

Aus dem
CharitéCentrum 6 für diagnostische und interventionelle
Radiologie und Nuklearmedizin
Institut für Radiologie (mit dem Bereich Kinderradiologie)
Direktor: Prof. Dr. med. B. Hamm

Habilitationsschrift

Multimodale molekulare Bildgebung solider Tumore im Mausmodell

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Radiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Lars H.F. Stelter
geboren in Essen

Eingereicht: Februar 2015
Dekan: Professor Dr. A. R. Pries
1. Gutachter/in: Professor Dr. G. Antoch
2. Gutachter/in: Professor Dr. B. J. Krause

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung und Fragestellung	6
1.1 Molekulare Bildgebung	6
1.1.1 Prinzipien und Anforderungen.....	6
1.1.2 Liganden- und Tracer-Prinzip.....	6
1.2 Modalitäten der Molekularen Bildgebung.....	7
1.3 Prinzip der Multimodalität.....	12
1.4 Molekulare Bildgebung in der präklinischen Onkologie	13
1.5 Molekulare Bildgebung in der Translation: Präklinik - Klinik	14
1.6 Fragestellungen	16
2. Eigene Arbeiten	17
2.1 Neue mechanistische Einsichten in die Pharmakologie von Arginin Deiminase suggerieren, dass ¹⁸ F-FDG sich nicht für die Therapiebeurteilung im Melanom eignet (Originalarbeit 1).....	17
2.2 Evaluation der Arginin Deiminase Therapie im Melanom Xenograft mittels ¹⁸ F-FLT PET (Originalarbeit 2).....	25
2.3 Bildgebung der Tumor-Vaskularisation mittels Fluorescence Molecular Tomography zur Beobachtung der Arginin Deiminase Therapie im Melanom (Originalarbeit 3)	34
2.4 Tumor-spezifischer Angriff durch modifizierte Sindbis Virus Vektoren: Evaluation mit Optischer Bildgebung und Positronen Emissions Tomographie <i>in Vivo</i> (Originalarbeit 4)	42
2.5 Ein orthotopes Modell pankreatischer Somatostatin Rezeptor (SSTR)-Positiver Tumore erlaubt bimodale Bildgebungsstudien mittels 3T MRT und Tier-PET- basierter Molekularer Bildgebung von SSTR Expressionen (Originalarbeit 5)	52
3. Diskussion	64
4. Zusammenfassung	72
5. Liste der in dieser Habilitation zusammengefassten Veröffentlichungen	75
6. Literaturverzeichnis	76
7. Danksagung	84

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
3T	drei Tesla
ADI	Arginin Deiminase
Ak	Antikörper
5-ALA	5-Aminolevulinsäure
Arg	L-Arginin
AS	Aminosäure
ASL	Argininosuccinatlyase
ASS	Argininosuccinatsynthetase
ATP	Adenosintriphosphat
BLI	Bioluminescence Imaging = Biolumineszenzbildgebung
bzw.	beziehungsweise
CCD	charge-coupled device
cm	Zentimeter
¹¹ C-MET	[¹¹ C]-methyl-L-methionin
CRC	Kolorektales Karzinom
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGFR	Endothelial Growth Factor Receptor
et al.	et alii/-ae/-a = und andere
FDA	Food and Drug Administration
¹⁸ F-FDG	[¹⁸ F]-2'-fluoro-2'-deoxy-D-Glukose
¹⁸ F-FEAU	[¹⁸ F]-2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-β-arabinofuranosyl-5-ethyluracil
¹⁸ F-FLT	[¹⁸ F]-fluoro-3'-deoxy-3'-L-Fluorothymidin
FLuc	Firefly Luciferase
FMT	Fluorescence Molecular Tomography
fMRT	funktionelle Magnet Resonanz Tomographie
FRI	Fluorescence Reflectance Imaging
FSHR	Follikel-stimulierender Hormonrezeptor
GDEPT	Gen-vermittelte Enzym-Prodrug Therapie
GEMM	Genetically-engineered Mouse Model
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

IHC	Immunhistochemie
¹²⁴ I-FIAU	[¹²⁴ I]-2'-fluoro-2'-deoxy-1-β-D-arabinofuranosyl-5-iodo-uracil
i.v.	intravenös
keV	Kiloelektronenvolt
KM	Kontrastmittel
LR	Lamininrezeptor
LSO	Lutetium Oxyorthosilikat
Mio.	Millionen
min.	Minuten
mm	Millimeter
Mrd.	Milliarden
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MRAC	MR-attenuation correction = MRT-Schwächungskorrektur
NET	Neuroendokriner Tumor
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	Nicht kleinzelliges Lungenkarzinom
o.g.	oben genannt
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PET	Positronen Emissions Tomographie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PSMA	Prostata-spezifisches Membran-Antigen
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
SCID	Severe combined immunodeficiency
SINV	Sindbis Virus
SK-MEL	Sloan-Kettering Melanomzellen
sog.	sogenannt
SPECT	Single Photon Emissions Tomographie
SSTR	Somatostatin Rezeptor
SUV	standardized uptake value
TK1	Thymidinkinase 1
u.a.	unter anderem

USA	United States of America
vs.	versus
VVF	vascular volume fraction
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Molekulare Bildgebung

Die Molekulare Bildgebung beschreibt die Vereinigung bildgebender Verfahren mit der Molekular- und Zellbiologie. Im Gegensatz zur anatomisch-morphologisch ausgerichteten traditionellen radiologischen Diagnostik befasst sich die Molekulare Bildgebung mit der Darstellung und Quantifizierung molekularer und zellulärer Strukturen und Abläufe in Tieren und Menschen.

1.1.1 Prinzipien und Anforderungen

Zielstrukturen (sog. 'targets') der Molekularen Bildgebung können bestimmte Zellpopulationen oder spezifische Merkmale, wie z.B. Rezeptoren der Zelloberfläche sein. Desweiteren ist es möglich komplexere Abläufe wie den zellulären Metabolismus, Interaktionen einzelner Proteine oder Transkriptionslevel von Nukleinsäuren zu untersuchen [1]. Ansatz und Anspruch der Molekularen Bildgebung ist die möglichst spezifische und sensitive Detektion des jeweiligen 'targets' und die frühzeitige Charakterisierung pathologischer Veränderungen [2]. Darüber hinaus besteht das Ziel einer verbesserten Klassifizierung von Schwere und Stadium einer Erkrankung sowie die objektive Beurteilung des Therapieerfolgs und eine somit zuverlässige Prognosabschätzung. Durch die Evaluierung pathophysiologischer wie auch physiologischer Prozesse ist die Molekulare Bildgebung ebenso Werkzeug in der Entwicklung neuer Therapien [3, 4].

1.1.2 Liganden- und Tracer-Prinzip

Nach Definierung einer Zielstruktur muss ein Ligand gefunden werden, der mit hoher Affinität und Spezifität an diese Struktur bindet [2, 5]. In Abhängigkeit von dem im Weiteren einzusetzenden bildgebenden Verfahren, muss an den

gewählten Liganden ein passendes detektierbares Signalmolekül gekoppelt werden. Dieser Prozess wird im Allgemeinen als 'labeling' bezeichnet [2, 6]. Diese gelabelten Liganden oder Tracer lassen sich im Wesentlichen in konstitutiv aktive Tracer und aktivierbare Tracer kategorisieren. Für nuklearmedizinische Modalitäten stehen eine Vielzahl an Radioisotopen, die ihr Signal konstant ("aktiv") durch radioaktiven Zerfall abgeben, zur Verfügung [7]. Optische Verfahren hingegen arbeiten mit Substraten oder Fluorochromen, die nach Bindung an die Zielstruktur erst z.B. enzymatisch oder durch Energieeinbringung aktiviert werden müssen bzw. nur durch Interaktion mit der Zielstruktur signalgebend wirken [8, 9]. Diese Eigenschaft der molekularen Spezifität bietet den Vorteil eines geringen Hintergrundsignals. Nachteil innovativer Tracer ist die erschwerte Translation in die Klinik und, aufgrund von aufwendigen regulatorischen Prozessen und Formalien, der tatsächliche Einsatz am Patienten [10].

1.2 Modalitäten der Molekularen Bildgebung

Für die Molekulare Bildgebung stehen eine Reihe geeigneter bildgebender Systeme zur Verfügung. Diese Systeme differieren mitunter erheblich in ihrer räumlichen Auflösung, ihres Tiefenlimits, ihrer Sensitivität sowie der Möglichkeit zur Quantifizierung und Verfügbarkeit ihres Tracerspektrums [2]. Im Folgenden finden die Modalitäten Erwähnung, die auch in der Durchführung der hier aufgeführten Studien zum Einsatz kamen.

1.2.1 Optische Bildgebung

Die optische Bildgebung ist eine der häufigsten eingesetzten Modalitäten in der Grundlagenforschungs-nahen Bildgebung. Methodisch basiert sie im Wesentlichen auf der Signaldetektion aus der Biolumineszenz und der Fluoreszenz [11]. Beide

Verfahren eignen sich sowohl für die *in vitro* als auch die präklinische *in vivo* Bildgebung und stellen hochsensitive Verfahren (im nano- bis femtomolaren Bereich) dar [8]. Weitere Vorteile sind die Schnelligkeit der Datenakquisition und die relativ geringen Kosten. Einschränkend für den klinischen Einsatz der optischen Bildgebung sind ihr, durch Lichtstreuung und Absorption im Gewebe bedingtes, Tiefenlimit von wenigen Zentimetern und ihre geringe räumliche Auflösung (in etwa ein Millimeter) [2, 12].

