

Untersuchungen zum Monitoring von Tumorexograftmodellen mittels nicht-invasivem in vivo Multispektral-Fluoreszenzimaging

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt

von Frau Diplom-Biologin (technisch orientiert) Henrike Caysa
geboren am 26.07.1980 in Potsdam

Gutachter/in

1. Prof. Dr. K. Mäder
2. Prof. Dr. med. H.-J. Schmoll
3. Prof. Dr. G. Bendas

Halle (Saale), den 29.07.2013

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	v
1 Einleitung	1
1.1 Das kolorektale Karzinom - Bedarf an neuen Therapieoptionen	1
1.2 Tiermodelle in der onkologischen Forschung	4
1.3 Bildgebungsverfahren	6
1.3.1 In der Medizin	6
1.3.2 In der Forschung	8
1.4 Polymere in der Krebstherapie	11
1.5 Zielstellung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Zellkultur	13
2.1.1 Die verwendeten Zelllinien	13
2.1.2 Material	14
2.1.3 Mikroskopie	14
2.2 Klonierung der RFP TurboFP635 und mPlum	14
2.2.1 Material	14
2.2.2 Methoden	15
2.3 Gewinnung tiefrot fluoreszierender Zellklone	17
2.3.1 Material	17
2.3.2 Methoden	18
2.4 In vitro Charakterisierung der CRC Klone	19
2.4.1 Material	19
2.4.2 Methoden	19
2.5 In vivo Charakterisierung der CRC Klone	22
2.5.1 In situ Vorversuche	22
2.5.2 Allgemeines zu den Tiermodellen	23
2.5.3 Material	23
2.5.4 Methoden	24
2.6 Multispektral-Fluoreszenzimagining	26
2.6.1 Material und Einstellungen	26

2.6.2	Methoden	28
2.7	Kontrastmittel und Modellarzneiträger NIR-HES	31
2.7.1	Material	31
2.7.2	Methoden	31
2.8	Software	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Gewinnung & Charakterisierung tiefrot fluoreszierender Tumorzellen	33
3.1.1	Gewinnung der Klone	33
3.1.2	In vitro Charakterisierung der Klone	35
3.1.3	Zusammenfassung	45
3.2	Etablierung des msFI für Xenograftmodelle	47
3.2.1	Erste in situ Vorversuche zum Tumorzellimaging	47
3.2.2	Überlegungen zur Quantifizierung der Tumorlast	51
3.2.3	Untersuchungen am s. c. Xenograft	53
3.2.4	Eine Fehlerbetrachtung	65
3.2.5	Untersuchungen für orthotope bzw. Metastasierungsmodelle	70
3.2.6	Zusammenfassung	81
3.3	Kontrastmittel und Modellarzneiträger NIR-HES	82
3.3.1	Untersuchungen zur Pharmakokinetik von NIR-HES 200	82
3.3.2	Verwendung von NIR-HES als KM und Modellarzneiträger	82
3.3.3	Zusammenfassung	91
4	Diskussion	92
4.1	Etablierung tiefroter Fluoreszenz	92
4.2	Nicht-invasives in vivo msFI in CRC Xenograftmodellen	93
4.3	Kontrastmittel und Modellarzneiträger NIR-HES	97
5	Zusammenfassung und Ausblick	98
6	Anhang	vii
6.1	Literaturverzeichnis	vii
6.2	Daten der verwendeten Fluoreszenzproteine	xv
6.3	Klonierung der tiefroten RFP	xviii
6.4	Wachstumskinetiken	xx
6.5	Erklärung	xxiv
6.6	Danksagung	xxv
6.7	Lebenslauf	xxvi
6.8	Publikationsliste	xxviii

Tabellenverzeichnis

1.1	Häufigkeiten von Krebserkrankungen in Deutschland 2010	2
1.2	Eine Übersicht zu den Bildgebungsverfahren in der Medizin	7
2.1	Die verwendeten Zelllinien	13
2.2	Die verwendeten PCR Primer	17
2.3	Die verwendeten source Vektoren	17
2.4	Die verwendeten Antikörper für den Western Blot	20
2.5	Die verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie	24
2.6	Die Übersicht der verwendeten Filtersätze	27
3.1	Der Vergleich der durchflusszytometrischen Intensitätsbestimmungen	38
3.2	Die IC50- und IC90-Werte der Zellklone	44
3.3	Die Zusammenfassung der Daten für die verwendeten CRC Zellklone	46
3.4	Die ermittelten Exponenten B der angepassten Potenzfunktionen . . .	58
3.5	Die Ergebnisse der Testung auf Normalverteilung für V, I & S. D. . .	66
3.6	Das Ergebnis der paarweisen Vergleiche im gemischten Modell A . . .	68
3.7	TAV für NIR-HES 200 in verschiedenen s. c. Xenograftmodellen . . .	85
3.8	TAV für verschiedene NIR KM in einem i. p. Xenograftmodell	91
6.1	Die wichtigen Eigenschaften der verwendeten FP	xvi

Abbildungsverzeichnis

1.1	Daten zur Todesursache in Deutschland	3
1.2	Eine Übersicht zu Tiermodellen in der onkologischen Forschung . . .	4
1.3	Schema zur Bildgebung mit elektromagnetischen oder Schallwellen . .	7
1.4	Das optische Fenster und zwei bekannte Fluoreszenzproteine	10
2.1	Das Maestro™ <i>in vivo</i> Fluorescence Imaging System	27
2.2	Das Schema zum Unmixing	29
3.1	Lichtmikroskopische Aufnahmen der fluoreszierenden CRC Klone . .	36
3.2	Die Intensitätsquantifizierung der Klone am FACSCalibur™	37
3.3	Die Fluoreszenzstabilität über die Kultivierungsdauer	38
3.4	Die Western Blots für die Fluoreszenzklone der Zelllinie DLD-1 . . .	40
3.5	Die Western Blots für die Fluoreszenzklone der Zelllinie HT-29	40
3.6	Die Verdopplungszeiten von DLD-1 & HT-29 mit den Klonen	41
3.7	Zytotoxizität von Oxaliplatin, 5-FU & Irinotecan auf DLD-1 Zellen .	42
3.8	Zytotoxizität von Oxaliplatin, 5-FU & Irinotecan auf HT-29 Zellen .	43
3.9	Der Einfluss der Belichtungszeit	48
3.10	Der Versuch zur Zellzahlquantifizierung im Kadaverexperiment. . . .	50
3.11	Der Einfluss der Zelllokalisierung im Tier	52
3.12	Der Vergleich zwischen I_{max} und I als Parameter der Tumorlast. . . .	55
3.13	Die Korrelation von V und I - eGFP & DsRed2	56
3.14	Die Korrelation von V und I - TurboFP635 & mPlum	57
3.15	Ein Sonderfall: Monitoring von DLD-1 FUKW 6 in Maus M2	60
3.16	Der Zusammenhang zwischen V und I	61
3.17	Das Monitoring mehrerer Tumorherde im s. c. Xenograftmodell . . .	62
3.18	Das Monitoring von Therapieansprechen im s. c. Xenograftmodell . .	64
3.19	Die Histogramme für die metrischen Merkmale V und I	67
3.20	Die Boxplots für die Verteilung der S. D. [%] von I	69
3.21	Das Monitoring von DLD-1 FUKW 5 nach i. p. Applikation (1)	71
3.22	Das Monitoring von DLD-1 FUKW 5 nach i. p. Applikation (2)	72
3.23	HT-29 FUKW 11 i. p.: Wachstum	73
3.24	HT-29 FUPW 11 i. p.: Wachstum	74
3.25	Eine Therapiestudie im i. p. Modell	76
3.26	HT-29 FUKW 11 und FUPW 11 i. v.: Wachstum	78
3.27	Die histologischen Schnitte der HT-29 Tumore nach i. v. Applikation	79

3.28	HT-29 FUKW 11 und FUPW 11 i. v.: Lungen	80
3.29	Zeitlicher Verlauf des NIR-HES 200 Signals nach i. v. Gabe	83
3.30	Differentielle NIR-HES Anreicherung im s. c. DLD-1-Xenograftmodell	84
3.31	Ein matched cells Modell	87
3.32	Die Kontrastmittelgabe im mPlum HT-29 i. p. Xenograftmodell	89
3.33	NIR-HES 200 im HT-29 i. p. Xenograftmodell - Maus 6	90
6.1	Die Übersicht zu den Maestro-Emissionsspektren der verwendeten FP	xvii
6.2	Die PCR zur Anreicherung des TurboFP635-Fragmentes	xviii
6.3	Der Kontrollrestriktionsverdau von verschiedenen pFUKW Klonen	xix
6.4	Der Kontrollrestriktionsverdau von verschiedenen pFUPW Klonen	xix
6.5	Die Ergebnisse der Wachstumskinetik für TurboFP635 DLD-1 Zellen	xxi
6.6	Die Ergebnisse der Wachstumskinetik für mPlum DLD-1 Zellen	xxii
6.7	Die Ergebnisse der Wachstumskinetik für HT-29 Zellen	xxiii

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom - Bedarf an neuen Therapieoptionen

Maligne Neoplasien sind nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland [Becker & Wahrendorf, 1998; Kaatsch *et al.*, 2012]. Der Trend zeigt, dass sie vermutlich in den kommenden 10 Jahren die Haupttodesursache sein werden (siehe Abb. 1.1). Auch international gilt, dass das Auftreten und der schwere Verlauf von Tumorerkrankungen häufige Todesursachen sind. Die einzelnen Krebsarten variieren dabei regional stark hinsichtlich ihrer Inzidenz, wobei mittlerweile die typischen Tumorerkrankungen des westlichen Kulturkreises, wie das kolorektale Karzinom (CRC) oder das Lungenkarzinom, auch in den asiatischen Staaten und den Entwicklungsländern aufgrund des sich verändernden Lebensstils häufiger werden. Sie haben dort z. T. die infektionsbedingten Tumorerkrankungen (Leberkarzinom, Gebärmutterhalskrebs u. a.) in ihrer Häufigkeit überholt [Jemal *et al.*, 2010].

Betrachtet man die Daten zu den Krebserkrankungen mit der höchsten Inzidenz und der höchsten Mortalität in Deutschland im Detail, so zeigt sich, dass das CRC bei Männern wie Frauen eine der großen therapeutischen Herausforderungen darstellt (siehe Tab. 1.1). Aber auch in anderen Staaten ist diese Gruppe der malignen Erkrankungen häufig [Jemal *et al.*, 2010]. Zu den Risikofaktoren, an einem CRC zu erkranken, gehören Übergewicht und Adipositas, Bewegungsmangel sowie eine ballaststoffarme, fettreiche Ernährung mit hohem rotem Fleisch- und Wurstanteil sowie einem geringen Gemüseanteil [Kaatsch *et al.*, 2012]. Diese Faktoren sollen die Darmpassage verlangsamen und damit die Kontaktzeit von potentiellen Kanzerogenen mit dem Darmepithel verlängern. Zudem tragen regelmäßiger Alkoholenuss und Tabakkonsum zur weiteren Risikoerhöhung bei. Auch erblich bedingte Formen des CRC existieren. Die Erkrankungen treten zu ca. 65 % im Kolon und ca. 30 % im Rektum auf. Die restlichen Krankheitsfälle sind im Rektosigmoid bzw. im Analkanal lokalisiert. Histologisch gesehen handelt es sich bei den meisten CRC um Adenokarzinome, daneben kommen Plattenepithelkarzinome im Analbereich und neuroendokrine Tumore vor [Kaatsch *et al.*, 2012].

Der stadiumabhängige Standard in der CRC Therapie ist die operative Behandlung mit unterstützender Chemotherapie. Ebenfalls kommt prä- bzw. postoperative Radiotherapie bei Patienten mit rektalem Karzinom zum Einsatz. Als Chemotherapeutika werden u. a. 5-Fluorouracil (5-FU), Irinotecan und Oxaliplatin, auch in Kombination mit Cetuximab und Bevacizumab als zielgerichtete Antikörper, verwendet [Schmiegel *et al.*, 2008;

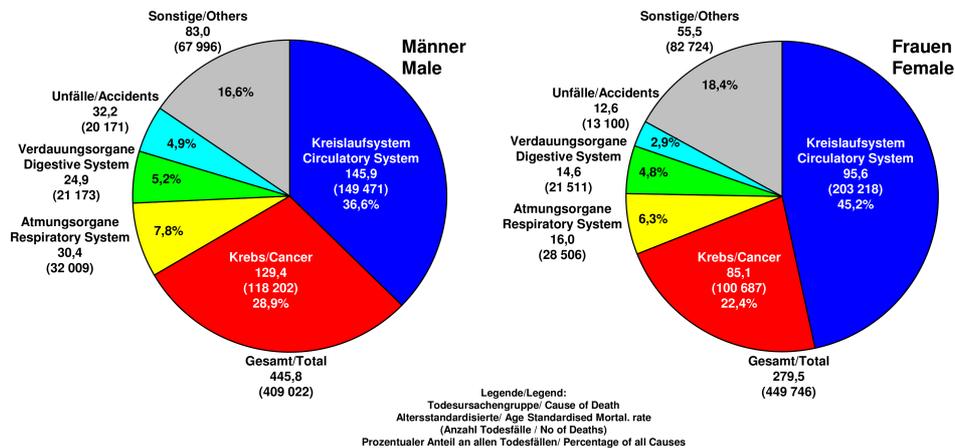
Tabelle 1.1: Häufigkeiten von Krebserkrankungen in Deutschland 2010.
[Becker & Wahrendorf, 1998; Kaatsch *et al.*, 2012]

		Männer	Frauen
Erkrankung	1.	Prostata	Brust
	2.	CRC	CRC
	3.	Lunge	Lunge
Todesursache	1.	Lunge	Brust
	2.	CRC	Lunge
	3.	Prostata	CRC

von der Schulenburg *et al.*, 2010]. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung von 63 % bei Männern und 62 % bei Frauen handelt es sich beim CRC um eine Krebserkrankung mit mittlerer Prognose [Kaatsch *et al.*, 2012]. Diese ist allerdings stark abhängig von dem Stadium, in dem die Erkrankung festgestellt wird. Insbesondere im fortgeschrittenen Stadium sind die Therapieoptionen limitiert, was die Notwendigkeit neuer Therapieoptionen bedingt.

Neben der Standardtherapie gibt es neue Ansätze, die Behandlung von CRC Patienten individueller zu gestalten. Basierend auf den molekularen Grundlagen der Entartung soll die Therapie optimiert werden. Das CRC ist durch intensive Forschung in den vergangenen Jahren von einer einzelnen Krankheit zu einer Erkrankung mit verschiedenen Ursachen und daraus resultierenden variablen Eigenschaften geworden [Chau & Cunningham, 2009; Perea *et al.*, 2011]. Es eröffnen sich so neue Möglichkeiten, gezieltere Therapieansätze zu etablieren, die eine bessere Prognose für die einzelnen Patienten bieten können. Aber auch die Entwicklung neuer Wirkstoffe, vor allem zur Überwindung von auftretenden Resistenzen gegen die bekannten Chemotherapeutika besonders bei fortgeschrittenen, metastasierten Stadien, sind ein wichtiger Baustein für höhere Überlebensraten bzw. längere progressionsfreie Zeiten. Ein weiterer möglicher Ansatz zur Steigerung der Effizienz etablierter Substanzen wäre, neuartige Arzneiformulierungen oder Arzneiträgersysteme einzusetzen, die z. B. eine lokale Anreicherung und damit Dosiserhöhung im Tumor bewirken und dadurch die unerwünschten Nebeneffekte einer Chemotherapie reduzieren können. Hier sei als möglicher Mechanismus der enhanced penetration and retention (EPR) Effekt erwähnt, der ein passives Tumortargeting ermöglichen kann [Maeda *et al.*, 2000].

Die häufigsten Todesursachengruppen in Deutschland 2010 The Most Frequent Causes of Death in Germany in 2010



Nikolaus Becker
Sabine Holzmeier
Abteilung Epidemiologie von Krebskrankungen
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg

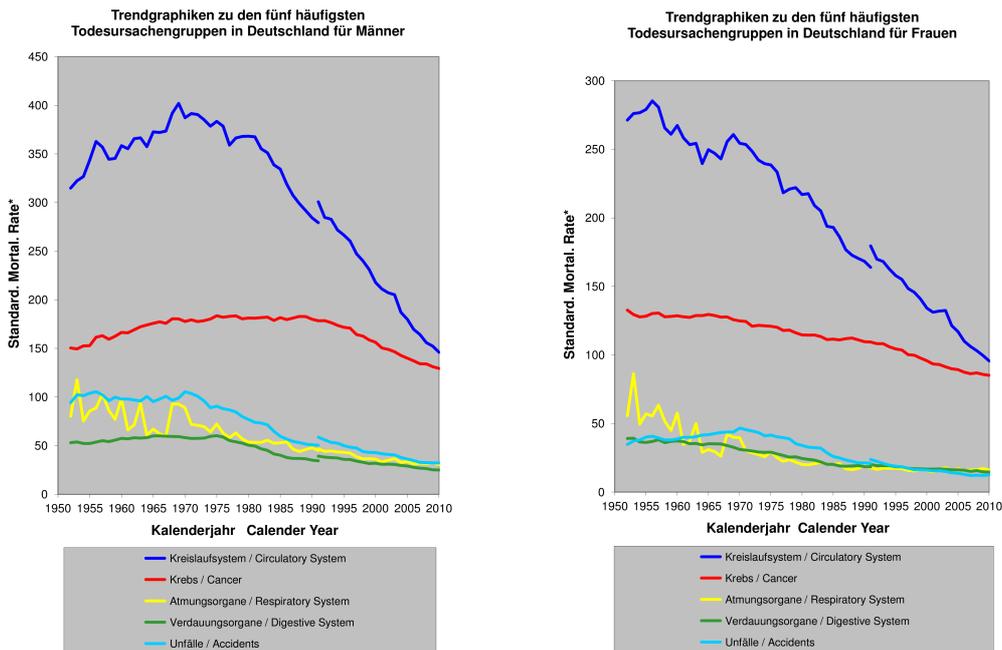


Abbildung 1.1: Daten zur Todesursache in Deutschland.

Oben: altersstandardisierte Mortalitätsraten (nach der Standardbevölkerung gewichteter Mittelwert über die in einzelnen Fünfjahresaltersgruppen ermittelten altersspezifischen Raten bezogen auf 100.000 Einwohner) des Jahres 2010, unten: Entwicklung der altersstandardisierten Mortalitätsraten seit 1950, links: Männer, rechts: Frauen.
<http://www.krebsatlas.de>

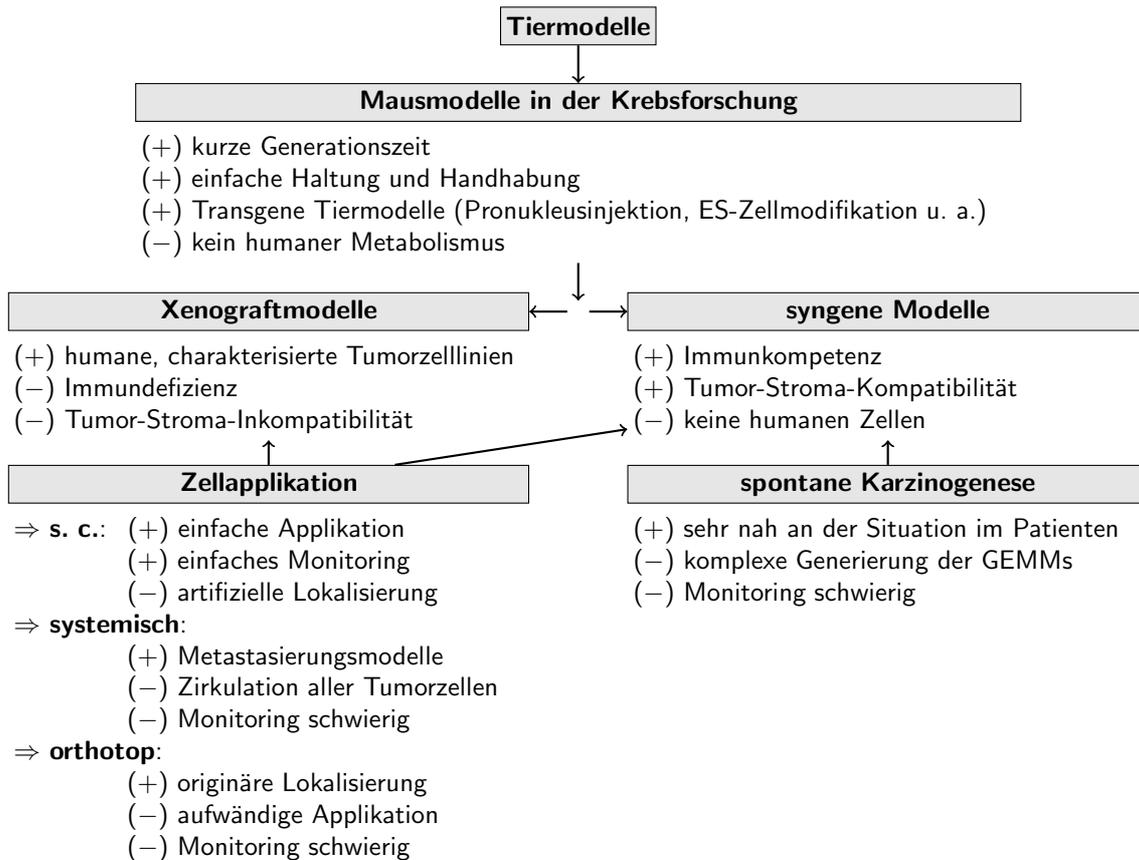


Abbildung 1.2: Eine Übersicht zu Tiermodellen in der onkologischen Forschung.
(+): Vorteile, (-): Nachteile

1.2 Tiermodelle in der onkologischen Forschung

Um Weiterentwicklungen der Krebstherapie zu ermöglichen, die den (individuellen) Ausgang der Erkrankung in den betroffenen Patienten verbessern, sind präklinische Tiermodelle unerlässlich. Sie werden benötigt, um *in vitro* gewonnene Erkenntnisse über neue Wirkstoffe, Arzneiformulierungen oder kombinationstherapeutische Ansätze sowie aktuelle Ergebnisse aus der Grundlagenforschung zur Tumorbilologie *in vivo* am komplexen System „Organismus“ zu überprüfen. Eine Kurzübersicht über die gängigen Tiermodelle in der onkologischen Forschung zeigt Abb. 1.2.

Der am häufigsten verwendete Modellorganismus ist die Hausmaus *Mus musculus ssp.* Diese Tierart zeichnet sich durch ihre einfache Haltung, Züchtung und Handhabung aus. Zudem handelt es sich bei Mäusen um Tiere, die viele Nachkommen bei einer kurzen Generationszeit und mit rascher Individualentwicklung erzeugen (r-Strategen). Durch die Kombination dieser natürlichen Eigenschaften mit den Techniken zur genetischen Modifikation von Säugerzellen ist es möglich, für eine zu untersuchende Fragestellung

das passende, der Erkrankung im Menschen ähnlichste Mausmodell zu generieren (z. B. genetically engineered mouse models (GEMMs) für CRC [Roper & Hung, 2012]).

Grundsätzlich sind xenogene und syngene Tumormodelle zu unterscheiden. Erstere arbeiten zumeist mit humanen, gut charakterisierten Tumorzelllinien oder mit Tumorgewebsimplantaten (z. B. aus Patientenmaterial). Voraussetzung für den xenogenen Ansatz ist die Verwendung immundefizienter Tiere, da sonst keine Xenograftprogression stattfinden würde. Die athymische Nacktmaus wird seit den 1970ern häufig in der Krebsforschung verwendet. Es handelt sich um eine natürlich aufgetretene spontane Deletion im *Foxn1* Gen (rezessives Allel *Foxn1tm*). Sie ist charakterisiert durch eine spärliche Restbehaarung sowie durch das Fehlen des Thymus. Betroffene Individuen können keine reifen T-Zellen zur spezifischen Immunabwehr bilden. Diese Tiere verfügen aber über ein Restimmunsystem, welches neben der Abwehr durch NK-Zellen auch die Produktion von Immunglobulinen erlaubt [Sharkey & Fogh, 1984; Shimosato *et al.*, 1979, 1976]. Will man stärker immundefiziente Tiere nutzen, beispielsweise weil die zu untersuchende Tumorzelllinie in Nacktmäusen kein Wachstum zeigt, so können u. a. die Mausstämme Fox Chase SCID[®] Mouse (Fa. Charles River, SCID mouse) oder CIEA NOG mouse[®] (Fa. Taconic, NOG mouse) verwendet werden, deren Immunsystem, verglichen mit der athymischen Nacktmaus, durch gentechnische Modifikation sehr viel stärker reduziert ist. Ein Vorteil der Xenograftmodelle liegt in ihrer einfachen Handhabung. Nutzt man die s. c. Zellapplikation, so ist der Implantationseingriff am Tier minimal-invasiv und das Monitoring der Tumorlast kann durch einfache Schieblehrenmessung hinreichend genau erfolgen [Euhus *et al.*, 1986; Tomayko & Reynolds, 1989]. Weiterhin erlauben Xenograftmodelle die Verwendung definierter, *in vitro* charakterisierter, humaner Zelllinien. So können z. B. bei Verwendung resistenter Tumorzelllinien Strategien zur Resistenzüberwindung untersucht werden. Nachteil der Xenograftmodelle ist, dass die Tiere kein normales Immunsystem besitzen und die Tumor-Stroma-Interaktion durch die Inkompatibilität zwischen dem genetischen Hintergrund von Xenograft und Empfänger verändert sein kann, was wiederum die Entwicklung, Metastasierung oder auch die Reaktion auf Chemotherapie des Xenografts im Vergleich zum Patiententumor beeinflussen kann. Zudem beeinflusst die artifizielle Tumorlokalisierung bei den häufig verwendeten s. c. Xenograftmodellen die Tumorbiologie entscheidend: Das die Tumorzellen umgebende Mikromilieu kann vor allem ihr Metastasierungsverhalten reduzieren. Weiterhin können die Progressionsrate und die Differenzierung des Xenografts von der des ursprünglichen Tumors stark abweichen. Diese Problematik lässt sich durch orthotope Zellinstallation positiv beeinflussen [Bibby, 2004; Douglas *et al.*, 2001; Fidler, 1991; Hoffman, 1994, 1999; Kerbel, 2003; Kubota, 1994]. Hier werden die Tumorzellen in das gleiche Mikromilieu implantiert, welches der Tumorentität entspricht, z. B. durch eine Zellinstallation für das CRC in das Kolon oder für testikuläre Keimzelltumore (TGCT) in den Testis. Voraussetzung für diese weniger artifiziellen Zellapplikationen ist neben der (invasiven) Implantationstechnik ein geeignetes Monitoringverfahren, welches die Beurteilung der Tumorlast im Tierinneren zuverlässig ermöglicht. Hier kommen unterschiedliche Bildgebungsverfahren in Frage, die im folgenden Abschnitt 1.3 näher erörtert werden.

Im Gegensatz zum Xenograftmodell wird bei syngenem Tumormodellen mit immunkompetenten Mäusen und entweder mit murinen Tumorzelllinien oder mit spontaner Karzinogenese gearbeitet. Zur Zellapplikation kommen prinzipiell die selben Techniken in Frage wie bei Xenograftmodellen. Für die sichere spontane Karzinogenese wurden mittlerweile unter Ausnutzung gentechnischer Modifikation wie Onkogenaktivierung oder Tumorsuppressorgeninaktivierung, sowohl in der Keimbahn als auch konditional, verschiedene GEMMs etabliert. Sie bieten den Vorteil, dass Immunkompetenz und Tumor-Stroma-Kompatibilität die Situation im Patienten gut abbilden [Roper & Hung, 2012; Sharpless & Depinho, 2006]. Erzeugung wie Etablierung dieser gentechnisch modifizierten Modelle sind jedoch hoch komplex und spiegeln nicht zwangsläufig die humane Tumorbilologie wieder [Walt *et al.*, 1993]. Analog den orthotopen Xenograftmodellen ist das Monitoring der Tumorlast von GEMMs auf spezielle Bildgebungsverfahren angewiesen.

1.3 Bildgebungsverfahren

1.3.1 In der Medizin

In der Humanmedizin kommen sehr verschiedene Techniken zur Darstellung von anatomischen Verhältnissen im Körper zum Einsatz. Die wichtigsten Verfahren fasst Tab. 1.2 zusammen [Dössel, 2000]. Grundsätzlich ist zwischen zwei Verfahrensklassen zu unterscheiden. Bei der Projektionsdarstellung werden alle im Strahlengang befindlichen Strukturen übereinander projiziert (z. B. das klassische Röntgenbild). Die tomographische Darstellung in Schnittbildern erlaubt aufgrund der geringen Schichtdicken eine nahezu überlagerungsfreie Abbildung und damit bessere, sensitivere Bilder mit hochaufgelöstem Informationsgehalt (z. B. CT, MRT). Für beide Verfahrensklassen können auch physiologisch-diagnostische Untersuchungen durchgeführt werden, wenn geeignete, eine Funktionalität abbildende Kontrastmittel (KM) in Kombination mit anatomischen Bilddaten ausgewertet werden (z. B. CT-PET). Allerdings erreichen tomographische Bilder auch hier die deutlich bessere Feindarstellung.

Vielen Verfahren gemein ist, dass sie auf elektromagnetischen oder Schallwellen und deren Verhalten im Gewebe und an dessen Grenzschichten basieren, wobei die Wellenart bzw. -qualität je nach Verfahren variiert und sich dementsprechend unterschiedliche Vor- und Nachteile der Methoden ergeben. Einige Beispiele sind CT, US oder optische Tomographie. Die entscheidenden Prozesse, die in der Bildgebung ausgenutzt werden, sind Absorption, Reflexion, Brechung, Beugung und Interferenz. Diese beeinflussen die eingesetzten Wellen gewebspezifisch hinsichtlich Amplitude, Frequenz und Phase. Aus den Differenzen zwischen den Eingangssignalen und den am Detektor aufgezeichneten Ausgangssignalen lassen sich computergestützt grafische Darstellungen in 2D oder 3D erzeugen. Das Grundprinzip der wellenbasierten Bildgebungsverfahren zeigt die Abb. 1.3.

Tabelle 1.2: Eine Übersicht zu den Bildgebungsverfahren in der Medizin.

Bei allen Tomographien handelt es sich um Schnittbildverfahren, die detailliertere Bild-
darstellungen generieren als Projektionsmethoden.

Verfahren	Basis	Vorteile	Nachteile
Röntgen	γ -Strahlung	für knöcherne Strukturen gut geeignet	Strahlenexposition
CT	γ -Strahlung	für knöcherne Strukturen gut geeignet, mit KM Weich- teildarstellung möglich	Strahlenexposition
SPECT	γ -Strahlung von KM	funktionelle Analysen	Strahlenexposition
PET	β^+ -Strahlung von KM	funktionelle Analysen	Strahlenexposition
US	hochfrequente Schallwellen	keine Strahlenexposition	geringe Auflösung, geringe Eindringtiefe
MRT	Kernspin	für nicht knöcherne Struk- turen geeignet, keine Strahlenexposition	hohe Betriebskosten

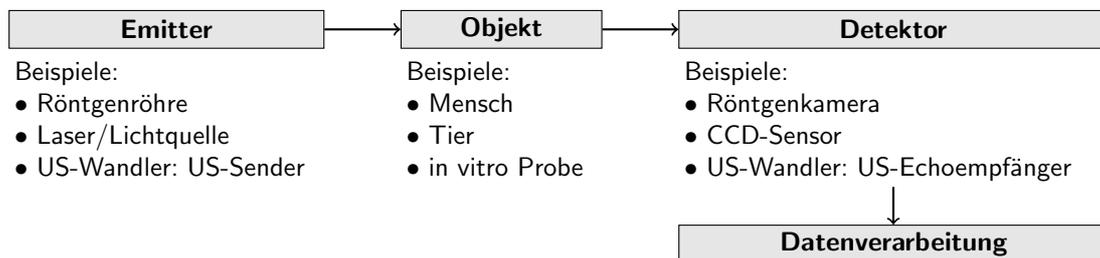


Abbildung 1.3: Ein Schema zur Bildgebung mit elektromagnetischen oder Schallwellen.

Die MRT hingegen nutzt im Wesentlichen den hohen, aber variierenden Protonengehalt biologischer Strukturen aus. Vereinfacht kann man festhalten, dass in einem extrem starken Magnetfeld die Atomkerne mit Eigenspin ausgerichtet werden. Aus dieser Ordnung (Längsmagnetisierung) lassen sich die Kerne mittels geeigneter, in Resonanz befindlicher Radiofrequenzimpulse auslenken (Quermagnetisierung). Je nach Bindungszustand des Protons dauert es unterschiedlich lange, bis diese Auslenkung wieder aufgehoben ist. Diese Abweichungen in den sogenannten Relaxationszeiten erlauben eine kontrastierte Darstellung der unterschiedlichen Gewebe. Je nach technischer Realisierung ist dies in 2D oder 3D möglich. Neben dem Proton ^1H biologisch auch relevant sind die Dipole Kohlenstoff ^{13}C , Fluor ^{19}F , Natrium ^{23}Na und Phosphor ^{31}P . Besonders gut geeignet für die Darstellung mittels MRT sind die Weichteile, da hier gute Eigenkontraste bei Nutzung optimaler Messsequenzen vorhanden sind, also ohne KM gearbeitet werden kann.

1.3.2 In der Forschung

In der Forschung werden neben den aus der Humanmedizin bekannten, ggf. angepassten Verfahren auch andere Techniken genutzt, die sich insbesondere der gentechnischen Zellmodifikation bedienen. Eine gute Kurzübersicht zum Kleintierimaging in der onkologischen Forschung haben Hong *et al.* [2010] und Sandhu *et al.* [2010] zusammengestellt. Die molekularbiologisch unterstützten Methoden erlauben neben der anatomisch-morphologischen Darstellung eines bestimmten Signals oder Markers auch funktionelle sowie genetische Analysen. Zu diesen Methoden gehört das Biolumineszenzimaging, welches bei der Untersuchung vieler Fragestellungen erfolgreich genutzt wird [Söling & Rainov, 2003]. Dabei wird das durch die energieaufwendige, enzymatische Oxidation eines Substrates entstehende Licht als Bildgebungssignal genutzt. Klassisch setzt das Enzym Luciferase, welches aus dem Glühwürmchen *Photinus pyralis* isoliert wurde, das Substrat Luciferin um. Der Nachweis der Luciferase dient als exogener Marker einer Zellpopulation. Etabliert man z. B. eine konstitutive Expression mittels geeignetem Promotor in Tumorzellen, so bildet das im Tier detektierte Lichtsignal die vitalen Tumorzellen ab und die Tumorlast kann so nicht-invasiv quantifiziert werden. Auch genetische Regulationsmechanismen lassen sich mit diesem Verfahren *in vivo* analysieren, wenn das Enzym unter Kontrolle des geeigneten, z. B. zellzyklusabhängigen Promotors exprimiert wird. Die zwingende Abhängigkeit der Licht freisetzenden Reaktion von zellulärer Energie in Form von ATP kann nachteilig sein, da sich absterbende und tote Zellen nicht mehr nachweisen lassen. Zudem wirkt die Notwendigkeit eines Substrates einschränkend auf die Flexibilität der zu untersuchenden Sachverhalte. Die Anzahl der nutzbaren Substrate ist begrenzt, wodurch die parallele zeitgleiche Analyse verschiedener Fragestellungen beschränkt ist. Weiterhin unterliegen die Substrate generell einer raschen, die Messzeiten limitierenden Pharmakokinetik. Sie sind z. T. auch sehr teuer, was, neben der notwendigen Kamerakühlung aufgrund geringer Signalintensitäten und dadurch bedingtem schlechtem Signal-Rausch-Verhältnis bei Raumtemperatur, die Kosten der Untersuchungen steigert. Eine vielseitig einsetzbare, günstigere Alternative stellt das Fluoreszenzimaging dar.

Das Fluoreszenzimaging

Ein weitverbreitetes Verfahren, biologische Fragestellungen *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen, ist das Fluoreszenzimaging. Sehr gute Übersichtsartikel sind von Graves *et al.* [2004] und Leblond *et al.* [2010], letzterer mit besonderem Schwerpunkt auf der technischen Realisierung und Limitierung, verfasst worden. Allen optischen Imagingmethoden basierend auf Fluoreszenz ist gemein, dass sie auf einer spontanen Lichtemission, die beim Übergang aus einem energetisch angeregten System in einen energieärmeren Zustand erfolgt, basieren. Sie benötigen daher mindestens ein Anregungslicht als Energielieferant, ein Fluorophor als anregbares System und einen Detektor für die Aufnahme der emittierten, längerwelligen Fluoreszenz. Diese drei Grundkomponenten erlauben ein flexibles Versuchsdesign, da sie alle für die jeweilige Fragestellung und das zu analysierende Modellsystem optimal gewählt werden können. Es kann sowohl das Projektionsverfahren als auch ein tomographisches Verfahren technisch realisiert werden, wenngleich die Projektionsverfahren, aufgrund ihrer langjährig erprobten Zuverlässigkeit und ihres geringeren apparativen und datenverarbeitungstechnischen Aufwands, noch häufiger im Einsatz sind.

Als Anregungsquellen können Laser mit monochromatischem Licht oder die flexibler einsetzbaren, energiereichen Weißlichtlampen kombiniert mit passenden Schmalbandfiltern verwendet werden. Häufig wird Auflichtbildgebung eingesetzt, aber auch Transmissionsimaging ist möglich. Die Detektion der emittierten Fluoreszenz erfolgt meist mittels CCD-Kameras, durch deren Objektiv das Untersuchungsobjekt fokussiert wird. Wichtig ist, dass dem Detektor ein (Langpass)Filter vorgeschaltet werden muss, der das Anregungslicht von der Aufnahme ausschließt. Die Trennung von Anregung und Fluoreszenz wird durch den Stokes Shift ermöglicht. Dieser beschreibt die Maximaverschiebung vom Extinktionsspektrum zum Emissionsspektrum des Fluorophors und ist durch den Energieverlust (Wärme, Schwingungsenergie) beim Zustandsübergang des Fluorophors bedingt. Die Fluorophore können aus einem breiten Spektrum an anorganischen wie organischen Verbindungen bis hin zu den komplexen Fluoreszenzproteinen (FP) ausgewählt werden. Fluoreszenzfarbstoffe, z. T. mit großen Stokes Shifts, sind inzwischen für jeden Wellenlängenbereich verfügbar.

Beim nicht-invasiven *in vivo* Fluoreszenzimaging ganzer Kleintiere, wie es in der präklinischen Forschung wünschenswert ist, sind zwei Phänomene die Hauptfaktoren, welche die Signalqualität, die Nachweisgrenze und die Quantifizierbarkeit einschränken: die starke Eigenfluoreszenz biologischer Gewebe und dessen geringe Lichtdurchlässigkeit, insbesondere bei Verwendung kurzwelliger Strahlung. Durch multispektrales Fluoreszenzimaging (msFI) kann der Einfluss der Eigenfluoreszenz verringert werden. Bei dieser Methode wird das emittierte Signal über einen breiten Wellenlängenbereich detektiert. Unter Zuhilfenahme von Referenzspektren für Autofluoreszenz und die nachzuweisenden Fluorophore kann das aufgenommene Summensignal eines Bildpunktes in die jeweiligen Einzelsignale zerlegt werden. So wird eine Quantifizierung der Signale getrennt von der überlagernden Autofluoreszenz der Probe (z. B. der Maushaut über einem s. c. Tu-

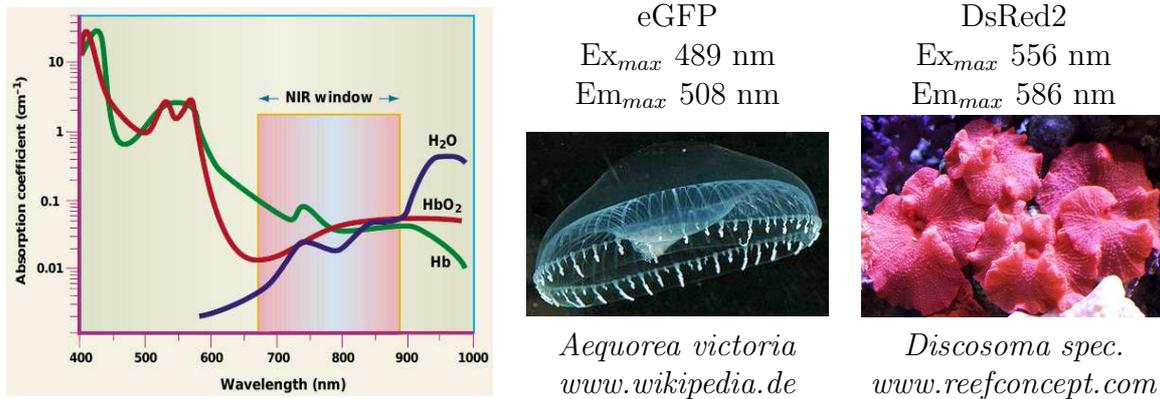


Abbildung 1.4: Das optische Fenster und zwei bekannte Fluoreszenzproteine.

links: Im nahen Infrarotbereich ist die Durchlässigkeit biologischer Gewebe für Licht besonders günstig, da die Absorption durch wesentliche Hauptkomponenten wie Wasser (H₂O), Hämoglobin (Hb) und oxidiertes Hämoglobin (HbO₂) hier am geringsten ist [Weissleder, 2001]. rechts: Die Extinktions- (Ex_{max}) und Emissionsmaxima (Em_{max}) der beiden FP eGFP und DsRed2 sowie Bilder der marinen Organismen, aus denen sie isoliert worden sind.

mor) möglich. Diese Methodik ist im MaestroTM *in vivo* Fluorescence Imaging System (Fa. CRi, Woburn, USA; siehe Abb. 2.1) technisch realisiert worden [Mansfield *et al.*, 2005a,c]. Der Bildkontrast wird so enorm gesteigert, was auch den Einsatz und Nachweis verschiedener Fluorophore in ein und dem selben Tier zur zeitgleichen Analyse unterschiedlicher Fragestellungen erlaubt. Allerdings kann bei Verwendung kurzweiliger Strahlung die Sensitivität dennoch so gering sein, dass schwache Signale nicht erfasst werden, da die Autofluoreszenz als dominierendes Signal die maximal mögliche Belichtungszeit beschränkt. Die unzureichende Eindringtiefe kurzweiliger Strahlung und erste Vorschläge zur Behebung dieser Limitation sind bereits früh beschrieben worden [Jöbbs, 1977]. Bedingt ist diese starke Abschwächung durch die hohe Absorption kurzweiligen Lichts im Gewebe. Eine vielversprechende Lösung dieses Problems stellt die Ausnutzung des optischen Fensters (optical window, siehe Abb. 1.4) dar [Stell *et al.*, 2007; Weissleder, 2001]. Im nahen Infrarotbereich (zwischen 650 und 900 nm) ist die Absorption von Oxy-/Hämoglobin sowie Melanin relativ gering und die von Wasser noch nicht zu stark, so dass hier gute Eindringtiefen erreicht werden können, die den Nachweis tiefer im Tier lokalisierter Fluorophore erlauben. Neben fluoreszierenden Farbstoffen des (nahen) Infrarotbereichs sind mittlerweile auch Proteine verfügbar, die in diesem Wellenlängenbereich angeregt werden und Fluoreszenz emittieren [Filonov *et al.*, 2011; Shu *et al.*, 2009]. Sie sind vielversprechende, stabile Marker für Zellen im Kleintierimaging.

1.4 Polymere in der Krebstherapie

In der modernen Krebstherapie gewinnt die individuell auf den Patienten abgestimmte Therapie an Bedeutung. Dies beinhaltet neben der Entwicklung neuer Wirkstoffe vor allem auch die Etablierung innovativer Arzneiträger, die ihre Wirkstoffe gezielt an den Wirkort bringen und dort freisetzen [Arias, 2011; Cho *et al.*, 2008; Holback & Yeo, 2011]. Ein wachsendes, erfolgversprechendes Gebiet der pharmazeutischen Technologie ist der Einsatz von polymerbasierten Arzneiträgersystemen (polymer therapeutics) [Canal *et al.*, 2011; Duncan, 2003; Haag & Kratz, 2006; Larson & Ghandehari, 2012; Maeda *et al.*, 2009]. Ihr Prinzip könnte besonders für die Therapie solider Tumore Bedeutung erlangen, da die Polymere als Makromoleküle bedingt durch den EPR Effekt im Tumor eine passive, lokale Anreicherung erfahren können. Dieser durch Matsumura und Maeda beschriebene Effekt beruht darauf, dass sich in soliden Tumoren sowohl die Gefäßstruktur als auch die Lymphdrainage von gesunden Geweben unterscheidet [Iyer *et al.*, 2006; Maeda *et al.*, 2000]. Tumore benötigen für ihr schnelles Wachstum eine exzessive Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff, was bereits in frühen Stadien zu einer starken Vaskularisierung des malignen Gewebes führt. Diese schnelle Angiogenese erzeugt aber oft fehlerhafte Endothelstrukturen. Die Gefäßwände sind löchrig, man sagt fenestriert, was den Durchtritt großer Moleküle erlaubt. Parallel dazu mangelt es im Tumor an lymphatischer Versorgung, so dass einmal aus der Blutbahn ausgetretene Stoffe nur sehr langsam wieder abtransportiert werden können.

Neben den strukturellen Besonderheiten des Tumors begünstigt die Pharmakokinetik von Makromolekülen die intratumorale Anreicherung. Die Plasmahalbwertszeiten von Makromolekülen oder auch mizellaren bzw. partikulären Arzneiträgersystemen können gegenüber niedermolekularen Substanzen verlängert sein. Die schnelle renale Ausscheidung ist aufgrund der Molekülgröße nicht möglich, so dass hauptsächlich die hepatische Elimination stattfindet. Haben die eingesetzten Makromoleküle eine geringe Bindung in der Leber bzw. unterdrückt man durch geeignete Strukturen die Leberaffinität der Arzneiträger, so kann man eine Verlängerung der Blutzirkulation erreichen. Dies kann die intratumorale Anreicherung stark fördern.

Neben der Verwendung als Arzneiträger können langzirkulierende, sich im Tumor bzw. an dessen Grenzflächen anreichernde Polymere als Kontrastmittel (KM) in der Bildgebung genutzt werden. In der Polymerdiagnostik ermöglicht das angereicherte, für die Bildgebung detektierbar markierte Polymer die Unterscheidung von gesundem und pathologischem Gewebe [Duncan, 2011; Lu *et al.*, 2007].

Verwendete Makromoleküle sollten nicht toxisch, sondern biokompatibel sein. Ihre Elimination aus dem Körper kann durch direkte Ausscheidung oder durch Abbau ohne unerwünschte Nebeneffekte (Bioabbaubarkeit) erfolgen [Markovsky *et al.*, 2012]. Hydroxyethylstärke (HES) ist ein Beispiel für ein natürliches, auf Glukose basierendes Polymer, welches biokompatibel und bioabbaubar ist. Sie wird erfolgreich als Plasmaexpander eingesetzt [Boldt & Suttner, 2005]. Erste, das Verwendungsspektrum der HES erweiternde Untersuchungen als KM in der MRT sind publiziert worden [Besheer *et al.*, 2011].

1.5 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Monitoring von Tumorwachstum und -biologie sowie der Therapie humaner Xenograftmodelle in der Nacktmaus durch Multispektral-Fluoreszenz Imaging (msFI) verbessert werden. In diesen Modellen sollten ferner neue Kontrastmittel (KM) und mögliche Arzneiträgersysteme getestet werden.

Tiefrote Fluoreszenz

In Ergänzung zu den im Labor bereits etablierten grün und hellrot fluoreszierenden Tumorzellklonen sollten verschiedene CRC Zelllinien mit den tiefroten Fluoreszenzproteinen TurboFP635 und mPlum markiert werden, da diese aufgrund ihrer Spektraleigenschaften *in vivo* eine bessere, besonders in tiefen Gewebsschichten sensitivere Detektion und Quantifizierung ermöglichen könnten. Anschließend sollten die gewonnenen Klone *in vitro* und *in vivo* im Vergleich zu den Wildtypen charakterisiert werden. Wichtige zu überprüfende *in vitro* Eigenschaften waren neben der Morphologie vor allem Wachstum und Chemotherapieresistenz.

Nicht-invasives *in vivo* Multispektral-Fluoreszenz Imaging

Es sollte untersucht werden, durch welche Vorgehensweise mittels msFI die Xenografte in der Maus am besten sichtbar gemacht werden können. Darauf aufbauend sollte ein einfacher, robuster Ansatz gefunden werden, welcher eine Quantifizierung der Tumormasse mittels msFI sowohl bei Progression als auch bei therapiebedingter Regression/Stagnation ermöglicht. Eine Fehlerbetrachtung zur Bestimmung der Grenzen des Modells sollte erarbeitet werden. Hierzu sollten s. c. Xenografte verschiedener CRC Zelllinien unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung ausgewertet werden. Des Weiteren sollte ein erstes Imaging tiefrot fluoreszierender Tumore in tieferen Mauslokalisationen (z. B. i. p.) durchgeführt werden.

HES - Polymerdiagnostik und Modellarzneiträger

Als Alternative zur Visualisierung von Tumoren mittels Fluoreszenzproteinexpression sollte das hochmolekulare, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Polymer HES als KM im msFI eingesetzt werden. Für eine mögliche Anwendung der HES als Arzneistoffträger in der Tumorthherapie sollte am KM die Anreicherung im Tumor untersucht und damit das passive Tumortargeting der HES charakterisiert werden. Ergänzend dazu sollten erste Tests zur Trennung verschiedener Fluoreszenzsignale in einem Tier zum gleichen Zeitpunkt, also zur zeitgleichen, parallelen Erfassung unterschiedlicher Versuchstierparameter wie z. B. Tumorgöße und Modellarzneiträgerkonzentration, durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgeführt und die eingesetzten Methoden erläutert. Laborverbrauchsmaterialien wie Einmalpipetten, Zentrifugenröhrchen, Reaktionsgefäße usw. wurden von den Firmen Eppendorf, Hamburg, Deutschland, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland und VWR International, Darmstadt, Deutschland bezogen. Die nicht methodenspezifischen Geräte und Verbrauchsmaterialien entsprachen den üblichen Laborstandards und werden nicht gesondert aufgelistet.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Die verwendeten Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in der Tab. 2.1 zusammengestellt. Als CRC Modelllinien wurden DLD-1 und HT-29 genutzt, da beide als resistent für klassische Chemotherapeutika geführt werden und somit für Entwicklung und Beurteilung neuer Therapieansätze zur Überwindung bestehender Resistenzen besonders geeignet sind. Die H12.1 als TGCT Zelllinie wurde hingegen als sensitives, gut auf Chemotherapie ansprechendes Modell untersucht. Die 293T Zellen dienten als Verpackungszellen für die Produktion der infektiösen lentiviralen Partikel. Alle Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte kultiviert.

