

Humane Alu-Sequenzen als Surrogat-Marker für die Metastasierung in humanen Xenograft-Tiermodellen

**Ein neuer Ansatz für den quantitativen Nachweis humaner Tumorzellen in
Xenograft-Modellen mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR**

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Tanja Schneider
aus Lagerlechfeld

Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik

2002

Diese Arbeit wurde am Forschungszentrum der Roche Diagnostics GmbH, Penzberg unter Anleitung von Dr. Werner Scheuer durchgeführt.

Eingereicht am 20. Juni 2002

Erstgutachter: Prof. Dr. E. H. Weiß

Zweitgutachter: PD Dr. Rainer Maier

Sondervotum: Dr. W. Scheuer

Tag der mündlichen Prüfung: 29. November 2002

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Therapie maligner Erkrankungen	3
2.2	Präklinische Tierversuche	5
2.3	Die Auswertung präklinischer Tiermodelle	6
2.4	Alu-Sequenzen	8
2.5	Der quantitative Nachweis humaner Alu-Sequenzen	10
2.6	Fragestellung dieser Arbeit	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Material	13
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	13
3.1.2	Geräte	14
3.1.3	Puffer und Medien	15
3.1.4	Fertige Lösungen und Reaktionssysteme	15
3.1.5	Anti-tumorale Substanzen	16
3.1.6	Verwendete Oligonukleotide	16
3.1.7	Zelllinien	16
3.1.8	Mausstämme	17
3.1.8.1	SCID	17
3.1.8.2	SCID beige (C.B.-17/GbmsTac- <i>scid</i> -bgfDF N7)	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Zellbiologische Methoden	18
3.2.1.1	Zellkultur	18
3.2.1.2	Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen	18
3.2.2	Isolierung genomischer DNA	18
3.2.2.1	aus Zellen	18
3.2.2.2	aus Blut	19
3.2.2.3	aus Gewebe	19
3.2.2.4	aus Paraffinschnitten	20
3.2.3	Die DNA-Quantifizierung	20
3.2.4	PCR mit dem LightCycler™-System	20
3.2.4.1	Das Prinzip des LightCycler™-Systems	20
3.2.4.2	SYBR Green I-Farbstoff	22
3.2.4.3	Die Quantifizierung des PCR-Produktes	23
3.2.4.4	Schmelzkurven-Analyse	25
3.2.4.5	Durchführung	26
3.2.5	Definition der Standardkurve	27
3.2.6	FACS-Analyse von GFP-transfizierten Zellen	28
3.2.7	WST-1 Proliferationstest	28
3.2.8	Tierversuche	28
3.2.8.1	Markierung der Versuchstiere mit Transponder-Chips	28
3.2.8.2	Darmkrebs-Modell HT29	28
3.2.8.3	Lungenkrebs-Modell H460M2	29
3.2.8.4	orthotopes Pankreas-Krebs Modell: PancTu-1	29
3.2.9	Histologische und immunhistochemische Analyse	30
3.2.9.1	Gewebefixierung und Dünnschnitte für die histologische Auswertung	30
3.2.9.2	H & E Färbung	30
3.2.9.3	Immunhistologischer Nachweis von Ki-67	31

3.2.9.4	Bestimmung der Metastasenfläche von histologischen und immun-histologischen Präparaten.....	31
3.2.9.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	32
3.2.10	Makroskopisch-anatomische Auswertung der Metastasen.....	32
3.2.11	Statistische Auswertung.....	33
4	Ergebnisse.....	34
4.1	Evaluierung der Alu-PCR mit dem LightCycler™-System.....	34
4.1.1	Auswahl der Oligonukleotide.....	34
4.1.2	Bestimmung des Alu-Gehalts in verschiedenen Tumorzelllinien.....	36
4.1.3	Bestimmung der Nachweisgrenze in vitro durch Zellmischungsversuche.....	37
4.1.4	Bestimmung der Nachweisgrenze ex vivo.....	39
4.2	Evaluierung der Alu-PCR in verschiedenen Xenograft-Tumormodellen.....	40
4.2.1	Das Darmkrebs-Modell HT29.....	41
4.2.2	Das Lungenkrebs-Modell H460M2.....	45
4.2.2.1	Kinetik der Metastasierung in der Lunge.....	45
4.2.2.2	Untersuchung des Einflusses von Taxol und RO28-2653 auf die Metastasierung.....	47
4.2.2.3	Bestimmung der Kinetik der Metastasierung nach Behandlung mit RO28-2653.....	53
4.2.3	Das orthotope PancTu-Modell.....	65
4.2.3.1	Bestimmung des Metastasierungsverhaltens von PancTu-1 Zellen in einer Maus.....	66
4.2.3.2	Quantitative Alu-PCR aus Paraffinschnitten und Vergleich mit der histologischen Detektion der Metastasen.....	67
4.2.3.3	Die inhibierende Wirkung von Gemcitabine auf die Metastasierung im PancTu1-Modell.....	70
4.2.4	Das H460M2-GFP Modell.....	71
4.2.4.1	Der Nachweis von H460M2-GFP transfizierten Zellen mittels FACS-Analyse.....	72
4.2.4.2	Vergleich der Wachstumskinetik von H460M2-GFP- und H460M2-wt-Zellen in vitro (WST-1 Test).....	73
4.2.4.3	Wachstumskinetik und Metastasierung von H460M2- und H460M2-GFP transfizierten Zellen in vivo.....	74
4.3	Nachweis von humanen Alu-Sequenzen im Blut.....	79
4.3.1	Bestimmung der Nachweisgrenze von humanen Tumorzellen im Blut.....	79
4.3.2	Nachweis von humanen Tumorzellen im Blut und in der Lunge nach i.v. Injektion: Kinetik.....	80
5	Diskussion.....	82
5.1	Problemstellung.....	82
5.2	Etablierung der quantitativen Alu-PCR.....	83
5.3	Nachweis humaner Alu-Sequenzen in verschiedenen Organen der Maus.....	86
5.4	Nachweis der Wirksamkeit von anti-metastasierenden Substanzen mittels quantitativer Alu-PCR.....	88
5.5	Alu-Sequenzen als Surrogat-Marker von humanen Tumorzellen in Tiermodellen?.....	91
5.6	Schlussbetrachtung.....	93
6	Literaturverzeichnis.....	94

7	Anhang	99
7.1	Abkürzungen.....	99
7.2	Sequenz des Alu-PCR-Produkts.....	100
7.3	Sequenzvergleich des PCR-Produkts der Alu-PCR mit Konsensussequenzen anderer Alu-Familien	101

1 Zusammenfassung

Die therapeutische Wirksamkeit neuer Substanzen, die die Metastasierung inhibieren, wird in präklinischen Modellen durch die makroskopische oder histologische Bestimmung des Metastasegehalts in den betroffenen Organen ermittelt. Erstere berücksichtigt jedoch nur Metastasen an einer Organoberfläche, so dass Metastasen, die sich innerhalb des betroffenen Organs manifestieren, nicht in die Bewertung miteinbezogen werden. Für eine histologische Bestimmung werden in der Regel drei bis fünf Organschnitte analysiert. In Tumormodellen mit geringem Metastasierungspotential besteht hierbei die Gefahr, dass Metastasen übersehen werden. Somit haben die genannten Auswerteverfahren ihre Limitationen. Eine neue sensitive Methode, die quantitative Aussagen über den Metastasegehalt in einem Organ ermöglicht, ist aus diesem Grund dringend erforderlich. Der quantitative Nachweis von humanen Alu-Sequenzen, die in einer hohen Kopienzahl in der Zelle vorliegen, umgeht die oben beschriebenen Schwierigkeiten.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich humane Alu-Sequenzen als Marker eignen, um menschliche Tumorzellen in Xenograft-Modellen nachzuweisen. Hierfür wurde eine quantitative Alu-PCR mit dem LightCycler™ System etabliert, das die Durchführung und anschließende Auswertung der PCR-Reaktion in weniger als 30 min ermöglicht.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass

1. 100 humane Tumorzellen in einer Maus-Lunge nachgewiesen werden können.
2. das Alu-Signal in der Lunge im spontanen Metastasierungsmodell H460M2 über die Zeit zunimmt. Hierfür wurden die humanen Tumorzellen H460M2 in die hintere Fußpfote von SCID beige Mäusen injiziert, nach 21 Tagen der Primärtumor entfernt und nach weiteren 7, 14 und 21 Tagen der Metastasegehalt in den Lungen mittels der quantitativen Alu-PCR bestimmt.
3. die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR in vier Tumormodellen (Lunge, Brust, Kolon und Pankreas) eine hohe Korrelation sowohl mit dem immunhistologischen als auch mit dem histologischen Nachweis der Metastasen aufwies. Des Weiteren stimmte die Alu-Signal-Intensität der DNA, die aus Paraffinschnitten isoliert wurde, sehr gut mit der Expression des histologischen Markers Ki-67 überein.
4. die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR die inhibierende Wirkung auf den Primärtumor und die Metastasierung von therapeutisch wirksamen Substanzen wiedergeben.

Für drei Zytostatika (Taxol, Gemcitabine und 5-Fluorouracil) und RO28-2653, ein Matrixmetalloproteinase-Inhibitor, der sich in der präklinischen Entwicklungsphase befindet (MMP-Inhibitor RO28-2653), konnte eine Abnahme der Alu-Signalstärke ermittelt werden. Zusätzlich wurde der Metastasegehalt histologisch und für

RO28-2653 im H460M2-Modell auch makroskopisch bestimmt. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine gute Übereinstimmung der verschiedenen Auswerteverfahren.

5. humane Alu-Sequenzen im Blut von Mäusen, denen Tumorzellen intravenös appliziert wurden, nachgewiesen werden konnten.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass der quantitative Nachweis von humanen Tumorzellen in Xenograft-Modellen mit Hilfe der Alu-PCR eine schnelle und sensitive Methode ist, um die therapeutische Wirksamkeit von anti-metastasierenden Substanzen zu bestimmen.

2 Einleitung

In Deutschland erkranken nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts jährlich 350.000 Menschen neu an Krebs; über 210.000 starben 1999 an den Folgen einer Tumorerkrankung. Krebs ist damit nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Die häufigsten Krebsarten des Mannes sind Prostata-(31.500), Lungen- (27.800) und Darmkrebs mit 15.100 jährlich Neuerkrankten. Die häufigsten Neuerkrankungen bei den Frauen waren 1998 Brust- (46.300), Darm- (19.200) und Gebärmutterkrebs (17.100). Des Weiteren stellte Lungenkrebs 1999 die häufigste Todesursache bei Krebserkrankungen dar, so starben 28.200 der Patienten mit dieser Neoplasie.

Dennoch ist die häufigste Todesursache bei Patienten mit soliden Tumoren nicht das Wachstum des Primärtumors, sondern vielmehr die Ausbildung von Metastasen in sekundären Organen. Zum Zeitpunkt der Diagnose eines soliden Tumors, haben 30 % der Patienten klinisch nachweisbare Metastasen. Von den verbleibenden 70 % haben zu diesem Zeitpunkt nahezu die Hälfte der Patienten schon Mikrometastasen, die jedoch erst zu einem späteren Zeitpunkt manifest werden (Rasmussen und McCann, 1997).

Aus diesem Grund werden in der Onkologie große Anstrengungen unternommen, um neue Therapieformen zu entwickeln, die vor allem den Prozess der Metastasierung inhibieren.

2.1 Therapie maligner Erkrankungen

Das größte Problem in der klinischen Behandlung von Krebs ist die Heterogenität der Tumorzellen. Bereits zum Zeitpunkt der Diagnose enthalten Tumore eine Vielzahl verschiedener Zellpopulationen, die sich hinsichtlich ihrer Wachstumsraten, Karyotypen, Zelloberflächeneigenschaften, Sensitivität gegenüber zytotoxischen Substanzen und ihrer Fähigkeit zu metastasieren, unterscheiden (Fidler, 1999). Dies führt dazu, dass Krebszellen, die dem Selektionsdruck am besten widerstehen, zu einem späteren Zeitpunkt Metastasen an anderen Orten ausbilden können. Die Behandlung dieser Metastasen kann jedoch nur mit aggressiven, systemischen Chemotherapien durchgeführt werden, da eine operative Entfernung der Metastasen nicht möglich ist (Dimitroff et al., 1998).

Eine zentrale Rolle bei der Tumorprogression spielt die Angiogenese bzw. Neovaskularisierung. Überschreitet ein Tumor einen Durchmesser von 1 bis 2 mm, sind neue Blutgefäße notwendig, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Unter physiologischen Bedingungen besteht zwischen Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese ein ausgewogenes und reguliertes Gleichgewicht. In Tumoren ist dieses Gleichgewicht jedoch gestört (Hanahan und Folkman, 1996) und bietet einen vielversprechenden Ansatz für zahlreiche neuartige Wirksubstanzen, die diesen als

„*angiogenic switch*“ bezeichnet Prozess verhindern. In präklinischen Versuchen zeigen solche Substanzen gegenüber den konventionellen Zytostatika eine geringere Toxizität und verhindern die Ausbildung von Therapeutikaresistenzen (Wyke, 2000; Zetter, 1998).

Im folgenden sind die Substanzen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, aufgeführt und ihr Wirkmechanismus beschrieben.

Taxol ist ein Zytostatikum, das bereits für die Behandlung von Brust-, Lungen- und Ovarialkarzinome eingesetzt wird. Es bindet an die β -Untereinheit von Tubulin, so dass stabile, funktionslose Mikrotubuli gebildet werden und somit die Mitose verhindert wird. Daneben konnte für Taxol gezeigt werden, dass es Apoptose induziert und auch einen hemmenden Einfluss auf die Angiogenese aufweist (Crown und O'Leary, 2000; Horwitz, 1992).

5-Fluorouracil (5-FU) gilt als die erste Wahl für die Behandlung von Patienten mit Kolonkrebs. Es übt seinen zytotoxischen Effekt durch die Inhibition der Thymidylat-Synthase aus. 5-FU kann auch in die RNA oder DNA eingebaut werden, was aber für die klinische Aktivität eine geringere Bedeutung hat. Somit ist 5-FU ein DNA-Synthese-Inhibitor, der zudem auch einen Effekt auf die RNA und Proteinsynthese hat (Bulusu, 1998; van Laar et al., 1998).

Ein neueres Zytostatikum, das bereits in der Klinik für die Behandlung von Pankreaskrebs eingesetzt wird, ist **Gemcitabine**. In klinischen Studien der Phase II konnte für Gemcitabine zudem eine anti-tumorale Wirkung bei Ovarialkarzinomen und bei Lungen- und Brustkrebs beobachtet werden. Gemcitabine ist ein Desoxy-Cytidin-Analog, das intrazellulär durch die Desoxycytidin-Kinase phosphoryliert und somit in seine aktive Form Difluorodesoxycytidin-Triphosphat umgewandelt wird. Das Triphosphat konkurriert mit den Desoxycytidin-Triphosphaten um den Einbau in die DNA. Gemcitabine stimuliert ebenfalls die intrazelluläre Desoxycytidin-Kinase-Aktivität und inhibiert die Ribonukleotid-Reduktase, was zu einer Abnahme der intrazellulären dNTP-Konzentration führt (Gunzburg und Salmons, 2001; Plunkett et al., 1995; Seidman, 2001).

Eine weitere, neue Substanz, deren Einfluss auf die Metastasierung auch in dieser Arbeit untersucht wurde, ist der **Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor (MMPI) RO28-2653**. Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind eine Familie von Proteinasen, mit bisher 16 identifizierten Mitgliedern. Sie scheinen bei der Entstehung, Wachstum, Angiogenese von Tumoren und bei der Metastasierung eine große Rolle zu spielen (Maekawa et al., 2000). In zahlreichen präklinischen und klinischen Studien konnte eine erhöhte MMP-Aktivität in Zusammenhang mit der Invasivität und dem Metastasierungspotential von Krebserkrankungen gebracht werden (Yu et al., 1997). MMP stellen aus diesem Grund ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Substanzen dar. Einige der MMP-Inhibitoren, wie Prinomastat (Agouron Pharmaceuticals) oder Marimastat (British Biotech), befinden sich bereits in klinischen Studien

(Hidalgo und Eckhardt, 2001). Der in dieser Arbeit eingesetzte MMP-Inhibitor RO28-2653, hemmt spezifisch die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9. In verschiedenen Tumormodellen konnte durch RO28-2653 sowohl das Tumorwachstum als auch die Metastasierung gehemmt werden (Pers. Mitteilung T. Frieß).

2.2 Präklinische Tierversuche

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben präklinische Modelle etabliert, die Aussagen über den Einfluss von neuen Substanzen auf die Metastasierung erlauben. So stellen immundefiziente Mäuse, wie SCID, SCID beige oder Nacktmäuse, attraktive Modelle für die Untersuchung des Wachstums- und Metastasierungsverhalten von humanen Tumorzellen *in vivo* dar. (Garofalo et al., 1993; Mitchell und Schumacher, 1997)

Der Applikationsort der Tumorzellen ist von großer Bedeutung für das Metastasierungs geschehen. Die intravenöse Applikation und die anschließende Bestimmung der Anzahl der Metastasen in dem Zielorgan, wie z. B. der Lunge, ist eine einfache und verlässliche Methode für die Bestimmung des Wachstums der Tumorzellen in einem bestimmten Organ (Price, 1990). Da bei diesem Ansatz die Tumorzellen hochkonzentriert, meist 100.000 Zellen, direkt in die Blutbahn injiziert werden, entstehen artifizielle Metastasen, da die Tumorzellen im Gefäßsystem von Lunge oder Leber hängen bleiben. Aus diesem Grund wurden Tumormodelle, bei denen humane Tumorzellen subkutan injiziert wurden und die zur Ausbildung von spontanen Metastasen führten, als geeigneter betrachtet (Condeelis et al., 2000; Mitchell et al., 1997; Mitchell und Schumacher, 1997).

Viele humane Tumorzellen führen nach subkutaner Injektion zu einer spontanen Metastasierung, wobei jedoch nur vereinzelte Metastasen ausgebildet werden (Garofalo et al., 1993). Eine Erhöhung der Metastasierungsrate durch eine Verlängerung der Studie ist in den meisten Fällen nicht möglich, da die Tumoren ein aggressives Wachstum aufweisen und der Versuch bei entsprechender Größe der Primärtumore in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz beendet werden muss. Die operative Entfernung des Primärtumors ist mittlerweile eine weitverbreitete und etablierte Methode und ermöglicht die Verlängerung der Versuchsdauer von *in vivo*-Studien. Jedoch variieren Anzahl und Größe der makroskopisch sichtbaren Metastasen auf der Oberfläche eines Organs so stark, dass viele Tiere in eine Studie eingesetzt werden müssen, um statistisch signifikante Aussagen über die Wirksamkeit einer Substanz zu erhalten (Garofalo et al., 1993; Jojovic und Schumacher, 2000).

Eine Alternative ist die orthotope Applikation der Tumorzellen. Hierbei werden die Zellen in das Organ implantiert werden, aus dem sie ursprünglich stammten. In verschiedenen Modellen konnte gezeigt werden, dass das Tumorwachstum bei orthotoper Applikation im Gegensatz zu ektopen Tumoren eine höhere Metastasierungsrate zur Folge hat. Die orthotope Transplantation von Tumorzellen ist eine reproduzierbare und verlässliche Methode für die

Untersuchung der therapeutischen Effizienz neuer Substanzen (Killion et al., 1998; Price et al., 1990).

2.3 Die Auswertung präklinischer Tiermodelle

Die Auswertung von tierexperimentellen Studien in Hinblick auf den Grad der Metastasierung in einem Organ erfolgt in der Regel über die histologische Bestimmung des Metastasegehalts in den entsprechenden Zielorganen. Hierfür werden zwei bis fünf Gewebeschnitte in verschiedenen Schnittebenen histologisch angefärbt. Die Metastasen werden aufgrund ihrer Größe in verschiedene Klassen eingeteilt und gezählt. Diese Vorgehensweise kann dazu führen, dass abhängig von der Schnittebene vor allem kleine Metastasen nicht gewertet werden (McKenzie et al., 1991; Shoemaker et al., 1992). Zudem konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Metastasen in einem Organ nicht gleichverteilt sind (Jojovic und Schumacher, 2000). Aus diesem Grund müssten serielle Schnitte des ganzen Organs untersucht werden, was jedoch zu zeitaufwendig und zu teuer ist (Neulat-Duga et al., 1984). Ein weiterer Nachteil der histologischen Auswertung ist, dass die Klassifizierung und Bewertung der Metastasen vom jeweiligen Betrachter abhängig ist und es zu Diskrepanzen kommen kann, wenn zwei Personen unabhängig voneinander eine tierexperimentelle Studie histologisch auswerten.

Bei einigen Metastasierungsmodellen wird der Grad der Metastasierung in einem Organ konventionell durch die makroskopisch-anatomische Auswertung der Metastasen bestimmt.

Nach Versuchsende werden hierfür die entsprechenden Organe der Tiere entnommen und fotografiert. Diese Fotos werden anschließend EDV-gestützt ausgewertet. Hierzu wird die größte Dimension einer Metastase gemessen und daraus das Kugelvolumen berechnet, aus dem auf das Gewicht einer Metastase geschlossen werden kann. Durch Aufsummieren der einzelnen Werte kann dann die Gesamtmasse an humanen Tumorzellen in einem Organ ermittelt werden. Dies ist zwar eine einfache Methode, um die Tumorlast in einem Organ zu quantifizieren, sie weist aber einige Mängel bzw. Limitationen auf.

So wird davon ausgegangen, dass die Metastasen kugelförmig und voneinander abgegrenzt sind. Dies ist nur begrenzt gültig, da oft beobachtet werden kann, dass die Metastasen Ausläufer bilden oder so mit dem umliegenden Gewebe verwachsen sind, dass sie nicht mehr zweifelsfrei identifiziert werden können. Wenn ein Organ von sehr vielen Metastasen übersät ist, ist die Auswertung sehr mühsam und in ihrer Aussagekraft limitiert. Die wohl bedeutendste Einschränkung besteht jedoch darin, dass nur Metastasen auf der Organoberfläche ausgewertet werden und somit diejenigen, die sich im Inneren befinden, nicht berücksichtigt werden. Nielsen et al. (2001) konnten zeigen, dass zwischen den an der Oberfläche befindlichen Metastasen und deren Gesamtzahl nur eine geringe Übereinstimmung besteht.

Hinzu kommt, dass die Bestimmung der makroskopisch sichtbaren Metastasen vom jeweiligen Betrachter abhängig ist und zu einer unterschiedlichen Bewertung führen kann.

Um ein genaueres und umfassenderes Bild der Ausbreitung der Tumorzellen in verschiedene Organe zu bekommen, wurden Tumorzellen mit Reporter Genen transfiziert, deren Expression den Nachweis von Metastasen *in vivo* ermöglicht.

In ersten Versuchsansätzen wurde das *E. coli* β -Galaktosidase-Gen verwendet, um Mikrometastasen nachzuweisen. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass für die Detektion von lacZ-Transfektanden eine intensive histologische Präparation des Gewebes nötig ist und die endogene β -Galaktosidase-Aktivität hohe Hintergrund-Signale verursacht (Lojda, 1970).

Proteine, wie die aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* stammende Luciferase, werden *in vivo* als Reporter Gene für die Bestimmung des Tumorwachstums eingesetzt. Für den Nachweis der Biolumineszenz in den Tumorzellen, muss das Substrat Luciferin in hohen Konzentrationen (150 mg/kg Körpergewicht) exogen zugegeben werden, um die enzymatische Reaktion zu ermöglichen. In lebenden Tieren wird das Luciferin intraperitoneal verabreicht. Die Signale können dann in verschiedenen Geweben gleichzeitig nachgewiesen werden (Contag et al., 2000; Edinger et al., 1999). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass neben der kurzen Halbwertszeit, die Signalstärke gering ist und es somit sehr zeitaufwendig ist, die Bilder der narkotisierten Tiere aufzunehmen. Auch die geringe Auflösung der erzeugten Bilder ermöglicht keine genaue Lokalisierung der Tumorzellen im Organismus (Hoffman, 2001).

Ein weiteres Reporterprotein, das zunehmend Verwendung für den Nachweis von Tumorzellen *in vivo* findet, ist das grüne Fluoreszenz-Protein (GFP), das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde. Gegenüber anderen Reporter Genen zeichnet es sich durch eine höhere Spezifität und Auflösung aus. Die GFP-cDNA kodiert für ein Monomer, bestehend aus 283 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 27 kDa. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Luciferase benötigt das GFP weder zusätzliche *Aequorea*-Proteine, noch Substrate oder Co-Faktoren um fluoreszieren zu können. Jedoch konnten Coralli et al. (2001) zeigen, dass unter Hypoxie-Bedingungen, was ein weitverbreitetes Kennzeichen von experimentellen Tumoren ist, die Fluoreszenz des GFP-Proteins abnahm. Neben dem Wildtyp-GFP wurden mittlerweile auch zahlreiche Mutanten entwickelt, wie z.B. das EGFP, das sich durch eine erhöhte Thermostabilität und Fluoreszenz auszeichnet (Hoffman, 2001). Die Einsatzmöglichkeiten des GFP sind sehr vielfältig. Neben dem Nachweis der Expression verschiedener Gene in lebenden Zellen oder Gewebe, kann auch die subzelluläre Lokalisation und Wanderung einzelner Proteine oder ganzer Zellen (z.B. Tumorzellen) untersucht werden. Einige generelle Limitationen ergeben sich bei der Verwendung von Reporter Genen. So kann die Expression der integrierten Gene mit zunehmender Zeit abnehmen (Migliaccio et al.,

2000), oder sich das Metastasierungsverhalten der markierten Zellen in vivo verändern. Die Reportergene benötigen einen starken Promotor, der eine konstitutionelle Expression ermöglicht. Walter et al. (2000) konnten jedoch zeigen, dass das EGFP unter Kontrolle des CMV-Promotors Gewebe-abhängig exprimiert wurde. Die EGFP-Expression wies signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Organen auf. Der wohl entscheidende Nachteil dieser Reportergene ist, dass sie für exakte quantitative Aussagen bezüglich des Ausmaßes der Metastasierung nicht geeignet sind.

Die Verwendung einer sensitiven, quantitativen molekularbiologischen Methode für die direkte Bestimmung der Tumorinzidenz in einem Organ umgeht die oben erwähnten Nachteile. Der in dieser Arbeit beschriebene Ansatz geht von dem quantitativen Nachweis humaner Alu-Sequenzen in Xenograftmodellen mittels quantitativer Alu-PCR aus.

2.4 Alu-Sequenzen

Alu-Sequenzen gehören zur Familie der mittel-repetitiven DNA-Sequenzen im humanen Genom. Ca. 1×10^6 Kopien befinden sich im haploiden Genom, was in etwa einem Anteil von 5 % der gesamten Masse der DNA entspricht. Ihr Name leitet sich von dem Restriktionsenzym *AluI* ab, das in der Alu-Konsensussequenz schneidet (Kariya et al., 1987).

Die Alu-Sequenzen weisen eine Länge von ca. 300 bp auf und setzen sich aus zwei ähnlichen Monomeren zusammen, die über einen Oligo-dA-Bereich miteinander verbunden sind. Beide Hälften (Alu-links und Alu-rechts) weisen eine große Ähnlichkeit mit der 7SL-RNA auf. Ein Modell für die Entstehung der ersten Alu-Sequenzen ist in der Publikation von Mighell, Markham und Robinson (1997) wiedergegeben. Das erste Alu-Monomer (FAM) ist durch eine Deletion der zentralen S-Domäne der 7SL-RNA und der Addition eines 3'-d(A)-Bereichs entstanden, wobei letzterer die reverse Transkription von RNA-Polymerase-III-Transkripten erleichterte. Aus diesem FAM entwickelte sich durch eine 42-bp-Deletion zum einen der freie linke Arm des Monomers (FLAM), und zum anderen durch eine 11-bp-Deletion der freie rechte Arm des Monomers (FRAM). Durch die Dimerisierung der beiden Monomere entstanden die ersten Alu-Sequenzen (Mighell et al., 1997).

Die Alu-Sequenzen werden entsprechend ihres phylogenetischen Alters in drei Unterfamilien – alte (J) – mittlere (S) – und junge Alu-Familien (Y)- eingeteilt, die wiederum aus mehreren Mitgliedern bestehen und in Abbildung 1 dargestellt sind (nach Mighell et al., 1997).

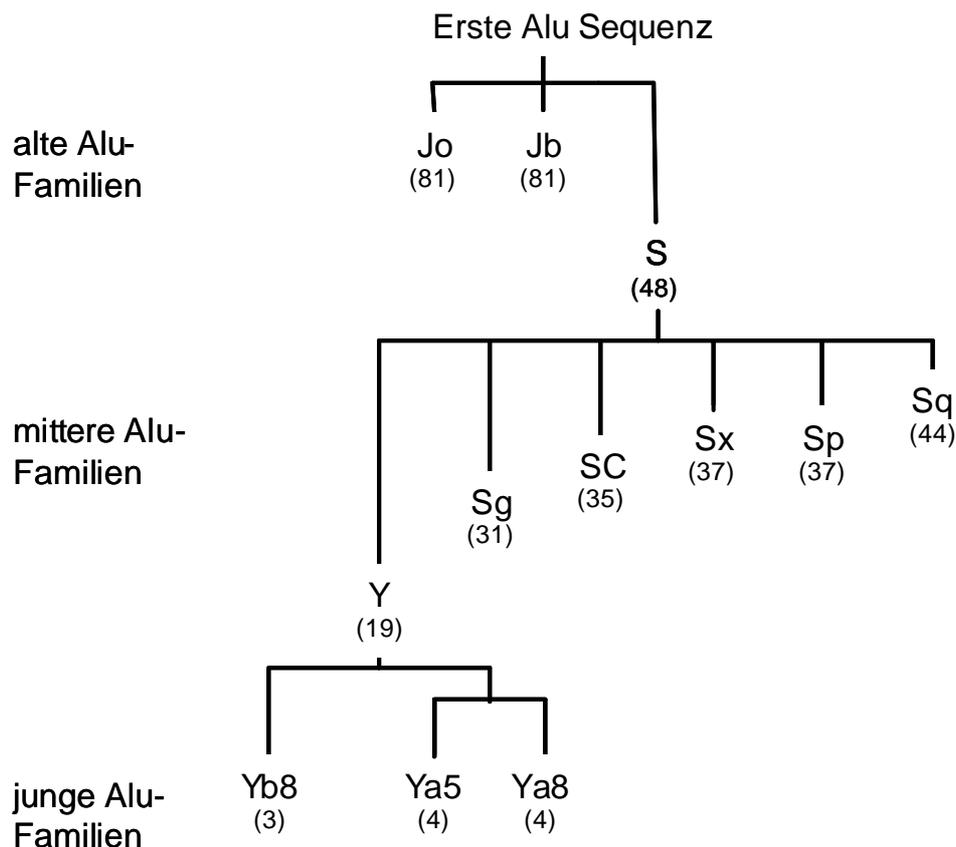


Abbildung 1: Die phylogenetische Entwicklung der 12 Alu-Unterfamilien

Die Zahlen in Klammern geben das geschätzte Alter (in Millionen von Jahren) für die Insertion der verschiedenen Subfamilien in das menschliche Genom wieder. (Mighell et al., 1997)

Alu-Sequenzen sind spezifisch für Primaten. In Nagern gibt es zwar homologe repetitive Elemente, die mit B1 bezeichnet werden. Sie sind im Verlauf der Evolution jedoch unabhängig von den humanen Alu-Sequenzen entstanden.

Die biologische Bedeutung der Alu-Sequenzen ist bisher nicht geklärt. Die erste Hypothese, die über die Funktion der Alu-Sequenzen aufgestellt wurde, war, dass sie Ursprünge der DNA-Replikation seien (Jelinek et al., 1980). Dies ist konsistent mit ihren hohen Kopienzahlen und ihrer weiten Verbreitung. Jedoch konnte diese Annahme in Experimenten nicht bestätigt werden. Außerdem scheint diese Funktion zu wichtig, als dass sie von Elementen, die nur bei den Primaten vorkommen, übernommen werden kann. Eine neuere Theorie besagt, dass die Alu-RNA die Protein-Translation durch eine Hemmung der RNA-abhängigen Protein-Kinase (PKR) stimuliert (Chu et al., 1998). Wenn das die Funktion der Alu-Sequenzen ist, müsste diese in Nicht-Primaten von anderen RNA oder Molekülen übernommen werden. In Hefe konnte unlängst gezeigt werden, dass retrotransposable Elemente an der Heilung von Chromosomenbrüchen beteiligt sind. Eine ähnliche Rolle könnten die Alu-Sequenzen im menschlichen Genom übernehmen (Garfinkel, 1997). Zahlreiche Überlegungen gehen davon

aus, dass Alu-Sequenzen in der Evolution des menschlichen Genoms eine Rolle gespielt haben. So kann die Insertion von Alu-Elementen zu ungleichen Rekombinationen führen, was wiederum eine Deletion oder Duplikation von Sequenzen zur Folge hat. Bei interchromosomaler Rekombination können zytogenetische Veränderungen auftreten. Es wurde berichtet, dass die Insertion von Alu-Sequenzen zu Erkrankungen, wie Leukämie, Gebärmutterkrebs, Hämophilie u.ä. führt und dass etwa 0,1 % der humanen genetischen Erkrankungen auf Alu-Elemente zurückgeführt werden kann. Obwohl zahlreiche Fälle beschrieben wurden, bei denen die einzelnen Alu-Sequenzen einen Einfluss auf das humane Genom hatten, scheint keine von diesen die wirkliche Funktion zu sein. So sind weitere Untersuchungen notwendig, um die Bedeutung und Funktion der Alu-Sequenzen zu bestimmen (Deininger und Batzer, 1999; Rowold und Herrera, 2000).

2.5 Der quantitative Nachweis humaner Alu-Sequenzen

Der repetitive Charakter der Alu-Sequenzen wurde bereits für die sensitive Quantifizierung von genomischer DNA in forensischem Probenmaterial ausgenutzt (Waye et al., 1989). McKenzie et al. berichteten erstmals die Verwendung einer ^{32}P -markierten Alu-Sonde für den Nachweis von humaner DNA in einer Mischung aus genomischer DNA von humanen Lungenkrebszellen und Lungen von athymischen Mäusen (McKenzie et al., 1991). Basierend auf dieser Arbeit wurden verschiedene Hybridisierungstechniken entwickelt, die die Quantifizierung von Alu-Sequenzen mit human-spezifischen Sonden in nicht-humanem Gewebe ermöglichten (Shoemaker et al., 1992; Weisberg et al., 1996), jedoch sind die quantitativen Aussagen, die mit dieser Technik erzielt wurden, limitiert. Die Verwendung der Alu-Sequenzen als Template für die PCR-Amplifikation um humane Tumorzellen nachzuweisen, wurde von zwei Arbeitsgruppen beschrieben. Zubair et al. (1996) konnten mit dieser Methode die Kolonisation von Tumorzellen in Milz, Leber und Lunge nach Injektion von humanen Burkitt-Lymphom-Zellen nachweisen. Kim et al. (1998) setzten die PCR-Technik ein, um humane Tumorzellen in einem CAM-Assay, mit dem der Vorgang der Intravasation untersucht werden kann, zu quantifizieren. Nachteile bei diesem Ansatz waren zum einen die Verwendung von ^{32}P -markiertem dCTP und zum anderen die relativ zeitaufwendige Quantifizierung des PCR-Produkts, die über die densitometrische Bestimmung des Hybridisierungssignals erfolgte.

Diese publizierten Daten legen nahe, dass die Verwendung der quantitativen Alu-PCR ein vielversprechender Ansatz ist, um Aussagen über den Metastasegehalt in Xenograft-Modellen machen zu können. In dieser Arbeit wurde das LightCycler™ System für die quantitative Alu-PCR verwendet. Der LightCycler™ ist ein schnelles PCR-Applikations- und Analyse-System. Durch die Zugabe von Fluoreszenz-Farbstoffen zum Reaktionsansatz kann

die PCR-Reaktion in Echt-Zeit und „on-line“ verfolgt werden. Gegenüber der klassischen PCR weist das LightCycler™-System zahlreiche Vorteile auf:

Die LightCycler™-PCR ermöglicht eine wesentlich schnellere Durchführung und Quantifizierung als die konventionelle PCR, da die Reaktionszeiten wesentlich kürzer sind und die Auswertung der PCR-Ergebnisse Computer-gestützt am Bildschirm erfolgt. So kann eine PCR-Reaktion in ca. 30 min durchgeführt und ausgewertet werden.

Ein weiterer Vorteil ist, dass das PCR-Produkt leichter quantifiziert werden kann. Bei der klassischen PCR treten häufig Probleme auf, die darauf zurückgeführt werden können, dass nur wenige Zyklen brauchbare Information für die Quantifizierung enthalten. Während in den frühen Zyklen kein PCR-Produkt nachgewiesen werden kann, ist die Analyse der späten Phase (Plateau-Phase) nicht mehr informativ. Für die Quantifizierung stehen deshalb nur die Zyklen zur Verfügung, bei denen der Gehalt an DNA exponentiell vom Hintergrund bis zum Erreichen des Plateaus ansteigt (Wittwer et al., 1997). Im LightCycler™ System kann dagegen die exponentielle Phase der PCR-Reaktion durch die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz sehr einfach identifiziert werden (Rasmussen und McCann, 1997).

Das LightCycler™-System ist somit das Mittel der Wahl, wenn es darum geht von zahlreichen Proben in kurzer Zeit quantitative Aussagen zu machen.

2.6 Fragestellung dieser Arbeit

In der präklinischen Onkologie sind quantitative Aussagen wichtig, um die Wirksamkeit von neuen Substanzen auf die Metastasierung exakt zu bestimmen. Hierfür werden neue Methoden benötigt, die eine exakte und schnelle Quantifizierung des Metastasegehalts ermöglichen. Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der quantitativen Alu-PCR mit Hilfe des LightCycler™-Systems, um den humanen DNA-Gehalt in Xenograft-Modellen zu bestimmen.

