

Aus der Abteilung Pharmakologie der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland  
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Dr. Tobias Schnitzer

Vorgelegt über das Institut für Tierpathologie  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

## **Vergleichende Etablierung und Charakterisierung eines orthotopen Kolonkarzinom-Xenograft-Modells**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Kirsten Dettmar  
aus Soest

München 2003

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla

Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. E. Wolf

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

Meinen Eltern

Wir sind nicht nur für das verantwortlich, was wir tun,  
sondern auch für das, was wir nicht tun.

*(Molière 1622 – 1673)*

<b>1. <u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1 DARMKREBS</b>	<b>1</b>
<b>1.2 PRÄKLINISCHE TIERMODELLE IN DER ONKOLOGIE</b>	<b>6</b>
<b>1.3 GFP (GRÜN FLUORESZIERENDES PROTEIN) ALS REPORTER</b>	<b>12</b>
<b>2. <u>FRAGESTELLUNG</u></b>	<b>15</b>
<b>3. <u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b>16</b>
<b>3.1 MATERIAL</b>	<b>16</b>
3.1.1 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	16
3.1.2 <i>Geräte</i>	17
3.1.3 <i>Puffer und Lösungen</i>	18
3.1.4 <i>Reaktionssysteme</i>	19
3.1.5 <i>Tiernahrung</i>	19
3.1.6 <i>Sonstiges</i>	19
3.1.7 <i>Zellen</i>	20
3.1.7.1 HT29	20
3.1.7.2 HT29-GFP	20
3.1.8 <i>Mäuse</i>	20
<b>3.2 METHODEN</b>	<b>21</b>
3.2.1 <i>Zellbiologische Methoden</i>	21
3.2.1.1 Zellkultur	21
3.2.1.2 Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen	21
3.2.1.3 Bestimmung von Generationszahl, Generationszeit und Teilungsrate	22
3.2.2 <i>Tierversuche</i>	23
3.2.2.1 Haltung und Fütterung der Mäuse	23
3.2.2.2 Markierung der Tiere	23
3.2.2.3 Operationen	23
3.2.2.4 Abbruchkriterien	27
3.2.2.5 Messung von Tumorgröße und Körpergewicht	27
3.2.2.6 Versuchsende	28
3.2.3 <i>Histologische und Immunhistochemische Analyse</i>	28
3.2.3.1 Gewebefixierung und Paraffinschnitte	28
3.2.3.2 HE-Färbung	30
3.2.3.3 Immunhistologischer Nachweis von CEA	32
3.2.3.4 Immunhistologischer Nachweis von CD34	34
3.2.3.5 Bestimmung der Metastasenfläche und -anzahl von histologischen Präparaten (Leber, Lunge)	36
3.2.3.6 Bestimmung der CD34 - positiven Gefäße der orthotopen Darmtumoren im Paraffinschnitt	36
3.2.4 <i>CEA-ELISA</i>	37
3.2.5 <i>Statistische Auswertung</i>	38

<b>4. <u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>39</b>
<b>4.1 ERGEBNISSE DER IN VITRO-VERSUCHE</b>	<b>39</b>
4.1.1 <i>Wachstumsverhalten HT29 und HT29-GFP in vitro</i>	39
4.1.2 <i>Fluoreszenz in vitro</i>	42
<b>4.2 ERGEBNISSE DER IN VIVO-VERSUCHE</b>	<b>45</b>
4.2.1 <i>Subkutane Zellinjektion</i>	45
4.2.1.1 Versuchsablauf	45
4.2.1.2 Tumorwachstum	46
4.2.1.3 Körpergewichtsentwicklung während des Versuchs	51
4.2.1.4 Metastasierung	52
4.2.1.5 Fluoreszenz subkutaner HT29-GFP-Tumoren	57
4.2.2 <i>Orthotope Zellinjektion</i>	58
4.2.2.1 Versuchsablauf	58
4.2.2.2 Tumorwachstum	59
4.2.2.3 Körpergewichtsentwicklung während des Versuchs	64
4.2.2.4 Metastasierung	66
4.2.2.5 Vaskularisierung	70
4.2.2.6 Fluoreszenz orthotoper HT29-GFP-Tumoren	74
4.2.2.7 CEA	75
4.2.3 <i>Orthotope Fragmentfixation</i>	79
4.2.3.1 Versuchsablauf	79
4.2.3.2 Tumorwachstum	82
4.2.3.3 Körpergewichtsentwicklung während des Versuchs	85
4.2.3.4 Metastasierung	86
4.2.3.5 Vaskularisierung	91
4.2.3.6 CEA	96
4.2.4 <i>Vergleich der in vivo-Versuche</i>	98
4.2.4.1 Tumorwachstum	98
4.2.4.2 Körpergewicht	100
4.2.4.3 Metastasierung	102
4.2.4.4 Vaskularisierung	105
4.2.4.5 Zusammenhang zwischen Metastasierung und Vaskularisierung	107
4.2.4.6 Fluoreszenz	109
4.2.4.7 CEA	109
<b>5. <u>DISKUSSION</u></b>	<b>112</b>
<b>6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>124</b>
<b>7. <u>SUMMARY</u></b>	<b>126</b>
<b>8. <u>ABKÜRZUNGEN</u></b>	<b>128</b>
<b>9. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>130</b>

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Darmkrebs

Im Jahr 1990 erkrankten weltweit etwa 783.000 Menschen an Darmkrebs; 437.000 starben an den Folgen dieser Krankheit (Parkin *et al.*, 1999).

In der Bundesrepublik Deutschland ist Krebs nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache.

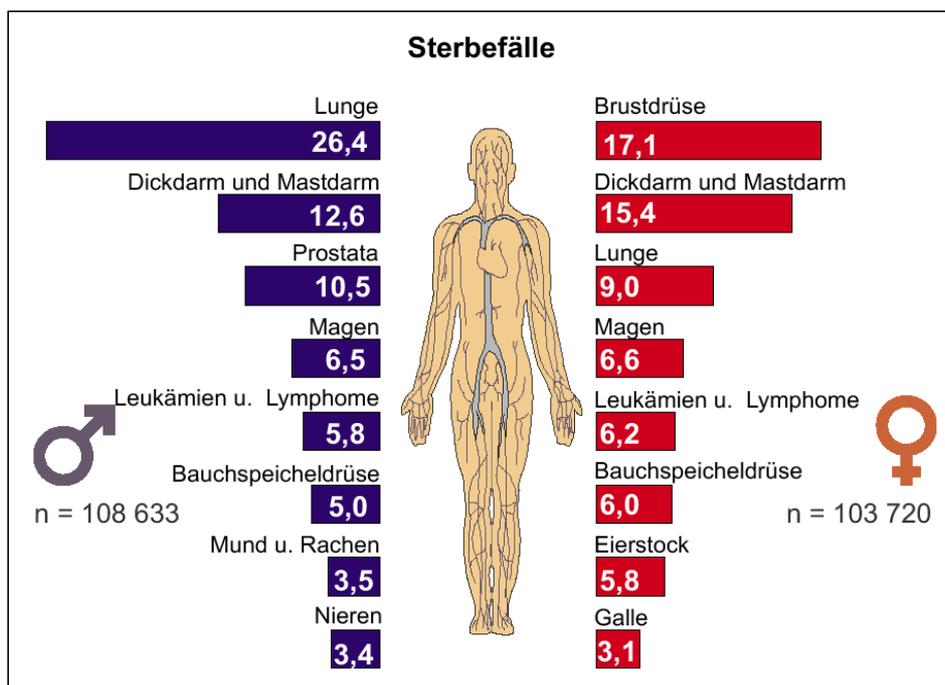
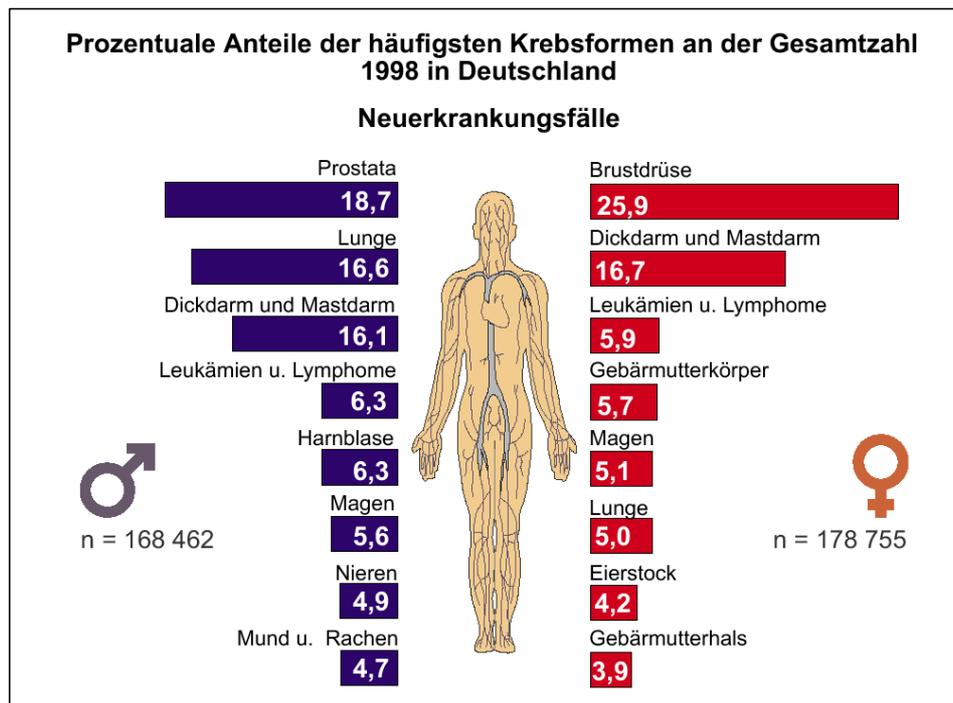
Nach Schätzungen der Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut erkranken jährlich etwa 350.000 Menschen neu an Krebs. Über 210.000 Menschen starben 1999 an den Folgen einer Tumorerkrankung.

Darmkrebs war in diesem Jahr in Deutschland sowohl bei Männern ( ~ 13.400 Fälle ) als auch bei Frauen ( ~ 16.000 Fälle ) die zweithäufigste Krebserkrankung mit Todesfolge. An erster Stelle der Todesstatistik standen bei Männern der Lungenkrebs und bei Frauen der Brustkrebs.

Bei den neuerkrankten männlichen Patienten nahmen Dickdarm- und Mastdarmkrebs, nach Prostata- und Lungenkrebs, die dritte Position mit jährlich etwa 27.000 Fällen ein.

Frauen erkrankten am häufigsten an Brustkrebs; Darmkrebs folgte mit jährlich ca. 30.000 Neuerkrankungen (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

Im Vergleich mit den Erkrankungsraten anderer EU-Länder steht die Inzidenz von Darmkrebs in Deutschland sowohl bei Männern als auch bei Frauen an erster Stelle in Europa. Die niedrigsten Erkrankungsraten in den EU-Ländern findet man in Griechenland, Finnland und Spanien (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).



**Abbildung 1: Prozentuale Anteile der häufigsten Krebsformen an der Gesamtzahl 1998 in Deutschland**

(Quelle: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland)

Die Ursachen für Darmkrebs sind vielfältig. Mehr als ein Viertel aller Patienten haben nahe Verwandte mit der gleichen Tumorerkrankung. Bei 5 - 10 % kann das familiäre Auftreten auf eine autosomal-dominant vererbte Prädisposition zurückgeführt werden. Dazu gehören die familiäre adenomatöse Polypose (FAP) oder das erbliche, nicht-polypöse, kolorektale Krebsyndrom (HNPCC), die beide mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits in jüngeren Jahren zu Darmkrebsfällen führen. Beispielsweise beträgt das Risiko an Darmkrebs zu erkranken bei einer nicht medizinisch betreuten Erkrankung an HNPCC 80 – 90 %. Daneben gibt es chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, die das Krebsrisiko erhöhen, zum Beispiel die Colitis ulcerosa (Müller *et al.*, 2000).

In den meisten Fällen tritt Darmkrebs jedoch ohne erbliche Vorbelastung auf. Zu den meist diskutierten Risikofaktoren für Darmkrebs gehören Einflüsse wie z.B. Ernährung und Lebensstil, wobei der häufige Konsum von rotem Fleisch, tierischen Fetten, eine hohe Gesamtkalorienaufnahme, Bewegungsarmut, Rauchen und Alkoholkonsum das Darmkrebsrisiko erhöhen sollen (Willett, 2001).

Bei einem Großteil der Darmkrebserkrankungen entsteht als Vorstufe des eigentlichen Tumors zunächst ein Polyp. Polypen sind potentiell gutartige Wucherungen der Darmschleimhaut, die in das Lumen hinein wachsen und finger- oder pilzförmig aussehen. Aus diesen zunächst benignen Schleimhautveränderungen können sich im Laufe der Zeit durch unterschiedliche Faktoren Darmtumoren entwickeln.

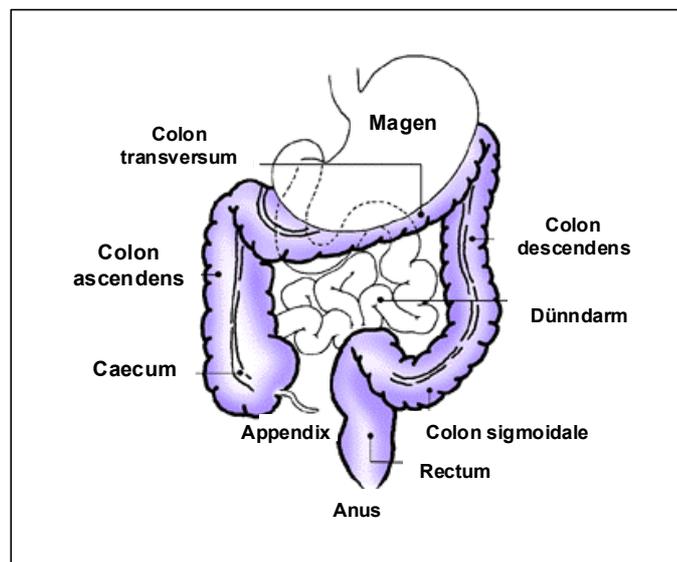
Bei 33 % der Bevölkerung bis 50 Jahren findet man adenomatöse Darmpolypen; bis zum 70. Lebensjahr erhöht sich ihr Anteil auf 50 % (Schulmann *et al.*, 2002).

Werden diese Polypen rechtzeitig entdeckt und entfernt, z.B. durch eine endoskopische Polypektomie, kann der Ausbruch der Krebserkrankung meist verhindert werden (Markowitz *et al.*, 2002). Es gilt heute als gesichert, dass diese Maßnahme das Risiko der Entstehung eines Kolonkarzinoms in den folgenden 6 Jahren um 50 % senkt.

Als weitere Präventivuntersuchung hat sich der Nachweis von okkultem Blut im Stuhl etabliert. Dabei sollen blutende Adenome und Karzinome im Darm frühzeitig nachgewiesen werden. Die so diagnostizierten Karzinome befinden sich dann meist im Anfangsstadium und sichern so eine gute Heilungsprognose.

Die Hauptlokalisationen sind fast immer Dickdarm (Kolon) oder Mastdarm (Rektum). Daher spricht man häufig auch von „kolorektalen Tumoren“, wenn man Darmkrebs meint. Krebserkrankungen des Dünndarms kommen hingegen selten vor.

60 - 70 % der Dickdarmkarzinome treten distal der Beckenflexur des Kolons, im sigmoidalen Kolon oder im Rektum, auf. Kolorektale Tumoren gehören in 95 % der Fälle histopathologisch zu den Adenokarzinomen. Andere Formen, wie z.B. Siegelringzellkarzinome (1 %) oder undifferenzierte Karzinome (1 %), kommen dagegen nur sehr selten vor (Ponz de Leon & Di Gregorio, 2001).



**Abbildung 2: Magen-Darm-Trakt des Menschen**

Der Dickdarm ist farblich hervorgehoben (violett).

Die genetischen Hintergründe der Darmkrebsentstehung sind gut untersucht. So weiß man, dass sich aus den zunächst gutartigen Darmpolypen über eine typische Abfolge molekulargenetischer Veränderungen die jeweils fortgeschritteneren Stadien der Karzinogenese entwickeln. Beteiligt sind sowohl Onkogene als auch Tumorsuppressorgene. Eine einzelne Mutation allein reicht nicht aus, um eine normale Darmzelle in eine maligne Krebszelle umzuwandeln (Tomlinson *et al.*, 1997).

Untersuchungen von Vogelstein an gesunden Darmzellen, Polypenzellen und Darmkarzinomzellen zeigen, dass die Zahl der Alterationen im Laufe der Karzinogenese in einer bestimmten Reihenfolge zunimmt (Vogelstein *et al.*, 1988).

Der Übergang von normalem Kolonepithel in ein hyperproliferatives Epithel geht mit einem Funktionsverlust des *APC-Gens* (= adenomatous polyposis coli) einher. Mutationen im Onkogen *K-ras* finden sich bei größeren Polypen. In noch weiter fortgeschrittenen Polypen zeigt sich ein dritter Gendefekt. Das Tumorsuppressorgen *DDC* (= deleted in colorectal cancer) fehlt auf Chromosom Nummer 18. Diese drei kritischen Mutationen lassen die Darmpolypen immer weiter wachsen. Der Übergang vom noch gutartigen, hyperplastischen Adenom zum Karzinom ist durch den Verlust des Tumorsuppressorgens *p53* gekennzeichnet. Diesem Gen kommt eine wichtige Bedeutung bei der Überwachung der Zellteilung zu (Fearon & Vogelstein, 1990).

Vor diesem Hintergrund wird die Bedeutung von genetischen Screeninguntersuchungen bei familiär vorbelasteten Menschen deutlich.

Die Therapie des Kolonkarzinoms besteht im wesentlichen aus drei Säulen: Operation, Chemotherapie und Bestrahlung – die je nach Tumorstadium, Lokalisation und Allgemeinzustand des Patienten eingesetzt und auch kombiniert werden.

Durch Fortschritte der chirurgischen Technik können immer mehr Darmtumoren durch eine Operation entfernt werden. Handelt es sich um Mastdarmkrebs, kann eine zusätzliche Bestrahlung sinnvoll sein (Blumberg & Ramanathan, 2002).

Grundlage der medikamentösen Standardtherapie bei kolorektalen Karzinomen ist seit den frühen 60er Jahren *5-Fluorouracil* (= 5-FU). Seine antikanzerogene Wirkung beruht hauptsächlich auf der Hemmung des Enzyms Thymidylatsynthase, das Nukleotidbausteine für die DNA-Synthese bereitstellt. Zusätzlich werden zytotoxische Effekte durch den Einbau von 5-FU-Metaboliten in DNA oder RNA erzielt. In schnell proliferierenden Geweben, wie zum Beispiel Tumoren, soll auf diese Weise das Zellwachstum gehemmt werden (van Laar *et al.*, 1998).

In Kombinationen von 5-FU mit anderen Medikamenten wie *Leucovorin* (Van Cutsem & Peeters, 1999) oder auch *Irinotecan* (Douillard *et al.*, 2000) konnten positive Effekte bezüglich Rezidiv- und/oder Todesrate gezeigt werden. Da die Substanzen jedoch wenig selektiv wirken und daher sämtliche schnell teilende Zellen angreifen, treten bei allen Therapien Nebenwirkungen wie Durchfall, Entzündungen der Mundschleimhaut, Haarausfall oder Verminderung der Leukozytenzahl (Leukopenie) auf, die den Patienten sowohl physisch als auch psychisch zusätzlich belasten.

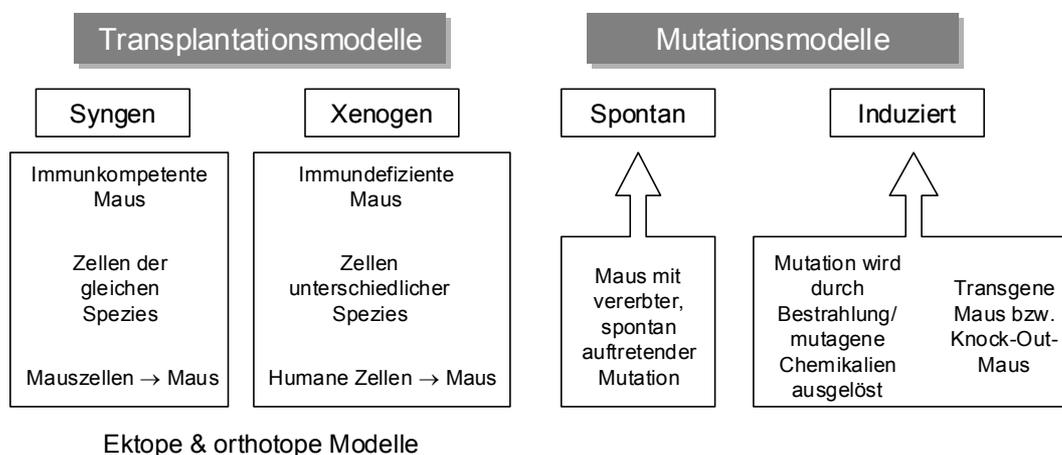
Das Anfang 2001 für Darmkrebs zugelassene *Capecitabin* stellt eine neue Generation von Zytostatika dar. Im Gegensatz zu der üblichen intravenösen Verabreichung anderer Substanzen, handelt es sich hier um ein oral verfügbares Fluoropyrimidin, das durch hohe intratumorale Thymidinphosphorylase-Konzentrationen vor allem im Tumor in 5-FU umgewandelt wird und dort hohe Wirkspiegel erzeugt. Die Nebenwirkungen sind im allgemeinen geringer als bei anderen Chemotherapien (Van Cutsem *et al.*, 1999).

Trotz all dieser Neuentwicklungen liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Darmkrebs in Deutschland für Männer bei nur 48 % und bei Frauen bei lediglich 51 % (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

Es besteht also ein dringender Bedarf an klinisch-relevanten Modellen, um neue, potentere und nebenwirkungsärmere Wirkstoffe entwickeln zu können.

### 1.2 Präklinische Tiermodelle in der Onkologie

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen Transplantations- und Mutationsmodellen (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Tiermodelle in der Onkologie**

In Mutationsmodellen werden Versuchstiere eingesetzt, die entweder durch spontane oder aber häufiger durch induzierte Mutationen eine bestimmte Eigenschaft besitzen (Berns, 2001).

Diese Mutationen können zum einen durch äußere Einflüsse wie Bestrahlung oder bestimmte Chemikalien erzeugt werden, zum anderen können transgene oder Knock-Out-Tiere hergestellt werden.

Das transgene Versuchstier trägt in seinem Erbgut ein Gen/mehrere Gene einer anderen Spezies; bei Knock-Out-Tieren werden bestimmte Gene/Genabschnitte „abgeschaltet“. Transgene Tiere bieten einige Vorteile im Versuchseinsatz. So sind die Tiere immunkompetent, müssen also nicht unter streng pathogenfreien Bedingungen gehalten werden. Auch kann der Einfluss eines intakten Immunsystems auf die Tumorentstehung und -entwicklung untersucht werden. Die Tumoren treten zufällig auf, was dem Verhalten bei einer humanen Krebserkrankung entspricht. Auch die Metastasierung entspricht meist in Ausmaß und Lokalisation dem klinischen Bild beim Menschen. In diesen Modellen können nicht nur chemotherapeutische, sondern auch chemopräventive Medikamente getestet werden (Dexter *et al.*, 1993). Nachteilig wirkt sich der große Aufwand zur Herstellung einer transgenen Maus und somit auch die damit verbundenen hohen Kosten aus. Will man eine Behandlung zu einem bestimmten Zeitpunkt der Tumorentwicklung beginnen, ist dies hier aufgrund der spontanen Tumorbildung nicht abzuschätzen. Zudem lässt sich nicht ausschließen, dass die Einbringung eines fremden Gens auch andere, unbekannte Effekte auf das Versuchstier hat, die den Versuchsablauf beeinflussen können (Thomas & Balkwill, 1995).

In der Onkologie gebräuchlicher als die Mutationsmodelle sind die Transplantationsmodelle, d.h. dem Versuchstier werden Tumorzellen/Fragmente in unterschiedlicher Weise zugeführt.

Man unterscheidet wiederum zwischen *syngen*en und *xenogen*en Modellen. Bei syngen Modellen werden Zellen der gleichen Tierspezies appliziert, im Xenograft-Modell stammen Zellspender und Zellempfänger aus zwei unterschiedlichen Arten. Aus diesem Grund müssen in Xenograft-Versuchen auch immundefiziente Tiere eingesetzt werden, um einer Abstoßung der fremden Zellen durch das Immunsystem des Empfängers vorzubeugen.

Anfang der 60er Jahre entstanden in Glasgow infolge einer Spontanmutation in einem Mäusestamm unbehaarte, thymusaplastische Mäuse (Flanagan, 1966). Diese fortan als *Nacktmaus* bezeichnete Mutante zeichnet sich durch normal entwickelte B-Lymphozyten aus, wohingegen aufgrund des fehlenden Thymus keine funktionelle T-Lymphozyten vorhanden sind (Pantelouris & Hair, 1970; Rygaard, 1969).

Bereits 1969 publizierten Rygaard und Povlsen erste Versuchsergebnisse ihrer Heterotransplantationen an Nacktmäusen (Rygaard & Povlsen, 1969).

Später entstanden weitere immundefiziente Mäusestämme, wie zum Beispiel die SCID-Maus (*SCID* = engl. *severe combined immunodeficiency*; schwere kombinierte Immundefizienz), die weder T- noch B-Lymphozyten besitzt und somit auch wenig oder keine Serumimmunglobuline (üblicherweise unter 0,02 mg/ml), wogegen die Zahl der Erythrozyten, Neutrophilen und NK-Zellen im Normalbereich liegt. Lymphknoten und Thymus haben etwa 10 % der normalen Größe, die Milz kann verkleinert sein (Bosma *et al.*, 1983; Custer *et al.*, 1985).

Im syngenem Modell besteht keine Gefahr einer Abstoßungsreaktion, allerdings sind auch keine humanen Zielmoleküle vorhanden, was oftmals der Grund ist, warum xenogene Modelle den syngenem vorgezogen werden.

Transplantationsmodelle werden aber nicht nur anhand der verwendeten Spezies unterschieden, sondern auch aufgrund des Applikationsortes der Tumorzellen.

Ist der Injektionsort identisch mit dem Originalgewebe aus dem die Zellen stammen, so spricht man vom orthotopen Modell. Sind Herkunftsgewebe und Zielgewebe verschieden, so bezeichnet man dies als ektop.

*Ektope Modelle* sind aufgrund ihrer einfachen Durchführung in der präklinischen Onkologie weit verbreitet. Die Tumorzellen werden meist subkutan appliziert, und die so entstandenen Tumoren werden mit einer Schublehre gemessen. Damit sind auch mögliche Effekte der zu untersuchenden Substanz im Vergleich zur Kontrolle leicht festzustellen. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, Wachstumskinetiken anhand von Mehrfachmessungen erstellen zu können.

Allerdings wachsen ektope Tumoren vielfach schneller als vergleichbare Tumortypen im Menschen. Im Tier werden Verdopplungszeiten von Tagen protokolliert, wohingegen Verdopplungszeiten humaner Tumoren im Bereich von Monaten oder Jahren liegen. Da zytotoxische Substanzen als Ziel schnell proliferierende Zellen haben, könnte dies eine Erklärung dafür sein, dass Medikamente, die in subkutanen Tumoren gute Effekte bewiesen, im Menschen jedoch manchmal hinter den Erwartungen zurück bleiben (Kerbel, 1998).

Zudem kann auch die Umgebung des Tumors seine Chemosensitivität verändern. So stellte man fest, dass murine CT-29-Darmkrebszellen je nach Injektionsort (Subkutis, Milz, Caecum, Lunge) unterschiedlich auf die Chemotherapeutika Doxorubicin und 5-Fluorouracil reagierten (Wilmanns *et al.*, 1992).

Ähnliche Ergebnisse wurden ein Jahr später von Kuo et al. (1993) publiziert, die Nicht-Kleinzellige-Lungenkarzinomzellen auf Ihre Sensitivität hinsichtlich Cisplatin und Mitomycin C untersuchten. Auch hier traten Unterschiede zwischen subkutanen Tumoren und Tumoren in anderen Lokalisationen auf.

All dies sind Gründe, warum man sich von orthotop wachsenden Tumoren eine bessere Übertragbarkeit zwischen Tiermodell und Mensch erhofft. In jedem Fall muss ein solches Modell gut etabliert und charakterisiert werden, um alle wichtigen Punkte abgreifen und die erhaltenen Ergebnisse verifizieren zu können.

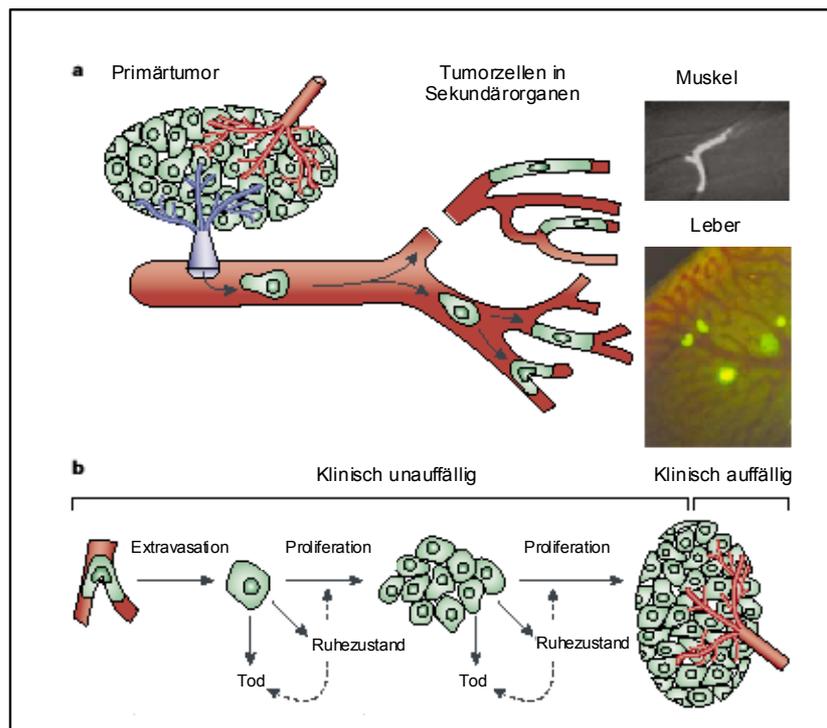
In der modernen Onkologie richtet sich das Hauptinteresse der Kliniker vermehrt auf die *Metastasierung* (Abbildung 4), da die chirurgischen Techniken heutzutage so weit fortgeschritten sind, dass die meisten Primärherde operativ entfernt werden können. Häufig entwickeln die Patienten jedoch Metastasen, die in vielen Fällen den Tod zur Folge haben. 30 % aller neudiagnostizierten soliden Tumoren sind bereits metastasiert. Viele Metastasen werden zudem erst entdeckt, wenn sie durch klinische Symptome auffällig werden. Dann ist ihre Therapie oft äußerst schwierig bis unmöglich (Liotta & Rao, 1986).

Die Behandlung dieser Metastasen ist, neben der Verhinderung eines neuen Tumors am Ursprungsort, das vorrangige Ziel einer postoperativen Therapie. So wird auch der immense Bedarf an Metastasierungsmodellen deutlich, in denen Effekte neuer Prüfsubstanzen auf das Metastasierungsgeschehen qualitativ und quantitativ untersucht sowie bewertet werden können.

Das *subkutane Modell* bringt jedoch nur selten Metastasen hervor, da die Tumoren gut abgegrenzt und somit wenig invasiv wachsen (Fidler, 1991a). Auch die Neoangiogenese, die den ersten Schritt zur Metastasierung darstellt, ist hier gering ausgeprägt (Sordat & Wang, 1984).

Um diese Nachteile zu vermeiden, wurden *orthotope Modelle* entwickelt. Bereits 1889 stellte Paget die „Seed-and-Soil-Theorie“ auf. Nach seiner Hypothese muss eine Tumorzelle zunächst die Eigenschaft besitzen, sich aus dem Zellverband des Primärtumors ablösen zu können. Eine Metastase entsteht auch nur, wenn das Organ, in dem sich die Zellen (= „Samen“/ „Seed“) neu ansiedeln, den richtigen „Boden“ (= „Soil“) dazu bieten kann, d.h. bestimmte Tumorzelltypen können sich nur in bestimmten Organen zu Metastasen entwickeln (Paget, 1889).

Diese Theorie ist heutzutage die Grundlage für den Einsatz von orthotopen Modellen. Weitere Untersuchungen stützen diese Annahme bis heute. So konnten Hart & Fidler (1980) an murinen B16-Melanomzellen im syngenem Modell zeigen, dass sowohl die Tumorzelle als auch das Zielorgan Einfluss auf die Metastasenentstehung haben.



**Abbildung 4: Der Prozeß der Metastasierung**

- Ablösung von Tumorzellen aus dem Primärtumor; Invasion in den Blutkreislauf, Erreichen von Sekundärorganen und Stillstand im Kapillarsystem aufgrund der Zellgröße (ebenso Invasion in Lymphgefäße möglich).
- Tumorzellen können in Sekundärorganen entweder in Form von einzelligen Metastasen oder als bereits mehrzellige, prä-angiogenetische Metastasen existieren. Auf jeder Stufe dieser Entwicklung proliferiert nur ein Teil der Zellen, andere gehen in einen Ruhezustand über oder sterben. Einzelzellen, die sich im Ruhezustand befinden, durchlaufen weder Proliferation noch Apoptose, wohingegen ruhende, mehrzellige prä-angiogenetische Metastasen ein Gleichgewicht zwischen aktiver Proliferation und aktiver Apoptose zeigen, so dass sich das Volumen der Metastase nicht vergrößert.

(Quelle: Chambers et al., Nature Reviews Cancer, 2002)

Zahlreiche Experimente haben in den folgenden Jahren gezeigt, dass die Metastasierung (siehe Abbildung 4) ein Prozess ist, der aus vielen Einzelschritten besteht, die nacheinander ablaufen. Am Anfang dieser Abfolge steht die Vaskularisierung des Primärtumors. Es folgen Invasion einzelner Tumorzellen in Blut- und/ oder Lymphgefäße, Zirkulation, Adhärenz, Extravasation und Proliferation im Zielorgan (Fidler, 1990). Bis heute wurden verschiedene orthotope Modelle entwickelt, die es ermöglichen, die Metastasierung von den ersten Schritten bis zum Ende vollständig zu dokumentieren. So gibt es orthotope Modelle für Tumoren des Kolons (Fidler, 1991b), des Eierstocks (Fu & Hoffman, 1993), der Brust (Fu *et al.*, 1993), des Magens (Furukawa *et al.*, 1993a), der Bauchspeicheldrüse (Schwarz *et al.*, 1999), der Blase (Xiao *et al.*, 1999), der Speiseröhre (Furuhata *et al.*, 2001), der Haut (Mueller *et al.*, 2002) und weiterer Organsysteme.

Ein weiterer großer Vorteil orthotoper gegenüber ektoper Modelle ist, dass man durch die orthotope Einbringung der Tumorzellen in den meisten Fällen das klinische Bild des menschlichen Patienten im Tierversuch abbilden kann. Das heißt, dass in den gleichen Organen und in der gleichen Häufigkeit wie in der Humanmedizin Metastasen im Versuchstier diagnostiziert werden können. Es konnte bereits in über 70 orthotopen Modellen gezeigt werden, dass man durch diese Technik der humanen Krebserkrankung näher kommt als mit bisher verwendeten Tiermodellen (Hoffman, 1999).

Die ersten orthotopen Versuche wurden mit Zellsuspensionen in syngenem Modellen durchgeführt (Tan *et al.*, 1977). Es folgten orthotope Zellinjektionen in Xenograft-Modellen (Bresalier *et al.*, 1987), bis schließlich intaktes Tumorgewebe orthotop fixiert wurde. Dabei wurde zum einen humanes Patientenmaterial (Fu *et al.*, 1991) und zum anderen in Mäusen passagiertes Tumorgewebe verwendet (Furukawa *et al.*, 1993c).

Allerdings sind orthotope Tierversuche erheblich aufwendiger als ektoper. In vielen Fällen ist ein operativer Eingriff, wie z.B. eine Laparotomie bei orthotoper Kolonkrebszellinjektion, notwendig, der mehr Zeit in Anspruch nimmt, als die subkutane Injektion. Es sind Eingriffe, die nur ein darauf spezialisierter Operateur durchführen kann. Zudem sind die Versuchstiere durch Narkose und Operation größeren Belastungen ausgesetzt. Auch der Zeitaufwand ist groß; so liegt die Tierzahl pro Zeiteinheit deutlich unter dem einer subkutanen Applikation.

Schwierigkeiten bereitet aber auch die Tumormessung bestimmter orthotoper Modelle im Versuchsverlauf. Ist das Wachstum eines subkutanen Primärtumors relativ einfach durch eine Schublehre jederzeit zu dokumentieren, so ist dies bei orthotopen Tumoren nur schwer oder gar nicht möglich (Kerbel, 1998).

Aus diesem Grund wird die orthotope Technik in einigen Forschungsgruppen mit GFP, dem grün fluoreszierenden Protein, und seinen Vorteilen kombiniert (Chishima *et al.*, 1997).

### 1.3 GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) als Reporter

Um neben der klassischen histologischen Auswertung eine weitere Methode zur Verfügung stehen zu haben, die einen zuverlässigen Nachweis von Tumorzellen in Organen ermöglicht, wurden sogenannte „Reportergene“ entwickelt.

Sie sollten vor allem dazu dienen, Mikrometastasen sichtbar zu machen, die mit den herkömmlichen Verfahren unentdeckt geblieben waren. Auch der Nachweis von Tumorzellen *in vivo*, d.h. im lebenden Tier, sollte dadurch ermöglicht werden.

Schon in den frühen 70er Jahren wurde das *E. coli*  $\beta$ -Glaktosidase-Gen verwendet, um Metastasen nachzuweisen, allerdings war eine aufwendige Präparation des zu untersuchenden Gewebes notwendig und die endogene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität erzeugte hohe Hintergrundsignale (Lojda, 1970).

Auch tierische Proteine, wie die *Luciferase* des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* fanden Verwendung. Um die Biolumineszenz in den Tumorzellen nachweisen zu können, muß das Substrat *Luciferin* exogen in hohen Konzentrationen zugegeben werden, um eine enzymatische Reaktion zu ermöglichen.

Im *in vivo*-Versuch wird Luciferin dem lebenden Tier intraperitoneal verabreicht und kann dann in den verschiedenen Organen anhand seiner Lichtemission nachgewiesen werden (Contag *et al.*, 2000). Nachteilig wirken sich die kurze Halbwertszeit und die geringe Signalstärke aus (Edinger *et al.*, 1999).

1962 beschrieben Shimomura *et al.* zum ersten Mal *GFP* (= grün fluoreszierendes Protein) als „Partnerprotein“ zum bereits entdeckten *Aequorin*, das ebenfalls aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert worden war.

Sie stellten fest, dass GFP die blaue Lumineszenz des *Aequorins* mit Hilfe eines Energietransfers in grüne Fluoreszenz umwandelte. Weitere Untersuchungen folgten und deckten die Struktur von GFP nach und nach auf (Shimomura & Johnson, 1969; Ward & Bokman, 1982).

Im Jahr 1992 gelang zum ersten Mal die Klonierung. Die GFP-cDNA kodiert für ein Monomer bestehend aus 283 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 27 kD (Prasher *et al.*, 1992). Die eigentliche chromophore Gruppe besteht nur aus drei Aminosäuren: Ser65-Tyr66-Gly67 (Cody *et al.*, 1993).

Mittlerweile sind viele Varianten des GFP's beschrieben, so zum Beispiel das EGFP (= enhanced green fluorescent protein), das im Vergleich zum Wildtyp 35fach heller fluoresziert (Zhang *et al.*, 1996). Außerdem modifizierte man die Wellenlängenspektren so, dass Mutationen mit blauer, gelber oder auch roter Fluoreszenz entstanden (Heim *et al.*, 1994; Nagai *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1998).

GFP wird seit seiner Entdeckung in vielfältiger Weise in der Wissenschaft eingesetzt. Es dient zum einen zur Überprüfung von Genexpressionen oder zum anderen zur genauen Lokalisation von zellulären Proteinen und ihren Interaktionen mit subzellulären Bestandteilen (Tsien, 1998).

Werden Tumorzellen mit GFP transfiziert, so kann man ihr Wachstum und ihre Verteilung im Organismus eines Versuchstiers verfolgen. Zunächst wurde die Fluoreszenz an explantierten Organen und Paraffinschnitten nachgewiesen (Walter *et al.*, 2000), aber in neusten Publikationen wurden auch *in vivo* (am lebenden Tier) Aspekte wie Tumorzellwachstum, Angiogenese und Metastasierung mit Hilfe von GFP untersucht (Bouvet *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002).

Ein großer Vorteil des GFP gegenüber anderen Reporterkonstrukten ist, dass es weder Substrate noch Kofaktoren benötigt.

Aber es sind auch Nachteile bekannt. So sind einige GFP-Varianten pH- und temperaturlabil, d.h. ihre Fluoreszenz ist nicht unter allen Umweltbedingungen konstant (Patterson *et al.*, 1997). Zudem beeinflusst der Sauerstoffgehalt die Bildung des Chromophors. Unter hypoxischen Verhältnissen nahm die grüne Fluoreszenz ab (Coralli *et al.*, 2001). Manche Autoren berichten auch von starker Autofluoreszenz nicht-transfizierter Zellen, die die GFP-Fluoreszenz überlagert.

Ein Grund dafür ist, dass GFP nur ein Chromophor besitzt und deshalb seine Lichtemission nicht durch zusätzliche Bindung von Substratmolekülen erhöhen kann wie dies enzymatische Farbstoffe vermögen (Wahlfors *et al.*, 2001).

Generell ergeben sich beim Einsatz von Reporter genen Grenzen. Die Expression des integrierten Gens kann mit zunehmender Zeitdauer abnehmen (Migliaccio *et al.*, 2000) oder es kann sich das Wachstums- und/oder Metastasierungsverhalten der Zellen durch die Transfektion im Vergleich mit den Wildtyp-Zellen ändern. Walter *et al.* konnten auch zeigen, dass EGFP unter Kontrolle eines CMV-Promotors in verschiedenen Geweben in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert wird (Walter *et al.*, 2000).

## 2. FRAGESTELLUNG

In der präklinischen Onkologie ist man stetig auf der Suche nach prädiktiveren Modellen, um neue Substanzen auf ihre Wirksamkeit zu prüfen. Dabei muss man je nach Fragestellung das geeignete Versuchsdesign auswählen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine umfangreiche und vergleichende Charakterisierung eines orthotopen Kolonkarzinom-Xenograft-Modells anhand verschiedener Injektions- und Transplantationstechniken unter besonderer Berücksichtigung von Kriterien wie Anwachsrate, Tumorwachstum, Vaskularisierung und CEA-Sekretion sowie Metastasierung durchgeführt.

Die ausgewählte humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 wurde sowohl in vitro als auch in in-vivo-Versuchen in weiblichen SCID-Mäusen einer eingehenden Untersuchung unterzogen. Dabei wurden neben der subkutanen Injektion auch zwei unterschiedliche orthotopen Techniken (Zellinjektion & Fragmentfixation) angewandt.

Neben den Wildtyp-Zellen wurden auch HT29-GFP-Zellen eingesetzt, um die Eignung dieses Reportergens hinsichtlich einer verbesserten und vereinfachten Auswertung der Tierversuche zu überprüfen.

Zur genauen Charakterisierung wurden Zellkultur, klassische Histologie (HE-Färbung), Immunhistochemie (CEA-, CD34-Färbung), Fluoreszenzmikroskopie und ein ELISA-Test zur Bestimmung von CEA im Serum eingesetzt.

*Durch die Arbeit sollten folgende zentrale Fragen beantwortet werden:*

- Welches Modell ist für welche Fragestellungen geeignet ?
- Welche Vor- und Nachteile bietet jedes einzelne Modell im Rahmen der Wirkstoffprüfung ?
- In welchem Umfang sind die verwendeten Tiermodelle auf den Menschen übertragbar ?
- Ist GFP in diesen Modellen ein geeignetes Reportergergen mit dessen Hilfe sich verschiedene Fragestellungen dieser Arbeit beantworten lassen ?  
Erleichtert es die quantitative Auswertung ?

