Gewebe. Dabei können sie die Wundheilung unterstützen und Funktion verbessern (Phinney and Prockop 2007). Einer der Mechanismen, durch den MSC zur Gewebereparatur beitragen, ist die Differenzierung in Bestandteile des entsprechenden Gewebes (Spees, Olson et al. 2003; Sasaki, Abe et al. 2008). In einem Modell von Rückenmarksverletzungen konnte die Differenzierung in neuronartige Zellen mit funktioneller Verbesserung beobachtet werden (Hofstetter, Schwarz et al. 2002). Der Einsatz von MSC wurde ebenfalls sehr intensiv in Herzinfarkt- und KHK-Modellen erprobt. Hierbei kam es zur Transdifferenzierung zu endothelialen Zellen, glatten Muskelzellen und sogar zu Cardiomyozyten mit verbesserter Pumpleistung (Orlic 2003; Silva, Litovsky et al. 2005). Ebenso tragen MSC zur Heilung chronischer Wunden durch Aufbau und Verbesserung der Gefäßversorgung bei und können den Lymphabfluss durch Differenzierung in lymphoendotheliale Zellen verbessern (Khalil, Weiler et al. 2007; Conrad, Niess et al. 2009). Ein weiterer Mechanismus besteht in der Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, sodass ein die Wundheilung unterstützendes Milieu entsteht. MSC sezernieren angiogene Faktoren wie VEGF und bFGF und matrix-modellierende Proteine wie MMP2 (Hall, Dembinski et al. 2007; Coffelt, Marini et al. 2009).

Das Tumormilieu ähnelt sehr stark dem Milieu der Wundheilung. In der Tat sind die ablaufenden Prozesse derart analog gestaltet, dass Tumore als „Wunden, die niemals heilen“ bezeichnet werden können (Dvorak 1986). Während normaler Wundheilung kommt es zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen, zur Proliferation von Fibroblasten, endothelialen und epithelialen Zellen, direkter Zellmigration und Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und matrixmodellierenden Proteinen (Karnoub, Dash et al. 2007). Etliche dieser Reparaturmechanismen sind in Tumoren konstitutiv aktiv und fördern auf diese Weise das Tumorwachstum, die Invasivität und Metastasierung (Bissell and Radisky 2001). Die Genexpressionsmuster von Fibroblasten, die in beiden Vorgängen einen großen zellulären

Anteil stellen, stimmen in großen Teilen überein, sodass Tumore nicht nur histologisch, sondern auch auf molekularer Ebene aktive Wunden darstellen (Chang, Nuyten et al. 2005).

Daher kommt es wie bei der Wundheilung zu einer gezielten Migration von MSC aus dem Knochenmark oder nach intravenöser Gabe in die Tumore (Kidd, Spaeth et al. 2009). Diese Rekrutierung konnte für etliche Tumormodelle verifiziert werden, wie für das Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Melanom, Ovarialkarzinom und das Gliom (Studeny, Marini et al. 2004; Hung, Deng et al. 2005; Nakamizo, Marini et al. 2005; Karnoub, Dash et al. 2007; Ren, Kumar et al. 2008). Die genauen molekularen Hintergründe dieses Migrationsverhaltens sind noch unklar, neben den oben geschilderten Erkenntnissen konnte jedoch auch die Beteiligung verschiedener Zytokin/Rezeptor Paare nachgewiesen werden. CXCL12/CXCR4, HGF/c-Met, VEGF/VEGFR, CCL2/CCR2 und Adhäsionsmoleküle wie β 1- und β 2-Integrine und L-Selektin sind assoziiert mit dem MSC-Tropismus (Son, Marquez-Curtis et al. 2006; Sasportas, Kasmieh et al. 2009).

Nach Migration der mesenchymalen Stammzellen werden diese in das Tumorstroma integriert, wo sie verschiedene Aufgaben wahrnehmen (Hall, Dembinski et al. 2007; Karnoub, Dash et al. 2007; Mishra, Humeniuk et al. 2008). MSC scheinen eine wichtige Rolle für die Vitalität des Tumors und der Tumorprogression zu spielen. In einigen Tumormodellen konnte eine Erhöhung der Wachstumsrate durch Gabe von MSC beobachtet werden. In einem Brustkrebsmodell konnte in-vitro und in-vivo ein tumorfördernder Effekt nachgewiesen werden (Mishra, Humeniuk et al. 2008), ebenso in einem Modell eines ovariellen Karzinoms (Spaeth, Dembinski et al. 2009). Zudem konnte in einem weiteren Mammakarzinom-Modell gezeigt werden, dass MSC die Metastasierungsrate erhöhen (Karnoub, Dash et al. 2007).

MSC fördern die Angiogenese innerhalb eines Tumors (Lazennec and Jorgensen 2008). Bis zu 30% der Endothelien stammen von Knochenmarkszellen ab (Hammerling and Ganss 2006). MSC tragen dabei zum einen durch Differenzierung in Endothelien und Perizyten zur Gefäßneubildung bei (Conrad, Gupta et al. 2007; Bexell, Gunnarsson et al. 2009). Zum anderen sezernieren die mesenchymalen Stammzellen lösliche Faktoren, die die Angiogenese antreiben. Darunter befinden sich die proangiogenen Faktoren VEGF, Ang-1, aber auch Wachstumsfaktoren wie PDGF, FGF-2 und die Zytokine IL-6, IL-8, TNF α (Beckermann, Kallifatidis et al. 2008; Lazennec and Jorgensen 2008; Coffelt, Marini et al. 2009). Diese Faktoren helfen zusätzlich bei der Aktivierung endothelialer Zellen zur Angiogenese und können zur Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen führen (Lazennec and Jorgensen 2008). Die angetriebene Angiogenese fördert das Tumorwachstum und kann das maligne Potential des Tumors erhöhen (Zhu, Xu et al. 2006).

Wie bereits geschildert, stellen fibroblastenartige Zellen als CAF einen Großteil des Tumorstromas. Diese „carcinoma associated fibroblasts“ treten als Myofibroblasten in Erscheinung und haben zum Teil ihren Ursprung im Knochenmark. Es konnte gezeigt werden, dass in Pankreastumor-Modellen bis zu 30% der Myofibroblasten ihren Ursprung im Knochenmark haben (Ishii, Sangai et al. 2003; Direkze, Hodivala-Dilke et al. 2004).

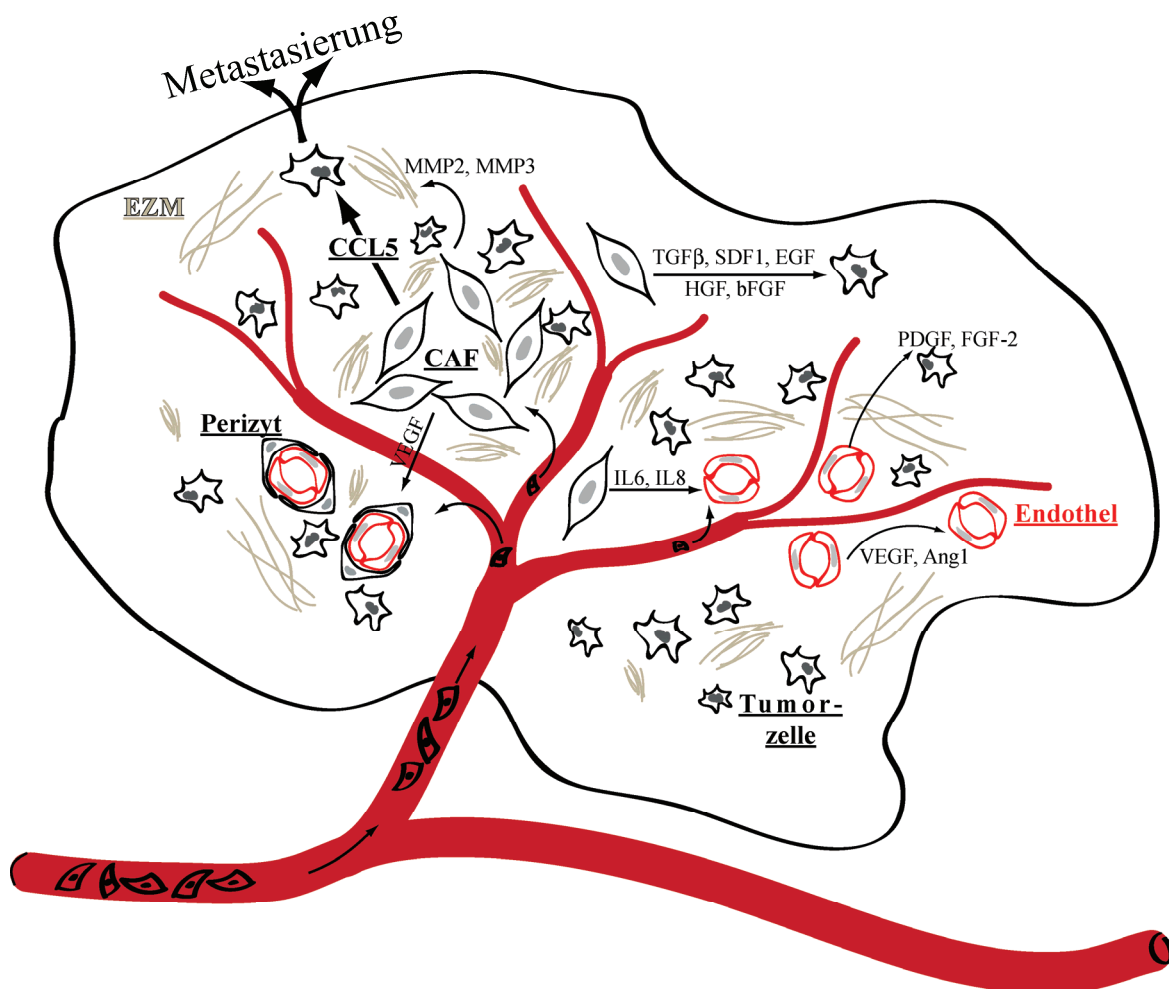


Abbildung 2: Ausgewählte Wirkungen von MSC im Tumorstroma

Tumore stellen durch die Produktion einer Vielzahl an chemotaktischen Proteinen in ähnlicher Weise wie Entzündungs- und Wundprozesse einen Migrationsreiz für MSC dar, sodass die Stammzellen nach Mobilisation aus dem Knochenmark und der Zirkulation in das Tumorstroma rekrutiert werden. Im stromalen Kontext kommt es zu einer Ausdifferenzierung der MSC in verschiedene Zelltypen wie Perizyten, Endothelien und fibroblastenartige Zellen (CAF). Durch die nun ausdifferenzierten MSC werden Zytokine (u.a. IL6, IL8, SDF-1, CCL5), Wachstumsfaktoren (darunter VEGF, TGFβ, EGF, HGF, bFGF, Ang1, PDGF, FGF2) und matrixmodellierende Proteine (MMP2, MMP3) produziert, die abermals die Tumorprogression fördern. Zum anderen wird durch die Ausdifferenzierung in Endothelien die Tumorneoangiogenese direkt durch MSC gefördert. Hervorzuheben ist die prometastatische Wirkung des durch fibroblastenartige Zellen sezernierten CC-Chemokins CCL5 auf Tumorzellen. **EZM:** Extrazellulärmatrix; **CAF:** Carcinoma Associated Fibroblasts

Durch Langzeitkultur von MSC in Tumorzellüberständen konnte eine Ausdifferenzierung in den myofibroblastenartigen Phänotyp in-vitro induziert werden (Mishra, Humeniuk et al. 2008; Spaeth, Dembinski et al. 2009). Dabei wurden die MSC zur Sekretion von verschiedenen Mediatoren wie IL6, VEGF, TGF β und SDF1 angeregt, über die sie parakrine Effekte ausüben. Darüberhinaus produzieren MSC als CAF ebenfalls die Wachstumsfaktoren HGF, bFGF und EGF. Über die Expression von MMP2, MMP3 und Thrombospondin 1 sind MSC ebenfalls an der Matrix Remodellierung beteiligt (Silzle, Kreutz et al. 2003; Coffelt, Marini et al. 2009; Spaeth, Dembinski et al. 2009). Im Rahmen der Ausdifferenzierung im Tumorstroma sezernieren MSC ebenfalls das CC-Chemokin CCL5, welches auf parakrinem Wege die Metastasierungsrate der Tumorzellen erhöht (Colombo, Benedetti et al. 1995; Karnoub, Dash et al. 2007).

Die in die Tumore migrierten MSC exprimieren dabei je nach Tumorentität unterschiedliche Gensets und passen sich dem jeweiligen Milieu an (Ostman and Augsten 2009; Spaeth, Dembinski et al. 2009). Die CAF zeigen oftmals zu den Tumorzellen komplementäre Stoffwechselwege. Sie können damit das Milieu durch Pufferung und Abtransport anfallender Metabolite stabilisieren und gehen eine metabolische Kooperation mit den malignen Zellen ein (Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2006; Kroemer and Pouyssegur 2008). In Cokulturrexperimenten konnte ebenso gezeigt werden, dass die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika durch diese Kooperation erhöht werden kann (Muerkoster, Wegehenkel et al. 2004). MSC fördern über die Ausdifferenzierung in fibroblastenartige Zellen und Produktion diverser Wachstumsfaktoren und Zytokine das Tumorwachstum, stabilisieren das Tumormilieu und können über die Matrix Remodellierung zur Invasivität und Metastasierung beitragen. Mesenchymale Stammzellen sind potentielle Vehikel einer Stammzell- und Gentherapie. Dank ihres ausgeprägten Tropismus in geschädigtes Gewebe, sei es eine Wunde, eine chronische Entzündung oder ein Tumor, können sie einerseits benötigte Vorläuferzellen und andererseits therapeutische Gene spezifisch in den entsprechenden biologischen Kontext transportieren (Conrad, Gupta et al. 2007). MSC bieten dabei einige Vorteile. So können sie relativ einfach isoliert werden und gut in Kultur gehalten und vermehrt werden. Sie zeigen eine hohe metabolische Aktivität bei geringer intrinsischer Mutationsrate (Hall, Dembinski et al. 2007). Nach Transfektion mit heutigen Methoden zeigen MSC ebenfalls eine starke Transgenexpression (Pereboeva, Komarova et al. 2003). Aufgrund dieser Eigenschaften bieten sich MSC zur Therapie von genetischen Erkrankungen an, in denen ein fehlerhaftes Gen vorliegt. Die Stammzellen können mit der korrekten Genvariante transfiziert werden und diese dann spezifisch in den von dem Defekt betroffenen Geweben zur Expression bringen.

Dieser Ansatz wurde erfolgreich bei der Osteogenesis imperfecta eingesetzt, wo in Stammzellen die mutierte Genvariante deaktiviert wurde. Nach anschließender Stammzelltransplantation konnte eine Zustandsverbesserung in den Patienten beobachtet werden (Horwitz, Prockop et al. 1999; Horwitz, Prockop et al. 2001; Horwitz, Gordon et al. 2002). Weitere Erkrankungen bei denen MSC in experimentellen Studien eingesetzt werden sind unter anderem die koronare Herzerkrankung und der Morbus Parkinson (Chen, Hung et al. 2005; Lu, Zhao et al. 2005).

Mesenchymale Stammzellen können ebenso in malignen Erkrankungen eingesetzt werden. Sie dienen dabei als trojanisches Pferd zum Transport von Genen und Genprodukten in den Tumor. Hierbei wurden in der Vergangenheit diverse antitumoröse Ansätze verfolgt. So wurden in einem Mammakarzinom und Melanommodell IFN β -produzierende MSC systemisch verabreicht. Dank der Anreicherung von MSC und damit auch von IFN β im Tumorgewebe konnte ein Überlebensvorteil und eine Tumorreduktion erreicht werden. Gleichzeitig konnte kein Anstieg des systemischen IFN β beobachtet werden (Studený, Marini et al. 2002). Mit anderen Genen, z.B. mit Suizidgenen, konnten ähnliche Ergebnisse in weiteren Mammakarzinom-Modellen und Gliom-Modellen erzielt werden (Nakamizo, Marini et al. 2005; Loebinger, Eddaoudi et al. 2009; Uchibori, Okada et al. 2009).

All diesen Studien ist gemeinsam, dass die Stammzellen die Genprodukte konstitutiv exprimieren. Der Effekt im Tumor wird in diesen Modellen nur durch das Migrationsverhalten bestimmt, systemischen Nebenwirkungen aufgrund dennoch stattfindender Anreicherung in anderen Organen kann so nicht begegnet werden. Wie oben bereits erläutert, exprimieren MSC im Rahmen ihrer Ausdifferenzierung im Tumorgewebe verschiedene Gensets. Dieses erlaubt durch Klonierung der therapeutischen Gene unter spezifische Promoter Kontrolle eine selektivere Genexpression im genauen biologischen Umfeld mit Reduktion der ungewünschten Nebenwirkungen.

Die Rolle von Zytokinen in der Tumorbilogie

Wie bereits beschrieben produzieren die verschiedenen Bestandteile von Tumoren eine Vielzahl an Zytokinen und schaffen so ein tumorförderliches Umfeld. Zytokine regulieren die Differenzierung und Proliferation von Zellen, steuern Immunantworten und sind in die Gewebshomöostase involviert (Luboshits, Shina et al. 1999). Über autokrine und parakrine Mechanismen werden die promalignen Eigenschaften wie Immunevasion, gesteigertes Wachstum und Angiogeneese vermittelt (Raman, Baugher et al. 2007). So entwickeln die Chemokine CXCL12, CCL2 und CXCL9 in-vitro direkt zellproliferative Wirkungen

(Karnoub and Weinberg 2006).

Eine herausragende Rolle spielen dabei chemotaktische Zytokine, sogenannte Chemokine. Chemokine steuern physiologisch die Migration von Leukozyten zu Orten von akuter und chronischer Entzündung (Balkwill 2004). Die in Tumoren chronisch erhöhte Chemokinproduktion führt zu einer Rekrutierung von Typ-2 Makrophagen, die sowohl über Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL10 und des Faktors TGF β als auch über eine Inhibition von dendritischen Zellen und T-Lyphozyten an der gestörten Immunantwort des Körpers gegen Tumore beteiligt sind (Balkwill 2004; Soria, Yaal-Hahoshen et al. 2008). An der Rekrutierung dieser tumorassoziierten Makrophagen (TAM) sind die Chemokine CCL2 und CCL5 beteiligt und sind so wichtige Determinanten eines Makrophageninfiltrates (Soria and Ben-Baruch 2008). Die TAM sezernieren proangiogene Faktoren wie MMP9 und VEGF und die Wachstumsfaktoren bFGF und EGF (Luboshits, Shina et al. 1999; Karnoub and Weinberg 2006).

Außerdem sind Chemokine in den Prozess der Metastasierung einbezogen. Neben der proinvasiven Wirkung einiger Chemokine spielen die Chemokinliganden- und die Chemokinrezeptoren- Ausstattung der Zellen und Gewebe ähnlich wie bei der Migration von Leukozyten oder mesenchymalen Stammzellen eine Rolle. So metastasierten in einem Mammakarzinom-Modell CXCR4 bzw. CCR7 exprimierende Tumorzellen vor allem in die Lunge bzw. Lymphknoten, die die entsprechenden Liganden CXCL12 bzw. CCL21 exprimierten (Muller, Homey et al. 2001).

Ein weiteres Chemokin, dessen bedeutende Rolle in der Tumorigenese und der Tumordinvasion derzeit erst bekannt wird, ist CCL5. Hierbei handelt es sich um ein 68 Aminosäuren langes CC-Chemokin, welches normalerweise in inflammatorische Geschehen involviert ist (Nelson, Kim et al. 1993; von Luetlichau, Nelson et al. 1996). Der frühere Name RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted) spielte auf die vorwiegende Expression durch aktivierte T-Lymphozyten im späten Zeitintervall (3-5 Tage) an (Schall 1991). CCL5 wird ebenfalls durch Thrombozyten und Makrophagen exprimiert und ist durch TNF α Stimulation auch in Fibroblasten und Nierenepithelien induzierbar (Nelson, Kim et al. 1993; Niwa, Akamatsu et al. 2001). Die Expression im Erwachsenen ist hauptsächlich auf Entzündungsgeschehen beschränkt, jedoch finden sich auch in der Milz vereinzelte positive Zellen (von Luetlichau, Nelson et al. 1996). CCL5 wirkt über 3 Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5, wobei letzterer hinsichtlich der Funktion der entscheidende Rezeptor ist (Tanaka, Bai et al. 2005). CCL5 wirkt chemotaktisch auf T-Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile, Basophile und dendritische Zellen (Schall 1991;

Nelson, Kim et al. 1993; Guignard, Combadiere et al. 1998). Neben der physiologischen Wirkung hat CCL5 Einfluss auf die Progression von malignen Erkrankungen. Eine CCL5 Expression konnte für verschiedene Tumorentitäten gezeigt werden, unter anderem für Melanome, Prostatakarzinome, Morbus Hodgkin, Chondrosarkome und Mammakarzinome (Luboshits, Shina et al. 1999; Mrowietz, Schwenk et al. 1999; Fischer, Juremalm et al. 2003; König, Senge et al. 2004).

Die Rolle von CCL5 für die Tumorbiologie wurde bisher am genauesten anhand des Mammakarzinoms untersucht. Luboshits et al. beschrieben eine hohe Expressionsrate an CCL5 in Mammakarzinomen, wohingegen im Normalgewebe keine Expression zu sehen war. Dabei korrelierte die CCL5 Expression mit dem Leukozyteninfiltrat und fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Eine CCL5 Expression konnte auch in Tumormetastasen nachgewiesen werden (Luboshits, Shina et al. 1999; Soria, Yaal-Hahoshen et al. 2008). In einer Studie von Niwa et al. waren die CCL5 Plasmaspiegel bei Patienten mit Mammakarzinom oder Zervixkarzinom ab Stadium II und in progressiver Erkrankung erhöht, wobei der CCL5 Gehalt des Primärtumors oder des metastatischen Gewebes einen besseren Marker darstellte (Niwa, Akamatsu et al. 2001). Die CCL5 Expression im Mammakarzinom förderte die Tumordinvasion über die Hochregulation von MMP9 in einem verstärkten monozytären Infiltrat und in den Tumorzellen. Die CCL5 Expression war durch Stimulation mit IFN γ und TNF α induzierbar. In-vitro führte CCL5 ebenfalls zu einer erhöhten Vaskularität (Azenshtein, Luboshits et al. 2002). CCL5 kann im Mammakarzinom einen Prädiktor für die Krankheitsprogression ab Stadium II darstellen (Yaal-Hahoshen, Shina et al. 2006). Durch Einsatz eines CCR5 Antagonisten konnte in einem weiteren Mammakarzinom-Modell eine Verlangsamung des Tumorwachstums erreicht werden und damit die proliferative Wirkung von CCL5 aufgedeckt werden (Robinson, Scott et al. 2003).

Die tumorfördernden Wirkungen werden durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen. CCL5 führt zu einer verstärkten Rekrutierung von Monozyten in das Tumorgewebe, die daraufhin zur Sekretion von löslichen Faktoren wie Wachstumsfaktoren, proangiogenen Faktoren und matrixmodellierenden Proteinen angeregt werden (Soria and Ben-Baruch 2008). CCL5 führt dabei zur Produktion von MMP9 durch Makrophagen (Robinson, Scott et al. 2002). Ebenso wurden Tumorzellen zur Sekretion von MMP2, MMP3, MMP9, MMP10, MMP17 und Cathepsin L angeregt (Stormes, Lemken et al. 2005; Chuang, Yang et al. 2009; Tang, Yamamoto et al. 2009). Außerdem fördert CCL5 direkt die Migration von Tumorzellen in in-vitro Migrationsassays (Chuang, Yang et al. 2009; Tang, Yamamoto et al. 2009; Xu, Bian et al. 2009). CCL5 ist über seinen Rezeptor CCR5 an der Rekrutierung von

regulatorischen T Zellen in den Tumor beteiligt. Diese Zellen sind in die Toleranz des Körpers gegenüber Tumoren involviert und die Inhibition dieser Achse konnte zur Verringerung des Tumorwachstums in einem Pankreaskarzinom-Modell eingesetzt werden (Tan, Goedegebuure et al. 2009). Durch diese verschiedenen Mechanismen ist CCL5 in der Lage, die Proliferation, die Aggressivität und das Metastasierungsverhalten von Tumoren zu beeinflussen. Durch Inhibition von CCL5 konnte daher in einem Mammakarzinommodell eine verminderte Metastasierung in die Lunge und die Leber erzielt werden (Stormes, Lemken et al. 2005).

CCL5 wird jedoch nicht nur von den Tumorzellen sezerniert. Karnoub et al. konnten in Coimplantationsversuchen von humanen Mammakarzinomzellen mit mesenchymalen Stammzellen die de novo Synthese von CCL5 durch die MSC nachweisen. Dabei führte die CCL5-Expression durch parakrine Wirkung auf die Tumorzellen zur Erhöhung der Motilität, Invasion und Metastasierung. Wurden die metastasierten Tumorzellen isoliert und erneut implantiert, war hingegen keine erhöhte Metastasierungsneigung feststellbar. Somit sind nicht zwangsläufig nur konstitutiv exprimierte Faktoren von Tumorzellen, sondern ebenfalls Signale wie CCL5 aus dem Tumorstroma für die Metastasierung notwendig (Karnoub, Dash et al. 2007). Die Expression von CCL5 durch mesenchymale Stammzellen konnte in vitro reproduziert werden (Pinilla, Alt et al. 2009). Ähnliche Wirkungen zeigten MSC auf Prostatakarzinome. CCL5 führte hier zu einem beschleunigten Tumorwachstum, zum anderen stellte CCL5 einen möglichen Prediktor für Knochenmetastasen dar (Sung, Hsieh et al. 2008).

Die Expression von CCL5 durch mesenchymale Stammzellen bietet einer Gentherapie zur Therapie von malignen Erkrankungen einen neuen Ansatzpunkt. Wie bereits beschrieben zeigen MSC einen ausgeprägten Tropismus zu Tumoren und erlauben damit einen Gentransport in das Tumorgewebe. MSC sind jedoch auch in gesunden Geweben nachweisbar und würden daher bei konstitutiver Expression des therapeutischen Gens ungewünschte Nebenwirkungen entwickeln. Aufgrund der kaum vorhandenen Expression von CCL5 im Normalgewebe und der selektiven Hochregulation in MSC nach Integration in das Stroma von Tumoren bietet sich der CCL5-Promoter als regulatorisches Element eines therapeutischen Gens an. Somit kann die Therapiespezifität durch die Kopplung des Stammzelltropismus mit der gewebeabhängigen CCL5-Promoteraktivierung unter Minimierung der systemischen Auswirkungen erhöht werden.

Suizidgentherapie

Ziel jedes therapeutischen Ansatzes in der Tumorthherapie ist es, den Tumor gezielt und aggressiv zu bekämpfen und gleichzeitig die systemischen Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten. Die etablierten Verfahren in der Chemotherapie und Strahlentherapie können trotz aller Fortschritte diesen Anforderungen nicht angemessen gerecht werden. Sie gehen noch immer mit einer großen Beeinträchtigung des Patienten einher und können sogar das Risiko von Zweitmalignomen deutlich erhöhen (Kaldor, Day et al. 1990; Kaldor, Day et al. 1990; Relling, Rubnitz et al. 1999). Daher werden viele Hoffnungen auf die Möglichkeiten der Gentherapie und der Stammzelltherapie gesetzt. Ein vielversprechender Ansatz ist dabei die Benutzung der Suizidgentherapie, bei der gezielt im Tumorgewebe die Expression von sogenannten Suizidgenen erreicht werden soll. Diese Suizidgene kodieren für Enzyme, die die Transformation einer sonst unschädlichen Substanz, einer sog. Prodrug, in einen toxischen Metaboliten katalysieren (van Dillen, Mulder et al. 2002). In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl an verschiedenen Systemen, die nach dem obigen Prinzip arbeiten, unter anderem die Kombinationen Cytosin-Deaminase/5-Fluorocytosin, Nitroreduktase/CB 1954 und Thymidin-Phosphorylase/5'-Deoxy-5-Fluorouridin, entwickelt (Austin and Huber 1993; Bridgewater, Springer et al. 1995; Patterson, Zhang et al. 1995). Das am besten untersuchte und am meisten eingesetzte Prodrug aktivierende System ist das von Moolten et al. erstmalig beschriebene HSV-TK/Ganciclovir System (Moolten 1986). Dabei wird die hohe Affinität der Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus Typ 1 ausgenutzt, um Ganciclovir, das kein Substrat für zelluläre Kinasen darstellt, zu aktivieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Therapie in einem murinen Pankreastumormodell dieses System für eine Suizidgentherapie verwendet und soll daher genauer vorgestellt werden.

Erster Bestandteil des HSV-TK/Ganciclovir Systems ist die Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus Typ 1. Dabei handelt es sich um ein 376 Aminosäuren langes Protein, das von einem 1128bp Gen kodiert wird (Morfin, Souillet et al. 2000). Es besitzt eine ATP Bindungsstelle (Aminosäuren 51-62) und eine Nucleosid-Bindungsstelle (Aminosäuren 168-176), welche eine Rolle für die katalytische Aktivität spielen (Graham, Larder et al. 1986). Die HSV-TK unterscheidet sich von zellulären Thymidinkinasen unter anderem durch eine etwa 1000-fach erhöhte Affinität gegenüber azyklischen Deoxyguanosin-Analoga wie Aciclovir und Ganciclovir (Mesnil and Yamasaki 2000). Die HSV-TK führt zur Phosphorylierung von Ganciclovir und fixiert es auf diese Weise in der Zelle, da die Zellmembran für phosphorylierte Stoffe impermeabel ist (Field, Davies et al. 1983). In der Vergangenheit wurden etliche Mutanten der Thymidinkinase kloniert, um die Affinität und

Sensitivität für Ganciclovir weiterhin zu erhöhen (Black, Newcomb et al. 1996; Pilger, Perozzo et al. 1999; Qiao, Black et al. 2000). Eine weitere interessante Anwendung der HSV-TK besteht in der in-vivo Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Durch Markierung spezifischer HSV-TK Substrate wie Ganciclovir oder Penciclovir (z.B. mit ^{18}F) kann die HSV-TK Expression bildhaft dargestellt werden (Gambhir, Bauer et al. 2000; Hung, Deng et al. 2005).

Nach Erreichen einer HSV-TK Expression im Zielgewebe muss die inaktive Substanz Ganciclovir (Gcv) appliziert werden. Ganciclovir ist ein azyklisches Nucleosidanalogen zu 2'-Deoxyguanosin (Fillat, Carrio et al. 2003). Es wird in die Zellen aufgenommen und nur von HSV-TK positiven Zellen zu Ganciclovir-Monophosphat verstoffwechselt, da zelluläre Thymidinkinasen keine ausreichende Affinität für Ganciclovir aufweisen. Dieser Schritt ist entscheidend für die darauf folgenden 2 Phosphorylierungen durch zelluläre Enzyme wie der Guanylatkinase und der Phosphoglyceratkinase zu Ganciclovir-Triphosphat (Matthews and Boehme 1988). Hierbei handelt es sich um den aktiven Metaboliten, der einen kompetitiven Inhibitor von dGTP darstellt (Cheng, Grill et al. 1983). Es kommt zu einer Inhibition der DNA-Polymerasen und trotz 5'- und 3'- Hydroxygruppen verhindert der unvollständige Zuckerring die DNA-Elongation und damit die DNA-Replikation. Auf diese Weise wird der apoptotische Zelltod eingeleitet. Daneben wird Ganciclovir-Triphosphat auch in das Genom eingebaut, was zum einen zu einem Zellzyklusarrest und zum anderen zum Zelltod führt (Ilsley, Lee et al. 1995; Halloran and Fenton 1998; Wei, Chao et al. 1999). Außerdem wurden chromosomale Aberrationen und Schwester-Chromatid Austausch durch Gcv-Triphosphat mit konsekutivem Zelluntergang beobachtet (Thust, Schacke et al. 1996). Alle diese Mechanismen greifen fast ausschließlich sich teilende Zellen an und sind daher spezifisch für schnell teilende Gewebe, in denen durch HSV-TK Expression der erste Phosphorylierungsschritt vollzogen werden kann. Ganciclovir ist daher ein in der antiviralen Therapie bei Cytomegalie-, Varizella Zoster- und Herpes Simplex Virusinfektionen häufig verabreichtes Medikament (Faulds and Heel 1990).

Moolten hat erstmalig das HSV-TK/Gcv System zum therapeutischen Ansatz in einem murinen Tumormodell beschrieben. Dazu wurden Tumorzellen vor Implantation in Balb/c Mäuse mit der HSV-TK transfiziert. Durch anschließende Ganciclovir Behandlung in vivo konnte eine Tumorrogression erreicht werden (Moolten 1986). In weiteren Tumormodellen konnte durch Einsatz dieser Suizidgenstrategie eine ausgedehntere Tumornekrose als Reaktion beobachtet werden (Makinen, Loimas et al. 2000). Auffällig war im in vitro Versuch, dass es bei dichter Aussaat von TK^+ und TK^- Zellen und Zugabe von Ganciclovir

zum Medium zu einem Untergang beider Zellpopulationen kam (Moolten 1986). Ein direkter Zellkontakt schien für diesen Effekt notwendig zu sein. Experimentelle Tumore konnten auch effektiv behandelt werden, wenn nur eine Minderheit der Zellen TK⁺ waren (Freeman, Abboud et al. 1993). In einem Kolonkarzinommodell reichten 10%, in einem Osteosarkommodell 5% TK⁺ Zellen (Marini, Nelson et al. 1995; Walling, Swarthout et al. 2000).

Dieses Phänomen wird heute als Bystander-Effekt bezeichnet und ist gerade für die experimentelle Tumorthherapie von entscheidender Bedeutung, da er eine geringe HSV-TK Expression kompensieren kann (Dufлот-Dancer, Piccoli et al. 1998). Durch stereotaktische Implantation von Zellen, die retrovirale HSV-TK enthaltende Partikel produzierten, in Gliomgewebe konnte trotz geringer Transfektionseffizienz unter Ausnutzung des Bystander-Effects in diesem Modell eine Tumorregression erreicht werden (Culver, Ram et al. 1992). Ebenso können hierdurch auch andere Zellpopulation in einem Tumor wie endotheliale Zellen und damit die Tumorgefäßversorgung angegriffen werden (Arafat, Casado et al. 2000). Besonders interessant ist die Beschreibung des noch nicht gesicherten „distant bystander effects“. Bei Implantation verschiedener Tumore mit unterschiedlichem HSV-TK Status, die untereinander keinen Kontakt hatten, kam es bei Ganciclovir Behandlung ebenfalls zur Regression der TK⁻ Tumore (Kianmanesh, Perrin et al. 1997; Wei, Bougnoux et al. 1998; Engelman, Heslan et al. 2002). Dieser Effekt scheint jedoch von dem verwendeten Tumormodell abhängig zu sein, da in einem Melanommodell keine Verkleinerung TK-Tumore beobachtet werden konnte (Slade, Galetic et al. 2001). Der „distant bystander-effect“ könnte die Anwendung der Suizidgentherapie auch auf metastatische Stadien ausweiten.

Für den Bystander-Effekt scheint die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions eine herausragende Rolle zu haben (Fick, Barker et al. 1995). So konnte der Transfer von Ganciclovir-Triphosphat über Gap Junctions an benachbarte Zellen bereits nach wenigen Stunden nachgewiesen werden (Bi, Parysek et al. 1993; Denning and Pitts 1997; Rubsam, Boucher et al. 1999). In verschiedenen Versuchen konnte die Transfektion mit Cx43, ein für den Aufbau von Gap Junctions wichtiges Connexin, die Ganciclovir Wirkung verstärken (Dilber, Abedi et al. 1996; Mesnil and Yamasaki 2000). Dieser interzelluläre Transport wurde im Sinne eines Schutzmechanismus der TK⁺ Einzelzelle („good samaritan effect“) erklärt, der die Toxizität in die umgebenden Zellen verlagert und gerade dadurch den eigentlichen Therapieerfolg verstärkt (Wygoda, Wilson et al. 1997). Für einige Substanzen wie cAMP, Retinoide und Glukokortikoide konnte gezeigt werden, dass sie in-vitro die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions erhöhen und damit den Erfolg des HSV-TK/Gcv

Systems verbessern können (Yamasaki and Katoh 1988; Trosko, Madhukar et al. 1993; Carystinos, Katabi et al. 1999).

Neben dem Austausch über Gap Junctions werden noch andere Thesen zur Ursache des Bystander Effects diskutiert, deren Beweis aber noch nicht erfolgt ist. So konnte die Phagozytose von apoptotischen Körperchen TK^+ Zellen durch TK^- Zellen mit konsekutivem Zelluntergang elektronenmikroskopisch beobachtet werden (Freeman, Abboud et al. 1993). Jedoch scheint die Phagozytose erst nach Einleiten der Apoptose zu erfolgen (Hamel, Magnelli et al. 1996). In vereinzelt Studien konnte phosphoryliertes Gcv im Kulturmedium nachgewiesen werden (Drake, Pitlyk et al. 2000). Ebenso wird eine Immunantwort diskutiert, da sich unter anderem das HSV-TK System in athymischen Mäusen als nicht effektiv gezeigt hat (Colombo, Benedetti et al. 1995) und eine erhöhte entzündliche Infiltration nachgewiesen werden konnte (Vile, Nelson et al. 1994).

Dieses Suizidgensystem hat sich in der Vergangenheit in experimentellen Tumormodellen bewährt. Daher wurde sehr früh versucht, auch in klinischen Studien Erfolge damit zu erzielen. Dazu wurden zunächst zellbasierte HSV-TK retrovirale Vektoren produzierende Zellen in kleinen klinischen Studien zu Hirntumoren eingesetzt. Hierbei wurden die Zellen stereotaktisch in die entsprechenden Hirnareale eingebracht. Es zeigten sich jedoch nur geringe Effekte in einzelnen Patienten (Ram, Culver et al. 1997; Klatzmann, Cherin et al. 1998; Klatzmann, Valery et al. 1998). In späteren Studien wurde adenoviraler Gentransfer eingesetzt, in denen eine erhöhte Effektivität gegenüber retroviralen Vektoren gezeigt werden konnte (Sandmair, Vapalahti et al. 2000).

In den oben genannten experimentellen Modellen wurde die intratumorale HSV-TK Expression durch Tumorinduktion mit TK^+ Zellen oder durch Injektion von TK^+ Zellen in den Tumor erreicht. Der Bystander-Effekt, der typisch für das HSV-TK/Gcv System ist, kann auch zwischen verschiedenen Zelltypen auftreten, sodass für therapeutische Ansätze nun auch andere Zellarten in Frage kommen. Dank der Entdeckung der gezielten Migration von mesenchymalen Stammzellen und damit deren Potential als zellbasierte Vehikel für den Gentransport kann eine solche Suizidgenstrategie nun deutlich eleganter und effektiver eingesetzt werden. TK^+ MSC können intravenös appliziert werden und das Gen aufgrund des Zelltropismus gezielt im Tumor zur Expression bringen. Dadurch ist man nicht mehr auf die wenig praktikable Übergangslösung der intratumoralen Injektion von TK^+ Zellen angewiesen, sondern kann eine einfach durchzuführende systemische Injektion anwenden.

Eine weitere Steigerung der Effektivität und vor allem eine Reduktion der systemischen Nebenwirkungen kann durch einen vollkommen neuen Ansatz erreicht werden. Dabei wird

die Expression der HSV-TK in den MSC von einem Promoter reguliert, der spezifisch im Tumorgewebe hochreguliert wird. Auf diese Weise wird die Therapiespezifität abermals erhöht, da die Zellen, die nicht in das Tumorgewebe migriert sind, nicht zur Expression der HSV-TK angeregt werden. Somit werden unerwünschte, systemische Nebenwirkungen nochmals deutlich vermindert.

Das Pankreaskarzinom

Das duktales Pankreasadenokarzinom stellt eines der aggressivsten Malignome des Menschen dar. Das infiltrative lokale Wachstum, die frühe Metastasierung in andere Organe und das Fehlen spezifischer Frühsymptome sind nur einige Gründe für die schlechte Prognose der Patienten. Histologisch dominiert neben den drüsenartigen epithelialen Zellverbänden die ausgeprägte reaktive Proliferation des Tumorstromas. Dadurch kommt der feste und derbe Tumoraufbau zustande, der von umgebenden Strukturen nur schwer abgegrenzt werden kann. Häufig kommt es zur Gefäß- und Nerveninfiltration. Das Tumorstroma hat einen großen Einfluss auf die Proliferation und Aggressivität von Tumoren. Daher eignen sich das Pankreaskarzinom und dessen Tiermodelle besonders zur Untersuchung der Stroma-Tumor Interaktionen und können somit neue therapeutische Ziele offenbaren.

Das Pankreaskarzinom gehört zu den aggressivsten soliden Tumoren des Menschen. Bei einem Anteil von nur 3% an allen Tumoren stellen Pankreastumore den 4. häufigsten Grund eines krebisbedingten Todes dar (Maitra, Fukushima et al. 2005). Die Inzidenz des Tumors in den USA mit ungefähr 38.000 neu aufgetretenen Fällen überschreitet nur knapp die Todesfallzahl von etwa 34.000. Das macht deutlich, dass fast jeder Patient mit einem Pankreaskarzinom an diesem auch versterben wird. Die Todesrate ist seit 1960 in etwa konstant geblieben und konnte auch durch neue Therapiestrategien nicht deutlich gesenkt werden (Jemal, Siegel et al. 2008). In Deutschland entwickeln derzeit circa 13.000 Menschen pro Jahr ein Pankreaskarzinom, was zu einer Inzidenz von 10-11/100.000 führt. Die 5 Jahres-Gesamtüberlebensrate liegt bei 4% und kann nur bei kompletter chirurgischer Tumorresektion und adjuvanter Chemotherapie auf 20-25% gesteigert werden (Cameron, Crist et al. 1991). Diese Kriterien erfüllt aber aufgrund der schlechten Diagnostizierbarkeit in Frühstadien nur eine kleine Minderheit der Patienten, sodass das mediane Überleben bei 4-8 Monaten liegt. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen, jedoch liegt bei Männern das mittlere Erkrankungsalter mit 69 Jahren etwas früher als bei Frauen mit 76 Jahren (Loos, Friess et al. 2009). Es konnten einige Risikofaktoren für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms identifiziert werden. So trägt das Alter (medianes Erkrankungsalter ist 73 Jahre) zur Entwicklung bei, ebenso wie Ernährungsfaktoren im Sinne einer fleisch- und fettreichen Diät

und Adipositas. Außerdem beeinflusst ein bestehender Diabetes mellitus und eine chronische Pankreatitis das Auftreten von Pankreaskarzinomen (Lowenfels, Maisonneuve et al. 1993). Ein entscheidender Risikofaktor ist Nikotinabusus. Zudem gibt es eine Anzahl relativ seltener hereditärer Syndrome (Mutationen im BRCA 1/ 2-Gen, in FANC C/G- Gen, MSH2/MLH1-Gen und im PRSS1 Gen, MEN), die ein Pankreaskarzinom hervorrufen können (Maitra, Fukushima et al. 2005).

Bei über 90% aller Pankreaskarzinome handelt es sich um duktales Adenokarzinome. Daher wird in dieser Arbeit „Pankreaskarzinom“ synonym zu „duktales Pankreasadenokarzinom“ verwendet. Die übrigen Formen wie das muzinöse Zystadenokarzinom, das intraduktales papillärmuzinöses Karzinom, das Azinuszell-Karzinom und die neuroendokrinen Tumore unterscheiden sich zum Teil erheblich in der Biologie und der Prognose (Loos, Friess et al. 2009) und werden im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet.

Bislang ist die Ursprungszelle des Pankreaskarzinoms unbekannt, als mögliche Ausgangszellen werden duktales Zellen, Azinuszellen und zentroazinäre Zellen diskutiert. Verschiedene morphologische Befunde und biologische Erkenntnisse aus Tiermodellen wie genetische Aberrationen lassen jedoch bislang keine eindeutigen Schlüsse zu (Wagner, Greten et al. 2001; Andea, Sarkar et al. 2003; Hruban, Wilentz et al. 2005).

Wie für andere Karzinome konnte für das Pankreaskarzinom ebenfalls ein Progressionsmodell aufgestellt werden. Es konnten 3 Vorläuferläsionen entdeckt werden, von denen die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) die wichtigste zu sein scheint. Diese Läsion ist vor allem in kleineren Gängen zu finden und zeigt zum Teil ähnliche genetische Aberrationen wie das invasive Karzinom (Maitra, Fukushima et al. 2005). Mit Fortschreiten der Vorläuferläsionen werden vermehrt genetische Mutationen in den Tumorzellen angehäuft, die zu dem invasiven Karzinom führen. Ein in der Kaskade sehr frühes Ereignis ist die aktivierende Mutation des G-Proteins KRAS, das in eine Signalkaskade für Proliferation, Motilität und Zellüberleben eingebettet ist (Fleming, Shen et al. 2005). Weitere Schritte sind Telomerverkürzung, Reaktivierung der Telomerase, Mutationen in den Tumorsuppressorgenen p16/CDKN4 (Zellzykluskontrolle), TP53 (Apoptose, Zellzykluskontrolle) und SMAD4 (TGF β -Signalweg) (Siegel and Massague 2003; Maitra, Fukushima et al. 2005). Ein Fortschreiten zum duktales Pankreasadenokarzinom findet in einem Zeitfenster von einigen Jahren statt (Hruban, Wilentz et al. 2005).

Ein Charakteristikum des Pankreaskarzinoms ist die ausgeprägte desmoplastische Reaktion. Hierunter versteht man die prominente reaktive Proliferation des Tumorstromas bestehend aus Fibroblasten, Endothelien, Perizyten, einem mononukleären Infiltrat und der extrazellulären

Matrix (Chu, Kimmelman et al. 2007). Diese Reaktion kann derart ausgeprägt sein, dass die entarteten Pankreastumorzellen die Minderheit des Tumorgewebes stellen (Maitra, Fukushima et al. 2005). Diese im Vergleich zu anderen Tumorentitäten herausragende stromale Proliferation ließ früh den Schluss zu, dass das Stroma einen großen Anteil an der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms hat (Farrow, Sugiyama et al. 2004).