Hierfür mussten folgende Aspekte bearbeitet werden:

- Validierung der quantitativen Alu-PCR mit Hilfe des LightCycler™ Systems
- Anwendung der quantitativen Alu-PCR auf verschiedene Tiermodelle u.a. nach Behandlung mit Zytostatika oder mit dem MMP-Inhibitor RO28-2653
- Vergleich der Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR mit konventionellen Auswerteverfahren
- Eignung der quantitativen Alu-PCR, für die Detektion von humanen Tumorzellen im Blut von tumortragenden Mäusen

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Aluminiumkaliumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampuwa	Fresenius, Hamburg
Antigene Unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame
Antikörper <hu-Cytokeratin 18>	Chemicon, Hofheim
Antikörper <hu-Ki-67>	Dako, Hamburg
Casyton-Lösung	Schärfe-System, Reutlingen
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA Molecular Weight Marker V	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethanol (z. A.)	Merck, Darmstadt
Ethanol (vergällt)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
FKS	PAA Laboratories GmbH, Innsbruck
Formaldehyd, 37 %	Merck, Darmstadt
Formalinlösung, 4 %	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Histomount	Shandon, Frankfurt
Humane genomische DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Isofluran	Baxter, Lessines
Isopropanol	Riedel DeHaen, Seelzer
Natrium-Jodat	Merck, Darmstadt
PBS, 10 x	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
PBS	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pikrinsäure	Merck, Darmstadt
TAE, 10 x	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypsin-EDTA-Lösung (1 x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tween20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame
Wasserstoffperoxid (Perhydrol)	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
Zirkonium-Kügelchen	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

3.1.2 Geräte

Ausbettstation	Tissue-Tek, Niederlande
Brutschrank CO ₂ – Auto-Zero	Heraeus Instruments, Hanau
Casy TTC Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
Dampftopf „Multi-Gourmet“	Braun, Kronberg
Durchflußzytometer (FACScan®)	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Reader Dynatech MR7000	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Einbettautomat	Shandon, Frankfurt
Fluoreszenzmikroskop mit digitalem Aufnahmesystem	Olympus, Japan
Lichtmikroskop mit digitalem Aufnahmesystem AVT Horn MC-3255P	Zeiss, Jena
Minifuge T	Heraeus Instruments, Hanau
LightCycler™	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler™ Kapillaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikrotom	Leica, Bensheim
Mini-beadbeater™	Biospec Products, USA
pH-Meter inoLab	WTW, Wien
Sterilwerkbank	BDK, Reutlingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Victor Multilabel Counter	Wallac, Finnland

3.1.3 Puffer und Medien

RPMI	Biochrom, Berlin
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 2 mM EDTA, pH 7,5
PBS-T	PBS + 0,05 % Tween 20
Bouin`s Lösung	750 ml Pikrinsäure (gesättigte Lösung) 250 ml Formaldehyd, 37 % 50 ml Eisessig
Hämalaun nach Mayer	1,0 g Zitronensäure 1,0 g Hämatoxylin 0,2 g Natriumjodat 50 g Aluminiumkaliumsulfat 50 g Chloralhydrat → ad 1000ml Aqua dest.. (heiß lösen)
1 % Eosin-Lösung	10 g Eosin in 1000 ml Aqua dest. lösen vor Gebrauch 0,3 ml Eisessig zu 200 ml Eosin geben

3.1.4 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme

DAB Substrate Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg
HighPure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LightCycler™-DNA Master SYBR GreenI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
M.O.M.™ Immunodetection Kit	Vector Laboratories, Burlingame USA
PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit	Molecular Probes, Göttingen
WST-1 Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.1.5 Anti-tumorale Substanzen

5-FU	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Gemcitabine	Elli Lilly, USA
Paclitaxel (Taxol)	Alexis, Grünberg
RO28-2653	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3.1.6 Verwendete Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von TIB MOLBIOL, Berlin synthetisiert.

Alu1-f	5'- CTG GGC GAC AGA ACG AGA TTC TAT -3' (Zubair et al., 1996)
Alu1-r	5'- CTC ACT ACT TGG TGA CAG GTT CA -3' (Zubair et al., 1996)
Alu2-f	5'- ACG CCT GTA ATC CCA GCA CTT -3' (Kim et al., 1998)
Alu2-r	5'- TCG CCC AGG CTG GAG TGC A -3' (Kim et al., 1998)
Alu3-f	5'- CAC CTG TAA TCC CAG CAC TTT -3'
Alu3-r	5'- CCC AGG CTG GAG TGC AGT -3'

3.1.7 Zelllinien

	Name	Art	Herkunft
human	H460M2	großzelliges Lungenkarzinom, stark metastasierender Klon	Novus Pharma, Italien
	A549	Lungenkarzinom	NCI, Bethesda USA ATCC: CCL-185
	CorL23	großzelliges Lungenkarzinom	NCI, Bethesda USA ECACC: CCL-185
	HCT116	kolorektales Karzinom	NCI, Bethesda USA ATCC: CCL-247
	HT29	kolorektales Adenokarzinom	NCI, Bethesda USA ATCC: HTB-38
	SW620	Lymphknotenmetastase der kolorektalen Adenokarzinom-zelllinie SW480, Duke's Stadium Typ C	NCI, Bethesda USA ATCC: CCL-227
	MDA-MB435	Duktales Brust-Adenokarzinom	NCI, Bethesda USA; ATCC: HTB-129
	PancTu1	Duktales Pankreas-Adenokarzinom	F. Alves, Universität Göttingen
	DU145	Adenokarzinom der Prostata	NCI, Bethesda USA ATCC: HTB-81
Maus	SCCVII	Plattenepithelkarzinom	C. Johnson u. B. Wollenberg, Universität München

3.1.8 Mausstämme

3.1.8.1 SCID

SCID-Mäuse (=severe combined immune deficiency) zeichnen sich durch eine spontane Mutation im C.B-17/lcr Bereich aus, welche den Locus 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 Immunglobuline und T-Zellrezeptoren verhindert.

SCID-Mäuse haben kaum zirkulierende Lymphozyten und wenig oder keine Serumimmunglobuline (üblicherweise unter 0,02 mg/ml), wogegen die Zahl der Erythrozyten und Neutrophilen im Normalbereich liegt. Lymphknoten und Thymus haben etwa 10 % der normalen Größe, die Milz kann verkleinert sein (M&B Data Sheet).

3.1.8.2 SCID beige (C.B.-17/GbmsTac-*scid-bgf*DF N7)

Diese Inzucht-Doppelmutante trägt sowohl die oben beschriebene SCID-Mutation (siehe 3.1.8.1), die das Fehlen von funktionstüchtigen B- und T-Lymphozyten verursacht, als auch die *beige*-Mutation. Diese führt zu einem defekten Vesikel-Transport von und zu den Lysosomen und Endosomen. Dadurch werden defekte T-Zellen und NK-Zellen gebildet, die selektiv in ihrer biologischen Funktion beeinträchtigt sind (M&B Data Sheet)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellkultur

Alle Zelllinien werden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen werden in RPMI-Medium, das bereits 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natrium-Pyruvat enthält, mit 10 % FKS kultiviert. Da es sich bei den Zelllinien um adhärenz wachsende Zellen handelt, wird das Medium dann erneuert, wenn diese einen nahezu konfluenten Zellrasen gebildet haben. Für die Passagierung und Ernte wird das Kulturmedium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 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 Zellzählgerät.

3.2.1.2 Langzeitlagerung eukaryontischer Zellen

Zellkulturen in der logarithmischen Wachstumsphase (ca. 2×10^5 – 4×10^6 Zellen/ml) werden wie unter 3.2.1.1 beschrieben geerntet. Nach dem Zentrifugieren wird das Zellsediment von je 5×10^5 – 5×10^6 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 einen Einfrierbehälter langsam auf die Lagerungstemperatur von –80 °C gebracht und anschließend in einem Stickstofftank bei –196 °C aufbewahrt.

3.2.2 Isolierung genomischer DNA

3.2.2.1 aus Zellen

Für die Isolierung genomischer DNA aus Zellen wird der HighPure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

Zu 10^4 – 10^5 kultivierten Zellen in 200 μ l PBS wird 200 μ l *Binding Buffer* gegeben und bei 72 °C 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 100 μ l Isopropanol wird der Ansatz auf Glasfaser-Säulen gegeben und bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Säule wird anschließend zweimal mit *Washing Buffer* gewaschen, wobei zwischen den einzelnen Schritten jeweils ein Zentrifugationsschritt (8000 rpm, 1 min) durchgeführt wird. Um den *Washing Buffer* komplett zu entfernen, wird die Säule anschließend für 10 s bei maximaler Geschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert. Für die Elution werden 200 μ l des auf 72 °C vorgewärmten *Elution Buffer* auf die Säule gegeben, eine Minute inkubiert und anschließend bei 8000 rpm, 2 min zentrifugiert.

3.2.2.2 aus Blut

Die Isolierung der genomischen DNA aus Vollblut erfolgt mit dem GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit von Amersham Pharmacia. Die Durchführung wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Vor der Isolierung der DNA werden zunächst die roten Blutkörperchen lysiert. Hierfür wird die dreifache Menge des Probenvolumens an *RBC Lysis Solution* vorgelegt, das Vollblut zugegeben und gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wird der Ansatz bei maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm, 20 s) zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Zellsediment im verbleibenden Puffer resuspendiert. Danach wird 500 μ l *Extraction Solution* zugegeben, gut gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird der Ansatz auf die GFX Säulen gegeben und bei 8000 rpm eine Minute zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wird entfernt, erneut 500 μ l *Extraction Solution* auf die Säule gegeben und die Säule erneut zentrifugiert. Nachdem 500 μ l *Wash Solution* auf die Säule gegeben wurde, wird diese 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Für die Elution der DNA werden 50 μ l vorgewärmtes Wasser auf die Säule gegeben. Die Säule wird 1 min bei RT inkubiert und anschließend bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

3.2.2.3 aus Gewebe

Für die Isolierung genomischer DNA aus Zellen oder Gewebe wird der HighPure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet.

Das Gewebe wird in einem Mini-beadbeater™ mit Silica-Kugeln homogenisiert. Hierfür wird zu jeweils 10 mg Gewebe 40 μ l *Tissue Lysis Buffer* und 8 μ l Proteinase K gegeben und im Mini-beadbeater™ bei höchster Geschwindigkeit für eine Minute homogenisiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei 56 °C kann das Homogenat unmittelbar weiterverarbeitet oder bei –80 °C aufbewahrt werden.

Für die DNA-Isolierung werden 200 μ l Homogenat verwendet, das wie in 3.2.2.1 beschrieben ist, weiterverarbeitet wird.

3.2.2.4 aus Paraffinschnitten

Die DNA-Isolierung aus Paraffinschnitten erfolgt ebenfalls mit dem HighPure PCR Template Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim).

10 µm dicke Paraffinschnitte werden nach dem Schneiden direkt in Eppendorf-Gefäße gegeben, mit 800 µl Xylol versetzt, gut gemischt und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach wiederholter Zugabe von 800 µl Xylol wird 400 µl Ethanol zugefügt und erneut zentrifugiert. Das Gewebesediment wird mit 1 ml 75 %-igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wird 250 µl *Tissue Lysis Buffer* und 0,5 mg/ml Proteinase K zugegeben und ÜN bei 55 °C inkubiert.

Die folgenden Schritte erfolgen nach dem unter 3.2.2.1 beschriebenen Protokoll. Eluiert wird mit 50 µl *Elution Buffer*.

3.2.3 Die DNA-Quantifizierung

Die DNA-Quantifizierung erfolgt mit dem PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit von Molecular Probes.

Die Quantifizierung wird in 96-Loch-Platten durchgeführt. Sie erlaubt die schnelle Auswertung bei zahlreichen Proben. Zunächst wird von der mitgelieferten λ-DNA eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 1 µg/ml, 100 ng/µl, 10 ng/µl, 1 ng/µl and 0 (=Leerwert). In der 96-Loch-Platte werden jeweils 100 µl der Standardkurve und 100 µl der 1:100 verdünnten Proben vorgelegt. Anschließend wird zu jeder Probe 100 µl des 1:200 verdünnten *PicoGreen dsDNA quantitation reagent* gegeben und die Proben werden 5 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Messung erfolgt in einem Fluoreszenz-ELISA-Reader (Extinktion ~480 nm, Emission ~520 nm). Von den gemessenen Werten wird der entsprechende Leerwert abgezogen. Aus der Standardkurve kann dann die Konzentration der einzelnen Proben bestimmt werden. Um Meßungenauigkeiten auszugleichen, wird bei allen Proben eine Doppelbestimmung durchgeführt.

3.2.4 PCR mit dem LightCycler™-System

3.2.4.1 Das Prinzip des LightCycler™-Systems

Das LightCycler™-System ist ein neuartiges Gerät kombiniert aus einem PCR-Cycler und Fluorimeter. Gegenüber der klassischen PCR hat es den Vorteil, dass die Reaktion wesentlich schneller durchgeführt werden kann. Zudem ermöglicht es die zeitgleiche Verfolgung der gesamten PCR-Reaktion am Bildschirm. Die Auswertung erfolgt mit einem

gerätespezifischen Computerprogramm, so dass eine Überprüfung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese nicht mehr notwendig ist.

Der Aufbau des Geräts ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt. Der Aufheiz- und Abkühlprozeß wird durch wechselnde Zufuhr von heißer, bzw. Luft mit Raumtemperatur gesteuert. Im Fluorimeter wird das Licht gefiltert und über eine Linse fokussiert. Die von der markierten Probe ausgesandte Fluoreszenz wird dann von derselben Linse wieder gesammelt, über dichromatische Filter spezifisch gefiltert und an Photohybrid-Detektoren weitergeleitet. Die optische Einheit enthält drei Filter in den Wellenlängen 530, 640 und 710 nm, so dass die Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen, deren Emissionsmaxima bei den entsprechenden Filtern liegt, möglich ist. Je nach Programmtyp kann man wählen zwischen der einmaligen Messung pro Zyklus oder der kontinuierliche Messung.

Die Datenverarbeitung erfolgt mit der gerätespezifischen LightCycler™ Software 3.5, mit der die Ergebnisse der einzelnen Messungen nach jedem Zyklus auf dem Bildschirm dargestellt werden.

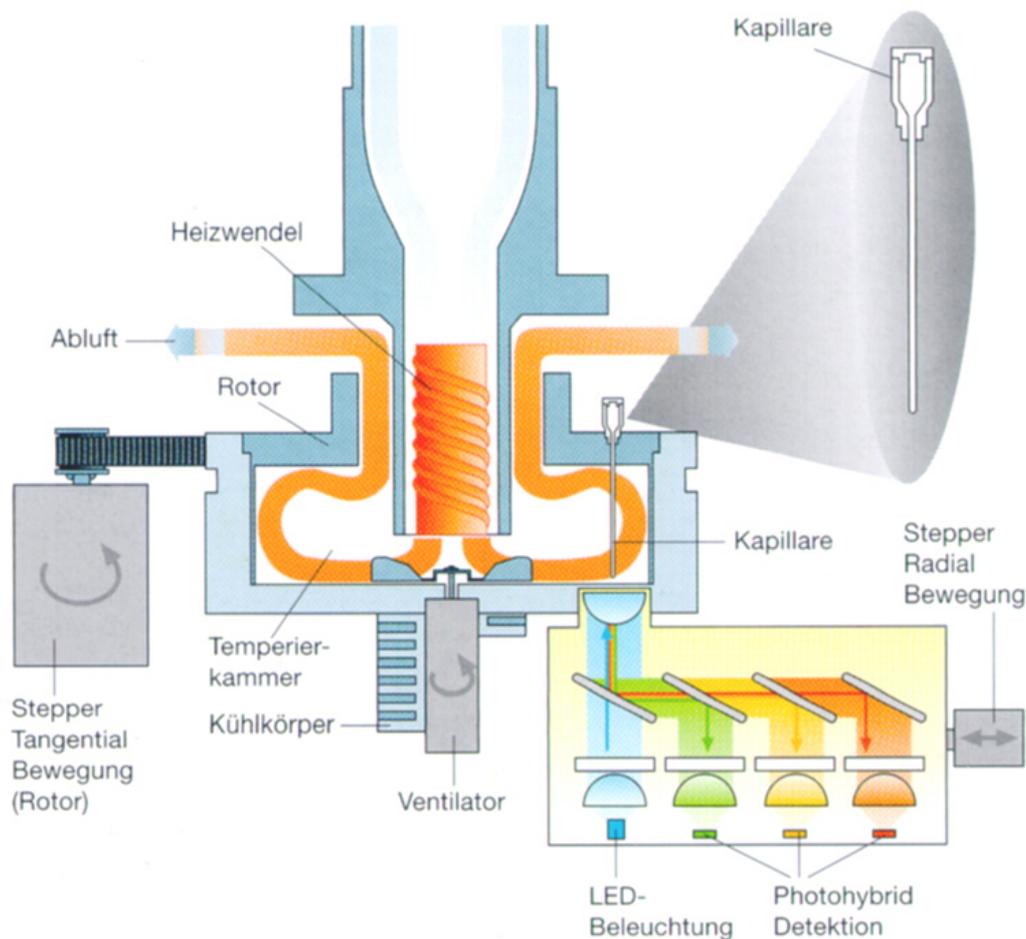


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des LightCycler™-Geräts.

Im oberen Bereich befindet sich die Probenkammer und im unteren Bereich die optische Einheit. Die Glaskapillaren mit den Proben werden in den Rotor gesteckt. Die Luft wird über eine Heizwendel erwärmt und mit dem Ventilator verteilt. Für die Fluoreszenzmessung werden die einzelnen Proben im Rotor mittels eines Stepper-Motors über die optische Einheit gebracht. Die Datenverarbeitung erfolgt on-line mit der gerätespezifischen LightCycler™ Software.

3.2.4.2 SYBR Green I-Farbstoff

Für das LightCycler™-System gibt es zwei verschiedene Fluoreszenz-Techniken, die die Messung der Amplifikationsrate ermöglichen: die „SYBR Green I“ - und die „Hyb-Probe“ – Methode. Da in dieser Arbeit nur erstere verwendet wurde, wird im folgenden lediglich auf diese näher eingegangen.

SYBR Green I, ein interkalierender Farbstoff, bindet nach der Elongationsphase an neu gebildete doppelsträngige DNA und generiert ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur DNA-Konzentration ist (siehe Abbildung 3).

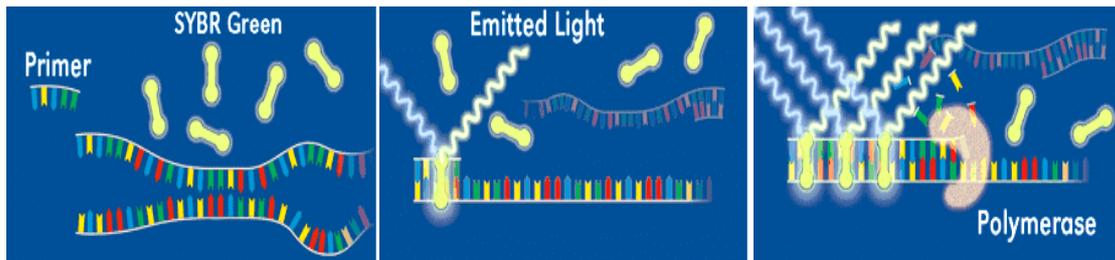


Abbildung 3: Schematische Darstellung der SYBR Green I-Methode.

SYBR Green I bindet während der Elongationsphase an die neugebildete doppelsträngige DNA. Die Fluoreszenzstärke ist direkt proportional zur DNA-Konzentration.

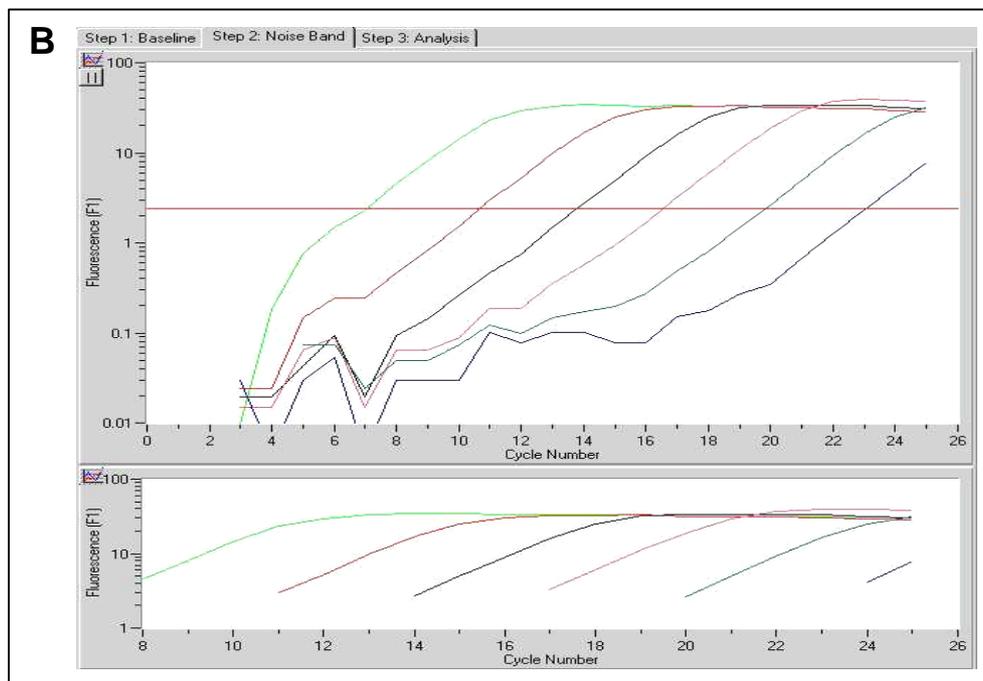
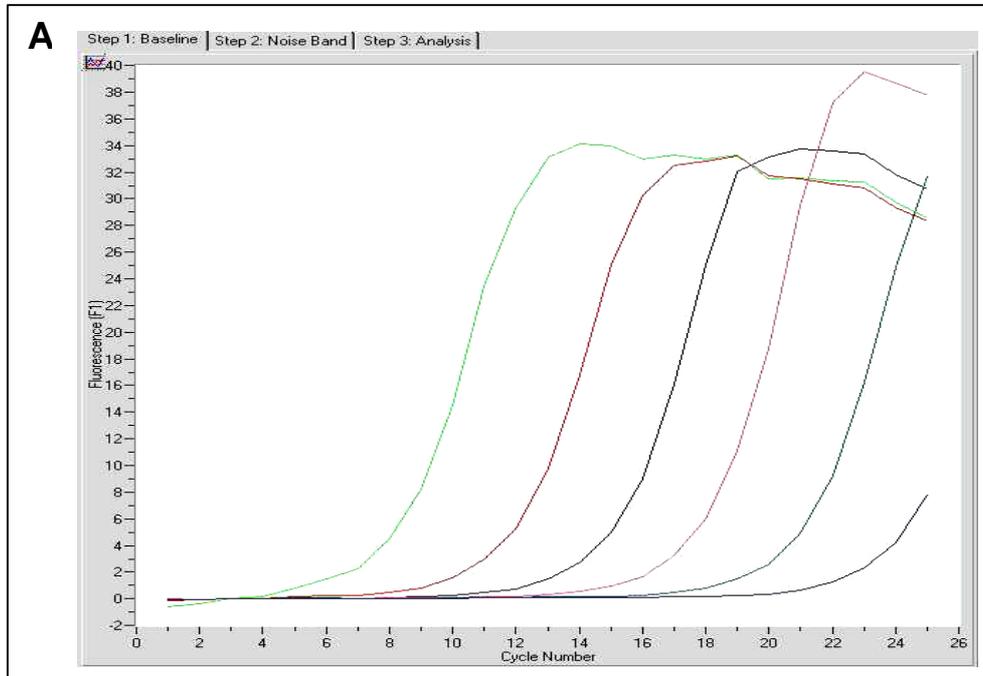
Für die Detektion des PCR-Produkts mit SYBR Green I werden keine zusätzlichen Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide benötigt, was die Etablierung einer LightCycler™-PCR erleichtert.

Der Nachteil dieser Methode ist, dass auch unspezifische PCR-Produkte und Primer-Dimere, die durch komplementäre Sequenzen der Primer entstehen, mitgemessen werden und somit das Ergebnis bei der Quantifizierung verfälschen können. Dies kann dadurch vermieden werden, dass die Messung der Fluoreszenz nicht wie gewöhnlich bei 72 °C, sondern bei einer etwas höheren Temperatur durchgeführt wird, bei der die Primer-Dimere bereits aufgeschmolzen sind, das eigentliche PCR-Produkt aber noch doppelsträngig vorliegt.

3.2.4.3 Die Quantifizierung des PCR-Produktes

Jede PCR-Reaktion weist einen exponentiellen Verlauf auf, der meist nur sehr kurz ist. Für die Quantifizierung des PCR-Produktes in der klassischen PCR ist es wichtig, die Reaktion vor dem Erreichen der Plateau-Phase zu beenden, was häufig zu Schwierigkeiten führt. Bei der Quantifizierung mit dem LightCycler™-System ist dagegen der Zeitpunkt entscheidend, wann das Fluoreszenz-Signal aus dem Hintergrund-Rauschen hervortritt. Bei einer halblogarithmischen Darstellung kann dann der Beginn der exponentiellen Phase sehr leicht an der Linearität der Kurve erkannt werden (Abbildung 4A). Wählt man im Auswerteprogramm die ‚fit point‘ Analyse, so wird der Hintergrund manuell durch die Verschiebung einer horizontalen Linie, der sog. ‚noise band‘, festgelegt (Abbildung 4B). Im nächsten Schritt wird dann die Standardkurve bestimmt. Aus der Interpolation einer Geraden durch eine vom Anwender definierten Anzahl von Messpunkten, die über dem Hintergrund liegen (in der Regel 2), berechnet das Computer-Programm die Schnittpunkte mit der „noise band“. Diese jetzt als „crossing line“ bezeichnete Linie kann im dritten Schritt entweder durch die Funktion ‚minimize‘ oder manuell verschoben werden, wodurch lediglich der Fehler der Ausgleichsgeraden (r^2) minimiert, nicht jedoch das Ergebnis beeinflusst wird (Abbildung 4C). Nach der Festlegung der Standardkurve kann dann die DNA-Menge und der Crossing Point der untersuchten Proben direkt am Bildschirm abgelesen werden. Da das Signal umso früher

aus dem Hintergrund-Rauschen hervortritt, je mehr template-DNA in der Probe enthalten ist, kann der *crossing point* für eine erste Abschätzung der DNA-Menge herangezogen werden. In dieser Arbeit wurde jedoch die DNA-Menge anhand einer Standardkurve aus humaner genomischer DNA ermittelt.



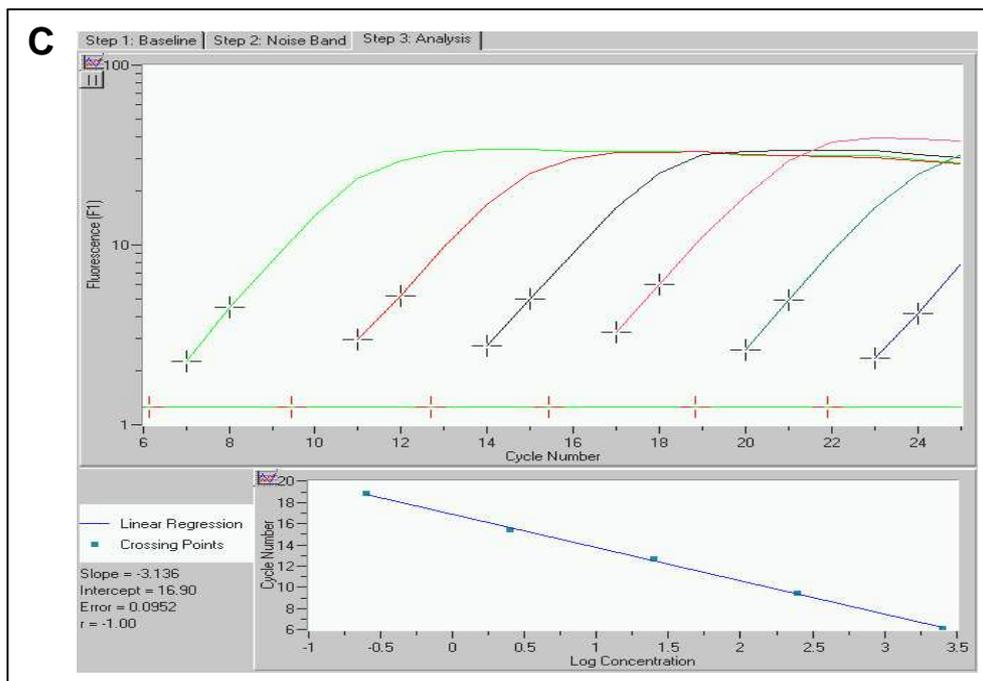


Abbildung 4: Die Quantifizierung mit Hilfe der ‚second derivative maximum‘ Methode - Bildschirm-Ansichten für die einzelnen Schritte der Quantifizierung

A) halb-logarithmische Darstellung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zyklenzahl

B) Festlegung des Hintergrunds durch die Bestimmung der ‚noise band‘

C) Berechnung der Standardkurve: Die Werte für die Standardkurve ergeben sich aus der linearen Verlängerung der ersten Messpunkte, die über dem Hintergrund liegen und der ‚crossing line‘.

In der unteren Abbildung ist die Standardkurve mit dem Korrelationskoeffizienten R und dem errechneten Fehler dargestellt.

Nähere Erklärung im Text

Bei der Quantifizierung mit der ‚second derivative maximum‘-Methode berechnet der Computer die Standardkurve, die Festlegung der ‚noise band‘ und der ‚crossing line‘ entfallen dann. In dieser Arbeit wurde immer die ‚fit point‘-Methode verwendet, da sie eine genauere Festlegung der Standardkurve mit einem geringeren Fehler erlaubte.

3.2.4.4 Schmelzkurven-Analyse

Zur Analyse des PCR-Produkts, wird im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt werden. Die Schmelzpunkt-Analyse basiert darauf, dass jede doppelsträngige DNA einen charakteristischen Schmelzpunkt aufweist. Der Farbstoff SYBR Green I bindet wie bereits beschrieben an doppelsträngige DNA. Wird die DNA in der Kapillare langsam erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen, löst sich das SYBR Green I von der doppelsträngigen DNA am Schmelzpunkt des PCR-Produkts, und das Signal geht zurück. Da sich die PCR-Produkte von den unspezifischen PCR-Nebenprodukten bzw. von den Primer-Dimere in ihrer Schmelztemperatur unterscheiden, kann die Qualität der PCR-Reaktion durch diese Methode leicht bestimmt werden (siehe Abbildung 5A). Die Abnahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur kann

auch in der ersten Ableitung nach der Temperatur dargestellt werden. Aus dem Wendepunkt ergibt sich dann das Maximum, das leichter aus der Graphik abgelesen werden kann (Abbildung 5B).

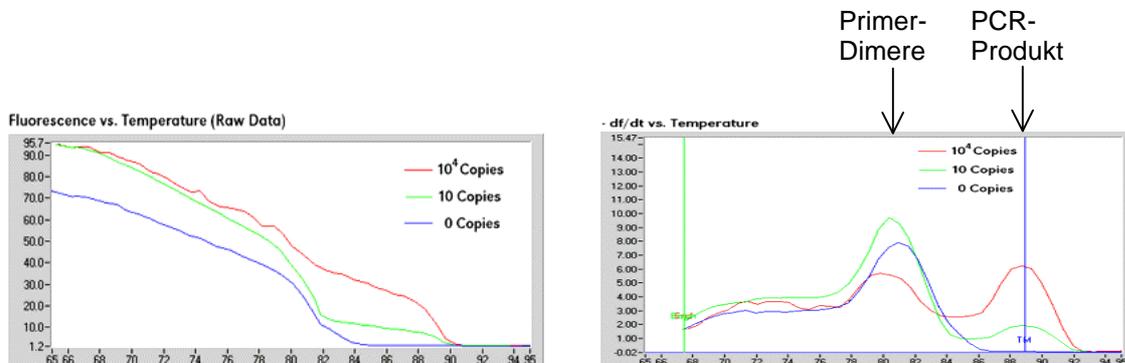


Abbildung 5: Die Schmelzkurvenanalyse

A) Zusammenhang Fluoreszenzstärke und Temperatur. Die Abnahme der Fluoreszenz mit steigender Temperatur verläuft bis ca. 80 °C linear; bei 80 bzw. 89 °C nimmt die Fluoreszenz stark ab, da hier Primer-Dimere bzw. das PCR-Produkt aufgeschmolzen wird.

B) Erste negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur wandelt die Schmelzkurven in Maxima der Schmelzkurven um.

3.2.4.5 Durchführung

Die PCR-Reaktion und die Schmelzkurven-Analyse wird mit dem LightCycler™-System durchgeführt. Hierfür wird der LightCycler™-Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Dieser Kit enthält einen Mastermix bestehend aus dem Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I, der Taq-Polymerase, einem 10 x PCR-Puffer, einem Nukleotidmix und 10 mM MgCl₂.

Die Verdünnungen und der PCR-Ansatz wird aufgrund der hohen Kontaminationsgefahr unter einer Sterilbank pipettiert. Die Amplifikation wird in Glaskapillaren (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Für die PCR-Reaktion wird 2,5 ng genomische DNA als *template*-DNA eingesetzt.

Der Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

2 µl	10 x Mastermix
2 µl	10 µM Primer-forward [Endkonzentration 1 µM]
2 µl	10 µM Primer-reverse [Endkonzentration 1 µM]
3,2 µl	MgCl ₂ [Endkonzentration 5 mM]
ad 18 µl	H ₂ O

Nach Zugabe von 2 µl der *template*-DNA (2,5 ng DNA) werden die Kapillaren verschlossen und kurz abzentrifugiert, da sonst die Proben aufgrund ihrer Oberflächenspannung nicht in die Kapillare gelangen. Anschließend werden die Kapillaren in den Rotor gesteckt und in das

LightCycler™ Gerät gestellt. Der Ablauf der PCR-Reaktion kann in drei Phasen unterteilt werden und setzt sich aus den in wiedergegebenen Schritten zusammen.

Tabelle 1: Ablauf der quantitativen Alu-PCR.

$\Delta T/\text{Zeit}$ gibt die Änderung der Temperatur pro Sekunde wieder.

Programm	Temperatur [°C]	Haltezeit [sek]	$\Delta T/\text{Zeit}$ [°C/sek]
Denaturierung	95	60	20
PCR (25 Zyklen)	95	0	20
	65	5	20
	72	10	20
	84 *	1	20
Schmelzkurvenanalyse	95	0	20
	60	15	20
	95 *	0	0,1
Kühlen	40	30	20

Bei den mit * gekennzeichneten Temperaturen erfolgt die Messung der Fluoreszenz, wobei diese bei der Schmelzkurvenanalyse bis zum Erreichen der Endtemperatur kontinuierlich erfolgt.

3.2.5 Definition der Standardkurve

Für die Quantifizierung des PCR-Produkts wird eine Standardkurve aus humaner genomischer DNA von 2,5 ng, 250 pg, 25 pg, 2,5 pg, 0,25 pg verwendet. Im LightCycler™-Programm wird die eingesetzte DNA für die Standardkurve entsprechend definiert und deren DNA-Menge eingegeben. Man erhält somit bei der Auswertung der unbekanntenen Proben den Gehalt an humaner DNA in insgesamt 2,5 ng Gesamt-DNA. Aus den ermittelten Werten kann dann der Gehalt an humaner DNA im gesamten Organ bestimmt werden. Hierfür wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Alu}_{\text{gesamtes Organ}} [\text{pg}] = \frac{c_{\text{DNA}} [\text{ng}/\mu\text{l}] * V_{\text{Lysat}} [\mu\text{l}] * \text{Alu-Signal} [\text{pg}]}{2,5\text{ng}}$$

c_{DNA} = Konzentration genomische DNA in ng/ μl

V_{Lysat} = Gesamtvolumen Gewebelysat in μl

Geht man von einem durchschnittlichen DNA-Gehalt von 5 pg pro Zelle aus, kann die die Anzahl humaner Zellen in dem untersuchten Organ wie folgt ermittelt werden:

$$\text{Anzahl humaner Zellen} = \text{Alu}_{\text{gesamtes Organ}} [\text{pg}] / 5 \text{ pg}$$

3.2.6 FACS-Analyse von GFP-transfizierten Zellen

Die Messung der GFP-Expression der GFP-transduzierten H460M2-Zellen erfolgt am Durchflußzytometer (FACScan). Hierfür werden 1×10^6 Zellen zweimal mit 2 % -iger PBS/FKS-Lösung gewaschen und anschließend in 1 ml PBS aufgenommen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt bei 530 ± 30 nm (Grünfluoreszenz des FITC).

3.2.7 WST-1 Proliferationstest

Für die Erstellung von Wachstumskurven wird das WST-1 Reagenz (Roche; Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. WST-1 ist ein Farbsubstrat, welches von mitochondrialen Dehydrogenasen zu einem Formazanderivat umgesetzt wird und somit die indirekte Bestimmung der Zellzahl ermöglicht.

Zum Erstellen der Wachstumskurven werden in einer 96-Loch-Platte jeweils 10^3 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Um die Zellzahl nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h zu bestimmen, werden die Zellen in 4 Mikrotiterplatten pipettiert. Der Test wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Zugabe des WST-1-Substrates werden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend wird im ELISA-Reader die Absorption bei 440 nm gemessen.

3.2.8 Tierversuche

3.2.8.1 Markierung der Versuchstiere mit Transponder-Chips

Für die Markierung der Versuchstiere werden Transponder-Chips (PLEXX, Niederlande) verwendet. Diese werden zwei Tage vor Versuchsbeginn nach einer individuellen Programmierung (Experiment, Gruppe und Tiernummer) subkutan in die Lumbal-Region implantiert. Dies erfolgt ohne vorherige Narkotisierung der Mäuse.