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Antibody Diluent	DAKO, Hamburg
Antigene Unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame
Antikörper CEA Rabbit Anti-Human polyklonal	DAKO, Hamburg
Antikörper Mouse cd34 clone MEC 14.7	Hycult Biotechnology, Niederlande
Äther	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Braunol®	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Casyton-Lösung	Schärfe-System, Reutlingen
DMSO, 20 %	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Eisessig	Merck, Darmstadt
EnVision™ +HRP, Ziege Anti-Kaninchen	Dako, Hamburg
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol (z. A.)	Merck, Darmstadt
Ethanol (vergällt)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories GmbH, Innsbruck
Formaldehyd-Lsg., 3,8 % gepuffert	Merck, Darmstadt
Geneticin (G 418)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HBSS W/W Phenol Red	Invitrogen, Karlsruhe
HCl (12N)	Merck, Darmstadt
Histomount	Shandon, Frankfurt
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Kanamycin-POS	Ursapharm, Saarbrücken
Kaninchenserum (normal)	Dako, Hamburg
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Mäuseserum (normal)	Dako, Hamburg
Mikrozid® Liquid	Schülke & Mayr, Norderstedt
NaCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NaCl-Lösung, 0,9 %	Delta Pharma, Pfullingen
PBS, 10 x	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

PBS, 1x	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Peroxidase Blocking Reagent	DAKO, Hamburg
Pronase, 1 %	DAKO, Hamburg
RPMI 1640 (mit NaHCO <sub>3</sub> )	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Sauerstoff	BOC Gase, Bopfingen
Trizma-Base (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trizma-HCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypsin-EDTA-Lösung (1 x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Temgesic®-Ampullen	Boehringer Mannheim, Mannheim
Tween20	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame
Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegenserum (normal)	DAKO, Hamburg

### 3.1.2 Geräte

Ausbettstation	Tissue-Tek, Niederlande
Brutschrank CO <sub>2</sub> – Auto-Zero	Heraeus Instruments, Hanau
Casy TTC Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
Dampftopf „Multi-Gourmet“	Braun, Kronberg
Digitalkamera Coolpix 990	Nikon GmbH, Düsseldorf
ELISA-Reader GENios	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Einbettautomat	Shandon, Frankfurt
Eindeckautomat	Tissue-Tek, Niederlande
Fluoreszenzmikroskop mit digitalem Aufnahmesystem	Olympus, Japan
Lichtmikroskop Axioskop mit digitalem Aufnahmesystem	Zeiss, Jena
Immunfärbeautomat „Autostainer“	DAKO, Hamburg
Mikrotom	Leica, Bensheim
Narkosegerät nach Stephens	Fa. Eikemeyer, Tuttlingen
pH-Meter inoLab	WTW, Wien
Sterilwerkbank	BDK, Reutlingen
Tischzentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Waage Sartorius BP 2100	Sartorius AG, Göttingen

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

Blockierungs-Serum CEA	5 ml Ziegenserum + 2 g BSA in 100 ml TBS (1 x) lösen
Blockierungs-Serum CD34	Kaninchen Serum 1:50 in PBS/BSA 1% (pH 7,4)
1 % Eosin-Lösung	10 g Eosin in 1000 ml Aqua dest. lösen → vor Gebrauch ca. 0,3 ml Eisessig zu 200 ml Eosin geben
Hämalaun nach Mayer	1,0 g Zitronensäure 1,0 g Hämatoxylin 0,2 g Natriumjodat 50 g Aluminiumkaliumsulfat 50 g Chloralhydrat ad 1000 ml Aqua dest. (heiß lösen)
PBS/BSA 1%	100 mg BSA + 10 ml PBS (pH 7,4)
Pronase 0,05 %	0,1 ml Pronase 1 % + 1,9 ml TBS (1x)
RPMI-Medium für HT29	500 ml RPMI-Medium (mit NaHCO <sub>3</sub> ) + 50 ml FKS + 5 ml L-Glutamin
RPMI-Medium für HT29-GFP	500 ml RPMI-Medium (mit NaHCO <sub>3</sub> ) + 50 ml FKS + 5 ml L-Glutamin + 3 ml Genitacin (G 418)
10 x TBS	13,9 g Trizma-Base + 60,6 g Trizma-HCl + 87,66 g NaCl in 1000 ml Aqua dest. lösen und pH mit 12N HCl auf pH 7,4 einstellen

1 x TBS	100 ml 10 x TBS + 900 ml Aqua dest.
TBS/Tween 0,05 %	1000 ml TBS (1 x ) + 0,5 ml Tween20

### 3.1.4 Reaktionssysteme

CEA-ELISA Kit (No. 800)	Alpha Diganostic International, San Antonio, USA
DAKO ChemMate Detection Kit (Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse)	DAKO, Hamburg

### 3.1.5 Tiernahrung

Altromin 1434 FORTIFIED	Altromin GmbH, Lage
-------------------------	---------------------

### 3.1.6 Sonstiges

DAKO Pen	DAKO, Hamburg
Dexon II Faden (6-0)	B.Braun-Dexon GmbH, Spangenberg
Ethibond Excel Faden (4-0)	Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt
Einmalspritzen (1, 2 und 5 ml)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Gazin-Kompressen (10 x 10 cm)	Lohmann GmbH & Co. KG, Neuried
Kanülen (30, 27 und 26 G)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Microvette 200 & 500 Z-Gel	Sarsted AG & Co., Nürnberg
Mikropipetten (44,7 µl)	Sarsted AG & Co., Nürnberg
Mulltupfer (walnussgroß)	Lohmann GmbH & Co. KG, Neuried
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
SuperfrostPlus-Objektträger	Menzel-Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig
TissueTek-Kapseln	Tissue-Tek, Niederlande
Transponder-Chips	PLEXX, Niederlande
Wundklammern (9 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg

### **3.1.7 Zellen**

#### **3.1.7.1 HT29**

Die Zelllinie HT29 wurde 1964 aus einem gut differenzierten Adenokarzinom des Kolons einer 44-jährigen Frau etabliert. HT29-Zellen wachsen adhärent, einschichtig und bilden große Kolonien. Die Tumoren gehören zu den epithelialen Tumoren. Sie tragen auf Ihrer Oberfläche u.a. Rezeptoren für Urokinase und Vitamin D. Außerdem werden CEA, Muzin und die sekretorische Komponente des IgA sezerniert.

Man erhält diese Zellen unter der ATCC-Bestellnummer *HTB-38* beim NCI (National Cancer Institute), Bethesda, USA.

Zur Zellgewinnung für die Tierversuche waren die Kulturflaschen zu 80 – 90 % bewachsen. Die Zellzahl betrug zwischen  $1,7$  und  $2,7 \times 10^6$  Zellen pro ml. Verwendet wurde die Passage 4 - mit Ausnahme der subkutanen Injektion zur Fragmentgewinnung - dort wurde Passage 3 eingesetzt.

#### **3.1.7.2 HT29-GFP**

Die Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Birgit Bossenmaier, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg zur Verfügung gestellt.

### **3.1.8 Mäuse**

In allen Versuchen wurden weibliche SCID- Mäuse (C.B-17-scid/lcrCrl) eingesetzt.

SCID-Mäuse (= severe combined immune deficiency) zeichnen sich durch eine spontane Mutation im C.B-17/lcr-Bereich aus, welche den Lokus für die schwere Kette von Immunglobulinen (IgH) trägt. Die SCID-Mutation hat ihren Haupteinfluss auf das Rearrangement der Gensegmente während der Reifung von B- und T-Zellen, da die Lymphozyten eine defekte Rekombinase exprimieren. Dies führt zu einem abnormalen und nicht funktionierenden Antigen-Rezeptor-Rearrangement, was wiederum die Bildung von Immunglobulinen und T-Zellrezeptoren verhindert.

SCID-Mäuse haben eine geringe Anzahl zirkulierende Lymphozyten und wenig oder keine Serumimmunglobuline (üblicherweise unter 0,02 mg/ml), wogegen die Zahl der Erythrozyten, Neutrophilen und NK-Zellen im Normalbereich liegt. Lymphknoten und Thymus haben etwa 10 % der normalen Größe, die Milz kann verkleinert sein.

(M & B Data Sheet).

Die in den Versuchen eingesetzten Mäuse waren zu Versuchsbeginn zwischen 6 und 10 Wochen alt.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **3.2.1.1 Zellkultur**

Die Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Medium wird RPMI-Medium verwendet, das bereits 1 mM Natrium-Pyruvat enthält, und zusätzlich noch mit 10 % FKS und 2 mM L-Glutamin versetzt wird.

Dem Medium für die HT29-GFP-Zellen werden außerdem noch 600 µl Geneticin/ml zugesetzt, um Zellen zu selektieren, die stabil mit dem Neomycin-Resistenz-Gen (neo) transfiziert worden sind.

Da es sich bei den Zelllinien um adhärent wachsende Zellen handelt, werden die Zellen gesplittet, wenn sie einen nahezu konfluenten Zellrasen gebildet haben.

Für die Passagierung und Ernte wird das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wird durch Zusatz von Medium gestoppt. Die Zellsuspension wird anschließend bei 300 x g für 5 min abzentrifugiert, mit PBS oder Medium gewaschen und erneut wie oben beschrieben ausgesät oder für weitere Analysen verwendet.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspension in Casyton-Lösung mit dem Casy TTC Zellzählgerät.

#### **3.2.1.2 Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen**

Zellkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase (ca.  $2 \times 10^5 - 4 \times 10^6$  Zellen/ml) werden wie unter 3.2.1.1 beschrieben geerntet. Nach dem Zentrifugieren wird das Zellsediment von je  $5 \times 10^5 - 5 \times 10^6$  Zellen in 500 µl kaltem FKS (4 °C) resuspendiert und in auf Eis gelagerte Einfrierröhrchen überführt. Anschließend werden 500 µl einer eiskalten Mischung aus 15 % DMSO und 85 % FKS in die Ampullen hinzugefügt. Die Konzentration von DMSO beträgt damit 7,5 % pro Ampulle. Die Ampullen werden in einem Einfrierbehälter langsam auf die Lagerungstemperatur von – 80 °C gebracht und anschließend in einem Stickstofftank bei – 196 °C aufbewahrt.

### 3.2.1.3 Bestimmung von Generationszahl, Generationszeit und Teilungsrate

Zum Vergleich des in-vitro-Wachstums von HT29 und HT29-GFP (mit und ohne Geneticin-Zusatz) werden jeweils fünf T25-Zellkulturflaschen mit jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen/ml beimpft und bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank aufbewahrt.

Nun wird an fünf aufeinanderfolgenden Tagen die Zellzahl mittels Casy TTC Zellzählgerät (Kursor bei 7,5 und 30  $\mu\text{m}$ ) bestimmt, wobei die Vitalität der Zellen mindestens 90 % betragen muß.

Zunächst ermittelt man die Generationszahl ( $n$ ), die angibt, wie viele Generationen sich im untersuchten Zeitraum entwickelt haben:

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

$N$  = Zellzahl  
 $N_0$  = Zellzahl zu Beginn  
 $n$  = Generationszahl

Die Generationszeit ( $g$ ) wird definiert als Zeit, in der sich die Anzahl der Zellen verdoppelt. Sie ergibt sich nach folgender Formel:

$$g = \frac{t}{n}$$

$t$  = Zeitraum zwischen zwei Messungen

Als Teilungsrate ( $v$ ) bezeichnet man den reziproken Wert der Generationszeit. Man kann damit die Verdopplungen pro Zeiteinheit ablesen. Man berechnet sie mit dieser Formel:

$$v = \frac{n}{t}$$

$n$  = Generationszahl  
 $t$  = Zeitraum zwischen zwei Messungen

### **3.2.2 Tierversuche**

#### **3.2.2.1 Haltung und Fütterung der Mäuse**

Die Mäuse werden vom Züchter (Charles River, Sulzfeld) ca. 2 Wochen vor Versuchsbeginn in speziellen Transportkäfigen angeliefert. Sie werden dann eine Woche in einer Quarantäneeinheit des Versuchstierstalls der Roche Diagnostics GmbH auf klinische Auffälligkeiten beobachtet, bevor sie schließlich noch eine Woche zur Eingewöhnung im eigentlichen Versuchstierraum verbringen. Alle Tiere sind gemäß der FELASA-Richtlinien frei von mäusepathogenen Mikroorganismen und können somit unter SPF-Bedingungen gehalten werden.

Die Tiere werden in Gruppen zu je fünf Mäusen pro Käfig eingeteilt. Es werden Makrolon Käfige Typ III (Grundfläche ca. 820 cm<sup>2</sup>) verwendet.

Als Futter wird pelletiertes Nageralleinfutter (Altromin Fortified, Altromin, Lage) und Wasser ad libitum angeboten. Die Tiere werden einmal pro Woche in einen frischen Käfig umgesetzt. Wasser und Futter werden zudem täglich kontrolliert.

In den Versuchstier- und Behandlungsräumen herrschen standardisierte Umweltbedingungen von 22 °C und 50 % Luftfeuchtigkeit. Ein automatisiertes Programm mit 12h/12h - Rhythmus regelt den Wechsel zwischen Hell und Dunkel, d.h. von 7.00 bis 19.00 Uhr sind die Tierräume erleuchtet.

#### **3.2.2.2 Markierung der Tiere**

Für die Markierung der Versuchstiere werden Transponder-Chips (PLEXX, Niederlande) verwendet. Diese werden vor Versuchsbeginn nach einer individuellen Programmierung (Experiment, Gruppe und Tiernummer) subkutan zwischen die Schulterblätter implantiert.

#### **3.2.2.3 Operationen**

Bei allen Versuchen findet eine Inhalationsnarkose Anwendung. Es steht ein Narkosegerät nach Stephens mit Isofluran als Narkosegas und medizinischem Sauerstoff als Trägergas zur Verfügung. Zur Narkoseeinleitung werden bis zu 4 % Isofluran eingesetzt; die Erhaltung wird mit 1,5 bis 3 % bestritten.

Die Mäuse werden in einer speziell angefertigten Plexiglasskammer mit dem Gasgemisch in Kontakt gebracht.

Nach Eintritt in das Toleranzstadium – die Tiere liegen ruhig in der Kammer und atmen regelmäßig – wird eine Maus entnommen und mit der Schnauze in eine spezielle Silikonmaske geschoben. Diese Maske ist ebenso wie die Kammer Teil des Narkosegaskreislaufes, so dass die Tiere weiterhin das Isofluran-O<sub>2</sub>-Gemisch einatmen. Nach Überprüfung der Narkosetiefe, wobei dem Ausfall des Zwischenzehenreflexes als Zeichen ausreichender Analgesie besondere Bedeutung zukommt, kann mit den verschiedenen Manipulationen begonnen werden.

### Subkutane Technik

Das narkotisierte Tier liegt in linker Seitenlage auf dem abgedeckten Operationstisch. Die rechte Seite wird geschoren und mit einem jodhaltigen Desinfektionsmittel (z.B. Braunol®) desinfiziert. Die auf Eis bereitgestellten in PBS suspendierten Zellen werden mittels einer 1 ml-Spritze aufgezogen. Die Injektion erfolgt mit einer 26 G-Nadel (0,45 x 23 mm) in die Flanke. Bei einseitiger Applikation wird die rechte Flanke bevorzugt, da so die Tumormessungen für einen Rechtshänder später einfacher sind. Die Kanüle wird durch die Haut gestochen. Die Verschieblichkeit wird vorsichtig überprüft, um sicher zu gehen, dass die Nadel subkutan liegt. Dann werden die Zellen appliziert.

Anschließend wird die Maus in einen Käfig zurückgelegt und während der kurzen Aufwachphase beobachtet. Um Wärmeverluste zu vermeiden, stehen Rotlicht-Wärmelampen zur Verfügung, mit denen die Tiere aus geeigneter Entfernung bestrahlt werden.

### Orthotope Techniken

Da die orthotopen Techniken einen Bauchschnitt erfordern und durch die Manipulation am Caecum ein nicht unwesentliches Schmerzpotential in sich bergen, kommt hier ein Schmerzmanagement mit Buprenorphin (Temgesic®) zur Anwendung.

Alle Mäuse werden nach folgendem Schema behandelt:

Präoperativ (am Abend vor der OP):	0,1 mg/ kg KGW s.c. (Volumen: 0,1 ml)
Intraoperativ:	0,1 mg/ kg KGW s.c. (Volumen: 0,1 ml)
Postoperativ (ca. 6 h post op.):	0,1 mg/ kg KGW s.c. (Volumen: 0,1 ml)

Die subkutane Injektion erfolgt in der Nackenfalte zwischen den Schulterblättern.

Das narkotisierte Tier liegt in Rückenlage auf dem abgedeckten OP-Tisch. Das Abdomen wird geschoren und mit einem jodhaltigen Desinfektionsmittel (z.B. Braunol<sup>®</sup>) desinfiziert. Im linken unteren Quadranten wird eine kleine Inzision vorgenommen. Das Caecum wird aufgesucht und vorsichtig vorgelagert. Dabei benutzt man mit sterilem NaCl getränkte sterile Gaze als Unterlage.

➤ Orthotope Zellinjektion

Nun werden  $1 \times 10^6$  Zellen in 50  $\mu$ l PBS in die Wand des Caecums injiziert (30 G-Kanüle; 0,30 x 12 mm). Bei erfolgreicher Injektion bildet sich eine deutlich sichtbare „Blase“ zwischen der Serosa und den restlichen Schichten der Darmwand. Das Caecum wird vorsichtig zurück verlagert. Peritoneum und Muskulatur werden durch Einzelhefte mit 4-0 Ethicon<sup>®</sup> Ethibond Excel geschlossen. Die Wundränder der Haut werden mit 2 - 3 Wundklammern (9 mm) in einem Abstand von 3 bis 5 mm adaptiert.

➤ Fragmentgewinnung für die orthotope Fragmentfixation

Zur Fragmentgewinnung injiziert man zehn Mäusen bilateral je Flanke  $6 \times 10^6$  Zellen s.c. und lässt die Tumoren bis zu einem Volumen von 400 – 500 mm<sup>3</sup> wachsen. Dann werden die Tumoren vorsichtig reseziert, eventuell vorhandenes nekrotisches Gewebe wird entfernt und das verbleibende vitale Tumorgewebe wird in kleine Fragmente von ca. 3 mm Durchmesser und ca. 40 mg/Stück geschnitten und in eisgekühltem HBSS aufbewahrt. Um die explantierten Tumoren nicht unnötig lange in HBSS aufbewahren zu müssen, werden die Tumoren zeitlich versetzt entnommen. So sollte kein Fragment länger als 45 Minuten außerhalb der Maus zugebracht haben, wenn es noch zur Fixation am Caecum verwendet werden soll.

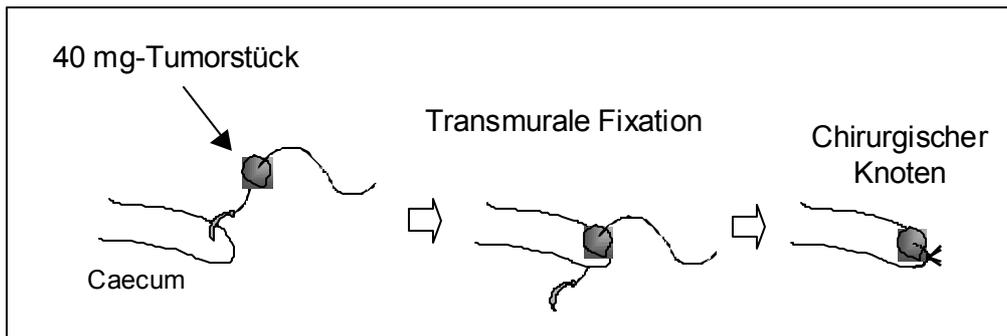
Die Präparation der Fragmente lässt sich gut auf steriler Aluminiumfolie durchführen, da so ein Anhaften der Tumorstücke an die Unterlage weitestgehend verhindert wird.

➤ orthotope Fragmentfixation

Das Tier ist, wie unter „Orthotope Techniken“ beschrieben, vorbereitet.

Die Caecum-Spitze wird so gut wie möglich von Kot befreit, d.h., man streicht die Ingesta vorsichtig mit einer stumpfen Pinzette oder anderen geeigneten Instrumenten Richtung Colon/Ileum. Ein Tumorstück wird mit einem 6-0 Faden (DEXON II<sup>®</sup> 0.7 metric, 45 cm lang, HR 13-Nadel) durchstochen und „aufgefädelt“.

Die Serosa der Caecum-Spitze wird auf ca. 2 mm Breite und Länge mit der Nadel des Fadens „angerauht“. Dann durchsticht man die Caecumspitze mit der Nadel und führt den Faden mit dem „aufgefädelten“ Tumorstück hindurch. Das Fragment wird dann mittels chirurgischer Knoten am Caecum befestigt (Abbildung 5). Fadenreste werden sorgfältig aus dem Abdomen entfernt.



**Abbildung 5: Transmurale Fixation eines Tumorfragments am Caecum**

Anschließend gibt man eine NaCl-Kanamycin-Lösung (Kanamycin 250 µg/ml) über die exponierten Organe, um einer durch die transmurale Technik bedingten Peritonitis aufgrund verschleppter Darmbakterien vorzubeugen. Das Caecum wird so zurück verlagert, dass das angenähte Fragment nicht an das Peritoneum stößt, also „innen“ liegt. So vermeidet man größtenteils Adhäsionen zwischen Fragment und Bauchwand.

Der Wundverschluss erfolgt wie bei der orthotopen Zellinjektion, d.h. Peritoneum und Muskulatur werden durch Einzelhefte mit 4-0 Ethicon® Ethibond Excel geschlossen; die Wundränder der Haut werden mit 2 - 3 Wundklammern (9 mm) im Abstand von 3 bis 5 mm adaptiert.

Alle operierten Tiere werden nach dem Eingriff zurück in neue Käfige gelegt und mit einer Rotlicht-Lampe aus geeigneter Entfernung für 1 - 2 Stunden post operationem bestrahlt, um zu großen Wärmeverlusten durch die Narkoseprozedur vorzubeugen. Die Käfige sind nach der Operation mit Bodengittern und Abdecktüchern ausgestattet, um eine Verschmutzung der Bauchnaht durch Streu zu vermeiden. Am Tag nach der Operation werden die Tiere dann in Käfige mit konventioneller Einstreu umgesetzt. Die Wundklammern werden (je nach Zustand der Hautwunde) nach 10 - 14 Tagen entfernt.

### 3.2.2.4 *Abbruchkriterien*

Es handelt sich bei den durchgeführten Versuche um anzeigepflichtige Tierversuche gemäß § 8<sup>1)</sup> Abs. 7 Nr. 1 und 2, die durch die Regierung von Oberbayern genehmigt wurden und unter folgenden Aktenzeichen geführt werden:

Aktenzeichen 211-2531.2-50/2000 humanisiertes subkutanen Tumormodell

Aktenzeichen 211-2531.2-16/2001 orthotopes Gastrointestinalkarzinommodell

Alle Untersuchungen erfolgten zudem nach den Richtlinien des Ausschusses für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und des Arbeitskreises 4 in der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (TVT) " Kriterien zur vorzeitigen Tötung von tumortragenden Mäusen und Ratten im Versuch". In jedem Fall wurde durch tägliche Beobachtung sichergestellt, dass Versuchstiere schmerzlos getötet werden, bevor ein vorhersehbarer Tod eintritt sowie wenn ihr Befinden offensichtlich beeinträchtigt ist.

Dies ist bei orthotopen Tiermodellen von besonderer Bedeutung, da hier das Wachstum des Tumors in der Regel während des Versuches nicht bzw. schlecht gemonitort werden kann.

Insbesondere werden alle Tiere getötet, die exzessives Tumorwachstum erkennen lassen (Tumordurchmesser  $\geq 20$  mm bzw. Tumorgewicht  $> 4$  g). Auch alle Tiere mit ulzerierten Tumoren werden sofort getötet. Durch das Tumorwachstum bedingte Reduktionen im Körpergewicht der Tiere, welche 20 % übersteigen, sind ebenfalls ein sofortiger Abbruchgrund.

### 3.2.2.5 *Messung von Tumorgröße und Körpergewicht*

Bei allen Versuchen wird zweimal pro Woche das Körpergewicht der Mäuse bestimmt.

Die Größe der subkutan wachsenden Tumoren wird mittels eines elektronischen Messschiebers ebenfalls zweimal pro Woche protokolliert. Das Volumen des Tumors wird dann nach folgender Formel berechnet:

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

<sup>1)</sup> Alle Paragraphen beziehen sich auf das Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.05.1998.

Bei den orthotopen Versuchen ist der Tumor selbst äußerlich nicht messbar. Durch die tägliche Überprüfung der Futter- und Wasserversorgung ist gewährleistet, dass eventuelle Verhaltensauffälligkeiten oder Störungen des Allgemeinbefindens anderer Art sofort bemerkt werden.

### **3.2.2.6 Versuchsende**

Am letzten Versuchstag werden die Tiere durch transzervikale Dislokation getötet und sezziert. Abweichungen von der Norm werden in einem Sektionsprotokoll festgehalten. Primärtumor, Lunge und Leber werden entnommen und in 3,8%igem Formaldehyd konserviert. Die Lunge wird zur besseren Fixierung mit 3,8%igem Formaldehyd instilliert.

Bei den beiden orthotopen Versuchen erfolgt vor der Sektion noch eine retrobulbäre Blutentnahme unter Äthernarkose. Das Blut wird in Serumröhrchen (Microvette 200 & 500 Z-Gel, Sarsted AG & Co., Nürnberg) aufgefangen und nach einer Wartezeit von mindestens einer Stunde 10 min lang bei 10 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Das Serum wird abpipettiert und für weitere Untersuchungen bei – 20 °C eingefroren.

Zur Dokumentation werden die orthotopen Darmtumoren sowie etwaige Auffälligkeiten mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 990) fotografiert und für weitere Auswertungen archiviert.

## **3.2.3 Histologische und Immunhistochemische Analyse**

### **3.2.3.1 Gewebefixierung und Paraffinschnitte**

Die Organe werden nach deren Entnahme mindestens 24 h in gepufferter 3,8%iger Formaldehydlösung fixiert, mit einem Skalpell in 2 – 3 mm dicke Stücke geschnitten und in einem Gewebeeinbettautomaten (Shandon, Frankfurt) weiter behandelt. Dort durchlaufen sie einen Entwässerungsvorgang und werden über Xylol in Paraffin überführt.

Das verwendete Programm beinhaltet mehrere Schritte, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind:

Reagenz	Temperatur	Immersion [h]
H <sub>2</sub> O fließend	RT	2,0
70 % Ethanol	RT	1,5
70 % Ethanol	RT	1,5
70 % Ethanol	RT	1,5
95 % Ethanol	RT	1,5
95 % Ethanol	RT	1,5
100 % Ethanol	RT	1,5
100 % Ethanol	RT	1,5
Xylol	RT	1,5
Xylol	RT	1,5
Xylol	RT	1,5
Paraffin	60 °C	2,0
Paraffin	60 °C	2,0

**Tabelle 1: Programm Einbettautomat**

[RT = Raumtemperatur]

Im Anschluss daran werden die Organe in Paraffinblöcke eingebettet. Dies geschieht an einer Ausbettstation (Tissue-Tek, Niederlande), die im wesentlichen aus einem heissen Paraffinbad, einer Kühlplatte und vorgeheizten Pinzetten und Metallförmchen besteht.

Man achtet darauf, dass die Schnittflächen der Organe auf dem Boden der Metallförmchen parallel zueinander angeordnet werden, damit sie sich nach Erstarren des Paraffins möglichst nah an der Oberfläche des fertigen Paraffinblockes befinden.

Von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe werden mit einem Schlittenmikrotom 2 - 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf SuperfrostPlus-Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 37 °C getrocknet und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Zum Nachweis von Metastasen in Lunge und Leber werden „Serienschnitte“ angefertigt, d.h., es werden pro Organ drei Ebenen geschnitten. Der Abstand zwischen den unterschiedlichen Ebenen beträgt bei der Lunge 80 µm und bei der Leber 100 µm. So erhält man pro Lunge bzw. pro Leber drei Paraffinschnitte.

### 3.2.3.2 HE-Färbung

Bei der HE-Färbung (= Hämatoxylin-Eosin-Färbung) handelt es sich um eine Kern-Plasma-Färbung für die Routineuntersuchung von histologischen Schnitten.

Die Kerne färben sich blauschwarz bis violett, zytoplasmatische Bestandteile rosa bis rot. Erythrozyten weisen eine charakteristische ziegelrote Farbe auf.

#### Prinzip:

Der Kernfarbstoff **Hämatoxylin** ist ein farbloser oder gelblicher kristalliner Farbstoff, der aus dem Blauholz (*Haematoxylon campechianum*, Mittelamerika) gewonnen wird. Die Kristalle lösen sich in Wasser, Alkohol und Glycerin. Die eigentlichen färberischen Eigenschaften kommen nicht dem Hämatoxylin zu, sondern dem durch Oxidation entstehenden Hämatein. Man nennt diesen Vorgang auch Reifung.

Bleibt die Lösung längere Zeit zum Oxidieren in offener Flasche stehen, spricht man von „natürlicher Reifung“. Wird beim Ansetzen der Lösung ein Oxidationsmittel hinzugefügt nennt man es „künstliche Reifung“, d.h., die Lösung ist nach dem Ansetzen sofort gebrauchsfertig.

Hämatein ist ein schwach negativ geladener Farbstoff. Erst durch den Zusatz verschiedener Alaunsalze entstehen Hämatoxylinlacke, die stark positiv geladen sind und sich zur progressiven Anfärbung besonders der Zellkerne eignen. Bei der Ausbildung der Farblacke kommt es zu Komplexverbindungen von Hämatein mit den jeweiligen Metallionen der Alaune. Die Farbe der Hämatoxylinlacke ist abhängig vom pH-Wert. Unter pH 3 erscheinen die Lösungen rotbraun, bei höheren pH-Werten tritt die bekannte, charakteristische blaue Farbe auf. Meist färbt man in sauren Lösungen und führt dann den Hämatoxylinlack durch Spülen in Leitungswasser in seine blaue Form über („Bläuen“). Dies bedeutet gleichzeitig eine Fixierung der Färbung, da die Hämatoxylinlacke bei höherem pH-Wert schwer löslich sind.

**Eosin** ist die gebräuchlichste Plasma- und Gegenfärbung. Es ist ein vom Fluorescein abgeleiteter saurer, roter Xanthenfarbstoff.

Er wird in 1%iger wässriger Lösung angewendet. Man färbt zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten, je nach Alter der Lösung, wäscht in Aqua dest. aus und differenziert mit 70%igem Alkohol. Auf 100 ml Eosin-Färbelösung setzt man einige Tropfen Eisessig zu, um die Färbeintensität zu erhöhen.

Vor der eigentlichen Färbung müssen die histologischen Schnitte noch entparaffiniert und rehydriert werden. Die Schnitte werden in spezielle Färbeständer einsortiert und nach folgendem Schema durch die in Glasküvetten gefüllte Lösungen geführt:

Xylol	10 min	
Xylol	10 min	
100 % EtOH	2 min	
100 % EtOH	2 min	
90 % EtOH	2 min	
80 % EtOH	2 min	
70 % EtOH	2 min	
Aqua dest.	2 min	
Aqua dest.	2 min	[EtOH = Ethanol]

Nun erfolgt die eigentliche Färbung:

Hämalaun nach Mayer	20 min
H <sub>2</sub> O fließend	15 min bläuen unter fließendem Leitungswasser
Aqua dest.	kurz
Eosin	30 sec - 5 min (je nach Alter der Lösung)
Aqua dest.	kurz

Die Schnitte werden dann in einer Alkoholreihe mit steigender Ethanolkonzentration dehydriert:

70 % EtOH	kurz, differenzieren
80 % EtOH	30 sec
90 % EtOH	30 sec
100 % EtOH	1 min (Mikroskopkontrolle der Schnitte)
100 % EtOH	1 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min

Nun können die Schnitte entweder manuell mit Deckgläsern und einem geeignetem Eindeckmedium (z.B. Histomount, Shandon, Frankfurt) oder maschinell (Eindeckautomat, Tissue-Tek, Niederlande) eingedeckt werden und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Sämtliche Organproben werden dieser Färbung unterzogen, und die Lungen- bzw. Leberschnitte werden wie unter 3.2.3.5 beschrieben auf Metastasen untersucht.

### **3.2.3.3 Immunhistologischer Nachweis von CEA**

CEA (= Carcinoembryonales Antigen) ist der in der onkologischen Praxis gebräuchlichste Differenzierungsmarker für Dickdarmkarzinome. Es ist ein Glykoprotein mit 180 kD und einem Kohlenhydratanteil von 50 – 60 %. Pränatal wird es im fetalen Gewebe gebildet. Postnatal wird es in geringem Maße auf Zellen der Darmmukosa, des exokrinen Pankreas und der Leber exprimiert sowie ins Blut sezerniert. Als Tumormarker ist es von Nutzen, da es auch in größeren Mengen von einigen bösartigen Tumoren gebildet wird.

CEA dient sowohl zur Prognosebeurteilung und als auch zur Verlaufskontrolle. Ebenso ist die Unterscheidung eines primären Lebertumors von Tochtergeschwülsten anderer Tumoren in der Leber möglich. Für Screeninguntersuchungen in der Routinediagnostik bei symptomlosen Menschen ist es nicht geeignet, denn neben malignen Veränderungen gibt es auch noch andere Faktoren, die die CEA-Konzentration beeinflussen können: Entzündungen der Leber, der Bauchspeicheldrüse oder der Lunge können zu erhöhten Werten führen.

Vorbehandlung: Alkoholreihe absteigend zur Entparaffinierung und Rehydrierung

Xylol	3 x 10 min
100 % Ethanol	5 min
95 % Ethanol	2 x 5 min
70 % Ethanol	5 min
Aqua dest.	5 min
Waschen: TBS	3 min

Anschließend wird das Gewebe auf den Objektträgern mit einem speziellen Stift (DAKO Pen) mehrmals markiert, um bei den folgenden Schritten ein Abfließen der aufgetragenen Lösungen zu vermeiden.

Nun werden die Schnitte für 5 min bei RT (= Raumtemperatur) mit *Peroxidase Blocking Reagent* (DAKO, Ready-to-use) inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren und somit unerwünschte Hintergrundreaktionen zu vermeiden. Es schließt sich ein Waschschrift in *TBS* (2 x 2 min, RT) an.

Eine Maskierung von Antigenen, hervorgerufen durch die Bildung übermäßiger Aldehydvernetzungen, kann die Bindung eines Antikörper verhindern. Auch Denaturierungsvorgänge durch das Fixativ können die Antigenstruktur so verändern, dass eine Antigen-Antikörper-Bindung nicht möglich ist. Eine Vorbehandlung, die die Antigene demaskiert, d.h. „freilegt“, kann z.B. unter Erhitzung (Dampfkochtopf, Mikrowelle uvm.) oder auch mit verschiedenen Enzymen erfolgen.

In diesem Fall erfolgt eine enzymatische Vorbehandlung mit 0,05 %iger *Pronase* (10 min, RT) zur Demaskierung der Antigene. Danach wird wieder 2 x 2 min bei RT in *TBS* gewaschen.

Durch Inkubation mit *Blockierungs-Serum* (*TBS* + 2 % BSA + 5 % Ziegen Serum) werden unspezifische Bindungen von Proteinen blockiert (15 min, RT).

Die häufigste Ursache ist die Anlagerung von Proteinen an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente der Präparate. Die dadurch entstehende „unspezifische Hintergrundfärbung“ wird durch die Inkubation mit Normalserum, das zuvor bei 56 °C 30 min inaktiviert wurde, reduziert. Das eingesetzte Serum stammt von der Spezies, in der der sekundäre Antikörper hergestellt wurde.

Nachdem das Blockierungs-Serum vom Objektträger abgekippt worden ist, wird der *Primär-AK* (CEA, polyklonal, Rabbit Anti-Human, DAKO) in einer Verdünnung von 1 : 800 für 1 h bei RT aufgetragen. Dann wird in *TBS/Tween* 0,05 % gewaschen (3 x 2 min, RT).

Als Sekundär-AK wird das *EnVision™* + *HRP-Ziege-Anti-Kaninchen-Reagenz* (Ready-to-use, Dako) benutzt. Dabei handelt es sich um ein Dextran-Polymer, das sowohl das Enzym Peroxidase als auch den Sekundär-AK Ziege-Anti-Kaninchen trägt. Man benötigt hier also einen Arbeitsschritt weniger als üblich.

Die Inkubationsdauer mit dem *EnVision™*-System beträgt 30 min bei RT.

Es schließt sich ein erneuter Waschschrift mit *TBS/Tween20* 0,05 % (3 x 2 min, RT) an.

Durch Zugabe von *DAB* (aus LSAB-System/Peroxidase, DAKO) entwickelt man die Farbreaktion. Durch das Enzym Peroxidase wird unter Zusatz des Elektronendonors H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das Chromogen 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (*DAB*) zu einem braunen Farbniederschlag ausgefällt.

Dieses Reaktionsprodukt ist in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln dauerhaft beständig. Die Reaktion wird bei gewünschter Farbintensität in Leitungswasser abgestoppt.

Anschließend werden die Schnitte mit *Hämalaun nach Mayer* 10 sec gegengefärbt.

Um die Schnitte dauerhaft lagern zu können, müssen sie eingedeckt werden. Zu diesem Zweck werden sie zuvor dehydriert und in Xylol überführt:

70 % Ethanol	45 sec
85 % Ethanol	1 min
95 % Ethanol	1 min
100 % Ethanol	1 - 2 min
Xylol	2 x 5 min

Anschließend werden sie eingedeckt. Dies geschieht halbautomatisch mit einem Eindeckautomaten (Tissue-Tek, Niederlande).

#### 3.2.3.4 Immunhistologischer Nachweis von CD34

CD-Moleküle (CD = cluster designation) bilden eine Gruppe von Molekülen, die man auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen vorfindet. CD34 ist ein einsträngiges transmembrales Glykoprotein, das auf Endothelzellen und hämatopoetischen Progenitor-/Vorläuferzellen exprimiert wird. Färbt man nun histologische Schnitte mit einem CD34-Antikörper, kann man aufgrund der angefärbten Endothelien Aussagen über die Gefäßversorgung des untersuchten Gewebes treffen.

Der eingesetzte Antikörper (Anti-Maus CD34, Klon MEC 14.7, Hycult Biotechnology, Niederlande) erkennt ein Neuraminidase-sensitives Epitop das vorrangig auf Endothel kleiner Blutgefäße, neuformierter Kapillaren oder sich entwickelnder Gefäßstrukturen vorkommt. Des weiteren reagiert er mit hämatopoetischen Stammzellen.

Der monoklonale Antikörper stammt aus der Ratte (IgG<sub>2a</sub>) und ist gegen murines CD34 gerichtet.

Vorbehandlung: Alkoholreihe absteigend zur Entparaffinierung und Rehydrierung

Xylol	3 x 10 min
100 % Ethanol	5 min
95 % Ethanol	2 x 5 min
70 % Ethanol	5 min
Aqua dest.	5 min
Waschen: TBS	3 min

Die weiteren Arbeitsschritte werden in einem Färbeautomat (Autostainer, Dako) durchgeführt.

Zu Anfang werden die Schnitte mit 3 %igem  $H_2O_2$  (5 min, RT) bedeckt, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Es folgt ein Waschschrift mit TBS/Tween 0,05 %. Anschließend inkubiert man mit Blockierungs-Serum (Kaninchenserum 1:50 in PBS/BSA 1 %) für 20 min bei RT, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Lösung wird ohne Waschschrift vom Schnitt entfernt. Als nächstes folgt die einstündige Inkubation mit dem Primär-AK (Anti-Maus CD34, Klon MEC 14.7, Fa. Hycult Biotechnology) bei RT. Der Antikörper wird dabei in einer Verdünnung von 1:50 in „Antibody Diluent“ (Dako) eingesetzt. Erneut ist ein Waschschrift mit TBS/Tween 0,05 % dazwischen geschaltet. Danach wird der biotinylierte Sekundär-AK (Anti-Ratte, Kaninchen-IgG, biotinyliert, Vector) für 30 min bei RT aufgebracht. Die Verdünnung erfolgt im Verhältnis 1:100 in PBS/BSA 1 %. Dieser Lösung werden noch 4,9 % Mäuseserum zugesetzt, um weitere unspezifische Bindungen zu verhindern.

Als Tertiärreagenz wird mit HRP konjugiertes Streptavidin (aus ChemMate-Kit CM 5001; Streptavidin-Biotin HRP/DAB Kaninchen/Maus, Dako) verwendet. Man inkubiert die Proben für 10 min bei RT. Ein Waschschrift mit TBS/Tween 0,05 % folgt.

Anschließend erfolgt die Farbreaktion mit DAB (Dako) über 5 min bei RT.

Die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer wird manuell durchgeführt.

Zur dauerhaften Lagerung der Gewebeschnitte schließt sich eine aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung und die Überführung in Xylol an. Als letzter Schritt erfolgt das Eindecken der Schnitte.

Nach diesem Protokoll werden alle orthotopen Darmtumoren gefärbt und nach Anzahl und Fläche der markierten Gefäße wie unter 3.2.3.6 beschrieben ausgewertet.

### 3.2.3.5 Bestimmung der Metastasenfläche und -anzahl von histologischen Präparaten (Leber, Lunge)

Die HE-gefärbten Schnitte von Lunge und Leber werden bei 100facher bis 200facher Vergrößerung in Mäanderform nach Metastasen untersucht. Identifiziert man eine bzw. mehrere Metastasen werden diese mit einer direkt dem Mikroskop aufsitzenden Digitalkamera fotografiert und anschließend mit dem Bildverarbeitungsprogramm *ImagePro Plus 4.0* (Media Cybernetics, USA) ausgewertet. Hierfür werden die Metastasen manuell mit dem Cursor markiert und das Programm errechnet die Fläche dieses Bereichs sowie die Anzahl der Metastasen.

### 3.2.3.6 Bestimmung der CD34 - positiven Gefäße der orthotopen Darmtumoren im Paraffinschnitt

Die wie unter 3.2.3.4 beschrieben gefärbten Paraffinschnitte werden mikroskopisch ausgewertet, um die Gefäßversorgung der Primärtumoren miteinander zu vergleichen. Von jedem orthotopen Darmtumor werden jeweils vier zufällige Abschnitte bei 100facher-Vergrößerung mit einer Digitalkamera fotografiert und mit dem Bildverarbeitungsprogramm *MetaMorph 4.5.0.0*. (Universal Imaging Corp., USA) ausgewertet, d.h. das Programm zählt die markierten Objekte und errechnet die Fläche. In Abbildung 6 ist die Benutzeroberfläche der verwendeten Software beispielhaft dargestellt. Die grün markierten Objekte werden gezählt und ihre Fläche kalkuliert.

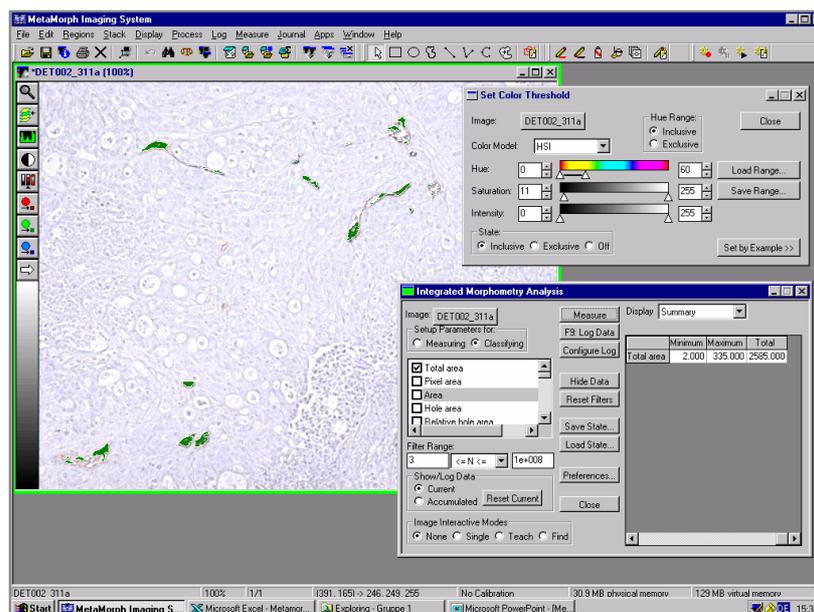


Abbildung 6: Benutzeroberfläche Bildbearbeitungsprogramm MetaMorph

### 3.2.4 CEA-ELISA

In den Serumproben, die bei den orthotopen Versuchen gewonnen wurden, wird der Gehalt an CEA (= Carcinoembryonales Antigen) bestimmt. Dazu wird ein ELISA-Kit der Firma Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA, benutzt.

Das Prinzip dieses CEA-ELISA-Kits basiert auf der Bindung des Antigens (CEA) an zwei Antikörper, wobei der Primärantikörper an eine Mikrotiterplatte fest gebunden ist und der Sekundärantikörper mit dem Enzym HRP (= *Horseradish-Peroxidase*) konjugiert ist.

Das Enzym bewirkt dann nach Substratzugabe eine Farbreaktion, die direkt proportional zum CEA-Gehalt der Proben ist.