Auch hier spielen verschiedenste Mechanismen eine Rolle. Das derbe Stroma bildet eine Barriere für Chemotherapeutika auf dem Weg zum Wirkort (Olive, Jacobetz et al. 2009). Außerdem fördert die Kooperation von stromalen Zellen mit Tumorzellen deren Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, was das schlechte Ansprechen des Pankreaskarzinoms in der Chemotherapie erklärt (Muerkoster, Wegehenkel et al. 2004). Das Stroma ist auch Produktionsort zahlreicher promaligner Faktoren. Das Tumorstroma produziert Wachstumsfaktoren wie EGF, PDGF und HGF und fördert über parakrine Wirkungen das Wachstum und die Tumorzellmotilität (Qian, Mizumoto et al. 2003; Farrow, Sugiyama et al. 2004; Mahadevan and Von Hoff 2007). CAF sind im Pankreaskarzinom ebenfalls an der Invasivität beteiligt. Bei Koimplantation von Tumorzellen mit Fibroblasten konnte eine erhöhte Metastasierung beobachtet werden (Hwang, Moore et al. 2008). Dabei kommt es zu einer spezifischen prometastatischen Genexpression, die abhängig vom entsprechenden biologischen Umfeld ist (Nakamura, Fidler et al. 2007). So werden unter anderem die matrix-modellierenden Proteine MMP2, MMP3 und MMP9 sezerniert (Farrow, Sugiyama et al. 2004; Chu, Kimmelman et al. 2007). MMP9 führt im Pankreaskarzinom ebenfalls zur Aktivierung von VEGF und regt damit die Angiogenese an. Diese Sekretion findet nicht in zellautonomer Weise statt, da in den stromalen Zellen keine Mutationen beobachtet werden konnten (Walter, Omura et al. 2008). Interessanterweise kommt es auch zu einer Aktivierung tumorassoziiertes Signaltransduktionswege spezifisch im Stroma durch parakrine Stimulation aus Tumorzellen. Einer dieser Pathways ist der Hedgehog (Hh)-Pathway, der in der frühen Entwicklung unter anderem der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung dient und in Tumoren und auch im Pankreaskarzinom reaktiviert wird (Yauch, Gould et al. 2008; Tian, Callahan et al. 2009). Die Stimulation des Hh-Pathways im Tumorstroma führt zur Expression von weiteren tumorfördernden Faktoren wie IGF, die die Invasion fördern (Theunissen and de Sauvage 2009).

Ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Pankreaskarzinoms stellt die chronische Pankreatitis dar, die mit einem circa 27fachen Risiko einhergeht (Malka, Hammel et al. 2002; Duell, Casella et al. 2006). Ein aktives entzündliches Geschehen geht mit erhöhten Zytokin- und Chemokinkonzentrationen einher, die auch im Tumor erhalten bleiben. Im

Pankreaskarzinom herrscht eine Überexpression von CCL2 (Monti, Leone et al. 2003) und CCL20 (Kleeff, Kusama et al. 1999), was zur verstärkten Rekrutierung von Makrophagen führt. Diese sezernieren erneut Zytokine wie IL1 β , IL6 und TNF α und fördern damit den malignen Phänotyp. Von Stroma- und Tumorzellen sezerniertes CXCL12 fördert die Lungen- und Lebermetastasierung (Koshiba, Hosotani et al. 2000; Saur, Seidler et al. 2005).

Mesenchymale Stammzellen tragen auch zur Progression des Pankreaskarzinoms bei. Das an Chemokinen reiche Tumormilieu und die dort exprimierten Wachstumsfaktoren wie PDGF, EGF und VEGF führen zur Rekrutierung von MSC in das Tumorstroma (Beckermann, Kallifatidis et al. 2008). Dort integrieren sich die MSC in die proliferierenden Gefäße und steigern zudem über Produktion von VEGF zusätzlich die Angiogenese (Conrad, Gupta et al. 2007; Beckermann, Kallifatidis et al. 2008). Außerdem differenzieren MSC zu CAF von Pankreastumoren aus. Bis zu über 30% der tumorassoziierten Myofibroblasten stammen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab (Ishii, Sangai et al. 2003). Die Differenzierung zu CAF konnte ebenfalls in-vitro durch Langzeitkultur in von Pankreastumorzellen konditioniertem Medium induziert werden (Mishra, Humeniuk et al. 2008; Spaeth, Dembinski et al. 2009).

Pankreatische periazinäre Myofibroblasten sezernieren nach differentieller Regulierung CCL5, was auf eine mögliche Rolle in der Ansammlung von entzündlichen Zellen im Pankreas schließen lässt. Die CCL5-Sekretion wird dabei vor allem durch TNF α stimuliert, welches selbst im Tumorgewebe von vielen Zelltypen hochreguliert wird (Andoh, Takaya et al. 2000). In Patienten mit einem Pankreaskarzinom waren vorausgegangene Pankreatitiden mit aktivitätssteigernden Polymorphismen im CCL5-Promoter assoziiert (Duell, Casella et al. 2006).

Aufgrund der ausgeprägten desmoplastischen Reaktion des Pankreaskarzinoms werden in dieser Tumorentität die verschiedenen Aspekte der Tumorbiologie in einem System vereint. Neben den genetisch aberranten Tumorzellen spielt das Stroma mit dem Zytokin- und Chemokinnetzwerk, der Tumorgefäßversorgung, dem entzündlichen Infiltrat, mit den „carcinoma associated fibroblasts“ und der Extrazellulärmatrix eine entscheidende Rolle in der Tumorigenese und der Tumorprogression des Pankreaskarzinoms. Außerdem scheinen mesenchymale Stammzellen und veränderte CCL5-Expressionsmuster am Pankreaskarzinom beteiligt zu sein. Daher bietet das Pankreaskarzinom ein interessantes System zur Untersuchung der Tumor-Stroma-Interaktionen und vor allem zur Erprobung einer CCL5-Promoter gesteuerten, stammzellbasierten und spezifischen Suizidtherapie.

Ziele der Studie

Die supportiven Bestandteile von Tumoren, i.e. das Tumorstroma, wurden lange Zeit als unbeteiligte Zuschauer in der Karzinogenese betrachtet. Die maligne entarteten Zellen existieren jedoch in einem komplexen zellulären und extrazellulären Umfeld, das einen wichtigen Anteil an der Initiation und der Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps hat. Solide Tumore setzen sich neben den eigentlichen Tumorzellen, die eine Reihe genetischer Aberrationen angehäuft haben, aus diversen Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelien, Perizyten, Lymphgefäßen und einem mononukleären Infiltrat zusammen. Durch die diversen Komponenten wird ein Milieu erzeugt, das reich an Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Matrix modellierenden Proteinen ist. Die Tumorbiologie ähnelt damit in wichtigen Prozessen der Wundheilung. Tumore stellen daher einen ähnlichen Reiz wie eine Wunde zur Rekrutierung verschiedener Zelltypen dar, zu denen ortsständige, zirkulierende und aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen wie mesenchymale Stammzellen gehören. Die prominente Reaktion des Tumorstromas bei der Entwicklung eines Pankreasadenokarzinoms scheint einen großen Anteil an der lokalen Aggressivität und der Metastasierung zu haben. Die genaue Kenntnis der stromalen Interaktionen und vor allem der Zellrekrutierung von mesenchymalen Stammzellen ermöglicht es, neue Einblicke in die Tumorbiologie zu erhalten und Ansatzpunkte für mögliche therapeutische Interventionen zur Behandlung des Pankreaskarzinoms zu finden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung mesenchymaler Stammzellen innerhalb des Stromas für die Tumorbiologie anhand des Pankreasadenokarzinoms untersucht und daraus ein therapeutischer Ansatz insbesondere für diese therapierefraktäre Tumorentität abgeleitet. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Produktion von CCL5 und der vorausgegangenen CCL5-Promoter Aktivierung durch MSC. Dabei wurde zunächst die tumorfördernde Wirkung von mesenchymalen Stammzellen nach Migration in das Tumorstroma für das Pankreaskarzinom bestätigt. Im Weiteren wurde die Aktivierung des CCL5-Promoters nach Ausdifferenzierung der MSC innerhalb des Tumorstromas untersucht. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, inwiefern unter Ausnutzung dieser Biologie eine stammzellbasierte Suizidgentherapie, bei der das Suizidgen HSV-TK unter CCL5-Promoter Kontrolle in den MSC vorliegt, zur gezielten und spezifischen Therapie des Tumors ohne systemische Nebenwirkungen eingesetzt werden kann.

Experimentelle Schritte

- Im syngenem, orthotopen Pankreastumor-Mausmodell wurde in-vivo die Rekrutierung exogen zugeführter MSC der Linie p53^{-/-} in das Tumorstroma und der tumorfördernde Effekt gezeigt
- Anschließend wurden Konstrukte für die Reportergene RFP und eGFP und das Suizidgen HSV-TK mit dem humanen CCL5-Promoter als regulatorisches Element kloniert
- Danach wurden durch stabile Transfektion der Konstrukte in mesenchymale Stammzellen (MSC) der Linie p53^{-/-} entsprechende Zelllinien geschaffen und die Expression der Konstrukte mittels verschiedener Methoden in-vitro unter Ausnutzung des „Promoter-Leakage“ nachgewiesen
- Im nächsten Schritt wurde die Aktivierung des CCL5-Promoters in den MSC nach Integration in das Tumorstroma und Ausdifferenzierung durch fluoreszenzmikroskopischen und immunhistochemischen Nachweis der Reportergenprodukte gezeigt
- Anschließend wurde ein HSV-TK Suizidgenkonstrukt mit dem humanen CCL5-Promoter als regulatorisches Element kloniert und nach Transfektion in p53^{-/-} MSC ebenfalls auf die Expression hin untersucht
- Als therapeutischer, stammzellbasierter Ansatz wurde die Expression des Suizidgens HSV-TK durch CCL5-Promoter Kontrolle selektiv im Tumorgewebe erreicht und durch anschließende Gabe von Ganciclovir zur Reduktion der Tumormasse eingesetzt
- Anhand humaner Pankreasadenokarzinome und Pankreasnormalgewebe wurde auf mRNA Ebene durch qRT-PCR und auf Proteinebene durch Immunhistochemie die Expression von CCL5 nachgewiesen, um die Relevanz der im Mausmodell erhaltenen Erkenntnisse für den Menschen zu zeigen

Für die Experimente wurde ein murines System gewählt, da auf diese Weise in vivo ein orthotopes und zu C57BL/6 Mäusen syngenes Pankreastumormodell verwendet werden konnte.

Methoden

Methoden im Rahmen der Zellkultur

Die murine Pankreaskarzinom-Zelllinie panc02

Bei der Zelllinie panc02 handelt es sich um eine tumorigene murine Pankreaskarzinomzelllinie mit duktaler Morphologie. Sie ging 1984 aus einem Tumor hervor, der durch Implantation von 3-Methylcholanthren-haltigen Wattetupfern in das Pankreas einer C57BL/6 Maus induziert wurde. Nach mehrfacher in vivo Passagierung konnte der ursprüngliche Tumor als panc02-Zelllinie etabliert werden (Corbett, Roberts et al. 1984). Nach Reimplantation der panc02 Zellen in C57BL/6 Mäuse entwickelten sich hieraus Grad III Adenokarzinome ohne großen Bindegewebsanteil. Zudem zeigte ein hoher Prozentsatz an Tieren Lungen- und Lymphknotenmetastasen. Bei Austestung der Chemosensibilität zeigte sich eine hohe Resistenz gegenüber fast allen gängigen Chemotherapeutika wie zum Beispiel gegenüber Alkylantien, interkalierenden Substanzen und Antimetaboliten (Corbett, Roberts et al. 1984). Die panc02 Zelllinie erlaubte erstmals ein einfaches Transplantationsmodell für das pankreatische duktale Adenokarzinom im orthotopen Modell (Morikane, Tempero et al. 1999). Durch das aggressive Wachstum können nach einigen Wochen bereits 10^3 implantierte panc02 Zellen durch eine hohe Tumorlast zum Tode der Maus führen (Nagaraj, Ziske et al. 2006). Die spindelförmigen panc02 Zellen zeigen in der Zellkultur ebenfalls ein extremes Wachstum mit einer Verdopplungszeit von ca. 22h. Sie neigen dabei als Kennzeichen ihres malignen Phänotyps zur Bildung von Foci, die durch Verlust der Kontaktinhibition zustande kommen.

Die murine mesenchymale Stammzelllinie p53^{-/-}

Für sämtliche Versuche wurde die murine Zelllinie p53^{-/-} verwendet. Hierbei handelt es sich um eine mesenchymale Stammzelllinie (MSC), die aus dem Knochenmark von p53^{-/-} C57BL/6 Mäusen entsprechend bekannter Protokolle isoliert wurden (Thalmeier and Huss 2001; Huss, Heil et al. 2004; Zambetti, Horwitz et al. 2006; Conrad, Niess et al. 2009). Mäuse mit homozygotem p53-knock-out sind überlebensfähig, entwickeln jedoch aufgrund der fehlenden Wirkung von p53 als Tumorsuppressoren solide Tumore in einer hohen Rate (Jacks, Remington et al. 1994). Die p53^{-/-} mesenchymalen Stammzellen exprimieren CD73 und CD105, sind jedoch für myelogenen Marker CD34, CD14, CD45 und MHC II negativ. Als Chemokinrezeptoren werden CCR2, CCR1, CXCR2, CXCR3 und CCR7 exprimiert (Von Lutichau, Notohamiprodjo et al. 2005; Conrad, Niess et al. 2009). Die Differenzierfähigkeit

in Osteoblasten und einen angiogenen Phänotyp konnte in-vitro gezeigt werden (Lechner and Huss 2006). Die Deletion von p53 in den Zellen erleichterte aufgrund immortalisierender Wirkung daher die Isolierung und Charakterisierung, ebenso wie die Kultivierung, Klonierung und spätere Transfektion mit Transgenen. Die Zellen wuchsen adhärent und kontinuierlich in der Zellkultur und behielten eine signifikante Pluripotenz. Diese mesenchymalen Stammzellen eigneten sich besonders für das eingesetzte Pankreastumormodell, da die einzelnen Komponenten MSC, panc02 und C57BL/6 Mäuse syngene waren.

Kulturbedingungen

Sämtliche Zelllinien wurden in RPMI w/Glutamax unter Zusatz von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) kultiviert. Zur Selektion transformierter Zelllinien wurde dem Medium das entsprechende Selektionsreagenz zugegeben. Die benötigte Konzentration wurde in separaten Toxizitätstests bestimmt und lag für Blasticidin und die Zelllinie p53^{-/-} bei 5µg/ml. Als Dauerkultur wurden die Zellen in 15ml Medium und 75cm² Kulturflaschen unter Standardbedingungen (37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂) kultiviert. Etwa 2 mal pro Woche wurden die Zellen 1:20 gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst. Das Trypsin wurde nach circa 5 Minuten mit dem gleichen Volumen an Medium durch die im Serum enthaltenen Proteinaseinhibitoren inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Falcon Röhrchen überführt und für 3 Minuten bei 1800 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen dem Splitverhältnis entsprechend neu ausgesät.

Längerfristige Konservierung von Zellen

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit 1x PBS wie gewohnt abgelöst und nach Zentrifugation im Kulturmedium (RPMI, 10% FCS, 1% P/S) resuspendiert. Um ein Auskristallisieren des Zellwassers beim Einfrieren der Zellen zu verhindern, wurde die Zellsuspension anschließend 1:1 mit 20% DMSO haltigem Kulturmedium (Einfriermedium) gemischt. Die so behandelten Zellen wurden aufgrund der Zytotoxizität des DMSO sofort in Kryotubes gefüllt und mit speziellen Einfriergefäßen, die das langsame Abkühlen ermöglichen, bei -80°C eingefroren. Nach einem Tag wurden die Zellen dann für die dauerhafte Konservierung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff zu -196°C gebracht. Eine zu 90% konfluente 75cm² Flasche ergab in der Regel Zellen für 2-3 Kryotubes.

Auftauen, in Kultur nehmen

Zum Auftauen von eingefrorenen Zellen wurden die entsprechenden Kryotubes vorsichtig in

einem 37°C warmen Wasserbad geschwenkt. Die Zellsuspension wurde sofort in eine 75cm² Flasche mit Kulturmedium (RPMI, 10% FCS, 1% P/S) gegeben, um das im Einfriermedium enthaltene bei Raumtemperatur zytotoxische DMSO auf eine tolerable Konzentration zu verdünnen. Nach 24h Kultivierung unter Standardbedingungen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, bei transformierten Zelllinien wurde Selektionsmedium dazugegeben.

Toxizitätstest

Nach Transfektion von Plasmid DNA in eukaryote Zellen ist eine Selektion der Zellen notwendig, die das Plasmid erfolgreich in ihr Genom integriert haben. Dazu tragen die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide pCMV/Bsd-CCL5Pro-RFP, pCMV/Bsd-CCL5Pro-eGFP und pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK das Resistenzgen für Blastocidin (Bsd). Blastocidin wirkt auf eine große Bandbreite von pro- und eukaryontischen Zellen toxisch. Es verhindert die peptidgebundene Formation der ribosomalen Maschinerie und damit die Proteinsynthese. Durch die Zugabe von Blastocidin zum Kulturmedium kann somit eine schnelle und zuverlässige Selektion der erfolgreich transformierten Zellen in etwa 2 Wochen erreicht werden. Um die notwendige Blastocidin Konzentration zu ermitteln, bei der nicht transformierte p53^{-/-} Zellen absterben, wurde eine Toxizitätstestung durchgeführt. Hierbei wurde diejenige Bsd-Konzentration ermittelt, bei der nach 10d unter Selektionsmedium jede native p53^{-/-} Zelle abgestorben ist. Dazu wurden die Zellen für einen Konfluenzgrad von 10% in Doppelbestimmung auf 12-Well Platten ausgesät. Sobald die Zellen zu 25% konfluent gewachsen waren erfolgte die Zugabe der Selektion in verschiedenen Konzentrationen, als Kontrolle galten Zellen ohne Selektionsmedium. Alle 2 Tage erfolgte ein Mediumwechsel (RPMI, 10 FCS, 1% P/S) mit erneuter Bsd-Zugabe. Täglich wurde der Zellrasen unter dem Mikroskop begutachtet und der prozentuale Flächenanteil der abgestorbenen Zellen anhand der veränderten Morphologie abgeschätzt. Auf diese Weise konnte die Selektionskonzentration für die verwendete Zelllinie p53^{-/-} als $c_{\text{Bsd}}=5\mu\text{g/ml}$ ermittelt werden.

Stabile Transfektion in eukaryote Zellen

Als Transfektionsmethode für die Einführung von Plasmiden in eukaryote Zellen wurde die Elektroporation gewählt, da es sich hierbei um eine einfache und effektive Methode der Transfektion handelt, die eine geringe Zelllinienspezifität aufweist. Die Elektroporation führt durch einen kurzen elektrischen Impuls aufgrund der relativ schwachen hydrophoben und hydrophilen Interaktionen in der Phospholipid-Doppelmembran zur Porenbildung in der Zellmembran. In dem kurzfristigen Zustand der permeabilisierten Membran können polare Moleküle wie DNA mit hoher Effizienz entlang des elektrophoretischen Gradienten in die

Zelle eingeschleust werden.

Die Zellen wurden so in einer 75cm² Flasche ausgesät, dass sie am Tag der Transfomation zu 80-90% konfluent waren. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen mit 10ml einer 1,5mM EDTA Lösung in 1x PBS abgelöst und anschließend 2 mal mit 1x PBS gewaschen. Nach den Waschsritten wurden die Zellen in 400µl 1x PBS resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden 3µg linearisierte Plasmid-DNA gegeben und nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde die Suspension sofort für 10 Minuten auf Eis inkubiert. 4mm Küvetten für die Transfektion wurden gleichzeitig auf Eis gestellt. Nach der Inkubationszeit wurde die Plasmid-Zell-Suspension in die Küvette überführt und bei 960µF und 260V transformiert. Die Küvette mit den Zellen wurde anschließend für weitere 10 Minuten auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurde in 1-2 10cm Petrischalen Medium (RPMI mit 10% FCS und 1% Pen/Strep) gegeben. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf den Platten ausgesät und anschließend unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 24h erfolgte ein Mediumwechsel auf das Blasticidin enthaltende Selektionsmedium ($c_{\text{Bsd}}=5\mu\text{g/ml}$).

Einzelklonselektion

Durch die Transfektion von eukaryonten Zellen mittels Elektroporation entsteht eine heterogene Zellpopulation. Diese Zellen tragen zwar alle die transformierte DNA, wie durch Einsatz des Selektionsmediums sichergestellt werden konnte, aber die entsprechenden DNA-Sequenzen sind in jeder Zelle an anderen Orten in das Genom integriert worden. Dieses kann unterschiedliche Auswirkungen auf die Genexpression und das Zellverhalten haben. Um eine einheitliche Zellpopulation zu erhalten, müssen nach Transfektion einzelne Zellklone isoliert werden, aus denen durch längere Kultivierung homogene Zelllinien hervorgehen. Nach Transfektion wurden die Zellen wie beschrieben ausgesät und kultiviert. Nach 4-7 Tagen unter Selektion wuchsen auf den Platten einzelne Kolonien von Zellen heran, die aus derselben transformierten Vorläuferzelle hervorgegangen sind. Unter dem Mikroskop wurden die einzeln stehenden Kolonien mit einem Stift auf der Unterseite der Platte markiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 5ml 1x PBS ersetzt. Gleichzeitig wurde in eine 96-Well Platte 15µl Trypsin/EDTA je Well vorgelegt. Mit einer 20µl Pipette wurde die jeweils ausgewählte Kolonie aspiriert und mit der Pipettenspitze nochmals letzte Zellen der Kolonie gelöst. Dabei wurden neben der Kolonie ebenfalls 20µl PBS aufgenommen und in ein trypsiniertes Well der 96-Well Platte gegeben. Nach einigen Minuten wurden 165µl Medium in das Well gegeben, die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren voneinander getrennt und auf einer frischen 96-Well Platte ausgesät. Dieses Vorgehen wurde entsprechend der Anzahl an markierten Kolonien wiederholt. Am nächsten

Tag wurde ein Mediumwechsel auf das Selektionsmedium durchgeführt.

Tumorzellvorbereitung zur Tumorinduktion im Tierversuch

In dem gewählten syngenem, orthotopen Pankreaskarzinom-Modell wurden die Tumore durch subkapsuläre Injektion von panc02 Tumorzellen in das Pankreas induziert. Dabei wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen injiziert, entsprechend 40 μ l einer panc02 Suspension der Konzentration $3,75 \times 10^6$ Zellen/ml. 4 Tage vor Tumorinduktion wurden die panc02 Zellen aus einer 75cm² Flasche 1:30 auf 4 150cm² Flaschen gesplittet. Am Versuchstag waren die Zellen auf diese Weise zu circa 80% konfluent gewachsen. Nach einmaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und das Trypsin anschließend mit dem gleichen Volumenteil an Medium inaktiviert. Die Zellen wurden in ein 50ml Falcon Tube überführt und nach dem ersten Zentrifugationsschritt bei 1800rpm für 3 Minuten 2 mal mit 1x PBS gewaschen. Nach den Waschschrinen wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellkonzentration auf $3,75 \times 10^6$ Zellen/ml in 1x PBS eingestellt. Zum Transport in den Tierstall wurden die Zellen auf Eis gelagert.

Zellvorbereitung zur Injektion im Tierversuch

2 Wochen vor Beginn der Stammzellinjektionen im Tierversuch wurden die Zelllinien p53^{-/-}-CCL5Pro-TK (in Versuch 2 Einzelklon #28), p53^{-/-}-CCL5Pro-RFP (in Versuch 2 Einzelklon #16) und p53^{-/-}-CCL5Pro-eGFP wie bereits beschrieben in Kultur genommen. Nach Hochwachsen auf 90% Konfluenz wurden die Zellen jeweils 1:20 auf 2 75cm² Flaschen gesplittet. Dabei wurde ein Flasche (= Selektionsflasche) unter Selektion mit Blasticidin gehalten, wohingegen die andere mit normalem Kulturmedium (= Kulturflasche) bestückt war. 3 Tage vor der Stammzellinjektion wurden die Zellen ohne Selektion 1:6 auf 3 150cm² Flaschen mit 20ml Kulturmedium gesplittet, sodass die Zellen am Versuchstag erneut zu 90% konfluent waren. Die restlichen Zellen der Kulturflasche wurden in eine frische 75cm² Flasche im Verhältnis 1:20 ausgesät und nun unter Selektion genommen, die ehemalige Selektionsflasche wurde ebenfalls 1:20 in eine nur Kulturmedium enthaltende 75cm² Flasche gesplittet. Auf diese Weise konnte im Versuchsverlauf eine Passage eingespart werden und dennoch gewährleistet werden, dass jede Zelllinie vor Injektion eine Passage ohne Selektion kultiviert wurde. Aufgrund der 3 Injektionszyklen wurden 2 Wochen vor der letzten Injektion nochmals frische Zellen aufgetaut, um eine niedrige Passagenzahl beizubehalten. Im Tierversuch 1 wurden Zellen der Passagen 14-18 eingesetzt, im Tierversuch 2 Passage 7-10. Vor jedem Tierversuch wurden die Zelllinien auf Mykoplasmenbefall hin untersucht und nur bei negativem Test für den Tierversuch verwendet.

Methoden

Am Versuchstag wurden die Zellen der 3 150cm² Flaschen je Zelllinie nach einmaligem Waschen mit 1x PBS mit 10ml 1,5mM EDTA Lösung in 1x PBS abgelöst. Hierbei wurde bewusst kein Trypsin verwendet, da die Oberflächenmoleküle auf den Zellen von entscheidender Bedeutung für das Migrationsverhalten in vivo sind und durch Trypsinbehandlung Schaden nehmen könnten. Anschließend wurden die Zellen der jeweiligen Zelllinien in 50ml Falcon Röhrchen gesammelt und bei 1800 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten zentrifugiert. Danach wurden die Zellen 2 mal mit 1x PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und der Anteil der avitalen Zellen wurde mittels Trypanblau Färbung von unter 2,5% ermittelt. Anschließend wurden die Zellen in 1x PBS auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und für den Transport in den Tierstall auf Eis gelagert.

Zellquantifizierung

Zur Zellquantifizierung wurden die Zellen wie gewohnt abgelöst und nach der Zentrifugation in einem bestimmten Volumen Kulturmedium oder 1x PBS resuspendiert. Anschließend wurden 40µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau zur Anfärbung avitaler Zellen gemischt und in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop erfolgte die Auszählung mindestens eines Großquadrates. Die Gesamtzellzahl ergab sich anhand folgender Formel:

$$N = \frac{N(\text{gezählte Zellen})}{N(\text{gezählte Großquadrate})} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10000 * \text{Gesamtvolumen}(ml)$$

Bestimmung von Wachstumskurven

Zur Bestimmung der Verdopplungszeit der verschiedenen genutzten Zelllinien wurden die Wachstumskurven der Zellen bestimmt. Dazu wurden 30.000 Zellen je Well auf mehreren 6-Well Platten ausgesät und bei Standardbedingungen in Kulturmedium kultiviert. Alle 24h wurden 3 Wells trypsiniert und ausgezählt. Alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt. Die Verdopplungszeit g wurde in der exponentiellen Phase des Wachstums bestimmt. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$g = \frac{\log 2 \cdot \Delta t}{\log N - \log N_0}$$

Δt = Dauer der Kultur in h

N = Anzahl der Zellen zum Ablesezeitpunkt

N_0 = Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt Null

Ganciclovir-Toxizitätstestung

Um die Ganciclovir (Gcv)- Wirkung auf CCL5Pro-TK positive Zellen in-vitro zu testen, wurden an Tag 1 30.000 p53^{-/-} -CCL5Pro-TK #28 Zellen je Well auf einer 12-Well Platte in Kulturmedium ausplattiert. Für die folgenden 3 Tage wurde alle 24h das Medium gewechselt und den jeweiligen Wells (2 Wells pro Gcv-Konzentration für Doppelbestimmung) unterschiedliche Mengen an Ganciclovir (Stocklösung c_{Gcv}=10mg/ml) zugegeben. An jedem Tag wurden von allen Wells repräsentative mikroskopische Bilder aufgenommen, um den Zellzustand und die Proliferation bzw. das Absterben zu dokumentieren. Der Versuch wurde 3 mal durchgeführt.

MTT-Assay

Um die Proliferation der mesenchymalen Stammzelllinie p53^{-/-} -CCL5Pro-Tk #28 unter Ganciclovir Behandlung und die Zytotoxizität des Gcv zu quantifizieren, wurde der MTT Assay eingesetzt. Diese Methode beruht auf der Verstoffwechslung des gelben MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu violett gefärbtem Formazan in den Mitochondrien lebendiger Zellen. Mitochondriale Dehydrogenasen katalysieren diese Umwandlung des MTT in wasserunlösliche Formazankristalle. Diese Kristalle können in angesäuertem Isopropanol gelöst werden. Die Absorption der entstehenden gefärbten Lösung kann anschließend bestimmt werden und korreliert mit der Anzahl lebender Zellen. Durch Vergleich von Zellen mit und ohne Behandlung kann die Zytotoxizität durch Erstellung einer dose-response Kurve abgeleitet werden. Da es sich bei dieser Methode um eine Endpunktmessung handelt, musste für jeden Messzeitpunkt eine Platte angelegt werden, sofern man einen zeitlichen Verlauf darstellen wollte. Daher waren für die Versuchsdauer von 4 Tagen 4 96-Well Platten notwendig (1 Kontrollplatte ohne Ganciclovir Behandlung, 3 Platten für die verschiedenen Behandlungszeiträume). Einen Tag vor der ersten Ganciclovir Behandlung wurden $2,2 \times 10^3$ Zellen pro Well auf einer 96-Well Platte ausgesät. Die Zellzahl war in Vorversuchen für die Versuchsdauer von 4 Tagen ermittelt worden. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch 50µl MTT-Medium (die MTT Stocklösung (5mg/ml MTT in PBS gelöst) wurde 1:7 in phenolrotfreiem RPMI verdünnt) pro Well ersetzt. Es folgte eine 3 stündige Inkubation unter Standardbedingungen. Die Platte wurde nach der Inkubationszeit für 5min bei 2000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde das MTT-Medium vorsichtig abgenommen und den Wells 100µl Isopropanol mit 0,04N HCL zugegeben. Dadurch lösten sich die Formazankristalle auf, was durch leichtes Schütteln der Platte unterstützt werden konnte. Die Absorptionsmessung erfolgte mit dem ELISA-Reader bei 570nm Absorption und der Referenzwellenlänge 690nm.

TNF α Stimulation

Zur Stimulation der Zelllinien p53^{-/-} und p53^{-/-}-CCL5Pro-TK (Einzelklon #28) mit rekombinantem humanen TNF α (rhTNF α , c=0,1mg/ml) wurden 2×10^5 p53^{-/-} und $6,5 \times 10^5$ p53^{-/-}-CCL5Pro-TK Zellen jeweils auf 6cm Kulturplatten in normalem Kulturmedium (s.o.) ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel auf das entsprechende Stimulationsmedium (TNF α -Zugabe in verschiedenen Konzentrationen zum Kulturmedium). Nach 36 stündiger Stimulation unter Standardbedingungen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wie in den Herstellerangaben des verwendeten RNA-Kits beschrieben auf der Platte lysiert und mit einem Schaber abgelöst. Anschließend wurde aus den Zellen RNA wie unten beschrieben isoliert.

Mykoplasmentestung

Mykoplasmen sind sehr kleine und einfache Prokaryonten, die aufgrund ihrer eingeschränkten biosynthetischen Fähigkeiten auf Wirte angewiesen sind. Mykoplasmen sind häufig für Kontaminationen von Zellkulturen verantwortlich, welche zu einer reduzierten Zellproliferation und veränderten Genexpression führen können. Um die Einflüsse einer Kontamination auf die in vitro und in vivo Versuche auszuschließen, wurde routinemäßig vor Versuchen eine Testung auf Mykoplasmen in der Zellkultur durchgeführt. Hierfür wurde das MykoAlert Mycoplasma Detection Kit verwendet. Dieses Verfahren beruht auf der Ausnutzung mykoplasmenspezifischer Enzyme. Im Rahmen des Testes werden die Mykoplasmen lysiert, sodass die Enzyme Zugang zu einem spezifischen Substrat erhalten. Dabei kommt es zu einer Konversion von ADP zu ATP. Mit Hilfe einer Biolumineszenzreaktion zum Detektieren des ATPs durch ein Luminometer kann eine Ratio des ATP Gehalts vor und nach Zugabe des spezifischen Substrates erstellt werden und so eine Aussage über den Mykoplasmenbefall getroffen werden. Zur Testdurchführung wurde der Zellkultur Überstand abgenommen und abzentrifugiert. Der letzte Mediumwechsel wurde mindestens 24h vorher durchgeführt.

Methodik der Klonierung

Grundlegende molekularbiologische Methoden wie Analyse von DNA-Fragmenten durch Auftrennung in einem Agarosegel, einfache Verdauung durch Restriktionsenzyme, Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten und Herstellen elektrokompetenter DH5 α -E.coli und hitzekompetenter XL1-Blue E.coli werden in dieser Arbeit nicht beschrieben. Die entsprechenden Arbeitsvorschriften wurden aus „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Sambrook and Russell 2001), „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel, Brent et al. 1987) und deren regelmäßig erscheinenden Aktualisierungen entnommen. In diesem Kapitel werden Methoden beschrieben, die für die Durchführung dieser Arbeit von besonderer Bedeutung waren oder aufgrund der verwendeten Kits notwendig waren.

DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zunächst wurden die gewünschten DNA-Banden auf dem Transilluminator mittels eines Skalpellens möglichst sparsam ausgeschnitten. Dabei wurde die Beleuchtungszeit gering gehalten, um Schäden an der DNA zu vermeiden. Anschließend wurde das ausgeschnittene Gelstück in Tubes überführt und zur Bestimmung der Gelmasse gewogen. Die anschließende Gelelution wurde mit dem „innuPREP DOUBLEpure Kit“ von Analytik Jena durchgeführt. Hiermit konnte die DNA Extraktion aus TBE Gelen bis zur einer Gelmasse von 300mg durchgeführt werden. Die Elution der DNA aus den Säulchen erfolgte mit mindestens 30 μ l ddH₂O.

Transformation von Bakterien per Elektroporation

Bei dieser Methode der Transformation von DH5 α -E.coli wurde das Prinzip der Elektroporation verwendet. Ein elektrisches Feld, das durch einen sich sehr schnell entladenden Kondensator erzeugt wird, führt zu einer kurzfristigen, im Millisekundenbereich gelegenen Porenbildung in Zellmembranen. Aufgrund der aufgehobenen Semipermeabilität kann der Lösung zuvor zugegebene Plasmid-DNA in die Zelle eingeschleust werden. Sämtliche Arbeitsschritte bis zur eigentlichen Elektroporation fanden auf Eis statt, um eine Temperaturerhöhung der DH5 α -Bakterien über 4°C zu vermeiden, die dabei ihre Elektrokompetenz verlieren würden. Zunächst wurden die in 50 μ l Aliquots eingefrorenen elektrokompetenten DH5 α -Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde jeweils 1/10 des entsprechenden Ligationansatzes, ca. 50-100ng DNA, dazugegeben, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und in eine 0,1cm Aluminium-Küvette überführt. Als

Elektroporator wurde das Gerät „E.Coli Pulser“ von BioRad benutzt. Bei einer Spannung von 1,8kV erfolgte die Elektroporation, wobei die Zeitkonstante in der Regel über 4ms lag. Unverzüglich wurden die transformierten Bakterien mit 1ml SOC Medium aufgenommen und in ein 15ml Falcon gegeben. Dieses wurde bei 37°C für 45min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Ausplattierung auf Agarplatten, die mit dem Resistenzgen entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin: $c_{\text{Amp}}=100\mu\text{g/ml}$) behandelt wurden, und weitere Inkubation bei 37°C für 16h im Brutschrank.

Transformation von Bakterien per Hitzeschock

Bei dieser Methode wurden vor der Transformation XL1-Blue E.coli Bakterien durch Zentrifugation aufkonzentriert und in einer Calciumchlorid Lösung resuspendiert. Die Exposition gegenüber Ca-Ionen führt dazu, dass die Bakterien unter geeigneten Umständen DNA aufnehmen können und somit „kompetent“ sind. Nach Mischung der Zellen mit Plasmid-DNA kann durch einen Hitzeschock die DNA in die Zelle eingeschleust werden. Zunächst wurde für jede Reaktion 0,5ml SOC Medium auf 42°C vorgewärmt. Währenddessen wurden 50 μl XL1-Blue auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1 μl DNA (50-100ng) und für 30min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zell-DNA Suspension für 45s bei 42°C inkubiert (=Hitzeschock), woran sich eine sofortige Inkubation auf Eis für 2min anschloss. Jeder Ansatz wurde anschließend für 1h bei 37°C und 250rpm auf dem Rüttler in dem zuvor vorgewärmten SOC Medium inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz auf LB Platten, die ein dem Resistenzgen des Plasmids entsprechendes Antibiotikum (Ampicillin: $c_{\text{Amp}}=100\mu\text{g/ml}$) enthalten, ausplattiert und für über 16h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

DNA Quantifizierung

Zur Konzentrationsmessung von DNA wurde das „Qbit Fluorometer“ von Invitrogen benutzt. Das Prinzip der „Quant-IT Technology“ beruht darauf, dass der DNA ein leicht fluoreszierender Farbstoff zugegeben wird, dessen Fluoreszenz sich bei Bindung an DNA vervielfacht. Das Fluoreszenzsignal selbst ist linear abhängig von der DNA Menge. Über 2 Standards kann somit bei bekanntem Volumen ein gemessenes Signal auf eine DNA Konzentration zurückgerechnet werden. Zur Messung der DNA Konzentration aus Verdaus und aus Gelextraktionen wurde das „Quant-IT dsDNA HS Assay Kit“ von Invitrogen verwendet. Zur Messung der Plasmid-DNA-Konzentration aus Mini- und Midipräparationen wurde das „Quant-IT dsDNA BR Assay Kit“ von Invitrogen verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß der Herstellerempfehlungen durchgeführt.

Glycerinstock

Zur dauerhaften Lagerung von erfolgreich transformierten DH5 α /XL1-Blue Bakterien wurden routinemäßig vor jeder Midi-Präparation Glycerinstocks angelegt. Auf diese Weise konnten zu einem späteren Zeitpunkt erneut die Plasmide ohne den Schritt der Transformation kultiviert werden. Dazu wurden in einem Kryotube 100 μ l 10x Einfriermedium für Bakterien vorgelegt. Anschließend wurden der Schüttelkultur für die Midi-Präparation 900 μ l Bakteriensuspension entnommen und im Tube mit dem Einfriermedium gemischt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Mini-Präp

Für Minipräparationen von Plasmid DNA wurde je eine einzelne DH5 α - E.Coli Kolonie von den jeweiligen Agarplatten gepickt, auf einer Agarplatte zur Sicherung strichförmig ausgestrichen und folgend 1,5ml LB-Medium, dem ein der Resistenz entsprechendes Antibiotikum (Ampicillin: $c_{\text{Amp}}=100\mu\text{g/ml}$) zugegeben wurde, angeimpft. Anschließend wurde die Kultur für mindestens 12h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert.

Zur Minipräparation von Plasmid DNA von 1,5ml Bakterienkulturen wurde das „innuPREP Plasmid Mini Kit“ von Analytik Jena verwendet. Hierbei wurde die DNA mit 50 μ l ddH₂O eluiert, was im Allgemeinen eine DNA Konzentration von 300ng/ μ l und somit eine Ausbeute von 15 μ g ergab. Die Reinheit der Präparation wurde mit einem 0,6% oder 1,2% Agarosegel überprüft.

Midi-Präp

Für Midipräparationen von Plasmid DNA wurde je eine Einzelkolonie DH5 α -E.Coli von den gewünschten Agarplatten gepickt und 2x 50ml LB Medium, dem ein dem Resistenzgen entsprechendes Antibiotikum (Ampicillin: $c_{\text{Amp}}=100\mu\text{g/ml}$) zugegeben wurde, angeimpft. Folgend wurden die Kulturen bei 37°C für 12h auf dem Schüttler inkubiert.

Zunächst wurden die am Vortag angeimpften Bakterienkulturen in zwei 50ml Falcon Röhren überführt, eine Glycerinkultur angelegt und anschließend bei 4°C und 4000x g für 10min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte so das Zellpellet bei -20°C gelagert werden oder sofort weiter verwendet werden. Die Midipräparation erfolgte mit dem „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ von Qiagen. Die Elution erfolgte abhängig von der Größe des DNA-Pellets mit 100 μ l bis zu 300 μ l ddH₂O, die Ausbeute betrug meist 200-500 μ g. Die Reinheit der Präparation wurde mit einem 0,6% oder 1,2% Agarosegel überprüft.

Mutagenese

Für die Klonierung der verschiedenen Konstrukte musste ein Vorläuferplasmid geschaffen werden, das zum einen die Kopplung der Reportergene RFP und eGFP und des therapeutischen Gens der HSV-TK an den CCL5-Promoter erlaubte, zum anderen aber auch die weitere Klonierung in den Zielvektor pCMV/Bsd möglich machte. Das von Dr. Nelson/Fr. Mojaat zur Verfügung gestellte Plasmid pDNA3-CCL5Pro-RFP ermöglichte zwar diese Kopplung über geeignete Schnittstellen, bot aber nicht die Möglichkeit, die nun an den CCL5-Promoter gekoppelten Gene weiter in den pCMV/Bsd zu klonieren. Daher musste nun eine weitere Schnittstelle eingefügt werden, die diese Klonierung ermöglichte. Da sich unmittelbar 5' des CCL5-Promoters eine singuläre Hind III Schnittstelle befand und auch eine Hind III Schnittstelle in der Multiple Cloning Site des pCMV/Bsd zur Verfügung stand, sollte mittels gezielter Mutagenese eine zweite Hind III Schnittstelle in den pDNA3-CCL5Pro-Red eingefügt werden. Um die Anzahl der zu verändernden Basenpaare möglichst gering zu halten, wurde die Plasmidsequenz nach einer der Hind III Schnittstelle ähnlichen Sequenz durchsucht. Es fand sich circa 100bp hinter der Bgh pA ein Abschnitt, der mit 5'-AAGCGC-3' bis auf 2 Basen der Hind III Schnittstelle von 5'-AAGCTT-3' identisch war. Dieser Abschnitt wurde zur Mutagenese ausgewählt, da hier sowohl die BGH pA Sequenz zur späteren mRNA-Stabilisierung mit in die Klonierung einbezogen werden konnte als auch nur ein Austausch von 2 Basen notwendig war.

Zur Mutagenese wurde das QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit von Stratagene verwendet. Hierbei wird ein zueinander komplementäres Primerpaar verwendet, das die gewünschte Mutation in sich trägt. Dieses Primerpaar lagert sich folglich an der gleichen Position an die beiden komplementären Stränge an und ermöglicht eine PCR des Vorlageplasmids. Das entstehende PCR-Produkt (mit der mutierten Sequenz) weist im Gegensatz zu dem bakteriellen Vorlagevektor (mit der Ursprungssequenz) keine DNA-Methylierung auf. Anschließend kann die Template-DNA durch das Restriktionsenzym Dpn I, welches spezifisch methylierte DNA schneidet, verdaut werden. Das nicht verdaute (weil nicht methylierte) PCR Produkt, welches die Mutation trägt, wird anschließend mittels Hitzeschock in XL1-Blue Bakterien transformiert und auf Ampicillin-Agarplatten selektioniert.

Nach Festlegen der zu mutierenden Basenpaare wurden die Primer für die Mutagenese designed. Diese bestehen aus 30bp der Template-DNA und enthalten etwa in der Mitte die bereits mutierten Basenpaare. Die Synthese der Oligonukleotide wurde von der Metabion AG in Martinsried ausgeführt.

Ursprungssequenz pDNA3-CCL5Pro-Red

Primer mit mutierter Sequenz

Fw:

5'-GTAGCGGCGCATTAAGCTTGGCGGGTGTGGTG-3'5'-GTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTG-3'

Rv:

5'- CACCACACCCGCCAAGCTTAATGCGCCGCTAC-3'

Der Ansatz für die Mutagenese-PCR wurde entsprechend der Herstellerangaben angesetzt. Zu diesem Ansatz wird 1µl der mitgelieferten Pfu-Turbo-DNA-Polymerase (2,5U/µl) gegeben und der gesamte Ansatz mit ca. 30µl Mineralöl überschichtet.

Der Ablauf der PCR hängt von der Plasmidgröße und der Mutationsart ab. In diesem Falle wurde die PCR Reaktion wie folgt durchgeführt:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	30s
2	16	95°C	30s
		55°C	1min
		68°C	2min pro kbp, d.h. 7,5min

Nach Abschluss des PCR-Programmes wurde dem PCR-Ansatz zum spezifischen Verdau methylierter Template-DNA 1µl Dpn I (10U/µl) unter die Mineralölschicht zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran konnte 1µl des Dpn I Verdau in XL1-Blue Bakterien mittels Hitzeschock transformiert werden.

Sequenzieren

Die Sequenzierung wurde von der Firma Entelechon GmbH in Regensburg übernommen. Dafür wurden für Plasmidsequenzierungen mindestens 1µg Plasmid DNA gelöst in ddH₂O, c(DNA)>150ng/µl, und, falls keine Standardprimer verwendet wurden, 5-10µl der gewünschten Primer, 10 µM gelöst in ddH₂O, in 1,5ml Tubes verschickt. Für Sequenzierungen von PCR Produkten wurden mindestens 100ng/500bp und die Primer nach obigen Bedingungen verschickt. Die Primer wurden anhand der Gensequenzen designed. Die Sequenzierungsergebnisse wurden von Entelechon per Email zugestellt.

Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, geringe Mengen an DNA zwischen einem Primerpaar, das an die Template-DNA bindet, in vitro zu vervielfältigen. Hierfür finden zyklisch die DNA-Denaturierung, das Primer-Annealing an die DNA und die DNA-

Methoden

Elongation durch eine thermostabile DNA-Polymerase statt. Während eines Zyklus schwankt die Reaktionstemperatur von 94-95°C bei der Denaturierung, über die primerspezifische Annealingtemperatur (ca. 50-70°C), bis zur Elongationstemperatur der jeweiligen thermostabilen Polymerase (Taq-Polymerase 72°C).

Für die verschiedenen PCR Läufe unabhängig von der Zielsetzung wurde folgender Standardansatz wenn möglich eingehalten:

DNA-Template	50-100 ng
Forward Primer (10pM)	1µl
Reverse-Primer (10pM)	1µl
dNTPs (1,25mM)	4µl
10x Taq-Puffer (NEB)	2,5µl
Taq (NEB)	0,2µl
H ₂ O	ad 25µl

Anschließend wurden die Ansätze trotz eines beheizten Deckels im PCR Cycler mit 30µl Mineralöl überschichtet.

Schnittstellen Kpn I und Not I per PCR

Im Rahmen der Klonierung des pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK Vektors war es nötig, die Herpes simplex Thymidinkinase (HSV-TK) aus dem Vektor pBlueTK (erhalten von Dr. Luckow, AG Klinische Biochemie, München) in den pDNA3-CCL5Pro-HindIII zu klonieren. Dabei standen keine kompatiblen Schnittstellen zur Verfügung, sodass die HSV-TK Sequenz zum einen mittels PCR aus dem pBlueTK vervielfältigt werden musste und zum anderen in der gleichen PCR die Kpn I und die Not I Schnittstellen erzeugt wurden. Dazu wurden Primer verwendet, welche die gewünschten Schnittstellen als „Mutation“ trugen. Die „Mutationen“ wurden zentral in die Primer gelegt, damit diese fest an die gewünschte Sequenz binden konnten und dennoch Spielraum für das Einfügen der Schnittstellen hatten.