3.2.8.2 Darmkrebs-Modell HT29

Um den Einfluss einer Substanz auf das Wachstum des Primärtumors zu untersuchen, werden Tumorzellen subkutan in die Flanke von Mäusen injiziert. Bei diesem Tumormodell

werden 5×10^6 HT29 Zellen in 100 μ l PBS in die linke Flanke von weiblichen SCID-Mäusen gespritzt. Die Behandlung der Tiere mit 5-FU erfolgt ab dem 12. Tag für 3 Wochen. 5-FU wird in einer Dosierung von 60 mg/kg einmal pro Woche i.v. in die Schwanzvene injiziert. Nach Versuchsende wurden von den Mäusen jeweils Lunge und Leber explantiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.8.3 Lungenkrebs-Modell H460M2

Für die Untersuchung der Wirksamkeit von Taxol bzw. des Matrixmetalloproteinase (MMP) - Inhibitors RO28-2653 werden SCID-beige Mäusen jeweils 3×10^6 H460M2-Zellen s.c. in die hintere Fußpfote injiziert. Nach 20 Tagen wird die Pfote mit dem Primärtumor amputiert. 21 Tagen später werden die Tiere getötet und neben der Lunge auch Leber, Niere und Milz explantiert (Uchida et al., 2000).

Taxol wird einmal wöchentlich in einer Dosis von 30 mg/kg i.v. in die Schwanzvene appliziert. RO28-2653 wird täglich in einer Dosierung von 50 mg/kg p.o. mittels einer Schlundsonde verabreicht. Kontrolltiere werden mit den entsprechenden Vehikeln, d. h. mit den Lösungsmitteln alleine, behandelt. Bei Taxol handelt es sich dabei um ein Ethanol/ Tween/ Kochsalz-Gemisch, bei RO28-2653 um DMA/PEG 400 50 %.

3.2.8.4 orthotopes Pankreas-Krebs Modell: PancTu-1

Bei dem Pankreas-Tumormodell PancTu-1 wird durch einen mittleren Bauchschnitt das Peritoneum geöffnet und 1×10^6 PancTu-1 Zellen in 15 μ l PBS mit einer Insulin-Spritze (30 G x 8 mm) in den proximalen Bereich des Pankreas durch die Serosa hindurch in das Gewebe von SCID-Mäusen injiziert. Anschließend wird das Peritoneum mit einem 4-Vicryl-Faden genäht und die Wunde mit Klammern verschlossen.

Nach 28 Tagen wird der Versuch beendet und Pankreas/Tumor, Lunge, Leber, Niere, Milz, Magen und Dünndarm explantiert und je nach weiterer Analyse in Flüssigstickstoff schockgefroren oder in Formalin fixiert (Alves et al., 2001a, b).

Das Zytostatikum Gemcitabine wird jeden zweiten Tag ab dem 8. Tag in einer Dosierung von 2,5 mg/kg i.p. appliziert. Als Kontrolle wird eine weitere Gruppe mit dem Vehikel (0,9 % NaCl-Lösung) behandelt.

3.2.9 Histologische und immunhistochemische Analyse

3.2.9.1 Gewebefixierung und Dünnschnitte für die histologische Auswertung

Die Organe werden nach deren Entnahme ÜN in Phosphat-gepufferter 4 %-iger Formalinlösung fixiert, in 2 – 3 mm dicke Stücke geschnitten und in einem Einbettautomaten (Shandon) weiterbehandelt. Das verwendete Programm beinhaltet mehrere Schritte, die in der folgenden Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 2: Programm für die Gewebefixierung in einem Einbettautomaten

Reagenz	Inkubationsdauer [h]	Abflussdauer [h]
70 % Ethanol	1,5	0,25
70 % Ethanol	1,5	0,25
70 % Ethanol	1,5	0,50
95 % Ethanol	1,5	0,25
95 % Ethanol	1,5	0,50
100 % Ethanol	1,5	0,25
100 % Ethanol	1,5	0,50
Xylol	1,5	0,25
Xylol	1,5	0,50
Xylol	0	0,50
Paraffin	1,5	0,25
Paraffin	1,5	0,25

Im Anschluss daran werden die Organe in Paraffinblöcke gegossen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Von dem in Paraffin eingebetteten Gewebe werden mit einem Schlitten- oder Rotations-Mikrotom 4 µm dicke Schnitte auf Superfrost Plus Objektträger angefertigt, ÜN bei 37 °C getrocknet und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

3.2.9.2 H & E Färbung

Vor der Färbeprozedur ist es notwendig, die in Paraffin eingelegten Schnitte zu entparaffinieren und zu rehydrieren. Hierfür werden die Schnitte 2 x 10 min in Färbeküvetten in Xylol deparaffiniert und anschließend jeweils 2 min in einer Ethanolreihe mit absteigender

Konzentration (100 %, 95 %, 85 %, 70 %, 50 %, 30 %) inkubiert. Danach werden die Schnitte 2 x 2 min in Aqua dest. gewaschen.

Für die Färbung werden die Schnitte 20 min in Hämalun nach Mayer getaucht und anschließend so lange mit Leitungswasser gespült (= bläuen), bis die überschüssige Farbe entfernt ist. Danach werden die Schnitte kurz in Aqua dest. getaucht und zwischen 30 sec und 5 min in Eosin-Lösung gefärbt. Um überschüssige Färbelösung zu entfernen, werden die Schnitte wieder kurz in Aqua dest. gespült. Die Schnitte werden dann jeweils für 2 min in einer Ethanolreihe mit steigender Ethanolkonzentration (70 %, 80 %, 90 %, 2 x 100 %) dehydriert. Nach Inkubation für 2 x 5 min, können die Schnitte mit Histomount eingeschlossen und unter dem Mikroskop betrachtet werden.

3.2.9.3 Immunhistologischer Nachweis von Ki-67

Die Paraffinschnitte werden wie bereits unter 3.2.9.2 beschrieben entparaffiniert und rehydriert. Zur Demaskierung der Antigene werden die Gewebeschnitte in einer *1 x Antigene Unmasking Solution* für 20 min im Dampfgarer behandelt. Im Anschluss daran werden endogene Peroxidasen durch die Inkubation mit 3 % H₂O₂ für 5 min inaktiviert.

Da der verwendete Antikörper aus der Maus stammt, wird für die Färbung der M.O.M.TM Kit von Vector Laboratories verwendet. Dies verhindert eine unspezifische Bindung des Antikörpers. Hierzu werden die Schnitte 1 h mit dem *M.O.M.TM Mouse IgG Blocking Reagent* inkubiert und anschließend 2 x in PBS-T und 1 x in PBS für jeweils 3 min gewaschen. Die Antikörperfärbung erfolgt über Nacht bei 4 °C mit dem in *M.O.M.TM Diluent* 1:50 verdünnten Ki-67-Antikörper. Nach den wie oben beschriebenen Waschschritten werden die Schnitte 10 min mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, dem *M.O.M.TM Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent*, inkubiert. Die Schnitte werden wieder wie bereits beschrieben gewaschen und anschließend

5 min mit *VECTASTAIN Elite ABC Reagent* behandelt und erneut gewaschen. Für den Antikörpernachweis werden die Schnitte so lange mit DAB inkubiert, bis eine optimale Anfärbung erkennbar wird. Die Schnitte werden anschließend mit Hämalun nach Mayer 15 Sek. gegengefärbt. Nach Behandlung mit Ethanol in der umgekehrten Reihenfolge der oben beschriebenen Alkoholreihe können die Schnitte mit Histomount eingeschlossen werden.

3.2.9.4 Bestimmung der Metastasenfläche von histologischen und immun-histologischen Präparaten

Für die mikroskopische Auswertung werden die angefärbten Metastasen mit einer Digitalkamera fotografiert und mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImagePro Plus 4.0

(Media Cybernetics, USA) ausgewertet. Hierfür werden die Metastasen manuell mit dem Cursor markiert und die Fläche von diesem Bereich berechnet.

3.2.9.5 Fluoreszenzmikroskopie

Für die histologische Auswertung der Gewebeschnitte von GFP-transfizierten H460M2-Zellen werden die Organe wie unter 3.2.9.1 fixiert, eingebettet und geschnitten. Anschließend werden die Schnitte entparaffiniert und mit Vectashield Mounting Medium eingeschlossen. Die Auswertung erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Filtern. Mit einer Digitalkamera werden die Metastasen fotografiert und wie unter 3.2.9.4 beschrieben ausgewertet.

3.2.10 Makroskopisch-anatomische Auswertung der Metastasen

Diese Methode wird verwendet, um auf der Lungenoberfläche die Zahl der Metastasen zu bestimmen und die Metastasenmasse zu berechnen. Hierzu werden nach dem Beenden des Versuchs die Lungen explantiert und mindestens einen Tag in Bouin'scher Lösung fixiert. In der Fixierlösung ist Pikrinsäure enthalten, die zu einer farblichen Kontrastierung der Metastasen gegenüber dem gesunden Gewebe führt: Metastasen färben sich gelb, gesundes Gewebe braun. Anschließend werden die einzelnen Lungenlappen separiert und mit einer Digitalkamera von beiden Seiten fotografiert. Die Auswertung erfolgt am Computer mit der ImagePro 4.0 Software, die die Bestimmung von Anzahl und Größe der Metastasen auf der Lungenoberfläche erlaubt. Für die Bestimmung des Metastasengewichts wird bei jeder Metastase die längste Dimension d bestimmt und aus dieser mit Hilfe der Formel

$$V = \frac{4}{3} \times \left(\frac{d}{2} \right)^3$$

das Volumen V berechnet. Da die Dichte in Näherung 1 g/ml gesetzt werden kann, kann man das Volumen der Masse gleichsetzen.

3.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wird mit dem Programm SigmaStat 2.0 (SPSS, Erkrath) durchgeführt. Die graphische Darstellung der Einzelergebnisse inklusive des Medians erfolgt in „*Frequency Plots*“ im Programm SigmaPlot 4.0. Die Ergebnisse werden hinsichtlich deren Verteilung getestet; liegt eine Gleichverteilung vor, wird der 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 erfolgt in „*Frequency Plots*“ im Programm SigmaPlot 4.0 (SPSS, Erkrath).

4 Ergebnisse

Quantitative Aussagen über den Metastasegehalt in humanen Xenograft-Modellen sind wichtig für die Bewertung der anti-metastasierenden Potenz neuer Substanzen. Der Nachweis von humanen Alu-Sequenzen mittels quantitativer PCR ist hierfür ein vielversprechender Ansatz, der in dieser Arbeit überprüft werden sollte.

4.1 Evaluierung der Alu-PCR mit dem LightCycler™-System

Das Ziel dieser Arbeit war mit Hilfe der LightCycler™-Technologie humane Alu-Sequenzen in einem Hintergrund von Maus-DNA nachzuweisen und exakt zu quantifizieren.

4.1.1 Auswahl der Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden humane Alu-Sequenzen mittels einer quantitativen PCR nachgewiesen. Die in der Literatur beschriebenen human-spezifischen Alu-Primer wurden jedoch für konventionelle PCR-Reaktionen verwendet. Aus diesem Grund wurden in einem ersten Schritt diese publizierten Primer auf ihre Verwendbarkeit im LightCycler™-System getestet, um gegebenenfalls die PCR-Bedingungen zu optimieren bzw. neue Primer zu entwickeln. Für diese Untersuchungen wurde kommerziell erhältliche humane genomische DNA als Template in unterschiedlichen Konzentrationen in die PCR eingesetzt. Die amplifizierten Produkte wurden anschließend mittels der Schmelzkurven-Analyse hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht. Die Ergebnisse der verschiedenen Oligonukleotide sind in Abbildung 6 wiedergegeben.

Die mit Alu-1 bezeichneten Oligonukleotide wurden von Zubair et al. verwendet, um in einer konventionellen PCR humane Alu-Sequenzen von Burkitt Lymphom-Zellen in SCID-Mäusen nachzuweisen (Zubair et al., 1996). Trotz Optimierung der PCR-Bedingungen, konnte mit diesen Primern im LightCycler™-System kein einheitliches PCR-Produkt gewonnen werden (Abbildung 6A). Auch die Standardkurve zeigt, dass diese Oligonukleotide nicht für den Einsatz in eine quantitative PCR geeignet sind (Abbildung 6B). Das mit Alu-2 bezeichnete Primerpaar, wurde von Kim et al. beschrieben (Kim et al., 1998). Bei dessen Verwendung konnten die Bedingungen zwar so gewählt werden, dass ein PCR-Hauptprodukt entstand, jedoch wiesen die Schmelzkurven noch eine Vielzahl kleinerer Produkte auf (Abbildung 6C und D). Die Untersuchung der Primer-Sequenzen zeigte, daß diese komplementäre Enden hatten, wodurch die Bildung von Primer-Dimeren erklärt werden konnte.

Aus diesen Gründen wurden neue Primer (Alu-3) verwendet, die ebenfalls komplementär zu der Konsensussequenz von humanen Alu-Sequenzen waren. Die *forward*-Primer unterschieden sich von den Alu-2f Primern durch einen Austausch der ersten drei Basen (ACG) durch die Basen CA und durch das Anhängen eines Thymidins am 3'-Ende. Bei den *reverse*-Primern wurden die ersten drei Basen der Alu-2r Primer (TCG) entfernt und am 3'-Ende zwei Basen (GT) angehängt. Die Primer wurden auf ihre Sensitivität in der Standardkurve und Spezifität in der Schmelzkurven-Analyse getestet. Sie zeigten bei einer $MgCl_2$ -Konzentration von 5 mM, Annealing-Bedingungen von 65 °C für 5 sec und einer Elongationszeit von 10 sec die besten Ergebnisse. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei 84 °C. Dadurch wurde sichergestellt, dass nur das spezifische PCR-Produkt quantifiziert wurde. Wie sich aus der Schmelzkurven-Analyse ergab, sind bei dieser Temperatur alle unspezifischen Nebenprodukte bereits aufgeschmolzen, das PCR-Produkt dagegen noch nicht, da es eine Schmelztemperatur von 89 °C aufweist (Abbildung 6E und F).

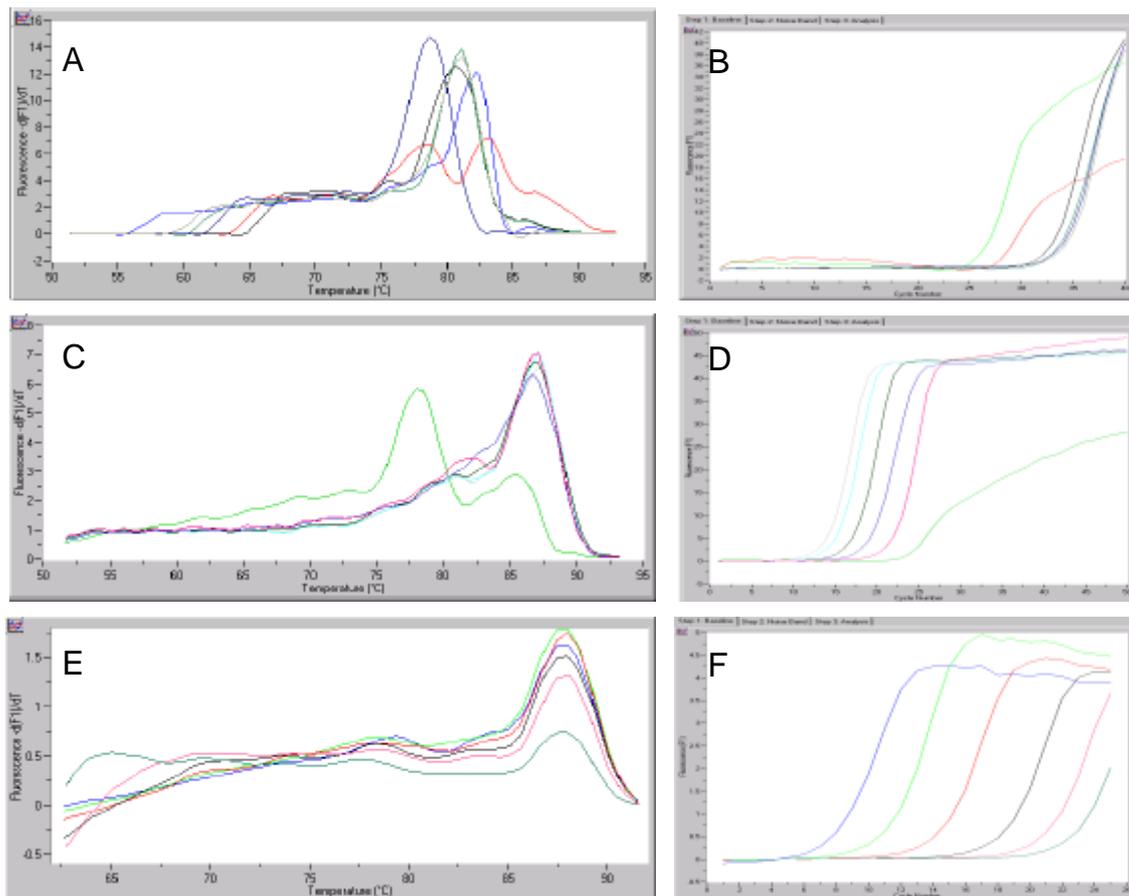


Abbildung 6: Schmelzkurvenanalyse (A, C, E) und Amplifikationskurven (B, D, F) der getesteten Alu-Primer.

Für die Alu-PCR wurden folgende Bedingungen ausgewählt: 5 mM MgCl₂, Annealing bei 65 °C für 5 sec., Elongation bei 72 °C für 10 sec.

Mit den Primern Alu-1 (A) und (B) konnte kein einheitliches PCR-Produkt amplifiziert werden. Bei dem Primerpaar Alu-2 (C) und (D) entstanden PCR-Nebenprodukte, erkennbar an der linken Schulter der Schmelzkurven. Sie konnten deshalb für die Quantifizierung nicht verwendet werden. Die Schmelzkurven-Analyse bei dem Primerpaar Alu-3 (E) zeigt keine Nebenprodukte und ermöglicht die Quantifizierung (F) des PCR-Produkts.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden deshalb nur noch die mit Alu-3 bezeichneten Primer für die Quantifizierung von humanen Alu-Sequenzen verwendet.

4.1.2 Bestimmung des Alu-Gehalts in verschiedenen Tumorzelllinien

Um den Gehalt an humanen Tumorzellen mittels quantitativer Alu-PCR bei möglichst vielen Xenograft-Tumormodellen bestimmen zu können, wurde überprüft, ob der Alu-Gehalt in humanen Tumorzelllinien verschiedenen Ursprungs (Lunge, Kolon, Prostata und Pankreas) gleich bleibt und zum anderen, ob sich der Gehalt an Alu-repetitiven Sequenzen verändert, je nachdem, ob die Zellen in vitro oder durch Implantation von Tumorfragmenten in der Maus passagiert wurden.

Hierfür wurde die genomische DNA aus verschiedenen Tumorzelllinien isoliert und Verdünnungsreihen, die von 25 ng bis 250 fg reichen, angefertigt. Die verwendeten Zelllinien waren A549 (Lunge), Cor-L23 (Lunge), DU145 (Prostata), SW620 (Kolon) und HCT116 (Colon). Abbildung 7 zeigt, dass alle untersuchten Tumorzellen einen vergleichbaren Gehalt an Alu-Sequenzen enthielten, wobei die Nachweisgrenze stets bei 250 fg lag.

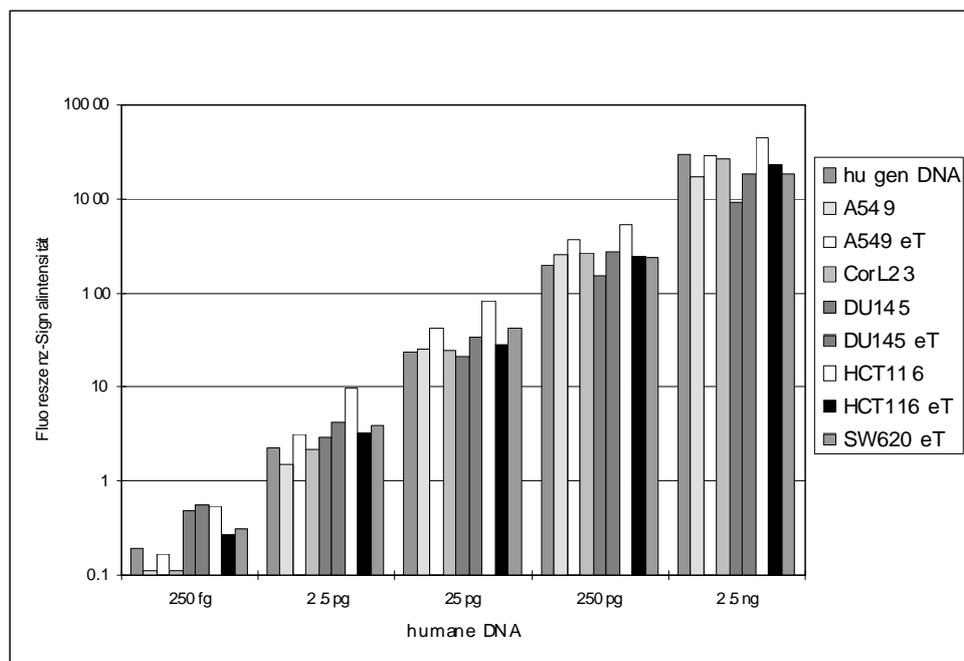


Abbildung 7: Bestimmung des Alu-Gehalts in Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs.

Verdünnungen von 2,5 ng bis 250 fg humaner genomischer DNA von A549 (Lunge), CorL23 (Lunge), DU145 (Prostata), HCT116 (Kolon) und SW620 (Kolon) Zellen wurden in die quantitative Alu-PCR eingesetzt. Als Standard diente humane genomische DNA. Es konnte gezeigt werden, dass der Gehalt an Alu-Sequenzen in den unterschiedlichen Zelllinien wie erwartet gleich war.

4.1.3 Bestimmung der Nachweisgrenze in vitro durch Zellmischungsversuche

Da der Gehalt an humanen Alu-Sequenzen zu einem späteren Zeitpunkt auch in Organen von Tumor-tragenden Mäusen bestimmt werden sollte, war es wichtig die PCR-Reaktion in einem Hintergrund von Maus-DNA durchzuführen. Dadurch konnten mögliche inhibierende Einflüsse auf die PCR-Reaktion analysiert werden.

Aus diesem Grund wurde Zellmischungen aus humanen H460M2-Zellen und Maus-Zellen der SCCVII-Zelllinie hergestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Gesamtzellzahl konstant bei 10^7 Zellen gehalten wurde. Dazu wurden folgende Mischungen hergestellt, die in Tabelle 3 wiedergegeben sind.

Tabelle 3: Zellmischungen aus humanen H460M2-Zellen und Mauszellen der SCCVII-Zelllinie

Zellzahl H460M2	Zellzahl SCCVII
10^7	0
10^6	$0,9 \times 10^7$
10^5	10^7
10^4	10^7
10^3	10^7
10^2	10^7
10	10^7
0	10^7

Anschließend wurde aus diesen Zellmischungen die genomische DNA isoliert und davon jeweils 25 ng in die Alu-PCR eingesetzt.

In Abbildung 8 ist die Anzahl humaner Zellen gegen das entsprechende Signal der Alu-PCR aufgetragen. Es zeigt über 3 Größenordnungen eine lineare Zunahme zwischen dem „Alu-Signal“ und der Zahl humaner Zellen in der Mischung. Werden weniger als 10^3 Zelläquivalente in die PCR eingesetzt, liegt die ermittelte DNA-Menge zwar noch über der Nachweisgrenze von 250 fg, ist aber außerhalb des linearen Messbereichs. Bei einer DNA-Menge, die 10^7 -Zelläquivalenten entspricht, tritt der sog. „Hook“-Effekt auf. Hier wirkt die hohe template-Konzentration inhibierend auf die PCR-Reaktion.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass repetitive Elemente der Maus mit diesen Primern nicht amplifiziert wurden, da kein Signal nachgewiesen werden konnte, wenn SCCVII Zellen alleine in die PCR-Reaktion eingesetzt wurden. Mit den verwendeten PCR-Primer konnte somit keine Maus-DNA amplifiziert werden.

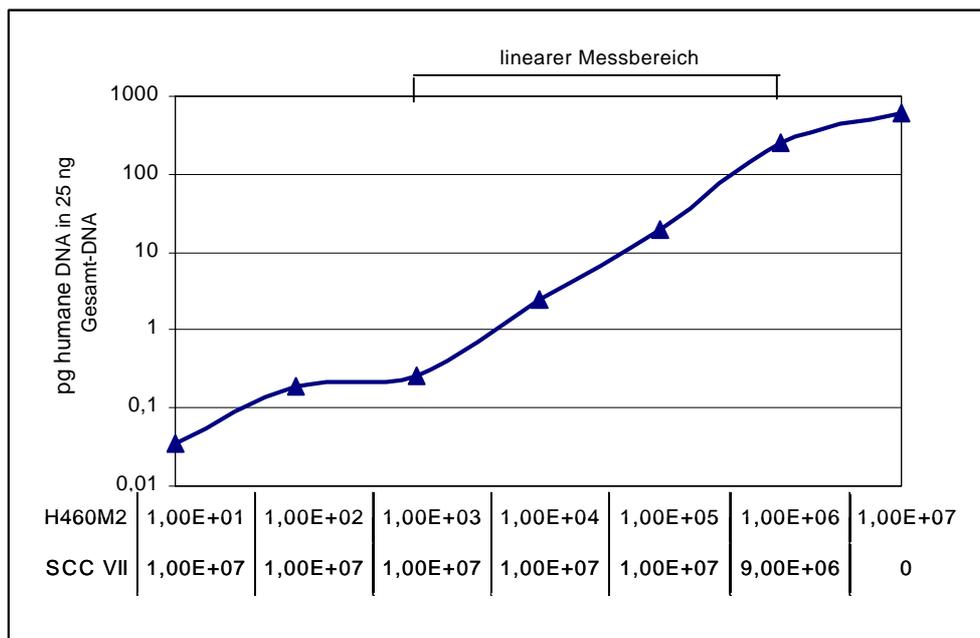


Abbildung 8: Bestimmung des linearen Messbereichs der quantitativen Alu-PCR in Zellmischungsexperimenten aus humanen H460M2 und Maus-SCCVII – Zellen.

Aus menschlichen H460M2- und Mauszellen wurden Zellmischungen in den angegebenen Mischungsverhältnissen hergestellt und die genomische DNA isoliert. Hiervon wurden 25 ng in die quantitative Alu-PCR eingesetzt und der Gehalt an humaner DNA bestimmt. Aufgetragen wurde die Zellzahl von H460M2 gegen die ermittelte DNA-Menge bezogen auf eine Standardkurve aus humaner genomischer DNA. Im Bereich von 10^3 bis 10^6 humanen Zellen liegt der lineare Messbereich der quantitativen Alu-PCR.

4.1.4 Bestimmung der Nachweisgrenze ex vivo

In einem weiteren Ansatz wurde die Nachweisgrenze ex vivo bestimmt. Hierfür wurden Lungen aus Mäusen explantiert und vor der DNA-Isolierung humane Tumorzellen (H460M2) in absteigenden Mengen von 10^6 bis 10^2 Zellen in das Organ injiziert. Als Negativkontrolle diente eine Lunge ohne Zusatz humaner Zellen. Die Standardkurve wurde aus humaner genomischer DNA hergestellt. Für die PCR-Reaktion wurden jeweils 25 ng aufgereinigte DNA eingesetzt.

In Abbildung 9 ist die Zahl der humanen Tumorzellen pro Lunge gegen die entsprechenden Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR aufgetragen. In einem Bereich von 10^3 bis 10^6 humanen Tumorzellen pro Lunge, liegt ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Tumorzellen und der PCR-Signalintensität vor, was durch den berechneten Korrelationskoeffizienten von $R=0,98$ unterstrichen wird. Das Hintergrundsignal ist durch die horizontale Linie dargestellt und liegt bei 0,056 ng humane DNA. Insgesamt konnten mit diesem Ansatz ca. 100 Tumorzellen in einer ganzen Lunge nachgewiesen werden. Da eine Lunge ungefähr aus 6×10^7 Zellen besteht, ergibt sich somit eine Nachweisgrenze von einer humanen Zelle in einem Hintergrund von 6×10^5 Mauszellen.

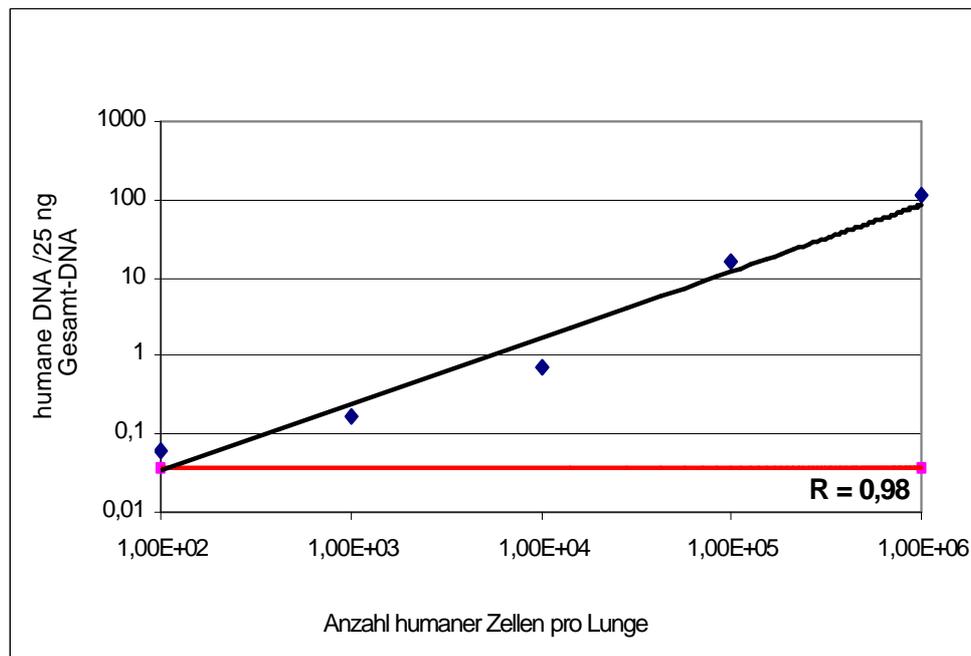


Abbildung 9: Bestimmung der Nachweisgrenze von humanen Tumorzellen in der Lunge ex vivo.

Zu explantierten Mauslungen wurden humane H460M2 Tumorzellen in den angegebenen Mengen gegeben, die DNA isoliert und jeweils 25 ng in die PCR eingesetzt. Aufgetragen wurde die Anzahl humaner Zellen in der Lunge gegen die ermittelte DNA-Menge in 25 ng Gesamt-DNA bezogen auf eine Standardkurve aus humaner genomischer DNA. Die horizontale Linie spiegelt das Hintergrundsignal, das bei 0,056 ng lag, wieder. Die Trendlinie zeigt eine sehr gute Korrelation zwischen Anzahl humaner DNA und gemessenem DNA-Gehalt in der PCR mit $R=0,98$.

4.2 Evaluierung der Alu-PCR in verschiedenen Xenograft-Tumormodellen

Die Verwendung von präklinischen Tiermodellen ist eine geeignete Methode um klinisch relevante Aussagen über die Funktionsweise und die therapeutische Wirksamkeit neuer Substanzen, die einen Einfluss auf das Tumorwachstum haben treffen zu können. Jedoch können Erkenntnisse aus syngenen Tiermodellen, die den gleichen histopathologischen Typ und Grad eines malignen Tumors aufweisen, meist nicht auf die klinische Situation im Menschen extrapoliert werden, da die Tumorzellen andere Oberflächenantigene exprimieren. Dagegen ist die Implantation von humanen Tumorzellen in immunkompetente Mäuse nicht möglich, da dies zur Abstoßung bzw. Abtötung der Tumorzellen führt. Bei Xenograft-Tumormodellen werden humane Tumorzellen in immundefiziente Mäuse eingesetzt. Zudem konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Transplantation von humanen Tumorzellen in SCID-Mäuse zu einem verbesserten Tumorwachstum und einer erhöhten Metastasierung als in Nacktmäusen führt (Garofalo et al., 1993; Xie et al., 1992).

4.2.1 Das Darmkrebs-Modell HT29

Häufig wird der hemmende Einfluss von Substanzen auf das Wachstum von Primärtumoren durch eine subkutane Injektion von humanen Tumorzellen in immundefiziente Mäuse untersucht. Jedoch korreliert die Größe des Tumors in den meisten Tumormodellen nicht mit dem Ausmaß der Metastasierung. Für Aussagen über einen Effekt auf die Metastasierung von neuen Substanzen muß der Metastasegehalt in Organen wie Lunge oder Leber zusätzlich bestimmt werden.

Bei diesem ersten orientierendem Versuch wurde die Wirksamkeit von 5-Fluorouracil (5-FU), einem klinisch etablierten Zytostatikum, und dessen Einfluss auf die Metastasierung in Lunge und Leber untersucht.

Der Versuchsablauf und das Behandlungsschema sind in Abbildung 10 dargestellt. HT29-Tumorzellen (5×10^6 Zellen) wurden subkutan in die Flanke von SCID beige Mäusen injiziert und ab dem 12. Tag einmal wöchentlich für drei Wochen mit 5-FU behandelt. Nach 29 Tagen wurde der Versuch beendet und von jedem Tier Lunge und Leber explantiert. Von diesen Organen wurde die genomische DNA isoliert und in die quantitative Alu-PCR eingesetzt.

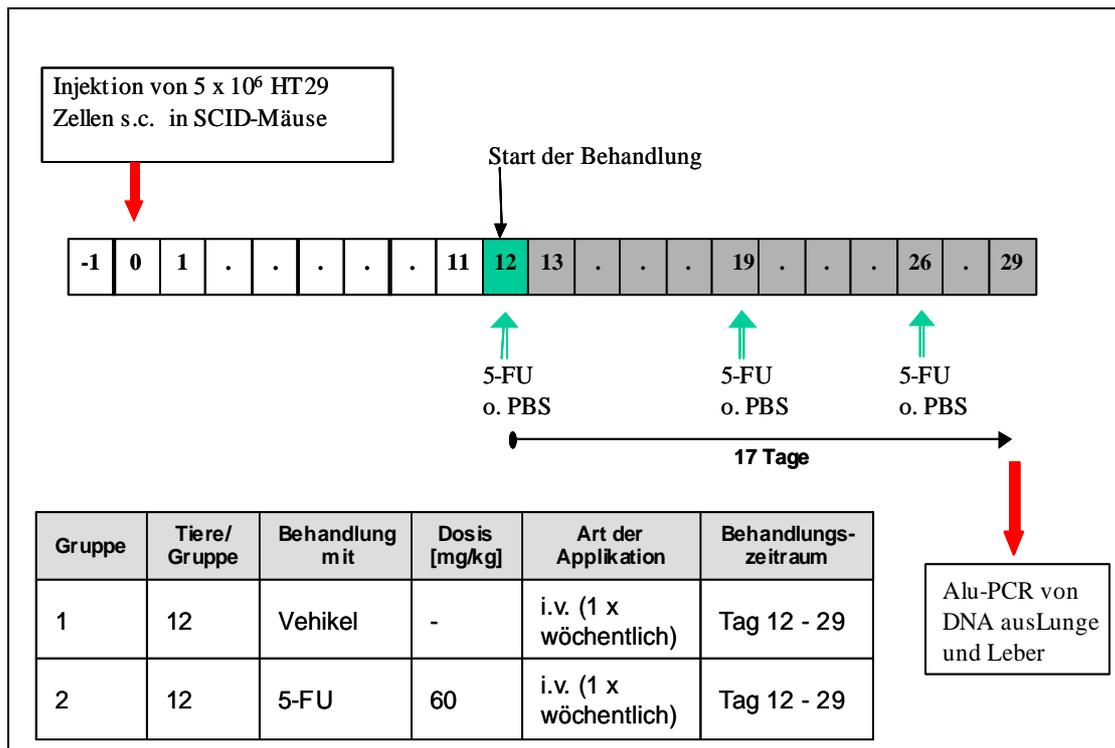


Abbildung 10: Darstellung des Versuchsablaufs und das zugrundeliegende Behandlungsschema nach subkutaner Injektion von HT29-Tumorzellen

12 Tage nach subkutaner (s.c.) Injektion der HT29-Tumorzellen wird mit der Behandlung begonnen. 5-FU wird hierfür einmal wöchentlich intravenös appliziert. Einer zweiten Gruppe mit 12 Tieren wurde parallel das entsprechende Vehikel (PBS) verabreicht. Nach Beendigung des Versuchs wurde von jeder Maus Lunge und Leber explantiert und deren Metastasenengehalt mittels quantitativer Alu-PCR bestimmt.

In Abbildung 11 ist exemplarisch die Auswertung einer quantitativen Alu-PCR gezeigt. Nach der Festlegung der Standardkurve wurde die DNA-Menge und der Crossing Point der untersuchten Proben direkt am Bildschirm abgelesen. Die Berechnung des Gehalts an humaner DNA in der gesamten Lunge bzw. Leber wurde entsprechend der unter 3.2.5 angegebenen Formel berechnet.