Tabelle 2.1: Die verwendeten Zelllinien.

Als Referenz dienen die Informationen der American Type Culture Collection (ATCC) und der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ).

Name	Ursprung	Verwendung	Nummer
DLD-1	humane CRC Zelllinie	Xenograftmodelle	CCL-221 TM
H12.1	humane TGCT Zelllinie	Xenograftmodelle	[Casper <i>et al.</i> , 1987]
HT-29	humane CRC Zelllinie	Xenograftmodelle	HTB-38 TM
293T	humane embryonale Nierenzelllinie	Lentivirusproduktion	ACC 635

2.1.2 Material

- Die Tumorzellen wurden in RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin und Phenolrot (Fa. PAA, Pasching, Österreich oder Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) sowie dem Zusatz von 10 % FCS (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1fach Penicillin/Streptomycin (P/S, 100fache Stammlösung der Fa. PAA) expandiert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde RPMI mit den genannten Zusätzen aber ohne Phenolrot (Fa. PAA) verwendet.
- Für die 293T Zellen zur Virusproduktion wurde DMEM (Fa. PAA) mit 10 % FCS (Fa. Biochrom) und 1fach P/S genutzt.
- Als CO₂-unabhängiger Puffer diente Dulbecco's PBS der Fa. PAA.
- Zum Ablösen adherenter Zellen diente einfaches Trypsin-EDTA (Fa. PAA).
- Die Zellkulturverbrauchsmaterialien (Schalen, Flaschen, Lochplatten, serologische Pipetten, Reaktionsgefäße usw.) der Fa. TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz wurden verwendet.

2.1.3 Mikroskopie

Für die Mikroskopie der Zellkulturen stand ein inverses Lichtmikroskop Typ Axiovert 40 CFL zur Verfügung. Für Fluoreszenzbeobachtungen wurde ein inverses Lichtmikroskop Axiovert 25 mit den Filtersätzen blau (BP 450-490, FT 510, LP 515) und grün (BP 546/12, FT 580, LP 590) genutzt. Histologische Präparate wurden am AxioLab Lichtmikroskop ausgewertet. Alle Komponenten stammen von der Fa. Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland. Des Weiteren wurde ein Biozero der Fa. Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland mit einem 4x PlanApo Objektiv für gering vergrößerte Übersichtsaufnahmen der histologischen Präparate genutzt.

2.2 Klonierung der RFP TurboFP635 und mPlum

2.2.1 Material

- Es wurden Restriktionsenzyme, deren Puffer sowie PCR Komponenten der Fa. Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland verwendet.
- Zur Gelisolation diente das Kit Perfectprep[®] Gel Cleanup Kit der Fa. Eppendorf.
- Zur Ligation wurde das Fast-Link[™] DNA Ligation Kit der Fa. Epicentre Biotechnologies, Madison, USA eingesetzt.
- Zur Transformation wurden kompetente DH5 α [™] *Escherichia coli* der Fa. Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland genutzt.

- Zur Isolierung der pDNA aus den *E. coli* Zellen diente das QIAprep Spin Miniprep Kit (Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland).
- Bei der Elektroporation der Tumorzellen kam das Amaxa[®] Cell Line Nucleofector[®] Kit V der Fa. Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland zum Einsatz.
- Als Medium zur Bakterienanzucht diente LB (10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton und 5 g/L Hefeextrakt) ggf. mit dem Zusatz von Ampicillin (f. c. 50 µg/mL). Für Platten wurden 15 g/L Agar Agar zugegeben.

2.2.2 Methoden

Das bereits in der Arbeitsgruppe etablierte lentivirale Transduktionssystem für Säugerzellen (siehe Abschnitt 2.3) sollte um die beiden RFP TurboFP635 und mPlum erweitert werden. Hierfür mussten zunächst beide codierende DNA-Abschnitte gewonnen werden (s. u.). Dann erfolgte die Ligation jedes Fragments in das mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI linearisierte Zielplasmid pFU-W mittels Kit nach Protokoll des Herstellers. Eingesetzt wurden 75 ng pFU-W und 20 ng TurboFP635 bzw. 17,7 ng mPlum (3facher Insertüberschuss) in 15 µL Gesamtvolumen (theoretische f. c. pDNA 5 ng/µL).

Es folgte die Transformation von kompetenten *Escherichia coli* mit 2 µL Ligationsansatz (theoretisch 10 ng Plasmid) nach modifiziertem Herstellerprotokoll. Ein Aliquot *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz dazugegeben und vorsichtig gemischt. Es folgte eine Inkubation für 5 min auf Eis, anschließend ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C, die Zugabe von 500 µL auf 37 °C vorgewärmtem LB Medium ohne Antibiotikum und eine weitere Inkubation für 1 h im Thermomixer bei 500 rpm. Danach wurde die Zellsuspension auf LB Platten mit Ampicillin zur Selektion verteilt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Am Folgetag wurden die Kolonien auf den Platten ausgezählt und für einzelne, ausgewählte Klone ein Verdünnungsausstrich zur Gewinnung von Einzelkolonien auf neuen LB + Amp Platten hergestellt und einen Tag bei 37 °C inkubiert. Aus den Einzelkolonien wurden 5 mL LB + Amp Flüssigkulturen über Nacht angesetzt, um Zellmasse für die Gewinnung der pDNA zu generieren. Mittels Kit wurde laut Protokoll des Herstellers die pDNA isoliert. Anschließend wurden für jeden Klon zwei Restriktionsverdau mit den Enzymen PstI in 1fach Puffer Orange bzw. XbaI in 1fach Tango-Puffer[™] 2 h bei 37 °C durchgeführt und mittels 1 % Agarosegel überprüft. Von korrekten Klonen wurden Glycerolgefrierkulturen angelegt und bei -80 °C gelagert.

Nach erfolgreichem Restriktionsverdau wurden die korrekten Plasmide mittels Amaxa-Elektroporation in die CRC Zelllinie DLD-1 gebracht und auf die Expression des jeweiligen RFP hin untersucht. Dazu wurden 2 Mio. Zellen in PBS gewaschen, in Puffer V resuspendiert und zu 2 bzw. 5 µg pDNA in die Elektroporationsküvette gegeben. Es folgte die Elektroporation mit Programm T20 im Nucleofector I (Fa. Lonza Cologne GmbH) und sofortige Überführung in auf 37 °C vorgewärmtes RPMI + 10 % FCS +

P/S mit anschließender Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Abschließend wurden am Folgetag die Zellen mikroskopiert und die rote Fluoreszenz bewertet.

Die Bestimmung der DNA-Konzentrationen für die Klonierungsexperimente erfolgte photometrisch am DU[®] 640 Spectrophotometer (Fa. Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Mit der Formel 2.1 wurden die Konzentrationen berechnet.

$$c = \frac{A_{260}}{0,02} \cdot f \quad (2.1)$$

c: Konzentration der DNA $\left[\frac{\mu g}{mL} \right]$

A₂₆₀: Absorption bei 260 nm

f: Verdünnungsfaktor

Für die Vorhersage der Restriktionsverdau, insbesondere für die Überprüfung von Fragmentanzahl und -längen der neu konstruierten Plasmide pFUKW und pFUPW bei Einsatz der genannten Restriktionsenzyme, wurde die Onlineresource NEBCutter V2.0 verwendet.

TurboFP635

Da es sich bei dem source Vektor für TurboFP635 (siehe Tab. 2.3) um einen C-terminalen Fusionsvektor ohne Stoppcodon handelte und eine N-terminale BamHI Schnittstelle fehlte, wurde die codierende DNA mittels PCR unter Verwendung von modifizierten Primern (siehe Tab. 2.2) gewonnen. Das Primerdesign erfolgte manuell unter zu Hilfenahme der Onlineresource Sequence Manipulation Suite 2 und dem dort zur Verfügung gestellten Tool PCR Primer Stats. In den forward Primer wurde eine BamHI und in den reverse Primer eine EcoRI Schnittstelle integriert, sodass der Einbau des TurboFP635 Gens in den Zielvektor pFU-W mittels sticky end Ligation erfolgen konnte. Die Sequenz des C-terminalen reverse Primers wurde zusätzlich so gewählt, dass in allen 3 Leserahmen ein Stoppcodon eingebaut wurde.

Für die PCR wurden 1 pg pTurboFP635-C, je 0,5 µM forward und reverse Primer, 0,2 mM dNTP und 0,5 U Taq-Polymerase in 1fach Taq-Puffer eingesetzt. Im Thermocycler wurde die DNA 5 min initial bei 94 °C denaturiert und anschließend in 30 Zyklen (30 s bei 94 °C Denaturierung, 30 s bei 65 °C Annealing sowie 60 s bei 72 °C Elongation) amplifiziert. Abschließend erfolgte ein finaler Elongationsschritt 5 min bei 72 °C und Abkühlung auf 4 °C.

Der PCR Ansatz wurde dann im 1 % Agarosegel aufgetrennt, die 756 bp Bande aus dem Gel herausgeschnitten und mittels Kit nach Protokollvorschrift des Herstellers isoliert. Es folgte die Generierung der sticky ends für die Ligation durch Doppelrestriktionsverdau mit BamHI und EcoRI in 2fach Tango-Puffer™ für 2 h bei 37 °C.

Tabelle 2.2: Die verwendeten PCR Primer.

Beide Primer wurden durch die Fa. Invitrogen GmbH synthetisiert.

Name	Sequenz	Beschreibung
f-TurboFP635-mod	5'-CATAGGATCCGGACCAT GGTGGGTGAGGATAGGA-3'	forward; BamHI Schnittstelle
r-TurboFP635-mod	5'-GACAGAATTCGTCAGCTAG TTAGATCTGAGTCCGGAGCT GTGC-3'	reverse; 3 Stoppcodons integriert; EcoRI Schnittstelle

Tabelle 2.3: Die verwendeten source Vektoren.

Der Vektor pTurboFP635-C wurde von der Fa. evrogen, Moskau, Russland und der Vektor pmPlum von der Fa. Clontech, Mountain View, USA geliefert.

Name	FP	wichtige Vektoreigenschaften
pTurboFP635-C	TurboFP635	Expressionsvektor für Säugerzellen (P_{CMVIE}) sowie C-terminaler Fusionsvektor 3'MCS inkl. BamHI und EcoRI Kanamycinresistenz
pmPlum	mPlum	Expressionsvektor für Bakterien (P_{lac}) 5'MCS inkl. BamHI 3'MCS inkl. EcoRI Ampicillinresistenz

mPlum

Die Isolierung des mPlum-Fragmentes erfolgte unter Verwendung der beiden vorhandenen MCS durch Restriktionsverdau von 5 µg pmPlum (siehe Tab. 2.3) mit je 10 U/µL BamHI und EcoRI in 2fach Tango-Puffer™. Im 1 % Agarosegel wurde das gewünschte 720 bp lange DNA-Fragment vom Restvektor getrennt. Anschließend wurde die Bande aus dem Gel herausgeschnitten und mittels Kit nach Herstellerprotokoll isoliert.

2.3 Gewinnung tiefrot fluoreszierender Zellklone

2.3.1 Material

- Für die Viruspelletierung wurden eine Sorvall Discovery 100SE Zentrifuge mit Rotor TH-641 der Fa. Thermo Fisher, Langenselbold, Deutschland verwendet.

2.3.2 Methoden

Die Herstellung infektiöser viraler Partikel erfolgte nach dem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll [Luetzkendorf, 2010]. Dabei wurden subkonfluente Zellen der Verpackungslinie 293T durch $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Präzipitation mit dem Expressionsplasmid pFUKW oder pFUPW, den zwei Verpackungsplasmiden pRSV-Rev und pMDLg/pRRE und dem für die virale Hülle codierenden pVSVG transformiert. Nach 48 h wurde der virushaltige Überstand abgenommen, über eine $0,45 \mu\text{m}$ PVDF-Membran filtriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für hohe Virustiter erfolgte eine Ultrazentrifugation des frischen Filtrats für 90 min bei $115.000 \times g$ und 4°C . Anschließend wurden die Viruspellets in PBS aufgenommen, aliquotiert, ebenfalls schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Transduktion der Tumorzellen erfolgte in 12- oder 24-Loch-Platten bei Subkonfluenz in RPMI + 10 % FCS + P/S und dem Zusatz von Polybrene (f. c. $8 \mu\text{g}/\text{mL}$) sowie Virus, wobei die zugegebene Virusmenge je nach Qualität der Viruspräparation variierte. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Nach weiteren 24 h wurde die Fluoreszenz im Mikroskop beurteilt. Waren rote Kolonien unterschiedlicher Intensität zu beobachten, wurden die Zellen trypsiniert, auf T25 Zellkulturflaschen gesetzt und inkubiert.

Bei Subkonfluenz wurden die Flaschen geerntet, ein Aliquot von 2 Mio. Zellen abgenommen und kryokonserviert. Die restlichen Zellen wurden für eine Klonierung mittels Verdünnungsschritten zur Zellvereinzellung (Limiting Dilution) aufgeteilt. Dabei wurden mehrere 96-Loch-Platten mit je $100 \mu\text{L}$ Medium und einer Zelle pro Loch (f. c. $10 \text{ Z}/\text{mL}$) beschickt. Anschließend wurden die Platten bei mehrfachem Mediumwechsel so lange inkubiert bis sich Kolonien aus den Einzelzellen gebildet hatten. Dies dauerte etwa 14 Tage. Es folgte ein Screening am Fluoreszenzmikroskop auf FP-Expression der Kolonien und eine erste, subjektive Klassifizierung hinsichtlich ihrer Helligkeit. Die hellsten Klone wurden ausgewählt, in 24-Loch-Platten gesetzt und expandiert. Sollte keine Einzelkolonie vorgelegen haben, wurde die Limiting Dilution als Subklonierung wiederholt, um tatsächlich reine Klone zu generieren. Gekennzeichnet sind diese Subklone durch Klonnummer. *Subklon-Ziffer* (z. B. DLD-1 FUKW 11.2).

Bei Erreichen ausreichender Zellzahlen wurden Gefrierkulturen angefertigt und die Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie am FACSCalibur™ bestimmt. Da bei diesen Analysen nicht alle Klone die gewünschte Intensität zeigten, wurde die Transduktion wiederholt mit (a) neuen Wildtypzellen und (b) als erneute Transduktion (Supertransduktion) des hellsten, bereits generierten Klons. Am Ende wurden die hellsten Klone für weitere *in vitro* Charakterisierungen ausgewählt.

2.4 In vitro Charakterisierung der CRC Klone

2.4.1 Material

- Für die Fluoreszenzintensitätsbestimmung der Einzelzellen wurden zwei Durchflusszytometer verwendet: ein FACSCalibur™ und ein LSR II Fortessa™ FlowCytometer (beide Fa. BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland). Das FACSCalibur™ verfügte über eine Extinktion mittels blauem Laser (488 nm / 10 nm). Die Detektion der RFP Emission erfolgte mittels 670 nm Langpassfilter im FL3 Kanal. Am LSR II wurde der gelbgrüne YG Laser (561 nm) zur Anregung genutzt. Die Detektion erfolgte mit dem 670 nm Langpassfilter.
- Benzonase® Nuclease (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde zur Entfernung der zellulären DNA in den Proteinproben eingesetzt.
- Bio-Rad Protein Assay Reagenz (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) wurde zur Quantifizierung der Proteine im Zelllysat genutzt.
- Die Chemikalien für die SDS-Page (Rotiphorese® Fertiggellösungen) wurden von der Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG bezogen. Eine Nitrocellulose Transfer Membrane der Fa. Whatman GmbH, Dassel, Deutschland, wurde verwendet. Die eingesetzten Antikörper fasst Tab. 2.4 zusammen. Das Substrat zum Nachweis der sekundären Antikörper war Roti®-Lumin (Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG).
- Der Farbstoff Sulforhodamin B (SRB, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurde zu 0,4 % in 1 % Essigsäure gelöst.

2.4.2 Methoden

Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden 24 h nach Plattierung trypsiniert, mit Dulbecco's PBS ohne Magnesium und Calcium (Fa. PAA) gewaschen und in selbigem zu einer f. c. von 1 Mio. Z/mL aufgenommen. Im Durchflusszytometer wurden dann 10000 Zellen analysiert. Als Referenz wurde stets ein nicht fluoreszierender Wildtyp mitgeführt, der auch zur Kontrolle des vitalen Gates verwendet wurde. Für die zeitliche Verfolgung der Fluoreszenzintensität wurden 6-Well-Platten für jeden Messzeitpunkt mit den Klonen sowie dem WT angesetzt. Bis zur Messung wurde das Medium nicht gewechselt. Nach 24/48/72/96 h Inkubation erfolgte die Analyse analog zur 24 h Messung.

Western Blot

Zur Analyse der RFP Expression wurden die Zellen 24 h nach Aussäen trypsiniert, mit PBS gewaschen und als trockenes Pellet bei -25 °C eingefroren. Die Lysierung der Zellen

Tabelle 2.4: Die verwendeten Antikörper für den Western Blot.

anti-RFP: erkennt DsRed und darauf basierende FP wie DsRed2 und mPlum, anti-tRFP: erkennt TurboFP635, f. c.: eingesetzte Endkonzentration.

Antikörper	Name	Firma	Ursprung	f. c. [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
primär	anti-RFP	Rockland Inc., Gilbertsville, USA	Kaninchen	0,10
	anti-tRFP	evrogen, Moskau, Russland	Kaninchen	0,10
	anti-Tubulin	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	Maus	0,02
sekundär	anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA	Ziege	0,16
	anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA	Ziege	0,16

erfolgte durch RIPA Puffer inkl. Protease-Inhibitor, Phenylmethylsulfonylfluorid und Dithiothreitol sowie Benzonase (f. c. 300 U/mL). Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis zur Spaltung der DNA. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben mittels Bradfordassay (Absorptionsmessung bei 595 nm) bestimmt. Die Auftrennung der Lysate erfolgte mittels SDS-Page auf einem 5 % Sammelgel mit anschließendem 12 % Trenngel. Pro Bahn wurde 1 μg Gesamtprotein mit Proteinladepuffer geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei konst. 200 V. Die anschließende Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran wurde mittels Semidry-Blot-Verfahren durchgeführt. Der Proteintransfer auf die Membran wurde mittels reversibler Ponceau S Färbung überprüft. Danach wurde die Membran an geeigneter Stelle geteilt, mit 5 % Trockenmilch in PBS mit Tween 80 (PBST) blockiert und anschließend mit den jeweiligen Primärantikörpern (siehe Tab. 2.4) gelöst in 5 % Trockenmilch (in PBST) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation mit sekundärem Antikörper (siehe Tab. 2.4) gelöst in PBST erfolgte nach wiederholtem Waschen für 1 h bei Raumtemperatur. Nach abschließendem Waschen wurden die Membranen mit Roti[®]-Lumin benetzt und in Folien fixiert. In der Dunkelkammer erfolgte die Röntgenfilmexposition mit verschiedenen Belichtungszeiten und final die Entwicklung der Filme, welche dann am Scanner zur Auswertung digitalisiert wurden.

SRB-Assay

Der von Skehan *et al.* [1990] entwickelte Assay basiert auf der unspezifischen Färbung zellulärer Proteine durch Bindung des Farbstoffs SRB im sauren Milieu. Nach Entfernung des verbliebenen freien Farbstoffes kann nach einer Resolubilisierung im alkalischen Milieu die Proteinmenge und damit die Zellzahl colorimetrisch quantifiziert werden.

Für die Wachstumskinetiken wurden die WT Zellen bzw. die Zellen der neu generierten, fluoreszierenden Klone mit jeweils 9 verschiedenen Zellzahlen (250 bis 4000 Z/Loch) pro Spalte in fünf 96-Loch-Platten eingesät und inkubiert. Nach 24/48/72/96/120 h wurde jeweils eine Platte mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) für mind. 2 h bei 4 °C fixiert. Vor der Färbung wurde die TCA abgenommen und die Platten fünfmal mit destilliertem Wasser im Plate Washer 96 PW (Fa. Tecan, Männedorf, Schweiz) gewaschen. Es folgte die Färbung mit SRB-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur. Durch fünfmaliges Spülen mit 1 % Essigsäure im Plate Washer 96 PW (Fa. Tecan) wurde die Farbstofflösung entfernt. Anschließend wurden die Platten bei Raumtemperatur mind. über Nacht luftgetrocknet. Die Vermessung der optischen Dichte als Maß für die Zellzahl erfolgte nach Solubilisierung des gebundenen SRB mit 100 µL 10 mM TRIS pro Loch bei 570 nm im Mikroplatten-Reader (SpectraFluor Plus, Fa. Tecan).

Für den Zytotoxizitätsassay zur Bestimmung der Chemotherapieresistenz wurde jeweils eine 96-Loch-Platte mit dem WT bzw. dem entsprechenden Zellklon zu einer Dichte, welche kontinuierliches Wachstum über 5 Tage in der unbehandelten Kontrolle erlaubt, eingesät. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und durch Medium mit Chemotherapeutikum bzw. bei der unbehandelten Kontrolle ohne Wirkstoff ersetzt, wobei jeweils eine Spalte (8 Löcher) eine bestimmte Konzentration erhielt. Die Konzentrationsbereiche der einzelnen Wirkstoffe waren wie folgt: Oxaliplatin sowie Irinotecan 0,01 bis 100 µM und 5-Fluorouracil 0,1 bis 1000 µM. Die Behandlung erfolgte für 96 h bei 37 °C. Am Tag 5 wurden die Platten mit 10 % TCA fixiert. Es folgten Färbung und Auswertung wie bei den Wachstumskinetiken.

Die Auswertung der gemessenen optischen Dichten erfolgte mittels der Tabellenkalkulationssoftware Excel[®] der Fa. Microsoft[®]. Dabei wurde jeweils für die 8 Einzelwerte einer 96-Loch-Platte-Spalte, entsprechend also einer spezifischen Startzellzahl bzw. einer definierten Chemotherapeutikakonzentration, der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und die Daten in Diagrammen grafisch aufbereitet. Für die Berechnung der Verdopplungszeiten t_d (siehe Formel 2.3) in der Wachstumskinetik wurden die Werte des exponentiellen Wachstums im halblogarithmischen Diagramm ausgewählt und mittels linearer Regression die entsprechenden Funktionen (siehe Formel 2.2) mit ihren Parametern ermittelt. Für die Ermittlung der IC50 bzw. IC90 der unterschiedlichen Chemotherapeutika wurden die auf die unbehandelte Kontrolle normierten, konzentrationsabhängigen Zellüberlebensraten von mind. drei verschiedenen Versuchen gemittelt und als Graph \pm Standardabweichung im halblogarithmischen Diagramm dargestellt. Die exakten IC50 bzw. IC90 Werte wurden für jeden Versuch einzeln mittels linearer Interpolation der benachbarten Messwerte ermittelt (Formeln 2.4). Abschließend wurden die Werte der Einzelversuche gemittelt und die S. D. berechnet.

Das exponentielle Wachstum: $N = f(t) = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$ (2.2)

N: Zellzahl

N_0 : Startzellzahl

μ : spezifische Wachstumsrate

t: Zeit

Die Verdopplungszeit: $2 \cdot N_0 = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t_d}$

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (2.3)$$

Die IC-Berechnung: $y = f(c) = m \cdot \lg(c) + n$

y: Zellüberlebensrate [%]

c: Zytostatikakonzentration

m: Anstieg im halblogarithmischen Diagramm

n: Verschiebung im halblogarithmischen Diagramm

$$m = \frac{y_2 - y_1}{\lg(x_2) - \lg(x_1)}$$

$$n = y_1 - m \cdot x_1$$

$$\lg(c) = (y - y_1) \cdot \frac{\lg(x_2) - \lg(x_1)}{y_2 - y_1} + x_1 \quad (2.4)$$

2.5 In vivo Charakterisierung der CRC Klone

2.5.1 In situ Vorversuche

Diese ersten Experimente sollten dazu dienen, geeignete Messprozeduren zu etablieren sowie die Software des Imagers und die möglichen Auswertungsvarianten zu testen.

Material

- Für die Kadaverexperimente wurden BALB/c Albino-Mäuse aus der Zucht des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland, genutzt.
- Um das Verlaufen der Zellpellets in den Reaktionsgefäßen zu minimieren, wurden sie mit farbloser, nicht fluoreszierender Vaseline überschichtet.

Methoden

Die Mäuse wurden zunächst durch eine Überdosis CO₂ getötet. Dann wurden die Tiere mit einem feinen Friseurhaarschneider gründlich an Bauch, Thorax und Flanken rasiert. Anschließend wurde der Rücken der Tiere eröffnet, wobei die Öffnung so klein wie nötig erfolgte. Die Reaktionsgefäße mit den entsprechenden Zellpellets wurden dann s. c., i. p. sowie im Thorax platziert und das Imaging durchgeführt (siehe Abschnitt 2.6).

2.5.2 Allgemeines zu den Tiermodellen

Die *in vivo* Charakterisierung der tiefrot fluoreszierenden CRC Klone umfasste verschiedene Xenograftmodelle (siehe Abschnitt 2.5.4). In jeder Studie wurde der Zustand der Tiere und das Wachstum der Tumore protokolliert. Als Parameter für die Tumormast dienten im s. c. Modell (a) die Berechnung des Tumolvolumens (Formel 2.5, [Tomayko & Reynolds, 1989]) sowie (b) die Fluoreszenzintensität aufgenommen mittels msFI (siehe Abschnitt 2.6). Für die Untersuchungen tiefer gelegener Xenografte war nur das Monitoring der Fluoreszenzentwicklung möglich. Die Messungen erfolgten mindestens zweimal wöchentlich.

$$\text{Das Tumolvolumen: } V = b^2 \cdot l \cdot \frac{\pi}{6} \quad (2.5)$$

V: Tumolvolumen

b: Tumorbreite als die kürzere Ellipsoiddimension

l: Tumurlänge als die größere Ellipsoiddimension

Nach Beendigung der Studie oder bei Erreichen der Abbruchkriterien wurden die Tiere getötet und eine Nekropsie vorgenommen. Die Tumore bzw. Organe mit fluoreszierenden Anteilen wurden explantiert, ggf. gewogen, *ex vivo* im Imager analysiert und anschließend in 5 % Formalin in PBS für mindestens 24 h fixiert. Es folgte die automatisierte Dehydratation der Proben und ihre Einbettung in Paraffin als Gewebeblöcke durchgeführt im Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I.

2.5.3 Material

- Verwendet wurden für alle Xenograftuntersuchungen immundefiziente, athymische Nacktmäuse der Stämme HsdCpb:NMRI-*Foxn1^{nu}* und Hsd:Athymic Nude-*Foxn1^{nu}* (Fa. Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland).
- Zur Injektion für s. c. und i. p. Modelle wurden Tuberkulinspritzen mit 27 G Kanülen genutzt (Fa. BD Medical, Heidelberg, Deutschland). Für die i. v. Applikation wurden 1 mL Spritzen mit 30 G Kanülen verwendet (beides Fa. B. Braun AG, Melsungen, Deutschland).

Tabelle 2.5: Die verwendeten Antikörper für die Immunhistochemie.
f. c.: eingesetzte Endkonzentration in der IHC.

Antikörper	Name	Firma	Ursprung	f. c. [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
primär	anti-RFP	Rockland Inc.	Kaninchen	0,10
	anti-tRFP	evrogen	Kaninchen	0,10
sekundär	anti-rabbit IgG-Biotin	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Ziege	0,50
Verstärker	Streptavidin- HRP-Konjugat	Dako Deutschland GmbH	—	0,50

- Als Xylolersatz wurde Roti[®]-Histol eingesetzt (Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG). Zum Eindeckeln wurde Roti[®]-Histokitt genutzt, ebenfalls Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG.
- Zur Übersichtsfärbung wurden (a) die ready-to-use Dako REAL[™] Hämatoxylinlösung der Fa. Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, und (b) eine wässrige 1 % Eosinlösung verwendet. Letztere wurde für den Einsatz 1:10 verdünnt und mit einem Tropfen konz. Essigsäure angesäuert.
- Die Lösungen für die Immunhistochemie (Antigen-Retrieval, Peroxidaseblock, Avidinblock, Biotinblock und Substrat-Chromogen-Mischung: DAB System) der Fa. Dako Deutschland GmbH wurden genutzt.

2.5.4 Methoden

Für alle Xenograftmodelle wurden die Tumorzellen in benötigter Zellzahl angezogen (siehe Abschnitt 2.1), mittels Trypsinierung geerntet, in PBS gewaschen und für die einzelnen Injektionen aliquotiert.

Subkutanes Xenograftmodell

In die Flanken der Mäuse wurden 3 bis 5 Mio. Zellen in 150 μL PBS s. c. injiziert. Die Zellapplikation erfolgte unter Kurznarkose mit Isofluran. Besonderes Augenmerk galt der korrekten Platzierung der Nadel zwischen Haut und Muskulatur, was nach der Injektion anhand der gebildeten Flüssigkeitsblase kontrolliert wurde.

Intraperitoneales Xenograftmodell

Drei Mio. Zellen des Klones DLD-1 FUKW 5 wurden in 20 μL Matrigel aufgenommen und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Das Matrigel[™] diente neben seiner wachs-

tumsfördernden Wirkung als Geliermittel und sollte das freie Verlaufen der Zellsuspension im Bauchraum begrenzen. Für die Untersuchungen mit DLD-1 FUKW 2 und FUPW 3 wurden 1 Mio. Zellen in 150 μ L PBS genutzt. Den Versuchstieren mit HT-29 Klonen wurden 1 Mio. Zellen in 150 μ L PBS injiziert. Die Applikation erfolgte unter Kurznarkose mit Isofluran. Für die Lokalisierung der Tumorherde im Bauchraum wurde die Kanüle in die unteren Hälfte des Peritoneums geschoben und die Zellsuspension langsam appliziert. Bei Applikation in das Zielorgan Leber wurde die Kanüle im rechten, oberen Quadranten im durch die Bauchdecke sichtbaren, mittleren Leberlappen platziert. Die Positionskontrolle erfolgte durch vorsichtiges Anheben der Spritze und damit der Leber. Bei korrekter Lage der Kanüle wurde anschließend langsam injiziert.

Systemisches Xenograftmodell

Um zirkulierende Tumorzellen zu simulieren, wurden 3 Mio. Zellen des Klones DLD-1 FUKW 5 bzw. 1 Mio. Zellen der HT-29 Klone FUKW 11 und FUPW 11 in eine der lateralen Schwanzvenen der Mäuse injiziert. Die Tiere wurden dazu nicht betäubt, sondern nur in einer mechanischen Fixierungseinheit arretiert.

Histologische Analysen

Für die vergleichenden Analysen der Organe, des Tumoraufbaus und der entsprechenden Feinstrukturen wurden am Mikrotom 4 μ m dicke Gewebsschnitte der Paraffinblöcke angefertigt und nach Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung (HE) histologisch analysiert. Die Färbung erfolgte unter Verwendung des etablierten Standardprotokolls. In Kürze: Deparaffinierung in absteigender Alkoholreihe (je 5 min in Roti[®]-Histol/Roti[®]-Histol/Isopropanol/96 % Ethanol/80 % Ethanol/70 % Ethanol/50 % Ethanol/bidest. Aqua), gefolgt von 30 s Hämatoxylin und zweimal 5 min Bläuen in Leitungswasser. Anschließend erfolgte die Eosinfärbung für 5 min, 2 min Waschen in bidest. Aqua und die aufsteigende Alkoholreihe bis zum Roti[®]-Histol. Abschließend erfolgte das Eindeckeln in Roti[®]-Histokitt.

Immunhistologie der Paraffinschnitte

Die Paraffinschnitte wurden nach einstündiger Inkubation bei 50 °C in einer absteigenden Alkoholreihe wie oben beschrieben deparaffiniert. Es folgte eine Antigenrückgewinnung in Antigen-Retrieval Lösung pH 6,1 für 30 min bei 95 °C im Wasserbad. Nach Abkühlung der Objektträger und Waschen mit PBS sowie kurzem Tauchen in bidest. Wasser folgte der Peroxidaseblock in der feuchten Kammer für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde nach Spülung mit bidest. Wasser und Waschen in PBS die Avidinblockierung für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Als nächster Schritt nach dreimaligem Waschen in PBS folgte die Biotinblockierung ebenfalls für 15 min bei Raumtemperatur. Im letzten Blockierungsschritt nach erneutem dreimaligen Waschen in PBS wurden die

Proteine bei Raumtemperatur für 20 min mit 3 % Albuminlösung (Bovine Serum Albumin Fraktion V in PBS) abgedeckt. Nach kurzer Spülung mit 1 % Albuminlösung folgte die Inkubation mit Primärantikörperverdünnung in 1 % Albuminlösung (Konz. siehe Tab. 2.5) für 3 h bei Raumtemperatur. Ein Schnitt pro Objektträger wurde als Kontrolle nur mit 1 % Albuminlösung ohne Antikörper inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit PBS und Lagerung in PBS bei 4 °C über Nacht. Nach einmaliger Spülung in PBS bei Raumtemperatur (ca. 15 min) folgte die Behandlung mit Sekundärantikörperlösung (in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur. Auf erneutes Waschen mit PBS folgte die Inkubation der Schnitte mit dem Verstärker Streptavidin-HRP-Konjugat für 30 min bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurde wiederholt mit PBS gewaschen und die Substrat-Chromogen-Mischung aufgetropft. Diese wirkte für 5 min bei Raumtemperatur ein und anschließend wurde mit bidest. Aqua gewaschen. Zum Schluss erfolgte eine Kernfärbung mit Hämatoxylin für 30 s und Bläuen in Leitungswasser für zweimal 5 min. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe konnten die Objektträger aus dem Roti[®]-Histol entnommen und in Roti[®]-Histokitt eingedeckelt werden.

2.6 Multispektral-Fluoreszenzimagining

2.6.1 Material und Einstellungen

Für das nicht-invasive msFI wurde ein Maestro[™] *in vivo* Fluorescence Imaging System (Fa. CRi, Woburn, USA; siehe Abb. 2.1) mit der Maestro[™] Software Version 2p22 bzw. dem Update 2.4.3 und für die Funktion compare images die Version 2.10.0 verwendet.

In dieser Arbeit wurden vier Filtersätze mit festen Einstellungen genutzt. Diese sind in Tab. 2.6 zusammengefasst. Für eGFP wurde der blaue, für DsRed2 der blaue und grüne, für TurboFP635 und mPlum der gelbe Filtersatz und die entsprechenden Einstellungen genutzt. Der Infrarotfiltersatz kam bei der NIR-HES zum Einsatz.

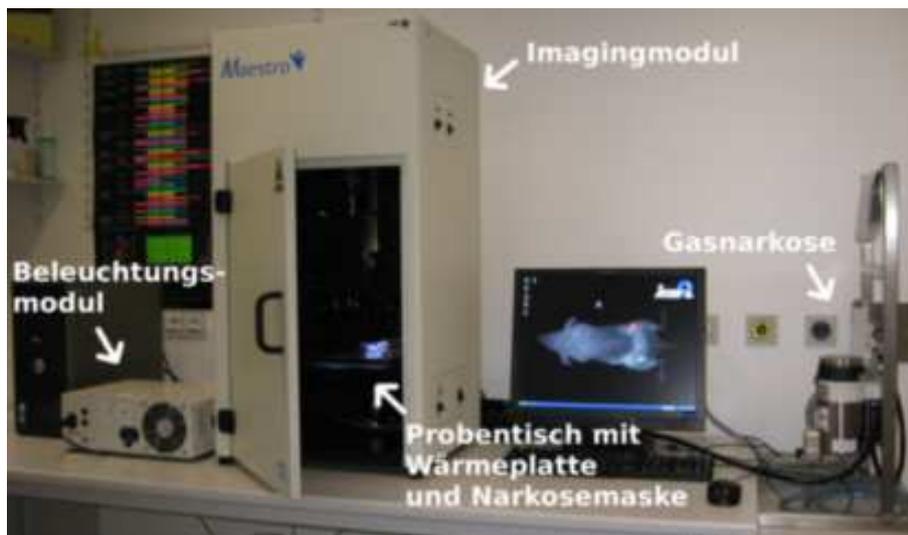
Die Probenstichhöhe und Lampenposition wurden je nach zu untersuchender Probe optimal gewählt. Für Mauseaufnahmen ist dies Stufe 1C mit einer Lampenposition 2, da hier die komplette Maus erfasst und gut ausgeleuchtet wird. Tubes und Platten wurden bei verschiedenen Imager-Konfigurationen aufgenommen, aber immer so, dass der relevante Bereich gut ausgeleuchtet und zentral positioniert war. Das Binning, eine interne Signalverstärkung, wurde 2 x 2 gesetzt, was ein Optimum zwischen Auflösung einerseits und Belichtungszeit andererseits darstellt und zu Cubes mit einer Bildgröße von 696 x 520 Pixeln führt.

Nach der Positionierung der Probe im Imager wurde unter Weißlicht fokussiert und ggf. ein Graustufenfoto aufgenommen mit festen Belichtungszeiten: 10 ms für den blauen und grünen Filtersatz sowie 30 ms für den gelben. Danach wurde auf Anregungslicht umgeschaltet und die optimale Belichtungszeit automatisch gemessen. Die Aufnahme der spektralen Daten in einem Cube erfolgte, soweit nicht anders angegeben, bei dieser automatischen Belichtungszeit gerundet auf die größte Ganzzahl [ms] ohne Überbelichtung.

Tabelle 2.6: Die Übersicht der verwendeten Filtersätze.

Es wird immer ein Schmalbandanregungsfilter mit einem Emissionslangpassfilter (LP) kombiniert und über einen Flüssigkristallfilter das nm-genaue Abtasten des aufgenommenen Wellenlängenbereichs realisiert.

Name	Abk.	Anregungsfilter	Emissionsfilter	Aufnahmebedingungen
blau	bl	445 - 490 nm	515 nm LP	500 - 720 nm, 10 nm Schritte
grün	gr	503 - 555 nm	580 nm LP	550 - 800 nm, 10 nm Schritte
gelb	ye	575 - 605 nm	645 nm LP	630 - 850 nm, 10 nm Schritte
nahes Infrarot	NIR	710 - 760 nm	800 nm LP	780 - 950 nm, 10 nm Schritte

Abbildung 2.1: Das Maestro™ *in vivo* Fluorescence Imaging System.

Imagingmodul: der bewegliche Probentisch mit Wärmeplatte und Beatmungsmaske sowie Abluftabsaugung, das Emissionsfilter, das Flüssigkristallfilter sowie die CCD Kamera; Beleuchtungsmodul: eine Xenonlampe, das Extinktionsfilter und zum Imager führende Glasfaserkabel; Gasnarkose: ein Isofluranverdampfer mit O₂-Anschluss.

Narkose beim *in vivo* Imaging

Für die Bildgebung mussten die Mäuse narkotisiert werden. Zu Beginn der Arbeit erfolgte dies mittels Injektionsnarkose. Es wurden i. p. 75 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketavet der Fa. Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 5 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun der Fa. Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) in 0,9 % NaCl Lösung injiziert. Später wurde ein Isoflurangasnarkosesystem (Fa. Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) eingesetzt. Der Sauerstoffvolumenstrom betrug zwischen 2 und 3 L/min. Initial wurde mit 2,5 % Isofluran gearbeitet, um die Mäuse zu betäuben. Die Erhaltung der Narkose erfolgte bei Isoflurankonzentrationen zwischen 0,8 und 2,0 %, je nach Dauer und Tiefe der Narkose sowie abhängig vom Zustand des Tieres. Während der Aufnahmen lagen die Tiere auf einer schwarzen, nicht fluoreszierenden Wärmeplatte bei 35 °C, so dass ein Auskühlen vermieden wurde.

2.6.2 Methoden

Die Besonderheit des msFI besteht darin, in einer Probe die Signale verschiedene Fluorophore sowie der Autofluoreszenz anhand ihrer spezifischen Spektren voneinander zu trennen. Wichtig ist neben dem Schmalbandanregungsfilter die Kombination des passenden Langpassemissionsfilters mit einem abstimmbaren Flüssigkristallfilter, welche Aufnahmen einer Probe bei vielen verschiedenen, aber definierten Wellenlängen ermöglicht. In einem Cube werden diese Einzelaufnahmen kombiniert. Mit der Maestro™ Software lassen sich anschließend einzelne Fluoreszenzsignale isolieren [Mansfield *et al.*, 2005a,b,c].

Unmixing

Unter Unmixing versteht man die Auftrennung des Cubes in seine einzelnen Fluoreszenzsignale unter Verwendung von spectral libraries (siehe Abb. 2.2). In diesen Bibliotheken werden die emittierten Referenzspektren der untersuchten Fluorophore und die entsprechende Autofluoreszenz der Kontrolle hinterlegt. Die in dieser Arbeit verwendeten Spektren der FP wurden aus s. c. injizierten Zellen in der Nacktmaus isoliert. Es wurde (a) für das Mischspektrum aus FP und Autofluoreszenz die Region des Zellpellets ausgewählt sowie (b) ein größerer Bereich der Maushaut ohne Tumorzellkontakt als Autofluoreszenz markiert. Aus dem Mischspektrum und der Autofluoreszenz wurde mittels manual compute das reine FP Spektrum gewonnen (siehe Abb. 6.1) und zusammen mit dem Autofluoreszenzspektrum und dem Spektrum des Hintergrundsignals gespeichert. Für die fluoreszenzmarkierte HES wurden *in vitro* Spektren aus den jeweiligen Stammlösungen isoliert. Die so gewonnenen Bibliotheken wurden für jede Filtereinstellung generiert und gespeichert, um die aufgenommenen Cubes mit dem selben, jeweils passenden spektralen Datensatz analysieren zu können. Das Unmixing Ergebnis ist ein 12-bit Graustufenbild für jedes Fluoreszenzsignal, das als Bild exportiert sowie für Quantifizierungen (measure panel) oder die compare image Funktion genutzt werden kann.

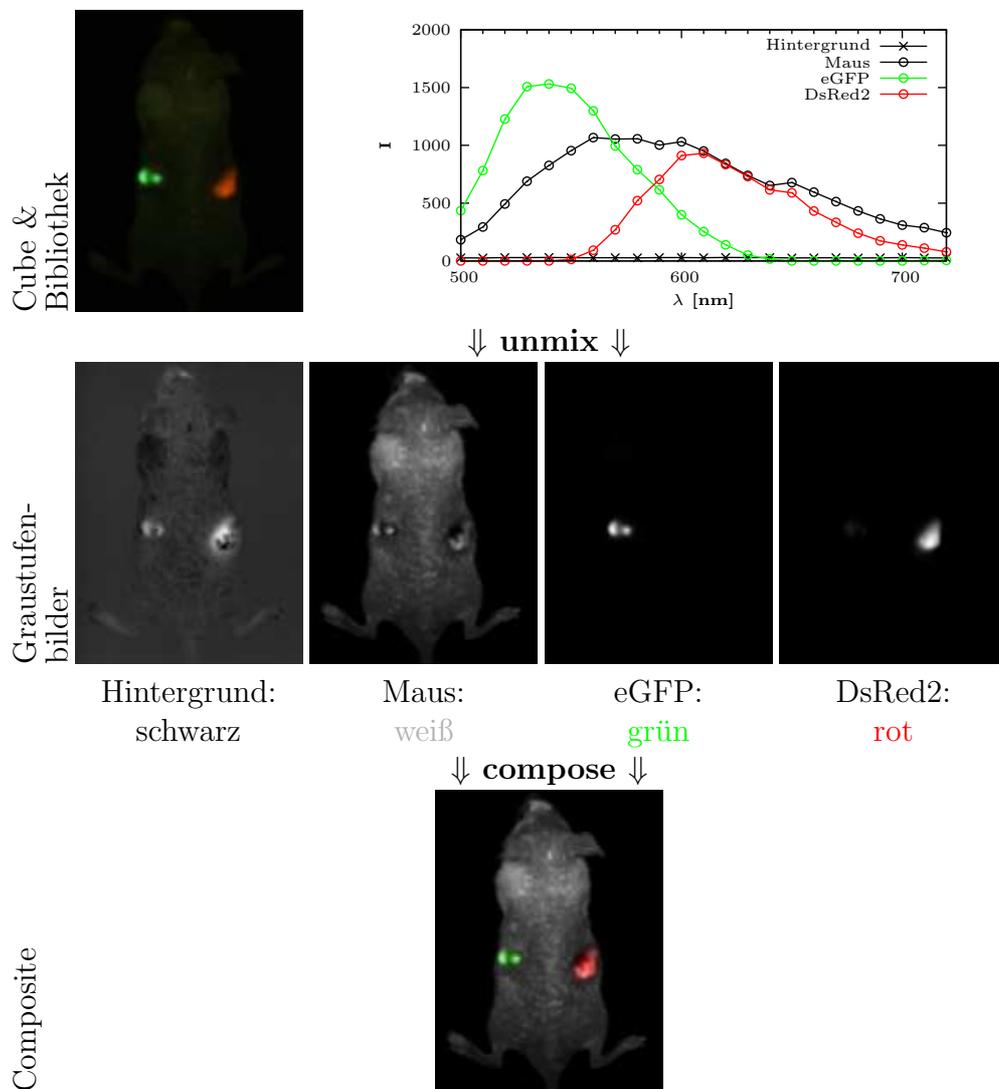


Abbildung 2.2: Das Unmixing am Maestro™ *in vivo* Fluorescence Imaging System.

Der aufgenommene Cube wird anhand der gespeicherten Spektren aus der spectral library in die Einzelsignale Hintergrund (schwarz = nicht fluoreszent), Autofluoreszenz der Maus (weiß), eGFP exprimierenden Tumor (grün) und DsRed2 exprimierenden Tumor (rot) aufgetrennt (unmix). Zudem wird ein zusammengesetztes Bild mit den für die Spektren definierten Farben generiert (compose).

Quantifizierung

Mit der Maestro™ Software können über das measure panel verschiedene Quantifizierungen durchgeführt werden. Dabei kann das isolierte Signal der kompletten Bildfläche oder einer region of interest (ROI) analysiert werden. Letztere kann manuell oder über die Festlegung eines Grenzwertes (threshold, TH, Mindestpixelintensität für das Fluoreszenzsignal) abgegrenzt und platziert werden. Als Quantifizierungsparameter stehen maximale, mittlere und Gesamtintensitäten zur Verfügung. Bei Auswahl einer ROI ist es zusätzlich möglich, deren Lokalisierung und Ausdehnung zu bestimmen.

Ziel der in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen ist es, die Bestimmung und die Verfolgung der Tumorlast eines Tieres über msFI zu etablieren. Dies erfordert die Quantifizierung der 2D-Projektion eines Fluoreszenzsignales in einem dynamischen *in vivo* System, bei dem Intensität, Position und Ausdehnung sowie Signaldichte von Messung zu Messung variieren. Einflussfaktoren sind unter anderem das Wachstum des Tumors, die Bildung von Nekrosen, die Infiltration muriner nicht fluoreszierender Tumorstromazellen oder die Lokalisierung des Tumorherdes in der Maus (z. B. s. c. oder i. p.). Aufgrund dieser hohen Variabilität muss ein robuster Parameter für die Quantifizierung herangezogen werden: die auf die Belichtungszeit normierte Gesamtintensität I des kompletten Bildes, also die Summe aller einzelnen Pixelsignale [ms^{-1}], ohne Selektion einer ROI. In ersten Tests wurde diese Festlegung durch (a) eine Auswertung mittels ROI Selektion durch einen Grenzwert von 200 (I_{TH200}) sowie (b) die maximale Intensität des Gesamtbildes (I_{max}) überprüft.

Um die Korrelation zwischen dem Tumolvolumen und dem Fluoreszenzsignal mit dem Potenzansatz zu überprüfen, wurden die Daten in log-log-Plots als Funktion $I = f(V) = A \cdot V^B$ dargestellt. Die Parameter A und B wurden mittels linearer Regression ($\ln(I); \ln(V)$) bestimmt und das Bestimmtheitsmaß als R^2 (quadrierter Pearsonscher Korrelationskoeffizient für $\ln(I); \ln(V)$) für die Güte der Regression ausgegeben.

Bildbearbeitung und Software

Am Imager wurden neben den einfachen Graustufenaufnahmen zur Mausübersicht auch die Bilder der Fluoreszenzsignale aus den Cubes generiert (siehe Abschnitt Unmixing). Diese wurden mit der compare image Funktion in ein intensitätsgewichtetes Pseudofarbbild, ein sogenanntes Compare Image, mit der Skalierung jetblack im clip & stretch Modus umgewandelt. Diese Farbskala ermöglicht eine für das menschliche Auge kontrastoptimierte Darstellung der Fluoreszenzintensität normiert auf das maximale Signal der vergleichend untersuchten Bilder. Dadurch werden dynamische Prozesse besser verdeutlicht als durch reine Graustufenbildserien. Die Compare Images wurden als Bild exportiert. Mittels Bildschirmfoto wurde die jeweilige Referenzfarbskala des Bildes mit dem stärksten Fluoreszenzsignal gespeichert.

Zur Bildbearbeitung wurden zwei Programme in der jeweils aktuellsten Version verwendet: (a) ImageMagick (www.imagemagick.org) und (b) GNU Image Manipulation

Program (GIMP, <http://www.gimp.org/>). Mittels ImageMagick wurden Konvertierungen, Drehungen, Skalierungen usw. durchgeführt. Das GIMP wurde genutzt, um Overlays aus Graustufenfoto und Compare Image zu erzeugen. Hierzu wurde die Graustufenaufnahme geöffnet, das entsprechende Compare Image als Ebene geladen und in dieser Ebene die Farbe Schwarz, welche einer Fluoreszenzintensität von Null entspricht, als transparent gesetzt. Abschließend wurden die Ebenen vereinigt und als TIFF mit dem verlustfreien Lempel-Ziv-Welch-Algorithmus komprimiert und gespeichert.