Ursprungssequenz pBlueTK	Primer mit abgewandelter Sequenz
5' der HSV-TK:	TK- <u>Kpn I</u> -Fw:
5'-GCCGCAGATCTTGGTGGCGTGAAACTCCC-3'	5'-GCCGCAGATCTTGGT <u>ACCGG</u> CGTGAAACTCCC-3'
3' der HSV-TK:	TK- <u>Not I</u> -Rv
5'-GGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTC	5'-GGGCGTATT <u>GCGGCCG</u> CAATGGGGTCTC-3'

Diese Primer dienten der Amplifikation der HSV-TK und dem Einfügen der für die folgende Klonierung notwendigen Kpn I und Not I Restriktionsschnittstellen. Für die PCR wurden

200ng an pBlueTK in den Standardansatz eingesetzt und mit folgendem Programm vervielfältigt:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	5min
2	30	95°C	30s
		69°C	90s
		72°C	150s
3	1	72°C	7min

Nach Aufreinigen mittels Agarosegelelektrophorese wurde das HSV-TK Fragment mit Kpn I und Not I in 2 aufeinander folgenden Schritten verdaut und war damit für die Ligation in den pDNA3-CCL5Pro-HindIII vorbereitet.

Reverse Transkriptions-PCR zum Expressionsnachweis auf mRNA-Ebene

Zum Expressionsnachweis der transfizierten Konstrukte auf mRNA-Ebene wurde die RT-PCR genutzt. Dabei wurden als Template 100ng der aus RNA umgeschriebenen cDNA in den oben beschriebenen PCR-Standardansatz eingesetzt. Das PCR-Programm wurde entsprechend der jeweiligen Primerpaare und der erwarteten Produkte angepasst.

PCR-Aufreinigung

Zur Aufreinigung von Produkten aus enzymatischen Reaktionen und aus Gelextraktionen wurde das „innuPREP DOUBLEpure Kit“ von Analytik Jena verwendet. Dieses erlaubte eine abschließende Elution mit mindestens 10µl ddH₂O.

Linearisieren

Bevor Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen transfiziert werden konnte, musste die DNA linearisiert werden. Plasmide sind ringförmige DNA-Doppelstränge, die Bakterien den extrachromosomalen Gentransfer ermöglichen. Eukaryonte Zellen können jedoch ringförmige DNA nicht in ihr Genom integrieren, sodass die DNA zu einem linearen Doppelstrang geschnitten werden muss. Dazu bedient man sich einer singulären Schnittstelle, die nicht in den regulatorischen Einheiten oder kodierenden Gensequenzen gelegen ist. In den verwendeten Plasmiden konnten dafür die Restriktionsstellen für Nhe I oder EcoR I genutzt werden. Für Transfektionen mittels Elektroporation wurden standardmäßig 30µg Plasmid-DNA mit Nhe I oder EcoR I verdaut.

Methoden zur RNA-Analyse

Gewebekonservierung

Das in den Tierversuchen gewonnene Gewebe wurde für später folgende RNA Isolationen als Schutz vor ubiquitären RNasen auf 2 verschiedene Arten konserviert.

Bei der ersten Konservierungsart wurde RNAlater als RNA Konservierungslösung verwendet. Diese Lösung kann frisch entnommene Gewebe schnell durchdringen und die RNA stabilisieren. Auf diese Weise erlaubt RNAlater somit eine spätere Probenprozessierung ohne die Notwendigkeit, Gewebe sofort einzufrieren zu müssen. Die Lösung wurde gemäß der Herstellerangaben eingesetzt. Zunächst wurde das Gewebe in maximal 0,5cm messende Stücke zerkleinert und sofort in das 5-10 fache Volumen an RNAlater in 15ml Falcon Tubes gegeben. Die so behandelten Proben wurden über Nacht bei 4°C gelagert, damit die Lösung das Gewebe zuverlässig durchdringen konnte, und nach anschließendem Verwerfen des Überstandes bei -20°C eingefroren. Bei späterer Weiterverarbeitung der Proben zur RNA Isolation wurden nach dem Auftauen letzte Tropfen von RNAlater mit Papiertüchern entfernt und die Proben sofort homogenisiert.

Bei Verfügbarkeit von flüssigem Stickstoff wurde die zweite Konservierungsart verwendet. Dazu wurde das Gewebe sofort nach Entnahme in kleine Stücke (ca. 0,5cm) zerteilt und in Kryotubes gefüllt. Anschließend wurde das Tube mit einer Pinzette in flüssigen Stickstoff gebracht und schockgefroren, um den Zugriff von RNasen zu verhindern. Jeder anschließende Transport wurde in flüssigem Stickstoff oder auf Trockeneis durchgeführt, die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80°C. Zudem konnte dieses Gewebe zusätzlich noch zum Anfertigen von Gefrierschnitten genutzt werden.

Gewebehomogenisierung:

Für RNA Isolationen aus Geweben wurde in Abhängigkeit der Konservierungsart zwischen zwei verschiedenen Homogenisierungsmethoden gewählt.

Lag das Gewebe in RNAlater Solution konserviert vor, wurde die Homogenisierung mit dem MagNA Lyser System unter Einsatz von Lysing Matrix D Tubes durchgeführt. Dazu wurden die Gewebeprobe(n) (bei -20°C gelagert) auf Eis aufgetaut und mit Papiertüchern von letzten Resten der Konservierungsflüssigkeit befreit. Anschließend wurden mit steriler Pinzette und Skalpell etwa 100mg der Probe entnommen und in ein Lysing Matrix D Tube überführt, in dem sich bereits 700µl Lysepuffer des „PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System“ Kits befand. Hierbei wurden für die Gewebeprobe repräsentative Regionen

ausgewählt und bei Tumorproben die zentrale Nekrosezone gemieden. Die Tubes enthalten kleine Keramikkugeln, die bei hochfrequentem Rütteln wie kleine Stößel wirken und das Gewebe im Lysepuffer zerkleinern. Dazu wurden die Tubes im MagNA Lyser eingespannt und die Probe 2x für 50s bei 6500 rpm homogenisiert, unterbrochen von einer einminütigen Inkubation auf Eis. Durch den Homogenisierungsvorgang kommt es zu einer Schaumbildung durch den Lysepuffer. Nach kurzer Inkubation auf Eis und 20s Zentrifugation bei 12.000 rpm erhält man jedoch wieder eine homogene Flüssigkeit. Anschließend kann die RNA dem entsprechenden Protokoll folgend isoliert werden oder die Probe bei -20°C eingefroren werden.

Lag das Gewebe in gefrorenem Zustand vor, wurde die Probe auf Trockeneis homogenisiert. Dazu dienten Trockeneisblöcke als Arbeitsfläche, da diese zum einen das Gewebe im gefrorenen Zustand hielten und zum anderen durch Abwischen und damit Verdampfen der obersten Schicht sauber zu halten waren. Sterile Pinzette und Skalpell wurden stets durch das Trockeneis auf Temperaturen unter dem Gefrierpunkt gehalten, was wichtig zur korrekten Homogenisierung des Gewebes war. Das Gewebestück wurde mit der Pinzette auf dem Trockeneisblock fixiert, während mit dem Skalpell an einer geeigneten und repräsentativen Schnittfläche schabend Gewebe von der Probe abgelöst wurde. Durch das Abschaben von Gewebe, was nur bei niedriger Temperatur des Gewebes und des Skalpells möglich war, entstanden sehr feine, fast pulverige Fasern. 100mg hiervon wurden in 600-900µl Lysepuffer des „PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System“ Kits aufgelöst. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren konnten größere Gewebestücke und durch Verwendung einer Kanüle und Pipettenspitze auch feinste Gewebereste homogenisiert werden. Die Proben wurden anschließend 1min bei 12.000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Tube überführt. In diesem Zustand konnte die Probe sofort weiterverarbeitet werden oder kurzfristig bei -20°C eingefroren werden.

RNA Isolation

RNA wurde aus homogenisiertem Gewebe und lysierten Zellen, hierzu wurde ebenfalls der Lysepuffer des entsprechenden Kits verwendet, mit dem „PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System“ den Anleitungen des Herstellerhandbuches entsprechend isoliert. Der optionale 15 minütige DNase I Verdau wurde ebenfalls durchgeführt. Die RNA wurde mit 50µl RNase-freien Wasser eluiert. Zur kurzfristigen Lagerung wurde die RNA bei -20°C, für langfristige Lagerung bei -80°C eingefroren.

RNA Quantifizierung

Zur Quantifizierung der RNA nach Isolation wurde der „Quant-iT™ RNA assay“ für das Qbit™ Fluorometer verwendet. Die Quant-iT Technologie benutzt Fluoreszenzfarbstoffe, die spezifisch an RNA binden. Bei Bindung an RNA vervielfacht sich die Fluoreszenz der Farbstoffe und erreicht so eine hohe Signal-Hintergrund Ratio, die durch das Qbit™ Fluorometer gemessen wird. Diese Methode ist spezifisch für RNA. Messungen und Berechnungen wurden gemäß der Herstellerangaben durchgeführt.

Analytisches RNA Gel

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde anhand eines 1%-Agarosegels in 1x MOPS Puffer analysiert.

Ladepuffer für analytisches RNA-Agarosegel: (Prämix)

Formamid	10µl
Formaldehyd 37%	4µl
10x MOPS	2,9µl
EtBr (10mg/ml)	<u>0,1µl</u>
	17µl

Zu 2µg jeder RNA Präparation wurden jeweils 17µl Prämix gegeben. Die RNA wurde dann für 15min bei 65°C denaturiert und anschließend auf einem 1%igen Agarosegel bei 90V für circa 45min aufgetrennt. Die RNA wurde im UV-Licht bei 254nm beurteilt. Die Unversehrtheit der Banden für die 28S- und der 18S- rRNA und die circa doppelte Intensität der 28S- gegenüber der 18S-rRNA Bande wurden als Kriterien für eine gute RNA-Qualität herangezogen.

Reverse Transkription

Die isolierte Gesamt-RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. qRT-PCR Primer sind in der Regel cDNA spezifisch, das heißt sie vervielfältigen lediglich cDNA und keine genomische DNA. Für einige Gene, wie das der 18S-rRNA, Gene, die nur aus einem Exon bestehen, oder Reportergene, die im Genom normalerweise nicht vorkommen, können jedoch keine cDNA spezifischen Primer gefunden werden. Um in der späteren qRT-PCR ein Signal auszuschließen, welches durch Verunreinigung der Probe mit genomischer DNA zustande käme, wird in der reversen Transkription die sogenannte RT⁻ Probe zusätzlich umgeschrieben. In der RT⁻ Probe werden 0,2µg der Gesamt-RNA, die möglicherweise genomische DNA als Kontamination enthält, dem Reaktionsansatz zugegeben. Dieser Reaktionsansatz unterscheidet sich von der RT⁺-Probe allein durch das Fehlen der

Reversen Transkriptase. Da hier nun keine reverse Transkription stattfinden kann, wird in der folgenden qRT-PCR jedes Signal in der RT⁻-Probe auf cDNA unspezifische Primer mit einer Kontamination durch genomische DNA zurückzuführen sein.

RT⁺ und RT⁻ Mastermix:

	RT ⁺	RT ⁻
5x First Strand Buffer	9µl	9µl
25mM dNTPs	1µl	1µl
0,1M DTT	2µl	2µl
RNasin	1µl	1µl
Lineares Acrylamid (15µg/ml)	0,5µl	0,5µl
10x Hexanucleotide	0,5µl	0,5µl
Superscript II	1µl	---

Für die reverse Transkription wurden 2,2µg gesamt-RNA in RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 33µl verdünnt. 30µl wurden zu 15µl des RT⁺ Mastermixes gegeben. Die restlichen 3µl wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 31µl verdünnt und zu 14µl des RT⁻ Mastermixes gegeben. Ein Reaktionsansatz von 45µl enthielt somit 2µg RNA für die RT⁺ und 0,2µg für die RT⁻. Beide Ansätze wurden für 1,5h bei 42°C und langsamen Schütteln im Thermoblock inkubiert. Für folgende qRT-PCR Reaktionen musste die RT⁺ jeweils noch 1:10 verdünnt werden, wohingegen die RT⁻ so eingesetzt werden konnte. Die so erhaltene cDNA wurde bei -20°C dauerhaft gelagert.

qRT-PCR: SYBRgreen, Assay

Die qRT-PCR ermöglicht die Rückrechnung auf die Anzahl von Amplifikationsprodukten in einer spezifischen PCR-Reaktion. Die Methode basiert dabei auf fluoreszierenden Signalen die durch die Vermehrung der Probe hervorgerufen werden und auf der Detektion dieser Signale durch Laser Technologie. Es gibt 2 Hauptkonzepte der qRT-PCR, zum einen den Taqman Assay, zum anderen den SYBRgreen Assay. Bei Verwendung des Taqman Assays lagern sich Primer und eine doppelmarkierte Sonde (Probe) an die cDNA an. Die Sonde ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff und mit einem Quencher markiert. In diesem Zustand kann kein fluoreszierendes Signal erzeugt werden. Wenn nun die Primer und die Sonde an eine spezifische cDNA Sequenz gebunden haben und die Taq-Polymerase die Amplifikation des Stranges durchführt, kommt es durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase zur Spaltung der Sonde, und damit zur Trennung des fluoreszierenden Farbstoffes vom Quencher. Dadurch kommt es nun zur Erzeugung eines Fluoreszenzsignals durch die Sonde, die FAM (6-Carboxyfluorescein) oder VIC markiert ist, das durch das Detektionssystem gemessen

Methoden

werden kann.

Bei Verwendung der SYBRgreen Methode wird das fluoreszierende Signal durch die Interkalation des SYBRgreen Farbstoffes in die doppelsträngige cDNA erzeugt. Um ein Signal durch ein unspezifisches Nebenprodukt auszuschließen wurde nach der Amplifikation der cDNA ein weiterer Schritt durchgeführt. Die Ansätze wurden schrittweise bis auf 95°C erhitzt, sodass sich die Doppelstränge entsprechend ihres Schmelzpunktes wieder trennen konnten. Der dadurch erzeugte Abfall an Fluoreszenz durch den SYBRgreen Farbstoff konnte bestimmt werden und eine Schmelzkurve erstellt werden. Ein einziges Maximum bei einer Temperatur, die zu dem spezifischen Amplifikationsprodukt passt, stellte die Spezifität der qRT-PCR sicher. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Methoden verwendet.

	Primer/Probes	SYBRgreen
Taqman Universal PCR Mastermix 10x	1x	---
Taqman Assay 20x	1x	---
SYBRgreen Mastermix	---	1x
SYBRgreen Fw-Primer	---	10 pM
SYBRgreen Rv-Primer	---	10 pM
Taq Polymerase	---	0,03 U/μl

Dem Mastermix wurde steriles Wasser bis zu einem Volumen von 18μl zugegeben. Für die qRT-PCR wurden 2μl der 1:10 RT⁺-Verdünnung oder 2μl der RT⁻-Probe zu dem Mastermix gegeben, sodass ein Gesamtvolumen von 20μl pro Well erreicht wurde. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt. Zur qRT-PCR wurde das ABIPrism7000 Sequence Detection System verwendet. Nach einer initialen Inkubation bei 50°C für 2min und 95°C für 10min, wurden die Proben für 40 Zyklen jeweils für 15s auf 95°C erhitzt und anschließend für 60s bei 60°C inkubiert. Es wurden für jede Probe RT⁺, RT⁻ und NTC („non-template-controls“) angesetzt. Die NTC enthielten keine cDNA und dienten der Kontrolle der Sondeneinheit und der Primer. Die verwendeten Primer wurden zuvor an Positiv- und Negativkontrollen erprobt, alle verwendeten Primer finden sich in der Materialauflistung. Die Expression der Zielgene wurde gegen das Referenzgen 18S rRNA normalisiert.

Zur Quantifizierung des PCR-Produktes muss die Kinetik der Reaktion berücksichtigt werden. Dazu wird derjenige Zyklus bestimmt, in dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert, den sogenannten CT-Wert („cycle threshold“), überschreitet. Ein niedriger CT-Wert spricht für eine Signaldetektion in einem frühen Zyklus und damit für eine höhere Menge an mRNA in der Originalprobe, das Umgekehrte gilt für einen hohen CT-Wert. Mit Überschreiten dieses Schwellenwertes beginnt die exponentielle Phase der Replikation. Als Merkmal einer korrekten Reaktion sollten die NTC negativ sein und 5 Zyklen zwischen

den RT⁻ und den RT⁺-Ansätzen liegen. Die Berechnung der Menge des gesuchten PCR-Produktes im Vergleich zu einem ubiquitär exprimierten Referenzgens erfolgt anhand der Formel:

$$dCT = CT_{(Zielgen)} - CT_{(Referenzgen)}$$

Bei dCT handelt es sich dabei um den korrigierten CT-Wert. In der exponentiellen Phase verdoppelt sich die eingesetzte cDNA annähernd pro durchgeführten Zyklus. Daher werden die Werte als 2^{dCT} angegeben. Negative Proben werden mit einem CT-Wert von 40 angegeben, da dies die maximal durchgeführte Zyklusanzahl war.

Primer Design

Primer sind Oligonukleotide die spezifisch an komplementäre DNA-Sequenzen binden. Mit ihrer 3'-OH Gruppe bieten sie einen Startpunkt für eine DNA-Replikation, welche im Rahmen von PCR-Amplifikationen, Sequenzierungen und Mutagenesen genutzt werden kann. Je nach Verwendung wurden bei der Erstellung der Primer unterschiedliche Gesichtspunkte berücksichtigt. Die Eigenschaften der Primer wurden in dieser Arbeit mit der frei zugänglichen Software Primer 3 berechnet.

Sämtliche Primer wurden bei der Firma Metabion International AG in Martinsried bestellt.

PCR-Primer

Diese Primer ermöglichen die Amplifikation von spezifischen DNA Sequenzen. Dazu bindet der sog. Forward-Primer am 5'-Ende an eine flankierende Sequenz und bildet so den Startpunkt für die Replikation des Leading Strands, wohingegen der Reverse-Primer den Startpunkt der Replikation des Lagging-Strands am 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz darstellt. Die Primer hatten eine Länge von 20-30 Basen und eine Schmelztemperatur von 58-65°C, was eine ausreichend hohe Annealingtemperatur erlaubte. Beim Design wurde darauf geachtet, dass die Primer einen GC Gehalt von über 40% hatten, und wenn möglich mit 2 Basen G oder C endeten, um eine gute Bindung zu ermöglichen. Zudem wurden Primer so erstellt, dass diese kaum interne Sekundärstrukturen ausbilden.

PCR-Primer zum Einfügen von Restriktionsschnittstellen

Eine PCR bietet über die spezifische Vervielfältigung von DNA hinaus die Möglichkeit, durch gezielte Wahl von Primern Mutationen einzufügen, welche die spätere Klonierung von PCR Amplifikaten in Vektoren der Wahl erlauben. So war es im Rahmen dieser Arbeit für die Klonierung des pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK wichtig, Kpn I und Not I Restriktionsschnittstellen zu erzeugen. Hierbei mussten einige Punkte beim Primerdesign beachtet werden, da diese

zwar spezifisch an gewisse Sequenzen binden sollten, gleichzeitig aber auch Mutationen tragen mussten. Die Mutationen, die die Sequenzen von Restriktionsschnittstellen darstellten, wurden in die Mitte des Primers platziert, um so eine ausreichend stabile Bindung durch die nicht veränderten Primerbestandteile an die Originalsequenz zu erreichen. Die Primer endeten falls möglich mit 2 Basen G oder C, und wiesen einen GC Anteil von mindestens 40% auf. Wiederum sollten die Primer keine Sekundärstrukturen aufweisen. Für diese Verwendung wurde mit HPLC-gereinigten Primern gearbeitet.

qRT-PCR Primer für SYBR Green Methode:

Aufgrund der Tatsache, dass doppelsträngige DNA zur Interkalation des SYBRgreen Farbstoffes führt, ist das Primer-Design ein kritischer Punkt für die Qualität der qRT-PCR. Primer-Dimere und unspezifische Amplifikate können zu einer inakkuraten Quantifizierung führen. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass Amplifikate von ca. 100bp Länge entstanden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Templates keine längere Regionen des gleichen Nukleotids und keine offensichtlichen Sekundärstrukturen boten. Die Primer hatten einen GC Anteil von mindestens 40%, endeten mit den Basen G und C und hatten keine Sekundärstrukturen. Die Schmelztemperaturen lagen bei ca. 60°C. Da lediglich Sequenzen nachgewiesen werden sollten, die nicht in der murinen genomischen DNA vorkommen (wie RFP, eGFP, HSV-TK), musste keine cDNA-Spezifität durch Beachtung der Exonstruktur erzeugt werden. Zuletzt wurden die Primersequenzen mit dem murinen Genom verglichen, um ungewünschte Bindungen an andere Sequenzen auszuschließen. Für diese Verwendung wurde mit HPLC-gereinigten Primern gearbeitet.

Sequenzierprimer

Diese Primer dienten als Startpunkt einer Sequenzierung. Die Forward-Primer erlaubten die Sequenzierung 5'-3', die Reverse-Primer die Sequenzierung 3'-5'. Hierbei wurden die gleichen Punkte wie bei der Erstellung von PCR-Primern beachtet. Als Reinigungsstufe war „entsalzt“ ausreichend.

Mutagenese Primer

Zur Durchführung der Mutagenese des pDNA3-CCL5Pro-Red wurde das „QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene benutzt. Diesem Kit lag eine genaue Beschreibung zur Erstellung der Primer bei. Dieses Kit benötigt 2 Primer, die beide die gewünschte Mutation tragen und die sich an die entsprechende Sequenz auf den beiden komplementären Plasmidsträngen binden. Diese Primer sollten eine Länge von 25-45 Basen haben und eine Schmelztemperatur von über 78°C aufweisen. Die Mutation sollte in der Mitte des Primers zu

liegen kommen und somit von ca. 10-15 Basen flankiert sein. Um die Bindungseffizienz noch zu steigern, sollten der GC-Anteil über 40% liegen und die Primer mit mindestens einem G oder C enden. Die Primer sollten mittels HPLC oder PAGE gereinigt worden sein. Das auf der Firmen-Homepage angebotene Programm wurde genutzt, um die Eigenschaften der Primer zu berechnen.

Methodik des Tierversuches

Die Tierexperimente erfolgten unter Zustimmung der Tierschutzkommission des Freistaates Bayern (Az. 55.2-1-54-2531-122-09).

Tiere

Für das orthotope panc02 Pankreastumor-Modell wurden C57BL/6 Mäuse verwendet. Da die panc02 Tumorzellen syngen zu den C57BL/6 Mäusen sind, entfiel hier die Notwendigkeit der Immunsuppression. Für die Versuche wurden weibliche Mäuse mit einer Masse von circa 22g, einem Alter von 8-11 Wochen entsprechend, verwendet. Sämtliche Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld) erworben.

Tumormodell

Ein syngenes und orthotopes Pankreastumormodell stellt die normalen Verhältnisse des Pankreaskarzinoms am ehesten dar und wurde daher für die in vivo Versuche gewählt. Dabei wurde eine modifizierte Variante des durch Morikane et al. etablierten Modells verwendet. Die Mäuse wurden mittels Ketamin (100mg pro kg Körpergewicht) (Ketavet), Xylazin (5mg pro kg Körpergewicht) (Rompun 2%) und Atropin über intraperitoneale Gabe narkotisiert. Anschließend erfolgte die elektrische Rasur und Desinfektion einer 1x2cm großen Fläche an der linken Flanke. Am linken Oberbauch wurde im Sinne eines Rippenrandschnittes eine 1-1,5cm lange Inzision gesetzt. Nach Eröffnung des Peritonealsackes wurde die Milz samt anhängendem Pankreas mobilisiert und nach kranial lateral aus der Bauchhöhle luxiert. Mit einer Vorrichtung, die auf Knopfdruck ein definiertes Volumen in diesem Fall durch eine Spritze mit 30G Nadel injiziert, wurden $1,5 \times 10^5$ panc02 Tumorzellen in einem Volumen von 40µl PBS subkapsulär in das Pankreaskorpus injiziert. Dabei bildete sich eine durch die bindegewebige Kapsel sichtbare Zellsuspensionsblase. Es wurde darauf geachtet, dass keine panc02 Zellen in die Bauchhöhle gelangen konnten. Dazu wurde mit einem Q-Tip für einige Minuten Druck auf die Injektionsstelle ausgeübt, sodass sich die Kapsel wieder adaptieren konnte. Nach Reposition des Pankreas erfolgte der Wundverschluss mit 4-0 Prolene als Einzelknopfnah. Während der Aufwachphase wurden die Tiere zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur unter eine Wärmelampe platziert. Zur postoperativen Schmerztherapie

wurde jedem Tier 1mg Tramadol s.c. verabreicht. Nach der Aufwachphase wurden die Tiere 2-stündlich kontrolliert, später bei stabilem Zustand täglich. 10 Tage nach Tumorinduktion entwickelten die Tiere bereits tastbare Tumore. Die Mäuse wurden dem Zufallsprinzip entsprechend in die jeweiligen Versuchsgruppen aufgeteilt, sodass eine ähnliche Verteilung in den Gruppen und damit Vergleichbarkeit angenommen werden konnte. Anschließend erfolgte die Einzeltiermarkierung durch Stanzen von Markierungslochern in die Ohrmuschel. Im ersten Tierversuch wurden 5 Gruppen untersucht, die Kontrollgruppe ohne Stammzellinjektionen ($n=5$) und die Stammzellgruppen p53^{-/-} ($n=3$), CCL5Pro-TK ($n=10$), CCL5Pro-RFP ($n=9$) und CCL5Pro-eGFP ($n=6$). Der zweite Tierversuch diente der Ergebnisbestätigung des Erstversuches und setzte sich aus den 3 Versuchsgruppen Kontrolle ($n=7$), CCL5Pro-RFP ($n=12$) und CCL5Pro-TK ($n=15$) zusammen. Für die Untersuchung gesunder Pankreata wurden in 6 Tieren keine Tumore induziert. 5 Mäuse wurden jeweils in Standard Makrolon Käfigen Größe II mit freiem Zugang zu Wasser und Futter in keimarmer Umgebung gehalten. Die Streu wurde einmal wöchentlich, bei starker Verunreinigung auch häufiger, gewechselt. Bei Auftreten blutiger Stühle, klinisch manifester funktioneller Störungen, verminderter Reaktion der Tiere auf Umweltreize und eines Gewichtsverlustes von mehr als 10% sah das Protokoll die Tötung der Tiere bereits vor Ablauf der Versuchsdauer vor.

Die mesenchymalen Stammzellen (p53^{-/-}, p53^{-/-}-CCL5Pro-RFP, p53^{-/-}-CCL5Pro-eGFP, p53^{-/-}-CCL5Pro-TK) wurden einmal wöchentlich intravenös über eine Schwanzvene appliziert. Dazu wurden die Tiere zunächst für einige Minuten unter einer Wärmelampe platziert, damit es zu einer Dilatation der Schwanzvenen kam und somit die Punktionsbedingungen verbessert wurden. Anschließend wurden die Mäuse mit Hilfe eines Becherglases so fixiert, dass der Schwanz durch eine Kerbung im Glasrand hindurch außerhalb des Becherglases zu liegen kam, wohingegen die Mäuse schonend innerhalb des Glases immobilisiert waren. Dann wurden 5×10^5 mesenchymale Stammzellen in 0,5ml 1x PBS mittels einer 1ml Insulinspritze und 26G Subkutannadel über eine Schwanzvene injiziert. Dabei wurde auf sehr feine Resuspension der Zellen und eine geringe Injektionsgeschwindigkeit geachtet, damit zum einen Lungenembolien durch Zellklumpen verhindert wurden und zum anderen die momentane Kreislaufbelastung von den Tieren kompensiert werden konnte. Nach dieser Prozedur konnten die Tiere wieder direkt in die Käfige zu den normalen Haltungsbedingungen gegeben werden.

Die therapeutische Ganciclovir (Gcv) Gabe erfolgte einmal täglich an den Tagen 5,6 und 7 nach Stammzellinjektion. Dazu wurde zunächst die Ganciclovir Stocklösung $c_{Gcv}=10\text{mg/ml}$

hergestellt. 500mg Ganciclovir wurden in 50ml Aqua ad iniectabilia aufgelöst. Diese Lösung war für circa 4 Wochen bei 4°C Lagerung stabil und konnte daher für einen Versuchsdurchgang genutzt werden. Ganciclovir wurde dann zu Dosen von 1,5mg pro Maus (150µl der Lösung) mittels einer 1ml Insulinspritze und 26G Subkutannadel intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden während der Versuchsdauer in regelmäßigen Abständen gewogen.

Nach 3 therapeutischen Zyklen wurden die Tiere an Tag 36 nach Tumorinduktion unter Narkose durch Entbluten getötet. Im Anschluss daran wurden den Tieren der Tumor und diverse Organe entnommen und das Gewebe auf verschiedene Weisen asserviert. Über einen Schnitt, der über die gesamte Mittellinie reichte, wurde sowohl die Bauchhöhle als auch die Brusthöhle eröffnet. Zunächst wurde der Bauchraum auf das Vorliegen von makroskopisch entdeckbaren Metastasen hin untersucht. Dazu wurden die verschiedenen Organe des Bauchraums Magen, Milz, Leber, Darm, Lymphknoten, Peritoneum und der Primärtumor genau inspiziert und palpirt. Dadurch konnten jedoch nur Makrometastasen entdeckt werden und eine Ja/Nein Aussage bezüglich des Metastasenbefalls getroffen werden. Die statistische Auswertung des Metastasierungszustandes wurde mit dem Fisher's Exact Test durchgeführt. Zudem wurde der Situs fotodokumentiert. Nun erfolgte die Präparation des Tumors. Die Pankreastumore waren derartig aggressiv gewachsen, dass das Pankreas vollkommen mit dem Tumor verbacken war und keine Trennung mehr möglich war. Der Tumor wurde entlang der kugeligen Oberfläche mit Pinzette und spitzer Schere von den umgebenden Strukturen abpräpariert und in einem Stück entfernt. Im Anschluss daran wurde der Tumor auf drei Nachkommastellen genau mit der Waage gewogen. Die statistische Auswertung der Tumormassen in den verschiedenen Gruppen erfolgte über den Student t-Test, die Tumore wurden ebenfalls fotodokumentiert. Es wurden nun die verschiedenen Organe (Milz, Leber, Thymus, Lunge, Haut, Darm) in ihrer normalen anatomischen Form entnommen, bei Vorliegen von makroskopisch erkennbaren Metastasen des Bauchfells oder der Magenwand wurden diese gesondert entnommen. Die Gewebe wurden nun für die folgenden Untersuchungen asserviert. Dazu wurden die Gewebe in vergleichbar große Stücke zerkleinert und entweder schockgefroren, formalinfixiert oder in RNAlater konserviert. Wenn nur wenig Gewebe vorlag wurde der Formalinfixierung für spätere Paraffineinbettung und Histologie der Vorrang gegeben.

Histologische Verfahren

Gefrierschnitte

Zur direkten Beurteilung der Reporterexpression von RFP und eGFP mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie mussten Gefrierschnitte der Gewebe angefertigt werden. Dazu wurden die Gewebeprobe mit Tissue-Tek O.C.T. in vorgefertigten Plastikeinbettenschälchen eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zum Schutz der instabilen Reporterprodukte vor Licht wurden die so eingebetteten Präparate zusätzlich mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff transportiert und kurzzeitig bei -20°C zwischengelagert. Die Gewebe mussten möglichst rasch weiterverarbeitet werden, um der Instabilität der Reporterproteine Rechnung zu tragen. Die Tumore wurden anschließend mit einem Gefriermikrotom zu $5\mu\text{m}$ dicken Schnittpräparaten geschnitten und auf Objektträger gezogen. Nach Auftropfen eines Tropfens DAPI zur Darstellung der Zellkerne wurden die Proben mit einem Deckglas versehen und direkt mit einem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert. Fotos wurden mit der AxioCamMR Microscope Camera aufgenommen und die Bilder der verschiedenen Fluoreszenzkanäle mit der Software Photoshop CS4 übereinandergelegt.

Paraffineinbettung

Für spätere histologische und immunhistochemische Untersuchungen musste das in den Tierversuchen entnommene Gewebe konserviert werden. Die Gewebeprobe wurden direkt nach der Entnahme in kleine Stücke zerteilt und in beschriftete Einbettkassetten gelegt. Diese wurden im Anschluss daran für 12-24h in einer 4%igen, gepufferten Formaldehydlösung als Fixiermedium bei Raumtemperatur fixiert. Nach Wässern der Präparate zum Auswaschen des Fixiermediums für 1h in Leitungswasser wurden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe auf die Paraffineinbettung vorbereitet. Wahlweise konnten die Proben nach der Wässerung auch für eine weitere Nacht in 70% Ethanol bei Raumtemperatur gelagert werden, ehe sie in folgender Alkoholreihe im Histomaten weiterbehandelt wurden.

Alkohol	Zeit
70% Ethanol	$2 \times 2\text{h}$
	$1 \times 1\text{h}$
96% Ethanol	$2 \times 1,5\text{h}$
100% Ethanol	$3 \times 1,5\text{h}$
Xylol	$1 \times 1,5\text{h}$
	$1 \times 1\text{h}$
Paraffin (60°C)	$2 \times 3\text{h}$

Die Präparate wurden maximal für weitere 12h in 60°C warmen Paraffin gelagert bis sie endgültig eingebettet wurden. Nach Abkühlen und Aushärten der Paraffinblöcke wurden diese bei Raumtemperatur gelagert.

Hämatoxylin und Eosin Färbung

Die HE-Färbung stellt in der Histologie eine der Standardfärbungen dar. Nach Deparaffinierung in Xylol für 3×5 min wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe für 3×5 min in 100% Ethanol, für $3 \times 1,5$ min in 95% Ethanol und für 1×1 min in 70% Ethanol rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser ausgewaschen und für 5min in Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Nach 5 minütigem Auswaschen unter Leitungswasser wurden die Gewebeschnitte für 2min mit 70% Ethanol behandelt. Nach 30s in Eosin-Lösung wurden die Schnitte zügig durch die obige aufsteigende Alkoholreihe geführt und mit einem Deckglas versehen.

Anfärbung des red fluorescent proteins

Zum Nachweis der Reportergene auf Proteinebene wurden die entnommenen Gewebe immunhistochemisch auf eine mögliche RFP-Expression hin untersucht. Dazu wurden die Paraffinschnitte zunächst für 3×5 min in Xylol deparaffiniert und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe für 3×3 min in 100% Ethanol, für 2×3 min in 96% Ethanol und für 1×3 min in 70% Ethanol rehydriert. Nach Waschen und einer 2×5 min Inkubation in PBS wurde die endogene Peroxidase durch 20 minütige Behandlung mit 3% Wasserstoffperoxid, verdünnt in Methanol, im Dunkeln blockiert und erneut für 2×5 min in PBS gewaschen. Für das Unmasking des Antigens wurden zunächst 300ml destilliertes Wasser zusammen mit 3ml der Antigen Unmasking Solution zum Kochen gebracht. Die Schnitte wurden folgend in dieser Lösung bei 1bar für 20min autoklaviert und konnten anschließend 40min auskühlen bevor sie erneut in PBS inkubiert wurden. Die Gewebe wurden mit einem Fettstift umkreist. Vor Detektion des Antigens wurde das endogene Biotin durch 15 minütige Behandlung mit je einem Tropfen Avidin und Biotin blockiert und danach für 2×5 min in PBS gewaschen. Nach einer 5 minütigen Behandlung mit Superblock bei Raumtemperatur erfolgte die Inkubation in dem 1:50 in Milch verdünnten anti-RFP Antikörper (Rabbit) für 1h ebenfalls bei Raumtemperatur. Nach Waschen für 2×5 min in PBS konnte das Antigen visualisiert werden. Der 1:300 in Milch verdünnte biotinylierte Anti-Rabbit Sekundärantikörper wurde für 30min zu der Probe gegeben und danach für 2×5 min in PBS gewaschen. Vor der eigentlichen Färbung wurde das Gewebe für 30min mit ABC Solution in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur behandelt. Die Schnitte wurden

erneut für 5min in PBS gewaschen und nochmals 5min in TRIS inkubiert. Für die Färbung wurden 4ml DAB und 1ml NiCl zu 200ml 37°C warmen TRIS gegeben und kurz vor Gebrauch mit 500µl 3%igem Wasserstoffperoxid gemischt. Mit der so entstandenen Lösung wurden die Schnitte gefärbt, in Methylgrün gegengefärbt und durch rasches Führen durch eine aufsteigende Alkoholreihe (ab 96% bis Xylol) entfärbt. Es folgte das Eindeckeln mit VectaMount.

Umgang mit Humangewebe

Bezug

Für die Untersuchung der CCL5-Expression an humanem Pankreaskarzinomgewebe wurde bei der gemeinnützigen Stiftung HTCR (Human Tissue and Cell Research) die Bereitstellung von Gewebeproben humaner pankreatischer duktaler Adenokarzinome und korrespondierendem Normalgewebe von den gleichen Patienten beantragt. Die bewilligten Gewebeproben von 10 Patienten lagen in schockgefrorenem Zustand vor und waren nach Patientenummer und Gewebeart (Tumorgewebe, Normalgewebe) sortiert. Die Proben wurden stets auf Trockeneis transportiert und bei -80°C dauerhaft gelagert. Die von der gemeinnützigen und staatlich kontrollierten Stiftung HTCR erhaltenen Gewebeproben unterlagen der Zustimmung des Patienten und wurden entsprechend den Richtlinien der Stiftung verwendet (Thasler, Weiss et al. 2003). Das Gewebe wurde wie in den obigen Methoden beschrieben behandelt.

CCL5 Färbung von Humangewebe

Die Expression von CCL5 in humanen Pankreaskarzinomproben wurde durch immunhistochemischen Nachweis des Proteins gezeigt. Da das Gewebe in gefrorenem Zustand vorlag, wurde die Färbung an Gefrierschnitten durchgeführt. Dabei wurde prinzipiell das bei der RFP-Färbung vorgestellte Protokoll mit leichten Modifikationen verwendet. Die Schnitte mussten nicht deparaffiniert und durch die Alkoholreihe geführt werden, sondern wurden nach 15 minütiger Lufttrocknung sofort für 2 × 5min in PBS gewaschen. Die übrigen Schritte waren bis auf den Einsatz der Antikörper identisch. Für die Detektion des Antigens konnte auf die Superblockbehandlung verzichtet werden. Als Primärantikörper wurde unverdünnter Überstand von VL2 produzierenden Zellen verwendet. VL2 („von Lüttichau 2“) ist ein muriner Anti-CCL5 (human) Antikörper (von Luettichau, Nelson et al. 1996), der zur Färbung von Gefrierschnitten geeignet ist. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter Goat Anti-mouse Antikörper verwendet.

Klonierstrategie

Eigenschaften der Plasmide

Zur späteren Expression von Reportergenen und therapeutischen Genen unter CCL5-Promoter Kontrolle war es nötig Vektoren zu verwenden, die zum einen den Einbau eines Promoters und damit die Kopplung der Zielgene an den CCL5-Promoter erlaubten und zum anderen eine schnelle und zuverlässige Selektion in eukaryonten Zellen möglich machten. Hierfür bot sich der Vektor pCMV/Bsd (Invitrogen) an, der sich als Grundgerüst zur Konstruktion eines neuen Vektors eignete. Im 3'-Polylinker, der nicht unter direkter Promoterkontrolle steht, kann über eine Vielzahl günstiger Restriktionsschnittstellen der CCL5-Promoter mit entsprechenden Zielgenen hineinkloniert werden. Zur Selektion in eukaryonten Zellen bietet der pCMV/Bsd Vektor eine Blasticidinresistenz, die durch den konstitutiven CMV-Promoter kontrolliert wird. Blasticidin ist ein Nukleosidantibiotikum, das aus *Streptomyces griseochromogenes* isoliert wurde. Es hemmt die Proteinsynthese sowohl von prokaryontischen als auch eukaryontischen Zellen. Das vorliegende bsd- Blasticidin S Desaminase Gen konnte aus *Aspergillus terreus* kloniert werden und setzt Blasticidin zu einem nicht toxischen Desaminohydroxyderivat um (Kimura 1994). Es ermöglicht daher nach Transfektion in eukaryonte Zellen die schnelle Selektion von erfolgreich transfizierten Zellen, in der Regel ist bereits nach 10 Tagen eine hohe Ausbeute erzielt worden. Für die Selektion in Bakterien trägt der Vektor zusätzlich ein Ampicillin-Resistenzgen. Daher wurde das Plasmid pCMV/Bsd als Zielvektor für die Klonierungen der verschiedenen CCL5-Promoter/Gen - Konstrukte ausgewählt.

Klonierung des Vorläufervektors pDNA3-CCL5Pro-Hind III

Zunächst wurde ein Plasmid kloniert, das die Koppelung der Gene an den CCL5-Promoter und das anschließende Klonieren in den pCMV/Bsd-Vektor ermöglichte. Dieses Plasmid sollte so beschaffen sein, dass die genutzten Restriktionsschnittstellen sowohl für das Koppeln an den CCL5-Promoter, als auch für die anschließende Klonierung aller benutzten Gene verwendet werden konnten. Dadurch konnten die Arbeitsschritte standardisiert durchgeführt werden, was zu einer Arbeits- und Zeitersparnis führte. Als Grundvoraussetzung durften die verwendeten Schnittstellen in keiner kodierenden (RFP, eGFP, HSV-TK) oder regulatorischen (CCL5-Promoter) Sequenz vorkommen. Außerdem musste eine einfache Klonierung in den pCMV/Bsd möglich sein. Diese Voraussetzungen erfüllte das von Dr. Nelson/Fr. Mojaat bereitgestellte Plasmid pDNA3-CCL5Pro-Red (6,4kbp). Hierbei handelte es sich um eine Modifikation des pDNA3-Vektors (Invitrogen), in dem der CMV- Promoter

durch den CCL5-Promoter (Hind III - Kpn I) ersetzt worden war und das Reporter-gen dsRed2 (Kpn I – Not I) unter die Promoterkontrolle gebracht worden war. Das Reporter-gen dsRed 2 konnte in diesem Plasmid über die Kpn I und die Not I Schnittstellen durch die Gensequenzen für das grün fluoreszierende Protein eGFP und die Herpes Simplex Virus Thymidinkinase leicht ersetzt werden. Lediglich für die Klonierung der Konstrukte in den pCMV/Bsd standen im Plasmid pDNA3-CCL5Pro-Red keine nutzbaren Schnittstellen zur Verfügung. Da im pDNA3-CCL5Pro-Red unmittelbar vor dem CCL5-Promoter eine Hind III Schnittstelle lag, wie sie auch im 3'-Polylinker des pCMV/Bsd vorkommt, wurde mittels Mutagenese eine zweite Hind III Restriktionsschnittstelle erzeugt. Diese Schnittstelle wurde an einer der Hind III Erkennungssequenz ähnelnden Sequenz eingefügt, um die zu mutierenden Basenanzahl gering zu halten. Dabei wurde diese zweite Hind III Schnittstelle abwärts der im pDNA3-CCL5Pro-Red vorhanden Bgh pA eingefügt, welche nach Transfektion in Zellen die entsprechende Gen-mRNA stabilisiert. Als Erfolgskontrolle wurde ein Hind III Verdau durchgeführt, der bei erfolgreicher Mutagenese in der folgenden Agarosegelelektrophorese statt einem 6,4kbp langen Fragment (=linearisierter Vektor) nun 2 Fragmente (2,1kbp und 4,3kbp) zeigte. Das so erhaltene Plasmid pDNA3-CCL5-Red-Hind III wurde mit den Restriktionsenzymen Kpn I und Not I geschnitten und das pDNA3-CCL5Pro-Hind III Fragment (5,7kbp) anschließend aufgereinigt. Das auf diese Weise erhaltene pDNA3-CCL5Pro-Hind III Grundgerüst erlaubte nun die Kpn I-Not I Klonierung von eGFP und der HSV-TK unter die CCL5-Promoter Kontrolle und die letzte Hind III Klonierung der Promoter-Gen Konstrukte in den pCMV/Bsd.

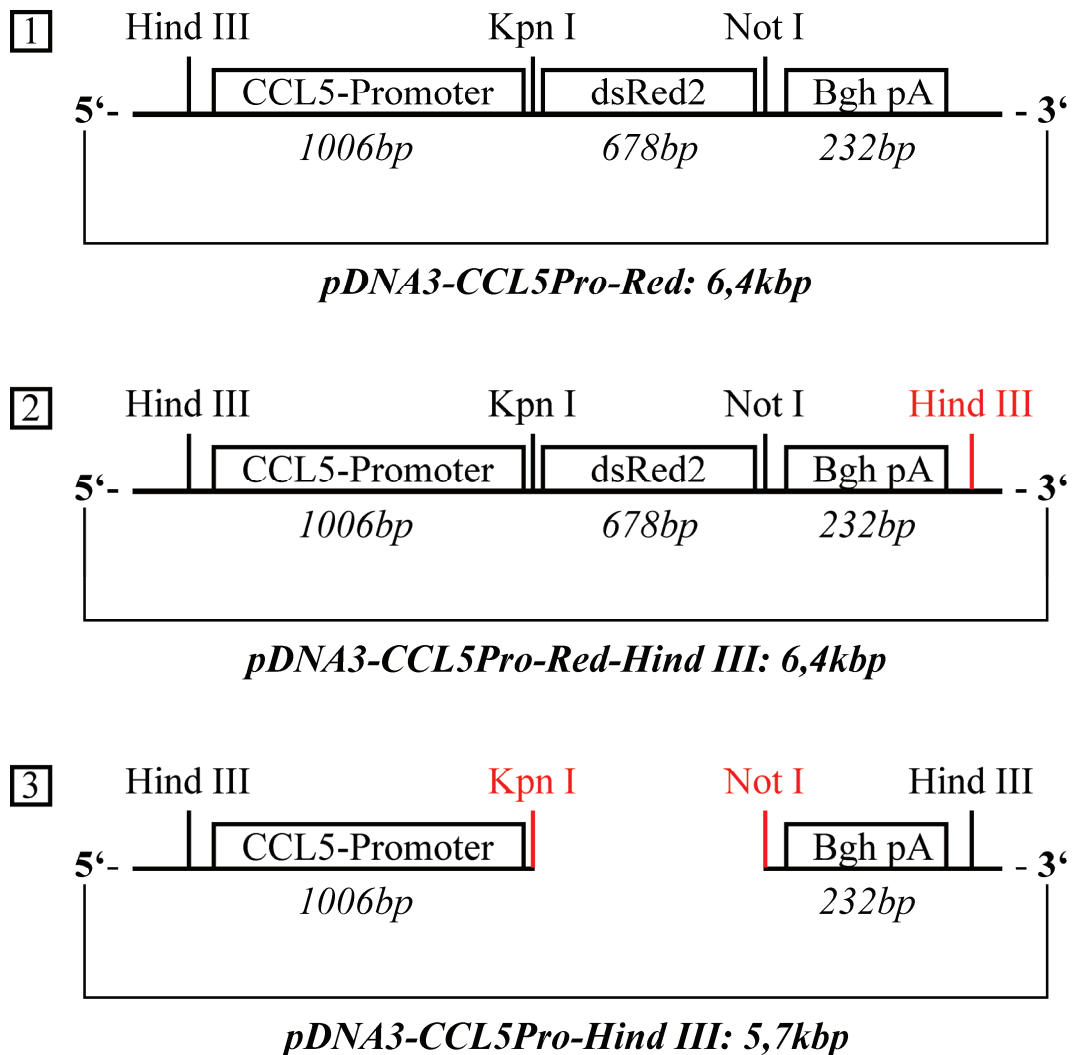


Abbildung 3: Klonierstrategie

Für die Klonierung der gewünschten pCMV/Bsd-CCL5Pro-Konstrukte musste ein Vorläuferplasmid geschaffen werden, welches einerseits die Kopplung der Reportergene und des therapeutischen Gens an den CCL5-Promoter erlaubte und andererseits geeignete Schnittstellen für die folgende Klonierung in den pCMV/Bsd-Vektor bot.