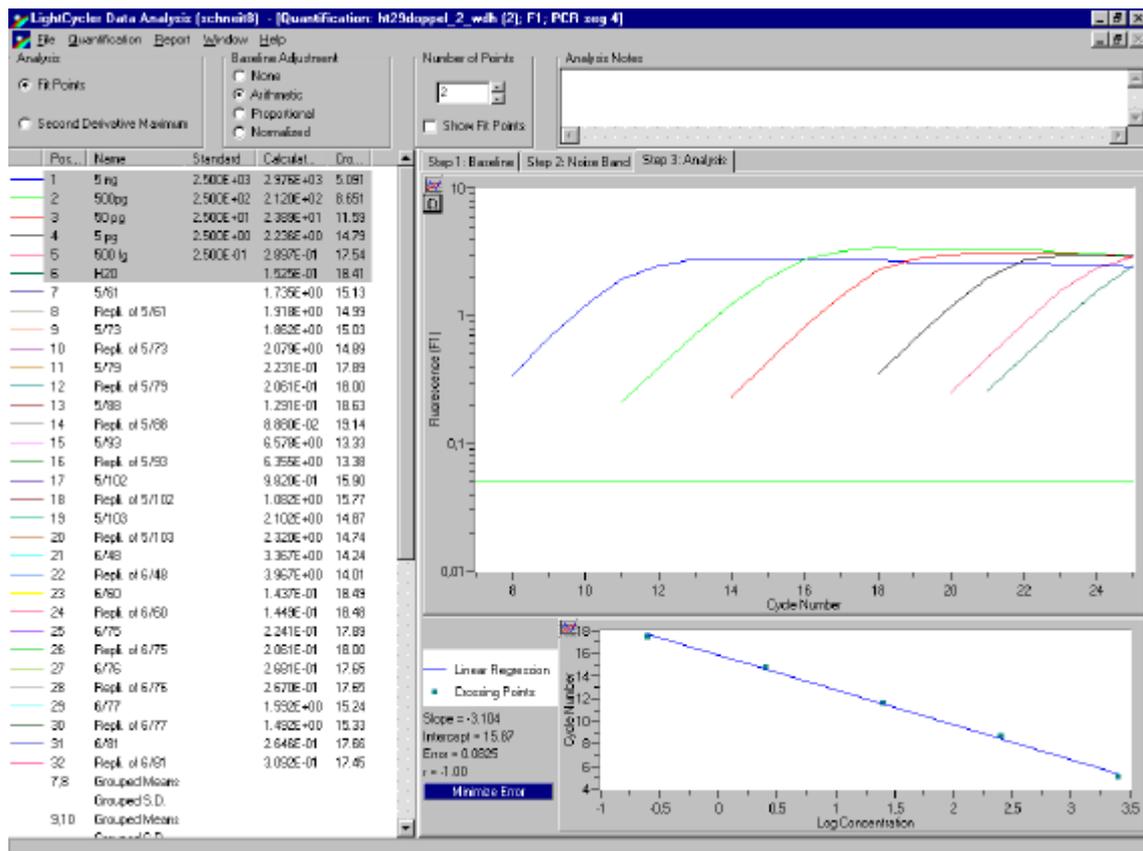


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Bildschirmauswertung einer Alu-PCR-Reaktion

Links sind die Proben mit den entsprechenden Konzentrationen dargestellt, wobei die Proben deren Verlauf (Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Zyklenzahl) rechts oben wiedergegeben sind, grau unterlegt sind. Die Standardkurve ist in der Abbildung unten rechts dargestellt. Die Konzentration der Werte für die untersuchten Proben ergibt sich aus dem Schnittpunkt der linearen Verlängerung der Kurven mit der *crossing line* (grün).

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR ist in Abbildung 12 wiedergegeben. Nach Behandlung der Tiere mit 5-FU zeigte sich eine nicht-signifikante Abnahme des Gehalts an humaner DNA in der Lunge mit $p=0,199$. So ging der Median von 51,4 ng humaner DNA pro Lunge bei der „Vehikel“-Gruppe auf 15,5 ng bei der 5-FU-Gruppe zurück, was einer Hemmung des Metastasenwachstums von 70 % entsprach.

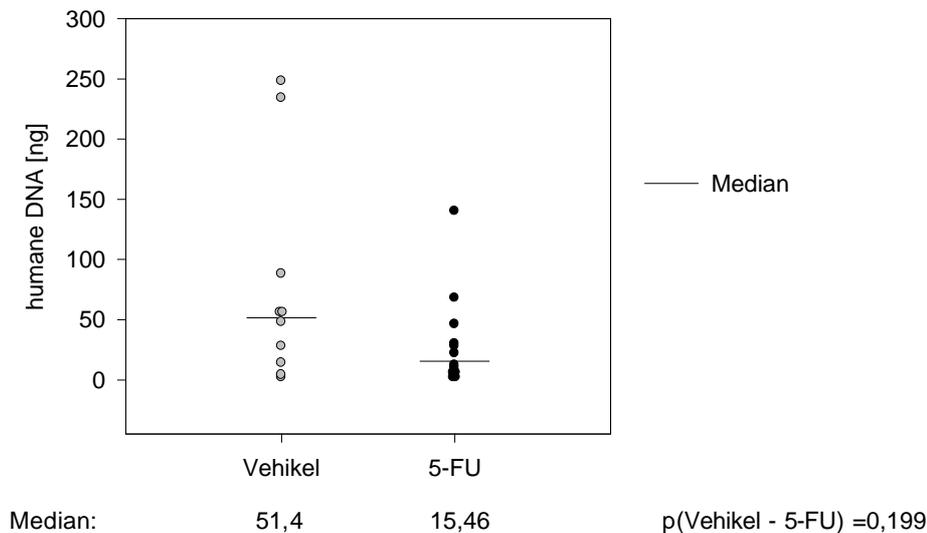


Abbildung 12: Bestimmung der inhibierenden Wirkung von 5-FU auf den Metastasengehalt in der Lunge im HT29-Tumormodell mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR.

29 Tage nach der subkutanen Injektion der HT29-Tumorzellen in SCID-Mäuse wurden die Lungen explantiert und die genomische DNA isoliert. In die PCR-Reaktion wurden jeweils 2,5 ng DNA eingesetzt. Die Werte geben den Gehalt an humaner DNA pro Lunge wieder und wurden aus dem Mittelwert von vier PCR-Reaktionen ermittelt.

Die Ausbildung von Metastasen in der Lunge nach subkutaner Injektion von HT29-Zellen stimmt mit Beobachtungen von Jojovic et al. (2000) überein, die ebenfalls nach subkutaner Injektion von HT29-Zellen histologisch Metastasen in der Lunge nachweisen konnten.

Bei der Untersuchung der Leber auf Metastasen mit Hilfe der Alu-PCR waren die Signale insgesamt sehr schwach und lagen nur in einzelnen Fällen deutlich über der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die HT29-Zellen bevorzugt in die Lunge und nur in einzelnen Fällen in die Leber metastasieren.

Die Ergebnisse dieses ersten Experiments legen nahe, dass die hemmende Wirkung von 5-FU auf die Metastasierung mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR bestimmt werden kann. Deshalb wurde im Folgenden dieser Sachverhalt näher untersucht.

4.2.2 Das Lungenkrebs-Modell H460M2

Das H460M2-Lungen-Adenokarzinom-Modell ist ein in vivo Xenograft-Modell für die Untersuchung der Wirksamkeit von therapeutischen Substanzen auf den Primärtumor und die spontane Metastasierung.

Die Tumorzellen wurden subkutan in die Fußsohle der Hinterpfote von SCID-Mäusen injiziert. Um das Auswachsen der Mikrometastasen zu fördern, wurde der Primärtumor nach 21 Tagen durch Amputation der entsprechenden Pfote entfernt (Kitinya et al., 1988; Uchida et al., 2000).

4.2.2.1 Kinetik der Metastasierung in der Lunge

In einer ersten tierexperimentellen Studie wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt nach Implantation des Tumors humane Zellen nachgewiesen werden können, bzw. ob die Alu-PCR der konventionellen makroskopisch-anatomischen Auswertung überlegen ist.

Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 13 dargestellt. H460M2-Tumorzellen wurden subkutan in die rechte hintere Fußpfote von SCID-beige Mäusen injiziert und nach 21 Tagen der Primärtumor entfernt. Nach weiteren 7, 14 und 21 Tagen wurde jeweils eine Gruppe von 6 Tieren getötet und die Lungen entnommen. Die Negativkontrollen, d. h. Tiere, denen keine Tumorzellen injiziert wurden, wurden ebenfalls nach 21 Tagen getötet. Anschließend wurde die genomische DNA isoliert und mittels Alu-PCR quantifiziert, wobei jeweils 25 ng DNA pro Reaktion verwendet wurden.

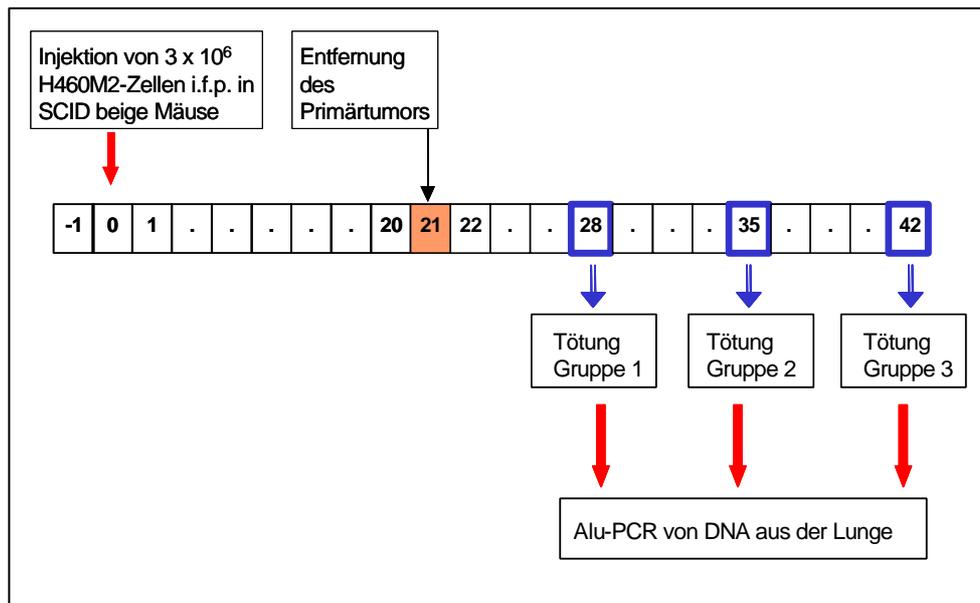


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs nach der Injektion von H460M2-Zellen in die Fußpfote (i.f.p.) von SCID beige Mäusen.

21 Tage nach Injektion von 3×10^6 H460M2-Tumorzellen in die Fußpfote von SCID beige Mäusen wird der Primärtumor entfernt. Nach weiteren 7 (Gruppe 1), 14 (Gruppe 2) und 21 Tagen (Gruppe 3) werden die Tiere der entsprechenden Gruppe getötet und die Lunge explantiert. Der Gehalt an humaner DNA wurde nach Isolierung der genomischen DNA mittels quantitativer Alu-PCR bestimmt.

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich ist, konnte bei allen untersuchten Lungen bereits sieben Tage nach der Entfernung des Primärtumors humane Alu-Sequenzen nachgewiesen werden. Auch 14 Tage nach der Operation waren in allen Lungen Tumorzellen detektierbar, wenn auch der Gehalt an humaner DNA im Mittel mit $2,0 \mu\text{g}$ pro Lunge ähnlich lag wie der Wert von Tag 7 ($1,8 \mu\text{g}$). Erst am letzten Tötungstag, waren Metastasen an der Lungenoberfläche erkennbar. Dies spiegelte sich auch in einem deutlich höheren Alu-Signal ($9,0 \mu\text{g}$ pro Lunge) im Vergleich zu den vorhergehenden Ergebnissen wieder. Bei Verwendung der Lungen der Negativkontrollgruppe in der PCR waren keine Alu-Sequenzen nachweisbar.

Die statistische Auswertung mit Hilfe des SigmaStat-Computerprogramms ergab, dass die Zunahme des Alu-Signals von Tag 7 auf Tag 21 mit $p=0,002$ und ebenso von Tag 14 auf Tag 21 mit $p=0,015$ statistisch signifikant war.

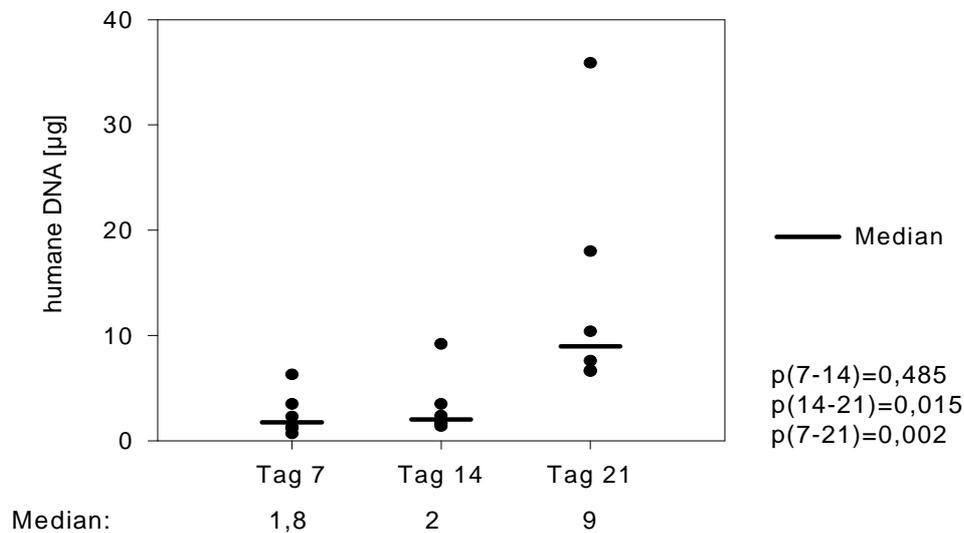


Abbildung 14: Kinetik der Metastasierung der Lunge im spontanen Metastasierungsmodell H460M2.

SCID beige Mäusen wurden 3×10^6 H460M2 Tumorzellen in die Fußpfote injiziert, nach 21 Tagen wurde der Primärtumor entfernt. Nach weiteren 7, 14 und 21 Tagen wurde jeweils eine Gruppe von 6 Mäusen getötet, die Lungen explantiert und die genomische DNA isoliert. In die PCR-Reaktion wurden jeweils 25 ng DNA eingesetzt. Die Werte geben den Gehalt an humaner DNA pro Lunge wieder und wurden aus dem Mittelwert von vier PCR-Reaktionen ermittelt.

Die Zunahme im Metastasegehalt war von Tag 14 auf Tag 21 ($p=0,015$) und von Tag 7 auf Tag 21 ($p=0,002$) statistisch signifikant.

4.2.2.2 Untersuchung des Einflusses von Taxol und RO28-2653 auf die Metastasierung

Taxol ist ein Zytostatikum, das in der Klinik zur Behandlung von Krebs etabliert ist. Diese Substanz inhibiert sowohl das Wachstum des Primärtumors als auch die Metastasierung. Deshalb wurde in einer weiteren tierexperimentellen Studie Taxol in dem spontanen H460M2 Metastasierungsmodell verwendet. Bei dieser Studie sollte überprüft werden, ob die quantitative Alu-PCR die hemmende Wirkung von Taxol auf die Metastasierung widerspiegelt. Parallel dazu wurde eine weitere Substanz, RO28-2653 ein neuentwickelter MMP-Inhibitor, auf seine Wirksamkeit hinsichtlich der Metastasierung getestet.

Der Versuchsablauf und das Behandlungsschema für dieses Experiment sind in Abbildung 15 dargestellt. Es wurden insgesamt vier Gruppen mit jeweils 15 Tieren in den Versuch eingesetzt, die mit dem Vehikel von Taxol bzw. Taxol oder mit dem Vehikel von RO28-2653 bzw. RO28-2653 behandelt wurden. 41 Tage nach Injektion der Tumorzellen wurden die Mäuse getötet, die Lungen explantiert und halbiert. Aus einer Lungen-Hälfte wurde die

genomische DNA isoliert und jeweils 2,5 ng in die PCR eingesetzt, die andere Hälfte wurde in Formalin fixiert und immunhistologisch untersucht.

Um ein Gesamtbild des Metastasierungsverhaltens von H460M2-Zellen zu erhalten, wurde neben der Lunge auch der Gehalt an humaner DNA in Leber, Milz und Niere bestimmt.

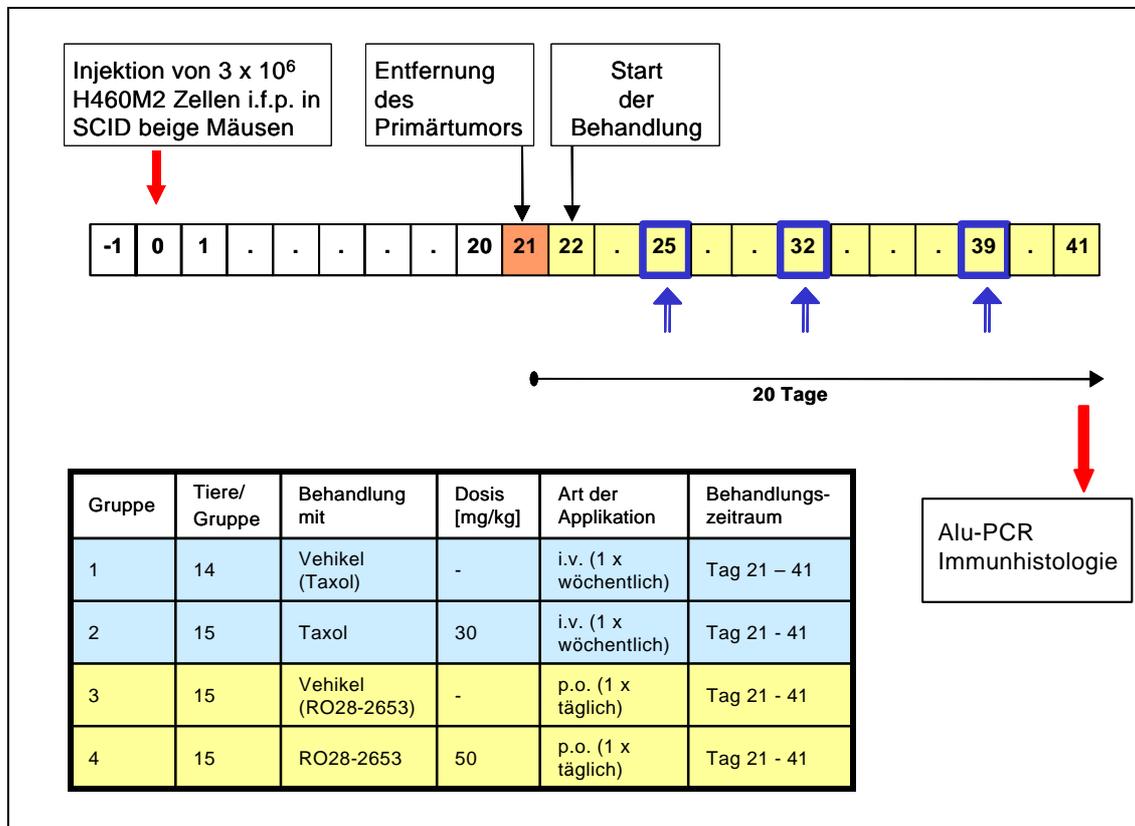


Abbildung 15: Darstellung des Versuchsaufbaus mit dem dazugehörigen Behandlungsschema zur Untersuchung der Wirksamkeit von Taxol und RO28-2653 im spontanen H460M2 Metastasierungsmodell

H460M2-Tumorzellen wurden in die Fußpfote (i.f.p.) von SCID beige Mäusen injiziert, nach 21 Tagen wurde der Primärtumor entfernt und ab dem 22. Tag mit der Behandlung begonnen. Das Behandlungsschema für die einzelnen Gruppen ist in der Tabelle wiedergegeben. Taxol wurde einmal wöchentlich, RO28-2653 täglich appliziert. Am 41. Tag wurde der Versuch beendet und jeweils Lunge und Leber explantiert. Der Metastasegehalt wurde in der Lunge (immunhistologisch/Alu-PCR) und Leber (Alu-PCR) bestimmt.

Das Ergebnis der quantitativen Alu-PCR ist in Abbildung 16 dargestellt. Es ergab sich eine deutliche Abnahme des Alu-Gehalts bei den Taxol-behandelten Tieren im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle. So lag der Median des Alu-Signals der Vehikel-Gruppe bei 140,9 µg humane DNA pro Lunge und der der Taxol-behandelten Gruppe bei 7,6 µg, was einer Hemmung von 95 % entsprach. Das Ergebnis war statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Bei der Behandlung mit RO28-2653 konnte ebenfalls eine Reduktion des Alu-Signals gegenüber der Vehikel-behandelten Gruppe beobachtet werden. Es wurde ein mittlerer DNA-Gehalt von 114,3 µg humane DNA pro Lunge in der Vehikel(RO)-Gruppe gegenüber 54,9 µg humane DNA in der RO28-2653-Gruppe ermittelt. Die Hemmung betrug somit 52 %

und war damit im Gegensatz zu Taxol wesentlich geringer. Des Weiteren ergab die statistische Auswertung für RO28-2653 eine nicht-signifikante Abnahme der Metastasen ($p=0,229$).

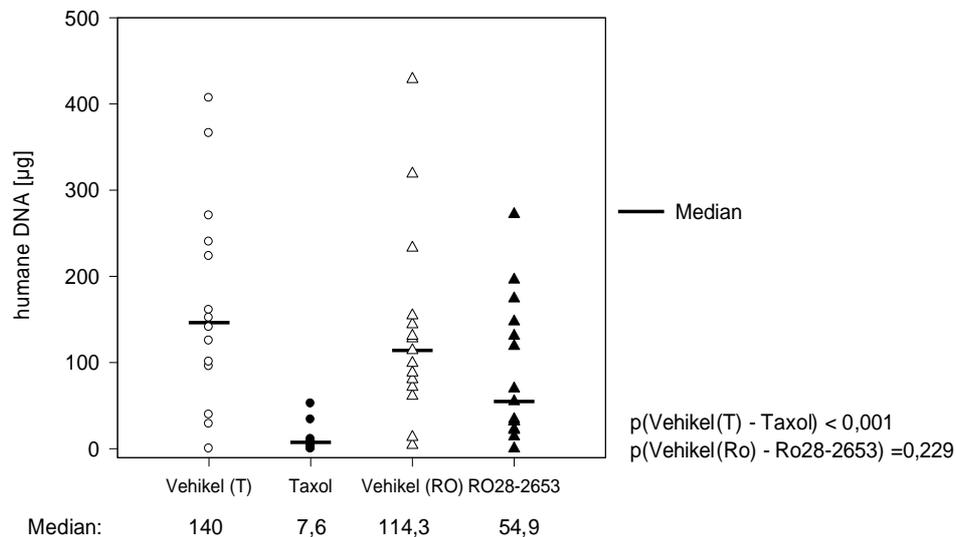


Abbildung 16: Bestimmung der inhibierenden Wirkung von Taxol und RO28-2653 auf den Metastasengehalt in der Lunge mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR.

In dem spontanen Metastasierungsmodell H460M2 wurde nach Explantation der Lungen die genomische DNA isoliert. In die PCR-Reaktion wurden jeweils 2,5 ng DNA eingesetzt. Die Werte geben den Gehalt an humaner DNA pro Lunge wieder und wurden aus dem Mittelwert von vier PCR-Reaktionen ermittelt.

Die Abnahme des Gehalts an humaner DNA in der Lunge nach Behandlung mit Taxol war im Vergleich zum Vehikel statistisch signifikant ($p < 0,001$). Der Effekt von RO28-2653 war dagegen nicht signifikant ($p = 0,229$).

Um die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR zu verifizieren, wurde jeweils die zweite Hälfte der Lunge aus dem oben beschriebenen Experiment immunhistologisch ausgewertet. Hierfür wurden drei Paraffinschnitte einer Lunge mit dem human-spezifischen Antikörper Ki-67 angefärbt und die Metastasenfläche mit dem Computerprogramm ImagePro4.0 bestimmt.

Die Abbildung 17 zeigt exemplarisch das Bild einer Ki-67 angefärbten Metastase in der Lunge. Sie befindet sich im Inneren des Organs zwischen einem Bronchus und einem Blutgefäß. Murines Gewebe wurde nicht angefärbt, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass dieser Antikörper keine Kreuzreaktivität mit Mausgewebe aufwies.

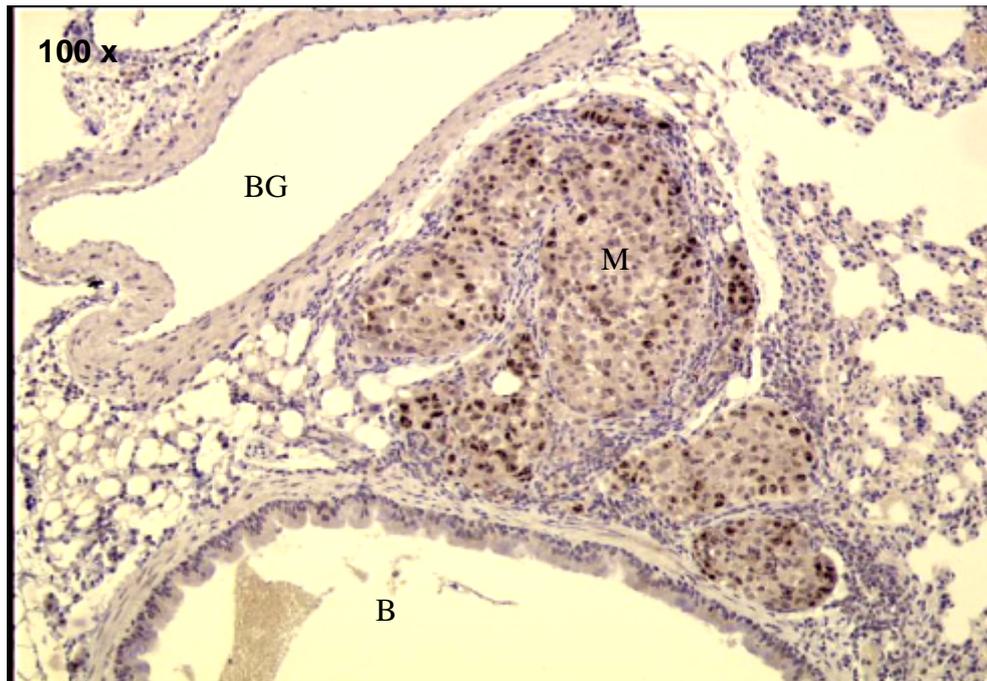


Abbildung 17: Immunhistologische Nachweis einer Metastase im Lungengewebe (100-fache Vergrößerung).

Aus Formalin-fixiertem Lungengewebe wurden 4 μm Dünnschnitte angefertigt. Die Metastasen wurden mit dem human-spezifischen Ki-67-Antikörper detektiert. Die Metastase (braun) befindet sich zwischen einem Blutgefäß (BG) und einem Bronchus (B). Murines Lungengewebe (blau) wurde nicht angefärbt.

Für die morphometrische Auswertung wurde von jeweils drei Gewebeschnitten einer Lunge die einzelnen Metastasenflächen bestimmt, aufsummiert. Diese wurden anschließend gruppenweise miteinander verglichen.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der morphometrischen Auswertung. Die Metastasenfläche ging von 15,9 mm^2 bei der Vehikel (T)-behandelte Gruppe auf 1,58 mm^2 bei der Taxol-Gruppe zurück. Dies entspricht einer Hemmung von 90 %. Die Wirkung des MMP-Inhibitors RO28-2653 war weniger deutlich, da hier die Metastasenfläche im Mittel von 15,77 mm^2 (Vehikel-Gruppe) auf 7,78 mm^2 (RO28-2653-Gruppe) abnahm. Die Hemmung betrug somit 50,6 %, war aber im Gegensatz zu Taxol statistisch nicht signifikant ($p_{\text{Taxol}} = 0,002$; $p_{\text{RO28-2653}} = 0,709$).

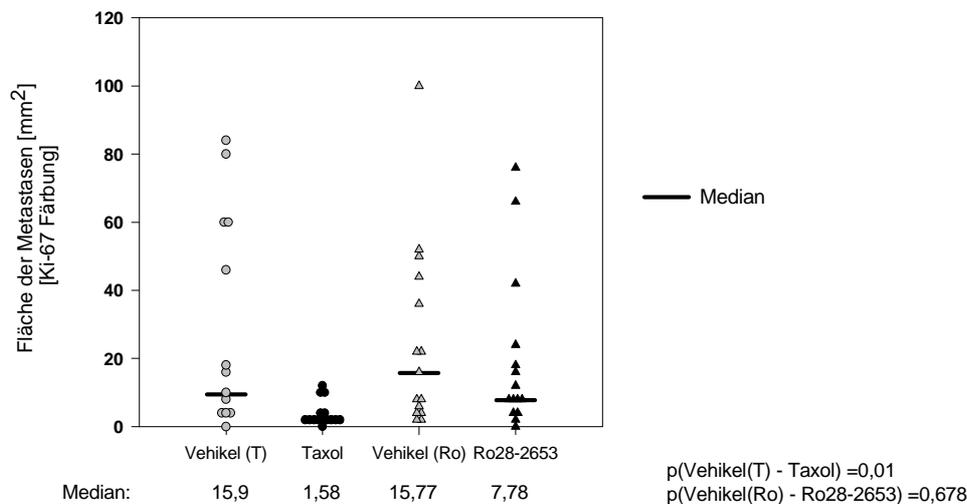


Abbildung 18: Bestimmung der anti-metastasierenden Wirkung von Taxol und RO28-2653 mittels morphometrischer Bestimmung der Metastasenfläche nach immunhistologischer Anfärbung mit dem human-spezifischen Antikörper Ki-67.

Von zwei Formalin-fixierten Lungenlappen wurden drei Gewebeschnitte mit dem humanspezifischen Antikörper Ki-67 gefärbt. Die Fläche der Metastasen wurde morphometrisch mit Hilfe des Computerprogramms ImagePro4.0 berechnet. Pro Lunge wurden drei Schnitte ausgewertet und die Metastasenflächen aufsummiert.

Die hemmende Wirkung von Taxol auf die Metastasierung war gegenüber dem Vehikel statistisch signifikant ($p=0,01$), nicht jedoch der Effekt von RO28-2653 ($p=0,678$).

Der Vergleich der morphometrischen Auswertung (Abbildung 18) mit der quantitativen Alu-PCR (Abbildung 16) ergab bei beiden Verfahren, annähernd die gleichen Effekte von Taxol bzw. RO28-2653 auf die Metastasierung.

Für den direkten Vergleich der beiden Methoden, wurden die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR den Werten der immunhistologischen Auswertung gegenübergestellt. Hierbei ergab sich insgesamt ein Korrelationskoeffizient von 0,76, was auf eine relativ gute Übereinstimmung dieser beiden Methoden hinweist. Bei der immunhistologischen Auswertung wurde beobachtet, dass die Lungen der Vehikel-Gruppen und der RO28-2653-Gruppe von vielen Metastasen übersät waren. Dadurch war eine exakte morphometrische Auswertung in einigen Fällen nicht möglich.

Für die Bestimmung des Gehalts an humaner DNA in sekundären Organen wie Leber, Niere und Milz, wurde jeweils 2,5 ng genomische DNA in die quantitative Alu-PCR eingesetzt. Die Ergebnisse sind für die einzelnen Organe in Abbildung 19 dargestellt.

Der Gehalt an humaner DNA in Leber, Niere und Milz war im Vergleich zu dem der untersuchten Lungen wesentlich geringer und lag oftmals auch unter der Nachweisgrenze. In der Leber konnte ein deutlicher Rückgang im „Alu-Signal“ unter Taxol-Behandlung

verzeichnet werden, das Signal ging von 42,7 ng in der Vehikel-Gruppe auf 2,1 ng/ml in der Taxol-Gruppe zurück. Die Hemmung betrug 95 % und war statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Unter Behandlung der Tiere mit dem MMP-Inhibitor RO28-2653 nahm das Alu-Signal in der Leber von 17,8 ng bei der Vehikel-Gruppe auf 17,4 ng bei der RO28-2653-Gruppe ab, wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war ($p = 0,934$).

Zudem konnten in den Nieren der Tiere der beiden Vehikel-Gruppen geringe DNA-Mengen gemessen werden. Lediglich in der Milz wurde in keiner Gruppe humane DNA nachgewiesen.

Da der Gehalt an humaner DNA in den oben beschriebenen Organen insgesamt sehr niedrig war, kann davon ausgegangen werden, dass in diesem Tiermodell die H460M2-Tumorzellen bevorzugt in die Lunge und nur zu einem geringen Anteil in andere Sekundärorgane metastasieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Quantifizierung humaner Alu-Sequenzen Aussagen bezüglich der Wirksamkeit von Substanzen auf die Metastasierung in verschiedenen Organen erlauben.

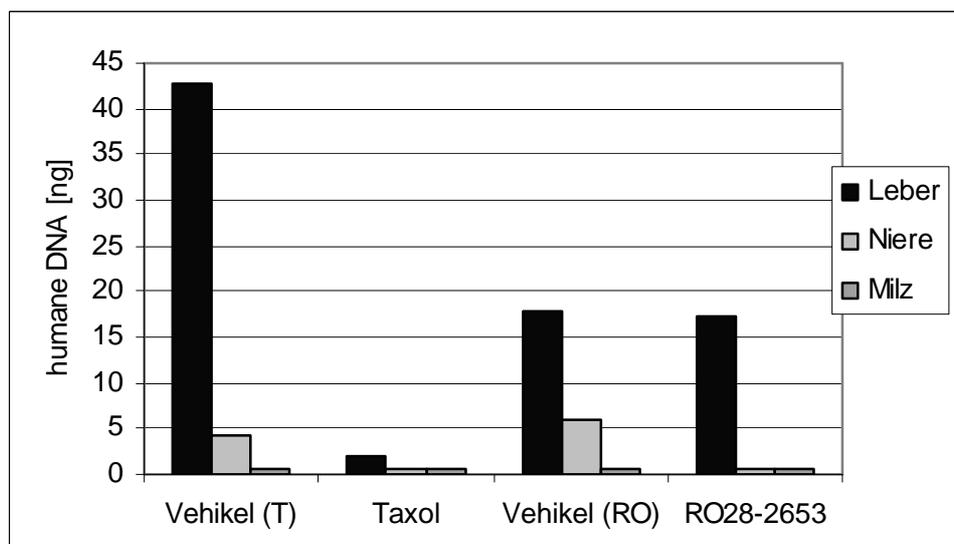


Abbildung 19: Bestimmung der inhibierenden Wirkung von Taxol und RO28-2653 auf den Metastasegehalt in Leber (gepunktet), Niere (grau) und Milz (schraffiert) mittels quantitativer Alu-PCR im H460M2-Lungenmodell.

21 Tage nach Injektion der H460M2-Tumorzellen, wurde der Primärtumor entfernt und mit der Behandlung (Taxol, RO28-2653 oder entsprechendes Vehikel) begonnen. Nach weiteren 21 Tagen wurde der Versuch beendet, die Organe entnommen und die genomische DNA isoliert. In die PCR-Reaktion wurden jeweils 2,5 ng DNA eingesetzt. Die Werte geben den Gehalt an humaner DNA pro Organ wieder und wurden aus dem Mittelwert von zwei PCR-Reaktionen ermittelt.

Dargestellt ist jeweils der Median jeder Gruppe. Die inhibierende Wirkung von Taxol in der Leber war gegenüber dem Vehikel statistisch signifikant. Dagegen konnte keine Wirkung von RO28-2653 auf die Metastasierung in der Leber verzeichnet werden. In der Niere wurde in beiden Vehikel-Gruppen humane DNA nachgewiesen. In der Milz konnte in keiner Gruppe Metastasen gemessen werden.

4.2.2.3 Bestimmung der Kinetik der Metastasierung nach Behandlung mit RO28-2653

Bei dem ersten Tierversuch zur Bestimmung der anti-metastasierenden Wirkung des MMP-Inhibitors RO28-2653 konnte mit Hilfe der morphometrischen Auswertung bzw. der quantitativen Alu-PCR ein Effekt auf die Metastasierung nach 21 Tagen Behandlung festgestellt werden. In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob die Wirkung einer Substanz bereits zu einem früheren Zeitpunkt nachgewiesen werden kann. Die durch die Alu-PCR ermittelten Werte wurden zusätzlich über die morphometrische Auswertung von immunhistologisch gefärbten Paraffinschnitten und mittels der makroskopischen Bestimmung der Metastasengewichte überprüft.

Das Tierexperiment wurde wie bereits unter 4.2.2.1 beschrieben durchgeführt, wobei entsprechend Tabelle 4 neun Gruppen mit jeweils 15 Tieren eingesetzt wurden. Die Gruppen 1 – 3 wurden nicht behandelt, bei den Gruppen 4 – 6 wurde das Vehikel DMA/PEG und bei den Gruppen 7 – 9 der MMP-Inhibitor RO28-2653 appliziert. Nach 7, 14 bzw. 21 Tagen wurden die Tiere getötet und die Lungen entnommen. Von jeweils 4 Tieren jeder Gruppe wurde eine Hälfte für die quantitative Alu-PCR und die zweite Hälfte für die immunhistologische Auswertung verwendet. Von den Gruppen 6 und 9 wurden alle Lungen halbiert, so dass immer eine Lungenhälfte mittels der quantitativen Alu-PCR und die andere Hälfte entweder immunhistologisch (n=4) oder makroskopisch ausgewertet werden konnte.

Tabelle 4: Gruppeneinteilung und Behandlungsschema für die Wirksamkeitsstudie von RO28-2653.

3 x 10⁶ H460M2-Tumorzellen wurden in die Fußpfote von SCID beige Mäusen injiziert. Nach 21 Tagen wurde die Fußpfote entfernt. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 7, 14 bzw. 21 Tage nicht (Gruppe 1 – 3), mit dem Vehikel (Gruppe 4 – 6) oder mit RO28-2653 (Gruppe 7- 9) behandelt. Die Bestimmung des Metastasenanteils erfolgte mittels quantitativer Alu-PCR, Immunhistologie oder makroskopisch-anatomischer Auswertung.

Gruppe	Tiere pro Gruppe*	Behandlung	Behandlungszeitraum bzw. Tage nach der Operation	Auswertung
1	14/15	keine	7	Alu-PCR (n=14) Immunhistologie (n=4)
2	12/15	keine	14	Alu-PCR (n=12) Immunhistologie (n=4)
3	13/15	keine	21	Alu-PCR (n=13) Immunhistologie (n=4)
4	13/15	Vehikel	7	Alu-PCR (n=13) Immunhistologie (n=4)
5	13/15	Vehikel	14	Alu-PCR (n=13) Immunhistologie (n=4)
6	11/15	Vehikel	21	Alu-PCR (n=11) Immunhistologie (n=4) Makroskopie (n=7)
7	13/15	RO28-2653	7	Alu-PCR (n=13) Immunhistologie (n=4)
8	15/15	RO28-2653	14	Alu-PCR (n=15) Immunhistologie (n=4)
9	11/15	RO28-2653	21	Alu-PCR (n=14) Immunhistologie (n=11) Makroskopie (n=7)

* Tiere bei Versuchsende/Tiere bei Versuchsbeginn

Nach Versuchsende wurde aus den Lungen die genomische DNA isoliert und in die quantitative Alu-PCR eingesetzt. Um Meßungengenauigkeiten zu minimieren wurde von jeder Probe eine Doppelbestimmung in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR grafisch für den jeweiligen Tötungstag in sog. „*Frequency-Plots*“ dargestellt.