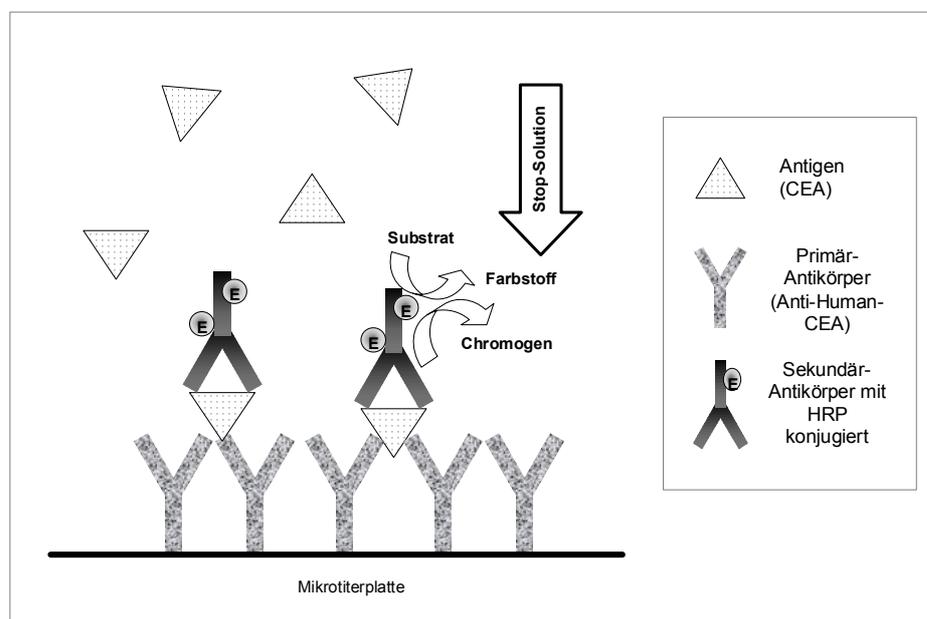


Abbildung 7: Prinzip CEA-ELISA

Man pipettiert je 25 µl der Standard- und Kontroll-Lösungen, sowie der einzelnen Proben in die entsprechenden Stellen auf der Mikrotiterplatte. Anschließend gibt man je 100 µl Anti-CEA-HRP-Konjugat dazu, deckt die Platte ab und inkubiert für 60 min bei RT.

Nach der Ablauf der Zeit wäscht man fünfmal mit Leitungswasser. Nun gibt man das Substrat hinzu. Dazu werden je 100 µl von Lösung A und Lösung B in jeder Vertiefung pipettiert, vorsichtig geschüttelt und die Platte für 30 min bei RT inkubiert.

Am Ende werden je 50 µl Stop-Lösung hinzugefügt und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader (GENios, Tecan Deutschland GmbH) gemessen.

Anhand der Standardkurve können die CEA-Konzentrationen berechnet werden.

### 3.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wird mit dem Programm SigmaStat 2.03 (SPSS, Erkrath) durchgeführt. Die Ergebnisse werden hinsichtlich ihrer Verteilung getestet; liegt eine Gleichverteilung vor, wird der *Student's-t-Test* verwendet, ansonsten greift das Programm auf den *Mann-Whitney Rank Sum Test* zurück.

Werte für  $p$ , die kleiner als 0,05 sind, gelten als statistisch signifikant.

Die graphische Darstellung der Einzelergebnisse erfolgt mit unterschiedlichen Graphiken des Programmes SigmaPlot 4.01 (SPSS, Erkrath). Es wird unter anderem der „Box Plot“ benutzt, der Lage, Streuung und Schiefe einer Meßwertreihe gut veranschaulicht (Abbildung 8).

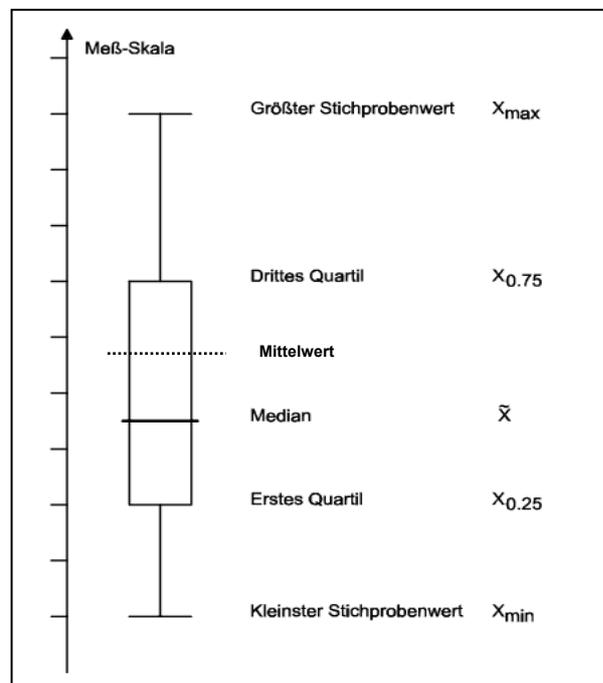


Abbildung 8: Box-Plot

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Ergebnisse der in vitro-Versuche

#### 4.1.1 Wachstumsverhalten HT29 und HT29-GFP in vitro

Um das Wachstumsverhalten der HT29 und der HT29-GFP-Zellen (mit und ohne Geneticin-Zusatz) in vitro näher zu charakterisieren, wurden (wie unter 3.2.1.3 näher beschrieben) Zellzählungen durchgeführt.

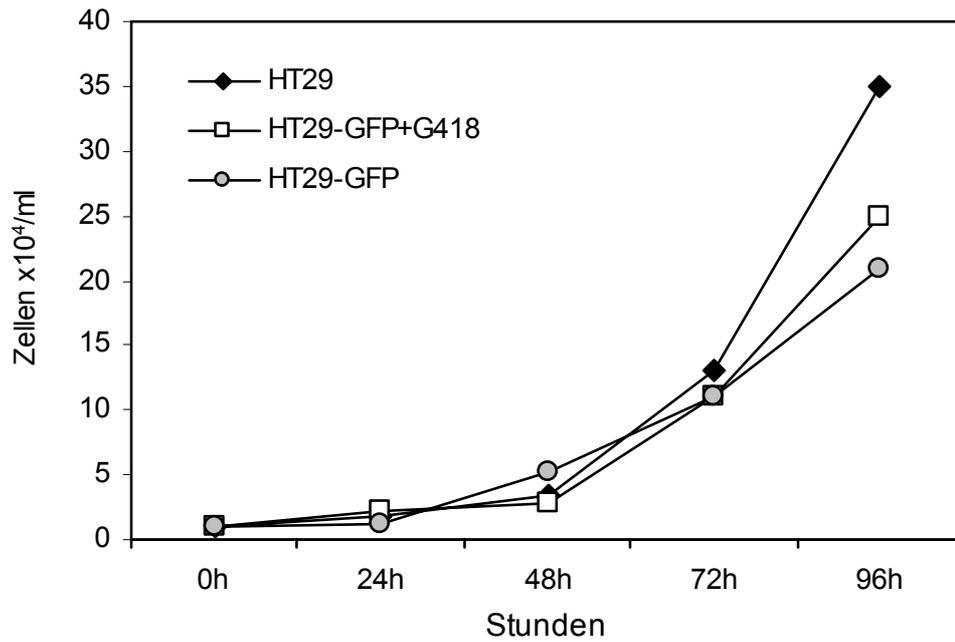
Die Ergebnisse der Zellzählungen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Zellen	Zellzahl x 10 <sup>4</sup> /ml				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
HT29	1	1.8	3.4	13	35
HT29-GFP mit G418	1	2.3	2.9	11	25
HT29-GFP ohne G418	1	1.3	5.3	11	21

**Tabelle 2: Zellzahl/ml nach Aussaat von 1 x 10<sup>4</sup> Zellen/ml in Zellkulturflaschen nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden (h)**

An Zeitpunkt 0 h wurden 1 x 10<sup>4</sup> Zellen pro ml je Zelllinie und Medium in Kulturflaschen ausgesät. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde die Zellzahl mittels elektronischem Zellzählgerät (Casy TTC) bestimmt.

Es ergab sich, dass die HT29-Zellen nach 96 h die höchste Zellkonzentration mit 35 x 10<sup>4</sup>/ml erreicht hatten, allerdings waren sie in den ersten 24 h den HT29-GFP-Zellen mit Geneticin-Zusatz mit 1,8 x 10<sup>4</sup>/ml zu 2,3 x 10<sup>4</sup>/ml noch leicht unterlegen. Die Unterschiede zwischen den drei untersuchten Gruppen sind jedoch statistisch nicht signifikant, was auch in Abbildung 9 deutlich wird.



**Abbildung 9: Wachstum von HT29- und HT29-GFP-Zellen (mit/ohne G418-Zusatz) in vitro über einen Zeitraum von 96 h**

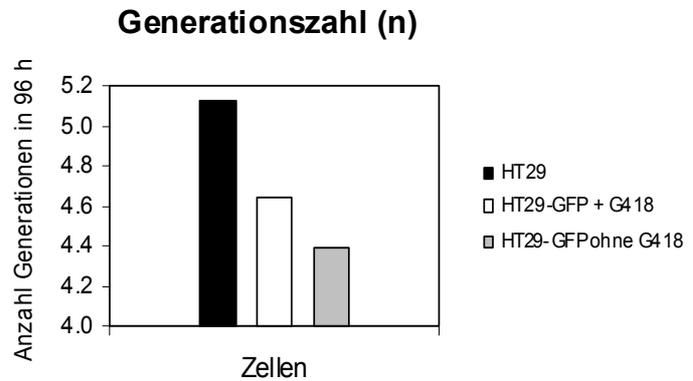
$p$  (HT29/HT29-GFP mit G418) = 0,767

$p$  (HT29/HT29-GFP ohne G418) = 0,704

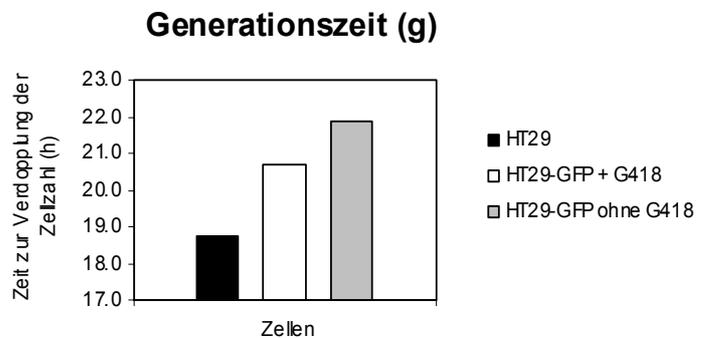
$p$  (HT29-GFP mit G418/ HT29-GFP ohne G418) = 0,931

Dieser geringe Unterschied wird auch deutlich, wenn man Generationszahl, Generationszeit und Teilungsrate betrachtet (Abbildung 10).

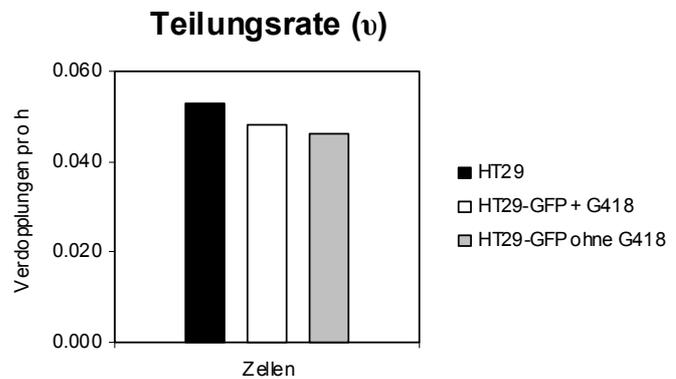
	Generationszahl (n)
HT29	5.13
HT29-GFP mit G418	4.64
HT29-GFP ohne G418	4.39



	Generationszeit (g)
HT29	18.72
HT29-GFP mit G418	20.67
HT29-GFP ohne G418	21.86



	Teilungsrate (v)
HT29	0.053
HT29-GFP mit G418	0.048
HT29-GFP ohne G418	0.046



**Abbildung 10: Generationszahl (n), Generationszeit (g) und Teilungsrate (v) von HT29- und HT29-GFP-Zellen (mit und ohne Zusatz von G418) in vitro**

Nach Aussaat von  $1 \times 10^4$  Zellen/ml in Zellkulturflaschen zum Zeitpunkt 0 h wurde die Zellzahl nach 24, 48, 72 und 96 h elektronisch bestimmt (Casy TTC Zellzählgerät, Schärfe System, Reutlingen).

In vitro deutete sich ein geringfügig besseres Wachstum der HT29-Wildtyp-Zellen gegenüber den HT29-GFP-Zellen an. Im folgenden in vivo-Experiment wurde untersucht, ob dieses Ergebnis auch im Tierversuch zu bestätigen ist. Es musste die Frage geklärt werden, ob sich die GFP-transfizierten Zellen in ihrem Wachstums- und/ oder Metastasierungsverhalten in vivo von den HT29-Wildtyp-Zellen unterscheiden.

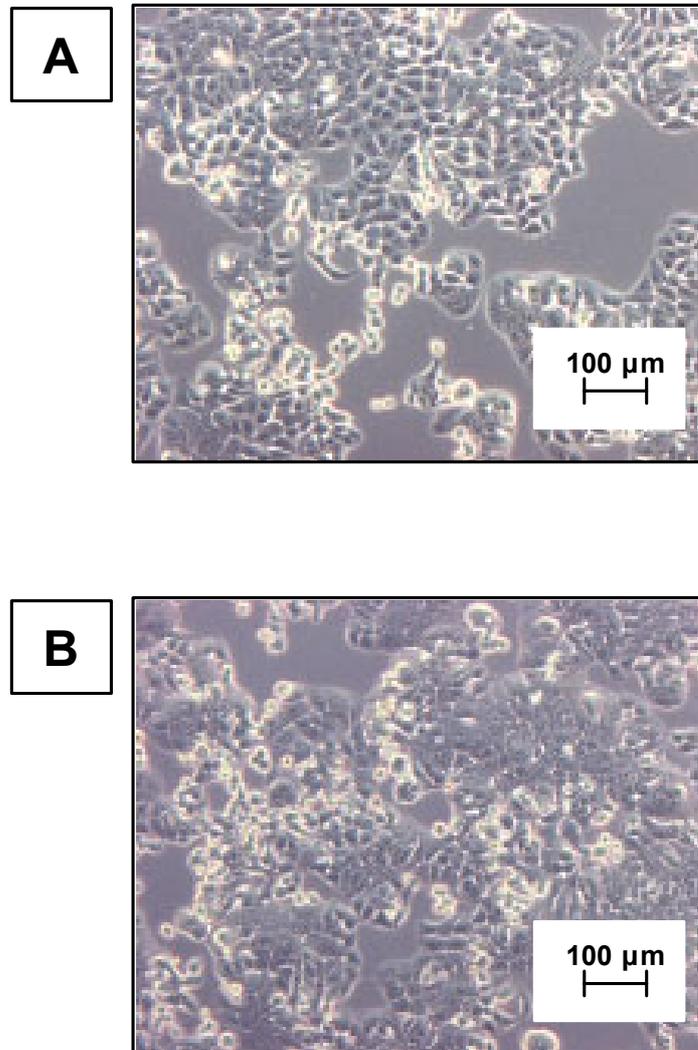
#### **4.1.2 Fluoreszenz in vitro**

Im Lichtmikroskop unterschieden sich HT29- und HT29-GFP-Zellen nicht (Abbildung 11). Beide Zelllinien wuchsen adhärent und konfluent.

Passagierte man die HT29-GFP-Zellen über 15 Generationen hinweg ohne Selektionsdruck, d.h. ohne Zusatz von Geneticin (G418), so verloren sie schnell ihre fluoreszierende Eigenschaft. Beispielhaft ist dies in Abbildung 12 dargestellt.

Hatte man zu Beginn (Passage 1) der Kultivierung noch ein dichtes Netz an fluoreszierenden Zellen pro Gesichtsfeld, so konnte man in Passage 15 nur noch wenige grün-fluoreszierende Zellen bei Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop feststellen.

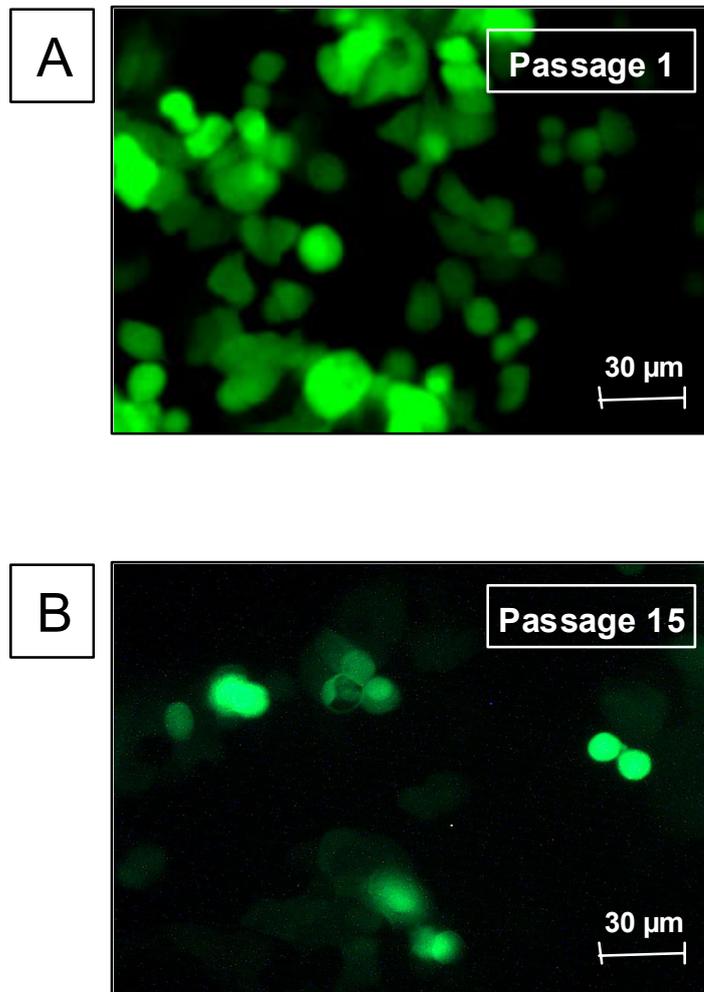
Da sich Wachstumscharakteristika in vitro und in vivo oft unterscheiden (de Vries *et al.*, 1995), wurden trotzdem sowohl Wildtyp- als auch GFP-Zellen in den folgenden beiden Versuchen im Tier eingesetzt.



**Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von HT29 (A)- und HT29-GFP-Zellen (B)**

Die HT29-Zellen unterscheiden sich bei lichtmikroskopischer Betrachtung nicht von den HT29-GFP-Zellen.

[100fache Vergrößerung]



**Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HT29-GFP-Zellen nach Passage 1 (A) und Passage 15 (B)**

Werden die GFP-Zellen ohne Selektionsmedium passagiert, so kommt es zum Verlust der grünen Fluoreszenz, die zu Beginn der Kultivierung noch deutlich vorhanden ist.

[400fache Vergrößerung]

## 4.2 Ergebnisse der in vivo-Versuche

### 4.2.1 Subkutane Zellinjektion

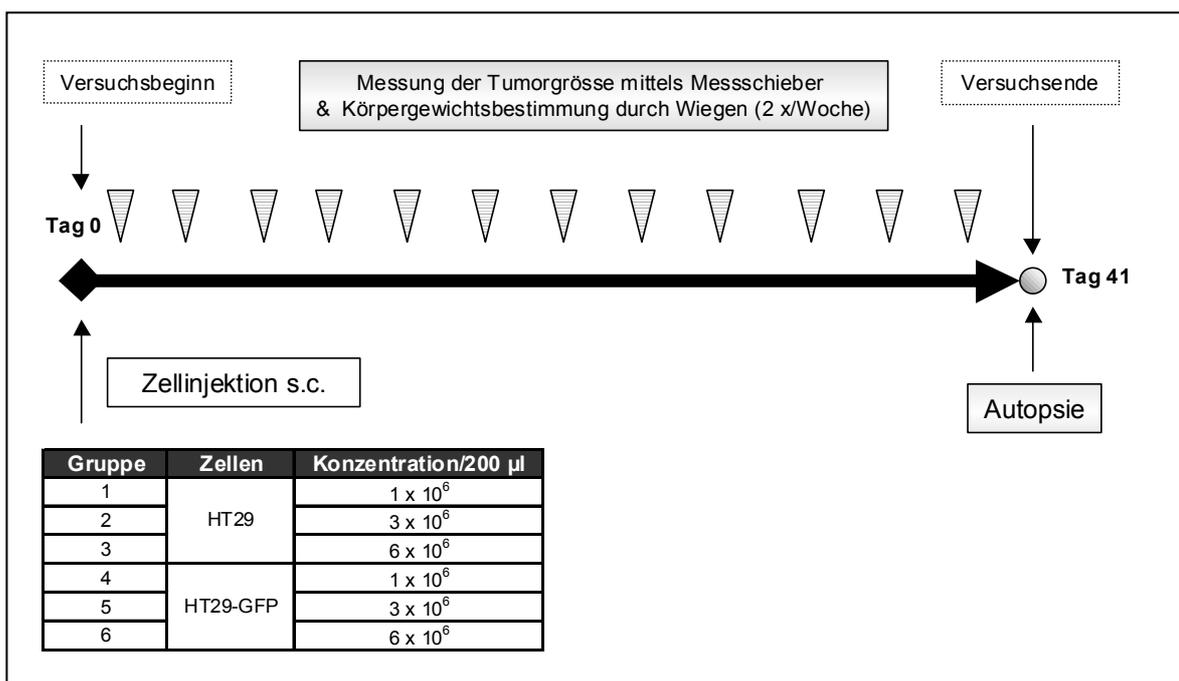
#### 4.2.1.1 Versuchsablauf

Im ersten in vivo-Experiment wurde das Wachstum von HT29- und HT29-GFP-Zellen nach subkutaner Zellinjektion in weiblichen SCID-Mäusen untersucht.

Der Ablauf des Versuches ist schematisch in Abbildung 13 dargestellt.

Es wurden 60 weibliche SCID-Mäuse in Gruppen zu je 10 Tieren eingeteilt. Dann wurden den Tieren drei unterschiedliche Zellkonzentrationen ( $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ) unter Inhalationsnarkose subkutan in die rechte Flanke injiziert. Das Injektionsvolumen betrug  $200 \mu\text{l}$  pro Tier. Der Tag der Zellinjektion wurde als Tag 0 definiert; der Endpunkt war Tag 41. Zweimal pro Woche wurden die Tiere gewogen und der Tumor gemessen.

Tiere, die vor Tag 41 eines der Abbruchkriterien (siehe dazu 3.2.2.4) erreicht hatten, sind durch Genickbruch vorzeitig getötet worden.



**Abbildung 13: Schematischer Versuchsablauf der subkutanen Zellinjektion von HT29- und HT29-GFP-Zellen**

Nach Ablauf der Versuchsdauer erfolgte die Autopsie (inklusive Organentnahme) aller verbliebenen Tiere.

#### **4.2.1.2 Tumorwachstum**

Die in-vivo-Wachstumscharakteristika der HT29- und der HT29-GFP-Zellen unterschieden sich in mehreren Punkten voneinander.

Zunächst bleibt festzuhalten, dass in den Gruppen, die HT29-GFP-Zellen injiziert bekommen hatten, vermehrt Tumoren mit großen nekrotischen Arealen auftraten, die dann unter Einhaltung der Abbruchkriterien zum vorzeitigen Tod der betroffenen Tiere führten. So blieben an Tag 41, dem geplanten Abbruchtag, in Gruppe 4 ( $1 \times 10^6$  Zellen s.c.) nur zwei Mäuse, in Gruppe 5 ( $3 \times 10^6$  Zellen s.c.) nur sieben Mäuse und in Gruppe 6 ( $6 \times 10^6$  Zellen s.c.) nur neun Mäuse übrig.

Da in der Gruppe mit der geringsten applizierten Zellzahl die meisten Ausfälle zu verzeichnen waren, spielte die Konzentration der Zellen offensichtlich keine entscheidende Rolle im Prozess der Nekrotisierung.

In den Gruppen mit HT29-Zellen war die Größe der Tumoren der alleinige Abbruchgrund. So mussten vier Mäuse in Gruppe 3 ( $6 \times 10^6$  Zellen s.c.) vorzeitig getötet werden. Tumoren mit sehr großen Nekrosebezirken stellten hier kein Problem dar.

Bei den GFP-Gruppen gab es keine Tumoren, die über die vorgegebenen Grenzwerte (bezüglich Ausdehnung oder Gewicht des Tumors) hinaus wuchsen.

Der letzte Tag, an dem in allen Gruppen noch  $n = 10$  Tiere vorhanden waren, war Tag 26. Einen Überblick über die vor Tag 41 getöteten Mäuse gibt Tabelle 3.

Gruppe	Tiere, die vor Tag 41 ein Abbruchkriterium erreicht hatten	Tag	Abbruchkriterium	Tierzahl an Tag 41
1	Keine Maus	-	-	10
2	Keine Maus	-	-	10
3	Maus 3, 5, 6 und 8	26 <sup>x</sup> , 32, 39	Tumor zu groß	6
4	Maus 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10	31	Tumor nekrotisch	2
5	Maus 7, 8, 9	38	Tumor nekrotisch	7
6	Maus 9	31	Tumor nekrotisch	9

**Tabelle 3: Anzahl, Tag und Abbruchkriterium bei subkutaner Zellinjektion von HT29- und HT29-GFP-Zellen**

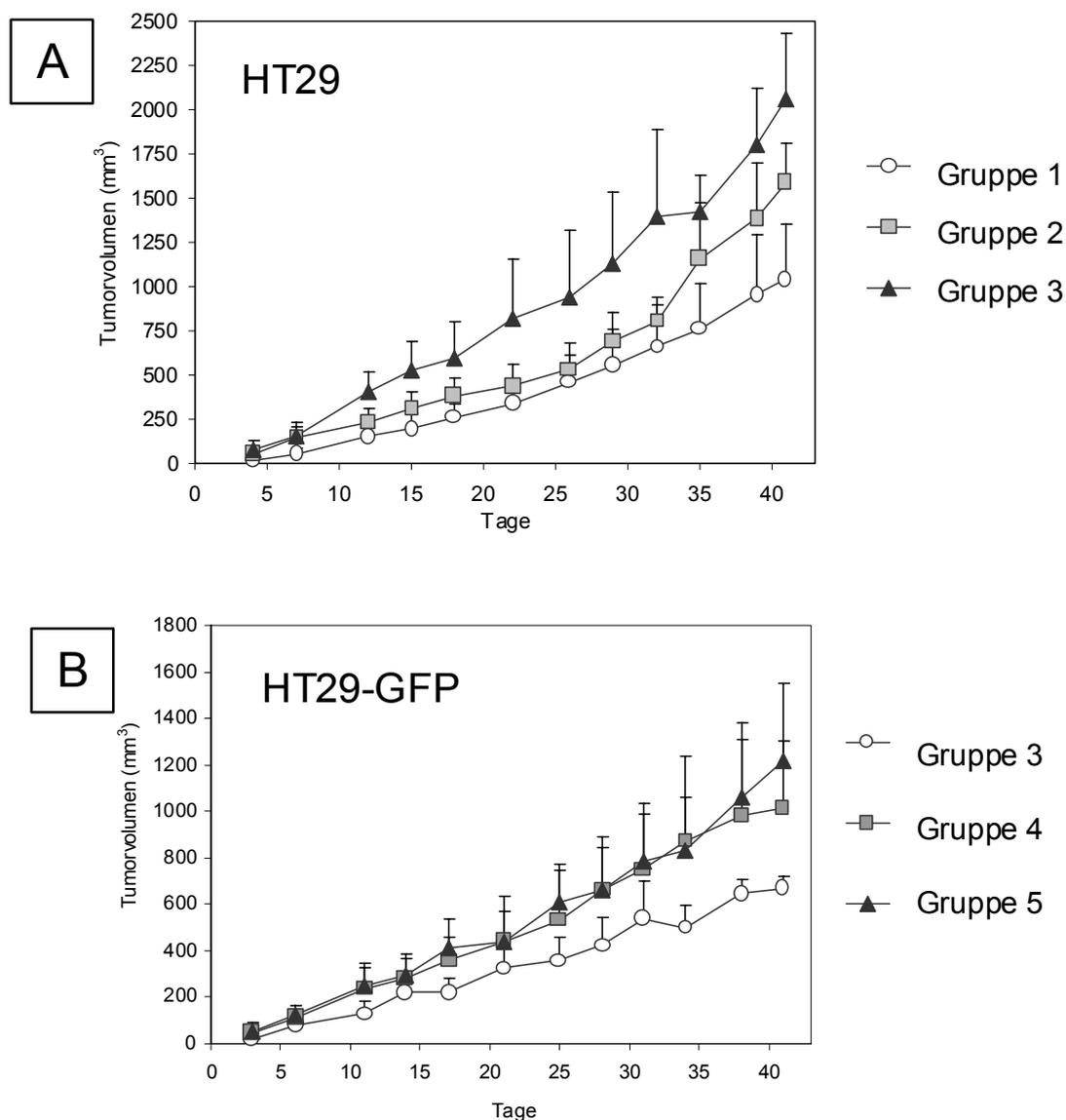
Gruppe 1 =  $1 \times 10^6$  HT29/ 200  $\mu$ l      Gruppe 4 =  $1 \times 10^6$  HT29-GFP/ 200  $\mu$ l  
 Gruppe 2 =  $3 \times 10^6$  HT29/ 200  $\mu$ l      Gruppe 5 =  $3 \times 10^6$  HT29-GFP/ 200  $\mu$ l  
 Gruppe 3 =  $6 \times 10^6$  HT29/ 200  $\mu$ l      Gruppe 6 =  $6 \times 10^6$  HT29-GFP/ 200  $\mu$ l

<sup>x</sup> Maus erst nach der Messung an Tag 26 getötet.

Alle Tieren, denen Tumorzellen subkutan appliziert wurden, entwickelten einen messbaren Tumor, d.h. die Anwachsrate betrug 100 %.

Vergleicht man nun die unterschiedlichen Zellkonzentrationen in ihrem Wachstumsverlauf miteinander (Abbildung 14), so ist vor allem bei den HT29-Zellen eine gute Korrelation zwischen Tumorzellen und injizierter Zellmenge abzulesen. Die Tumoren der höchsten Zellkonzentration ( $6 \times 10^6$  Zellen/200  $\mu$ l) wuchsen am schnellsten, dann folgten die Tumoren der mittleren Konzentration ( $3 \times 10^6$  Zellen/200  $\mu$ l). Die Tumoren, die sich nach Injektion der geringsten HT29-Konzentration ( $1 \times 10^6$  Zellen/200  $\mu$ l) entwickelt hatten, wuchsen am langsamsten und hatten am Versuchsende die kleinsten Volumina.

Bei den GFP-Zellen wuchsen die Tumoren der beiden höheren Zellkonzentrationen,  $3 \times 10^6$  und  $6 \times 10^6$ , nahezu identisch; nur die Tumoren der geringsten Zellzahl,  $1 \times 10^6$ , entwickelten sich langsamer.

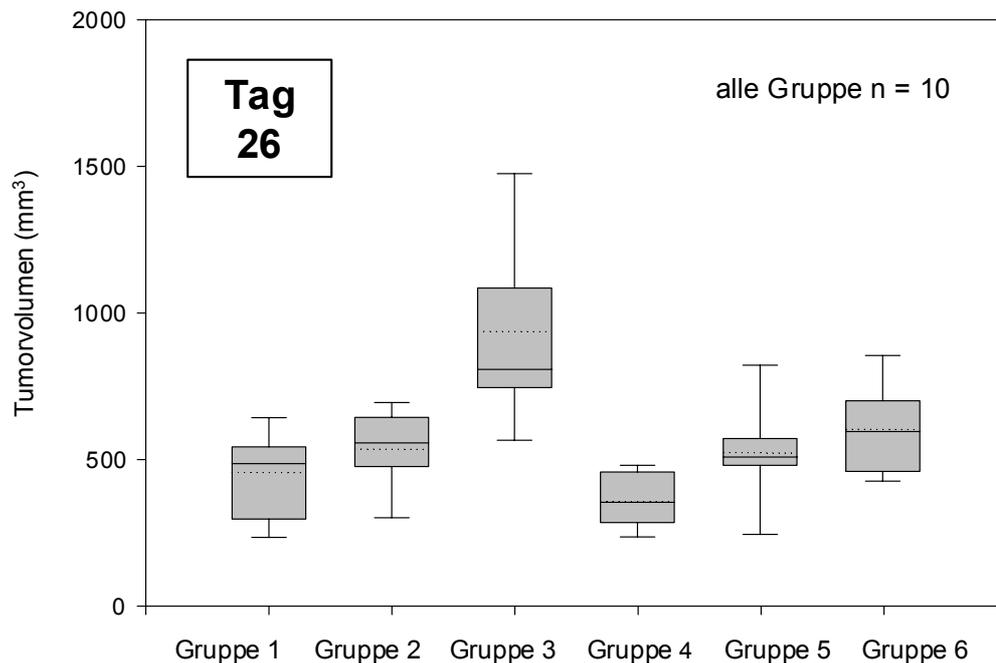


**Abbildung 14: Wachstumsverlauf subkutan injizierter Kolonkarzinomzellen in weiblichen SCID-Mäusen**

**(A) HT29** Gruppe 1 =  $1 \times 10^6$  /200  $\mu$ l    **(B) HT29-GFP** Gruppe 4 =  $1 \times 10^6$  /200  $\mu$ l  
 Gruppe 2 =  $3 \times 10^6$  /200  $\mu$ l                    Gruppe 5 =  $3 \times 10^6$  /200  $\mu$ l  
 Gruppe 3 =  $6 \times 10^6$  /200  $\mu$ l                    Gruppe 6 =  $6 \times 10^6$  /200  $\mu$ l

Die Messung der subkutanen Tumoren erfolgte mit einer elektronischen Schublehre zweimal pro Woche.

Die statistische Absicherung war kritisch, da an Tag 41 nicht mehr in allen Gruppen  $n = 10$  Tiere vorhanden waren. An Tag 26, dem letzten Tag, an dem dies der Fall war, war aber erst etwa mehr als die Hälfte der Versuchszeit abgelaufen. So wurde an beiden Tagen, Tag 26 und Tag 41, eine statistische Untersuchung durchgeführt (Abbildung 15 und Abbildung 16).



**Abbildung 15: Tumorzumina (mm<sup>3</sup>) an Tag 26**

Die Gruppen 1-3 hatten HT29-Zellen subkutan injiziert bekommen; die Gruppen 4-6 erhielten HT29-GFP-Zellen subkutan appliziert.

Die Tumoren wurden zweimal pro Woche mit einer elektronischen Schublehre gemessen.

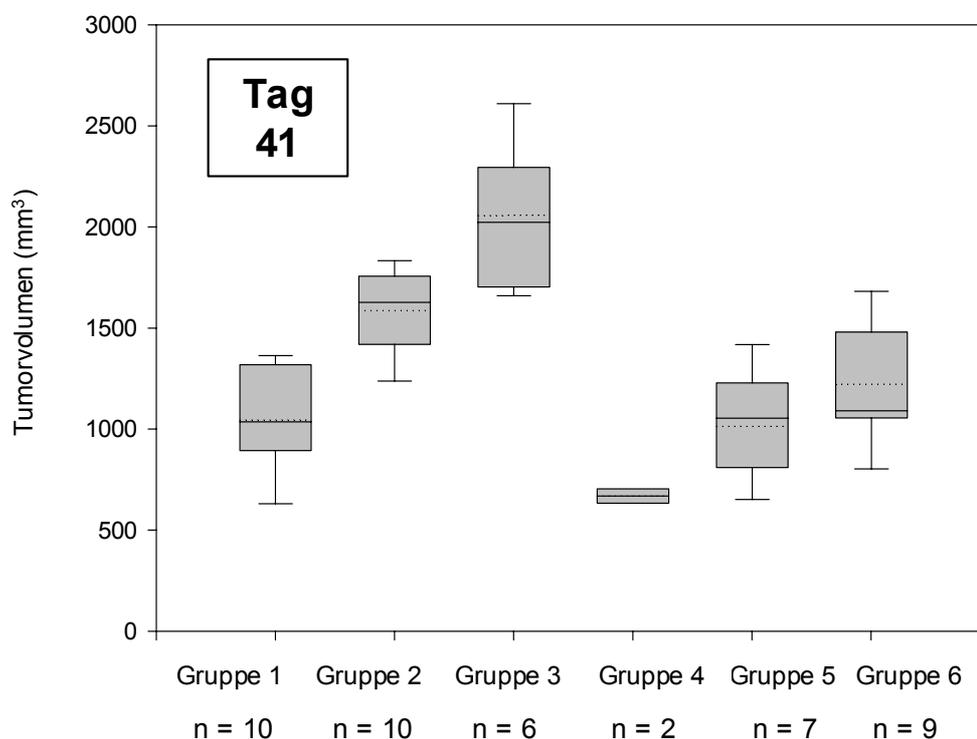
Tag 26:

p (Gruppe 1-2) = 0,140	p (Gruppe 4-5) = 0,014
p (Gruppe 2-3) = 0,002	p (Gruppe 5-6) = 0,427
p (Gruppe 1-3) = 0,001	p (Gruppe 4-6) = 0,002
p (Gruppe 1-4) = 0,104	
p (Gruppe 2-5) = 0,571	
p (Gruppe 3-6) = 0,017	

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SigmaPlot und SigmaStat (Firma SPSS, Erkrath).

Am Tag 26 (Abbildung 15) waren noch jeweils 10 Tiere in jeder Gruppe vorhanden. Vergleicht man zu diesem Zeitpunkt das Wachstum der HT29-Zellen mit den HT29-GFP-Zellen, so kann man nur bei der höchsten Zellkonzentration ( $6 \times 10^6$ ) eine statistische Signifikanz mit  $p = 0,017$  feststellen. Die Unterschiede zwischen den anderen Gruppen könnten somit auch zufallsbedingt sein. Weiterhin ergeben sich p-Werte von 0,002 bzw. 0,001, wenn man die mittlere mit der niedrigsten Konzentration bzw. die niedrigste mit der höchsten Konzentration der HT29-Zellen vergleicht. Bei den GFP-Zellen stellt man ähnliches bei einem Vergleich von niedrigster und mittlere bzw. niedrigster und höchster Zellzahl fest ( $p = 0,002$  und  $0,014$ ).

Führt man nun die gleichen Überlegungen am letzten Versuchstag, Tag 41, erneut durch, so kommt man zu einem anderen Ergebnis (Abbildung 16). Hier sind nun die Unterschiede zwischen den HT29- und HT29-GFP-Gruppen sowohl in der höchsten als auch in der mittleren Zellzahl signifikant ( $p < 0,001$ ). Auch die verschiedenen Konzentrationen der HT29-Gruppen weisen untereinander p-Werte zwischen 0,007 und  $< 0,001$  auf. Die HT29-GFP-Gruppen hingegen unterscheiden sich zu diesem Zeitpunkt nicht statistisch signifikant voneinander.



**Abbildung 16: Tumorvolumina (mm<sup>3</sup>) an Tag 41**

Die Gruppen 1-3 hatten HT29-Zellen subkutan injiziert bekommen; die Gruppen 4-6 erhielten HT29-GFP-Zellen subkutan appliziert.

Die Tumoren wurden zweimal pro Woche mit einer elektronischen Schublehre gemessen.

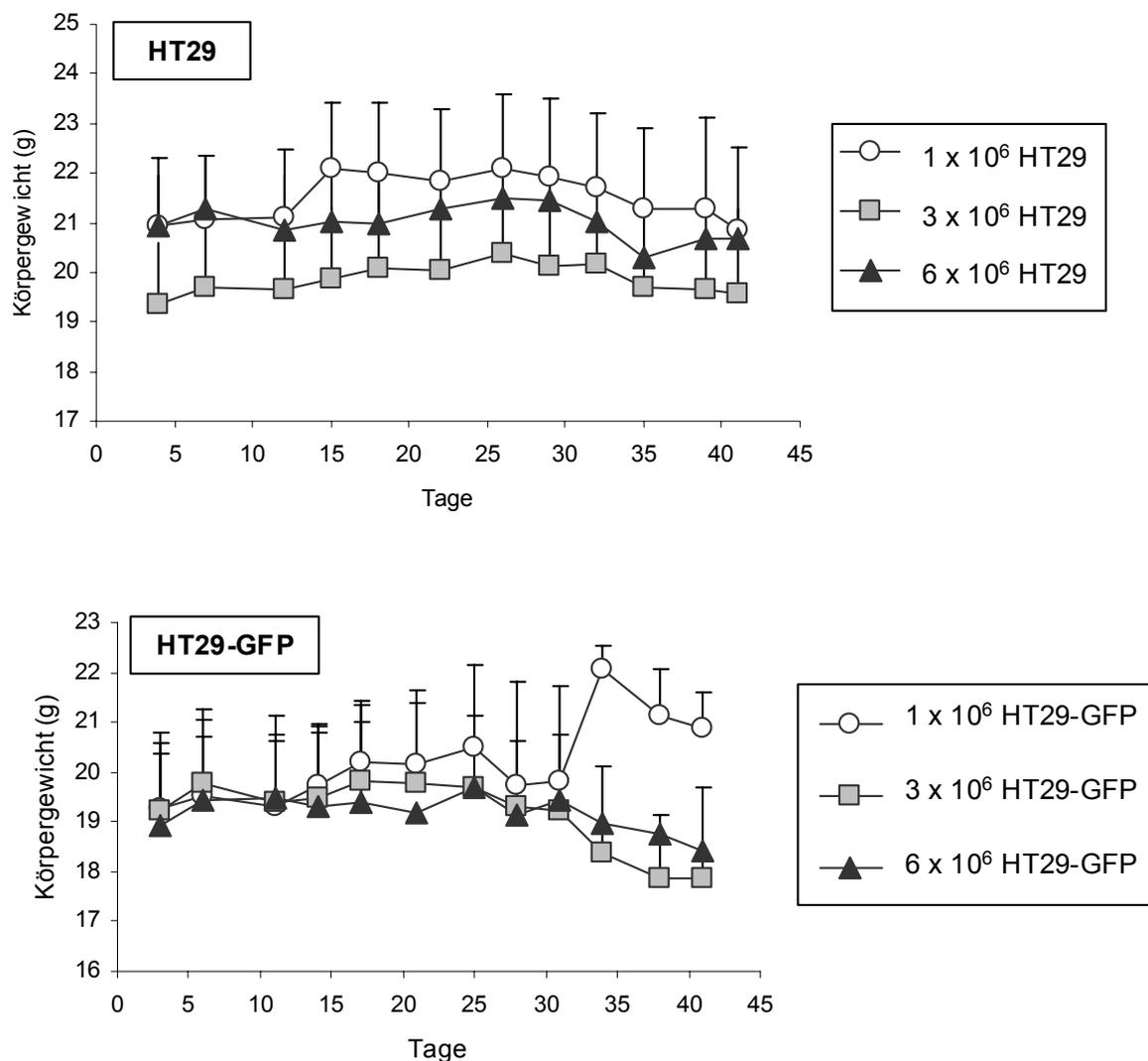
Tag 41:

$p$ (Gruppe 1-2) < 0,001	$p$ (Gruppe 4-5) = 0,156
$p$ (Gruppe 2-3) = 0,007	$p$ (Gruppe 5-6) = 0,213
$p$ (Gruppe 1-3) < 0,001	$p$ (Gruppe 4-6) = 0,052
$p$ (Gruppe 1-4) = 0,125	
$p$ (Gruppe 2-5) < 0,001	
$p$ (Gruppe 3-6) < 0,001	

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SigmaPlot und SigmaStat (Firma SPSS, Erkrath).

#### 4.2.1.3 Körpergewichtsentwicklung während des Versuchs

Die Tiere wurden zweimal pro Woche gewogen, um sicher zu stellen, dass kein Tier mehr als 20 % seines Ursprungsgewichtes im Versuchsverlauf verliert. In diesem Fall wäre ein Abbruchkriterium erreicht, und die Maus müsste vor Versuchsende getötet werden. Als Ursprungsgewicht wurde das Gewicht definiert, das die Maus bei der ersten Messung hatte.



**Abbildung 17: Körpergewichtsverlauf weiblicher SCID-Mäuse nach subkutaner HT29- bzw. HT29-GFP-Zellinjektion**

Angegeben sind die Mittelwerte der Gruppen in g Körpergewicht. Zu beachten ist, dass nicht in allen Gruppen bis zum Versuchsende  $n = 10$  Tiere vorhanden sind, so dass ein Abfall/Anstieg der Kurve auch durch eine Reduktion der Gruppengröße zustande kommen kann (vgl. Tabelle 3, S.47).

Bei den HT29-Gruppen waren keine auffälligen Schwankungen festzustellen. Bei den GFP-Gruppen sah man in Gruppe 4 ( $1 \times 10^6$  Zellen s.c.) an Tag 31 einen Anstieg des mittleren Körpergewichtes, der allerdings darauf zurückzuführen war, dass an diesem Tag acht Tiere dieser Gruppe aufgrund nekrotischer Tumoren getötet werden mussten. Die Gruppen 5 und 6, die  $3 \times$  bzw.  $6 \times 10^6$  HT29-GFP-Zellen injiziert bekommen hatten, zeigten ca. ab Tag 31 einen langsamen Rückgang des durchschnittlichen Gewichtes der Versuchstiere. Aber auch hier muss man berücksichtigen, dass bis zum Versuchsende aus diesen Gruppen insgesamt vier Tiere vorzeitig getötet werden mussten.