(1) Der CCL5-Promoter lag in dem Plasmid pDNA3-CCL5Pro-Red vor. (2) Mittels Mutagenese wurde eine zweite Hind III Schnittstelle erzeugt, die die Klonierung in den Vektor pCMV/Bsd erlaubte. (3) Durch Not I und Kpn I Verdau entstand eine Kasse, in die ebenfalls mit Not I und Kpn I geschnittenen Gene ligiert werden konnten. Dargestellt wurden nur die für die Klonierung wichtigen Abschnitte.

Klonierung von pCMV/Bsd-CCL5Pro-RFP

Bei dsRed2 (=RFP) handelt es sich um ein rot fluoreszierendes Protein, das von einem ähnlichen Protein der *Discosoma species* (Korallen) abstammt (Matz, Fradkov et al. 1999). dsRed2 trägt einige stille Basenpaartausche zur Anpassung an humane Codon-Präferenzen, um eine hohe Expression zu ermöglichen (Haas, Park et al. 1996). Zudem wurden einige Aminosäuren substituiert, um eine schnellere Reifung und eine geringe Aggregation zu garantieren (Yarbrough, Wachter et al. 2001). dsRed2 fluoresziert bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 558nm rot (Wellenlänge 583nm). Daher eignet sich dsRed2 (678bp) bei entsprechender Kopplung als Reporter gen für die Aktivierung des CCL5-Promoters in-vitro und in-vivo. Nach der Mutagenese des Vektors pDNA3-CCL5Pro-Red zu pDNA3-CCL5Pro-Red-Hind III wurde die 2,1kbp lange CCL5-Promoter/RFP Sequenz mit Hind III ausgeschnitten, aufgereinigt und in den pCMV/Bsd-Vektor, der zuvor aufgrund der ungerichteten Ligation dephosphoryliert wurde, kloniert. So wurde das 5,7kbp lange Plasmid pCMV/Bsd-CCL5Pro-RFP erhalten.

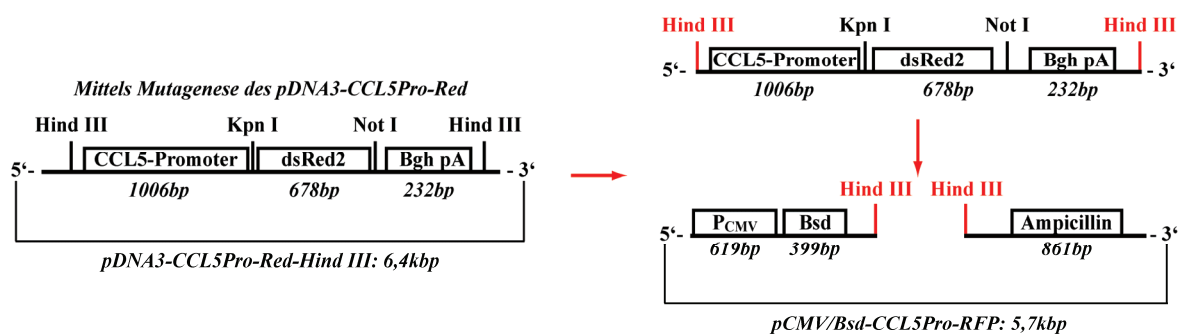


Abbildung 4: Klonierungsstrategie pCMV/Bsd-CCL5Pro-RFP

Im Rahmen der zuvor beschriebenen Mutagenese entstand das Plasmid pDNA3-CCL5Pro-Red-Hind III. Hieraus konnte die CCL5Pro-RFP-Bgh pA Sequenz mittels Hind III Verdau gewonnen werden. Durch Klonierung in den entsprechend Hind III verdauten pCMV/Bsd entstand so das 5,7kbp lange Plasmid pCMV/Bsd-CCL5Pro-RFP. Dargestellt wurden nur die für die Klonierung wichtigen Sequenzen.

Klonierung von pCMV/Bsd-CCL5Pro-eGFP

Bei eGFP (enhanced green fluorescent protein) handelt es sich um eine modifizierte Variante des grün fluoreszierenden Proteins GFP, das aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Prasher, Eckenrode et al. 1992). eGFP besitzt dabei einen doppelten Aminosäureaustausch (Cormack, Valdivia et al. 1996) und über 190 stille Basenpaaraustausche (Haas, Park et al. 1996), die den humanen Codonpräferenzen entsprechen und damit eine schnellere Reifung und eine erhöhte Proteinproduktion ermöglichen. Bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488nm fluoresziert das Protein grün (Wellenlänge 507nm). Aufgrund der etwas höheren Stabilität bei geringerer Leuchtintensität als dsRed2 wurde ebenfalls eGFP als Reportergen für die Aktivierung des CCL5-Promoters verwendet. Als Quelle von eGFP diente bei den Klonierungen der Vektor pEGFP-N1 (4,7kbp, Clontech, BD Biosciences). Mittels Kpn I – Not I wurde die 720bp lange eGFP Sequenz in den pDNA3-CCL5Pro-Hind III kloniert. Das 2,1kbp lange CCL5-Promoter/eGFP Fragment wurde anschließend über Hind III in den pCMV/Bsd Vektor kloniert. Auf diese Weise wurde das 5,8kbp lange Plasmid pCMV/Bsd-CCL5Pro-eGFP erzeugt.

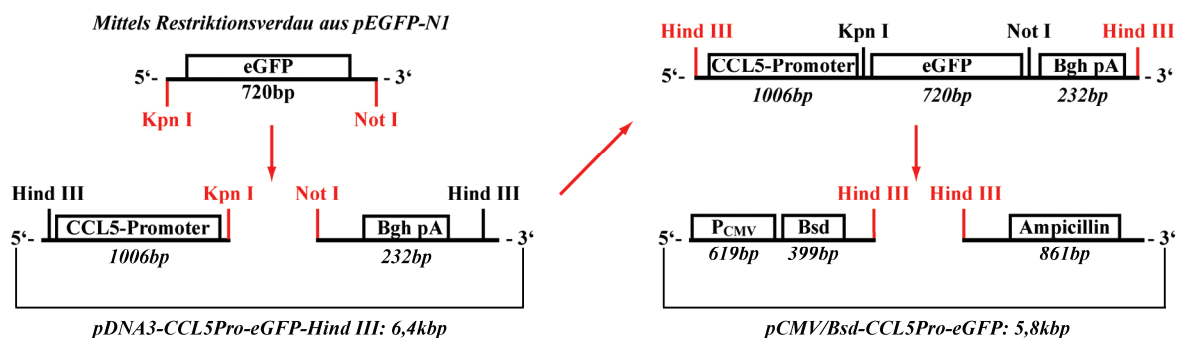


Abbildung 5: Klonierungsstrategie pCMV/Bsd-CCL5Pro-eGFP

Das Gen für eGFP konnte mittels Kpn I und Not I direkt aus dem Ursprungsplasmid pEGFP-N1 ausgeschnitten werden. Über dieselben Schnittstellen konnte so die eGFP-Sequenz in den Vektor pDNA3-CCL5Pro-Hind III ligiert werden. Nach Hind III Verdau gelang die Ligation in den Hind III verdauten pCMV/Bsd-Vektor, sodass das 5,8kbp lange Plasmid pCMV/Bsd-CCL5Pro-eGFP entstand. Dargestellt wurden nur die für die Klonierung wichtigen Abschnitte.

Klonierung von pCMV/Bsd -CCL5Pro-TK

Die Herpes simplex Thymidinkinase (HSV-TK) ist ein virales Enzym, das sich vom humanen und murinen Isoenzym unter anderem dadurch unterscheidet, dass es die Prodrug Ganciclovir phosphorylieren und so in eine aktive Form verstoffwechseln kann. Aktives Ganciclovir wirkt zytotoxisch, weshalb das HSV-TK/Ganciclovir System eine etablierte „suicide-gene/prodrug“ Strategie in diversen Tumormodellen darstellt. Zur gewebespezifischen HSV-TK Expression im in-vivo Versuch musste die HSV-TK unter die CCL5-Promoter Kontrolle gebracht werden. Die HSV-TK wurde durch Dr. Luckow mit dem Plasmid pBlueTK (5,8kbp) bereitgestellt. Da die HSV-TK in diesem Plasmid mit keinen zum Vektor pDNA3-CCL5Pro-Hind III kompatiblen Schnittstellen vorlag, mussten daher 5‘ der HSV-TK eine Kpn I und 3‘ eine Not I Schnittstelle eingefügt werden. Hierfür wurde die 1,1kbp lange Sequenz der HSV-TK mit flankierender Plasmid-DNA (0,3kbp) mittels PCR vervielfältigt. Dabei lagen in den Primern die entsprechenden Schnittstellen als „Mutationen“ vor, sodass die Schnittstellen eingefügt werden konnten. Nach Schneiden der Amplifikate mit Kpn I und Not I und Aufreinigung dieser, konnte die HSV-TK in den pDNA3-CCL5Pro-Hind III kloniert werden. Über Hind III konnte anschließend das 2,7kbp lange CCL5-Promoter/HSV-TK Fragment in den pCMV/Bsd Vektor kloniert werden. Produkt war das 6,3kbp lange Plasmid pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK.

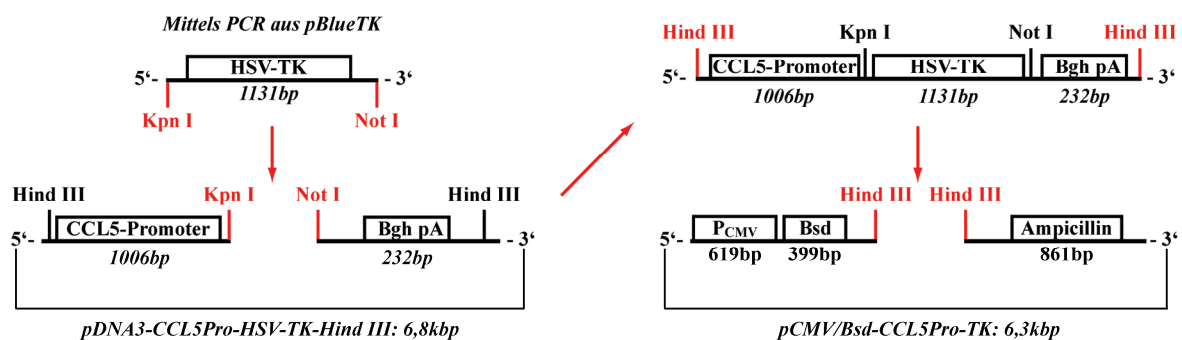


Abbildung 6: Klonierungsstrategie pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK

Das Gen für die HSV-TK wurde mittels PCR aus dem Plasmid pBlueTk vervielfältigt. Im Rahmen der PCR wurden gleichzeitig die für die weitere Klonierung notwendigen Schnittstellen für Kpn I und Not I eingefügt. Nach Ligation in den Vektor pDNA3-CCL5Pro-Hind III wurde die CCL5-Promoter-HSV-TK-Bgh pA Sequenz mittels Hind III in den pCMV/Bsd ligiert. So entstand das 6,3kbp lange Plasmid pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK. Dargestellt wurden nur die für die Klonierung wichtigen Abschnitte.

Materialien

Verbrauchsmaterialien

0,1cm Elektroporationsküvetten	PeqLab, Erlangen
4mm Elektroporationsküvetten	PeqLab, Erlangen
96 well Elisa Platte Maxisorb	Nunc, Roskilde, Dänemark
Falcon Röhrchen (15ml, 50ml)	BD Bioscience, Heidelberg
Kryotubes	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
Kulturflaschen (150cm ² , 75cm ²)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Kulturplatten (6,12,24,48,96 Wells)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Kulturschalen (10cm, 6cm)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Lysing Matrix D Tubes	MP-Biomedicals Europe, Illkirch, Frankreich
MN Serilizer PES 0,22µm	Macherey-Nagel, Düren
Serologische Pipetten	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Taqman Cover	Sarstedt, Nürnberg
Taqman Platten	Sarstedt, Nürnberg
Zellschaber	TPP AG, Trasadingen, Schweiz

Kulturmedien und Zusätze für die Zellkultur

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Biotase	Biochrom AG, Berlin
Blasticidin	Invitrogen, Karlsruhe
FBS Superior	BioChrom AG, Berlin
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin 100x	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 GlutaMax-1	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Chemikalien und Reagenzien

10x Hexonucleotide	Roche Diagnostics, Mannheim
1kbp Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
ABC Solution	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Materialien

Biotin	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovine serum albumin (BSA)	Fermentas, St. Leon-Rot
CaCl ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAB (3,3'-diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTP Set	Fermentas, St. Leon-Rot
DTT (Dithiotreitol) 0,1M	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Calbiochem, Darmstadt
EGTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eosin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 1%	Merck, Darmstadt
First strand Buffer (5x)	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd, pro analysis 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka, Schnelldorf
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Hämatoxilin	Vector Laboratories, Burlingame, USA
HCL	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Lineares Acrylamid	Ambion/ Applied Biosystems, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylgrün	Fluka, Schnelldorf
MgCl ₂	Fermentas, St. Leon-Rot
Mineralöl	Sigma Aldrich, Taufkirchen
MOPS	Merck, Darmstadt
MTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl	Merck, Darmstadt
NiCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraffin Histo-Comp	Vogel, Giessen
PCR Optimizer	Bitop, Witten
Restriktionspuffer	NEB, Frankfurt a.M.; Roche Diagnostics, Mannheim; Boehringer Mannheim, Mannheim
rhTNF α	Peptotech, Hamburg
RNase Out 5000U	Invitrogen, Karlsruhe

RNAasin-ribonuclease inhibitor	Promega, Madison, USA
Rox referencedye (25x)	Invitrogen, Karlsruhe
Superblock	ID Labs inc., London, Canada
SYBRgreen I (250x)	Fluka, Schnelldorf
T4 Puffer	NEB, Frankfurt a.M.
Taq Puffer ohne Detergenz (10x)	Fermentas, St. Leon-Rot
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma Aldrich, Taufkirchen
UltraPure Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Vecta Mount	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Puffer und Lösungen	
Antigen unmasking solution	0,1M Na-Citrat, pH 6,0
MOPS (10x)	200mM MOPS, 50mM Na-Acetat, 10mM EDTA pH 8,0, mit NaOH auf pH 7,0
SYBRgreen I solution	1:100 in H ₂ O mit 20% DMSO, -20°C
SYBRgreen Mastermix	20% Taq Puffer ohne Detergenz, 375 μM NTPs, 4% Rox referencedye, 40% PCR Optimizer, 2% BSA, 0,4% SYBRgreen I solution, 6mM MgCl ₂
TBE (1x)	90mM Tris, 2 mM Borsäure, 10mM EDTA pH 8,0, 0,015 EtBr (v/v)
Einfriermedium für Bakterien	1,8% (w/v) KH ₂ PO ₄ , 0,45% (w/v) Na-Citrat, 0,09% (w/v) MgSO ₄ 7H ₂ O, 0,9% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ , 8% (w/v) K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O, 44% (w/v) Glycerin
LB-Medium	1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl
6x Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerol in Wasser
SOC-Medium	0,5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Trypton, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl 10mM, MgSO ₄ 10mM, Glukose 20mM, sterilfiltrieren
Enzyme	
Alkalische Phosphatase 5000U	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I	Qiagen, Hilden
Dpn I	Stratagene

Materialien

EcoR I	Roche Diagnostics, Mannheim
Hind III	Roche Diagnostics, Mannheim
Kpn I	Boehringer Mannheim, Mannheim
Nhe I	NEB, Frankfurt a.M.
Not I	NEB, Frankfurt a.M.
RNase-free DNase Set (50)	Qiagen, Hilden
Sal I	Roche Diagnostics, Mannheim
Superscript TM II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA Ligase	NEB, Frankfurt a.M.
Taq DNA-Polymerase (5U/ μ l)	NEB, Frankfurt a.M.
Xba I	Roche Diagnostics, Mannheim
Xho I	Roche Diagnostics, Mannheim

Antikörper

Rabbit Anti-RFP IgG, polyklonal	MBL International, Woburn, USA
Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Biotin, polyklonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Biotin, polyklonal	LINARIS, Wertheim-Bettingen

Kits

DsDNA BR Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe
DsDNA HS Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Innu PREP Doublepure Kit	Analytik Jena, Jena
innuPREP Plasmid Mini kit	Analytic Jena, Jena
MykoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Basel, Schweiz
PureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System	Invitrogen, Karlsruhe
Quant-it TM RNA Assay kit	Invitrogen, Karlsruhe
QuikChange Site directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Taqman Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

Materialien und Reagenzien für den Tierversuch

Atropinsulfat	Braun, Melsungen
---------------	------------------

C57BL/6 Mäuse	Charles River, Sulzfeld
Cymeven (Ganciclovir)	Roche, Schweiz
Hamilton Syringe	Hamilton Syringe Company, USA
Insulinspritze	BD Bioscience, Heidelberg
Kanülen	BD Bioscience, Heidelberg
Ketavet (Ketamin)	Pfizer Pharmacia, Karlsruhe
Nadelhalter	Aeskulap/ Braun, Melsungen
Nahtmaterial Prolene 3-0	Ethicon, Norderstedt
Pinzette	Aeskulap/Braun, Melsungen
RNAlater	Ambion/ Applied Biosystems, Darmstadt
Skalpell	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Tissue Tec O.C.T.	Miles Inc., Elkhart, USA
Xylazin (Rompun)	Bayer AG, Leverkusen
Assay on Demand	
hCCL5	Applied Biosystems, Darmstadt
Assay ID:	Hs00174575_m1
Probe:	6FAM-TCCAACCCAGCAGTCGTCTTTGTCACCCG
mCcl5	Applied Biosystems, Darmstadt
Assay ID:	Mm01302428_m1
Probe:	6FAM-ATCTTGCAGTCGTGTTTGTCACTCGA
Primer	
<i>Primername</i>	<i>5'- Sequenz-3'</i>
3'-CCL5-Pro. Fw	GCCAATGCTTGGTTGCTATT
5'-CCL5-Pro. Fw	ATCATGTCTGAATTCCCGGG
Bgh pA Rv	TGGTTCTTTCCGCCTCAGAAGC
eGFP Fw	GAACGGCATCAAGGTGAAC
eGFP Rv	GGGTGTTCTGCTGGTAGTGG
HSV-TK Fw	TACCCGAGCCGATGACTTAC
HSV-TK Probe	6FAM-ATCTACACCACACAACACCGCCTCG
HSV-TK Rv	GTTATCTGGGCGCTTGTCAT
HSV-TK/Kpn I Fw	GCCGCAGATCTTGGTACCGGCGTGAAACTCCC
HSV-TK/Not I Rv	GGGCGTATTGCGGCCGCAATGGGGTCTC
pDNA3-Mutagenese Fw	GTAGCGGCGCATTAAAGCTTGGCGGGTGTGGTG
pDNA3-Mutagenese Rv	CACCACACCCGCCAAGCTTAATGCGCCGCTAC
RFP Fw	ACCGTGAAGCTGAAGGTGAC

Materialien

RFP Rv

CTTGGAGCCGTACTGGAACT

Geräte

-80°C Truhe

Heraeus Instruments, Hanau

ABIPrism 7000 Sequence
Detection System

Applied Biosystems, Darmstadt

AxioCamMR

Zeiss, Göttingen

Axioskop 40

Zeiss, Göttingen

Biofuge 15

Heraeus Instruments, Hanau

BioRad Gene Pulser

BioRad, München

Brutschrank BB 6220 CU

Heraeus Instruments, Hanau

E.coli gene Pulser

BioRad, München

Tissue-Tek TEC

Sakura Finetek, Torrance, USA

FACSCalibur

Becton Dickinson, Heidelberg

Gelelektrophoresekammer

MBT Brand, Gießen

Geneamp PCR System 9700 PE

Applied Biosystems, Darmstadt

Histomat 2065/2LZ/di

Bavimed, Birkenau

Inkubator Modell 400

Brutmaschinen Janeschitz, Hammelburg

Jung CM3000 Kryotom

Leica, Cambridge, UK

Leica DM IL

Leica, Cambridge, UK

Leica DM RBE

Leica, Cambridge, UK

Leitz Diavert

Leica, Ismaning

Lumat 9501

Berthold, Bad Wildbad

MagNA Lyser

Roche Diagnostics, Mannheim

Megafuge 1.0R

Heraeus Instruments, Hanau

Micro Zentrifuge 5415D

Eppendorf, Hamburg

Micro Zentrifuge SD

Roth, Karlsruhe

Minifuge T

Heraeus Instruments, Hanau

Mixer Vortex Genie 2

Bender&Hobein, Zürich, Schweiz

Neubauer Zählkammer

Braun, Melsungen

Mikrotom LEICA RM2255

Leica, Cambridge, UK

Objektträger

R. Langenbrinck, Emmendingen

Plate Reader GENiosPlus

Tecan, Crailsheim

QbitTM Fluorometer

Invitrogen, Karlsruhe

Steamer MultiGourmet

Braun, Kronberg

sterilGard Hood

Baker, Sanford Maine

Stromversorgung PowerPac 300

BioRad, München

Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Universal 16 Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
UV Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Waage Mettler P1200N	Mettler, Giessen
Waage Mettler PJ 300	Mettler, Giessen
Wasserbad Haake SWB20	Thermo Haake, Karlsruhe
Software	
ABI Prism 7000 SDS	Applied Biosystems, Darmstadt
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems, San Jose, USA
Adobe Photoshop	Adobe Systems, San Jose, USA
EndNote 2.0	Thomson Reuters, New York, USA
Image Processing and Analysis in Java (ImageJ)	NIH, Maryland, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft, Redmont, USA
PASW Statistics 17.0	SPSS inc., Chicago, USA
Primer 3	Whitehead Institute for Biomedical Research; Cambridge, USA
Prism 4.03.	GraphPad Software, La Jolla, USA
Savvy 0.1	Bioinformatics Organization, Hudson, USA
XFluor	Tecan, Crailsheim

Ergebnisse

MSC fördern das Tumorwachstum und die Metastasierung

Zunächst sollte der Einfluss von MSC auf wachsende Pankreastumore in-vivo untersucht werden. Dazu wurden 2 Wochen nach panc02 Tumorinduktion einer Gruppe von C57BL/6 Mäusen (Stammzellgruppe, n=3) über 3 Wochen einmal wöchentlich 5×10^5 p53^{-/-} MSC über eine Schwanzvene injiziert, während eine weitere Gruppe (Kontrollgruppe, n=5) nach Tumorinduktion keine weiteren Maßnahmen erfuhr. Nach 5 Wochen erfolgte die Opfierung der Tiere mit Bestimmung klinischer Merkmale und Gewebekonservierung.

Bereits bei Eröffnen des Bauchraumes fiel eine deutlich größere Tumorlast der Tiere auf, die über 3 Wochen systemisch p53^{-/-} MSC erhalten hatten. Der Tumor nahm einen Großteil des Bauchraumes ein und führte zur Verdrängung anderer Bauchorgane. Ebenso zeigten die Tumore ein infiltratives Wachstum in das umgebende Gewebe und Organe. So war die Milz im Gegensatz zur Tumorkontrollgruppe als Zeichen der gesteigerten Aggressivität meist direkt mit dem Tumor verbacken und ausgeprägter von Tumormassen durchsetzt. Zudem zeigten sich nach Mobilisation des Tumors und anschließender Inspektion des Bauchraumes etliche gut abgrenzbare Bauchwandmetastasen.

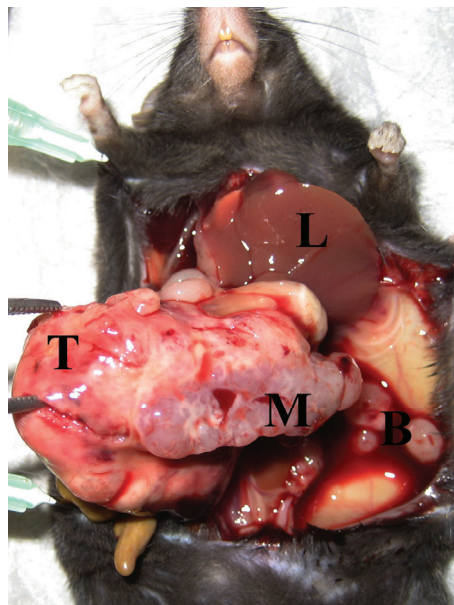


Abbildung 7: Situs nach systemischer MSC-Gabe

Exemplarischer Bauchraum einer panc02-tumortragenden C57BL/6 Maus, die über 3 Wochen einmal wöchentlich 500.000 p53^{-/-} MSC i.v. erhalten hatte. Es zeigte sich eine deutlich gesteigerte Invasivität in Form einer vollkommen mit dem Tumor verbackenen Milz und einigen Bauchwandmetastasen. **T**: Tumor; **M**: Milz; **L**: Leber, **B**: Bauchwandmetastasen

Anschließend wurden die Tumore vollständig freipräpariert und aus dem Bauchraum entnommen. In beiden Gruppen zeigten die Tumore ein knotig derbes Wachstum zum Teil mit zentraler Nekrosezone. Die panc02-Tumore der Stammzellgruppe zeigten jedoch ein deutlich erhöhtes Tumolvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem waren die Tumore mit gelappter Oberfläche unschärfer begrenzt und wiesen kein kugelförmiges Wachstum mit scharfer Abgrenzung wie die Kontrolltumoren auf.

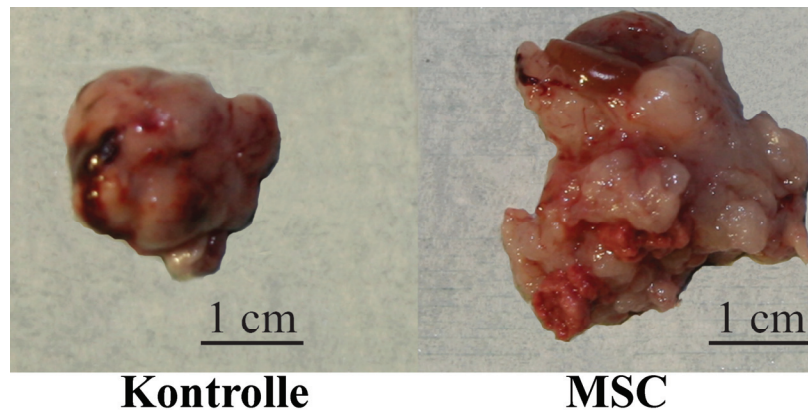


Abbildung 8: panc02-Tumore nach MSC Gabe

2 Wochen nach panc02-Tumorinduktion wurden der Stammzellgruppe über 3 Wochen einmal wöchentlich 500.000 p53^{-/-} MSC intravenös appliziert, wohingegen die Kontrollgruppe keine weitere Behandlung erfuhr. Nach Opferung wurden die Tumore beider Versuchsgruppen vollkommen freipräpariert und entnommen. Es zeigt sich eine deutliche Volumenzunahme der Tumore durch die dreimalige systemische Gabe von MSC gegenüber der unbehandelten panc02-Kontrollgruppe. Dargestellt sind repräsentative Tumore der Kontrollgruppe ($n=5$) und der p53^{-/-} MSC Gruppe ($n=3$).

Zur weiteren Quantifizierung des beschleunigten Wachstums der panc02-Tumore aus der Stammzellgruppe wurden die Tumore beider Versuchsgruppen gewogen. Dabei ergab sich eine durchschnittliche Tumormasse von 2,8g in der Kontrollgruppe. Die Tumore der Stammzellgruppe hingegen wogen im Durchschnitt 6,1g, was einer um Faktor 2,2 erhöhten Tumormasse entsprach ($p<0,003$, Student's t-Test).

Nach Entfernen der Tumore wurden die Organe des Bauchraumes durch Inspektion und Palpation auf Metastasen hin untersucht. Auf diese Weise konnten jedoch nur Makrometastasen detektiert werden, eine unter diesem Level liegende Metastasierung im Sinne von Mikrometastasen wurde so nicht erfasst. Die bevorzugten Metastasierungsstationen in dem gewählten Pankreaskarzinom-Modell waren in erster Linie die Milz und Leber. In der Kontrollgruppe lagen in diesen Organen zu einem hohen Prozentsatz Filiae vor.

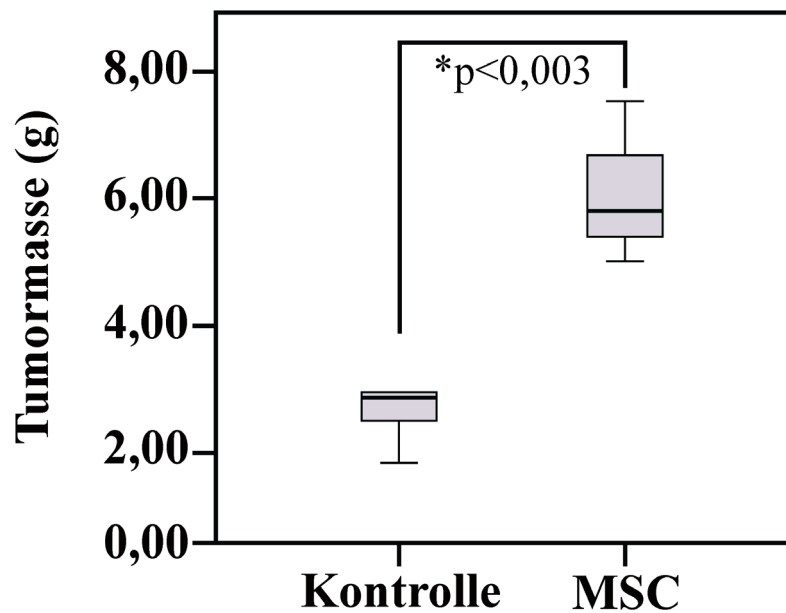


Abbildung 9: Effekt von MSC auf die Tumormasse

Panc02-tumortragenden syngenischen Mäusen wurden für 3 Wochen einmal pro Woche 500.000 p53^{-/-} MSC intravenös verabreicht. Nach Opfung der Tiere wurden die Tumore in toto entfernt und gewogen. Die mesenchymalen Stammzellen ($n=3$) führten zu einer Verdopplung der Tumormasse (6,1g in der Stammzellgruppe gegenüber 2,8g in der Kontrollgruppe) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($n=5$). $p < 0,003$ Student's t-test. MSC scheinen somit zur Tumorprogression beizutragen.

Jedes Tier der Stammzellgruppe zeigte eine Metastasierung in diese beiden Organe. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe jedoch war die lokale Aggressivität, wie bereits bei erster Inspektion des Situs aufgefallen, deutlich erhöht. So lagen ebenfalls in allen Tieren, die p53^{-/-} MSC erhalten hatten, peritoneale Metastasen im Sinne einer Peritonealkarzinose vor ($p=0,018$; Fisher's Exact Test).

	Gruppe		p
	Kontrolle n=5	MSC n=3	
Metastasen	Metastasen	Metastasen	
Milz	5 (100%)	3 (100%)	n.s.
Leber	3 (60%)	3 (100%)	n.s.
Peritoneum	0 (0%)	3 (100%)	0,018*

Tabelle 1: Auswirkung i.v. applizierter MSC auf das Metastasierungsverhalten

Die Bauchraumorgane wurden mittels Inspektion und Palpation auf das Vorliegen von Makrometastasen hin untersucht. Es zeigte sich eine gesteigerte lokale Invasivität durch die i.v. injizierten p53^{-/-} MSC. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Fisher's Exact Tests.

Histologisch zeigten beide Gruppen in der HE Färbung das gleiche Bild eines schlecht differenzierten pankreatischen Adenokarzinoms. Zentral kamen in den Tumoren Nekrosezonen zur Darstellung. In der Stammzellgruppe zeigte sich ein gleiches Tumorzell-Stromazellverhältnis, sodass die beobachteten Wachstumszuwächse wahrscheinlich nicht durch die Vermehrung der Stammzellen zustande kamen, sondern durch proliferationsfördernde parakrine Effekte der Stammzellen auf die Tumorzellen.

Durch die intravenöse Applikation von syngenem $p53^{-/-}$ MSC in panc02-tumortragende C57BL/6 Mäuse kam es zu einer deutlichen Volumen- und Massenzunahme der Tumore. Außerdem zeigten die panc02-Tumore in der Stammzellgruppe eine erhöhte Metastasierungsneigung und eine gesteigerte lokale Aggressivität. Diese Effekte deuten auf eine Rekrutierung der Stammzellen durch die panc02 Tumore hin, wodurch eine tumorfördernde Wirkung durch die MSC hervorgerufen wurde.

MSC als Quelle einer gesteigerten Ccl5 Expression im Tumormilieu

Von Karnoub et al. wurde gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen innerhalb des Tumorstromas von Mammakarzinomen durch de-novo Sekretion des CC-Chemokins CCL5 die Motilität, Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen erhöhen (Karnoub, Dash et al. 2007). Da durch Applikation von MSC in panc02-tumortragende Mäuse ebenfalls ein aggressiveres Tumorstromawachstum und eine erhöhte Metastasierungsrate beobachtet werden konnte, wurde die Ccl5 Expression auf mRNA-Ebene untersucht, um eine mögliche Beteiligung von Ccl5 an der gesteigerten Aggressivität der Tumore aufzuklären.

Dazu wurde die Ccl5 Expression in normalen murinen Pankreata, in panc02-Tumoren (5 Wochen nach Tumorinduktion) und in panc02-Tumoren von Tieren, die beginnend 2 Wochen nach Tumorinduktion über 3 Wochen einmal wöchentlich 5×10^5 MSC i.v. erhalten hatten, mittels qRT-PCR unter Nutzung eines Ccl5 spezifischen Assays bestimmt. Hierbei zeigte sich eine circa 30-fach erhöhte Ccl5 Expression im Tumorgewebe gegenüber normalem Pankreasgewebe, was auf eine deutliche Hochregulation von Ccl5 im Tumormilieu hindeutet ($p < 0,01$, Mann-Whitney-U Test). Die systemische Applikation von mesenchymalen Stammzellen führte zu einer nochmals 3-fach erhöhten Ccl5 Expression gegenüber obigen panc02-Tumoren ($p < 0,05$, Mann-Whitney-U Test). Die Stammzellgabe induzierte folglich im Tumorgewebe eine gesteigerte Ccl5 Expression, wobei jedoch die Zellpopulation, die eine erhöhte Ccl5 Expression aufwies, methodenbedingt nicht identifiziert werden konnte.

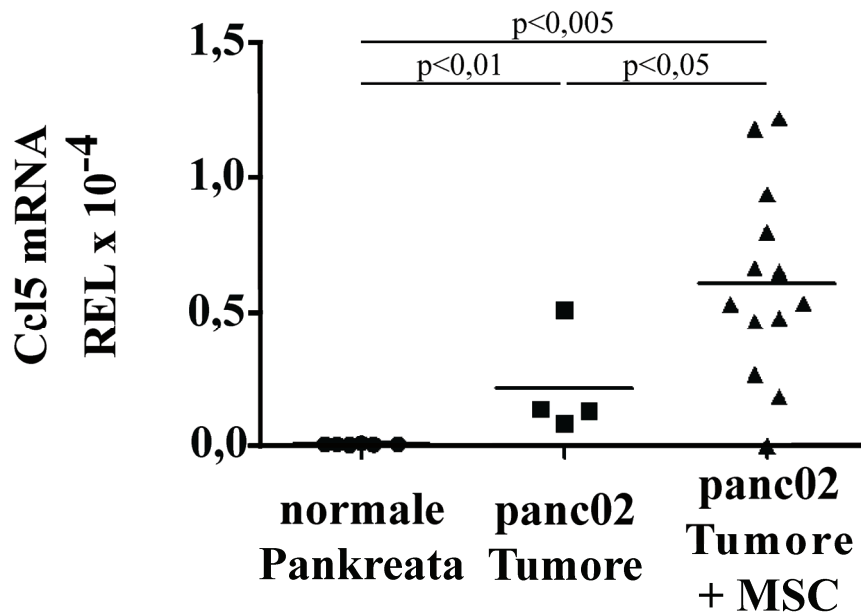


Abbildung 10: Ccl5 mRNA-Level in murinen Pankreasgeweben

Zur Bestimmung der Ccl5-Expression in verschiedenen Pankreas-Gewebearten auf mRNA Ebene wurden normale Pankreata ($n=6$), panc02-Tumore ($n=4$) und panc02-Tumore ($n=14$) aus Tieren, die über 3 Wochen einmal wöchentlich 500.000 p53^{-/-} Reporter-MSK systemisch erhalten hatten, mittels qRT-PCR untersucht. Hierbei zeigte sich zum einen eine um Faktor 30 erhöhte Ccl5-Expression im panc02-Tumorgewebe gegenüber normalem Pankreasgewebe. Die Rekrutierung von MSC in das tumorassoziierte Stroma führte nochmals zur einer dreifachen Erhöhung des Ccl5-Expressionsniveaus gegenüber panc02-Tumoren ohne systemische Stammzellgabe. Normalisierung gegen 18S-rRNA. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Mann-Whitney-U Tests. **REL**: Relative Expression Level

Um die Frage zu klären, ob die injizierten und in die Tumore rekrutierten mesenchymalen Stammzellen lediglich eine Ccl5 Produktion in den Tumorzellen und stromalen Zelltypen hervorrufen oder ob sie selbst als Quelle der Ccl5 Expression in Frage kommen, wurden p53^{-/-} MSC in-vitro auf Ccl5 Expression hin mittels qRT-PCR auf mRNA Ebene untersucht. Dazu wurden p53^{-/-} MSC mit verschiedenen Konzentrationen an rhTNF α für 36h stimuliert oder als Kontrolle in normalem Kulturmedium kultiviert. TNF α ist über seinen Signaltransduktionsweg ein bekannter Aktivator des CCL5-Promoters. Außerdem ist TNF α in einer Vielzahl von Tumoren hochreguliert und stellt damit einen der Faktoren im Tumormilieu des Pankreaskarzinoms dar (Farrow, Duell). Es zeigte sich eine bis zu 7-fache Hochregulation von Ccl5 in einer dosisabhängigen Art und Weise in den Konzentrationen von 1 ng/ml bis 15 ng/ml rhTNF α gegenüber der Mediumkontrolle. MSC zeigen somit eine Regulation des Ccl5-Promoters und kommen als Quelle der gesteigerten Ccl5 Expression in-vivo in Betracht.

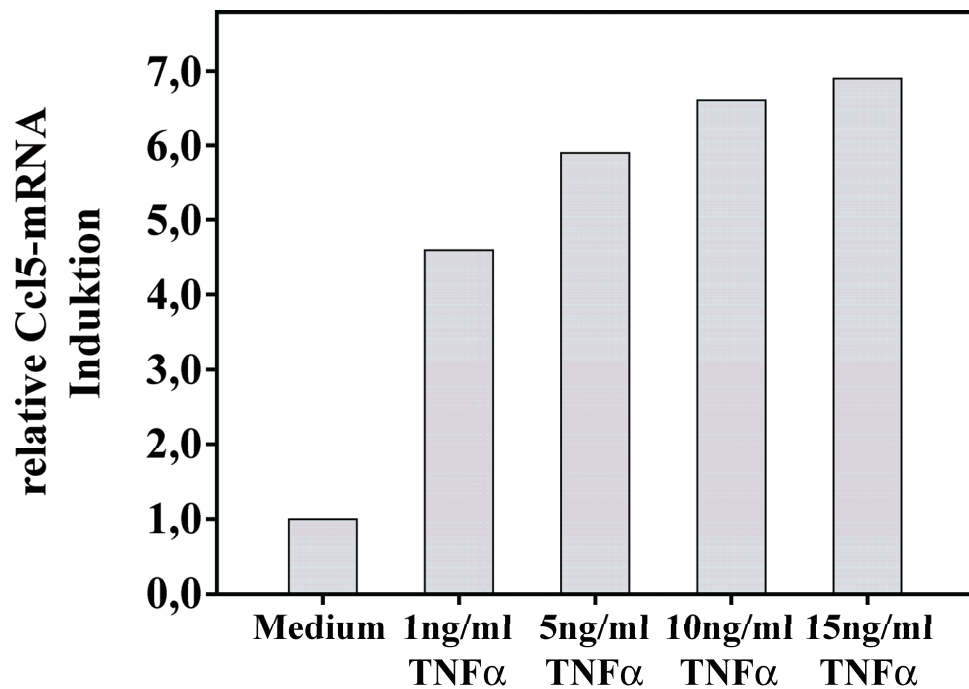


Abbildung 11: p53^{-/-} MSC exprimieren bei TNFα-Stimulation Ccl5

Zur Klärung der Frage, ob mesenchymale Stammzellen im Tumormilieu lediglich die Tumorzellen zur Ccl5 Sekretion anregen oder aber selbst zur Ccl5 Expression beitragen, wurden p53^{-/-} MSC für 36h mit aufsteigenden Konzentrationen an rhTNFα, einem klassischen Zytokin des Tumorstromas stimuliert. TNFα ist über seinen Signaltransduktionsweg ein Aktivator des CCL5-Promoters. Die TNFα Stimulation der mesenchymalen Stammzellen führte zu einer dosisabhängigen Expressionssteigerung von Ccl5. MSC sind somit in der Lage auf entsprechende Stimuli mit einer Expression von Ccl5 zu reagieren und können aktiv zur gesteigerten Ccl5-Expression im Tumorgewebe beitragen. Normalisierung gegen 18S-rRNA.

Klonierung von CCL5-Promoter Reportergenzelllinien

Die bisherigen in-vivo Ergebnisse gaben erste Hinweise darauf, dass MSC zur einer induzierten Ccl5 Expression im Tumorgewebe beitragen. In-vitro konnte durch Stimulation mit rhTNFα gezeigt werden, dass MSC selbst zur Expression von Ccl5 angeregt werden können und damit eine mögliche Ccl5 Quelle darstellen. Um diese Indizien zu erhärten, wurden CCL5-Promoter/Reportergenkonstrukte kloniert, die nach Transfektion in MSC es ermöglichten, die Aktivierung des CCL5-Promoters direkt zu verfolgen und die Gewebespezifität dieser Aktivierung in-vivo zu bestimmen.

Als Reportergene wurden die kodierenden Sequenzen des rot fluoreszierenden Proteins dsRed2 (678bp) und des grün fluoreszierenden Proteins eGFP (720bp) verwendet. Diese Proteine fluoreszieren bei Anregung mit Licht der entsprechenden Exzitationswellenlängen und lassen sich somit in der Zellkultur oder anhand von Gefrierschnitten in der

Fluoreszenzmikroskopie direkt nachweisen. Bei Verwendung von Paraffinschnitten ist der immunhistochemische Nachweis ebenfalls möglich. Um störende Hintergrundfluoreszenz des Gewebes und Stabilitätsunterschiede der fluoreszierenden Proteine zu berücksichtigen wurden beide Proteine im in-vivo Versuch in getrennten Versuchsgruppen eingesetzt. Diese Reportergene standen in den klonierten Vektoren unter CCL5-Promoter Kontrolle, um einen Rückschluss auf dessen Regulation zuzulassen. Bei Aktivierung des Promoters kommt es zu einer vermehrten Expression der Reportergene, womit die Hochregulation des Promotors sichtbar gemacht werden kann. Als Promotersequenz wurden -972bp der upstream region und die gesamte 5'-untranslatierte Region (1006bp) der humanen CCL5 Sequenz verwendet. Um eine sichere Transkription und eine Stabilisierung der entsprechenden mRNA zu erreichen wurde nach dem 3'-Ende der Reportergene eine Bgh pA-Sequenz (232bp) eingefügt. Diese CCL5-Promoter/Reportergen/Bgh-Polyadenylierungs -Konstrukte wurden in den pCMV/Bsd Vektor kloniert. In diesem liegt ein vom CMV-Promoter getriebenes Blasticidin-Resistenzgen vor, welches eine schnelle und zuverlässige Selektion erfolgreich transfizierter Zellen zulässt.

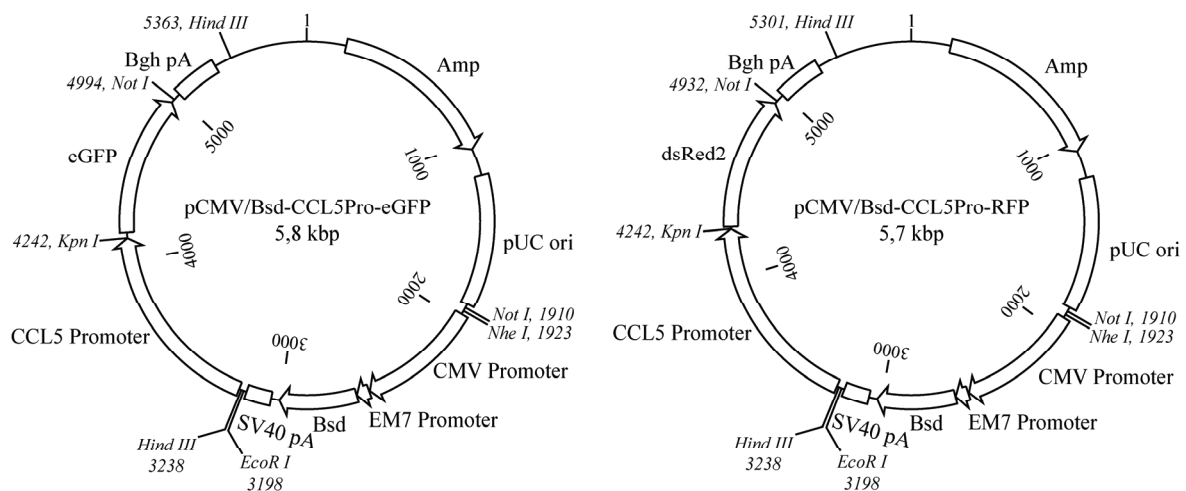


Abbildung 12: Die Reportergenkonstrukte pCMV/Bsd-CCL5Pro-eGFP und pCMV/Bsd-CCL5Pro-RFP

Dargestellt sind die beiden Reportergenkonstrukte, die dem direkten Nachweis der CCL5-Promoter Aktivierung dienen sollen. Der konstitutiven Expression des Blasticidin-Resistenzgens (Bsd) dient der starke CMV-Promoter, sodass eine zuverlässige Selektion erfolgreich transfizierter Zellklone durch Zugabe von Blasticidin zum Kulturmedium erfolgen kann. Der CCL5-Promoter reguliert die Expression der grün bzw. rot fluoreszierenden Reportergenprodukte, sodass von deren Expression auf die Aktivität des Promoters rückgeschlossen werden kann. Zur sicheren Transkription und zur Stabilisierung der mRNA folgt dem Reportergen die Bgh pA-Sequenz. Die Abbildungen sind maßstabsgetreu mit Darstellung sämtlicher regulatorischer und kodierender Sequenzen.