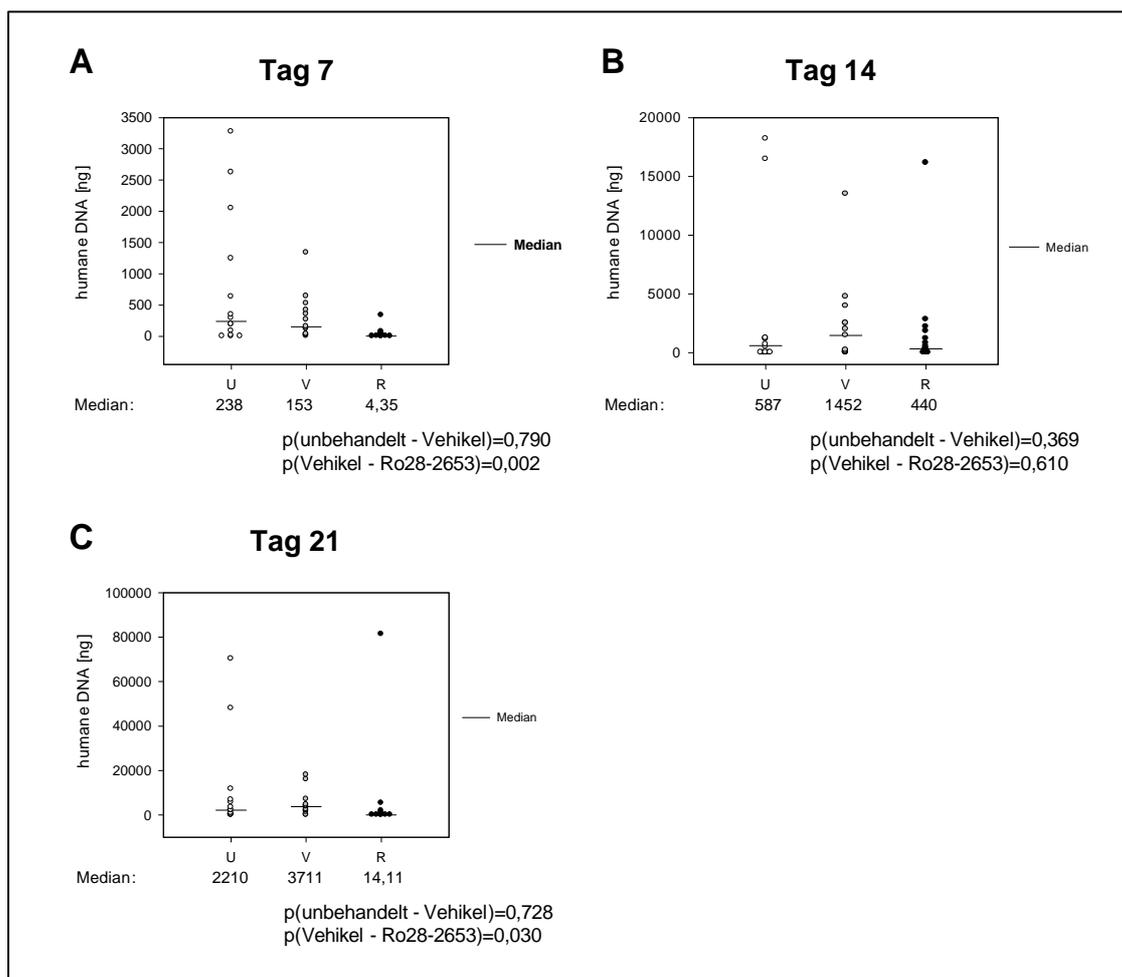


Abbildung 20: Gehalt an humaner DNA in den Lungen von SCID beige Mäusen im H460M2-Modell nach Behandlung mit RO28-2653 (R) im Vergleich zu unbehandelten (U) und Vehikel-behandelten (V) Tieren 7, 14 und 21 Tagen nach der Operation (ps). (A) Metastasengehalt 7 Tage ps; (B) Metastasengehalt 14 Tage ps, (C) Metastasengehalt 21 Tage ps

Nach der Explantation der Lungen wurde die genomische DNA isoliert. In die PCR-Reaktion wurden jeweils 2,5 ng DNA eingesetzt. Die Werte geben den Gehalt an humaner DNA pro Lunge wieder und wurden aus dem Mittelwert von vier PCR-Reaktionen ermittelt.

Bereits sieben Tage nach der Entfernung des Primärtumors nahm der Gehalt an humaner DNA pro Lunge von den RO28-2653-behandelten Tieren gegenüber der Vehikel-behandelten Gruppe von 152,9 ng auf 4,35 ng ab. Dies entsprach einer signifikanten Hemmung von 97 % ($p=0,002$). Für die unbehandelte Gruppe wurde im Mittel 238,3 ng humane DNA pro Lunge gemessen, wobei der Unterschied zwischen der Vehikel-Gruppe und den unbehandelten Tieren mit $p=0,790$ statistisch nicht signifikant war.

In den Lungen der Tiere, die 14 Tage nach der Operation getötet wurden, betrug der humane DNA-Gehalt pro Lunge bei der „Vehikel“-Gruppe 1452 ng und bei der RO28-2653-behandelten Gruppe 440 ng. Obwohl die Metastasierung deutlich zurückgegangen war und

die Hemmung durch RO28-2653 70 % betrug, war das Ergebnis aufgrund der großen Streuung statistisch nicht signifikant ($p=0,610$). Bei der unbehandelten Gruppe lag das Alu-Signal, das 587,5 ng humaner DNA pro Lunge entsprach, deutlich unterhalb des Werts der Vehikel-Gruppe, wobei dieser Unterschied wie schon bei den am Tag 7 getöteten Tieren statistisch nicht signifikant ($p=0,369$) war.

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse, der am 52. Tag getöteten Tiere, also 21 Tage nach der Entfernung des Primärtumors, ergab eine Inhibition der Metastasierung um 100 % ($p=0,030$). Während der mittlere humane DNA-Gehalt pro Lunge in der Vehikel-Gruppe 3711,3 ng betrug, lag er bei der RO28-2653 Gruppe bei 14,11 ng. Der Wert für die unbehandelte Gruppe war mit 2209,8 ng ähnlich wie bei der Vehikel-Gruppe.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der quantitativen PCR zeigten eine deutliche Abnahme der Metastasierung unter der Behandlung mit dem MMP-Inhibitor RO28-2653. Der Effekt lag durchschnittlich bei 90 % und war damit deutlich höher als bei dem vorausgegangenen Experiment. Des Weiteren konnte eine signifikante Wirkung von RO28-2653 auf die Metastasierung bereits 7 Tage nach Entfernung des Primärtumors gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, daß aufgrund der großen Streuung besonders am Tag 14 weitere Experimente durchgeführt werden müssen, um verlässliche Aussagen über die Wirksamkeit einer Substanz machen zu können.

Für die Verifizierung der Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR wurden die so ermittelten Werte mit der immunhistologisch bestimmten Metastasenfläche verglichen. Hierfür wurden randomisiert zwei Lungenlappen von vier Lungen aus jeder Gruppe (Tag 7, 14, 21) in Paraffin fixiert und mit Ki-67 angefärbt. Die Gesamtfläche der Metastasen pro Tier wurde dann mit dem jeweiligen Ergebnis aus der Alu-PCR verglichen. In Abbildung 21 sind die aus der Alu-PCR ermittelten Werte gegen die entsprechenden Metastasenflächen aufgetragen und eine Ausgleichsgerade durch die Punkte gelegt worden. Da die Werte annähernd auf einer Geraden liegen, was sich auch im Korrelationskoeffizienten widerspiegelt ($R=0,90$), kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der quantitativen PCR verlässliche Aussagen über den Grad der Metastasierung geben.

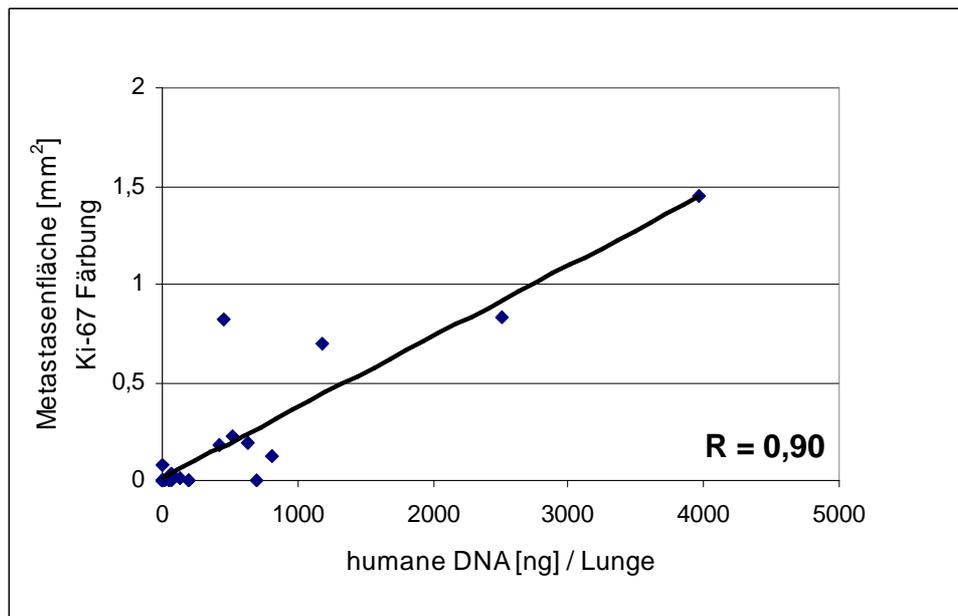


Abbildung 21: Korrelationsanalyse von quantitativer Alu-PCR und Metastasenfläche

Von jeder Gruppe wurden randomisiert vier Lungen halbiert, um eine Hälfte über die quantitative Alu-PCR und die zweite Hälfte immunhistologisch auszuwerten. In dem Diagramm wurden die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR gegen die morphometrisch bestimmten Werte der Metastasenfläche aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,90.

Der Grad der Metastasierung wird bei dem H460M2-Modell konventionell über die makroskopische Auswertung des Metastasengewichts bestimmt. Für den direkten Vergleich von quantitativer Alu-PCR und herkömmlicher Auswertung wurden die Lungen der Tiere, die 21 Tage nach Entfernung des Primärtumors getötet wurden (Gruppe 6 und 9, siehe S. 54) halbiert, der Gehalt an Metastasen makroskopisch bestimmt und mit den Werten der quantitativen Alu-PCR verglichen.

Das mittlere Metastasengewicht der Vehikel-behandelten Gruppe lag bei 127,3 mg, und bei der RO28-2653-behandelten Gruppe bei 1,95 mg. Dies entsprach einer Hemmung von 98 %, die jedoch mit $p=0,085$ statistisch nicht signifikant war (Abbildung 22).

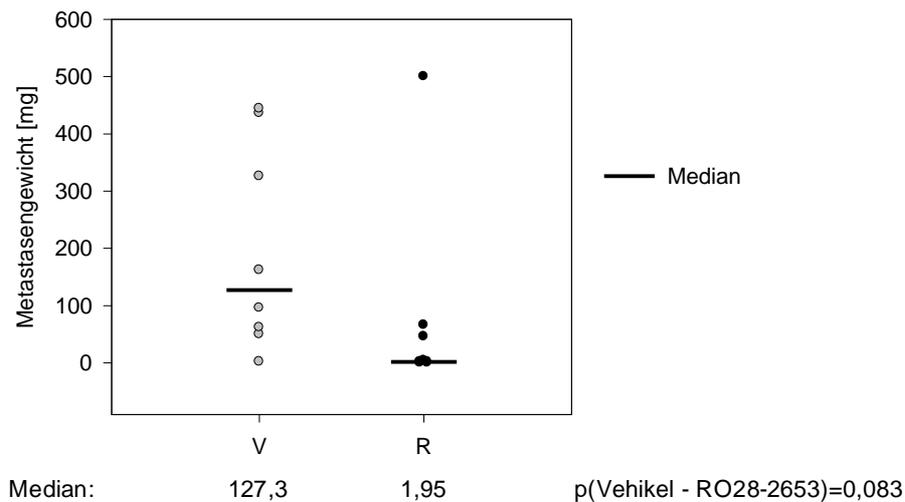


Abbildung 22: Bestimmung des Metastasengewichts 21 Tagen *post surgery* mittels der makroskopischen Auswertung der Metastasen in der Lunge.

Jeweils zwei Lungenlappen pro Lunge wurden in Bouin'scher Lösung fixiert und mit einer Digitalkamera photographiert. Das Volumen der an der Oberfläche sichtbaren Metastasen wurde mit dem Software Programm ImagePro4.0 ermittelt.

Der Vergleich von makroskopischer Auswertung und quantitativer PCR ist in der folgenden Abbildung (Abbildung 23) dargestellt. Hierfür wurden die Werte aus der PCR gegen die ermittelten Werte für das Metastasengewicht aufgetragen und eine Regressionsgerade durch die einzelnen Punkte gelegt. Der so ermittelte Korrelationskoeffizient R lag bei 0,67. Die Korrelationsanalysen zeigen eine wesentlich geringere Übereinstimmung von quantitativen Alu-PCR mit der makroskopischen Auswertung als die Immunhistologie. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei der Makroskopie Metastasen, die sich im Inneren der Lunge befinden, nicht gewertet werden.

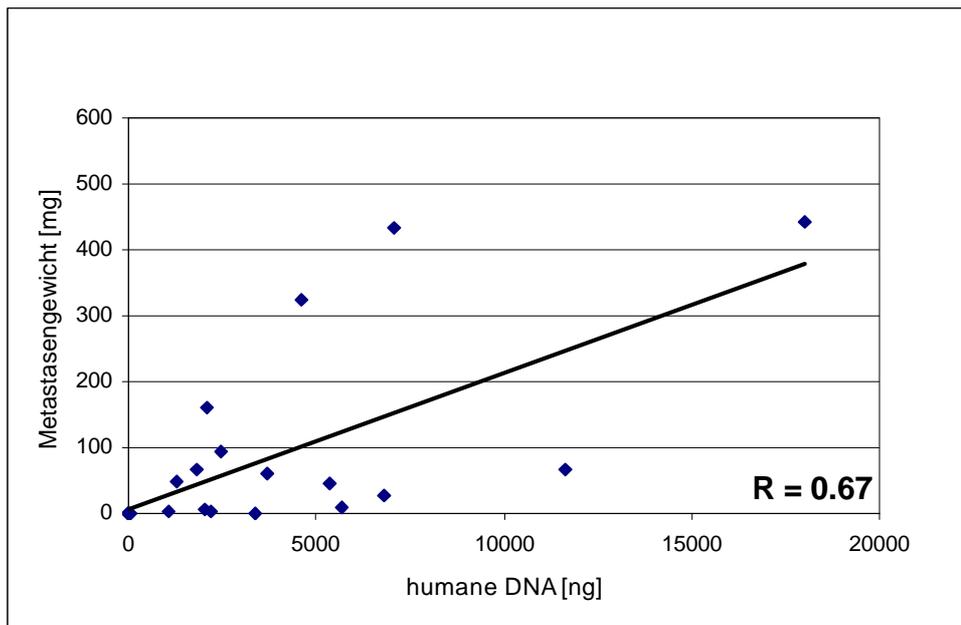


Abbildung 23: Korrelationsanalyse von quantitativer Alu-PCR und Metastasengewicht

In dem Diagramm wurden die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR gegen die Gewichte der makroskopisch sichtbaren Metastasen aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,67.

Für die Verifizierung der Ergebnisse wurde die oben beschriebene tierexperimentelle Studie zur Bestimmung der Wirksamkeit von RO28-2653 in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer wiederholt. Der Metastasegehalt wurde wiederum mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR bestimmt und mit der immunhistologischen bzw. makroskopischen Auswertung verglichen.

Die Behandlung und die entsprechende Auswertung für die einzelnen Gruppen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Gruppeneinteilung und Behandlungsschema für die Wirksamkeitsstudie von RO28-2653.

3 x 10⁶ H460M2-Tumorzellen wurden in die Fußpfote von SCID beige Mäusen injiziert. Nach 21 Tagen wurde die Fußpfote entfernt. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 7, 14 bzw. 21 Tage nicht (Gruppe 1 – 3), mit dem Vehikel (Gruppe 4 – 6) oder mit RO28-2653 (Gruppe 7- 9) behandelt. Die Bestimmung des Metastasenanteils erfolgte mittels quantitativer Alu-PCR, Immunhistologie oder makroskopisch-anatomischer Auswertung.

Gruppe	Tiere pro Gruppe	Behandlung	Behandlungszeitraum bzw. Tage nach der Operation	Auswertung
1	11/12	-	7	Alu-PCR (n=11) Immunhistologie (n=4)
2	12/12	-	14	Alu-PCR (n=12) Immunhistologie(n=4)
3	12/12	-	21	Alu-PCR (n=12) Immunhistologie (n=4) Makroskopie (n=8)
4	11/12	Vehikel	7	Alu-PCR (n=11) Immunhistologie (n=4)
5	12/12	Vehikel	14	Alu-PCR (n=12) Immunhistologie (n=4)
6	13/15	Vehikel	21	Alu-PCR (n=13) Immunhistologie (n=4) Makroskopie (n=9)
7	11/12	RO28-2653	7	Alu-PCR (n=11) Immunhistologie (n=4)
8	12/12	RO28-2653	14	Alu-PCR (n=12) Immunhistologie (n=4)
9	11/12	RO28-2653	21	Alu-PCR (n=11) Immunhistologie (n=4) Makroskopie (n=7)

* Anzahl bei Versuchsende/Tiere bei Versuchsbeginn

Für die quantitative Alu-PCR wurde, wie bereits im vorangegangenen Experiment, jeweils 2,5 ng genomische DNA. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 für den jeweiligen Tötungstag in *Frequency-Plots* dargestellt.

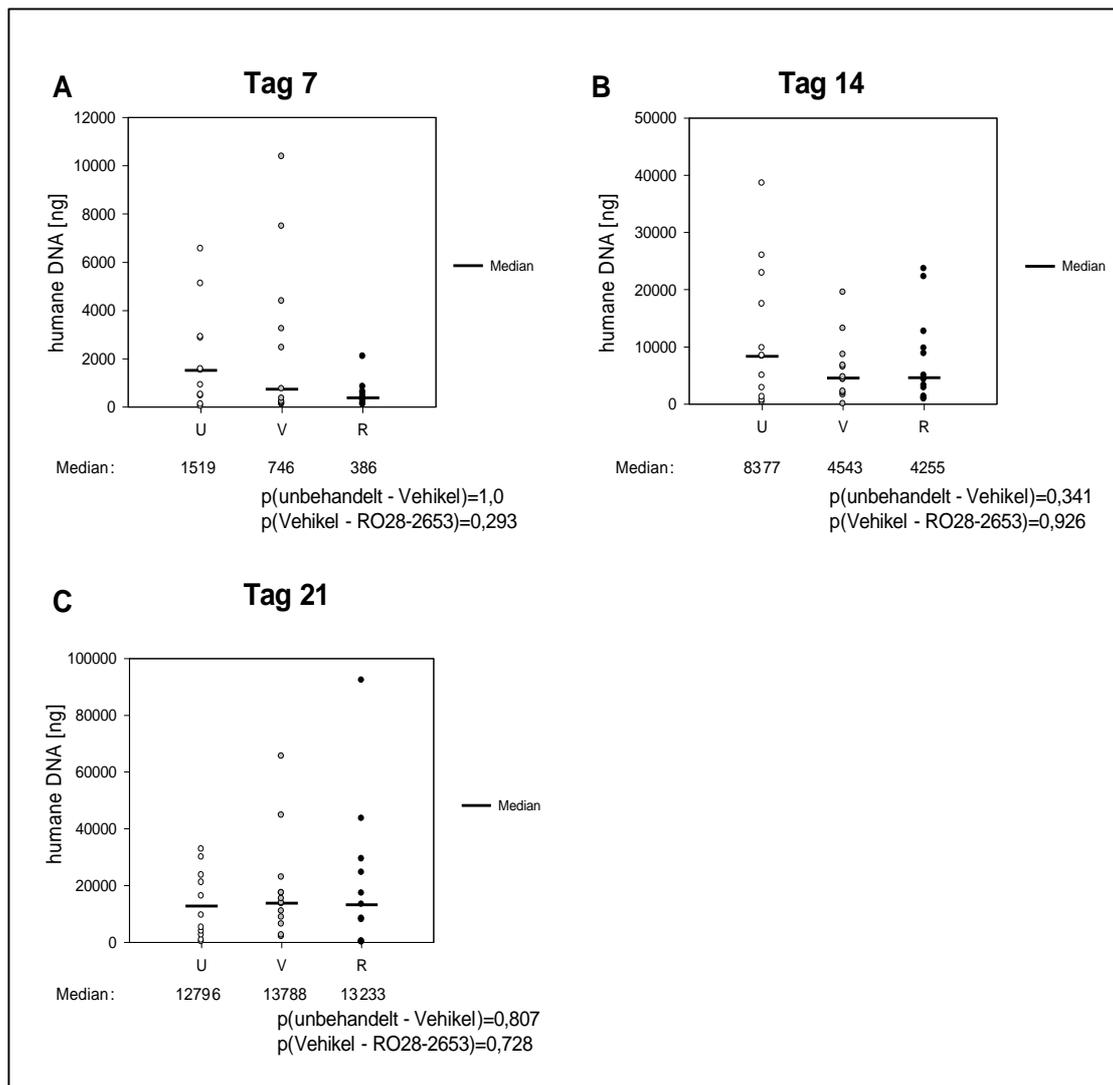


Abbildung 24: Metastasenengehalt der Lunge im H460M2-Modell nach Behandlung mit RO28-2653 (R) im Vergleich zu unbehandelten (U) und Vehikel-behandelten (V) Tieren 7, 14, und 21 Tage ps. (A) Metastasenengehalt 7 Tage ps, (B) Metastasenengehalt 14 Tage ps, (C) Metastasenengehalt 21 Tage ps

Nach der Explantation der Lungen wurde die genomische DNA isoliert. In die PCR-Reaktion wurden jeweils 2,5 ng DNA eingesetzt. Die Werte geben den Gehalt an humaner DNA pro Lunge wieder und wurden aus dem Mittelwert von vier PCR-Reaktionen ermittelt.

Sieben Tage nach der Entfernung des Primärtumors konnte bei der RO28-2653-behandelten Gruppe gegenüber der Vehikel-Gruppe ein Rückgang des Alu-Gehalts von 746 ng auf 386 ng festgestellt werden, der aber statistisch nicht signifikant war ($p=0,293$). Im Vergleich dazu lag der mittlere DNA-Gehalt bei der unbehandelten Gruppe bei 1519 ng, wobei der Unterschied zur Vehikel-Gruppe ebenfalls nicht signifikant war ($p=1,0$).

Bei den Tieren, die eine Woche später getötet wurden, nahm die Alu-Signalstärke zwar erwartungsgemäß signifikant zu, jedoch konnte keine Wirkung von RO28-2653 auf den Metastasenengehalt in der Lunge verzeichnet werden. Im Mittel lag der humane DNA-Gehalt bei der unbehandelten Gruppe bei 8377 ng, bei der Vehikel-Gruppe bei 4543 ng und bei der RO28-2653-behandelten Gruppe bei 4255 ng. Die statistische Auswertung ergab sowohl für

den Vergleich von unbehandelten mit Vehikel behandelten Tieren als auch von Vehikel-behandelten mit RO28-2653 behandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede ($p_{\text{unbehandelt-Vehikel}}=0,341$ bzw. $p_{\text{Vehikel-RO28-2653}}=0,926$).

Auch nach 21 Tagen zeigte sich, dass der MMP-Inhibitor keinen Effekt auf die Metastasierung hatte. Der mittlere Gehalt an humaner DNA lag bei der RO28-2653-behandelten Gruppe bei 13233 ng im Vergleich zu 13788 ng bei der Vehikel-Gruppe. In der unbehandelten Gruppe konnte im Mittel 12796 ng humane DNA nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren jedoch statistisch nicht signifikant ($p_{\text{unbehandelt-Vehikel}}=0,807$ bzw. $p_{\text{Vehikel-RO28-2653}}=0,728$) waren.

Die aus der Alu-PCR ermittelten Werte sprechen dafür, dass die Substanz RO28-2653 in diesem Versuch keinen Effekt auf die Metastasierung hatte. Die Schwankungen in der anti-metastasierenden Wirkung des MMP-Inhibitors in den drei tierexperimentellen Studien dokumentieren die große Variabilität tierexperimenteller Studien zur Quantifizierung der therapeutischen Effektivität.

Wie bereits bei dem ersten Versuch zur Untersuchung der Wirksamkeit von RO28-2653, wurden pro Gruppe vier Lungenhälften immunhistologisch analysiert. Die Metastasen wurden durch eine Ki-67-Färbung nachgewiesen und anschließend morphometrisch deren Fläche bestimmt.

Die so ermittelten Metastasenflächen wurden dann gegen die entsprechenden Ergebnisse aus der quantitativen Alu-PCR aufgetragen und der Korrelationskoeffizient berechnet (Abbildung 25). Die Werte lagen annähernd auf einer Geraden und für den Korrelationskoeffizienten R ergab sich ein Wert von 0,94, was wiederum auf eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus Immunhistologie und Alu-PCR hinwies.

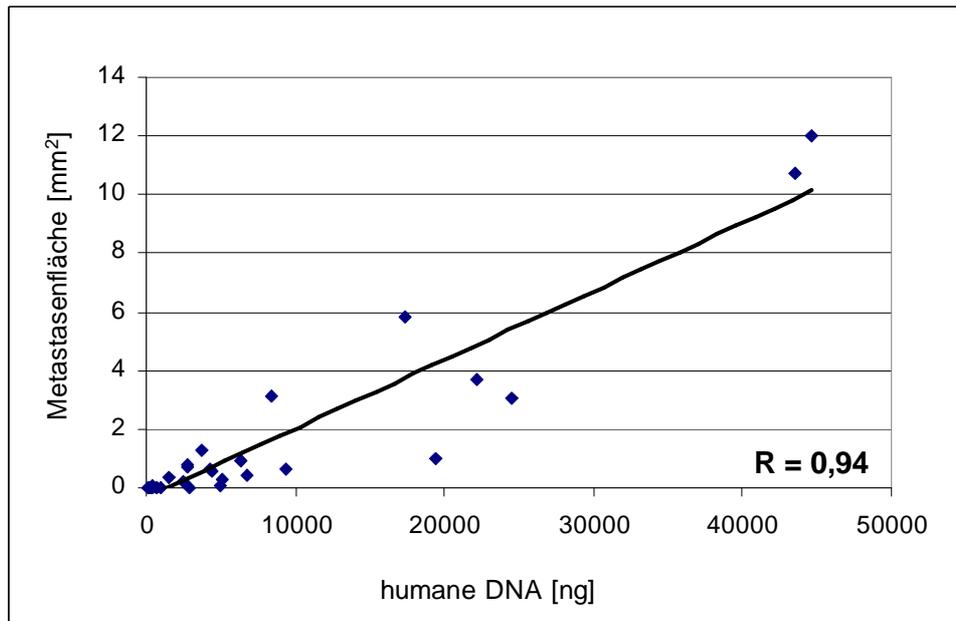


Abbildung 25: Korrelationsanalyse von quantitativer Alu-PCR und Metastasenfläche

Von jeder Gruppe wurden randomisiert vier Lungen halbiert, um eine Hälfte über die quantitative Alu-PCR und die zweite Hälfte immunhistologisch auszuwerten. In dem Diagramm wurden die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR gegen die morphometrisch bestimmten Werte der Metastasenfläche aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,93.

Für den direkten Vergleich von Alu-PCR und makroskopischer Auswertung des Metastasengewichts wurden die Lungenhälften der am Tag 21 getöteten Tiere in Bouin'scher Lösung fixiert und das Metastasengewicht bestimmt. Die Auswertung ergab ein mittleres Metastasengewicht für die unbehandelte Gruppe von 11,09 mg, für die Vehikel-Gruppe 10,19 mg und für die RO28-2653-Gruppe 3,65 mg, wobei die Hemmung statistisch nicht signifikant war ($p=0,169$).

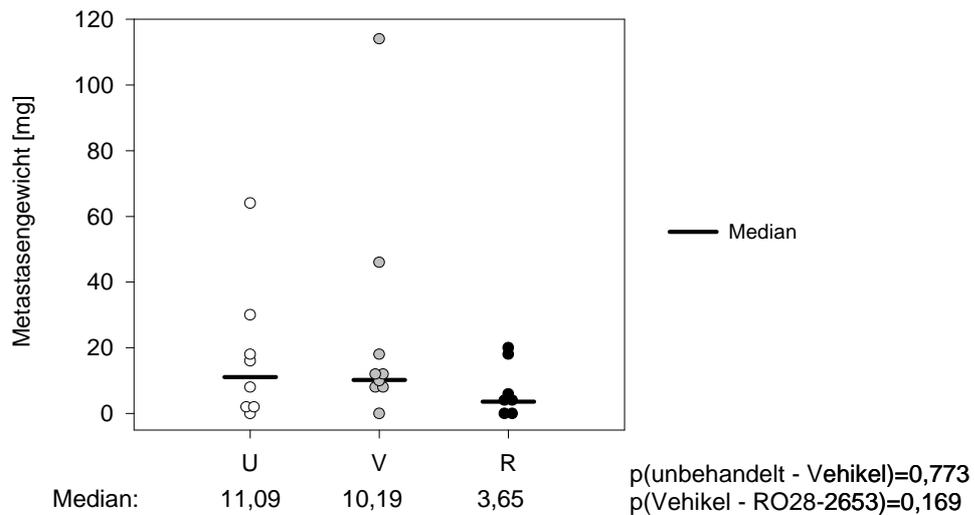


Abbildung 26: Bestimmung des Metastasengewichts 21 Tagen ps von unbehandelten (U), Vehikel- (V) und RO28-2653- behandelten (R) Tieren mittels der makroskopischen Auswertung der Metastasen in der Lunge.

Jeweils zwei Lungenlappen pro Lunge wurden in Bouin'scher Lösung fixiert und mit einer Digitalkamera fotografiert. Das Volumen der an der Oberfläche sichtbaren Metastasen wurde mit dem Software Programm ImagePro4.0 ermittelt.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR gegen die Werte der morphometrischen Auswertung aufgetragen. Der so ermittelte Korrelationskoeffizient R lag bei 0,77. Wie schon bei dem vorangegangenen Experiment, war die Korrelation zwischen Makroskopie und Alu-PCR wesentlich geringer als die Übereinstimmung mit der Immunhistologie.

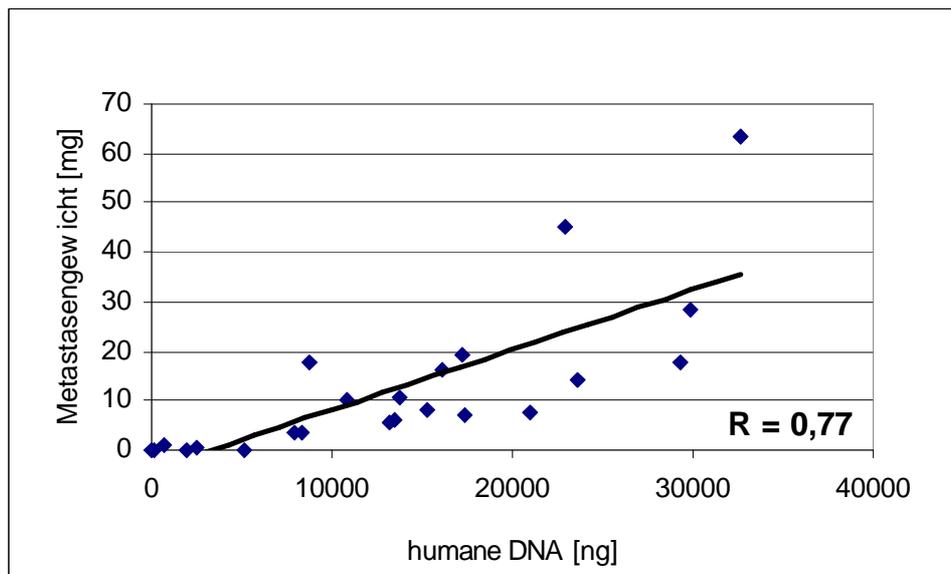


Abbildung 27: Korrelationsanalyse von quantitativer Alu-PCR und Metastasengewicht 21 Tage nach Entfernung des Primärtumors

In dem Diagramm wurden die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR der 21 Tage nach Entfernung des Primärtumors getöteten Tiere gegen die Gewichte der makroskopisch sichtbaren Metastasen aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,77.

4.2.3 Das orthotope PancTu-Modell

Die ektote, z. B. subkutane Injektion von Tumorzellen ist leicht durchzuführen und hat keinen traumatischen Effekt auf die Tiere. Häufig führt jedoch die subkutane Injektion von Tumorzellen zu einer Veränderung im Phänotyp und Metastasierungsverhalten (Mitchell und Schumacher, 1997). Aus diesem Grund werden mittlerweile häufig orthotope Modelle für die Analyse der Metastasierung verwendet. So kann bei der direkten Injektion der Tumorzellen in ihren ursprünglichen Entstehungsort das natürliche Milieu der Umgebung des Tumors imitiert werden, was eine bessere Anwachsrate der Tumore zur Folge hat. Zudem stimmt das Metastasierungsverhalten mit den Beobachtungen in der Klinik besser überein (Manzotti et al., 1993). Die Wirksamkeit von neuen anti-metastasierenden Substanzen kann somit wesentlich genauer analysiert werden, als es mit ektopen Modellen möglich wäre.

Das hier verwendete humane orthotope PancTu1-Adenokarzinom-Modell ist ein etabliertes System, um die therapeutische Wirksamkeit neuer Substanzen sowohl auf die Invasivität des Primärtumors als auch auf das Metastasierungsverhalten zu untersuchen. Die Injektion der Tumorzellen erfolgt direkt in den Pankreas und nach ca. einer Woche wird mit der Behandlung begonnen. Der Grad der Metastasierung und das Metastasierungsmuster wird im Regelfall nach 3-4 Wochen mittels Histologie bestimmt.

4.2.3.1 Bestimmung des Metastasierungsverhaltens von PancTu-1 Zellen in einer Maus

In einem ersten Experiment sollte die Verteilung der Metastasen in verschiedenen Organen nach orthotoper Injektion von PancTu1-Zellen mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR untersucht werden. Hierfür wurden die folgenden Organe einer Maus eines PancTu-Experiments, das von der Arbeitsgruppe F. Alves (Uni Göttingen) durchgeführt wurde, der Gehalt an humaner DNA bestimmt: Pankreas (Primärtumor), retroperitoneale Lymphknoten des Bauchraums, Zwerchfell, Mesenterium, Duodenum, Ileum, Jejunum Milz, Leber Magen, Herz und Lunge. Von allen Organen wurde die genomische DNA isoliert und in die quantitative Alu-PCR eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt, wobei die Summe der humanen DNA der verschiedenen Organe 100 % entspricht.

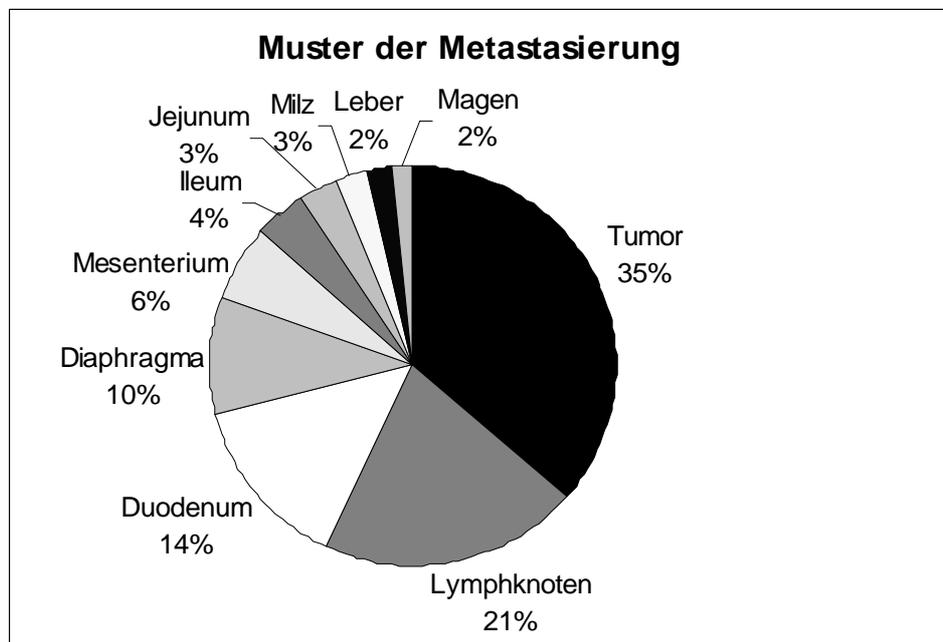


Abbildung 28: Muster der Metastasierung nach orthotoper Injektion von PancTu1-Zellen

Von einer Maus wurden die oben angegebenen Organe explantiert und die genomische DNA isoliert. Jeweils 2,5 ng DNA wurden in die Alu-PCR eingesetzt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil humaner DNA des entsprechenden Organs von der Summe der humanen DNA in allen untersuchten Organen.

Der größte Anteil humaner DNA wurde wie erwartet im Primärtumor (35 %) gemessen, aber auch in den Lymphknoten (21 %), im Duodenum (14 %), im Bereich des Darms (13 %) und im Zwerchfell (10 %) konnten humane Tumorzellen nachgewiesen werden. In der Milz (3 %), Leber (2 %) und Magen (2 %) war das Signal zwar wesentlich schwächer, dennoch waren auch hier Metastasen nachweisbar. Lediglich in der Lunge und im Herz dieser Maus waren keine Metastasen vorhanden.

Da der Tumor stark invasiv wächst, ist denkbar, dass die Metastasen in Leber, Magen und Darm durch die direkte Nachbarschaft zum Primärtumor entstanden sind.