1.2.1.1 Bioluminescence Imaging (BLI)

Die Biolumineszenzbildgebung basiert auf dem Einsatz optischer Reporterproteine, den Luziferasen, und der Gene, die für diese Enzyme kodieren [13]. Das Substrat der Luziferasen sind die Luziferine, die, nach enzymatischer Oxidation, Licht im grünen Wellenlängenbereich (490 – 620 nm) emittieren. Um die Biolumineszenz für die Molekulare Bildgebung nutzen zu können, müssen Zellen mit dem Luziferase-Gen transfiziert und das Substrat Luziferin appliziert werden [2, 14]. Der grosse Vorteil der BLI ist, wie bereits oben beschrieben, die hohe Sensitivität basierend auf einem sehr niedrigen Hintergrundsignal. Das Biolumineszenzsignal kann nicht-invasiv durch makrooptische Systeme, sogenannter charge-coupled device Kameras (CCD Kameras), als Ganzkörperaufnahme *in vivo* detektiert und im Weiteren quantifiziert werden. Die BLI ermöglicht zahlreiche Varianten und Kombinationen an Reporter-Konjugaten, z.B. durch die Inkorporation von Reporter-Genen verschiedener Luciferasen oder Antikörpern (Ak), in die Ziel-DNA [15]. Ihr Einsatz ist aufgrund ihrer eingeschränkten translationalen Kapazität ein primär präklinischer, z.B. für die Validierung potentieller therapeutischer Targets oder die Testung experimenteller Trägermoleküle, welche ein Therapeutikum an die jeweilige Zielstruktur transportiert [16].

1.2.1.2 Fluorescence Reflectance Imaging (FRI)

Die FRI ist ein planares bildgebendes Verfahren, welches die Eigenschaft von Fluoreszenzfarbstoffen (sogenannten Fluorochromen) nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (= Exzitation), langwelligeres Licht als das Anregungslicht abzugeben (= Emission) nutzt [2]. Das emittierte Licht kann durch geeignete Filter, die nur das Fluoreszenzsignal passieren lassen, über CCD Kameras detektiert und nach digitaler Weiterverarbeitung quantifiziert werden [2]. In Abhängigkeit vom Filtersystem ist es möglich mehrere Fluorochrome simultan einzusetzen und somit, entsprechend der gekoppelten Liganden, verschiedene biologische Prozesse zeitgleich zu beobachten [17]. Die Translation der FRI in den klinischen Alltag hat bereits stattgefunden. So ist die Fluoreszenz-gesteuerte retinale Angiographie oder die Fluoreszenz Projektionsmammographie mit Indocyaningrün zum Teil bereits seit mehreren Jahren klinisch praktikabel [18, 19]. Die klinisch ausgerichtete 'Fluorescence-guided surgery study group' hat sich zum Ziel gesetzt die Fluoreszenz Bildgebung, z.B. in Kombination mit der Endoskopie, fester in die klinische Medizin und insbesondere die Chirurgie zu implementieren. Die Ermöglichung eines 'molekularen Kontrastes' von z.B. tatsächlichen Tumorgrenzen, die, wenn unterhalb von Gewebeflächen, für das menschliche Auge nicht erfassbar sind, kann nach Einschätzung der Arbeitsgruppe die Medizin und die Patientenversorgung deutlich verbessern [20, 21].

1.2.1.3 Fluorescence Molecular Tomography (FMT)

Das tomographische fluoreszenzoptische Verfahren FMT ist ebenso sehr sensitiv (pico- bis femtomolar) und liefert im Gegensatz zur planaren FRI einen hochaufgelösten (Submillimeterbereich) 3D Datensatz. Dieser kann, ähnlich wie bei anderen schnittbildgebenden Modalitäten, in verschiedenen räumlichen

Ebenen rekonstruiert und quantifiziert werden. Mit der FMT ist es somit möglich auch Strukturen in relativer Körpertiefe (bis 10 cm) zu detektieren [22]. Das FMT arbeitet ausschliesslich im nahinfraroten Fluoreszenzspektrum (680-750 nm). In diesem Wellenlängenbereich ist eine deutlich bessere Signaldetektion möglich, da das emittierte Licht weniger durch das Blut (oxigeniertes und de-oxigeniertes Hämoglobin) absorbiert wird und die Autofluoreszenz der Haut bis auf ein Minimum reduziert ist [23]. Insgesamt wird durch die hochaufgelösten Schichtaufnahmen ein linearerer Bezug zu der rekonstruierten Fluorochromkonzentration und dem vom Liganden 'getargeten' Molekül gewährleistet. Das FMT eignet sich somit hervorragend für nicht-invasive Biodistributionsstudien von z.B. neuer Klassen fluoreszierender Proteine und Liganden [1, 24].

1.2.2 Positronen Emissions Tomographie (PET)

In der klinischen Routine wie auch der präklinischen Forschung kommt der PET insbesondere in der Charakterisierung, Ausbreitungsdiagnostik und Therapie von neoplastischen Erkrankungen eine maßgebliche Rolle zu. Durch ihre Eigenschaft Modulationen im Metabolismus pathologisch veränderter Gewebe hochsensitiv (nano- bis picomolar) und somit potentiell frühzeitig sowie, in Abhängigkeit vom eingesetzten Tracer, spezifisch zu detektieren ist sie eine fest etablierte Modalität der Molekularen Bildgebung [25, 26]. Die Bildgebung in der PET, sowie in anderen nuklearmedizinischen Modalitäten, basiert auf dem radioaktiven Zerfall eines Radiopharmakons, z.B. einem Glukose-Analogon gebunden an ein Positronen-emittierendes Radionuklid. Die frei werdende Positronen wandeln sich jeweils im Gewebe zusammen mit einem Elektron in zwei Gammaquanten gleicher Energie (511 keV) um, die in entgegengesetzter Richtung freigesetzt und zeitgleich vom PET-Detektorring (meist bestehend aus Lutetium Oxyorthosilikat-(LSO)-Kristallen)

registriert werden können [2]. Nachteilig bei der PET ist die damit verbundene Strahlenexposition und die, u.a. durch den PET-Scanner bedingten, relativ hohen Kosten. Aufgrund der eingeschränkten Auflösung von dedizierten Kleintier-PET-Scannern (1-2 mm) und der somit wenig detaillierten Information auf anatomisch-morphologischer Ebene, kann die kombinierte Bildgebung mit einem hochauflösenden Verfahren, wie z.B. der Magnet Resonanz Tomographie, vorteilig sein [2, 27].

1.2.3 Magnet Resonanz Tomographie (MRT)

Die MRT stellt, im Gegensatz zu den Verfahren der optischen Bildgebung und denen der Nuklearmedizin, eine Modalität mit hoher Auflösung (Mikrometerbereich) und einem exzellenten Weichgewebekkontrast dar. Weitere Vorteile sind die fehlende ionisierende Strahlung und die quasi nicht bestehende Tiefenlimitation der Bildgebung. Die MRT nutzt die Eigenschaft der kernmagnetischen Resonanz von Wasserstoff-Atomen (H^+) im Zell- bzw. Gewebsverband. Die Protonen der H^+ -Kerne richten sich im Magnetfeld des Scanners parallel bzw. anti-parallel aus. Mit Hilfe von Radiofrequenzimpulsen kann die Ordnung dieser Magnetisierung beeinflusst werden, welches dazu führt, dass die H^+ -Kerne ein rotierendes magnetisches Feld produzieren, das vom MRT-Scanner detektiert werden kann [28]. Verschiedene Variablen, wie die Protonendichte, die T1- und T2-Relaxationszeiten der Gewebe oder die Präzessionsfrequenz (oder Larmofrequenz) der Teilchen beeinflussen die Bildakquisition des gescannten Objekts [29]. Neben den morphologisch-anatomischen Daten ist die Generierung funktioneller Informationen über z.B. Perfusion, Diffusion sowie biochemische oder molekularbiologische Kontraste ebenso möglich. [30, 31]. Einschränkend ist hierbei, im Vergleich zu den zuvor

beschriebenen Modalitäten, jedoch die geringere Sensitivität, die hohen Kosten der MR-Bildgebung sowie der relativ hohe Aufwand der Datenakquisition zu nennen.

1.3 Prinzip der Multimodalität

Multimodale Molekulare Bildgebung beschreibt die synergistische Kombination zweier oder mehrerer bildgebender Verfahren [32]. Einen großen Vorteil des multimodalen Ansatzes birgt die Möglichkeit die Stärken einer einzelnen Modalität mit denen eines anderen Verfahrens zu kombinieren und somit gleichzeitig ihre jeweiligen Schwächen zu minimieren. Historisch gesehen werden bildgebende Modalitäten in zwei Grundkategorien eingeteilt: die anatomische Bildgebung (also Verfahren, die primär die Morphologie darstellen), welche die MRT, die Computertomographie (CT) und den Ultraschall beinhaltet, und die funktionelle Bildgebung (Verfahren, die Informationen über metabolische und biochemische Abläufe liefern), welche die PET, die Single Photon Emissions Tomographie (SPECT), die MR-Spektroskopie sowie die funktionelle MRT (fMRT) und, noch vorrangig im Bereich der Präklinik, die optischen Bildgebungsverfahren umfasst [33]. Die zwei praktikablen Ansätze der multimodalen Bildakquisition und -fusion sind entweder Software- oder Hardware-basiert. In der ersten Variante werden die unterschiedlichen Datensätze an verschiedenen Geräten erstellt, prozessiert und anschliessend digital fusioniert. Die Grundlage der Hardware-basierten Multimodalität stellt ein Kombinationsgerät aus z.B. einem state-of-the-art PET- und CT- oder MRT-Scanner dar. Diese kombinierten Modalitäten weisen eine nahezu perfekte Koregistrierung von Funktion und Anatomie *in vivo* auf, sind somit zeitsparend und angenehmer, weil vom Ablauf her weniger aufwendig, für den Patienten. Insbesondere in der Onkologie haben diese Verfahren, bei verbesserter

diagnostischer Genauigkeit und der Möglichkeit der weiteren Charakterisierung von Tumoren, einen definitiven Einfluss auf die klinische Entscheidungsfindung [34, 35, 36].