Nach Kontrolle der klonierten Plasmide pCMV/Bsd-CCL5Pro-RFP (5,7kbp) und pCMV/Bsd-CCL5Pro-eGFP (5,8kbp) durch gezielte Restriktionsverdau und Sequenzierung wurden p53^{-/-} MSC mittels Elektroporation mit diesen Plasmiden transfiziert. Dem Kulturmedium wurde Blasticidin als Selektionsmedium in der Konzentration 5µg/ml zugesetzt. Auf diese Weise wuchsen innerhalb einiger Tage einzelne Kolonien erfolgreich transfizierter Zellen auf den Zellkulturplatten heran. Die so erhaltenen, das Blasticidin-Resistenzgen exprimierenden Zellen wurden zum einen als Einzelklone weiter kultiviert und zum anderen als gepoolte Population in Kultur gehalten.

Um die erfolgreiche Integration der CCL5-Promoter/Reporterigen Sequenzen und nicht nur der Resistenzgenesequenz in das zelluläre Genom vor einem in-vivo Versuch nachzuweisen, wurde das Promoter-Leakage des CCL5-Promoters genutzt. Jedes regulatorische Element hat eine gewisse Hintergrundaktivität, die ohne Stimulation vorhanden ist. Da die transfizierten Reportergene im normalen Mausgenom nicht vorhanden sind, ist jede messbare, wenn auch geringe Expression auf die erfolgreiche Transfektion der Konstrukte zurückzuführen. Dazu wurden die erhaltenen Zellpopulationen mittels RT-PCR qualitativ und qRT-PCR semi-quantitativ auf mRNA-Ebene, mittels Fluoreszenzmikroskopie qualitativ auf Proteinebene untersucht. Dabei zeigte sich eine Expression der Reportergene dsRed2 und eGFP im unstimulierten Zustand gegenüber nativen MSC in der RT-PCR. In der qRT-PCR konnten die Expressionsunterschiede anschließend quantifiziert werden. Die Produktion der korrespondierenden Proteine konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden.

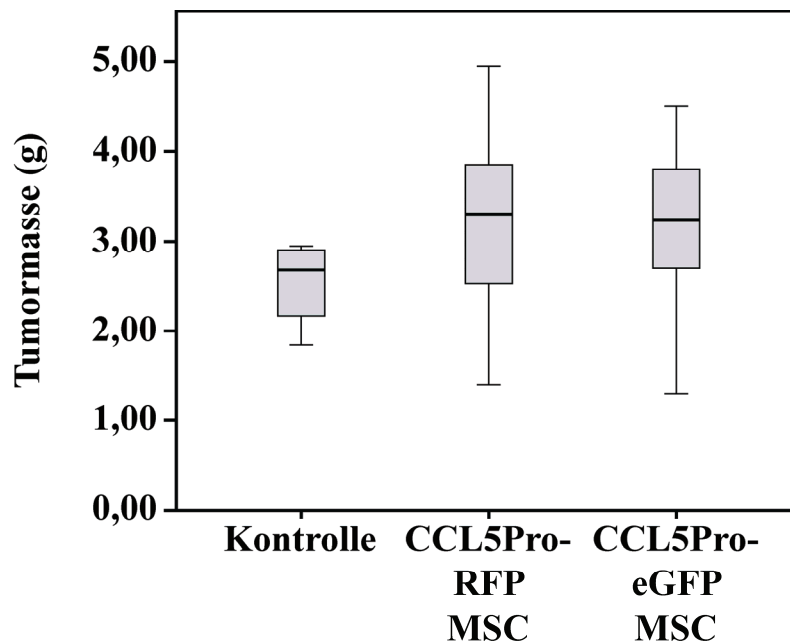
Stromale Aktivierung des CCL5-Promoters in MSC in-vivo

Durch Injektion der CCL5Pro-Reporterigen Stammzelllinien in panc02-tumortragende Mäuse sollte die Aktivierung des CCL5-Promoters in den MSC untersucht werden. Das Hauptaugenmerk lag auf dem potentiellen Tropismus der Zellen in das stromale Kompartiment des Pankreaskarzinoms und der CCL5-Promoteraktivierung innerhalb der MSC im Tumorgewebe. Durch die Untersuchung verschiedener Organe sollte die Spezifität des CCL5-Promoters evaluiert werden.

Dazu wurden 2 Wochen nach orthotoper Tumorinduktion durch subkapsuläre Injektion von 150.000 panc02 Zellen in das Pankreas einer Gruppe von C57BL/6 Mäusen (RFP-Gruppe, n=9) über 3 Wochen einmal wöchentlich 5×10^5 syngene p53^{-/-}-CCL5Pro-RFP MSC und einer weiteren Gruppe (eGFP-Gruppe, n=6) über 3 Wochen einmal wöchentlich 5×10^5 syngene p53^{-/-}-CCL5Pro-eGFP MSC über eine Schwanzvene injiziert, während eine weitere Gruppe (Kontrollgruppe, n=5) nach Tumorinduktion keine weiteren Maßnahmen erfuhr. Nach

5 Wochen erfolgte die Opfierung der Tiere mit Bestimmung klinischer Merkmale und Gewebekonservierung für weitere Untersuchungen.

Die Inspektion des Situs zeigte ähnliche Befunde wie in der bereits beschriebenen p53^{-/-}-Stammzellgrupp. Die intravenöse Applikation der Reportergergenstammzellen ließ in den jeweiligen Gruppen einen Trend zur Erhöhung der Tumormassen erkennen, der hier jedoch keine Signifikanz erreichte.



**Abbildung 13: Trend zur Erhöhung der Tumormasse durch i.v. Gabe von Reportergergen-
MSC**

Ein tumorfördernder Effekt konnte bereits mit nativen MSC gezeigt werden. Die wöchentliche intravenöse Gabe von 500.000 Reportergergen-MSC über 3 Wochen ließ einen Trend in dieselbe Richtung gegenüber panc02-Kontrolltumoren erkennen. Kontrolle ($n=5$), CCL5Pro-RFP ($n=9$), CCL5Pro-eGFP ($n=6$). Es konnte in diesem Fall jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden, Student's t-test.

Nachdem die Tumore aus dem Bauchraum entfernt worden waren, wurden die Bauchraumorgane nach Makrometastasen abgesucht. Dabei konnten vermehrt Metastasen im Peritoneum gefunden werden. Damit konnte auch in diesem Versuch die tumorfördernde, proinfiltrative und prometastatische Wirkung von MSC bestätigt werden.

	Gruppe				
	Kontrolle n=5 Metastasen	CCL5Pro-RFP MSC n=9 Metastasen	p	CCL5Pro-eGFP MSC n=6 Metastasen	p
Metastasen					
Milz	5 (100%)	8 (89%)	n.s.	6 (100%)	n.s.
Leber	3 (60%)	4 (44%)	n.s.	2 (33%)	n.s.
Peritoneum	0 (0%)	7 (78%)	0,021*	4 (67%)	0,06

Tabelle 2: Auswirkung i.v. applizierter Reporter-gen-MSK auf das Metastasierungsverhalten:

Nach Opfung der Versuchstiere wurden die Bauchraumorgane mittels Inspektion und Palpation auf das Vorliegen von Makrometastasen hin untersucht. Es zeigte sich eine gesteigerte lokale Invasivität im Sinne einer Peritonealkarzinose durch die dreimalige intravenöse Gabe von 500.000 Reporter-gen-MSK. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Fisher's Exact Tests.

Um die Aktivierung des CCL5-Promoters in den MSC nach Migration in das Tumorgewebe nachzuweisen, wurden Gefrierschnitte von Tumoren der Kontrollgruppe und der RFP- und eGFP- Reporter-gen-Gruppen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

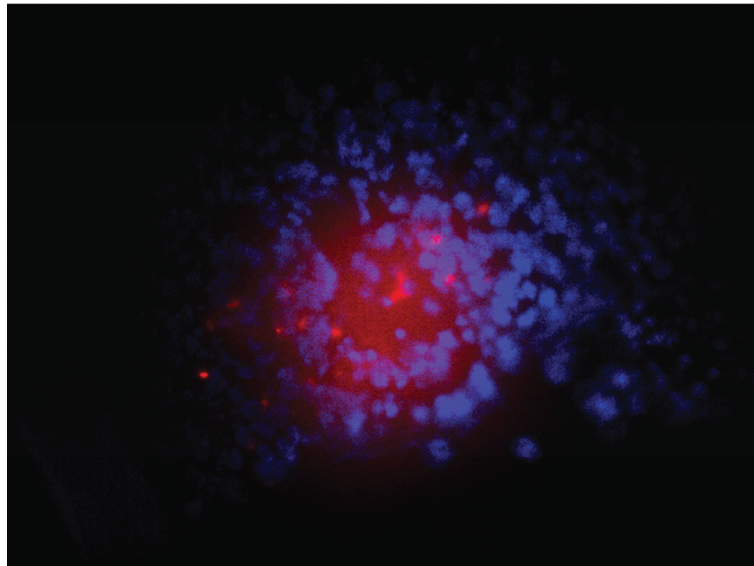
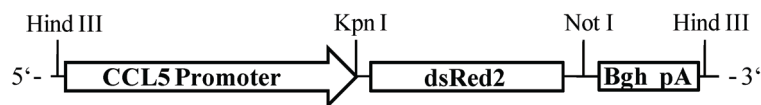


Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines panc02-Tumors nach systemischer Gabe von CCL5Pro-RFP MSC

Gefrierschnitte der panc02-Tumore aus der CCL5Pro-RFP Tiergruppe wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es zeigten sich im Tumorgewebe spezifische rote Reporter-gen-fluoreszenzmuster, welche für eine Migration der MSC in die Tumore mit konsekutiver Aktivierung des CCL5-Promoters in den Stammzellen sprechen. Die Signale waren im Kontrollgewebe nicht nachweisbar, die panc02-Tumore zeigten somit keinen störenden Fluoreszenzhintergrund. Die Zellkerne stellen sich mittels DAPI-Färbung blau dar.

Es konnte in der Kontrollgruppe sowohl für eGFP als auch für RFP keine Hintergrundfluoreszenz nachgewiesen werden, sodass man bei Signalen in den Reportergruppen davon ausgehen konnte, dass es sich hierbei um spezifische, vom CCL5-Promoter getriebene Signale durch die MSC handelte. Bei der mikroskopischen Untersuchung der Tumore der RFP-Gruppe zeigten sich etliche rot fluoreszierende Zellen in kleinen Zellnestern über das Tumorgewebe hinweg verteilt.

Aufgrund der unterschiedlichen Stabilität der Reporterprodukte wurden zur besseren Aussagekraft auch Gefrierschnitte der Tumore aus der CCL5Pro-eGFP Gruppe mit direkter Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei bestätigte sich das Bild, es waren ausgeprägte Fluoreszenzsignale, die eine deutlich höhere Intensität als in der CCL5Pro-RFP Gruppe zeigten, im Tumorgewebe detektierbar.

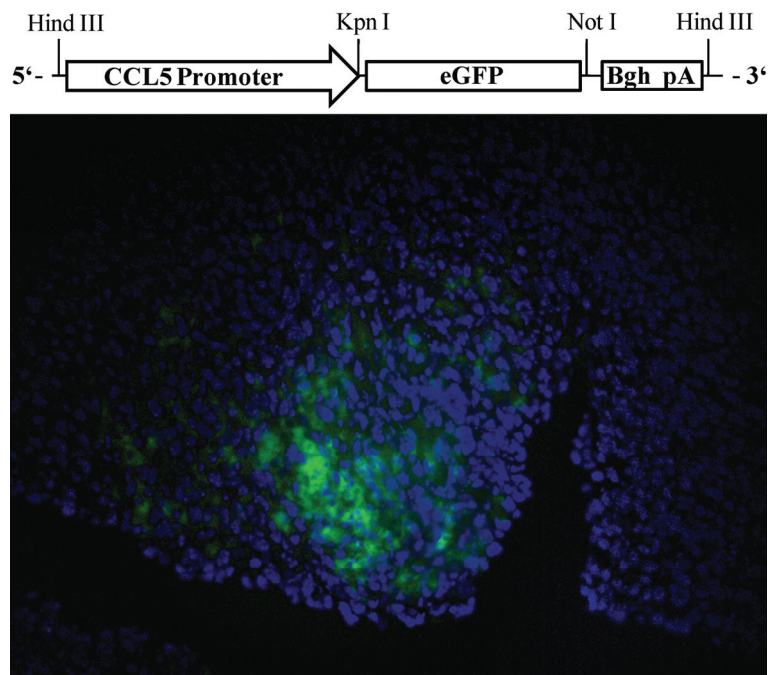


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines panc02-Tumors nach systemischer Gabe von CCL5Pro-eGFP MSC

Aufgrund der unterschiedlichen Stabilität der Reporterprodukte wurden ebenfalls Gefrierschnitte von panc02-Tumoren der CCL5Pro-eGFP Tiergruppe direkt nach der Tieropferung fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es zeigte sich eine deutlich kräftigere Fluoreszenz des enhanced green fluorescent proteins (eGFP). Das Fluoreszenzmuster hingegen war deckungsgleich mit der CCL5Pro-RFP Tiergruppe, sodass einstimmig von einer CCL5-Promoter Aktivierung in MSC, die in die Tumore migriert waren, ausgegangen werden kann. Die Tumore zeigten ebenfalls keine störende Hintergrundfluoreszenz. Die Zellkerne stellen sich in der Fluoreszenz aufgrund DAPI-Markierung blau dar.

Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der Reporterproteine bestätigte eine Migration von systemisch applizierten MSC in die experimentellen panc02-Tumore mit konsekutiver CCL5-Promoter Aktivierung. Um eine bessere Darstellung der Tumormorphologie und der Verteilung der MSC innerhalb der Tumore zu erhalten, wurde das rot fluoreszierende Protein in den Tumoren der RFP-Gruppe immunhistochemisch mittels eines polyklonalen Anti-RFP Antikörper nachgewiesen. Hierbei kamen regelrechte Zellnester vorwiegend im stromalen Kompartiment, welches zwischen den vitalen Arealen des Adenokarzinoms eingelagert ist, der panc02-Tumoren zur Darstellung. In den knotigen panc02 Wucherungen waren nur sehr spärlich RFP-exprimierende Zellen nachweisbar. Diese Ergebnisse sprechen für eine stromale Aktivierung des CCL5-Promoters im Rahmen des Ausdifferenzierungsprozesses innerhalb des Tumorstromas.

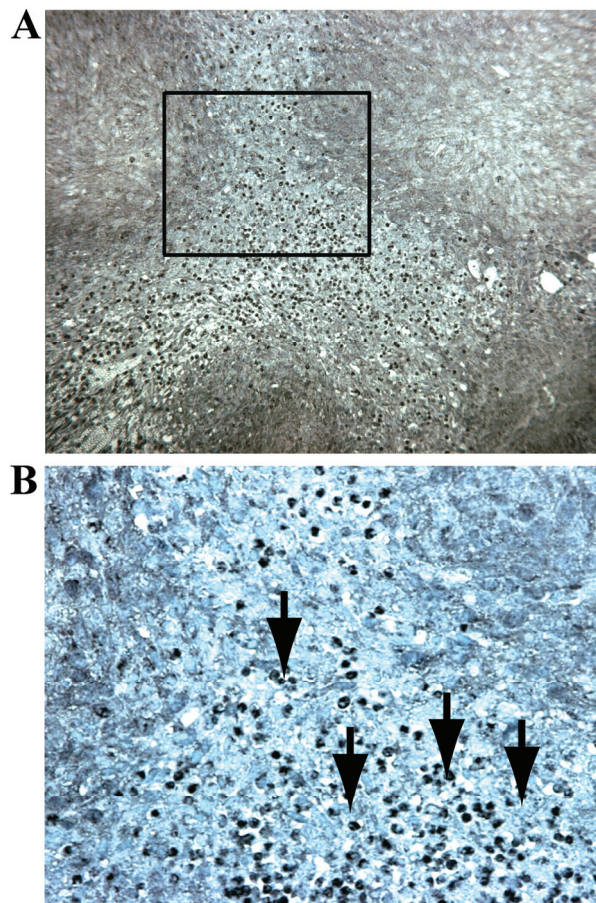


Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von RFP

Zur besseren morphologischen Darstellung des Verteilungsmusters der MSC, die den CCL5-Promoter aktiviert haben, wurde das red fluorescent protein (RFP) mittels eines polyklonalen RFP-Antikörpers nachgewiesen. Es stellen sich spezifisch im tumorassoziierten Stroma Zellnester von RFP-exprimierenden Zellen, hier dunkel angefärbt, dar. Pfeile: RFP positive Zellen (A) 100x Vergrößerung (B) 250x Vergrößerung des in A gekennzeichneten Bezirkes

Um die Frage zu klären, inwiefern die Aktivierung des CCL5-Promoters in den mesenchymalen Stammzellen spezifisch für das Tumorstroma ist, wurden ebenfalls andere Organe immunhistochemisch auf Reporterexpression hin untersucht. Dazu wurden Paraffinschnitte von Thymus, Leber und Milz gefärbt. In Thymus und Leber kam es zu keinem Nachweis von RFP, sodass entweder keine MSC in diese Organe wanderten oder aber diese migrierten Zellen keine Aktivierung des CCL5-Promoters zeigten. In der Milz hingegen waren in der roten Pulpa RFP-positive Zellen nachweisbar. Die Stimulation des CCL5-Promoters in MSC scheint mit Ausnahme der Milz spezifisch für das Tumorstroma zu sein.

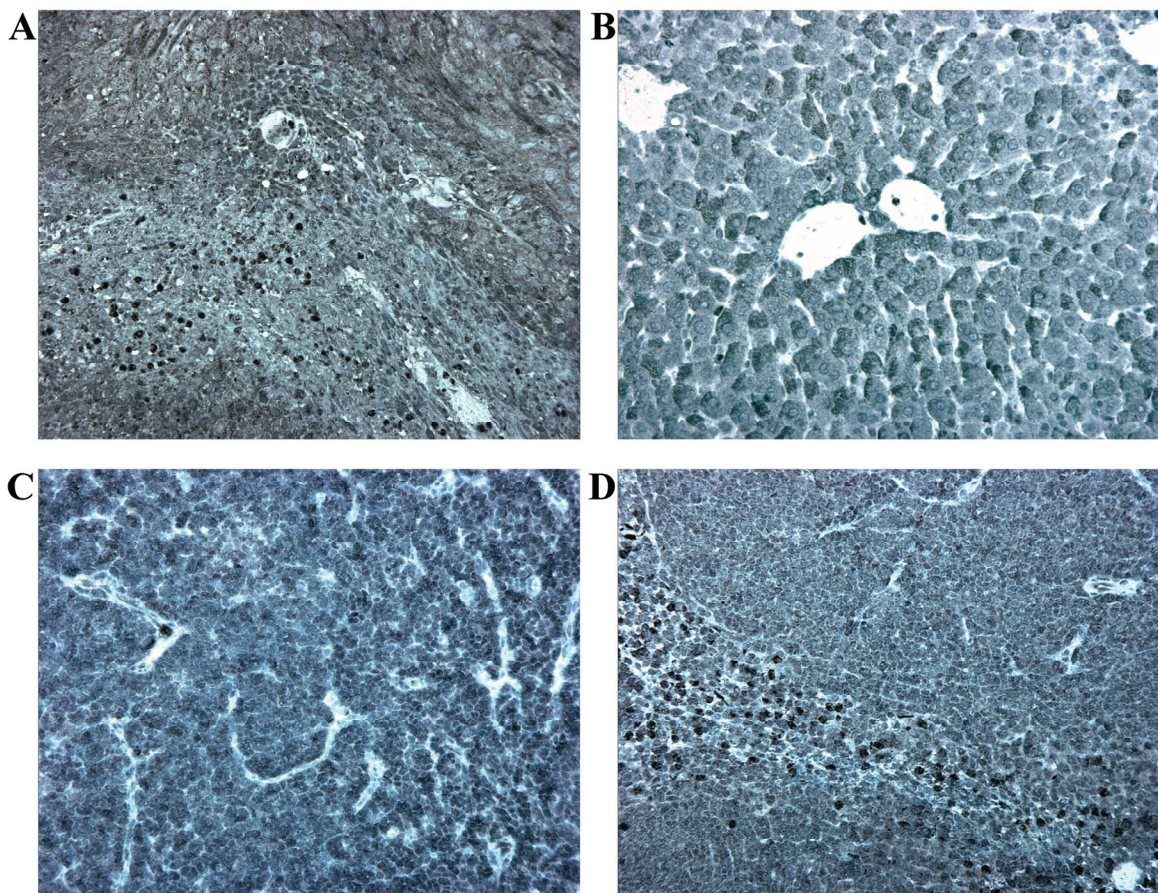


Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis RFP-exprimierender Zellen in verschiedenen Organen

Zum Nachweis der tumorspezifischen CCL5-Promoteraktivierung wurden verschiedene Organe mittels eines polyklonalen RFP-Antikörpers untersucht. RFP-exprimierende Zellen sind dunkel dargestellt. Dargestellt ist die 100x Vergrößerung.

- | | |
|-------------------------|---|
| (A) panc02-Tumorgewebe: | RFP-Nachweis im Tumorstroma |
| (B) Leber: | Keine Darstellung RFP-exprimierender Zellen |
| (C) Thymus: | Keine Darstellung RFP-exprimierender Zellen |
| (D) Milz: | RFP-Nachweis in der roten Pulpa |

Exogen applizierte mesenchymale Stammzellen zeigen einen ausgeprägten Tropismus in murine panc02-Tumore. Dabei kommt es zu einer Integration der Stammzellen in das tumorassoziierte Stroma, wodurch eine Förderung des Tumorwachstums und der Metastasierung resultiert. Im Rahmen des im Stroma induzierten Ausdifferenzierungsprozesses wird der CCL5-Promoter in den MSC aktiviert. Diese Aktivierung ist mit Ausnahme der Milz spezifisch für die Stammzellen innerhalb des Tumorgewebes.

Klonierung einer CCL5-Promoter/HSV-TK Suizidgenzelllinie

Therapiestrategien in der Malignomtherapie zielen auf eine möglichst lokale Bekämpfung der Tumormassen mit minimalen systemischen Wirkungen ab. Der ausgeprägte Tropismus der mesenchymalen Stammzellen und die zusätzliche, hoch spezifische Aktivierung des CCL5-Promoters in den migrierten Stammzellen bieten zwei Mechanismen an, die zu einer Erhöhung der Selektivität einer stammzellbasierten Therapie führen. Dazu wurde analog zu den Reporter-genkonstrukten das Gen der Herpes Simplex Thymidinkinase (1131bp, HSV-TK) als Suizidgen unter die Kontrolle des CCL5-Promoters (1006bp) kloniert.

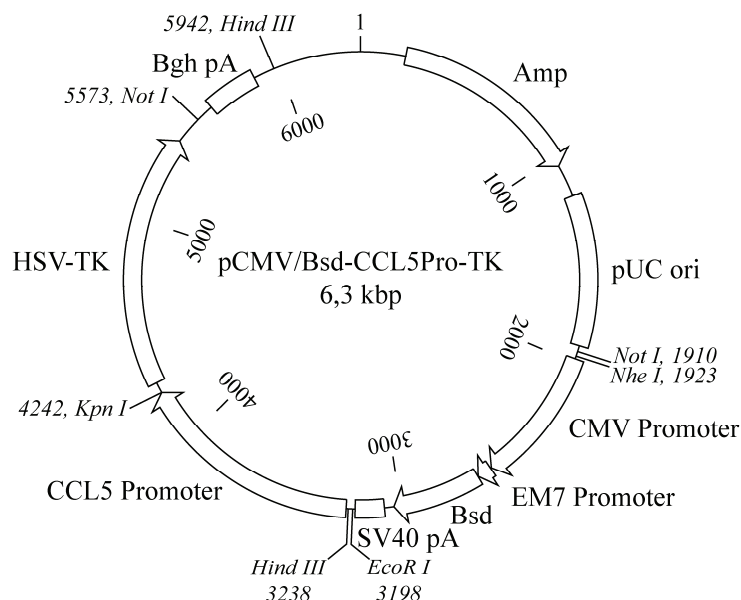


Abbildung 18: Das therapeutische Genkonstrukt pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK

Der CCL5-Promoter reguliert das Suizidgen HSV-TK, sodass es bei Aktivierung des CCL5-Promoters zur TK-Expression kommt. Ebenso wie in den Reporter-genkonstrukten wird das Blasticidin-Resistenzgen (Bsd) vom konstitutiven CMV-Promoter reguliert, was eine zuverlässige Selektion erfolgreich transfizierter Zellklone durch Zugabe von Blasticidin zum Kulturmedium erlaubt. Zur Sicherung der Transskription und der mRNA-Stabilisierung folgt der HSV-TK eine Bgh pA-Sequenz. Die Abbildung ist maßstabsgetreu mit Darstellung sämtlicher regulatorischer und kodierender Sequenzen.

Die HSV-TK kodiert für eine virale Thymidinkinase, die in der Lage ist die inaktive Prodrug Ganciclovir, ein Guanosinanalogen, in die einfach phosphorylierte Form zu überführen. In konsekutiven Phosphorylierungsschritten durch zelluläre Kinasen entsteht Ganciclovir-Triphosphat, welches zu einem toxischen Milieu sowohl für TK⁺ Zellen als auch aufgrund des sogenannten Bystander-Effektes für umgebende TK⁻ Zellen führt.

Nach Kontrolle des klonierten Plasmids pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK (6,3kbp) durch gezielte Restriktionsverdau und Sequenzierung wurden p53^{-/-} MSC mittels Elektroporation mit diesem Plasmid transfiziert.

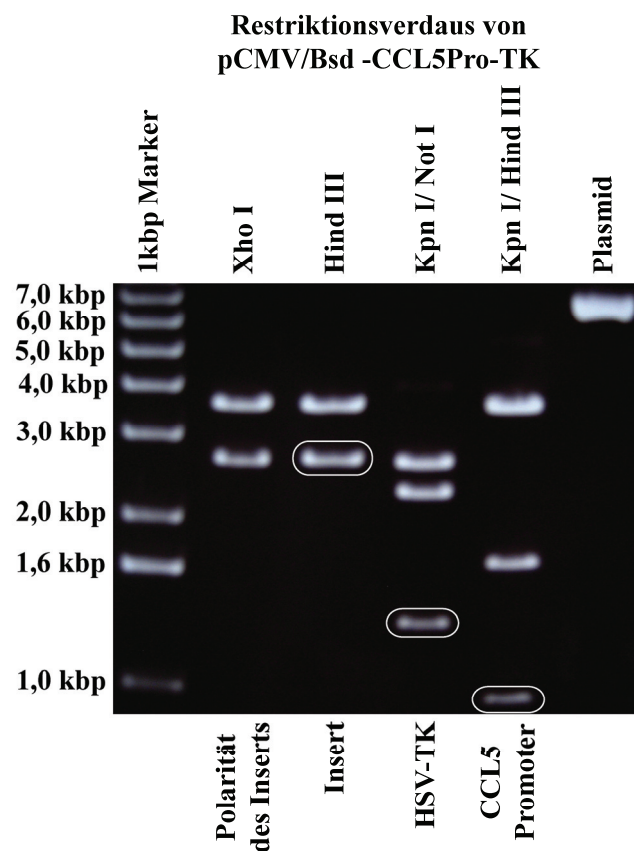


Abbildung 19: Restriktionsverdau des pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK Konstruktes

Durch gezielte Restriktionsverdau sollten die korrekte Ausrichtung der CCL5Pro-TK Sequenz und die einzelnen regulatorischen bzw. kodierenden Sequenzen dargestellt werden. Durch **Xho I** Verdau konnte die korrekte Polarität des CCL5Pro-TK-Bgh pA Inserts nach ungerichteter Ligation in die Hind III Restriktionsschnittstelle ermittelt werden (3,6kbp und 2,7kbp). Mittels **Hind III** Verdau kam das pCMV/Bsd Grundgerüst (3,6kbp) und das Insert (2,7kbp) zur Darstellung, mittels **Kpn I und Not I** Verdau das Gen der HSV-TK (1,4kbp, aufgrund flankierender Sequenzen) und 2 weitere Fragmente (2,3kbp und 2,6kbp). Der **Kpn I und Hind III** Verdau deckte den CCL5-Promoter (1kbp) und das pCMV/Bsd Grundgerüst (3,6kbp) auf, zudem ein Fragment aus der HSV-TK und der Bgh pA (1,7kbp). Die letzte Spur zeigt als Kontrolle das unverdaute Plasmid (6,3kbp). Umkreiste Banden werden am unteren Bildrand benannt.

Dem Kulturmedium wurde Blasticidin als Selektionsmedium in der Konzentration 5 µg/ml zugesetzt. Auf diese Weise wuchsen innerhalb einiger Tage einzelne Kolonien erfolgreich transfizierter Zellen auf den Zellkulturplatten heran. Die so erhaltenen, das Blasticidin-Resistenzgen exprimierenden Zellen wurden zum einen als Einzelklone weiter kultiviert und zum anderen als gepoolte Population in Kultur gehalten.

Die so erhaltenen Zellpopulationen wurden anschließend auf die Expression der HSV-TK hin untersucht. Dabei wurde das Promoter-Leakage des CCL5-Promoters ausgenutzt, der zu einem geringen Grad auch im nicht stimulierten Zustand aktiv ist. Mittels RT-PCR konnte ein ca. 1,4 kbp langes Fragment, das neben der 1,1 kbp langen HSV-TK 0,3 kbp umgebende nicht kodierende Sequenz beinhaltet, aus der gesamten cDNA transfizierter und Bsd-selektionierter Klone beziehungsweise gepoolter Populationen vervielfältigt werden. In der untransfizierten Zelllinie p53^{-/-} konnte kein entsprechendes Fragment nachgewiesen werden.

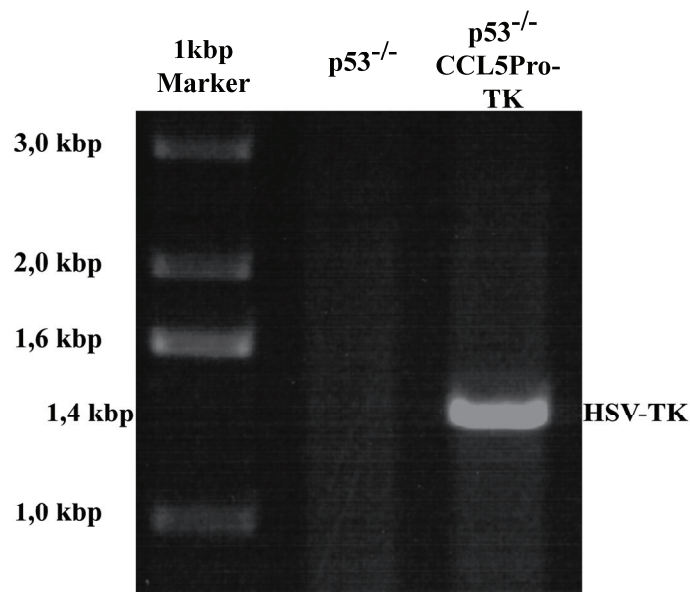


Abbildung 20: RT-PCR Nachweis der HSV-TK Expression durch CCLPro-TK MSC in vitro

Mit Hilfe spezifischer HSV-TK Primer wird neben der 1,1 kbp langen HSV-TK ebenfalls 0,3 kbp nicht kodierende Sequenz amplifiziert, sodass im Falle einer HSV-TK Expression ein 1,4 kbp langes Fragment erhalten wird. Die cDNA nativer p53^{-/-} MSC weist keine unspezifischen PCR-Produkte auf, ebensowenig eine HSV-TK typische Bande. Die p53^{-/-} CCL5Pro-TK MSC zeigen eine 1,4 kbp lange, HSV-TK typische Bande ohne weitere Produkte, sodass es sich hierbei um das spezifische PCR Produkt handelt. Durch den Einsatz HSV-TK spezifischer Primer konnte bereits in unstimulierten p53^{-/-} CCL5Pro-TK MSC eine basale Expression des therapeutischen Gens HSV-TK nachgewiesen werden. Das „Leakage“ des CCL5-Promoters führt zu einer Hintergrundexpression, die in-vitro die Identifizierung und Isolierung einzelner Zellklone ermöglicht und in-vivo ungewollte MSC-Wirkungen in tumorfernen Organen durch Stammzelluntergang bei Ganciclovirgabe verhindert.

Durch die ebenfalls durchgeführte qRT-PCR konnten die Expressionslevel der HSV-TK in den verschiedenen Klonen miteinander verglichen werden. Hierbei bestätigte sich, dass in der untransfizierten Zelllinie keine Expression nachweisbar ist. Außerdem war nur ein geringer Expressionsunterschied zwischen der gepoolten Population und dem höchstexprimierten Einzelklon vorhanden. Zusammengenommen konnte somit eine erfolgreiche Transfektion des CCL5-Promoter/HSV-TK Konstruktes in $p53^{-/-}$ MSC mit geringer Transkriptionsrate der HSV-TK im unstimulierten Zustand nachgewiesen werden.

Wirkung des HSV-TK/Gcv Systems in vitro

Bisher konnte die Expression der HSV-TK lediglich auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Um die Translation und die Funktionalität der HSV-Thymidinkinase auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde den Kulturmedien von einer transfizierten CCL5-Promoter/HSV-TK Zelllinie und der nativen $p53^{-/-}$ MSC Ganciclovir in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Es erfolgte über 3 Tage täglich ein Mediumwechsel mit erneuter Zugabe von Ganciclovir.

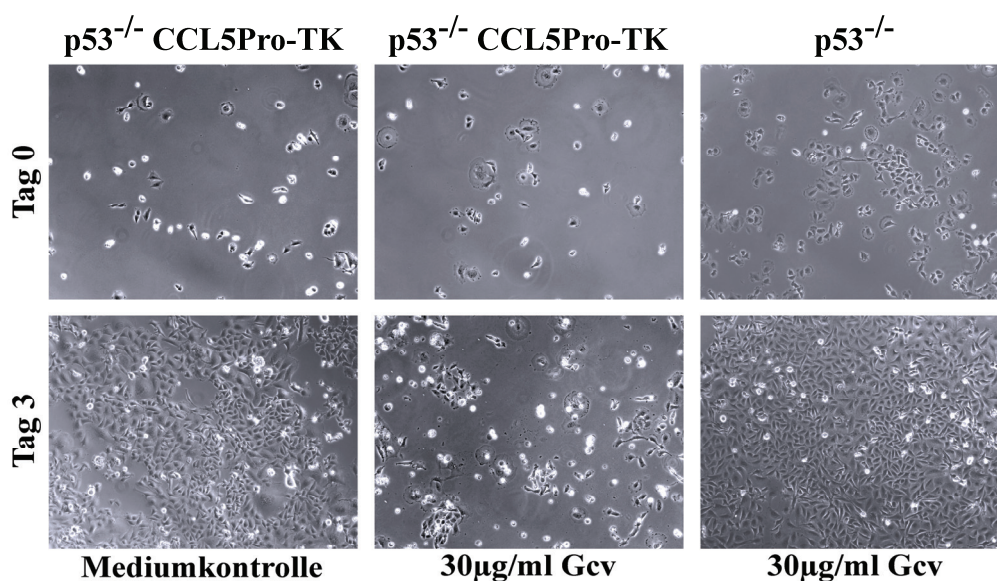


Abbildung 21: Ganciclovir-Wirkung auf CCL5Pro-TK MSC

Einen Tag nach Zellaussaat beginnend wurden $p53^{-/-}$ CCL5Pro-TK MSC - und native $p53^{-/-}$ MSC für 3 Tage in Medium, dem Ganciclovir ($c_{Gcv}=30\mu\text{g/ml}$) zugegeben wurde, kultiviert. CCL5Pro-TK $p53^{-/-}$ MSC in normalem Kulturmedium zeigten in diesem Zeitraum ein Wachstum fast bis zur vollständigen Konfluenz. Bei Ganciclovir Zugabe zeigten die Zellen ein deutlich vermindertes Wachstum, sodass an Tag 3 nur wenige vitale Zellen, die jedoch ebenfalls Zeichen einer Verplumpung der Zellmorphologie aufwiesen, vorhanden waren. Native $p53^{-/-}$ zeigten keine Beeinträchtigung des Wachstums durch die Zugabe von Ganciclovir zum normalen Kulturmedium. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Bereits bei der mikroskopischen Inspektion zeigte sich eine dosisabhängige Verminderung des Wachstums der TK⁺ MSC. Zeitabhängig nahm ebenfalls der Anteil abgestorbener Zellen zu, ebenso wie die noch vitalen Zellen deutliche Veränderungen wie blasiges Auftreiben, Bildung von Vakuolen und Verplumpung aufwiesen. Untransfizierte p53^{-/-} MSC zeigten bei gleichen Ganciclovirkonzentrationen jedoch keinerlei Beeinträchtigung der Zellproliferation und Zellintegrität.

Um die Wirkung von Ganciclovir auf die Zellvitalität zu quantifizieren, wurden die CCL5-Promoter/HSV-TK Zelllinie und die nativen p53^{-/-} MSC nach Inkubation mit Ganciclovir einem MTT-Assay unterzogen.

Hierbei zeigte sich bereits nach der ersten Gcv-Gabe eine dosisabhängige geringere Zellproliferation der transfizierten TK⁺ Zellen ohne Stimulation des CCL5-Promoters. Schon bei einer Ganciclovir-Konzentration von 1µg/ml konnte ein Effekt erzielt werden, wohingegen die gleiche Zelllinie ohne Gcv-Gabe weiterhin proliferierte. Mit der dritten Gcv-Gabe konnte sogar eine Abnahme der Zellzahl erreicht werden, sodass nicht nur eine proliferationshemmende Wirkung, sondern auch eine zytotoxische Wirkung auf TK⁺ Zellen erreicht werden konnte.

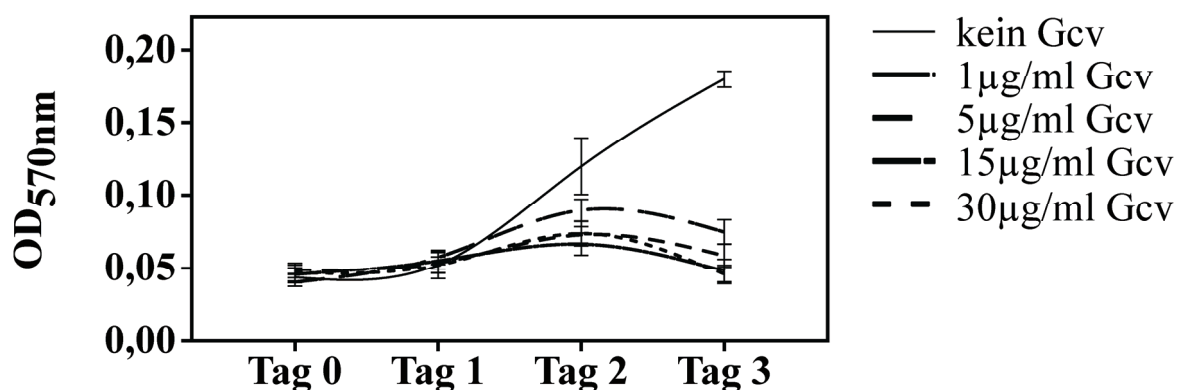


Abbildung 22: MTT-Assay von CCL5Pro-TK MSC unter Ganciclovirbehandlung

CCL5Pro-TK p53^{-/-} MSC wurden für 3 Tage in Medien kultiviert, die verschiedene Konzentrationen an Ganciclovir aufwiesen. Dabei zeigte sich ab dem zweiten Mediumwechsel ein dosisabhängiger Ganciclovireffekt im Sinne einer Wachstumsverlangsamung. Zellen proliferierten in Ganciclovir-freiem Medium ungehindert, doch bereits 1µg/ml führte zu einer deutlichen Proliferationsabnahme und ab Tag 2 sogar zu einem Zelluntergang. Balken zeigen ± 1 SD an, die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

p53^{-/-} MSC wurden ebenfalls mit Gcv inkubiert. Hierbei zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Proliferationsrate und der Vitalität der Zellen gegenüber der Kultivierung

in ganciclovirfreiem Medium, selbst bei Gcv-Konzentrationen von 30µg/ml war kein signifikanter Effekt nachweisbar.

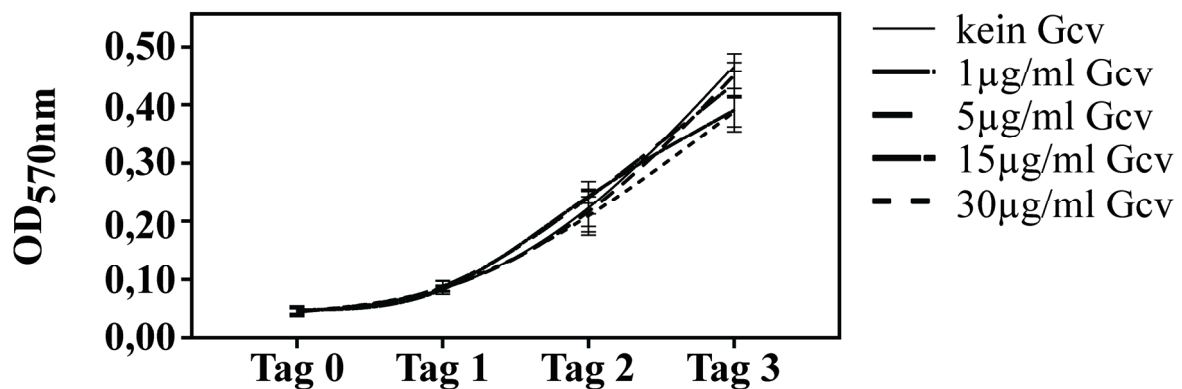


Abbildung 23: MTT-Assay von nativen p53^{-/-} MSC unter Ganciclovirbehandlung

p53^{-/-}- MSC wurden für 3 Tage in Medien kultiviert, die verschiedene Konzentrationen an Ganciclovir aufwiesen. Dabei zeigte sich keine signifikante Einschränkung der Zellproliferationen sogar bei Ganciclovir-Konzentrationen von 30µg/ml. Native p53^{-/-}- MSC sprechen nicht auf eine Ganciclovirbehandlung an. Balken zeigen ± 1 SD an, die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Die erhaltenen CCL5-Promoter/HSV-TK MSC exprimieren die funktionale HSV-TK bereits ohne spezifische Stimulation des CCL5-Promoters. Durch die Zugabe von Gcv zum Kulturmedium kann bereits bei geringen Konzentrationen eine Inhibition der Zellproliferation und sogar eine Zytotoxizität erreicht werden. Auf diese Weise können im in-vivo Versuch sämtliche injizierten TK⁺ Zellen durch die Ganciclovirbehandlung abgetötet werden, sodass mögliche stammzellbedingten Nebenwirkungen minimiert werden können. Native p53^{-/-} MSC zeigen hingegen keinerlei Ansprechen auf Ganciclovir, sodass entsprechend im in-vivo Versuch Normalgewebe geschont werden kann.

CCL5Pro-TK MSC verringern das Wachstum von panc02 Tumoren

Von den bisherigen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass mesenchymale Stammzellen durch das murine pankreatische Adenokarzinom rekrutiert und in das tumorassoziierte Stroma integriert werden. Im Rahmen der daran anschließenden Ausdifferenzierungsvorgänge kommt es zu einer Aktivierung des CCL5-Promoters in den Stammzellen mit konsekutiver CCL5-Sekretion. Diese Vorgänge sind hoch spezifisch für das Tumorgewebe mit minimaler Aktivität in anderen Geweben (etwa der Milz).

Dieser Umstand sollte für eine stammzellbasierte CCL5-Promoter/HSV-TK Suizidgentherapie verwendet werden. Nach intravenöser Gabe von syngenem CCL5-Promoter/HSV-TK MSC in panc02-tumortragende C57BL/6 Mäuse kommt es zu einer Rekrutierung dieser Zellen aus der Zirkulation und Integration in das tumorassoziierte Stroma. Im Rahmen der Ausdifferenzierung zu verschiedenen Zelltypen des Stromas wie Myofibroblasten bzw. CAFs wird in den MSC der CCL5-Promoter im Sinne einer „stromalen Aktivierung“ aktiviert. Neben dem normalen Genprodukt Ccl5 wird nun jedoch auch das therapeutische Suizidgen HSV-TK exprimiert, welches diese Zellen gegenüber der inaktiven Prodrug Ganciclovir sensibel macht. Dadurch wird Ganciclovir zu dem zytotoxischen Metaboliten Ganciclovirtriphosphat verstoffwechselt, der zum Absterben der ausdifferenzierten MSC führt. Aufgrund des Bystander-Effektes wird diese Zytotoxizität auf umgebende Zelltypen sowohl des Stromas als auch der eigentlichen Karzinomzellen ausgeweitet, die somit ebenfalls absterben und zur Tumorreduktion führen. Auf diese Weise wird die Spezifität der antitumorösen Behandlung zum einen durch den ausgeprägten Stammzelltropismus in das Tumorgewebe, zum anderen durch die Regulation der HSV-TK durch den tumorspezifischen CCL5-Promoter mit gleichzeitiger Minimierung der systemischen Nebenwirkungen erhöht.