2.7 Kontrastmittel und Modellarzneiträger NIR-HES

2.7.1 Material

- Die kovalent mit dem NIR-Farbstoff IRDye[®] 800CW (Fa. LI-COR[®], Lincoln, USA) markierte HES (NIR-HES) wurde freundlicherweise von Herrn Dipl. Pharm. Stefan Hoffmann als Lyophilisat zur Verfügung gestellt. Die Herstellung findet sich bei Schädlich *et al.* [2012] und basiert auf einer Abwandlung der von Besheer *et al.* [2009] publizierten Methodik. Es wurden zwei HES mit unterschiedlicher molekularer Masse untersucht: (a) HES 200 mit dem mittleren Molekulgewicht von 200 kDa und einem Substitutionsgrad von 0,5 Hydroxyethylgruppen pro Glukosemolekül und (b) HES 450 mit dem mittleren Molekulgewicht von 450 kDa und einem Substitutionsgrad von 0,7 Hydroxyethylgruppen pro Glukosemolekül.
- Als niedermolekulare Kontrolle diente der inaktivierte NHS-Ester des IRDye[®] 800CW (Fa. LI-COR[®]).
- Für die Sterilfiltration wurden 1 mL Spritzen mit Luer-Lok[™] Spitze (Fa. BD Medical) und Millex[®]-GV Sterilfilter mit einem Durchmesser von 4 mm und einer PVDF Membran der Porengröße 0,22 µm (Fa. Millipore, Carrigtwohill, Irland) verwendet.
- Für die i. v. Applikation der Lösung wurden Microlance 30Gx1/2" Kanülen genutzt (Fa. BD Medical).

2.7.2 Methoden

Die NIR-HES wurde in 0,9 % NaCl Lösung aufgenommen ($c = 10$ oder 20 mg/mL), anschließend sterilfiltriert und in Aliquots abgefüllt. Eine Lagerung dieser Lösung erfolgte bei -20 °C. Zur i. v. Injektion in eine der lateralen Schwanzvenen wurden die Mäuse in einer mechanischen Fixierungseinheit arretiert und nicht betäubt. Die Dosis pro Tier betrug 1 mg Polymer (Injektionsvolumen 50 bzw. 100 µL). Vom niedermolekulare Farbstoff IRDye[®] 800CW wurden 50 µL einer 0,1 mg/mL Lösung in 0,9 % NaCl Lösung injiziert. Das ist eine Dosis von 5 µg/Tier und entspricht der Farbstoffmenge, die theoretisch an das Polymer gekoppelt wurde.

Als Maß für die Akkumulation der NIR-HES im Tumor wurde der Tumorakkumulationswert nach Hoffmann *et al.* [2012] bestimmt (tumor accumulation value, TAV, siehe Formel 2.6). Die Tumorfläche A_{Tumor} wurde aus dem Tumorfluoreszenzsignal ermittelt und umfasste alle Bildpunkte mit einer Intensität größer 0 ($TH > 0,01$), die über dem Hintergrundsignal lagen. Die Fläche der Maus A_{Maus} wurde aus dem Autofluoreszenzsignal der Haut analog zur Tumorfläche mittels $TH > 0,01$ ausgewählt. Die so definierten Flächen wurden gespeichert und ihre Größen notiert. Für die Bestimmung der jeweiligen Intensitäten I_{Tumor} bzw. I_{Maus} wurden die gespeicherten Flächen in das isolierte NIR-HES Signal importiert und die jeweiligen Werte ausgelesen.

Die Tumorakkumulation:
$$TAV = \frac{I_{Tumor} \cdot (A_{Maus} - A_{Tumor})}{A_{Tumor} \cdot (I_{Maus} - I_{Tumor})} \quad (2.6)$$

A: Fläche [pixel]
I: normierte Gesamtfluoreszenzintensität [ms^{-1}]

2.8 Software

Diese Arbeit wurde mit $\text{\LaTeX} 2_{\epsilon}$ geschrieben. Die Graphen wurden mit Gnuplot 4 erstellt und über das Ausgabedateiformat (Terminal) pslatex in die Arbeit eingebunden. Die Literaturverwaltung erfolgte mittels Bibus. Zitierte Quellen wurden über $\text{BIB}\text{\TeX}$ eingefügt.

Für Berechnungen wie Mittelwerte oder empirische Standardabweichungen sowie die Ermittlung der angepassten Potenzfunktionen wurde, sofern nicht anders im Methodenteil beschrieben, Open Office Calc genutzt. Für die weitergehenden statistischen Analysen (u. a. Tests auf Abhängigkeiten mittels linearer Modelle) sowie deren graphischer Darstellung wurde PASW Statistics 18 der Fa. IBM verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Gewinnung und Charakterisierung tiefrot fluoreszierender Tumorzellen

In der Arbeitsgruppe konnten mittels lentiviraler Transduktion erfolgreich verschiedene Tumorzelllinien mit dem grünen eGFP und dem orange-hellroten DsRed2 versehen werden. Diese Klone sind für *in vitro* Versuche sowie s. c. Xenograftstudien sehr gut geeignet, stoßen allerdings vor allem aufgrund der relativ kurzwelligen Extinktionsspektren im orthotopen oder Metastasierungsmodell an ihre Grenzen, da hier Tumorherde im Tierinneren nachgewiesen werden sollen. Aus diesem Grund sollten weitere Tumorzellklone etabliert werden, die stabil ein tiefrotes Fluoreszenzprotein, entweder TurboFP635 oder mPlum, exprimieren. Diese waren dann *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren. Insbesondere sollte ihr Potential für das orthotope bzw. Metastasierungsmodell ermittelt werden.

3.1.1 Gewinnung der Klone

Klonierung der codierenden DNA von TurboFP635 und mPlum

Aus beiden source Vektoren (siehe Tab. 2.3) konnten die cDNAs für die FP TurboFP635 und mPlum gewonnen werden. Sie wurden in das pFU-W des lentiviralen Klonierungssystems wie im Folgenden beschrieben zur Herstellung von pFUKW (überträgt die cDNA für TurboFP635) und pFUPW (überträgt die cDNA für mPlum) kloniert.

Für TurboFP635 kam eine PCR mit modifizierten Primern zur Amplifikation des codierenden DNA-Abschnittes auf pTurboFP635-C zum Einsatz. Das entsprechende Fragment von 756 bp Länge konnte angereichert und aus dem Gel isoliert werden. Das Kontrollgel mit 2 μ L der Ansätze ist in Abb. 6.2 im Anhang dargestellt. Die anschließenden zwei parallelen Ligationsansätze lieferten 586 bzw. 615 Kolonien, von denen jeweils vier zufällig ausgewählte Klone genauer untersucht wurden. Die isolierte pDNA wurde Kontrollrestriktionsverdau mit PstI und XbaI unterzogen. Die Ergebnisse sind der Abb. 6.3 im Anhang zu entnehmen. Ein *E. coli* Klon (Spur A) entsprach dem geplanten Konstrukt für pFUKW. Er zeigte zwei Banden bei PstI Restriktionsverdau (8557 bp und 1374 bp) sowie eine Linearisierung für den Restriktionsverdau mit XbaI. Daher wurde dieser Klon für die Produktion von pFUKW verwendet.

Bei pmPlum genügte ein Restriktionsdoppelverdau, um das gewünschte cDNA-Fragment zu gewinnen. Die Ausbeute an Transformanten nach der Ligation war 251 Kolonien. Sieben davon wurden für einen Verdünnungsausstrich zur Plasmidkontrolle genutzt. Das Ergebnis des Restriktionsverdaus zeigt Abb. 6.4 im Anhang. Für ein korrektes pFUPW sollten beim Restriktionsverdau mit PstI drei Fragmente bei 8098 bp, 1374 bp und 428 bp vorhanden sein, beim Restriktionsverdau mit XbaI zwei bei 9132 bp und 768 bp. Letzteres trifft auf drei *E. coli* Klone (Spuren B, C und F) zu. Die Klone C und F aber zeigten im PstI-Restriktionsverdau eine Zusatzbande bei ca. 1800 bp, die nicht zu erwarten war. Aus diesem Grund wurde für die Gewinnung von pFUPW der Klon B genutzt.

Lentivirale Transduktion und Etablierung stabil fluoreszierender Klone

Unter Verwendung des im Labor etablierten lentiviralen Transduktionssystems konnten die CRC Zelllinien DLD-1 und HT-29 mit TurboFP635 oder mPlum markiert werden. Hierfür wurden zunächst in 293T Zellen infektiöse Viruspartikel produziert, welche die genetische Information für die FP nach der Transduktion auf die CRC Zellen stabil mittels Integration ins Zielzellgenom übertragen. Durch den verwendeten Ubiquitinpromotor werden die FP konstitutiv überexprimiert und können daher als Tracer genutzt werden.

Die Virusproduktion in der Verpackungszelllinie 293T war unterschiedlich effizient. Nachdem der virushaltige Überstand abgenommen worden war, erfolgte eine Kontrolle der noch an der Zellkulturschale haftenden 293T Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop, um den zu erwartenden Virustiter und damit die Virusausbeute abschätzen zu können. Bei sehr erfolgreicher Transduktion konnten zahlreiche rote Punkte beobachtet werden. Dies ließ auf hohe Titer schließen, da viele 293T Zellen DNA-Aggregate aufgenommen hatten und rot fluoreszierten. In diesem Fall wurde direkt der filtrierte Überstand genutzt und auf eine Ultrazentrifugation verzichtet.

Die Transduktion der CRC Zelllinien erfolgte unter Subkonfluenz, da einerseits die Zellen nicht zu dicht sein durften, um die Inkubationszeit ohne Schaden zu überstehen, und andererseits die Lücken zwischen den Zellen gering sein sollten, da die Viruspartikel nicht aktiv zu ihren Zielzellen wandern. Die Transduktionseffizienz wurde nach 48 h unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt: Zeigte sich eine Mischpopulation mit verschieden intensiv fluoreszierenden Kolonien, wurden Verdünnungsschritte zur Zellvereinzelung (Limiting Dilution) vorbereitet.

Bei den verwendeten CRC Zelllinien konnte eine Limiting Dilution als Klonierungsmethode gut genutzt werden, da die Zellen unempfindlich gegenüber geringen Zelldichten waren und auch als Einzelzelle zur Kolonie heranwachsen konnten. Es wurden mehrere 96-Loch-Platten der Mischpopulationen mit einer Zelle pro Well angesetzt. Beim Durchsuchen der Platten wurden Kolonien mit starker Fluoreszenzintensität ausgewählt und diese Klone vermehrt. Sollte wie z. B. im Falle der DLD-1 FUKW 11.2 keine Einzelkolonie vorgelegen haben, erfolgte eine Subklonierung mittels erneuter Limiting Dilution, um die Klone voneinander zu trennen.

Die Klonierung verlief insgesamt erfolgreich, da viele Klone für die weiteren Untersuchungen gewonnen werden konnten. Festzuhalten ist allerdings, dass mehrere Virusproduktionen sowie mehrere Transduktionsansätze und anschließende Limiting Dilution notwendig waren, um eine Auswahl an hell fluoreszierenden, gut wachsenden Klonen zu gewinnen.

3.1.2 In vitro Charakterisierung der Klone

Die isolierten Zellklone wurden vor der *in vivo* Verwendung *in vitro* charakterisiert. Zunächst wurden mikroskopische Beobachtungen festgehalten und das Wachstumsverhalten in der Zellkultur beobachtet. Etablierten sich die Klone stabil, wurde ihre Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie bestimmt und das Expressionsniveau der FP semiquantitativ im Western Blot überprüft. Für die hellsten Klone wurden die Wachstumsraten ermittelt und die Chemotherapiesensitivität getestet.

Mikroskopie

Für die CRC Zelllinie DLD-1 ist bereits früh nach ihrer Etablierung eine heterogene Morphologie beschrieben worden [Dexter *et al.*, 1981]. Es treten neben der geschlossenen Form ohne deutlich erkennbare Zellgrenzen offene Kolonien auf, bei denen die Einzelzellen deutlich erkennbar sind (siehe Abb. 3.1 schwarzer Pfeil bei DLD-1 WT). Während der Klonierung sind Klone beider Morphologietypen isoliert worden: DLD-1 FUKW 11.2 und FUPW 3 entsprechen der offenen Kolonieform, alle anderen der geschlossenen, die auch den WT dominiert (siehe Abb. 3.1). Auffällig in der Zellkultur mit fortschreitender Passagierung ist, dass in der geschlossenen Form offene Bereiche auftreten können. Ist aber einmal der offene Subtyp als Klon stabil etabliert, bilden sich keine geschlossenen Bereiche mehr aus. Für die Fluoreszenzintensität kann aus der Mikroskopie heraus bereits auf Unterschiede zwischen den Klonen geschlossen werden, da die Belichtungszeiten der Fluoreszenzaufnahmen deutlich variieren. Eine Quantifizierung anhand dieser ist jedoch nicht möglich, da die Belichtungszeit automatisch auf das hellste Signal im Bild eingestellt ist und dies nicht repräsentativ für den gesamten Klon sein muss.

Die Gewinnung tiefroter HT-29 Klone war ebenfalls erfolgreich: Jeweils zwei unterschiedlich stark fluoreszierende Klone konnten für TurboFP635 und mPlum isoliert werden. Morphologisch entsprechen alle dem WT (siehe Abb. 3.1). Für Klon FUKW 11 ist jedoch festzuhalten, dass zu Beginn der Etablierung das Wachstum langsamer erfolgte als beim WT und viele Zellen (anfangs > 50 %) abgestorben waren. Mit zunehmender Passagierung stabilisierte sich der Klon jedoch und konnte für weitere Versuche eingesetzt werden.

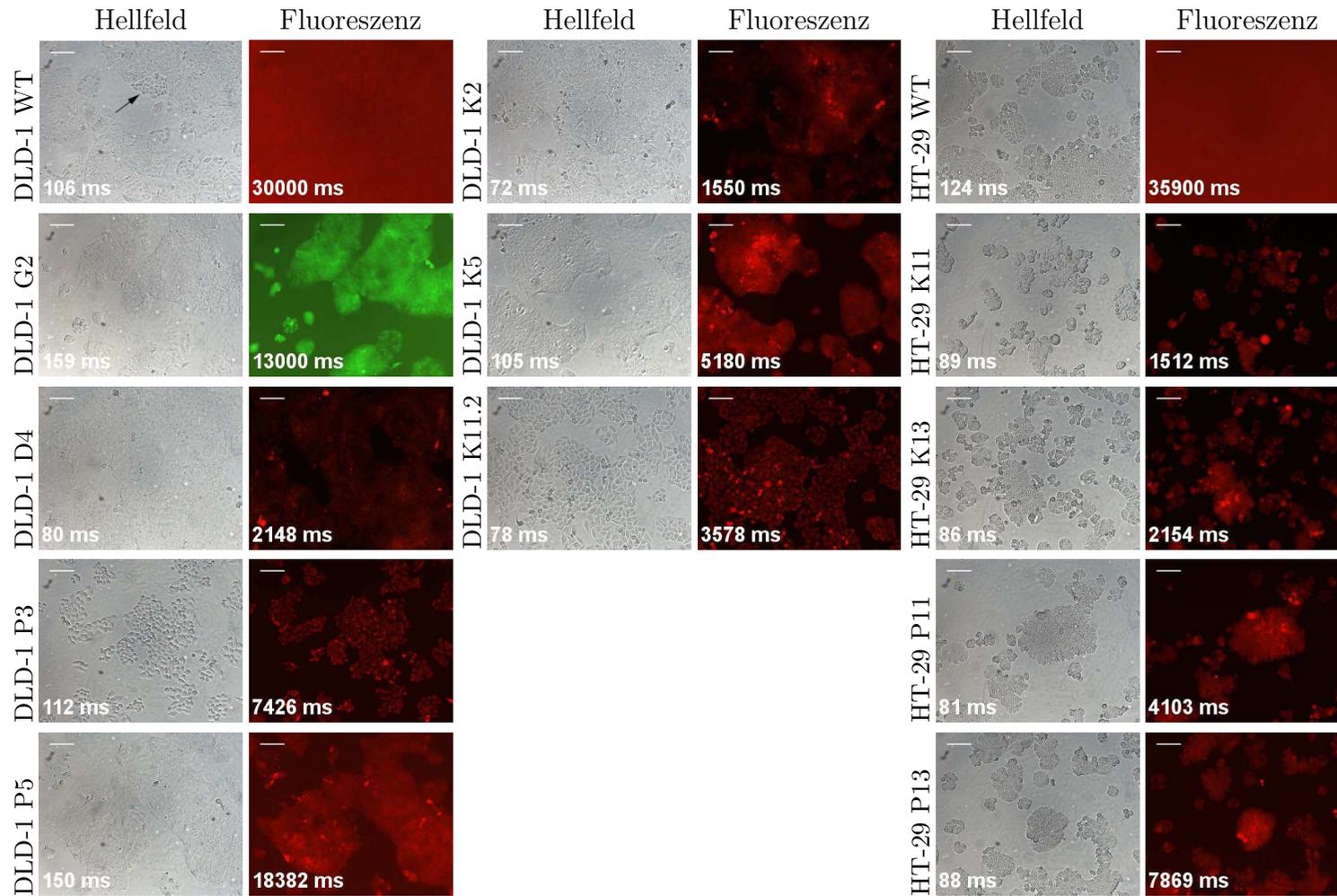


Abbildung 3.1: Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der fluoreszierenden CRC Klone.

Dargestellt sind Aufnahmen in Hellfeld und unter Fluoreszenzanregung (G2: blauer Filtersatz, alle anderen: grüner Filtersatz). Der weiße Balken entspricht 100 μm . Beim DLD-1 WT ist die Heterogenität der Morphologie zu erkennen: Der schwarze Pfeil markiert den offenen Subtypus, bei dem die Einzelzellen durch klare Zellgrenzen identifizierbar sind.

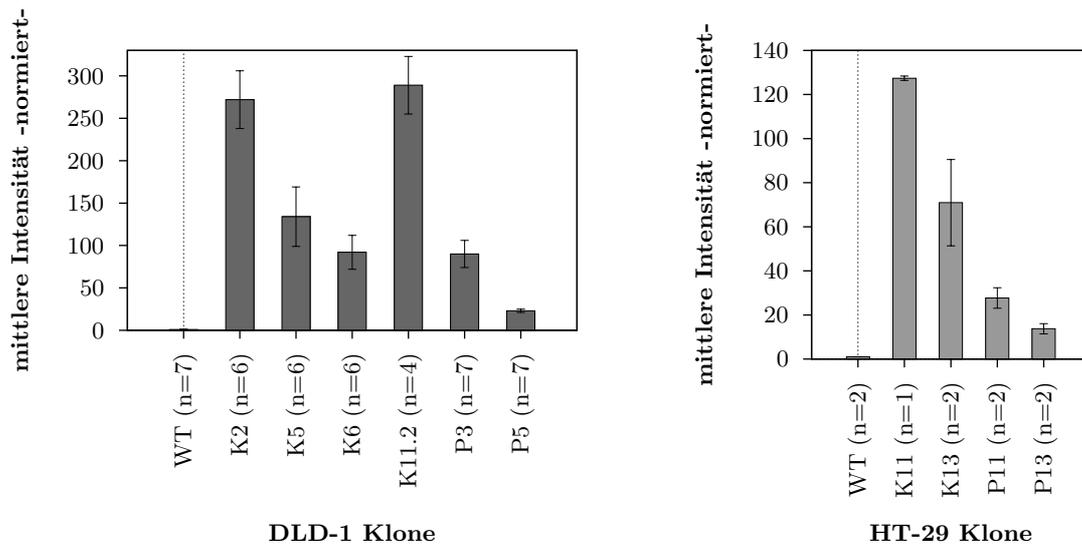


Abbildung 3.2: Die Intensitätsquantifizierung der tiefroten DLD-1 und HT-29 Klone am FACSCalibur™.

Dargestellt ist die auf den WT normierte mittlere Fluoreszenzintensität \pm S. D. der Klone 24 h nach Zellplattierung. Mittlere Intensität: gemittelte Fluoreszenzintensität bezogen auf die des WT, n: Anzahl der Messungen. Mit der DLD-1 Zelllinie konnten die hellsten Klone erzeugt werden. Die Klone mit TurboFP635 fluoreszieren unabhängig von der Zelllinie intensiver als die mit mPlum markierten.

Durchflusszytometrie

Um die Fluoreszenzintensität der einzelnen Klone objektiv vergleichen zu können, wurden Messungen am Durchflusszytometer durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 3.2. Die DLD-1 Klone weisen unabhängig vom FP die hellsten mittleren Intensitäten auf. Die schwächere Fluoreszenz der HT-29 Klone kann auf (a) eine Transduktionsineffizienz, (b) ihre mangelnde Überexpressionsfähigkeit bzw. (c) die ungünstige Messsituation am FACSCalibur™ zurückzuführen sein. Letzteres konnte durch Analysen am LSR II Fortessa™ ausgeschlossen werden. Zwar zeigten die Klone hier deutlich höhere Intensitäten, aber dies galt für alle untersuchten Klone (siehe Tab. 3.1). Die Intensitätsverhältnisse der Klone untereinander variierten kaum, was die Nutzung des in der Arbeitsgruppe vorhandenen FACSCalibur™ zum Screening und Beurteilen von (tiefroten) RFP Mutanten erlaubt unter der Berücksichtigung, dass die absoluten Intensitätswerte relativ zum LSR II Fortessa™ um eine Größenordnung niedriger sind.

Des Weiteren war wichtig zu zeigen, dass die fluoreszierende Zellpopulation der Klone mit der Kultivierungsdauer nicht abnimmt und keine Fluoreszenzinstabilität vorliegt. Hierzu wurden alle tiefrot markierten DLD-1 Klone in einem 4-Tage-Assay am FACSCalibur™ vermessen. Die Ergebnisübersicht zeigt Abb. 3.3. Für alle Klone ist festzuhalten, dass der Anteil roter Zellen an der gesamten vitalen Zellpopulation nur marginal über die Kultivierungszeit abnimmt, was sie für *in vivo* Versuche einsetzbar macht.

Tabelle 3.1: Der Vergleich der durchflusszytometrischen Intensitätsbestimmungen der tiefroten CRC Klone.

Calibur: FACSCalibur™, LSR II: LSR II Fortessa™. Die Intensitätsnormierung erfolgte auf die ersten isolierten Klone (n = 1). Die mittleren Intensitäten der Klone analysiert mit dem LSR II sind deutlich höher als die am Calibur ermittelten bedingt durch die optimale Anregung der RFP mit dem YG Laser. Die Verhältnisse innerhalb der Klone bleiben jedoch gleich, was ein Screening mit dem Calibur gestattet.

Zelllinie	Klon	mittlere Intensität			
		WT normiert		Klon normiert	
		Calibur	LSR II	Calibur	LSR II
DLD-1	WT	1	1		
	K2	268	1262	2,1	2,1
	K5	129	611	1,0	1,0
	K6	93	490	0,7	0,8
	K11.2	294	1117	2,3	1,8
	P3	94	887	3,5	4,2
	P5	27	212	1,0	1,0
HT-29	WT	1	1		
	K11	127	1644	1,5	1,6
	K13	83	1050	1,0	1,0
	P11	24	894	1,8	1,7
	P13	13	531	1,0	1,0

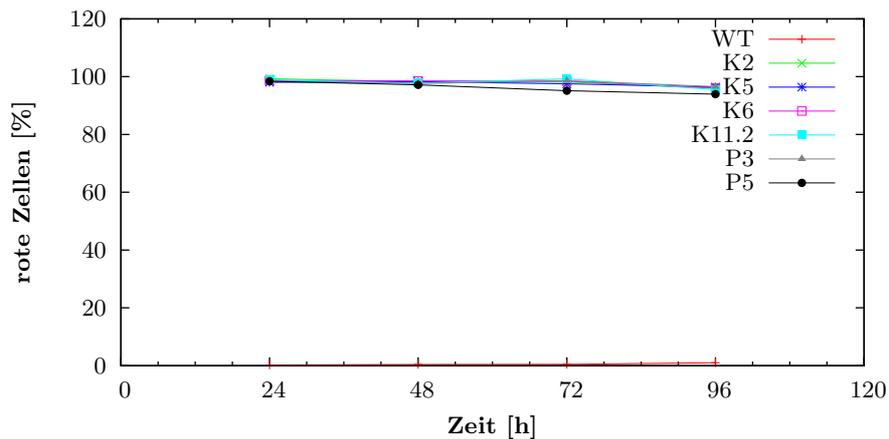


Abbildung 3.3: Die Fluoreszenzstabilität der tiefroten DLD-1 Klone im 4-Tage-Assay. Rote Zellen [%]: Anteil roter Zellen an der als vital gegateten Gesamtpopulation.

Semiquantitiver Western Blot

Die Intensität einer Fluoreszenzfarbstofflösung, der vereinfacht auch das Zytoplasma mit dem gelösten FP entspricht, ist aufgrund von Quenchingeffekten nicht kontinuierlich linear abhängig von der Menge des Farbstoffes. Vielmehr treten ab einer gewissen Konzentration störende Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffmolekülen auf und die Gesamtintensität der Lösung kann trotz einer Zunahme der fluoreszierenden Teilchen sogar sinken. Aus diesem Grund wurden neben der Intensitätsbestimmung der Einzelzellen mittels Durchflusszytometrie auch die Expressionslevel der RFP für die Klone im Western Blot semiquantitativ analysiert. Die Abb. 3.4 und 3.5 zeigen die Ergebnisse.

Die TurboFP635 Expression der DLD-1 Klone variiert so, wie es aus der Mikrokopie und den durchflusszytometrischen Analysen zu erwarten war: FUKW 2 und 11.2 zeigen stärkere Banden als FUKW 5 und 6. Die unterschiedliche Fluoreszenzintensität der Klone basiert demnach auf der unterschiedlichen Proteinexpression. Für mPlum im DLD-1 Modell gilt das Gleiche: geringe Fluoreszenz resultiert aus geringerer Proteinexpression. Betrachtet man die Klone der HT-29 Zelllinie, so bedingt auch hier eine stärkere Proteinexpression hellere Fluoreszenzen, wobei der Unterschied zwischen den Klonen FUKW 11 und 13 nicht so stark ist, wie die Durchflusszytometrie vermuten ließ. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei FUKW 11 bereits ein Quenching aufgrund hoher Fluorophorkonzentration innerhalb der Zelle auftritt.

Zur Verwendung der Antikörper anti-RFP und anti-tRFP kann festgehalten werden, dass beide ihr Antigen gut erkennen und dass das FP eGFP als Kontrolle nicht detektiert werden kann. Allerdings zeigte der gegen TurboFP635 gerichtete anti-tRFP eine Kreuzreaktion mit den auf DsRed basierenden Varianten DsRed2 und mPlum. Dies ist bei möglichen Kombinationsanwendungen wie einer parallelen Immunhistochemie beider tiefroten RFP zu berücksichtigen. Des Weiteren fällt auf, dass für TurboFP635 neben seinem reifen, vollständigen Protein von 26 kDa Länge auch zwei Fragmente zwischen 17 und 20 kDa Länge nachgewiesen werden können. Diese sind vermutlich Abbauzwischenstufen, die sich aufgrund der starken Überexpression und dem ausgelasteten Turn over in der Zelle anreichern.

Wachstum

Mittels SRB-Assay über 5 Tage wurden die Verdopplungszeiten der WT und der fluoreszierenden Klone ermittelt. Dafür wurde für verschiedene Zellzahlen ($n = 9$) die exponentielle Wachstumsphase ausgewählt und der Anstieg als spezifische Wachstumsrate μ [1/h] mittels linearer Regression berechnet (Formel 2.2). Die Verdopplungszeit t_d ergibt sich dann als Quotient aus dem $\ln(2)$ durch die ermittelte Wachstumsrate (Formel 2.3). Die ausführlichen Diagramme der neugenerierten tiefroten RFP Klone finden sich im Anhang (siehe Abb. 6.5, 6.6 und 6.7). Die Übersicht in Abb. 3.6 lässt keine deutlichen Unterschiede im *in vitro* Wachstum erkennen. Beide WT und die Klone verdoppeln ihre Zellzahl unter optimalen Bedingungen ca. alle 20 h.

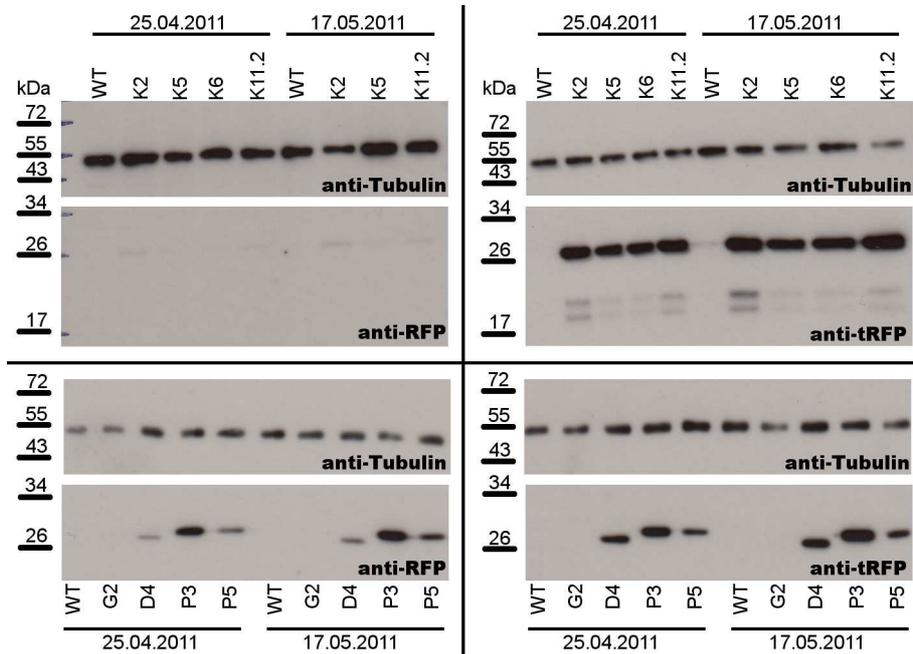


Abbildung 3.4: Die Western Blots für die Fluoreszenzklone der Zelllinie DLD-1.

Dargestellt sind die Blots von zwei verschiedenen Zellaufschlussreihen mit jeweils optimaler Belichtungszeit zur Beurteilung der RFP Expression. Für die Klone ist festzuhalten, dass FUPW 3 eine deutlich höhere mPlum-Expression zeigt als FUPW 5 und FUKW 2 sowie 11.2 mehr TurboFP635 bilden als FUKW 5 und 6.

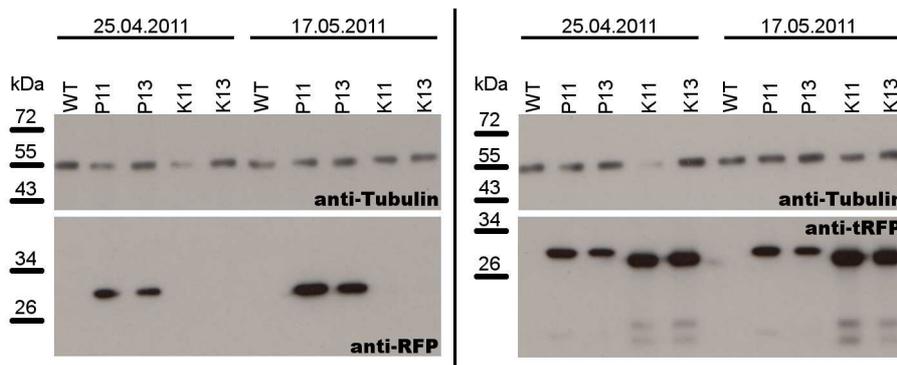


Abbildung 3.5: Die Western Blots für die Fluoreszenzklone der Zelllinie HT-29.

Dargestellt sind die Blots von zwei verschiedenen Zellaufschlussreihen mit jeweils optimaler Belichtungszeit zur Beurteilung der RFP Expression. Man kann erkennen, dass sowohl FUPW 11 als auch FUKW 11 eine höhere Proteinexpression im Vergleich zu FUPW 13 bzw. FUKW 13 zeigen.

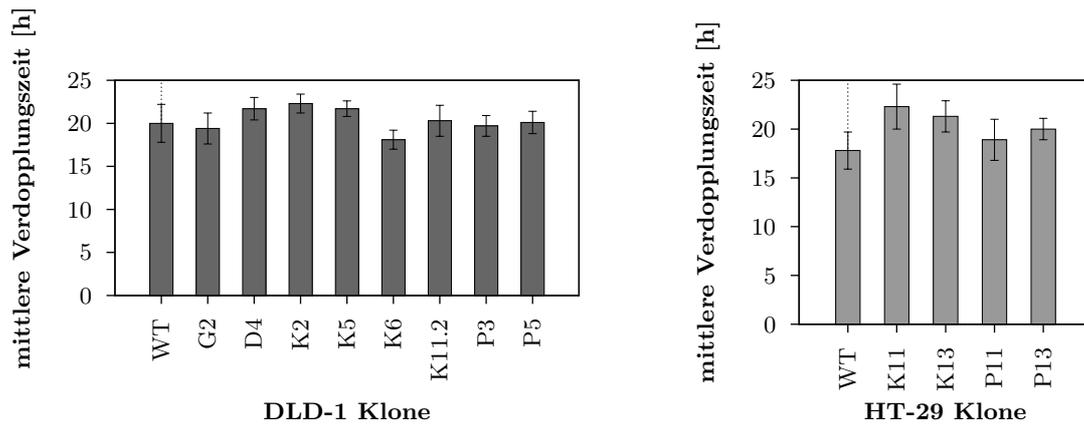


Abbildung 3.6: Die Verdopplungszeiten der Zelllinien DLD-1 & HT-29 mit den Klonen. Dargestellt sind die mittleren Verdopplungszeiten [h] \pm S. D. aus 9 verschiedenen Initialzellzahlen. Die Berechnung der Verdopplungszeiten erfolgte aus dem Anstieg in der exponentiellen Wachstumsphase im 5-Tage-SRB-Assay. Die ausführlichen Diagramme der Kinetiken finden sich im Anhang in den Abb. 6.5, 6.6 und 6.7.

Resistenz gegen Chemotherapeutika

Die beiden CRC Zelllinien DLD-1 und HT-29 sind resistente Modelle für die Chemotherapeutika Oxaliplatin, 5-Fluoruracil und Irinotecan. Es war zu überprüfen, ob durch die lentivirale Transduktion und anschließende Klonierung eine Änderung der Sensitivität gegenüber diesen Standardtherapeutika resultiert. Hierfür wurden SRB-Assays konstanter Initialzellzahl angesetzt, die für 96 h mit der jeweiligen Substanz behandelt wurden. Die Mittelwertkurven der Versuche für DLD-1 zeigt die Abb. 3.7, die Diagramme für HT-29 finden sich in Abb. 3.8. Die IC₅₀- und IC₉₀-Werte der Klone wurden für jeden Versuch einzeln berechnet (Formel 2.4). In der Tab. 3.2 sind diese Mittelwerte für den WT und die Klone zusammengefasst. Als resistent werden diejenigen Zelllinien bezeichnet, deren IC₉₀ über den realistischen Peakplasmaspiegel im Menschen liegen. Referenzwerte bei Infusionsgabe sind: für Oxaliplatin 4 bis 7 μ M (nach Allain *et al.* [2000]; Ehrsson *et al.* [2002]; Graham *et al.* [2000]; Liu *et al.* [2002]; Massari *et al.* [2000]), für 5-FU 1 bis 10 μ M (nach Grem [2000]; Grem *et al.* [2000, 2001a,b]) sowie für Irinotecan 2 bis 5 μ M (nach de Bruijn *et al.* [1997]; Gupta *et al.* [1997]; Hazama *et al.* [2010]; Yokoo *et al.* [2009]). Bei Bolusgabe können diese Werte höher sein, dafür verringert sich aber die Bioverfügbarkeit. Die area under the curve (AUC) ist dann deutlich geringer.

Die Zytotoxizitätsdaten für die Klone der DLD-1 Zelllinie zeigen, dass es sich nach der Klonierung weiterhin um resistente Zellen handelt. Auffällig ist, dass der Klon FUKW 4.1 und die daraus durch Supertransduktion hervorgegangenen Klone FUKW 5 und 6 eine leichte Verminderung der Irinotecanresistenz zeigen, was besonders bei der IC₉₀ erkennbar ist: Sie liegt für die Klone etwa dreimal niedriger als beim WT. Bei den untersuchten HT-29 Klonen konnte für Oxaliplatin und Irinotecan kein Abweichen vom WT festgestellt werden. Bei 5-Fluoruracil hingegen fällt eine geringere IC₅₀ des Klones FUKW 11 auf. Dennoch können alle HT-29 Klone als resistent bezeichnet werden.

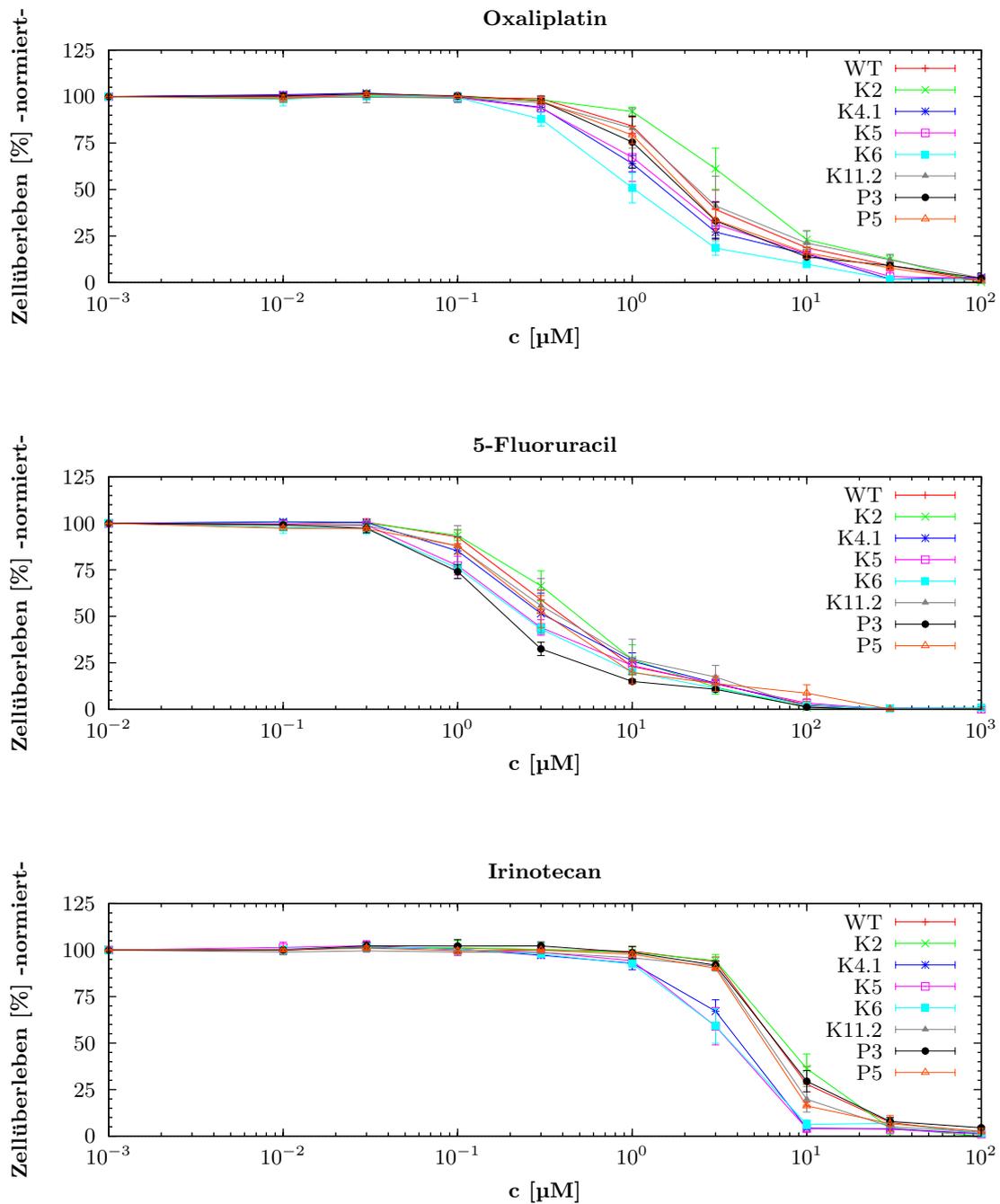


Abbildung 3.7: Die Zellüberlebensrate als Funktion der Therapeutikakonzentration im 96 h-Zytotoxizitätsassay für die Substanzen Oxaliplatin, 5-Fluoruracil und Irinotecan auf DLD-1 Zellen.

Dargestellt sind die Mittelwertkurven \pm S. D. für WT (n = 6), K2 (n = 3), K4.1 (n = 3), K5 (n = 6), K6 (n = 4), K11.2 (n = 3), P3 (n = 3) und P5 (n = 3).

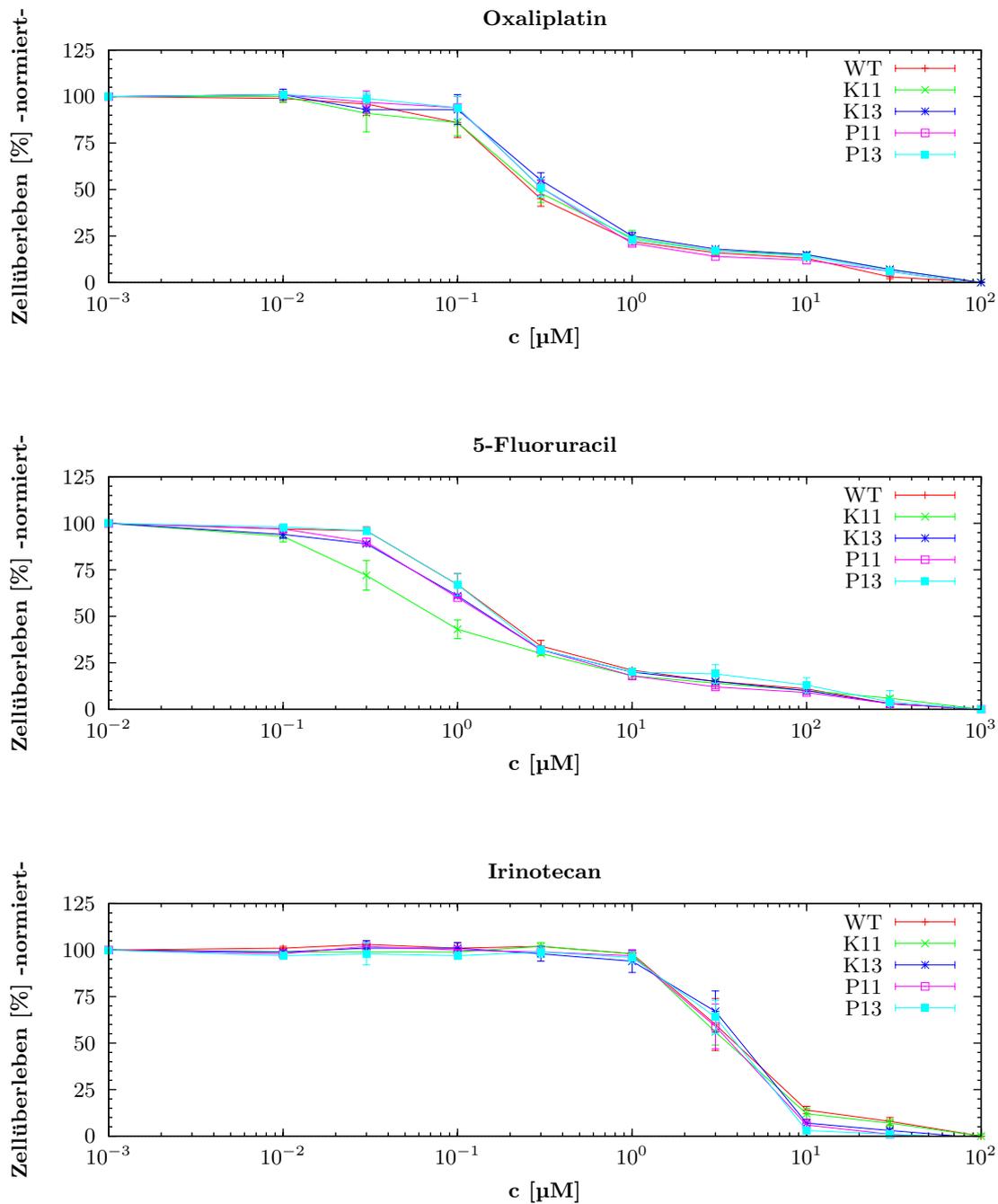


Abbildung 3.8: Die Zellüberlebensrate als Funktion der Therapeutikakonzentration im 96 h-Zytotoxizitätsassay für die Substanzen Oxaliplatin, 5-Fluoruracil und Irinotecan auf HT-29 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwertkurven \pm S. D. für WT (n = 3), K11 (n = 3), K13 (n = 3), P11 (n = 3) und P13 (n = 3).

Tabelle 3.2: Die berechneten IC50- und IC90-Werte (Formeln 2.4) der CRC Zelllinien DLD-1 und HT-29 und ihrer Klone.

Aufgelistet sind die Mittelwerte \pm S. D. aus den Einzelversuchen ($n \geq 3$). IC50: inhibitorische Konzentration [μM], bei der noch 50 % der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle leben, IC90: inhibitorische Konzentration [μM], bei der noch 10 % der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle leben. Alle Klone können wie die WT als resitent bezeichnet werden, da ihre IC90 deutlich über den durch Infusion erreichbar realistischen Peakplasmaspiegeln für Oxaliplatin (4 bis 7 μM), 5-FU (1 bis 10 μM) und Irinotecan (2 bis 5 μM) liegen.

Zelllinie	Klon	Oxaliplatin		5-Fluoruracil		Irinotecan	
		IC50 \pm S. D. [μM]	IC90 \pm S. D. [μM]	IC50 \pm S. D. [μM]	IC90 \pm S. D. [μM]	IC50 \pm S. D. [μM]	IC90 \pm S. D. [μM]
DLD-1	WT	2,5 \pm 0,8	27,4 \pm 6,3	4,0 \pm 0,6	44,8 \pm 10,4	6,8 \pm 0,9	26,5 \pm 3,9
	FUKW2	4,1 \pm 0,9	38,2 \pm 6,1	5,0 \pm 1,1	36,2 \pm 11,7	7,6 \pm 1,0	24,7 \pm 3,6
	FUKW4.1	1,5 \pm 0,2	15,3 \pm 0,9	3,4 \pm 1,3	44,8 \pm 4,5	4,2 \pm 0,4	9,0 \pm 0,2
	FUKW5	1,8 \pm 0,9	16,8 \pm 5,4	2,5 \pm 0,4	46,8 \pm 9,9	3,6 \pm 0,7	8,7 \pm 0,5
	FUKW6	1,1 \pm 0,2	9,6 \pm 2,8	2,4 \pm 0,2	35,6 \pm 5,3	3,7 \pm 0,7	9,1 \pm 0,7
	FUKW11.2	2,7 \pm 1,3	37,7 \pm 13,3	4,1 \pm 2,0	49,4 \pm 15,5	6,1 \pm 0,5	20,1 \pm 0,6
	FUPW3	2,0 \pm 0,6	25,4 \pm 6,5	1,9 \pm 0,2	32,9 \pm 2,1	6,8 \pm 0,5	27,6 \pm 2,9
	FUPW5	2,0 \pm 0,3	22,1 \pm 0,6	3,4 \pm 0,9	73,6 \pm 53,0	5,8 \pm 0,0	24,9 \pm 12,8
HT-29	WT	0,3 \pm 0,0	14,5 \pm 0,4	1,8 \pm 0,3	127,8 \pm 11,1	4,0 \pm 1,1	22,9 \pm 7,2
	FUKW11	0,3 \pm 0,1	20,8 \pm 4,4	0,8 \pm 0,2	115,4 \pm 57,7	3,6 \pm 0,7	18,4 \pm 12,3
	FUKW13	0,4 \pm 0,1	20,7 \pm 3,9	1,5 \pm 0,0	114,4 \pm 5,3	4,2 \pm 0,7	9,5 \pm 4,0
	FUPW11	0,3 \pm 0,1	17,1 \pm 2,5	1,5 \pm 0,1	87,7 \pm 35,5	3,7 \pm 0,9	9,2 \pm 0,7
	FUPW13	0,3 \pm 0,1	19,1 \pm 4,8	1,7 \pm 0,3	186,4 \pm 135,1	3,9 \pm 0,6	8,9 \pm 0,0

3.1.3 Zusammenfassung

Es konnten verschiedene Klone der CRC Zelllinien DLD-1 und HT-29 mit TurboFP635 bzw. mPlum markiert werden. Die Zusammenfassung der *in vitro* Charakterisierung der *in vivo* verwendeten Klonen findet sich in Tab. 3.3. Für die DLD-1 Zelllinie konnten die bereits im WT zu beobachtenden Morphologietypen offen bzw. geschlossen als Klone isoliert werden. Zu bemerken ist, dass Zellen, welche einmal als reiner, offener Klon etabliert wurden, nicht in der Lage sind, den geschlossenen Subtypus des WT wieder auszubilden. Bei geschlossenen Klonen kann es jedoch zur Ausprägung des offenen Typus kommen. Die Fluoreszenzintensität variierte innerhalb der Klone, aber für beide CRC Linien konnten sehr helle, für *in vivo* Versuche potentiell geeignete, vielversprechende Klone gewonnen werden. Das *in vitro* Wachstum der Klone unterschied sich nicht deutlich von dem der jeweiligen WT. Für das Resistenzverhalten gegenüber den Standardsubstanzen in der CRC Therapie kann festgehalten werden, dass die Klone im Vergleich zum jeweiligen WT z. T. unterschiedliche IC₅₀ bzw. IC₉₀ besitzen, aber dennoch alle als resistente CRC Modelle genutzt werden können.

Tabelle 3.3: Die Zusammenfassung der Daten für die *in vivo* verwendeten CRC Zellklone.