1.4 Molekulare Bildgebung in der präklinischen Onkologie

Präklinische Molekulare Bildgebung im onkologischen Kleintiermodell ist ein nahezu unumgänglicher Abschnitt in der longitudinalen, nicht-invasiven Definierung und Evaluation neuer molekularer 'targets' sowie in der Entwicklung und Testung neuartiger Therapien [37]. Zahlreiche zeitintensive und kostenaufwendige Einzelschritte, u.a. hinsichtlich Aktivität, Spezifität, Biodistribution, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen/Toxizität eines neuen Tracers, sind, *in vivo* wie auch *in vitro*, notwendig um eine Translation in die Klinik bzw. eine klinische Studie zu ermöglichen [38]. Im Durchschnitt müssen ca. \$150 Mio. über 10 Jahre in die Grundlagenforschung eines Tracers investiert werden, welcher wiederum, bei marktwirtschaftlichem Erfolg, einen Ertrag von ca. \$200 – 400 Mio. pro Jahr erbringen kann [39]. Neben der Abbildung des Phänotyps eines Tumors, also dessen Metabolismus, Proliferation, Angiogenese oder Apoptose, spezifiziert sich die Tracer-Entwicklung zunehmend und wählt als 'target' tumorspezifische Antigene, wie z.B. Rezeptoren (EGFR, HER2/neu, SSTR, etc.), Integrine, Proteasen oder das Prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA) [38]. Viele neuartige Therapeutika haben die gleichen oder damit assoziierten 'targets'. Dieses innovative Feld aus kombinierter Molekularer Bildgebung und spezifischer anti-Tumorthherapie wird aktuell unter dem Begriff 'Theranostic' zusammengefasst [40, 41]. Neben der direkten Abbildung des Tumors und seiner Metastasen stehen zunehmend Zellen der Tumorumgebung (z.B. T-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten oder Endothelzellen, etc.) sowie die sog. Extrazelluläre Matrix (ECM),

maßgeblich bestehend aus Kollagenen, Fibronectin und Glykoproteinen, im Fokus der Molekularen Bildgebung und der onkologischen Therapie [42]. Beide Komponenten, Tumor und dessen direkte Umgebung, interagieren miteinander und wirken, z.B. in Bezug auf das Tumorstadium oder die Metastasierung, regulatorisch aufeinander ein [43, 44].

1.5 Molekulare Bildgebung in der Translation: Präklinik - Klinik

Der Einsatz von humanen Tumorexograft-Modellen im Kleintier, z.B. in der Maus oder Ratte, ist, wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, ein unumgänglicher Schritt in der Translation präklinischer onkologischer Forschung in den klinischen Alltag. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß lediglich 5% der in den USA in präklinischen Studien evaluierten anti-neoplastischen Therapeutika von der zuständigen Behörde, der Food and Drug Administration (FDA), zugelassen werden [45]. Diese, meist aufgrund von Toxizitäts-bezogenen Ursachen, hohe Ablehnungsrate von (kosten-)aufwendig getesteten Therapeutika läßt die Krebs-assoziierten direkten und indirekten Kosten alleine in den USA zukünftig auf ca. \$300 Mrd. ansteigen [46]. Unter anderem vor dem Hintergrund dieser steigenden sozioökonomischen Kosten wäre eine möglichst individualisierte, Patienten-bezogene präklinische Evaluation einer onkologischen Therapie vorteilhaft und wünschenswert [47]. Ein Ansatz um die Idee der 'personalisierten Medizin' näher zu kommen ist die Initiierung sog. co-klinischer Studien. Begleitend zu einer klinisch-onkologischen Studie werden 'genetically-engineered mouse models' (GEMMs) eingesetzt um, u.a. mittels Molekularer Bildgebung, bestimmte Aspekte der Therapie zu beleuchten oder aufkommende Fragen studienbegleitend zu beantworten und in den Ablauf der klinischen Studie einfließen zu lassen [48]. Ein weiterer Ansatz stellt der Einsatz sog. 'mouse

avartars' dar, also Xenograft-Mäuse, die Tumorzellen des individuellen Patienten tragen und parallel betreut werden und u.a. für die Testung und Bestimmung des geeigneten Chemotherapeutikums hergenommen werden [49]. Ein ähnlicher Ansatz ist die Implantation eines Patienten-spezifischen Xenografts in ein künstlich hergestelltes Organ, einer 'three-dimensional tissue-engineered organ-like structure' [40]. Diese, in Bioreaktoren unter physiologischen Bedingungen gehaltenen Organsubstitute, ermöglichen ebenfalls das Verhalten eines Tumors, z.B. hinsichtlich seines Gen-Expressionsprofils oder seiner Proteinproduktion, unter therapeutischen Bedingungen zu untersuchen und ermöglichen zumindest die Beantwortung primärer Fragen, bevor für den weiteren Studienverlauf ein Kleintier eingesetzt werden muss [50, 51]. In dieser Grundidee der Patienten-bezogenen, individualisierten Tumorbehandlung wird die Molekulare Bildgebung mit ihren zahlreichen Modalitäten und deren zunehmend multimodalem Einsatz eine vermehrt tragende Rolle einnehmen. Aktuelle Studien lassen vermuten, daß u.a. durch die zunehmende Spezifizierung der Bildgebungs-Tracer, zukünftig "molekulare Fingerabdrücke" einer individuellen Tumorerkrankung erstellt werden können, welche die Basis für neue Behandlungsalgorithmen bilden werden. In diesem Zusammenhang wird der Molekularen Bildgebung in der Onkologie die Aufgabe zuteil werden, a) die Basis für die optimale Behandlung des einzelnen Patienten zu schaffen, b) das Werkzeug für die zeitnahe oder 'real-time' Beurteilung zielgerichteter Behandlungsstrategien ('targeted therapies') und c) anteilig die Entwicklung und Optimierung neuer Therapien zu unterstützen und im Verlauf ihre Effektivität zu evaluieren [52].

1.6 Fragestellungen

Ziel der im Rahmen dieser Habilitationsschrift vorgestellten und zusammengefassten Veröffentlichungen war die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- Welche Modalität der Molekularen Bildgebung eignet sich am ehesten für die Evaluation einer neuartigen Therapie des malignen Melanoms? (Originalarbeit 1 bis 3)
- Kann der multimodale Einsatz der funktionellen Molekularen Bildgebung das Tumor-spezifische 'targeting' eines onkolytischen Virus abbilden? (Originalarbeit 4)
- Erlaubt die Kombination der morphologischen und funktionellen Molekularen Bildgebung die Etablierung eines orthotopen pankreatischen Tumormodells? (Originalarbeit 5)

2. Eigene Arbeiten

2.1. Neue mechanistische Einsichten in die Pharmakologie von Arginin Deiminase suggerieren, dass ^{18}F -FDG sich nicht für die Therapiebeurteilung im Melanom eignet (Originalarbeit 1)

Novel mechanistic insights into arginine deiminase pharmacology suggest ^{18}F -FDG is not suitable to evaluate clinical response in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Zanzonico P, Ritter G, Ku T, Rosenfeld E, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

J Nucl Med. 2012;53:281-6

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Evaluation einer neuartigen enzymatischen Therapie im Melanom-Xenograftmodell mittels ^{18}F -FDG PET. Der Einsatz des Enzyms Arginin Deiminase (ADI) führt zu einer intrazellulären Depletion der Aminosäure L-Arginin (Arg). Für zahlreiche neoplastisch transformierte Zellen bedeutet dieses der Zelltod, da sie Arg nicht selbständig synthetisieren können. Ursächlich hierfür ist die fehlende Expression des Enzyms Argininosuccinatsynthetase (ASS), welches den wesentlichen Schritt der Arg-Synthese katalysiert. ADI wird zur Zeit in mehreren Phase I/II Studien eingesetzt. Die Evaluation und das Monitoring der Therapie mittels adäquater Bildgebung zur frühzeitigen Identifizierung von Respondern vs. Non-Respondern ist somit von entscheidender Bedeutung. Zwei Melanomzelllinien, SK-MEL 28 (ASS-negativ/ADI-sensitiv) und SK-MEL 10 (ASS-positiv/ADI-resistent), wurden *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell mit ADI über 4 Wochen behandelt und bildgebend mit ^{18}F -FDG PET begleitet und die molekularen Mechanismen des Therapieansprechens auf ADI parallel untersucht. Ein besonderer Fokus lag in der

Beobachtung biologischer Signalwege, welche die zelluläre FDG-Aufnahme regulieren. Trotz eines deutlichen Therapieansprechens von SK-MEL 28 Zellen *in vitro* als auch *in vivo*, konnte kein eindeutiges metabolisches Korrelat mittels ^{18}F -FDG beobachtet werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die ADI-Therapie zu einer post-translationalen Degradation von PTEN und einer Aktivierung des PI3K-Signalwegs, einem bekannten Aktivator der Glykolyse und FDG-Zellaufnahme, führt. Die weitere gezielte mechanistische Untersuchung zeigte, dass ADI einen komplexen Mechanismus von Zelltod, vermittelt durch apoptotischer PARP-Spaltung und fehlender Caspase-3-Aktivierung, im Melanom induziert. Diese Ergebnisse suggerieren, dass unerwartete pharmakologische Eigenschaften von ADI den Einsatz von ^{18}F -FDG zur klinischen Response-Beurteilung im Melanom beeinflussen und behindern. Die Erprobung weiterer PET Tracer, die z.B. den apoptotischen Signalweg oder Zelltod als Ziel haben, ist somit sinnvoll und notwendig.

Novel mechanistic insights into arginine deiminase pharmacology suggest ^{18}F -FDG is not suitable to evaluate clinical response in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Zanzonico P, Ritter G, Ku T, Rosenfeld E, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

J Nucl Med. 2012;53:281-6

<http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.111.092973>

Novel mechanistic insights into arginine deiminase pharmacology suggest ^{18}F -FDG is not suitable to evaluate clinical response in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Zanzonico P, Ritter G, Ku T, Rosenfeld E, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

J Nucl Med. 2012;53:281-6

<http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.111.092973>

Novel mechanistic insights into arginine deiminase pharmacology suggest ^{18}F -FDG is not suitable to evaluate clinical response in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Zanzonico P, Ritter G, Ku T, Rosenfeld E, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

J Nucl Med. 2012;53:281-6

<http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.111.092973>

Novel mechanistic insights into arginine deiminase pharmacology suggest ^{18}F -FDG is not suitable to evaluate clinical response in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Zanzonico P, Ritter G, Ku T, Rosenfeld E, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

J Nucl Med. 2012;53:281-6

<http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.111.092973>

Novel mechanistic insights into arginine deiminase pharmacology suggest ^{18}F -FDG is not suitable to evaluate clinical response in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Zanzonico P, Ritter G, Ku T, Rosenfeld E, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

J Nucl Med. 2012;53:281-6

<http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.111.092973>

Novel mechanistic insights into arginine deiminase pharmacology suggest ^{18}F -FDG is not suitable to evaluate clinical response in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Zanzonico P, Ritter G, Ku T, Rosenfeld E, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

J Nucl Med. 2012;53:281-6

<http://dx.doi.org/10.2967/jnumed.111.092973>

2.2. Evaluation der Arginin Deiminase Therapie im Melanom Xenograft mittels ^{18}F -FLT PET (Originalarbeit 2).

Evaluation of Arginine deminase treatment in melanoma xenografts using ^{18}F -FLT PET.