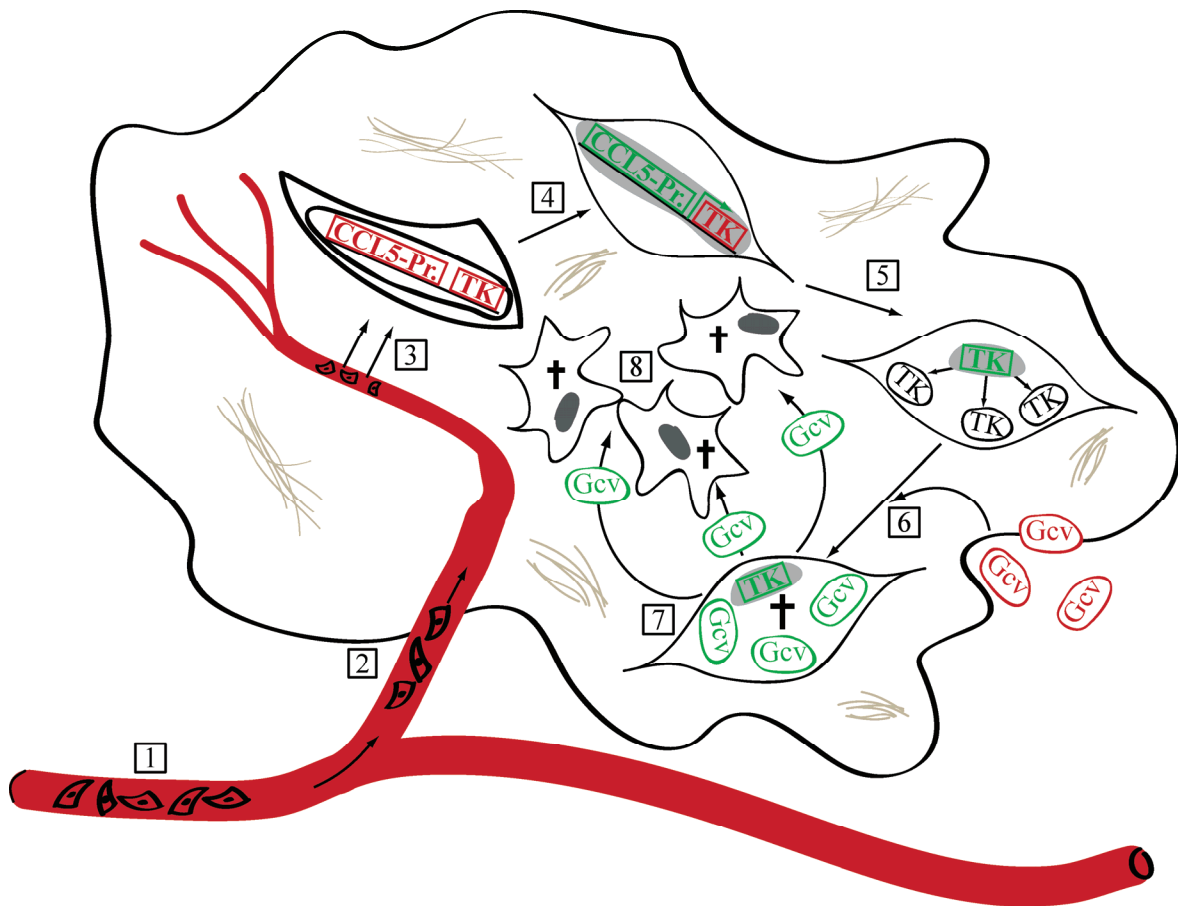


Abbildung 24: Strategie der stammzellbasierten Suizidtherapie

(1) Die therapeutischen MSC werden mittels einer intravenösen Injektion systemisch verabreicht. (2) Über verschiedene Signale werden die MSC aus der Zirkulation in den Tumor rekrutiert, (3) wo sie die endotheliale Barriere überschreiten können und sich in das tumorassoziierte Stroma integrieren. (4) Im stromalen Kontext wird die Ausdifferenzierung der MSC in fibroblastenartige Zellen angeregt, wodurch es zur konsekutiven Aktivierung des CCL5-Promotors kommt. (5) Die ausdifferenzierten MSC exprimieren nun die Herpes Simplex-Thymidinkinase und werden dadurch Ganciclovir-sensibel. (6) Intraperitoneal verabreichtes Ganciclovir gelangt in das Tumorgewebe und wird von den ausdifferenzierten MSC aufgenommen. (7) Die Thymidinkinase führt zur Aktivierung des Ganciclovirs mit anschließendem Zelltod der TK⁺ - Zelle. (8) Über der sog. „Bystander-Effect“ kommt es durch aktiviertes Ganciclovir auch zum Zelltod von TK⁻ Zellen wie umgebende stromale Zelltypen und Tumorzellen, wodurch eine Tumoringibition erreicht werden kann.

Als Versuchsaufbau wurde analog zu heutigen Chemotherapieschemata ein zyklisches Injektionsschema gewählt. Auf diese Weise kann die Therapie zum einen im Einzelzyklus schonend durchgeführt werden, zum anderen ist durch die mehrmalige Durchführung eine Steigerung der Effektivität möglich. Beginnend 2 Wochen nach panc02 Tumorinduktion durch subkapsuläre Injektion von $1,5 \times 10^5$ syngenem panc02 Adenokarzinomzellen in das Pankreas von C57BL/6 Mäusen wurden an Tag 1 eines jeden Zyklus 5×10^5 CCL5-Promoter/HSV-TK MSC (Therapiegruppe; n=10) intravenös über eine Schwanzvene

appliziert. An den 3 folgenden Tagen erfolgte keine Behandlung, sodass die MSC in das Tumorstroma migrieren konnten und im Rahmen der Ausdifferenzierung zur Aktivierung des CCL5-Promoters angeregt werden konnten. An Tag 5 bis Tag 7 erfolgte einmal täglich eine intraperitoneale Gabe von 1,5mg Ganciclovir. Bei einer vergleichbaren Eliminationshalbwertszeit von 1,5h bis 3h beim Menschen konnte bereits am Tag nach der letzten Ganciclovirgabe mit dem nächsten Zyklus begonnen werden. Insgesamt wurden 3 Zyklen durchgeführt, sodass die Tiere an Tag 36 geopfert wurden und der weiteren Untersuchung zugeführt wurden.

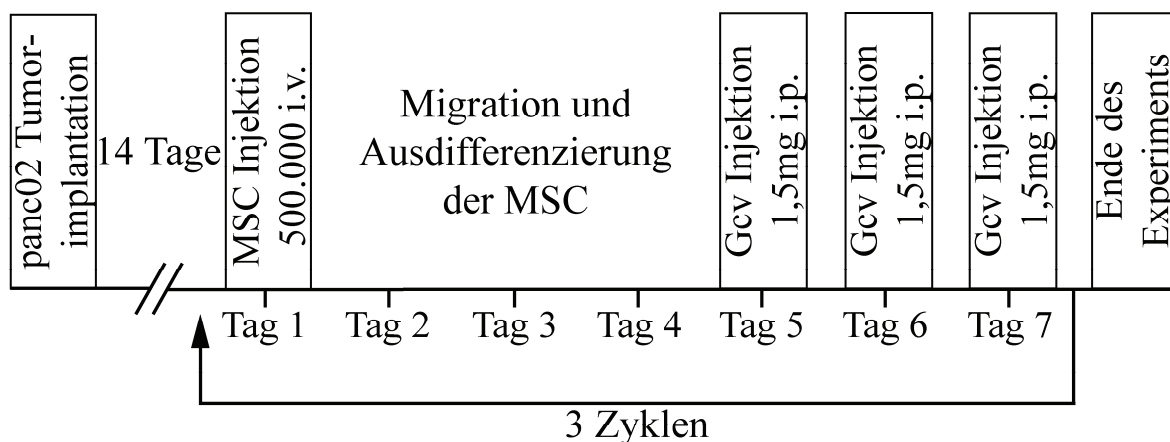


Abbildung 25: Therapieschema

Für die Therapie wurde ein zyklisches Protokoll gewählt. 2 Wochen nach panc02-Tumorimplantation erfolgte die erste intravenöse Gabe von 500.000 p53^{-/-} CCL5Pro-TK MSC. Um die Migration und Anreicherung in den panc02-Tumoren und die anschließende Ausdifferenzierung mit Aktivierung des CCL5-Promoters sicherzustellen, folgten 3 Ruhetage. Der Zyklus endete mit der dreitägigen intraperitonealen Gabe von 1,5mg Ganciclovir pro Tag. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Ganciclovirs konnte bereits am folgenden Tag der nächste Zyklus der insgesamt 3 Zyklen gestartet werden.

Als orientierender Parameter der Tumorlast und des Tumorprogresses wurden die Tiermassen regelmäßig bestimmt. Dabei zeigte sich bei der Therapiegruppe eine Abnahme von 27,7g auf 25,2g im Zeitraum der Therapie. Die Kontrollgruppe, die nach Tumorinduktion keinerlei Behandlung mehr erfuhr, zeigte hingegen eine stetige Zunahme von 27,3g auf 28,1g. Dabei schien der Gewichtsverlust in der Therapiegruppe nicht Ausdruck einer Art von Tumor-Wasting bei fortgeschrittenem Krebsleiden zu sein, da die Tiere dieser Gruppe ein regelrechtes Verhalten bezüglich Nahrungsaufnahme, Aktivitätsgrad und Reaktion gegenüber Menschen an den Tag legten. Die Tiere der Kontrollgruppe schienen jedoch durch die Krankheit in ihrem Verhalten (geringe Aktivität, z.T. apathisch) bereits deutlich beeinträchtigt

zu sein. Vielmehr ist der beobachtete Effekt in der Therapiegruppe eine zusätzliche positive Folge der Therapie.

	Kontrolle	CCL5Pro-TK MSC + Gcv	p-Wert
Masse vor Therapiebeginn	27,3	27,7	0,518
Masse nach Zyklus 1	27,6	26,1	0,12
Masse nach Zyklus 2	27,8	27,3	0,465
Masse nach Zyklus 3	28,1	25,2	0,008*

Tabelle 3: Entwicklung der Tiermassen im Laufe der Therapie

Als möglicher Hinweis auf die Tumorprogression wurden während der Therapie die Mausmassen in konstanten Abständen bestimmt. Dabei kam es im Verlauf zu einer kontinuierlichen Zunahme um 0,8g in der unbehandelten Tumorkontrollgruppe, was als Progression des Tumorleidens zu werten ist. Im gleichen Zeitraum nahmen die Therapietiere 2,5g als Zeichen einer Antitumor-Wirkung ab. Auswertung mittels Student's t-Test.

Nach Opferung der Tiere an Tag 36 des Versuches wurden die Tumore von den umgebenden Organen abpräpariert und aus dem Bauchraum entnommen. Bereits makroskopisch zeigte sich, dass die Therapiegruppe deutlich kleinere Tumore aufwies als die Kontrollgruppe. Vom makroskopischen Aspekt her zeigten sich die Tumore beider Gruppen kugelförmig und relativ scharf gegenüber dem umgebenden Gewebe abgegrenzt.

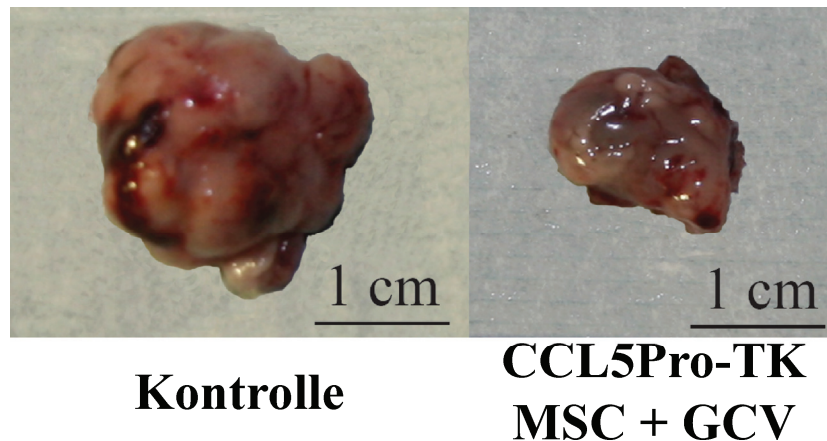


Abbildung 26: panc02-Tumore nach Therapie

Nach 3 therapeutischen Zyklen wurden die Versuchstiere ($n=10$) geopfert und die Tumore in toto entnommen. Die $p53^{-/-}$ CCL5Pro/TK MSC Gabe in Kombination mit intraperitonealer Ganciclovirinjektion führte zu einer deutlichen Verminderung des Tumolvolumens gegenüber der panc02-Kontrollgruppe ($n=5$). Dargestellt sind exemplarische Tumore der beiden Gruppen.

Bei der anschließenden Massenbestimmung der Tumore konnte eine signifikante Massenreduktion um 50% von 2,8g in der Kontrolle auf 1,4g in der TK-Therapie beobachtet werden ($p < 0,0003$, Student's t-Test).

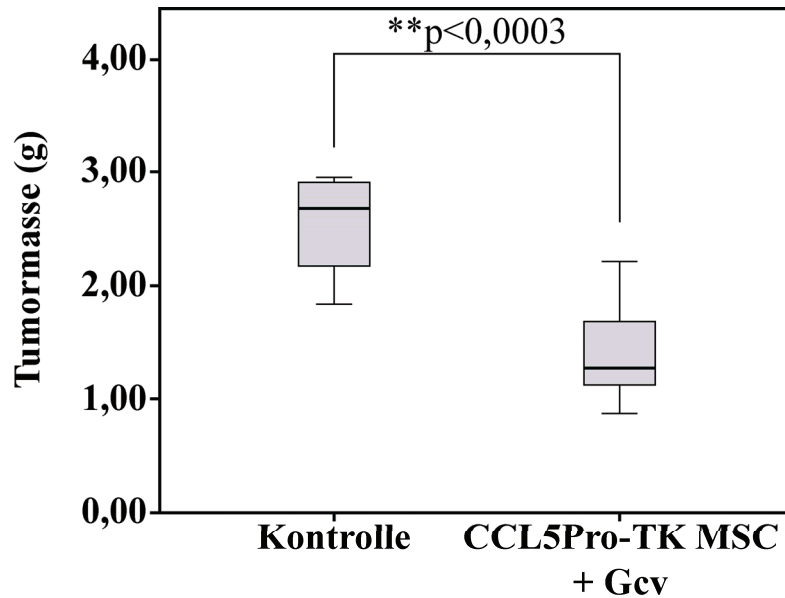


Abbildung 27: Effekt der CCL5-Promoter regulierten Suizidtherapie auf die Tumormasse

Die einmal wöchentliche systemische Gabe von 500.000 p53^{-/-} CCL5Pro-TK MSC und die wöchentlich dreimalige intraperitoneale Ganciclovirgabe über einen Zeitraum von 3 Wochen führte in panc02-tumortragenden Mäusen ($n=10$) zu einer Tumorreduktion um 50% gegenüber unbehandelten Kontrolltieren ($n=5$) (1,4g vs. 2,8g). $p < 0,0003$ Student's t-Test.

Durch den Einsatz der CCL5-Promoter/TK-MSC konnte die ursprüngliche Massenzunahme der Tumore durch native MSC und Reporter-gen-MSC verhindert und sogar umgekehrt werden, sodass ein therapeutischer Erfolg, bestimmt als reduziertes Tumorstadium, erzielt werden konnte.

Als zusätzlicher Parameter wurde der Bauchraum auf das Vorliegen von Metastasen hin untersucht. Die Suche konzentrierte sich hierbei auf die makroskopisch von Metastasen bevorzugten Organe Milz, Leber und Peritoneum. Wie in der Kontrollgruppe lag bei keinem der Tiere eine Peritonealkarzinose vor. Zudem konnte keine Metastase in der Leber beobachtet werden (0% gegenüber 60%; $p=0,022$, Fisher's Exact Test). 3 von 10 Tieren zeigten sichtbare Milzmetastasen (30% gegenüber 100%; $p=0,026$, Fisher's Exact Test).

	Gruppe		
	Kontrolle	CCL5Pro-TK MSC + Gev	
	n=5	n=10	
Metastasen	Metastasen	Metastasen	p
Metastasen			
Milz	5 (100%)	3 (30%)	0,026*
Leber	3 (60%)	0 (0%)	0,022*
Peritoneum	0 (0%)	0 (0%)	n.s.

Tabelle 4: Effekt der CCL5-Promoter kontrollierten Suizidgentherapie auf das Metastasierungsverhalten der panc02-Tumore

Die Bauchraumorgane wurden nach Opferung der Tiere und Eröffnung des Bauchraumes mittels Inspektion und Palpation auf das Vorliegen von Makrometastasen hin untersucht. Die Therapiegruppe zeigte ebenso wie die Kontrollgruppe keine Peritonealkarzinose, die therapeutischen Stammzellen in Verbindung mit der Ganciclovirgabe steigerten also anders als native MSC nicht die lokale Invasivität. Im Gegenteil, es kam durch die Therapie zu einer signifikanten Reduktion der Metastasierung in die Prädilektionsorgane Leber und Milz. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Fisher's Exact Tests.

Bei der HE-Färbung von Tumoren der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe zeigte sich histologisch ein ähnliches Bild. Jedoch schien die Nekrosezone in der therapierten Gruppe prominenter und auch in die Randbereiche der Tumore eingelagert zu sein. Dieser Befund ist auch stimmig mit der Beobachtung, dass therapierte Tumore eine weichere Konsistenz hatten und beim Aufschneiden mit dem Skalpell weniger Widerstand boten.

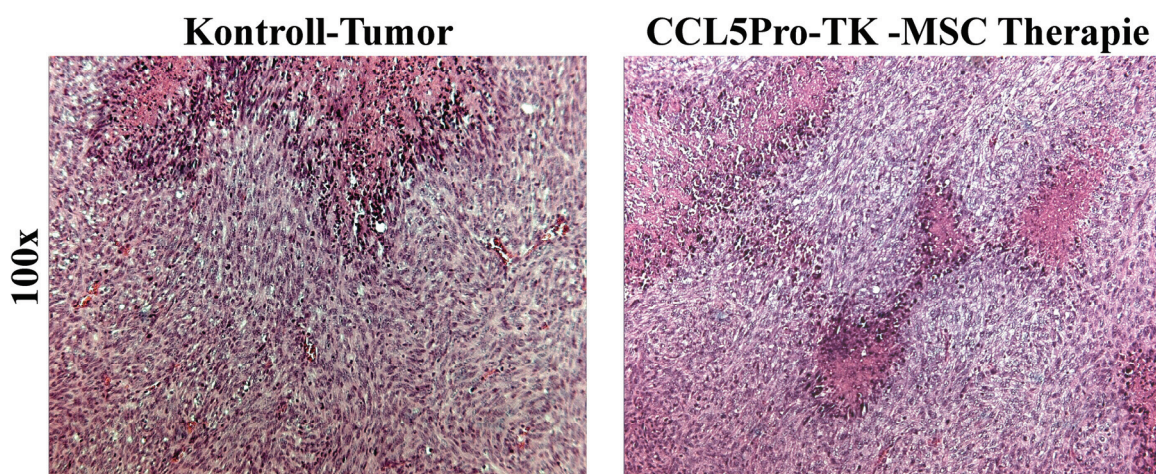


Abbildung 28: HE-Färbung von repräsentativen Tumorschnitten

Die Histologie zeigte sowohl für die Kontrolltumore als auch für die therapierten Tumore ein sehr ähnliches Bild. In der Therapiegruppe kam es jedoch zu ausgedehnteren Nekrosen, die sich nicht nur auf die Innenzone beschränkten, sondern auch im Randbereich zwischen vitales Tumorgewebe eingelagert waren. 100x Vergrößerung.

Zum Ausschluss von unerwünschten Wirkungen durch die intravenöse Gabe von CCL5-Promoter/TK MSC in Verbindung mit konsekutiver Ganciclovir-Applikation wurden diverse Gewebe (Haut, Lunge, Leber, Milz, Thymus, Darm) mittels der HE-Färbung dargestellt. Dabei wurden die Gewebe zum einen auf Merkmale einer Schädigung durch tumorunspezifische Verstoffwechslung von Gcv durch MSC, zum anderen auf die Bildung von Tumoren durch MSC hin untersucht. In keinem der Organe konnten Tumore nachgewiesen werden. Auch zeigten die Organe keine pathologischen Veränderungen durch Ganciclovir, sodass von einer nebenwirkungsarmen Therapie ausgegangen werden konnte.

Bei der Untersuchung der Gewebe fielen in den Milzen einzelner therapierter Tiere Mikrometastasen auf. Diese waren jedoch zuvor nicht makroskopisch nachweisbar gewesen. Die CCL5-Promoter/TK-MSC Therapie scheint somit nicht kausal die Metastasierung zu verhindern, sondern vielmehr ebenfalls nach Migration der Zellen in die Metastasen über die Aktivierung von Ganciclovir zur Metastasenbekämpfung beizutragen.

CCL5 Expression ist im humanen PDA hochreguliert

Um die Relevanz der im Tiermodell erhaltenen Erkenntnisse für das humane Pankreaskarzinom zu zeigen, wurde humanes Pankreasgewebe auf CCL5 Expression hin untersucht. Dazu wurde durch die Stiftung „Human Tissue and Cell Research“ Pankreasnormalgewebe und korrespondierendes Pankreastumorgewebe aus demselben Patienten von insgesamt 10 Patienten bereitgestellt. Die korrekte Einteilung der bereitgestellten Gewebeproben wurde bereits durch die Stiftung durchgeführt.

Die CCL5-Expression im Normalgewebe und im Tumorgewebe der einzelnen Patienten wurde auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR bestimmt. Bei 7 von 10 Patienten zeigte sich eine signifikante Hochregulation der CCL5-Expression, wobei eine Vervielfachung größer 2 als signifikant angesehen wurde.

Aufgrund interindividueller Unterschiede in den Expressionsniveaus reichte die Hochregulation von Faktor 5 bis Faktor 32. 2 Patienten zeigten mit der Hochregulation von Faktor 1,8 bzw. 1,9 und 1 Patient mit der Expressionsabnahme von Faktor 0,9 aufgrund des möglichen Messfehlers der Methode keine bestimmbareren Regulationsunterschiede. Somit reagierten auf mRNA-Ebene die Tumore sehr homogen in Richtung Hochregulation von CCL5, nur ein Patient ließ diesen Trend nicht erkennen. In der statistischen Auswertung mittels des U-Testes für verbundene Stichproben konnte die Signifikanz der erhöhten CCL5-Expression im Tumorgewebe gegenüber der im Normalgewebe gezeigt werden ($p < 0,01$, Wilcoxon-U-Test).

Patient	Normalgewebe	Tumorgewebe	Tumor/Normal	
1	9,76E-06	1,73E-05	1,8	↔
2	5,84E-06	2,89E-05	4,9	↑
3	2,22E-05	4,26E-05	1,9	↔
4	2,40E-06	7,65E-05	31,9	↑
5	5,25E-06	8,57E-05	16,3	↑
6	5,45E-06	2,79E-05	5,1	↑
7	1,53E-04	1,39E-04	0,9	↔
8	6,14E-07	1,52E-05	24,7	↑
9	6,55E-06	7,33E-05	11,2	↑
10	3,94E-06	2,82E-05	7,2	↑

Tabelle 5: CCL5-mRNA Expression in humanen Gewebeproben

Die CCL5-Expression wurde mittels qRT-PCR anhand von korrespondierenden Pankreasnormalgewebe- und Pankreaskarzinomgewebeproben von 10 Tumorpatienten bestimmt. CCL5 scheint ebenfalls im humanen Pankreaskarzinom gegenüber dem Pankreas-Normalgewebe, auch wenn es reaktiv verändert sein sollte, hochreguliert zu sein. Dargestellt sind die gegen 18S-rRNA normalisierte Expressionslevel für das Tumorgewebe und das Normalgewebe, ebenso der Quotient beider Werte. Ein Quotient über 2 wurde als signifikante Hochregulation angesehen.

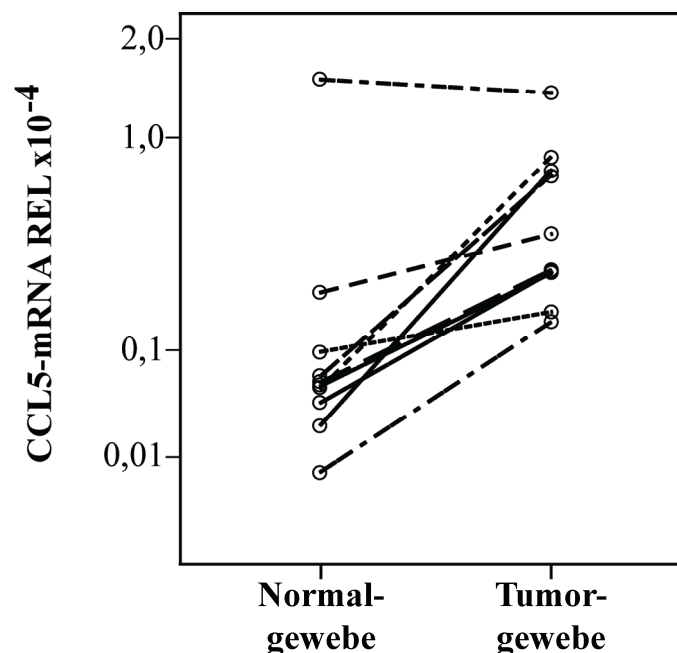


Abbildung 29: Paarweise Darstellung der CCL5-Regulation in gesundem und tumorösem Gewebe

Die CCL5-Expression wurde mittels qRT-PCR anhand von korrespondierenden Pankreasnormalgewebe- und Pankreaskarzinomgewebeproben von 10 Tumorpatienten bestimmt, die Normalisierung erfolgte gegen 18S-rRNA. In der paarweisen grafischen Darstellung zeigt sich eine annähernd homogene Hochregulation von CCL5 im Tumorgewebe. $p < 0,01$ Wilcoxon-U-Test.

Zum Nachweis der CCL5-Expression auf Proteinebene wurden die verschiedenen Gewebeproben mit dem monoklonalen Anti-CCL5 Antikörper VL2 angefärbt. Dabei zeigte sich eine über die gesamte Schnittfläche ungleichmäßig verteilte Anfärbung von CCL5-exprimierenden Zellen, die zum Teil die Tumorzellen selbst betraf, aber vor allem im dazwischen eingelagerten Stroma nachweisbar war. In den Schnitten des Normalgewebes waren allenfalls einzelne CCL5-positive Zellen angefärbt, jedoch im Vergleich zum Tumorgewebe war die CCL5-Expression deutlich niedriger.

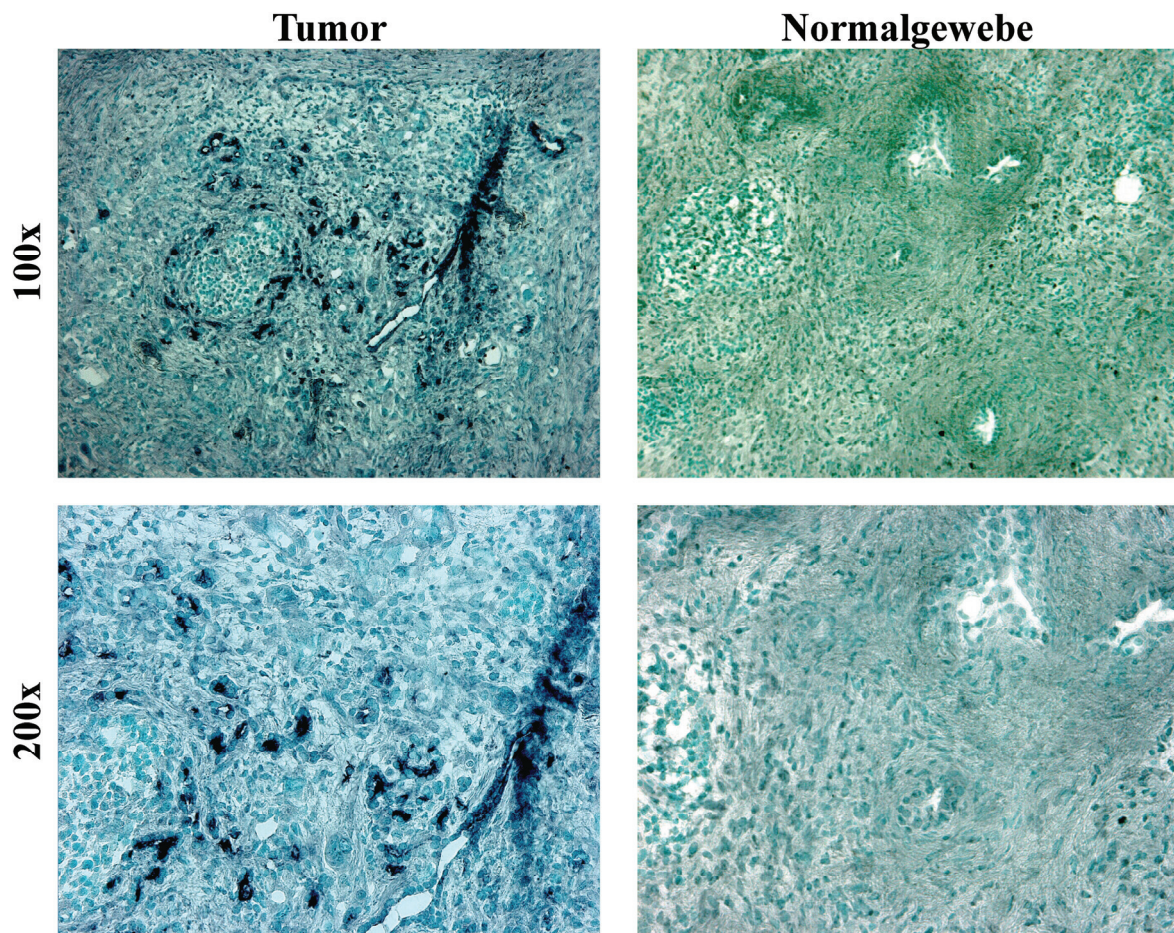


Abbildung 30: Immunhistochemischer Nachweis von CCL5

CCL5 wurde in Gefrierschnitten von Pankreaskarzinom- und Pankreasnormalgewebe mit dem monoklonalen CCL5-Antikörper VL2 markiert. Im Rahmen der folgenden Anfärbung stellt sich nachgewiesenes CCL5 dunkel dar. Abgebildet sind repräsentative Areale von Pankreaskarzinomgewebe und Pankreasnormalgewebe in 100x und 200x Vergrößerung. Im Tumorgewebe kommt CCL5 sowohl im Tumor- als auch im stromalen Kompartiment zur Darstellung. Im Normalgewebe, sei es auch reaktiv verändert, ist hingegen kein CCL5 nachweisbar.

Durch die Untersuchung exemplarischer humaner Pankreaskarzinome und von Pankreasnormalgewebe sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene konnte eine

Hochregulation von CCL5 nachgewiesen werden. Histologisch ließ sich diese Expression vor allem im Stroma der Tumore nachweisen. Somit scheint CCL5 auch in die Tumor-Stroma Interaktionen des humanen Pankreaskarzinoms involviert zu sein, sodass die im Tiermodell erhobenen Ergebnisse durchaus auch Relevanz für das menschliche Karzinom haben.

Diskussion

Neuer Therapieansatz zur Behandlung maligner Erkrankungen

In den westlichen Gesellschaften stellen maligne Erkrankungen eine stetig an Bedeutung zunehmende medizinische Herausforderung dar. Sie liegen mit einem Anteil von 22,8% direkt hinter den Herz- und Kreislauferkrankungen auf der Todesursachenstatistik, in der Alterklasse 60-79 Jahre sind sie sogar die führende Todesursache (Jemal, Siegel et al. 2008). In den letzten Jahren wurden multimodale Therapieansätze entwickelt, die durch Kombination von Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie in vielen Fällen zu großen Fortschritten geführt haben. Trotz aller Verbesserungen in den Überlebensraten sind etliche Tumorerkrankungen noch immer therapieresistent. Vor allem kann oftmals nur noch eine palliative Zielsetzung erfolgen, sobald ein metastatisches Stadium vorliegt (Loos, Friess et al. 2009). Ein besonderes Problem stellen die kurzen Halbwertszeiten der Therapeutika und die unspezifischen, toxischen und systemischen Nebenwirkungen dar (Sasportas, Kasmieh et al. 2009). Auch das Risiko von Zweitmalignomen wird durch bestimmte Chemotherapeutika erhöht (Kaldor, Day et al. 1990; Relling, Rubnitz et al. 1999).

Aus diesen Gründen ist es ein Ziel sämtlicher Therapiestrategien, Tumore gezielt und aggressiv zu bekämpfen und gleichzeitig die Nebenwirkungen so zu reduzieren, dass es möglichst zu keiner systemischen Beeinträchtigung kommt. Daher werden viele Hoffnungen auf innovative Ansätze, besonders auf die Möglichkeiten der Kombination von Gentherapie und Stammzelltherapie, gesetzt. Diese stammzellbasierte Gentherapie verspricht hauptsächlich über drei Mechanismen eine hoch-gewebespezifische Tumorthherapie. Erstens zeigen mesenchymale Stammzellen ein besonderes Migrationsverhalten in-vivo, zweitens können MSC dem Transport von Genen dienen und drittens kommt es zu einer gewebeabhängigen Genexpression durch diese Zellen. Im Folgenden sollen die theoretischen Hintergründe dieser drei Mechanismen dargestellt werden und die Auswirkungen für eine mögliche Anti-Tumorthherapie erläutert werden.

MSC migrieren in-vivo in das tumorassoziierte Stroma

Mesenchymale Stammzellen zeigen ein besonderes Migrationsverhalten nach intravenöser Gabe im Organismus. Dieser Stammzelltropismus stellt die erste Grundlage für einen möglichen Einsatz in der Tumorthherapie dar. Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften, unter anderem eine hohe Proliferationsrate und eine große Plastizität, sind mesenchymale Stammzellen in die Aufrechterhaltung und in die Wiederherstellung der Gewebeintegrität

involviert (Lazennec and Jorgensen 2008). Daher zeigen MSC einen ausgeprägten Tropismus zu Orten von Gewebeschädigung und chronischer Entzündung, wo sie durch Ausdifferenzierung zur Gewebereparatur beitragen (Kidd, Spaeth et al. 2009). Tumore bieten eine Vielzahl an Charakteristika von Wunden. Dabei kommen oftmals die gleichen Genexpressionsmuster zur Expression (Chang, Nuyten et al. 2005), sodass Tumore plakativ als „Wunden, die niemals heilen“ bezeichnet werden können (Dvorak 1986). In Analogie zu dem biologischen Verhalten von mesenchymalen Stammzellen bei der Wundheilung konnte inzwischen für etliche Tumormodelle nachgewiesen werden, dass MSC von Tumoren aktiv rekrutiert werden und in das Stroma integriert werden. In verschiedenen Mammakarzinom-Modellen konnte eine Migration von intravenös injizierten MSC in die Tumore gezeigt werden, ohne dass es zu einer Anreicherung in Leber, Niere oder Milz kam (Karnoub, Dash et al. 2007). Kidd et al. beschrieben in einem anderen Mammakarzinom-Modell, das eine *in vivo* Bildgebung erlaubte, in der Frühphase nach Injektion zunächst eine Zellanreicherung in der Lunge, die im zeitlichen Verlauf zugunsten von Leber und Milz abnahm. Diese Signale waren nach verschiedenen Zeiten (Stunden bis Tage) nicht mehr detektierbar, jedoch kam es im Tumorgewebe zu einer anhaltenden Akkumulation von MSC. Interessanterweise waren MSC auch in Leber- und Lungenmetastasen nachweisbar, sodass hier eine Migration nicht nur in den Primärtumor, sondern auch in Filiae beobachtet werden konnte (Kidd, Spaeth et al. 2009). Anhand eines Kolonkarzinom-Modells konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von MSC durch Tumore bereits in lediglich mikroskopisch nachweisbaren Tumoren stattfindet und somit früh in der Tumorbilogie einsetzt (Hung, Deng et al. 2005). Auch für das Pankreaskarzinom gibt es erste Berichte über eine gezielte Migration von mesenchymalen Stammzellen in die Tumore mit konsekutiver Integration in die Tumorgefäßversorgung (Beckermann, Kallifatidis et al. 2008). Kallifatidis et al. berichteten in einem orthotopen Pankreaskarzinom-Modell den Nachweis systemisch gegebener MSC, wobei in Leber, Niere und Lunge nur wenige Zellen nachweisbar waren (Kallifatidis, Beckermann et al. 2008). Eine Migration von Stammzellen in Tumorgewebe konnte unter anderem für das Gliom (Nakamizo, Marini et al. 2005; Sasportas, Kasmieh et al. 2009), das Ovarialkarzinom (Coffelt, Marini et al. 2009; Spaeth, Dembinski et al. 2009), das Melanom (Khakoo, Pati et al. 2006) und das Nierenzellkarzinom (Gao and Mittal 2009) gezeigt werden.

Die Mechanismen, die dem Migrationsverhalten der mesenchymalen Stammzellen zu Grunde liegen, sind hingegen leider noch nicht bis ins Detail verstanden. Das Tumormilieu ist reich an Zytokinen, Chemokinen und vielen anderen Proteinen, die ebenfalls in Entzündungs- und Heilungsprozessen exprimiert werden und im Rahmen dieser Prozesse der

Leukozytenrekrutierung dienen. Es wird daher vermutet, dass die Migration der MSC den Prinzipien der Leukozytenmigration ähnelt. Hierbei sind die Expressionsmuster von Chemokinen und Chemokinrezeptoren auf den beteiligten Zellen für die gezielte Migration von entscheidender Bedeutung. Von Lüttichau et al. konnten durch Analyse der Chemokinrezeptorausstattung von mesenchymalen Stammzellen (human, murin, primär und immortalisiert) das Verteilungsmuster dieser Zellen in-vivo voraussagen. Die MSC exprimierten dabei die Rezeptoren CCR4, CCR7, CCR10 und CXCR5 und migrierten entsprechend in die Organe mit den korrespondierenden Liganden wie Haut, Darm, Speicheldrüsen und sekundär lymphatisches Gewebe (Von Luttichau, Notohamiprodjo et al. 2005). MSC exprimieren abhängig vom Organismus (humane oder murine Abstammung) und von der Zellkultivierung (primäre oder immortalisierte MSC) noch eine Reihe weiterer Chemokinrezeptoren, wie CCR1, CCR6, CCR9, CXCR1, CXCR3, CXCR6 und c-met, die ebenfalls für den Stammzelltropismus wichtig sind (Von Luttichau, Notohamiprodjo et al. 2005; Son, Marquez-Curtis et al. 2006; Sasportas, Kasmieh et al. 2009).

Eine wichtige Rolle bei der Migration von Vorläuferzellen und mesenchymalen Stammzellen scheint der Chemokinrezeptor CXCR4 zu spielen, dessen Expression dennoch kontrovers beschrieben wird. Orimo et al. konnten zeigen, dass CAFs durch die Produktion von SDF-1 zur Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen, die den korrespondierenden Rezeptor CXCR4 exprimieren, in das tumorassoziierte Stroma beitragen (Orimo, Gupta et al. 2005). In anderen in-vitro Studien konnte gezeigt werden, dass humane MSC, die in diesem System für 18 Passagen eine Expression von CXCR4 zeigten, durch hohe Spiegel an SDF-1 zur Migration angeregt werden (Son, Marquez-Curtis et al. 2006). Mediumüberstand von Osteosarkomzellen induzierte in humanen MSC eine Migration über höhere Spiegel an SDF-1 (Xu, Bian et al. 2009). Von Lüttichau jedoch konnte auf murinen MSC keine funktionelle Expression des Rezeptors CXCR4 nachweisen, was in den Studien von Chamberlain et al. bestätigt wurde. Auch bestehen Unterschiede zwischen den Spezies, denn Chamberlain konnte eine CXCR4 Expression auf humanen MSC zeigen (Von Luttichau, Notohamiprodjo et al. 2005; Chamberlain, Fox et al. 2007). Möglicherweise spielen für diese unterschiedlichen Ergebnisse in-vitro Effekte eine Rolle, denn bei längerer Passagierung von MSC konnte ein Rezeptorenverlust beschrieben werden (Honczarenko, Le et al. 2006; Stagg 2008). Als weiterer Grund für diese kontroverse Datenlage ist anzuführen, dass es sich bei MSC trotz gewisser Minimalkriterien zur Charakterisierung in den unterschiedlichen Systemen um unterschiedliche Zellpopulationen handelt (Kumar, Chanda et al. 2008).

Neben den oben genannten Chemokinrezeptor/Chemokinliganden-Paaren konnten noch

andere Achsen, die Bedeutung für den Stammzelltropismus haben, identifiziert werden. Darunter befinden sich Integrine, L-Selektin, MCP-1/CCR2, SCF/c-kit, HGF/c-met (Son, Marquez-Curtis et al. 2006; Sasportas, Kasmieh et al. 2009). MSC reagieren auch auf VEGF, PDGF und EGF in-vitro mit einer gerichteten Migration (Beckermann, Kallifatidis et al. 2008). In einem in-vivo Gliommodell konnte zudem die migrationsfördernde Wirkung des PDGF auf MSC direkt nachgewiesen werden (Hata, Shinojima et al.).

Trotz dieser zahlreichen in-vitro Studien und der Analogie zum Leukozyten-Trafficking bleiben die grundlegenden Mechanismen des Stammzelltropismus leider unklar. Es ist jedoch festzuhalten, dass MSC ein ausgeprägtes Migrationsverhalten zu Orten von Gewebeschädigung, seien es Wunden, Entzündungen oder Tumore, zeigen, wo sie sich in das reaktive Stroma integrieren und biologische Funktionen durch Ausdifferenzierung in verschiedene Zelltypen übernehmen.

MSC zeigen eine tumorspezifische Genexpression

Der zweite Mechanismus, der für eine Tumorthherapie genutzt werden kann, ist die gewebespezifische Expression von Genen durch mesenchymale Stammzellen. Hierbei werden spezifisch im Tumorgewebe regulatorische Elemente aktiviert, die zu den speziellen Expressionsmustern der MSC führen.

Karnoub et al. konnten in dem von ihnen gewählten Mammakarzinom-Modell zeigen, dass mesenchymale Stammzellen nach Ausdifferenzierung innerhalb des Tumorstromas die Tumorprogression fördern. Die erhöhte Aggressivität der Tumore wurde dabei durch die de-novo Sekretion des CC-Chemokins CCL5 durch die MSC hervorgerufen, welches die Motilität und damit die Metastasierung der Tumorzellen steigerte (Karnoub, Dash et al. 2007).

Eine Hochregulation von CCL5 ist in verschiedenen Tumorentitäten wie das Melanom, das Prostatakarzinom, das Kolonkarzinom und das Mamma-Karzinom beschrieben worden (Mrowietz, Schwenk et al. 1999; Vaday, Peehl et al. 2006; Soria, Yaal-Hahoshen et al. 2008; Erreni, Bianchi et al. 2009). Für das Mammakarzinom korreliert die CCL5 Expression im Tumorgewebe, mit einer geringeren Aussagekraft auch die Plasmaspiegel, mit einer schlechteren Prognose (Yaal-Hahoshen, Shina et al. 2006). Die CCL5 Expression war dabei nicht nur auf den Primärtumor beschränkt, sondern auch in Metastasen nachweisbar (Luboshits, Shina et al. 1999).

CCL5 führt durch verschiedene Mechanismen zur Förderung des Tumorwachstums und der Tumorprogression. Das CC-Chemokin CCL5 ist in inflammatorische Geschehen involviert

und wirkt chemotaktisch unter anderem auf T-Lymphozyten und Monozyten (Nelson, Kim et al. 1993; Niwa, Akamatsu et al. 2001). So fördert CCL5 auch in Tumoren die Monozyteninfiltration, welche zur Sekretion von löslichen Faktoren wie Wachstumsfaktoren, proangiogenetischen Faktoren und MMPs angeregt werden (Soria and Ben-Baruch 2008). CCL5 wirkt dabei parakrin auf Tumorzellen und stromale Zellen und führt zur Produktion matrixremodellierender Proteine wie MMP9, MMP2, MMP3, MMP9, MMP10, MMP17 und Cathepsin L (Azenshtein, Luboshits et al. 2002; Robinson, Scott et al. 2002; Stormes, Lemken et al. 2005; Tang, Yamamoto et al. 2009). In in-vitro Migrationsassays konnte eine Steigerung der Tumorzellmotilität durch CCL5 nachgewiesen werden (Tang, Yamamoto et al. 2009; Xu, Bian et al. 2009). In einem weiteren in-vivo Modell förderte die Überexpression von CCL5 durch intravenös injizierte Tumorzellen die Tumorzellmetastasierung. Es traten mehr Metastasen vor allem in Lunge und Leber auf und es ergab sich ebenfalls ein größeres Spektrum an weiteren befallenen Organen. Diese CCL5-abhängigen Effekte wurden zum Teil durch die CCL5-assoziierte Sekretion von S100A4, einem prometastatischen Mediator der S100 Familie, potentiert. In-vitro war eine Erhöhung der Zellmotilität nachweisbar, zudem förderte S100A4 im Sinne eines positiven Feedbacks die CCL5 Sekretion durch Tumorzellen und Stromazellen (Forst, Hansen et al.). CCL5 hat auch direkt proliferative Wirkungen auf Tumorzellen, wie anhand von MCF-7 Mammakarzinomzellen gezeigt werden konnte (Murooka, Rahbar et al. 2009). Viele der parakrinen CCL5-Effekte wie Steigerung der Metastasierungsrate und Steigerung des Tumorwachstums beruhen auf der Etablierung eines CCL5-CCR5-Loops, sprich auf der anhaltenden Interaktion des Liganden mit seinem entsprechenden Rezeptor (Karnoub, Dash et al. 2007). In einem Mammakarzinom-Modell konnte durch einen CCR5-Antagonisten, also durch Blockade des vorrangigen CCL5 Rezeptors, eine Verlangsamung des Tumorwachstums erreicht werden (Robinson, Scott et al. 2003).

MSC eignen sich zum Transport therapeutischer Gene

Die Anwendung heutiger Chemotherapeutika wird oft durch das Auftreten systemischer Nebenwirkungen limitiert, sodass es Ziel neuer Therapiestrategien ist, die systemische Toxizität durch Erhöhung der Therapiespezifität zu minimieren. Dank der Beobachtung, dass mesenchymale Stammzellen bei intravenöser Gabe zu einem großen Teil in Tumore migrieren, boten sich diese Zellen schon früh als zellbasierte Vektoren zum Transport von Tumortheraeutika an.

MSC agieren im Rahmen des dritten gewebespezifischen Mechanismus als „trojanisches Pferd“. Wie bereits gezeigt führen MSC zu einem Überlebensvorteil von Tumorzellen indem

sie im Stroma vielfältige biologische Aufgaben übernehmen. Da mesenchymale Stammzellen hervorragend isoliert werden können und anschließend in-vitro kultiviert und genetisch verändert werden können, kann die tumorfördernde Eigenschaft manipuliert werden und in eine schädigende Wirkung umgekehrt werden.

Studený et al. verfolgten als erste diesen möglichen therapeutischen Ansatz in einem pulmonalen Metastasenmodell. Dabei injizierten sie Mäusen mit pulmonalen Melanom- oder Brustkrebsmetastasen intravenös MSC, die konstitutiv das Wachstum maligner Zellen inhibierende IFN β exprimierten. Sie konnten zum einen die gezielte Anreicherung der Stammzellen in den Metastasen unter Schonung anderer Organe wie Leber, Milz und Niere zeigen, zum anderen wurde das Metastasenwachstum bei gleichzeitiger Lebensverlängerung signifikant vermindert. Gleichzeitig waren die systemischen IFN β Spiegel nicht erhöht und keine systemischen Nebenwirkungen bemerkbar (Studený, Marini et al. 2002). Die MSC führten aufgrund des Tropismus in die Metastasen trotz konstitutiver Expression zu einer lokalen Produktion von IFN β mit therapeutischem Erfolg unter Schonung des Gesamtorganismus.

Die tumorreduzierende Wirkung von IFN β unter Einsatz von MSC als Vehikel konnte auch in einem Gliom-Modell erfolgreich eingesetzt werden (Nakamizo, Marini et al. 2005). Andere Faktoren, die durch mesenchymale Stammzellen in Tumore gebracht werden können, sind IL12, welches in einem Nierenzellkarzinom-Modell zu einem Überlebensvorteil führte (Gao and Mittal 2009), TRAIL, das experimentelle Mammakarzinome, deren Lungenmetastasen und Glioblastome erfolgreich bekämpfen konnte (Loebinger, Eddaoudi et al. 2009; Sasportas, Kasmieh et al. 2009), oder die HSV-TK, die in einem Gliommodell unter Einsatz von Ganciclovir eine Tumorreduktion erzielte (Uchibori, Okada et al. 2009).