FP: Fluoreszenzprotein; FI: Fluoreszenzintensität ermittelt am FACSCalibur™ normiert auf den WT; t_d : Verdopplungszeit [h]; Irinotecan, 5-FU und Oxaliplatin: 50 % bzw. 90 % inhibitorische Konzentration (IC50 bzw. IC90) der Standardtherapeutika bei CRC [μ M].

Zelllinie	Klon	FP	Morphologie	FI	t_d	Oxaliplatin		5-FU		Irinotecan	
						IC50	IC90	IC50	IC90	IC50	IC90
DLD-1	WT		heterogen	1	20,0	2,5	27,4	4,0	44,8	6,8	26,5
DLD-1	FUKW2 (K2)	TurboFP635	geschlossen	268	22,3	4,1	38,2	5,0	36,2	7,6	24,7
DLD-1	FUKW5 (K5)	TurboFP635	geschlossen	129	21,7	1,8	16,8	2,5	46,8	3,6	8,7
DLD-1	FUKW6 (K6)	TurboFP635	geschlossen	93	18,1	1,1	9,6	2,4	35,6	3,7	9,1
DLD-1	FUKW11.2 (K11.2)	TurboFP635	offen	294	20,3	2,7	37,7	4,1	49,4	6,1	20,1
DLD-1	FUPW3 (P3)	mPlum	offen	94	19,7	2,0	25,4	1,9	32,9	6,8	27,6
DLD-1	FUPW5 (P5)	mPlum	geschlossen	27	20,1	2,0	22,1	3,4	73,6	5,8	24,9
HT-29	WT			1	17,8	0,3	14,5	1,8	127,8	4,0	22,9
HT-29	FUKW11 (K11)	TurboFP635		127	22,3	0,3	20,8	0,8	115,4	3,6	18,4
HT-29	FUPW11 (P11)	mPlum		24	18,9	0,3	17,1	1,5	87,7	3,7	9,2

3.2 Etablierung des msFI für Xenograftmodelle

Neben der reinen Visualisierung von Tumoren ist eine Quantifizierung der Tumorlast im Tier für präklinische Studien unerlässlich. Im weit verbreiteten, einfach anzuwendenden Modell des s. c. Xenografts erfolgt die Quantifizierung über eine genäherte Volumenberechnung (Ellipsoid, Formel 2.5). Liegt der Tumor bzw. die Metastasen jedoch im Tierinneren, so sind sie einer Ausmessung mittels Schieblehre nicht zugänglich. Hier können bildgebende Verfahren eingesetzt werden, um einen Ersatz für das berechnete Tumolvolumen als Tumorlastparameter zu finden. Die folgenden Punkte zeigen die Ergebnisse von *in vitro* und *in situ* Vorversuchen zum msFI sowie die Überlegungen zur Quantifizierung der Tumorlast einer Maus mittels msFI. Anschließend folgt die Überprüfung der Quantifizierbarkeit in verschiedenen *in vivo* Mausmodellen und die Beschreibung aufgetretener Probleme. Zunächst wurde mit s. c. Xenograften gearbeitet, da hier sowohl das Tumolvolumen als auch die Messgrößen des msFI zeitgleich erfasst und zur Tumorlastbestimmung herangezogen werden können. Es folgten Untersuchungen mit intraperitonealer (i. p.) und intravenöser (i. v.) Zellapplikation in die Maus.

3.2.1 Erste *in situ* Vorversuche zum Tumorzellimaging

Zunächst wurden erste Bildgebungen mit fluoreszierenden Zellklonen in einem Kadaverexperiment durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Zellzahlen an unterschiedlichen Stellen im Mausekörper positioniert und mit unterschiedlichen Parametern (Belichtungszeit, Zellzahl, Spektrenisolation) die Fluoreszenzintensität ermittelt. Diese Versuche dienten dazu, den Imager kennenzulernen, aber auch der Überprüfung von optischen Gesetzmäßigkeiten am Zellmaterial im Tier. Für die Versuche mit konstanter Belichtungszeit wurden 120 ms ausgewählt, weil diese für rasierte Albinomäuse im blauen Filtersetting noch keine Überbelichtung der Autofluoreszenz ergaben.

Einfluss der Belichtungszeit

Für das Auffinden eines Fluoreszenzsignals mittels msFI wird ein Referenzspektrum benötigt. Es sollte überprüft werden, wie der Verlauf dieses Spektrums von der Belichtungszeit abhängt. Die Abb. 3.9 für 20 Mio. DLD-1 FUGW 2 Zellen in einem Reaktionsgefäß s. c. im Mausekadaver platziert zeigt, dass alle Spektren den gleichen, Belichtungszeit unabhängigen Verlauf haben, nur die absoluten Werte steigen mit zunehmender Belichtungszeit an. Normiert man die Spektren auf ihr jeweiliges Maximum, so liegen sie aufeinander. Dieser Verlauf der Spektren ist es auch, der die Isolation der Einzelfluoreszenzen in einem Cube wesentlich bestimmt und nicht der absolute Intensitätswert. Daher ist die Verwendung von Referenzspektren auch bei verschiedenen experimentellen Bedingungen wie z. B. einer variierenden Fluoreszenzintensität durch die Verwendung unterschiedlich stark fluoreszierender Klone oder durch variable Lokalisierung des Fluoreszenzsignals im Tier möglich.

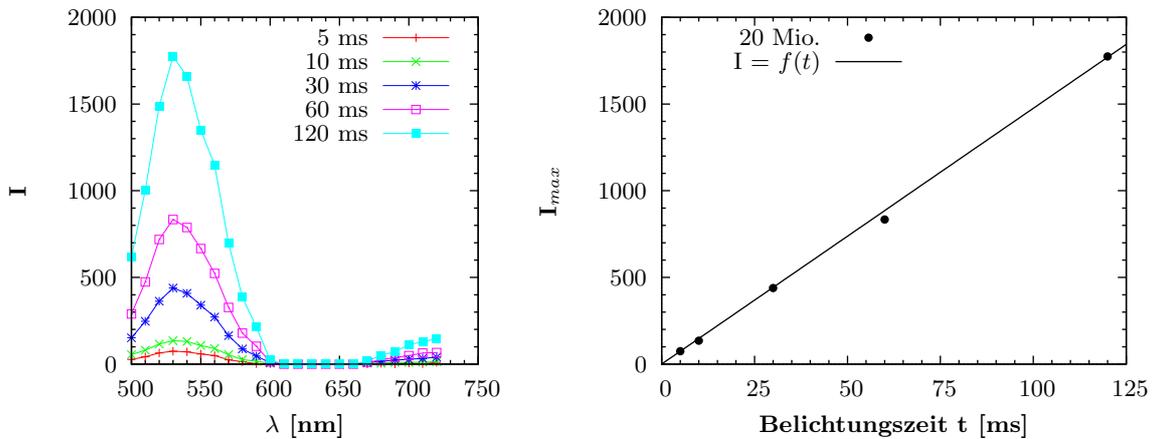


Abbildung 3.9: Der Einfluss der Belichtungszeit auf die für eGFP isolierten Fluoreszenzspektren.

Dargestellt sind Spektren isoliert aus Cubes von 20 Mio. Zellen DLD-1 FUGW 2 s. c. im Kadaver platziert bei unterschiedlichen Belichtungszeiten. links: Man kann erkennen, dass alle Spektren den gleichen Intensitätsverlauf über den detektierten Wellenlängenbereich zeigen. Das maximale Signal liegt für eGFP bei 530 nm und variiert in seiner Intensität in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. rechts: Die maximale Intensität (I_{max} bei 530 nm) der Spektren nimmt mit längeren Belichtungszeiten linear zu.

Normiert man die maximalen Intensitäten bei 530 nm jeweils auf die Belichtungszeit, so ergibt sich eine mittlere normierte Intensität von $14,34 \pm 0,60 \text{ ms}^{-1}$ ($n = 5$). Die S. D. liegt unter 5 %. Es ist also möglich, die Intensität auf die Belichtungszeit zu normieren und Cubes, die mit variierenden Belichtungszeiten etwa zu verschiedenen Versuchszeitpunkten aufgenommen wurden, vergleichend auszuwerten. Dies gilt natürlich nur, solange keine Unter- oder Überbelichtung erfolgt, da unter diesen Bedingungen die Fluoreszenzeinzelsignale nicht korrekt von einander getrennt werden können.

Bei Unterbelichtung kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen: Wird die Probe zu kurz belichtet, reicht die Intensität des zu detektierenden Fluorophors nicht aus, eine klare Trennung von der Autofluoreszenz zu bekommen. Für die Überbelichtung gilt: Die Intensitätsmaxima werden abgetrennt. Damit ist der Verlauf des Spektrums über den gemessenen Wellenlängenbereich nicht mehr nachvollziehbar und falsch-negative Ergebnisse treten auf.

Aussagen zum Signal-Rausch-Verhältnis, also der Nachweisgrenze bzw. der Sensitivität im Tier, sind extrem abhängig vom verwendeten Fluorophor und dessen spektralen Eigenschaften. Für die Belichtungszeit gilt, dass es bei kurzweiligem Anregungslicht zu starker Autofluoreszenz kommt, was die maximal mögliche Belichtungszeit ohne Überbelichtung begrenzt. Die Nachweisgrenze wird heraufgesetzt, die Sensitivität ist reduziert. Bei langweiligem Anregungslicht kann sehr lange ohne Überbelichtung aufgenommen werden, die Nachweisgrenze sinkt. Das ermöglicht Messungen schwacher Fluores-

zenzsignale. Neben der maximal möglichen Belichtungszeit begrenzen aber auch Quantausbeute des verwendeten Fluorophors und Lage der Fluoreszenzquelle im Tier die Sensitivität (siehe folgende Abschnitte).

Nachweis und die Quantifizierung verschiedener Zellzahlen in situ

Es wurden verschiedene Zellzahlen der Klone DLD-1 FUGW 2 bzw. FUDW 4 in einem s. c. im Mauskadaver platzierten Reaktionsgefäß bei konstanter Belichtungszeit (120 ms) aufgenommen. Im ersten Experiment wurden 1, 2 bzw. 5 Mio. Zellen ($c = 2 \cdot 10^7$ Z/mL), im zweiten Experiment 20 bzw. 100 Mio. Zellen ($c = 4 \cdot 10^8$ Z/mL) eingesetzt. Für die hohe Konzentration wurden aufgrund der großen benötigten Wachstumsfläche und des dadurch bedingten zellkulturtechnischen Aufwandes nur die zwei genannten Zellzahlen getestet. Die Abb. 3.10 zeigt die Ergebnisse. Man kann klar erkennen, dass eine direkte Quantifizierung der Zellzahl durch Analyse der maximalen Intensität I_{max} in keinem der Experimente gelungen ist.

Betrachtet man zunächst die maximale Intensität von eGFP markierten Zellen (bei 530 nm), so zeigt sich im ersten Experiment, dass 1 Mio. Zellen unter der Nachweisgrenze liegen. Für 2 und 5 Mio. Zellen hingegen stimmt die lineare Zunahme der maximalen Intensität. Zwischen 20 und 100 Mio. Zellen im zweiten Experiment konnte kein Unterschied in der maximalen Intensität detektiert werden, da es hier bereits zu Überbelichtungs- und Quenchingeffekten kam.

Die maximale Fluoreszenzintensität von DsRed2 markierten Zellen (bei 600 nm) wurde in zwei Filtereinstellungen untersucht: dem blauen und dem grünen Filtersatz. Analysiert man die niedrigen Zellzahlen, so zeigt sich bereits bei 1 Mio. ein eindeutiges Signal sowohl im blauen als auch im grünen Filtersatz. Aber keine Filtereinstellung ermöglicht die Erstellung einer Eichgeraden für die eingesetzten Zellzahlen. Dies gilt auch für die großen Zellzahlen. Hier fällt besonders auf, dass 100 Mio. Zellen im grünen Filtersatz keine Intensität liefern, denn dieser Cube war mit 120 ms so stark überbelichtet, dass es zur Abtrennung des Intensitätsmaximums kam und keine korrekte Signalisolation möglich war.

An diesen Experimenten wird deutlich, dass die Analyse der maximale Intensität I_{max} von Cubes mit konstanter, auf die Autofluoreszenz optimierter Belichtungszeit in der durch den Maestro generierten 2D-Auswertung keine sinnvolle Größe zur Quantifizierung von Zellzahlen darstellt. Besser ist die Verwendung von automatischen, auf die jeweilige Probe eingestellten Belichtungszeiten und die anschließende Normierung der Fluoreszenzintensitäten auf diese, da so zumindest die Überbelichtung der Proben ausgeschlossen werden kann (siehe dazu auch Abschnitt 3.2.3).

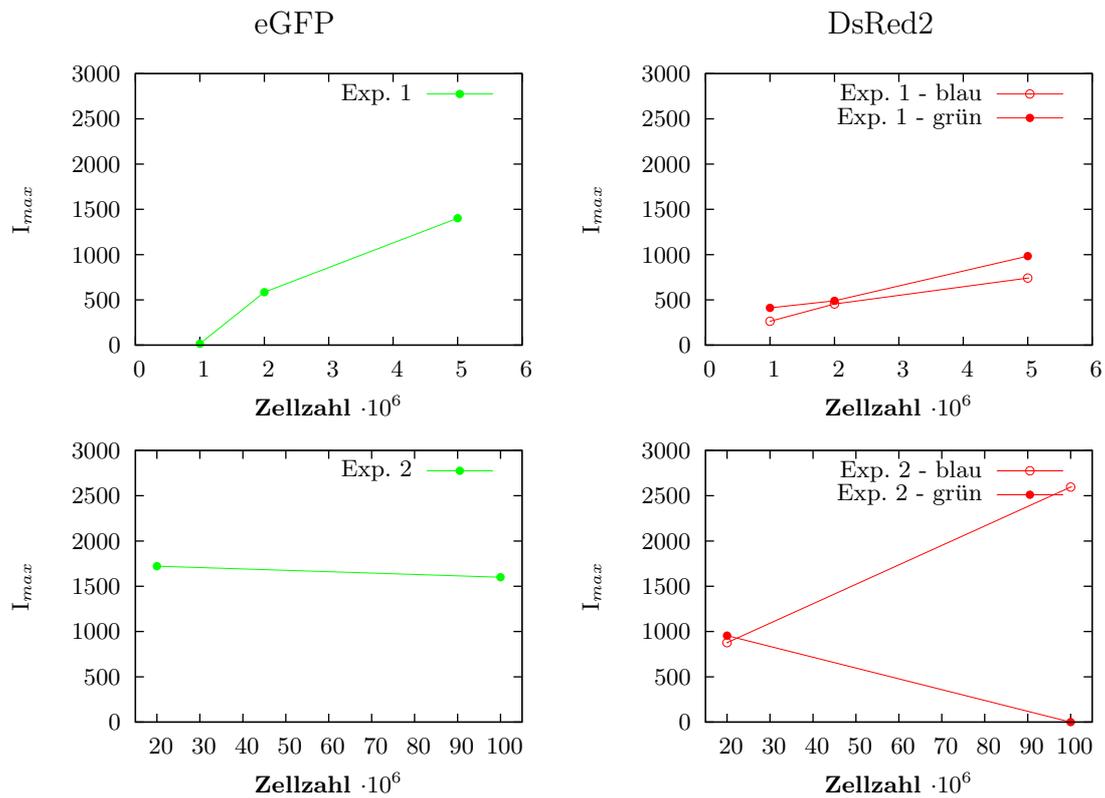


Abbildung 3.10: Der Versuch zur Zellzahlquantifizierung im Kadaverexperiment mittels maximaler Intensität I_{max} .

Dargestellt sind die Daten für die Klone DLD-1 FUGW 2 bzw. FUDW 4 in rasiereten Albinomäusen. Exp. 1: Experiment mit einer Zellkonzentration von $2 \cdot 10^7$ Z/mL, Exp. 2: Experiment mit einer Zellkonzentration von $4 \cdot 10^8$ Z/mL. blau: blauer Filtersatz und entsprechende Einstellungen, grün: grüner Filtersatz und entsprechende Einstellungen. Bei konstanter, auf die Autofluoreszenz optimierter Belichtungszeit aufgenommene Cubes ermöglichen keine Quantifizierung der Zellzahl mittels I_{max} , da vor allem die Überbelichtung starker Signale schnell erreicht werden kann.

Einfluss der Zellokalisierung im Tier

Es wurde untersucht, wo die Nachweisgrenze für ein Reaktionsgefäß mit 100 Mio. eGFP bzw. DsRed2 markierten DLD-1 Zellen an verschiedenen Positionen im Tier platziert liegt. Die Bildgebung erfolgte mit der konstanten, auf die Autofluoreszenz von rasierten Albinomäusen maximierten Belichtungszeit von 120 ms. Wie in Abb. 3.11 zeigt, ist die Detektion für die eGFP markierten Zellen bereits unter der Bauchdecke schwierig. Bei den DsRed2 markierten Zellen ist die Probe unter der Bauchdecke noch überbelichtet. Befinden sich diese stark fluoreszierenden Zellen tief im Bauchraum bzw. im Thorax, so sind sie jedoch nicht mehr detektierbar. Ursache hierfür ist das kurzwellige Anregungslicht der beiden FP: Bei der durch die Autofluoreszenz begrenzten Belichtungszeit durchdringt es das Gewebe nicht ausreichend, um eine tiefe Fluoreszenzemission auszulösen. Es kommt zum falsch-negativen Ergebnis, dem Unterbelichtungsphänomen. Hieran wird deutlich, dass langwelligere FP, deren Extinktion wie Emission im Spektralbereich nach rechts verschoben sind, für *in vivo* Fluoreszenzimaging unabdingbar sind. Des Weiteren kann die Verwendung von Nacktmäusen die Bildgebung verbessern, da sie 2- bis 3fach geringere Autofluoreszenzintensitäten besitzen als haartragende Albinomäuse.

3.2.2 Überlegungen zur Quantifizierung der Tumorlast

Um einen geeigneten Zusammenhang für Tumolvolumen (V) und Fluoreszenzsignal (I) zu finden, wurden die zwei folgenden, stark vereinfachten Annahmen getroffen (Formeln 3.1 und 3.2). Hierbei wurde sowohl für das Tumolvolumen als auch für die Fluoreszenz über die Zeit t bewusst der Ansatz des exponentiellen Wachstums basierend auf der Zweiteilung der Tumorzellen gewählt und etwaige Einflussfaktoren (Wachstumlimitierung; Invasion muriner, nicht fluoreszierender Zellen; Nekrose/Fibrose; 2D-Imaging) vernachlässigt.

$$\text{Das Tumolvolumen:} \quad V = f(t) = V_0 \cdot e^{\mu_V \cdot t} \quad (3.1)$$

$$\text{Die Fluoreszenzintensität:} \quad I = f(t) = I_0 \cdot e^{\mu_I \cdot t} \quad (3.2)$$

V_0 : Startvolumen

μ_V : spez. Wachstumsrate für V

I_0 : Startfluoreszenzintensität

μ_I : spez. Wachstumsrate für I

t : Zeit

$$t \text{ in Abhängigkeit von } V \text{ aus 3.1:} \quad t = \frac{1}{\mu_V} \cdot \ln \left(\frac{V}{V_0} \right) \quad (3.3)$$

$$\begin{aligned} \text{3.3 in 3.2 eingesetzt:} \quad I &= f(V) = I_0 \cdot e^{\frac{\mu_I}{\mu_V} \cdot \ln \left(\frac{V}{V_0} \right)} \quad (3.4) \\ &= \frac{I_0}{V_0^{\frac{\mu_I}{\mu_V}}} \cdot V^{\frac{\mu_I}{\mu_V}} \end{aligned}$$

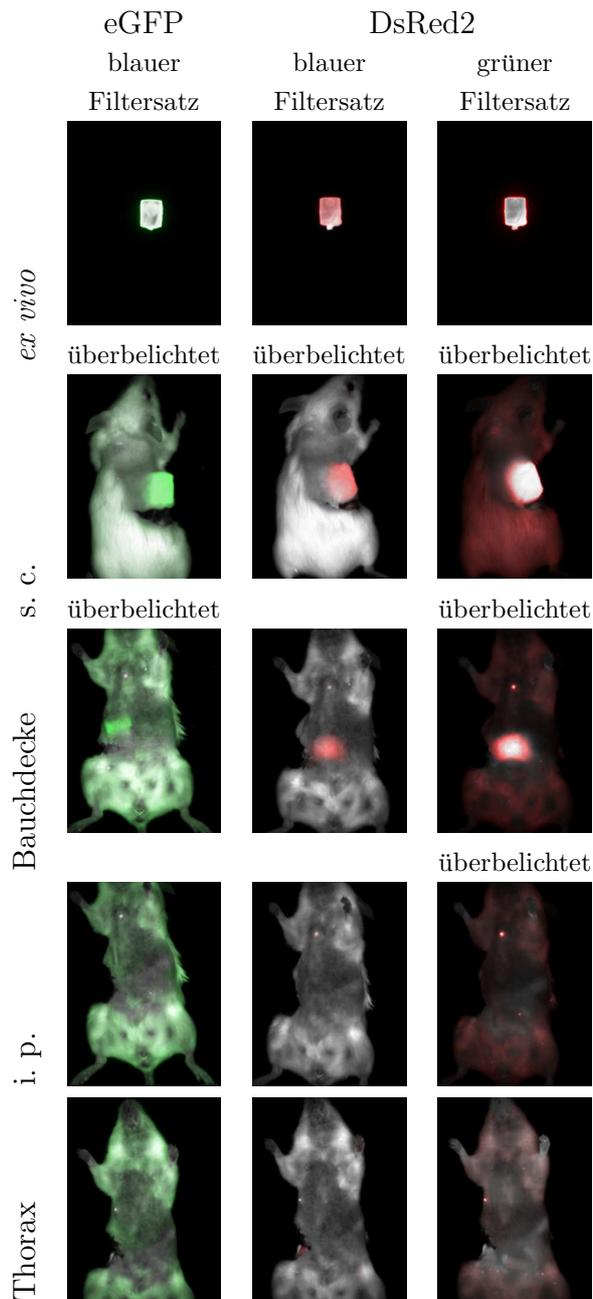


Abbildung 3.11: Der Einfluss der Zelllokalisierung im Tier.

Dargestellt sind die Unmixed Composite Images für die Klone DLD-1 FUGW 2 und FUDW 4 aufgenommen bei 120 ms Belichtungszeit. Bauchdecke: Reaktionsgefäß direkt unter der Bauchdecke, *i. p.*: Reaktionsgefäß zwischen den Darmschlingen. Im Unmixed Composite Image werden die überbelichteten Bereiche weiß als Autofluoreszenz dargestellt und nicht grün bzw. rot wie es für zum FP gehörend Signale der Fall wäre. Es wird deutlich, dass für die kurzwelligen FP eGFP und DsRed2 selbst bei 100 Mio. Zellen keine Detektion tief im Bauchraum bzw. im Thorax möglich ist.

Das theoretische Modell des potentiellen Zusammenhangs mit den Parametern A & B:

$$I = f(V) = A \cdot V^B \quad (3.5)$$

$$A = \frac{I_0}{V_0^{\mu_V}} \quad \text{und} \quad B = \frac{\mu_I}{\mu_V}$$

Es wurde t in Abhängigkeit von V ausgedrückt (Formel 3.3) und in I eingesetzt (Formel 3.4), um den Zusammenhang zwischen V und I herzuleiten. Das Ergebnis ist ein potentieller Zusammenhang zwischen V und I , wobei in den Exponenten die Wachstumsraten beider Größen eingehen (Formel 3.5). Haben beide Wachstumsraten die gleiche Größe, so vereinfacht sich der Zusammenhang auf eine lineare Funktion. Dies gilt dann, wenn die Annahmen (Formeln 3.1 und 3.2) gültig und die Einflussfaktoren vernachlässigbar sind. Wächst nun μ_V schneller als μ_I , so hat die Potenzfunktion einen abgeflachten Verlauf, da der Exponent B kleiner als 1 ist. Dies könnte z. B. durch massive Rekrutierung muriner, nicht fluoreszierender Stromazellen in den Tumor der Fall sein. Sollte der Exponent B größer als 1 sein, so wächst I schneller als V . Dies könnte bei einem sehr kompaktem Tumor auftreten, der kein Stroma rekrutiert oder bei intrakutanem Wachstum eines s. c. Xenografts. Ob sich dieser theoretisch entwickelte potentielle Ansatz für den Zusammenhang zwischen Tumolvolumen und Fluoreszenzsignal auf die *in vivo* Situation übertragen lässt und mit der Fluoreszenzintensität ein geeigneter Parameter des msFI zur Tumorlastquantifizierung gefunden ist, wurde im s. c. Xenograftmodell für verschiedene CRC Zelllinien markiert mit verschiedenen FP untersucht.

3.2.3 Untersuchungen am s. c. Xenograft

Um das Tumolvolumen als Tumorlastparameter zu ersetzen, muss eine Messgröße des msFI gefunden werden, welche sich über den gesamten Versuchszeitraum identisch verhält und unter geänderten Versuchsbedingungen gleich reagiert wie das Tumolvolumen. Das bedeutet, dass z. B. bei Tumorprogression auch die Messgröße steigen oder bei therapiebedingter Tumorregression die Messgröße abnehmen muss. In diesem Abschnitt werden die Überlegungen zu dieser gesuchten idealen Messgröße erläutert und ihre Eignung für *in vivo* Studien überprüft.

Geeignete Messgröße im msFI für Xenograftmodelle

Zunächst stellt sich die Frage, ob die gesamte Bildfläche oder eine manuelle bzw. eine über einen Grenzwert festgelegte ROI ausgewertet werden soll. Für ein orthotopes oder systemisches Xenograftmodell gilt, dass die genaue Lage wachsender Tumore nicht vorhersehbar ist. So ist zunächst keine Positionierung einer manuellen ROI möglich. Aus diesem Grund und aus der Tatsache heraus, dass die maximale Tumorgöße ebenfalls nicht prognostiziert werden kann, kann eine sinnvolle Auswertung mittels manueller ROI nur retrospektiv erfolgen. Für die Festlegung eines Grenzwertes zur Signalabgrenzung

muss die Belichtungszeit konstant sein oder der Grenzwert mittels einer geeigneten mathematischen Funktion an die geänderte Belichtungszeit angepasst werden. Zudem spielt die Lage des Tumors eine entscheidende Rolle für seine Anregbarkeit zur Fluoreszenz und die jeweilige emittierte Intensität. Wird nun der Grenzwert zu hoch angesetzt, werden tief im Tierinneren lokalisierte Tumore oder Tumoranteile unterrepräsentiert oder im schlechtesten Falle nicht erfasst, da sie entweder gar nicht als Signal detektiert werden oder kaum über dem unspezifischen Hintergrundsignal liegen. Aus diesen Gründen wurde in allen Cubes dieser Arbeit das Fluoreszenzsignal der gesamten Bildfläche (696 x 520 Pixel) ausgewertet.

Die Software stellt nach Festlegung der auszuwertenden Fläche zwei Fluoreszenzintensitäten zur Verfügung: (a) die maximale Intensität (I_{max}) und (b) die Gesamtintensität (I). Erstere gibt das höchste Pixeleinzelsignal an, Letztere die Summe aller in der Fläche enthaltenen Pixeleinzelsignale. Für beide gilt: Werden Cubes mit unterschiedlicher Belichtungszeit verglichen, so muss eine Normierung auf diese erfolgen. Die Abb. 3.12 zeigt die Ergebnisse für I_{max} und I einer repräsentativen Maus mit einem DLD-1 FUGW 2 Xenograft in der linken und einem DLD-1 FUDW 4 Xenograft in der rechten Flanke. Für I_{max} [ms^{-1}] kann festgehalten werden, dass dieser Parameter zu Beginn häufig stark streute. Mit zunehmender Tumorgroße kam es zum Abflachen der Funktion $I_{max} = f(V)$. Dies führte zu schlechten Korrelationen für $I_{max} = f(V)$. Für die langwelligeren RFP besserte sich der Zusammenhang etwas, erreichte aber nicht die gute Bestimmtheit der Funktion der Gesamtintensität $I = f(V)$.

Zusammenfassend sollte die Messung des Tumolvolumens V durch die Bestimmung der auf die Belichtungszeit normierten Gesamtintensität I [ms^{-1}] ohne Festlegung einer ROI ersetzt werden, um das Tumorlastmonitoring in späteren orthotopen oder systemischen Xenograftmodellen zu ermöglichen. Daher wurde die Korrelation von V und I im s. c. Modell unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht.

Korrelation von V und I unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen

Um das Potential und die Robustheit der auf die Belichtungszeit normierten Gesamtintensität I als Tumorlastparameter zu ermitteln, wurden Untersuchungen am s. c. Modell durchgeführt, da hier ein zeitgleiches Monitoring des Tumorwachstums durch Volumenmessung und Bildgebung möglich ist. Zur Analyse wurden zunächst die Daten für V und I über der Beobachtungszeit t [d] geplottet. Es folgte zur Bestimmung der Funktion $I = f(V)$ und ihrer Parameter ein Diagramm mit I über V in log-log-Darstellung sowie der dazugehörigen angepassten Potenzfunktion (Fit als lineare Regression mit $\ln(I); \ln(V)$). Die Parameter A und B sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 wurden ausgegeben.

Verschiedene Fluoreszenzproteine

Zunächst wurden mit eGFP, DsRed2, TurboFP635 oder mPlum markierte DLD-1 Klone im s. c. Xenograftmodell getestet (n = 28, siehe Tab. 3.4). Die Ergebnisse für einzelne, repräsentative Individuen sind in den Abb. 3.13 und 3.14 zusammengestellt. Man kann

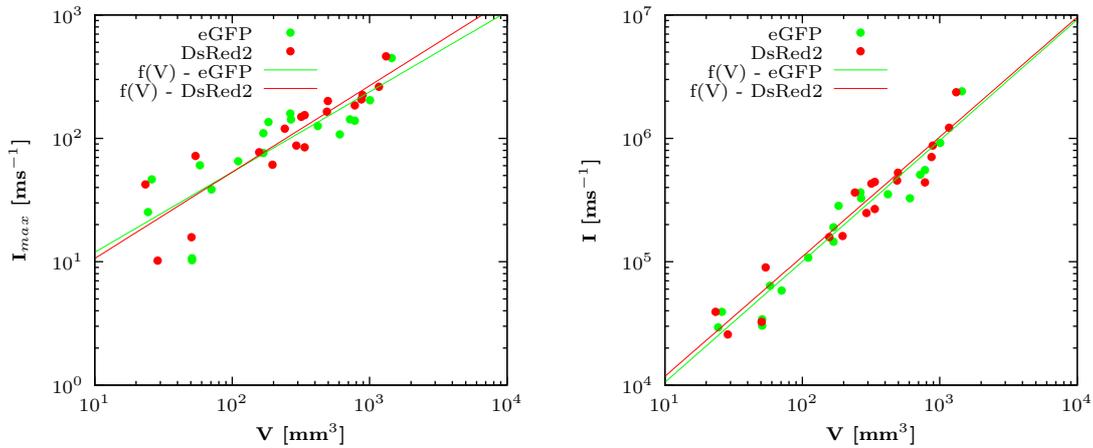


Abbildung 3.12: Der Vergleich zwischen I_{max} und I als Parameter der Tumorlast.

Dargestellt sind die Daten einer repräsentativen Maus mit zwei s. c. Xenograften: in der linken Flanke DLD-1 FUGW 2 und in der rechten Flanke DLD-1 FUDW 4. links: I_{max} korreliert nicht zufriedenstellend mit dem Tumorzvolumen. Bei kleinen Tumoren kommt es zu starken Streuungen, bei größeren Tumoren flachen die Daten zunehmend ab. Dies schlägt sich in den schlechten R^2 , für eGFP 0,69 und für DsRed2 0,81, nieder. rechts: Das Tumorzvolumen kann besser durch die Gesamtfluoreszenzintensität I ersetzt werden, da hier die Korrelation gut bestimmt werden konnte mit $R^2 = 0,93$ für beide FP.

festhalten, dass mit steigendem V die I zunimmt und die individuelle Korrelation der beiden Größen hinreichend gut ist. Damit konnte für alle FP ein über die Zeit stetiger, individueller Zusammenhang zwischen V und I als Potenzansatz gezeigt werden. Es trat eine individuelle Ausnahme bei TurboFP635 auf, bei der die Korrelation aufgrund stagnierender I bei wachsendem V nicht beobachtet wurde ($n = 1/28$; siehe *Sonderfall DLD-1 FUKW 6*).

Die Güte der linearen Regression für die Parameter der einzelnen Individuen schwankt zwischen 0,67 und 0,99, was durch die *in vivo* Situation und die Fehler der gemessenen Größen I und V begründet ist (siehe Abschnitt 3.2.4), aber ebenfalls vom Umfang der Datenstichprobe und von der Genauigkeit des gewählten Modells abhängt. Die Anpassung der Potenzfunktion an eine große Datenspannweite über drei Größenordnungen von V gelingt besser als bei kleineren Datenbereichen (ein oder zwei Größenordnungen). Daher hat z. B. ein Xenograft von DLD-1 FUKW 2 ein $B = 1,22$ mit $R^2 = 0,67$ bei einer Funktionsanpassung über Daten mit $V_{min} = 33,5 \text{ mm}^3$ bis $V_{max} = 192,4 \text{ mm}^3$. In einem Fall von DLD-1 FUKW 6 konnte kein stetiger Zusammenhang zwischen V und I erfasst werden, obwohl die angepasste Funktion mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,87 berechnet werden konnte (siehe *Sonderfall DLD-1 FUKW 6*). Diese Feststellungen machen deutlich, dass das Bestimmtheitsmaß allein nichts über die Güte einer Funktionsanpassung aussagt, sondern lediglich die Qualität der linearen Annäherung beschreibt und daher immer die Daten an sich sowie ihr sinnvoller Zusammenhang betrachtet werden müssen.

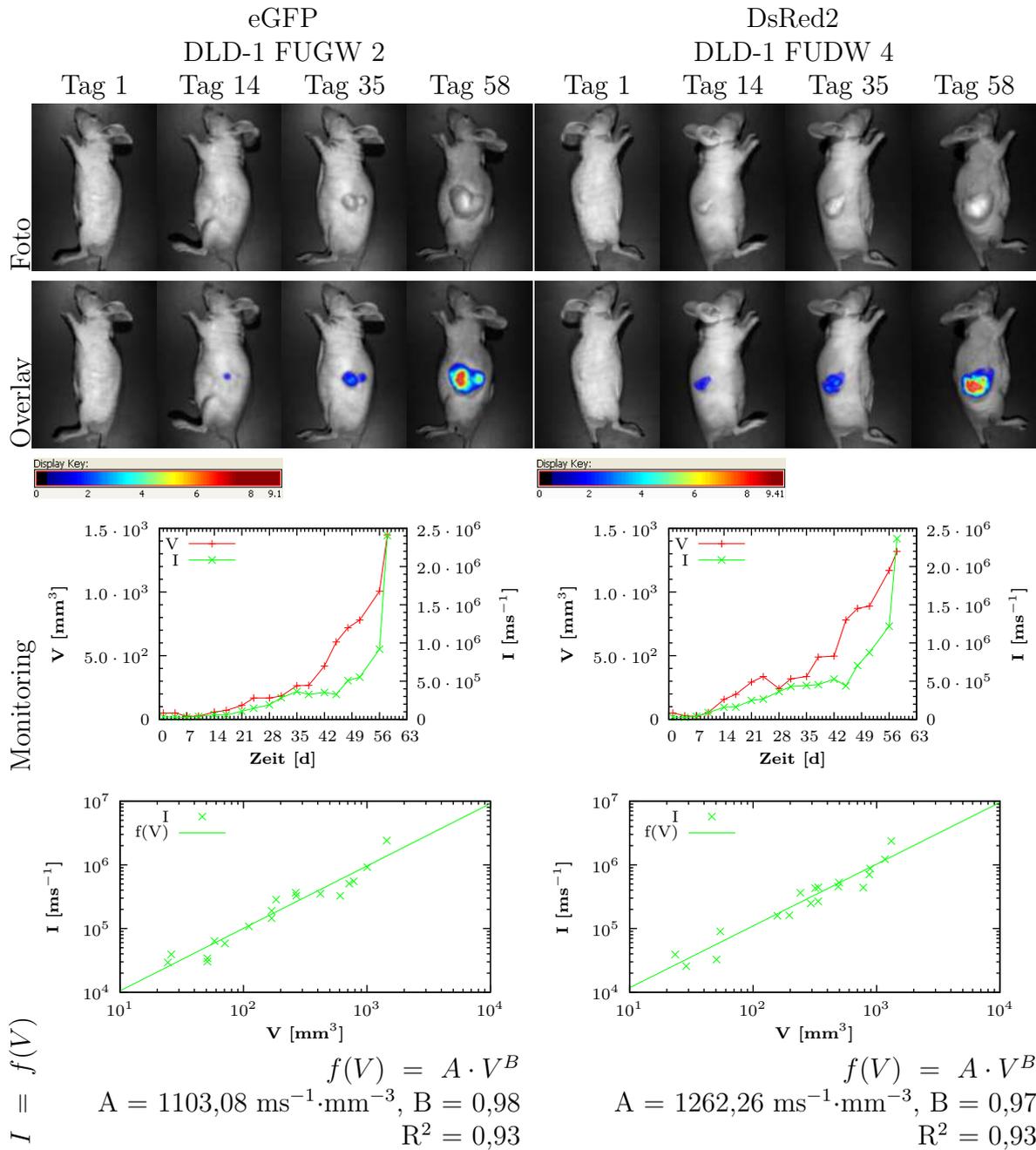


Abbildung 3.13: Die Korrelation von V und I unter verschiedenen Versuchsbedingungen - variable FP: eGFP & DsRed2.

Dargestellt sind die Ergebnisse des Monitorings von fluoreszierenden DLD-1 Klonen im s. c. Xenograftmodell für eGFP (n = 1) und DsRed2 (n = 1).

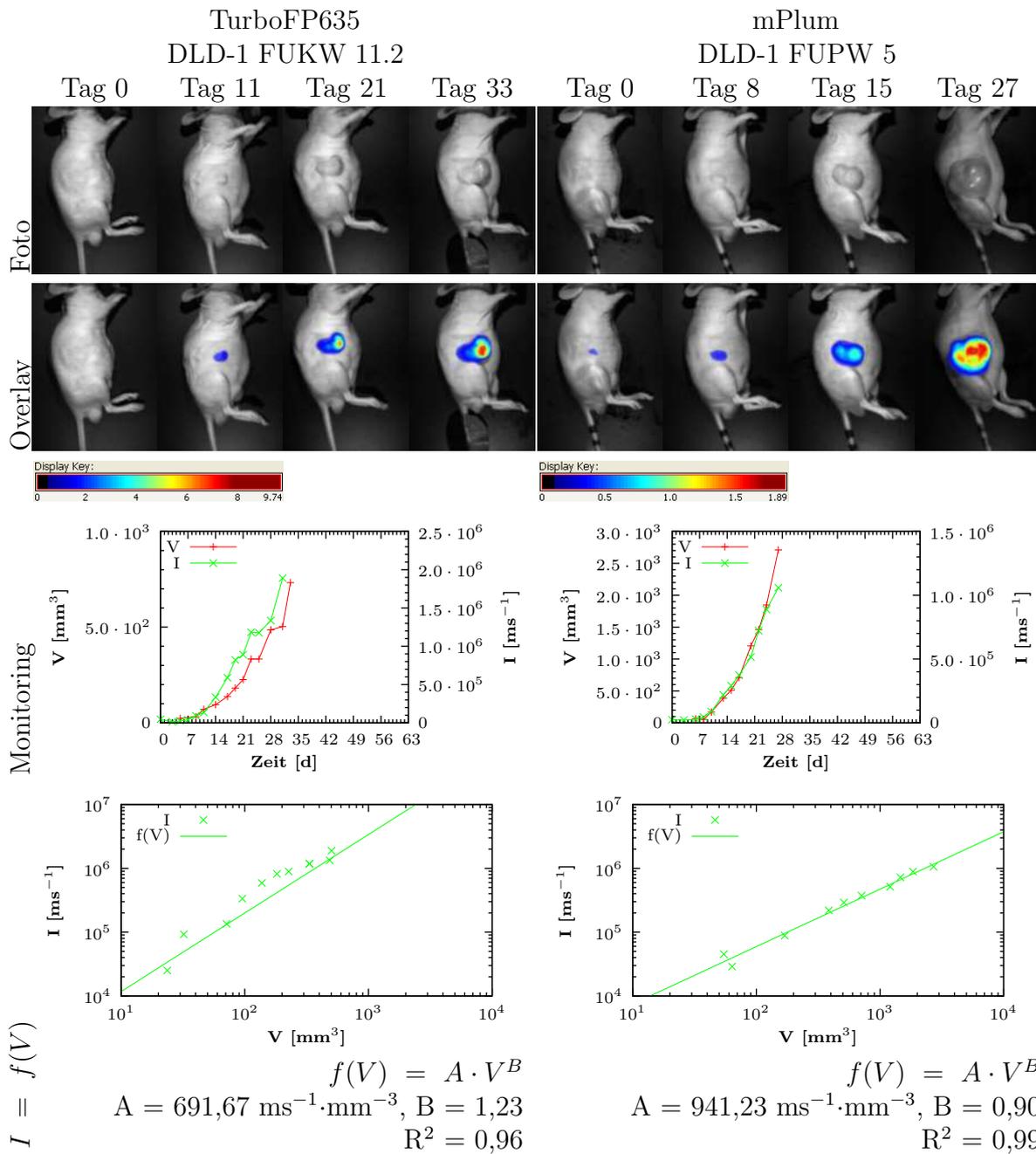


Abbildung 3.14: Die Korrelation von V und I unter verschiedenen Versuchsbedingungen - variable FP: TurboFP635 & mPlum.

Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse des Monitorings von fluoreszierenden DLD-1 Klonen im s. c. Xenograftmodell für TurboFP635 (n = 16) und mPlum (n = 10).

Tabelle 3.4: Die ermittelten Exponenten B als Verhältnis zwischen Fluoreszenzintensitätsanstieg und Volumenzunahme der angepassten Potenzfunktionen in Abhängigkeit von den s. c. untersuchten DLD-1 Klonen.

n: Anzahl der s. c. Xenografte, B: Exponent der individuell angepassten Potenzfunktion für $I = f(V) = A \cdot V^B$ mit $B = \frac{\mu_I}{\mu_V}$, R^2 : Bestimmtheitsmaß, MW: arithmetisches Mittel, S. D.: Standardabweichung des MW. Eine Variation des Exponenten in Abhängigkeit vom verwendeten Zellklon ist erkennbar. Für DLD-1 FUKW 6 konnten nur zwei Xenografte für eine sinnvolle Berechnung des Exponenten eingesetzt werden, da ein Tumor die monotone Korrelation zwischen V und I nicht erfüllte und bei zunehmendem V eine stagnierende Fluoreszenz zeigte (rot markiert).

Klon	FUGW		FUDW		FUKW			FUPW	
	2	4	2	5	6	11.2	3	5	
n	1	1	5	3	3	5	5	5	
B (R^2)	0,98 (0,93)	0,97 (0,93)	1,22 (0,67)	0,89 (0,99)	0,76 (0,87)	1,26 (0,94)	1,32 (0,95)	0,58 (0,93)	
			0,94 (0,93)	0,96 (0,97)	0,75 (0,98)	0,67 (0,92)	1,28 (0,94)	0,65 (0,98)	
			1,00 (0,84)	1,07 (0,99)	0,90 (0,97)	1,19 (0,96)	0,95 (0,93)	0,64 (0,89)	
			0,98 (0,95)			0,85 (0,95)	1,10 (0,94)	0,82 (0,96)	
			1,02 (0,94)			0,96 (0,92)	1,12 (0,94)	0,90 (0,99)	
MW B	0,98	0,97	1,03	0,97	0,83	0,99	1,16	0,72	
S. D.	-	-	0,11	0,09	0,11	0,24	0,15	0,14	

Weiterhin wurde festgestellt, dass der Exponent B und damit das Verhältnis von μ_I zu μ_V von Klon zu Klon, aber auch von Individuum zu Individuum variiert. Wächst I schneller als V, wie es bei DLD-1 FUPW 3 meist der Fall ist, so ist $B > 1$. Entwickeln sich V und I über die Zeit gleich schnell oder kompensieren bisher nicht berücksichtigte Parameter eine mögliche Unausgewogenheit von V und I, so liegt eine lineare Funktion vor ($B \approx 1$). Nimmt V sehr schnell zu im Vgl. zur I (z. B. durch einströmendes, nicht fluoreszierendes, murines Stroma oder starke Nekrose/Fibrose), so wird $B < 1$ wie bei DLD-1 FUPW 5. Ausführlichere Überlegungen zu B und dem Einfluss des Stromas sowie der Xenograftarchitektur finden sich auf S. 85.

Zusammenfassend muss man festhalten, dass die für eine Maus individuelle Korrelation zwischen V und I über den Versuchszeitraum in der Regel ($n = 27/28$) gut durch den Potenzansatz beschrieben werden kann. Fasst man die Werte des Parameters B für einzelne Klone zusammen, so sind S. D. von 10 bis 20 % vorhanden (siehe Tab. 3.4), was bereits recht große Abweichungen sind. Würde man ferner die Parameter abhängig vom FP für die Zelllinie DLD-1 zusammenführen, so würden die Fehler weiter wachsen. Es ist also nicht sinnvoll, eine Potenzfunktion für ein FP im s. c. DLD-1 Xenograftmodell zu bestimmen und mit dieser von gemessenen I auf vorhandene V zurückzurechnen, um die Tumormasse eines Tieres zu einem bestimmten Versuchszeitpunkt zu quantifizieren. Vielmehr muss ein kontinuierliches Monitoring der Fluoreszenz mittels msFI über den gesamten Versuchsverlauf erfolgen, um der Individualität Rechnung zu tragen.

Sonderfall DLD-1 FUKW 6 bei Maus M2

Im Rahmen der durchgeführten Kleinstudien im s. c. Modell ist eine Maus aufgefallen, bei der keine monoton steigende Volumen-Intensität-Korrelation über die Zeit beobachtet werden konnte (siehe Abb. 3.15). Bei diesem Tumor stieg das Volumen kontinuierlich, wohingegen die Fluoreszenzintensität ab Tag 22 stagnierte und in ein Plateau überging. Diese Beobachtung wurde bei einem von drei DLD-1 FUKW 6 Tumoren ($n = 1/3$) bzw. bei einem von 28 s. c. gewachsenen Tumoren aus FP markierten DLD-1 Klonen insgesamt ($n = 1/28$) gemacht.

Ursache für diese Beobachtung war eine extrem stark ausgeprägte Nekrose/Fibrose des Xenografts und besonders deren Durchbruch an die Tumoraußenseite (Haut zugewandt). Das projizierte 2D-Signal des Tumors zeigt zentral einen Bereich sehr schwacher Fluoreszenzintensität, der bis Tag 34 zunahm. Die Fläche der stark fluoreszierenden Tumorbereiche stieg hingegen nur marginal an nach Tag 22. In der histologischen Untersuchung des Xenografts konnte die Dominanz der nekrotisch/fibrotischen Bereiche nachgewiesen werden, lediglich auf der Bauchseite zeigte sich noch eine größere vitale Tumorzellschicht.

Das Phänomen der Entkopplung von Fluoreszenzintensitätsanstieg und Volumenzunahme wurde nur in diesem einen speziellen Fall beobachtet. Da keine Aussage über die Häufigkeit dieses Ereignisses bei Klon FUKW 6 gemacht werden kann und unklar ist, ob diese Beobachtung ausschließlich s. c. auftritt, zudem dieser Klon nur relativ schwach fluoresziert (siehe Tab 3.3), wurde er nicht für weitere orthotope bzw. systemische *in vivo* Untersuchungen genutzt.

Verschiedene Zelllinien

Neben der CRC Zelllinie DLD-1 wurden FP markierte Klone der CRC Zelllinie HT-29 im s. c. Xenograft untersucht. Zusätzlich erfolgten erste Versuche mit einem bereits im Labor etablierten eGFP markierten Klon der TGCT Zelllinie H12.1. Die Abb. 3.16 zeigt in einer zusammenfassenden Punktwolken-Darstellung alle Daten aufgeschlüsselt nach Zelllinie und FP ohne Berücksichtigung der individuellen Maus und bei DLD-1 TurboFP635 und mPlum auch unter Vernachlässigung der einzelnen Klone. Es wird deutlich, dass die prinzipielle Korrelation für V und I bei allen drei Zelllinien beobachtet werden konnte. Allerdings ist eine Berechnung des Potenzansatz und der dazugehörigen Parameter über eine Zelllinie wenig sinnvoll, denn die Vernachlässigung von FP, Zellklon und Mausindividuum führt zu sehr ungenauen Daten (vgl. Tab. 3.4 für die Betrachtung einzelner DLD-1 Klone).