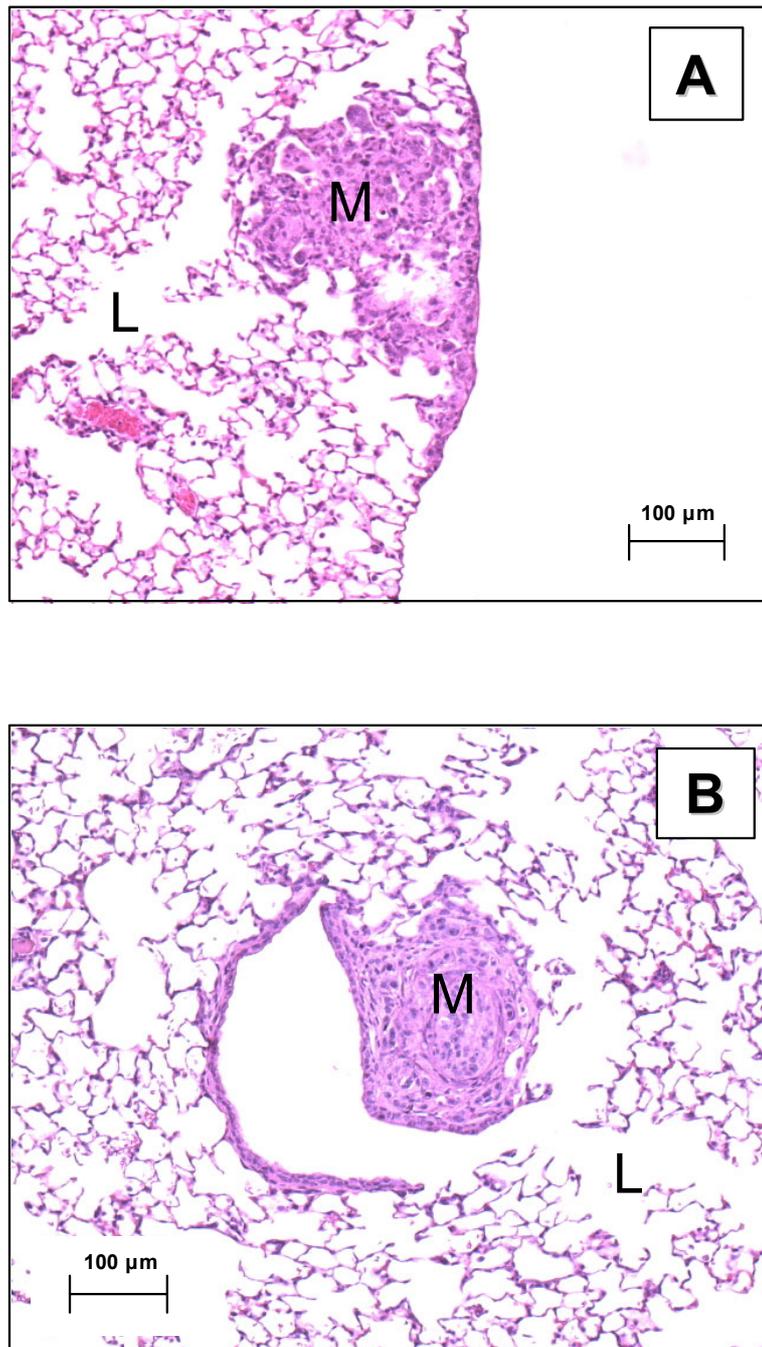
Festzuhalten bleibt, dass keine Maus wegen einer übermäßigen Gewichtsreduktion frühzeitig getötet werden musste.

#### **4.2.1.4 Metastasierung**

Die bei der Sektion entnommenen Organe (Lunge und Leber) wurden histologisch auf das Vorhandensein von Metastasen untersucht (vergleiche 3.2.3.5).

Bei einzelnen Tieren konnten Lungenmetastasen festgestellt werden. Sie waren deutlich an den für maligne Gewebe typischen Veränderungen zu erkennen. So konnten unregelmäßige, polymorphe Zellen mit zahlreichen Mitosen identifiziert werden.

Zudem war die Abgrenzung zwischen den sehr kompakten Metastasen und dem aufgelockerten Alevolargewebe in der Lunge deutlich ( Abbildung 18).



**Abbildung 18: Lungenmetastasen nach subkutaner Zellinjektion von HT29- (A) bzw. HT29-GFP-Zellen (B)**

Nach Explantation und Fixierung in 3,8%igem Formaldehyd wurden die Organe in Paraffin eingebettet. Es wurden Serienschritte mit drei Ebenen mit einem Abstand von je 80 µm hergestellt und anschließend HE-gefärbt.

Die Präparate stammen von zwei verschiedenen Mäusen, die beide an Tag 41 getötet wurden.

[100fache-Vergrößerung]

(L) Lungengewebe (M) Metastase

Wie aus Tabelle 4 und Tabelle 5 ersichtlich wird, wurden zwar in allen Versuchsgruppen vereinzelt Metastasen in der Lunge diagnostiziert, allerdings reichte ihre Anzahl nicht für eine statistische verwertbare Aussage aus. So rangierte die durchschnittliche Anzahl in den verschiedenen Gruppen zwischen 0,8 und 2,6 Metastasen. Es gab insgesamt 37 von 60 Tieren die gar keine Metastasen in der Lunge hatten, wobei davon 19 aus den HT29-Gruppen und 18 aus den HT29-GFP-Gruppen stammten. Die maximale Metastasenanzahl pro Tier lag bei 17.

Lebermetastasen wurden bei keinem der untersuchten Tiere diagnostiziert.

Dieser subkutane Ansatz erscheint nicht geeignet, um Substanzen mit einer primären Wirkung auf Metastasen zu untersuchen, denn eine Hemmung wäre nur schwer ablesbar bzw. statistisch zu verifizieren.

Gruppe	Tier	Autopsie-Tag	LUNGEN-Metastasen	
			Anzahl	Fläche ( $\mu\text{m}^2$ )
1 x 10 <sup>6</sup> HT 29 s.c.	1	41	0	0
	2	41	0	0
	3	41	0	0
	4	41	1	15507
	5	41	0	0
	6	41	0	0
	7	41	0	0
	8	41	0	0
	9	41	15	186134
	10	41	0	0

3 x 10 <sup>6</sup> HT 29 s.c.	1	41	4	246138
	2	41	0	0
	3	41	0	0
	4	41	2	67116
	5	41	6	95498
	6	41	1	14642
	7	41	0	0
	8	41	0	0
	9	41	3	20314
	10	41	1	4218

6 x 10 <sup>6</sup> HT 29 s.c.	1	41	0	0
	2	41	2	29389
	3	26	0	0
	4	41	0	0
	5	39	17	305984
	6	32	0	0
	7	41	7	263616
	8	26	0	0
	9	41	0	0
	10	41	0	0

	Durchschnittliche Anzahl Metastasen	Durchschnittliche Fläche der Metastasen ( $\mu\text{m}^2$ )
1 x 10 <sup>6</sup> HT29	1.6	20164
3 x 10 <sup>6</sup> HT29	1.7	44793
6 x 10 <sup>6</sup> HT29	2.6	59899

**Tabelle 4: Metastasen in HE-gefärbten Paraffinschnitten der Lunge nach subkutaner Injektion von HT29-Zellen in weiblichen SCID-Mäusen**

Die Auswertung der HE-gefärbten Paraffinschnitte (3 Ebenen pro Lunge mit je 80  $\mu\text{m}$  Abstand) erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImagePro Plus (Media Cybernetics, USA). Dargestellt sind die Einzelwerte jeder Maus (Anzahl und Fläche der Lungenmetastasen) sowie die Mittelwerte der einzelnen Gruppen.

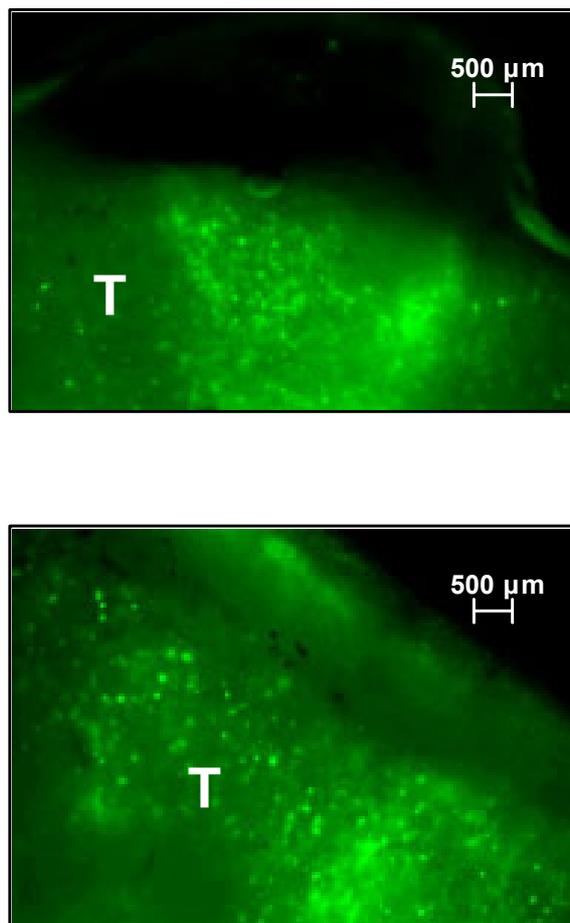
Gruppe	Tier	Autopsie-Tag	LUNGEN-Metastasen	
			Anzahl	Fläche ( $\mu\text{m}^2$ )
1 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP s.c.	1	31	0	0
	2	41	8	79934
	3	31	0	0
	4	41	0	0
	5	31	0	0
	6	31	0	0
	7	31	0	0
	8	31	0	0
	9	31	0	0
	10	31	0	0
3 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP s.c.	1	41	3	80192
	2	41	3	16300
	3	41	1	34004
	4	41	0	0
	5	41	3	29206
	6	41	0	0
	7	38	4	77939
	8	38	0	0
	9	38	5	153380
	10	41	3	31744
6 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP s.c.	1	41	3	7416
	2	41	0	0
	3	41	1	4571
	4	41	0	0
	5	41	0	0
	6	41	8	88558
	7	41	0	0
	8	41	9	70378
	9	31	0	0
	10	41	0	0
		Durchschnittliche Anzahl Metastasen	Durchschnittliche Fläche der Metastasen ( $\mu\text{m}^2$ )	
1 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP		0.8	7993	
3 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP		2.2	42276	
6 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP		2.1	17092	

**Tabelle 5: Metastasen in HE-gefärbten Paraffinschnitten der Lunge nach subkutaner Injektion von HT29-GFP-Zellen in weiblichen SCID-Mäusen**

Die Auswertung der HE-gefärbten Paraffinschnitte (3 Ebenen pro Lunge mit je 80  $\mu\text{m}$  Abstand) erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImagePro Plus (Media Cybernetics, USA). Dargestellt sind Einzelwerte jeder Maus (Anzahl und Fläche der Lungenmetastasen) sowie Mittelwerte der einzelnen Gruppen.

#### 4.2.1.5 *Fluoreszenz subkutaner HT29-GFP-Tumoren*

Wie bereits *in vitro*, wurden die HT29-GFP-Zellen auch nach subkutaner Injektion einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Die subkutan wachsenden GFP-Tumoren wurden bei der Sektion explantiert und unverzüglich unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.



**Abbildung 19: HT29-GFP-Tumoren (T) nach subkutaner Zellinjektion**

Aufnahmen mit Fluoreszenzmikroskop direkt nach Tumorentnahme  
[12,5fache Vergrößerung]

Wie aus Abbildung 19 ersichtlich, überwiegt die natürliche Autofluoreszenz des Gewebes. Nur noch vereinzelt kann man grün leuchtenden Punkte identifizieren, die Zellen darstellen, die noch GFP exprimieren.

#### **4.2.2 Orthotope Zellinjektion**

Nach Untersuchung des subkutanen Wachstumsverhaltens von HT29- und HT29-GFP-Zellen, folgte der erste orthotope Ansatz bei dem Zellen in die Darmwand injiziert wurden. Das Caecum wurde als Injektionsort ausgewählt, da es sich aufgrund seiner Lage und Anatomie gut für eine Zellinjektion zu eignen schien. Es ist weit aus dem Abdomen heraus zu verlagern und bietet eine breite Auflagefläche für eine Kanüle. Zudem wirft die Serosa durch die Poschen kleine Falten, die mit der Kanülenspitze relativ einfach unterminiert werden können.

##### **4.2.2.1 Versuchsablauf**

60 weibliche SCID-Mäuse wurden in Gruppen zu je 10 Tieren eingeteilt. Da es sich, im Gegensatz zur subkutanen Zellinjektion, um einen größeren chirurgischen Eingriff mit nicht zu unterschätzendem Zeitaufwand handelte, wurden 30 Tiere (HT29-Zellen) an einem Tag und weitere 30 (HT29-GFP-Zellen) am darauf folgenden Tag operiert. Ein weiterer Grund für diese Einteilung war der Umstand, dass alle Zellen die gleiche Vitalität aufweisen sollten.

Die Messungen von Tumolvolumen und Körpergewicht wurden im Versuchsablauf aber immer gemeinsam für alle 60 Tiere durchgeführt. Das erklärt im weiteren Verlauf die unterschiedlichen Tagesangaben bei den Messpunkten.

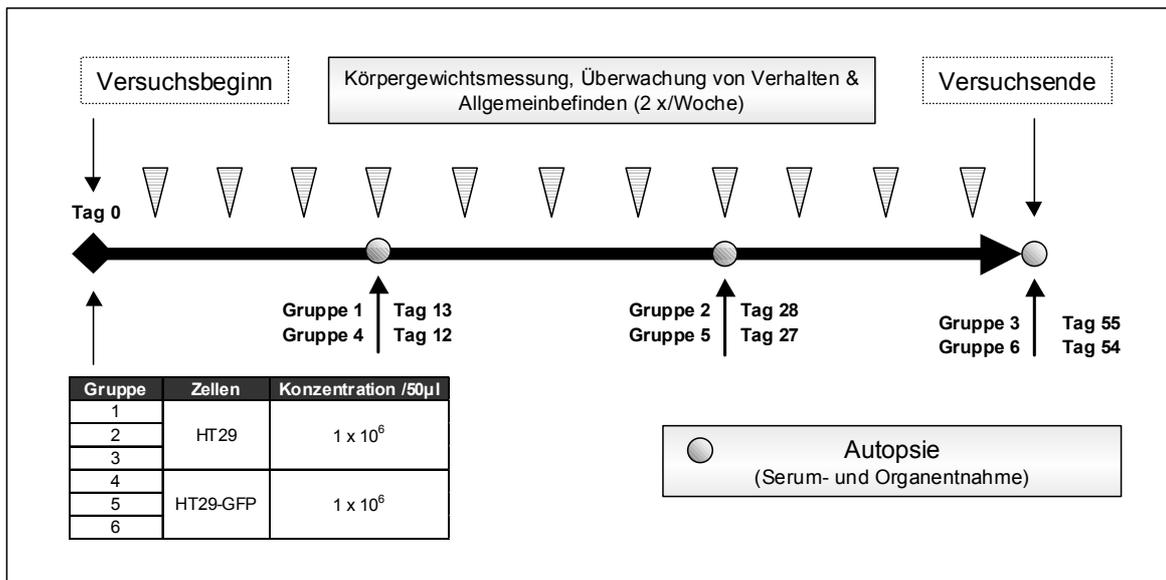
Die orthotope Zellinjektion wurde wie unter 3.2.2.3 beschrieben durchgeführt.

Im Abstand von zwei Wochen wurden jeweils eine HT29-Gruppe und eine HT29-GFP-Gruppe getötet. So waren dies Gruppe 1 an Tag 13 und Gruppe 4 an Tag 12. Nach zwei weiteren Wochen folgten Gruppe 2 an Tag 28 und Gruppe 5 an Tag 27. Da die Tiere weiterhin ein gutes Allgemeinbefinden zeigten, wurden die letzten beiden Gruppen bis Tag 54 (Gruppe 6) bzw. Tag 55 (Gruppe 3) im Versuch belassen.

Am jeweils letzten Versuchstag erfolgten Blutentnahme und Sektion.

Die unterschiedlichen Tötungszeitpunkte sollten zum einen dazu dienen das Wachstum des caecalen Tumors nach verschiedenen langen Zeitspannen zu dokumentieren, zum anderen sollte das Ausmaß der Metastasierung zeitlich eingeordnet werden können.

Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20: Schematischer Versuchsablauf der orthotopen Zellinjektion von HT29- und HT29-GFP-Zellen**

#### 4.2.2.2 Tumorstadium

Die Größe des orthotop wachsenden Darmtumors ist von außen ohne technische Hilfsmittel, wie z.B. Ultraschall, nur schwer und sehr ungenau zu bestimmen. Deshalb wurden während des Versuches das Allgemeinbefinden, das Körpergewicht und der Kotabsatz als Surrogatmarker für die Tumorbilastung beobachtet. Auffälligkeiten bei diesen Parametern galten als Indiz für ein übermäßiges Tumorstadium im Abdomen.

Eine Maus (106; Gruppe 1) musste am Tag 2 getötet werden, da sie ein hochgradig verschlechtertes Allgemeinbefinden zeigte. Bei der anschließenden Sektion stellte man ein aufgelegtes Caecum mit hochgradiger Fibrinausschwitzung fest. Eine andere Maus (102; Gruppe 1) wurde an Tag 6 tot im Käfig aufgefunden. Aufgrund von Fäulnis und Autolyse wurde auf eine Sektion verzichtet. Maus 307 (Gruppe 3) fiel Kannibalismus zum Opfer und wurde bei der morgendlichen Kontrolle tot im Käfig gefunden. Bei allen drei Mäusen wurden keine Organe zur histologischen Untersuchung entnommen.

Zur weiteren Charakterisierung des Modells wurde die Anwachsrate herangezogen. So wurde zum einen bei der Sektion makroskopisch das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines Tumors am Caecum protokolliert und zum anderen wurden später HE-gefärbten Paraffinschnitte mit der gleichen Fragestellung mikroskopisch untersucht. Einige Sektionsbefunde waren nicht eindeutig, da mit bloßem Auge nicht genau identifiziert werden konnte, ob es sich bei der entdeckten Umfangsvermehrung am Darm wirklich um einen malignen Tumor handelte. In den meisten Fällen bestand daran aber kein Zweifel. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Gruppe	Zellen/ 50 µl	Sektionstag	Tumor makroskopisch		Tumor mikroskopisch	
			absolut	%	absolut	%
1	1 x 10 <sup>6</sup> HT29	13	8/8	100	8/8	100
2		28	8(-10)/10	80 - (100)	10/10	100
3		55	9/9	100	9/9	100
4	1 x 10 <sup>6</sup> HT29- GFP	12	9/10	90	9/10	90
5		27	8(-10)/10	80 - (100)	10/10	100
6		54	9/10	90	9/10	90

**Tabelle 6: Anwachsrate eines Tumors im Caecum nach orthotoper Zellinjektion von HT29- und HT29-GFP-Zellen**

*Makroskopische* Untersuchung des Caecums bei Sektion mit unbewaffnetem Auge.

*Mikroskopische* Untersuchung anhand von HE-gefärbten Paraffinschnitten mit bis zu 630facher Vergrößerung. In Klammern ( ) angegebene Werte beziehen sich auf unsichere Ergebnisse.

Drei Mäuse starben vor dem für ihre Gruppe vorhergesehen Sektionstermin.

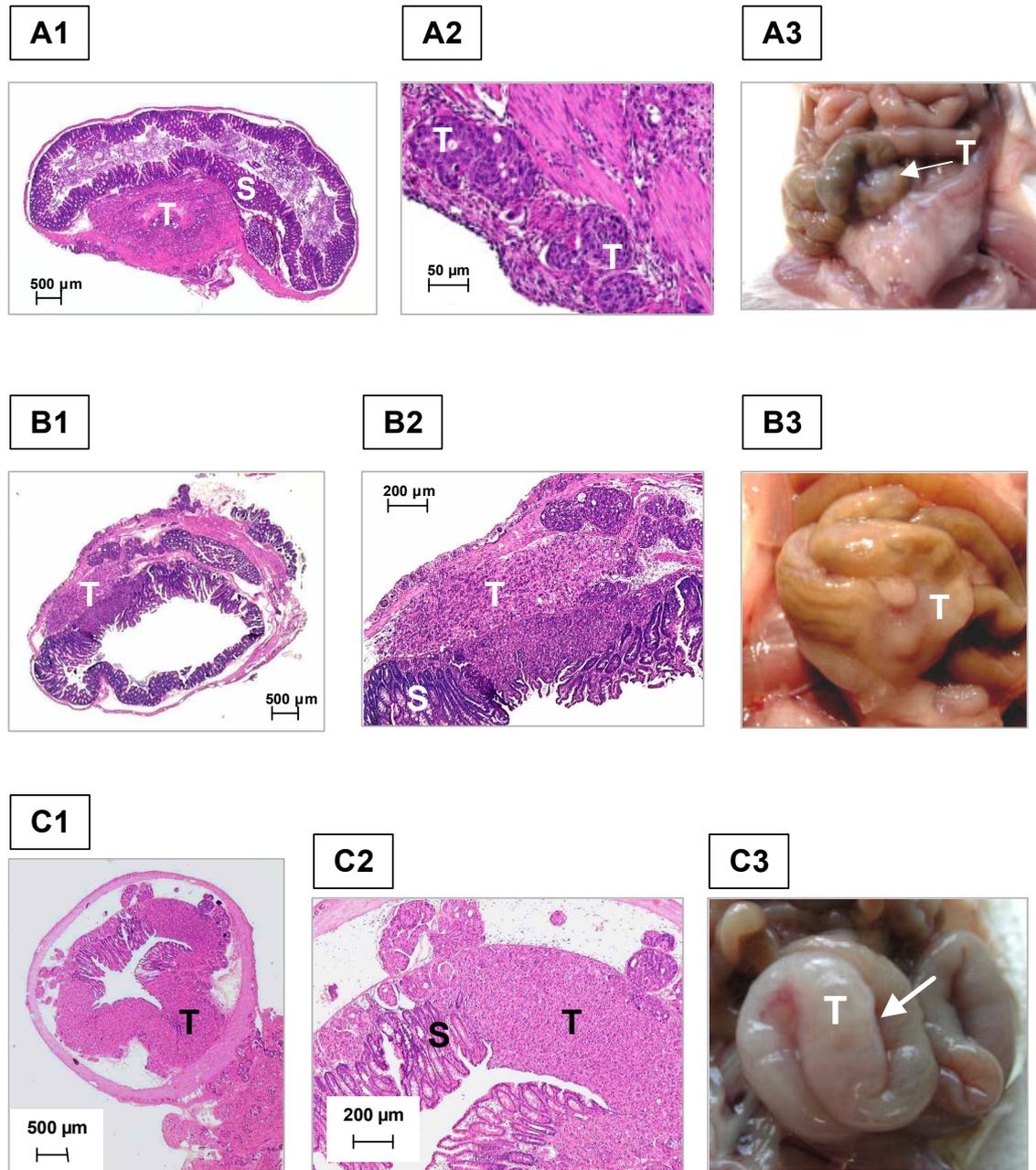
In allen Gruppen wurden nach makroskopischer Abschätzung Anwachsrate über 80 % erreicht, in zwei Gruppen, (Gruppe 1 und 3) sogar 100 %. Nach lichtmikroskopischer Auswertung gab es zwei Gruppen mit 90 % Tumorstadium, d.h. nur ein Tier jeder dieser Gruppen hatte keinen Tumor im Caecum. Die übrigen vier Gruppen zeigten sogar zu 100% caecale Tumoren. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Anwachsrate der orthotopen Tumoren zwischen HT29- und HT29-GFP-Gruppen.

Des Weiteren konnte anhand von HE-gefärbten Paraffinschnitten von Caecum und von Digitalfotos der Sektion das invasive Wachstum der Tumoren gut verfolgt und dokumentiert werden (Abbildung 21).

So zeigten Tiere, die nach 12 bzw. 13 Tagen getötet wurden, noch eine rundum intakte Darmschleimhaut. Der Tumor war zwar deutlich sichtbar, aber seine Umrisse waren gut abgrenzbar; er penetrierte die Schleimhaut nicht.

Bei den Mäusen, die nach 27 bzw. 28 Tagen seziiert wurden, wuchs der Tumor schon zum Teil durch die Schleimhaut hindurch in das Darmlumen. Allerdings war die Struktur des Caecums noch erkennbar. Darm und Tumor waren gut zu unterscheiden.

Bei den Tieren der letzten beiden Gruppen (Tag 54 bzw. 55) war fast das gesamte Caecum mit tumorösem Gewebe durchsetzt. Ursprünglich vorhandene Strukturen waren kaum noch zuzuordnen. Der Tumor wuchs großflächig invasiv in das Darmlumen. Bei einigen Tieren war kein Lumen mehr erkennbar, da die großen Tumormassen alle physiologischen Schichten verdrängt hatten.



**Abbildung 21: Paraffinschnitte, HE-gefärbt, von Caecum mit Tumor (1,2) und Sektionsfotos (3) nach orthotoper HT29-Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten**

(A) Maus 104, Sektion Tag 13

(A1) 12,5fache Vergrößerung

(A2) 200fache Vergrößerung

(A3) Sektionsfoto

(B) Maus 210, Sektion Tag 28

(B1) 12,5fache Vergrößerung

(B2) 50fache Vergrößerung

(B3) Sektionsfoto

(C) Maus 306, Sektion Tag 55

(C1) 12,5fache Vergrößerung

(C2) 50fache Vergrößerung

(C3) Sektionsfoto

*T = Tumor*

*S = Schleimhaut des Caecums*

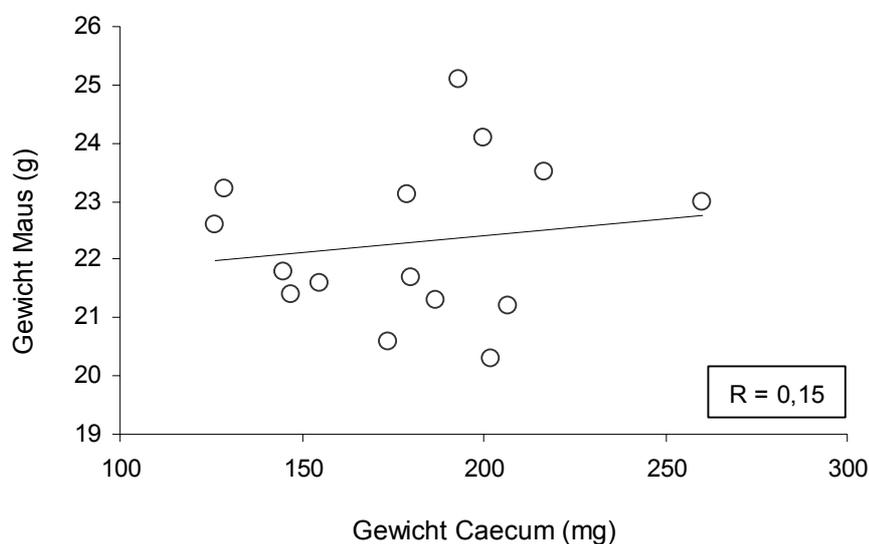
*L = Lumen des Caecums*

Zur besseren Übersicht werden hier nur Bilder der HT29-Tiere gezeigt, die HT29-GFP-Tiere zeigten aber einen vergleichbaren Verlauf des Tumorwachstums.

Auch nach Eröffnung der Bauchhöhle bei der Sektion konnte der Darmtumor nicht gemessen werden. Eine Messung mittels Schublehre, wie bei subkutanen Tumormodellen üblich, war nicht praktikabel, da die Tumoren infiltrativ nach innen wuchsen. So gab es keine Ansatzpunkte für den Messschieber.

Die Bestimmung der Tumorgöße durch Wiegen war nicht möglich, da einerseits die Tumoren sehr klein waren, und andererseits ihr infiltratives Wachstum eine exakte Explantation verhinderte. Zudem sollten Paraffinschnitte von Caecum und Tumor angefertigt werden. Dies wäre nicht möglich gewesen, wenn man den Tumor vom Darm abgetrennt hätte.

Der Ansatz, Caecum mit Tumor zusammen zu wiegen und im Vergleich zu einem Caecum ohne Tumor die Masse des Tumors zu berechnen, schied aus folgendem Grund aus: Ein Vorversuch, in dem gesunde Caeca von 15 weiblichen SCID-Mäusen aus anderen Versuchen bei der Sektion von Kot befreit gewogen wurden, wies eine zu große Streuung auf. So rangierten die Gewichte der Caeca zwischen 129 mg und 260 mg. Auch eine Abhängigkeit zum Körpergewicht der Maus konnte nicht festgestellt werden ( $R = 0,15$ ).



**Abbildung 22: Caecumgewichte ohne Tumor von 15 weiblichen SCID-Mäusen (Gewichte in mg)**

Die Mäuse stammten aus einem nicht dargestellten Versuch. Ihnen wurde bei der Sektion das gesunde Caecum entnommen, so gut wie möglich von Kot befreit und gewogen.

#### **4.2.2.3 Körpergewichtsentwicklung während des Versuchs**

Um neben der Beobachtung des Allgemeinzustandes Auskunft über den Gesundheitszustand der Versuchstiere zu erhalten, wurden die Mäuse zweimal pro Woche gewogen.

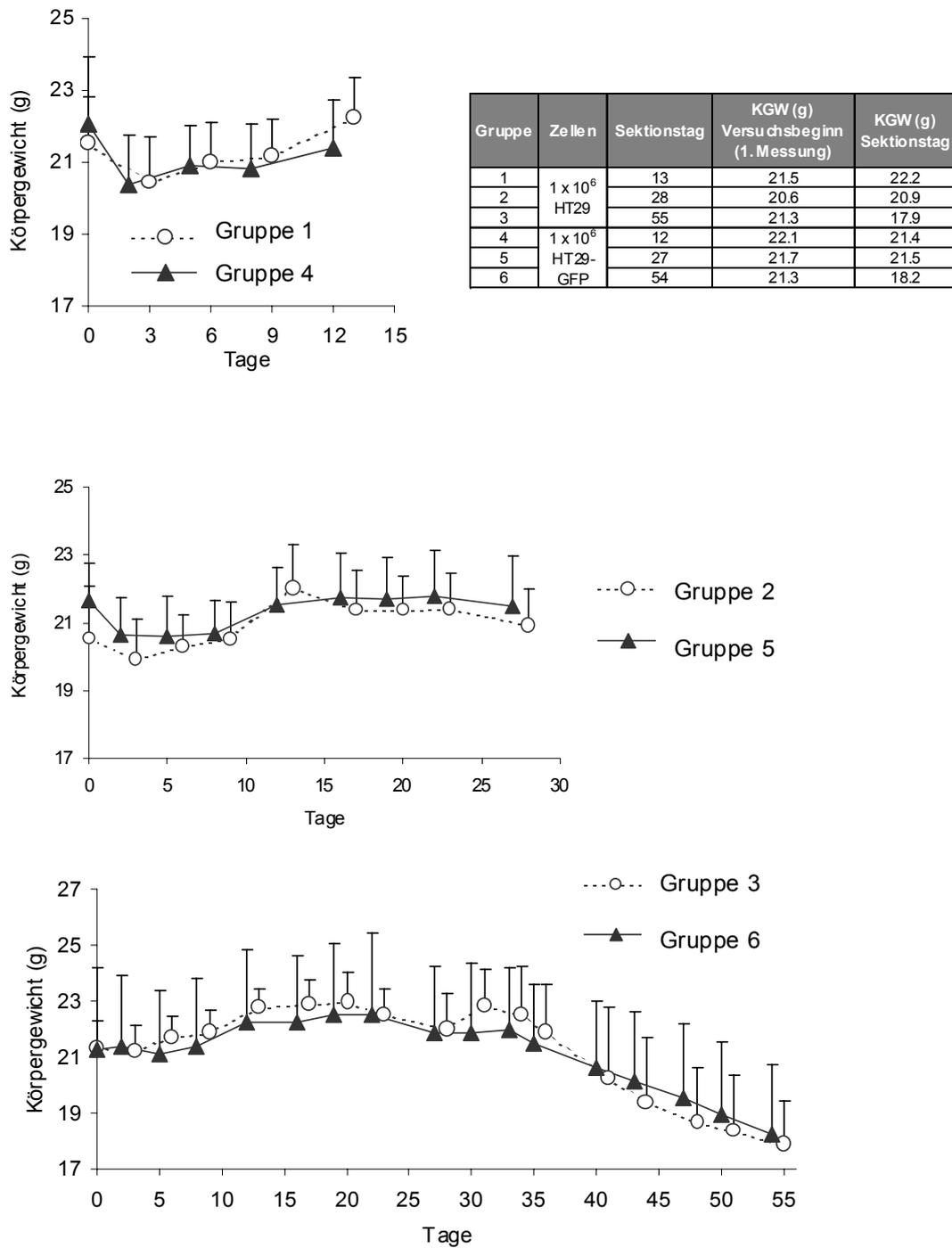
In Abbildung 23 ist der Körpergewichtsverlauf dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind jeweils nur zwei Gruppen, die gemeinsam getötet wurden, in einem Diagramm aufgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe in Gramm Körpergewicht.

Fast alle Tiere verloren in den ersten drei Tage geringfügig an Gewicht. Der mittlere Verlust in den Gruppen 1 bis 5 betrug 1,1 g. Nur in Gruppe 6 blieb das Durchschnittsgewicht bis Tag 9 nahezu konstant; es stieg sich sogar um 0,1 g an.

Die Gewichtsabnahme ist möglicherweise auf den Operationsstress zurück zu führen. Die Mäuse waren am Operationstag noch nicht so agil und fraßen auch subjektiv weniger.

In den folgenden Tagen erholten sich die Mäuse aber sehr schnell, was sich in einer Gewichtszunahme aller Gruppen bis Tag 12/13 widerspiegelte. Dann schloss sich eine Phase an, in der das Körpergewicht nahezu konstant blieb. In allen Gruppen wurden Durchschnittswerte zwischen 22 und 23 Gramm erreicht. In den Gruppen 3 und 6, die als letztes im Versuch verblieben, sank das durchschnittliche Körpergewicht ab Tag 35 dann langsam von 22 auf 17,9 Gramm (Gruppe 3) bzw. 18,2 Gramm (Gruppe 6) am letzten Versuchstag ab.

Dieser Gewichtsrückgang kann auf die mit zunehmender Versuchsdauer immer größer werdende Belastung durch den stetig wachsenden abdominalen Primärtumor und die ansteigende Metastasenanzahl zurückgeführt werden.



**Abbildung 23: Körpergewichtsverlauf der Versuchstiere nach orthotoper HT29- bzw. HT29-GFP-Zellinjektion**

Die Tiere wurden zweimal pro Woche gewogen. Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte jeder Gruppe mit Standardabweichung.

#### 4.2.2.4 *Metastasierung*

Die bei der Sektion entnommenen Organe (Lunge und Leber) wurden histologisch auf das Vorhandensein von Metastasen untersucht (siehe 3.2.3.5) und mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware (ImagePro Plus 4.0, Media Cybernetics, USA) hinsichtlich Anzahl und Fläche der festgestellten Metastasen ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung stellt Tabelle 7 (S. 68) dar.

Bei keinem untersuchten Tier konnten Lebermetastasen nachgewiesen werden.

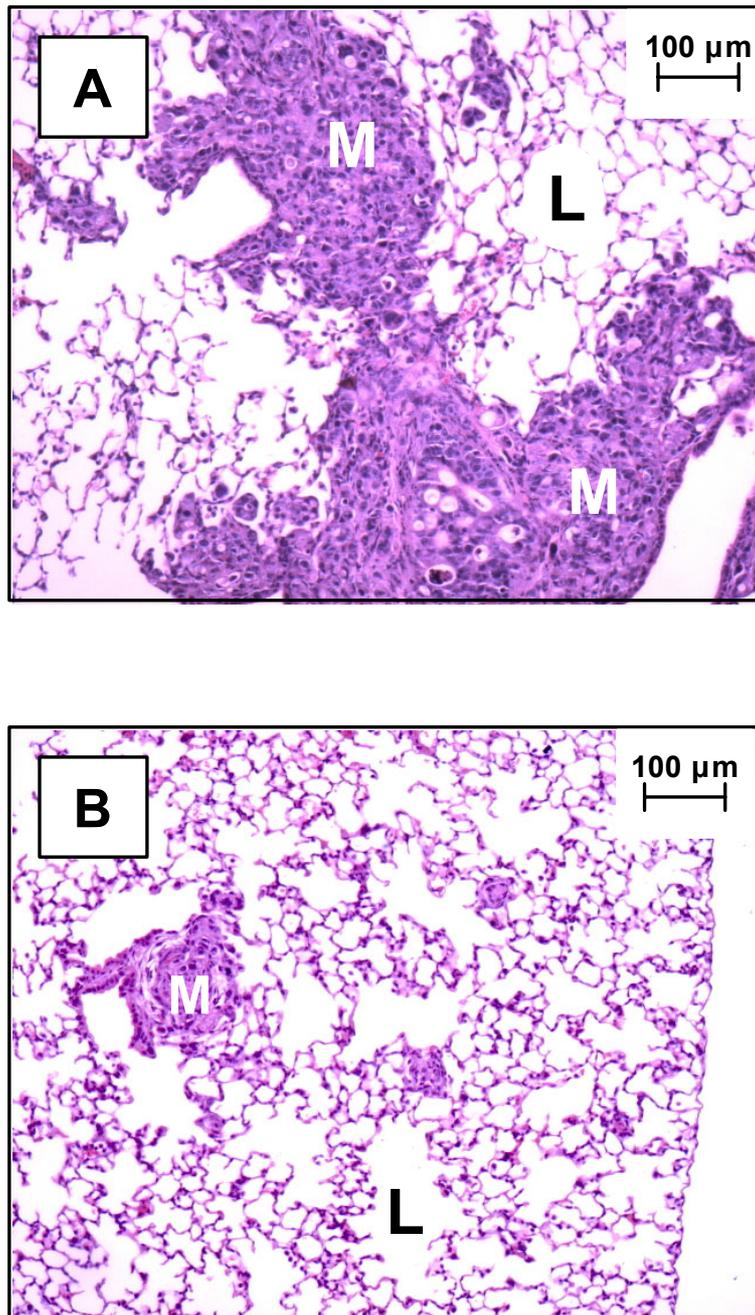
Lungenmetastasen (Abbildung 24) hingegen konnten in zwei Gruppen diagnostiziert werden.

Die Gruppen, die bis Tag 12/13 bzw. 27/28 im Versuch waren, wiesen keine Metastasen auf. Bei den letzten beiden am Ende des Versuchs getöteten Gruppen (Gruppe 3 und 6) konnten hingegen Lungenmetastasen festgestellt werden. Allerdings gab es erhebliche Unterschiede im Metastasierungsverhalten dieser Gruppen.

In der HT29-Gruppe (Gruppe 3) zeigten 9/9 der untersuchten Tieren Metastasen, wogegen in der HT29-GFP-Gruppe (Gruppe 6) nur bei 5/10 Tieren Tochtergeschwülste protokollierbar waren.

Auch Anzahl und Fläche der Metastasen wiesen signifikante Unterschiede auf. So zeigte die HT29-Gruppe fast um den Faktor 10 mehr Metastasen im Durchschnitt sowie eine um den Faktor 20 größere Metastasenfläche als in der GFP-Gruppe. Vergleicht man die Gesamtmetastasenanzahl der beiden Gruppen miteinander, so erhält man mit  $p = 0,001$  eine hoch signifikante Aussage. Die Unterschiede in der Gesamtmetastasenfläche der Gruppen 3 und 6 sind mit  $p < 0,001$  ebenfalls statistisch hoch signifikant.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass erst bei Tieren des letzten Tötungszeitpunktes (Tag 54/55) Metastasen auftraten und dass es hoch signifikante Unterschiede in Zahl und Größe der Metastasen zwischen HT29- und HT29-GFP-Gruppen gab. Die Mäuse, die HT29-Wildtyp-Zellen orthotop injiziert bekommen hatten, wiesen eine deutlich stärker ausgeprägte Metastasierung auf als die Versuchstiere, die GFP-transfizierte HT29-Zellen erhalten hatten.



**Abbildung 24: Lungenmetastasen nach orthotoper Zellinjektion von HT29- (A) bzw. HT29-GFP-Zellen (B)**

(A) Maus 305 (HT29), Sektion Tag 55

(B) Maus 603 (HT29-GFP-Zellen), Sektion Tag 54

Es wurden Paraffinschnitte mit 3 Ebenen mit je 80 µm Abstand hergestellt und HE-gefärbt. [100fache Vergrößerung]

(L) Lungengewebe (M) Metastase

Gruppe	Tier	Sektionstag	LUNGEN-Metastasen	
			Anzahl	Fläche ( $\mu\text{m}^2$ )
1	n = 8	13	0	0
2	n = 10	28	0	0
3	301	55	39	876841
	302		31	173864
	303		8	30035
	304		19	128969
	305		57	919975
	306		45	1209261
	308		54	628871
	309		79	1270891
	310		5	293405

**1 x 10<sup>6</sup>  
HT29/  
50  $\mu\text{l}$**

Gruppe 3	Mittelwert	37.4	614679
	Median	39.0	628871

Gruppe	Tiere	Sektionstag	LUNGEN-Metastasen	
			Anzahl	Fläche ( $\mu\text{m}^2$ )
4	n = 10	12	0	0
5	n = 10	27	0	0
6	601	54	3	13820
	602		0	0
	603		6	27507
	604		0	0
	605		0	0
	606		1	5299
	607		0	0
	608		0	0
	609		5	84996
	610		24	174647

**1 x 10<sup>6</sup>  
HT29-  
GFP/  
50  $\mu\text{l}$**

Gruppe 6	Mittelwert	3.9	30627
	Median	0.5	2650

**Tabelle 7: Metastasen in HE-gefärbten Paraffinschnitten der Lunge nach orthotoper Zellinjektion von HT29- bzw. HT29-GFP-Zellen in weiblichen SCID-Mäusen**

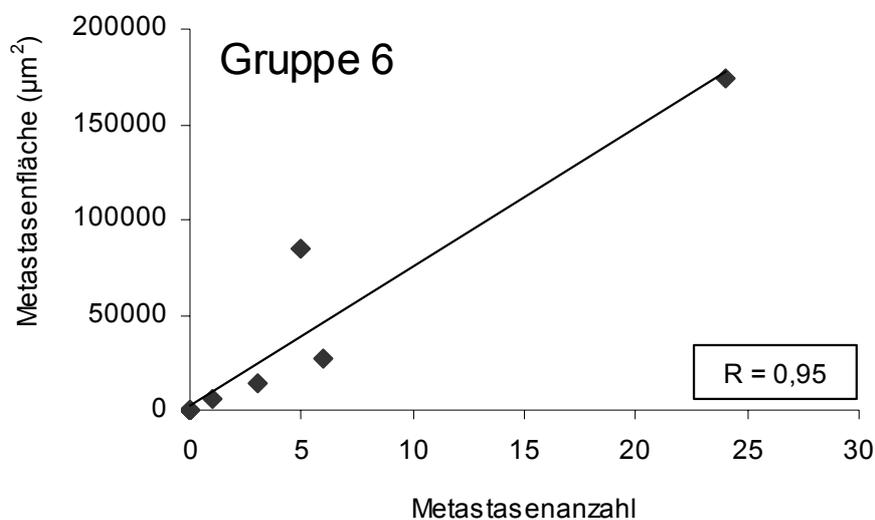
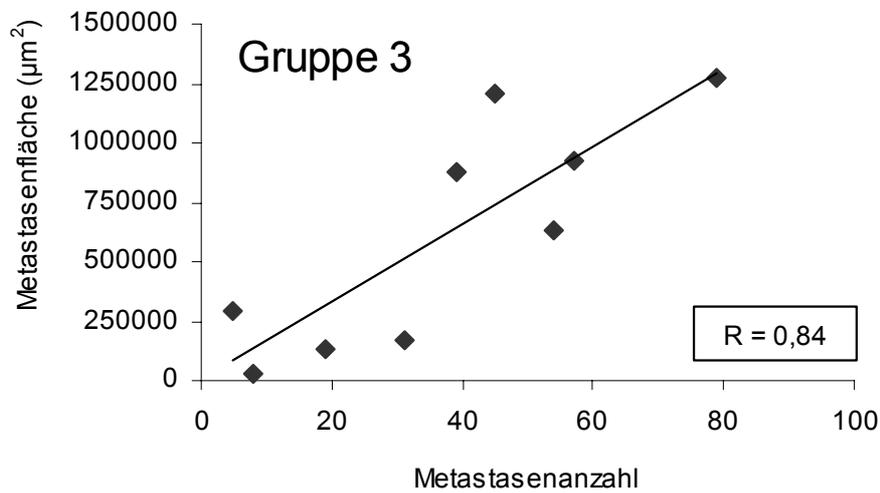
Die Auswertung der HE-gefärbten Paraffinschnitte (3 Ebenen pro Lunge mit je 80  $\mu\text{m}$  Abstand) erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImagePro Plus (Media Cybernetics, USA). Dargestellt sind Einzelwerte jeder Maus (Anzahl und Fläche der Lungenmetastasen) sowie Mittelwerte und Mediane der Gruppen 3 und 6.