Gewebespezifischer Ansatz einer stammzellbasierten und promoterregulierten Suizidtherapie

Die Grundlage für die gezielte Therapie von Tumoren bildete in den bisherigen Modellen der bevorzugte Tropismus der mesenchymalen Stammzellen in Tumorgewebe. Bei der konstitutiven Expression der therapeutischen Genprodukte können jedoch Nebenwirkungen in anderen Organen nicht ausreichend ausgeschlossen werden, auch wenn die entsprechenden Serumspiegel Normwerte boten. Trotz der ausgeprägten Migration der Stammzellen in das Tumorstroma kommt es zeitabhängig zu Zellanreicherungen in verschiedenen Organen wie Lunge, Leber und Milz, sodass mit adversen Wirkungen durch die Therapeutika gerechnet werden muss (Von Luttichau, Notohamiprodjo et al. 2005; Kallifatidis, Beckermann et al.

2008; Kidd, Spaeth et al. 2009).

Ziel war es unter Ausnutzung der Tumorbiologie eine spezifischere Genexpression durch die MSC im stromalen Tumorkontext zu erreichen, die nicht nur auf dem Zelltropismus beruht. Mesenchymale Stammzellen aktivieren nach Integration in das Stroma im Rahmen des Ausdifferenzierungsprozesses den CCL5-Promoter. Um eine gewebespezifische Expression eines Suizidgens im Tumor zu erreichen, wurden MSC kloniert, die die Herpes Simplex I Thymidinkinase unter Kontrolle des CCL5-Promoters exprimierten. Die HSV-TK führt den ersten Phosphorylierungsschritt bei der Aktivierung der Prodrug Ganciclovir durch. In Folge davon entsteht ein Toxin, welches sowohl die transfizierten Zellen als auch umgebende stromale Zellen und Tumorzellen über den sog. „Bystander-effect“ abtötet (Mesnil and Yamasaki 2000). Neuartig an diesem Ansatz ist, dass nicht die Tumorzellen selbst, sondern das Tumorstroma primäres Ziel der Therapie ist. Erst nach stromaler Ausdifferenzierung der MSC und der Störung der stromalen Integrität durch konsekutive Ganciclovirgabe wird die Zytotoxizität auf die Tumorzellen ausgeweitet. Durch diese neue Strategie werden die beiden Hauptkomponenten eines Tumors, nämlich die Tumorzellen und die stromalen Zellentypen, gleichzeitig mit in die Therapie einbezogen.

Aufgrund seiner biologischen Merkmale eignet sich das PDA als Modellerkrankung

Das Pankreaskarzinom stellt eines der aggressivsten soliden Malignome des Menschen dar. Trotz großer Fortschritte in der Forschung und der Einführung multimodaler Therapieansätze ist die 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate in den letzten 30 Jahren nur marginal gestiegen und liegt noch immer unter 5%. Die einzige kurative Option ist die radikale chirurgische Intervention, doch befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lediglich 20% der Patienten noch in einem operablen Stadium. 40% leiden schon an einem lokal fortgeschrittenen Tumor und weitere 40% zeigen bereits Metastasen. Das Fehlen an wegweisenden Frühsymptomen, die unspezifische Beschwerdesymptomatik in späteren Stadien, das aggressive lokale Wachstum mit Gefäß- und Nerveninvasion und die frühe Metastasierung sind die Hauptgründe für die infauste Prognose. Diese Zahlen machen deutlich, weshalb das Pankreaskarzinom für die Tumorforschung von großem Interesse ist. Zum einen handelt es sich um ein Krankheitsbild, welches dringend neue Therapieansätze benötigt, um den Patienten überhaupt eine Prognose bieten zu können. Zum anderen stellt sich natürlich die Frage, weshalb ausgerechnet das Pankreaskarzinom von solcher Aggressivität ist.

Histologisch ist das Pankreaskarzinom durch eine ausgeprägte Desmoplasie gekennzeichnet. Darunter wird die überschießende Proliferation des Tumorstromas mit den entsprechenden stromalen Zelltypen wie Fibroblasten, Endothelien, Lymphoendothelien und Immunzellen verstanden. Durch die Produktion von Extrazellulärmatrix durch Fibroblasten entsteht das typisch derbe Stroma und aggressive Wachstum des Pankreaskarzinoms. Da die desmoplastische Reaktion das Pankreasadenokarzinom von anderen Tumoren abhebt, wird dieser schon seit längerer Zeit eine wichtige Rolle an der Tumorprogression zugeschrieben. Aus diesen Gründen bietet das Pankreaskarzinom und seine Tiermodelle ein ideales System, um Tumor-Stroma Interaktionen mit besonderem Augenmerk auf dem Beitrag mesenchymaler Stammzellen zur Tumorbilogie zu untersuchen.

Das syngene orthotope panc02- PDA Modell als Tumormodell

Das biologische Mikromilieu hat einen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression der Einzelkomponenten. Die verschiedenen Zelltypen eines Tumors stehen in vielseitigen Wechselwirkungen, die zu einer gegenseitigen Beeinflussung führen. Dadurch kommt es zur Aktivierung spezifischer Gensets in den Zellen, die durch parakrine Effekte moduliert wird. Bei der Microarray-Untersuchung von humanen Pankreaskarzinomzellen, die in die Subkutis oder in das Pankreas von Nacktmäusen implantiert wurden, konnten signifikante Unterschiede in der Genexpression aufgedeckt werden. Im Vergleich mit der Monozellkultur kam es zu einer dramatischen Hochregulation einer Vielzahl von tumorassoziierten Genen. Gleichfalls konnte in der orthotopen Implantation eine vermehrte und differenzierte Aktivierung als in der ektopen Implantation nachgewiesen werden. Das orthotope Mikromilieu hat somit einen bedeutenden Einfluss auf die Genexpression in Pankreaskarzinomzellen (Nakamura, Fidler et al. 2007). Auch werden das Tumorwachstum und die körpereigene Reaktion gegen Tumorzellen durch das biologische Umfeld bestimmt. Bei orthotoper Implantation von murinen Pankreaskarzinomzellen kam es zu einem erhöhten Tumorwachstum gegenüber subkutaner Implantation. Auch war die Immunantwort gegen orthotope Tumore deutlich geringer ausgeprägt (Morikane, Tempero et al. 1999).

Um die Tumorbilogie des humanen Pankreaskarzinoms möglichst genau in einem Tiermodell wiedergeben zu können, wurde daher ein syngenes orthotopes Pankreaskarzinom-Modell gewählt. Dieses System ähnelt dem von Morikane et al. etablierten Tiermodell, wurde jedoch in den Zelldosierungen modifiziert (Morikane, Tempero et al. 1999). Die Tumore wurden dabei durch subkapsuläre Injektion von panc02-Tumorzellen in das Pankreas von C57BL/6 Mäusen induziert. Bei der Zelllinie panc02 handelt es sich um eine chemisch induzierte Pankreas-Adenokarzinom-Zelllinie, die aus einer männlichen C57BL/6 Maus

isoliert worden ist. Panc02 Zellen zeigen in-vitro eine sehr hohe Proliferationsrate mit Fokusbildung und in-vivo ein aggressives Wachstum mit Ausbildung schlecht differenzierter G3 Tumore, die jedoch im Gegensatz zum humanen Karzinom einen geringen Stromalen Anteil entwickeln (Corbett, Roberts et al. 1984). Die Zellzahl von 150.000 panc02 Zellen erlaubte bei C57BL/6 Mäusen mit einer Ausgangsmasse von etwa 22g eine Versuchsdauer von 5 Wochen, ehe erste Ausfälle in der Kontrollgruppe bedingt durch die Tumorlast auftraten. Die panc02-Tumore zeigten in-vivo ebenfalls ein Metastasierungsverhalten, das im Vergleich zum humanen Karzinom in der Tendenz aggressiver und frühzeitiger eintrat. Die bevorzugten Organe einer metastatischen Absiedlung waren die Milz, die Leber und das Peritoneum. Die Erzeugung von Metastasen schon bei der Tumorinduktion konnte durch die spezielle Injektionstechnik weitestgehend vermieden werden. Um die Bedeutung mesenchymaler Stammzellen für die Tumorbiologie des Pankreaskarzinoms zu untersuchen, wurden in den Versuchen C57BL/6 Mäusen 2 Wochen nach Tumorinduktion mehrmals MSC intravenös über eine Schwanzvene injiziert. Die MSC wurden zuvor aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen, die die gezielte Deletion für p53 zur Immortalisierung der Zellen trugen, isoliert und positiv als MSC charakterisiert (Von Luttichau, Notohamiprodjo et al. 2005; Lechner and Huss 2006; Conrad, Niess et al. 2009). Da alle Komponenten dieses Modells, also die panc02-Tumorzellen, die mesenchymalen Stammzellen und die C57BL/6 Mäuse, denselben genetischen Hintergrund haben, konnte auf eine Immunsuppression verzichtet werden.

MSC steigern die Aggressivität und die Metastasierung von panc02-Tumoren

Das Pankreaskarzinom zeigt eine ausgeprägte desmoplastische Reaktion mit Proliferation sämtlicher Stromaler Zelltypen. Ishii et al. konnten bei Untersuchungen des Stromas von experimentellen Pankreaskarzinomen nachweisen, dass bis zu 30% der Myofibroblasten einen Ursprung in Knochenmarks-Vorläuferzellen hatten. Diese wurden vor allem in der späten Phase dieses Modells in das Tumorstroma rekrutiert (Ishii, Sangai et al. 2003). Eine ähnliche Rate von Vorläuferzellen konnte in einem Pankreas-Insulinom-Modell gezeigt werden, weshalb das Tumorstroma als systemische Beteiligung am Tumorgeschehen gewertet werden kann (Direkze, Hodivala-Dilke et al. 2004). Beckermann et al. konnten nachweisen, dass intravenös injizierte MSC in das Stroma von Pankreaskarzinomen migrieren und dort eine Rolle in der Angiogenese spielen (Beckermann, Kallifatidis et al. 2008). Dabei ist bisher jedoch nicht verstanden, inwiefern mesenchymale Stammzellen zum Tumorwachstum und zur Tumorprogression des Pankreaskarzinoms beitragen.

Um den Einfluss mesenchymaler Stammzellen auf das Wachstum von Pankreaskarzinomen

zu untersuchen, wurden in C57BL/6-Mäusen panc02- Pankreasadenokarzinome induziert. Beginnend 2 Wochen nach Tumorinduktion wurden den Tieren für 3 Wochen einmal wöchentlich 500.000 syngene p53^{-/-}-MSC über eine Schwanzvene systemisch injiziert. Nach Versuchsbeendigung und Opferung der Tiere zeigte sich eine deutliche Volumen- und Massenzunahme der Tumore in der Tiergruppe, die MSC intravenös erhalten hatten, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die nach Tumorinduktion keine weitere Behandlung erfahren hatte. Ebenfalls war die lokale Aggressivität erhöht, die Tumore waren oftmals infiltrativ in die Nachbarorgane und Gefäße eingebrochen und regelrecht mit diesen verbacken. Als zusätzlicher Parameter wurde der Metastasenbefall der Bauchraumorgane hinzugezogen. Dabei war die Metastasierung in Milz und Leber in beiden Gruppen gleich, während die Peritonealkarzinoserate durch Stammzellgabe deutlich gesteigert worden war. Die systemisch applizierten MSC förderten in dem gewählten Modell das Tumorwachstum und die Tumorprogression. Eine Migration der Stammzellen in die Tumore und die folgende Ausdifferenzierung könnte daher für die beobachteten tumorfördernden Effekte verantwortlich sein.

Die in dem gewählten syngen orthotopen panc02-Tumormodell erhobenen Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen. Das Pankreaskarzinom stellt ebenfalls einen starken Migrationsreiz für mesenchymale Stammzellen dar. Die systemische Applikation von MSC führte durch parakrine Signale der in das Tumorstroma migrierten Stammzellen zu einem verstärkten Tumorwachstum. Dabei konnte nicht nur die Migration, sondern zusätzlich die Aktivierung spezifischer Gensets nachgewiesen werden.

MSC wirken auf parakrine Art und bilden keine eigenen Tumore

Für die Förderung des Tumorwachstums kommen verschiedene Mechanismen in Frage. Die erhöhte Tumormasse und das vergrößerte Volumen könnte durch eine Proliferation der in die Tumore rekrutierten MSC zustande gekommen sein. In der HE-Färbung repräsentativer Schnitte von Tumoren zeigten sich dabei jedoch keine vom Tumor unterschiedlichen Zellansammlungen innerhalb des Tumorstromas, die durch die MSC hätten bedingt sein können. In einem Modell für chronisch entzündliche Darmerkrankungen wurden ebenfalls murine MSC, hier jedoch der Mauslinie BalbC, verabreicht. In diesem nicht malignen Setting zeigten sich keinerlei MSC-Tumore (Khalil, Weiler et al. 2007). Auch in einem Glioblastom-Modell mit intravenöser Zufuhr mesenchymaler Stammzellen konnte keine Proliferation dieser Zellen in-vivo nachgewiesen werden (Sasportas, Kasmieh et al. 2009), sodass dieser Mechanismus für das Tumorwachstum keine Rolle zu spielen scheint.

Ein weiterer tumorfördernder Mechanismus ist die Ausdifferenzierung der Stammzellen, beispielsweise in Endothelien oder CAFs, im Tumorstroma mit konsekutiver Aktivierung gewebespezifischer Gensets (Conrad, Gupta et al. 2007; Mishra, Humeniuk et al. 2008). Dabei kommt es zur Produktion von Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen, matrixmodellierenden Enzymen, die auf parakrine Art und Weise auf die umgebenden Tumorzellen und anderen stromalen Zelltypen wirken (Karnoub, Dash et al. 2007; Spaeth, Dembinski et al. 2009; Xu, Bian et al. 2009).

Beckermann et al. konnten zeigen, dass MSC sich im Stroma des Pankreaskarzinoms in endotheliale Zelltypen ausdifferenzieren können und somit sowohl über direkte Beteiligung an der Angiogenese als auch durch Produktion proangiogenetischer Faktoren wie VEGF das Tumorstromawachstum fördern (Beckermann, Kallifatidis et al. 2008). Diese endotheliale Ausdifferenzierung konnte durch intravenöse Injektion von MSC, die ein Reporter-gen unter der Kontrolle des endothelspezifischen Tie2-Promoters exprimieren, in panc02-tumortragende Mäuse direkt nachgewiesen werden (Conrad, Gupta et al. 2007). In einem experimentellen Gliom-Modell konnte zudem eine Ausdifferenzierung der verabreichten mesenchymalen Stammzellen in Perizyten beobachtet werden, wodurch ebenfalls eine Förderung der Angiogenese erreicht werden konnte (Bexell, Gunnarsson et al. 2009).

Mesenchymale Stammzellen stellen eine Vorläuferpopulation der „carcinoma associated fibroblasts“ (CAF) dar (Mishra, Humeniuk et al. 2008; Bagley, Weber et al. 2009). Ishii et al. haben gezeigt, dass ein erheblicher Teil dieser myofibroblastenartigen Zellen Knochenmarksprung haben (Ishii, Sangai et al. 2003). Auch in einigen in-vitro Studien, in denen MSC mit Tumorzellüberstand für längere Zeit kultiviert wurden, konnte eine Differenzierung in Myofibroblasten mit Expression der Marker α -SMA, Desmin, FSP und FAP beobachtet werden (Mishra, Humeniuk et al. 2008; Spaeth, Dembinski et al. 2009). Spaeth et al. gaben dabei den Überstand von Panc1-Zellen, einer humanen Pankreaskarzinomzelllinie, zu mesenchymalen Stammzellen und kultivierten diese für einige Passagen unter Standardbedingungen. Die auf diese Weise aktivierten Stammzellen exprimierten nach der Inkubation die oben genannten Faktoren und förderten im anschließenden in-vivo Modellversuch das Tumorstromawachstum von Pankreaskarzinomen. Die ausdifferenzierten MSC sezernierten im Stroma verschiedene Wachstumsfaktoren wie TGF- β , HGF, EGF, bFGF, VEGF und Zytokine wie IL6 (Spaeth, Dembinski et al. 2009). Hwang et al. injizierten pankreatische Tumorzellen zusammen mit pankreatischen Sternzellen, die als lokale Vorläuferzellen ebenfalls eine Quelle von CAF darstellen, in einem orthotopen Pankreastumormodell. Dadurch kam es zu einem verstärkten Wachstum der Primärtumore als

auch zu einer erhöhten Metastasierungsrate, zudem wurde die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verstärkt. All diese Effekte waren auf Faktoren mit parakriner Wirkung zurückzuführen (Hwang, Moore et al. 2008). Karnoub et al. waren in der Lage zu zeigen, dass MSC im Rahmen der Ausdifferenzierung spezifische Gensets zur Expression bringen. Sie verwendeten dabei ein ektopes Mammakarzinom-Modell und mischten die Tumorzellen mit MSC. Im Rahmen der Differenzierung und der Stromalen Aktivierung kam es zur de-novo Sekretion des CC Chemokins CCL5, welches die Motilität und Metastasierung der Tumorzellen über seinen Rezeptor CCR5 erhöhte (Karnoub, Dash et al. 2007). Zudem hat CCL5 auch direkte proliferative Wirkungen, wie bei MCF-7 Brustkrebszellen gezeigt werden konnte (Murooka, Rahbar et al. 2009).

Die Ergebnisse in dem gewählten panc02-Tumormodell mit intravenöser Injektion von mesenchymalen Stammzellen stehen also im Einklang mit den Daten, die in verschiedenen Tumormodellen erhoben wurden. Die Ausdifferenzierung der MSC im Stroma der Pankreaskarzinome vornehmlich zu CAF mit konsekutiver Expression verschiedener tumorfördernder Faktoren scheint die entscheidende Rolle für die Massezunahme und aggressivere Metastasierung zu spielen.

Die p53-Deletion ist nicht Ursache der Tumorprogression durch MSC

Die verwendeten mesenchymalen Stammzellen wurden aus C57BL/6 p53^{-/-} knockout Mäusen isoliert. Die Inaktivierung von p53 führt zur Immortalisierung der Zellen bei erhaltener Pluripotenz, so dass diese Zellen ohne Gefahr der Ausdifferenzierung für etliche Passagen in-vitro kultiviert werden konnten. p53 ist jedoch als Tumorsuppressorgen entscheidend für viele Zellprozesse und inaktivierende Mutationen finden sich in einer Vielzahl von Tumoren. Daher stellt sich die Frage, ob der zum Zwecke der Immortalisierung gewollte Knockout des p53 für die Förderung des Tumorwachstums nach Ausdifferenzierung der MSC in Stromale Zelltypen verantwortlich ist bzw. beiträgt. Das Vorhandensein von p53 Mutationen in Stromalen Zellen scheint von der untersuchten Tumorart abhängig zu sein. Dudley et al. fanden bei experimentellen Melanomen und Prostatakarzinomen eine verminderte p53 Aktivität und ein geringeres Ansprechen auf p53 aktivierende Stoffe in Stromalen Zellen, was zu einer gesteigerten genetischen Instabilität im Stroma führte. Dieser Sachverhalt wurde von einem geringeren Ansprechen auf die Chemotherapeutika Vincristin und Etoposid begleitet (Dudley, Shih et al. 2008). Walter et al. haben Fibroblasten von humanen Pankreaskarzinomen auf Expression und Mutationen von p53 hin untersucht. Dabei zeigte sich kein Anhalt für Mutationen oder Veränderungen in der Kopienanzahl, so dass Stromale p53 Mutationen keine entscheidende Rolle für das Pankreaskarzinom zu spielen scheinen (Walter, Omura et al.

2008). Bisher sind noch keine Untersuchungen von MSC auf das Vorliegen von p53 Mutationen bzw. Inaktivierungen vorgenommen worden. Dabei zeichnen sich gerade MSC durch eine besonders geringe intrinsische Mutationsrate aus (Hall, Dembinski et al. 2007), sodass der bewusste Knockout aufgrund nur geringer Akkumulation anderer Mutationen noch nicht zwangsläufig zur Autonomie führt. So führte in einem Pankreastumormodell erst die Kombination von konstitutiver TGF α Überexpression mit dem Knockout von p53 zu einer Beschleunigung der Tumorentwicklung (Wagner, Greten et al. 2001). Eine Förderung des Tumorwachstums und der Tumorprogression durch mesenchymale Stammzellen auch ohne p53 knockout konnte für eine Vielzahl verschiedener in-vivo und in-vitro Modelle gezeigt werden. Darunter befinden sich das Ovarialkarzinom, das Pankreaskarzinom, das Mammakarzinom, das Osteosarkom und das Kolonkarzinom (Karnoub, Dash et al. 2007; Beckermann, Kallifatidis et al. 2008; Mishra, Humeniuk et al. 2008; Coffelt, Marini et al. 2009; Luetzkendorf, Mueller et al. 2009; Spaeth, Dembinski et al. 2009; Xu, Bian et al. 2009). Somit scheint eine Inaktivierung von p53 in einzelnen stromalen Zellen keinen entscheidenden Einfluss auf die Progression des Pankreaskarzinoms zu haben und ist daher in dem gewählten Modell als kausale Ursache zu vernachlässigen.

MSC zeigen keine tumoradversen Effekte im panc02-Modell

Vor dem Hintergrund, dass Tumore Eigenschaften nicht heilender Wunden und chronischer Entzündungen besitzen, ist der Beitrag mesenchymaler Stammzellen zum Tumorwachstum nachvollziehbar. Es wird jedoch in Einzelfällen beschrieben, dass systemisch applizierte MSC tumoradverse Wirkungen hervorrufen können. In einem in-vivo Modell des Kaposi-Sarkoms konnte durch die intravenöse Gabe von MSC eine Inhibition des Tumorwachstums erreicht werden. Durch direkten Zell-Zell Kontakt mit den Tumorzellen wurde dabei die Aktivierung der Akt Proteinkinase inhibiert (Khakoo, Pati et al. 2006). In Modellen des Lungenkarzinoms und des Melanoms konnte eine Verringerung des Tumorwachstums und der Metastasierung durch MSC hervorgerufen werden, woran lösliche Faktoren beteiligt waren (Maestroni, Hertens et al. 1999). Bei einem in-vivo Kolonkarzinom-Modell wurde ebenfalls ein geringeres Tumorwachstum nach MSC Applikation beobachtet, diese Tumore wiesen ein erhöhtes Immunzellinfiltrat auf (Ohlsson, Varas et al. 2003). In anderen Kolonkarzinom-Modellen führte aber gerade die Gabe von MSC zu einem beschleunigten Tumorwachstum (Luetzkendorf, Mueller et al. 2009). Zudem besteht eine Diskrepanz zwischen in-vitro und in-vivo Modellen. Ramasamy et al. konnten in-vitro zeigen, dass MSC zu einem transienten G1-Zellzyklusarrest in verschiedenen Tumorzelllinien führten. Im in-vivo Versuch mit den gleichen Zelllinien hingegen förderten die Stammzellen das Tumorwachstum, indem sie ein

tumorförderliches Umfeld schufen (Ramasamy, Lam et al. 2007). Die Ergebnisse anhand des verwendeten Pankreaskarzinom-Modells sprechen eindeutig für eine tumorfördernde Wirkung systemisch gegebener MSC. Auch die Mehrheit der in-vivo Tumormodelle verschiedenster Malignome bestätigt diese Beobachtung.

MSC aktivieren unter Tumorbedingungen den CCL5-Promoter

Um eine mögliche Expression von Ccl5 durch die MSC nachzuweisen, wurden mesenchymale Stammzellen in-vitro mit rhTNF α stimuliert. Das Zytokin TNF α kann in Fibroblasten und Mesangialzellen über den NF κ B-Signaltransduktionsweg den Ccl5-Promoter aktivieren (Nelson, Kim et al. 1993). MSC sind ebenfalls in der Lage, auf TNF α Stimulation mit einer Produktion von Zytokinen zu antworten (van den Berk, Jansen et al. 2009). TNF α ist in etlichen Tumoren und auch im Pankreaskarzinom hochreguliert (Farrow and Evers 2002; Balkwill 2004). Durch die Stimulation der Stammzellen war eine dosisabhängige Expression von Ccl5 durch die MSC nachweisbar. In Cokultorexperimenten, welche die in-vivo Situation besser darstellen als die TNF α -Stimulation, konnte Makinoshima zeigen, dass Pankreaskarzinomzellen die Expression von CCL5 in mesenchymalen Stammzellen induzieren (Makinoshima and Dezawa 2009). Die CCL5-Produktion durch MSC konnte ebenfalls in einem Osteosarkom-, einem Mammakarzinom- und einem Prostatakarzinom-System nachgewiesen werden (Sung, Hsieh et al. 2008; Pinilla, Alt et al. 2009; Xu, Bian et al. 2009). Panc02 Zellen exprimieren zwar ebenfalls Ccl5 (Tan, Goedegebuure et al. 2009), dennoch erscheinen die systemisch applizierten MSC in diesem Modell als Quelle der gesteigerten Ccl5-Expression gegenüber panc02-Tumoren ohne Stammzellgabe.

In dem vorliegenden panc02-Tumormodell führte die systemische Gabe von syngen MSC ebenfalls zu einem beschleunigtem Tumorwachstum und einer gesteigerten lokalen Aggressivität im Sinne einer Peritonealkarzinose. Um eine mögliche Beteiligung von Ccl5 in Analogie zu dem Mammakarzinom-Modell nachzuweisen, wurde die Ccl5-Expression sowohl in Pankreasnormalgewebe als auch in panc02-Tumoren und panc02-Tumoren mit systemischer Gabe von mesenchymalen Stammzellen auf mRNA Ebene untersucht. Dabei zeigte sich ein erhöhtes Ccl5-Expressionsniveau in Tumoren verglichen mit Normalgewebe. Tumore zeigen meist eine ausgeprägte Entzündungskomponente und die verschiedenen Zelltypen wie Tumorzellen, Fibroblasten und Leukozyten regulieren in diesem Umfeld eine Vielzahl an autokrinen und parakrinen Mediatoren hoch, die zu einer Expression von Ccl5 führen (Coussens and Werb 2002; Farrow, Sugiyama et al. 2004). Interessanterweise war die

Ccl5 Expression in den panc02-Tumoren von Tieren, die MSC intravenös erhalten hatten, nochmals erhöht. Mesenchymale Stammzellen scheinen somit auch im Stroma des Pankreaskarzinoms zu einer erhöhten Expression von Ccl5 zu führen, sei es durch de-novo Sekretion durch die MSC oder durch parakrine Effekte auf die panc02-Zellen.

Um die Produktion von Ccl5 durch die mesenchymalen Stammzellen direkt nachzuweisen, wurden zwei Reporterstammzelllinien kloniert. Dazu wurden die Gene für die beiden fluoreszierenden Proteine RFP und eGFP jeweils unter die Kontrolle des CCL5-Promoters gebracht. Diese Plasmide konnten anschließend in p53^{-/-} MSC transfiziert werden und erfolgreich transfizierte Zellen wurden anschließend über Zugabe von Blasticidin zum Kulturmedium selektioniert. Die erhaltenen CCL5-Promoter/Reporterstammzellen wurden panc02-tumortragenden Mäusen beginnend 2 Wochen nach Tumorinduktion für 3 Wochen einmal wöchentlich intravenös injiziert. Nach Opferung der Tiere konnten in der direkten Fluoreszenzmikroskopie spezifische Reporterensignale in den Tumoren nachgewiesen werden, wohingegen keine Signale in Tieren ohne Stammzellgabe nachweisbar waren. Bei den Fluoreszenzsignalen handelte es sich folglich um den direkten Nachweis der CCL5-Promoteraktivierung in den Stammzellen nach Integration und Ausdifferenzierung im Stroma, sodass MSC im Einklang mit den obigen Ergebnissen eine Quelle von Ccl5 im Pankreaskarzinom darstellen.

Die immunhistochemische Färbung des Reporterproduktes RFP erlaubte eine bessere Darstellung der Morphologie und damit eine bessere Beurteilung der Zellintegration in die Tumore. Dabei zeigten sich Anreicherungen von Reporter-exprimierenden Zellen im Stromal-Kompartiment der panc02-Tumore, im übrigen Tumorgewebe waren nur vereinzelte Zellen nachweisbar. In den darüberhinaus untersuchten Organen ließen sich keine RFP-exprimierenden Zellen nachweisen, lediglich in der roten Pulpa der Milz waren MSC mit Reporterexpression nachweisbar. Eine Migration von MSC in Leber und Thymus kann so zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch findet keine Aktivierung des CCL5-Promoters in diesen Organen statt. Die RFP-Expression in der Milz ist vereinbar mit einer geringen physiologischen Aktivität des CCL5-Promoters in vereinzelten Zellen der roten Pulpa (von Luetichau, Nelson et al. 1996).

Die orthotopen panc02-Tumore stellen einen ausgeprägten Migrationsreiz für intravenös verabreichte mesenchymale Stammzellen dar. Nach Migration in die Tumore integrieren sich die Stammzellen in das tumorassoziierte Stroma und differenzieren sich in verschiedene Zelltypen mit spezifischen Genexpressionsmustern aus. Im Rahmen des Ausdifferenzierungsprozesses aktivieren die MSC gewebespezifisch innerhalb der panc02-

Tumore den CCL5-Promoter und produzieren konsekutiv Ccl5, welches in Tumoren eine tumorfördernde und prometastatische Wirkung entfaltet (Karnoub, Dash et al. 2007; Ostman and Augsten 2009). Durch den Einsatz von CCL5-Promoter/Reporter-gen-Stammzellen konnte diese gewebeabhängige Expression direkt nachgewiesen werden und eine mögliche unspezifische Expression weitestgehend ausgeschlossen werden.

CCL5Pro-TK MSC reduzieren die Tumorwachstumsrate

Wie in den Versuchen nachgewiesen, zeigen mesenchymale Stammzellen bei intravenöser Injektion, also systemischer Gabe, einen ausgeprägten Tropismus zu Tumoren unter weitestgehender Aussparung anderer Organe. Dabei integrieren sich die Stammzellen in das tumorassoziierte Stroma und differenzieren sich in verschiedene Zelltypen wie CAFs, Endothelien oder Perizyten aus. Diese ausdifferenzierten Zellen exprimieren für das Gewebeumfeld spezifische Gensets und tragen über parakrine Wirkungen zum Tumorwachstum, zur Tumorprogression und zur Metastasierung bei. Einer der neugebildeten Faktoren ist das CC-Chemokin CCL5, welches mit Ausnahme der Milz hochspezifisch in den MSC nur nach Integration in das Tumorstroma produziert wird.

Diese Zellen wurden panc02-tumortragenden Tieren über 3 Wochen einmal wöchentlich intravenös verabreicht. Jeder Stammzellgabe folgten 3 Tage zur Migration in den Tumor und Ausdifferenzierung der MSC mit Aktivierung des CCL5-Promoters. Erst danach wurde einmal täglich für 3 Tage 1,5mg Ganciclovir intraperitoneal appliziert. Durch diesen spezifischen Ansatz konnte in dem gewählten panc02-Modell eine Verringerung des Tumolvolumens und eine Tumormassenreduktion um 50% gegenüber der Kontrollgruppe erzielt werden. In der behandelten Gruppe waren keine systemischen Nebenwirkungen zu beobachten, die Histologie zeigte trotz bestehender Hepatotoxizität von Ganciclovir keine strukturelle Schädigung von Leber und trotz geringer Hintergrundaktivität des CCL5-Promoters keine Veränderung der Milz.

Die Tiere zeigten weder Veränderungen des Verhaltens noch objektivierbare unerwünschte Wirkungen wie Durchfälle oder Organversagen. Sämtliche histologisch untersuchte Organe zeigten keine strukturellen Schädigungen, sodass von einer nebenwirkungsarmen Therapie ausgegangen werden kann.

Die deutliche Verringerung des Tumorwachstums spricht für einen erfolgreichen therapeutischen Ansatz unter Ausnutzung der spezifischen Tumorbiologie. Der ausgesprochene Stammzelltropismus zu panc02-Tumoren und die anschließende Ausdifferenzierung im tumorassoziierten Stroma mit konsekutiver Aktivierung des CCL5-

Promoters führten zu einer gesteigerten gewebespezifischen Suizidgenexpression mit keinen beobachteten systemischen Nebenwirkungen. Die lokale Phosphorylierung von intraperitoneal appliziertem Ganciclovir führte zu einer Zytotoxizität, die auf den Tumor beschränkt war. Primäres Ziel des Toxins waren die HSV-TK exprimierenden ausdifferenzierten MSC, sodass zum einen der eigentlich tumorfördernde Effekt von systemisch gegebenen MSC verhindert werden konnte. Doch die Ausbildung des sogenannten „Bystander-effects“ erweiterte zum anderen die Toxizität auf umgebende TK⁻ Zellen, in diesem Fall stromale Zelltypen und panc02-Tumorzellen, sodass es zu einer Massenreduktion des Gesamt tumors kam. Dabei ist bereits ein geringer Prozentsatz an TK⁺ Zellen ausreichend zur Ausbildung eines therapeutischen Effektes (Freeman, Abboud et al. 1993; Marini, Nelson et al. 1995).

CCL5Pro-TK MSC reduzieren die Metastasierung

Besonders vielversprechend für einen möglichen therapeutischen Ansatz einer stammzellbasierten Suizidgentherapie ist eine Verringerung der Metastasierung. Durch das verwendete therapeutische Regime konnte die Metastasierungsrate signifikant verringert werden. Dabei wurde nicht nur die Peritonealkarzinoserate, sondern auch die Metastasierung in die bevorzugten Zielorgane Leber und Milz verringert. Es kommen verschiedene Mechanismen für die reduzierte Metastasierung in Frage.

Das Tumorstroma produziert wichtige Signale, die in die metastatische Kaskade eingebunden sind. In diesem Prozess spielen CAFs, die Tumorgefäße, das mononukleäre Infiltrat und die ständig remodellierte Extrazellulärmatrix eine wichtige Rolle (Coussens and Werb 2002; Karnoub and Weinberg 2006; Ostman and Augsten 2009). Durch die stammzellbasierte Suizidgentherapie wird genau dieses biologische Mikromilieu gezielt angegriffen. Das im Stroma aktivierte Ganciclovir entfaltet seine Toxizität auf die diversen stromalen Zelltypen und kann damit zu einer Reduktion der prometastatischen Faktoren führen.

Als weitere Möglichkeit kommt eine direkte Bekämpfung der Metastasen in Betracht. Metastasen stellen den Primärtumoren ähnlich einen adäquaten Migrationsreiz für MSC dar (Hung, Deng et al. 2005; Kidd, Spaeth et al. 2009; Loebinger, Kyrtatos et al. 2009). Somit kommt es bei intravenöser Applikation nicht nur zu einer MSC-Anreicherung im Stroma der Primärtumore, sondern auch in den Filiae. Metastasen zeigen ebenfalls komplexe Zytokinmuster, unter anderem wird CCL5 exprimiert. So konnte in Mammakarzinom- und Zervixkarzinommetastasen die Expression von CCL5 nachgewiesen werden (Luboshits, Shina et al. 1999; Niwa, Akamatsu et al. 2001). In Analogie zu den Verhältnissen in den induzierten panc02-Tumoren kann es zu einer Migration von MSC in die Metastasen mit

konsekutiver Aktivierung des CCL5-Promoters kommen, wodurch Ganciclovir auch in den Metastasen aktiviert wird und das Wachstum von Metastasen inhibiert wird.

Beide möglichen Mechanismen unterdrücken den Metastasierungsprozess nicht vollständig, sondern reduzieren das Auftreten makroskopisch nachweisbarer Filiae. So wird zum einen durch die Bekämpfung des Tumorstromas die Metastasierungsrate reduziert, zum anderen durch die Stammzellwirkung in den Filiae ein Auswachsen von vorhandenen Mikrometastasen verhindert. Das Auftreten einiger Makrometastasen und weniger Mikrometastasen in der Therapiegruppe muss vor diesem Hintergrund als normal gewertet werden.

Besonderheiten des verwendeten panc02-Modells

Die Zelllinie panc02 wurde ursprünglich aus einem chemisch induzierten Pankreas-Adenokarzinom mit C57BL/6-Hintergrund isoliert. Bei Tumorinduktion durch subkapsuläre panc02-Zellinjektion bilden sich schlecht differenzierte Adenokarzinome aus, die im Gegensatz zum humanen Karzinom nur einen geringen stromalen Anteil bieten (Corbett, Roberts et al. 1984). Trotzdem zeigten sich schon in diesem Modell eine Anreicherung von systemisch gegebenen MSC und durch den Einsatz der CCL5-Promoter/HSV-TK MSC eine deutliche Tumorverkleinerung und Abnahme der Metastasierung. Entsprechend würde man bei Tumoren mit einem größeren stromalen Anteil, die also die humane Situation besser wiedergeben, die therapeutischen Effekte noch ausgeprägter erwarten.

Für einen therapeutischen mesenchymalen Stammzelleinsatz ist es aus verschiedenen Gründen wichtig, möglichst Zellen mit niedriger Passagenzahl zu verwenden. Die Rezeptorausstattung der Zellen ist nicht konstant und variiert mit der Kultivierungsdauer. So ist der Verlust von Chemokinrezeptoren, die für das Migrationsverhalten in-vivo entscheidend sind, beschrieben worden (Honczarenko, Le et al. 2006; Hall, Dembinski et al. 2007). Ebenso zeigen MSC nach Transfektion eine starke Transgenexpression, jedoch nimmt diese bereits nach einigen Passagen drastisch ab (Pereboeva, Komarova et al. 2003). Transfizierte MSC erreichen das Stadium der Seneszenz zudem früher als native Stammzellen (Kallifatidis, Beckermann et al. 2008).

Außerdem berichteten Rosland et al. bei Langzeitkultivierung (5-106 Wochen) von mesenchymalen Stammzellen eine spontane maligne Transformation. Diese Transformation war gekennzeichnet durch eine deutlich geänderte Zellmorphologie, ein limitiertes Ausdifferenzierungspotential und ein „anchorage-independent“ Wachstum in der Zellkultur. Im in-vivo Versuch waren die transformierten MSC nach intravenöser Verabreichung

tumorigen (Rosland, Svendsen et al. 2009).

Daher wurden in dem vorliegenden panc02-Tumormodell niedrige Passagen von MSC zur Therapie eingesetzt. Es kam zu einer Migration der MSC in das Tumorgewebe mit konsekutiver Transgenexpression. In der Untersuchung verschiedener Organe zeigten sich keine durch MSC hervorgerufene Tumore. Obige Probleme beim Einsatz mesenchymaler Stammzellen konnten durch die Nutzung niedriger Passagen in den Versuchen erfolgreich umgangen werden.

Eine Tumorbildung durch mesenchymale Stammzellen konnte in dem verwendeten Modell ausgeschlossen werden. Promoter haben immer eine geringe Hintergrundaktivität, so auch der CCL5-Promoter. Daher kommt es bereits ohne Aktivierung des CCL5-Promoters zu einer geringen Expression der HSV-TK durch die Stammzellen. Durch die therapeutische Ganciclovirgabe werden folglich auch die MSC in tumorfernen Organen abgetötet. Dieser Effekt konnte im in-vitro Experiment nachgewiesen werden. Aufgrund des niedrigen Expressionsniveaus kommt kein „Bystander-effect“ zustande, sodass gesundes Gewebe, zumal meist langsam teilend, geschont wird. So war die Organarchitektur in den untersuchten Geweben regelrecht und die Tiere zeigten keine Nebenwirkungen.

CCL5 wird im humanen Pankreaskarzinom hochreguliert

CCL5 wird von pankreatischen periazinären Myofibroblasten exprimiert und in diesen differenziert reguliert. Myofibroblasten scheinen somit eine Rolle bei der Infiltration und bei der Akkumulation von Entzündungszellen im Pankreas zu spielen (Andoh, Takaya et al. 2000). Bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom auf dem Boden einer chronischen Pankreatitis kommen signifikant erhöht Polymorphismen des CCL5-Promoters vor (Duell, Casella et al. 2006).

Bei der Untersuchung von Pankreaskarzinomgewebe und Pankreasnormalgewebe aus den gleichen Patienten zeigte sich bei der Mehrheit eine deutliche Hochregulation von CCL5-mRNA in den Tumoren. In der Immunhistochemie mit einem monoklonalen Anti-CCL5 Antikörper konnte in den Tumoren die CCL5 Expression auf Proteinebene nachgewiesen werden, wohingegen im Normalgewebe lediglich vereinzelt CCL5 exprimierende Zellen zur Darstellung kamen. CCL5 war vor allem in stromalen Bezirken exprimiert, war aber auch in den Tumorzellen selbst nachweisbar.

Die ausgeprägte desmoplastische Reaktion des humanen Pankreaskarzinoms, der Tropismus mesenchymaler Stammzellen in das tumorassoziierte Stroma und die hochregulierte Aktivität des CCL5-Promoters in stromalen Zellen zeigen die hohe Relevanz der im Tiermodell

erhaltenen Erkenntnisse. Damit werden die Voraussetzungen einer stammzellbasierten und CCL5-Promoter kontrollierten Suizidgentherapie ebenfalls vom humanen Pankreasadenokarzinom erfüllt.

Die direkte CCL5-Inhibition ist nicht attraktiv

Karnoub et al. konnten zeigen, dass durch MSC produziertes CCL5 in ihrem gewählten Mammakarzinom-Modell durch parakrine Wirkung auf Tumorzellen über den korrespondierenden Rezeptor CCR5 entscheidend zur Metastasierung beitrug (Karnoub, Dash et al. 2007). Diverse in-vitro Studien belegen motilitätssteigernde und direkt proliferative Wirkungen auf Tumorzellen durch CCL5 (Murooka, Rahbar et al. 2009; Pinilla, Alt et al. 2009; Tang, Yamamoto et al. 2009). Vor diesem Hintergrund lässt sich die Frage formulieren, weshalb der komplexe Ansatz einer stammzellbasierten Suizidgentherapie statt einer direkten Inhibition des CCL5-Signalweges gewählt wurde.

CCL5 ist nur einer von vielen Faktoren, der in den Prozess der Metastasierung und des Tumorwachstums involviert ist. Etliche Schritte sind dabei redundant organisiert, sprich die alleinige Ausschaltung eines Faktors führt nicht zwangsläufig zum Aufhalten der Progression, viel eher höchstens zu einer Verlangsamung. Zudem wird durch eine entsprechende Inhibition keine Verringerung der bereits bestehenden Tumormassen erreicht. Entsprechende Inhibitoren wurden in malignen Tumormodellen zwar bereits eingesetzt, jedoch mit dem Ziel das Immuninfiltrat zu modulieren und nicht die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und CCL5-produzierenden Stromalen Zellen zu attackieren (Robinson, Scott et al. 2003; Tan, Goedegebuure et al. 2009). Der Vorteil einer stammzellbasierten und promoterregulierten Suizidgentherapie besteht gerade darin, dass gewebespezifisch eine Toxizität erzielt werden kann, die Stromale Interaktionen unterbricht, die bestehenden Tumore und Metastasen angreift und die systemischen Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert. Die CCL5-Inhibition kann jedoch nur systemisch erfolgen, wodurch diese gewebespezifische Wirkung nicht erzielt werden kann. Es kommt zu „off-target“ Wirkungen mit ungewollten Nebenwirkungen, da auch physiologische Aktivität im CCL5-Signalweg unterbunden wird. Diese Inhibition hat in einer Reihe von Versuchen zu massiven Negativfolgen geführt (Virelizier 1999). Einer der Kernpunkte der gewählten stammzellbasierten Suizidgentherapie ist die Ausbildung eines Bystander-Effektes, der zu einem zytotoxischen Milieu führt. Auf diese Weise werden nicht nur die parakrinen Interaktionen wie bei einer CCL5-Inhibition unterbunden, sondern auch aktiv Zellen, insbesondere Tumorzellen, abgetötet. Somit ist eine CCL5-Inhibition dem gewählten Ansatz unterlegen.

Bedeutung stammzellbasierter Therapieansätze für die Zukunft

Trotz des Erfolges der im murinen panc02-Tumormodell eingesetzten stammzellbasierten CCL5Pro-TK MSC Suizidgentherapie müssen in Zukunft noch einige offene Fragen geklärt werden. Zwar konnte der Nachweis erbracht werden, dass mesenchymale Stammzellen nach intravenöser Injektion in Tumorgewebe migrieren. Jedoch konnte bislang nicht geklärt werden, welcher Prozentsatz der applizierten Zellen sich im Zielgewebe anreichert und wie viele Zellen in andere Organe wandern (Hung, Deng et al. 2005; Kidd, Spaeth et al. 2009). Von diesen Tatsachen ist zum einen die Zelldosierung bei therapeutischer Gabe abhängig und zum anderen die Einschätzung potentieller Nebenwirkungen. Das Nebenwirkungsprofil konnte durch den Einsatz des gewebespezifischen CCL5-Promoters deutlich verringert werden. Noch vorhandene unspezifische Hintergrundaktivität wie in der Milz kann durch „promoter-engineering“ zusätzlich reduziert werden (Werner, Fessele et al. 2003). Außerdem muss das Verhalten der mesenchymalen Stammzellen genauer untersucht werden. Wichtig sind hier die Faktoren, die den Zelltropismus bestimmen und die Kinetik der Migration, der Ausdifferenzierung und der CCL5-Promoteraktivierung, um so ein optimiertes Therapieschema zur Maximierung des Wirkerfolges zu entwickeln.

Die Stammzell- und Gentherapie eröffnet neue Wege zur Behandlung von Erkrankungen. In der aktuellen Forschung kristallisiert sich die prominente Rolle aus dem Knochenmark abstammender Vorläuferzellen für die physiologischen und pathologischen Prozesse im Organismus heraus. So sind mesenchymale Stammzellen in den normalen Zellturnover, in die Aufrechterhaltung und die Wiederherstellung der Gewebeintegrität bei Verletzung und Entzündung involviert. Durch Ausdifferenzierung in verschiedene Zelltypen, durch die Produktion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und matrixmodellierenden Proteinen konnten MSC zur Abheilung von Wunden im Rahmen experimenteller Wundmodelle (Rückenmarksdurchtrennung, Hautwunden, CED, KHK) beitragen (Hofstetter, Schwarz et al. 2002; Chen, Hung et al. 2005; Khalil, Weiler et al. 2007). Gerade im Rahmen genetischer Erkrankungen können MSC durch Expression der korrekten Genvariante in den betroffenen Geweben im Sinne einer kombinierten Stammzell- und Gentherapie erfolbringend eingesetzt werden. So konnte durch genetische Veränderung der MSC eine Genkorrektur in betroffenen Geweben von Osteogenesis imperfecta Patienten erreicht werden (Horwitz, Prockop et al. 1999).