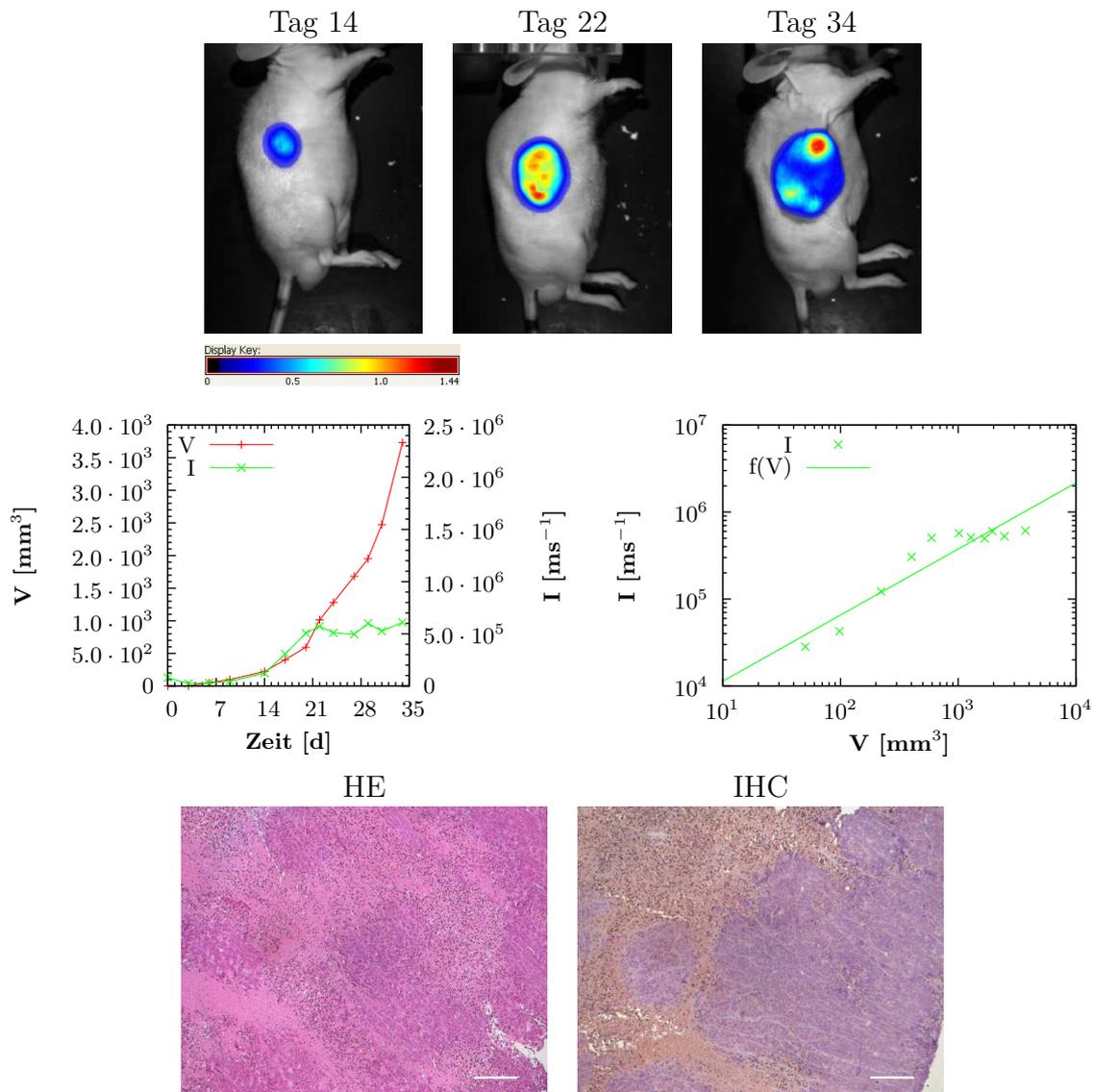


Abbildung 3.15: Ein Sonderfall: Monitoring von DLD-1 FUKW 6 als s. c. Xenograft in Maus M2.

Dargestellt sind die Overlays von Maus M2 für das *in vivo* Signal von TurboFP635 sowie die Graphen zum Monitoring dieses Individuums. Ergänzend sind HE und IHC (mit anti-tRFP) des Xenografts dargestellt. weißer Balken: 100 μ m. Es kam ab Tag 22 anstatt zu der erwarteten monoton steigenden Funktion $I = f(V)$ zu einem deutlichen Abfall in der Korrelation von V & I, was zu einer schlechten Bestimmung der Funktion führte ($A = 1974,24 \text{ ms}^{-1} \cdot \text{mm}^{-3}$, $B = 0,76$ mit $R^2 = 0,87$). Die Tumoroberfläche wies zunehmende Areale schwacher Fluoreszenz auf (blau im Overlay), was durch zunehmende Nekrose/Fibrose verursacht wurde.

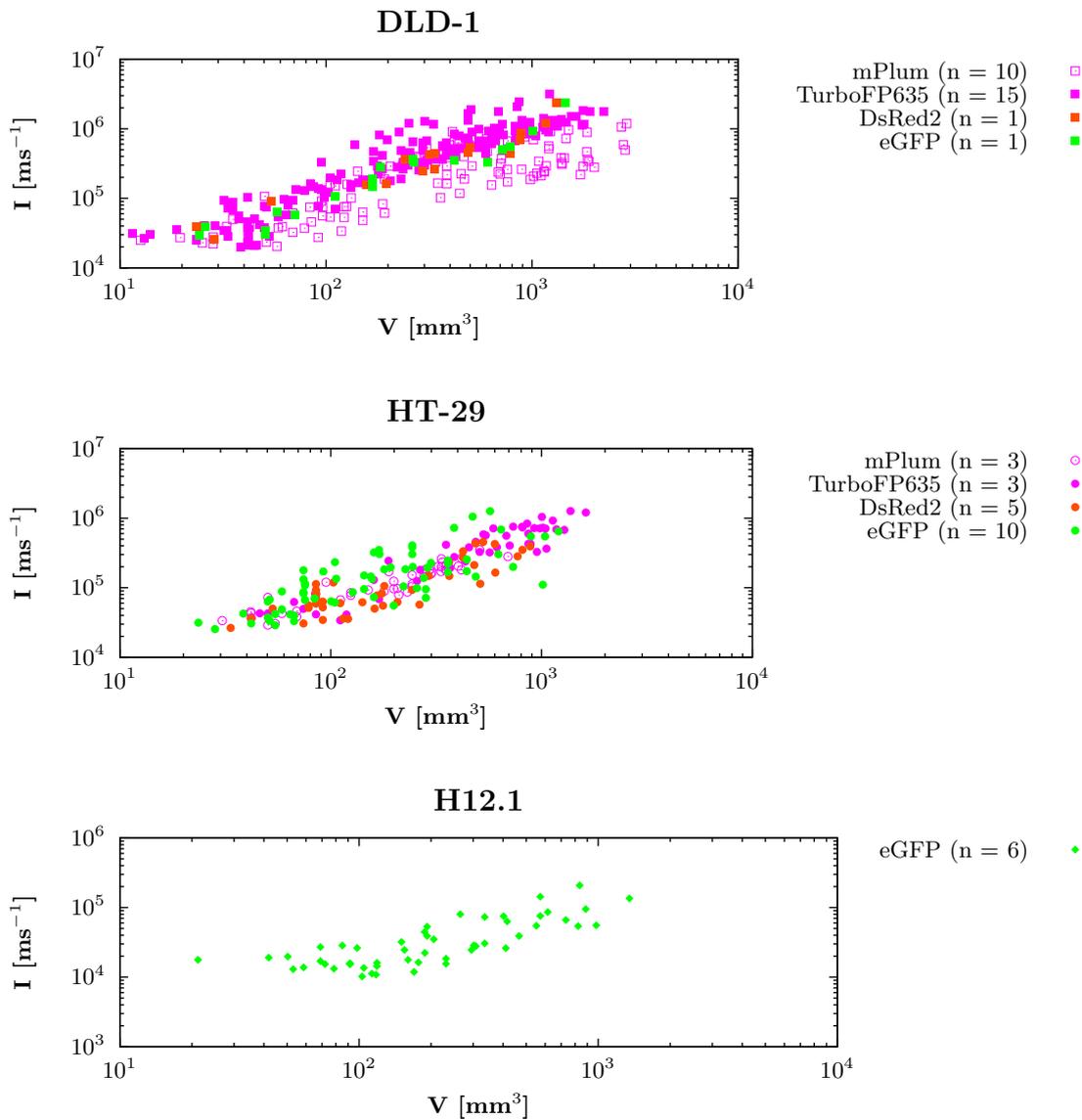


Abbildung 3.16: Der Zusammenhang zwischen Tumorzellen und Gesamtfluoreszenzintensität in Abhängigkeit des verwendeten Fluoreszenzproteins für verschiedene humane Tumorzelllinien.

V: Tumorzellen, I: belichtungszeitnormierte Gesamtfluoreszenzintensität, n: Anzahl der ausgewerteten s. c. Xenografte. Die Punktwolken zeigen für alle drei untersuchten Zelllinien eine Korrelation zwischen V und I.

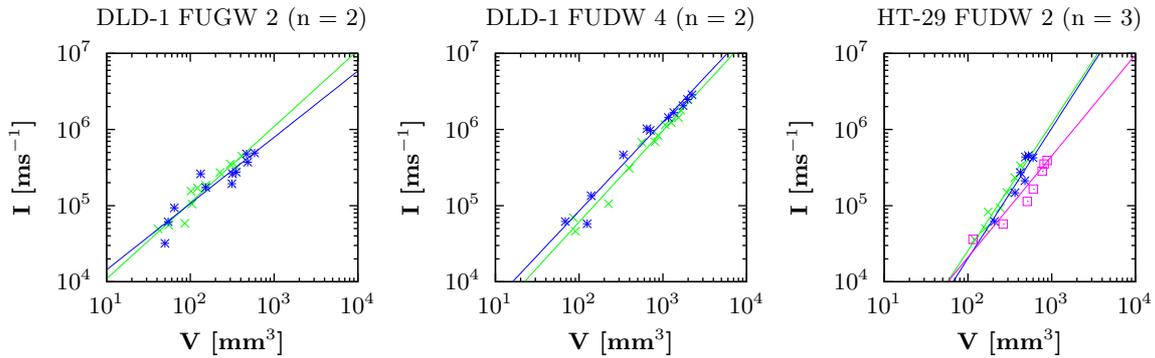


Abbildung 3.17: Das Monitoring von mehreren Tumorherden im s. c. Xenograftmodell verschiedener CRC Zellkone.

farbiges Symbol: unterschiedliche Individuen, farbiger Graph: an Daten angepasste Potenzfunktionen. Die Daten beider DLD-1 Klone beinhalten jeweils zwei Xenografte, für den HT-29 Klon wurden drei Tumore gesetzt. Für alle untersuchten Mäuse konnte das Tumorwachstum über die Zeit sowohl mittels Schieblehnmessung und Volumenberechnung (V , Summe aller einzelnen Tumorumfänge) als auch mittels Imaging und Auswertung der auf die Belichtungszeit normierten Gesamtfluoreszenzintensität (I) verfolgt werden.

Mehrere Tumorherde

In Metastasierungsmodellen würden sich mehrere Tumorherde und damit verschieden lokalisierte Fluoreszenzquellen etablieren, die alle zur Bestimmung der Tumorlast berücksichtigt werden müssen. Da die Evaluierung von Therapien bestenfalls in diesen Metastasierungsmodellen erfolgen soll, wurden erste Vorversuche zur Bildgebung mehrerer s. c. Xenografte auf einer Mausseite durchgeführt. Wichtig ist festzuhalten, dass zwei bzw. drei Tumore gleichzeitig beobachtet wurden, aber deren Tiefenlokalisierung nicht variierte, da alle s. c. wuchsen. Die Abb. 3.17 zeigt die Daten der untersuchten Mäuse. Für alle konnte eine Korrelation mit dem aufgestellten Potenzansatz $f(V) = A \cdot I^B$ mit hinreichenden R^2 von 0,86 bis 0,98 gezeigt werden, wobei V der Summe der einzelnen Tumorumfänge und I der normierten Gesamtfluoreszenzintensität einer Mausseite entspricht. Damit lässt sich das Wachstum von mehreren Tumoren einer Tiefenebene, hier s. c., mittels normierter Gesamtfluoreszenzintensität quantifizieren.

Unter Therapie

Die bisherigen Daten umfassten ausschließlich die Auswertung von Tumorwachstum. Unter erfolgreicher Therapie wäre aber eine Tumorregression zu beobachten. Daher war zu zeigen, dass auch die Tumorlastabnahme mittels msFI erfasst und quantifiziert werden kann. Hierzu wurden jeweils 6 Mäusen Cisplatin sensitive H12.1 FUGW 11 bzw. resistente HT-29 FUGW 1.1 als s. c. Xenograft gesetzt. Nach Tumoretablierung (an Tag 26 bzw. Tag 29 post Zellinjektion) erfolgte in der Therapiegruppe ($n = 4$) die einmalige i. p. Gabe von 10 mg/kg Körpergewicht Cisplatin (CDDP). Die Kontrollgruppe

($n = 2$) erhielt i. p. 0,9 % NaCl Lösung. Die Auswertung zeigt Abb. 3.18. Das Imaging einer Maus der Therapiegruppe mit HT-29 Xenograft konnte nicht ausgewertet werden, da es zu intrakutanem Wachstum des Tumors kam und damit kein stetiger Zusammenhang zwischen V und I gegeben war. Für die Kontrollgruppen beider Zelllinien zeigte sich das zu erwartende Verhalten: Tumolvolumen und Fluoreszenz nahmen weiter zu. Das in der sensitiven Therapiegruppe der H12.1 Xenografte beobachtete sofortige Abfallen der Gesamtintensität korrelierte mit einer Volumenregression. Das Ausmaß des Tumorrückgangs variierte von Individuum zu Individuum. Eine vollständige Remission konnte nicht beobachtet werden, was bei einmaliger CDDP Gabe auch nicht zu erwarten war. Als die Xenografte erneut zu wachsen begannen, korrelierte die Volumenzunahme wieder mit der ansteigenden Fluoreszenz. Die resistenten Xenografte der HT-29 hingegen zeigten keine Reaktion auf CDDP.

Zusammenfassung

Fasst man die Ergebnisse der Untersuchungen am s. c. Xenograftmodell mit verschiedenen Versuchsbedingungen zusammen, so ergibt sich, dass die Gesamtfluoreszenzintensität I die Messung des Tumolvolumens V ersetzen kann. Der potentielle Zusammenhang beider Größen muss allerdings für jedes Xenograftmodell *in vivo* neu bestimmt werden. Unter Modell ist dabei der individuelle fluoreszierende Zellklon zu verstehen, da dieser mit seinen Eigenschaften wie Fluoreszenzintensität oder *in vivo* Wachstumsverhalten die Bildgebung entscheidend beeinflusst. Kennt man diese Charakteristika und wichtige Tumoreigenschaften wie Chemotherapieresistenz u. a., so können sinnvolle *in vivo* Studien mittels msFI durchgeführt werden, was im Idealfall orthotope und systemische Tumormodelle einschließt.

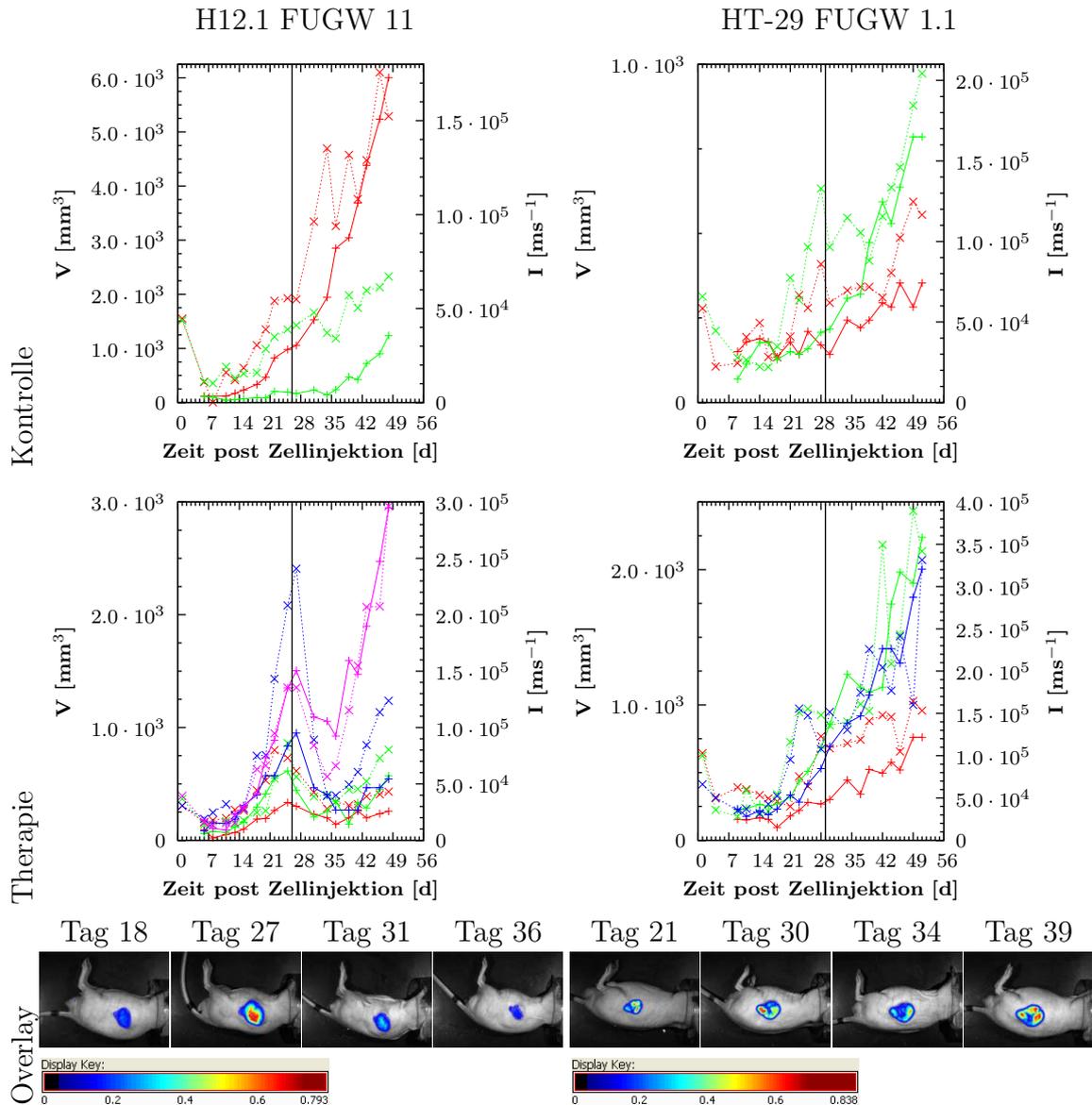


Abbildung 3.18: Das Monitoring von Therapieansprechen im s. c. Xenograftmodell einer therapiesensitiven TGCT und einer therapieresistenten CRC Zelllinie. Farbe: Individuum, solide Graphen mit \times : V, gepunktete Graphen mit $+$: I, schwarzer Strich: Tag der i. p. Gabe von CDDP (10 mg/kg KG) bzw. 0,9 % NaCl Lösung. Die CDDP sensitiven Xenografte des H12.1 FUGW 11 Klon's zeigten nach Therapiegabe einen sofortigen steilen Abfall der Gesamtintensität. Eine Abnahme der Tumervolumina setzte ebenfalls ein, fiel aber nicht so deutlich aus wie bei der Gesamtintensität. Eine vollständige, dauerhafte Remission konnte nicht beobachtet werden. Dies zeigen auch die repräsentativen Overlays des therapierten Tieres mit dem H12.1 Xenograft. Für die resistenten CRC Xenografte konnte kein CDDP Effekt nachgewiesen werden.

3.2.4 Eine Fehlerbetrachtung

Für die vorangestellten Überlegungen und die Ergebnisse zum Zusammenhang zwischen Tumorzvolumen und Fluoreszenzintensität im s. c. Xenograftmodell gilt, dass alle gemessenen Parameter vom wahren Wert abweichen: systematische und zufällige Fehler sowie Messabweichungen treten auf. Um eine Aussage zur Qualität der ermittelten Potenzfunktionen machen zu können, wurde eine Fehlerbetrachtung durchgeführt.

Berechnung des Tumorzvolumens

Die verwendete Schieblehre hat eine Skala von 1 mm. Die Länge und Breite des Tumors wurde zum jeweiligen Zeitpunkt auf 0,5 mm genau erfasst. Diese Längenmessungen sind mit einem Fehler von $\pm 0,5$ mm zu betrachten.

Der absolute Fehler ΔV ergibt sich aus der Berechnung der Tumorzvolumens mittels Ellipsoid (Formel 2.5) und dem Fehlerfortpflanzungsgesetz als totales Differential (Formel 3.6). Setzt man diesen nun ins Verhältnis zum Tumorzvolumen (Formel 3.7), so ergibt sich der relative Fehler ΔV (Formel 3.8).

$$\text{Das Tumorzvolumen:} \quad V = b^2 \cdot l \cdot \frac{\pi}{6} \quad V: \text{Volumen, } b: \text{Breite, } l: \text{Länge}$$

$$\text{Der absolute Fehler:} \quad \Delta V = \left| \frac{\partial (b^2 \cdot l \cdot \frac{\pi}{6})}{\partial b} \right| \cdot \Delta b + \left| \frac{\partial (b^2 \cdot l \cdot \frac{\pi}{6})}{\partial l} \right| \cdot \Delta l \quad (3.6)$$

$$\text{Der relative Fehler:} \quad \frac{\Delta V}{V} = \frac{2 \cdot \Delta b}{b} + \frac{\Delta l}{l} \quad (3.7)$$

$$\Delta V = \left(\frac{1 \text{ mm}}{b} + \frac{0,5 \text{ mm}}{l} \right) \cdot V \quad (3.8)$$

Man kann erkennen, dass kleine Volumina größere Fehler aufweisen als große Volumina. Die tatsächliche Tumorzgröße weicht zusätzlich vom berechneten Wert ab, da sich nicht alle s. c. Tumore zur idealisierten Ellipsoidform entwickeln. Zudem sollten Messungen mit der Schieblehre von einer Person über den Versuchszeitraum durchgeführt werden, um einen weiteren, subjektiven Störfaktor ausschließen zu können.

Messung der Gesamtfluoreszenzintensität

Zunächst ist zu klären, welche Parameter die Gesamtfluoreszenzintensität beeinflussen. Ist ein größeres Tumorzvolumen immer mit einer stärkeren Fluoreszenz assoziiert? Wird die Helligkeit eines Tumors von der verwendeten Zelllinie beeinflusst? Zur Überprüfung dieser Fragestellungen wurden pro Zeitpunkt fünffach wiederholte Messungen verschiedener Mausindividuen mit s. c. Tumoren durchgeführt und die ermittelte Gesamtfluoreszenzintensität auf Beeinflussung durch (a) die Zelllinie (H12.1, HT-29, DLD-1), (b)

Tabelle 3.5: Die Ergebnisse der Testung auf Normalverteilung für V , $\ln(V)$, I , $\ln(I)$ und S. D. [%].

V : Tumorzvolumen, I : Gesamtfluoreszenzintensität (beide $n = 315$); S. D. [%]: Standardabweichung der mittleren I ($n = 63$). Beide Tests lehnen für alle metrischen Größen, auch die logarithmierten, die Normalverteilung ab: Die Wahrscheinlichkeit p ist stets kleiner $\alpha = 0,05$ und demzufolge ist eine statistisch signifikante Abweichung der Häufigkeitsverteilung der Stichproben von der Normalverteilung anzunehmen.

Test	V	$\ln(V)$	I	$\ln(I)$	S. D. [%]
Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors	$W = 0,176$ $p < 0,001$	$W = 0,069$ $p = 0,001$	$W = 0,159$ $p < 0,001$	$W = 0,055$ $p = 0,024$	$W = 0,125$ $p = 0,015$
Shapiro-Wilk	$W = 0,736$ $p < 0,001$	$W = 0,970$ $p < 0,001$	$W = 0,866$ $p < 0,001$	$W = 0,975$ $p < 0,001$	$W = 0,920$ $p < 0,001$

die Fluoreszenzfarbe (grüne Fluoreszenz des eGFP und tiefrote Fluoreszenz der RFP Turbo635 und mPlum) und (c) das Volumen hin statistisch getestet.

Für statistische Untersuchungen müssen zunächst die metrischen Merkmale auf Normalverteilung überprüft werden, da viele Modelle nur korrekte Aussagen erlauben, wenn normalverteilte Größen verwendet werden. Sowohl Tumorzvolumen V als auch Gesamtfluoreszenzintensität I sind nicht normal verteilt. Sowohl der Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors- als auch Shapiro-Wilk-Test schlugen fehl (siehe Tab. 3.5). Die Histogramme in Abb. 3.19 zeigen eine deutliche Häufung kleiner Werte. Logarithmiert man beide Größen, so erreicht man eine bessere Verteilung und die geringe Anzahl sehr großer Werte fällt nicht mehr so stark ins Gewicht [Heitjan, 2011]. Nach der Transformation lehnen beide Tests jedoch weiterhin eine Normalverteilung ab (siehe Tab. 3.5). Betrachtet man aber die Werte der Teststatistik (W) für den Shapiro-Wilk-Test, der besonders bei kleinen Stichprobenumfängen eine bessere Teststärke als der Kolmogorov-Smirnov-Lilliefors-Test besitzt, so nähern sich diese nach Logarithmierung 1 an, was eine bessere Annäherung an die Normalverteilung anzeigt. Dies ist auch aus den Histogrammen der Abb. 3.19 zu entnehmen. Daher wurden die folgenden statistischen Tests mit den transformierten metrischen Größen $\ln(V)$ und $\ln(I)$ unter Annahme einer hinreichenden Normalverteilung durchgeführt.

Für das dritte metrische Merkmal, die normierte Standardabweichung als Maß für die Fehler der mittleren Gesamtfluoreszenzintensität, zeigt sich ebenfalls keine Normalverteilung (siehe Tab. 3.5). Die mit dem Shapiro-Wilk-Test ermittelte Teststatistik $W = 0,920$ zeigt jedoch die Tendenz zu hinreichend normalverteilten Daten. Eine zusätzliche Datentransformation erschien nicht sinnvoll, so dass mit der S. D. [%] als normalverteilt angenommener Größe gerechnet wurde.

Das komplette gemischte Modell mit allen drei Fragestellungen, also die Beeinflussung der Gesamtfluoreszenzintensität durch Zelllinie und Fluoreszenzfarbe sowie Tumorzvolumen, konvergierte nicht und wurde daher in zwei gemischte Modelle aufgeteilt. Im ersten Modell A wurde getestet, ob die logarithmierte Gesamtfluoreszenzintensität als

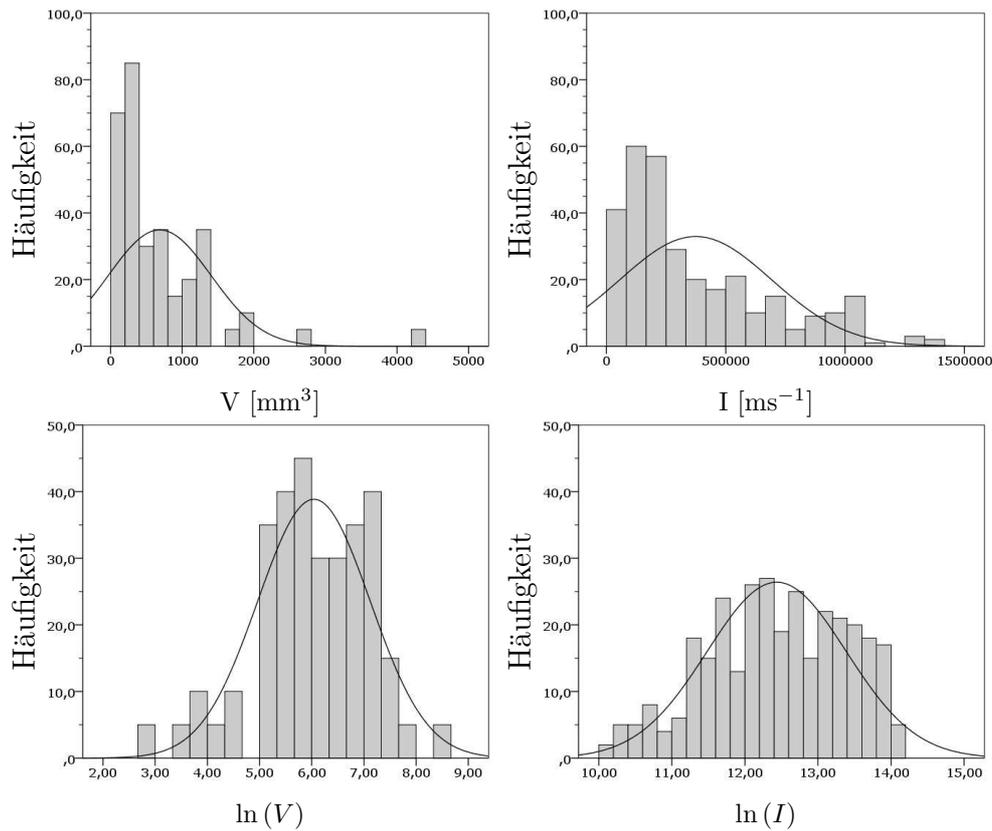


Abbildung 3.19: Die Histogramme für die metrischen Merkmale Tumolvolumen V und Gesamtfluoreszenzintensität I vor und nach Datentransformation.

Dargestellt sind die Häufigkeitsverteilung sowie die zugehörige Gaußsche Normalverteilung als Kurve. Die Mittelwerte \pm S. D. sind ($n = 315$): $\bar{V} = 684,9 \text{ mm}^3 \pm 719,9 \text{ mm}^3$ und $\overline{\ln(V)} = 6,0 \pm 1,1$ sowie $\bar{I} = 373944,2 \text{ ms}^{-1} \pm 318087,3 \text{ ms}^{-1}$ und $\overline{\ln(I)} = 12,4 \pm 1,0$.

Tabelle 3.6: Das Ergebnis der paarweisen Vergleiche im ersten gemischten Modell.

Das Modell lieferte von der Zelllinie abhängige Schätzungen für die mittlere logarithmierte Gesamtintensität, deren jeweiligen Differenzen und zur Signifikanz dieser beobachteten Abstände. DLD-1 bildet im Mittel die hellsten s. c. Tumore gefolgt von HT-29 und H12.1, wobei H12.1 Xenografte immer hoch signifikant schwächer fluoreszieren verglichen mit den beiden CRC Xenograften. Der Vergleich zwischen DLD-1 und HT-29 lieferte keinen signifikanten Unterschied in der mittleren logarithmierten Gesamtfluoreszenzintensität.

Vergleich	$\Delta \lg(I)$	p
DLD-1 \Leftrightarrow HT-29	0,611	0,129
DLD-1 \Leftrightarrow H12.1	1,639	0,004
HT-29 \Leftrightarrow H12.1	1,029	0,003

abhängige Variable von den festen Effekten (a) Zelllinie und (b) Fluoreszenzfarbe unter Berücksichtigung der Messwiederholung beeinflusst wird. Es konnte festgestellt werden, dass die Zelllinie einen hochsignifikanten Einfluss auf die logarithmierte Gesamtfluoreszenzintensität ausübt ($p = 0,006$), wohingegen die Fluoreszenzfarbe für die Intensität keine Bedeutung hat ($p = 0,671$). Es ist also wichtig, welche Zelllinie für das Imaging verwendet wird, da dies die Stärke der Fluoreszenz beeinflusst (siehe Tab. 3.6). Dies bestätigt die Beobachtung, dass es innerhalb einer Zelllinie Klone verschiedener Intensität gibt, aber sich aus DLD-1 Zellen generell die hellsten Klone isolieren ließen. Für die Intensität der s. c. Tumoren ist es aber nicht relevant, welche Farbe das emittierte Licht aufweist: Sowohl bei grünen und roten als auch tiefroten Xenograften treten dunkle wie helle Exemplare auf.

Im zweiten Modell B folgte die Überprüfung der Hypothese, dass (a) Zelllinie als fester Effekt und (c) logarithmiertes Tumolvolumen als zufälliger Effekt die logarithmierte Gesamtfluoreszenzintensität als abhängige Variable unter Berücksichtigung der Messwiederholung beeinflussen. Hier bestätigte der Parameter Zelllinie seinen Einfluss auf die Helligkeit der s. c. Xenografte ($p < 0,001$). Das logarithmierte Tumolvolumen als Kovarianzparameter beeinflusst die logarithmierte Gesamtfluoreszenzintensität ebenfalls hoch signifikant ($p < 0,001$). Dieser Einfluss ist unabhängig von der Zelllinie ($p = 0,857$).

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so steht fest, dass die Gesamtfluoreszenzintensität der s. c. Xenografte von Zelllinie und Volumen abhängt. Betrachtet man jedoch die Fluoreszenzfarbe, so spielt diese für die Helligkeit eines s. c. Tumors keine entscheidende Rolle.

Nun musste noch überprüft werden, wovon der Fehler der logarithmierten Gesamtfluoreszenzintensität zu einem Zeitpunkt t abhängt. Als geeigneter Parameter für den Imagingfehler wurde die prozentuale Standardabweichung ($N = 63$) der mittleren Gesamtfluoreszenzintensitäten gewählt. Es wurde eine univariate Varianzanalyse dieser in Abhängigkeit von (a) Zelllinie, (b) Fluoreszenzfarbe und (c) Tumolvolumen durchgeführt. Das Ergebnis zeigte signifikante Abhängigkeiten von der Zelllinie ($p = 0,032$) und Fluoreszenzfarbe ($p = 0,003$). Das Volumen hingegen beeinflusste die Abweichung

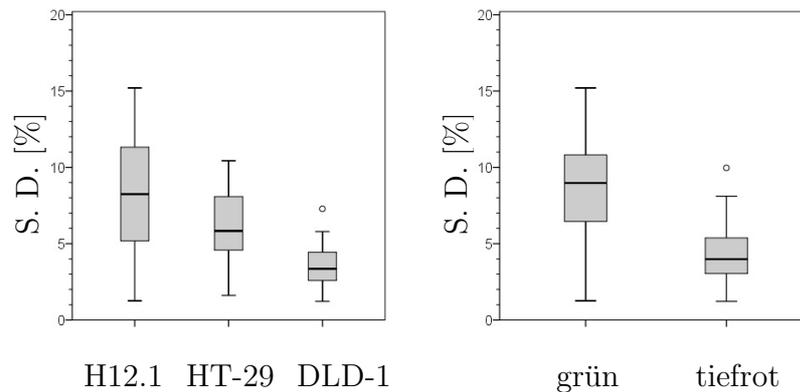


Abbildung 3.20: Die Boxplots zur Analyse der Fehlerverteilung der Gesamtfluoreszenzintensität in Abhängigkeit von Zelllinie und Fluoreszenzfarbe.

S. D. [%]: Standardabweichung der mittleren Gesamtfluoreszenzintensität ($n = 5$) bei verschiedenen s. c. Xenografts in unterschiedlichen Mausindividuen, z. T. mit Messwiederholung ($N = 63$), \circ : Ausreißer. Links: Der mittlere Fehler für DLD-1 Xenografte ist deutlich kleiner, als für H12.1 bzw. HT-29. Rechts: Tiefrote Xenografte weisen geringere Fehler auf als grün fluoreszierende. Aus beiden Plots wird deutlich, dass sowohl Zelllinie als auch Fluoreszenzfarbe einen großen Einfluss auf die Fehleranfälligkeit des msFI haben.

der Fluoreszenzintensität nicht ($p = 0,527$). Abschließend erfolgte die Visualisierung des Einflusses von (a) Zelllinie und (b) Fluoreszenzfarbe anhand von Boxplots. Die Abb. 3.20 zeigt deutlich, dass DLD-1 Xenografte die geringsten Fehler aufweisen. Dies liegt an ihrer *in vivo* Stabilität: Sie wachsen s. c. kontinuierlich wie gleichmäßig und zeigen dabei nur sehr selten optisch relevante Auffälligkeiten wie z. B. intrakutanes Wachstum. Die geringere Fehlerstreuung und der deutlich geringere mittlere Fehler der tiefroten FP erklärt sich aus ihren besseren optischen Eigenschaften: In die Erfassung der Tumorfluoreszenz gehen viele Gewebsschichten des s. c. Xenografts ein und kleine Positionierungsunterschiede wirken sich nicht stark aus. Bei grün fluoreszierenden Tumoren hingegen können bereits geringe Abweichungen in der Positionierung zur Kamera große Unterschiede in der Gesamtfluoreszenzintensität verursachen. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Tumore inhomogen strukturiert sind und nicht fluoreszierende Bereiche murinen Stromas fluoreszierende Bereiche des Xenografts überlagern können. Im Ergebnis zeigt sich, dass Abweichungen der Gesamtfluoreszenz bis zu 10 % realistisch sein können. Bei besonders gut geeigneten Modellen sind aber auch unter 5 % möglich. Dies ist unabhängig von der absoluten Gesamtfluoreszenzintensität sowie vom Experimentator, solange die Fluoreszenzquelle zentral im Imager platziert ist und keine manuelle Auswertung durchgeführt wird. Damit bietet das Imaging mit tiefroten FP auch Vorteile für das Monitoring s. c. Xenografte gegenüber der alleinigen Tumolvolumenmessung: Der Fehler der Tumorlastbestimmung mittels msFI ist unabhängig von Tumolvolumen und Experimentator. Er kann bei einem guten Modell mit weniger als 5 % angenommen werden.

3.2.5 Untersuchungen für orthotope bzw. Metastasierungsmodelle

In den Untersuchungen zum s. c. Xenograftmodell konnte gezeigt werden, dass msFI geeignet ist, die Tumorlast im Tier zu bestimmen. Da aber dieses artifizielle Modell nicht mit der Situation im Patienten identisch ist, sollen orthotope bzw. systemische Modelle entwickelt werden, die dennoch einfach zu handhaben sind sowohl hinsichtlich der Tumorbildung bzw. Tumorzellinstallation als auch des Monitorings über den gesamten Versuchszeitraum. Dafür wurden in ersten Mausstudien die mit tiefroten FP markierten CRC Zellklone der DLD-1 und HT-29 i. p. bzw. i. v. appliziert und mittels msFI beobachtet.

Intraperitoneale Zellapplikation

Für die CRC Tumorzelllinie DLD-1 wurde der Klon FUKW 5 untersucht ($n = 3$). Die Injektion der 3 Mio. Zellen erfolgte in 20 μ L Matrigel. Alle drei Individuen zeigten *in vivo* nachweisbare Fluoreszenzsignale, allerdings konnte keine kontinuierliche Xenograftbefragung durchgeführt werden. Bei Maus 1 konnte bis Tag 34 immer ein Fluoreszenzsignal unterschiedlicher Intensität erfasst werden. Danach war jedoch auch bei Neupositionierung oder Bauchraumbewegung kein *in vivo* Nachweis mehr erfolgreich. Wie sich bei Nekropsie *in situ* zeigte, war ein kleiner, abgekapselter Tumorherd im Bauchraum vorhanden, dessen Intensität allerdings sehr gering war und daher für eine *in vivo* Detektion nicht ausreichte. Die histologische Untersuchung zeigte darüber hinaus, dass keine vitalen Tumorzellen mehr vorhanden waren und lediglich die Restfluoreszenz des noch nicht abgebauten TurboFP635 erfasst wurde (siehe Abb. 3.21). In Abb. 3.22 sind einige problematische Phänomene der Bildgebung mittels msFI exemplarisch an Maus 2 dargestellt. Nach gezielter Applikation der Zellen in die Leber waren mehrere TurboFP635 Signale nachweisbar, welche in den kommenden Tagen zunächst an Intensität verloren. Ab Tag 22 konnte eine Zunahme der Intensität verzeichnet werden, allerdings stets unterschiedlich lokalisiert. An Tag 39 wurde zunächst kein Signal erfasst, nach Massage des Bauchraums mit dem Ziel der Neupositionierung der Darmschlingen gelang die Bildgebung. An den Folgetagen 46 und 48 konnte jeweils in einer Mauspositionierung das Xenograft erfasst werden, jedoch in unterschiedlicher Lage. Ab Tag 50 konnte keine eindeutige Fluoreszenz mehr detektiert werden. An diesen Bildern wird deutlich, dass die Lage des Tumors im Bauchraum, seine eventuelle Abdeckung durch gefüllte Darmschlingen und damit seine optische Entfernung zum Anregungslicht die entscheidende Größe für seine Nachweisbarkeit darstellt. Bei dem dritten untersuchten Individuum wurde *in vivo* ein an den rechten Testis assoziiertes Fluoreszenzsignal nachgewiesen, welches bei Nekropsie als einzige maligne Veränderung beobachtet wurde.

Um festzustellen, ob eine stabile Nachweissicherheit im Bauchraum lokalisierter Xenografte durch einen helleren Klon bzw. durch mPlum als längerwelligeres FP realisierbar ist, wurden jeweils einer Maus 1 Mio. Zellen DLD-1 FUKW 2 bzw. DLD-1 FUPW 3 in PBS i. p. in die Leber appliziert. Für DLD-1 FUKW 2 konnte *in vivo* kein Wachs-

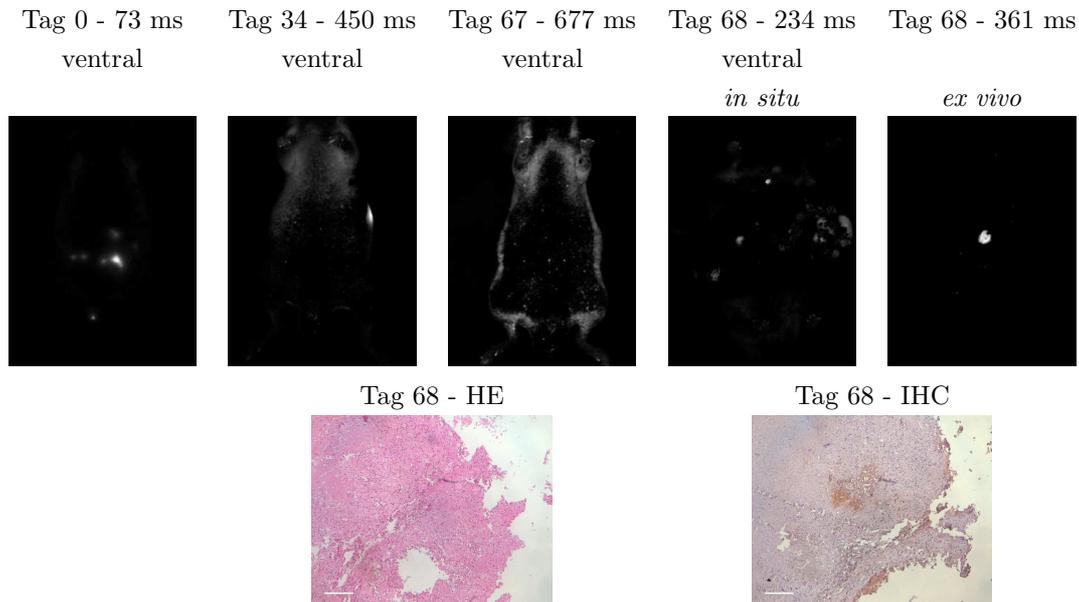


Abbildung 3.21: Das beispielhafte Monitoring von DLD-1 FUKW 5 nach i. p. Applikation mit dem Zielorgan Darm.

Dargestellt sind ausgewählte isolierte TurboFP635 Signale als Graustufenbild zum angegebenen Zeitpunkt nach Zellgabe. IHC: anti-tRFP verwendet, weißer Balken: 100 μm . Nach Tag 34 konnte kein Fluoreszenzsignal mehr *in vivo* nachgewiesen werden. Es stellte sich bei der Nekropsie ein abgekapselter kleiner, schwach fluoreszierender Resttumor dar, der nach Bewertung durch histologische Untersuchung keine vitalen Tumorzellen mehr enthielt.

tum nachgewiesen werden. Auch die Nekropsie zeigte keine malignen Veränderungen im Bauchraum. Für DLD-1 FUPW 3 zeigte sich die gleiche Nachweissicherheit wie für Klon FUKW 5: Zeitweise konnte das Xenograft dargestellt werden, zu anderen Tagen war trotz unterschiedlicher Mauspositionierung keine Detektion eines mPlum-Signals möglich.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass Detektion und kontinuierliches Monitoring von i. p. lokalisierten DLD-1 Klonen mittels msFI von tiefroten RFP schwierig sind.

Im HT-29 Xenograftmodell wurden die Klone FUKW 11 und FUPW 11 nach i. p. Injektion untersucht ($n = 3$). Die Entwicklung nach der Gabe von 1 Mio. Zellen in PBS ist den Abb. 3.23 und 3.24 zu entnehmen. Es zeigte sich, dass beide Klone nach direkter Leberinjektion sowie im Bauchraum anwachsen und gut zu verfolgen sind. Es ist festzuhalten, dass die Tumore mit TurboFP635 höhere Intensitäten aufweisen als die mit mPlum markierten. Dies ist neben den Helligkeitsunterschieden der FP an sich und der doch teilweise unterschiedlichen Xenograftlage im Tier vor allem auf die unterschiedlich starke Fluoreszenz der Klone zurückzuführen (vgl. Abschnitt 3.1.2).

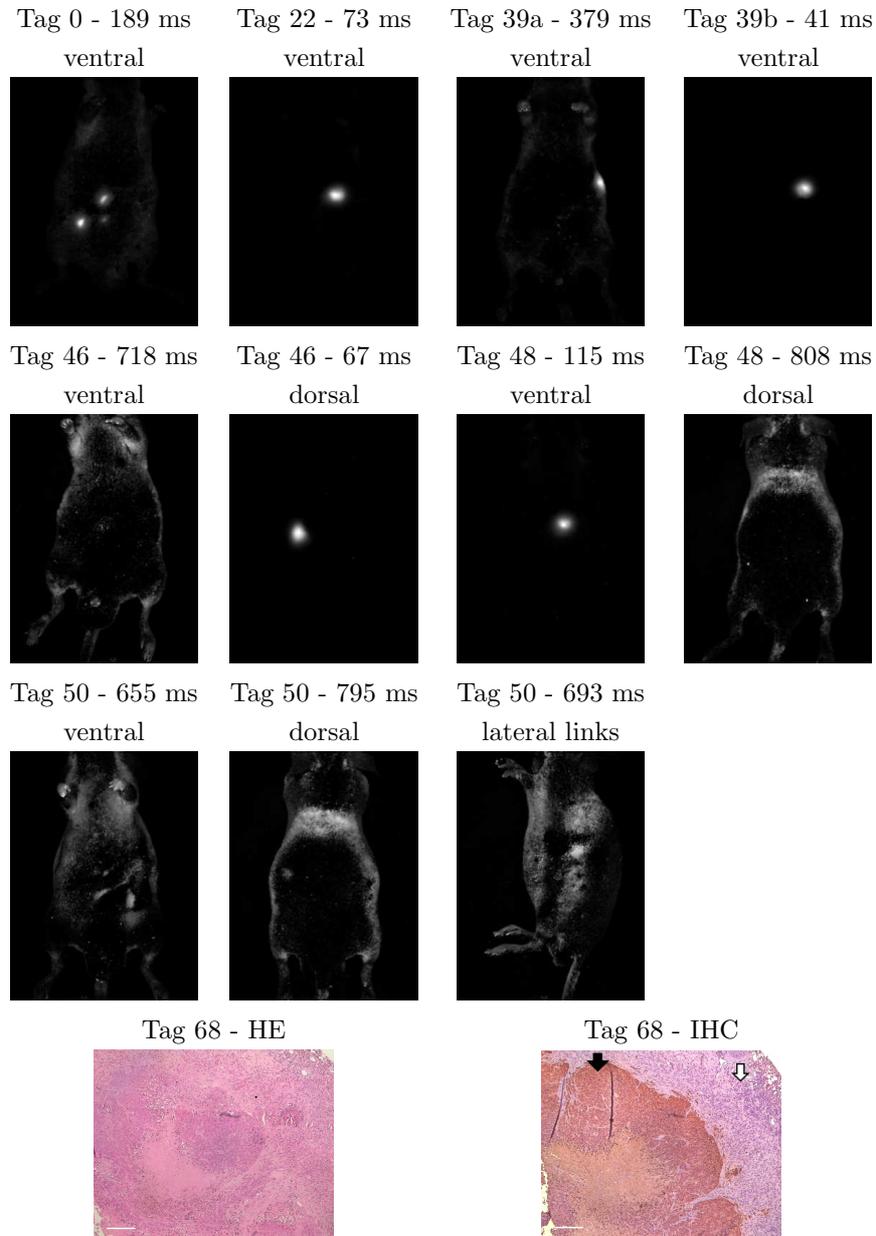


Abbildung 3.22: Das beispielhafte Monitoring von DLD-1 FUKW 5 nach i. p. Applikation mit dem Zielorgan Leber.

Dargestellt sind ausgewählte isolierte TurboFP635 Signale als Graustufenbild zum angegebenen Zeitpunkt nach Zellgabe. Zwischen Tag 39a und b wurde der Bauch massiert für eine neue Darmpositionierung. weißer Balken: 100 μ m. Die kontinuierliche Erfassung eines TurboFP635 markierten Xenografts im Bauchraum war nicht möglich (vgl. Tag 50). In der IHC (mit anti-tRFP) zeigten sich neben den Tumorzellen (schwarzer Pfeil) viele TurboFP635 negative Stromazellen (weißer Pfeil), was die Bildgebung zusätzlich erschwerte.