Stelter L, Fuchs S, Jungbluth AA, Ritter G, Longo VA, Zanzonico P, Raschzok N, Bomalaski JS, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2013;15:768-75

Basierend auf Originalarbeit 1 ist das Ziel dieser Studie die weitere Entwicklung einer molekularen Bildgebungs-Strategie für die Beurteilung des Therapie-Ansprechens von Melanom-Xenografts auf Arginin Deiminase (ADI). Evaluiert wurde der Proliferationsmarker ^{18}F -FLT in der PET. Die FLT Tracer-Aufnahme wurde unter laufender ADI-Behandlung im präklinischen Melanommodell *in vitro* und *in vivo* untersucht. Erneut bestand ein Fokus der Arbeit in der Untersuchung der molekularen Mechanismen des Ansprechens auf ADI sowie der biologischen Signalwege, welche den ^{18}F -FLT Metabolismus regulieren. SK-MEL 28 Melanomzellen und -tumore konnten erfolgreich in ihrer Proliferation durch ADI behindert werden. Dennoch, konnte eine entsprechende metabolische Antwort im FLT PET nicht beobachtet werden. Auch hierfür scheint die ADI-vermittelte Degradation von PTEN, gefolgt von einer Instabilität des Tumorsuppressors p53 und einer relativen Überexpression von Thymidinkinase 1 (TK1), dem hauptverantwortlichen Enzym der zellulären FLT-Aufnahme, verantwortlich zu sein. Schlussfolgernd konnte beobachtet werden, daß spezifische pharmakologische Eigenschaften von ADI auch den Einsatz von ^{18}F -FLT PET zur klinischen Response-Beobachtung im Melanom-Mausmodell verhindern.

Evaluation of Arginine deminase treatment in melanoma xenografts using ^{18}F -FLT PET.

Stelter L, Fuchs S, Jungbluth AA, Ritter G, Longo VA, Zanzonico P, Raschzok N, Bomalaski JS, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2013;15:768-75

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-013-0655-6>

Evaluation of Arginine deminase treatment in melanoma xenografts using ^{18}F -FLT PET.

Stelter L, Fuchs S, Jungbluth AA, Ritter G, Longo VA, Zanzonico P, Raschzok N, Bomalaski JS, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2013;15:768-75

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-013-0655-6>

Evaluation of Arginine deminase treatment in melanoma xenografts using ^{18}F -FLT PET.

Stelter L, Fuchs S, Jungbluth AA, Ritter G, Longo VA, Zanzonico P, Raschzok N, Bomalaski JS, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2013;15:768-75

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-013-0655-6>

Evaluation of Arginine deminase treatment in melanoma xenografts using ^{18}F -FLT PET.

Stelter L, Fuchs S, Jungbluth AA, Ritter G, Longo VA, Zanzonico P, Raschzok N, Bomalaski JS, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2013;15:768-75

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-013-0655-6>

Evaluation of Arginine deminase treatment in melanoma xenografts using ^{18}F -FLT PET.

Stelter L, Fuchs S, Jungbluth AA, Ritter G, Longo VA, Zanzonico P, Raschzok N, Bomalaski JS, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2013;15:768-75

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-013-0655-6>

Evaluation of Arginine deminase treatment in melanoma xenografts using ^{18}F -FLT PET.

Stelter L, Fuchs S, Jungbluth AA, Ritter G, Longo VA, Zanzonico P, Raschzok N, Bomalaski JS, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2013;15:768-75

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-013-0655-6>

Evaluation of Arginine deminase treatment in melanoma xenografts using ^{18}F -FLT PET.

Stelter L, Fuchs S, Jungbluth AA, Ritter G, Longo VA, Zanzonico P, Raschzok N, Bomalaski JS, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2013;15:768-75

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-013-0655-6>

Evaluation of Arginine deminase treatment in melanoma xenografts using ^{18}F -FLT PET.

Stelter L, Fuchs S, Jungbluth AA, Ritter G, Longo VA, Zanzonico P, Raschzok N, Bomalaski JS, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2013;15:768-75

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-013-0655-6>

2.3. Bildgebung der Tumor-Vaskularisation mittels Fluorescence Molecular Tomography zur Beobachtung der Arginin Deiminase Therapie im Melanom (Originalarbeit 3)

Imaging of tumor vascularization using Fluorescence Molecular Tomography to monitor Arginine deiminase treatment in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Longo VA, Zanzonico P, Ritter G, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

Mol Imaging. 2013;12:67-73

Basierend auf ihrer fehlenden Expression von Argininosuccinatsynthetase (ASS) teilen zahlreiche maligne Tumorentitäten die Eigenschaft der L-Arginin-Auxotrophie. Dieses Unvermögen der intrinsischen Synthese der Aminosäure L-Arginin (Arg) ermöglicht die anti-neoplastische Therapie mittels Arginin Deiminase (ADI), einem Enzym, welches Zellen aktiv Arg entzieht. Arg ist neben der allgemeinen zellulären Homöostase ebenso beteiligt an der Synthese von endotheliale Stickstoffmonoxid (NO). NO vermittelt primär die Vasodilatation, ist jedoch ebenso in die Vaskularisation und Neoangiogenese von Tumoren involviert. In dieser Studie haben wir den Einfluss von ADI auf die Vaskularisation von Melanom-Xenografts mit dem `blood pool` Marker AngioSense® 750 und Fluorescence Molecular Tomography (FMT) untersucht. ASS-negative Melanomtragende SCID Mäuse wurden wöchentlich mit ADI behandelt. Neben der regelmäßigen Bestimmung der Tumorgöße erfolgte eine wöchentliche Bildgebung mit Quantifizierung der Tumor-Vaskularisation mittels FMT und CD31 Immunhistochemie (IHC). Unter klinisch effektiver Anti-Tumorthherapie konnten wir eine deutliche Reduktion des NO-Spiegels im Blutplasma sowie eine Verringerung der Tumor-Vaskularisation mittels FMT und IHC visualisieren und quantifizieren.

Imaging of tumor vascularization using Fluorescence Molecular Tomography to monitor Arginine deiminase treatment in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Longo VA, Zanzonico P, Ritter G, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

Mol Imaging. 2013;12:67-73

<http://dx.doi.org/10.2310/7290.2012.00009>

Imaging of tumor vascularization using Fluorescence Molecular Tomography to monitor Arginine deiminase treatment in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Longo VA, Zanzonico P, Ritter G, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

Mol Imaging. 2013;12:67-73

<http://dx.doi.org/10.2310/7290.2012.00009>

Imaging of tumor vascularization using Fluorescence Molecular Tomography to monitor Arginine deiminase treatment in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Longo VA, Zanzonico P, Ritter G, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

Mol Imaging. 2013;12:67-73

<http://dx.doi.org/10.2310/7290.2012.00009>

Imaging of tumor vascularization using Fluorescence Molecular Tomography to monitor Arginine deiminase treatment in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Longo VA, Zanzonico P, Ritter G, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

Mol Imaging. 2013;12:67-73

<http://dx.doi.org/10.2310/7290.2012.00009>

Imaging of tumor vascularization using Fluorescence Molecular Tomography to monitor Arginine deiminase treatment in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Longo VA, Zanzonico P, Ritter G, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

Mol Imaging. 2013;12:67-73

<http://dx.doi.org/10.2310/7290.2012.00009>

Imaging of tumor vascularization using Fluorescence Molecular Tomography to monitor Arginine deiminase treatment in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Longo VA, Zanzonico P, Ritter G, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

Mol Imaging. 2013;12:67-73

<http://dx.doi.org/10.2310/7290.2012.00009>

Imaging of tumor vascularization using Fluorescence Molecular Tomography to monitor Arginine deiminase treatment in melanoma.

Stelter L, Evans MJ, Jungbluth AA, Longo VA, Zanzonico P, Ritter G, Bomalaski JS, Old L, Larson SM

Mol Imaging. 2013;12:67-73

<http://dx.doi.org/10.2310/7290.2012.00009>

2.4. Tumor-spezifischer Angriff durch modifizierte Sindbis Virus Vektoren: Evaluation mit Optischer Bildgebung und Positronen Emissions Tomographie *in Vivo* (Originalarbeit 4)

Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.

Stelter L, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2012;15:166-74

Sindbis Viren (SINV) infizieren Tumorzellen spezifisch und systemisch *in vivo*. Über Sindbis Vektoren besteht die Möglichkeit transduzierte `Suizid-Gene`, z.B. für die Vermittlung der Enzymsynthese zur Prodrug-Konversion, in infizierten Tumorzellen zu exprimieren. Die Möglichkeit das Expressions-Niveau dieser `Suizid-Gene` sowie die Viruslast selber im Tumor bzw. im Patienten visuell abzubilden und zu kontrollieren, würde die Planung und Durchführung einer tumorspezifischen, Gen-vermittelten Enzym-Prodrug Therapie (GDEPT) deutlich verbessern. In dieser Arbeit haben wir verschiedene Molekulare Bildgebungsmodalitäten wie die Biolumineszenz, die Fluoreszenz und die Positronen Emissions Tomographie genutzt, um die SINV-Infektionsrate in verschiedenen Tumoren *in vitro* und *in vivo* zu evaluieren. SINV erlangen ihre Tumorzell-Spezifität durch die Nutzung des, auf den meisten Tumorentitäten vermehrt exprimierten, 67kDa Lamininrezeptors (LR). Alle hier untersuchten Zelllinien wiesen eine Überexpression von LR auf. Die SINV-Infektionsrate wiederum, differierte signifikant zwischen den unterschiedlichen Tumorarten, so dass schlussfolgernd die zelluläre Infektionsrate durch SINV nicht ausschließlich durch LR definiert zu werden scheint.

Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.

Stelter L, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2012;15:166-74

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-012-0585-8>

Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.

Stelter L, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2012;15:166-74

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-012-0585-8>

Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.

Stelter L, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2012;15:166-74

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-012-0585-8>

Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.

Stelter L, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2012;15:166-74

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-012-0585-8>

Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.

Stelter L, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2012;15:166-74

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-012-0585-8>

Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.

Stelter L, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2012;15:166-74

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-012-0585-8>

Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.

