



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Establishing a novel immunocompetent murine model for bladder cancer using in vivo electroporation

Autor: Stefan Soleder
Institut / Klinik: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
Doktorvater: Prof. Dr. H. Augustin

Für das Urothelkarzinom der Blase gibt es kaum zuverlässige und gut reproduzierbare Tumormodelle. Dieser Mangel beeinträchtigt den Fortschritt der Forschung zu dieser Tumorentität. Das Ziel der im Rahmen der medizinischen Doktorarbeit durchgeführten Studie war die Etablierung eines neuen genetisch modifizierten Tiermodells für Blasenkrebs zur besseren Erforschung der Tumorbilogie sowie für die Erprobung neuer Therapieverfahren.

Das entwickelte Verfahren zur Tumorinduktion ist neuartig. An genetisch modifizierten Mäusen mit Zielgenen, die mit loxP Stellen flankiert waren, wurden im Rahmen einer Operation in vivo Plasmidlösungen intraluminal in die Harnblase injiziert. Anschließend wurde die Blase elektroporiert. Ziel war die Transfektion des Urothels mit den Onkogenen *Kras*^{G12V} und *Cmyc* sowie mit Plasmiden die für die Cre-Rekombinase und die Sleeping Beauty Transposase kodieren. Durch die Cre-Rekombinase wurden die genetischen Modifikationen der Mäuse lokal in der Blase aktiviert. Die Sleeping Beauty Transposase ermöglichte die permanente Integration der Onkogen-Plasmide in das Genom der Urothelzellen.

Verwendet wurden zwei verschiedene genetisch modifizierte Mauslinien der Rasse C57BL/6 („black 6“ Mäuse): einerseits *Tp53*^{fl/fl}, wobei das Gen für das Tumorsuppressorgen *Tp53* mit loxP Stellen markiert ist und durch die Cre-Rekombinase inaktiviert wird und andererseits *Braf*^{LSL-V600E}, *Pten*^{lox/lox}, *Ctnnb1*^{ex3lox/lox}, wobei das Protoonkogen *Braf* durch eine durch Cre aktivierte Punktmutation zum Onkogen modifiziert wird, das Tumorsuppressorgen *Pten* durch Cre inaktiviert und das Protoonkogen *Ctnnb1* (Beta-Catenin) durch eine Entfernung des Exon 3 mittels Cre dauerhaft aktiviert wird.

In zwei experimentellen Durchgängen wurden erst verschiedene Plasmidkombinationen erprobt und anschließend das experimentelle Verfahren optimiert, indem die verwendeten Promoter epithelspezifisch gemacht wurden und das Plasmidapplikationsverfahren bei weiblichen Mäusen auf Harnblasenkatheterisierung umgestellt wurde. Die Mäuse wurden täglich mittels Palpation und bis zu zwei Mal wöchentlich mittels MRT-Scan auf Tumorwachstum sowie auf Eintreten eines humanen Abbruchkriteriums untersucht. Bei der Feststellung von Tumorwachstum wurden die Tiere euthanisiert und es wurde eine Autopsie durchgeführt. Die resultierenden Tumore wurden histologisch mittels H.E. Färbung und Immunhistochemie aufgearbeitet und durch zwei unabhängige Pathologen beurteilt. Darüber hinaus wurden eine RT-qPCR Analyse des Tumorgewebes durchgeführt, um Genexpressionsmuster der Tumoren zu identifizieren.

Insgesamt zeigte sich Tumorwachstum in der Blase in 55,3% im ersten und 59,6% im zweiten experimentellen Durchgang, sowie in 19,1% beziehungsweise 18,0% ektope Tumoren, bei denen kein orthotoper Primärtumor in der Blase festgestellt werden konnte. Die tumortragenden Tiere zeigten außerdem zahlreiche klinische Merkmale, die für das Urothelkarzinom typisch sind, wie beispielsweise Makrohämaturie sowie frühzeitige Metastasierung der Tumore. In einzelnen Versuchsgruppen entwickelten 100% der Tiere urotheliale Blasenkarzinome orthotop in der Blase, beispielsweise in den *Tp53*^{fl/fl} Gruppen mit *KRT14* Promoter und *Cdh1* Promoter für Cre Rekombinase und Sleeping Beauty Transposase, denen sowohl *Kras* als auch *Cmyc* als Onkogene verabreicht wurden. Die Genexpressionsmuster und pathologischen Analysen ergaben einen Tumorphänotyp, der dem basalen Typ des Urothelkarzinoms ähnelt. Tumorwachstum war im Median in einzelnen Gruppen bereits nach 20 Tagen nach Operation festzustellen.

Insgesamt ist es in der Studie gelungen, ein zuverlässig funktionierendes, durch Verwendung anderer Plasmide vielseitig anpassbares und schnelles Tumormodell zu entwickeln, das in immunkompetenten Mäusen angewendet werden kann. Dieses Modell kann in Zukunft für weitere präklinische Forschung

am urothelialen Blasenkarzinom verwendet werden und öffnet somit zahlreiche neue Möglichkeiten für subtypspezifische Erforschung von Tumorbiologie und Therapiemöglichkeiten.