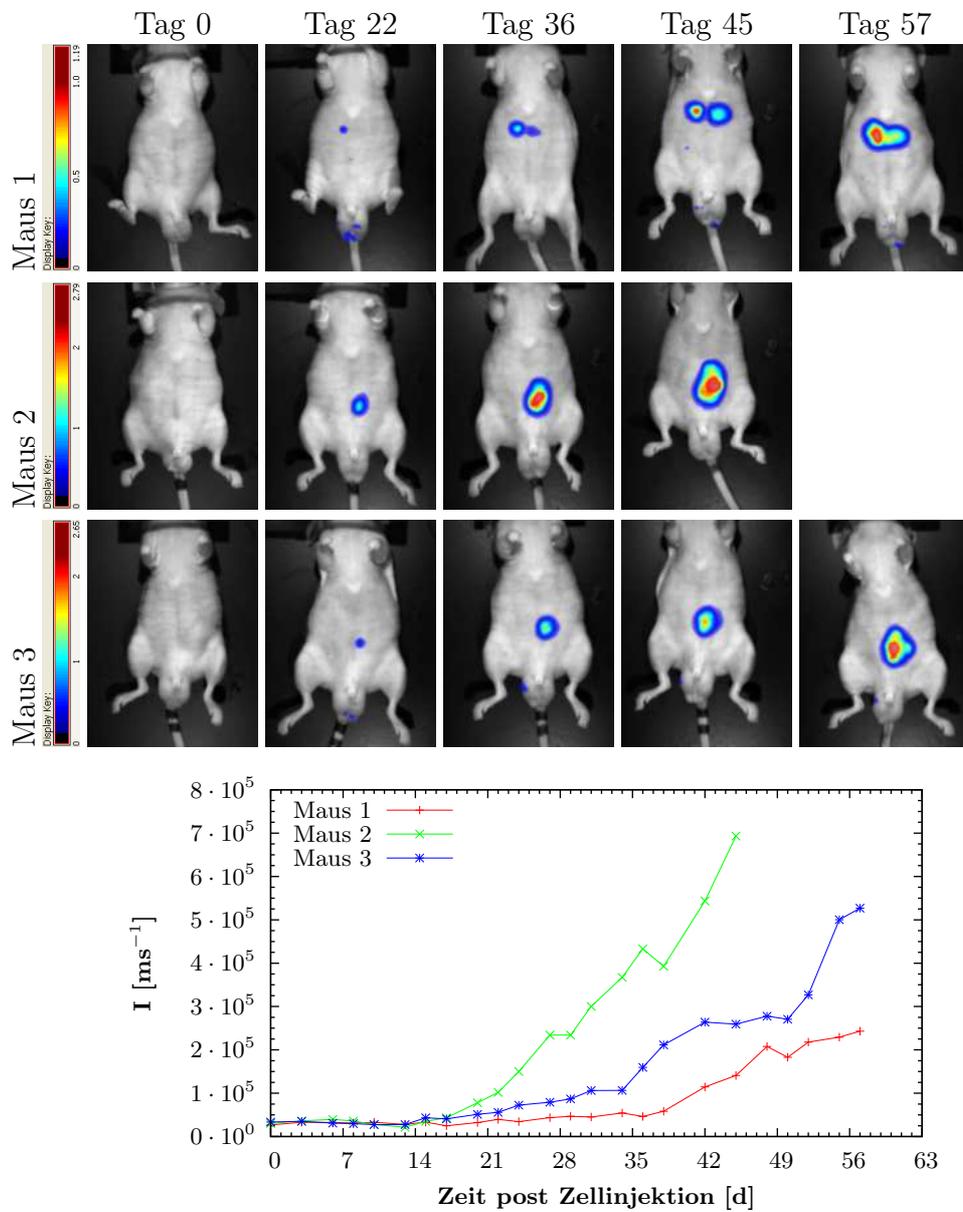


Abbildung 3.23: Das Wachstum von HT-29 FUKW 11 nach i. p. Injektion der Zellen. Dargestellt sind die Overlays für ausgewählte Zeitpunkte sowie die Zunahme der Intensität über den Beobachtungszeitraum für alle untersuchten Individuen ($n = 3$). Bei Maus 1 erfolgte die Injektion direkt in die Leber, was zu zwei Tumorherden führte: ein heller i. p. lokalisiert (rechte Mauseite) und ein dunklerer, bei Nekropsie als direkt in der Leber lokalisiert identifiziert (linke Mauseite). Die Zellapplikation bei den beiden anderen Tieren erfolgte in den Bauchraum. Maus 2 musste aufgrund eines auffälligen, starken Ikterus, vermutlich posthepatisch (Nekropsie: stark vergrößerte Gallenblase), vorzeitig getötet werden.

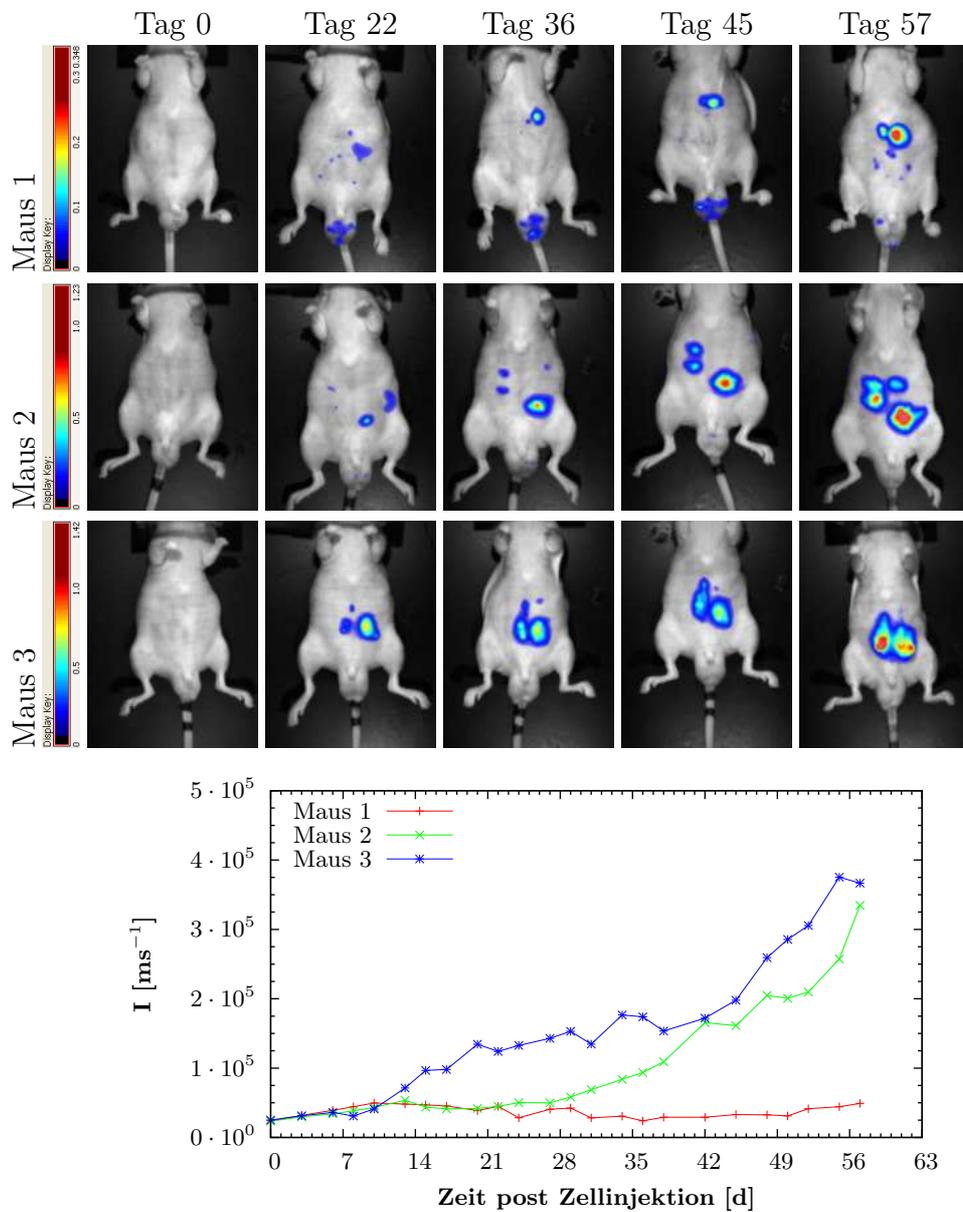


Abbildung 3.24: Das Wachstum von HT-29 FUPW 11 nach i. p. Injektion der Zellen. Dargestellt sind die Overlays für ausgewählte Zeitpunkte sowie die Zunahme der Intensität über den Beobachtungszeitraum für alle untersuchten Individuen ($n = 3$). Bei Maus 1 erfolgte die Injektion direkt in die Leber, bei den anderen in den Bauchraum. Maus 1 zeigte bei Nekropsie nur einen Tumorherd in der Leber, also tiefer gelegen als direkt an der Bauchdecke und daher ist die Intensität deutlich geringer als bei den anderen Mäusen (siehe Farbskala).

Therapieverfolgung im i. p. Xenograftmodell

Da die ersten Untersuchungen im i. p. Modell der beiden HT-29 Klone vielversprechend verliefen, wurde der Klon FUPW 11 für eine Therapiestudie genutzt. Die langwelligeren Extinktions- und Emissionsspektren sprachen für den Einsatz von FUPW 11 trotz der geringeren Fluoreszenzintensität seiner Zellen und damit auch seiner Xenografte. Es wurden 15 Mäusen 1 Mio. Zellen i. p. injiziert und deren Wachstum verfolgt.

Vier Tiere mussten aus der Studie ausgeschlossen werden, da einerseits bei zwei Mäusen kein über *in vivo* msFI detektierbares Wachstum innerhalb von 4 Wochen beobachtet wurde. Bei zwei weiteren Mäusen andererseits konnte *in vivo* kein kontinuierliches Tumorstadium nachgewiesen werden. Bei einer dieser Mäuse entwickelte sich zunächst ein Tumor im Bauchraum nahe der Bauchdecke lokalisiert. Dieser zeigte aber ab Tag 49 eine kontinuierliche Abnahme des Fluoreszenzsignals. Die Nekropsie zeigte keine weiteren malignen Veränderungen. Die histologische Untersuchung des Bauchdeckenxenografts zeigte trotz seiner geringen Größe (85 mg) bereits erste nekrotische/fibrotische Areale. Die andere Maus zeigte bis Tag 84 nur schwankende Fluoreszenzintensitäten $< 10^5$ aus einem kleinen Tumorspot an der Bauchdecke, ab Tag 69 jedoch eine zunächst unklare, langsame Gewichtsabnahme. Bei der abschließenden Nekropsie konnte als Ursache ein großer, zwischen den Darmschlingen lokalisierter Tumor (259,1 mg) gefunden werden, welcher *in vivo* mittels mPlum-Fluoreszenz nicht detektierbar war.

Die verbliebenen 11 Mäuse wurden entweder als Kontrolle ($n = 4$) mit 0,9 % NaCl Lösung oder mit einer Kombinationstherapie ($n = 7$) aus einmaliger Gabe von Irinotecan (50 mg/kg KG) und anschließender viermaliger Gabe von 5-FU (30 mg/kg KG) i. p. behandelt. Die Abb. 3.25 zeigt die Entwicklung der Gesamtfluoreszenzintensität und ausgewählte Bilder typischer Individuen zu den angegebenen Zeitpunkten. Es wird deutlich, dass die Therapiegabe zu einer Abnahme der Fluoreszenz führt. Es wird aber keine vollständige Tumorremission erreicht, was an dem Wiederanstieg der Fluoreszenz ca. eine Woche nach Therapie deutlich wird. Bei wiederholter Gabe zeigte sich erneut ein Therapieansprechen der Xenografte.

Zusammenfassend kann man festhalten: Wird ein Bauchraumtumor mittels msFI des tiefroten RFP über die Zeit sicher nachgewiesen und quantifiziert, so ist auch sein Ansprechen auf Therapiegabe verfolgbar. Die Therapie darf aber erst erfolgen, wenn nachweislich eine kontinuierliche Fluoreszenzsignalfolge und damit ein Tumorstadium vorliegt. Problematisch ist, dass das tiefrote RFP-Signal tief lokalisierter Tumore nicht immer detektiert wird, so dass die Gesamttumorlast im Tier nicht immer korrekt erfasst ist. Eine stabile NIR-Markierung der Tumorzellen könnte hier helfen, welche durch neuartige, Cofaktor unabhängige FP, fluoreszierend im NIR, realisierbar wäre [Filonov *et al.*, 2011].

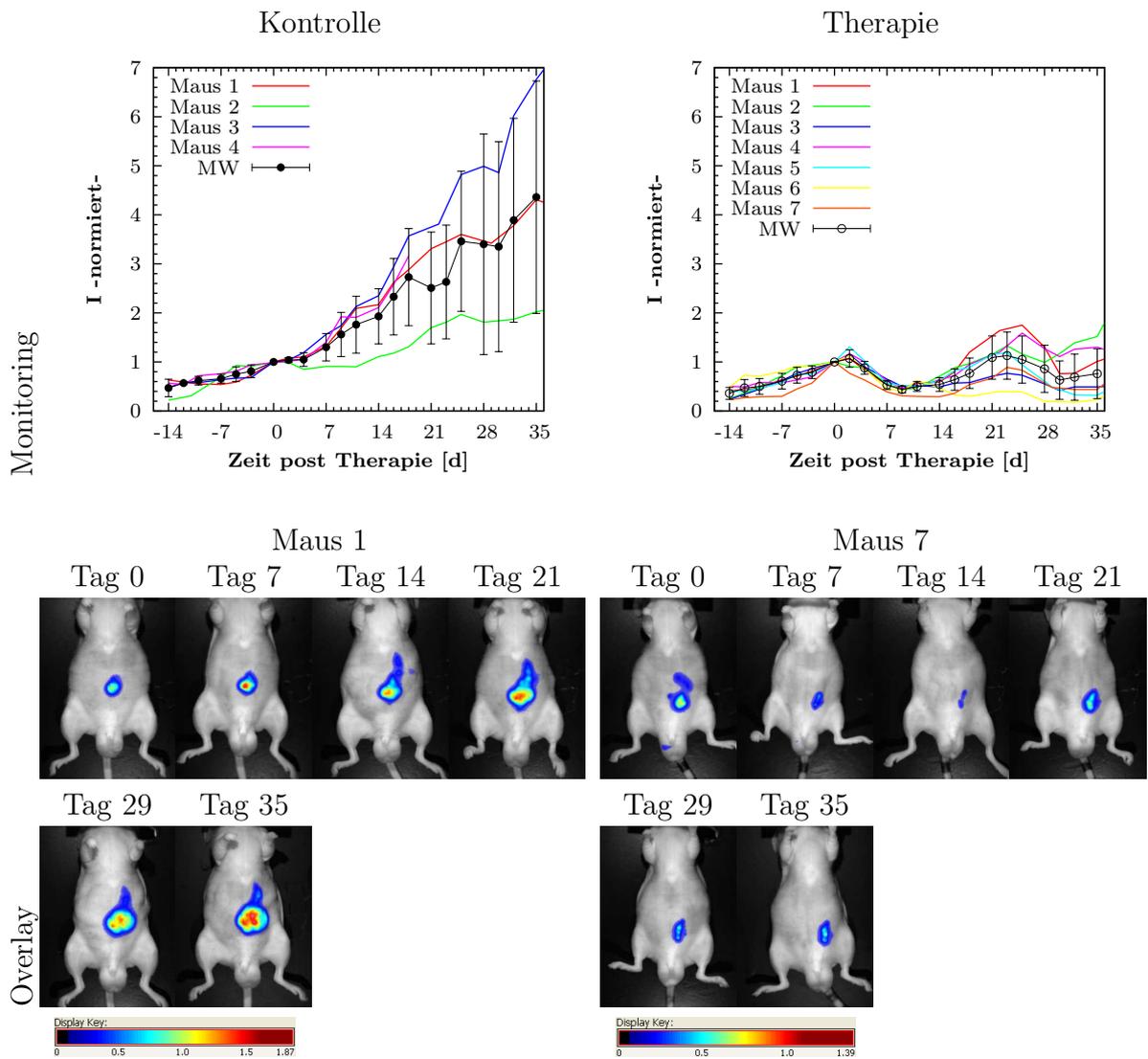


Abbildung 3.25: Eine Therapiestudie im i. p. Modell des HT-29 FUPW 11 CRC Klon. Therapiegabe erfolgte i. p. in zwei Zyklen: An Tag 0 sowie 21 Irinotecan (50 mg/kg KG) und an den Tagen 0,1,2,3 sowie 21,22,23,24 5-FU (30 mg/kg KG). MW: Mittelwertkurve \pm S. D. Die Fluoreszenzintensitäten der therapierten Mäuse fielen nach Substanzgabe ab, die Kurven der Kontrollmäuse stiegen hingegen weiter an.

Intravenöse Zellapplikation

Klone beider CRC Zelllinien wurden auch auf ihr Wachstum nach systemischer Zellapplikation untersucht. Für den Klon DLD-1 FUKW 5 ($n = 2$) konnte kein Wachstum nachgewiesen werden. Der Beobachtungszeitraum betrug 4 Monate und weder dorsale noch ventrale Aufnahmen zeigten Fluoreszenzsignale.

Für den HT-29 Klon FUKW 11 konnten Fluoreszenzsignale nachgewiesen werden (100 % *in vivo* Nachweisrate, $n = 2$). Eine Maus entwickelte einen Tumor im linken oberen Quadranten des Torso außerhalb des Brustkorbes und zeigte ab Tag 49 ein Fluoreszenzsignal an dieser Stelle. Die andere Maus zeigte Tumorwachstum an der Schwanzwurzel bereits ab Tag 5. Bei HT-29 FUPW 11 zeigte sich bei einer Maus nach Tag 52 ein Signal rechts am Hals (50 % *in vivo* Nachweisrate, $n = 2$). Die Abb. 3.26 zeigt ausgewählte Aufnahmen dieser Tiere über den bis Tag 70 laufenden Beobachtungszeitraum. Die Fluoreszenzintensitätsentwicklung über die Zeit ist nur für die Maus mit dem Tumorherd an der Schwanzwurzel zufriedenstellend: Im Laufe des Experimentes wachsen die Tumorzellen und das detektierte Signal nimmt zu. Für die beiden anderen Mäuse konnte die Quantifizierung des Tumorwachstums nicht erfolgreich durchgeführt werden. Besonders problematisch ist die sehr geringe Intensität der Fluoreszenz, was die große Fläche falsch-positiver, wenn auch sehr schwacher, Signale erklärt und auch an der Falschfarbenskala deutlich wird: Die Signale sind um den Faktor 20 bzw. 50 schwächer als die der Maus mit dem am Schwanz lokalisierten Signal. Die Histologien der entnommenen Tumore finden sich unter Abb. 3.27.

Bei allen drei Mäusen mit *in vivo* Fluoreszenz zeigten sich nach der Nekropsie *ex vivo* in den Lungen Hotspots der Fluoreszenz, welche aber zuvor *in vivo* nicht detektierbar waren. Bei der Untersuchung der histologischen Präparate wurden in den Lungen Tumorzellen und maligne Veränderungen nachgewiesen, was sich mit dem Ergebnis des *ex vivo* Imaging deckt (siehe Abb. 3.28).

Zusammenfassend gilt, dass ein Nachweis von Tumorherden nach i. v. Applikation für die HT-29 Klone erfolgreich geführt werden konnte. Eine über die Lokalisierung hinausgehende zuverlässige, d. h. eine in jedem Fall erfolgreiche Quantifizierung der detektierten Tumore ist mit dem gewählten Vorgehen nicht möglich gewesen.

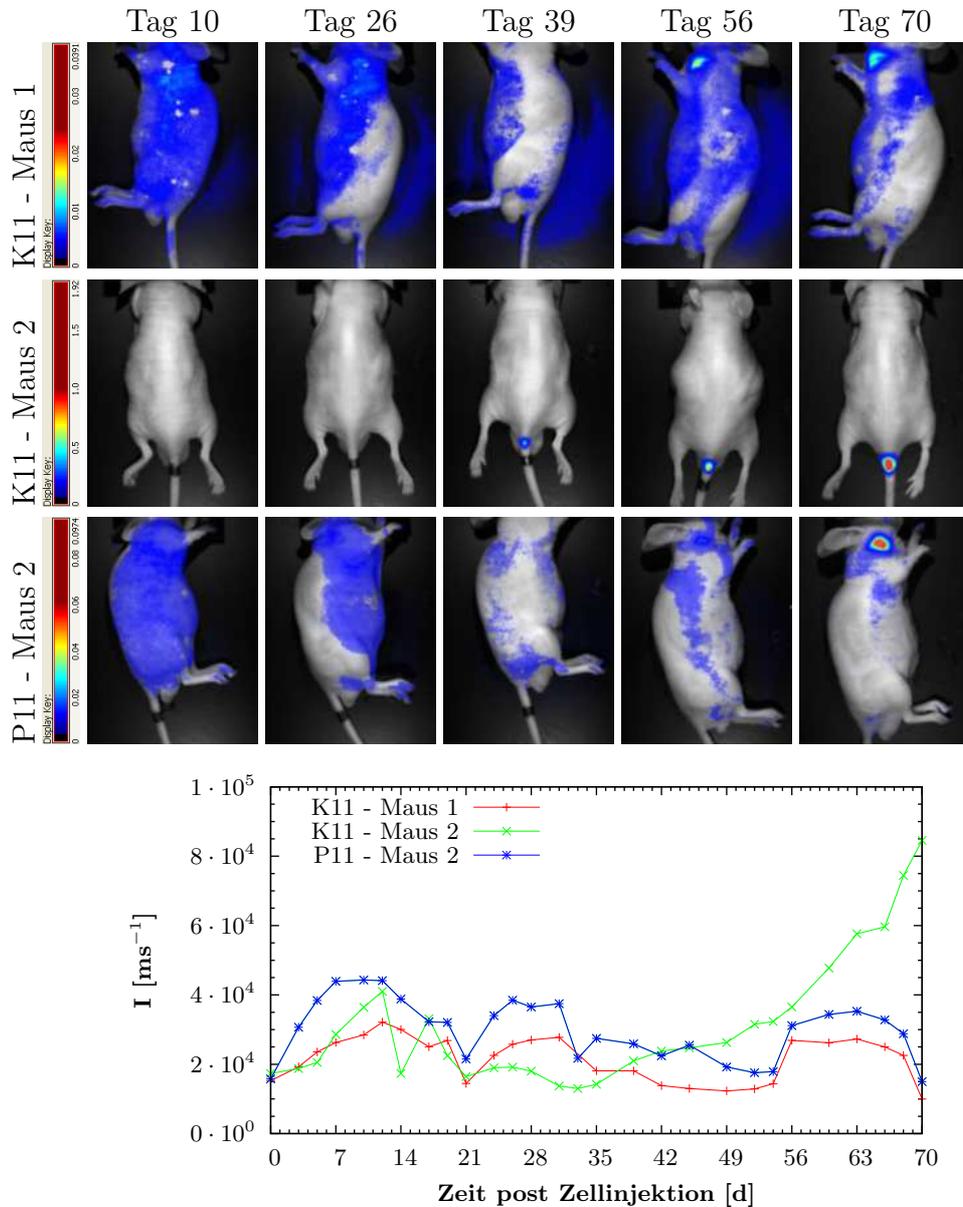


Abbildung 3.26: Das Wachstum von HT-29 FUKW 11 und FUPW 11 nach i. v. Applikation der Zellen.

Dargestellt sind die Overlays für ausgewählte Zeitpunkte sowie die Entwicklung der Intensität über den gesamten Beobachtungszeitraum. Bei drei von vier Mäusen konnte ein eindeutiges Fluoreszenzsignal detektiert werden, aber nur in einem Fall (K11 - Maus 2) gelang die kontinuierliche Quantifizierung. Für K11 - Maus 1 und P11 - Maus 2 sind zwar konzentrierte Fluoreszenzareale zu erkennen, aber die Quantifizierung schlug aufgrund der minimalen Intensität fehl: Die blauen, als falsch-positiv detektierten Areale sind zwar nur von sehr schwacher Intensität, umfassen aber viele Pixel, sodass das echte Fluoreszenzsignal mit höherer Intensität, aber deutlich kleinerer Fläche, quantitativ (noch) nicht das dominierende Signal ist.

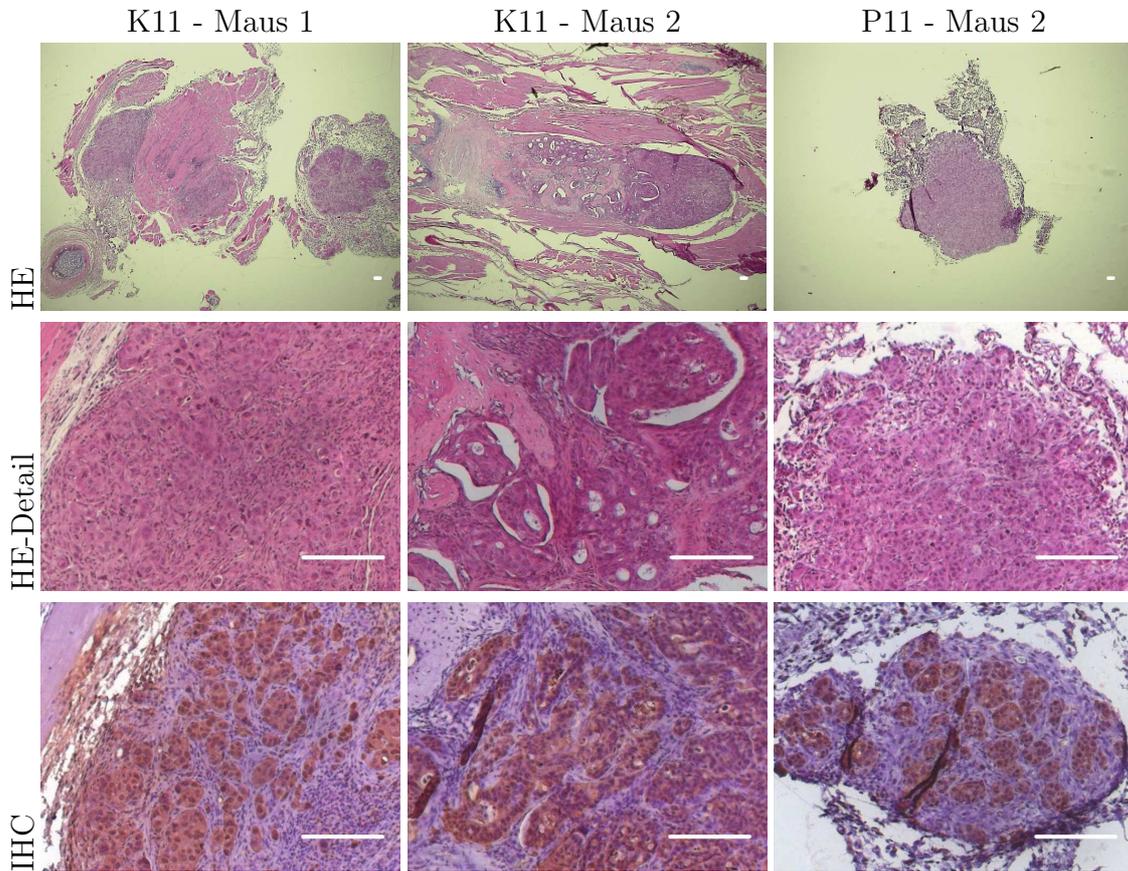


Abbildung 3.27: Die histologischen Schnitte der nach i. v. Applikation von HT-29 Zellen gewachsenen Tumore.

IHC: für K11 mit anti-tRFP, für P11 mit anti-RFP; weißer Balken: 100 μ m. Für K11 konnten zwei wachsende Xenografte nachgewiesen werden. Maus 1 besaß einen mit Stroma durchzogenen Tumor an der Halswurzel. Bei Maus 2 etablierte sich in der Nähe der Zellapplikationsstelle an der Schwanzwurzel ein Tumor, der ebenfalls durch Stromarekrutierung gekennzeichnet war. Bei P11 Injektion zeigte sich bei einer Maus Xenograftwachstum an der rechten Halsseite. Auch dieser Tumor war durch einwachsendes Stroma strukturiert: Braungefärbte, in der IHC positive Zellinseln sind umgeben von blaugefärbten Zellsträngen.

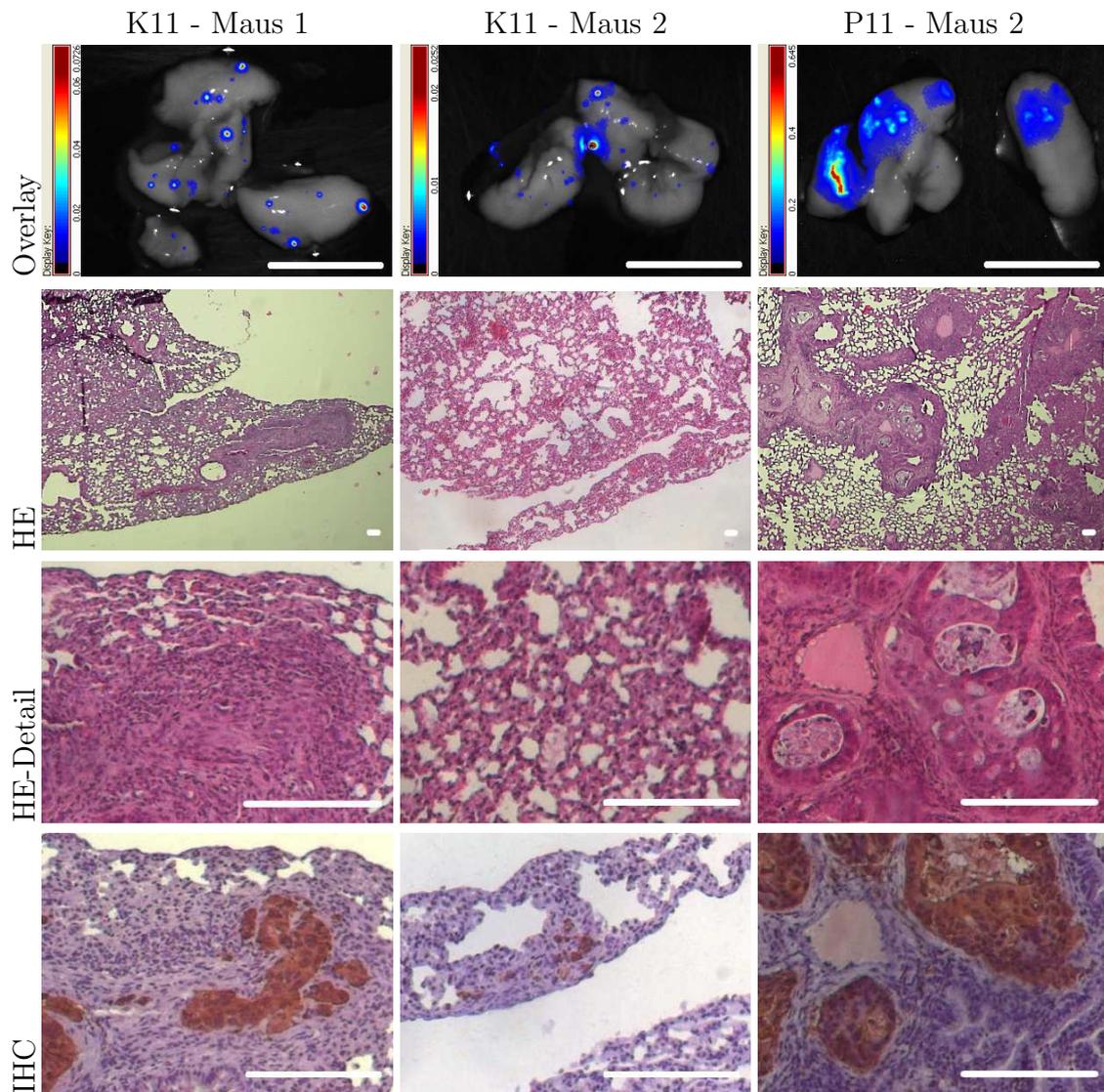


Abbildung 3.28: Die *ex vivo* Analyse der Lungen nach i. v. Applikation von HT-29 FUKW 11 und FUPW 11.

IHC: für K11 mit anti-tRFP, für P11 mit anti-RFP; msFI weißer Balken: 0,5 cm, Histologie weißer Balken: 100 μ m. Im *ex vivo* msFI konnten in allen drei Lungen Fluoreszenzsignale der RFP detektiert werden, was den abgebildeten Overlays zu entnehmen ist. Der Nachweis maligner Veränderungen in den Lungen gelang am histologischen Präparat bereits in der HE für zwei Mäuse, was über IHC anhand der Braunfärbung bestätigt werden konnte. Für Maus 2 mit K11 konnten in den Schnitten erst nach IHC einzelne Tumorzellen nachgewiesen werden.

3.2.6 Zusammenfassung

Am s. c. Xenograftmodell konnte gezeigt werden, dass es mit msFI möglich ist, die Tumorlast im Tier zu quantifizieren. Der am besten geeignete Parameter des msFI für den Ersatz des Tumolvolumens ist die auf die Belichtungszeit normierte Gesamtfluoreszenzintensität I . Ihre Stärke hängt von der Zelllinie bzw. dem verwendeten Klon ab, nicht aber vom Fluoreszenzprotein bzw. dessen Spektraleigenschaften. Weiterhin wird sie zelllinienunabhängig vom Volumen des Tumors proportional beeinflusst: größere Tumore liefern stärkere Intensitäten. Der Fehler des msFI, genauer der Fehler der normierten Gesamtfluoreszenzintensität, ist unabhängig von der Tumorgroße und dem Experimentator, was sie robuster als die Schieblehnmessung im s. c. Modell macht. Allerdings beeinflussen Zelllinie bzw. Klon und das zur Markierung gewählte Fluoreszenzprotein den Betrag des Fehlers erheblich: In optisch gut geeigneten Modellen beträgt er im Mittel unter 5 %, bei schlechteren hingegen kann er deutlich über 10 % erreichen.

Überträgt man die Tumorlastquantifizierung mittels Gesamtfluoreszenzintensität auf Xenograftmodelle mit tiefer in der Maus lokalisierten Tumorherden, so ist eine zuverlässige Detektion als qualitativer Nachweis und eine kontinuierliche Quantifizierung auch bei Verwendung tiefrot emittierender FP schwierig. Die optischen Eigenschaften des lebenden Gewebes erlauben einen Signalnachweis nur bei sehr stark fluoreszierenden, nahe der Körperoberfläche lokalisierten Xenograften.

3.3 Kontrastmittel und Modellarzneiträger NIR-HES

3.3.1 Untersuchungen zur Pharmakokinetik von NIR-HES 200

Zunächst musste die Pharmakokinetik der NIR-HES 200 untersucht werden, um den optimalen Zeitpunkt zur Bestimmung der Tumoranreicherung zu finden. Da bekannt ist, dass die HES eine gewisse Verweilzeit im Blutkreislauf hat (Plasmaexpander) und sie nach i. v. Gabe in der Haut angereichert wird, war anfangs ein hohes Signal der gesamten Maus zu erwarten. Es musste derjenige Zeitpunkt für das msFI bestimmt werden, an dem dieses Mausgesamtsignal klar zum Tumorsignal abgegrenzt werden kann, also ein aufgrund der intratumoralen Anreicherung nachweisbarer Kontrast zwischen beiden vorliegt.

Es kam innerhalb einer Stunde nach Injektion des KM zum maximalen Signal in der Maus (siehe Abb. 3.29). Neben den erwarteten intensiven Hautsignalen, wurden starke Fluoreszenzwerte in den an der Elimination beteiligten Organen nachgewiesen: Nieren und vor allem Blase für die renale Ausscheidung, aber auch Leber für den hepatischen Weg. Bereits nach 3 h hatte das Mausgesamtsignal stark abgenommen und die Verschiebung hin zur Tumoranreicherung begonnen. So konnte am Folgetag die Differenzierung zwischen Tumorsignal und Restsignal, vor allem aus der Haut, erfolgreich vorgenommen werden. Daher erfolgte das msFI zur Berechnung des Tumoranreicherungswertes (TAV) 24 h nach Applikation des KM.

3.3.2 Verwendung von NIR-HES als Kontrastmittel und Modellarzneiträger

Für die Nutzung von Polymeren in der Krebsdiagnostik und -therapie ist ihre Anreicherung entweder im Tumorkern oder zumindest an den Grenzflächen zum benachbarten, gesunden Gewebe erforderlich. Ersteres würde besonders beim Einsatz als Arzneiträger von Nutzen sein, um den transportierten Wirkstoff gezielt im Tumor freizusetzen. Letzteres wäre zur Differenzierung zwischen gesund und maligne ausreichend. Um zu klären, ob NIR-HES einerseits als KM tauglich ist, also einen sicheren Nachweis maligner Tumorerde im Körper erlaubt, und andererseits als innovativer Arzneiträger in der Onkologie eingesetzt werden könnte, wurden erste *in vivo* Untersuchungen an Xenograft tragenden Mäusen durchgeführt.

Untersuchungen im s. c. Xenograftmodell

Zunächst wurde die NIR-HES 200 in verschiedenen s. c. Xenograftmodellen der CRC Zelllinie DLD-1 getestet. Es zeigte sich, dass die Anreicherung von Xenograft zu Xenograft variiert. Besonders auffällig war der Unterschied zwischen den Klonen FUPW 3 und FUPW 5 wie der Abb. 3.30 zu entnehmen ist.

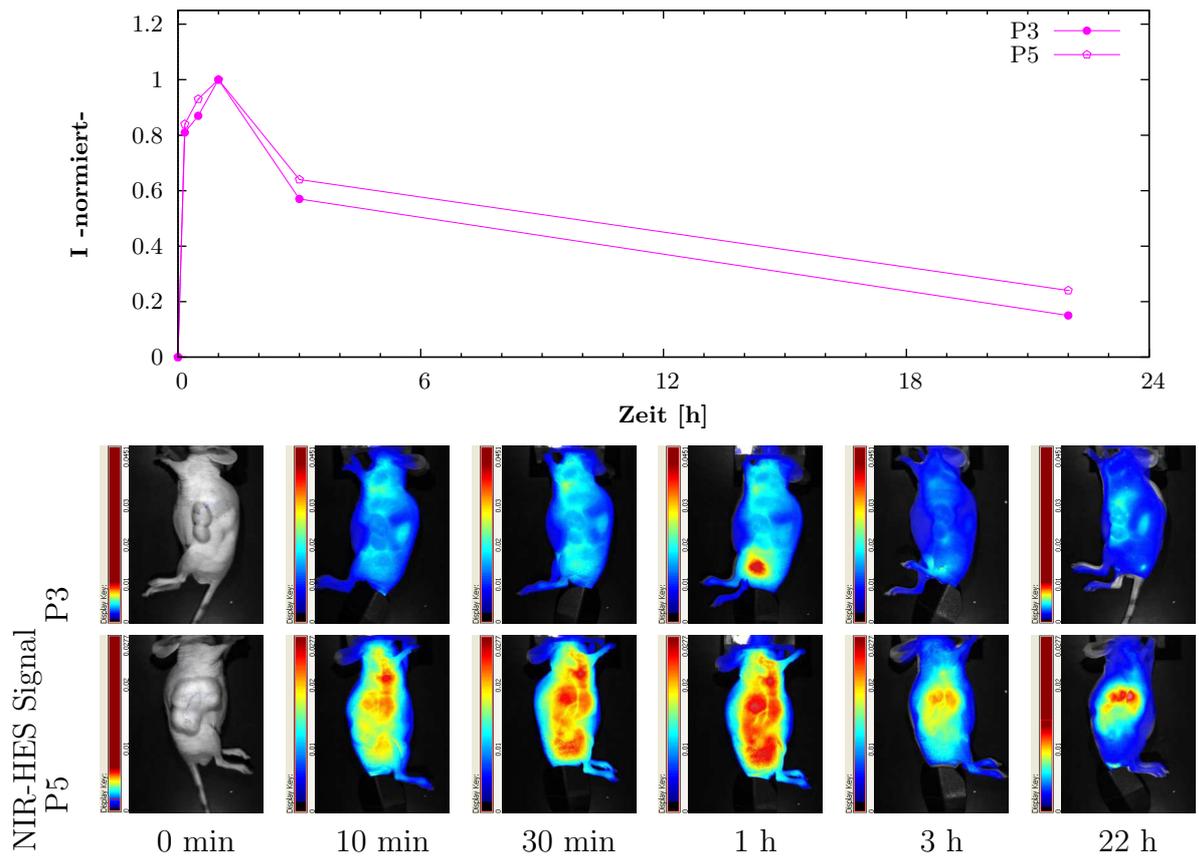


Abbildung 3.29: Zeitlicher Verlauf des NIR-HES 200 Signals für eine Maus nach i. v. Gabe.

oben: Das Diagramm der auf den Maximalwert normierten Fluoreszenzintensität einer Maus mit den s. c. DLD-1 Xenograften P3 (linke Flanke) und P5 (rechte Flanke). unten: Die für das Diagramm ausgewerteten NIR-Signale als Overlays. Man kann deutlich erkennen, dass eine sinnvolle TAV Bestimmung frühestens am Tag nach der KM Gabe möglich ist. Zudem wird bereits hier deutlich, dass es zu einer unterschiedlichen Anreicherung zwischen Xenograften kommen kann.

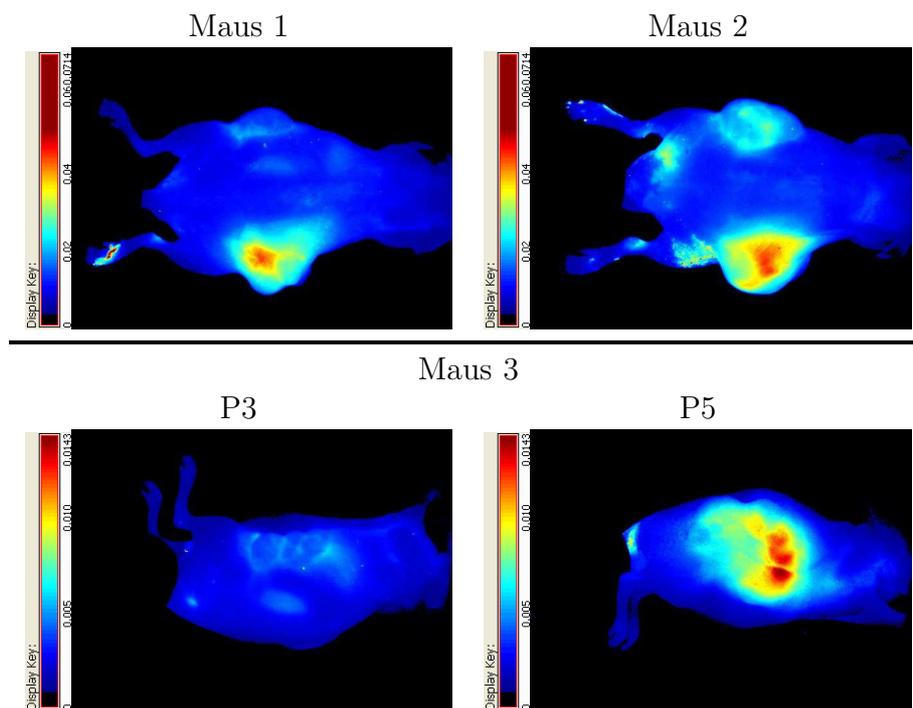


Abbildung 3.30: Differentielle Anreicherung von NIR-HES im s. c. DLD-1-Xenograftmodell.

Dargestellt sind die NIR-HES Signale von drei der vier untersuchten Mäuse mit den Xenograften P3 (linke Flanke) und P5 (rechte Flanke) 24 h nach i. v. Applikation des KM. oben: Dorsalansicht zweier Mäuse, unten: Lateralansichten der beiden s. c. Xenografte von Maus 3.

Tabelle 3.7: TAV für NIR-HES 200 in verschiedenen s. c. Xenograftmodellen.

Ausgewertet wurden Cubes, die 24 h nach i. v. Applikation der NIR-HES aufgenommen worden waren. MW \pm S. D.: arithmetischer Mittelwert und empirische Standardabweichung, Min: niedrigster Wert, Max: höchster Wert, n: Anzahl der auswertbaren Xenografte, N: Anzahl der injizierten Mäuse. Man kann erkennen, dass Xenografte, welche durch unterschiedliche Klone des gleichen genetischen Hintergrundes gebildet wurden, unterschiedliche TAV zeigen.

	DLD-1			
	FUKW 2	FUKW 11.2	FUPW 3	FUPW 5
MW \pm S. D.	1,88 \pm 0,23	2,24 \pm 0,17	1,97 \pm 0,30	2,97 \pm 0,53
Min	1,63	2,04	1,63	2,36
Max	2,09	2,36	2,19	3,33
n	3	3	3	3
N	3	3	4	4

Bei den mit TurboFP635 markierten Tumoren konnte für alle lateralen Aufnahmen 24 h nach Applikation des KM der TAV bestimmt werden. Bei den mit mPlum markierten Xenograften war dies für drei von vier Mäusen möglich. Eine Maus zeigte im NIR Imaging falsch-positive Signale, die auf Spuren des Desinfektionsmittels Sterillium[®] zurückzuführen waren (siehe Abb. 3.30 Maus 2 rechter Oberschenkel). Die Ergebnisse zur TAV Berechnung finden sich in Tab. 3.7.

Man kann anhand der TAV festhalten, dass die Tumorakkumulation zwei- bis dreimal über dem Niveau der restlichen Maus liegt. Dieses Ausmaß hängt aber vom jeweiligen Xenograft, bedingt durch dessen Strukturierung, ab. Aufgrund der geringen Anzahl der ausgewerteten Tumore wurde keine Testung auf signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Klonen und ihren TAV durchgeführt. Als Tendenz lässt sich jedoch feststellen, dass besonders Tumore mit großen nekrotisch/fibrotischen Arealen, wie sie der FUPW 5 ausbildet, höhere TAV zeigen (siehe folgender Abschnitt).

Verschiedene Klone: Imaging, der Exponent B und der Stromaanteil

Die Untersuchungen zum Imaging verschiedener FP zeigten bereits, dass die DLD-1 Klone unterschiedliche Korrelationen zwischen V und I im Potenzansatzmodell zeigen (siehe Tab. 3.4). Besonders auffällig war der Unterschied zwischen den Klonen FUPW 3 und FUPW 5: $B_{P3} = 1,16 \pm 0,15$ und $B_{P5} = 0,72 \pm 0,14$.

Sie unterschieden sich hinsichtlich ihrer Zellmorphologie bereits *in vitro* als Monolayerkultur deutlich voneinander. Die Fluoreszenzintensität von FUPW 3 ist etwa viermal höher als von FUPW 5. Des Weiteren zeigt die Abb. 3.31 repräsentativ an den Xenograften eines Individuums, dass diese trotz des gleichen genetischen Hintergrundes unterschiedlich strukturiert sind. Vergleicht man die *ex vivo* Bilder des mPlum Signals miteinander, so zeigte das FUPW 5 Xenograft eine inhomogene Intensitätsverteilung,

welche zudem noch deutlich schwächer ausfällt als bei dem Tumor des Klons FUPW 3. Das KM NIR-HES 200 hingegen zeigte die höchsten Intensitäten im FUPW 5 Xenograft. Bei dem FUPW 3 Tumor erfolgte eine KM Anreicherung ausschließlich am äußeren Tumorrand. Betrachtet man nun die Histologien beider Proben, so zeigt sich, dass Klon FUPW 5 Xenografte mit großen nekrotisch/fibrotischen Arealen ausbildete, wohingegen FUPW 3 Tumore kaum bis keine nekrotisch/fibrotischen Areale aufwiesen und hauptsächlich durch vitale Tumorzellen gekennzeichnet waren. Das Ausmaß an Gefäßversorgung zwischen beiden Xenograften variierte kaum, allerdings ist die Wachstumsgeschwindigkeit unterschiedlich: FUPW 3 Tumore wuchsen *in vivo* s. c. langsamer als FUPW 5 basierte. Dies bedingt möglicherweise, dass der Aufbau der Gefäßarchitektur im Tumor regelmäßiger und damit funktionell effektiver erfolgt, wodurch die Versorgung der Tumorzellen besser gewährleistet werden kann und sich kaum nekrotisch/fibrotischen Bereiche im Tumor etablieren. Dies könnte ebenfalls den EPR Effekt beeinflussen, da die Fenestrierung der Gefäßwände schwächer ausgeprägt sein dürfte.

Betrachtet man die Ergebnisse der IHC gegen das tiefrote RFP mPlum, so sind bei den s. c. Tumoren von Klon FUPW 3 nahezu alle Zellen positiv, d. h. braun gefärbt. Bei den Xenograften von Klon FUPW 5 ist dies nicht der Fall. Hier sind RFP negative Zellinseln (siehe Abb. 3.31 IHC - weiße Pfeile) vorhanden, bei denen es sich vermutlich um murine Zellen handelt, da die Expression von mPlum als Marker in den permanent transduzierten humanen Tumorzellen konstitutiv erfolgt und daher immer als zytoplasmatisches Protein nachweisbar ist. Stellt man die Resultate der Histologie in Zusammenhang mit dem angepassten Potenzansatz für beide Klone, so wird deutlich, dass der Exponent B bei FUPW 5 von den nicht-fluoreszierenden Zellen und den großen nekrotisch/fibrotischen Bereichen deutlich unter 1 gesenkt wird.

Demnach sind aus der Fluoreszenzmarkierung der CRC Zelllinie DLD-1 zwei Klone hervorgegangen, die *in vivo* verschieden strukturierte Xenografte mit unterschiedlichen Charakteristika bei gleichem genetischen Hintergrund aufbauen. Dies ermöglicht nun differentielle Untersuchungen z. B. zum passiven Tumortargeting in einem matched cells Modell, also an Zellen und Xenograften, die unterschiedliche Eigenschaften besitzen, aber aus dem gleichen Patienten isoliert wurden.

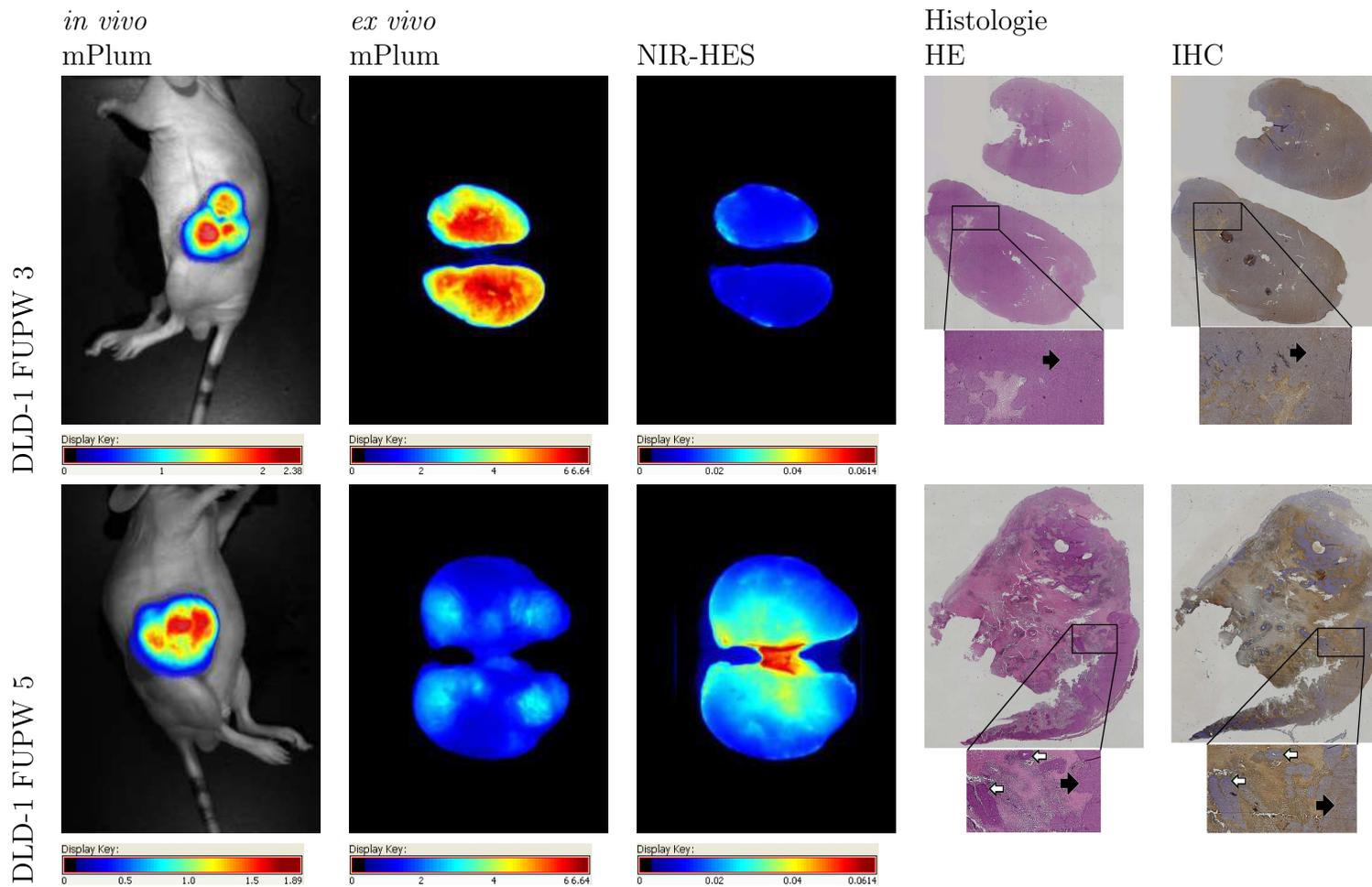


Abbildung 3.31: DLD-1 FUPW 3 und FUPW 5: ein matched cells Modell mit differentiell strukturierten s. c. Xenograften.