Stelter L, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2012;15:166-74

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-012-0585-8>

Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.

Stelter L, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2012;15:166-74

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-012-0585-8>

Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.

Stelter L, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM

Mol Imaging Biol. 2012;15:166-74

<http://dx.doi.org/10.1007/s11307-012-0585-8>

2.5. Ein orthotopes Modell pankreatischer Somatostatin Rezeptor (SSTR)-Positiver Tumore erlaubt bimodale Bildgebungsstudien mittels 3T MRT und Tier-PET-basierter Molekularer Bildgebung von SSTR Expressionen (Originalarbeit 5)

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

Somatostatinrezeptor (SSTR)-Szintigraphie ist momentan der Goldstandard in der Bildgebung neuroendokriner Tumore (NETs). Eine optimierte Bildgebung von NETs verspricht zukünftig der Einsatz sensitiverer und spezifischerer Tracer der Positronenemissionstomographie (PET) in Kombination mit der Computertomographie (PET-CT) oder der Magnetresonanztomographie (PET-MRT). In der vorliegenden Arbeit haben wir ein orthotopes, human-pankreatisches NET Mausmodell etabliert, welches die typischen Charakteristika, wie die SSTR-Expression, die starke Vaskularisation sowie die typische Metastasierung, einer klinischen NET-Erkrankung aufweist. Im Weiteren haben wir das Modell auf die Möglichkeit der zuverlässigen Tumordetektion mittels PET und MRT untersucht. Orthotop implantierte, humane amphikrine AR42J Pankreaszellen zeigten ein schnelles lokales Tumorstadium sowie die typischen Metastasierungswege nach lymphonodal und peritoneal. Sowohl die Primärtumore als auch ihre Metastasen wiesen *in vivo* eine starke Expression der neuroendokrinen Marker Chromogranin A und Synaptophysin auf. Für die Bildgebung mittels PET erfolgte die i.v. Injektion der SSTR-Liganden ⁶⁸Ga-DOTATOC bzw. ⁶⁸Ga-DOTANOC mit folgender Untersuchung in einem dedizierten Kleintier-PET-Scanner sowie einem

klinischem 3T MRT. Alle untersuchten Tiere zeigten eine deutliche Radionuklid-Akkumulation im Primärtumor im PET. Eine eindeutige anatomische Korrelation konnte durch digitale Bildfusion mit dem MRT-Datensatz erreicht werden. ^{68}Ga -DOTANOC zeigte eine stärkere tumorale Anreicherung im Vergleich zu ^{68}Ga -DOTATOC, welches eine vermehrte renale Clearance aufwies. In guter Korrelation mit den *ex vivo* Biodistributionsdaten zeigte ^{68}Ga -DOTATOC ein höheres Niere-zu-Tumor Verhältnis (2,43-fach vs. 1,75-fach) als ^{68}Ga -DOTANOC. Zusammenfassend beschreibt die Arbeit die Etablierung eines neuartigen orthotopen, pankreatischen, SSTR-positiven Tumormodells, welches zuverlässig mittels SSTR-basierter Molekularer Bildgebung und MRT evaluiert werden kann. Dieses Mausmodell eignet sich somit für weitere Studien der Bildung SSTR-positiver NETs.

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

<http://dx.doi.org/10.1159/000111502>

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Anthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

<http://dx.doi.org/10.1159/000111502>

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

<http://dx.doi.org/10.1159/000111502>

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

<http://dx.doi.org/10.1159/000111502>

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Anthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

<http://dx.doi.org/10.1159/000111502>

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

<http://dx.doi.org/10.1159/000111502>

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

<http://dx.doi.org/10.1159/000111502>

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

<http://dx.doi.org/10.1159/000111502>

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

<http://dx.doi.org/10.1159/000111502>

An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.

Stelter L, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A

Neuroendocrinology 2008;87:233-42

<http://dx.doi.org/10.1159/000111502>

3. Diskussion

3.1 Molekulare Bildgebung - Historie

Die Molekulare Bildgebung ist mittlerweile fester Bestandteil der präklinischen Krebsforschung, in klinisch-onkologischen Studien sowie in der täglichen medizinischen Routine. Im Laufe der letzten Jahrzehnte gab es eine rasante Entwicklung sowohl in der Anzahl als auch in den Anwendungsmöglichkeiten von bildgebenden Technologien [53]. Die Entdeckung und erstmalige Beschreibung der Röntgenstrahlen durch Wilhelm Conrad Röntgen im Jahre 1896 legte den Grundstein der makroskopisch-morphologischen Bildgebung, welche in den 40er Jahren durch den Ultraschall, 1972 durch den ersten Computertomographen und der Entwicklung der Magnet Resonanz Tomographie ab 1973 ergänzt wurde [42, 54]. Mit der Entwicklung der funktionellen nuklearmedizinischen Bildgebung Anfang der 60er Jahre und der Implementierung der Single Photon Emissions Tomographie und Positronen Emissions Tomographie, bis hin zu den optischen Bildgebungsverfahren, welche mit der Fluoreszenz Bildgebung bereits 1924 medizinisch eingesetzt wurde, wurde die Visualisierung molekularer und zellulärer Prozesse möglich [55, 56]. Neben der bis dato lediglich Lokalisationsdiagnostik von Tumoren und ihrer Metastasen konnten nun Aussagen über Tumoraktivität sowie Expression tumorspezifischer Moleküle oder biologischer Abläufe, welche das Tumorverhalten und das Ansprechen auf ein Therapeutikum beeinflussen, getätigt werden [52].

3.2 Molekulare Hybrid-Bildgebung

Auch wenn die Grenzen zwischen klassisch 'morphologischer' und 'funktioneller' Bildgebung mitunter einige Unschärfe aufweisen (funktionelle Informationen werden ebenso durch z.B. Tumorperfusions-Messungen mittels Kontrastmittel-CT oder -MRT generiert), wird die Idee des komplementären Einsatz von Modalitäten aus dem primär

morphologischen und primär funktionellem Bereich seit Jahrzehnten präklinisch und klinisch umgesetzt und stetig weiterentwickelt. Diese z.T. sehr erfolgreichen Kombinationen von z.B. PET und CT als Hybridgerät (PET-CT) hat mittlerweile dazu geführt, das sog. 'PET-only' Systeme nahezu vollständig vom Markt verdrängt wurden [57]. Interessanterweise wurde das Potential der erst kürzlich klinisch-praktikabel einsetzbaren PET-MRT Scanner bereits 1982 erkannt und beschrieben [58]. Mit der Kombination beider Modalitäten und der Möglichkeit der simultanen Akquisition der PET- und MRT-Datensätze ist der potentiell größtmögliche Informationsgewinn durch ein bildgebendes Verfahren gewährleistet. Zusätzlich zu dem exzellenten Weichteilkontrast der MRT, den funktionellen Informationen der dynamischen KM-gestützten MRT und der MR-Spektroskopie wird ein quantitativer molekularer PET-Datensatz geliefert, der je nach eingesetztem Tracer, die bestmögliche Voraussetzung für die Diagnose, das Staging sowie die Therapieplanung und -kontrolle einer neoplastischen Erkrankung liefert [57].

Die Äquivalenz und partielle Überlegenheit der PET-MRT gegenüber dem etablierterem Verfahren der PET-CT konnte bereits in mehreren onkologisch-basierten Studien gezeigt werden. Nach technischer Anpassung des Detektorsystems der PET und Etablierung einer reproduzierbaren MRT-Schwächungskorrektur (MRAC) zur quantitativen 'standardized uptake value' (SUV)-Bestimmung, ist eine Ganzkörper PET-MRT Untersuchung in einem zeitlich vertretbarem Rahmen (≤ 20 min.) aktuell möglich [59]. Desweiteren reduziert sich durch den Einsatz der MRT deutlich die Strahlenexposition für den Patienten, welches insbesondere bei Schwangeren und Kindern mit maligner Grunderkrankung, u.a. vor dem Hintergrund der möglichen Induktion eines Zweitkarzinoms, von entscheidender Bedeutung ist [60, 61]. Aufgrund des höheren Weichgewebkontrasts der MRT gegenüber der CT scheint die

Beurteilung des T-Stadiums einer Neoplasie im PET-MRT besser oder 'realistischer' als im PET-CT. Eine kürzlich erschienene Studie von Catalano et al. zeigt eindrucksvoll, daß die PET-MRT in einem Kollektiv von 134 Patienten mit unterschiedlichen neoplastischen Erkrankungen (u.a. Mammakarzinom, Lymphom, kolorektalem Karzinom, Lungenkarzinom oder Sarkom) eine um 41% höhere Detektionsrate von malignen Läsionen aufwies, welche zu ca. 18% als entscheidend für das weitere therapeutische Vorgehen angesehen wurden [62]. Die von Czernin et al. formulierten Anforderungen und Fragen an integrierte PET-MRT Systeme, nämlich die bessere klinische Beurteilung von Malignitäten in Weichgeweben, die Generierung neuer Einsichten und Erkenntnisse in die unterschiedlichen onkologischen Phänotypen und ihre Biologie sowie die reduzierte Strahlenexposition, scheinen erfüllt bzw. vielversprechend erforscht und ggf. beantwortet werden zu können [63].