Maus 102, 106 und 307 wurden vorzeitig getötet; ihre Organe wurden nicht entnommen.

p Metastasenanzahl (Gruppe 3 - 6) = 0,001

p Metastasenfläche (Gruppe 3 - 6) < 0,001

Setzt man jetzt noch Metastasenanzahl und Metastasenfläche in Beziehung zueinander (Abbildung 25), so erhält man mit  $R = 0,84$  (Gruppe 3) und  $R = 0,95$  (Gruppe 6) eine gute Korrelation. Es besteht also eine Abhängigkeit zwischen diesen beiden Kriterien.



**Abbildung 25:** Korrelation zwischen Anzahl und Fläche von Lungenmetastasen in HE-gefärbten Paraffinschnitten nach orthotoper Zellinjektion

Sektionstage: Gruppe 3 (HT29) Tag 55  
Gruppe 6 (HT29-GFP) Tag 54

Tiere ohne Metastasen sind nicht in der Abbildung aufgeführt.

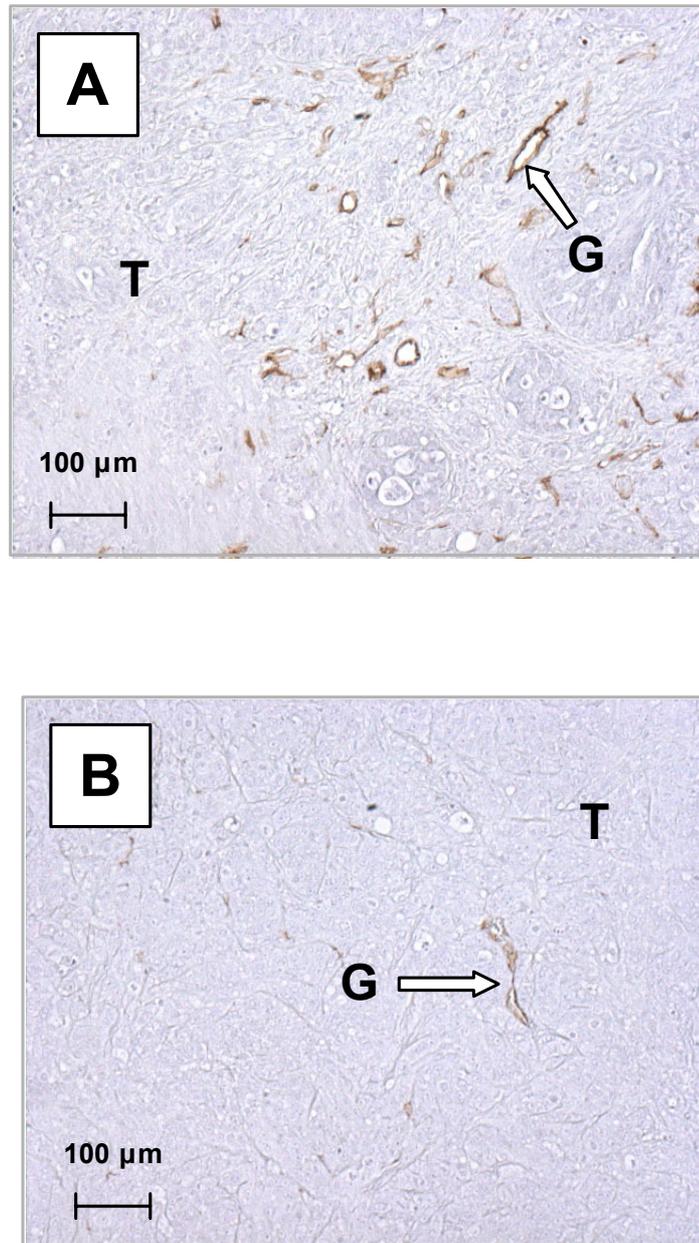
#### **4.2.2.5 Vaskularisierung**

Die Vaskularisierung der Primärtumoren wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Gefäßmarkierung mit Hilfe eines CD34-Antikörpers untersucht.

Paraffinschnitte des Caecums inklusive Tumor wurden mit der unter 3.2.3.4 beschriebenen immunhistologischen Methode gefärbt und digital mit einem Bildbearbeitungsprogramm ausgewertet. Als Ergebnis erhielt man neben der Anzahl der markierten Gefäße auch ihre Fläche, und somit ein Maß für die Größe der Blutgefäße (Tabelle 8, S. 72).

In diesem Versuch wurden nur die beiden letzten Gruppen (Gruppe 3 und Gruppe 6) bezüglich ihrer Vaskularisierung untersucht, da in den ersten vier Gruppen die Tumoren zu klein waren, um jeweils vier digitale Aufnahmen machen zu können. Deshalb konnten hier zwar keine verschiedenen Zeitpunkte miteinander verglichen werden, der Vergleich zwischen HT29-Wildtyp und GFP-transfizierten Zellen war jedoch möglich.

Das Ergebnis der Färbung ist beispielhaft in Abbildung 26 (S. 71) dargestellt.



**Abbildung 26: CD34-Färbung von Darmtumoren (T) nach orthotoper Zellinjektion von HT29- bzw. HT29-GFP-Zellen**

(A) HT29-Zellen; Maus 309 → Sektion Tag 55

(B) HT29-GFP-Zellen; Maus 606 → Sektion Tag 54

Der verwendete CD34-Antikörper markiert die Endothelzellen der Gefäße (G).  
Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer  
[100fache Vergrößerung]

In Gruppe 3 (HT29-Zellen) wurden zwischen 709 und 25029 Gefäßen pro Tier gezählt. Der Mittelwert lag somit bei 3978, und die Summe aller markierten Gefäße dieser Gruppe betrug 35 806. Damit lag die Gesamtanzahl um den Faktor 6,5 höher als in der HT29-GFP-Gruppe (Gruppe 6) wo sich eine Summe von 5541 Blutgefäßen ergab. Die Einzelwerte rangierten zwischen 185 und 851, so dass der Durchschnitt sich auf 554 belief ( $p = 0,002$ ).

Bei Betrachtung der Fläche der Gefäße kam man zu einem ähnlichen Ergebnis. Gruppe 6 wies mit einer Gesamtfläche aller Gefäße von 79648 Pixel einen 3,5fach geringeren Wert als Gruppe 3 mit 280863 Pixel auf.

Dabei lagen die Einzelwerte in der HT29-GFP-Gruppe zwischen 1312 und 16052 Pixel. Der Mittelwert betrug 7965 Pixel. In der HT29-Gruppe fand man Werte zwischen 7458 und 130359 Pixel. Der daraus folgende Mittelwert belief sich auf 31207 Pixel.

Auch diese Unterschiede wiesen mit  $p = 0,003$  eine statistische Signifikanz auf.

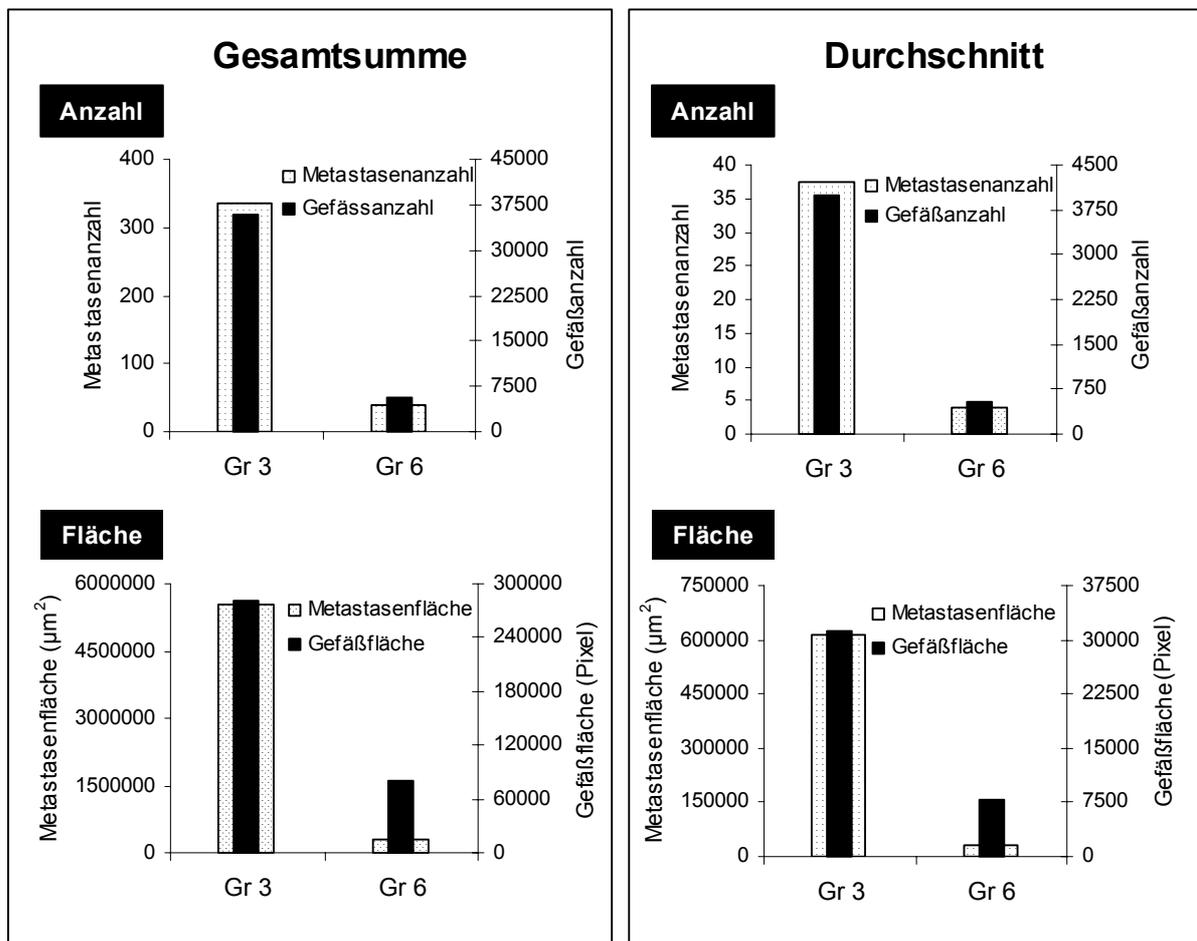
Gruppe 3			Gruppe 6		
Tier	Anzahl	Fläche (Pixel)	Tier	Anzahl	Fläche (Pixel)
301	709	15707	601	498	4877
302	1575	17456	602	847	6861
303	1371	15168	603	506	16052
304	987	7458	604	716	9281
305	1913	24653	605	373	6880
306	25029	130359	606	185	1312
308	746	15110	607	851	13316
309	743	21342	608	661	7474
310	2733	33610	609	496	10078
			610	408	3517
Summe	35806	280863	Summe	5541	79648
Mittelwert	3978	31207	Mittelwert	554	7965
Median	1371	17456	Median	502	7177
STDEV	7922.1	37893	STDEV	213.6	4428

**Tabelle 8: Anzahl und Fläche von Blutgefäßen in Paraffinschnitten (CD34-Färbung) von Darmtumoren nach orthotoper HT29- (Gruppe 3) und HT29-GFP- (Gruppe 6) Injektion in das Caecum von SCID-Mäusen**

$p$  Gefäßanzahl (Gruppe 3 - Gruppe 6) = 0,002

$p$  Gefäßfläche (Gruppe 3 - Gruppe 6) = 0,003

Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse der Metastasenauswertung und der Resultate der Vaskularisierungsuntersuchung (Abbildung 27) stellte man fest, dass eine Abhängigkeit zwischen beiden Faktoren vorhanden war. Eine große Anzahl von Metastasen ging auch mit einer großen Gefäßanzahl einher. Ebenso verhielt es sich im Bezug auf die Fläche. Diese Übereinstimmung war in der HT29-Gruppe (Gruppe 3) deutlicher als in der GFP-Gruppe (Gruppe 6), wobei man hinzufügen muss, dass die GFP-Gruppe mit ihrer geringen Metastasenanzahl (im Durchschnitt nur 3,9 Metastasen pro Tier) nur bedingt wissenschaftlich auswertbar war.



**Abbildung 27: Gegenüberstellung von Lungenmetastasen und Gefäßen am Primärtumor im Caecum in Bezug auf die Kriterien „Anzahl und Fläche“**

Die Metastasen wurden in HE-gefärbten Paraffinschnitten der Lunge mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware digital gezählt und vermessen. Die Gefäße wurden mittels CD34-Färbung in Paraffinschnitten des Caecums markiert und anschließend digital ausgewertet.

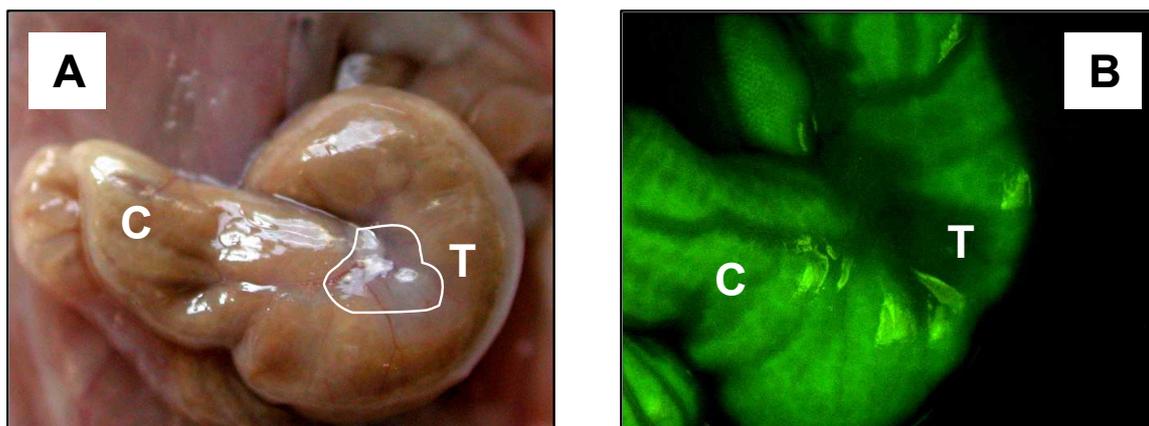
*Gesamtsumme:* Einzelergebnisse in jeder Gruppe wurden addiert

*Durchschnitt:* Gesamtsumme dividiert durch Tieranzahl/Gruppe (n)

#### 4.2.2.6 Fluoreszenz orthotoper HT29-GFP-Tumoren

Um die Fluoreszenz nicht nur in vitro und im ektopen, subkutanen Modell, sondern auch im orthotopen Versuchsansatz zu untersuchen, wurden im ersten orthotopen Versuch neben den HT29-Wildtyp-Zellen auch GFP-transfizierte Zellen eingesetzt.

Analog zum subkutanen Injektionsversuch (siehe 4.2.1.5) war die Fluoreszenz der orthotop wachsenden Tumoren unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht ausreichend, um sie am explantierten Darm sicher identifizieren zu können. Die Tumoren konnten makroskopisch mit bloßem Auge einfach zugeordnet werden, aber unter dem Fluoreszenzmikroskop war die Autofluoreszenz des Darminhaltes stärker als die sehr schwache Fluoreszenz des eigentlichen Tumors (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Sektionsfotos des Caecums (C) einer SCID-Maus 12 Tage nach orthotoper Injektion von  $1 \times 10^6$  HT29-GFP-Zellen

A: Digitalfoto ohne Fluoreszenz

B: Digitalfoto unter Fluoreszenzmikroskop In Bild A ist der Tumor (T) weiß markiert

Die Aufnahmen wurden direkt während der Sektion angefertigt, nachdem das Tier durch Genickbruch getötet worden war.

Aufgrund dieser sowie vorangegangener Ergebnisse wurden im folgenden Versuch, der orthotopen Fragmentfixation, nur noch HT29-Wildtyp-Zellen eingesetzt.

Auf die Herstellung eines neuen, eventuell stabileren HT29-GFP-Klons wurde aus Zeitgründen verzichtet.

#### 4.2.2.7 CEA

Die ursprüngliche Idee, mit Hilfe der GFP-transfizierten HT29-Zellen das Tumorstadium und auch die Metastasierung in den Versuchstieren quantifizieren zu können, war nach den Ergebnissen der subkutanen Zellinjektion in Frage gestellt. Zum einen war die Fluoreszenz weder *in vitro* noch *in vivo* stabil genug, zum anderen traten in den GFP-Gruppen sehr viele Tumoren mit großflächigen nekrotischen Bereichen auf, die zum Abbruch führten.

So wurden bei diesem ersten orthotopen Versuch den Tieren am jeweiligen Sektionstag Blutproben entnommen, in denen dann anschließend der Tumormarker CEA (Carcinoembryonales Antigen) mittels ELISA bestimmt wurde (vergleiche 3.2.4).

Zusätzlich wurden exemplarisch Paraffinschnitte einzelner Darmtumoren wie unter 3.2.3.3 beschrieben immunhistochemisch gefärbt und damit auf das Vorhandensein von CEA untersucht.

##### ➤ CEA-ELISA

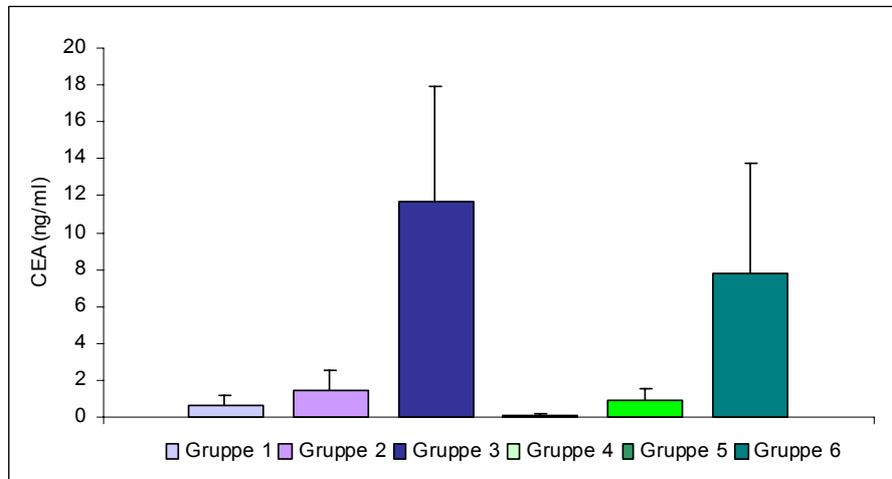
Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Die unterschiedliche Probenanzahl ergibt sich aus der Tatsache, dass Tiere vorzeitig gestorben waren und ihnen aus diesem Grund keine Blutprobe entnommen werden konnten.

Es sind deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Tötungszeitpunkten zu sehen. Der CEA-Gehalt stieg mit der Dauer der Zeit an.

Nach 12/13 Tagen lag der Mittelwert in der HT29-Gruppe bei 0,640 ng CEA/ml Serum und in der GFP-Gruppe bei 0,129 ng CEA/ml Serum. Zwei Wochen später wurden in beiden Zelllinien Werte um 1 ng/ml gemessen.

Am letzten Sektionszeitpunkt stiegen die CEA-Gehalte bis 7,802 (GFP) bzw. 11,683 ng/ml (Wildtyp) an. Sowohl die Unterschiede innerhalb der HT29-Gruppen wie auch die in den HT29-GFP-Gruppen waren signifikant. Zwischen Wildtyp- und GFP-Gruppen gab es lediglich zwischen Gruppe 1 und Gruppe 4 eine Signifikanz ( $p = 0,015$ ).

Hiermit konnte zum einen CEA im Serum der Versuchstiere eindeutig nachgewiesen werden, zum anderen konnte gezeigt werden, dass der CEA-Gehalt mit fortschreitender Versuchsdauer und folglich mit zunehmender Tumorbilastung anstieg. Eine direkte Korrelation zwischen Tumorstadium und CEA-Gehalt konnte nicht untersucht werden, da der Primärtumor sehr klein und infiltrativ wuchs und deshalb nicht gemessen werden konnte.



	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
<b>CEA Mittelwert (ng/ml)</b>	0.640	1.441	11.683	0.129	0.918	7.802
<b>STDEV</b>	0.574	1.072	6.250	0.089	0.611	5.959
<b>Probenanzahl</b>	8	10	9	10	10	10
<b>Sektionstag</b>	13	28	51	12	27	50

**Abbildung 29: CEA-Gehalt (ng/ml) von Serumproben nach orthotoper HT29-Zellinjektion**

Den weiblichen SCID-Mäusen wurde vor der Sektion unter Äthernarkose durch Punktion des retrobulbären Venenplexus Blut entnommen und mit einem CEA-ELISA-Kit (Alpha Diagnostic International, USA) untersucht.

$p$  (Gruppe 1-2) = 0,041     $p$  (Gruppe 4-5) < 0,001     $p$  (Gruppe 1-4) = 0,015  
 $p$  (Gruppe 2-3) < 0,001     $p$  (Gruppe 5-6) = 0,002  
 $p$  (Gruppe 1-3) < 0,001     $p$  (Gruppe 4-6) < 0,001

Dargestellt sind die Mittelwerte CEA jeder Gruppe in ng/ml sowie positive Standardabweichung (STEDV), Probenanzahl und Sektionstag.

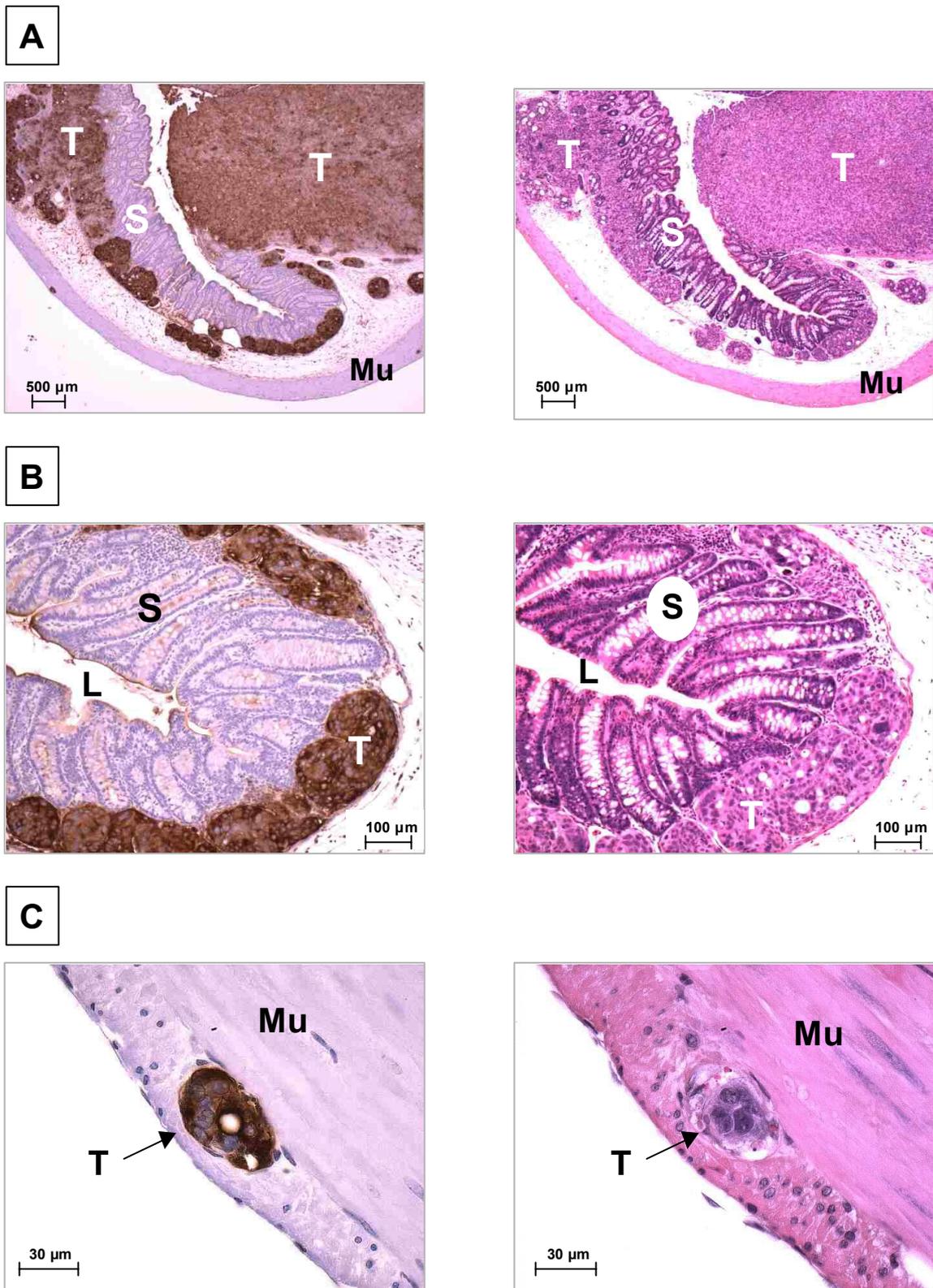
➤ CEA-Immunhistologie

CEA konnte nicht nur im Blut der Versuchstiere nachgewiesen werden, auch in Paraffinschnitten der caecalen Tumoren war CEA vorhanden und konnte durch eine immunhistologische Methode detektiert werden. Wie unter 3.2.3.3 beschrieben, wurden exemplarisch einige in Paraffin eingebettete Darmtumoren mit einem CEA-Antikörper (CEA Rabbit Anti-Human polyklonal, DAKO, Hamburg) behandelt und das Ergebnis mit HE-gefärbten Objektträgern verglichen.

Abbildung 30 zeigt das Resultat dieser immunhistochemischen CEA-Färbung am Beispiel des Darmtumors einer Maus, die an Tag 51 getötet worden war, im Vergleich zum Paraffinschnitt des gleichen Tumors, der einer HE-Färbung unterzogen wurde. In der linken Spalte ist die CEA-Färbung dargestellt, in der rechten Spalte die HE-Färbung.

Die deutlichen braunen Abschnitte stellen Bereiche dar, in denen der CEA-Antikörper gebunden hat. Dort exprimieren die Zellen also CEA. Vergleicht man nun den konventionell HE-gefärbten Schnitt in der rechten Spalte mit dem immunhistochemisch gefärbten Paraffinschnitt in der linken Spalte, so stimmen die braunen Areale mit den Bereichen überein, in denen man im HE-Schnitt Tumorgewebe identifizieren kann. Unveränderte Bereiche dieses Darmausschnitts, wie z.B. die Schleimhaut und die Muskulatur, sind nicht braun angefärbt, da dort kein CEA vorhanden ist.

Die deutlichen Farbunterschiede zwischen braun (CEA-positiv; tumorös) und violett (CEA-negativ; nicht-tumorös) erleichterten die Auswertung der histologischen Schnitte erheblich.



**Abbildung 30: CEA-Nachweis in Paraffinschnitten von Darmtumoren nach orthotoper HT29-Injektion in die Caecumwand in weiblichen SCID-Mäusen**  
 Die linke Spalte zeigt das Ergebnis der CEA-Färbung, die rechte Spalte zeigt den gleichen Ausschnitt in der HE-Färbung.

(A) 12,5fache Vergrößerung (B) 100fache Vergrößerung (C) 400fache Vergrößerung

*T = Tumor Mu = Muskelschicht S = Schleimhaut L = Lumen des Caecums*

### **4.2.3 Orthotope Fragmentfixation**

#### **4.2.3.1 Versuchsablauf**

Neben der Zellinjektion wurde noch eine andere orthotope Technik, nämlich die chirurgische Fixierung eines Tumorfragments, durchgeführt.

Dazu wurden zunächst 10 weiblichen SCID-Mäusen bilateral jeweils  $6 \times 10^6$  HT29-Zellen subkutan injiziert. Auf die Injektion von HT29-GFP-Zellen wurde in diesem Ansatz verzichtet, da die Fluoreszenz weder in vitro noch in den beiden vorangegangenen in-vivo-Versuchen überzeugen konnte.

An Tag 20 hatten die subkutan wachsenden Tumoren ein durchschnittliches Volumen von  $393 \text{ mm}^3$  erreicht. Fünf Mäuse mit gleichmäßig geformten, nicht nekrotischen Tumoren wurden als „Fragment-Spender“ ausgewählt. Nach der Resektion der Tumoren stellte man aus ihnen Fragmente von ca. 3 mm Durchmesser mit einem Gewicht von ca. 40 mg/Stück her. Bis zum Einsatz wurden sie in eisgekühltem HBSS aufbewahrt.

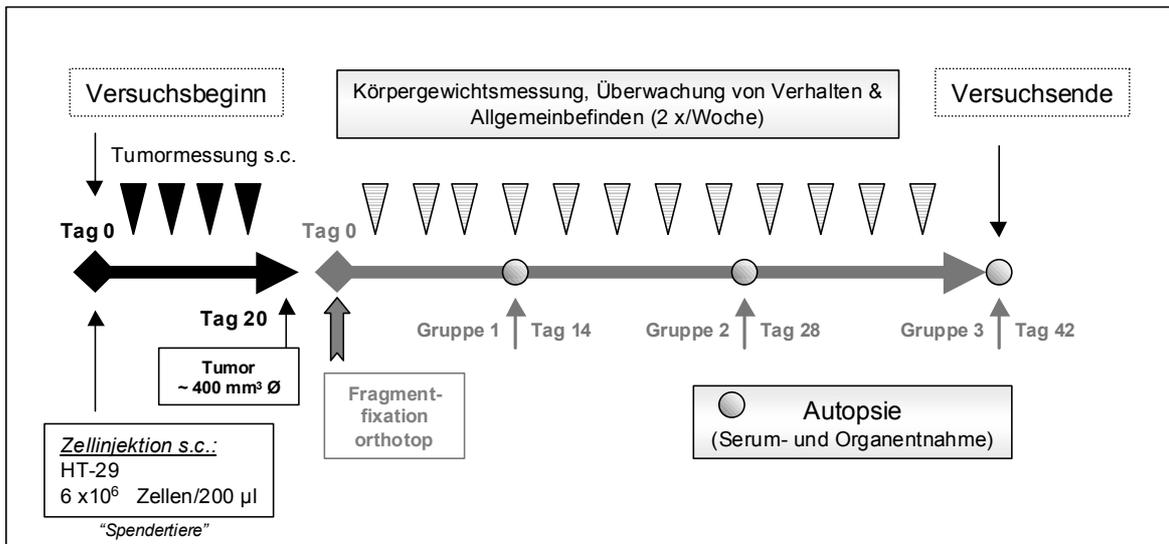
Die „Empfänger“-Tiere, d.h. die 34 weiblichen SCID-Mäuse (Gruppe 1 n = 12 Mäuse, Gruppe 2 & 3 jeweils n = 11 Mäuse), die ein Tumorstück am Caecum angenäht bekommen sollten, wurden wie unter 3.2.2.3 beschrieben vorbereitet und operiert.

Analog zum Versuchsdesign der orthotopen Zellinjektion wurde auch in diesem Versuch alle zwei Wochen eine Tiergruppe getötet. So konnten Tumorwachstum und Metastasierung an drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden.

Der Sektionstag für Gruppe 1 war also Tag 14, für Gruppe 2 Tag 28 und für Gruppe 3 Tag 42.

Am jeweilig letzten Versuchstag erfolgten Blutentnahme und Sektion mit Entnahme von Leber, Lunge und Primärtumor.

Eine schematische Übersicht über den Versuchsablauf gibt Abbildung 31.



**Abbildung 31: Schematischer Versuchsablauf der orthotopen Fixation eines HT29-Tumorfragments**

Einige Tiere zeigten in den ersten Tagen nach der Operation ein gestörtes Allgemeinbefinden oder wurden ohne vorangegangene Anzeichen bei der morgendlichen Visite tot im Käfig gefunden. Um später eine statistische Auswertung durchführen zu können, wurden die verbliebenen Mäuse an Tag 11 nach Körpergewicht randomisiert und neu in Gruppen eingeteilt. Sie behielten aber ihre ursprüngliche Bezeichnung den gesamten Versuch hindurch (Tabelle 9 und Tabelle 10).

Insgesamt wurden schließlich drei Gruppen mit je  $n = 8$  Tieren eingesetzt.

Gruppe	Tiere, die vor dem festgelegten Sektionstag gestorben sind	Tag	Todesursache	Geplanter Sektionstag
1	Maus 110, 112	3, 4	Tot im Käfig gefunden	Tag 14
2	Maus 204, 206, 208, 209, 210, 211	3, 4, 7, 10		Tag 28
3	Maus 303, 310	8		Tag 42

**Tabelle 9: Übersicht über vorzeitig gestorbene Tiere (vor neuer Gruppenzusammensetzung)**

Die Tiere wurden bei der täglichen Überprüfung am Morgen tot im Käfig gefunden.

Im weiteren Versuchsverlauf gab es dann noch zwei weitere Todesfälle. Maus 305 wurde an Tag 35 mit gestörtem Allgemeinbefinden aus Tierschutzgründen vorzeitig getötet. Ihre Organe wurden entnommen und in 3,8%igem Formaldehyd fixiert.

Maus 111 wurde am Morgen des geplanten Sektionstermins (Tag 42) tot im Käfig gefunden. Es wurde noch eine Sektion durchgeführt, ihre Organe wurden jedoch aufgrund von Autolyse weder entnommen noch konserviert.

So bestand Gruppe 3 am Ende aus n = 6 Mäusen.

Gruppe 1		Gruppe 2		Gruppe 3	
Tier	KGW (g)	Tier	KGW (g)	Tier	KGW (g)
101	20.6	104	19.9	111	19.2
102	20.4	107	21.1	301	20.7
103	17.5	201	19.2	302	20.0
105	21.0	202	22.2	305	18.4
106	18.9	203	20.6	306	21.7
108	22.4	205	20.4	307	19.2
109	19.8	207	18.6	308	21.1
304	18.8	309	18.0	311	18.7
Median	20.1		20.2		19.6
Durchschnitt	19.9		20.0		19.9

**Tabelle 10: Neue Gruppeneinteilung (Tag 11) aufgrund vorzeitiger Todesfälle**

Ergebnis der Randomisierung nach KGW (g)

Neue Gruppen alle n = 8

Die Mäuse behielten ihre ursprüngliche Bezeichnung bis zum Versuchsende.

#### 4.2.3.2 Tumorwachstum

Die Anwachsrate dieses Modells betrug 100 %, d.h. bei allen seziierten Tieren war makroskopisch und somit folglich auch mikroskopisch ein Tumor im Caecum sichtbar.

Bei Vergleich der Tumorinvasivität der einzelnen Gruppen anhand der HE-gefärbten Paraffinschnitte des Caecums und der Sektionsfotos, war eine zeitabhängige Entwicklung feststellbar (Abbildung 32).

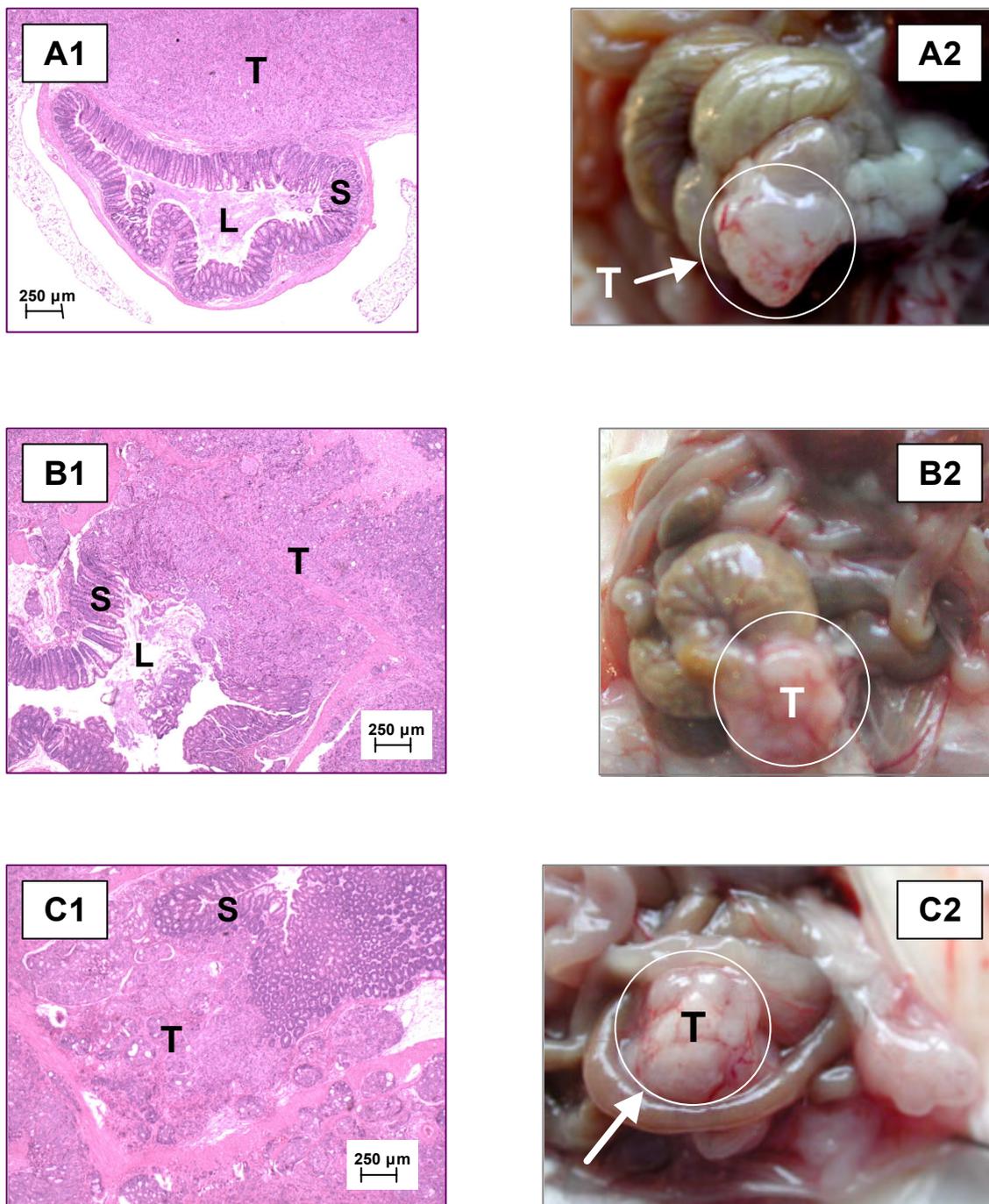
Bei den Tieren, die am ersten Sektionszeitpunkt (Tag 14) getötet worden waren, war der Darmtumor noch gut abgegrenzt und lag dem Caecum lateral an. Das Lumen war deutlich sichtbar; die Schleimhaut war im ganzen Durchmesser vollständig erhalten. In der zweiten Gruppe, die an Tag 28 seziiert wurde, entdeckte man schon eine massive Durchdringung einzelner Schichten der Darmwand. Das Lumen war nahezu komplett durch Tumormassen verdrängt worden; die Schleimhaut war in großen Bereichen zerstört.

Nach 42 Tagen war das Caecum nicht mehr als solches zu identifizieren. Der Tumor infiltrierte alle Schichten der ehemaligen Darmwand und ersetzte das ursprünglich vorhandene Gewebe.

Durch das Annähen eines dreidimensionalen Fragments wölbte sich der Tumor nach außen vor, so dass eine Messung mittels eines elektronischen Messschiebers durchgeführt werden konnte (Abbildung 33). Allerdings kann diese Messung nur als Anhaltspunkt dienen, da der Tumor infiltrativ in das Darmlumen wuchs und sich so einer exakten Volumenbestimmung entzog.

Auch, wenn dies keine exakte Methode darstellt, so ließ sich dennoch folgende Aussage treffen: Die angenähten HT29-Fragmente, die ursprünglich ca. 40 mg gewogen hatten, waren gut angewachsen und nahmen mit fortschreitender Zeit an Größe zu. So stieg der Mittelwert von 92,9 mm<sup>3</sup> nach 14 Tagen über 298,0 mm<sup>3</sup> nach 28 Tagen bis hin zu 502,3 mm<sup>3</sup> an Tag 42 stetig an. Die Unterschiede im Tumolvolumen zwischen allen drei Gruppen waren statistisch signifikant (p-Werte zwischen < 0,001 und 0,043).

Eine weitere Messmöglichkeit stellt das Wiegen dar, allerdings wurde schon unter 4.2.2.2 darauf hingewiesen, dass die Gewichte gesunder Caeca schon sehr große Variationen aufwiesen und somit eine verlässliche Bestimmung des Tumorgewichtes nicht zuließen.



**Abbildung 32: Paraffinschnitte von Caecum mit Tumor (1) und Sektionsfotos (2) nach orthotoper HT29-Fragmentfixation zu verschiedenen Zeitpunkten**

T = Tumor

S = Schleimhaut des Caecums

L = Lumen des Caecums

(A) Maus 102, Sektion Tag 14

(B) Maus 205, Sektion Tag 28

(C) Maus 301, Sektion Tag 42

[HE-Färbung, 25fache Vergrößerung]

### Gruppe 1 Sektion Tag 14

Maus	Tumor-Länge (mm)	Tumor-Breite (mm)	Tumor-Volumen (mm <sup>3</sup> )
102	6.7	4.7	72.7
103	7.0	5.6	108.6
105	7.1	6.0	126.9
106	6.3	6.1	117.6
108	5.6	3.9	43.6
109	6.6	5.1	86.7
304	5.9	5.6	94.1

n =	7
Mittelwert	92.9
Median	94.1
STDEV	28.5

Maus 101: kein Tumor gemessen.

### Gruppe 2 Sektion Tag 28

Maus	Tumor-Länge (mm)	Tumor-Breite (mm)	Tumor-Volumen (mm <sup>3</sup> )
104	8.7	8.2	291.5
107	5.6	8.4	196.6
201	10.8	8.6	394.6
202	9.7	7.4	263.1
203	9.6	9.2	410.7
205	7.6	7.6	220.9
207	9.2	8.3	313.7
309	9.5	7.8	292.9

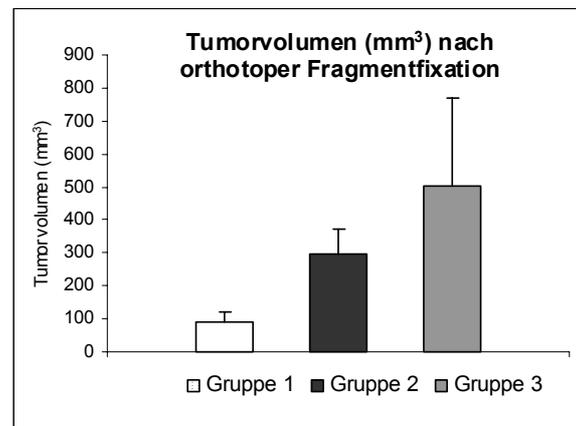
n =	8
Mittelwert	298.0
Median	292.2
STDEV	75.4

### Gruppe 3 Sektion Tag 42

Maus	Tumor-Länge (mm)	Tumor-Breite (mm)	Tumor-Volumen (mm <sup>3</sup> )
301	10.9	7.6	319.3
302	9.7	8.8	376.7
306	10.9	7.9	344.0
307	13.5	12.3	1009.9
308	13.7	7.4	370.8
311	12.5	9.8	593.0

n =	6
Mittelwert	502.3
Median	373.8
STDEV	267.4

Maus 111 und 305 vor Sektion verstorben.



Bestimmung mittels Schublehre bei Sektion

### Abbildung 33: Tumorvolumina (mm<sup>3</sup>) nach orthotoper Fragmentfixation

Die Tumoren wurden mittels Schublehre bei der Sektion vermessen und ihr Volumen mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Tumorvolumen (mm}^3\text{)} = (\text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Breite}) / 2$$

$$p (\text{Gruppe 1-2}) < 0,001$$

$$p (\text{Gruppe 2-3}) = 0,043$$

$$p (\text{Gruppe 1-3}) = 0,001$$

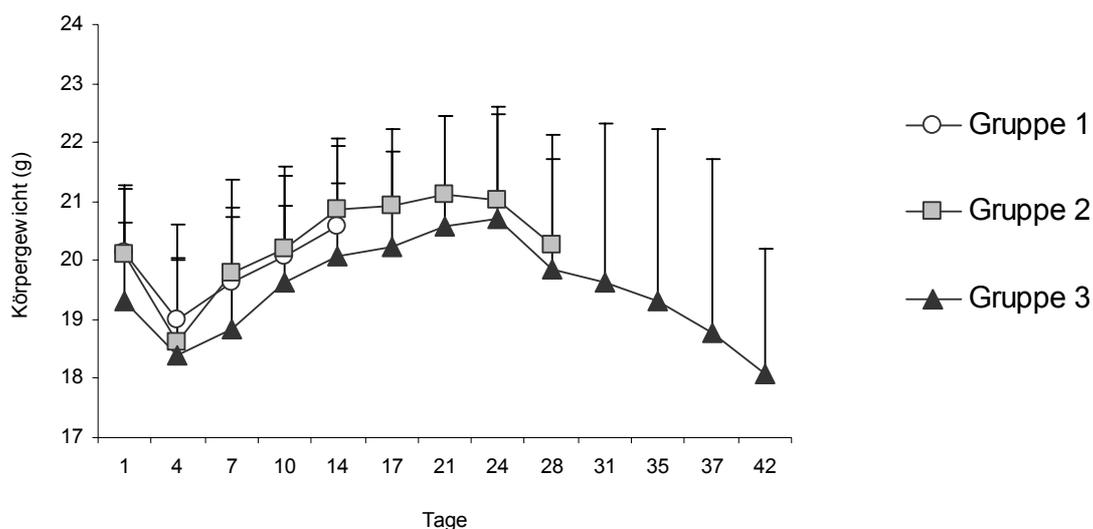
#### **4.2.3.3 Körpergewichtsentwicklung während des Versuchs**

Die Versuchstiere wurden zweimal pro Woche gewogen.