IHC: anti-RFP, weißer Pfeil: RFP negative Zellen (Stroma), schwarzer Pfeil: RFP positive Tumorzellen. P3 besteht nahezu ausschließlich aus vitalen Tumorzellen und zeigt im Gegensatz zu P5 keine nekrotisch/fibrotischen Areale. Daher reichert sich das KM NIR-HES nicht im Xenograft an, sondern nur am Tumorrand, der Grenze zum gesunden Gewebe.

Untersuchungen im i. p. Xenograftmodell

Es wurden 9 Mäuse der HT-29 FUPW 11 i. p. Therapiestudie vor Beendigung des Versuchs mit jeweils zwei KM untersucht. Zunächst erhielten alle Mäuse i. v. 50 µg IRDye® 800CW. Dessen Verteilung im Körper wurde 24 h später am Imager festgehalten und die TAV der Mäuse berechnet. Nach dieser Aufnahme erhielten die Mäuse am gleichen Tag die hochmolekularen KM NIR-HES 200 (n = 5) bzw. 450 (n = 4), auch wenn das Signal des niedermolekularen Farbstoffes noch vorhanden war. Wiederum 24 h später erfolgte ein *in vivo* Imaging, die TAV Auswertung sowie abschließend die Nekropsie der Tiere. Die Abb. 3.32 zeigt die Overlays in einer Übersicht.

Der Farbstoff als Beispiel für ein niedermolekulares KM zeigte 24 h nach Applikation eine schwächere Tumoranreicherung im Vgl. zu den beiden NIR-HES Varianten. Dies liegt wahrscheinlich an der sehr viel schnelleren Ausscheidung und damit reduzierten Verweilzeit niedermolekularer Substanzen im Blutkreislauf.

Des Weiteren war festzuhalten, dass die NIR-HES z. T. zusätzliche Fluoreszenzsignale zeigte im Vergleich zur Tumoreigenen Markierung nachgewiesen als mPlum Signal. Bei einem Individuum (Maus 6) war dies besonders deutlich auszumachen (siehe Abb. 3.33). In der abschließenden Nekropsie wurde festgestellt, dass diese Maus einen großen, tiefliegenden Tumor besaß, welcher durch das *in vivo* Imaging des mPlum Signals nicht erfasst wurde. Beide Xenografte dieser Maus zeigten starke FP Signale, wobei die Verteilung dieser im größeren Bauchraumtumor inhomogen war. Eine dazu invertierte Inhomogenität zeigte das KM. Der kleine Bauchdeckentumor wies ein homogenes FP Signal auf und zeigte nur in den Rachbereichen eine Anreicherung des KM. Drei weitere Mäuse wiesen im Bauchrauminnenen lokalisierte Xenografte auf, welche aber nicht durch die KM Gabe eindeutig identifiziert werden konnten. So brachte die Verwendung von NIR-HES als KM nur in einem von vier Fällen eine zusätzliche Information zur Tumorlast *in vivo*.

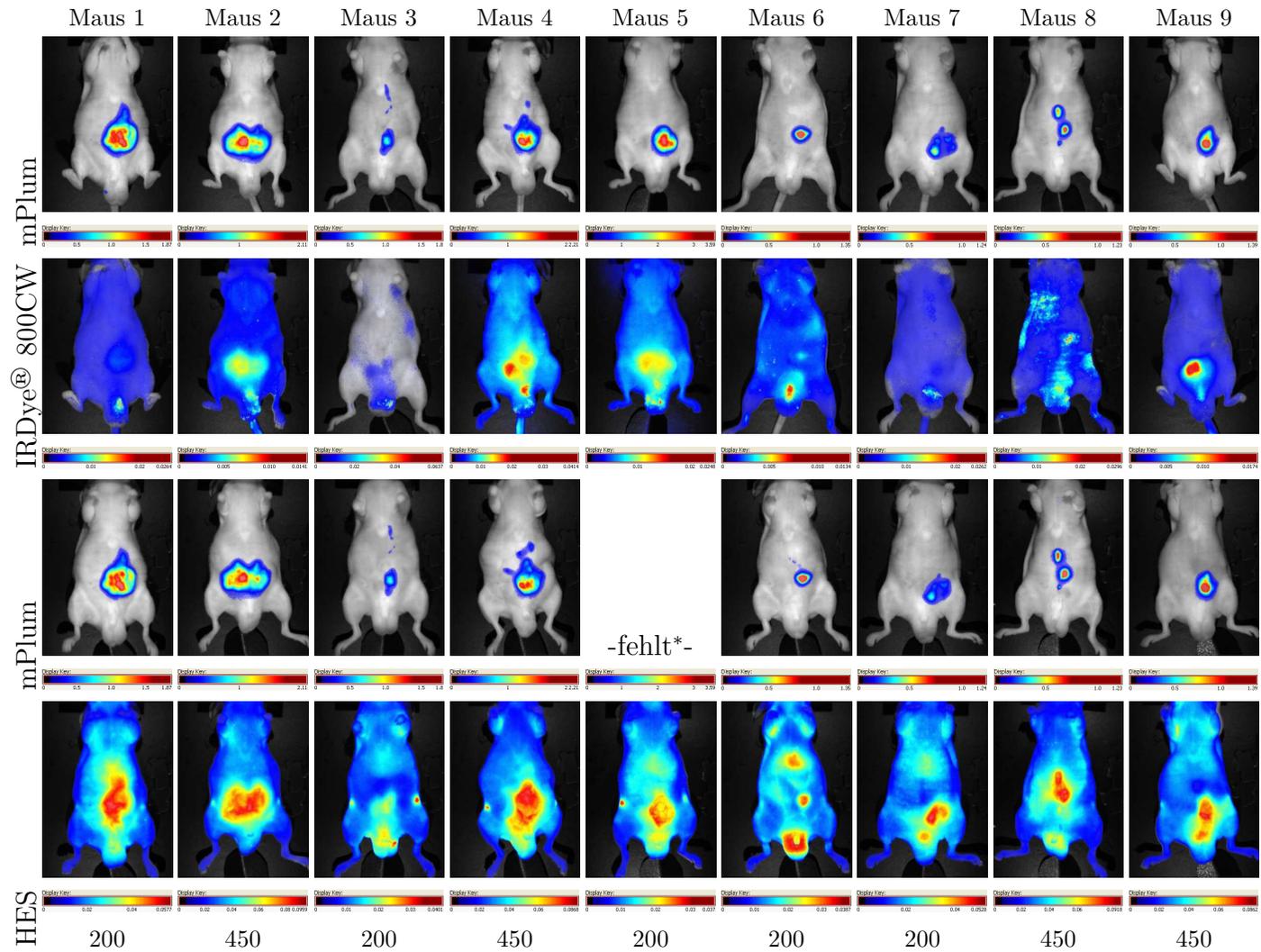


Abbildung 3.32: Die Kontrastmittelgabe im HT-29 i. p. Xenograftmodell.

Dargestellt sind die Overlays für mPlum, sowie der Kontrastmittel IRDye® 800CW (5 µg/Maus) und NIR-HES 200 bzw. 450 (1 mg/Maus) 24 h nach i. v. Applikation. *: defekte Datei. Die Bauchdeckensignale wurden bei allen Mäusen durch mPlum und die KM nachgewiesen, wobei die hochmolekularen HES Varianten stärkere Anreicherungen zeigten.

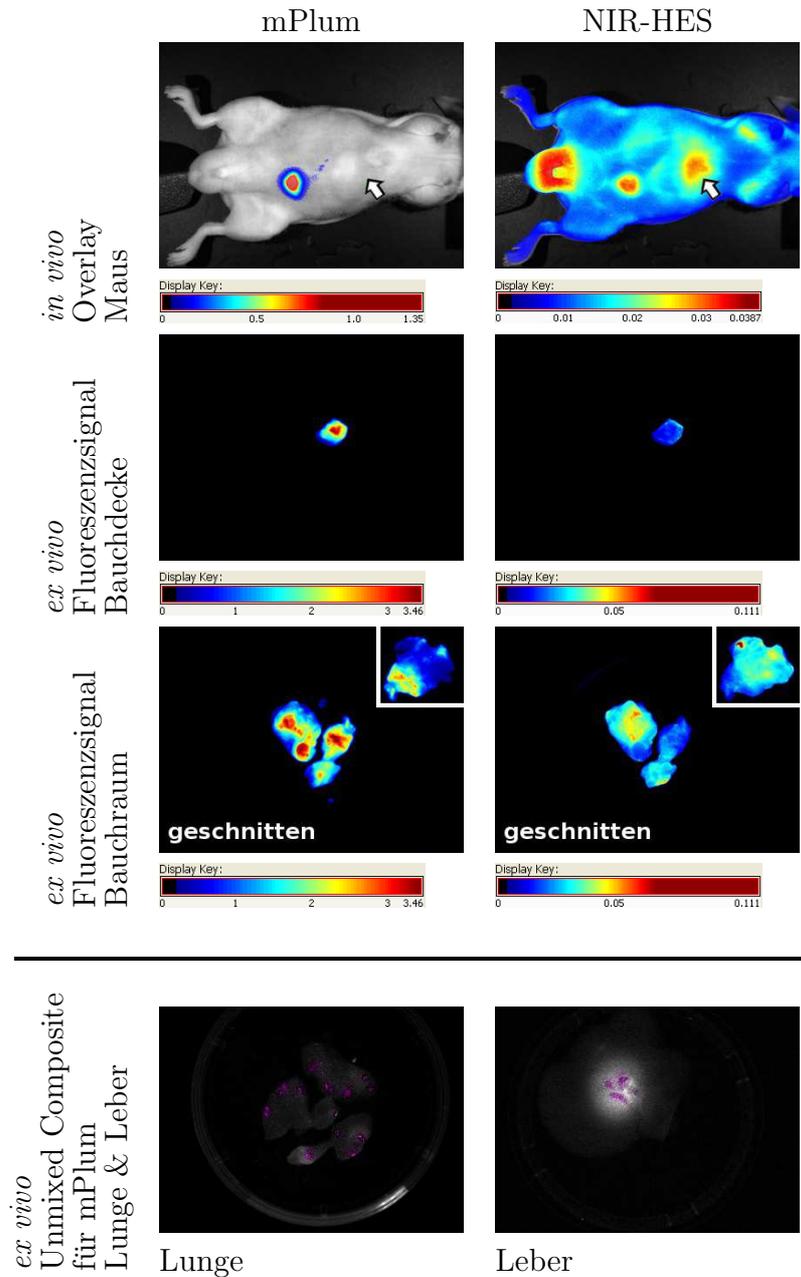


Abbildung 3.33: Die Verwendung von NIR-HES 200 im HT-29 i. p. Xenograftmodell - Maus 6.

oben: *In vivo* wird deutlich, dass das mPlum Signal der Tumorzellen nicht mit dem Signal des KM übereinstimmt. Im Oberbauch findet sich ein zweites KM Signal (weißer Pfeil), welches nach Nekropsie als tief liegender Tumorherd identifiziert wurde. *Ex vivo* ließen sich beide Xenografte mit starker mPlum Fluoreszenz darstellen. Die Signale des KM variierten. Ihre Intensität war besonders am Rand des Tumors bzw. in für das FP schwach fluoreszierenden Arealen hoch. unten: Lunge und Leber zeigten *ex vivo* mPlum Signale, welche *in vivo* nicht nachgewiesen wurden.

Tabelle 3.8: TAV für verschiedene NIR KM in einem i. p. Xenograftmodell.

Ausgewertet wurden Cubes, die 24 h nach i. v. Applikation der KM aufgenommen worden waren. MW \pm S. D.: arithmetischer Mittelwert und empirische Standardabweichung, Min: niedrigster Wert, Max: höchster Wert, n: Anzahl der untersuchten Xenografte. Man kann erkennen, dass der niedermolekulare Farbstoff tendenziell schwächere Tumorkkumulationen zeigte verglichen mit den hochmolekularen KM.

	IRDye [®] 800CW	NIR-HES 200	NIR-HES 450
MW \pm S. D.	1,68 \pm 0,51	1,87 \pm 0,32	2,29 \pm 0,14
Min	1,09	1,43	2,14
Max	2,63	2,22	2,46
n	9	5	4

Für die TAV Berechnung (siehe Formel 2.6) erfolgte die Festlegung der Tumorfläche über das *in vivo* detektierte mPlum Signal zum jeweiligen Zeitpunkt. Da sich bei Nekropsie herausstellte, dass nicht bei allen Individuen alle Xenografte *in vivo* erfasst wurden (vgl. Maus 6), entsprach das Maussignal I_{Maus} hier keinem reinen Hintergrundsignal, sondern umfasste auch die ggf. vorhandene Anreicherung in einem tiefen Xenograft. So können die TAV aus Tab. 3.8 zunächst nur als Anhaltspunkte dienen. In der Tendenz kann man festhalten, dass je größer das Molekulargewicht ist, desto mehr Anreicherung der Substanz ist zu beobachten. Die Verhältnisse von $TAV_{niedermolekularesKM}$ zu $TAV_{Polymer}$ der einzelnen Mäuse liegen im Mittel bei 82 % \pm 19 %, wobei in einem Fall 123 % beobachtet worden sind (n = 1/9).

3.3.3 Zusammenfassung

Die kovalente NIR Markierung von HES erlaubt eine Verwendung als hochmolekulares KM im msFI. Im s. c. Xenograftmodell reicherte sich das Polymer entweder im Randbereich oder zentral im Kern des Tumor an. Dies war abhängig vom jeweiligen Tumor und dessen innerer Struktur (siehe Abb. 3.31). Im i. p. Modell, welches unabdingbar auf den Nachweis der Tumorlast mittels Imaging angewiesen ist, konnte nur in einem Fall *in vivo* ein zusätzlicher Informationsgewinn durch KM Injektion erreicht werden (siehe Abb. 3.33). Dies ist vermutlich ebenfalls auf die Tumorstrukturen zurückzuführen.

Für die Anwendung als KM bleibt also festzuhalten, dass NIR-HES prinzipiell geeignet ist, Tumore vom gesunden Gewebe zu trennen. Dies muss aber im jeweiligen Modell überprüft werden.

Die unterschiedlichen Anreicherungsraten schränken auch die Nutzung von HES als Arzneiträger ein. Man könnte modellabhängig sehr gute lokale Dosiserhöhungen erreichen, z. B. im s. c. Xenograftmodell von DLD-1 FUPW 5 mit einem TAV von 2,97 (siehe Tab. 3.7), aber auch weniger starke Anreicherungen sind realistisch und schließen damit vorerst einen generalisierten HES Einsatz als Arzneiträger in der Tumorthherapie aus.

4 Diskussion

4.1 Etablierung tiefroter Fluoreszenz

Die aktuellen Daten zur Krebsinzidenz und -entwicklung zeigen, dass die Gruppe der malignen Erkrankungen eine der großen Herausforderungen für die präklinische wie klinische Forschung darstellt [Kaatsch *et al.*, 2012]. Die herausragenden Probleme dabei stellen das Auftreten von Chemotherapieresistenzen und von fortgeschrittenen, metastasierten Stadien der Krebserkrankung dar. Um möglichst allen Patienten abgestimmt auf ihre spezifische Tumorerkrankung helfen zu können, müssen mehrere innovative Therapieansätze parallel verfolgt werden: Neben der Entwicklung neuer Wirkstoffe gilt es die Therapieeffizienz zu erhöhen. Neue Arzneiträgersysteme können helfen, eine lokale Dosiserhöhung der Arzneistoffe im Tumor zu erreichen bei gleichzeitiger Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen. Auch der Einsatz von fortschrittlichen Kombinations-therapien kann die Aussicht auf Heilung verbessern. Für all diese Weiterentwicklungen sind verlässliche *in vitro* Testsysteme wie präklinische *in vivo* Tiermodelle unabdingbar, um vielversprechende Ansätze herauszufiltern und eine Entscheidung über die Eignung für die klinische Erprobung treffen zu können.

Diese Aussagen gelten insbesondere für das CRC, welches in Deutschland eine Erkrankung mit mittlerer Prognose ist [Kaatsch *et al.*, 2012]. Es existieren verschiedenen humane CRC Tumorzelllinien mit unterschiedlichen Charakteristika, die für *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen geeignet sind. Für diese Arbeit wurden die zwei chemotherapieresistenten Zelllinien DLD-1 und HT-29 ausgewählt. Beiden Zelllinien konnten mittels lentiviraler Transduktion stabil mit TurboFP635 oder mPlum als tiefrot fluoreszierende Proteine markiert werden. Es gelang, sehr helle Klone zu isolieren, welche über eine hohe Markergenexpression verfügen ohne dabei in den wesentlichen *in vitro* Eigenschaften vom WT abzuweichen. Besonders wichtig war, dass die neuen Klone ebenfalls als chemotherapieresistent einzustufen sind. Ihre IC90-Werte, bei denen Apoptose *in vitro* beobachtet wird, liegen über den realistischen humanen Peakplasmalevel für die Standardtherapeutika Oxaliplatin, 5-FU und Irinotecan. Sie können somit als Basis neuer resistenter CRC Xenograftmodelle dienen, die aufgrund ihrer Markierung eine nicht-invasive Tumorlastbestimmung mittels Fluoreszenzimaging auch im Tierinneren erlauben sollten.

4.2 Nicht-invasives *in vivo* Multispektral-Fluoreszenzimagining in CRC Xenograftmodellen

Ziel der Neuentwicklung von Xenograftmodellen in der Maus sollte sein, dass die artifizielle, ektope *s. c.* Zellapplikation durch orthotope Modelle abgelöst wird. Nachteilig an der *s. c.* Lokalisierung der Xenografte ist die von der Entität des Tumors abweichende Umgebung, die zu anderen Eigenschaften des Tumors führen kann u. a. hinsichtlich Wachstum, Struktur, Ansprechen auf Chemotherapie oder Metastasierungsverhalten [Bibby, 2004; Douglas *et al.*, 2001; Fidler, 1991; Hoffman, 1994, 1999; Kerbel, 2003].

Grundvoraussetzung für diese aussagekräftigeren Modelle ist die Möglichkeit, die Progression des Tumors und unter Therapie ggf. dessen Regression oder seine komplette Remission feststellen zu können. Hierfür bedarf es zuverlässiger Nachweismethoden wie CT oder MRT. In der präklinischen Forschung wird seit Jahren erfolgreich das kostengünstigere Fluoreszenzimagining eingesetzt, da es gegenüber den klassischen, in der Humanmedizin etablierten Bildgebungsverfahren eine Vielzahl von Vorteilen besitzt. Es ist für Kleinnager prinzipiell geeignet, nutzt keine ionisierende Strahlung und bietet aufgrund seines technischen Entwicklungsstandes verschiedene Möglichkeiten, die die Untersuchung auch komplexer Fragestellungen bei Auswahl des geeigneten Systems erlauben [Leblond *et al.*, 2010]. Mit dem msFI konnte die Sensitivität des Fluoreszenzimagings entscheidend verbessert und zudem der zeitgleiche Nachweis verschiedener Fluorophore *in vivo* ermöglicht werden, da es die Auftrennung und Analyse in die einzelnen Fluoreszenzsignale des Untersuchungsobjektes anhand ihrer spektralen Eigenschaften realisiert [Mansfield *et al.*, 2005a,c].

Die neugewonnenen tiefroten Klone der CRC Zelllinien DLD-1 und HT-29 wurden zunächst vergleichend mit grün- und orange-rot fluoreszierenden Tumoren im klassischen *s. c.* Xenograftmodell ohne Therapie untersucht. Hier konnte die Bestimmung der Tumorlast des jeweiligen Tiers sowohl über Schieblehnmessung mit anschließender Tumolvolumenberechnung als auch über das msFI erfolgen. Es zeigte sich, dass die auf die Belichtungszeit normierte Gesamtfluoreszenzintensität einer Maus ohne Auswahl einer ROI am besten mit dem berechneten Tumolvolumen korrelierte. Als Zusammenhang beider Größen konnte der theoretisch formulierte Potenzansatz bestätigt werden.

Offenkundig wurde aber bei den vergleichenden Untersuchungen verschiedener Klone desselben genetischen Hintergrundes, dass der Zusammenhang zwischen Tumolvolumenzunahme und Fluoreszenzintensitätsanstieg einerseits zwischen den Individuen variiert, aber andererseits auch stark vom eingesetzten Klon abhängig ist. Individuelle Unterschiede des Xenograftwachstums in einer Studie sind keine neue Erkenntnis [Shimosato *et al.*, 1979]. Dies liegt an der Variabilität des lebenden Organismus, z. B. in der Aktivität des Restimmunsystems der Nacktmaus, und an den injizierten humanen Tumorzellen, die sich erst im murinen Milieu etablieren müssen (mögliche Ursache für lag-Phasen). Das muss bei statistischen zu beurteilenden Versuchen in der Gruppengröße unbedingt berücksichtigt werden. Das Ausmaß der mangelnden Übertragbarkeit der ermittelten

Parameter zwischen verschiedenen Klonen der DLD-1 überraschte jedoch. Aus dem Klonierungsprozess ist der Klon DLD-1 FUPW 3 hervorgegangen, der *in vitro* den morphologisch offenen Subtyp des DLD-1 WT repräsentiert. Er ist nicht mehr in der Lage, die in der Literatur beschriebene geschlossene Kolonieform auszubilden [Dexter *et al.*, 1981]. Diese Eigenschaft zeigte auch DLD-1 FUKW 11.2, aber nur bei FUPW 3 wurde *in vivo* eine vom WT deutlich abweichende Xenograftstruktur gefunden. Dieser Klon wuchs s. c. etwas langsamer als die anderen getesteten und bestand nahezu ausschließlich aus vitalen Tumorzellen. Es konnte wenig Stroma und kaum Nekrose/Fibrose beobachtet werden. Histologisch waren keine gravierenden Unterschiede in der Gefäßversorgung erkennbar, die eine mögliche Erklärung für dieses gleichmäßige, kontrollierte Tumorstromawachstum ohne große absterbende Areale sein könnten. Es ist daher anzunehmen, dass im Klonierungsprozess ein besonderer Zelltyp angereichert wurde, der auf genomischer Ebene so verändert ist, dass die Tumorzellinteraktion und/oder die Tumor-Stroma-Interaktion beeinflusst wurde. Ob dies durch die lentivirale Integration des mPlum Gens oder durch die den CRC eigene genetische Variabilität bedingt ist, muss noch untersucht werden.

Im s. c. DLD-1 Modell eigneten sich alle FP zur Verfolgung des Xenograftwachstums unter Berücksichtigung der individuellen Variabilität. Selbst die im Spektrum kurzweilige Tumorzellmarkierung mit eGFP zeigte gute Korrelationen nach dem Potenzansatz.

Mittels lentiviraler Transduktion konnten verschiedene Zelllinien mit FP markiert werden, wobei die Effizienz sowohl der Klonierung (Gesamtausbeute an Klonen) als auch hinsichtlich der Helligkeit der einzelnen Klone z. T. stark variierte. Von den CRC Zelllinien ließ sich DLD-1 besonders gut markieren, bei der HT-29 waren die Klone weniger intensiv fluoreszierend, aber dennoch für *in vivo* Versuche geeignet. Die Ergebnisse zeigen, dass sich mit unterschiedlichen Zelllinien msFI erfolgreich zur Tumorlastbestimmung einsetzen lässt, allerdings kann es bei Zelllinien mit ausgeprägter interindividueller Variabilität der s. c. Xenografte zu größerer Varianz der Korrelation zwischen Volumen und Fluoreszenz kommen.

Mehrere Tumorherde lassen sich mit msFI gut quantifizieren, wenn sie in der gleichen Bildebene lokalisiert sind, z. B. direkt unter der Haut. Das Problem des msFI bei mehreren Tumorherden in unterschiedlichen Bildebenen kann die Intensitätsabschwächung der Signale sein, welche zur Überstrahlung der tieferen, scheinbar schwächer fluoreszierenden Tumore durch sehr helle, der Körperoberfläche nahe liegende Xenografte führen könnte. Das Ausmaß dieser optischen Entfernung hängt natürlich von dem verwendeten Fluorophor ab und könnte bei ungehindertem Durchdringen der einzelnen Gewebe, wie es für den NIR Bereich angenommen wird, minimal sein.

Bei Therapie eignete sich die normierte Gesamtfluoreszenzintensität ebenfalls als Tumorlastparameter: Im sensitiven Modell des TGCT Zelllinie H12.1 zeigte sich das Therapieansprechen bereits vor der Volumenabnahme durch Intensitätsabfall. Resistente Xenografte hingegen zeigten höchstens eine (kurze) Stagnation der Fluoreszenzintensität entsprechend der Volumenentwicklung.

Anhand der in dieser Arbeit im s. c. Modell generierten ausführlichen Daten zum msFI konnte eine Fehleranalyse durchgeführt werden. Dass die Volumenbestimmung *in vivo* besonders bei kleinen Volumina größeren Fehler unterliegt und auch personenabhängig ist, ist bereits in der Literatur diskutiert worden, z. T. auch vergleichend mit Bildgebungsverfahren wie bei Jensen *et al.* [2008]. Dennoch ist die Erfassung der Tumormass Xenograft tragender Tiere mittels Ellipsoidformel möglich [Euhus *et al.*, 1986; Tomayko & Reynolds, 1989]. Für das msFI zeigte sich, dass sowohl Tumorumfang als auch Zelllinie die Gesamtintensität der Xenografte beeinflussen. Ersteres ist unabdingbare Voraussetzung, wenn das Tumorumfang durch die Intensität im kontinuierlichen Monitoring ersetzt werden soll. Letzteres zeigt, dass es durchaus nicht vernachlässigbar ist, welches Tumormodell mittels msFI beobachtet werden soll. Je nach Zelllinie, deren *in vivo* Wachstumseigenschaften sowie deren Eignung für das gewählte Markierungsverfahren, kann es zu großen Bandbreiten in der Fluoreszenzintensität der Xenografte kommen und damit die Verlässlichkeit der Fluoreszenzbildgebung stark beeinflusst werden. Die Farbe der FP spielt hingegen keine entscheidende Rolle für die Gesamtfluoreszenzintensität, wohl aber für den Fehler des msFI. Es konnte gezeigt werden, dass kurzwelligere FP größere Fehler in der Bestimmung der Intensität eines s. c. Xenograft haben als die tiefrot emittierenden. Dies liegt an den besseren optischen Eigenschaften der biologischen Gewebe im langwelligeren Spektralbereich: je größer die Wellenlänge bis zu einem Maximum von etwa 1000 nm, desto geringer ist die Gewebeabsorption (optisches Fenster) und mehr Fluoreszenzsignale werden korrekt erfasst. Die Zelllinie beeinflusst den msFI Fehler ebenfalls, was in der Xenograftstruktur und ggf. dessen Heterogenität begründet ist. Bildet eine Zelllinie s. c. stets ähnlich strukturierte, fast konservierte Strukturen aus, so ist der Fehler gering. Liegt jedoch eine hohe Variabilität im Xenograftaufbau vor, so kann auch das Fehlermaß zunehmen. Die Größe des s. c. Tumors hingegen beeinflusst den Fehler der Gesamtfluoreszenzintensität nicht, was das msFI besonders zur Messung kleiner Volumina oder geringer Volumenänderungen auch im s. c. Xenograftmodell attraktiv macht, obgleich es mit mehr Aufwand verbunden ist als die alleinige Schiebelenkmessung.

Erste Versuche zu i. p. lokalisierten Tumorherden ergaben, dass tiefrote FP die Quantifizierung der Tumormass auch unter Therapie erlauben, wenn die Xenografte einen kurzen optischen Weg zur Tieroberfläche haben. Ist dies nicht der Fall, so stößt das msFI an seine Grenzen und die sehr tiefen, durch viele Gewebsschichten maskierten Tumore werden nicht detektiert. Dies kann auch der Fall sein, wenn die Nachweisgrenze durch dominierende helle Fluoreszenzbereiche, also Tumore mit kurzem optischen Weg, heraufgesetzt wird bedingt durch die Limitierung der Belichtungszeit nach oben. Dies kann umgangen werden, wenn man helle Bereiche maskiert und die automatische Belichtungszeit sich dadurch verlängert. Allerdings erzeugt man auf diese Weise Abschattungen und kann dadurch bestimmte Tumore möglicherweise nicht nachweisen.

Gesondert zu diskutieren ist die Auswertung der Fluoreszenzsignale anstatt über ihre Intensität über die Ausmessung der Signaldimensionen. Dies ist prinzipiell möglich, da der Imager geeicht ist und sich so Bildmaße [Pixel] in metrische Maße umrechnen lassen.

Bei der Quantifizierung mittels Messung und anschließender Tumolvolumenberechnung tritt jedoch das gleiche Problem auf wie beim Monitoring mittels Schieblehre, da es sich bei dem MaestroTM *in vivo* Fluorescence Imaging System um ein 2D Projektionsverfahren handelt und somit die dritte Dimension nicht gemessen werden kann. Man ist also im s. c. Modell nicht sensitiver oder weniger fehlerbehaftet als beim klassischen Ausmessen der Tumordimensionen. Zudem kommt noch ein weiteres, sehr viel größeres Problem, welches besonders bei tiefliegenden Xenograften zum Tragen kommt: die Auswahl der Fläche(n), die als echtes Tumorsignal erfasst und damit in die Tumorlastberechnung einbezogen werden. Es ist sehr schwierig, objektiv richtige Abgrenzungen vorzunehmen, da die Signale nicht exakt scharf abgrenzt auf den Bildern dargestellt werden, sondern von einer Art Korona umgeben sind. Dieser Effekt verstärkt sich mit zunehmendem optischen Abstand und je langwelliger das Fluorophor ist [Leblond *et al.*, 2010]. Auch die Festlegung eines geeigneten Intensitätsgrenzwertes, bei dem ein Pixel zum Fluoreszenzsignal hinzugerechnet wird, ist beim dynamischen System Tumorwachstum und ggf. Tumorregression kaum möglich, da die Belichtungszeiten über den Versuchsverlauf um Größenordnungen variieren und sich somit die Nachweisgrenzen verschieben.

Es konnte gezeigt werden, dass msFI prinzipiell geeignet ist, die Möglichkeiten für neue, innovativere CRC Xenograftmodelle zu erweitern. Jedoch muss man sich der methodenspezifischen Grenzen genauso bewusst sein wie bei allen Modellen für (biologische) Prozesse. Ein wichtiger Fakt ist, dass bei jeder neuen Klonierung zur Fluoreszenzmarkierung nur bestimmte Zellen des WT erfasst werden und es daher unbedingt erforderlich ist, den Zusammenhang zwischen Tumolvolumen und *in vivo* Fluoreszenzsignal zu überprüfen bevor an die Etablierung orthotoper oder systemischer Modelle mit diesen Klonen gedacht wird. Mit dem s. c. Modell ist eine Beurteilung der Eignung eines neugenerierten Klones zur Detektion tiefer lokalisierter *in vivo* Xenografte möglich, da die Verfolgung zweier Tumorlastparameter über die Zeit entscheidende Informationen liefert. Neben der *in vivo* Bildgebung sollte auch das explantierte s. c. Xenograft hinsichtlich seiner Struktur histologisch analysiert werden, um etwaige Unterschiede zum WT zu entdecken. Die Verwendung tiefroter FP genügt nicht für eine zuverlässige Detektion und Quantifizierung von im Bauchraum lokalisierten Tumoren. Hier muss für die neuen Modelle des CRC der Einsatz langwelligerer FP erwogen werden. Mit iRFP steht inzwischen auch ein cofaktorunabhängiges, im nahen Infrarotbereich anregbares und fluoreszierendes Protein zur Verfügung, das diesem Zweck dienen kann [Filonov *et al.*, 2011]. Wichtig bleibt aber auch hier, dass ein zweiter Parameter zur Tumorlastbestimmung hilfreich ist, da er eine Absicherung der mittels msFI gewonnenen Daten darstellt. Dies könnte bei Xenograftmodellen mit tiefer lokalisierten Tumoren z. B. das gesamte Tumorgewicht am Versuchsende sein. Auch das *ex vivo* Fluoreszenzsignal der von Metastasierung betroffenen Organe wäre eine mögliche zweite Messgröße. Beide eignen sich bspw. für die Überprüfung von Vergleichen zwischen Therapie- und Kontrollgruppe ergänzend zu den *in vivo* gewonnenen Fluoreszenzintensitäten. Nicht unerwähnt sollte bleiben, dass in der Literatur bereits die Verwendung des NIR im *in vivo* Fluoreszenz-*imaging* und dessen Grenzen diskutiert werden. Bei Leblond *et al.* [2010] wird dazu

bereits in Modellen eindrucksvoll gezeigt, dass die ungehinderte Gewebedurchdringung langwelliger Strahlung zu einer Art Diffusion des Lichts führt, was wiederum besonders in der 2D Projektionstechnik zu schwachen, wenig klar definierten Tumorsignalen führen kann und damit die Quantifizierung erschwert werden könnte. Bei Nutzung von iRFP muss also zunächst untersucht werden, ob die hier vorgestellte Bestimmung der Tumorlast mittels normierter Gesamtfluoreszenzintensität ebenfalls robust genug für die *in vivo* Analyse von Xenograftmodellen ist.

4.3 Kontrastmittel und Modellarzneiträger NIR-HES

Für den Nachweis von Tumoren können in der Bildgebung Kontrastmittel eingesetzt werden, die die Differenzierung von malignem und gesundem Gewebe verbessern. Für das Polymer HES konnte dieser Einsatz in der Polymerdiagnostik für die MRT schon gezeigt werden [Besheer *et al.*, 2011]. Im Fluoreszenzimaging konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass NIR-HES modellabhängig als KM geeignet ist. Die Anreicherung im Tumorgewebe erfolgt vornehmlich am Tumorrand und in nekrotisch/fibrotischen Arealen des Tumors. Letzteres wird vermutlich durch den gesteigerten, von Maeda *et al.* [2000] beschriebenen EPR Effekt in diesen Bereichen gefördert. Es zeigte sich aber auch an einem Klon der CRC Zelllinie DLD-1, welcher nur geringe nekrotisch/fibrotische Areale in seinen s. c. Xenograften ausbildet, dass diese zentrale, intratumorale, starke Anreicherung ausbleiben kann. So ist nun mit DLD-1 FUPW 3 (kaum Nekrose/Fibrose) und FUPW 5 (starke Nekrose/Fibrose) ein matched cells Modell verfügbar, dessen Xenograften, obwohl sie einen identischen genetischen Hintergrund besitzen, aufgrund ihrer Tumorstruktur ein unterschiedliches Anreicherungsverhalten für ein hochmolekulares Kontrastmittel und mögliches Arzneiträgersystem zeigen. Zunächst muss also für die Verwendung der HES als KM (und letztendlich auch als Arzneiträgersystem) geklärt sein, welche Morphologie und innere Struktur der Tumor aufweist, sonst kann es zu falsch-negativen Interpretationen kommen. Dies ist auch eine mögliche Ursache, warum ein zusätzlicher Erkenntnisgewinn durch das KM NIR-HES im i. p. Xenograftmodell nur in einem Fall erzielt werden konnte.

Dieses modellabhängige Anreicherungsverhalten ist es auch, was die Verwendung von HES als Arzneiträgersystem limitiert. Kommt es im Tumor zu einer starken lokalen Polymerkonzentration, könnten hier gezielt Wirkstoffe freigesetzt werden. Bleibt dies jedoch aus, wird die gewünschte Therapieverbesserung nicht erreicht werden können. Polymere, die wie HES auf natürlichen, biologisch gut verträglichen Monomeren basieren, können im Rahmen einer individuell auf den Patienten und seine Tumorerkrankung angepassten Therapie sehr vielversprechende Arzneiträger sein. Sie werden aber aufgrund variierender Tumorrakkumulationen als Universalträgersystem ohne weitergehende Modifikationen nicht eingesetzt werden können.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden erstmals vier verschiedene Fluoreszenzproteine als Marker für *in vivo* Xenograftimaging vergleichend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit nicht-invasivem *in vivo* Multispektral-Fluoreszenzimaging eine Quantifizierung der Tumorlast in humanen Xenograftmodellen in der athymischen Nacktmaus prinzipiell möglich ist. Im subkutanen Modell humaner kolorektaler Karzinome sind Fluoreszenzmarker mit kurzen wie längeren Emissionsmaxima geeignet, wobei sich die größere Wellenlänge positiv auf das Ausmaß des Quantifizierungsfehlers auswirkt. Tiefrote Fluoreszenzproteine ermöglichen auch erste Untersuchungen von Xenograften im Bauchraum, jedoch wurden hier die Grenzen dieser Tumorzellmarkierung offensichtlich. Tieflokalisierte Tumore werden nur unzureichend erfasst und daher auch nicht sicher quantifiziert. Dies schränkt die Verwendung dieser Fluorophore für das kontinuierliche Monitoring von humanen, orthotopen oder systemischen Xenograftmodellen, die näher an der Patientensituation orientiert sind, erheblich ein.

Um die Problematik der schlechten Gewebsdurchdringung von sowohl Anregungs- als auch Emissionslicht zu verbessern, ist die Verwendung infrarot emittierender Fluorophore sinnvoll. Der Einsatz des markierten Polymers HES als hochmolekulares Kontrastmittel im nahen Infrarot brachte im intraperitonealen Xenograftmodell des kolorektalen Karzinoms bereits zusätzliche Informationen, allerdings nur in einem von vier Fällen, was wahrscheinlich mit der inneren Tumorstruktur und dem Ausmaß an Nekrose/Fibrose zusammenhing. Liegen jedoch optimale Voraussetzungen für einen ausgeprägten EPR Effekt im Xenograft vor, so reichert sich das Polymer an. Dann ist eine über die Polymerdiagnostik hinausgehende Verwendung als biokompatibler Arzneiträger zur lokalen Dosiserhöhung eines transportierten Wirkstoffs sehr vielversprechend, um die Therapieeffizienz zu steigern.

Um alle Tumore einer Maus *in vivo* sicher mittels Multispektral-Fluoreszenzimaging zu erfassen und zu quantifizieren, müssen Fluoreszenzproteine des (nahen) Infrarotspektralbereichs als Tumorzellmarker getestet werden. Wichtig dabei wird sein, dass die in dieser Arbeit vorgestellten Daten nicht ohne Weiteres auf diese langwellige Bildgebung übertragen werden können, und somit eine erneute Evaluierung der Quantifizierungsmethodik in den neu zu etablierenden Tumorzellklonen und Xenograftmodellen erfolgen muss, bevor vergleichende Studien zur Therapieeffizienz durchgeführt werden können.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

[Allain *et al.* 2000] ALLAIN, P ; HEUDI, O ; CAILLEUX, A ; LE BOUIL, A ; LARRA, F ; BOISDRON-CELLE, M ; GAMELIN, E: Early biotransformations of oxaliplatin after its intravenous administration to cancer patients. In: *Drug Metab Dispos* 28 (2000), Nr. 11, 1379-84. PubMed

[Arias 2011] ARIAS, J L.: Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview. In: *Mini Rev Med Chem* 11 (2011), Jan, Nr. 1, 1-17. PubMed. ISBN 1875-5607

[Baird *et al.* 2000] BAIRD, G S. ; ZACHARIAS, D A. ; TSIEN, R Y.: Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Nr. 22, 11984-9. PubMed

[Becker & Wahrendorf 1998] BECKER, N ; WAHRENDORF, J: *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990 (Fortschreibung im Internet)*. Springer, 1998 PubMed

[Besheer *et al.* 2011] BESHEER, A ; CAYSA, H ; METZ, H ; MUELLER, T ; KRESSLER, J ; MÄDER, K: Benchtop-MRI for in vivo imaging using a macromolecular contrast agent based on hydroxyethyl starch (HES). In: *Int J Pharm* 417 (2011), Sep, Nr. 1-2, 196-203. PubMed. ISBN 1873-3476

[Besheer *et al.* 2009] BESHEER, A ; HERTEL, T C. ; KRESSLER, J ; MÄDER, K ; PIETZSCH, M: Enzymatically catalyzed HES conjugation using microbial transglutaminase: Proof of feasibility. In: *J Pharm Sci* 98 (2009), Nov, Nr. 11, 4420-8. PubMed. ISBN 1520-6017

[Bibby 2004] BIBBY, M C.: Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. In: *Eur J Cancer* 40 (2004), Nr. 6, 852-7. PubMed

[Boldt & Suttner 2005] BOLDT, J ; SUTTNER, S: Plasma substitutes. In: *Minerva Anesthesiol* 71 (2005), Nr. 12, 741-58. PubMed

[de Bruijn *et al.* 1997] BRUIJN, P de ; VERWEIJ, J ; LOOS, W J. ; NOOTER, K ; STOTER, G ; SPARREBOOM, A: Determination of irinotecan (CPT-11) and its active metabolite SN-38 in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. In: *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 698 (1997), Nr. 1-2, 277-85. PubMed

- [Canal *et al.* 2011] CANAL, F ; SANCHIS, J ; VICENT, M J.: Polymer–drug conjugates as nano-sized medicines. In: *Curr Opin Biotechnol* 22 (2011), Dec, Nr. 6, 894-900. PubMed. ISBN 1879–0429
- [Casper *et al.* 1987] CASPER, J ; SCHMOLL, H J. ; SCHNAIDT, U ; FONATSCH, C: Cell lines of human germinal cancer. In: *Int J Androl* 10 (1987), Nr. 1, 105-13. PubMed
- [Chau & Cunningham 2009] CHAU, I ; CUNNINGHAM, D: Treatment in advanced colorectal cancer: what, when and how? In: *Br J Cancer* 100 (2009), Jun, Nr. 11, 1704-19. PubMed. ISBN 1532–1827
- [Cho *et al.* 2008] CHO, K ; WANG, X ; NIE, S ; CHEN, Z G. ; SHIN, D M.: Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. In: *Clin Cancer Res* 14 (2008), Nr. 5, 1310-6. PubMed
- [Dexter *et al.* 1981] DEXTER, D L. ; SPREMULLI, E N. ; FLIGIEL, Z ; BARBOSA, J A. ; VOGEL, R ; VANVOORHEES, A ; CALABRESI, P: Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. In: *Am J Med* 71 (1981), Nr. 6, 949-56. PubMed
- [Douglas *et al.* 2001] DOUGLAS, M L. ; BOUCAUT, K J. ; ANTALIS, T M. ; HIGGINS, C ; PERA, M F. ; STUTTGEN, M A. ; NICOL, D L.: An orthotopic xenograft model of human nonseminomatous germ cell tumour. In: *Br J Cancer* 85 (2001), Nr. 4, 608-11. PubMed
- [Duncan 2003] DUNCAN, R: The dawning era of polymer therapeutics. In: *Nat Rev Drug Discov* 2 (2003), May, Nr. 5, 347-60. PubMed. ISBN 1474–1776
- [Duncan 2011] DUNCAN, R: Polymer therapeutics as nanomedicines: new perspectives. In: *Curr Opin Biotechnol* 22 (2011), Aug, Nr. 4, 492-501. PubMed. ISBN 1879–0429
- [Dössel 2000] DÖSSEL, O: *Bildgebende Verfahren in der Medizin: Von der Technik zur medizinischen Anwendung*. Springer, 2000. – ISBN 3–540–66014–3
- [Ehrsson *et al.* 2002] EHRSSON, H ; WALLIN, I ; YACHNIN, J: Pharmacokinetics of oxaliplatin in humans. In: *Med Oncol* 19 (2002), Nr. 4, 261-5. PubMed
- [Euhus *et al.* 1986] EUHUS, D M. ; HUDD, C ; LAREGINA, M C. ; JOHNSON, F E.: Tumor measurement in the nude mouse. In: *J Surg Oncol* 31 (1986), Nr. 4, 229-34. PubMed
- [Fidler 1991] FIDLER, I J.: Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. In: *Cancer Metastasis Rev* 10 (1991), Nr. 3, 229-43. PubMed

[Filonov *et al.* 2011] FILONOV, G S. ; PIATKEVICH, K D. ; TING, L ; ZHANG, J ; KIM, K ; VERKHUSHA, V V.: Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging. In: *Nat Biotechnol* 29 (2011), Aug, Nr. 8, 757-61. PubMed. ISBN 1546–1696

[Graham *et al.* 2000] GRAHAM, M A. ; LOCKWOOD, G F. ; GREENSLADE, D ; BRIENZA, S ; BAYSSAS, M ; GAMELIN, E: Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. In: *Clin Cancer Res* 6 (2000), Nr. 4, 1205-18. PubMed

[Graves *et al.* 2004] GRAVES, E E. ; WEISSLEDER, R ; NTZIACHRISTOS, V: Fluorescence molecular imaging of small animal tumor models. In: *Curr Mol Med* 4 (2004), Nr. 4, 419-30. PubMed

[Grem 2000] GREM, J L.: 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. In: *Invest New Drugs* 18 (2000), Nr. 4, 299-313. PubMed

[Grem *et al.* 2000] GREM, J L. ; HAROLD, N ; SHAPIRO, J ; BI, D Q. ; QUINN, M G. ; ZENTKO, S ; KEITH, B ; HAMILTON, J M. ; MONAHAN, B P. ; DONAVAN, S ; GROLLMAN, F ; MORRISON, G ; TAKIMOTO, C H.: Phase I and pharmacokinetic trial of weekly oral fluorouracil given with eniluracil and low-dose leucovorin to patients with solid tumors. In: *J Clin Oncol* 18 (2000), Nr. 23, 3952-63. PubMed

[Grem *et al.* 2001a] GREM, J L. ; QUINN, M ; ISMAIL, A S. ; TAKIMOTO, C H. ; LUSH, R ; LIEWEHR, D J. ; STEINBERG, S M. ; BALIS, F M. ; CHEN, A P. ; MONAHAN, B P. ; HAROLD, N ; CORSE, W ; PANG, J ; MURPHY, R F. ; ALLEGRA, C J. ; HAMILTON, J M.: Pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of 5-fluorouracil given as a one-hour intravenous infusion. In: *Cancer Chemother Pharmacol* 47 (2001), Nr. 2, 117-25. PubMed

[Grem *et al.* 2001b] GREM, J L. ; YEE, L K. ; SCHULER, B ; HAMILTON, J M. ; CHEN, A P. ; CHABUK, C ; GROLLMAN, F ; GRABENC, M ; ALLEGRA, C J. ; TAKIMOTO, C H.: N-(phosphonacetyl)-L-aspartate and calcium leucovorin modulation of fluorouracil administered by constant rate and circadian pattern of infusion over 72 hours in metastatic gastrointestinal adenocarcinoma. In: *Ann Oncol* 12 (2001), Nr. 11, 1581-7. PubMed

[Gross *et al.* 2000] GROSS, L A. ; BAIRD, G S. ; HOFFMAN, R C. ; BALDRIDGE, K K. ; TSIEN, R Y.: The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Oct, Nr. 22, 11990-5. PubMed. ISBN 0027–8424

[Gupta *et al.* 1997] GUPTA, E ; MICK, R ; RAMIREZ, J ; WANG, X ; LESTINGI, T M. ; VOKES, E E. ; RATAIN, M J.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the topoisomerase inhibitor irinotecan in cancer patients. In: *J Clin Oncol* 15 (1997), Nr. 4, 1502-10. PubMed

[Haag & Kratz 2006] HAAG, R ; KRATZ, F: Polymer therapeutics: concepts and applications. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 45 (2006), Feb, Nr. 8, 1198-215. PubMed. ISBN 1433-7851

[Hazama *et al.* 2010] HAZAMA, S ; NAGASHIMA, A ; KONDO, H ; YOSHIDA, S ; SHIMIZU, R ; ARAKI, A ; YOSHINO, S ; OKAYAMA, N ; HINODA, Y ; OKA, M: Phase I study of irinotecan and doxifluridine for metastatic colorectal cancer focusing on the UGT1A1*28 polymorphism. In: *Cancer Sci* 101 (2010), Nr. 3, 722-7. PubMed

[Heitjan 2011] HEITJAN, D F.: Biology, models, and the analysis of tumor xenograft experiments. In: *Clin Cancer Res* 17 (2011), Mar, Nr. 5, 949-51. PubMed. ISBN 1078-0432

[Hoffman 1994] HOFFMAN, R M.: Orthotopic is orthodox: Why are orthotopic-transplant metastatic models different from all other models? In: *Journal of Cellular Biochemistry* 56 (1994), S. 1-3

[Hoffman 1999] HOFFMAN, R M.: Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. In: *Invest New Drugs* 17 (1999), Nr. 4, 343-59. PubMed