4.2.3.2 Quantitative Alu-PCR aus Paraffinschnitten und Vergleich mit der histologischen Detektion der Metastasen

Da die oben beschriebenen Ergebnisse lediglich aus einer Maus gewonnen wurden, sollte in einem weiteren Experiment zum einen der Gehalt an humaner DNA in Pankreas, Leber und Magen bestimmt werden und zum anderen die erzielten Ergebnisse direkt mit der histologischen Auswertung verglichen werden. Aus diesem Grund wurden serielle Dünnschnitte angefertigt. Jeweils ein Schnitt wurde für die quantitative Alu-PCR und der unmittelbar folgende Schnitt für eine HE-Färbung verwendet. Nach Isolierung der genomischen DNA wurden jeweils 2,5 ng in die PCR eingesetzt. In den HE-gefärbten Schnitten wurde die Fläche der Metastasen morphometrisch bestimmt und mit den Ergebnissen der quantitativen PCR verglichen.

Die Auswertung der quantitativen Alu-PCR ist in Abbildung 29 dargestellt. Dabei zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Metastasen wie bei der histologischen Auswertung. Der höchste Anteil humaner DNA konnte im Pankreas (757 ng), dem Ort der Injektion der Tumorzellen, nachgewiesen werden. Aber auch im Magen wurde mit 257 ng ein hoher Anteil humaner DNA festgestellt, was durch die anatomische Nähe zum Pankreas erklärt werden kann. In der Leber konnte nur in vier von zehn Tieren geringe Mengen an humaner DNA nachgewiesen werden, der Median lag hier bei 1 ng.

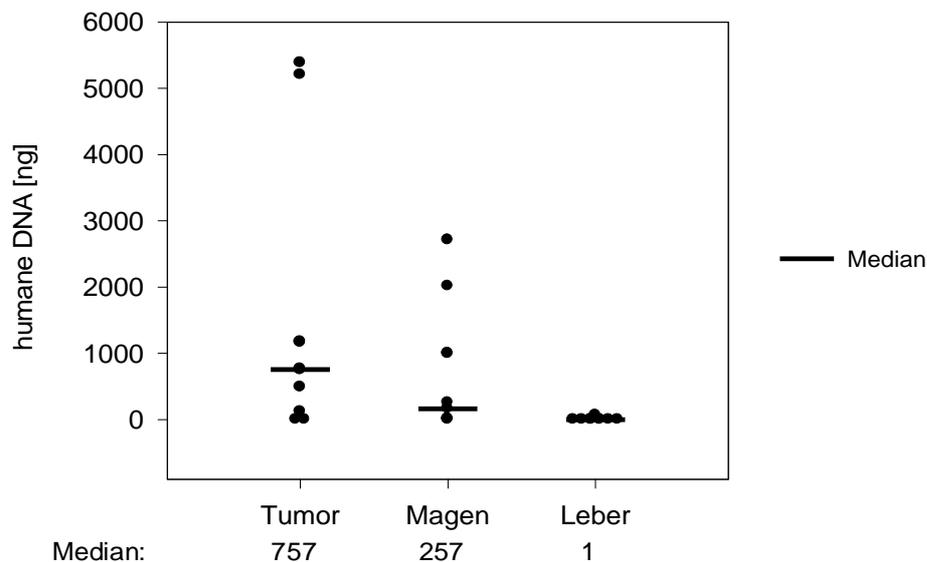


Abbildung 29: Bestimmung des Gehalts an humaner DNA in Paraffinschnitten von Pankreas, Magen und Leber

1×10^6 PancTu1-Zellen wurden orthotop in den Pankreas von SCID Mäusen appliziert. Nach 28 Tagen wurden Tumor, Magen und Leber explantiert und in Formalin fixiert. Nach der DNA-Isolierung aus einem Paraffinschnitt wurden 2,5 ng DNA in die PCR eingesetzt. Die Werte geben den Gehalt an humaner DNA pro Gewebedünnschnitt wieder und wurden aus dem Mittelwert von zwei PCR-Reaktionen ermittelt.

In Abbildung 30 sind HE-gefärbte Dünnschnitte von Pankreas(A), Magen (C) und Leber (E) und die jeweiligen Korrelationsanalysen (B, D, F) dargestellt. Der stark-invasive und aggressive Charakter dieser Tumorzelllinie ist v. a. im Pankreas zu erkennen (A). Im Bereich des Magens (C) wächst der Tumor zum Teil um den Magenausgang, was häufig zu Magenstenosen führt. Dieser Sachverhalt wird auch in der klinischen Situation beobachtet. In den Schnitten der Leber (E) ist die invasive Front des Tumors deutlich zu erkennen, die Metastasen wachsen hier von außen nach innen.

Für den direkten Vergleich von Alu-Signal und Metastasenfläche wurde die Signalstärke aus der PCR gegen die Metastasenfläche aufgetragen und anschließend der Korrelationskoeffizient R ermittelt. Die Organe zeigten eine sehr gute Übereinstimmung von diesen beiden Auswerteverfahren, wobei folgende Werte für R ermittelt wurden: $R_{\text{Pankreas}}=0,93$, $R_{\text{Magen}}=0,98$ und $R_{\text{Leber}}=0,99$.

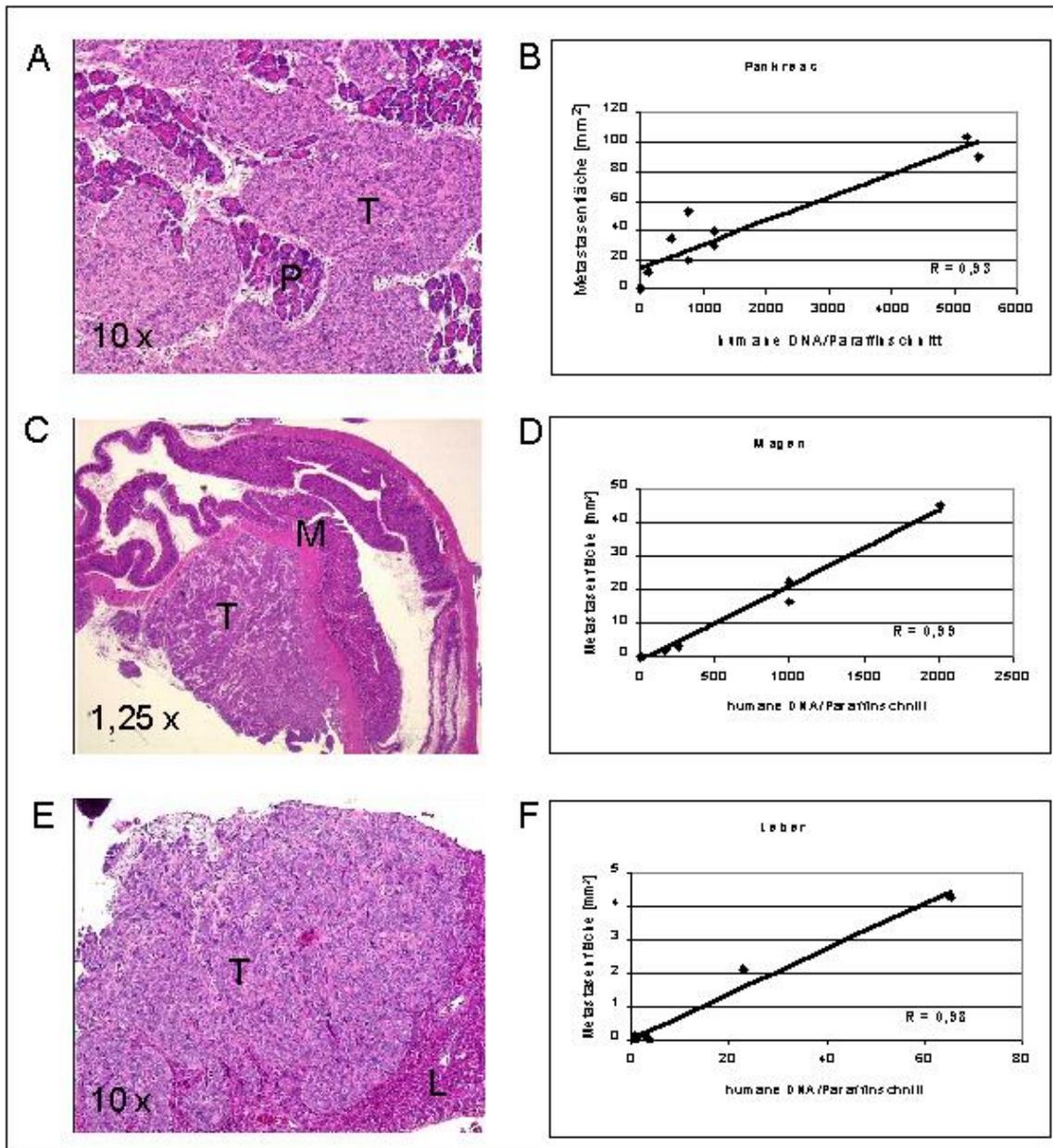


Abbildung 30: HE-gefärbte Gewebeschnitte von Pankreas (A), Magen (B) und Leber (C) nach orthotoper Injektion von PancTu1-Zellen und anschließende Korrelationsanalyse von quantitativer Alu-PCR und histologisch bestimmter Metastasenfläche.

(A) infiltratives Wachstum des Tumors (T) in das Pankreas-Gewebe (P)

(B) Korrelationsanalyse des Pankreas

(C) Magen(M) mit angrenzendem Tumorgewebe (T)

(D) Korrelationsanalyse des Magens

(E) Tumorgewebe (T), das in das benachbarte Leberparenchym (P) einwächst

(F) Korrelationsanalyse der Leber

28 Tage nach orthotoper Injektion der PancTu1-Zellen in den Pankreas wurde der Versuch beendet. Tumor, Leber und Magen wurden in Formalin fixiert. Die HE-gefärbten Schnitte wurden anschließend mit einer Digitalkamera fotografiert und die Metastasenfläche morphometrisch bestimmt. Aus den nächst folgenden Schnitten wurde die DNA isoliert und davon 2,5 ng in die PCR eingesetzt. In den Diagrammen (B, D, F) wurden die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR, die dem Gehalt humaner DNA pro Gewebedünnschnitt entsprechen, gegen die morphometrisch bestimmten Metastasenflächen aufgetragen und die Korrelationskoeffizienten ermittelt.

4.2.3.3 Die inhibierende Wirkung von Gemcitabine auf die Metastasierung im PancTu1-Modell

In einem weiteren PancTu1-Experiment wurde die Wirksamkeit von Gemcitabine, einem in der onkologischen Therapie etablierten Zytostatikum, getestet. In dieser Studie wurde ab dem achten Tag einer Gruppe das Vehikel und der anderen Gruppe Gemcitabine jeden zweiten Tag oral appliziert. Aufgrund des schlechten Allgemeinzustands der Tiere der Vehikel-Gruppe wurde der Versuch bereits nach 24 Tagen beendet. Von allen Tieren wurden Tumor, Magen, Darm, Niere, Lunge, Milz und Leber entnommen. Nach der Isolierung der genomische DNA wurde davon jeweils 2,5 ng in die PCR eingesetzt.

Von jedem Organ wurde eine Doppelbestimmung in zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 wiedergegeben.

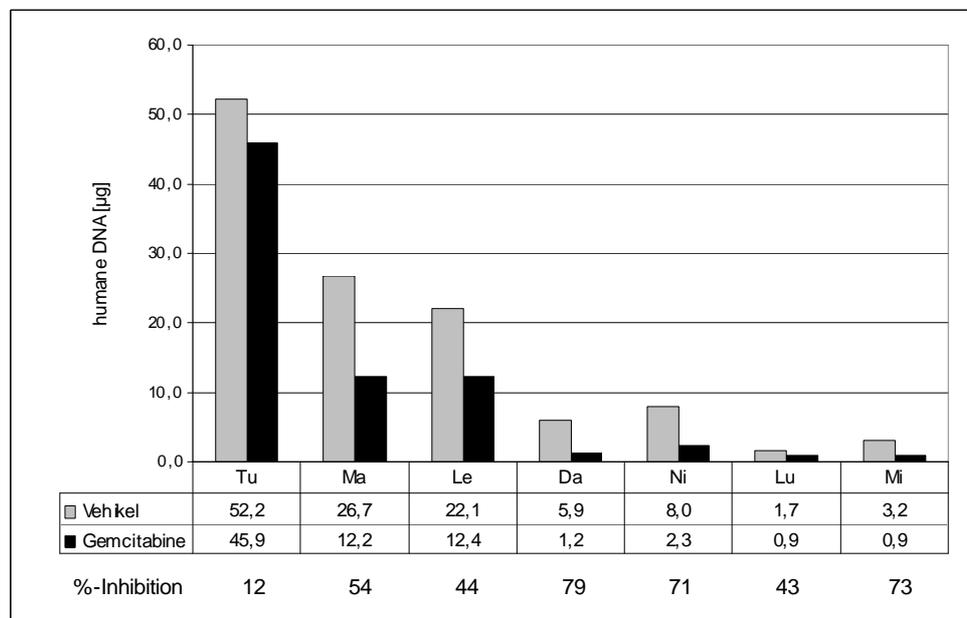


Abbildung 31: Bestimmung des Gehalts an humaner DNA in verschiedenen Organen mittels Alu-PCR

Nach orthotoper Injektion der PancTu1 Zellen in den Pankreas wurde ab dem 8. Tag mit der Behandlung begonnen. Gemcitabine wurde jeden zweiten Tag verabreicht. Nach Versuchsende wurden die Organe entnommen und der Gehalt an humaner DNA mittels quantitativer Alu-PCR ermittelt. In dem Diagramm sind die ermittelten Mediane der Vehikel- und Gemcitabine-Gruppe wiedergegeben, die den Gehalt an humaner DNA pro Organ wiedergeben. Zusätzlich wurde der Rückgang des Metastasegehalts in Prozent angegeben. (Tu = Primärtumor, Ma = Magen, Da = Darm, Le = Leber, Ni = Niere, Mi = Milz, Lu = Lunge)

Bei der Verwendung des Tumormaterials für die PCR war das Signal erwartungsgemäß am höchsten, wobei die Kontrollgruppe einen höheren Gehalt an humaner DNA aufwies (52,2 µg) als die Gemcitabine-Gruppe (45,9 µg). Somit ging der Gehalt an humaner DNA um 12 % zurück, was im Vergleich zu den anderen Organen verhältnismäßig gering war. Dies kann jedoch dadurch erklärt werden, dass bei der Entnahme nicht exakt der gesamte Tumor

entnommen wurde, da dieser meist mit anderen Organen wie Magen oder Mesenterium verwachsen war. Der Gehalt an humaner DNA im Magen lag in der Gemcitabine-Gruppe (12,2 µg) deutlich unter den Werten für die Vehikel-Gruppe (26,7 µg), entsprechend einer Hemmung von 54 %. Im Darm war der Effekt der Gemcitabine-Behandlung mit 79 % Hemmung am höchsten, der humane DNA-Gehalt ging dabei von 5,9 µg auf 1,2 µg zurück. Eine deutliche Abnahme im Metastasengehalt konnte auch in Leber (44 %), Niere (71 %) und Milz (73 %) beobachtet werden. Die Untersuchung der Lunge ergab in allen Lungen der Vehikel-Gruppe und in 8 von 10 Tieren der Gemcitabine-Gruppe ein deutliches, wenn auch wesentlich schwächeres Alu-Signal. Es lag im Mittel bei 1,7 µg in der Kontrollgruppe und bei 0,9 µg in der Gemcitabin-behandelten Gruppe, so dass davon ausgegangen werden muß, dass PancTu1-Zellen auch in die Lunge metastasieren.

Die Wirkung von Gemcitabine war bei allen untersuchten Organen aufgrund der großen Streuung statistisch nicht signifikant (Tumor: $p_{\text{Gemcitabine}} - p_{\text{Vehikel}} = 0,791$; Magen: $p_{\text{Gemcitabine}} - p_{\text{Vehikel}} = 0,473$; Leber: $p_{\text{Gemcitabine}} - p_{\text{Vehikel}} = 0,623$; Darm: $p_{\text{Gemcitabine}} - p_{\text{Vehikel}} = 0,104$; Niere: $p_{\text{Gemcitabine}} - p_{\text{Vehikel}} = 0,076$; Lunge: $p_{\text{Gemcitabine}} - p_{\text{Vehikel}} = 0,089$ und Milz: $p_{\text{Gemcitabine}} - p_{\text{Vehikel}} = 0,089$)

4.2.4 Das H460M2-GFP Modell

Eine Vielzahl von Versuchsansätzen wurde bereits unternommen, um Tumorzellen mit Reportergenen zu markieren und sie anschließend in vivo durch nicht-invasive bildgebende Verfahren zu detektieren. Reportergene kodieren z.B. für Proteine, die leicht über ihre Enzym-Aktivität (*E. coli* β -Galaktosidase) oder ihre Fluoreszenz nachgewiesen werden können. Das ‚green fluorescent protein‘ (GFP) wurde aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und hat ähnliche Eigenschaften wie der Farbstoff Fluorescein. Da die GFP-transfizierten Tumorzellen im lebenden Tier nachgewiesen werden können, kann mit Hilfe der intravitalen Videomikroskopie der Verlauf von Tumorwachstum und Metastasierung beobachtet werden. Quantitative Aussagen über den Metastasengehalt sind jedoch nicht möglich und können erst nach Tötung des Tieres über RT-PCR oder Western-Blot gemacht werden.

Metastasen sind mittels histologischen Anfärbung häufig nur schwer zu erkennen und der immunhistologische Nachweis, bestehend aus Entparaffinierung, Färbeprozedur und Auswertung ist in der Regel sehr zeitaufwendig. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit überprüft, ob die fluoreszenzmikroskopische Detektion von GFP-transfizierten Tumorzellen in Paraffinschnitten eine Alternative zu den oben genannten Methoden ist und die Ergebnisse mit denen der quantitativen Alu-PCR übereinstimmen.

Hierfür wurden mit GFP stabil transfizierte H460M2-Zellen verwendet und zunächst deren Wachstumsverhalten mit den Wildtyp-Zellen *in vitro* verglichen. Darauf aufbauend sollte überprüft werden, ob sich die GFP-Zellen auch *in vivo* ähnlich verhalten wie die Ausgangszellen.

4.2.4.1 Der Nachweis von H460M2-GFP transfizierten Zellen mittels FACS-Analyse

Die GFP-transfizierten H460M2-Tumorzellen sollten vor dem Einsatz in tierexperimentelle Studien auf die Expression des GFP-Proteins untersucht werden. Hierfür wurden die Tumorzellen im Durchflußzytometer auf deren Expressionspotential und Stabilität analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 32 dargestellt und zeigt eine hohe GFP-Expression in 95 % der untersuchten H460M2-GFP-Zellen. Auch der Vergleich von frisch aufgetauten H460M2-Zellen mit mehrfach passagierten Zellen ergab keinen Unterschied in der GFP-Expression, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Transfektion stabil war. Somit konnten die Zellen auch in tierexperimentelle Studien eingesetzt werden.

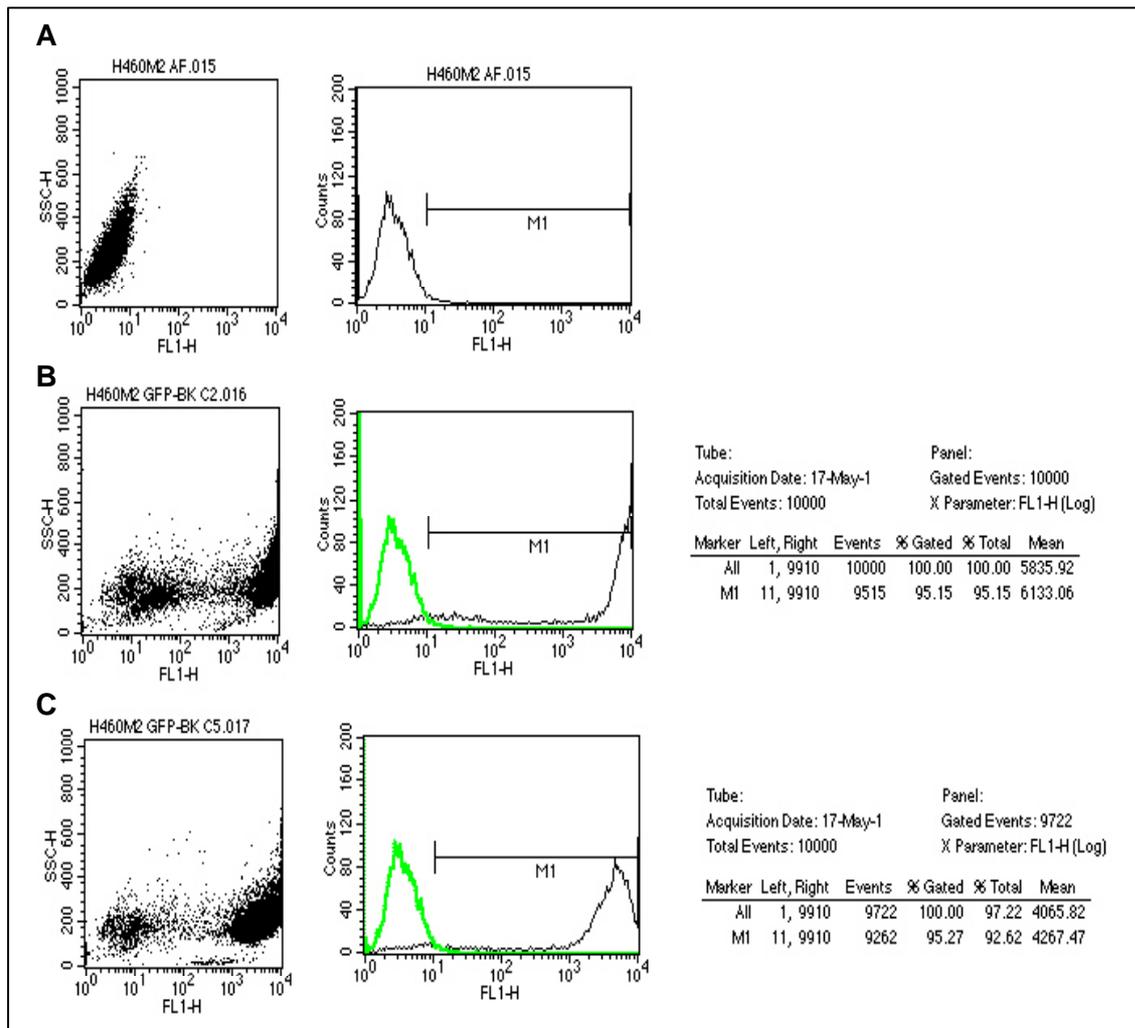


Abbildung 32: FACS-Analyse zur Untersuchung der Expression von GFP in H460M2-Wildtyp (A), H460M2-GFP-Passage 2 (B) und H460M2-GFP-Passage 5 (C).

Jeweils 1×10^6 Zellen wurden im Durchflusszytometer auf die Expression von GFP untersucht. Rechts ist der Prozentsatz der GFP-positiven Zellen in 10000 gezählten Zellen wiedergegeben.

4.2.4.2 Vergleich der Wachstumskinetik von H460M2-GFP- und H460M2-wt-Zellen in vitro (WST-1 Test)

In einem weiteren Test sollte untersucht werden, ob sich die GFP-transfizierten H460M2-Zellen von den Wildtyp-Zellen hinsichtlich ihrer Wachstumsgeschwindigkeit unterscheiden. Hierfür wurde mit beiden Zelllinien ein WST1-Proliferationstest durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 wiedergegeben und zeigt, dass die GFP-Transfektanten die gleiche Wachstumskinetik aufwiesen wie die Wildtyp-Zellen.

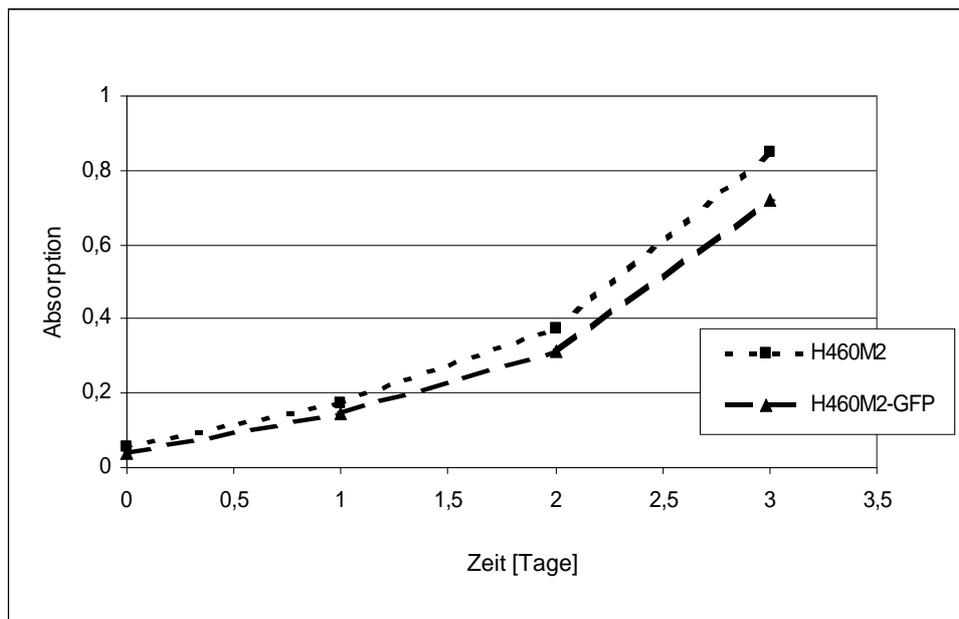


Abbildung 33: Wachstumsanalyse von H460M2-Wildtyp und H460M2-GFP Zellen mittels eines WST-1 Tests.

Es wurden jeweils 1000 H460M2-Wildtyp und -GFP Zellen in einen WST-1-Proliferationstest eingesetzt. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde in einem ELISA-Reader die Absorption bei 440 nm gemessen. In dem Diagramm wurde die Zunahme des Signals über die Zeit dargestellt. Es zeigt keinen Unterschied zwischen den Wildtyp-Zellen und den Transfektanten.

4.2.4.3 Wachstumskinetik und Metastasierung von H460M2- und H460M2-GFP transfizierten Zellen in vivo

Die GFP-transfizierten H460M2- und die H460M2-wt-Zellen wurden in das H460M2- Modell eingesetzt, um deren Wachstums- und Metastasierungsverhalten in vivo zu untersuchen. Hierfür wurden 6 Gruppen mit jeweils 10 SCID beige Mäusen in den Versuch eingesetzt, denen 3×10^6 H460M2- oder H460M2-wt-Zellen in die hintere Fußpfote injiziert wurden. Das Volumen des Primärtumors wurde zweimal wöchentlich mit Hilfe einer Schieblehre bestimmt. Da die Primärtumore jedoch bei den Tieren, denen H460M2-Zellen injiziert wurden, wesentlich schneller wuchsen, wurden diese bereits nach 19 Tagen entfernt. Bei den Mäusen der H460M2-GFP-Gruppen erfolgte die Operation nach 23 Tagen. In Abbildung 34A ist die Volumenzunahme des Primärtumors über die Zeit wiedergegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die H460M2-wt-Zellen in vivo schneller wuchsen als die H460M2-GFP-Zellen, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war. Des Weiteren konnte bei einigen Tieren der Tumor mit Hilfe einer UV-Lampe 16 Tage nach der Operation und bei allen Tieren am Tag der Operation sichtbar gemacht werden (Abbildung 34B und C)

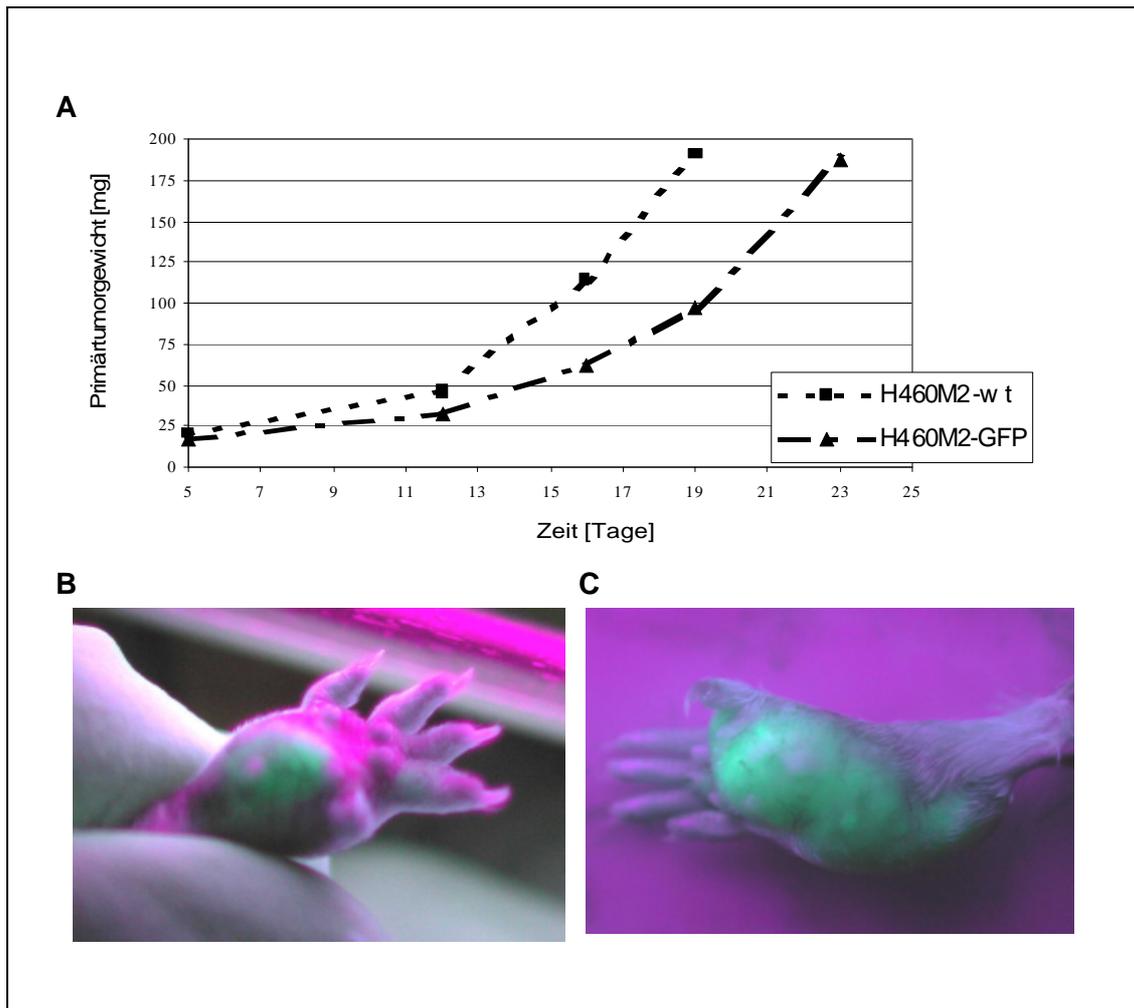


Abbildung 34: A) Wachstum des Primärtumors nach Injektion von H460M2-wt bzw. H460M2-GFP in die Fußpfote; B) Primärtumor nach 16 Tagen; C) Primärtumor nach 26 Tagen

H460M2-Wildtyp und H460M2-GFP Zellen wurden in die hintere rechte Fußpfote von SCID beige Mäusen injiziert. Der Primärtumor wurde nach 19 Tagen bei der H460M2-wt Gruppe und nach 23 Tagen bei der H460M2-GFP Gruppe entfernt. (A) Das Diagramm zeigt die Gewichtszunahme des Primärtumors über die Zeit. Die Größe der Tumoren wurde hierfür zweimal wöchentlich mit einer Schieblehre bestimmt. (B) und (C) Der Primärtumor konnte mit einer UV-Handlampe sichtbar gemacht werden.

Nach der Beendigung des Versuchs (7, 14 und 21 Tage nach Entfernung des Primärtumors) wurde eine Lungenhälfte entsprechend vorausgegangener Versuche (siehe 4.2.2.1) für die quantitative Alu-PCR und die andere Hälfte für die immunhistologische bzw. fluoreszenzmikroskopische Untersuchung verwendet. Die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR sind in Abbildung 35 wiedergegeben.

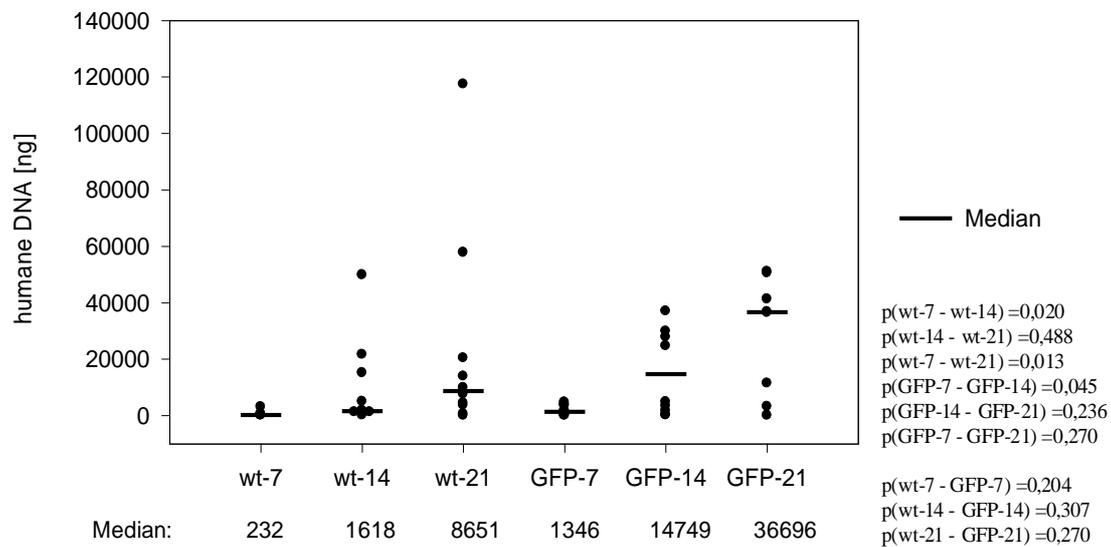


Abbildung 35: Bestimmung des Gehalts an humaner DNA von H460M2-wt oder H460M2-GFP Zellen in der Lunge 7, 14 und 21 Tage nach Entfernung des Primärtumors mittels Alu-PCR

Der Gehalt an humaner DNA wurde nach Beendigung des Versuchs mittels quantitativer Alu-PCR ermittelt. In die PCR wurden 2,5 ng DNA eingesetzt. Die Werte geben den Gehalt an humaner DNA pro Lunge wieder und wurden aus dem Mittelwert von vier PCR-Reaktionen ermittelt.

Die Auswertung mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR ergab für die H460M2-Wildtyp Gruppen ein ähnliches Metastasierungspotential der Lunge wie bei dem unter 4.2.2.1 beschriebenen Experiment. Der Gehalt an humaner DNA pro Lunge stieg im Mittel von 232 ng (Tag 7) auf 1,6 µg (Tag 14) bzw. 86,5 µg (Tag 21) an. Hierbei war die Zunahme von Tag 7 auf Tag 14 mit $p=0,020$ und von Tag 7 auf Tag 21 mit $p=0,013$ statistisch signifikant.

Bei den H460M2-GFP Gruppen konnte generell ein höherer Gehalt an humaner DNA festgestellt werden. So wurde am Tag 7 im Mittel 1,3 µg humane DNA und am Tag 14 14,7 µg DNA nachgewiesen. 21 Tage nach der Entfernung des Primärtumors lag der mittlere DNA-Gehalt bei 36,7 µg. Die statistische Auswertung ergab, dass sowohl die Zunahme der Signalstärke von Tag 7 auf Tag 14 ($p=0,045$) als auch von Tag 7 auf Tag 21 ($p=0,010$) signifikant war.

Vergleicht man die Ergebnisse der H460M2-GFP Zellen mit denen der Wildtyp-Zellen, so kann man bei ersteren einen deutlich höheren Metastasegehalt erkennen, wobei der Unterschied jedoch mit $p=0,197$ statistisch nicht signifikant war. Daneben muß berücksichtigt werden, dass der Primärtumor der GFP-Gruppen aufgrund des langsameren Wachstums fünf Tage später entfernt wurde. Es kann deshalb nicht unbedingt davon ausgegangen werden, dass das höhere Metastasierungspotential der H460M2-GFP Zellen auf die Transfektion der Tumorzellen mit dem GFP-Gen zurückzuführen ist. Vielmehr könnte auch

die längere Wachstumsphase des Tumors eine erhöhte Metastasierungsrate zur Folge haben.

Da die fluoreszierenden Eigenschaften des GFP-Proteins auch nach der Formalin-Fixierung erhalten bleiben, sollte überprüft werden, ob die morphometrische Auswertung über die Fluoreszenz der Metastasen möglich ist. Des Weiteren konnten die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR der immunhistologischen bzw. fluoreszenzmikroskopischen Analyse gegenüber gestellt werden.

In Abbildung 36 wurden die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR gegen die berechnete Metastasenfläche aufgetragen. Dabei ergab sich sowohl für die immunhistologische als auch für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung eine gute Übereinstimmung ($R_{\text{Ki-67}} = 0,93$ und $R_{\text{GFP}} = 0,87$).