Abbildung 34 zeigt, dass alle Mäuse bis Tag 4 durchschnittlich 1,2 g an Gewicht verloren hatten. Der niedrigste Wert wurde in Gruppe 3 mit einem mittleren Gewicht von 18,4 g erreicht. Dieser Rückgang im Vergleich zum Ausgangsgewicht, das zwischen 20,2 g und 19,3 g lag, kann durch den operativen Eingriff bedingt sein. Die Tiere waren in den ersten Tagen nach der Operation weniger agil als gewöhnlich und nahmen auch subjektiv weniger Futter auf.

Nach diesem Zeitpunkt erholten sich die Versuchstiere stetig und nahmen an Gewicht zu. Gruppe 1 wurde an Tag 14 getötet. Das durchschnittliche Gewicht dieser Mäuse betrug bei der letzten Messung 20,6 g. Die beiden im Versuch verbliebenen Gruppen erreichten zwischen Tag 21 und 24 ihr Gewichtsmaximum mit 20,7 g (Gruppe 2) bzw. 21,1 g (Gruppe 3).

Die im Versuchsverlauf zunehmende Tumorlast führte ab Tag 24 in den letzten beiden Gruppen zu einem erneuten Gewichtsrückgang. Das mittlere Körpergewicht sank, so dass Gruppe 2 am Tag ihrer Sektion (Tag 28) einen Wert von 20,3 g aufwies. Die letzte Versuchsgruppe (Gruppe 3) wurde an Tag 42 seziiert und wies dabei ein durchschnittliches Körpergewicht von 18,1 g auf.



**Abbildung 34: Körpergewichtsverlauf der Versuchstiere nach orthotoper Fixation eines HT29-Tumorfragments**

Die Tiere wurden zweimal/Woche gewogen. Dargestellt sind die Mittelwerte jeder Gruppe. An Tag 11 erfolgte eine Randomisierung nach KGW mit neuer Gruppeneinteilung aufgrund gehäufeter Todesfälle.

Gruppe	KGW (g) Versuchsbeginn (1. Messung)	KGW (g) Sektionstag	Tag Sektion
1	20,2	20,6	14
2	20,1	20,3	28
3	19,3	18,1	42

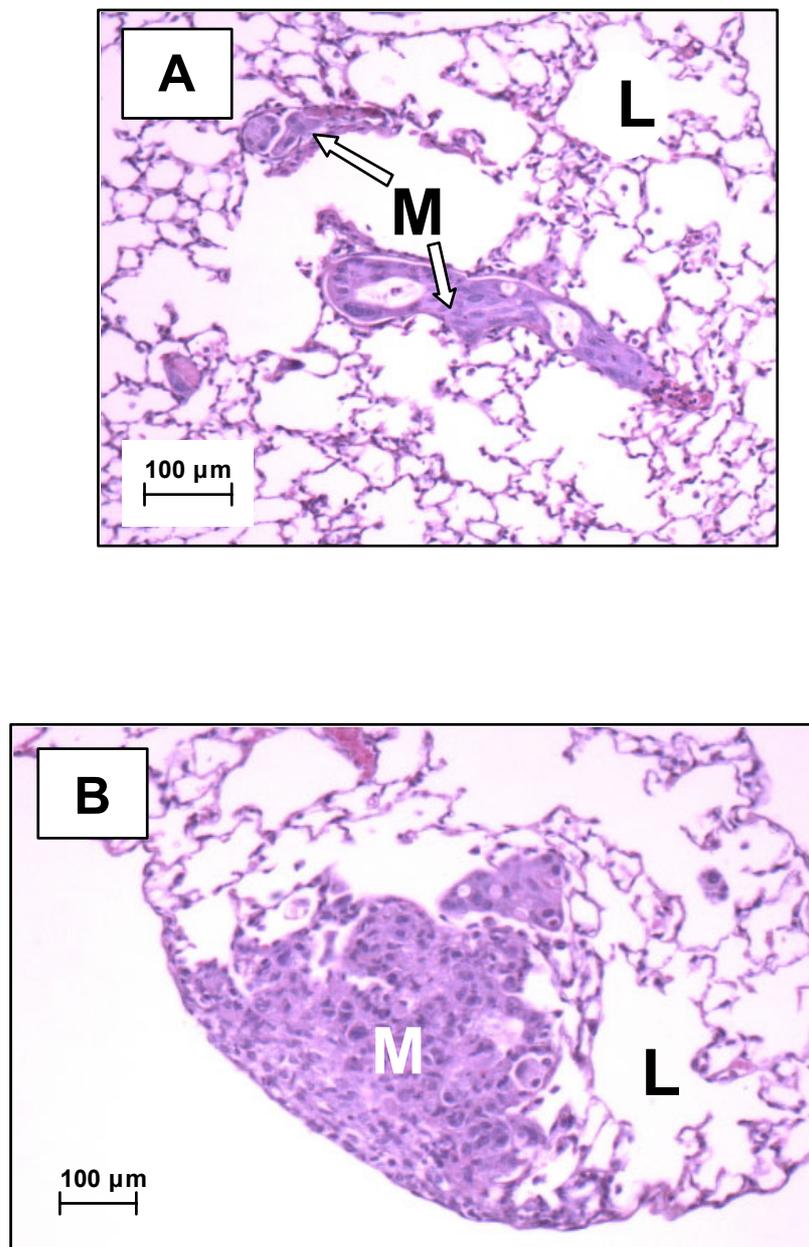
#### 4.2.3.4 *Metastasierung*

Leber und Lunge jeder Maus wurden histologisch auf das Vorhandensein von Metastasen untersucht und mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware analysiert. So konnten Anzahl und Fläche der Metastasen bestimmt werden (siehe 3.2.3.5).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 11 (S. 89) dargestellt.

Die Paraffinschnitte der Leber waren bei allen Mäusen frei von Metastasen.

In den Lungenschnitten konnten Metastasen in unterschiedlichem Umfang diagnostiziert werden (Abbildung 35).



**Abbildung 35: Lungenmetastasen nach orthotoper Fixation eines HT29-Tumorfragments**

(A) und (B) Maus 308 → Sektion Tag 42

Es wurden Paraffinschnitte mit 3 Ebenen mit je 80 µm Abstand hergestellt und HE-gefärbt. [100fache Vergrößerung]

(L) Lungengewebe  
(M) Metastase

Die Metastasierung war deutlich von der Versuchsdauer abhängig (Tabelle 11). So wurden in Gruppe 1, die an Tag 14 getötet wurde, keine Metastasen nachgewiesen. Alle Tiere zeigten eine unauffällige Lunge.

In Gruppe 2, die zwei Wochen an Tag 28 später seziiert wurde, wiesen 3 von 8 Tieren maligne Lungenveränderungen auf. Die durchschnittliche Metastasenanzahl lag bei weniger als einer Metastase pro Tier (exakt: 0,9); ihre mittlere Fläche betrug  $3217 \mu\text{m}^2$ .

Anzahl und Größe dieser Tochtergeschwülste wurde durch die Auswertung von Gruppe 3 (Sektion Tag 42) übertroffen. Hier konnten bei allen Tieren Lungenmetastasen festgestellt werden. Die Anzahl rangierte zwischen 2 und 32 Metastasen pro Tier; die Fläche erstreckte sich zwischen  $6810$  und  $327084 \mu\text{m}^2$  pro Tier. Im Vergleich mit Gruppe 2 ergab sich ein 10fach höherer Durchschnitt in der Metastasenanzahl und eine fast um den Faktor 25 größere mittlere Metastasenfläche.

Die Unterschiede zwischen Gruppe 2 und Gruppe 3 sind statistisch signifikant mit  $p = 0,004$  bezogen auf die Anzahl und  $p = 0,006$  bezogen auf die Fläche.

Gruppe	Tier	Sektionstag	LUNGEN-Metastasen			
			Anzahl	Fläche ( $\mu\text{m}^2$ )		
1	101	14	0	0	<b>Gruppe 1</b>	
	102		0	0		
	103		0	0		
	105		0	0		
	106		0	0		
	108		0	0		
	109		0	0		
	304		0	0		
2	104	28	0	0	<b>Gruppe 2</b>	
	107		0	0		
	201		2	8534		
	202		0	0		
	203		0	0		
	205		4	16126		
	207		0	0		
	309		1	1078		
3	301	42	4	11725	<b>Gruppe 3</b>	
	302		3	6810		
	305		2	30240		
	306		3	7118		
	307		6	49373		
	308		14	119545		
	311		32	327084		
					<b>Metastasenanzahl</b>	<b>Metastasenfläche</b>
				Mittelwert	0	0
				Median	0	0
					<b>Metastasenanzahl</b>	<b>Metastasenfläche</b>
				Mittelwert	0.9	3217
				Median	0	0
					<b>Metastasenanzahl</b>	<b>Metastasenfläche</b>
				Mittelwert	9.1	78842
				Median	4.0	30240

**Tabelle 11: Metastasen in HE-gefärbten Paraffinschnitten der Lunge nach orthotoper Fixation eines HT29-Tumorfragments in weiblichen SCID-Mäusen**

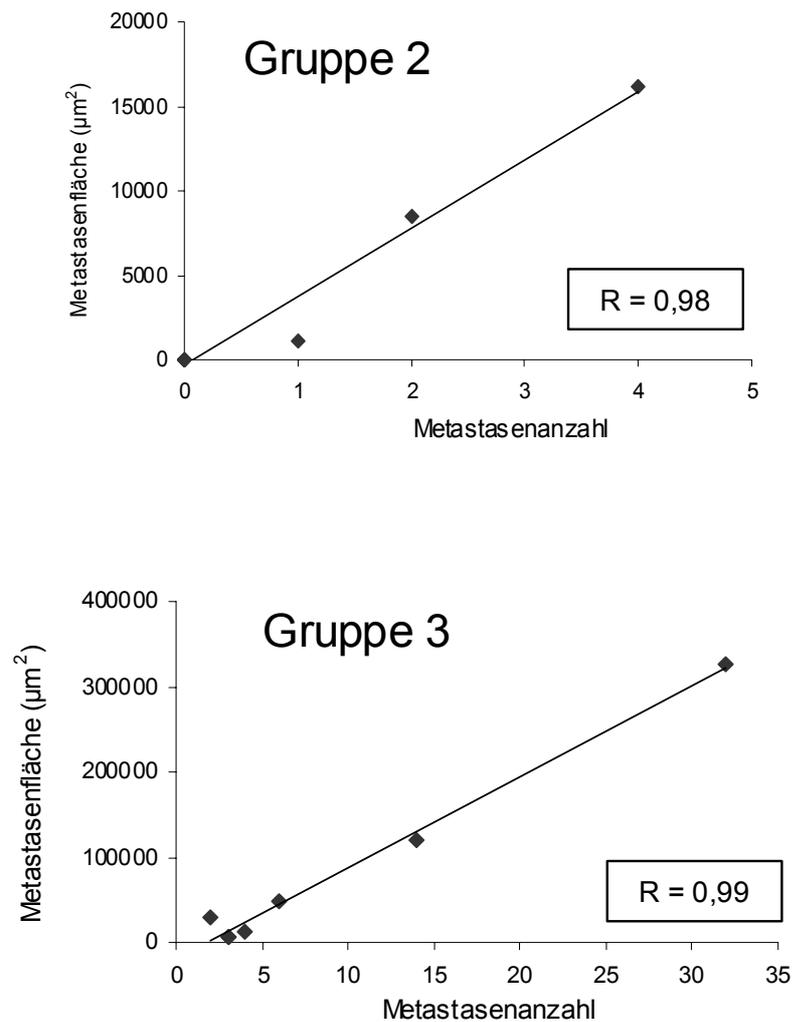
Die Auswertung der HE-gefärbten Paraffinschnitte (3 Ebenen pro Lunge mit je 80  $\mu\text{m}$  Abstand) erfolgte mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImagePro Plus (Media Cybernetics, USA). Dargestellt sind Einzelwerte jeder Maus (Anzahl und Fläche der Lungenmetastasen) sowie Mittelwerte und Mediane der Gruppen.

p Metastasenanzahl (Gruppe 2 - 3) = 0,004

p Metastasenfläche (Gruppe 2 - 3) = 0,006

Setzt man Anzahl und Fläche der Metastasen in Beziehung zueinander (Abbildung 36), so ergibt sich eine gute Korrelation mit  $R = 0,98$  in Gruppe 2 und  $R = 0,99$  in Gruppe 3.

Wie bereits bei der orthotopen Zellinjektion beobachtet worden war, stieg auch in diesem Modell die Metastasenanzahl proportional zu ihrer Fläche an.



**Abbildung 36:** Korrelation zwischen Anzahl und Fläche von Lungenmetastasen in HE-gefärbten Paraffinschnitten nach orthotoper Fixierung eines HT29-Fragments

Sektionstage: Gruppe 2 → Tag 28  
Gruppe 3 → Tag 42

Tiere ohne Metastasen sind nicht in der Abbildung aufgeführt.

#### 4.2.3.5 Vaskularisierung

Wie im ersten orthotopen Versuchsdesign, sollte auch nach Fragmentfixation der Zusammenhang zwischen Tumorgröße, Metastasenanzahl und Vaskularisierungsgrad mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung (Abbildung 37) mit dem Endothelmarker CD34 untersucht werden. Die Durchführung ist unter 3.2.3.4 näher beschrieben.

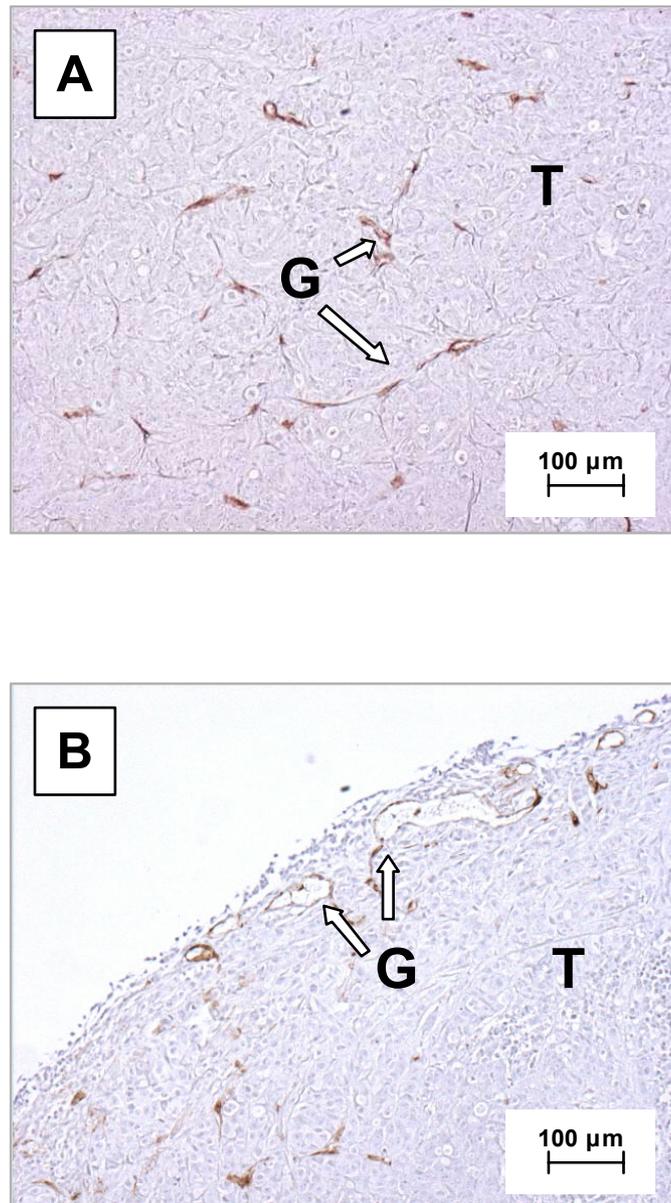
Die Ergebnisse der anschließenden digitalen Auswertung geben Abbildung 38 (S. 93) und Tabelle 12 (S. 94) wieder.

Im Gegensatz zur orthotopen Zellinjektion, bei der die Tumoren nur am letzten Sektionszeitpunkt groß genug waren, um sie bezüglich ihrer Gefäßversorgung auswerten zu können, wuchsen die Tumoren in diesem Modell bei allen Tieren ausreichend. Demnach wurden auch alle Gruppen in Bezug auf die Vaskularisierung der Tumoren näher untersucht.

Wie aus Tabelle 12 und Abbildung 38 ersichtlich ist, nimmt die durchschnittliche Anzahl der Gefäße von Beginn des Versuchs bis zum Ende hin ab. So beträgt der Mittelwert bei Gruppe 1, die an Tag 14 getötet wurde, 1149. Gruppe 2 mit der Sektion an Tag 28, weist noch einen Mittelwert von 969 Gefäßen auf, wohingegen die letzte Gruppe an Tag 42 nur noch 518 Gefäße als Durchschnittswert zeigt.

Ähnlich verhält es sich mit der Fläche der Gefäße. Gruppe 1 weist mit 20473 Pixel den niedrigsten Wert im Durchschnitt auf. Eine fast identische Fläche findet man bei Gruppe 2 mit 20493 Pixel, und bei Gruppe 3 stellt man mit 14158 Pixel im Mittel den kleinsten Wert fest.

Eine statistische Signifikanz ist nur zwischen den Gruppen 2 - 3 ( $p = 0,006$ ) und den Gruppen 1 - 3 ( $p = 0,002$ ) beim Kriterium Gefäßanzahl nachzuweisen.



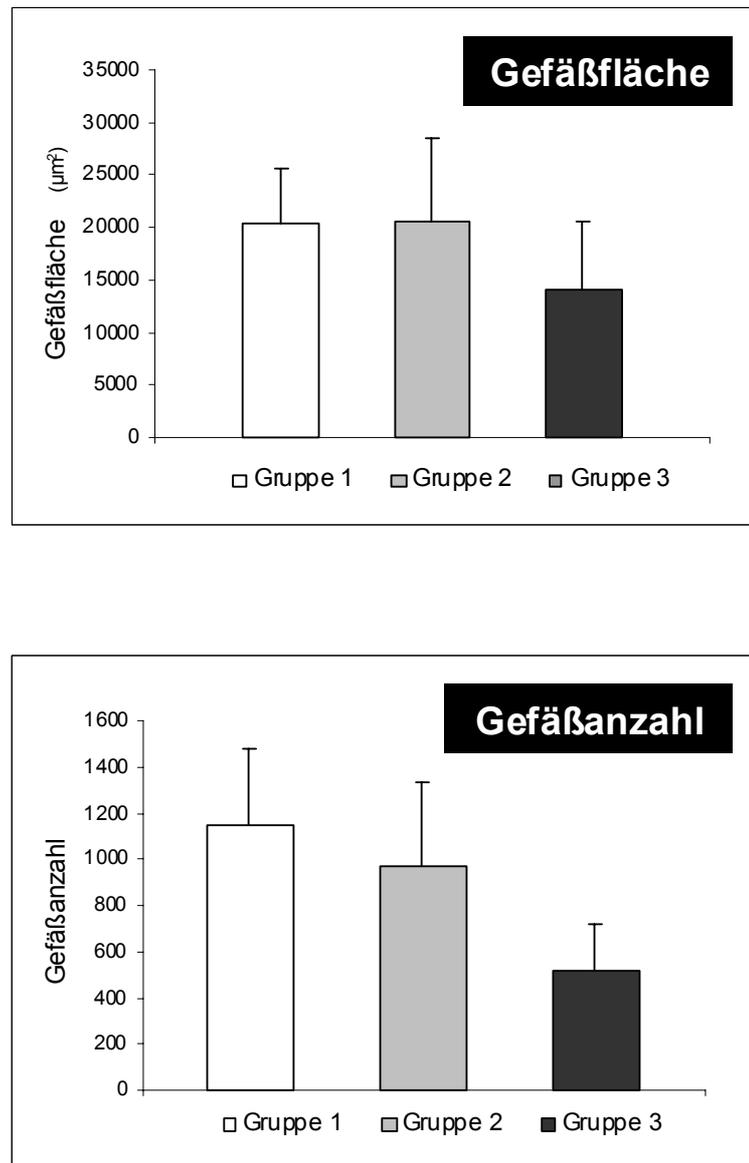
**Abbildung 37: CD34-Färbung von Darmtumoren (T) nach orthotoper Fixation eines HT29-Tumorfragments**

(A) Gruppe 1; Maus 105 → Sektion Tag 28

(B) Gruppe 3; Maus 306 → Sektion Tag 42

Der verwendete CD34-Antikörper markiert die Endothelzellen der Gefäße (G).

Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer  
[100fache Vergrößerung]



**Abbildung 38: Gefäßfläche und Gefäßanzahl in Paraffinschnitten des Caecums nach orthotoper Fixation eines HT29-Tumorfragments**

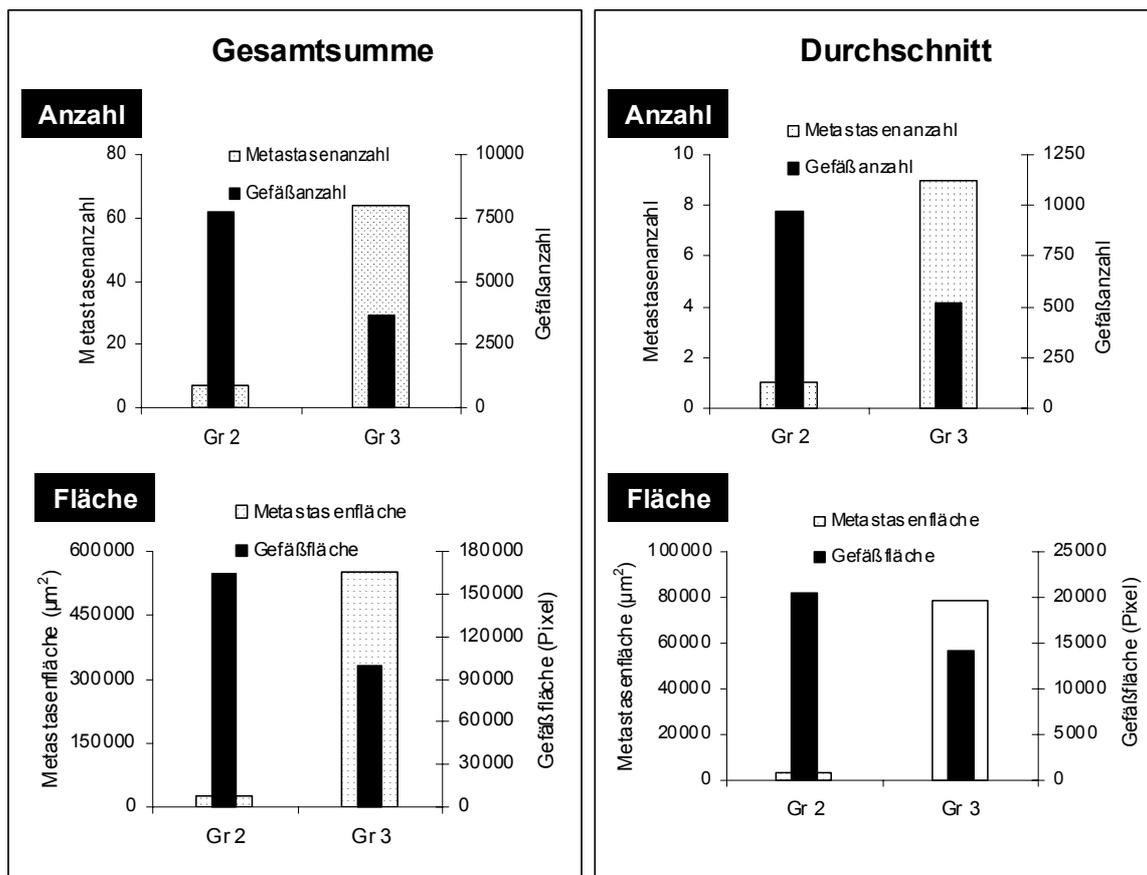
Die Serienschnitte der in Paraffin eingebetteten Lungen wurden einer immunhistochemischen CD34-Färbung unterzogen und digital ausgewertet.

Sektion: Gruppe 1 → Tag 14  
Gruppe 2 → Tag 28  
Gruppe 4 → Tag 42

p Gefäßanzahl (Gruppe 1 - 3) = 0,002  
p Gefäßanzahl (Gruppe 2 - 3) = 0,003



Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse der Metastasenauswertung und der Betrachtung der Vaskularisierung (Abbildung 39) konnten nach orthotoper Fragmentfixation - im Gegensatz zur orthotopen Zellinjektion, bei der nur am letzten Sektionstag Metastasen auftraten - zwei Zeitpunkte miteinander verglichen werden, an denen Metastasen nachgewiesen wurden: Tag 28 (Gruppe 2) und Tag 42 (Gruppe 3).



**Abbildung 39: Gegenüberstellung von Lungenmetastasen und Gefäßen am Primärtumor im Caecum in Bezug auf die Kriterien „Anzahl und Fläche“**

Die Metastasen wurden in HE-gefärbten Paraffinschnitten der Lunge mit Hilfe einer digitalen Bildbearbeitungssoftware gezählt und vermessen. Die Gefäße wurden mittels CD34-Färbung in Paraffinschnitten des Caecums markiert und anschließend digital ausgewertet.

Gruppe 2 → Sektion Tag 28    *Gesamtsumme*: Einzelergebnisse in jeder Gruppe wurden addiert  
 Gruppe 3 → Sektion Tag 42    *Durchschnitt*: Gesamtsumme dividiert durch Tieranzahl/Gruppe (n)

(Gruppe 1 wurde nicht mit aufgeführt, da in dieser Gruppe keine Metastasen vorhanden waren.)

Es fällt auf, dass Gefäßanzahl und –fläche mit der Dauer der Zeit abnahmen, Metastasenanzahl und –fläche jedoch anstiegen. Weiterhin konnte man feststellen, dass mit zunehmender Tumorgroße das Zentrum des Tumors vermehrt nekrotische Anteile aufwies und Gefäße nur noch im Randbereich vorhanden waren (siehe auch Abbildung 37, S.92).

#### **4.2.3.6 CEA**

Nachdem im Blut der Versuchstiere des ersten orthotopen Versuchs, der Zellinjektion in die Darmwand, CEA nachgewiesen werden konnte, wurde auch das Blut der Tiere des zweiten orthotopen Versuchs daraufhin untersucht. So gab es eine Vergleichsmöglichkeit zwischen beiden Techniken in Bezug auf die CEA-Sekretion.

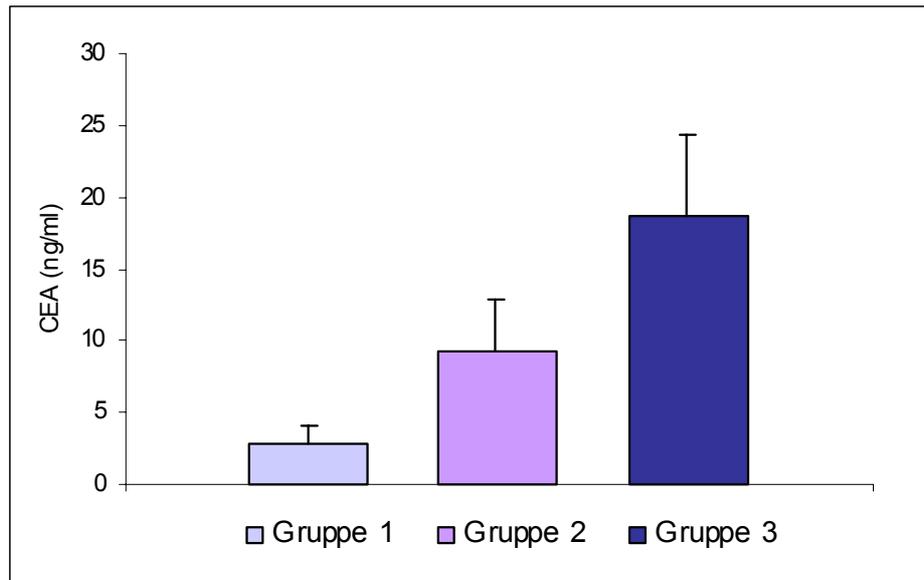
Allen Mäusen wurde kurz vor der Sektion Blut entnommen und wie unter 3.2.4 beschrieben auf ihren CEA-Gehalt analysiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 40 dargestellt. Die unterschiedliche Probenanzahl resultiert aus zwei Todesfällen in Gruppe 3 vor dem Sektionstermin und einer mißglückten Blutentnahme bei einem anderen Tier der gleichen Gruppe.

Der CEA-Gehalt stieg mit der Dauer des Versuches an, d.h. zum ersten Tötungszeitpunkt (Tag 14) lag der Mittelwert bei 2,853 ng CEA/ml Serum, zwei Woche später bei 9,287 ng CEA/ml Serum und am letzten Sektionstermin (Tag 42) schließlich bei 18,662 ng CEA/ml Serum. Diese Ergebnisse deckten sich mit der Beobachtung, dass der Tumor sein Volumen stetig vergrößert hatte.

Allerdings konnte keine gute Korrelation zwischen Tumolvolumen und CEA-Gehalt festgestellt werden. Die Gründe hierfür können sowohl in der nur ungenau möglichen Tumormessung als auch im verwendeten ELISA-Kit liegen.

Die Unterschiede waren mit  $p = 0,002$  bis  $p = 0,006$  statistisch hoch signifikant.



	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
<b>CEA Mittelwert (ng/ml)</b>	2.853	9.287	18.662
<b>STDEV</b>	1.222	3.635	5.611
<b>Probenanzahl</b>	8	8	5
<b>Sektionstag</b>	14	28	42

**Abbildung 40: CEA-Gehalt (ng/ml) von Serumproben nach orthotoper Fixation eines HT29-Tumorfragments**

Den weiblichen SCID-Mäuse wurde vor der Sektion unter Äthernarkose Blut durch Punktion des retrobulbären Venenplexus entnommen und mit einem CEA-ELISA-Kit (Alpha Diagnostics, USA) untersucht.

$p$  (Gruppe 1-2) = 0,005

$p$  (Gruppe 2-3) = 0,006

$p$  (Gruppe 1-3) = 0,002

Aufgeführt sind der mittlere CEA-Gehalt jeder Gruppe in ng/ml, sowie die positive Standardabweichung (STEDV), die Probenanzahl und der Sektionstag.

#### 4.2.4 Vergleich der in vivo-Versuche

Um einen besseren Überblick über die erhobenen Daten zu erlangen, gibt der folgende Abschnitt eine Zusammenfassung der drei untersuchten in-vivo-Modelle.

##### 4.2.4.1 Tumorwachstum

Bei subkutaner Zellinjektion lag die Anwachsrate bei 100 %, d.h. bei allen Versuchstieren war ein Primärtumor unter der Haut festzustellen. Der große Vorteil dieses Modells lag in der einfach durchzuführenden Tumormessung mittels eines elektronischen Messschiebers. Man konnte nach subkutaner Injektion von HT29-Zellen ein konzentrationsabhängiges Wachstumsverhalten der Tumoren beobachten. Die Tumoren der höchsten Zellkonzentration,  $6 \times 10^6$ , wuchsen am schnellsten und erreichten am Ende des Versuchs die größten Tumorumfänge; nach Injektion der niedrigsten eingesetzten Konzentration,  $1 \times 10^6$ , wuchsen die Tumoren am langsamsten und wiesen am letzten Versuchstag die kleinsten Volumina auf. Die mittlere Zellzahl,  $3 \times 10^6$ , ordnete sich in der Mitte zwischen diesen beiden Gruppen ein.

In den drei Gruppen, die HT29-GFP-Zellen subkutan appliziert bekommen hatten, war diese von der Zellzahl abhängige Einteilung nicht eindeutig vorzunehmen. Hier wuchsen zwar auch die Tumoren der geringsten Zellkonzentration am langsamsten, aber zwischen den Tumoren der mittleren und der höchsten Zellmenge gab es über die gesamte Versuchsdauer hinweg kaum einen Unterschied in den mittleren Volumina.

Bei den HT29-GFP-Tumoren traten im Versuchsverlauf vermehrt Tumoren mit großen nekrotischen Bereichen auf. 12 von 30 Mäusen mussten aus diesem Grund vorzeitig getötet werden. Inwiefern diese Beobachtung mit der Transfektion korreliert, bleibt fraglich. Auch in dem Umstand, dass HT29- und HT29-GFP-Zellen an zwei verschiedenen Tagen injiziert worden waren, und somit eventuell unterschiedliche Versuchsbedingungen vorlagen, könnte ein Grund für die Nekrotisierung zu finden sein.

Die orthotope Zellinjektion wies Anwachsrate von 80 bis 100 % auf, wobei sich nach mikroskopischer Untersuchung die Quote auf 90 bis 100 % erhöhte. Die in der Caecumwand wachsenden Tumoren waren sehr klein und dadurch war bei der Sektion makroskopisch nicht in jedem Fall eindeutig zu bestimmen, ob es sich wirklich um einen Tumor handelte oder nicht. Ein Nachteil dieses Modells war, bedingt durch das infiltrative Wachstum und eben die geringe Größe des Tumors, dass eine Messung des Tumorumfanges unmöglich war. Auch eine Gewichtsbestimmung durch Wiegen des Caecums inklusive Tumor schied aus, da schon gesunde Caeca sehr stark in ihrem Gewicht variierten.

Im Gegensatz zu den kleinen, flachen Tumoren, die nach orthotoper Zellinjektion wuchsen, fand man bei der orthotopen Fixation eines HT29-Tumorfragments am Ende deutlich sichtbare, größere Tumoren vor. Obwohl sie auch infiltrativ wuchsen, ließ sich ihr Volumen näherungsweise mit einer Schublehre bestimmen.

Das durchschnittliche Tumolvolumen betrug nach 14 Tagen (Gruppe 1) 92,9 mm<sup>3</sup>, nach 28 Tagen (Gruppe 2) 298,0 mm<sup>3</sup> und nach 42 Tagen (Gruppe 3) 502,3 mm<sup>3</sup>. Die angenäherten Tumorstücke hatten also kontinuierlich ihr Volumen vergrößert. Die festgestellten Unterschiede an den drei Tötungszeitpunkten sind statistisch signifikant mit p-Werten zwischen < 0,001 und 0,043. Die Anwachsrate lag in diesem Modell bei 100 %.

MODELL	ANWACHSRATE					
	Zellen	Sektions- Tag	makroskopisch		mikroskopisch	
absolut			relativ (%)	absolut	relativ (%)	
<b>SUBKUTANE ZELLINJEKTION</b>						
alle 6 Gruppen	1/ 3/ 6 x 10 <sup>6</sup> HT29 + HT29-GFP	(26-) 41	je Gruppe 10/10	100	je Gruppe 10/10	100
<b>ORTHOTOPE ZELLINJEKTION</b>						
1	1 x 10 <sup>6</sup> HT29	13	8/8	100	8/8	100
2		28	8(-10)/10	80 - (100)	10/10	100
3		55	9/9	100	9/9	100
4	1 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP	12	9/10	90	9/10	90
5		27	8(-10)/10	80 - (100)	10/10	100
6		54	9/10	90	9/10	90
<b>ORTHOTOPE FRAGMENTFIXATION</b>						
1	1 HT29-Tumor-Fragment	14	8/8	100	8/8	100
2		28	8/8	100	8/8	100
3		42	7/7	100	7/7	100

**Tabelle 13:** Anwachsrate nach subkutaner Zellinjektion, orthotoper Zellinjektion und orthotoper Fragmentfixation in weiblichen SCID-Mäusen im Vergleich

#### 4.2.4.2 Körpergewicht

Einen Überblick über die Gewichtsentwicklung in den drei in-vivo-Modellen gibt Tabelle 14 (siehe S. 101).

Nach subkutaner Zellinjektion blieb das Durchschnittsgewicht der Versuchsgruppen über die gesamte Versuchsdauer nahezu konstant. Das Gewicht am Versuchsende lag im Bereich des Ausgangsgewichtes. In Gruppe 4 ( $1 \times 10^6$  HT29-GFP) stellte man an Tag 31 einen Anstieg fest, der aber zusammen mit der Tatsache gesehen werden muss, dass an diesem Tag acht Mäuse aufgrund von Tumoren mit großflächigen Nekrosebezirken getötet werden mussten. Auch der leichte Rückgang im Gewichtschnitt der Gruppen 5 ( $3 \times 10^6$  HT29-GFP) und 6 ( $6 \times 10^6$  HT29-GFP) ist vor dem Hintergrund zu betrachten, dass auch hier insgesamt vier Tiere vorzeitig aus dem Versuch ausschieden. Es bleibt festzuhalten, dass kein Tier aufgrund übermäßigen Gewichtsverlustes die Abbruchkriterien erfüllte und somit vorzeitig getötet werden musste.

Vergleicht man den ersten orthotopen Ansatz (intracaecale Zellinjektion) mit dem ektopen Modell, so kann man einige Unterschiede feststellen. Als erstes fällt auf, dass die Tiere in den ersten drei Tagen nach der Laparotomie abnahmen. Dieser Gewichtsverlust ist vermutlich auf den Operationsstress zurückzuführen. Die Mäuse erholten sich aber schnell und gewannen im weiteren Versuchsablauf wieder an Gewicht. Es folgte eine Phase in der das mittlere Gewicht jeder Gruppe nahezu konstant blieb. Die letzten beiden Gruppen des Versuchs verloren dann ab Tag 35 bis zum Versuchsende stetig an Gewicht.

Ähnlich wie bei der orthotopen Zellinjektion, kam es auch bei der orthotopen Fragmentfixation zu einem Körpergewichtsabfall in den ersten 4 Tagen nach der Operation. Die Mäuse nahmen im weiteren Verlauf stetig an Gewicht zu. Zwischen Tag 21 und 24 erreichten die noch im Versuch befindlichen Gruppen 2 und 3 ihr Gewichtsmaximum. Nach diesem Zeitpunkt sank das durchschnittliche Körpergewicht stetig bis zum Versuchsende.

Die Gewichtsverluste in der Endphase beider orthotopen Versuche liegen in der mit zunehmender Versuchsdauer größer werdenden Belastung durch den wachsenden Primärtumor und die sich entwickelnden Metastasen begründet.

In der humanen Onkologie sind ähnliche Effekte auch bei Darmkrebspatienten unter dem Begriff „Tumorkachexie“ bekannt.

SUBKUTANE ZELLINJEKTION										
Gruppe	Zellen	Gewicht (g) bei 1. Messung	Gewicht (g) am Sektionstag		Unterschied Anfangsgewicht / Endgewicht	Minimalgewicht (g)	Maximalgewicht (g)			
			Tag	Tag			Tag	Tag		
1	1 x 10 <sup>6</sup> HT29	21.0	4	20.9	41	- 0.5 %	20.9	41	22.1	15, 22
2	3 x 10 <sup>6</sup> HT29	19.3		19.6		+ 1.5 %	19.3	4	20.4	26
3	6 x 10 <sup>6</sup> HT29	20.9		20.7		- 0.9 %	20.3	35	21.5	26, 29
4	1 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP	19.3	3	20.9	41	+ 7.7 %	19.3	3, 11	20.5	25
5	3 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP	19.2		17.9		- 7.3 %	17.9	38, 41	19.8	17, 21
6	6 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP	18.9		18.4		- 2.7 %	18.4	41	19.7	25

ORTHO TOPE ZELLINJEKTION										
Gruppe	Zellen	Gewicht (g) bei 1. Messung	Gewicht (g) am Sektionstag		Unterschied Anfangsgewicht / Endgewicht	Minimalgewicht (g)	Maximalgewicht (g)			
			Tag	Tag			Tag	Tag		
1	1 x 10 <sup>6</sup> HT29	21.5	0	22.2	13	+ 3.2 %	20.4	3	22.2	13
2		20.6		20.9	28	+ 1.4 %	19.9	3	21.4	17, 20, 23
3		21.3		17.9	55	- 19.0 %	17.9	55	22.9	31
4	1 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP	22.1	0	21.4	12	- 3.3 %	20.4	2	22.1	0
5		21.7		21.5	27	- 0.9 %	20.6	2, 5	21.8	22
6		21.3		18.2	54	- 17.0 %	18.2	54	22.0	33

ORTHO TOPE FRAGMENTFIXATION										
Gruppe	Zellen	Gewicht (g) bei 1. Messung	Gewicht (g) am Sektionstag		Unterschied Anfangsgewicht / Endgewicht	Minimalgewicht (g)	Maximalgewicht (g)			
			Tag	Tag			Tag	Tag		
1	1 HT29-Tumorfragment	20.2	1	20.6	14	+ 1.9 %	19.0	4	20.6	14
2		20.1		20.3	28	+ 1.0 %	18.6	4	21.1	21
3		19.3		18.1	42	- 6.6 %	18.1	42	20.7	24

**Tabelle 14: Körpergewicht nach subkutaner & orthotoper Zellinjektion und orthotoper Fragmentfixation in weiblichen SCID-Mäusen**

Angegeben ist das mittlere Körpergewicht in Gramm (g) und der Versuchstag, an dem die Messung erfolgte.

#### 4.2.4.3 *Metastasierung*

Neben dem Primärtumorwachstum entscheidet u.a. auch das Metastasierungsverhalten über die Eignung eines Tiermodells zur Prüfung neuer Wirkstoffe.

In allen drei untersuchten Modellen wurden Lungenmetastasen diagnostiziert. Allerdings gab es große Unterschiede in Anzahl, Größe und zeitlichem Auftreten dieser Tochtergeschwülste (Tabelle 15, S. 103 und Abbildung 41, S. 104).

Die subkutane Zellinjektion lieferte eine sehr geringe Metastasenanzahl. So reichten die durchschnittlichen Werte von 0,8 bis 2,6 Metastasen pro Tier pro Gruppe. Außerdem gab es auf der einen Seite Gruppe 4, in der nur ein Tier von 10 Tieren Metastasen aufwies, auf der anderen Seite gab es Gruppe 5, in der bei 7 von 10 Tieren Metastasen festgestellt wurden. Dieses Ergebnis bietet sich nicht für eine statistische Erhebung an. Würde man eine Substanz prüfen wollen, bei der ein hemmender Einfluss auf Metastasen untersucht werden soll, so eignet sich dieses Modell nicht. Auftretende Effekte könnten nicht statistisch abgesichert werden.

Die niedrige Metastasenanzahl in diesem subkutanen Modell zeigt schon das Hauptproblem der meisten ektopen Tumormodelle auf. Es entwickeln sich oft sehr wenige Metastasen. Oft bilden die Tumoren unter der Haut eine Kapsel aus, die eine Verbreitung von Tumorzellen weitestgehend verhindert. Zudem unterscheidet sich das Unterhautgewebe vom Herkunftsort der Zellen, in diesem Fall des Darms.

Bei der orthotopen Zellinjektion fand man in Gruppe 3 (HT29, Sektion Tag 55) eine mittlere Metastasenanzahl von 37,4 die sich gut für die histologische Auswertung eignete. Zudem hatten 9 von 9 Tieren dieser Gruppe Metastasen. In der vergleichbaren GFP-Gruppe, Gruppe 6, traten nur bei 50 % der Tiere Lungenmetastasen auf. Die durchschnittliche Anzahl lag bei 7,8 Metastasen pro Tier und war somit deutlich niedriger als in der HT29-Gruppe. Alle Tiere, die vor Tag 54/55 getötet worden waren, wiesen keine Lungenmetastasen auf.

Die GFP-Zellen zeigten also im Vergleich mit den Wildtyp-Zellen deutliche Unterschiede im Metastasierungsverhalten.

Im Gegensatz zur orthotopen Zellapplikation entstanden nach orthotoper Fixierung eines HT29-Tumorfragments nur wenige Lungenmetastasen. Die erste Gruppe, die nach 14 Tagen seziiert wurde, entwickelte keine Metastasen. Nach 28 Tagen stellte man in Gruppe 2 durchschnittlich 0,9 Metastasen fest; nach 42 Tagen lag der Mittelwert von Gruppe 3 bei 9,1 Metastasen pro Tier.