3.3 Hybrid-Bildgebung in der Onkologie

Die bereits zuvor beschriebene Notwendigkeit der longitudinalen, nicht-invasiven Abbildung eines Tumors in der präklinischen onkologischen Forschung ist für das Verständnis der Tumorbiologie und insbesondere der Änderung des Tumorwachstums/-verhaltens unter laufender Therapie von außerordentlicher Wichtigkeit. Auch hier kann die Ko-Registrierung des MR- und PET-Datensatzes in einem Hybridgerät wertvolle Informationen liefern. Viel et al. konnten z.B. in einem Multitracer-PET mit ^{18}F -FLT (als Proliferationsmarker) und ^{11}C -MET (als essentielle AS für die Hirntumor-Diagnostik) und KM-gestützter MRT Aussagen über die Tumor-Heterogenität im präklinischen Glioblastom-Mausmodell tätigen und primär proliferativ aktive von primär angiogenetisch aktiven Tumoranteilen differenzieren [64]. Die Möglichkeit der simultanen PET- und MRT-Akquisition ermöglicht das multimodale Messen dynamischer Prozesse und wird die Qualität und Reproduzierbarkeit präklinischer und

klinischer, Bildgebungs-begleiteter Forschung verbessern. Möglichst geringe experimentelle Variabilität ist für Studien, in denen bestimmte Stimuli oder Konditionen, wie z.B. vergleichbarer physiologischer Status oder Anästhesie, wichtig sind, von entscheidender Bedeutung [65]. In Originalarbeit 5 wurde ebenso ein Multitracer-PET-mit (sequentiell) MRT-Ansatz gewählt um ein orthotopes, SSTR-positives NET-Modell des Pankreas für die präklinische NET-Forschung in unserer und der kooperierenden Klinik zu etablieren. Für beide eingesetzten, und mittlerweile in der klinischen Routine etablierten, PET-Tracer (^{68}Ga -DOTATOC und ^{68}Ga -DOTANOC) konnte eine gute tumorale Akkumulation in Korrelation mit dem MRT beschrieben werden. Die hier erstmalig etablierte orthotope Lokalisation des murinen neuroendokrinen Tumors war insofern für uns wichtig, als das die Eigenschaften eines pankreatischen NETs, wie der hypervaskularisierte, invasive wachsende Primarius sowie die lymphonodale und peritoneale Metastasierung, denen der typischen klinischen Situation am ehesten entsprach [66].

3.4 Molekulare optische Bildgebung

Die vielleicht größte Entwicklung und Wachstum unter den Modalitäten der Molekularen Bildgebung hat im Bereich der optischen Verfahren stattgefunden. Trotz der bereits erwähnten eingeschränkten Penetration von optischem Licht durch Gewebe hat die Entwicklung hoch spezialisierter Technologien zu einem weit verbreiteten Einsatz und sehr produktiven Nutzen von Licht, sowohl der Biolumineszenz als auch der Fluoreszenz, für die *in vivo* Bildgebung in Kleintieren und partiell auch im Menschen geführt [9, 67].

Einen hohen Stellenwert kommt der Biolumineszenz Bildgebung in der präklinischen onkologischen Forschung insbesondere im Bereich der Reporter-Gen Bildgebung zu.

Die nicht-invasive Darstellung molekularer genetischer und zellulärer Prozesse mittels unterschiedlichster Reporter-Gen Konstrukte, basierend auf z.B. retroviralen, adenoviralen oder herpesviralen Vektoren, hat ermöglicht neue Ansätze und Fragen z.B. in der Onkogenese, Tumorerhalt oder –progression oder Tumorreaktion auf molekulare Therapie zu entdecken und zu beantworten [68, 69]. Einen entsprechenden Ansatz der Tumor-spezifischen Reporter-Gen Bildgebung haben wir ebenso in Originalarbeit 4 vorgenommen. Unter Einsatz verschiedentlich genetisch modifizierter Vektoren, basierend auf dem onkolytischen Alphavirus Sindbis Virus, haben wir unterschiedliche Tumorzellen mit Vektorkonstrukten für die Biolumineszenz (FLuc) und PET-Bildgebung (^{124}I -FIAU und ^{18}F -FEAU) transfiziert und als Xenograft in Mäuse inokuliert. Ziel war die nicht-invasive Visualisierung der tumoralen Virusinfektion vor dem Hintergrund einer möglich folgenden, anti-neoplastischen Gen-vermittelten Enzym-Prodrug Therapie. Die Idee der GDEPT beinhaltet die Einschleusung eines Reporter- oder Suizid-Gens in Tumorzellen über einen z.B. viralen Vektor. Die eingebrachte genetische Information vermittelt in einem nächsten Schritt die intrazelluläre Synthese eines z.B. Enzyms, welches im Weiteren ein appliziertes Prodrug aktiviert und die Tumorzellen quasi von innen heraus (und damit selektiv) zerstört [70, 71]. Zur Visualisierung und Evaluation der zellulären Infektionsrate kam neben der PET und der Biolumineszenz auch die Fluoreszenz-vermittelte Bildgebung mittels FMT zum Einsatz. Wie bereits zuvor beschrieben liegt der Vorteil der FMT darin, daß sie ausschliesslich im nahinfraroten Spektrum arbeitet, die Einschränkung der Lichtabsorption durch Gewebe hier also nur relativ ist. Ein weiterer Vorteil ist die Erstellung eines tomographischen 3D-Datensatzes, der, basierend auf der Gerätekalibrierung, quantifizierbar ist. In Bezug auf die SINV Studie konnten wir eine gute Korrelation im tumoralen Verteilungsmuster des Virus in der Biolumineszenz und dem Fluoreszenz-Signal in der FMT beobachten. Der hier eingesetzte Tracer AngioSenseTM750

unterstützte, als sog. blood-pool Marker, die Annahme, daß die Tumolvaskularisation und Gefäßpermeabilität einen signifikanten Einfluss auf die SINV Infektion und intratumorale Akkumulation hat [72, 73].

Auch in Originalarbeit 3 kam die Untersuchung der Tumolvaskularisation mittels FMT und AngioSenseTM750 zum Einsatz. Ziel war es hierbei den Einfluss der enzymatischen Therapie mit ADI auf die Tumolvaskularisation im Melanom-Xenograft abzubilden. Mit Hilfe des FMT-Datensatzes und der hieraus bestimmbaren tumoralen 'vascular volume fraction' (VVF) konnte, in Korrelation mit dem endothelialen Marker CD31 in der IHC, die eindeutige Reduktion der Tumolvaskularisation unter ebenso klinisch erfolgreicher anti-neoplastischer Therapie visualisiert werden. Eine andere Modalität der Molekularen Bildgebung, die PET, unter Benutzung der Tracer ¹⁸F-FDG und ¹⁸F-FLT konnte das beschriebene klinische Ansprechen der Xenografts nicht abbilden, geschweige denn vor den messbaren morphologischen Veränderungen der Tumore eine metabolische Antwort erahnen lassen. Vermutlich ursächlich hierfür waren unerwartete Eingriffe des eingesetzten Medikaments in den zellulären 'survival pathway' PTEN/PI3K/Akt, welches in einer 'metabolischen Maskierung' des Tumoransprechens resultierte (siehe Originalarbeit 1 und 2).

3.5 Innovative Molekulare Bildgebung in der klinischen Translation

Ein übergeordnetes Ziel der präklinischen Molekularen Bildgebung ist die Translation der gewonnenen Erkenntnisse, u.a. in Bezug auf tumorspezifische Darstellung oder Verhalten unter anti-neoplastischer Therapie, in den klinischen Alltag. Abgesehen von der Übertragung der reinen Bildgebung und Nutzung dieser für eine möglichst sensitive und spezifische Tumordiagnostik, ist ein weiteres hoch innovatives Feld die Anwendung molekularer nuklearer und optischer Verfahren intraoperativ [57]. Der Einsatz offener

Radionuklide in der ‚radioguided surgery‘ zur z.B. Detektion von Wächterlymphknoten mittels intraoperativer γ -Kameras begann bereits vor über 60 Jahren [74, 75]. Die klinische Anwendung optischer Verfahren bezieht sich bis dato im Wesentlichen auf die Nutzung der Fluoreszenz in Kombination mit der Endoskopie oder in einem tumorchirurgischem Kontext. Der primäre Ansatz ist hierbei eine möglichst histopathologisch-tumorspezifische, intraoperative Kontrolle der vollständigen Tumorresektion in Echtzeit. Dieses direkte feedback an den Chirurgen hat das Potential ein verbessertes chirurgisches Ergebnis mit guter lokaler Kontrolle und einem verlängertem/dauerhaftem Krankheits-freiem Überleben zu liefern. Zusätzlich kann gesundes Gewebe potentiell geschont werden, was für die post-operative (Organ)funktion und die Lebensqualität von entscheidender Bedeutung ist [76]. Der entscheidende Faktor und die größte Herausforderung für den erfolgreichen Einsatz der ‚optical image-guided cancer surgery‘ ist die Definierung eines universellen, tumorspezifischen targets. Zusätzlich dazu sind Faktoren wie Tumorheterogenität, Bestimmung der wahren Tumorgrenzen unter Einbezug invasiverer Tumorstränge und die Unterschiede und Variationen in den optischen Eigenschaften verschiedener Gewebearten zu beachten [77]. Klinisch im Einsatz sind z.B. im Rahmen der Fluoreszenz-Zystoskopie zur Detektion von Harnblasenkarzinomen sowie zur Resektionskontrolle bei Glioblastomen der Photosensitizer 5-Aminolevulinsäure (5-ALA) [78, 79]. Auch wenn der genaue Mechanismus hier noch nicht bekannt ist, so scheint 5-ALA selektiv in neoplastisch transformierte Zellen aufgenommen zu werden und gesundes Gewebe sowie Blutgefäße und Nerven auszusparen. Ein weiteres potentielles Target scheint der Follikel-stimulierende Hormonrezeptor (FSHR), der vermehrt in Tumorblutgefäßen einer großen Anzahl an Tumorentitäten exprimiert wird, zu sein. Dieser konnte bis zu 5 mm im Tumor selbst und maximal 9 mm außerhalb des Tumors histopathologisch nachgewiesen werden. Eine Überschreitung der Grenze von

mehr als 10 mm im gesunden Gewebe war in keiner der untersuchten Tumorarten zu beschreiben. Eine hohe Tumorspezifität (verbunden mit einem sehr geringen Hintergrundsignal) kann dadurch gewährleistet sein, daß FSHR ansonsten nur in Granulosazellen der Ovarien und den Sertolizellen der Hoden exprimiert werden [80]. Eine FSHR-spezifische, intraoperative Resektionskontrolle scheint von großem Potential und ein vielversprechendes Konzept in der Einbindung der Molekularen Bildgebung in die klinische Therapie in Form der 'image-guided cancer therapy' darzustellen.

3.6 Limitationen

Eine der wesentlichen Limitationen der hier vorgestellten Arbeiten ist die z.T. inhaltliche Divergenz der einzelnen Studien. Auch wenn sich, entsprechend dem Titel dieser Habilitationsschrift, jedes Manuskript mit der Anwendung verschiedener Modalitäten der Molekularen Bildgebung in Bezug auf eine präklinische, onkologische Fragestellung befasst, so wäre natürlich die Anwendung der hier beschriebenen morphologisch und funktionell ausgerichteten Modalitäten der Molekularen Bildgebung auf ein spezifisches Tumormodel und eine entsprechend spezifische Therapie wünschenswert. Aufgrund der unterschiedlichen zeitlichen und z.T. auch räumlichen Entstehung dieser Arbeiten war eine absolute inhaltliche Kongruenz aber leider nicht möglich. Eine Reihe weiterer Kritikpunkte finden sich inhaltlich bezogen in den jeweils einzelnen Arbeiten und werden dort diskutiert.