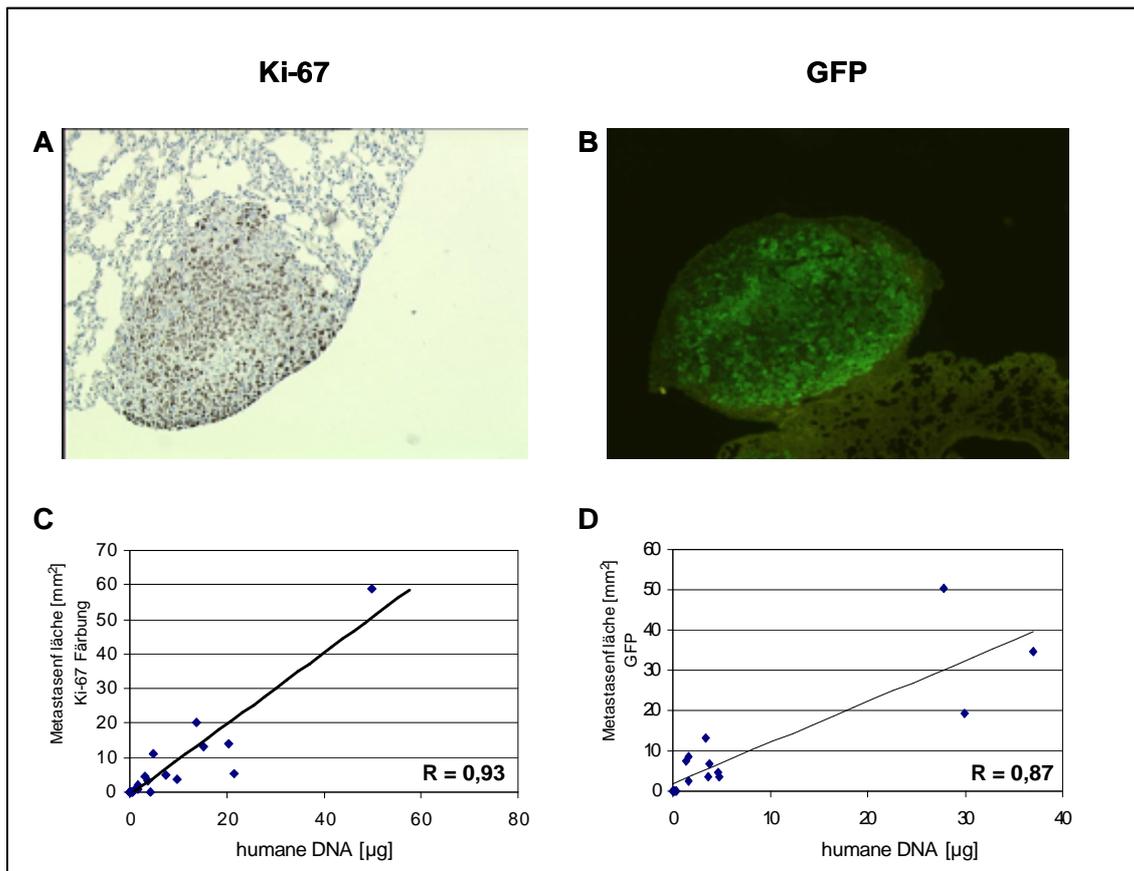


Abbildung 36: Korrelationsanalyse von quantitativer Alu-PCR und Metastasenfläche:
A) Ki-67 angefärbte Lungenmetastase (braun) von einer 14 Tage ps getöteten Maus (50 x Vergrößerung)
B) fluoreszierende Metastase (grün) von einer 14 Tage ps getöteten Maus (25 x Vergrößerung)
C) Vergleich mit immunhistologischer Ki-67 Färbung,
D) Vergleich mit dem Fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von GFP

In den beiden Diagrammen wurden die Ergebnisse der quantitativen Alu-PCR gegen die morphometrisch ermittelten Metastasenfläche von Ki-67 gefärbten und fluoreszenzmarkierten Schnitten aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt. Der Korrelationskoeffizient lag für Ki-67 bei 0,93 und für GFP bei 0,87.

Für die morphometrische Auswertung der H460M2-GFP Tiere konnten jedoch nur die Schnitte der am Tag 7 und 14 getöteten Tiere berücksichtigt werden, da bei den Tieren, die am Tag 21 getötet wurden, die Lungen derart von Metastasen übersät waren, dass keine histologische Auswertung mehr möglich war.

4.3 Nachweis von humanen Alu-Sequenzen im Blut

Die Bestimmung des Gehalts an humaner DNA in verschiedenen Organen gibt Aufschluss über das Metastasierungsverhalten der Tumorzellen. Da die Tiere für diese Untersuchung getötet werden müssen, können keine Verlaufsstudien an individuellen Tieren durchgeführt werden. Eine mögliche Alternative, die hier geprüft werden sollte, ist der Nachweis der Tumorzellen mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR im Blut. Dies würde neben einer genaueren Charakterisierung der Tumormodelle auch eine exaktere Analyse der Wirksamkeit von neuen Substanzen auf die Metastasierung im Verlauf von tierexperimentellen Studie ermöglichen.

4.3.1 Bestimmung der Nachweisgrenze von humanen Tumorzellen im Blut

Für die Bestimmung der Nachweisgrenze von humanen Tumorzellen im Blut wurde zu jeweils 200 µl heparinisiertem Maus-Vollblut 1×10^6 bis 10 H460M2-Zellen gegeben. Anschließend wurde die genomische DNA isoliert und 2,5 ng DNA in die quantitative Alu-PCR eingesetzt. Wie aus Abbildung 37 ersichtlich, konnten bis zu 10 Tumorzellen im Blut nachgewiesen werden.

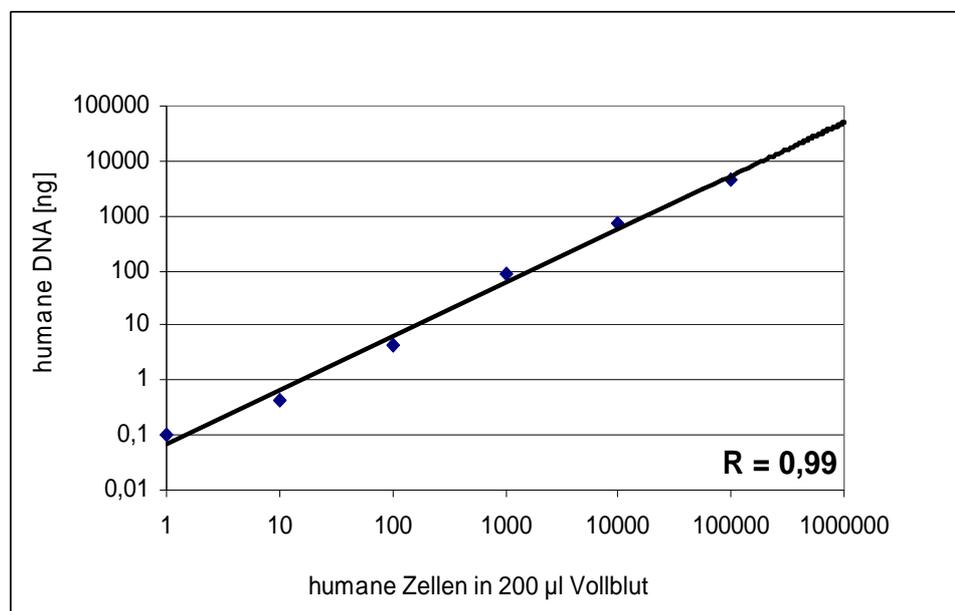


Abbildung 37: Bestimmung der Nachweisgrenze von humanen Tumorzellen in Blut

Zu 200 µl Vollblut wurden die oben angegebenen Zellzahlen von H460M2-Zellen zugegeben. Anschließend wurde die DNA isoliert, in die PCR wurden 2,5 ng DNA eingesetzt. In dem Diagramm ist die Zellzahl gegen die in der PCR bestimmte DNA-Menge pro 200 µl Blut aufgetragen. Die Ausgleichsgerade weist eine hohe Korrelation auf ($R=0,99$).

4.3.2 Nachweis von humanen Tumorzellen im Blut und in der Lunge nach i.v. Injektion: Kinetik

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt nach intravenöser Applikation Tumorzellen im Blut und in der Lunge nachgewiesen werden können. Hierfür wurden jeweils 4×10^6 H460M2-Zellen intravenös in die Schwanzvene von drei SCID beige Mäusen injiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 min, 5 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h und 24 h) retroorbital Blut entnommen, die Tiere getötet und die Lungen explantiert. Aus Blut und Lungen wurde dann die genomische DNA isoliert und jeweils 2,5 ng für die quantitative Alu-PCR verwendet. Abbildung 38 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments. Direkt nach Injektion der Tumorzellen war das Signal im Blut am stärksten und nahm dann kontinuierlich ab, wobei nach 6 h keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden konnten.

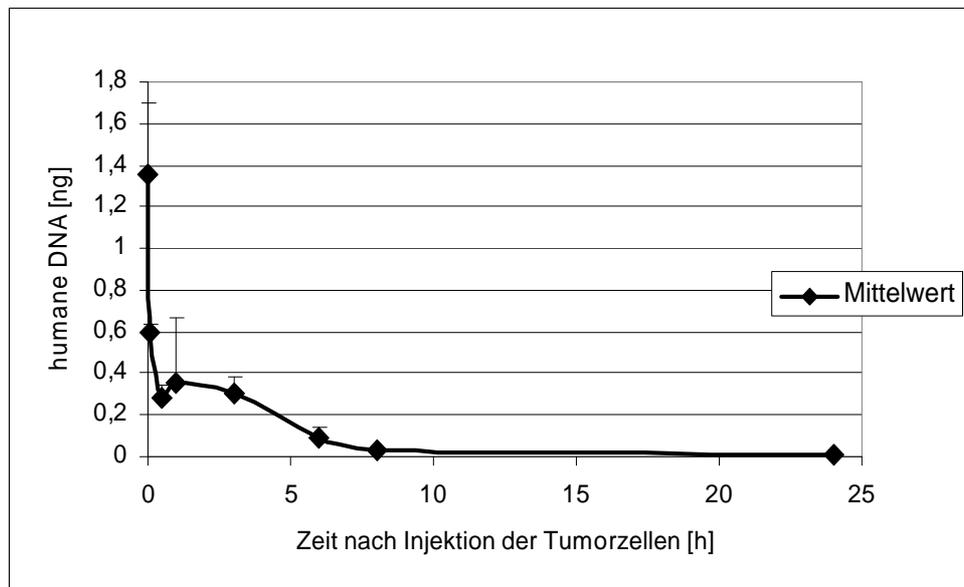


Abbildung 38: Nachweis von humanen Tumorzellen in Blut nach iv Injektion von H460M2-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

4×10^6 H460M2-Zellen wurden intravenös in SCID Mäuse injiziert. Nach 0 min, 5 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h und 24 h wurde von jeweils drei Tieren 200 μ l Blut entnommen. Von der isolierten DNA wurden 2,5 ng DNA in die Alu-PCR eingesetzt. Das Diagramm zeigt die Abnahme des DNA-Gehalts im Blut über die Zeit. Die Werte geben den Gehalt an humaner DNA pro 200 μ l Blut wieder und wurden aus dem Mittelwert der von drei Mäusen gemessenen Werte ermittelt.

Interessanterweise ergab sich bei der Auswertung der quantitativen Alu-PCR der Lungen ein ähnlicher Verlauf wie bei der Analyse des Bluts. Direkt nach der Injektion der Tumorzellen war das Signal am stärksten und ging dann kontinuierlich zurück, bis schließlich nach 6h keine Tumorzellen detektiert werden konnten (Abbildung 39).

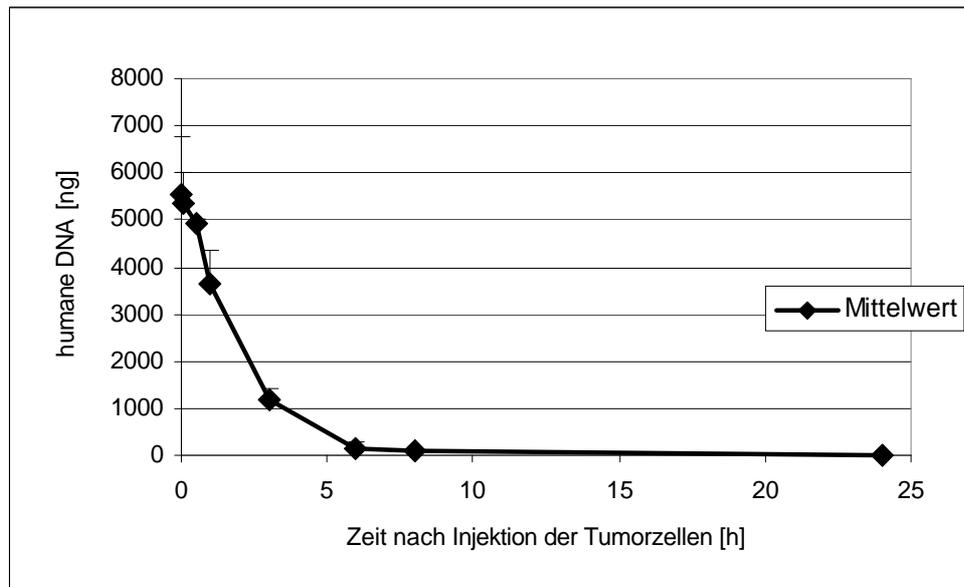


Abbildung 39: Nachweis von humanen Tumorzellen in der Lunge nach intravenöser Injektion von H460M2-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

4×10^6 H460M2-Zellen wurden intravenös in SCID Mäuse injiziert. Nach 0 min, 5 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 8 h und 24 h wurden jeweils drei Tieren getötet und die Lunge explantiert. Von der isolierten DNA wurden 2,5 ng DNA in die Alu-PCR eingesetzt. Das Diagramm zeigt die Abnahme des DNA-Gehalts in der Lunge über die Zeit. Die Werte, die den Gehalt an humaner DNA pro Lunge wiedergeben, wurden aus dem Mittelwert der gemessenen Werte von drei Tieren, die zu den angegebenen Zeitpunkten getötet wurden, ermittelt.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist Tumorzellen im Blut in vivo nachzuweisen.

Das hohe Alu-Signal direkt nach der Injektion der Tumorzellen zeigt, dass sich die Zellen im Blutkreislauf befinden und auch in der Lunge nachgewiesen werden können. Die Abnahme des Alu-Signals weist darauf hin, dass die Tumorzellen eliminiert werden, möglicherweise werden die Zellen wie bereits von N. Mizuno et al. (1998) gezeigt über den Urin ausgeschieden.

Die i.v. Applikation von Tumorzellen führt wie bereits mehrfach gezeigt zur Ausbildung von Lungenmetastasen. Die oben beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass zunächst der größte Teil der Tumorzellen abgebaut und ausgeschieden wird und das Signal dadurch unter die Nachweisgrenze sinkt. Die verbleibenden Tumorzellen bilden dann die später messbaren Metastasen aus. Für die Bestätigung dieser Vermutung müsste der Gehalt an humaner DNA in der Lunge und Leber auch zu späteren Zeitpunkten gemessen werden.

5 Diskussion

5.1 Problemstellung

Zahlreiche Versuchsansätze für die Untersuchung von Tumorwachstum und -regression in verschiedenen Tumormodellen beruhen auf der Messung des Tumolvolumens mit Hilfe einer Schieblehre. Da es sich in diesen Tumormodellen häufig um artifizielle Tumoren handelt und keine grundsätzliche Korrelation zwischen Wachstum des Primärtumors und dem Ausmaß der Metastasierung besteht, kann damit die Wirksamkeit von Substanzen auf Vorgänge der Metastasierung nicht schlüssig bestimmt werden. Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zeigten, dass eine Regression des Primärtumors durch Zytostatika nicht unbedingt auch mit einer inhibierenden Wirkung auf die Metastasierung einhergeht. Vielmehr konnte eine vermehrte Metastasierung nach Behandlung mit etablierten Substanzen von tumortragenden Mäusen beobachtet werden. Doxorubicin, ein Zytostatikum, das bereits bei zahlreichen Chemotherapien eingesetzt wird, führte bei der Behandlung von tumortragenden Ratten in dem MatLyLu Prostata-Modell zu einem signifikanten Anstieg der Lungenmetastasen (Geldof und Rao, 1988). Bei einem weiteren Zytostatikum, Etoposide, das die Topoisomerase-II hemmt, wird vermutet, dass es die Ausbildung von Sekundärtumoren fördert (Murphy, 1993). In einem kürzlich erschienenen Bericht konnten Krüger et al. (2001) zeigen, dass die Behandlung von tumortragenden Mäusen mit einem Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor zwar zu einer signifikanten Abnahme der Lungenmetastasen führte, dass jedoch die Metastasierung in der Leber deutlich zunahm. Eine vorhergehende *in vitro* Behandlung von nicht-metastasierenden Brustkrebs-Zellen mit Adriamycin führte in einem orthotopen Tiermodell zu einer vermehrten Metastasierung in der Lunge. Dagegen entwickelten die Tiere, denen unbehandelte Tumorzellen injiziert wurden, keine Metastasen (De Larco et al., 2001). Für Thalidomid konnte gezeigt werden, dass es die Angiogenese inhibiert. Trotzdem konnte nach subkutaner Injektion von Prostata-Adenokarzinom-Zellen eine signifikante Zunahme der Metastasen in der Lunge gegenüber den Kontrolltieren nachgewiesen werden (D'Amato et al., 1994; Pollard, 1996).

Die oben genannten Daten zeigen, dass eine reproduzierbare, quantitative Auswertung von tierexperimentellen Studien nötig ist, um die hemmende Wirkung von neuen Substanzen auf die Metastasierung zu bestimmen und um mögliche Nebenwirkungen neuer Wirkstoffe in der präklinischen Entwicklungsphase analysieren zu können.

Wie bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, wurde der Nachweis von humanen Alu-Sequenzen dazu verwendet, humane DNA in Mausgewebe nachzuweisen. Für genaue und quantitative Aussagen über den Gehalt an humaner DNA ist jedoch eine quantitative PCR

notwendig, die schnelle und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob das LightCycler™ System für diese Anwendung geeignet ist.

5.2 Etablierung der quantitativen Alu-PCR

Für die quantitative Alu-PCR wurden zunächst verschiedene bereits in der Literatur beschriebene Primer getestet, die an die Konsensus-Sequenz der Alu-Familie binden (Kim et al., 1998; Zubair et al., 1996). Dabei zeigte sich, dass diese für das LightCycler™-System nicht geeignet waren. Möglicherweise sind die kurzen Reaktionszeiten dafür verantwortlich, dass Primer, die in der konventionellen PCR zur Amplifikation des Produktes führen, hier nicht eingesetzt werden können. Bei den Primern, die letztlich für die PCR verwendet wurden, wurde besonders darauf geachtet, dass sie keine Primer-Dimere ausbilden, d.h. dass sie nicht zueinander komplementär sind.

Das PCR-Produkt wies eine Länge von 220 bp auf und hatte, wie sich aus der Schmelzkurve ergab, einen Schmelzpunkt bei 89 °C. Die Überprüfung der Sequenz ergab eine hohe Übereinstimmung mit den bereits beschriebenen Alu-Sequenzen der Genbanken (s. auch 7.3). Da aber die Bindestelle der Alu-3r-Primer bei den Alu-Sb2- und Alu-Y8-Familien eine Insertion von 7 bp aufwies und letztere einen zusätzlichen Basenaustausch (G statt A) an Position 261 hatte, kann davon ausgegangen werden, dass diese Familien mit der Alu-PCR nicht amplifiziert wurden. Des Weiteren konnte auch bei der Alu-Ya5-Familie eine 2 bp-Deletion an Position 251-252, also auch im Bereich der Primer-Bindestelle, beobachtet werden. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Primer zur Amplifikation aller humanen Alu-Sequenzen, mit Ausnahme der Familien Alu-Sb2, Alu-Ya5, Alu-Yb8 führt. In Tabelle 6 sind die einzelnen Alu-Familien mit der entsprechenden *Accession Number* und ihrer prozentualen Übereinstimmung mit der Sequenz des PCR-Produkts zusammengefasst. Da von den beiden Sub-Familien Alu-Ya5 und Alu-Yb8 keine Konsensussequenz in der Datenbank vorhanden war, wurden diese am Computer aus den Genbank-Einträgen mit dem GCG-Gap/Bestfit-Programm erstellt.

Tabelle 6: Die unterschiedlichen Alu-Subfamilien mit *Accession Number* und ihre prozentualen Übereinstimmungen mit dem Alu-PCR Produkt.

Alu-Subfamilie	<i>Accession Number</i>	%-Übereinstimmung mit PCR-Produkt
Alu-J	HS14567	90
Alu-Sb	HS14568	91
Alu-Sb1	HS14569	89
Alu-Sb2	HS14570	86
Alu-Sc	HS14571	93
Alu-Sp	HS14572	90
Alu-Sq	HS14573	95
Alu-Sx	HS14574	90
Alu-Ya5	Konsensus aus allen Eintragungen bzgl. Alu-Ya5	87
Alu-Yb8	Konsensus aus allen Eintragungen bzgl. Alu-Yb8	84

Die hohe Übereinstimmung der Sequenz des PCR-Produkts mit den veröffentlichten Konsensussequenzen der einzelnen Alu-Familien weist daraufhin, dass in der PCR-Reaktion alle oben genannten Alu-Familien amplifiziert werden müssen. Da diese aber zueinander nicht vollständig homolog sind, würde man in der Schmelzkurve mehrere Maxima erwarten, oder zumindest einen breiten Kurvenverlauf. In der Schmelzkurvenanalyse entstand jedoch ein einheitliches Produkt, erkennbar an dem gleichen Maximum bei 89 °C. Eine Erklärungsmöglichkeit bietet die hohe Annealing-Temperatur von 65 °C, die 5 °C über der errechneten Temperatur liegt. Die Primer binden unter diesen Bedingungen bevorzugt an eine Sequenz, die dann amplifiziert wird.

Trotz räumlicher Trennung von DNA-Isolierung, Ansetzen der PCR-Reaktion (unter einer Sterilbox) und Durchführung der PCR, konnte eine Kontamination der Negativkontrolle nicht verhindert werden. Die Aufreinigung und Sequenzierung dieser Verunreinigung ergab, dass in der Negativkontrolle das Alu-PCR-Produkt amplifiziert wurde. Aufgrund der hohen Kopienzahl der Alu-Sequenzen, 5×10^6 Kopien pro haploidem Genom, kann ein ubiquitäres Vorkommen geringer Mengen humaner DNA nicht ausgeschlossen werden. Urban et al. führten eine quantitative und systematische Analyse von ubiquitär vorkommender DNA, die einen Einfluss auf die Quantifizierung von PCR-Produkten haben kann, durch. Trotz stringenter Messbedingungen konnten sie in dieser Arbeit einen relativ hohen Hintergrund an template-DNA detektieren, wobei die effektive Nachweisgrenze bei 17,4 pg lag (Urban et al., 2000).

Diese Daten stimmen mit den hier ermittelten Werten überein, da mit der quantitativen Alu-PCR 25 pg nachgewiesen werden können und der DNA-Gehalt in der Wasserkontrolle meist deutlich unter dem kleinsten Wert der Standardkurve lag. Werte, die über dem ermittelten Hintergrund liegen, können somit als positiv in Hinblick auf die Anwesenheit von humaner DNA in Gewebe betrachtet werden.

In ersten Experimenten wurden humane Tumorzellen verschiedenen Ursprungs in die quantitative Alu-PCR eingesetzt, um zu überprüfen, ob sie einen vergleichbaren Gehalt an Alu-Sequenzen aufweisen. Erwartungsgemäß konnte gezeigt werden, dass die Zellen eine vergleichbare Anzahl an Alu-Kopien enthielten. Somit kann mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR generell humane DNA nachgewiesen werden.

Für die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der Alu-Primer wurden Zellmischungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden humane H460M2- und murine SCCVII-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt. Es konnte gezeigt werden, dass mit den ausgewählten Primern keine Maus-DNA amplifiziert wurde. Des Weiteren konnte die Nachweisgrenze für humane Zellen in murinem Hintergrund bei einer humanen Zelle in $0,5 \times 10^6$ bis 1×10^6 Mauszellen festgelegt werden. Die Zugabe von humanen Tumorzellen in unterschiedlichen Konzentrationen zu explantierten Lungen erlaubte den Nachweis von 100 bis 300 humanen Zellen pro Lunge. Geht man von durchschnittlich 6×10^7 Zellen pro Lunge aus, ergibt sich somit eine ähnliche Nachweisgrenze wie bei den Zellmischungsexperimenten.

Die Aussagen in der Literatur über die Nachweisgrenze von vergleichbaren Versuchsansätzen sind sehr unterschiedlich. In Tabelle 7 sind die in der Literatur beschriebenen Ansätze für die Quantifizierung humaner Alu-Sequenzen zusammengefasst. Zubair et al. (1996) setzten die quantitative Alu-PCR ein, um die Wirksamkeit von Batimastat auf die Metastasierung von humanen Lymphoma-Zellen zu untersuchen. Sie konnten mit dieser Methode 1 bis 10 ng humane DNA in 1 μ g Maus-DNA nachweisen. Kim et al. (1998) untersuchten in einem Chorioallantoismembran-Ansatz (CAM-Assay) die Bedeutung von Proteasen auf die Intravasation von Tumorzellen. Für die Quantifizierung ihrer Ergebnisse etablierten sie eine quantitative Alu-PCR, die den Nachweis von 50 humanen Tumorzellen in 10^8 Zellen erlaubte.

Neben der quantitativen Alu-PCR wurden auch Dot-Blot-Hybridisierungen verwendet, um den Gehalt an humaner DNA in murinem Hintergrund nachzuweisen. Hierfür wurden radioaktiv- oder Biotin-markierte Sonden eingesetzt, die spezifisch für humane Alu-Sequenzen waren. Shoemaker et al. (1992) konnten mit dieser Technik 1–16 ng humane DNA von LOX-L Zellen nachweisen. McKenzie et al. (1991) verwendeten diese Dot Blot-Technik um Mikrometastasen im spontanen Metastasierungsmodell MV522 zu quantifizieren. Die Nachweisgrenze lag hier bei einer humanen Zelle in 2000 Mauszellen. Wesentlich sensitiver war dagegen der Ansatz von Weisberg et al. (1996). Sie konnten eine humane Zelle in 10000 Mauszellen nachweisen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die konventionellen PCR-Ansätze bzw. Hybridisierungstechniken zum Nachweis humaner Alu-Sequenzen weniger sensitiv waren, als die in dieser Arbeit etablierte LightCycler™-PCR.

Tabelle 7: Literaturübersicht der beschriebenen Ansätze zum quantitativen Nachweis von humaner DNA (hu DNA) in Maus-DNA (m DNA)

Nachweis von	Literatur	Technik	Detektionslimit
humane DNA in forensischem Probenmaterial	(Waye et al., 1989)	Hybridisierung	1,6 ng hu DNA
humane Tumorzellen in Lungen von athymischen Mäusen	(McKenzie et al., 1991)	Hybridisierung	1 hu Zelle in 2000 Mauszellen
humane Tumorzellen in Mauszellen	(Shoemaker et al., 1992)	Hybridisierung	1-16 ng hu DNA
humane DNA in Maus-DNA	(Weisberg et al., 1996)	Hybridisierung	1 hu Zelle in 10 ⁴ Mauszellen
humane Tumorzellen in einem CAM-Assay	(Kim et al., 1998)	PCR	5 hu Zellen in 1 x 10 ⁷ Mauszellen
humane Tumorzellen in verschiedenen Sekundärorganen der Maus	(Zubair et al., 1996)	PCR	1-10 ng hu DNA in 1 µg mu DNA

5.3 Nachweis humaner Alu-Sequenzen in verschiedenen Organen der Maus

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die quantitative Alu-PCR eignet, um humane Tumorzellen in Zellmischungsexperimenten aus humanen und murinen Zellen in vitro nachzuweisen, wurde der Metastasengehalt in verschiedenen Xenograft-Modellen mittels Alu-PCR bestimmt. Die Verifizierung der Ergebnisse erfolgte über die histologische Auswertung der entsprechenden Organe.

Die Untersuchung des Metastasengehalts der Lunge zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Entfernung des Primärtumors im spontanen H460M2-Metastasierungsmodell ergab eine stetige Zunahme der humanen DNA in der Lunge. Bereits sieben Tage nach Amputation der Fußpfote konnte bei fast allen Tieren ein deutliches Signal gemessen werden. Die histologische Auswertung zeigte, dass besonders in diesem frühen Stadium oftmals noch keine Metastasen nachweisbar waren.

Die quantitative Alu-PCR ist somit wesentlich sensitiver und erlaubt bereits in einem frühen Stadium Aussagen über den Metastasengehalt in einem Organ. Dies ermöglicht eine Verkürzung der Versuchsdauer, wodurch den Tieren weniger Leid zugefügt wird und zudem der Substanzbedarf neuer Wirkstoffe reduziert werden kann.

Der Gehalt an humaner DNA in verschiedenen Organen wurde auch in einem orthotopen Xenograft-Modell mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR bestimmt. Das hier verwendete humane PancTu1-Adenokarzinom-Modell ist ein Pankreas-Tumormodell, das Ähnlichkeiten mit dem klinischen Krankheitsbild von Pankreaskrebs aufweist. Es ist somit geeignet, um die anti-metastasierende Wirksamkeit von neuen Therapeutika zu untersuchen. Die Implantation von humanen PancTu1-Zellen in den Pankreas von immundefizienten SCID-Mäusen führt zur Ausbildung eines wenig differenzierten Adenokarzinoms, das sowohl in das umliegende Gewebe eindringt als auch in andere Organe des Abdomens und in die Lunge metastasiert. So konnte humane DNA in Leber, Leberpforte, Zwölffingerdarm, Magen, Mesenterium, Zwerchfell jedoch seltener in Milz und Niere detektiert werden (Alves et al., 2001a, b). Dies stimmt mit den hier beschriebenen Beobachtungen überein. Mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR konnten bei der Analyse verschiedener Organe der Maus neben dem Primärtumor im Pankreas auch Metastasen in Lymphknoten, Zwölffingerdarm, Zwerchfell, Mesenterium, Darm, Milz, Leber und Magen nachgewiesen und quantifiziert werden.

Des Weiteren wurde der Gehalt an humaner DNA eines Paraffinschnitts mit der histologisch bestimmten Metastasenfläche des folgenden Gewebeschnitts von Tumor (Pankreas), Magen und Leber verglichen. Es konnte zwar eine hohe Übereinstimmung dieser beiden Methoden gezeigt werden, jedoch muss bedacht werden, daß einzelne, sehr hohe Werte bei der Bestimmung des Korrelationskoeffizienten überbewertet werden. Aus diesem Grund müssen für eine genauere Analyse wesentlich mehr Paraffinschnitte ausgewertet werden. Die Ergebnisse zeigen dennoch, dass die quantitative Alu-PCR nicht nur mit DNA aus Zellen oder frischem Gewebe, sondern auch mit Formalin-fixiertem Gewebe durchgeführt werden kann.

In dieser Arbeit wurde das Metastasierungsverhalten von GFP-transfizierten H460M2-Zellen mit den Ausgangszellen im H460M2-Tumormodell verglichen. Die Bestimmung des Metastasenanteils erfolgte mittels quantitativer Alu-PCR und morphometrischer Auswertung. Sowohl bei den Wildtyp-Zellen als auch bei den GFP-Transfektanten konnte eine stetige Zunahme des Metastasenanteils nach Entfernung des Primärtumors beobachtet werden. Der Metastasenanteil war bei den GFP-transfizierten Zellen höher, jedoch war der Unterschied nicht signifikant ($p=0,197$). Zudem muß berücksichtigt werden, dass bei den GFP-Gruppen der Primärtumor nach 23 Tagen, also fünf Tage später als bei den Wildtyp-Gruppen, entfernt wurde, da erst zu diesem Zeitpunkt die Primärtumoren im Mittel die gleiche Größe hatten. Aus diesem Sachverhalt kann jedoch nicht darauf geschlossen werden, dass das GFP einen Einfluss auf die Metastasierung hat. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass die erhöhte Metastasierungsrate auf die spätere Entfernung des Primärtumors zurückzuführen ist.

Ein direkter Vergleich von quantitativer Alu-PCR und immunhistologischer Auswertung bzw. Detektion von GFP ergab wiederum eine hohe Korrelation zwischen diesen Auswerteverfahren.

Anzumerken ist, dass Reporter Gene zwar das Auffinden von Tumorzellen erleichtern, aber für eine Quantifizierung des Metastasengehalts in einem Organ nicht geeignet sind. Bei der Auswertung von Paraffinschnitten fiel auf, dass häufig nur noch ein geringer Teil der Metastasen fluoreszierte, das Reporter Gen z.B. aufgrund von Hypoxie (Coralli et al., 2001) ausgeschaltet wurde. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist, daß das GFP-Protein bei der Fixierung zerstört wurde. Für Aussagen hinsichtlich Metastasengröße und Verteilung bzw. Invasivität von Tumorzellen scheinen GFP und andere Reporter Gene keine Vorteile gegenüber der klassischen Histologie aufzuweisen, lediglich bei Verlaufsstudien erlauben diese Techniken genauere Aussagen über Tumorwachstum (z. B. bei orthotopen Tiermodellen) oder Metastasierung, da die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen werden kann.

5.4 Nachweis der inhibierenden Wirkung auf die Metastasierung mittels quantitativer Alu-PCR

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die quantitative Alu-PCR geeignet ist, um humane Tumorzellen in vitro und in vivo nachzuweisen, war ein weiterer Aspekt dieser Arbeit zu überprüfen, ob diese Methode auch den Effekt von therapeutischen Substanzen auf die Metastasierung wiedergibt. Dazu wurden Zytostatika wie Taxol, Gemcitabine und 5-FU, die in der klinischen Onkologie einen hohen Stellenwert haben als Referenzsubstanz, eingesetzt. Weiterhin wurde RO28-2653 ein neuer MMP-Inhibitor, der sich in der präklinischen Entwicklung befindet, in tierexperimentellen Studien verwendet und der Grad der Metastasierung über die quantitative Alu-PCR bestimmt. Für die Verifizierung der Ergebnisse wurden die Organe zusätzlich histologisch und im Falle des MMP-Inhibitors auch makroskopisch ausgewertet.

Taxol ist ein Zytostatikum, das bereits für die Behandlung von Lungenkrebs eingesetzt wird. Es konnte sowohl eine inhibierende Wirkung auf den Primärtumor als auch auf die Metastasierung beobachtet werden (Belani, 1998; Crown und O'Leary, 2000). Im spontanen Metastasierungsmodell H460M2 wurde der Effekt von Taxol auf die Metastasierung in der Lunge untersucht (4.2.2.2). Dabei konnte eine 95 %-ige Reduktion des Metastasengehalts im Vergleich zur Vehikel-behandelten Gruppe bestimmt werden. Die immunhistologischen Detektion ergab zwar einen ähnlichen Effekt (90 % Hemmung), dennoch konnte lediglich ein Korrelationskoeffizient von $R=0,76$ ermittelt werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass

die hohe Anzahl der Metastasen in den Lungen keine exakte Auswertung zulässt. In diesem Experiment wurden zusätzlich Leber, Niere und Milz auf Metastasen untersucht. Bei einigen Tieren konnten humane Alu-Sequenzen in Leber und Niere nachgewiesen werden. Möglicherweise ist der hohe Metastasengehalt in der Lunge die Ursache für die verstärkte Extravasation der Tumorzellen in Sekundärorgane. Yang et al. (2000) konnten dagegen bei Verwendung von H460-GFP Transfektanten in diesen Organen keine Metastasen nachweisen, was auf die geringere Sensitivität der Fluoreszenzmikroskopie zurückgeführt werden kann.

Ein weiteres Zytostatikum ist Gemcitabine, das seit einigen Jahren eine wichtige Rolle bei der Behandlung von Pankreaskrebs spielt (Haq et al., 2000). In der Literatur wurde mehrfach die anti-tumorale Wirkung von Gemcitabine in orthotopen Pankreasmodellen gezeigt (Mohammad et al., 1998a; Mohammad et al., 1998b; Schwarz et al., 1999). In dieser Arbeit wurde der Effekt von Gemcitabine auf die Metastasierung im orthotopen PancTu1-Modell untersucht. Mittels der quantitativen Alu-PCR wurde neben dem Primärtumor auch in Magen, Darm, Leber, Niere, Milz und Lunge der Gehalt an humaner DNA bestimmt. Dabei konnte in allen Organen der Gemcitabine-behandelten Gruppe mit Ausnahme des Primärtumors ein deutlicher Rückgang des Alu-Signals, der zwischen 12 und 83 % lag, nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung des Primärtumors auf humane DNA muß berücksichtigt werden, dass bei Versuchsende meist der gesamte Bauchraum von Metastasen überwuchert war, so dass der Pankreas mit Primärtumor zu diesem Zeitpunkt nicht mehr exakt von umliegenden Metastasen getrennt werden konnte. Eine organspezifische Messung des Alu-Gehalts war somit nicht mehr möglich und erklärt den geringen Effekt von Gemcitabine auf das Primärtumorwachstum. Die Unterschiede zwischen Gemcitabine- und Vehikel-behandelten Tieren waren jedoch statistisch nicht signifikant.

5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Pyrimidin-Analog, das für die Behandlung bei einer Reihe von soliden Tumoren, vor allem aber bei Darmkrebs eingesetzt wird. Für die Bestimmung der anti-tumoralen Wirkung von 5-FU wurden HT29-Tumorzellen subkutan in SCID-Mäuse injiziert und über einen Zeitraum von 17 Tage mit 5-FU behandelt. Da Mitchell et al. (1997) und Jojovic et al. (2000) bereits für dieses Tumormodell eine Metastasierung in die Lunge beschrieben haben, wurden bei diesem Experiment jeweils Lunge und Leber auf Metastasen untersucht. Die Bestimmung des Metastasengehalts mittels quantitativer Alu-PCR ergab eine 70 %-ige Reduktion des Metastasengehalts in der Lunge bei der 5-FU-Gruppe im Vergleich zur Vehikelgruppe, wobei das Ergebnis statistisch nicht signifikant war ($p=0,199$). Die Untersuchung der Leber ergab nur vereinzelt ein schwaches Signal, so dass davon

ausgegangen werden muß, dass HT29 Zellen in diesem Modell bevorzugt in die Lunge metastasieren.

RO28-2653 ist ein neuentwickelter Matrixmetalloproteinase-Inhibitor der Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), der sich während dieser Arbeit in der präklinischen Entwicklung befand. Bisherige Ergebnisse zeigten, dass diese Substanz sowohl *in vitro* als auch *in vivo* spezifisch die Expression von MMP-2 und MMP-9 hemmt und eine inhibierende Wirkung auf Primärtumor und Metastasierung aufweist. Neben den oben beschriebenen bereits in der Klinik angewendeten Zytostatika wurde der Effekt von RO28-2653 im spontanen Metastasierungsmodell H460M2 mittels der quantitativen Alu-PCR bestimmt. Dabei sollte überprüft werden, ob sich diese Methode als Standardmethode eignet, um die Wirksamkeit von neuen Substanzen in der präklinischen Entwicklungsphase zu bestimmen.

Der MMP-Inhibitor RO28-2653 wurde in dieser Arbeit in drei tierexperimentellen Studien getestet und die Effekte mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR ermittelt. Gleichzeitig wurden die Ergebnisse mit konventionellen Auswerteverfahren wie der immunhistologischen Bestimmung der Metastasenfläche und der makroskopischen Analyse verglichen.