Neben der Vielzahl an genetischen und degenerativen Krankheiten bietet sich dieser neue Ansatz auch für maligne Erkrankungen an. Mit dem immer besser werdenden Verständnis der Tumorbiologie sowohl bezüglich der Tumorzellen als auch des supportiven Stromas kann hier

gezielt Einfluss genommen werden. Mit der Kombination der Stammzelltherapie und der selektiven Genterapie vergrößert sich die Bandbreite therapeutischer Optionen, Tumorwachstum, Tumorprogression und Metastasierung zu kontrollieren. Die erhobenen Ergebnisse sind vielversprechend für den klinischen Einsatz einer auf den individuellen Patienten zugeschnittenen kombinierten Stammzell- und Suizidgenterapie. Autologe, aus dem Knochenmark stammende MSC könnten aus dem entsprechenden Tumorpatienten isoliert werden, in-vitro vervielfältigt und mit dem Suizidgenkonstrukt transfiziert werden und anschließend nach wenigen in-vitro Passagen intravenös verabreicht werden. Auf diese Weise wäre keinerlei Immunsuppression oder gar Myeloablation notwendig. Die selektive Kontrolle der Genexpression durch Ausdifferenzierung der mesenchymalen Stammzellen in einem bestimmten Gewebeumfeld sorgt dabei neben dem ausgeprägten Tropismus der MSC zu Tumoren für die Minimierung der systemischen Nebenwirkungen.

Aber dennoch haben sich therapeutische Ansätze, die auf diesen Methoden beruhen und in Tiermodellen hervorragende Ergebnisse geliefert haben, noch nicht in der klinischen Praxis durchsetzen können. Zurzeit stehen die biologischen, methodischen und ethischen Probleme einem breiten Einsatz im Patienten noch im Wege. So müssen die Protokolle zur Isolation von humanen MSC optimiert werden, um zum einen eine Verbesserung hinsichtlich der Effizienz und des Zeitaufwandes zu erreichen, zum anderen um möglichst patientenschonend Zellen isolieren zu können, sodass eine Isolation aus der peripheren Zirkulation die Abhängigkeit vom Knochenmark aufhebt. Ebenfalls müssen standardisierte Protokolle für die in-vitro Kultur entwickelt werden, um Mutationen durch lange Passagierung in der Zellkultur vorzubeugen. Ein weiterer kritischer Punkt ist die Transfektionseffizienz bei Transfektion fremder Gene in die Stammzellen. Virale Vektoren könnten hierbei einen potentiellen Weg darstellen, um schnell und effektiv eine erfolgreiche Transfektion der MSC mit den entsprechenden Suizidgen- oder Genkonstrukten zu ermöglichen (Cavazzana-Calvo, Payen et al. 2010). Ebenso muss die Langzeitsicherheit der transfizierten Zellen im Bezug auf potentielle Gefahr von Zweitmalignomen noch kritisch evaluiert werden. Bisher existieren leider nur wenige klinische Studien mit geringer Fallzahl, in denen mesenchymale Stammzellen klinisch verwendet wurden. Dabei wurden diese Zellen meist nur in-vitro vervielfältigt und nicht mit therapeutischen Genen transfiziert. In diesen Studien zeigte sich bisher jedoch, dass diese expandierten Stammzellen keine Nebenwirkungen bezüglich der Patientensicherheit aufwiesen. Um die größtmögliche Patientensicherheit garantieren zu können, müssen noch etliche Studien durchgeführt werden, um mögliche Nebenwirkungen der Zellen selbst oder durch die exprimierten Suizidgene zu identifizieren.

Die minimale Voraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie ist die anhaltende Produktion des therapeutischen Genproduktes im definierten biologischen Tumormilieu unter Vermeidung systemischer Nebenwirkungen. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen neue Strategien zur Lösung der oben aufgeführten Probleme gefunden werden. Besonders wichtig sind dabei die effiziente Transfektion in die Stammzellen und die selektive Modulation der Genexpression. So könnte die Spezifität des CCL5-Promoters für das Tumorgewebe des Pankreaskarzinoms durch das sogenannte „Promoter-Engineering“ noch erhöht werden, um jegliche unspezifische Hintergrundexpression des therapeutischen Genprodukts in anderen Geweben zu unterdrücken. Ebenfalls wäre denkbar, dass die verschiedenen Tumorentitäten jeweils unterschiedliche Signalkaskaden in den Stammzellen aktivieren, sodass für die jeweilige Entität spezifische Promoter verwendet werden könnten.

Die Kombination aus Stammzell- und Gentherapie bietet sich bei malignen Erkrankungen, bei denen die konventionellen Therapiestrategien keinen Erfolg mehr zeigen, an. So zeigte sich auch das experimentelle Pankreaskarzinom empfindlich für diesen Therapieansatz. Aufgrund des ausgeprägten Migrationsverhaltens der Stammzellen in das Tumorstroma auch in sehr fortgeschrittenen Krankheitsstadien wäre ein potentieller Einsatz dieser Therapie zum Downstaging von Tumoren zum Erreichen einer Operabilität denkbar. Die angewandte CCL5Pro-TK MSC Therapie führte in den Versuchen zu einer signifikanten Reduzierung der Metastasierung, die am ehesten auf einen Tropismus der Zellen zu Metastasen zu erklären war. Somit könnten durch diesen Therapieansatz auch bei inoperabler metastatischer Ausbreitung von Tumoren und bei Tumorrezidiven Erfolge erzielt werden.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Ang	Angiopoetin
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
Bgh	Bovine Growth Hormone
bp/ kbp	basepair/ kilo basepair
BRCA	Breast Cancer, Tumorsuppressorgene
Bsd	Blasticidin
C	Cytosin
C57BL/6	Verwendeter Mäusestamm
Ca	Calcium
CAF	Carcinoma Associated Fibroblast
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL	CC-Chemokinligand
CCL5Pro	CCL5-Promoter
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin Dependent Kinase
cDNA	komplementäre DNA
Cl	Chlor
cm	Zentimeter
c-Met	mesenchymal-epithelial transition factor
CSF	Colony stimulating factor
Cx	Connexin
CXCL	CXC-Chemokinligand
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsRed2	Rot fluoreszierendes Protein dsRed2
E. coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N' - Tetraacetat
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FANC	Fanconi anemia complementation group
FAP	Fibroblast Activated Protein
FCS	fötale Kälberserum
FDF	Fibroblast-derived factor
FGF	Fibroblast Growth Factor
FSP	Fibroblast Specific Protein
G	Guanin
Gcv	Ganciclovir
h	Stunde
HE	Hämatoxylin und Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
Hh	Hedgehog
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSV-TK	Herpes Simplex Virus I Thymidinkinase
HTCR	Human Tissue and Cell Research
IFN	Interferon β
IGF	Insulinlike Growth Factor
IHC	Immunohistochemie
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar (mol pro Liter)

Abkürzungsverzeichnis

m	Meter
m	Milli
μ	Mikro
MCS	Multiple Cloning Site
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
MLH	MutL Homolog
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulphonsäure
mRNA	Messenger RNA
MSC	mesenchymale Stammzellen
MSH	MutS Homolog
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Anzahl
n	nano
Ni	Nickel
OD	Optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
pA	Polyadenylierung
panc02	Tumorzelllinie
PanIN	Pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDA	pankreatisches duktales Adenokarzinom
PDGF	Platlet Derived Growth Factor
PRSS1	Trypsin 1 kodierendes Gen
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptions Polymerase Kettenreaktion
RANTES	Regulated on activation, normally T-cell expressed and secreted (=CCL5)
RFP	rot fluoreszierendes Protein
rhTNFα	rekombinanter humaner TNFα
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute

RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptions- Polymerase Kettenreaktion
SDF-1	Stromal Derived Factor 1 (=CXCL12)
SMAD4	Protein, das in Zellsignaltransduktion involviert ist
SOC	Super Optimal broth with Catabolite Repression
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TAF	Tumor associated Fibroblast
TAM	Tumor associated Macrophage
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF β	Transforming Growth Factor β
TK	Thymidinkinase
TNF α	Tumor necrosis factor α
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
α -SMA	α -Smooth Muscle Actin

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Ausgewählte Wechselwirkungen im Tumorstroma.....	13
Abbildung 2: Ausgewählte Wirkungen von MSC im Tumorstroma	19
Abbildung 3: Klonierstrategie	65
Abbildung 4: Klonierungsstrategie pCMV/Bsd-CCL5Pro-RFP	66
Abbildung 5: Klonierungsstrategie pCMV/Bsd-CCL5Pro-eGFP	67
Abbildung 6: Klonierungsstrategie pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK.....	68
Abbildung 7: Situs nach systemischer MSC-Gabe	76
Abbildung 8: panc02-Tumore nach MSC Gabe.....	77
Abbildung 9: Effekt von MSC auf die Tumormasse.....	78
Abbildung 10: Ccl5 mRNA-Level in murinen Pankreasgeweben	80
Abbildung 11: p53-/- MSC exprimieren bei TNF α -Stimulation Ccl5.....	81
Abbildung 12: Die Reportergenkonstrukte pCMV/Bsd-CCL5Pro-eGFP und pCMV/Bsd-CCL5Pro-RFP	82
Abbildung 13: Trend zur Erhöhung der Tumormasse durch i.v. Gabe von Reporter-gen- MSC	84
Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines panc02-Tumors nach systemischer Gabe von CCL5Pro-RFP MSC	85
Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines panc02-Tumors nach systemischer Gabe von CCL5Pro-eGFP MSC	86
Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von RFP	87
Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis RFP-exprimierender Zellen in verschiedenen Organen	88
Abbildung 18: Das therapeutische Genkonstrukt pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK.....	89
Abbildung 19: Restriktionsverdau des pCMV/Bsd-CCL5Pro-TK Konstruktes	90
Abbildung 20: RT-PCR Nachweis der HSV-TK Expression durch CCLPro-TK MSC in vitro	91
Abbildung 21: Ganciclovir-Wirkung auf CCL5Pro-TK MSC.....	92
Abbildung 22: MTT-Assay von CCL5Pro-TK MSC unter Ganciclovirbehandlung	93
Abbildung 23: MTT-Assay von nativen p53-/- MSC unter Ganciclovirbehandlung	94
Abbildung 24: Strategie der stammzellbasierten Suizidgentherapie.....	96
Abbildung 25: Therapieschema	97
Abbildung 26: panc02-Tumore nach Therapie	98
Abbildung 27: Effekt der CCL5-Promoter regulierten Suizidgentherapie auf die Tumormasse	99
Abbildung 28: HE-Färbung von repräsentativen Tumorschnitten.....	100
Abbildung 29: Paarweise Darstellung der CCL5-Regulation in gesundem und tumorösem Gewebe.....	102
Abbildung 30: Immunhistochemischer Nachweis von CCL5.....	103
Tabelle 1: Auswirkung i.v. applizierter MSC auf das Metastasierungsverhalten.....	78
Tabelle 2: Auswirkung i.v. applizierter Reporter-gen- MSC	85
Tabelle 3: Entwicklung der Tiermassen im Laufe der Therapie	98
Tabelle 4: Effekt der CCL5-Promoter kontrollierten Suizidgentherapie auf das Metastasierungsverhalten der panc02-Tumore	100
Tabelle 5: CCL5-mRNA Expression in humanen Gewebeproben	102

Literaturverzeichnis

- Aboody, K. S., J. Najbauer, et al. (2008). "Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy." Gene Ther **15**(10): 739-52.
- Andea, A., F. Sarkar, et al. (2003). "Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma." Mod Pathol **16**(10): 996-1006.
- Andoh, A., H. Takaya, et al. (2000). "Cytokine regulation of chemokine (IL-8, MCP-1, and RANTES) gene expression in human pancreatic periacinar myofibroblasts." Gastroenterology **119**(1): 211-9.
- Angoulvant, D., A. Clerc, et al. (2004). "Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens." Biorheology **41**(3-4): 469-76.
- Arafat, W. O., E. Casado, et al. (2000). "Genetically modified CD34+ cells exert a cytotoxic bystander effect on human endothelial and cancer cells." Clin Cancer Res **6**(11): 4442-8.
- Austin, E. A. and B. E. Huber (1993). "A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing, and expression of Escherichia coli cytosine deaminase." Mol Pharmacol **43**(3): 380-7.
- Ausubel, F. M., R. Brent, et al. (1987). Current protocols in molecular biology. .
- Azenshtein, E., G. Luboshits, et al. (2002). "The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity." Cancer Res **62**(4): 1093-102.
- Bagley, R. G., W. Weber, et al. (2009). "Human mesenchymal stem cells from bone marrow express tumor endothelial and stromal markers." Int J Oncol **34**(3): 619-27.
- Balkwill, F. (2004). "Cancer and the chemokine network." Nat Rev Cancer **4**(7): 540-50.
- Beckermann, B. M., G. Kallifatidis, et al. (2008). "VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma." Br J Cancer **99**(4): 622-31.
- Bexell, D., S. Gunnarsson, et al. (2009). "Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas." Mol Ther **17**(1): 183-90.
- Bhowmick, N. A. and H. L. Moses (2005). "Tumor-stroma interactions." Curr Opin Genet Dev **15**(1): 97-101.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson, et al. (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." Nature **432**(7015): 332-7.
- Bi, W. L., L. M. Parysek, et al. (1993). "In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy." Hum Gene Ther **4**(6): 725-31.
- Bissell, M. J. and D. Radisky (2001). "Putting tumours in context." Nat Rev Cancer **1**(1): 46-54.

- Black, M. E., T. G. Newcomb, et al. (1996). "Creation of drug-specific herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants for gene therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(8): 3525-9.
- Bridgewater, J. A., C. J. Springer, et al. (1995). "Expression of the bacterial nitroreductase enzyme in mammalian cells renders them selectively sensitive to killing by the prodrug CB1954." Eur J Cancer **31A**(13-14): 2362-70.
- Cameron, J. L., D. W. Crist, et al. (1991). "Factors influencing survival after pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer." Am J Surg **161**(1): 120-4; discussion 124-5.
- Carystinos, G. D., M. M. Katabi, et al. (1999). "Cyclic-AMP induction of gap junctional intercellular communication increases bystander effect in suicide gene therapy." Clin Cancer Res **5**(1): 61-8.
- Cavazzana-Calvo, M., E. Payen, et al. (2010). "Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia." Nature **467**(7313): 318-22.
- Chamberlain, G., J. Fox, et al. (2007). "Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing." Stem Cells **25**(11): 2739-49.
- Chang, H. Y., D. S. Nuyten, et al. (2005). "Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(10): 3738-43.
- Chen, H. K., H. F. Hung, et al. (2005). "Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction." Eur J Clin Invest **35**(11): 677-86.
- Cheng, Y. C., S. P. Grill, et al. (1983). "Metabolism of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, a new anti-herpes virus compound, in herpes simplex virus-infected cells." J Biol Chem **258**(20): 12460-4.
- Chu, G. C., A. C. Kimmelman, et al. (2007). "Stromal biology of pancreatic cancer." J Cell Biochem **101**(4): 887-907.
- Chuang, J. Y., W. H. Yang, et al. (2009). "CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells." J Cell Physiol **220**(2): 418-26.
- Coffelt, S. B., F. C. Marini, et al. (2009). "The pro-inflammatory peptide LL-37 promotes ovarian tumor progression through recruitment of multipotent mesenchymal stromal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(10): 3806-11.
- Colombo, B. M., S. Benedetti, et al. (1995). "The "bystander effect": association of U-87 cell death with ganciclovir-mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice." Hum Gene Ther **6**(6): 763-72.
- Condeelis, J. and J. W. Pollard (2006). "Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis." Cell **124**(2): 263-6.
- Conrad, C., R. Gupta, et al. (2007). "Genetically engineered stem cells for therapeutic gene delivery." Curr Gene Ther **7**(4): 249-60.

- Conrad, C., H. Niess, et al. (2009). "Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo." Circulation **119**(2): 281-9.
- Constantin, G., S. Marconi, et al. (2009). "Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Chronic Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." Stem Cells **27**(10): 2624-2635.
- Corbett, T. H., B. J. Roberts, et al. (1984). "Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice." Cancer Res **44**(2): 717-26.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia, et al. (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." Gene **173**(1 Spec No): 33-8.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-7.
- Culver, K. W., Z. Ram, et al. (1992). "In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors." Science **256**(5063): 1550-2.
- Cunha, G. R. and Y. K. Hom (1996). "Role of mesenchymal-epithelial interactions in mammary gland development." J Mammary Gland Biol Neoplasia **1**(1): 21-35.
- Darash-Yahana, M., E. Pikarsky, et al. (2004). "Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis." FASEB J **18**(11): 1240-2.
- De Falco, E., D. Porcelli, et al. (2004). "SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells." Blood **104**(12): 3472-82.
- Denning, C. and J. D. Pitts (1997). "Bystander effects of different enzyme-prodrug systems for cancer gene therapy depend on different pathways for intercellular transfer of toxic metabolites, a factor that will govern clinical choice of appropriate regimes." Hum Gene Ther **8**(15): 1825-35.
- Dilber, M. S., M. R. Abedi, et al. (1996). "Suicide gene therapy for plasma cell tumors." Blood **88**(6): 2192-200.
- Direkze, N. C., K. Hodiwalla-Dilke, et al. (2004). "Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts." Cancer Res **64**(23): 8492-5.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-7.
- Drake, R. R., K. Pitlyk, et al. (2000). "Connexin-independent ganciclovir-mediated killing conferred on bystander effect-resistant cell lines by a herpes simplex virus-thymidine kinase-expressing colon cell line." Mol Ther **2**(5): 515-23.
- Dudley, A. C., S. C. Shih, et al. (2008). "Attenuated p53 activation in tumour-associated stromal cells accompanies decreased sensitivity to etoposide and vincristine." Br J Cancer **99**(1): 118-25.
- Duell, E. J., D. P. Casella, et al. (2006). "Inflammation, genetic polymorphisms in proinflammatory genes TNF-A, RANTES, and CCR5, and risk of pancreatic adenocarcinoma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(4): 726-31.

- Duflot-Dancer, A., C. Piccoli, et al. (1998). "Long-term connexin-mediated bystander effect in highly tumorigenic human cells in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy." Gene Ther **5**(10): 1372-8.
- Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." N Engl J Med **315**(26): 1650-9.
- Engelmann, C., J. M. Heslan, et al. (2002). "Importance, mechanisms and limitations of the distant bystander effect in cancer gene therapy of experimental liver tumors." Cancer Lett **179**(1): 59-69.
- Erreni, M., P. Bianchi, et al. (2009). "Expression of chemokines and chemokine receptors in human colon cancer." Methods Enzymol **460**: 105-21.
- Farrow, B. and B. M. Evers (2002). "Inflammation and the development of pancreatic cancer." Surg Oncol **10**(4): 153-69.
- Farrow, B., Y. Sugiyama, et al. (2004). "Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development." Ann Surg **239**(6): 763-9; discussion 769-71.
- Faulds, D. and R. C. Heel (1990). "Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections." Drugs **39**(4): 597-638.
- Fick, J., F. G. Barker, 2nd, et al. (1995). "The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11071-5.
- Field, A. K., M. E. Davies, et al. (1983). "9-([2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine: a selective inhibitor of herpes group virus replication." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(13): 4139-43.
- Fillat, C., M. Carrio, et al. (2003). "Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application." Curr Gene Ther **3**(1): 13-26.
- Finak, G., N. Bertos, et al. (2008). "Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer." Nat Med **14**(5): 518-27.
- Fischer, M., M. Juremalm, et al. (2003). "Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg cells and its possible role in the recruitment of mast cells into lymphomatous tissue." Int J Cancer **107**(2): 197-201.
- Fleming, J. B., G. L. Shen, et al. (2005). "Molecular consequences of silencing mutant K-ras in pancreatic cancer cells: justification for K-ras-directed therapy." Mol Cancer Res **3**(7): 413-23.
- Forst, B., M. T. Hansen, et al. "Metastasis-inducing S100A4 and RANTES cooperate in promoting tumor progression in mice." PLoS One **5**(4): e10374.
- Freeman, S. M., C. N. Abboud, et al. (1993). "The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified." Cancer Res **53**(21): 5274-83.
- Gambhir, S. S., E. Bauer, et al. (2000). "A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2785-90.

- Gao, D. and V. Mittal (2009). "The role of bone-marrow-derived cells in tumor growth, metastasis initiation and progression." Trends Mol Med **15**(8): 333-43.
- Graham, D., B. A. Larder, et al. (1986). "Evidence that the 'active centre' of the herpes simplex virus thymidine kinase involves an interaction between three distinct regions of the polypeptide." J Gen Virol **67** (Pt 4): 753-8.
- Guignard, F., C. Combadiere, et al. (1998). "Gene organization and promoter function for CC chemokine receptor 5 (CCR5)." J Immunol **160**(2): 985-92.
- Haas, J., E. C. Park, et al. (1996). "Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein." Curr Biol **6**(3): 315-24.
- Hall, B., J. Dembinski, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles." Int J Hematol **86**(1): 8-16.
- Halloran, P. J. and R. G. Fenton (1998). "Irreversible G2-M arrest and cytoskeletal reorganization induced by cytotoxic nucleoside analogues." Cancer Res **58**(17): 3855-65.
- Hamel, W., L. Magnelli, et al. (1996). "Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells." Cancer Res **56**(12): 2697-702.
- Hammerling, G. J. and R. Ganss (2006). "Vascular integration of endothelial progenitors during multistep tumor progression." Cell Cycle **5**(5): 509-11.
- Hata, N., N. Shinojima, et al. "Platelet-Derived Growth Factor BB Mediates the Tropism of Human Mesenchymal Stem Cells for Malignant Gliomas." Neurosurgery **66**(1): 144-57.
- Hayward, S. W., Y. Wang, et al. (2001). "Malignant transformation in a nontumorigenic human prostatic epithelial cell line." Cancer Res **61**(22): 8135-42.
- Hofstetter, C. P., E. J. Schwarz, et al. (2002). "Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2199-204.
- Honczarenko, M., Y. Le, et al. (2006). "Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors." Stem Cells **24**(4): 1030-41.
- Horwitz, E. M., P. L. Gordon, et al. (2002). "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8932-7.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, et al. (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." Nat Med **5**(3): 309-13.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, et al. (2001). "Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta." Blood **97**(5): 1227-31.
- Hruban, R. H., R. E. Wilentz, et al. (2005). "Identification and analysis of precursors to invasive pancreatic cancer." Methods Mol Med **103**: 1-13.

- Hung, S. C., W. P. Deng, et al. (2005). "Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging." Clin Cancer Res **11**(21): 7749-56.
- Huss, R., M. Heil, et al. (2004). "Improved arteriogenesis with simultaneous skeletal muscle repair in ischemic tissue by SCL(+) multipotent adult progenitor cell clones from peripheral blood." J Vasc Res **41**(5): 422-31.
- Hwang, R. F., T. Moore, et al. (2008). "Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression." Cancer Res **68**(3): 918-26.
- Ilsley, D. D., S. H. Lee, et al. (1995). "Acyclic guanosine analogs inhibit DNA polymerases alpha, delta, and epsilon with very different potencies and have unique mechanisms of action." Biochemistry **34**(8): 2504-10.
- Ishii, G., T. Sangai, et al. (2003). "Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction." Biochem Biophys Res Commun **309**(1): 232-40.
- Jacks, T., L. Remington, et al. (1994). "Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice." Curr Biol **4**(1): 1-7.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Kaldor, J. M., N. E. Day, et al. (1990). "Leukemia following Hodgkin's disease." N Engl J Med **322**(1): 7-13.
- Kaldor, J. M., N. E. Day, et al. (1990). "Leukemia following chemotherapy for ovarian cancer." N Engl J Med **322**(1): 1-6.
- Kallifatidis, G., B. M. Beckermann, et al. (2008). "Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer." Cancer Gene Ther **15**(4): 231-40.
- Karnoub, A. E., A. B. Dash, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis." Nature **449**(7162): 557-63.
- Karnoub, A. E. and R. A. Weinberg (2006). "Chemokine networks and breast cancer metastasis." Breast Dis **26**: 75-85.
- Khakoo, A. Y., S. Pati, et al. (2006). "Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma." J Exp Med **203**(5): 1235-47.
- Khalil, P. N., V. Weiler, et al. (2007). "Nonmyeloablative stem cell therapy enhances microcirculation and tissue regeneration in murine inflammatory bowel disease." Gastroenterology **132**(3): 944-54.
- Kianmanesh, A. R., H. Perrin, et al. (1997). "A "distant" bystander effect of suicide gene therapy: regression of nontransduced tumors together with a distant transduced tumor." Hum Gene Ther **8**(15): 1807-14.
- Kidd, S., E. Spaeth, et al. (2009). "Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescence Imaging." Stem Cells.

- Kimura, T., Yamaguchi (1994). "Blasticidin S deaminase gene from *Aspergillus terreus* (BSD): a new drug resistance gene for transfection of mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1219**(3): 653-659.
- Klatzmann, D., P. Cherin, et al. (1998). "A phase I/II dose-escalation study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for metastatic melanoma. Study Group on Gene Therapy of Metastatic Melanoma." Hum Gene Ther **9**(17): 2585-94.
- Klatzmann, D., C. A. Valery, et al. (1998). "A phase I/II study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for recurrent glioblastoma. Study Group on Gene Therapy for Glioblastoma." Hum Gene Ther **9**(17): 2595-604.
- Kleeff, J., T. Kusama, et al. (1999). "Detection and localization of Mip-3alpha/LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer." Int J Cancer **81**(4): 650-7.
- Konig, J. E., T. Senge, et al. (2004). "Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer." Prostate **58**(2): 121-9.
- Korbling, M., Z. Estrov, et al. (2003). "Adult stem cells and tissue repair." Bone Marrow Transplant **32 Suppl 1**: S23-4.
- Koshiha, T., R. Hosotani, et al. (2000). "Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression." Clin Cancer Res **6**(9): 3530-5.
- Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, et al. (2006). "Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma." Cancer Res **66**(2): 632-7.
- Kroemer, G. and J. Pouyssegur (2008). "Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel." Cancer Cell **13**(6): 472-82.
- Kumar, S., D. Chanda, et al. (2008). "Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells." Gene Ther **15**(10): 711-5.
- Kunter, U., S. Rong, et al. (2006). "Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis." J Am Soc Nephrol **17**(8): 2202-12.
- Lange, C., F. Tögel, et al. (2005). "Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats." Kidney Int **68**(4): 1613-7.
- Lazarus, H. M., O. N. Koc, et al. (2005). "Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients." Biol Blood Marrow Transplant **11**(5): 389-98.
- Lazennec, G. and C. Jorgensen (2008). "Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit?" Stem Cells **26**(6): 1387-94.
- Lechner, S. and R. Huss (2006). "Bone engineering: combining smart biomaterials and the application of stem cells." Artif Organs **30**(10): 770-4.
- Li, H., X. Fan, et al. (2007). "Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer." J Cell Biochem **101**(4): 805-15.

- Loebinger, M. R., A. Eddaoudi, et al. (2009). "Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer." Cancer Res **69**(10): 4134-42.
- Loebinger, M. R., P. G. Kyrtatos, et al. (2009). "Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles." Cancer Res **69**(23): 8862-7.
- Loos, M., H. Friess, et al. (2009). "[Surgery of malignant pancreatic tumors]." Radiologe **49**(2): 137-43.
- Lowenfels, A. B., P. Maisonneuve, et al. (1993). "Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group." N Engl J Med **328**(20): 1433-7.
- Lu, L., C. Zhao, et al. (2005). "Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease." Brain Res Brain Res Protoc **15**(1): 46-51.
- Luboshits, G., S. Shina, et al. (1999). "Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma." Cancer Res **59**(18): 4681-7.
- Luetzkendorf, J., L. P. Mueller, et al. (2009). "Growth-inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence." J Cell Mol Med.
- Maeshima, A. M., T. Niki, et al. (2002). "Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma." Cancer **95**(12): 2546-54.
- Maestroni, G. J., E. Hertens, et al. (1999). "Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice." Cell Mol Life Sci **55**(4): 663-7.
- Mahadevan, D. and D. D. Von Hoff (2007). "Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma." Mol Cancer Ther **6**(4): 1186-97.
- Maitra, A., N. Fukushima, et al. (2005). "Precursors to invasive pancreatic cancer." Adv Anat Pathol **12**(2): 81-91.
- Makinen, K., S. Loimas, et al. (2000). "Evaluation of herpes simplex thymidine kinase mediated gene therapy in experimental pancreatic cancer." J Gene Med **2**(5): 361-7.
- Makinoshima, H. and M. Dezawa (2009). "Pancreatic cancer cells activate CCL5 expression in mesenchymal stromal cells through the insulin-like growth factor-I pathway." FEBS Lett **583**(22): 3697-703.
- Malka, D., P. Hammel, et al. (2002). "Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis." Gut **51**(6): 849-52.
- Mansilla, E., G. H. Marin, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries." Transplant Proc **37**(1): 292-4.
- Marini, F. C., 3rd, J. A. Nelson, et al. (1995). "Assessment of bystander effect potency produced by intratumoral implantation of HSVtk-expressing cells using surrogate marker secretion to monitor tumor growth kinetics." Gene Ther **2**(9): 655-9.
- Matthews, T. and R. Boehme (1988). "Antiviral activity and mechanism of action of ganciclovir." Rev Infect Dis **10 Suppl 3**: S490-4.

- Matz, M. V., A. F. Fradkov, et al. (1999). "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species." Nat Biotechnol **17**(10): 969-73.
- Mesnil, M. and H. Yamasaki (2000). "Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication." Cancer Res **60**(15): 3989-99.
- Mishra, P. J., J. W. Glod, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells: flip side of the coin." Cancer Res **69**(4): 1255-8.
- Mishra, P. J., R. Humeniuk, et al. (2008). "Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells." Cancer Res **68**(11): 4331-9.
- Monti, P., B. E. Leone, et al. (2003). "The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity." Cancer Res **63**(21): 7451-61.
- Moolten, F. L. (1986). "Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy." Cancer Res **46**(10): 5276-81.
- Morfin, F., G. Souillet, et al. (2000). "Genetic characterization of thymidine kinase from acyclovir-resistant and -susceptible herpes simplex virus type 1 isolated from bone marrow transplant recipients." J Infect Dis **182**(1): 290-3.
- Morikane, K., R. M. Tempero, et al. (1999). "Organ-specific pancreatic tumor growth properties and tumor immunity." Cancer Immunol Immunother **47**(5): 287-96.
- Mrowietz, U., U. Schwenk, et al. (1999). "The chemokine RANTES is secreted by human melanoma cells and is associated with enhanced tumour formation in nude mice." Br J Cancer **79**(7-8): 1025-31.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." Nat Rev Cancer **4**(11): 839-49.
- Muerkoster, S., K. Wegehenkel, et al. (2004). "Tumor stroma interactions induce chemoresistance in pancreatic ductal carcinoma cells involving increased secretion and paracrine effects of nitric oxide and interleukin-1beta." Cancer Res **64**(4): 1331-7.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." Nature **410**(6824): 50-6.
- Murooka, T. T., R. Rahbar, et al. (2009). "CCL5 promotes proliferation of MCF-7 cells through mTOR-dependent mRNA translation." Biochem Biophys Res Commun **387**(2): 381-6.
- Nagaraj, S., C. Ziske, et al. (2006). "Dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide induce anti-tumor immunity against pancreatic cancer in vivo." Int Immunol **18**(8): 1279-83.
- Nakamizo, A., F. Marini, et al. (2005). "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas." Cancer Res **65**(8): 3307-18.
- Nakamura, T., I. J. Fidler, et al. (2007). "Gene expression profile of metastatic human pancreatic cancer cells depends on the organ microenvironment." Cancer Res **67**(1): 139-48.

- Nasef, A., N. Mathieu, et al. (2007). "Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G." Transplantation **84**(2): 231-7.
- Nelson, P. J., H. T. Kim, et al. (1993). "Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene." J Immunol **151**(5): 2601-12.
- Niwa, Y., H. Akamatsu, et al. (2001). "Correlation of tissue and plasma RANTES levels with disease course in patients with breast or cervical cancer." Clin Cancer Res **7**(2): 285-9.
- Ohlsson, L. B., L. Varas, et al. (2003). "Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix." Exp Mol Pathol **75**(3): 248-55.
- Olive, K. P., M. A. Jacobetz, et al. (2009). "Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer." Science **324**(5933): 1457-61.
- Olumi, A. F., G. D. Grossfeld, et al. (1999). "Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium." Cancer Res **59**(19): 5002-11.
- Opitz, C. A., U. M. Litzemberger, et al. (2009). "Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R." Stem Cells **27**(4): 909-19.
- Orimo, A., P. B. Gupta, et al. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." Cell **121**(3): 335-48.
- Orimo, A. and R. A. Weinberg (2006). "Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type." Cell Cycle **5**(15): 1597-601.
- Orlic, D. (2003). "Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease." Ann N Y Acad Sci **996**: 152-7.
- Ostman, A. and M. Augsten (2009). "Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players." Curr Opin Genet Dev **19**(1): 67-73.
- Patterson, A. V., H. Zhang, et al. (1995). "Increased sensitivity to the prodrug 5'-deoxy-5-fluorouridine and modulation of 5-fluoro-2'-deoxyuridine sensitivity in MCF-7 cells transfected with thymidine phosphorylase." Br J Cancer **72**(3): 669-75.
- Pereboeva, L., S. Komarova, et al. (2003). "Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles." Stem Cells **21**(4): 389-404.
- Pereira, R. F., M. D. O'Hara, et al. (1998). "Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(3): 1142-7.
- Phinney, D. G. and D. J. Prockop (2007). "Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views." Stem Cells **25**(11): 2896-902.
- Pilger, B. D., R. Perozzo, et al. (1999). "Substrate diversity of herpes simplex virus thymidine kinase. Impact Of the kinematics of the enzyme." J Biol Chem **274**(45): 31967-73.

- Pinilla, S., E. Alt, et al. (2009). "Tissue resident stem cells produce CCL5 under the influence of cancer cells and thereby promote breast cancer cell invasion." Cancer Lett **284**(1): 80-5.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, et al. (1992). "Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein." Gene **111**(2): 229-33.
- Qian, L. W., K. Mizumoto, et al. (2003). "Co-cultivation of pancreatic cancer cells with orthotopic tumor-derived fibroblasts: fibroblasts stimulate tumor cell invasion via HGF secretion whereas cancer cells exert a minor regulative effect on fibroblasts HGF production." Cancer Lett **190**(1): 105-12.
- Qiao, J., M. E. Black, et al. (2000). "Enhanced ganciclovir killing and bystander effect of human tumor cells transduced with a retroviral vector carrying a herpes simplex virus thymidine kinase gene mutant." Hum Gene Ther **11**(11): 1569-76.
- Ram, Z., K. W. Culver, et al. (1997). "Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells." Nat Med **3**(12): 1354-61.
- Raman, D., P. J. Baugher, et al. (2007). "Role of chemokines in tumor growth." Cancer Lett **256**(2): 137-65.
- Ramasamy, R., E. W. Lam, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth." Leukemia **21**(2): 304-10.
- Rasmusson, I., O. Ringden, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells." Transplantation **76**(8): 1208-13.
- Rasmusson, I., M. Uhlin, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes." J Leukoc Biol **82**(4): 887-93.
- Relling, M. V., J. E. Rubnitz, et al. (1999). "High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites." Lancet **354**(9172): 34-9.
- Ren, C., S. Kumar, et al. (2008). "Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model." Stem Cells **26**(9): 2332-8.
- Robinson, S. C., K. A. Scott, et al. (2002). "Chemokine stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-9 requires endogenous TNF-alpha." Eur J Immunol **32**(2): 404-12.
- Robinson, S. C., K. A. Scott, et al. (2003). "A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth." Cancer Res **63**(23): 8360-5.
- Rosland, G. V., A. Svendsen, et al. (2009). "Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation." Cancer Res **69**(13): 5331-9.
- Rubsam, L. Z., P. D. Boucher, et al. (1999). "Cytotoxicity and accumulation of ganciclovir triphosphate in bystander cells cocultured with herpes simplex virus type 1 thymidine kinase-expressing human glioblastoma cells." Cancer Res **59**(3): 669-75.

- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandmair, A. M., M. Vapalahti, et al. (2000). "Adenovirus-mediated herpes simplex thymidine kinase gene therapy for brain tumors." Adv Exp Med Biol **465**: 163-70.
- Sasaki, M., R. Abe, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type." J Immunol **180**(4): 2581-7.
- Sasportas, L. S., R. Kasmieh, et al. (2009). "Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4822-7.
- Satoh, H., K. Kishi, et al. (2004). "Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds." Cell Transplant **13**(4): 405-12.
- Saur, D., B. Seidler, et al. (2005). "CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer." Gastroenterology **129**(4): 1237-50.
- Schall, T. J. (1991). "Biology of the RANTES/SIS cytokine family." Cytokine **3**(3): 165-83.
- Schmidt, A., D. Ladage, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier." Eur J Cell Biol **85**(11): 1179-88.
- Siegel, P. M. and J. Massague (2003). "Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer." Nat Rev Cancer **3**(11): 807-21.
- Silva, G. V., S. Litovsky, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model." Circulation **111**(2): 150-6.
- Silzle, T., M. Kreutz, et al. (2003). "Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue." Eur J Immunol **33**(5): 1311-20.
- Slade, N., I. Galetic, et al. (2001). "The efficacy of retroviral herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer and ganciclovir treatment on the inhibition of melanoma growth in vitro and in vivo." Arch Dermatol Res **293**(10): 484-90.
- Son, B. R., L. A. Marquez-Curtis, et al. (2006). "Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases." Stem Cells **24**(5): 1254-64.
- Soria, G. and A. Ben-Baruch (2008). "The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer." Cancer Lett **267**(2): 271-85.
- Soria, G., N. Yaal-Hahoshen, et al. (2008). "Concomitant expression of the chemokines RANTES and MCP-1 in human breast cancer: a basis for tumor-promoting interactions." Cytokine **44**(1): 191-200.
- Spaeth, E. L., J. L. Dembinski, et al. (2009). "Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression." PLoS One **4**(4): e4992.

- Spees, J. L., S. D. Olson, et al. (2003). "Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2397-402.
- Stagg, J. (2008). "Mesenchymal stem cells in cancer." Stem Cell Rev **4**(2): 119-24.
- Stormes, K. A., C. A. Lemken, et al. (2005). "Inhibition of metastasis by inhibition of tumor-derived CCL5." Breast Cancer Res Treat **89**(2): 209-12.
- Studený, M., F. C. Marini, et al. (2002). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors." Cancer Res **62**(13): 3603-8.
- Studený, M., F. C. Marini, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents." J Natl Cancer Inst **96**(21): 1593-603.
- Sung, S. Y., C. L. Hsieh, et al. (2008). "Coevolution of prostate cancer and bone stroma in three-dimensional coculture: implications for cancer growth and metastasis." Cancer Res **68**(23): 9996-10003.
- Tan, M. C., P. S. Goedegebuure, et al. (2009). "Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer." J Immunol **182**(3): 1746-55.
- Tanaka, T., Z. Bai, et al. (2005). "Chemokines in tumor progression and metastasis." Cancer Sci **96**(6): 317-22.
- Tang, C. H., A. Yamamoto, et al. (2009). "Involvement of matrix metalloproteinase-3 in CCL5/CCR5 pathway of chondrosarcomas metastasis." Biochem Pharmacol.
- Thalmeier, K. and R. Huss (2001). "Highly efficient retroviral gene transfer into immortalized CD34(-) cells and organ distribution after transplantation into NOD/SCID mice." Cytotherapy **3**(4): 245-51.
- Thasler, W. E., T. S. Weiss, et al. (2003). "Charitable State-Controlled Foundation Human Tissue and Cell Research: Ethic and Legal Aspects in the Supply of Surgically Removed Human Tissue For Research in the Academic and Commercial Sector in Germany." Cell Tissue Bank **4**(1): 49-56.
- Theunissen, J. W. and F. J. de Sauvage (2009). "Paracrine Hedgehog signaling in cancer." Cancer Res **69**(15): 6007-10.
- Thust, R., M. Schacke, et al. (1996). "Cytogenetic genotoxicity of antiherpes virostatics in Chinese hamster V79-E cells. I. Purine nucleoside analogues." Antiviral Res **31**(1-2): 105-13.
- Tian, H., C. A. Callahan, et al. (2009). "Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(11): 4254-9.
- Trosko, J. E., B. V. Madhukar, et al. (1993). "Endogenous and exogenous modulation of gap junctional intercellular communication: toxicological and pharmacological implications." Life Sci **53**(1): 1-19.
- Uchibori, R., T. Okada, et al. (2009). "Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy." J Gene Med **11**(5): 373-81.

- Vaananen, H. K. (2005). "Mesenchymal stem cells." Ann Med **37**(7): 469-79.
- Vaday, G. G., D. M. Peehl, et al. (2006). "Expression of CCL5 (RANTES) and CCR5 in prostate cancer." Prostate **66**(2): 124-34.
- van den Berk, L. C., B. J. Jansen, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells respond to TNF but do not produce TNF." J Leukoc Biol.
- van Dillen, I. J., N. H. Mulder, et al. (2002). "Influence of the bystander effect on HSV-tk/GCV gene therapy. A review." Curr Gene Ther **2**(3): 307-22.
- Vile, R. G., J. A. Nelson, et al. (1994). "Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component." Cancer Res **54**(23): 6228-34.
- Virelizier, J. L. (1999). "Blocking HIV co-receptors by chemokines." Dev Biol Stand **97**: 105-9.
- von Luettichau, I., P. J. Nelson, et al. (1996). "RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues." Cytokine **8**(1): 89-98.
- Von Lutichau, I., M. Notohamiprodjo, et al. (2005). "Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4." Stem Cells Dev **14**(3): 329-36.
- Wagner, M., F. R. Greten, et al. (2001). "A murine tumor progression model for pancreatic cancer recapitulating the genetic alterations of the human disease." Genes Dev **15**(3): 286-93.
- Walling, H. W., J. T. Swarthout, et al. (2000). "Bystander-mediated regression of osteosarcoma via retroviral transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and human interleukin-2 genes." Cancer Gene Ther **7**(2): 187-96.
- Walter, K., N. Omura, et al. (2008). "Pancreatic cancer associated fibroblasts display normal allelotypes." Cancer Biol Ther **7**(6): 882-8.
- Wei, M. X., P. Bougnoux, et al. (1998). "Suicide gene therapy of chemically induced mammary tumor in rat: efficacy and distant bystander effect." Cancer Res **58**(16): 3529-32.
- Wei, S. J., Y. Chao, et al. (1999). "Involvement of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in apoptosis induced by ganciclovir treatment of tumor cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase." Gene Ther **6**(3): 420-31.
- Werner, T., S. Fessele, et al. (2003). "Computer modeling of promoter organization as a tool to study transcriptional coregulation." FASEB J **17**(10): 1228-37.
- Whiteside, T. L. (2008). "The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth." Oncogene **27**(45): 5904-12.
- Wygoda, M. R., M. R. Wilson, et al. (1997). "Protection of herpes simplex virus thymidine kinase-transduced cells from ganciclovir-mediated cytotoxicity by bystander cells: the Good Samaritan effect." Cancer Res **57**(9): 1699-703.

- Xu, W. T., Z. Y. Bian, et al. (2009). "Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis." Cancer Lett **281**(1): 32-41.
- Yaal-Hahoshen, N., S. Shina, et al. (2006). "The chemokine CCL5 as a potential prognostic factor predicting disease progression in stage II breast cancer patients." Clin Cancer Res **12**(15): 4474-80.
- Yamasaki, H. and F. Katoh (1988). "Further evidence for the involvement of gap-junctional intercellular communication in induction and maintenance of transformed foci in BALB/c 3T3 cells." Cancer Res **48**(12): 3490-5.
- Yarbrough, D., R. M. Wachter, et al. (2001). "Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(2): 462-7.
- Yauch, R. L., S. E. Gould, et al. (2008). "A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer." Nature **455**(7211): 406-10.
- Zambetti, G. P., E. M. Horwitz, et al. (2006). "Skeletons in the p53 tumor suppressor closet: genetic evidence that p53 blocks bone differentiation and development." J Cell Biol **172**(6): 795-7.
- Zappia, E., S. Casazza, et al. (2005). "Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy." Blood **106**(5): 1755-61.
- Zhu, W., W. Xu, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo." Exp Mol Pathol **80**(3): 267-74.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Christoph Zischek
Anschrift: Wacholderstr. 5
82515 Wolfratshausen
Geboren: 6. Februar 1985 in München
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1991-1995: Grundschule Weidach
1995-2004: Gymnasium Icking

Universitätsausbildung:

2004-2006: Studium der Medizin an der LMU München
2006: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2006-2010: Studium der Medizin an der TU München
2010: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation

Berufliche Tätigkeit:

Juli 2004: Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter
Dez 2010: Beförderung zum Stabsarzt

Veröffentlichungen:

Zischek C, Niess H, Ischenko I, Conrad C, Huss R, Jauch KW, Nelson PJ, Bruns C:
Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of
pancreatic carcinoma. Ann Surg. 2009 Nov;250(5):747-753

Vorträge:

C.J. Bruns, **C. Zischek**, H. Niess, I. Ischenko, M. Eichhorn, K.W. Jauch, P. Nelson:

Targeted stem cell based RANTES/TK suicide gene therapy of murine pancreatic cancer

XVI. Meeting of the European Surgical Association Vienna 18.4.2009

C. Zischek, H. Niess, I. Ischenko, M. Eichhorn, K.W. Jauch, P. Nelson, C.J. Bruns:

Gezielte stammzellbasierte RANTES/Tk Suizidgentherapie des murinen Pankreaskarzinoms

Chirurgisches Forum des 126. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 1.5.2009

Poster:

C. Zischek, H. Niess, I. Ischenko, M. Eichhorn, K.-W. Jauch, P. Nelson, C.J. Bruns:

Das Tumorstroma als Angriffspunkt einer stammzellbasierten CCL5/TK Suizidgentherapie in einem murinen Pankreaskarzinom-Modell

DoktaMed Doktorarbeitstage Medizin München 25.6.2009

Nieß H, **Zischek C.**, Conrad C., Ischenko I., Jauch K.-W., Nelson P., Bruns C.:

Das Tumorstroma als Angriffspunkt einer stammzellbasierten CCL5-HSV/TK Suizidgentherapie in einem murinen Tiermodell zum Pankreaskarzinom

3. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit der Sektion für Gastroenterologische Endoskopie (DGVS) und der Deutschen Gesellschaft für Allgemein- und Viszeralchirurgie (DGAV)

M. Kolokythas, K. Knoop, **C. Zischek**, K. Klutz, M.J. Willhauck, N. Wunderlich, D.

Draganovici, C. Zach, F. Gildehaus, B. Göke, C. Spitzweg:

Molekulare Bildgebung und gezielte Radionuklidtherapie extrathyreoidaler Tumore nach Stammzell-basiertem Natrium/Iodid-Symporter (NIS) Gentransfer

DoktaMed Doktorarbeitstage Medizin München 11.5.2010

Preise

2009: Fritz-Linder-Forumspreis der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

Promotion

Jan 2007-2011: Chirurgische Klinik, Klinikum Großhadern LMU

Medizinische Poliklinik, Klinikum Innenstadt der LMU

Wolfratshausen, den 12.1.2011