4. Zusammenfassung

Unter dem Begriff der Molekularen Bildgebung wird die Erforschung und Erfassung physiologischer sowie pathophysiologischer Prozesse auf molekularer Ebene mittels bildgebender Verfahren *in vivo* zusammengefasst. Ziel ist es Krankheiten in ihrer Genese besser zu verstehen und diese möglichst frühzeitig, sprich vor dem Beginn einer klinischen Symptomatik, zu erkennen und zu charakterisieren. Idealerweise, wie z.B. im Fall der Somatostatin-Rezeptor Bildgebung neuroendokriner Tumore, identifiziert die Molekulare Bildgebung die Pathologie spezifisch und bietet damit die Grundlage für die weitere Therapie einschließlich deren Beurteilung im Verlauf. Ein Anspruch ist, erneut möglichst frühzeitig, sogenannte ‚non-responder‘ von den ‚respondern‘ zu trennen, also Patienten zu identifizieren, die nicht auf die gewählte Therapie ansprechen werden, um im Weiteren das therapeutische Regime auf den individuellen Patienten zuzuschneiden und zu optimieren.

Die hier vorgelegten Arbeiten befassen sich mit den unterschiedlichen o.g. Ansätzen der Molekularen Bildgebung im Rahmen onkologisch ausgerichteter Grundlagenforschung. Der jeweilige Hauptfokus der einzelnen Arbeiten richtete sich nach dem Prinzip der Multimodalität, also der Beurteilung der entsprechenden Fragestellungen mittels unterschiedlicher bildgebender Verfahren.

Die ersten drei aufgeführten Originalarbeiten befassten sich mit der Beurteilung einer neuartigen enzymatischen Therapie des malignen Melanoms im Mausmodell mittels verschiedener Tracer der Positronen Emissions Tomographie (PET). Ziel war es hierbei, begleitend zu einer entsprechenden Phase II-Studie an Patienten mit metastasiertem malignen Melanom, mittels der klinisch häufig eingesetzten PET-Tracer

^{18}F -FDG und ^{18}F -FLT, die optimalen Zeitpunkte für die Verlaufsbeurteilung der Therapie mittels funktioneller Bildgebung zu bestimmen und den geeignetsten Tracer hierfür zu identifizieren. Wie sich im Laufe der präklinischen Arbeiten zeigte, waren, trotz gutem therapeutischem Erfolg von ADI, weder FDG noch FLT für die Therapiebeurteilung geeignet und wurden resultierend in der parallelen klinischen Studie nicht mehr eingesetzt. Die Basis dieser Ergebnisse stellte ein unerwartetes Eingreifen des eingesetzten Therapeutikums in verschiedene zelluläre Signalwege der Tumore dar, welches folgend durch Modulation der Expression zellulärer Rezeptoren (Glukosetransporter 1 und 4) und Enzyme (Thymidinkinase 1) zu einer Maskierung des jeweiligen Tracer-Signals führte und die Beurteilung mittels PET verhinderte.

Eine weitere Arbeit (Originalarbeit 4) untersuchte die spezifische Bildgebung verschiedener Tumorentitäten, wie z.B. Kolonkarzinom (HT29 Zellen), Prostatakarzinom (DU145 Zellen), Zervixkarzinom (HeLa Zellen) oder nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (H1650 Zellen), mittels optischer Bildgebung und ^{18}F -FIAU/-FEAU PET nach Transfektion mit einem genetisch modifiziertem viralen Vektor. Hintergrund der Studie war die Evaluation einer geplanten, Tumor-spezifischen ‚Gene-vermittelten Enzym-Prodrug Therapie‘ (GDEPT) mit Hilfe der Molekularen Bildgebung. Unter Einsatz der planaren Biolumineszenz, der tomographischen Fluoreszenz (FMT) sowie der PET konnten überraschende Unterschiede der viralen Transfektionsraten zwischen den verschiedenen Tumorarten visualisiert und quantifiziert werden.

Wie in Originalarbeit 5 demonstriert, ermöglichte die Somatostatin-Rezeptor-spezifische PET mit den Tracern ^{68}Ga -DOTATOC und ^{68}Ga -DOTANOC in Korrelation mit der morphologischen Darstellung durch die Magnet Resonanz Tomographie (MRT) die Etablierung eines orthotopen pankreatischen NET-Mausmodells, welches folgend für

innovative Untersuchungen im Zusammenhang mit der NET-Bildgebung zur Verfügung stand.

Die vorgelegten Arbeiten leisten Beiträge sowohl zur Durchführung als auch zum Verständnis einer onkologisch ausgerichteten, Therapie-begleitenden sowie Therapie-vorbereitenden Molekularen Bildgebung. Zudem beleuchten sie mögliche ‚Fallstricke‘ in der funktionellen Bildgebung und betonen die Notwendigkeit eines tieferen molekularen Verstehens von Erkrankungen. Sie unterstreichen somit die Unerlässlichkeit einer möglichst individuellen und Erkrankungs-spezifischen Bildgebung.

5. Liste der in dieser Habilitation zusammengefassten Veröffentlichungen

1. **Stelter L**, Evans MJ, Jungbluth AA, Zanzonico P, Ritter G, Ku T, Rosenfeld E, Bomalaski JS, Old L, Larson SM.
Novel mechanistic insights into arginine deiminase pharmacology suggest ^{18}F -FDG is not suitable to evaluate clinical response in melanoma.
J Nucl Med 2012;53:281-6
2. **Stelter L**, Fuchs S, Junbluth AA, Ritter G, Longo VA, Zanzonico P, Raschzok N, Bomalaski JS, Larson SM.
Evaluation of Arginine deiminase treatment in melanoma xenografts using ^{18}F -FLT PET.
Mol Imaging Biol 2013;15:768-75
3. **Stelter L**, Evans MJ, Jungbluth AA, Longo VA, Zanzonico P, Ritter G, Bomalaski JS, Old L, Larson SM.
Imaging of tumor vascularization using Fluorescence Molecular Tomography to monitor Arginine deiminase treatment in melanoma.
Mol Imaging 2013;12:67-73
4. **Stelter L**, Tseng JC, Torosjan A, Levin B, Longo VA, Pillarsetty N, Zanzonico P, Meruelo D, Larson SM.
Tumor-Specific Targeting With Modified Sindbis Viral Vectors: Evaluation with Optical Imaging and Positron Emission Tomography In Vivo.
Mol Imaging Biol 2012;15:166-74
5. **Stelter L**, Amthauer H, Rexin A, Pinkernelle J, Schulz P, Michel R, Denecke T, Stiepani H, Hamm B, Wiedenmann B, Scholz A.
An orthotopic model of pancreatic somatostatin receptor (SSTR)-positive tumors allows bimodal imaging studies using 3T MRI and animal PET-based molecular imaging of SSTR expression.
Neuroendocrinology 2008;87:233-42

6. Literaturverzeichnis

1. Weissleder R, Ross BD, Rehemtulla A, Gambhir SS. Molecular Imaging – Principles and Practice. PMPH-USA 2010
2. Grimm J, Wunder A. Molekulare Bildgebung: Stand der Forschung. Fortschr Röntgenstr 2005;177:326-337
3. Weissleder R, Mahmood U. Molecular imaging. Radiology 2001;219:316-333
4. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. Genes Dev 2003;17:545-580
5. Lindsay MA. Target discovery. Nature Rev Drug Discov 2003;2:831-838
6. Lahorte CM, Vanderheyden JL, Steinmetz N, et al. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2004;31:887-919
7. Fox JJ, Autran-Blanc E, Morris MJ, et al. Practical approach for comparative analysis of multilesion molecular imaging using a semiautomated program for PET/CT. J Nucl Med 2011;52:1727-1732
8. Weissleder R, Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. Nature Med 2003;9:123-128
9. Ntziachristos V, Ripoll J, Wanf LV, Weissleder R. Looking and listening to light: the evolution of whole body photonic imaging. Nature Biotech 2005;23:313-320
10. Townsend DW. Positron emission tomography/computed tomography. Semin Nucl Med 2008;38:152-166
11. Srinivas M, Aarntzen EH, Bulte JW et al. Imaging of cellular therapies. Adv Drug Deliv Rev 2010;62:1080–1093
12. Bremer C, Ntziachristos V, Weissleder R. Optical-based molecular imaging: contrast agents and potential medical applications. Eur Radiol 2003;13:231-243

13. Hastings JW, Morin JG. Photons for reporting molecular events: green fluorescent protein and four luciferase systems. *Methods Biochem Anal* 2006;47:15-38
14. Wilson T, Hastings JW. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:197-230
15. Na IK, Marklex JC, Tsai JJ, et al. Concurrent visualization of trafficking, expansion, and activation of T lymphocytes and T-cell precursors in vivo. *Blood* 2010;116:18-25
16. Wehrmann TS, von Degenfeld G, Krutzik PO, et al. Luminescent imaging of β -galactosidase activity in living subjects using sequential reporter-enzyme luminescence. *Nature Meth* 2006;3:295-301
17. Giepmans BNG, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY. Review – the fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 2006;312:217-24
18. Slakter JS, Yannuzzi LA, Guyer DR, et al. Indocyanine-green angiography. *Curr Opin Ophthalmol* 1995;6:25-32
19. Poellinger A, Burock S, Grosenick D, et al. Breast cancer: early- and late-fluorescence near-infrared imaging with indocyanine green – a preliminary study. *Radiology* 2011;258:409-16
20. Vahmeijer AL, Hutteman M van der Vorst, et al. Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nature Rev Clin Oncology* 2013;10:507-518
21. Snoeks TJA, van Driel PBAA, Keereweer S, et al. Towards a Successful Clinical Implementation of Fluorescence-Guided Surgery. *Mol Img Biol* 2014;16:147-151
22. Ntziachristos V, Ripoll J, Weissleder R. Would near-infrared fluorescence signals propagate through large human organs for clinical studies? *Opt Lett* 2002;27:333-335
23. Ntziachristos V, Tung CH, Bremer C, Weissleder R. Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. *Nature Med* 2002;8:757-760