[Hoffmann *et al.* 2012] HOFFMANN, S ; VYSTRČILOVÁ, L ; ULBRICH, K ; ETRYCH, T ; CAYSA, Henrike ; MUELLER, Thomas ; MÄDER, Karsten: Dual Fluorescent HPMA Copolymers for Passive Tumour Targeting with pH-Sensitive Drug Release: Synthesis and Characterisation of Distribution and Tumour Accumulation in Mice by Noninvasive Multispectral Optical Imaging. In: *Biomacromolecules* (2012), Jan. PubMed. ISBN 1526-4602

[Holback & Yeo 2011] HOLBACK, H ; YEO, Y: Intratumoral drug delivery with nanoparticulate carriers. In: *Pharm Res* 28 (2011), Aug, Nr. 8, 1819-30. PubMed. ISBN 1573-904X

[Hong *et al.* 2010] HONG, H ; YANG, Y ; ZHANG, Y ; CAI, W: Non-invasive cell tracking in cancer and cancer therapy. In: *Curr Top Med Chem* 10 (2010), Nr. 12, 1237-48. PubMed

[Iyer *et al.* 2006] IYER, A K. ; KHALED, G ; FANG, J ; MAEDA, H: Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. In: *Drug Discov Today* 11 (2006), Nr. 17-18, 812-8. PubMed

[Jemal *et al.* 2010] JEMAL, A ; CENTER, M M. ; DESANTIS, C ; WARD, E M.: Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. In: *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19 (2010), Aug, Nr. 8, 1893-907. PubMed. ISBN 1538-7755

[Jensen *et al.* 2008] JENSEN, M M. ; JORGENSEN, J T. ; BINDERUP, T ; KJAER, A: Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. In: *BMC Med Imaging* 8 (2008), 16. PubMed

[Jöbsis 1977] JÖBSIS, F F.: Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. In: *Science* 198 (1977), Dec, Nr. 4323, 1264-7. PubMed. ISBN 0036-8075

[Kaatsch *et al.* 2012] KAATSCH, P ; SPIX, C ; KATALINIC, A ; HENTSCHEL, S ; BARAS, N ; BARNES, B ; BERTZ, J ; DAHM, S ; HABERLAND, J ; KRAYWINKEL, K ; LAUDI, A ; WOLF, U: Krebs in Deutschland 2007/2008 / Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2012 (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 8). – Forschungsbericht. – ISBN 978-3-89606-214-7

[Kerbel 2003] KERBEL, R S.: Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved. In: *Cancer Biol Ther* 2 (2003), Nr. 4 Suppl 1, S134-S139. PubMed

[Kubota 1994] KUBOTA, T: Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. In: *J Cell Biochem* 56 (1994), Nr. 1, 4-8. PubMed

[Larson & Ghandehari 2012] LARSON, N ; GHANDEHARI, H: Polymeric conjugates for drug delivery. In: *Chem Mater* 24 (2012), Mar, Nr. 5, 840-853. PubMed. ISBN 0897-4756

[Leblond *et al.* 2010] LEBLOND, F ; DAVIS, S C. ; VALDES, P A. ; POGUE, B W.: Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. In: *J Photochem Photobiol B* 98 (2010), Nr. 1, 77-94. PubMed

[Liu *et al.* 2002] LIU, J ; KRAUT, E ; BENDER, J ; BROOKS, R ; BALCERZAK, S ; GREVER, M ; STANLEY, H ; D'AMBROSIO, S ; GIBSON-D'AMBROSIO, R ; CHAN, K K.: Pharmacokinetics of oxaliplatin (NSC 266046) alone and in combination with paclitaxel in cancer patients. In: *Cancer Chemother Pharmacol* 49 (2002), Nr. 5, 367-74. PubMed

[Lu *et al.* 2007] LU, Z R. ; YE, F ; VAIDYA, A: Polymer platforms for drug delivery and biomedical imaging. In: *J Control Release* 122 (2007), Nr. 3, 269-77. PubMed

[Luetzkendorf 2010] LUETZKENDORF, J: *Mesenchymale Stammzellen bei Patienten mit malignen Erkrankungen - Untersuchung ihrer Eigenschaften und ihres Potentials als Vehikel einer Tumortherapie*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diss., 2010

- [Maeda *et al.* 2009] MAEDA, H ; BHARATE, G Y. ; DARUWALLA, J: Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. In: *Eur J Pharm Biopharm* 71 (2009), Nr. 3, 409-19. PubMed
- [Maeda *et al.* 2000] MAEDA, H ; WU, J ; SAWA, T ; MATSUMURA, Y ; HORI, K: Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. In: *J Control Release* 65 (2000), Nr. 1-2, 271-84. PubMed
- [Mansfield *et al.* 2005a] MANSFIELD, J R. ; GOSSAGE, K W. ; HOYT, C C. ; LEVENSON, R M.: Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging. In: *J Biomed Opt* 10 (2005), Nr. 4, 41207. PubMed
- [Mansfield *et al.* 2005b] MANSFIELD, J R. ; GOSSAGE, K W. ; LEVENSON, R M.: *Beyond autofluorescence removal: automated analysis methods for multispectral in-vivo imaging.* 2005
- [Mansfield *et al.* 2005c] MANSFIELD, J R. ; HOYT, C C. ; MILLER, P J. ; LEVENSON, R M.: Distinguished photons: increased contrast with multispectral in vivo fluorescence imaging. In: *Biotechniques* 39 (2005), Nr. 6 Suppl, S33-S37. PubMed
- [Markovsky *et al.* 2012] MARKOVSKY, E ; BAABUR-COHEN, H ; ELDAR-BOOCK, A ; OMER, L ; TIRAM, G ; FERBER, S ; OFEK, P ; POLYAK, D ; SCOMPARIN, A ; SATCHI-FAINARO, R: Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. In: *J Control Release* 161 (2012), Jul, Nr. 2, 446-60. PubMed. ISBN 1873-4995
- [Massari *et al.* 2000] MASSARI, C ; BRIENZA, S ; ROTARSKI, M ; GASTIABURU, J ; MISSET, J L. ; CUPISSOL, D ; ALAFACI, E ; DUTERTRE-CATELLA, H ; BASTIAN, G: Pharmacokinetics of oxaliplatin in patients with normal versus impaired renal function. In: *Cancer Chemother Pharmacol* 45 (2000), Nr. 2, 157-64. PubMed
- [Merzlyak *et al.* 2007] MERZLYAK, E M. ; GOEDHART, J ; SHCHERBO, D ; BULINA, M E. ; SHCHEGLOV, A S. ; FRADKOV, A F. ; GAINITZEVA, A ; LUKYANOV, K A. ; LUKYANOV, S ; GADELLA, T W. ; CHUDAKOV, D M.: Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. In: *Nat Methods* 4 (2007), Nr. 7, 555-7. PubMed
- [Nienhaus & Wiedenmann 2009] NIENHAUS, G U. ; WIEDENMANN, J: Structure, dynamics and optical properties of fluorescent proteins: perspectives for marker development. In: *Chemphyschem* 10 (2009), Jul, Nr. 9-10, 1369-79. PubMed. ISBN 1439-7641
- [Perea *et al.* 2011] PEREA, J ; LOMAS, M ; HIDALGO, M: Molecular basis of colorrectal cancer: towards an individualized management? In: *Rev Esp Enferm Dig* 103 (2011), Jan, Nr. 1, 29-35. PubMed. ISBN 1130-0108

- [Roper & Hung 2012] ROPER, J ; HUNG, K E.: Priceless GEMMs: genetically engineered mouse models for colorectal cancer drug development. In: *Trends Pharmacol Sci* (2012), Jun. PubMed. ISBN 1873–3735
- [Sandhu *et al.* 2010] SANDHU, G S. ; SOLORIO, L ; BROOME, A M. ; SALEM, N ; KOLTHAMMER, J ; SHAH, T ; FLASK, C ; DUERK, J L.: Whole animal imaging. In: *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2 (2010), Nr. 4, 398-421. PubMed
- [Schmiegel *et al.* 2008] SCHMIEGEL, W ; REINACHER-SCHICK, A ; ARNOLD, D ; GRAEVEN, U ; HEINEMANN, V ; PORSCHEN, R ; RIEMANN, J ; RÖDEL, C ; SAUER, R ; WIESER, M ; SCHMITT, W ; SCHMOLL, H-J ; SEUFFERLEIN, T ; KOPP, I ; POX, C: Update S3 guidelines colorectal cancer 2008 [in German]. In: *Z Gastroenterol* 46 (2008), Aug, Nr. 8, 799-840. PubMed. ISBN 0044–2771
- [von der Schulenburg *et al.* 2010] SCHULENBURG, J M. d. ; PRENZLER, A ; SCHURER, W: Cancer management and reimbursement aspects in Germany: an overview demonstrated by the case of colorectal cancer. In: *Eur J Health Econ* 10 Suppl 1 (2010), Jan, S21-6. PubMed. ISBN 1618–7601
- [Schädlich *et al.* 2012] SCHÄDLICH, A ; HOFFMANN, S ; MUELLER, T ; CAYSA, H ; ROSE, C ; GÖPFERICH, A ; LI, J ; KUNTSCHKE, J ; MÄDER, K: Accumulation of nanocarriers in the ovary: a neglected toxicity risk? In: *J Control Release* 160 (2012), May, Nr. 1, 105-12. PubMed. ISBN 1873–4995
- [Shaner *et al.* 2007] SHANER, N C. ; PATTERSON, G H. ; DAVIDSON, M W.: Advances in fluorescent protein technology. In: *J Cell Sci* 120 (2007), Dec, Nr. Pt 24, 4247-60. PubMed. ISBN 0021–9533
- [Shaner *et al.* 2005] SHANER, N C. ; STEINBACH, P A. ; TSIEN, R Y.: A guide to choosing fluorescent proteins. In: *Nat Methods* 2 (2005), Nr. 12, 905-9. PubMed
- [Sharkey & Fogh 1984] SHARKEY, F E. ; FOGH, J: Considerations in the use of nude mice for cancer research. In: *Cancer Metastasis Rev* 3 (1984), Nr. 4, 341-60. PubMed. ISBN 0167–7659
- [Sharpless & Depinho 2006] SHARPLESS, N E. ; DEPINHO, R A.: The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. In: *Nat Rev Drug Discov* 5 (2006), Sep, Nr. 9, 741-54. PubMed. ISBN 1474–1776
- [Shimosato *et al.* 1979] SHIMOSATO, Y ; KAMEYA, T ; HIROHASHI, S: Growth, morphology, and function of xenotransplanted human tumors. In: *Pathol Annu* 14 Pt 2 (1979), 215-57. PubMed
- [Shimosato *et al.* 1976] SHIMOSATO, Y ; KAMEYA, T ; NAGAI, K ; HIROHASHI, S ; KOIDE, T ; HAYASHI, H ; NOMURA, T: Transplantation of human tumors in nude mice. In: *J Natl Cancer Inst* 56 (1976), Nr. 6, 1251-60. PubMed

- [Shu *et al.* 2009] SHU, X ; ROYANT, A ; LIN, M Z. ; AGUILERA, T A. ; LEV-RAM, V ; STEINBACH, P A. ; TSIEN, R Y.: Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. In: *Science* 324 (2009), Nr. 5928, 804-7. PubMed
- [Skehan *et al.* 1990] SKEHAN, P ; STORENG, R ; SCUDIERO, D ; MONKS, A ; MCMAHON, J ; VISTICA, D ; WARREN, J T. ; BOKESCH, H ; KENNEY, S ; BOYD, M R.: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. In: *J Natl Cancer Inst* 82 (1990), Jul, Nr. 13, 1107-12. PubMed. ISBN 0027-8874
- [Stell *et al.* 2007] STELL, A ; BELCREDITO, S ; RAMACHANDRAN, B ; BISERNI, A ; RANDO, G ; CIANA, P ; MAGGI, A: Multimodality imaging: novel pharmacological applications of reporter systems. In: *Q J Nucl Med Mol Imaging* 51 (2007), Nr. 2, 127-38. PubMed
- [Söling & Rainov 2003] SÖLING, A ; RAINOV, N G.: Bioluminescence imaging in vivo - application to cancer research. In: *Expert Opin Biol Ther* 3 (2003), Oct, Nr. 7, 1163-72. PubMed. ISBN 1471-2598
- [Tomayko & Reynolds 1989] TOMAYKO, M M. ; REYNOLDS, C P.: Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. In: *Cancer Chemother Pharmacol* 24 (1989), Nr. 3, 148-54. PubMed
- [Walt *et al.* 1993] WALT, H ; OOSTERHUIS, J W. ; STEVENS, L C.: Experimental testicular germ cell tumorigenesis in mouse strains with and without spontaneous tumours differs from development of germ cell tumours of the adult human testis. In: *Int J Androl* 16 (1993), Aug, Nr. 4, 267-71. PubMed. ISBN 0105-6263
- [Wang *et al.* 2004] WANG, L ; JACKSON, W C. ; STEINBACH, P A. ; TSIEN, R Y.: Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004), Nr. 48, 16745-9. PubMed
- [Weissleder 2001] WEISSLEDER, R: A clearer vision for in vivo imaging. In: *Nat Biotechnol* 19 (2001), Apr, Nr. 4, 316-7. PubMed. ISBN 1087-0156
- [Yokoo *et al.* 2009] YOKOO, K ; HAMADA, A ; TAZOE, K ; SASAKI, Y ; SAITO, H: Effects of oral administration of S-1 on the pharmacokinetics of SN-38, irinotecan active metabolite, in patients with advanced colorectal cancer. In: *Ther Drug Monit* 31 (2009), Nr. 3, 400-3. PubMed

6.2 Daten der verwendeten Fluoreszenzproteine

Die Tab. 6.1 fasst die wichtigsten Daten der in dieser Arbeit verwendeten FP zusammen.

Für die Trennung der Autofluoreszenz von den jeweiligen Fluorochromsignalen müssen am Maestro-Imager Referenzemissionsspektren aufgenommen werden. Einmal isoliert werden diese Spektren für die Auswertung aller Cubes verwendet. Die Abb. 6.1 zeigt diese Referenzspektren der verwendeten FP normiert für alle verwendeten Filtersätze. Zunächst fällt auf, dass es eine geringfügige Rechtsverschiebung der Emissionsmaxima im Vergleich zu den *in vitro* beschriebenen gibt. Weiterhin sind aufgrund der Normierung keine Intensitätsunterschiede mehr zu erkennen, die aber vorhanden sind bedingt durch unterschiedliche Quantenausbeuten einerseits und die verschiedenen Extinktionsspektren andererseits. Zudem führen cut-on Effekte der Filter beispielsweise bei DsRed2 im gelben Filtersatz zu einer scheinbaren Emissionsmaximumverschiebung und damit zu einer Angleichung an die tiefroten FP. Im gelben Filtersatz gibt es für eGFP kein sinnvolles Spektrum mehr zu isolieren, hier liegt lediglich eine verzerrte Grundfluoreszenz vor. Für Untersuchungen von Farbmischungen wird des Weiteren deutlich, dass TurboFP635 und mPlum mit diesen Filtersätzen nicht zu trennen sind, da ihre Spektren zu stark überlappen.

Tabelle 6.1: Die wichtigen Eigenschaften der verwendeten FP.

Die Daten wurden 09/2011 aus Literatur und über des Internet erhoben. Es waren zu diesem Zeitpunkt verschiedene Angaben z. B. zu den Extinktionsmaxima im Umlauf. Internet-Links: Clontech - DsRed2, evrogen - TurboFP, Nikon - MircoscopyU und Uniprot.org - mPlum. Baird *et al.* [2000]; Gross *et al.* [2000]; Merzlyak *et al.* [2007]; Nienhaus & Wiedenmann [2009]; Shaner *et al.* [2007, 2005]; Wang *et al.* [2004]

	eGFP	DsRed2	TurboFP635	mPlum
Herkunft	Variante von GFP aus <i>Aequorea spec.</i>	Variante von dsRed aus <i>Discosoma spec.</i>	Variante von eqFP578 aus <i>Entacmaea spec.</i>	Variante von dsRed aus <i>Discosoma spec.</i>
Molekulargewicht	27 kDa	26 kDa	26 kDa	26 kDa
Polypeptidlänge	238 Aminosäuren	225 Aminosäuren	235 Aminosäuren	226 Aminosäuren
Fluoreszenzfarbe	grün	hellrot	tiefrot	tiefrot
Extinktionsmaximum	488 nm	563 nm	588 nm	590 nm
Emissionsmaximum	507 nm	582 nm	635 nm	649 nm
Quantenausbeute	0,60	0,55	0,34	0,10
Extinktionskoeffizient	56000 M ⁻¹ cm ⁻¹	43800 M ⁻¹ cm ⁻¹	65000 M ⁻¹ cm ⁻¹	41000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Helligkeit ^a	33,6 mM ⁻¹ cm ⁻¹	24,1 mM ⁻¹ cm ⁻¹	22,1 mM ⁻¹ cm ⁻¹	4,1 mM ⁻¹ cm ⁻¹
Helligkeit, % eGFP	100	72	66	12
Struktur	Monomer, z. T. lockeres Dimer	Tetramer	Dimer	Monomer
Aggregation	nein	wenig	nein	nein

^a Helligkeit als Produkt aus Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute

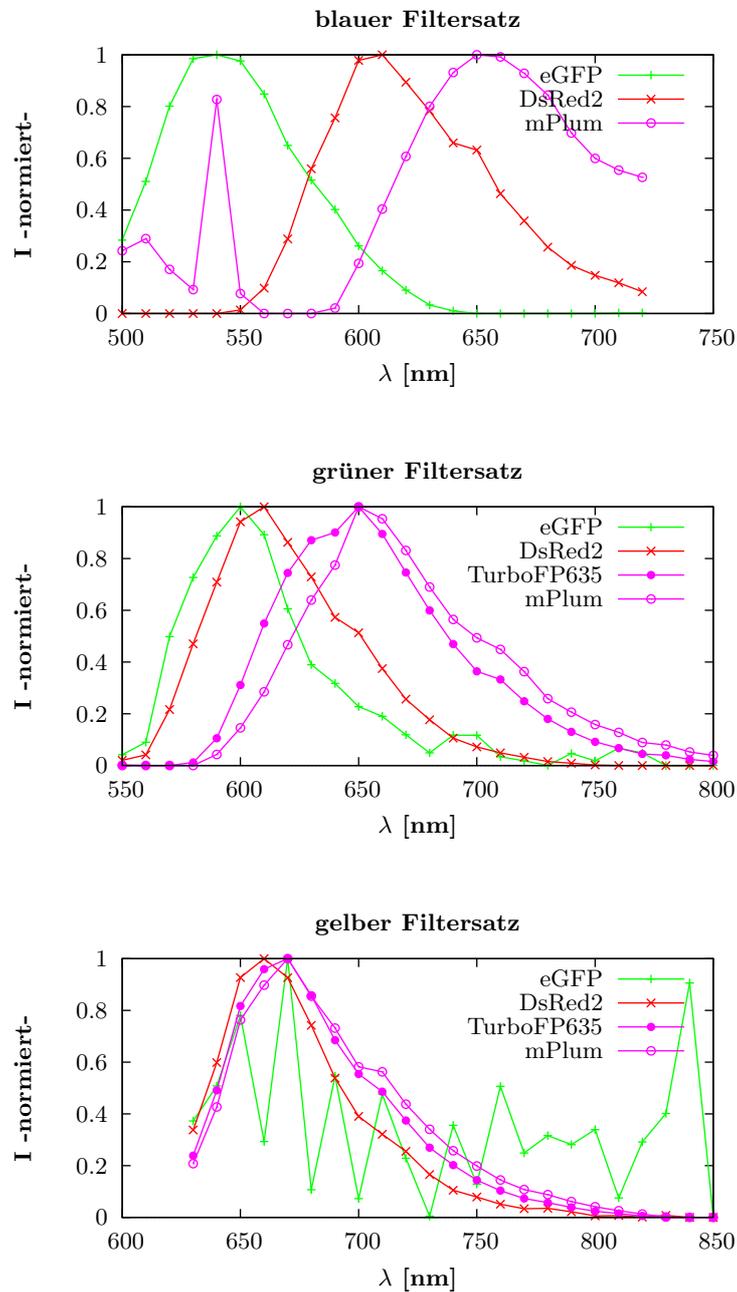


Abbildung 6.1: Die verschiedenen Emissionsspektren der verwendeten FP eGFP, DsRed2, TurboFP635 und mPlum zur Signalisolation am Maestro-Imager bei unterschiedlichen Filtersettings.

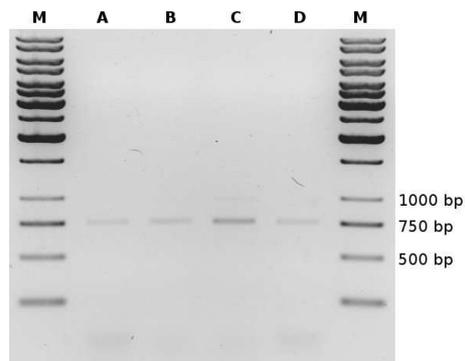


Abbildung 6.2: Die PCR zur Anreicherung des TurboFP635-Fragmentes.

Abgebildet ist das 1 % Kontrollagarosegel mit je 2 μ L der vier parallel angesetzten PCRs für die Anreicherung von TurboFP635 (A bis D). M: Marker Generuler 1 kb Ladder.

6.3 Klonierung der tiefroten RFP

Dargestellt sind die Agarosegelelektrophoresebilder der Klonierung von TurboFP635 (Abb. 6.2 und 6.3) und mPlum (Abb. 6.4) in das Plasmid pFU-W des lentiviralen Transduktionssystems.

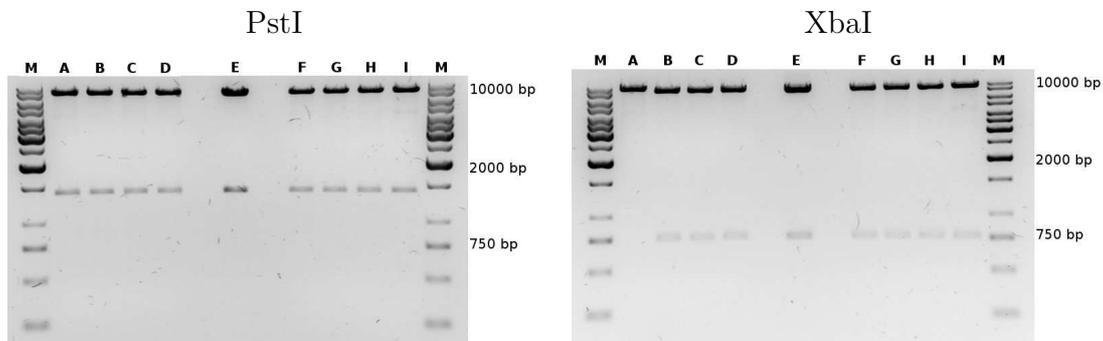


Abbildung 6.3: Der Kontrollrestriktionsverdau verschiedener pFUKW Klone mittels PstI und XbaI.

Die Abbildung zeigt das 1 % Agarosegel verschiedener *E. coli* pFUKW Klone. M: Marker Generuler 1 kb Ladder. A bis D: vier Klone des Ligationsansatzes 1, E: Kontrollrestriktionsverdau von pFUGW, F bis G: vier Klone des Ligationsansatzes 2. Für PstI sind alle Klone wie zu erwarten, aber eine Linearisierung mit XbaI zeigte nur der Klon in Spur A.

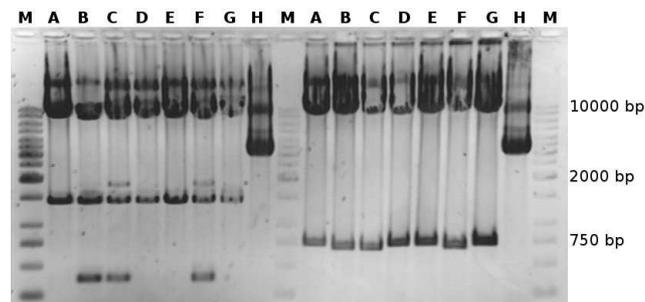


Abbildung 6.4: Der Kontrollrestriktionsverdau verschiedener pFUPW Klone mittels PstI (links) und XbaI (rechts).

Die Abbildung zeigt das 1 % Agarosegel verschiedener *E. coli* pFUPW Klone. M: Marker Generuler 1 kb Ladder. A bis G: die sieben Klone eines Ligationsansatzes, H: Restriktionsverdau eines potentiellen pFUKW Klons. Für XbaI sind die Klone B, C und F wie zu erwarten, aber bei Restriktionsverdau mit PstI zeigt nur der Klon in Spur B die gewünschten drei Banden.

6.4 Wachstumskinetiken

Im Folgenden sind die Ergebnisse der SRB-Assays zum Wachstum von DLD-1 WT und HT-29 WT sowie den jeweiligen Fluoreszenzklonen dargestellt (siehe die Abb. 6.5, 6.6 sowie 6.7). Die halblogarithmische Auftragung ermöglicht es, die exponentielle Wachstumsphase zu erkennen. Aus diesen Werten ohne eventuelle lag- oder stationäre Phase wurden die Verdopplungszeiten berechnet. Zudem konnte aus den Kurven die ideale Initialzellzahl für die Zytotoxizitätsassays abgelesen werden, bei der keine lag-Phase auftritt und die stationäre Phase möglichst nicht erreicht wird.

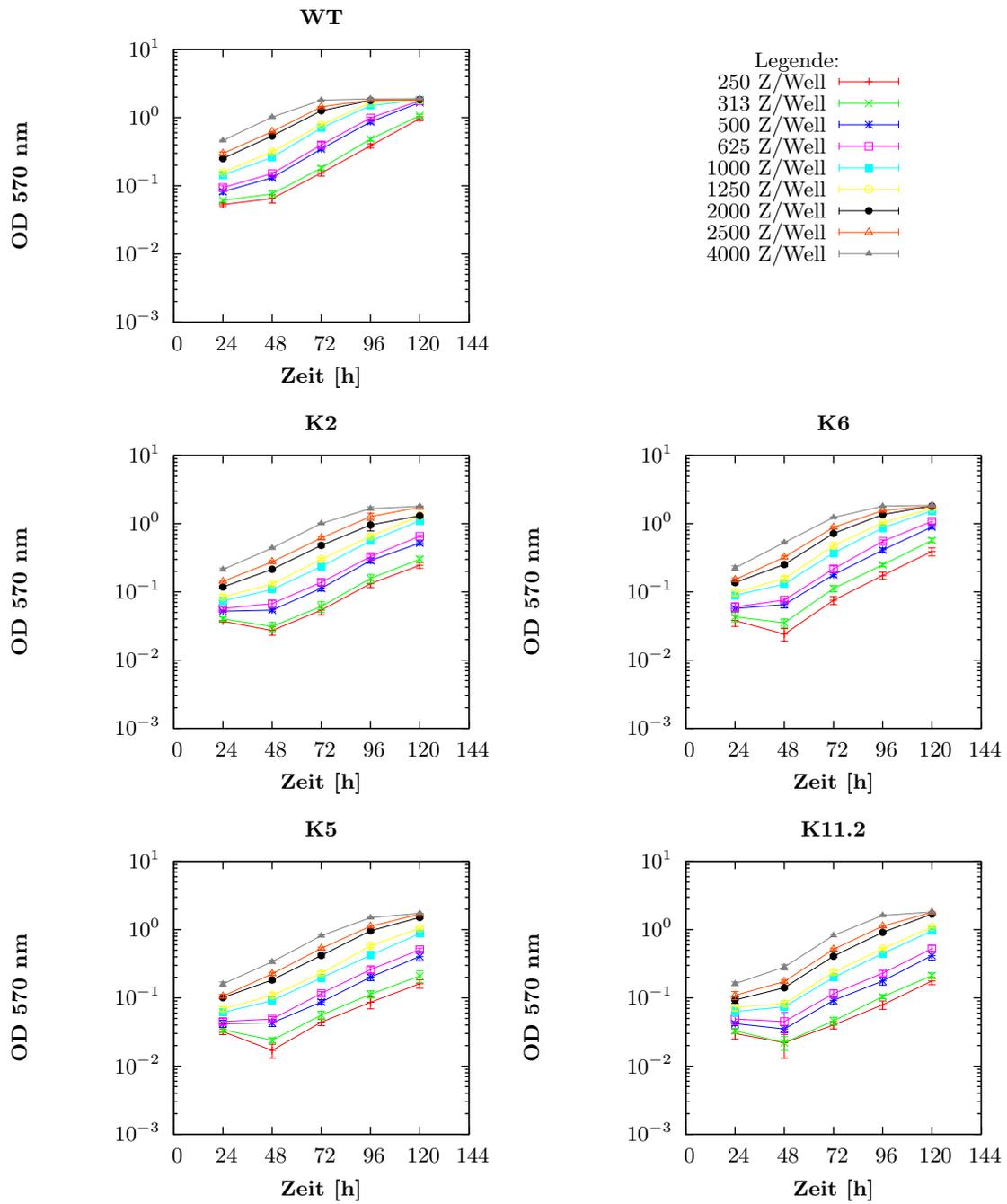


Abbildung 6.5: Die Ergebnisse der Wachstumskinetik für DLD-1 Zellen (TurboFP635 Klone) mittels SRB-Assay.

Halblogarithmische Darstellung des Zellwachstums verschiedener Initialzellzahlen über der Zeit.

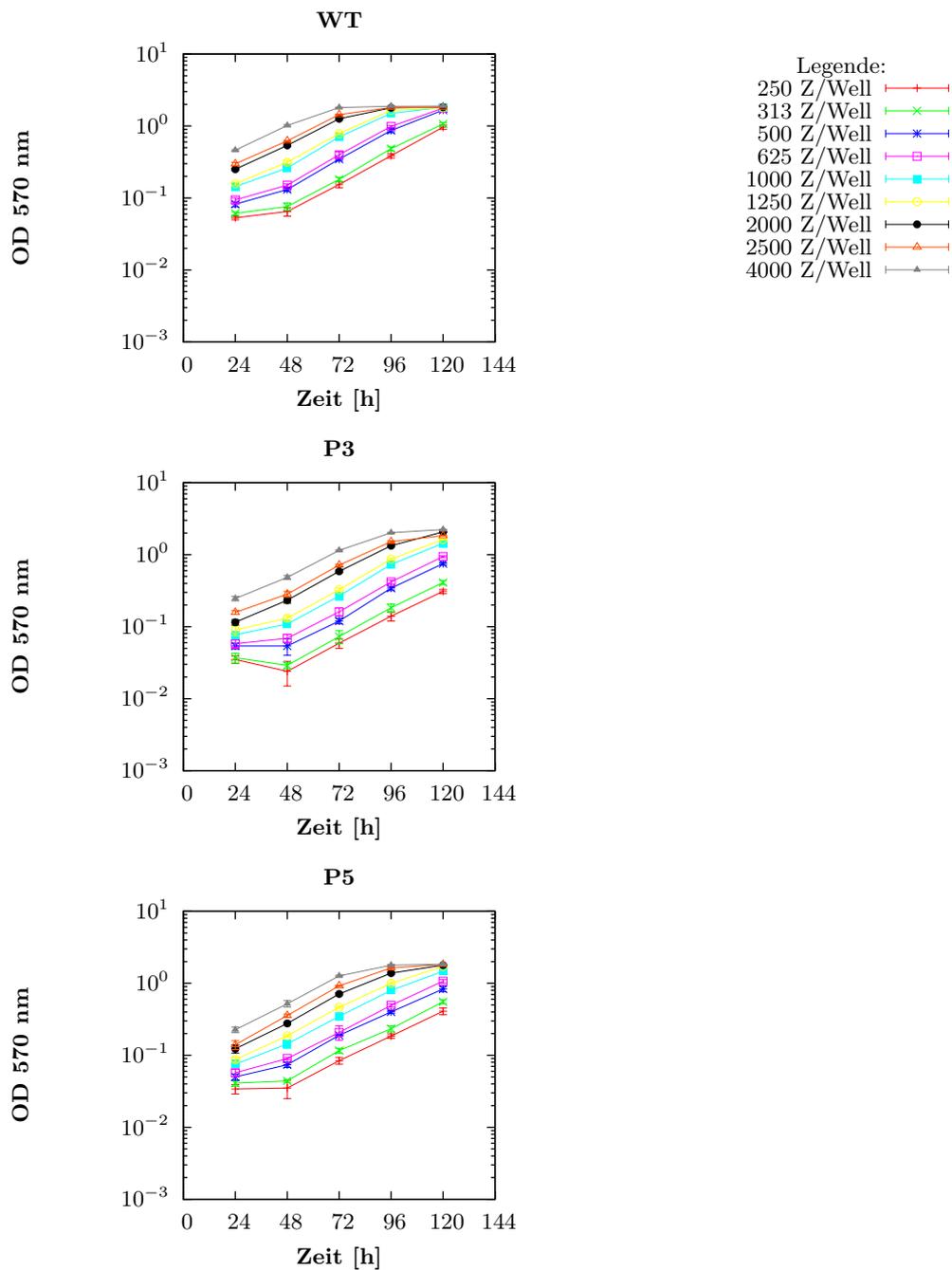


Abbildung 6.6: Die Ergebnisse der Wachstumskinetik für DLD-1 Zellen (mPlum Klone) mittels SRB-Assay. Halblogarithmische Darstellung des Zellwachstums verschiedener Initialzellzahlen über der Zeit.

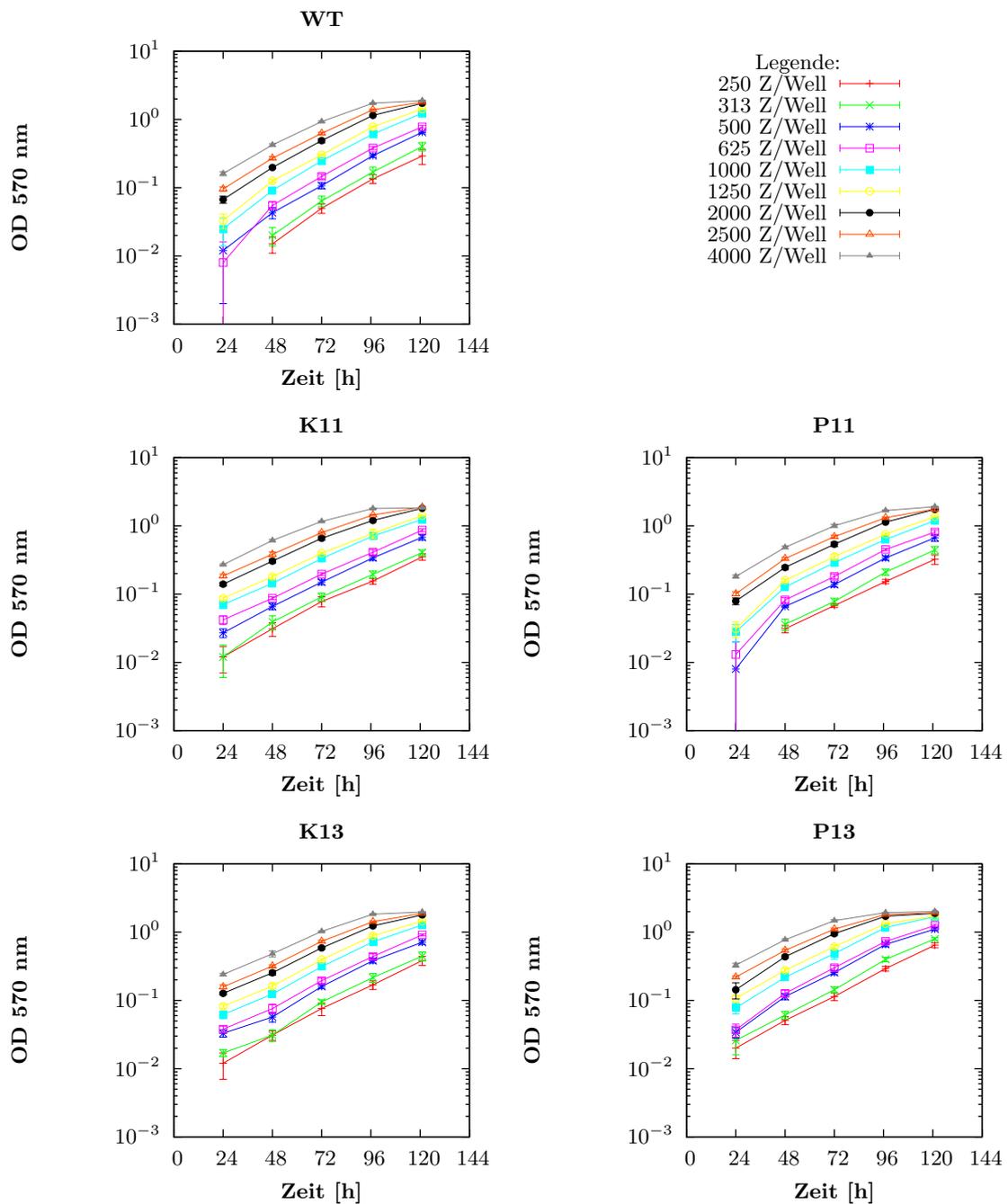


Abbildung 6.7: Die Ergebnisse der Wachstumskinetik für HT-29 Zellen mittels SRB-Assay.

Halblogarithmische Darstellung des Zellwachstums verschiedener Initialzellzahlen über der Zeit.

6.5 Erklärung

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in den Jahren 2007 bis 2012 im Hämatologisch/Onkologischen Forschungslabor, Universitätsklinik für Innere Medizin IV, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Teile der vorliegenden Arbeit sind in Publikationen eingegangen oder wurden zur Publikation eingereicht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet sowie verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ich versichere weiterhin, dass die aus anderen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet wurden. Ebenfalls sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Dienstleistungen als solche aufgeführt.

Ich versichere, dass die vorliegende Arbeit keiner anderen Universität oder Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde.

Ich versichere, dass ich mich zuvor noch nicht um einen Doktorgrad beworben habe.

Henrike Caysa

Halle (Saale), den

6.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karsten Mäder, Institut für Pharmazie, AG Pharmazeutische Technologie, für die Übernahme der Betreuung dieser Dissertation mit einem fächerübergreifenden Thema, sein Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seine stete kritische Diskussionsbereitschaft. Bei Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Schmoll, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, möchte ich mich für die Möglichkeit zur Bearbeitung des interessanten Themas bedanken.

Herzlich danken möchte ich Herrn Dr. Thomas Müller, Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabor der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin IV, für die Bereitstellung des Themas und sein Interesse am Fortgang der Arbeit, seine fortwährende, hilfreiche Unterstützung mit konstruktiven Ratschlägen und vor allem für die Möglichkeit, selbstständig eigene Ideen zu entwickeln und überprüfen zu dürfen.

Der AG Pharmazeutische Technologie danke ich für ihr Interesse an einem Thema, das nicht der klassischen Pharmazie zugeordnet war. Besonders möchte ich mich bei Herrn Stefan Hoffmann für die Herstellung der NIR-HES und die Diskussionen zur Bildgebung und -quantifizierung bedanken. Weiterhin danke ich Herrn Andreas Schädlich für den hilfreichen Austausch der Erfahrungen am Imager und seine technische Unterstützung.

Dem gesamten Team des Hämatologisch-Onkologisches Forschungslabors danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und stetige Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten.

Frau Dr. Susanne Unverzagt (Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik) möchte ich für die statistische Beratung zur Ermittlung der Abhängigkeiten der Fluoreszenzintensität und dem Fehler beim Imaging danken.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Seufferlein und Herrn Holger Reim, zum damaligen Zeitpunkt Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danken für die Möglichkeit zur Herstellung der Paraffinpräparate.

Für die Gelegenheit zur Nutzung des Biozero Mikroskops danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Geckle und Frau Dr. Stefanie Ruhs, Julius-Bernstein-Institut für Physiologie.

Ganz besonders möchte ich meiner Mutter danken, die meine Neugier immer gefördert und manchmal ertragen hat. Herzlich danken möchte ich Sascha für seine moralische Unterstützung, Geduld und Toleranz.

6.7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Henrike Caysa
Anschrift: Advokatenweg 3A, 06114 Halle (Saale)
Geburtsdatum: 26.07.1980
Geburtsort: Potsdam
Familienstand: ledig, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch
Elternzeit: 08/2008 bis 04/2009, 01/2013 bis heute

Arbeitstätigkeiten

06/2012 bis 12/2012 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, AG Pharmazeutische Technologie

05/2012 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Institut für angewandte Dermatopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

05/2009 bis 04/2012 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** an der Universitäts- und Poliklinik für Hämatologie/Onkologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Forschungslabor

01/2008 bis 07/2008

08/2007 bis 12/2007 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Institut für angewandte Dermatopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

08/2005 bis 07/2007 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** an der Universitäts- und Poliklinik für Neurochirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Neuroonkologisches Forschungslabor

12/2001 bis 06/2005 **Studentische Hilfskraft** am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart, Abteilung Biologische Abluftreinigung

Studium und Schulbildung

- 10/2005 bis 03/2012 **Promotionsstudium** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem Ziel des Erlangens des akademischen Grades **Dr. rer. nat.**
- 14.06.2005 Erlangung des akademischen Grades **Diplom-Biologin (technisch orientiert)** durch Urkunde und Zeugnis der Universität Stuttgart
- 10/2001 bis 06/2005 **Studium der Technischen Biologie** an der Universität Stuttgart
- 23.07.2001 **Vordiplom**
- 10/1999 bis 09/2001 **Studium der Biologie** an der Universität Leipzig
- 10.07.1999 **Abitur** an der Wilhelm-Ostwald-Schule, Gymnasium der Stadt Leipzig

Zusatzqualifikation

- Weiterbildung **Sachkundenachweis „Tierschutz / Versuchstierkunde“
Fachsprachenzertifikat Englisch**

Henrike Caysa

Halle (Saale), den

6.8 Publikationsliste

Artikel

1. Caysa H, Hoffmann S, Luetzkendorf J, Mueller LP, Unverzagt S, Mäder K, Mueller T. **Monitoring of xenograft tumor growth and response to chemotherapy by non-invasive in vivo multispectral fluorescence imaging.** PLoS One. 2012;7(10):e47927. Epub 2012 Oct 24. PMID: 23112873 [PubMed - in process].
2. Schädlich A, Hoffmann S, Mueller T, Caysa H, Rose C, Göpferich A, Li J, Kuntsche J, Mäder K. **Accumulation of nanocarriers in the ovary: a neglected toxicity risk?** J Control Release. 2012 May 30;160(1):105-12. Epub 2012 Feb 21. PMID: 22361117.
3. Hoffmann S, Vystrčilová L, Ulbrich K, Etrych T, Caysa H, Mueller T, Mäder K. **Dual Fluorescent HPMA Copolymers for Passive Tumor Targeting with pH-Sensitive Drug Release: Synthesis and Characterization of Distribution and Tumor Accumulation in Mice by Noninvasive Multispectral Optical Imaging.** Biomacromolecules. 2012 Mar 12;13(3):652-63. Epub 2012 Feb 10. PubMed PMID: 22263698.
4. Hoffmann S, Vystřeilova L, Ulbrich K, Etrych T, Caysa H, Mueller T, Mäder K. **HPMA Copolymer Drug Conjugates with pH-sensitive Release: Noninvasive and Simultaneous Characterisation of Carrier and Drug Model Biodistribution and Tumor Accumulation In Mice By Use of In Vivo Multispectral Optical Imaging.** Polymers in Medicine. 2012. ISBN 978-80-85009-72-9.
5. Schädlich A, Caysa H, Mueller T, Tenambergen F, Rose C, Göpferich A, Kuntsche J, Mäder K. **Tumor accumulation of NIR fluorescent PEG-PLA nanoparticles: impact of particle size and human xenograft tumor model.** ACS Nano. 2011 Nov 22;5(11):8710-20. Epub 2011 Oct 10. PubMed PMID: 21970766.
6. Besheer A, Caysa H, Metz H, Mueller T, Kressler J, Mäder K. **Benchtop-MRI for in vivo imaging using a macromolecular contrast agent based on hydroxyethyl starch (HES).** Int J Pharm. 2011 Sep 30;417(1-2):196-203. Epub 2010 Nov 5. PubMed PMID: 21056646.
7. Schädlich A, Rose C, Kuntsche J, Caysa H, Mueller T, Göpferich A, Mäder K. **How stealthy are PEG-PLA nanoparticles? An NIR in vivo study combined with detailed size measurements.** Pharm Res. 2011 Aug;28(8):1995-2007. Epub 2011 Apr 27. PubMed PMID: 21523513.

8. **Caysa H, Metz H, Mäder K, Mueller T. Application of Benchtop-magnetic resonance imaging in a nude mouse tumor model.** J Exp Clin Cancer Res. 2011 Jul 21;30(1):69. PubMed PMID: 21777437; PubMed Central PMCID: PMC3158420.
9. Mueller LP, Luetzkendorf J, Widder M, Nерger K, **Caysa H, Mueller T. TRAIL-transduced multipotent mesenchymal stromal cells (TRAIL-MSС) overcome TRAIL resistance in selected CRC cell lines in vitro and in vivo.** Cancer Gene Ther. 2011 Apr;18(4):229-39. Epub 2010 Oct 29. PubMed PMID: 21037557.
10. Luetzkendorf J, Mueller LP, Mueller T, **Caysa H, Nерger K, Schmoll HJ. Growth inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence.** J Cell Mol Med. 2010 Sep;14(9):2292-304. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00794.x. PubMed PMID: 19508388.
11. **Caysa H, Jacob R, Müther N, Branchini B, Messerle M, Söling A. A redshifted codon-optimized firefly luciferase is a sensitive reporter for bioluminescence imaging.** Photochem Photobiol Sci. 2009 Jan;8(1):52-6. Epub 2008 Oct 29. PubMed PMID: 19247529.

Tagungsbeiträge

1. Hoffmann S, **Caysa H, Vystrcilova L, Etrych T, Ulbrich K, Mueller T, Mäder K. Polymers as Promising Drug Carrier Systems for Targeted Tumor Therapy - In Vitro Characterization and In Vivo Analyses.** Polymeric Materials 2012, Halle (Saale), 2012.
2. **Caysa H, Hoffmann S, Mueller T, Mäder K. Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Charakterisierung moderner Arzneiformen unter Einbeziehung präklinischer in vivo Mausmodelle.** Innovationsforum: Funktionelle Farbstoffe - Innovation in Medizin und Technik, Bitterfeld-Wolfen, 2012.
3. Hoffmann S, Vystrcilova L, Ulbrich K, Etrych T, **Caysa H, Mueller T, Mäder K. Tumour Targeted Delivery of Polymer Drug Conjugates with pH-Sensitive Release: Monitoring the Biodistribution of Carriers and Drug Model Simultaneously by Multispectral Optical Imaging.** 9th International Symposium on Polymer Therapeutics: From Laboratory to Clinical Practice, Valencia, 2012.
4. Hoffmann S, Vystrcilova L, Ulbrich K, Etrych T, **Caysa H, Mueller T, Mäder K. HPMA Copolymer Drug Conjugates with pH-sensitive Release** 76th Prague Meeting on Macromolecules: Polymers in Medicine, Prag, 2012.

5. Schädlich A, Hoffmann S, Mueller T, **Caysa H**, Mäder K. **Is the Accumulation of Nanocarriers in the Ovary a Common Phenomenon?** 76th Prague Meeting on Macromolecules: Polymers in Medicine, Prag, 2012.
6. Schobert R, Biersack B, **Caysa H**, Sassa F, Reipsch F, Mueller T. **Characterisation of new vascular-disrupting agents with antitumor activity.** DGHO Jahrestagung, Basel, 2011.
7. Hoffmann S, Schädlich A, **Caysa H**, Mueller, T. and Mäder, K. **HES 450 as Potential Drug Delivery System for Passive Tumor Targeting: An In Vivo Study in Nude Mice Using Near Infrared Optical Imaging.** European Summerschool in Nanomedicine 2011, Wittenberg, 2011.
8. Hoffmann S, Schädlich A, **Caysa H**, Mäder K. **In Vivo Characterisation Of High Molecular Weight Hydroxyethyl Starch Using Noninvasive Fluorescence Imaging.** 8th International Symposium on Polymer Therapeutics: From Laboratory to Clinical Practice, Valencia, 2010.
9. Hoffmann S, Schädlich A, **Caysa H**, Mäder K. **Plasma Volume expanders as Potential Drug delivery Systems – An in vivo study utilising Noninvasive Near Infrared Fluorescence Optical Imaging.** DPhG Jahrestagung, Braunschweig, 2010.
10. **Caysa H**, Mäder K, Metz H, Mueller LP, Luetzkendorf J, Schmoll HJ, Mueller T. **Monitoring of xenograft tumour growth and response to chemotherapy by non-invasive *in vivo* fluorescence imaging.** Advanced Drug Delivery, Berlin, 2009.
11. Luetzkendorf J, Mueller T, **Caysa H**, Nerger K, Schmoll HJ, Mueller, LP. **TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells (MSC) can overcome resistance to soluble TRAIL in colorectal carcinoma (CRC) cells.** DGHO Jahrestagung, Heidelberg / Mannheim, 2009.
12. Besheer A, Vogel J, **Caysa H**, Groth T, Kressler J, Mäder K. **Comparison of hydrophobically-modified hydroxyethyl starch vs. pluronics as stabilizers of PLGA nanospheres.** Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Braunschweig, 2008.
13. **Caysa H**, Mueller T, Mäder K, Metz H. **Benchtop MRI: A new tool for the noninvasive characterisation of drug delivery and cancer in mice.** Controlled Release Society German Chapter Annual Meeting, Braunschweig, 2008.
14. **Caysa H**, Mäder K, Metz H, Mueller LP, Luetzkendorf J, Schmoll HJ, Mueller T. **Monitoring of xenograft tumour growth and response to chemotherapy**

-
- by non-invasive in vivo fluorescence imaging.** International Symposium on Polymer Therapeutics, Valencia, 2008.
15. Kramm CM, Gombert M, **Caysa H**, Söling A, Hanenberg H. **New 4-Ipomeanol analogues are potent prodrugs of the rabbit cytochrome P450 4B1 suicide gene therapy system in human glioma cells in vivo and in vitro.** Arbeitstagung „Experimentelle Neuroonkologie“, Oldenburg, 2007.
16. Müther N, **Caysa H**, Nagel CH, Sodeik B, Söling A, Messerle M. **Evaluation of the therapeutic effect of oncolytic herpes simplex viruses by bioluminescence imaging.** 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie, Düsseldorf, 2006. 1. Posterpreis zuerkannt.