Es konnte eine hohe Korrelation zwischen der immunhistologisch bestimmten Metastasenfläche und der Ergebnisse der quantitativen PCR in den beiden tierexperimentellen Studien zur Bestimmung der Kinetik der Metastasierung nach Behandlung mit RO28-2653 (vgl. hierzu 4.2.2.2) verzeichnet werden. Die Korrelationskoeffizienten lagen bei $R=0,90$ bzw. bei $R=0,93$. Lediglich die Auswertung der Studie, bei der neben RO28-2653 auch Taxol verwendet wurde, zeigte mit einem Korrelationskoeffizienten von $R=0,76$ eine geringere Übereinstimmung der beiden Methoden. Dies kann auf den hohen Metastasegehalt in der Lunge zurückgeführt werden, welcher eine genaue morphometrische Bestimmung nicht mehr zulässt.

Neben der immunhistologischen Auswertung wurden die Lungen in den beiden Kinetik-Studien zur Wirksamkeit von RO28-2653 am letzten Tag auch makroskopisch ausgewertet und mit der quantitativen Alu-PCR verglichen. Dabei ergab sich eine geringere Übereinstimmung als bei der Korrelation von immunhistologischer Auswertung und Alu-PCR. So konnte ein Korrelationskoeffizient von $0,67$ bzw. $0,77$ ermittelt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der makroskopischen Auswertung der Metastasegehalt nur unzureichend bestimmt werden kann, da Metastasen im Inneren des Organs nicht erfasst werden. Eine genauere Aussage über den Metastasegehalt in einem Organ ist deshalb nur über die Histologie bzw. quantitative Alu-PCR möglich.

Bei der Bestimmung der Wirksamkeit des MMP-Inhibitors RO28-2653 war der Effekt auf die Metastasierung sehr unterschiedlich. In der Studie, bei der die Tiere entweder mit RO28-2653 oder mit Taxol behandelt wurden, ging die Metastasierung um 52 % zurück, war aber

statistisch nicht signifikant ($p=0,229$). Einen wesentlich stärkeren Effekt mit durchschnittlich 90 % hatte RO28-2653 auf den Metastasengehalt in der Lunge in der ersten Kinetik-Studie. Zudem konnte die Hemmung bereits 7 Tage nach Entfernung des Primärtumors gemessen werden. Bei der Auswertung der quantitativen Alu-PCR der Lungen von den Tieren, die 14 Tage nach der Operation getötet wurden, lagen die Werte der unbehandelten Tiere deutlich unter denen der Vehikel-Gruppe. Dieser Unterschied war aber wie auch bei den Tag 7 und Tag 21 getöteten Tieren statistisch nicht signifikant.

In der zweiten Kinetik-Studie mit RO28-2653-Behandlung lag die Hemmung nur bei den Tieren, die 7 Tage nach Entfernung des Primärtumors getötet wurden, bei 47 %. Zu späteren Zeitpunkten konnte dagegen keine Wirkung von RO28-2653 auf die Metastasierung ermittelt werden. Eine mögliche Erklärung für diese großen Unterschiede in der Wirksamkeit von RO28-2653 könnte sein, dass sie bei längerer Lagerung nicht stabil ist. Um diese These zu belegen, müsste bei weiteren Studien der Gehalt von RO28-2653 im Plasma zumindest bei Versuchsende, bestimmt werden.

Da diese Ergebnisse mit den konventionellen Auswerteverfahren aber bestätigt wurden, können diese Unterschiede nicht auf Messungenauigkeiten der quantitativen Alu-PCR zurückgeführt werden, vielmehr spiegeln sie die große Variabilität von tierexperimentellen Studien wieder.

Die beiden Wirksamkeitsstudien von RO28-2653 zeigten zudem, dass mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR bereits wesentlich früher Aussagen bezüglich einer hemmenden Wirkung auf die Metastasierung möglich sind als es mit der konventionellen makroskopischen Auswertung möglich wäre.

5.5 Alu-Sequenzen als Surrogat-Marker von humanen Tumorzellen in Tiermodellen?

Die quantitative Alu-PCR ermöglicht die Bestimmung des Metastasengehalts in verschiedenen Tumormodellen. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit, die in dieser Arbeit überprüft werden sollte, war die Quantifizierung von humanen Tumorzellen im Blut. Bisher gibt es nur sehr wenige Ansätze, um humane Tumorzellen im Blut von Mäusen nachzuweisen und zu quantifizieren. Nitsche et al. (2001) konnten in einer kürzlich erschienenen Arbeit humane Zellen im Blut von NOD/SCID Mäusen mittels PCR detektieren, wengleich die Nachweisgrenze von einer humanen Zelle in einem Hintergrund von 50 Mauszellen nicht ausreicht, um den geringen Anteil humaner Tumorzellen zu verschiedenen Zeitpunkten im Blut zu bestimmen.

Durch Zugabe von humanen Tumorzellen zu jeweils 200 μ l Vollblut, konnten bis zu 10 humane Zellen nachgewiesen werden. Geht man von durchschnittlich 1×10^4 Zellen/ μ l Blut

aus, ergibt sich eine Nachweisgrenze von einer Tumorzelle in 2×10^5 Blutzellen, die ausreichen sollte um humane Tumorzellen im Blut von tumortragenden Mäusen nachzuweisen.

In einem weiteren Experiment wurden Blut und Lunge nach intravenöser Injektion von H460M2-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Alu-PCR auf humane DNA untersucht. Sowohl im Blut als auch in der Lunge konnte nach einem anfänglich hohen Signal bereits nach 6 h keine humane DNA mehr nachgewiesen werden. Diese Daten weisen daraufhin, dass der größte Teil der Tumorzellen zunächst im Lungengewebe verbleibt und anschließend abgetötet wird. Ähnliche Beobachtungen machten auch Mizuno et al. (1998), die radioaktiv markierte Kolonkarzinom-Zellen i.v. applizierten und nach etwa 5 h keine Zellen mehr in der Lunge nachweisen konnten. Dagegen konnten Luzzi et al. (1998) zeigen, dass nahezu 80 % der injizierten Tumorzellen die ersten Tage überleben, aber nur ein kleiner Anteil zu makroskopische Metastasen heranwächst. Möglicherweise sind unterschiedliche Versuchsansätze der Grund für die kontroverse Diskussion.

Um genauere Aussagen über den Verlauf der Metastasierung machen zu können, müsste der Gehalt an humaner DNA zu späteren Zeitpunkten, wie etwa nach 3, 5, 10 und 20 Tagen bestimmt werden. Außerdem müssten neben der Lunge auch andere Organe wie Leber, Niere und Milz auf humane DNA untersucht werden. Prinzipiell konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die quantitative Alu-PCR eignet, um humane Tumorzellen im Blut nachzuweisen.

5.6 Schlussbetrachtung

Mit der quantitativen Alu-PCR am LightCycler™ konnte eine schnelle und zuverlässige Methode entwickelt werden, um die Metastasierung humaner Tumorzelllinien in der Maus zu bestimmen. Die PCR-Reaktion mit anschließender Schmelzkurven-Analyse und Computergestützter Auswertung kann in etwa 30 min durchgeführt werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Amplifikation von humanen Alu-Sequenzen unabhängig von der Vorbehandlung des Gewebes (kultivierte Tumorzellen, Stickstoff-fixiertes Gewebe und Formalin-fixierte Paraffinschnitte) war und somit universell für die Quantifizierung humaner DNA in Xenograft-Modellen eingesetzt werden kann.

Da die Alu-PCR den Nachweis und die Quantifizierung der Metastasen zu einem Zeitpunkt ermöglicht, zu dem eine exakte Auswertung mit der klassischen Histologie noch nicht möglich ist, könnten tierexperimentelle Studien zu einem früheren Zeitpunkt beendet werden. Eine Verkürzung der Versuchsdauer wäre im Sinne des Tierschutzes, da dadurch den Tieren viele Schmerzen und Leid erspart werden könnte. Zudem könnte auch der Substanzbedarf vermindert werden, was vor allem in der präklinischen Entwicklungsphase von Bedeutung ist, da zu diesem Zeitpunkt neue Wirkstoffe meist nur mit einem hohen Synthesaufwand bereitgestellt werden können bzw. Naturstoffextrakte nur begrenzt verfügbar sind.

Des Weiteren erleichtert diese Methode die Charakterisierung bereits bestehender und neuer Tumormodelle hinsichtlich ihres Metastasierungspotentials und -musters.

Somit ist die quantitative Alu-PCR geeignet, um humane DNA nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde als Hintergrund-DNA lediglich Maus-DNA getestet, die Methode müsste jedoch auch geeignet sein, um den Gehalt an humaner DNA in anderen Xenograft-Modellen zu bestimmen.

6 Literaturverzeichnis

Alves, F., Borchers, U., Padge, B., Augustin, H., Nebendahl, K., Kloppel, G., and Tietze, L. F. (2001). 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., Kaspareit, J., Nebendahl, K., Borchers, U., Heidrich, B., Streich, R., and Hiddemann, W. (2001). An orthotopic model of ductal adenocarcinoma of the pancreas in severe combined immunodeficient mice representing all steps of the metastatic cascade. *Pancreas* 23, 227-235

Bagheri-Yarmand, R., Kourbali, Y., Rath, A. M., Vassy, R., Martin, A., Jozefonvicz, J., Soria, C., Lu, H., and Crepin, M. (1999). Carboxymethyl benzylamide dextran blocks angiogenesis of MDA-MB435 breast carcinoma xenografted in fat pad and its lung metastases in nude mice. *Cancer Res* 59, 507-10.

Belani, C. P. (1998). Paclitaxel/carboplatin in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Oncology (Huntingt)* 12, 74-9.

Bulusu, V. R. (1998). Irinotecan and 5-fluorouracil in colorectal cancer: time for a pause? *Eur J Cancer* 34, 286-9.

Chu, W. M., Ballard, R., Carpick, B. W., Williams, B. R., and Schmid, C. W. (1998). Potential Alu function: regulation of the activity of double-stranded RNA-activated kinase PKR. *Mol Cell Biol* 18, 58-68.

Condeelis, J. S., Wyckoff, J., and Segall, J. E. (2000). Imaging of cancer invasion and metastasis using green fluorescent protein. *Eur J Cancer* 36, 1671-80.

Contag, C. H., Jenkins, D., Contag, P. R., and 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., and Dachs, G. U. (2001). Limitations of the reporter green fluorescent protein under simulated tumor conditions. *Cancer Res* 61, 4784-90.

Crown, J., and O'Leary, M. (2000). The taxanes: an update. *Lancet* 355, 1176-8.

D'Amato, R. J., Loughnan, M. S., Flynn, E., and Folkman, J. (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4082-5.

De Larco, J. E., Wuertz, B. R., Manivel, J. C., and Furcht, L. T. (2001). Progression and enhancement of metastatic potential after exposure of tumor cells to chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 61, 2857-61.

Deininger, P. L., and Batzer, M. A. (1999). Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 67, 183-93.

Dimitroff, C. J., Sharma, A., and Bernacki, R. J. (1998). Cancer metastasis: a search for therapeutic inhibition. *Cancer Invest* 16, 279-90.

Edinger, M., Sweeney, T. J., Tucker, A. A., Olomu, A. B., Negrin, R. S., and Contag, C. H. (1999). Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models. *Neoplasia* 1, 303-10.

- Fidler, I. J. (1999). Critical determinants of cancer metastasis: rationale for therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 43, S3-10.
- Garfinkel, D. J. (1997). Genetic loose change: how retroelements and reverse transcriptase heal broken chromosomes. *Trends Microbiol* 5, 173-5.
- Garofalo, A., Chirivi, R. G., Scanziani, E., Mayo, J. G., Vecchi, A., and Giavazzi, R. (1993). Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice. *Invasion Metastasis* 13, 82-91.
- Geldof, A. A., and Rao, B. R. (1988). Doxorubicin treatment increases metastasis of prostate tumor (R3327-MatLyLu). *Anticancer Res* 8, 1335-9.
- Gunzburg, W. H., and Salmons, B. (2001). Novel clinical strategies for the treatment of pancreatic carcinoma. *Trends Mol Med* 7, 30-7.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-64.
- Haq, M., Shafii, A., Zervos, E. E., and Rosemurgy, A. S. (2000). Addition of matrix metalloproteinase inhibition to conventional cytotoxic therapy reduces tumor implantation and prolongs survival in a murine model of human pancreatic cancer. *Cancer Res* 60, 3207-11.
- Hidalgo, M., and Eckhardt, S. G. (2001). Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93, 178-93.
- Hoffman, R. M. (2001). Visualization of GFP-expressing tumors and metastasis in vivo. *Biotechniques* 30, 1016-22, 1024-6.
- Horwitz, S. B. (1992). Mechanism of action of taxol. *Trends Pharmacol Sci* 13, 134-6.
- Jelinek, W. R., Toomey, T. P., Leinwand, L., Duncan, C. H., Biro, P. A., Choudary, P. V., Weissman, S. M., Rubin, C. M., Houck, C. M., Deininger, P. L., and Schmid, C. W. (1980). Ubiquitous, interspersed repeated sequences in mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1398-402.
- Jojovic, M., and Schumacher, U. (2000). Quantitative assessment of spontaneous lung metastases of human HT29 colon cancer cells transplanted into SCID mice. *Cancer Lett* 152, 151-6.
- Kariya, Y., Kato, K., Hayashizaki, Y., Himeno, S., Tarui, S., and Matsubara, K. (1987). Revision of consensus sequence of human Alu repeats--a review. *Gene* 53, 1-10.
- Killion, J. J., Radinsky, R., and Fidler, I. J. (1998). Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 17, 279-84.
- Kim, J., Yu, W., Kovalski, K., and Ossowski, L. (1998). Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell* 94, 353-62.
- Kitinya, J. N., Kinjo, M., and Tanaka, K. (1988). Growth and metastasis of Lewis lung carcinoma in the footpad of mice. *Exp Cell Biol* 56, 221-8.

- Kruger, A., Soeltl, R., Sopov, I., Kopitz, C., Arlt, M., Magdolen, V., Harbeck, N., Gansbacher, B., and Schmitt, M. (2001). Hydroxamate-type matrix metalloproteinase inhibitor batimastat promotes liver metastasis. *Cancer Res* 61, 1272-5.
- 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.
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., and Groom, A. C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol* 153, 865-73.
- Maekawa, R., Maki, H., Wada, T., Yoshida, H., Nishida-Nishimoto, K., Okamoto, H., Matsumoto, Y., Tsuzuki, H., and Yoshioka, T. (2000). Anti-metastatic efficacy and safety of MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin Exp Metastasis* 18, 61-6.
- Manzotti, C., Audisio, R. A., and Pratesi, G. (1993). Importance of orthotopic implantation for human tumors as model systems: relevance to metastasis and invasion. *Clin Exp Metastasis* 11, 5-14.
- McKenzie, B. A., Barrieux, A., and Varki, N. M. (1991). A novel detection system for submicroscopic human metastases in athymic mice. *Cancer Commun* 3, 15-9.
- Mighell, A. J., Markham, A. F., and Robinson, P. A. (1997). Alu sequences. *FEBS Lett* 417, 1-5.
- Migliaccio, A. R., Bengra, C., Ling, J., Pi, W., Li, C., Zeng, S., Keskinetepe, M., Whitney, B., Sanchez, M., Migliaccio, G., and 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., Adam, E., and Schumacher, U. (1997). Immunophenotype of human HT29 colon cancer cell metastases in the lungs of scid mice: spontaneous versus artificial metastases. *Invasion Metastasis* 17, 75-81.
- Mitchell, B. S., and Schumacher, U. (1997). Use of immunodeficient mice in metastasis research. *Br J Biomed Sci* 54, 278-86.
- Mizuno, N., Kato, Y., Shirota, K., Izumi, Y., Irimura, T., Harashima, H., Kiwada, H., Motoji, N., Shigematsu, A., and Sugiyama, Y. (1998). Mechanism of initial distribution of blood-borne colon carcinoma cells in the liver. *J Hepatol* 28, 878-85.
- Mohammad, R. M., Al-Katib, A., Pettit, G. R., Vaitkevicius, V. K., Joshi, U., Adsay, V., Majumdar, A. P., and Sarkar, F. H. (1998). An orthotopic model of human pancreatic cancer in severe combined immunodeficient mice: potential application for preclinical studies. *Clin Cancer Res* 4, 887-94.
- Mohammad, R. M., Dugan, M. C., Mohamed, A. N., Almatchy, V. P., Flake, T. M., Dergham, S. T., Shields, A. F., Al-Katib, A. A., Vaitkevicius, V. K., and Sarkar, F. H. (1998). Establishment of a human pancreatic tumor xenograft model: potential application for preclinical evaluation of novel therapeutic agents. *Pancreas* 16, 19-25.
- Murphy, S. B. (1993). Secondary acute myeloid leukemia following treatment with epipodophyllotoxins. *J Clin Oncol* 11, 199-201.

- Neulat-Duga, I., Sheppel, A., Marty, C., Lacroux, F., Pourrat, J., Caveriviere, P., and Delsol, G. (1984). Metastases of human tumor xenografts in nude mice. *Invasion Metastasis* 4, 209-24.
- Nielsen, B. S., Lund, L. R., Christensen, I. J., Johnsen, M., Usher, P. A., Wulf-Andersen, L., Frandsen, T. L., Dano, K., and Gundersen, H. J. (2001). A precise and efficient stereological method for determining murine lung metastasis volumes. *Am J Pathol* 158, 1997-2003.
- Nitsche, A., Becker, M., Junghahn, I., Aumann, J., Landt, O., Fichtner, I., Wittig, B., and Siegert, W. (2001). Quantification of human cells in NOD/SCID mice by duplex real-time polymerase-chain reaction. *Haematologica* 86, 693-9.
- Parkin, D. M., Pisani, P., and Ferlay, J. (1999). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49, 33-64, 1.
- Plunkett, W., Huang, P., and Gandhi, V. (1995). Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs* 6 Suppl 6, 7-13.
- Pollard, M. (1996). Thalidomide promotes metastasis of prostate adenocarcinoma cells (PA-III) in L-W rats. *Cancer Lett* 101, 21-4.
- Price, J. E. (1990). The biology of cancer metastasis. *Prog Clin Biol Res*, 237-55.
- Price, J. E., Polyzos, A., Zhang, R. D., and Daniels, L. M. (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res* 50, 717-21.
- Rasmussen, H. S., and McCann, P. P. (1997). Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Ther* 75, 69-75.
- Rowold, D. J., and Herrera, R. J. (2000). Alu elements and the human genome. *Genetica* 108, 57-72.
- Schmidt, C. M., Settle, S. L., Keene, J. L., Westlin, W. F., Nickols, G. A., and Griggs, D. W. (1999). Characterization of spontaneous metastasis in an aggressive breast carcinoma model using flow cytometry. *Clin Exp Metastasis* 17, 537-44.
- Schwarz, R. E., McCarty, T. M., Peralta, E. A., Diamond, D. J., and Ellenhorn, J. D. (1999). An orthotopic in vivo model of human pancreatic cancer. *Surgery* 126, 562-7.
- Seidman, A. D. (2001). The evolving role of gemcitabine in the management of breast cancer. *Oncology* 60, 189-98.
- Shoemaker, R. H., Smythe, A. M., Wu, L., Balaschak, M. S., and Boyd, M. R. (1992). Evaluation of metastatic human tumor burden and response to therapy in a nude mouse xenograft model using a molecular probe for repetitive human DNA sequences. *Cancer Res* 52, 2791-6.
- Uchida, J., Sato, K., Okabe, H., Saito, H., Nakano, K., Fujioka, A., Takechi, T., Takeda, S., Unemi, N., and Fukushima, M. (2000). Experimental postoperative adjuvant chemotherapy by UFT using primary tumor amputation model. *Int J Mol Med* 5, 357-62.
- Urban, C., Gruber, F., Kundi, M., Falkner, F. G., Dorner, F., and Hammerle, T. (2000). A systematic and quantitative analysis of PCR template contamination. *J Forensic Sci* 45, 1307-11.

- van Laar, J. A., Rustum, Y. M., Ackland, S. P., van Groeningen, C. J., and 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.
- Walter, I., Fleischmann, M., Klein, D., Muller, M., Salmons, B., Gunzburg, W. H., Renner, M., and 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.
- Waye, J. S., Presley, L. A., Budowle, B., Shutler, G. G., and Fourney, R. M. (1989). A simple and sensitive method for quantifying human genomic DNA in forensic specimen extracts. *Biotechniques* 7, 852-5.
- Weisberg, T. F., Cahill, B. K., and Vary, C. P. (1996). Non-radioisotopic detection of human xenogeneic DNA in a mouse transplantation model. *Mol Cell Probes* 10, 139-46.
- Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A., and Balis, U. J. (1997). The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22, 176-81.
- Wyke, J. A. (2000). Overview--burgeoning promise in metastasis research. *Eur J Cancer* 36, 1589-94.
- Xie, X., Brunner, N., Jensen, G., Albrechtsen, J., Gotthardsen, B., and Rygaard, J. (1992). Comparative studies between nude and scid mice on the growth and metastatic behavior of xenografted human tumors. *Clin Exp Metastasis* 10, 201-10.
- 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., and 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.
- Yu, A. E., Hewitt, R. E., Connor, E. W., and Stetler-Stevenson, W. G. (1997). Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Drugs Aging* 11, 229-44.
- Zetter, B. R. (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 49, 407-24.
- Zubair, A. C., Ali, S. A., Rees, R. C., Goepel, J. R., and Goyns, M. H. (1996). Investigation of the effect of BB-94 (batimastat) on the colonization potential of human lymphoma cells in SCID mice. *Cancer Lett* 107, 91-5.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

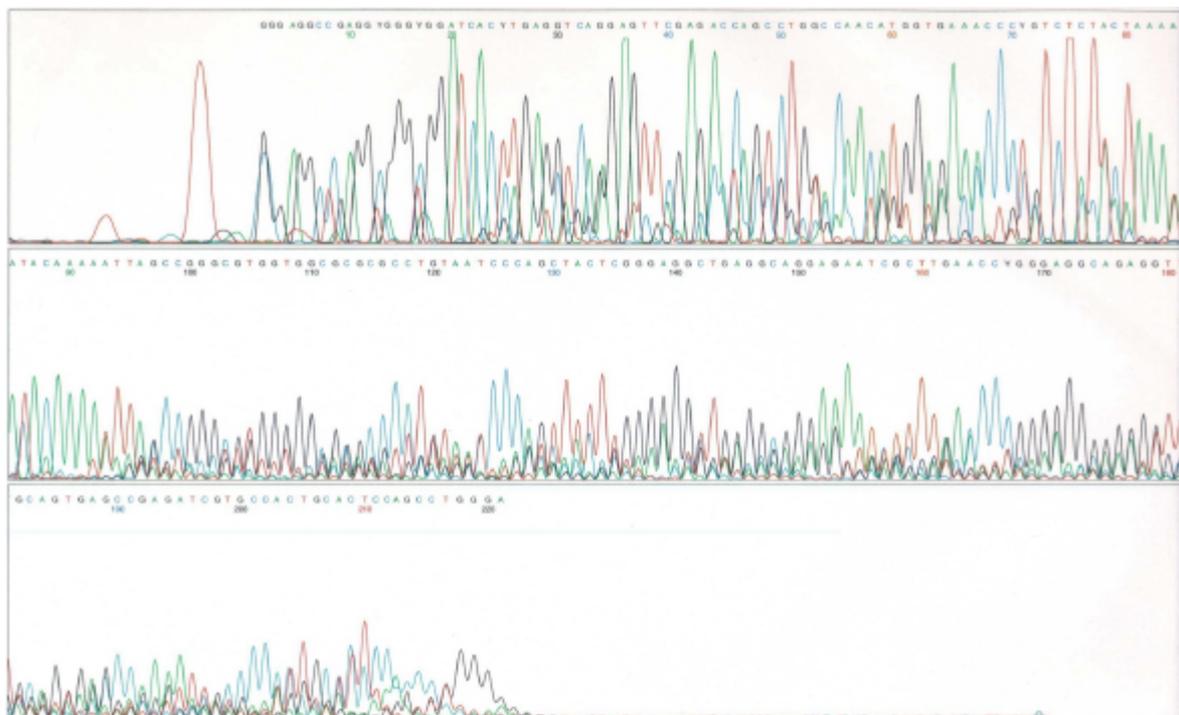
5-FU	5-Fluorouracil
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CAM-Assay	Chorioallantoismembran-Ansatz
CMV	Cytomegalovirus
DAB	Diaminobenzidin
d. h.	das heißt
DMA	Dimethylacetamid/PEG
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eT	explantierter Tumor
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell scanner</i> , Durchflußzytometrie
FKS	fötales Kälberserum
GFP	<i>green fluorescence protein</i>
hu	human
i.f.p.	<i>intra foot-pad</i>
i.p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
MMP	Matrixmetalloproteinase
m	Maus
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
p.o.	per oral
ps	<i>post-surgery</i> , nach der Operation
R	Korrelationskoeffizient
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SCID	<i>severe combined immuno-deficiency</i>
SSC	Zitrat-gepufferte Kochsalzlösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett

vgl.
wt
x
z. B.

vergleiche
Wildtyp
mal
zum Beispiel

7.2 Sequenz des Alu-PCR-Produkts

Die Sequenzierung des PCR-Produkts der Alu-PCR wurde von der Firma Sequiserve (Ebersberg) durchgeführt. Die Abbildung zeigt die Sequenz des PCR-Produkts, Neben diesem werden in der PCR-Reaktion auch andere Produkte gebildet, die an den schwächeren Amplituden zu erkennen sind. Für die Bestimmung der prozentualen Übereinstimmung des PCR-Produkts mit den Konsensussequenzen der Genbank wurde die in der oberen Zeile angegebene Sequenz verwendet.



7.3 Sequenzvergleich des PCR-Produkts der Alu-PCR mit Konsensussequenzen anderer Alu-Familien

Dargestellt ist der Sequenzvergleich des PCR-Produkts der quantitativen Alu-PCR mit den Konsensussequenzen der verschiedenen Alu-Familien. Rot markiert sind die Bindestellen der Primer Alu-3 f und Alu-3r.

	1				50
ALU-J	~~~~~	GGCCGGGCGC	GGTGGCTCAC	GCCTGTAATC	CCAGCACTTT
ALU-SB	~~~~~	GGCCGGGCGC	GGTGGCTCAC	GCCTGTAATC	CCAGCACTTT
ALU-SB1	~~~~~	GGCCGGGCGC	GGTGGCTCAC	GCCTGTAATC	CCAGCACTTT
ALU-SB2	~~~~~	GGCCGGGCGC	GGTGGCTCAC	GCCTGTAATC	CCAGCACTTT
ALU-SC	~~~~~	GGCCGGGCGC	GGTGGCTCAC	GCCTGTAATC	CCAGCACTTT
ALU-SP	~~~~~	GGCCGGGCGC	GGTGGCTCAC	GCCTGTAATC	CCAGCACTTT
ALU-SQ	~~~~~	GGCCGGGCGC	GGTGGCTCAC	GCCTGTAATC	CCAGCACTTT
ALU-SX	GGCGGGCGGA	GGCCGGGCGC	GGTGGCTCAC	GCCTGTAATC	CCAGCACTTT
ALU-YA5	~~~~~	~CCGGGCGC	GGTGGCTCAC	GCCTGTAATC	CCAGCACTTT
ALU-YB8	~~~~~	~GGCCGGGCGC	GGTGGCTCAC	GCCTGTAATC	CCAGCACTTT
ALU-PCR	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	51				100
ALU-J	GGGAGGCCGA	GGCGGGAGGA	TCACTTGAGC	CCAGGAGTTC	GAGACCAGCC
ALU-SB	GGGAGGCCGA	GGCGGGCGGA	TCAC..GAGG	TCAGGAGATC	GAGACCATCC
ALU-SB1	GGGAGGCCGA	GGCGGGCGGA	TCAC..GAGG	TCAGGAGATC	GAGACCATCC
ALU-SB2	GGGAGGCCGA	GGCGGGTGGGA	TCAT..GAGG	TCAGGAGATC	GAGACCATCC
ALU-SC	GGGAGGCCGA	GGCGGGCGGA	TCAC..GAGG	TCAAGAGATC	GAGACCATCC
ALU-SP	GGGAGGCCGA	GGCGGGCGGA	TCACCTGAGG	TCGGGAGTTC	GAGACCAGCC
ALU-SQ	GGGAGGCCGA	GGCGGGTGGGA	TCACCTGAGG	TCAGGAGTTC	GAGACCAGCC
ALU-SX	GGGA.....GGAAGA	TCACCTGAGG	TCAGGAGTTC	GAGACCAGCC
ALU-YA5	GGGAGGCCGA	GGCGGGCGGA	TCAC..GAGG	TCAGGAGATC	GAGACCATCC
ALU-YB8	GGGAGGCCGA	GGCGGGTGGGA	TCAT..GAGG	TCAGGAGATC	GAGACCATCC
ALU-PCR	GGGAGGCYGA	GGYGGGYGGA	TCACYTGAGG	TCAGGAGTTC	GAGACYAGCC
	101				150
ALU-J	TGGGCAACAT	AGTGAAACCC	CGTCTCTACA	AAAAATAC.A	AAAATTAGCC
ALU-SB	TGGCTAACAC	GGTGAAACCC	CGTCTCTACT	AAAAATAC.A	AAAATTAGCC
ALU-SB1	CGGCTAAAAC	GGTGAAACCC	CGTCTCTACT	AAAAATAC.A	AAAATTAGCC
ALU-SB2	TGGCTAACAA	GGTGAAACCC	CGTCTCTACT	AAAAATACAA	AAAATTAGCC
ALU-SC	TGGCCAACAT	GGTGAAACCC	CGTCTCTACT	AAAAATAC.A	AAAATTAGCT
ALU-SP	TGACCAACAT	GGAGAAACCC	CGTCTCTACT	AAAAATAC.A	AAAATTAGCC
ALU-SQ	TGGCCAACAT	GGTGAAACCC	CGTCTCTACT	AAAAATAC.A	AAAATTAGCC
ALU-SX	TGGCCAACAT	GGTGAAACCC	CGTCTCTACT	AAAAATAC.A	AAAATTAGCC
ALU-YA5	CGGCTAAAAC	GGTGAAACCC	CGTCTCTACT	AAAAATAA.A	AAAATTAGCC
ALU-YB8	TGGCTAACAA	GGTGAAACCC	CGTCTCTACT	AAAAATACAA	AAAATTAGCC
ALU-PCR	TGTCCAACAT	GGTGAAACCC	YGTCTCTACT	AAAAATAC.A	AAAATTAGCT

151 200

ALU-J GGGCGTGGTG GCGCGCGCCT GTAGTCCCAG CTACTCGGGA GGCTGAGGCA
 ALU-SB GGGCGTGGTG GCGGGCGCCT GTAGTCCCAG CTACTCGGGA GGCTGAGGCA
 ALU-SB1 GGGCGTAGTG GCGGGCGCCT GTAGTCCCAG CTACTTGGGA GGCTGAGGCA
 ALU-SB2 GGGCGCGGTG GCGGGCGCCT GTAGTCCCAG CTACTGGGGA GGCTGAGGCA
 ALU-SC GGGCGTGGTG GCGCGCGCCT GTAGTCCCAG CTACTCGGGA GGCTGAGGCA
 ALU-SP GGGCGTGGTG GCGCATGCCT GTAATCCCAG CTACTCGGGA GGCTGAGGCA
 ALU-SQ GGGCGTGGTG GCGGGCGCCT GTAATCCCAG CTACTCGGGA GGCTGAGGCA
 ALU-SX GGGCGTGGTG GCGCGCGCCT GTAATCCCAG CTACTCGGGA GGCTGAGGCA
 ALU-YA5 GGGCGTAGTG GCGGGCGCCT GTAGTCCCAG CTACTTGGGA GGCTGAGGCA
 ALU-YB8 GGGCGCGGTG GCGGGCGCCT GTAGTCCCAG CTACTCGGGA GGCTGAGGCA

ALU-PCR GGGCGTGGTG GCGCGCGCCT GTGATCCCAG CTACTCGAGA GGCTGAGGCA

201 250

ALU-J GGAGGATCGC TTGAGCCCGG GAGGTGCGAGG CTGCAGTGAG CCGTGATCGC
 ALU-SB GGAGAATGGC GTGAACCCGG GAGGCGGAGC TTGCAGTGAG CCGAGATCGC
 ALU-SB1 GGAGAATGGC GTGAACCCGG GAGGCGGAGC TTGCAGTGAG CCGAGATCCC
 ALU-SB2 GGAGAATGGC GTGAACCCGG GAAGCGGAGC TTGCAGTGAG CCGAGATTGC
 ALU-SC GGAGAATCGC TTGAACCCGG GAGGCGGAGG TTGCAGTGAG CCGAGATCGC
 ALU-SP GGAGAATCGC TTGAACCCGG GAGGCGGAGG TTGCGGTGAG CCGAGATCGC
 ALU-SQ GGAGAATCGC TTGAACCCGG GAGGCGGAGG TTGCAGTGAG CCGAGATCGC
 ALU-SX GGAGAATCGC TTGAACCCGG GAGGCGGAGG TTGCAGTGAG CCGAGATCGC
 ALU-YA5 GGAGAATGGC GTGAACCCGG GAGGCGGAGC TTGCAGTGAG CCGAGATCCC
 ALU-YB8 GGAGAATGGC GTGAACCCGG GAAGCGGAGC TTGCAGTGAG CCGAGATTGC

ALU-PCR GGAGAATCTC TTGAACCTGA GAGGCAGAGG TTGCAGTGAG CCGAGATCGT

251 300

ALU-J GCCACT **GCACTCC AGCCTGGG**CG AC .AGAGCGA GACCCTGTCT
 ALU-SB GCCACT **GCACTCC AGCCTGGG**CG AC .AGAGCGA GACTCCGTCT
 ALU-SB1 GCCACT **GCACTCC AGCCTGGG**CG AC .AGAGCGA GACTCCGTCT
 ALU-SB2 GCCACTGCAG TCC**GCACTCC GGCCTGGG**CG AC .AGAGCGA GACTCCGTCT
 ALU-SC GCCACT **GCACTCC AGCCT .GG**CG AC .AGAGCGA GACTCCGTCT
 ALU-SP GCCATT **GCACTCC AGCCTGGG**CA ACAAGAGCGA AACTCCGTCT
 ALU-SQ GCCACT **GCACTCC AGCCTGGG**CA ACAAGAGCGA AACTCCGTCT
 ALU-SX GCCACT **GCACTCC AGCCTGGG**CG AC .AGAGCGA GACTCCGTCT
 ALU-YA5 GCCACT **GCACTCC . .CCTGGG**CG AC .AGAGCGA GACTCCGTCT
 ALU-YB8 GCCACTGCAG TCC**GCACTCC GGCCTGGG**CG AC .AGAGCGA GACTCCGTCT

ALU-PCR GCCACT **GCACTCC AGCCTGGG**A~ ~~~~~ ~~~~~

301 320

ALU-J } CAAAAAAAA~ ~~~~~
 ALU-SB } CAAAAAAAA~ ~~~~~
 ALU-SB1 } CAAAAAAAA~ ~~~~~
 ALU-SB2 } CAAAAAAAA~ ~~~~~
 ALU-SC } CAAAAAAAA~ ~~~~~
 ALU-SP } CAAAAAAAA~ ~~~~~
 ALU-SQ } CAAAAAAAA~ ~~~~~
 ALU-SX } CAAAAAAAA~ ~~~~~
 ALU-YA5 } CAAAAAAAA AAAAAAAAA
 ALU-YB8 } CAAAAAAAA AAAAA~
 ALU-PCR } ~~~~~ ~~~~~

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Lagerlechfeld, den 18.04.02

(Unterschrift)

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen:

Frau Prof. Dr. H. Weiß danke ich sehr für die Erstellung des Erstgutachtens, für ihre Betreuung und ihr großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. R. Maier möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Herrn Dr. W. Scheuer danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und dafür, dass ich die Arbeiten im Labor durchführen konnte und mir alle theoretischen und praktischen Mittel zur Verfügung standen. Seine Anregungen und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit waren mir immer eine große Hilfe.

Meinen Laborkolleginnen und –kollegen bin ich für das stets gute Arbeitsklima und die hervorragende Zusammenarbeit dankbar. Besonders danken möchte ich Dr. Thomas Frieß, Christa Bielmeier und Wolfgang Kinle (für die Hilfe bei der Durchführung der tierexperimentellen Studien), Franz Osl (für seine tatkräftige Unterstützung bei der Aufarbeitung so mancher Gewebeproben und seine Hilfe bei so manchen Computer-Problemen), Gaby Dietmann und Bernd Kirchner (für so manchen Tipp für die Histologie).

Besonders möchte ich mich auch bei meinen „Mitdoktoranden“ für die gegenseitige Unterstützung und Motivation bedanken.

Vielen Dank an alle meine Penzberger Freunde, die dabei halfen, einen Ausgleich zum Laboralltag zu schaffen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken, die mir durch ihre Unterstützung mein Studium und diese Promotion erst ermöglicht haben.

Lebenslauf

Name: Tanja Katharina Schneider
Geburtsdatum: 29. Januar 1972
Geburtsort: Augsburg
Familienstand: ledig

Schulbildung

1979 - 1983 Grundschule – Graben
1983 – 1992 Gymnasium der Leonhard-Wagner Schule, Schwabmünchen
1992 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/92 – 06/96 Studium der Biologie an der Universität Regensburg
06/96 – 06/97 Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie der Universität Regensburg unter Anleitung von PD Dr. S. Fabry
Thema der Diplomarbeit: „In-vitro und in-vivo Analysen von Spezifitäts-determinierenden Proteinabschnitten in Ypt-Proteinen“
01/98 – 11/02 Dissertation in dem Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik an der Ludwigs-Maximilians-Universität, München unter Anleitung von Prof. E. H. Weiß zum Thema: „Humane Alu-Sequenzen als Surrogat-Marker für die Metastasierung in humanen Xenograft-Tiermodellen? – Ein neuer Ansatz für den quantitativen Nachweis humaner Tumorzellen in Xenograft-Modellen mit Hilfe der quantitativen Alu-PCR.“
Durchführung der praktischen Arbeiten bei der Roche Diagnostics GmbH, Pharma Forschung Penzberg, unter Anleitung von Dr. W. Scheuer