24. Zacharias g, Kambara H, Shih H, et al. Volumetric tomography of fluorescent proteins through small animals in-vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;23:313-20
25. Zanzonico P. Positron emission tomography: a review of basic principles, scanner design and performance, and current systems. *Semin Nucl Med* 2004;34:87-111
26. Zanzonico P. Principles of nuclear medicine imaging: planar, SPECT, PET, multi-modality, and autoradiography systems. *Radiat Res* 2012;177:349-364
27. Judenhofer MS, Wehrl HF, Newport DF, et al. Simultaneous PET-MRI: a new approach for functional and morphological imaging. *Nature Med*;14:459-65
28. Gaa J, Fischer H, Laub G, Georgi M. Breath-hold MR imaging of focal liver lesions: comparison of fast and ultrafast techniques. *Eur Radiol* 1996;6:838-43
29. Alfke H, Kohle S, Maurer E, et al. Analyse von Maustumormodellen mittels dynamischer MRT und einer dedizierten Softwareplattform. *Fortschr Röntgenstr* 2004;176:1226-1231
30. Jaffer FA, Weissleder R. Molecular Imaging in the Clinical Arena. *JAMA* 2005;293:855-862
31. Makowski MR, Wiethoff AJ, Blume U, et al. Assessment of atherosclerotic plaque burden with an elastin-specific magnetic resonance contrast agent. *Nature Med* 2011;17:383-388
32. Jennings LE, Long NJ. 'Two is better than one' – probes for dual-modality molecular imaging. *Chem Commun (Camb)* 2009;24:3511-3524
33. Zanzonico P. Principles of Nuclear Medicine Imaging: Planar, SPECT, PET, Multi-modality, and Autoradiography Systems. *Radiat Res* 2012;177:349-364
34. Zanzonico PB, Nehmeh SA. Introduction to clinical and laboratory (small-animal) image registration and fusion. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2006;1:1580-1583
35. Townsend DW, Beyer T, Blodgett TM. PET/CT scanner: the path to true image fusion. *Br J Radiol* 2002;75:S24-30

36. Ng TS, Bading JR, Park R, et al. Quantitative, simultaneous PET/MRI for intratumoral imaging with an MRI-compatible PET scanner. *J Nucl Med* 2012;53:1102-1109
37. Willmann JK, van Bruggen N, Dinkelborg LM, et al. Molecular imaging in drug development. *Nature Rev Drug Discov* 2008;7:591-607
38. Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin Radiol* 2010;65:500-516
39. Agdeppa ED, Spilker ME. A review of imaging agent development. *AAPS J* 2009;11:286-99
40. Alberti C. From molecular imaging in preclinical/clinical oncology to theranostic applications in targeted tumor therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012;16:1925-1933
41. Kiessling F, Fokong S, Bzyl J, et al. Recent advances in molecular, multimodal and theranostic ultrasound imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;72:15-27
42. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 2008;452:580-589 (vormals 41)
43. Thakor AS, Gambhir SS. Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin* 2013;63:395-418
44. Wood SL, Pernemalm M, Crosbie PA, Whetton AD. The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets. *Cancer Treat Rev* 2014;40:558-566
45. Hutchinson L, Kirk R. High drug attrition rates-where are we going wrong? *Nature Rev Clin Oncol* 2011;8:189-190
46. Yabroff LJ, Kepka KR, Mariotto A. Economic burden of cancer in the United States: estimates, projections, and future research. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2011;20:2006-2014

47. Malaney P, Nicosia SV, Davé V. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. *Cancer Lett* 2014;344:1-12
48. Nardella C, Lunardi A, Patnaik LC, et al. The APL paradigm and the “co-clinical trial” project. *Cancer Discovery* 2011;1:108-116
49. Tontler JJ, Tan AC, Weekes CD, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature Rev Clin Oncol* 2012;9:338-350
50. Zhang S. Fabrication of novel biomaterial through molecular self-assembly. *Nature Biotech* 2009;21:1171-1178
51. Schanz J, Pusch J, Hansmann J, Walles H. Vascularized human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research. *J Biotechnol* 2010;148:56-63
52. Kircher MF, Hricak H, Larson SM. Molecular imaging for personalized cancer care. *Mol Oncol* 2012;6:182-195
53. Condeelis J, Weissleder R. In Vivo Imaging in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a003848
54. Röntgen WC. On a new kind of rays. *Nature* 1896;53:274-276
55. Kuhl DE, Edwards RQ. Cylindrical and section radioisotope scanning of the liver and brain. *Radiology* 1964;83:926-936
56. Policard A. Étude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *C. R. Séances Soc. Biol. Fil* 1924;91:242-261
57. Zanzonico PB. Advances in Nuclear and Optical Imaging of Tumors: Multi-Modality, Small-Animal, and Intraoperative Technologies. In Aktolun C and Goldsmith SJ (Eds), *Nuclear Oncology*, Wolters Kluwer, Philadelphia, PA, pp 664-698, 2015
58. Brownell GL, Budinger TF, Lauterbur PC, et al. Positron Tomography and Nuclear Magnetic Resonance Imaging. *Science* 1982;215:619-626

59. Drzezga A, Souvatzoglou M, Eiber M, et al. First clinical experience with integrated whole-body PET/MR: comparison to PET/CT in patients with oncologic diagnosis. *J Nucl Med* 2012;53:845-855
60. Partovi S, Kohan A, Rubbert C, et al. Clinical oncologic applications of PET/MRI: a new horizon. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2014;4;202-212
61. Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet* 2012;380:499-505
62. Catalano OA, Rosen BR, Sahani DV, et al. Clinical impact of PET/MR imaging in patients with cancer undergoing same-day PET/CT: initial experience in 134 patients – a hypothesis-generating exploratory study. *Radiology* 2013;269:857-869
63. Czernin J, Ta L, Herrmann K. Does PET/MR Imaging Improve Cancer Assessments? Literature Evidence from More Than 900 Patients. *J Nucl Med* 2014;55:59S-62S
64. Viel T, Talasila KM, Monfared P, et al. Analysis of the Growth Dynamics of Angiogenesis-Dependent and –Independent Experimental Glioblastomas by Multimodal Small-Animal PET and MRI. *J Nucl Med* 2012;53:1135-1145
65. Judenhofer MS, Cherry SR. Applications for Preclinical PET/MRI. *Semin Nucl Med* 2013;43:19-29
66. Plöckinger U, Wiedenmann B. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract; management of metastatic endocrine tumours. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:553-576
67. Contag PR, Olomu IN, Stevenson DK, et al. Bioluminescent indicators in living mammals. *Nature Med* 1998;4:245-247
68. Blasberg RG. In vivo molecular-genetic imaging: multi-modality nuclear and optical combinations. *Nucl Med Biol* 2003;30:879-888

69. Brader P, Seganova I, Blasberg RG. Noninvasive molecular imaging using reporter genes. *J Nucl Med* 2013;54:167-172
70. Caruso M, Panis Y, Gagandeep S, et al. Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:7024-7028
71. Jacobs A, Tjuvajev JG, Dubrovin M, et al. Positron emission tomography-based imaging of transgene expression mediated by replication-conditional, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutant vectors in vivo. *Cancer Res* 2001;61:2983-95
72. Montet X, Figueiredo JL, Alencar H, et al. Tomographic Fluorescence Imaging of Tumor Vascular Volume in Mice. *Radiology* 2007;242:751-7578
73. Tseng JC, Granot T, DiGiacomo V, et al. Enhanced specific delivery and targeting of oncolytic Sindbis viral vectors by modulating vascular leakiness in tumor. *Cancer Gene Ther* 2010;17:244-255
74. Sweet WH. The use of nuclear disintegration in the diagnosis and treatment of brain tumors. *N Engl J Med* 1951;245:875-878
75. Pitre S, Ménard L, Ricard M, et al. A hand-held imaging probe for radio-guided surgery: physical performance and preliminary clinical experience. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003;30:339-343
76. van Dam GM, Themelis G, Crane LM, et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-alpha targeting: first in-human results. *Nature Med* 2011;17:1315-1319
77. Keereweer S, Van Driel PBAA, Robinson DJ, et al. Shifting Focus in Optical Image-Guided Cancer Therapy. *Mol Img Biol* 2013;16:1-9
78. Witjes JA, Douglass J. The role of hexaminolevulinate fluorescence cystoscopy in bladder cancer. *Nature Clin Pract Urol* 2007;4:542-549

79. Stummer W, Novotny A, Stepp H, et al. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: A prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg* 2000;93:1003-1013
80. Radu A, Pichon C, Camparo P, et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor in tumor blood vessels. *N Engl J Med* 2010;363:1621-1630

7. Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Bernd Hamm bedanken. Seine nachhaltige Unterstützung ermöglichte meine wissenschaftliche und klinische Entwicklung.

Herrn Prof. Dr. Holger Amthauer und Herrn Prof. Dr. Ulf Teichgräber verdanke ich die Entdeckung und Förderung meines Interesses an der onkologisch-orientierten Molekularen Bildgebung in ganz besonderem Maße. Wesentliche Teile dieser Habilitationsschrift wären ohne ihre Hilfe und Unterstützung nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Steven M. Larson verdanke ich vertiefte Einblicke in die Welt der Mausmodelle und Molekularbiologie. Seinem Enthusiasmus und seiner Expertise auf diesem Gebiet verdanke ich zwei erfolg- und ereignisreiche Jahre in New York, USA.

Die vorliegenden Arbeiten wären nicht möglich geworden ohne exzellente Kollegen und Kooperationspartner. Um nur einige wenige – stellvertretend - zu nennen: PD. Dr. Timm Denecke, Dr. Christian Grieser und Prof. Dr. Pat Zanzonico.

Herzlichen Dank!

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit danke ich der Charité, dem Boehringer Ingelheim Fonds und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

Sehr viel zu verdanken habe ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau PD Dr. Il-Kang Na und meinen beiden Kindern Luis und Lotta Na, meinen Eltern Dr. Lothar und Wiebke Stelter sowie meinen Geschwistern Nils und Kristina, die über viele Jahre durch verständnisvolle Unterstützung und seelischen Beistand meinen wissenschaftlichen Weg mit ermöglichten.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Univeritätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte

Berlin, 11. März 2015

Dr. med. Lars H.F. Stelter