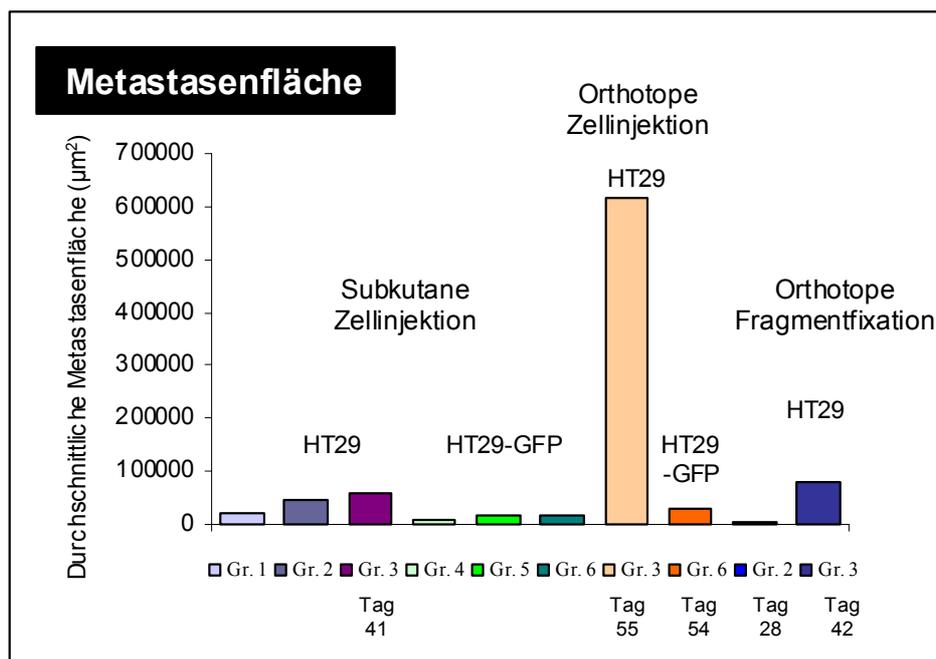
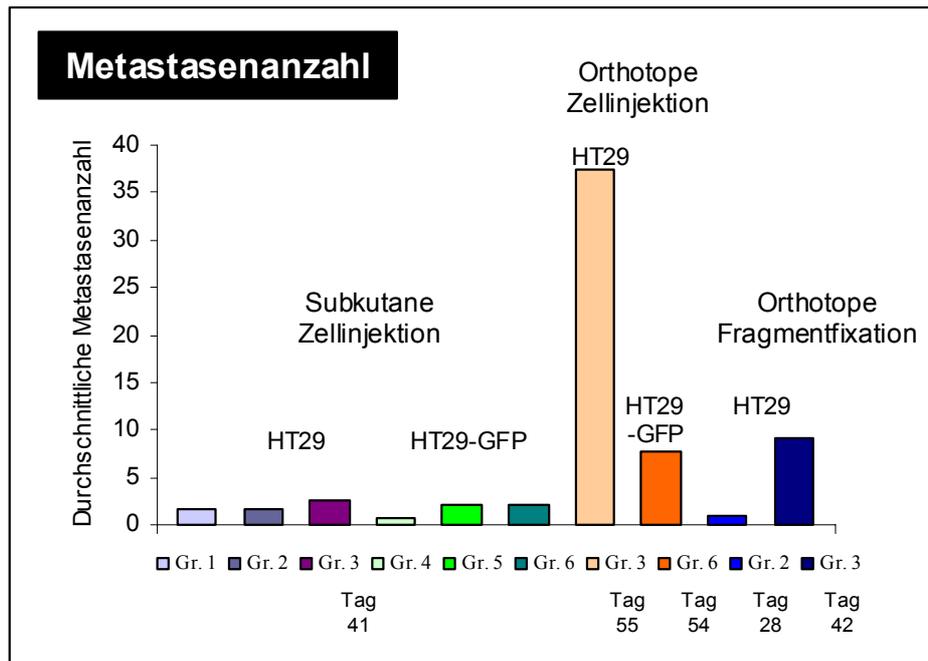
Im Vergleich beider orthotopen Modelle stellte man zwei große Unterschiede fest. Zum einen lag die Metastasenanzahl nach Zellinjektion um ein 4faches höher als nach Fragmentfixation, zum anderen traten nach dem Annähen eines Tumorfragments zwei Wochen früher Lungenmetastasen auf als nach orthotoper Zellinjektion.

Gruppe	Zellen	Sektions-Tag	Tiere mit Metastasen	Durchschnittliche Anzahl Metastasen	Durchschnittliche Fläche Metastasen ( $\mu\text{m}^2$ )
<b>SUBKUTANE ZELLINJEKTION</b>					
1	$1 \times 10^6$ HT29	41	2/10	1.6	20164
2	$3 \times 10^6$ HT29	41	6/10	1.7	44793
3	$6 \times 10^6$ HT29	(26-) 41	3/10	2.6	59899
4	$1 \times 10^6$ HT29-GFP	(31-) 41	1/10	0.8	7993
5	$3 \times 10^6$ HT29-GFP	(38-) 41	7/10	2.2	42276
6	$6 \times 10^6$ HT29-GFP	(31-) 41	4/10	2.1	17092
<b>ORTHOTOPE ZELLINJEKTION</b>					
1	$1 \times 10^6$ HT29	13	0/8	0	0
2		28	0/10	0	0
3		55	9/9	37.4	614679
4	$1 \times 10^6$ HT29-GFP	12	0/0	0	0
5		27	0/0	0	0
6		54	5/10	7.8	30627
<b>ORTHOTOPE FRAGMENTFIXATION</b>					
1	1 HT29-Tumor-Fragment	14	0/8	0	0
2		28	3/8	0.9	3217
3		42	7/7	9.1	78842

**Tabelle 15: Metastasenanzahl und Metastasenfläche in HE-gefärbten Paraffinschnitten der Lunge nach subkutaner Zellinjektion, orthotoper Zellinjektion und orthotoper Fragmentfixation in weiblichen SCID-Mäusen im Vergleich**

Die Lungen der Versuchstiere wurden mindestens 24 h in 3,8%igem Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und in 3 Ebenen mit je 80  $\mu\text{m}$  Abstand geschnitten. Anschließend wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte digital mit Hilfe der Software „Image Pro 4.0“.

So wurden Anzahl und Fläche (in  $\mu\text{m}^2$ ) der Metastasen bestimmt.



**Abbildung 41: Durchschnittliche Anzahl und Fläche von Lungenmetastasen nach subkutaner & orthotoper Zellinjektion sowie orthotoper Fragmentfixation**

Die Lungen wurden in 3,8%igem Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und Serienschnitte mit 3 Ebenen und je 80 µm Abstand hergestellt. Es folgte eine HE-Färbung, die anschließend mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware ausgewertet wurde.

#### 4.2.4.4 Vaskularisierung

Um die Vaskularisierung des Primärtumors im Caecum zu untersuchen, wurden Paraffinschnitte des Caecums inklusive Tumor angefertigt und einer CD34-Färbung (siehe 3.2.3.4) unterzogen und anschließend digital bezüglich Anzahl und Fläche der markierten Gefäße ausgewertet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Gruppe	Zellen	Sektions-Tag	Tiere mit Metastasen	Durchschnittliche Anzahl Gefäße	Durchschnittliche Fläche Gefäße (Pixel)
<b>ORTHOTOPE ZELLINJEKTION</b>					
3	1 x 10 <sup>6</sup> HT29	55	9/9	3978.4	31207
6	1 x 10 <sup>6</sup> HT29-GFP	54	5/10	554.1	7965
<b>ORTHOTOPE FRAGMENTFIXATION</b>					
1	1 HT29-Tumor-Fragment	14	0/0	1149.1	20473
2		28	3/8	969.4	20493
3		42	7/7	517.9	14158

**Tabelle 16: Vaskularisierung orthotop wachsender Tumoren bei weiblichen SCID-Mäusen nach orthotoper Zellinjektion und orthotoper Fragmentfixation im Vergleich**

Es wurden Paraffinschnitte von den Primärtumoren hergestellt, mit einem CD34-Antikörper immunhistochemisch behandelt (siehe 3.2.3.4) und anschließend mit einer Bildbearbeitungssoftware digital ausgewertet. Als Ergebnis erhielt man Anzahl und Fläche (in Pixel) der markierten Gefäße. In dieser Tabelle sind die Durchschnittswerte für jede Gruppe dargestellt.

Fläche: p (Zellinjektion Gr. 3-6) = 0,003

Anzahl: p (Fragment Gr. 1-3) = 0,002

p (Fragment Gr. 2-3) = 0,006

p (Zellinjektion Gr. 3-6) = 0,002

p (Fragment Gr. 3 - Zellinjektion Gr.3) = 0,003

Im ersten orthotopen Versuch, der Zellinjektion, wurden nur die beiden letzten Gruppen (Gruppe 3 und Gruppe 6) bezüglich ihrer Vaskularisierung untersucht, da in den ersten vier Gruppen die Tumoren zu klein waren, um jeweils vier digitale Aufnahmen im Paraffinschnitt machen zu können. Deshalb konnten hier zwar keine verschiedenen Zeitpunkte miteinander verglichen werden, der Vergleich zwischen HT29-Wildtyp- und GFP-transfizierten Zellen war jedoch möglich.

Zwischen der letzten HT29- und HT29-GFP-Gruppe konnten sowohl Unterschiede der Gefäßanzahl, als auch der Gefäßfläche festgestellt werden. So betrug die mittlere Anzahl in der HT29-Gruppe (Gruppe 3) fast 4000 Gefäße und überstieg die durchschnittliche Anzahl der HT29-GFP-Gruppe (Gruppe 6) damit um das 7fache. Die durchschnittliche Fläche war in der GFP-Gruppe um den Faktor 3,9 niedriger als in der Wildtyp-Gruppe. Gründe für diese Unterschiede könnten in der Transfektion der Zellen mit dem GFP-Gen liegen. Schon in vitro deutet sich ein unterschiedliches Wachstum an, und außerdem wich das Ausmaß der Metastasierung voneinander ab.

Im zweiten orthotopen Experiment, der chirurgischen Fragmentfixation am Caecum, war es aufgrund der größeren Volumina der Tumoren möglich, alle drei Versuchsgruppen auszuwerten und somit drei Sektionszeitpunkte miteinander zu vergleichen.

Die durchschnittliche Gefäßanzahl nahm mit zunehmender Versuchsdauer ab. Der Tumor besaß also zu Beginn seines Wachstums eine große Anzahl an Gefäßen. Im weiteren Verlauf wurde das Zentrum des Tumors vermehrt nekrotisch; Gefäße fanden sich nur noch im Randbereich (vergleiche Abbildung 37, S. 92).

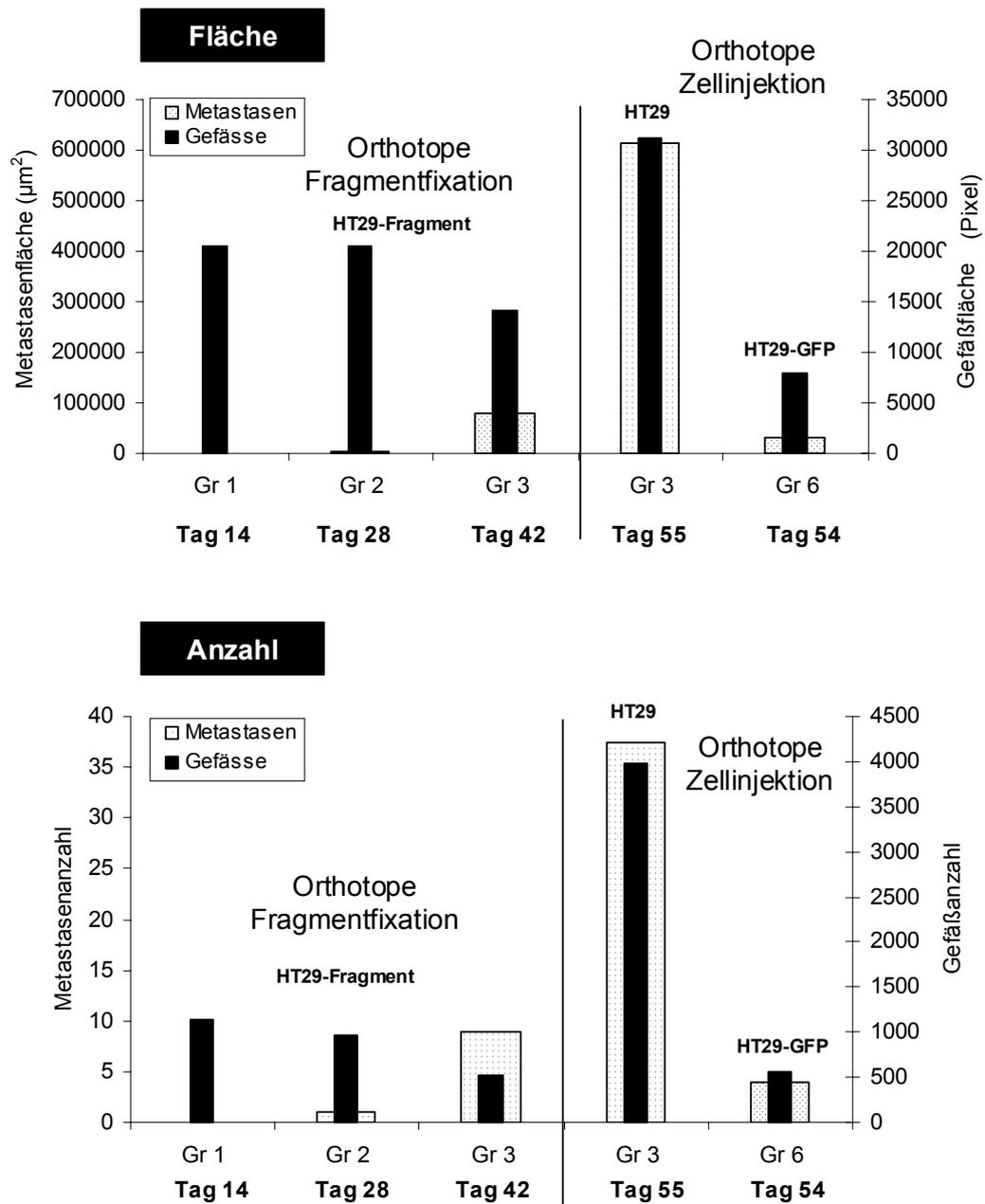
Vergleicht man die Vaskularisierung des Primärtumors in beiden orthotopen Versuchen miteinander, so stellt man sowohl in Anzahl als auch Fläche der Gefäße Unterschiede fest. Nach orthotoper Zellinjektion von HT29-Zellen (Gruppe 3) fand man im Durchschnitt 8mal mehr Gefäße als in der vergleichbaren Gruppe des Fragmentversuchs (Gruppe 3). Die markierten Gefäße nahmen eine mittlere Fläche von 31207 Pixel nach HT29-Injektion in die Darmwand ein, damit ist ihre Fläche mehr als doppelt so groß wie nach Fragmentfixation.

#### **4.2.4.5 Zusammenhang zwischen Metastasierung und Vaskularisierung**

Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse der Metastasenauswertung und der Vaskularisierung (Abbildung 42) kann man folgende Aussagen treffen:

Nach orthotoper Zellinjektion wurden nur die letzten beiden im Versuch befindlichen Gruppen (Gruppe 3 und 6) bezüglich ihrer Gefäßversorgung untersucht, da die Tumoren der ersten beiden Tötungszeitpunkte zu klein waren, um sie histologisch auswerten zu können. So konnte zum letzten Sektionszeitpunkt (Tag 54/55) eine Abhängigkeit zwischen Metastasen und Gefäßen festgestellt werden. Eine große Anzahl von Metastasen ging auch mit einer großen Gefäßanzahl einher. Ebenso verhielt es sich im Bezug auf deren Fläche.

Im zweiten orthotopen Experiment, der Fragmentfixation, konnte aufgrund größerer Tumorumfänge alle drei Gruppen untersucht werden. Die Ergebnisse geben also einen zeitlichen Verlauf der Gefäßneubildung von Tag 14 über Tag 28 bis hin zu Tag 42 wieder. Die Gefäßanzahl und -fläche nahmen mit fortschreitender Versuchsdauer ab, die Metastasenanzahl und -fläche stiegen jedoch an. Zu Beginn des Tumorwachstums wurden somit viele Gefäße neu gebildet. Im weiteren Verlauf wuchs der Tumor immer weiter, das Zentrum des Tumors wies große nekrotische Areale auf, und man fand nur noch einzelne Gefäße im Randbereich. Die Metastasen entwickelten sich gegenläufig, d.h. ihre Anzahl und Fläche nahm mit steigender Versuchsdauer zu. Einzelzellen mussten sich aus dem angenähten Tumorfragment zunächst lösen, um in die Blut- und/oder Lymphbahn zu gelangen und sich dann in der Lunge neu anzusiedeln und Metastasen auszubilden.



**Abbildung 42: Gegenüberstellung von Lungenmetastasen und Gefäßen am Primärtumor im Caecum in Bezug auf die Kriterien „Anzahl und Fläche“ nach orthotoper Fragmentfixation und orthotoper Zellinjektion.**

Dargestellt sind die Durchschnittswerte jeder Gruppe.

#### 4.2.4.6 **Fluoreszenz**

Nachdem die HT29-GFP-Zellen schon *in vitro* ihre grüne Fluoreszenz nicht ohne Selektionsmedium stabil exprimierten, konnte auch *in vivo* keine stabile Fluoreszenz festgestellt werden (vergleiche auch Abbildung 19, S. 57).

Im subkutanen Versuch waren nur noch vereinzelte grüne Punkte im Primärtumor zu entdecken.

In ersten orthotopen Experiment war die Autofluoreszenz des Darms so stark, dass die Tumoren unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht identifiziert werden konnten.

Eine verbesserte Fluoreszenz hätte man eventuell durch die Herstellung eines neuen HT29-GFP-Klons erreichen können, darauf wurde aber aus Zeitgründen verzichtet.

#### 4.2.4.7 **CEA**

In Blutproben aller Versuchstiere der beiden orthotopen Versuche wurde der CEA-Gehalt bestimmt (siehe 3.2.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 (S. 111) dargestellt.

Nach orthotoper Zellinjektion waren deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Tötungszeitpunkten abzulesen. Der CEA-Gehalt nahm mit der Dauer der Zeit zu; so lag der Mittelwert nach 12/13 Tagen in der HT29-Gruppe bei 0,640 ng CEA/ml Serum und in der GFP-Gruppe bei 0,129 ng CEA/ml Serum. Zwei Wochen später (Tag 27/28) wurden in beiden Zelllinien Werte um 1 ng/ml gemessen. Am letzten Sektionszeitpunkt (Tag 54/55) stiegen die CEA-Gehalte auf 7,802 (GFP) bzw. 11,683 ng/ml (Wildtyp) an. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Sektionstagen waren sowohl in den HT29-Gruppen als auch in den GFP-Gruppen signifikant ( $p$  zwischen  $< 0.001$  bis  $0,041$ ).

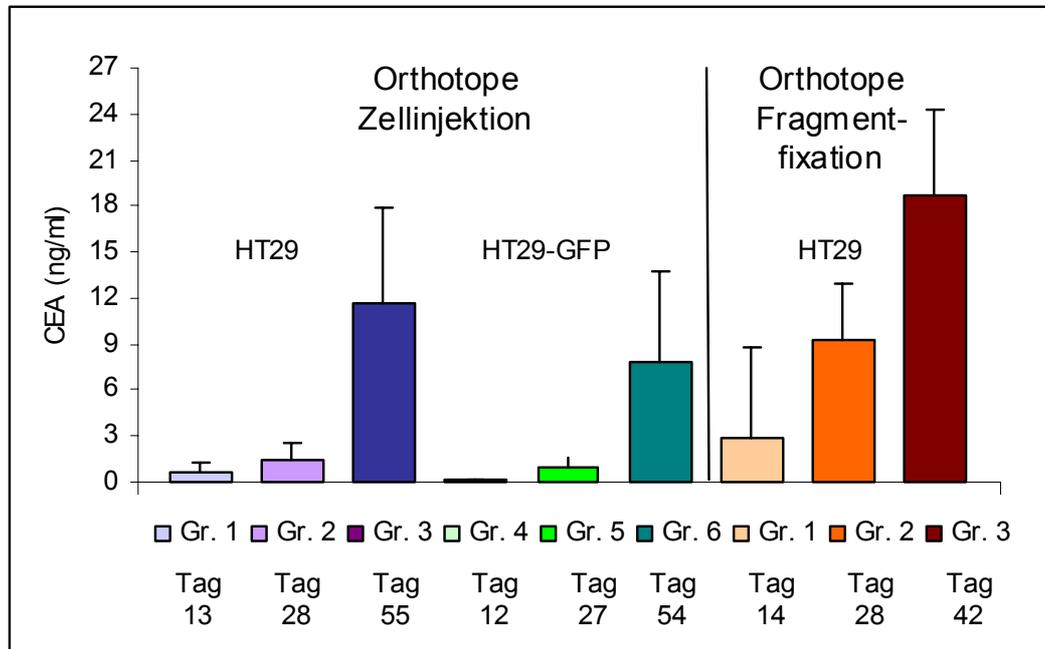
Eine ähnliche Entwicklung konnte nach orthotoper Fragmentfixation, nachgewiesen werden. Auch hier stieg der CEA-Gehalt mit zunehmender Versuchsdauer an, d.h. zum ersten Tötungszeitpunkt (Tag 14) lag der Mittelwert bei 2,853 ng CEA/ml Serum, zwei Woche später bei 9,287 ng CEA/ml Serum und am letzten Sektionstermin (Tag 42) schließlich bei 18,662 ng CEA/ml Serum.

Beim Vergleich beider Versuche fiel auf, dass die CEA-Gehalte nach Fragmentfixation deutlich höher lagen als nach Zellinjektion. Dabei sind die Unterschiede signifikant, bis auf den Vergleich zwischen Gruppe 3 (HT29-Zellen; Tag 55) aus dem Zellinjektionsversuch und Gruppe 3 aus dem Fragmentversuch (HT29-Fragment; Tag 42).

Gerade zu Beginn beider Versuche konnten erhebliche Unterschiede im CEA-Gehalt nachgewiesen werden. So lagen die CEA-Werte 12 bzw. 13 Tage nach Zellinjektion noch unter 1 ng CEA/ml Serum, wohingegen der Durchschnittswert nach Fragmentfixation bereits 2,853 ng CEA/ml Serum betrug.

In beiden untersuchten Experimenten konnte zum einen CEA im Serum der Versuchstiere nachgewiesen werden, zum anderen konnte gezeigt werden, dass der CEA-Gehalt mit steigender Versuchsdauer und somit mit zunehmender Tumorbelastung anstieg. Der direkte Vergleich zwischen Tumorgröße und CEA-Konzentration konnte im ersten orthotopen Versuch nicht durchgeführt werden, da die Primärtumoren infiltrativ wuchsen und deshalb nicht vermessen werden konnten.

Nach Fragmentfixation waren die Tumoren zwar größer, allerdings konnte hier keine gute Korrelation zwischen Tumolvolumen und CEA-Gehalt festgestellt werden. Die Gründe hierfür können sowohl in der nur ungenau möglichen Tumormessung als aber auch im verwendeten ELISA-Kit zu finden sein.



**Abbildung 43: CEA-Gehalt (ng/ml) in Blutproben von weiblichen SCID-Mäusen nach orthotoper Zellinjektion und orthotoper Fragmentfixation**

Vor der Sektion wurden unter Äthernarkose Blutproben durch Punktion des retrobulbären Venenplexus gewonnen und anschließend mit dem CEA-ELISA-Kit der Firma Alpha Diagnostic International (USA) untersucht.

Dargestellt sind die durchschnittlichen CEA-Gehalte in ng/ml jeder Gruppe.

Zellinjektion: p (Gruppe 1-2) = 0,041      Fragmentfixation: p (Gruppe 1-2) = 0,005  
 p (Gruppe 2-3) < 0,001                      p (Gruppe 2-3) = 0,006  
 p (Gruppe 1-3) < 0,001                      p (Gruppe 1-3) = 0,002  
 p (Gruppe 4-5) = 0,001  
 p (Gruppe 5-6) = 0,002  
 p (Gruppe 4-6) < 0,001

Zellinjektion Gr.1 – Fragment Gr.1 = 0,001  
 Zellinjektion Gr.2 – Fragment Gr.2 = 0,001  
 Zellinjektion Gr.3 – Fragment Gr.3 = 0,073

Zellinjektion Gr.4 - Fragment Gr.1 < 0,001  
 Zellinjektion Gr.5 - Fragment Gr.2 < 0,001  
 Zellinjektion Gr.6 - Fragment Gr.3 = 0,016

## 5. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 vergleichend untersucht und charakterisiert. Für die Ergebnisse stehen verschiedene Parameter zur Verfügung.

Die **Anwachsrate** (engl. „take rate“) ist ein wichtiges Kriterium für Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit eines Tiermodells.

Nach *subkutaner Zellinjektion* entwickelten alle Tiere einen messbaren Tumor, so dass die Erfolgsrate bei 100 % lag. Dies deckt sich auch mit Zahlen anderer Autoren, die u.a. die humanen Kolonkarzinomzelllinien KM12C und KM12SM (Ogata *et al.*, 1998) sowie HT29 (Jojovic *et al.*, 2000) subkutan injizierten.

Nach *orthotoper Zellinjektion* konnte bei 90 – 100 % der Mäuse, je nach Gruppe, ein Tumor in der Caecumwand diagnostiziert werden. Insgesamt zeigten 55 von 57 Versuchstieren ein lokales Tumorstadium. Dies ist ein hoher Prozentsatz, verglichen mit den Untersuchungen von Garcia-Olmo *et al.*, die nach intracaecaler Zellinjektion Anwachsrate zwischen 50 und 83 % erzielen konnten (Garcia-Olmo *et al.*, 1998). Auch bei Yang *et al.* lag die Erfolgsquote nicht höher. Hier entwickelte sich nach orthotoper Injektion von verschiedenen humanen Kolonkarzinomzelllinien (HCT116-, KM12SM-, LIM1215- und SW480-Zellen) bei 78 % der Tiere ein caecaler Tumor (Yang *et al.*, 1997).

Die Anwachsrate nach *orthotoper Fixation* eines HT29-Tumorfragments lag bei 100 %, d.h. alle 23 Tiere wiesen bei der Sektion einen caecalen Tumor auf. Andere Autoren berichten von ähnlichen Erfolgsquoten. So konnte mit subkutan passagierten Fragmenten der Zelllinien Co-3, Col-3-JCK und Col-5-JCK ebenfalls in 100 % der Fälle (25/25) ein lokales Wachstum beobachtet werden (Kubota, 1994). Wurde Tumormaterial eingesetzt, das aus humanen Patienten entnommen worden waren, variierte der Erfolg zwischen 10 % (Cui *et al.*, 1998) und 100 % (Kuo *et al.*, 1995). Ursachen für diese große Varianz können unterschiedliche Auswahl, Aufbereitung oder Aufbewahrung des humanen Tumormaterials sein.

Das **Tumorstadium** ließ sich im *ektopen Modell* einfach verfolgen. Hierzu wurde ein elektronischer Messschieber benutzt, mit dem zweimal pro Woche die Tumoren vermessen wurden. Die subkutanen Tumoren zeigten ein konzentrationsabhängiges Wachstum, d.h. die niedrigste Zellkonzentration entwickelte sich am langsamsten zu einem Tumor und wies am Versuchsende die kleinsten Tumorstadien auf. Die höchste Zellkonzentration führte zu den größten Tumoren am Ende des Experiments.

Im *orthotopen Kolonkarzinommodell* war die Messung des Primärtumors während des Versuchsverlaufs nur schwer möglich. Der Einsatz eines Messschiebers schied aus, da die im Abdomen wachsenden Tumoren *intra vitam* durch ihre Lage nicht direkt zugänglich waren.

Durch den Einsatz bildgebender Verfahren (Ultraschall, Röntgen) hätte man einen nicht-invasiven Messversuch unternehmen können, diese Methoden standen jedoch nicht zur Verfügung. So wurde das Versuchsdesign diesen Schwierigkeiten angepasst, d.h. es wurden drei unterschiedliche Tötungszeitpunkte festgelegt, um dadurch den zeitlichen Wachstumsverlauf der orthotopen Tumoren dokumentieren zu können.

In anderen Arbeitsgruppen gab es unterschiedliche Vorgehensweisen bezüglich der **Messung orthotoper Primärtumoren** im Abdomen: Die einen trafen am Tag der Sektion lediglich eine qualitative Aussage (Tumor vorhanden: ja/nein) (Rashidi *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 1999), die anderen lösten den Tumor bei der Sektion komplett vom Caecum ab und bestimmten sein Gewicht durch Wiegen (Furukawa *et al.*, 1993b). Letzteres war in dieser Arbeit nicht möglich, da die Tumoren hinsichtlich ihre Invasivität histologisch untersucht werden sollten und deshalb am Caecum verbleiben mussten.

Eine weitere Methode besteht darin, den Tumor durch die intakte Bauchwand hindurch mit Hilfe eines Messschiebers zu messen (Rho *et al.*, 1999). In dem selbst durchgeführten orthotopen Fragment-Experiment konnte man zwar eine Tumormasse im Abdomen ertasten, eine Messung wäre jedoch zu ungenau gewesen. Außerdem kann man sich nicht sicher sein, wirklich einen Tumor zu vermessen und nicht etwa andere Strukturen wie zum Beispiel eine feste Kotanschoppung oder Umfangsvermehrungen aufgrund Überempfindlichkeit/Unverträglichkeit gegenüber dem Nahtmaterial.

Auch der Ansatz, das Caecum inklusive Tumor zu wiegen und anschließend das mittlere Gewicht gesunder Caeca zu subtrahieren, um das Tumorgewicht zu erhalten, musste verworfen werden. Die Gewichte gesunder Blinddärme von Mäusen anderer beendeter Versuche variierten zu stark, um eine verlässliche Aussage treffen zu können.

In neuesten Publikationen konnte gezeigt werden, wie mit Hilfe GFP-transfizierter Tumorzellen sowohl abdominale Tumoren als auch Metastasen in unterschiedlichen Organen qualitativ und quantitativ dokumentiert wurden (Bouvet *et al.*, 2002).

Die meisten Autoren begnügten sich jedoch entweder mit qualitativen Aussagen oder machten keine genauen Angaben über ihre Messmethode.

Nach *intracaecaler Zellinjektion* entstanden nur sehr kleine, nach außen flache und zugleich invasiv in das Darmlumen wachsende Tumoren. Hier konnte keine Bestimmung der Tumorgöße durchgeführt werden.

Nach der *Fixation eines Tumorfragments* wuchsen die Tumoren zwar auch invasiv, jedoch gleichzeitig dreidimensional und durch das höhere Anfangsvolumen auch insgesamt deutlich größer. Es wurde eine Volumenmessung mittels Messschieber durchgeführt.

Die Ergebnisse dürfen jedoch nur als Anhaltspunkt für die tatsächliche Tumorgroße gesehen werden, da sich ein Teil des Tumors durch sein invasives Wachstum einer exakten Messung entzog.

Der **Körpergewichtsverlauf** der Versuchstiere gibt in jedem Modell wichtige Hinweise auf den Gesundheitszustand der Tiere und dient somit auch als Abbruchkriterium.

Nach *subkutaner Zellinjektion* traten nur geringe Gewichtsschwankungen auf. So lagen die Unterschiede zwischen mittlerem Gewicht zu Versuchsbeginn und Versuchsende zwischen - 7,3 % und + 7,7 %. Dies kann als Indiz dafür gelten, dass die subkutan wachsenden Tumoren die Tiere nicht in ihrem Allgemeinbefinden stören.

Sowohl nach *orthotoper Zellinjektion* als auch nach *orthotoper Fragmentfixation* nahmen die Versuchstiere in den ersten 3 - 4 Tagen nach der Operation an Gewicht ab. Im letzten Versuchsdrittel kam es in beiden orthotopen Modellen zu starken Gewichtsverlusten zwischen 6,6 % und 19 %. Diese Beobachtung deckt sich mit Untersuchungen von Funahashi *et al.* (1999) die nach orthotoper Transplantation von Kolonkarzinomfragmenten den Versuch zwischen Tag 28 und Tag 32 beenden mussten, da die Mäuse eine Kachexie entwickelten.

Das Phänomen der Kachexie ist bei Menschen mit Tumorerkrankungen ein großes Problem. Es ist ein multifaktorielles Geschehen, das zum einen mit einer verringerten Nahrungsaufnahme und zum anderen mit pathologischen Abläufen im metabolischen Stoffwechsel zusammenhängt. Viele unterschiedliche Mediatoren wie Zytokine, Hormone und tumorspezifische Faktoren sind daran beteiligt, allerdings sind die direkten Zusammenhänge bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Fearon & Moses, 2002; Strain, 1979).

Neben diesen Ursachen muss man in den orthotopen Darmkrebsmodellen auch die Möglichkeit einer verringerten Motilität durch Kompression anderer Darmabschnitte durch den im Caecum wachsenden Tumor oder durch Verwachsungen mit anderen Darmanteilen bzw. mit der Bauchwand in Betracht ziehen. So starben in einem syngenem, orthotopen Kolonkrebsmodell 40 % der Tiere vor Versuchsende aufgrund von intestinalen Obstruktionen (Tan *et al.*, 1977).

Andere Autoren berichten von ähnlichen Fällen nach orthotoper Fixation von humanem Tumormaterial im Darm von Nacktmäusen (Fu *et al.*, 1991).

Neben dem Wachstum des Primärtumors entscheidet die **Metastasierung** über die Eignung eines Tiermodells für die onkologische Wirkstoffprüfung. Grund dafür ist die Tatsache, dass immer weniger Patienten an den Folgen des Primärtumors sterben, da dieser in vielen Fällen chirurgisch entfernt werden kann, sondern an dessen Metastasen (Chambers *et al.*, 2002). Zum Zeitpunkt der Entdeckung eines Primärherdes sind bei vielen Patienten bereits Metastasen in anderen Organen vorhanden (Fidler & Balch, 1987). Deshalb ist die Metastasierung in den letzten Jahren vermehrt in den Mittelpunkt der Forschung gerückt.

Nach *subkutaner Zellinjektion* konnten nur wenige Metastasen in der Lunge der Versuchstiere entdeckt werden. So lag die durchschnittliche Anzahl unter 3 Metastasen pro Tier. Zudem zeigten lediglich 23 der 60 Mäuse Tochtergeschwülste, was einem Anteil von 38 % entspricht.

Einige Autoren berichten ebenfalls von Lungenmetastasen nach subkutaner Injektion von unterschiedlichen Tumorzelllinien (T24B, MDA-MB-435-BAG) in SCID-Mäusen (Xie *et al.*, 1992). Auch nach HT29-Applikation konnten Metastasen in der Lunge festgestellt werden (Mitchell *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 1996). Gleiches wurde in einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, die zudem noch untersuchten, dass unterhalb eines Primärtumorgewichts von 1,25 g nur einige wenige Metastasen in der Lunge auftraten, wohingegen über dieser als „kritisch“ bezeichneten Tumormasse ein 10facher Anstieg der mittleren Metastasenanzahl auftrat (Jojovic & Schumacher, 2000). Auch in Nacktmäusen metastasierten subkutan injizierte HT29-Zellen in die Lunge. Allerdings wiesen nur 12 % der Versuchstiere Metastasen auf (Kozlowski *et al.*, 1984).

Die meisten Publikationen kommen jedoch zu dem Schluss, dass sich nach subkutaner Injektion nur äußerst wenige oder gar keine Metastasen entwickeln. Als Ursache dafür wird u.a. angeführt, dass subkutane Tumoren meist expansiv und lokal abgegrenzt wachsen. Zudem ist ihre Versorgung durch Blutgefäße meist schlecht ausgebildet, so dass Tumorzellen weniger Möglichkeiten haben, in den Blutkreislauf zu gelangen und sich als Metastasen in anderen Organen anzusiedeln (Sordat & Wang, 1984). Fidler (1991b) spricht sogar von einer dichten Kapsel, die sich um den Tumor unter der Haut bildet. Ohne Invasion dieser Kapsel können keine Metastasen aus diesen Tumoren hervorgehen.

Auch Paget's „Seed-und-Soil-Theorie“ trägt zur Erklärung bei (Paget, 1889). Die Unterhaut stellt keine geeigneten Umweltbedingungen für die Darmkarzinomzellen dar. Untersuchungen von Togo *et al.* (1995) bestätigen dies. Fragmente einer Lungenmetastase eines Kolonkarzinompatienten wurden in Lunge, Kolon und Subkutis von Nacktmäusen implantiert. Ein Wachstum konnte jedoch nur in der Lunge beobachtet werden.

Nach *orthotoper Zellinjektion* wurden in den Gruppen, die als letztes im Versuch verblieben waren (Tag 54/55), Lungenmetastasen festgestellt. Tiere, die vor diesem Zeitpunkt getötet wurden, waren frei von Metastasen.

In der HT29-Gruppe lag die mittlere Metastasenanzahl bei 37, in der HT29-GFP-Gruppe bei knapp 8. In der HT29-Gruppe zeigten 100 % der Mäuse Metastasen in der Lunge, während es in der GFP-Gruppe nur 50 % der Tiere waren. Diese signifikanten Unterschiede in Metastasen- und Tieranzahl weisen auf eine Veränderung der Zellcharakteristika durch die Transfektion mit GFP hin. Bereits *in vitro* waren unterschiedliche Verdopplungs- und Generationszeiten festgestellt worden.

Nach *orthotoper Fixierung* eines HT29-Tumorfragments lag die mittlere Metastasenanzahl um den Faktor 4 niedriger als nach Zellinjektion. Ein weiterer Unterschied bestand darin, dass hier früher Lungenmetastasen festgestellt werden konnten. So wurden nach 28 Tagen durchschnittlich knapp 1 Metastase; nach 42 Tagen durchschnittlich 9 Metastasen in den Lungen der Versuchstiere diagnostiziert.

In Publikationen gibt es sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der **Metastasenanzahl** nach orthotoper Zellinjektion bzw. nach orthotoper Fragment-Transplantation. So fanden Furukawa *et al.* (1993c) und Kubota (1994) nach orthotoper Implantation intakter Tumorfragmente in Nacktmäusen Metastasen in verschiedenen Lokalisationen (Lymphknoten, Peritoneum, Leber, Lunge); nach orthotoper Zellinjektion konnten jedoch bei keinem Tier Metastasen entdeckt werden. Ihrer Meinung nach ist der Grund dafür, dass dissoziierten Tumorzellen normale Zell-Zell-Interaktionen fehlen, die den Prozess der Metastasierung ermöglichen.

Andere Autoren berichten auch nach orthotoper Zellinjektion von Metastasen. Nach Injektion der Zelllinien HCT116, KM12SM und LIM1215 in das Caecum von Nacktmäusen konnten in 67 bis 100 % der Tiere Metastasen in Leber und Lymphknoten festgestellt werden; 33 bis 75 % wiesen Lungenmetastasen auf (Yang *et al.*, 1997).

Eine Erklärung für die unterschiedliche Metastasenanzahl könnte sein, dass ein Tumorfragment nicht nur aus Tumorzellen, sondern auch aus anderen Zelltypen (Bindegewebszellen, Entzündungszellen u.a.) besteht (Matrisian *et al.*, 2001). So könnte die absolute Anzahl vitaler Krebszellen bei Zellinjektion größer gewesen sein, als bei Fragmentfixation.

Ungewöhnlich ist auch die Tatsache, dass in den durchgeführten Experimenten **keine Metastasen in der Leber** detektiert werden konnten. Bei Menschen mit kolorektalem Karzinom ist die Leber der Hauptort der Metastasierung. Die Zellen gelangen entweder hämatogen über den Portal-Venen-Kreislauf oder lymphogen zur Leber.

Zellen, die nicht in den Leber-Sinusoiden „hängenbleiben“, werden weiter durch das Herz bis zur Lunge transportiert (Chambers *et al.*, 2002). Auch Forscher, die orthotope Techniken im Tiermodell untersuchten, berichteten in vielen Fällen von Lebermetastasen (Fidler, 1991b; Morikawa *et al.*, 1988; Rashidi *et al.*, 2000).

Gründe für die abweichenden Ergebnisse könnten im verwendeten Mäusestamm liegen, da in dieser Arbeit SCID-Mäuse anstatt Nacktmäuse eingesetzt wurden.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit liegt in der Detektionsmethode der Metastasen in Lunge und Leber. Die Untersuchung einer großen Anzahl HE-gefärbter Schnitte birgt natürlich auch die Gefahr, dass kleinste Mikrometastasen übersehen werden können. Zudem könnten sich einzelne Tumorzellen zwischen den drei Ebenen des Paraffinschnittes befinden, da diese 80 µm weit auseinander liegen. Methoden, die Tumorzellen in Organen sensitiver nachweisen können, wären zum Beispiel PCR (Matano *et al.*, 1995) oder RT-PCR (Cui *et al.*, 2001).

Dies erklärt aber nicht, warum dann trotzdem in der Lunge deutlich größere und erheblich mehr Metastasen vorzufinden waren.

Im engen Zusammenhang mit der Metastasierung steht die **Vaskularisierung** eines Tumors, denn ohne Invasion in Blut- oder Lymphgefäße können keine Metastasen in entfernten Organen entstehen. Um den Zusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren näher zu untersuchen, wurde eine immunhistochemische Färbung mit dem Endothelmarker CD34 durchgeführt (modifiziert nach Alves *et al.*, 2001b).

Dabei wurden vier zufällige Abschnitte des orthotopen Primärtumors in 100facher Vergrößerung digital fotografiert und mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware halbautomatisiert ausgewertet.

Da die Tumoren nach *orthotoper Zellinjektion* sehr klein waren, konnten nicht von allen Tumoren vier Fotos hergestellt werden, so dass die Auswertung auf die letzten beiden Gruppen beschränkt wurde, da auch nur sie Metastasen vorwiesen.

Der Unterschied in der Metastasenanzahl zwischen Wildtyp- und GFP-Zellen spiegelte sich auch in der Vaskularisierung des Primärtumors wider. So war die mittlere Gefäßanzahl in der HT29-Gruppe 7fach höher und die mittlere Gefäßfläche fast um den Faktor 4 größer als in der HT29-GFP-Gruppe.

Im zweiten orthotopen Experiment, der *Fragmentfixation*, konnten alle Tumoren aufgrund ihres größeren Volumens hinsichtlich ihrer Gefäßversorgung untersucht werden. So konnte hier die zeitliche Entwicklung der Vaskularisierung abgelesen werden.

Gefäßentwicklung und Metastasierung entwickelten sich gegenläufig, d.h. die durchschnittliche Gefäßanzahl/-fläche nahm mit zunehmender Versuchsdauer ab, die Metastasenanzahl/-fläche hingegen stieg mit fortschreitender Zeit an. Hier liegt die Erklärung auf der Hand: Zu Beginn wurden viele Gefäße neu gebildet, um den größer werdenden Tumor zu ernähren. Im weiteren Verlauf wuchs der Tumor immer weiter, sein Zentrum wurde zunehmend nekrotisch; Gefäße fanden sich nur noch in der Peripherie. So nahm die absolute Zahl der Gefäße mit fortschreitender Zeit ab.

Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Analyse humaner Darmkarzinomproben erhoben. Man stellte auch hier fest, dass die Gefäßanzahl mit steigender Tumorprogression abnahm (Tsuji *et al.*, 2002).

Die Metastasenanzahl stieg mit der Versuchsdauer an, da die sich zunächst Einzelzellen aus dem angenäherten Fragment lösen, in die Blut- und/oder Lymphgefäße einwandern mussten, um sich dann in der Lunge neu anzusiedeln und Metastasen auszubilden. Dieser Prozess war zeitintensiv, und so wurden am Anfang des Versuchs wenige, später viele Metastasen festgestellt.

Eine **quantitative Abhängigkeit** zwischen intratumoraler **Gefäßdichte** und **Metastasierung** wurde schon früh im Tiermodell untersucht. So konnte bereits vor mehr als 25 Jahren ein signifikanter Zusammenhang zwischen Gefäßdichte und Lungenmetastasenanzahl nachgewiesen werden (Liotta *et al.*, 1974). Dieses Ergebnis konnte in den folgenden Jahren in Studien mit humanen Patientenproben verschiedener Tumortypen bestätigt werden. So untersuchten zum Beispiel Srivastava *et al.* (1988) Probenmaterial von Hautkrebs-Patienten.

Sie stellten fest, dass bei Patienten, die nach chirurgischer Behandlung in den darauf folgenden neun Jahren ein Melanomrezidiv entwickelten, die Gefäßfläche (in %) der Primärläsion mehr als doppelt so groß war wie bei Patienten, die krankheitsfrei geblieben waren. Auch im Falle von Darmkrebs konnte dieser Zusammenhang nachgewiesen werden. Die Analyse von 145 humanen Kolonkarzinomproben ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen hoher intratumoraler Gefäßdichte und verkürzter Überlebenszeit (Vermeulen *et al.*, 1999).

Andere Untersuchungen zeigten, dass eine Korrelation von Gefäßdichte und dem Auftreten von Lebermetastasen (Tomisaki *et al.*, 1996), sowie zwischen Gefäßanzahl und hämatogener Metastasierung (Tanigawa *et al.*, 1997) besteht.

Auch neueste Veröffentlichungen beschäftigen sich mit der Vaskularisierung von Tumoren und ihrer Bedeutung. Beim Vergleich humaner Kolonkrebsproben wurden signifikante Unterschiede zwischen normalem Gewebe, metastasierenden Tumoren und nicht-metastasierenden Tumoren festgestellt (Tsuji *et al.*, 2002).

Die Gefäßdichte ist somit ein Prognosefaktor bezüglich der Metastasierung und damit auch gleichzeitig im Hinblick auf die Überlebenszeit (Choi *et al.*, 1998).

Noch zu ergänzen ist, dass neugeformte Gefäße im Vergleich zu älteren, bereits ausgereiften Gefäßen, durchlässigere Basalmembranen besitzen und somit den Tumorzellen die Invasion in die Blutbahn erleichtern (Liotta *et al.*, 1976).

Neben den HT29-Wildtyp-Zellen wurden auch **GFP-transfizierte Zellen** sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht.

Nach wiederholter *in vitro*-Passage verloren die Zellen deutlich an Intensität ihrer **Fluoreszenz**. Ähnliche Bilder erhielt man in den *in vivo*-Versuchen. Es fiel sowohl bei der Auswertung von frisch explantierten subkutanen Tumoren als auch in den Paraffinschnitten auf, dass nur noch einzelne Bereiche des Primärtumors grün fluoreszierten. Nach orthotoper Zellinjektion stellte sich der Darm deutlich fluoreszierender dar als der dort vorhandene Tumor.

Die Gründe dafür können vielfältig sein. So ist beschrieben, dass die Fluoreszenz von GFP unter hypoxischen Bedingungen abnimmt (Coralli *et al.*, 2001) und dass ihr Ausmaß sowohl pH-Wert- als auch Temperaturschwankungen unterliegt (Patterson *et al.*, 1997). Weiterhin könnte die natürliche Autofluoreszenz des Gewebes die vorhandene GFP-Fluoreszenz überdeckt haben (Zimmer, 2002).

GFP besitzt lediglich eine chromophore Gruppe und ist nicht in der Lage, durch Bindung zusätzlicher Substrate seine Fluoreszenz zu erhöhen, wie dies enzymatische Farbstoffe vermögen (Wahlfors *et al.*, 2001).

Walter *et al.* (2000) konnten zudem zeigen, dass GFP in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert wird. Interessant sind auch die Ergebnisse von Guo *et al.* (2001), die feststellten, dass unterschiedliche Reagenzien die zur Transfektion benutzt werden, eine eigene Fluoreszenz entwickeln können. Diese Eigenfluoreszenz kann unter Umständen zu einem falsch-positiven Resultat führen, besonders, wenn die eigentliche GFP-Fluoreszenz sehr niedrig exprimiert wird.

Generell kann die Expression eines integrierten Gens mit zunehmender Zeitdauer abnehmen (Migliaccio *et al.*, 2000).

Andere Autoren berichten von äußerst erfolgreichen Einsätzen von GFP sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Fillmore *et al.* (1999) konnten stabile GFP-Ratten-Gliomzellklone erzeugen, die über 30 Passagen und mehr Fluoreszenz zeigten. Zudem gab es keinen Unterschied zwischen dem Wachstum der GFP-Klone und nicht-transfizierten Kontrollen *in vitro* und *in vivo*.

Crook *et al.* (2000) etablierten Organkulturen, in denen sie mit Hilfe von GFP und konfokaler Mikroskopie zytotoxische Substanzen testen konnten.

Bei den *in vivo*-Untersuchungen führte die Arbeitsgruppe um Hoffman (1998) viele Experimente mit GFP durch. Sie kombinierte orthotope Xenograft-Modelle mit GFP, so dass neben dem Primärtumor auch die Metastasierung anhand der grünen Fluoreszenz beobachtet werden konnte.

Es wurden zum Beispiel Hamster-Ovarzellen mit GFP transfiziert und subkutan in Nacktmäuse injiziert. Die daraufhin entstandenen Tumoren exprimierten gleichmäßig und stabil GFP. Daraufhin wurden Stücke dieser Tumoren orthotop implantiert. Auch diese Tumoren wie auch die Metastasen in Lunge, Leber und anderen Organen exprimierten GFP. Zum GFP-Nachweis wurden die Organe entnommen und frisch auf einem Objektträger untersucht (Chishima *et al.*, 1997).

Der nächste Schritt war, GFP direkt im Tier nachzuweisen. Dies gelang zum einen invasiv durch Laparotomien (Hasegawa *et al.*, 2000) oder aber in neuesten Untersuchungen auch nicht-invasiv durch eine „Ganz-Körper-Betrachtung“ (= „whole-body imaging“) des lebenden Versuchstieres von außen (Hoffman, 2002a; Hoffman, 2002b). Diese für das Versuchstier schonende Methode wurde unter anderem erfolgreich mit Melanomzellen durchgeführt, die intravenös appliziert wurde. In diesem Modell konnten GFP-positive Metastasen in Gehirn, Leber und Skelett nachgewiesen werden.

Die gleiche Arbeitsgruppe implantierte Kolonkarzinom-Fragmente orthotop in Nacktmäuse und konnte auch hier sowohl Primärtumor als auch Metastasen in Leber und Knochen anhand der Fluoreszenz nachweisen (Yang *et al.*, 2000).

Neben der unzureichenden Fluoreszenz war die **geringe Metastasierungsrate** ein weiteres Problem der **GFP-Zellen** in dieser Arbeit (s.o.). Im subkutanen Versuch kam es zusätzlich noch zu einer **Häufung** von Tumoren mit **großen nekrotischen Arealen** nach HT29-GFP-Zellinjektion. 12 von 30 Mäusen mussten aus diesem Grund vorzeitig getötet werden. Inwiefern diese Tatsache mit der Transfektion zusammenhängt, bleibt fraglich. Es muss auch bedacht werden, dass unterschiedliche Versuchsbedingungen ebenso nicht ausgeschlossen werden können, da HT29- und HT29-GFP-Zellen an zwei verschiedenen Tagen appliziert wurden.

Festzuhalten bleibt, dass der in dieser Arbeit eingesetzte HT29-GFP-Klon keinen Vorteil gegenüber bereits etablierten Untersuchungsmethoden lieferte.

Nachdem GFP weder in vitro noch im ersten in vivo-Experiment überzeugende Ergebnisse zeigte, fand man in **CEA (Carcinoembryonales Antigen)** eine weitere Möglichkeit, das Wachstum des orthotopen Tumors zu verschiedenen Zeitpunkten zu dokumentieren.

CEA ist ein Glykoprotein, das erstmals 1965 in der Literatur beschrieben wurde (Gold & Freedman, 1965). Heute ist es der bedeutendste Tumormarker des kolorektalen Karzinoms. Vor allem zur Verlaufskontrolle nach chirurgischer Entfernung eines Darmtumors findet es Verwendung. Steigt der CEA-Gehalt im Patientenblut nach der Operation an, so müssen weitere Untersuchungen klären, ob es zu einem Rezidiv gekommen ist. Zum Screening ist es weniger geeignet, da auch andere Faktoren, wie zum Beispiel Entzündungen, die Ursache für erhöhte CEA-Werte sein können (Woolfson, 1991).

In beiden orthotopen Versuchen wurde den Mäusen vor der transzervikalen Dislokation Blut entnommen, das anschließend mit Hilfe eines ELISA-Testkits auf seinen CEA-Gehalt untersucht wurde. Da es jeweils drei unterschiedliche Tötungszeitpunkte gab, war es möglich, einen zeitlichen Verlauf des CEA-Gehalts zu protokollieren.

Man konnte in beiden Experimenten mit zunehmender Versuchsdauer ansteigende CEA-Werte im Blut der Tiere feststellen. Diese Beobachtung deckt sich mit dem oft beschriebenen Zusammenhang zwischen **Tumorlast** und **CEA-Wert**. So wurde bereits 1984 mit subkutan wachsenden Tumoren der Darmkrebszelllinie T-380 in Nacktmäusen ein linearer Anstieg zwischen Serum-CEA und Tumorgröße beschrieben (Martin & Halpern, 1984). Man findet weitere Beispiele für die Abhängigkeit dieser beiden Faktoren. Nach subkutaner Injektion von SK-CO-1- und HT29-Zellen in Nacktmäusen konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Soletormos *et al.*, 1997).

Allerdings konnten die Tumoren nach orthotoper Zellinjektion nicht vermessen werden, da sie sehr klein und infiltrativ wuchsen; nach orthotoper Fragmentfixation wurden die Tumoren zwar mit Hilfe eines elektronischen Messschiebers vermessen, aber auch in diesem Versuch entzogen sich Anteile des Tumors durch stark infiltratives Wachstum einer exakten Volumenbestimmung. Es konnte keine direkte Korrelation zwischen Tumolvolumen und CEA-Gehalt festgestellt werden.

Neben der ungenauen Tumormessung könnte auch die verwendete Bestimmungsmethode (ELISA) ein Grund für die fehlende Korrelation sein. Aus Gründen der Sicherheit wurde anstatt der weit üblichen Radioimmunassays (RIA) der nicht radioaktive ELISA ausgewählt.

Weiterhin ist beschrieben, dass die **CEA-Sekretion** neben der Tumorgröße auch vom **Tumorstadium** abhängt. Je invasiver der Tumor wächst, desto höher ist auch der CEA-Gehalt im Blut (Bhatnagar *et al.*, 1999). Dieser Zusammenhang konnte in beiden durchgeführten orthotopen Experimenten bestätigt werden.

Interessant ist auch der Aspekt, dass sich die mittleren **CEA-Konzentrationen** der vergleichbaren Zeitpunkte in beiden orthotopen Experimenten deutlich in ihrer Höhe unterschieden (Abbildung 43, S. 111), d.h. der CEA-Gehalt lag nach Fragmentfixation deutlich höher als nach Zellinjektion. Die Unterschiede sind bis auf den Vergleich von beiden letzten Gruppen (Gruppe 3) signifikant, wobei man hier darauf hinweisen muß, dass der Endpunkt im Zellinjektionsversuch bei Tag 55 lag, wohingegen im Fragmentversuch Tag 42 der letzte Versuchstag war. Eine mögliche Erklärung wären die unterschiedlichen Tumolvolumina, denn die orthotop wachsenden Tumoren nach Fragmentfixation wiesen erheblich größere Volumina auf als nach Zellinjektion. So könnte das angenähte Fragment eine größere Anzahl CEA-produzierender Zellen enthalten haben als die injizierte Zellsuspension.

### **Schlussbetrachtung**

Die umfangreiche vergleichende Untersuchung der Zelllinie HT29 sowohl in vitro als auch in vivo in drei unterschiedlichen Tiermodellen erleichtert dem Versuchsleiter die Auswahl eines geeigneten Modells für verschiedene Fragestellungen.

Das *subkutane Modell* ist einfach durchführbar, der Primärtumor mit geringem Aufwand zu vermessen und die Belastung für die Tiere ist gering. Allerdings entstehen nur wenige Metastasen.

Die *orthotope Injektion* von HT29-Zellen eignet sich aufgrund ihrer Metastasenanzahl zur Untersuchung metastasenhemmender Substanzen; der Primärtumor hingegen ist klein und durch sein infiltratives Wachstum schlecht messbar. Der Aufwand liegt höher als beim subkutanen Modell, jedoch deutlich geringer als bei orthotoper Fragmentapplikation.

Die *orthotope Fragmentfixation* hat den Vorteil eines größeren Primärtumors, jedoch gleichzeitig den Nachteil einer geringerer Metastasenausbeute.

Beide orthotopen Modelle belasten die Versuchstiere aufgrund der notwendigen Operation mehr als die subkutane Zellinjektion.

In allen drei in-vivo-Modellen entstehen keine Lebermetastasen wie beim humanen Darmkrebspatienten. Somit ist die Übertragbarkeit auf den Menschen nur bedingt möglich.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass es kein perfektes Modell gibt, das alle Fragestellungen gleich gut erfüllen kann. Der Experimentator muss das für seine Zwecke am besten geeignete Modell auswählen und sich gleichzeitig über Vor- und Nachteile seiner Entscheidung bewusst sein.

Es ist also weiterhin Aufgabe der Wissenschaft, neue präklinische Modelle in der onkologischen Forschung zu entwickeln, die zukünftig einen wertvollen Beitrag in der Prüfung neuer Wirkstoffe leisten können.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT29 wurde in verschiedenen Modellen hinsichtlich unterschiedlicher Kriterien eingehend untersucht.

Die in-vivo-Versuche wurden an weiblichen SCID-Mäusen durchgeführt und bestanden aus subkutaner Zellinjektion, orthotoper Zellinjektion in die Wand des Caecums und orthotoper Fixation eines Tumorfragments am Caecum. Der subkutane Versuch dauerte 41 Tage, die orthotopen Tierexperimente hatten jeweils drei Tötungszeitpunkte mit einem Abstand von je zwei Wochen. Es wurden jeweils Tumor, Leber und Lunge entnommen, in 3,8%igem Formaldehyd fixiert und histologisch untersucht.

Den Tieren der orthotopen Versuche wurde zusätzlich am Sektionstag Blut entnommen und mittels ELISA sein CEA (Carcinoembryonales Antigen)- Gehalt bestimmt. Die Vaskularisierung der orthotopen Primärtumoren wurde anhand einer CD34-Färbung quantitativ ausgewertet, d.h. Anzahl und Fläche der markierten Gefäße wurden bestimmt. Zudem wurde noch das grün fluoreszierende Protein (GFP) auf seine Eignung als quantifizierbares Reporter gen in diesen Modellen überprüft. So wurden neben den Wildtyp-Zellen auch GFP-transfizierte HT29-Zellen in vitro und in den ersten beiden in-vivo-Experimenten eingesetzt.

### ***Vor- und Nachteile zusammengefasst:***

- Das subkutane Modell war leicht durchführbar, der Primärtumor einfach zu vermessen, die Anwachsrate lag bei 100 % und die Belastung der Versuchstiere ist als relativ gering einzustufen. Allerdings eignet sich dieser Ansatz aufgrund der geringen Metastasenanzahl nicht als Metastasierungsmodell.
- Die orthotope Zellinjektion brachte sehr kleine, schlecht messbare Primärtumoren hervor, jedoch eignet sich dieser Ansatz aufgrund der Metastasenanzahl gut als Metastasierungsmodell. Der Aufwand und die Tierbelastung waren höher als bei subkutaner Injektion, jedoch niedriger im Vergleich zur orthotopen Fragmentfixation.
- Die orthotope Fragmentfixation stellt das aufwendigste aller untersuchten Modelle dar. Die Primärtumoren waren groß genug, um vermessen zu werden, allerdings war die Metastasenanzahl zu gering, um eine statistisch abgesicherte Aussage treffen zu können.

- Die CD34-Färbung markierte erfolgreich die Gefäße des Primärtumors und ermöglichte somit eine Computer-unterstützte quantitative Auswertung der Vaskularisierung der orthotopen Darmtumoren. Es konnte festgestellt werden, dass zu Beginn des Tumorwachstums, eine ausgeprägte Neoangiogenese stattfindet, die der Metastasenentwicklung vorausgeht. So stieg die Metastasenanzahl mit zunehmender Versuchsdauer an, die Gefäßanzahl nahm jedoch ab. Grund dafür ist die stetige Volumenvergrößerung der Tumoren, so dass ihr Zentrum nekrotisch wurde und Gefäße nur noch im Randbereich detektiert werden konnten.
  
- Der verwendete HT29-GFP-Klon war nicht stabil genug, um eine ausreichende Fluoreszenz hervorzubringen. Zudem wuchsen die Zellen sowohl in vitro als auch in vivo langsamer, die subkutanen Tumoren zeigten vermehrt nekrotische Bereiche, und es entstanden weniger Metastasen nach orthotoper GFP-Zellinjektion als nach Wildtyp-Zellinjektion. Eine Quantifizierung im Rahmen der Metastasenauswertung mit Hilfe von GFP konnte aufgrund der unzureichenden Fluoreszenz nicht durchgeführt werden. Der Einsatz von GFP hat in diese Modellen keinen Vorteil gebracht.
  
- CEA zeichnete sich als wertvoller Tumormarker für Darmtumoren in beiden untersuchten orthotopen Modellen aus. Abhängig von steigender Tumorbelastung und zunehmender Invasivität der Tumoren nahm auch der CEA-Gehalt im Blut der Versuchstiere zu. Mit einem verfeinerten Meßsystem bzw. einer verbesserten Volumenmessung der Tumoren, könnte eine direkte Korrelation zwischen Tumorgroße und CEA hergestellt werden.

Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte vergleichende Charakterisierung verschiedener Injektions- und Implantationstechniken sowie weiterführender Untersuchungen lassen sich je nach Fragestellung geeignete Modelle für die präklinische Wirkstoffprüfung auswählen.

## 7. SUMMARY

### *Comparative establishment and characterization of an orthotopic colon cancer xenograft-model*

The human colon cancer cellline HT29 was investigated in various models regarding different criteria. The in-vivo-experiments were carried out with female SCID mice and consisted of subcutaneous cell injection, orthotopic cell injection into the cecal wall and orthotopic fixation of a tumor fragment onto the cecum. The subcutaneous experiment took 41 days; the orthotopic animal experiments were equally divided into three points of necropsy each two weeks apart. On these days tumor, liver and lung were withdrawn, fixed in 3,8% formaldehyde and analyzed histologically.

In addition blood samples of all animals of the orthotopic experiments were taken on days of autopsy and the CEA (carcinoembryonic antigen) content was determined using an ELISA. The vascularization of the orthotopic primary tumors was examined by staining of CD34, i.e. number and area of the tagged vessels were ascertained.

Additionally the green fluorescent protein (GFP) was studied in view of its suitability as quantifiable reporter gene in these models. Therefore not only HT29-wildtype but also HT29 cells transfected with GFP were used in vitro and in the first two in-vivo-assays.

#### **Advantages and disadvantages summarized:**

- The subcutaneous model was realized easily, measurement of the primary tumor was simple, the tumor take rate was 100 % and the laboratory animals appeared to suffer only from a relative slight amount of stress. Besides these advantages this setting cannot be used for investigations regarding metastasis because of the low number of metastases.
- The orthotopic cell injection generated small, hardly measurable primary tumors, but this approach is a suitable model of metastasis because of the number of metastases detected. The technical effort and the burden for the animals exceeded that found in the subcutaneous setting but was below the effort of orthotopic fixation of a tumor fragment.
- Of all investigated models the orthotopic fixation of a tumor fragment represents the model with the greatest effort. The primary tumors were big enough to be measured, but the number of metastases was too low to make statistical valuable evaluations.

➤ The CD34 staining successfully marked the vessels of the primary tumor and facilitated a computer-assisted quantitative analysis of the vascularization of orthotopic colon tumors. It was assessed that a broad neoangiogenesis occurred at the beginning of tumor growth prior to the development of metastases. The number of metastases increased with proceeding length of time, whereas the number of vessels decreased. The continuous extension in tumor volume resulted in a necrotic tumor center so that vessels were detectable in the border area only.

➤ The used HT29-GFP clone was not stable enough to generate sufficient fluorescence. The cells both in vitro and in vivo grew more slowly, the subcutaneous tumors showed necrotic areas and there were less metastases after orthotopic injection of GFP cells than after injection of wildtype cells. Because of the insufficient fluorescence it was not possible to execute a quantifiable analysis of metastasis.

The application of GFP was not advantageous within these models.

➤ CEA suits to be a valuable tumor marker for colon cancer in both investigated models. The CEA content in the blood samples of tumor bearing animals increased dependent on tumor burden and tumor invasiveness. A direct correlation between tumor size and CEA might be established with an improved measurement system or rather an advanced measuring of tumor volume.

Due to the comparative characterization of injection and implantation techniques as well as other detailed examinations carried out for this thesis, it is possible to select suitable models for preclinical trials depending on the individual purpose .

## 8. ABKÜRZUNGEN

5-FU	5-Fluorouracil
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	engl. <i>Cluster Designation</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CMV	Cytomegalie-Virus
DAB	3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FELASA	engl. <i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FKS	Fötale Kälberserum
G	Gauge
G418	Synonym für Geneticin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - engl. <i>Society for laboratory animal science</i>
h	Stunde(n)
HBSS	engl. <i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	engl. <i>Hereditary Non-Polyposis Colon-Carcinoma</i>
HRP	engl. <i>Horseradish-Peroxidase</i> (Merrettich-Peroxidase)
i.e.	<i>id est</i> (das heißt)
Ig	Immunglobulin
kD	Kilo Dalton

KGW	Körpergewicht
min	Minute(n)
mM	millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NCI	engl. <i>National Cancer Institute</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OP	Operation
PBS	engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
post op/operationem	nach der Operation
R	Korrelationskoeffizient
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl. <i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
s.c.	subcutan (subkutan)
SCID	engl. <i>severe combined immunodeficiency</i> (schwere kombinierte Immundefizienz)
sec	Sekunde(n)
s.o.	siehe oben
SPF	spezifiziert pathogenfrei
STDEV	engl. <i>Standard Deviaton</i> (Standardabweichung)
TBS	engl. <i>Tris-Buffered Saline</i>
Tris-Base	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TVT	Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
uvm.	und vieles mehr
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

- Alves, F., Borchers, U., Padge, B., Augustin, H., Nebendahl, K., Kloppel, G. & Tietze, L.F. (2001a). Inhibitory effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on growth and spread of human pancreatic ductal adenocarcinoma evaluated in an orthotopic severe combined immunodeficient (SCID) mouse model. *Cancer Lett*, **165**, 161-70.
- Alves, F., Contag, S., Missbach, M., Kaspereit, J., Nebendahl, K., Borchers, U., Heidrich, B., Streich, R. & Hiddemann, W. (2001b). An orthotopic model of ductal adenocarcinoma of the pancreas in severe combined immunodeficient mice representing all steps of the metastatic cascade. *Pancreas*, **23**, 227-35.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut). Krebs in Deutschland. 3. erweiterte, aktualisierte Auflage, Saarbrücken (2002).
- Berns, A. (2001). Cancer. Improved mouse models. *Nature*, **410**, 1043-4.
- Bhatnagar, J., Tewari, H.B., Bhatnagar, M. & Austin, G.E. (1999). Comparison of carcinoembryonic antigen in tissue and serum with grade and stage of colon cancer. *Anticancer Res*, **19**, 2181-7.
- Blumberg, D. & Ramanathan, R.K. (2002). Treatment of colon and rectal cancer. *J Clin Gastroenterol*, **34**, 15-26.
- Bosma, G.C., Custer, R.P. & Bosma, M.J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, **301**, 527-30.
- Bouvet, M., Wang, J., Nardin, S.R., Nassirpour, R., Yang, M., Baranov, E., Jiang, P., Moossa, A.R. & Hoffman, R.M. (2002). Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model. *Cancer Res*, **62**, 1534-40.
- Bresalier, R.S., Raper, S.E., Hujanen, E.S. & Kim, Y.S. (1987). A new animal model for human colon cancer metastasis. *Int J Cancer*, **39**, 625-30.
- Chambers, A.F., Groom, A.C. & MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*, **2**, 563-72.
- Chishima, T., Miyagi, Y., Wang, X., Yamaoka, H., Shimada, H., Moossa, A.R. & Hoffman, R.M. (1997). Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res*, **57**, 2042-7.
- Choi, H.J., Hyun, M.S., Jung, G.J., Kim, S.S. & Hong, S.H. (1998). Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in colorectal carcinoma with special reference to mode of metastasis and recurrence. *Oncology*, **55**, 575-81.
- Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G. & Ward, W.W. (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. *Biochemistry*, **32**, 1212-8.
- Contag, C.H., Jenkins, D., Contag, P.R. & Negrin, R.S. (2000). Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. *Neoplasia*, **2**, 41-52.

- Coralli, C., Cemazar, M., Kanthou, C., Tozer, G.M. & Dachs, G.U. (2001). Limitations of the reporter green fluorescent protein under simulated tumor conditions. *Cancer Res*, **61**, 4784-90.
- Crook, T.J., Hall, I.S., Solomon, L.Z., Birch, B.R. & Cooper, A.J. (2000). A model of superficial bladder cancer using fluorescent tumour cells in an organ-culture system. PG - 886-93. *BJU Int*, **86**, 886-93.
- Cui, J.H., Krueger, U., Henne-Bruns, D., Kremer, B. & Kalthoff, H. (2001). Orthotopic transplantation model of human gastrointestinal cancer and detection of micrometastases. *World J Gastroenterol*, **7**, 381-6.
- Cui, J.H., Krueger, U., Vogel, I., Luttgies, J., Henne-Bruns, D., Kremer, B. & Kalthoff, H. (1998). Intact tissue of gastrointestinal cancer specimen orthotopically transplanted into nude mice. *Hepatogastroenterology*, **45**, 2087-96.
- Custer, R.P., Bosma, G.C. & Bosma, M.J. (1985). Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. *Am J Pathol*, **120**, 464-77.
- de Vries, J.E., Dinjens, W.N., De Bruyne, G.K., Verspaget, H.W., van der Linden, E.P., de Bruine, A.P., Mareel, M.M., Bosman, F.T. & ten Kate, J. (1995). In vivo and in vitro invasion in relation to phenotypic characteristics of human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer*, **71**, 271-7.
- Dexter, D.L., Diamond, M., Creveling, J. & Chen, S.F. (1993). Chemotherapy of mammary carcinomas arising in ras transgenic mice. *Invest New Drugs*, **11**, 161-8.
- Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L. & Rougier, P. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*, **355**, 1041-7.
- Edinger, M., Sweeney, T.J., Tucker, A.A., Olomu, A.B., Negrin, R.S. & Contag, C.H. (1999). Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia*, **1**, 303-10.
- Fearon, E.R. & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-67.
- Fearon, K. & Moses, A. (2002). Cancer cachexia. *Int J Cardiol*, **85**, 73.
- Fidler, I.J. (1990). Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res*, **50**, 6130-8.
- Fidler, I.J. (1991a). 7th Jan Waldenstrom Lecture. The biology of human cancer metastasis. *Acta Oncol*, **30**, 668-75.
- Fidler, I.J. (1991b). Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, **10**, 229-43.
- Fidler, I.J. & Balch, C.M. (1987). The biology of cancer metastasis and implications for therapy. *Curr Probl Surg*, **24**, 129-209.

- Fillmore, H.L., Shurm, J., Furqueron, P., Prabhu, S.S., Gillies, G.T. & Broaddus, W.C. (1999). An in vivo rat model for visualizing glioma tumor cell invasion using stable persistent expression of the green fluorescent protein. *PG - 9-19*.  
*Cancer Lett*, **141**, 9-19.
- Flanagan, S.P. (1966). 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res*, **8**, 295-309.
- Fu, X. & Hoffman, R.M. (1993). Human ovarian carcinoma metastatic models constructed in nude mice by orthotopic transplantation of histologically-intact patient specimens. *Anticancer Res*, **13**, 283-6.
- Fu, X., Le, P. & Hoffman, R.M. (1993). A metastatic orthotopic-transplant nude-mouse model of human patient breast cancer. *Anticancer Res*, **13**, 901-4.
- Fu, X.Y., Besterman, J.M., Monosov, A. & Hoffman, R.M. (1991). Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 9345-9.
- Funahashi, Y., Koyanagi, N., Sonoda, J., Kitoh, K. & Yoshimatsu, K. (1999). Rapid development of hepatic metastasis with high incidence following orthotopic transplantation of murine colon 38 carcinoma as intact tissue in syngeneic C57BL/6 mice. *J Surg Oncol*, **71**, 83-90.
- Furihata, T., Sakai, T., Kawamata, H., Omotehara, F., Shinagawa, Y., Imura, J., Ueda, Y., Kubota, K. & Fujimori, T. (2001). A new in vivo model for studying invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, **19**, 903-7.
- Furukawa, T., Fu, X., Kubota, T., Watanabe, M., Kitajima, M. & Hoffman, R.M. (1993a). Nude mouse metastatic models of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue. *Cancer Res*, **53**, 1204-8.
- Furukawa, T., Kubota, T., Watanabe, M., Kuo, T.H., Kase, S., Saikawa, Y., Tanino, H., Teramoto, T., Ishibiki, K., Kitajima, M. & et al. (1993b). Immunochemotherapy prevents human colon cancer metastasis after orthotopic onplantation of histologically-intact tumor tissue in nude mice. *Anticancer Res*, **13**, 287-91.
- Furukawa, T., Kubota, T., Watanabe, M., Kuo, T.H., Nishibori, H., Kase, S., Saikawa, Y., Tanino, H., Teramoto, T., Ishibiki, K. & et al. (1993c). A metastatic model of human colon cancer constructed using cecal implantation of cancer tissue in nude mice. *Surg Today*, **23**, 420-3.
- Garcia Olmo, D., Garcia Rivas, M., Garcia Olmo, D.C. & Atienzar, M. (1998). Establishment of an experimental model of colon cancer which replicates the regional extension pattern of human colorectal adenocarcinoma. *Rev Esp Enferm Dig*, **90**, 251-62.
- Gold, P. & Freedman, S.O. (1965). Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med*, **122**, 467-81.
- Guo, B., Pearce, A.G., Traulsen, K.E., Rintala, A.C. & Lee, H. (2001). Fluorescence produced by transfection reagents can be confused with green fluorescent proteins in mammalian cells. *Biotechniques*, **31**, 314-6, 318, 320-1.

- Hart, I.R. & Fidler, I.J. (1980). Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res*, **40**, 2281-7.
- Hasegawa, S., Yang, M., Chishima, T., Miyagi, Y., Shimada, H., Moossa, A.R. & Hoffman, R.M. (2000). In vivo tumor delivery of the green fluorescent protein gene to report future occurrence of metastasis. *Cancer Gene Ther*, **7**, 1336-40.
- Heim, R., Prasher, D.C. & Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12501-4.
- Hoffman, R.M. (1998). Orthotopic transplant mouse models with green fluorescent protein-expressing cancer cells to visualize metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, **17**, 271-7.
- Hoffman, R.M. (1999). Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs*, **17**, 343-59.
- Hoffman, R.M. (2002a). Watching real-time metastasis in vivo. *Trends Mol Med*, **8**, 354-5.
- Hoffman, R.M. (2002b). Whole-body fluorescence imaging with green fluorescence protein. *Methods Mol Biol*, **183**, 135-48.
- Jojovic, M. & Schumacher, U. (2000). Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice. *Cancer Lett*, **152**, 151-6.
- Kerbel, R.S. (1998). What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing? *Cancer Metastasis Rev*, **17**, 301-4.
- Kozlowski, J.M., Fidler, I.J., Campbell, D., Xu, Z.L., Kaighn, M.E. & Hart, I.R. (1984). Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. *Cancer Res*, **44**, 3522-9.
- Kubota, T. (1994). Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem*, **56**, 4-8.
- Kuo, T.H., Kubota, T., Watanabe, M., Furukawa, T., Kase, S., Tanino, H., Saikawa, Y., Ishibiki, K., Kitajima, M. & Hoffman, R.M. (1993). Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. *Anticancer Res*, **13**, 627-30.
- Kuo, T.H., Kubota, T., Watanabe, M., Furukawa, T., Teramoto, T., Ishibiki, K., Kitajima, M., Moossa, A.R., Penman, S. & Hoffman, R.M. (1995). Liver colonization competence governs colon cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 12085-9.
- Liotta, L.A., Kleinerman, J. & Saidel, G.M. (1974). Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*, **34**, 997-1004.
- Liotta, L.A. & Rao, C.N. (1986). Tumor invasion and metastasis. *Monogr Pathol*, 183-92.
- Liotta, L.A., Saidel, M.G. & Kleinerman, J. (1976). The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res*, **36**, 889-94.

- Lojda, Z. (1970). Indigogenic methods for glycosidases. II. An improved method for beta-D-galactosidase and its application to localization studies of the enzymes in the intestine and in other tissues. *Histochemie*, **23**, 266-88.
- Markowitz, S.D., Dawson, D.M., Willis, J. & Willson, J.K. (2002). Focus on colon cancer. *Cancer Cell*, **1**, 233-6.
- Martin, K.W. & Halpern, S.E. (1984). Carcinoembryonic antigen production, secretion, and kinetics in BALB/c mice and a nude mouse-human tumor model. *Cancer Res*, **44**, 5475-81.
- Matano, S., Ryoyama, K., Nakamura, S., Okada, G. & Nomura, T. (1995). Application of the polymerase chain reaction (PCR) to quantify micro-metastasis in an experimental animal. *Cancer Lett*, **91**, 93-9.
- Matrisian, L.M., Cunha, G.R. & Mohla, S. (2001). Epithelial-stromal interactions and tumor progression: meeting summary and future directions. *Cancer Res*, **61**, 3844-6.
- Migliaccio, A.R., Bengra, C., Ling, J., Pi, W., Li, C., Zeng, S., Keskinetepe, M., Whitney, B., Sanchez, M., Migliaccio, G. & Tuan, D. (2000). Stable and unstable transgene integration sites in the human genome: extinction of the Green Fluorescent Protein transgene in K562 cells. *Gene*, **256**, 197-214.
- Mitchell, B.S., Horny, H.P. & Schumacher, U. (1997). Immunophenotyping of human HT29 colon cancer cell primary tumours and their metastases in severe combined immunodeficient mice. *Histochem J*, **29**, 393-9.
- Mitchell, B.S., Whitehouse, A., Prehm, P., Delpech, B. & Schumacher, U. (1996). CD44 exon variant 6 epitope and hyaluronate synthase are expressed on HT29 human colorectal carcinoma cells in a SCID mouse model of metastasis formation. *Clin Exp Metastasis*, **14**, 107-14.
- Morikawa, K., Walker, S.M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, J.M. & Fidler, I.J. (1988). Influence of organ environment on the growth, selection, and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res*, **48**, 6863-71.
- Mueller, A., Maniotis, A., Freeman, W., Bartsch, D., Schaller, U., Bergeron-Lynn, G., Cheng, L., Taskintuna, I., Chen, X., Kan-Mitchell, J. & Folberg, R. (2002). An Orthotopic Model for Human Uveal Melanoma in SCID Mice. *Microvasc Res*, **64**, 207.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. & Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol*, **20**, 87-90.
- Ogata, Y., Hara, Y., Akagi, Y., Ohkita, A., Morodomi, T. & Shirouzu, K. (1998). Metastatic model of human colon cancer constructed using orthotopic implantation in nude mice. *Kurume Med J*, **45**, 121-5.
- Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, **1**, 366-368.
- Pantelouris, E.M. & Hair, J. (1970). Thymus dysgenesis in nude (nu nu) mice. *J Embryol Exp Morphol*, **24**, 615-23.

- Parkin, D.M., Pisani, P. & Ferlay, J. (1999). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, **49**, 33-64, 1.
- Patterson, G.H., Knobel, S.M., Sharif, W.D., Kain, S.R. & Piston, D.W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J*, **73**, 2782-90.
- Ponz de Leon, M. & Di Gregorio, C. (2001). Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis*, **33**, 372-88.
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. & Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, **111**, 229-33.
- Rashidi, B., Gamagami, R., Sasson, A., Sun, F.X., Geller, J., Moossa, A.R. & Hoffman, R.M. (2000). An orthotopic mouse model of remetastasis of human colon cancer liver metastasis [In Process Citation]. *Clin Cancer Res*, **6**, 2556-61.
- Rho, Y.S., Lee, K.T., Jung, J.C., Yoon, C., An, Z., Hoffman, R.M. & Chang, S.G. (1999). Efficacy of new platinum analog DPPE in an orthotopic nude mouse model of human colon cancer. *Anticancer Res*, **19**, 157-61.
- Rygaard, J. (1969). Immunobiology of the mouse mutant "Nude". Preliminary investigations. *Acta Pathol Microbiol Scand*, **77**, 761-2.
- Rygaard, J. & Povlsen, C.O. (1969). Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand*, **77**, 758-60.
- Schulmann, K., Reiser, M. & Schmiegel, W. (2002). Colonic cancer and polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **16**, 91-114.
- Schwarz, R.E., McCarty, T.M., Peralta, E.A., Diamond, D.J. & Ellenhorn, J.D. (1999). An orthotopic in vivo model of human pancreatic cancer. *Surgery*, **126**, 562-7.
- Shimomura, O. & Johnson, F.H. (1969). Properties of the bioluminescent protein aequorin. *Biochemistry*, **8**, 3991-7.
- Soletormos, G., Fogh, J.M., Sehested-Hansen, B., Spang-Thomsen, M., Schioler, V., Dombrowsky, P. & Skovsgaard, T. (1997). Carcino-embryonic antigen in monitoring the growth of human colon adenocarcinoma tumour cells SK-CO-1 and HT-29 in vitro and in nude mice. *Eur J Cancer*, **33**, 108-14.
- Sordat, B. & Wang, W.R. (1984). Human colorectal tumor xenografts in nude mice: expression of malignancy. *Behring Inst Mitt*, 291-300.
- Srivastava, A., Laidler, P., Davies, R.P., Horgan, K. & Hughes, L.E. (1988). The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol*, **133**, 419-23.
- Strain, A.J. (1979). Cancer cachexia in man: a review. *Invest Cell Pathol*, **2**, 181-93.
- Sun, F.X., Sasson, A.R., Jiang, P., An, Z., Gamagami, R., Li, L., Moossa, A.R. & Hoffman, R.M. (1999). An ultra-metastatic model of human colon cancer in nude mice. *Clin Exp Metastasis*, **17**, 41-8.

- Tan, M.H., Holyoke, E.D. & Goldrosen, M.H. (1977). Murine colon adenocarcinoma: syngeneic orthotopic transplantation and subsequent hepatic metastases. *J Natl Cancer Inst*, **59**, 1537-44.
- Tanigawa, N., Amaya, H., Matsumura, M., Lu, C., Kitaoka, A., Matsuyama, K. & Muraoka, R. (1997). Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res*, **57**, 1043-6.
- Thomas, H. & Balkwill, F. (1995). Assessing new anti-tumour agents and strategies in oncogene transgenic mice. *Cancer Metastasis Rev*, **14**, 91-5.
- Togo, S., Wang, X., Shimada, H., Moossa, A.R. & Hoffman, R.M. (1995). Cancer seed and soil can be highly selective: human-patient colon tumor lung metastasis grows in nude mouse lung but not colon or subcutis. *Anticancer Res*, **15**, 795-8.
- Tomisaki, S., Ohno, S., Ichiyoshi, Y., Kuwano, H., Maehara, Y. & Sugimachi, K. (1996). Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer. *Cancer*, **77**, 1722-8.
- Tomlinson, I., Ilyas, M. & Novelli, M. (1997). Molecular genetics of colon cancer. *Cancer Metastasis Rev*, **16**, 67-79.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **67**, 509-44.
- Tsuji, T., Sasaki, Y., Tanaka, M., Hanabata, N., Hada, R. & Munakata, A. (2002). Microvessel morphology and vascular endothelial growth factor expression in human colonic carcinoma with or without metastasis. *Lab Invest*, **82**, 555-62.
- Van Cutsem, E. & Peeters, M. (1999). Developments in fluoropyrimidine therapy for gastrointestinal cancer. *Curr Opin Oncol*, **11**, 312-7.
- Van Cutsem, E., Peeters, M., Verslype, C., Filez, L., Haustermans, K. & Janssens, J. (1999). The medical treatment of colorectal cancer: actual status and new developments. *Hepatogastroenterology*, **46**, 709-16.
- van Laar, J.A., Rustum, Y.M., Ackland, S.P., van Groeningen, C.J. & Peters, G.J. (1998). Comparison of 5-fluoro-2'-deoxyuridine with 5-fluorouracil and their role in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, **34**, 296-306.
- Vermeulen, P.B., Van den Eynden, G.G., Huget, P., Goovaerts, G., Weyler, J., Lardon, F., Van Marck, E., Hubens, G. & Dirix, L.Y. (1999). Prospective study of intratumoral microvessel density, p53 expression and survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*, **79**, 316-22.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M. & Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, **319**, 525-32.
- Wahlfors, J., Loimas, S., Pasanen, T. & Hakkarainen, T. (2001). Green fluorescent protein (GFP) fusion constructs in gene therapy research. *Histochem Cell Biol*, **115**, 59-65.

- Walter, I., Fleischmann, M., Klein, D., Muller, M., Salmons, B., Gunzburg, W.H., Renner, M. & Gelbman, W. (2000). Rapid and sensitive detection of enhanced green fluorescent protein expression in paraffin sections by confocal laser scanning microscopy. *Histochem J*, **32**, 99-103.
- Ward, W.W. & Bokman, S.H. (1982). Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*, **21**, 4535-40.
- Willett, W.C. (2001). Diet and cancer: one view at the start of the millennium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10**, 3-8.
- Wilmanns, C., Fan, D., O'Brian, C.A., Bucana, C.D. & Fidler, I.J. (1992). Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer*, **52**, 98-104.
- Woolfson, K. (1991). Tumor markers in cancer of the colon and rectum. *Dis Colon Rectum*, **34**, 506-11.
- Xiao, Z., McCallum, T.J., Brown, K.M., Miller, G.G., Halls, S.B., Parney, I. & Moore, R.B. (1999). Characterization of a novel transplantable orthotopic rat bladder transitional cell tumour model. *Br J Cancer*, **81**, 638-46.
- Xie, X., Brunner, N., Jensen, G., Albrechtsen, J., Gotthardsen, B. & Rygaard, J. (1992). Comparative studies between nude and scid mice on the growth and metastatic behavior of xenografted human tumors. PG - 201-10. *Clin Exp Metastasis*, **10**, 201-10.
- Yang, J.L., Hanley, J.R., Yu, Y., Berney, C.R., Russell, P.J. & Crowe, P.J. (1997). In vivo overexpression of c-erbB-2 oncoprotein in xenografts of mice implanted with human colon cancer lines. *Anticancer Res*, **17**, 3463-8.
- Yang, M., Baranov, E., Jiang, P., Sun, F.X., Li, X.M., Li, L., Hasegawa, S., Bouvet, M., Al-Tuwaijri, M., Chishima, T., Shimada, H., Moossa, A.R., Penman, S. & Hoffman, R.M. (2000). Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1206-11.
- Yang, M., Baranov, E., Wang, J.W., Jiang, P., Wang, X., Sun, F.X., Bouvet, M., Moossa, A.R., Penman, S. & Hoffman, R.M. (2002). Direct external imaging of nascent cancer, tumor progression, angiogenesis, and metastasis on internal organs in the fluorescent orthotopic model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3824-9.
- Yang, T.T., Sinai, P., Green, G., Kitts, P.A., Chen, Y.T., Lybarger, L., Chervenak, R., Patterson, G.H., Piston, D.W. & Kain, S.R. (1998). Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem*, **273**, 8212-6.
- Zhang, G., Gurtu, V. & Kain, S.R. (1996). An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **227**, 707-11.
- Zimmer, M. (2002). Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev*, **102**, 759-81.

## Danksagung

*Mein herzlicher Dank gilt:*

Frau Dr. Sabine Bauer für die Überlassung des Themas und ihr Vertrauen in mich.  
Ich wünsche ihr alles Gute für ihre junge Familie !

Herrn Dr. Tobias Schnitzer für die gute Betreuung, die vielen hilfreichen Anregungen und seinen Mut, mich selbständig arbeiten zu lassen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schmahl für die Vertretung dieser Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät, seine stets freundliche Art und die produktive Kritik, die mich immer ein Stück weitergebracht hat.

Besonders auch Frau Jeannine Büttner, Frau Petra Heiden und Frau Liese Lipponer, die mir allzeit hilfreich zur Seite standen und ohne die die Zeit der Doktorarbeit nur halb so schön und heiter gewesen wäre !

Frau Christa Bielmeier, Frau Gabriele Dietmann, Frau Ute Haupt und Herrn Bernhard Kirchner für die Unterstützung in Fragen der Histologie und Immunhistochmie.

Dem gesamten Tierpfleger-Team der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, die mich oft bei meinen Versuchen unterstützt haben und die immer gute Laune verbreitet haben.

Und natürlich allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Pharmakologie der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, die mir in irgendeiner Weise geholfen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie - meinen Eltern und meinem Bruder Frank - die mir das Tiermedizinstudium ermöglicht haben. Sie haben mich stets unterstützt und mir mit Rat & Tat zur Seite gestanden, wenn ich dachte, es geht nicht weiter. Sie haben mir immer das Gefühl gegeben, dass ich die richtigen Entscheidungen treffe.

Und Markus, der immer für mich da war, meine Launen immer geduldig ertragen hat und mir immer wieder den Rücken gestärkt hat ! Schön, dass es Dich gibt !

Und ohne Tanja wäre ich sicher noch häufiger vor dem Computer verzweifelt.  
Danke für die zahlreichen Tips & Tricks und die lieben „Ablenkungen“ !

## Lebenslauf

**Kirsten Melanie Dettmar** geboren am 19.08.1973 in Soest/Westfalen

**Eltern** Wolfgang Dettmar  
Brunhilde Dettmar, geb. Laubner

**Schulbildung** 1980 – 1984 Bruno - Grundschule in Soest  
1984 – 1994 Aldegrevener - Gymnasium in Soest  
Abschluss: Abitur am 30. Mai 1994

**Studium** WS 94/95 – Juli 2000 Studium der Tiermedizin,  
Tierärztliche Hochschule Hannover  
3. Staatsexamen bestanden am 7. Juli 2000  
Gesamtergebnis der Tierärztlichen Prüfung: *Gut*

**Approbation** 25. Juli 2000

**Dissertation** September 2000 – Oktober 2002  
Anfertigung der vorliegenden Dissertation als  
Doktorandin der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg