

Aus der Klinik mit
Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
der medizinischen Fakultät der Charité-Universitätsmedizin Berlin

eingereicht über das Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Validierung fluoreszierender Peptidkonjugate für die optische Bildgebung
gastrointestinaler Tumormodelle in der Nacktmaus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Cordula Karthaus, geb. Dierkes
Tierärztin
aus Oldenburg

Berlin 2012

Journal-Nr.: 3591

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber, Ph.D.
Zweiter Gutachter: PD Dr. Thorsten Cramer
Dritter Gutachter: PD Dr. Christoph Gabler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

xenografts, tumours, colorectal cancer, mouse, targets, endoscopy,
bioluminescence, monitoring

Tag der Promotion: 31.07.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-348-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung.....	1
2 Literatur	3
2.1 Kolorektale Tumoren.....	3
2.1.1 Epidemiologie.....	3
2.1.2 Ursachen	4
2.1.3 Tumorwachstum und Metastasierung.....	5
2.1.4 Diagnostik.....	6
2.1.4.1 Fäkaler Occulter Bluttest (FOBT)	7
2.1.4.2 Sigmoidoskopie	7
2.1.4.3 Koloskopie.....	8
2.1.5 Therapie	9
2.2 Präklinische Tumormodelle.....	10
2.2.1 Mutationsmodelle	10
2.2.2 Transplantationsmodelle.....	11
2.2.3 Diagnostische Bildgebung	13
2.2.4 Biolumineszenz-Bildgebung.....	14
2.2.5 Fluoreszenz-Bildgebung	15
2.2.6 Integrine als Zielstrukturen für die molekulare Bildgebung.....	17
3 Arbeitshypothese und Strategie des Dissertationsprojektes	18
4 Material und Methoden.....	19
4.1 Material	19
4.1.1 Biologisches Material	19
4.1.1.1 Eukaryotische Zellen	19
4.1.2 Zellkulturmedien und deren Zusätze	20
4.1.3 Antikörper.....	20
4.1.4 Kits.....	21

Inhaltsverzeichnis

4.1.5	Puffer und Lösungen.....	21
4.1.6	Chemikalien/Reagenzien	21
4.1.7	NIR-Kontrastmittel	22
4.1.8	Sonstige Materialien	22
4.1.9	Bildgebende Untersuchungsgeräte	24
4.1.10	Software der Bildgebungsgeräte	25
4.1.11	Geräte für die Zellkultur	25
4.2	Methoden	26
4.2.1	Zellbiologische Methoden	26
4.2.1.1	Kultivierung und Passagieren	26
4.2.1.2	Einfrieren und Auftauen	26
4.2.1.3	Zellzahlbestimmung.....	26
4.2.1.4	Messung der Luciferaseaktivität <i>in vitro</i>	27
4.2.2	Tierexperimentelle Methoden.....	28
4.2.2.1	Versuchstiere und Haltung.....	28
4.2.2.2	<i>Subcutane</i> Implantation	28
4.2.2.3	Vorbereitung zur orthotopen Implantation	29
4.2.2.4	Implantation der Tumorzellen ins Kolon.....	29
4.2.2.5	Postoperatives klinisches Management der Versuchstiere	30
4.2.3	Bildgebende Verfahren	31
4.2.3.1	Endoskopische Untersuchung der Tiere	31
4.2.3.2	Versuchsablauf.....	32
4.2.3.3	Biolumineszenz-Bildgebung.....	33
4.2.3.4	Erstellung einer <i>in vivo</i> -Kinetik	34
4.2.3.5	Nah-Infrarotfluoreszenz-Bildgebung.....	34
4.2.3.6	Vorversuch zur Autofluoreszenz	34
4.2.3.7	Vorversuch: NIR-Kontrastmittel für das NIR-Faserendoskop ..	35
4.2.3.8	Integrin-Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop	36
4.2.3.9	<i>Ex vivo</i> Einsatz des NIR-Faserendoskopes	36
4.2.4	<i>Ex vivo</i> Aufarbeitung	37
4.2.4.1	Sektion	37

4.2.5	HE-Färbung und immunhistochemische Methoden	39
4.2.5.1	Herstellung von Gefrierschnitten.....	39
4.2.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).....	40
4.2.5.3	Immunhistochemische Färbungen	40
5	Ergebnisse	42
5.1	Charakterisierung der kolorektalen Zelllinien	42
5.1.1	Ermittlung der Photonenausbeute	42
5.1.2	<i>In vitro</i> -Luciferasestabilität.....	43
5.1.3	<i>In vivo</i> -Luciferasestabilität	45
5.2	Etablierung der orthotopen Implantation	46
5.2.1	Orthotope Tumorimplantation	46
5.2.2	Gruppenaufteilung	47
5.2.2.1	Klinische Symptome für das Tumorwachstum.....	49
5.2.2.2	Gewichtsentwicklung.....	51
5.2.3	Monitoring des Tumorwachstums	51
5.2.3.1	Koloskopie und Beurteilung der Tumorgöße	53
5.2.3.2	Biolumineszenz Bildgebung (BLI).....	54
5.2.4	Anwachsrate in Abhängigkeit von der Operationsmethode	57
5.2.4.1	Orthotopes Tumorwachstum.....	58
5.2.4.2	<i>Ex vivo</i> -Charakterisierung.....	64
5.2.4.3	Metastasierung	65
5.2.4.4	Immunhistochemischer Nachweis humaner Tumorzellen.....	67
5.3	Nahinfrarot Experimente	70
5.3.1	Analyse der Autofluoreszenz verschiedener Futtermittel.....	70
5.3.2	NIR-Bildgebung der orthotopen kolorektalen Tumoren	73
5.3.2.1	Auswahl eines geeigneten Kontrastmittels	73
5.3.2.2	Kolokalisation von Fluoreszenz und Biolumineszenz.....	75
5.3.2.3	Etablierung der NIR-Bildgebung mit dem Faserendoskop.....	76
5.3.2.4	Quantitative Analyse der NIR-Fluoreszenzsignale.....	78
5.3.2.5	NIR-Fluoreszenzbildgebung der Kryoschnitte	85
5.3.2.6	Quantifizierung des Fluoreszenzsignales der Kryoschnitte.....	86

Inhaltsverzeichnis

6	Diskussion.....	89
6.1	Das orthotope kolorektale Tumormodell.....	89
6.2	Monitoring des Tumorwachstums	92
6.2.1	Klinische Überwachung.....	93
6.2.2	Bildgebende Verfahren	94
6.2.2.1	Endoskopie.....	95
6.2.2.2	Biolumineszenz.....	96
6.2.2.3	Integrine als Zielstrukturen in der Bildgebung	98
6.3	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Klinik	102
7	Zusammenfassung	105
8	Summary	107
9	Literaturverzeichnis	109
10	Anhang.....	132
11	Veröffentlichungen	136
12	Danksagung	138
13	Selbstständigkeitserklärung	139

Abkürzungsverzeichnis

ABC	A vidin- B iotin- C omplex
ADU	A rbitrary D igital U nits (engl.: beliebige digitale Einheiten)
AEC	A mino- E thylcarbazol
A- Max	A bsorptions m aximum
AOM	A zo x ymethan
Aqua dest.	A qua d estillata (lat.: destilliertes Wasser)
ATCC	A merican T ype C ulture C ollection
BSA	B ovines S erum A lbumin
BLI	B ioluminescence- I maging (engl.: Biolumineszenz-Bildgebung)
CCD	C harge c oupled D evice
CK	C ytokeratine (engl.: Zytokeratin)
Colo 205-Luc	Colo 205-luc2 -Bioware® Ultra Zellen
DMSO	D imethylsulfoxid
DSS	D extran S odium S ulphate (engl.: Natrium Dextran Sulfat)
DGVS	D eutschen G esellschaft für V erdauungs- und S toffwechselkrankheiten
EDTA	E thylend i amintetraessigsäure
E-Max	E missions m aximum
Engl.	E nglisch
et al.	et alii (lat.: und andere)
FCS	F etal C alf S erum (engl.: fetales Kälberserum)
FLI	F luorescence I maging (engl.: Fluoreszenz-Bildgebung)
FOB-Test	F äkal o kkultes B lut- T est
FV	F luoreszenz V erhältnis
G	G auge
g	G ravitation
G-418	G enicinsulfat- 418
GAM-POD	G oat- a nti- m ouse p eroxidase-conjugated antibody
GEKID	G esellschaft der E pidemiologischen K rebsregister I n D eutschland

Abkürzungsverzeichnis

ggr.	geringgradig
h	Stunde (lat.: hora)
HCT 116-Luc	HCT 116-luc2 -Bioware® Ultra Zellen
HE	H ämatoxylin- E osin-Färbung
HEPES	4-(2- H ydroxyethyl)- P iperazin-1- E thansulfonsäure
HRP	H orseradish P eroxidase
HT 29-Luc	HT-29-luc D6- Bioware® Zellen
ICG	I ndocyaningrün
IDCC	I ndodicarbocyanine
IHC	I mmun h istochemie
Ig	I mmunglobuline
i.p.	i ntra p eritoneal (lat.: in die Bauchhöhle)
i.v.	i ntra v enös (lat.: in die Vene)
K	K inetik
KGW	K örpergewicht
mes. Ln.	m esenterialer L ymphonodus (lat.: mesenterialer Lymphknoten)
mgr.	m ittelgradig
MMP 2	M atrix- M etalloprotease 2
Min	M inuten
MW	M olecular W eight (engl.: Molekulargewicht)
NaCl	N atriumchlorid
NIR	N ah- I nfrarot
Nu/nu	Nacktmäuse homozygot
OP	O peration
PBS	P hosphate b uffered s aline (engl.: Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PECAM-1	P latelet E ndothelial C ell A dhesion M olecule- 1
PFA	P araformaldehyd
p.i.	p ost i njectionem (lat.: nach der Injektion)
P/Z/S	P hotonen/ Z elle/ S ekunde
RKI	R obert K och- I nstitut

Abkürzungsverzeichnis

RLE	Relativen Licht-Einheiten
ROI	Region of Interest (engl: Messfeld, Bildbereich)
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency (engl.: schwerer kombinierter Immundefekt)
s.c.	subcutan (lat.: unter die Haut)
SD	Standard Deviation (engl.: Standardabweichung)
UICC	Union Internationale contre le Cancer
UKCCCR	UK Co-ordinating Committee on Cancer Research
w/o	without (engl.: ohne)
Wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema zur Aussaat der Zellen auf einer schwarzen Optilux Platte zur Überprüfung der Luciferaseaktivität.....	27
Abbildung 2: Isoflurananlage zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose.....	31
Abbildung 3: Schematischer Versuchsablauf nach orthotoper Zellinjektion.....	32
Abbildung 4: Darstellung des <i>ex vivo</i> Einsatzes der Nah-Infrarot-Laser-Sonde.....	37
Abbildung 5: Separationsschema des Enddarmes	38
Abbildung 6: Vorgehensweise zur Herstellung der Kryopräparate.....	39
Abbildung 7: <i>In vitro</i> -Luciferaseaktivität eigens kultivierter Zellen im Vergleich zu den Herstellerangaben.....	43
Abbildung 8: Luciferasestabilität <i>in vitro</i> über den Zeitraum von 60 Minuten.....	44
Abbildung 9: Kinetik zur Überprüfung der Luciferasestabilität <i>in vivo</i>	45
Abbildung 10: Orthotope Zellimplantation ins Kolon.....	47
Abbildung 11: Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere.....	52
Abbildung 12: Monitoring des Tumorwachstums durch die Koloskopie	53
Abbildung 13: Darstellung des Biolumineszenzsignals 24 Stunden und 48 Stunden nach Implantation.....	55
Abbildung 14: Monitoring des Tumorwachstums über Biolumineszenz-Bildgebung	55
Abbildung 15: Überwachung des Tumorwachstums durch Endoskopie und Biolumineszenz.....	56
Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der Biolumineszenz- und Tumorgrößenentwicklung der Operationsgruppen A1-A3.....	61
Abbildung 17: Vergleichende Darstellung der Biolumineszenz- und Tumorgrößenentwicklung der Operationsgruppen B1-B3.....	62
Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der Biolumineszenz- und Tumorgrößenentwicklung der Operationsgruppen C1-C3.....	63
Abbildung 19: Ex vivo-Aufnahmen von neoplastisch veränderten Kolonabschnitten und den dazugehörigen Biolumineszenz-Aufnahmen	64
Abbildung 20: Nachweis Biolumineszenz-positiver Zellen im Kolon und mesenterialen Lymphknoten derselben Maus	66
Abbildung 21: HE- und Immunhistochemische Färbungen von humanen, kolorektalen Tumorzellen (Colo 205-Luc) im murinen Kolon.....	67
Abbildung 22: HE- und Immunhistochemische Färbungen von humanen, kolorektalen Tumorzellen (HT 29-Luc) im murinen Kolon.....	68
Abbildung 23: HE- und Immunhistochemische Färbungen von humanen, kolorektalen Tumorzellen (HCT 116-Luc) im murinen Kolon.....	69
Abbildung 24: Einfluss des Futtermittels auf Autofluoreszenz und Körpergewicht	72

Abbildung 25: Darstellung der <i>in vivo</i> verwendeten NIR-Sonden zur Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop	75
Abbildung 26: Nahinfrarot- und Biolumineszenzsignal	76
Abbildung 27: Faserendoskopische Darstellung gesunder Mukosa und Tumorgewebe	78
Abbildung 28: Darstellung eines HT 29-Luc-Tumors in der NIR-Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop	80
Abbildung 29: Darstellung eines HCT 116-Luc-Tumors in der NIR-Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop	81
Abbildung 30: Darstellung eines Colo 205-Luc-Tumors in der NIR-Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop	82
Abbildung 31: Quantifizierung der Fluoreszenzsignale der kolorektalen Tumoren	84
Abbildung 32: Vergleichende Darstellung orthotoper Tumoren im NIR- Fluoreszenzscanner mit HE-Färbungen und NIR-Mikroskopie	86
Abbildung 33: Quantifizierung des NIR-Fluoreszenzsignales der Kryoschnitte.....	87
Abbildung 34: Darstellung der Luciferaseaktivität drei verschiedener Zelllinien.....	132
Abbildung 35: Darstellung eines gesunden Kolons in der NIR-Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop	133

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Primäre Antikörper für die Immunhistochemie (IHC)	20
Tabelle 2:	Darstellung der verwendeten NIR-Kontrastmittel.....	22
Tabelle 3:	Bildgebende Geräte	24
Tabelle 4:	Sonstige Geräte	25
Tabelle 5:	Einteilung der Gruppen im Vorversuch zur Beurteilung der Autofluoreszenz	35
Tabelle 6:	Einteilung der Tierversuchsgruppen	49
Tabelle 7:	Zusammenfassung der Anwachsdaten in den unterschiedlichen Operationsgruppen	58
Tabelle 8:	Metastasenentwicklung der einzelnen Operationsgruppen	65
Tabelle 9:	Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Kontrastmittel	74
Tabelle 10:	Ergebnisse der <i>in vitro</i>-Messung der drei verschiedenen Zelllinien.....	134
Tabelle 11:	<i>Score Sheet</i> zur täglichen klinischen Überwachung der Versuchstiere	134

1 Einleitung

Trotz großer Fortschritte in der Aufklärung der molekularen Ursachen der Tumorentstehung steht die Medizin noch immer vor dem Problem, nur einem kleinen Teil der an Krebs erkrankten Patienten dauerhaft helfen zu können. Abgesehen von der chirurgischen Resektion stehen für die meisten Tumorentitäten keine kurativen Therapien zur Verfügung. Vor allem maligne Entartungen des Darmes weisen, je nach Erkrankungsstadium, eine ungünstige Prognose auf. Neue Behandlungsstrategien und moderne hochwirksame Therapeutika sind erforderlich, um bereits metastasierte Tumoren in ihrem Wachstum zu hemmen. Gerichtete Therapien, molekulare Bildgebung und individualisierte Medizin gehören deshalb zu den wichtigsten aktuellen Ansätzen in der Bekämpfung des kolorektalen Karzinoms (Ochendusko und Krzemieniecki, 2010; Ksienski, 2011).

Kolorektale Tumoren entwickeln sich über Hyperplasien und Adenome (Gruber und Klopffleisch, 2011), sogenannte neoplastische Polypen (Pschyrembel, 2002a) über einen Zeitraum von fünf bis zehn Jahren. Diese Krebsvorstufen können während einer Koloskopie, wenn sie erkannt werden, entfernt werden, so dass das von ihnen ausgehende Risiko stark minimiert ist (Faiss, 2011).

Dennoch werden während einer präventiv durchgeführten Koloskopie bei 25-30 % der Patienten kleine und flache Polypen übersehen (van Rijn et al., 2006). Aufgrund dessen besteht die Notwendigkeit, diese makroskopisch unauffälligen Tumorstufen sichtbar zu machen und die Diagnostik zu optimieren.

Das von Paul Ehrlich entworfene Konzept der „Zauberkegeln“ – Therapeutika, die nur am Krankheitsherd wirken, nicht jedoch das gesunde Gewebe schädigen (Ehrlich und Morgenroth, 1901; Ehrlich, 1909; Ehrlich und Sachs, 1910) – ist der Leitgedanke der vorliegenden Dissertation.

Zu den größten Herausforderungen der Tumormedizin gehört es, krebs-spezifische Zielmoleküle (*Targets*) zu identifizieren und ihre Funktion zu erforschen.

Diese Zielstrukturen sollen möglichst ausschließlich auf Tumorzellen, nicht aber auf gesundem Gewebe zu finden sein. Die zielgerichteten Bindungsmoleküle können an ein signalgebendes oder an ein therapeutisches Agenz oder Substrat gekoppelt und dem betroffenen Patienten verabreicht werden. Auf diese Weise erhalten die Erkrankten molekular gerichtete Kontrastmittel bzw. Chemotherapeutika, die sich primär im Tumorgewebe anreichern. Diese Substanzen werden auch als „*Theranostics*“ bezeichnet (Dubernet, 2011; Lammers et al., 2011). Solche *Theranostics* in Form molekular gerichteter Kontrastmittel sind ein vielversprechender Forschungsansatz, um flache Adenome sichtbar zu machen.

Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass die Entwicklung innovativer Tiermodelle für die präklinische Validierung solcher Kontrastmittel von essentieller Bedeutung ist. Orthotope Tumormodelle eignen sich sehr gut für präklinische Studien, da sie neben Metastasierungs- und Angiogeneseverhalten das Krankheitsbild des humanen Patienten in wesentlichen Aspekten widerspiegeln.

Ziel dieser Dissertation war es, ein orthotopes kolorektales Tumormodell mit unterschiedlichen humanen Zelllinien im Bereich des Kolons der Nacktmaus zu entwickeln. Die Tumoren sollten im Bereich des *Colon descendens* wachsen und mittels eines starren Kleintierendoskops beobachtet werden. Unterstützend dazu sollte das Tumorwachstum mittels Biolumineszenzbildgebung beurteilt werden. Ein solches Modell wird bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Beschriebene Tumormodelle in dieser Lokalisation sind in der Regel murinen Ursprungs, sie beruhen auf einem Gendefekt (Ignatenko et al., 2008; Puppa et al., 2011) oder werden durch chemische Substanzen erzeugt (Neufert et al., 2007).

Im weiteren Verlauf sollte dieses Modell für präklinische Studien für zielgerichtete, signalgebende Agentien im Nah-Infrarot-Bereich verwendet werden.

2 Literatur

2.1 Kolorektale Tumoren

Unter kolorektalen Tumoren versteht man alle malignen Tumoren des Dick- und Enddarms. 95 % dieser Tumoren entstehen aus Drüsenepithel und werden als kolorektale Adenokarzinome bezeichnet (Pschyrembel, 2002a).

Es wird angenommen, dass die meisten kolorektalen Adenokarzinome aus gutartigen Veränderungen, sogenannten Adenomen oder adenomatösen Polypen entstehen (Ahlquist, 2010; Bretthauer, 2011). Polypen sind nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation benigne Veränderungen der Darmschleimhaut, die in das Lumen hineinwachsen und meist ein pilzähnliches Aussehen aufweisen. In der Koloskopie werden auch flache bzw. eingesunkene Adenome in der Darmschleimhaut beobachtet. Diese Art von Krebsvorstufen wurde zuerst von Muto beschrieben (Muto et al., 1985).

Die Umwandlung der Adenome in Adenokarzinome erfolgt über eine Multistep-Karzinogenese. Es wird davon ausgegangen, dass bis zur Entstehung von soliden, malignen Tumoren mit metastatischem Potential etwa fünf unabhängige Defekte in derselben Zelle akkumulieren müssen (Gruber und Klopffleisch, 2011). Durch eine Serie genetischer Veränderungen über einen längeren Zeitraum kommt es zur Modifikation der Mukosazellen (vgl. Theorie von Vogelstein und Fearon; Gruber und Klopffleisch, 2011). Der Prozess der malignen Transformation kann bis zu 10 Jahren dauern. Durch die lange Entwicklungszeit besteht die Möglichkeit, präventiv einzugreifen und somit die Entstehung des kolorektalen Tumors zu verhindern (Brenner et al., 2009).

2.1.1 Epidemiologie

Kolorektale Tumoren sind mit 13 % bzw. 16 % die zweithäufigste Krebserkrankung in Europa bzw. in Deutschland (Ferlay et al., 2010). Nach Angaben des Robert-Koch-Institutes (RKI) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) ist Darmkrebs mit 12-14 % die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache (RKI und GEKID, 2010).

Nach Erhebungen der GEKID sind im Jahr 2010 39.300 Männer und 32.400 Frauen an Darmkrebs erkrankt (RKI und GEKID, 2010).

Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts hat die Anzahl der Neuerkrankungen zwischen 1989 und 2006 bei Frauen um 26 %, bei Männern um 34 % zugenommen, während die Sterberate bei Frauen um 38 % und bei Männern um 24 % zurückgegangen ist (RKI und GEKID, 2010). Seit 1990 ist insbesondere die höhere Erkrankungsrate der über 75-jährigen Frauen und der 60 bis 84-jährigen Männer auffällig. Derzeit werden nach Angaben des epidemiologischen Krebsregisters bei niedriger Sterberate circa zweimal so viele Darmkrebserkrankungen pro Jahr entdeckt wie 1980 (RKI und GEKID, 2010).

Die Überlebensrate ist vom Stadium der Erkrankung zum Diagnosezeitpunkt abhängig. 1980 lag die relative Fünf-Jahres-Überlebensrate bei 50 %. Im Jahr 2006 wiesen die epidemiologischen Krebsregister der Bundesländer eine Fünf-Jahres-Überlebensrate zwischen 53 % und 63 % aus. Im Vergleich dazu liegen die aktuellen Werte für finnische und US Patienten mit 60 % bis 63 % und 65 % deutlich höher (RKI und GEKID, 2010).

2.1.2 Ursachen

Die Ursachen für Darmkrebs sind vielfältig; mehr als 95 % der kolorektalen Tumoren treten sporadisch auf, ohne dass ein signifikant erhöhtes erbliches Risiko bei dem Patienten vorliegt (Watson und Collins, 2011). Eine Vielzahl von Risikofaktoren wird mit der westlichen Lebensweise assoziiert (Watson und Collins, 2011). Zu diesen zählen Adipositas, hohe Kaloriendichte in der Nahrung, wenig Bewegung, Alkohol und eine geringe Aufnahme von Ballaststoffen. Auch der häufige Konsum von rotem Fleisch und tierischen Fetten werden als mögliche Ursache diskutiert (Watson und Collins, 2011). Insbesondere Rauchen gehört zu den prädisponierenden Faktoren. Raucher haben ein 50 % höheres Risiko, an Kolonkrebs und ein um 100 % erhöhtes Risiko, an Rektumkrebs zu erkranken.

Physische Aktivität, inklusive der Senkung des Blutdrucks, Verminderung der Insulinresistenz und die Erhöhung der Ballaststoffaufnahme erhöhen die Darm-

motilität und sollen der Entstehung von Darmkrebs präventiv entgegenwirken (Zeng und Lazarova, 2011).

2.1.3 Tumorwachstum und Metastasierung

Es wird angenommen, dass die meisten kolorektalen Adenokarzinome aus gutartigen Veränderungen, sogenannten Adenomen oder adenomatösen Polypen entstehen (Bretthauer, 2011).

Wie alle epithelialen Tumoren werden auch die kolorektalen Adenokarzinome nach dem TNM / pTNM-System der Union Internationale contre le Cancer (UICC) klassifiziert (Sobin et al., 2009). In die TNM-Klassifikation geht neben den Resultaten der klinischen Diagnostik (cTNM) auch die postoperative pathohistologische Beurteilung (pTNM) ein. Der Buchstabe „T“ steht dabei für die Beschreibung des Primärtumors. Die folgenden Ausführungen basieren auf den *TNM-Classification of Malignant Tumours* der UICC (Sobin et al., 2009).

Als Kriterium für die Einteilung der Primärtumorstadien (T/ pT) gilt die Infiltrationstiefe in die Kolonschichten bzw. in die des benachbarten Gewebes. Hieraus ergeben sich folgende Kategorien:

- T / pTX: Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T / pT0: Kein Anhalt für einen Primärtumor
- T / pT 1: Infiltration des Tumors in die Submukosa
- T/ pT 2: Infiltration des Tumors in die *Tunica muscularis propria*
- T/ p T 3: Infiltration des Tumors in die Subserosa, jedoch keine Beteiligung der Peritonealhöhle
- T / p T4a: Perforation des Tumors durch die Serosa
- T / p T4b: Infiltration des Tumors in andere Organstrukturen

Mit dem Buchstaben „N“ wird die Anzahl der befallenen Lymphknoten im Patienten beschrieben.

- N1: Metastasen in ein bis drei regionalen Lymphknoten
- N1a: ein Lymphknoten ist infiltriert

- N1b: zwei bis drei Lymphknoten weisen Tumorzellen auf
- 1c: Satelliten in der Subserosa, ohne Beteiligung regionaler Lymphknoten
- N2: Metastasen in vier oder mehr regionalen Lymphknoten
- N2a: vier bis sechs befallene Lymphknoten
- N2b: sieben oder mehr befallene Lymphknoten

Das „M“ beschreibt das Vorkommen von Fernmetastasen;

- M0: keine Metastasen sichtbar
- M1: Fernmetastasen in Leber, Lunge oder anderen Organen vorhanden

Die Metastasierung des kolorektalen Adenokarzinoms kann sowohl lymphogen als auch hämatogen erfolgen. Die hämatogene Streuung erfolgt primär in die Leber und sekundär in die Lunge (Pschyrembel, 2002b). Die lymphogene Streuung findet erst recht spät statt. Dabei kommt es zu einem Befall der mesenterialen Lymphknoten, entlang der vorhandenen Lymphgefäße. Beim Rektumkarzinom kommt es in Abhängigkeit von der Lokalisation zur Metastasierung in die Beckenhöhle beziehungsweise in die mesenterialen Lymphknoten (Pschyrembel, 2002b).

2.1.4 Diagnostik

Auf internationalen Kongressen werden anhand neuer Forschungsergebnisse Präventions- und Diagnostikstrategien entwickelt, die in Leitlinien zusammengefasst werden.

Die Leitlinien „Kolorektales Karzinom, Screening und Prävention des Wissensnetzwerkes evidence“ sind von der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und der Arbeitsgemeinschaft für Gastroenterologische Onkologie in einer Konsensuskonferenz erstellt worden. Die Untersuchungsmöglichkeiten werden im Folgenden erläutert (Schmiegel et al., 2000).

Nach den Leitlinien in der asymptomatischen Bevölkerung mit normalem Risiko, besteht die Möglichkeit, sich zu drei Früherkennungsmodalitäten beraten zu lassen. Aufgrund der deutlichen Zunahme des kolorektalen Adenokarzinoms ab dem

50. Lebensjahr sollte zu diesem Zeitpunkt mit der Früherkennung begonnen werden (Winawer et al., 2003). Eine Untersuchungsmethode ist der Stuhltest auf okkultes Blut (FOB-Test), der jährlich durchgeführt wird. Eine weitere ist die Durchführung einer Sigmoidoskopie alle fünf Jahre. Die dritte Option ist sich alle zehn Jahre einer Koloskopie zu unterziehen (Schmiegel et al., 2000).

2.1.4.1 Fäkaler Occulter Bluttest (FOBT)

Die Durchführung des FOBT basiert auf der Annahme, dass zwei Drittel aller kolorektalen Adenokarzinome im Verlauf einer Woche bluten, weshalb die wiederholte Testung zur zuverlässigen Erkennung führen soll (Mandel et al., 1993; Mandel et al., 1999; Schmiegel et al., 2000). Bei diesem Test werden Stuhlproben im Labor mit Wasserstoffperoxid auf Blut untersucht (Schmiegel et al., 2000).

Durch wiederholte Testung kommt es zu einer Senkung der kolorektalen Mortalität um 16-26 % (Hardcastle et al., 1996; Hewitson et al., 2007). Bereits bei einem einmalig positiven Testergebnis ist eine komplette endoskopische Darstellung des Dickdarms erforderlich (Schmiegel et al., 2000).

2.1.4.2 Sigmoidoskopie

Eine Sigmoidoskopie sollte als Präventionsmaßnahme alle fünf Jahre durchgeführt werden (Schmiegel et al., 2000). Nach Literaturangaben kommen 70 % aller Kolonkarzinome im sigmorektalen Bereich vor (Pschyrembel, 2002a). Bei der Sigmoidoskopie werden das distale Kolon und das Rektum mit einem Sigmoidoskop bzw. mit einem Koloskop untersucht. Eine Studie hat gezeigt, dass nur 2-6 % der Patienten Neoplasien im proximalen Kolon aufweisen, ohne dass Polypen im distalen Enddarm vorliegen (Erarslan et al., 2009). Die Sigmoidoskopie führt nach Literaturangaben zu einer Senkung der Mortalität um 33 % und senkt die Inzidenz um 33 % (Bretthauer, 2011). Da weiter kranial liegende Karzinome mit dieser Methode nicht detektiert werden können, wird die Durchführung des FOBT ergänzend angeraten (Schmiegel et al., 2000). Die Kombination beider Verfahren ist der alleinigen Sigmoidoskopie überlegen.

2.1.4.3 Koloskopie

In Deutschland und den USA ist die Koloskopie der Goldstandard zur Früherkennung kolorektaler Adenokarzinome (Pizzo et al., 2011). Im Oktober 2002 wurde die Koloskopie in den Katalog der gesetzlichen Vorsorgeuntersuchung in Deutschland aufgenommen (Schmiegel et al., 2000; Waldmann et al., 2010).

Die komplette Koloskopie besitzt die höchste Sensitivität zur Detektion von Adenomen bzw. kolorektalen Adenokarzinomen. Die Koloskopie erlaubt Diagnostik und gleichzeitige Entfernung von Polypen. Ferner wird die Entnahme von Biopsien bei großflächigen Veränderungen der Schleimhaut ermöglicht (Winawer et al., 2003).

Sowohl von Autoren einiger Studien als auch von den Leitlinien, wird bei Patienten mit einem durchschnittlichen Risiko ein 10-Jahres-Untersuchungsintervall als ausreichend angesehen (Schmiegel et al., 2000; DGVS, 2007; Brenner et al., 2007; Brenner et al., 2009). In einer Studie zeigten nur 16 % der Patienten fünf Jahre nach der ersten Endoskopie ein oder mehrere Adenome, 1,6 % der Patienten zeigten fortgeschrittene Adenome (Imperiale et al., 2008). Besteht bei Patienten ein erhöhtes Risiko für kolorektale Adenokarzinome, z. B. bei familiärer Vorbelastung (Schmiegel et al., 2000; DGVS, 2007), ist ein engmaschigeres Untersuchungsintervall erforderlich.

Auch wenn die Koloskopie als die beste vorhandene Methode für die Diagnostik und die Entfernung von Kolonpolypen gilt und mittlerweile als Goldstandard angesehen wird (Winawer et al., 2003), so ist diese Untersuchungsmethode nicht fehlerfrei und die meisten Gastroenterologen vertreten die Auffassung, dass Polypen während der Koloskopie übersehen werden können. Van Rijn et al. (2006) wertete diesbezüglich verschiedene Studien aus. Hierbei wurden 22 % der Polypen, unabhängig von ihrer Größe, nicht detektiert. 2,1 % der Adenome mit einer Größe unter 10 mm, 13 % der Adenome zwischen 5-10 mm und 26 % der Adenome zwischen 1-5 mm blieben bei präventiven Koloskopien unentdeckt.

Verschiedenste Forschungsansätze, um die Detektion von Polypen bzw. Adenomen zu verbessern, wurden bereits untersucht (van Rijn et al., 2006). Eine Methode zur Verbesserung der Diagnostik ist die Chromoendoskopie. Hierbei wird

Farbstoff auf die Mukosaoberfläche des Gastrointestinaltraktes gesprüht (Pschyrembel, 2002c). Grundgedanke ist, die Detailerkennung zu verbessern und rein optisch nicht wahrnehmbare Mukosaveränderungen sichtbar zu machen. Bei den Farbstoffen handelt es sich um Substanzen, die mit intrazellulären Strukturen der Mukosa (Intravitalfärbungen) oder mit Bestandteilen der Mukosaoberfläche reagieren (Kontrastfärbung). Für die Anfärbung von Kolonstrukturen wird in der Klinik Indigokarmin, Cresylviolett oder Methylenblau verwendet (Repici et al., 2011). Einige Autoren bestätigen einen verbesserten diagnostischen Gewinn in der Endoskopie durch die Verwendung von Farbstoffen, ergänzend zu der Weißlichtendoskopie (Hlavaty et al., 2011). Entwicklungen wie Narrow Band Imaging (Baumgart, 2011; Jin et al., 2011b) oder Auto-Fluoreszenz Koloskopie (Arita et al., 2011) befinden sich noch in den Anfängen der Forschung.

Vor dem Hintergrund neuer Forschungsansätze wird deutlich, dass die Entwicklung innovativer Diagnostik zur Detektion kolorektaler Tumoren von essentieller Bedeutung ist.

2.1.5 Therapie

Die Therapie des Kolonkarzinoms besteht im Wesentlichen aus Operation und/oder Chemotherapie. Bei der Therapie des Rektumkarzinoms hat die Strahlentherapie einen hohen Stellenwert und ist zusätzlich zu Operation und medikamentöser Behandlung integraler Bestandteil der Therapie (Schallhorn, 2009). Je nach Zustand und Erkrankung des Patienten werden diese Optionen einzeln oder kombiniert eingesetzt.

Grundlage der medikamentösen Standardtherapie ist 5-Fluorouracil (5-FU; Zhao et al., 2011). Es führte zu Remissionsraten von 10-15 % und zu einer medianen Überlebenszeit von 6-9 Monaten. 5-FU muss durch Ribosylierung und Phosphorylierung aktiviert werden. In dieser aktiven Form blockiert es die Thymidylat-Synthetase, wodurch die Bildung von Thymidinnukleotiden verhindert wird (Frey und Löscher, 2002). Dadurch wird die DNA-Synthese gehemmt. Durch einen weiteren 5-FU Metaboliten wird zusätzlich die RNA-Synthese gestört. Unter der

Therapie kann es u. a. durch kompensatorische Hochregulation der Thymidylat-Synthetase zur Resistenzentwicklung kommen (Frey und Löscher, 2002).

In den letzten Jahren erschienen eine Reihe großer Phase III-Studien über die Erstlinientherapie des metastasierten kolorektalen Adenokarzinoms. Eine Kombinationstherapie aus 5-FU, Irinotecan oder Oxalatin verbesserte in allen Studien die Ansprechrate und das progressionsfreie Überleben (de Gramont et al., 2000).

Auch zielgerichtete Therapien (Ochendusko und Krzemieniecki, 2010) mit monoklonalen Antikörpern wie Bevacizumab (Okita et al., 2011), Cetuximab (Cunningham et al., 2004; Jonker et al., 2007) und Panitumab (Weeraratne et al., 2011) kommen in den letzten Jahren immer mehr zum Einsatz. Insbesondere bei weiter fortgeschrittenen Erkrankungen zeigen sie in Kombination mit anderen Therapien eine deutliche Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (Ochendusko und Krzemieniecki, 2010).

2.2 Präklinische Tumormodelle

In der Wissenschaft wurden unterschiedliche präklinische Tier-Tumormodelle entwickelt, welche je nach Forschungsschwerpunkt zum Einsatz kommen.

Gemein ist allen Modellen, dass sie der Biologie humaner Krebserkrankungen ähneln sollen (Bhullar et al., 2011); zelluläre und molekulare Ereignisse sollten mit dem Tumorwachstum und der Metastasierung in Zusammenhang gebracht werden. Des Weiteren sollen paraneoplastische Syndrome bei den Versuchstieren erkennbar sein, die auch bei den Patienten zu beobachten sind. Ferner sollten die Modelle verlässliche, reproduzierbare und finanziell tragbare Ergebnisse liefern (Killion et al., 1998).

Tumormodelle können in zwei große ätiologische Gruppen unterteilt werden: in die Mutations- und die Transplantationsmodelle.

2.2.1 Mutationsmodelle

Die Mutationsmodelle können in induzierte (z. B. durch Bestrahlung oder Verabreichung chemischer Substanzen) und genetische Modelle eingeteilt werden (Giulio und Kerbel, 2010). Induzierte Mutationen werden durch die Verabreichung mutagen wirkender Substanzen im Versuchstier hervorgerufen. Ein be-

kanntes Beispiel hierfür ist das Azoxymethan-Natriumdextranmodell (AOM/DSS-Modell). Hierbei wird dem Versuchstier zunächst Natriumdextransulfat verabreicht, welches eine hochgradige Kolitis hervorruft. Darauf folgend erhalten die Tiere das Azoxymethan, welches kanzerogen wirkt und kolorektale Adenokarzinome verursacht (Tanaka et al., 2001; Neufert et al., 2007). Dieses Modell stellt die Wirkung natürlicher Karzinogene nach.

Durch die Verwendung transgener Modelle (wie z. B. die APC-Min-*knockout*-Maus) können frühe Veränderungen im Krankheitsgeschehen untersucht, Präventions- und Diagnostikstrategien entwickelt werden. Die Charakterisierung der verschiedenen Risikofaktoren spielt bei den genetischen Modellen ebenfalls eine große Rolle (Ignatenko et al., 2011). Ein Vorteil ist, dass die Metastasierung dem Krankheitsbild der humanen Patienten ähnelt (Fichtner, 2008), aufgrund dessen sind sie für die zeitabhängige Verfolgung der Metastasierung geeignet (Fichtner, 2008). Außerdem handelt es sich um immunkompetente Tiere, so dass keine besonderen Haltungsbedingungen erforderlich sind. Nachteilig ist der hohe Kostenfaktor. Oft ist ein hoher Zeitaufwand notwendig, um dieses Tiermodell zu etablieren (Killion et al., 1998).

2.2.2 Transplantationsmodelle

Die Verwendung von Transplantationsmodellen ist in der onkologischen Forschung weitaus gebräuchlicher als die von Mutationsmodellen.

Es wird grundsätzlich zwischen syngenem und xenogenem Transplantationsmodellen unterschieden. Unter syngenem Modellen versteht man die Verwendung von murinen Tumorzellen in dem Versuchstier Maus (Fichtner, 2008). Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Transplantation der murinen Kolon-Karzinomzelllinie C26 beziehungsweise C38 Zelllinie (*American Type Culture Collection: ATCC*). Die Zellen werden immunkompetenten Versuchstieren implantiert. Dadurch sind syngene Modelle das Modell der Wahl, wenn es um Versuche mit Immuntherapeutika geht (Fichtner, 2008).

Syngene Modelle werden als frühe *in vivo*-Modelle eingesetzt, um beispielsweise ein Behandlungsschema zu etablieren. Diese Modelle ermöglichen eine relativ

schnelle Aussage zur Wirksamkeit von Chemotherapeutika. Hierbei können auch die unerwünschten Arzneimittelwirkungen beurteilt und beobachtet werden (Fichtner, 2008). Der Nachteil syngener Modelle ist die Andersartigkeit der Zellen zur humanen Spezies. Des Weiteren wird von einigen Autoren die Immunogenität von syngen Zellen, etwa durch Veränderung der genetischen Eigenschaften (z. B. durch virale Transfektion) kritisch betrachtet (Hewitt, 1979). Durch das Wachstum solcher Tumoren kommt es zur Immunreaktion im Versuchstier, insbesondere durch zytotoxische T-Zellen und Antikörper, die bei humanen Patienten nicht beobachtet werden (Hewitt, 1979).

Unter xenogenen Transplantationsmodellen wird die Übertragung von lebens- und funktionstüchtigen Zellen oder Zellverbänden zwischen verschiedenen Spezies verstanden (Pschyrembel, 2002d). Um die Anwachsrate zu verbessern, werden dafür immunsupprimierte Tiere wie Nackt- oder SCID-Mäuse verwendet.

Auch die Wirksamkeit der Chemotherapeutika ist bei Therapieversuchen vom Immunstatus der Versuchstiere abhängig (De Palma und Lewis, 2011).

Xenograftmodelle sind ausgezeichnet zur Testung zielgerichteter Therapeutika geeignet. Die Zielstrukturen sind homogener als im humanen Patienten ausgebildet (Fichtner, 2008). 2001 untersuchte das „National Cancer Institute“ der USA Chemotherapeutika, mit dem Ergebnis, dass 33 % der Medikamente an Xenograftmodellen getestet wurden. Mehr als 45 % dieser Substanzen wurden in der klinischen Forschung bestätigt (Johnson et al., 2001). Andere Autoren kritisieren hingegen, dass xenogene Transplantationsmodelle häufig zu positiven Bewertungen neuer Substanzen führen, die sich in klinischen Prüfungen nicht bestätigen lassen (Fichtner, 2008).

Je nach Lokalisation wird zwischen orthotopen und ektopen bzw. heterotopen Transplantationen unterschieden (Pschyrembel, 2002d). Unter einer ektopen oder heterotopen Transplantation wird die Implantation von Zellen oder Zellverbänden ohne örtliche Übereinstimmung verstanden (Pschyrembel, 2002d), z. B. die *subcutane* Verpflanzung von Pankreaskarzinomzelllinien.

Unter orthotopen Transplantationen versteht man das Einpflanzen von Zellen an den „natürlichen Ursprungsort“ (Pschyrembel, 2002d), z. B. die Implantation von

kolorektalen Tumorzellen in den Dickdarm. Der Vorteil orthotoper Tumormodelle liegt darin, dass die Tumorzellen in das Tumormikromilieu transplantiert werden, woraus sie entstammen (Bhullar et al., 2011). Dadurch kommt es zu einer Expression von Genen und Rezeptoren (Bhullar et al., 2011), die in *subcutanen* Modellen nicht zu finden sind. Ferner werden eher Metastasen ausgebildet (Li et al., 2011), vergleichbar zum humanen Krankheitsbild.

In der Literatur werden kaum xenogene, orthotope kolorektale Karzinommodelle im absteigenden Ast des Kolons beschrieben.

Lediglich von zwei Autoren werden Methoden vorgestellt, wie ein solches Modell zu etablieren ist (Alencar et al., 2005; Tseng et al., 2007). Diese beiden beschriebenen Modelle sind jedoch chirurgisch hochgradig traumatisch (Alencar et al., 2005) bzw. im Management der Versuchstiere sehr aufwendig (Tseng et al., 2007). Eine direkte Injektion von Tumorzellen in die murine Mukosa beziehungsweise Submukosa wird als technisch zu schwierig beschrieben (Alencar et al., 2005). Das in dieser Dissertation verwendete Modell soll eine Verbesserung zu den in der Literatur beschriebenen Modellen darstellen. Ziel war es, das Modell tierschonender zu etablieren als die publizierten Modelle (Alencar et al., 2005; Tseng et al., 2007) und es durch Koloskopie mit einem starren Endoskop zu überwachen.

2.2.3 Diagnostische Bildgebung

Bildgebungsverfahren sind ein unabdingbares Werkzeug in der Krebsforschung, in klinischen Studien und in der klinischen Diagnostik, um die Prognose (Lee et al., 2004), die Therapieplanung (Ciernik et al., 2003) und das Ansprechen auf die eingeschlagene Therapie zu erörtern (Neves und Brindle, 2006). In den letzten drei Jahrzehnten wurde eine große Anzahl an Bildgebungsverfahren entwickelt, die teilweise schon in der Klinik eingesetzt werden (Neves und Brindle, 2006) oder sich noch in der Validierungsphase befinden (Weissleder und Pittet, 2008).

Geräte zur Darstellung anatomischer und physiologischer Gegebenheiten sind sowohl in der Klinik als auch in der präklinischen Forschung sehr verbreitet: Computertomographie (CT), Magnet-Resonanztomographie (MRT), Positionen

Emissions-Tomographie (PET) und Single-Photon-Emission-CT (SPECT) werden dazu gezählt (Weissleder und Pittet, 2008). Für die klinische Routinepraxis und zur Überprüfung der Wirksamkeit von Behandlungsprotokollen sind CT, MRT, PET und SPECT nützlich (Neves und Brindle, 2006). CT und MRT geben dem Kliniker detaillierte Informationen zu anatomischen Strukturen und pathologischen Veränderungen, während PET und SPECT eher molekulare und metabolische Informationen liefern (Fass, 2008). Dennoch weisen diese Untersuchungsmöglichkeiten eine geringe Spezifität und Sensitivität auf. Zudem kommt es, je nach Untersuchungsmodalität, zu einer Strahlenbelastung der Patienten (Hilderbrand und Weissleder, 2009; Pysz et al., 2010).

Neue Forschungsfelder beschäftigen sich deshalb mit optischen Bildgebungsmodalitäten, wie der Fluoreszenz- (FLI: Fluoreszenz Imaging) und Biolumineszenz-Bildgebung (BLI: Biolumineszenz Imaging), da diese spezifische molekulare Informationen liefern.

2.2.4 Biolumineszenz-Bildgebung

Als Lumineszenz bezeichnet man alle Leuchterscheinungen, die auf der Freisetzung von Lichtquanten beruhen (Pschyrembel, 2002e). Dieser Eigenschaft liegt ein biologischer Prozess zugrunde, bei welchem das Enzym Luciferase mit dem Substrat Luciferin unter der Anwesenheit von Sauerstoff reagiert. Einige Enzyme benötigen zusätzlich die Anwesenheit von ATP und Magnesium. In der Biomedizinischen Forschung werden primär drei unterschiedliche Luciferasen verwendet: die *Photinus pyralis* (Firefly)-Luciferase, die *Renilla reniformis*-Luciferase und die *Gaussia princeps*-Luciferase (Badr und Tannous, 2011).

Für die Experimente dieser Dissertation wurden Zellen verwendet, die stabil die Firefly-Luciferase exprimieren. Die Biolumineszenz-Bildgebung visualisiert die Emission von Licht, die bei der Umsetzung des Substrates D-Luciferin durch das Enzym Luciferase frei wird. Das Signal ist abhängig von der Menge bzw. dem Aktivitätszustand der Luciferase und der Anwesenheit von Luciferin, ATP und Sauerstoff (Weissleder und Pittet, 2008). Zur Detektion des Signals sind ultrasen-

sitive Charge coupled Device-Kameras (CCD-Kameras) notwendig (Prescher und Contag, 2009).

Die Biolumineszenz-Bildgebung (Biolumineszenz-Imaging: BLI) hat sich als Methode etabliert, um kleine Versuchstiere *in vivo* zu untersuchen (Godechal et al., 2011; Hwang et al., 2011; Keereweer et al., 2011). Die Biolumineszenz ist mittlerweile die sensitivste Untersuchungsmethode für die Kleintierbildgebung (Prescher und Contag, 2009). Im Gegensatz zur Fluoreszenzbildgebung weist die Biolumineszenz kein Hintergrundrauschen auf.

Der Vorteil ist, dass das Wachstumsverhalten von Zellen, die stabil Luciferase exprimieren, in Versuchstieren untersucht werden kann, ohne Tiere dafür töten zu müssen. Dadurch kann die Anzahl der Versuchstiere stark reduziert werden (Contag, 2007).

2.2.5 Fluoreszenz-Bildgebung

Unter Fluoreszenz versteht man die kurzzeitige spontane Emission von Licht beim Übergang eines durch eine spezifische Wellenlänge elektronisch angeregten Moleküls in einen niedrigeren Energiezustand, wobei Licht emittiert wird (Pschyrembel, 2002e). Das hierbei emittierte Licht weist eine längere Wellenlänge auf und ist damit energieärmer als das zuvor absorbierte Licht (Weissleder und Pittet, 2008).

Das Phänomen der Fluoreszenz ist seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt und 1924 wurde erstmalig eine Autofluoreszenz endogener Porphyrine in Tumoren beobachtet, die bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht leuchteten (Weissleder und Pittet, 2008). 1977 beobachteten Forscher, dass Nah-Infrarotlicht (NIR: 650-900 nm) wesentlich effizienter das Gewebe durchdringt als Wellenlängen aus dem sichtbaren Bereich (Jobsis, 1977). Insbesondere die Wellenlängen zwischen 700 nm und 900 nm werden kaum vom Organismus absorbiert (Bhargava, 2004). Des Weiteren ist bei Bestrahlung des Körpers mit dieser Wellenlänge kaum Autofluoreszenz zu beobachten (Bhargava, 2004), da die Absorption von Hämoglobin und Wasser hier sehr gering ist (Luo et al., 2011). Das führt zu einer Verstärkung des

Bildkontrastes. Damit ermöglicht die Bildgebung im NIR-Bereich, Veränderungen tiefer liegender Strukturen nicht-invasiv zu untersuchen (Jobsis, 1977).

Um befriedigende Ergebnisse in der NIR-Bildgebung zu erhalten, werden NIR-Kontrastmittel mit hervorragenden chemischen und photophysikalischen Eigenschaften benötigt (Luo et al., 2011). Kontrastmittel werden verwendet, um einzelne Organe, Tumoren oder molekulare Prozesse in der *in vivo*-Bildgebung darzustellen (Weissleder, 2002). Das ideale NIR-Kontrastmittel muss im NIR-Spektrum funktionieren, einen hohen molaren Absorptionskoeffizienten besitzen und in gelöster Form bzw. im Organismus chemisch- und photostabil sein (Luo et al., 2011). Die Kontrastmittel können nach Weissleder (Weissleder, 2002) in drei große Gruppen eingeteilt werden:

- a) Bei den gebräuchlichsten Kontrastmitteln handelt es sich um einen freien Farbstoff, der sich in den unterschiedlichen Kompartimenten verteilt. Diese Kontrastmittel werden dazu verwendet, um Veränderungen im Blutvolumen, in der Perfusion bzw. im Blutfluss der Angiogenese darzustellen (Weissleder, 2002). Ein Beispiel dafür ist das Indocyaningrün (ICG), welches für klinische Studien zugelassen ist (Poellinger et al., 2012).
- b) Bei der Gruppe der zielgerichteten Kontrastmittel handelt es sich um Farbstoffe, die an Moleküle gebunden werden. Diese können speziell z. B. nur an den entsprechenden Rezeptoren binden. Abhängig vom Ursprung des Kontrastmittels kann das Hintergrundrauschen recht hoch sein (Weissleder, 2002).
- c) Aktivierbare Kontrastmittel reduzieren das Verhältnis von Signal- und Hintergrundrauschen. Diese Kontrastmittel können nur detektiert werden, wenn sie mit ihrem Substrat interagieren. Beispiele für Fluoreszenzlöschende NIR-Fluorochrome sind z. B. durch Matrix-Metalloprotease 2 (MMP 2), Cathepsin oder Caspasen aktivierbare Kontrastmittel (Weissleder et al., 1999; Bremer et al., 2001).

2.2.6 Integrine als Zielstrukturen für die molekulare Bildgebung

Integrine sind geeignete Moleküle für die Bildgebung und Darstellung von Tumoren (Sipkins et al., 1998).

Bei Integrinen handelt es sich um heterodimere Transmembranproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen (Pschyrembel, 2002f), die je nach Funktion variieren kann (Arnaout et al., 2007). Sie dienen als Adaptorproteine zwischen Zelle und den Makromolekülen der Extrazellulären Matrix und verankern die Zelle fest im Bindegewebe (Arnaout et al., 2007). Neben ihren physiologischen Funktionen (Pschyrembel, 2002f; Arnaout et al., 2007) sind sie jedoch auch in einigen Tumoren überexprimiert (Keereweer et al., 2011; Naber et al., 2011) und gehen mit einer schlechten Prognose für den Patienten einher (Desgrosellier und Cheresch, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Tumoren mit einer bestimmten Integrin-Expression deutlich häufiger Metastasen ausbilden als Tumoren ohne diese Integrine (Pawelek und Chakraborty, 2008). Die Überexpression von Integrin-Rezeptoren macht man sich in der zielgerichteten Diagnostik (Solomon et al., 2011) und Therapie zunutze (Liu et al., 2011; van der Horst et al., 2011). Es konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass gegen Integrine zielgerichtete Therapien wesentlich effizienter wirkten und deutlich weniger Nebenwirkungen aufwiesen als die Kontrollsubstanzen (Liu et al., 2011). Aufgrund dessen sind Integrine vielversprechende *Targets* in der molekularen Diagnostik und Krebstherapie.

3 Arbeitshypothese und Strategie des Dissertationsprojektes

Kolorektale Tumoren gehören zu der zweithäufigsten krebsbedingten Todesursache in Europa (Ferlay et al., 2010). Ein großer Anteil der Krebsvorstufen wird bei der Vorsorge nicht entdeckt (van Rijn et al., 2006), weshalb innovative Diagnostikmöglichkeiten notwendig sind (Banks et al., 2011; Coe und Wallace, 2011).

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass spezifische NIR-Kontrastmittel in Kombination mit Fluoreszenz unterstützter Koloskopie ein vielversprechendes Diagnostikverfahren darstellen. Die gerichteten Kontrastmittel sollen sich im Tumor anreichern und somit unauffällige Krebsvorstufen im Nah-Infrarotlicht (NIR) sichtbar machen.

Zur Validierung human- und krebsspezifischer Kontrastmittel werden vor allem geeignete orthotope Tumormodelle gebraucht.

Das Ziel und die Strategie des Dissertationsprojektes lauten deshalb:

1. Etablierung eines orthotopen kolorektalen Tumormodells in der Nacktmaus mit humanen kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinien,
2. minimalinvasive Überwachung des Tumorwachstums mittels starrem Kleintier-Endoskop und Biolumineszenz und
3. Einsatz des orthotopen Tumormodells für die NIR-Bildgebung mit spezifischen Kontrastmitteln.

Es soll ein Modell entwickelt werden, welches die klinische Erkrankung des humanen Patienten widerspiegelt. Dieses Tumormodell soll möglichst tierschonend und mit einer geringen Anzahl an Versuchstieren etabliert werden. Unter Verwendung eines spezifischen Integrin-NIR-Kontrastmittels soll geklärt werden, ob sich dieses Tumormodell zur Validierung zielgerichteter, fluoreszenter NIR-Kontrastmittel eignet.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Biologisches Material

4.1.1.1 Eukaryotische Zellen

Für den experimentellen Anteil dieser Dissertation wurden drei verschiedene Zelllinien verwendet. Die verwendeten Zelllinien stammten von der Firma Caliper Life Science.

Colo 205-luc2-Bioware® Ultra Zellen (Colo 205-Luc) wurden für die *in vitro*- und *in vivo*-Versuche verwendet. Colo 205-Luc sind humane kolorektale Adenokarzinomzellen, die als Suspensionszellen wachsen und aus der Aszitesflüssigkeit eines männlichen, 70-jährigen Patienten gewonnen wurden, die kolorektale Tumorzellen enthielt. Sie zeigen epitheliale Morphologie und wirken im Tiermodell tumorigen.

Des Weiteren wurden HT-29-luc D6- Bioware® Zellen (HT 29-Luc) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine humane, adhärent wachsende Adenokarzinomzelllinie kolorektalen Ursprungs einer weiblichen Patientin. Die Zellen besitzen eine tumorigene Tendenz.

HCT 116-luc2- Bioware® Ultra Zellen (HCT 116-Luc) wurden als dritte Zelllinie für die *in vitro*- und *in vivo*-Studien verwendet. Hierbei handelt es sich um eine kolorektale Adenokarzinomzelllinie aus einem erwachsenen, männlichen Patienten. Auch sie zeigt eine epitheliale Morphologie, wächst adhärent und weist im Tiermodell eine Tumorigenität auf.

Alle Tumorzellen wurden von der Firma Caliper mit einem Luciferase-Gen (pGL4) über einen Virusvektor transduziert.

4.1.2 Zellkulturmedien und deren Zusätze

- RPMI: Zellkulturmedium für Colo 205 Zellen. Bei Vollmedium Hinzugabe von 10 % Fetalem Kälber-Serum (v/v; FCS Biochrom) und 1 % Penicillin (10^4 E/ml)/ Streptomycin (10^4 µg/ml; v/v; Biochrom)
- McCoy-Medium w/o Glutamin: Zellkulturmedium für HT 29-Luc und HCT 116-Luc- Zellen. Zusätzlich erfolgt noch eine Zugabe von 10 % FCS (Biochrom), 1 % Glutamax (v/v) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (v/v; Biochrom).
- PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} , 1x (Gibco BRL, PAA Laboratories)
- Trypsin / EDTA (Biochrom KG)
- FCS (Biochrom KG)
- Penicillin/ Streptomycin 10.000 U bzw. 10 mg/ml (Biochrom)
- Glutamax (Invitrogen)

4.1.3 Antikörper

Alle Antikörper wurden den jeweiligen Angaben des Herstellers entsprechend aufbewahrt.

Primäre Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie (IHC)

Antikörper	Spezies	Klonalität	Firma	Verdünnung in der IHC
KI67 Dako	Maus monoklonal	IgG1	DAKO	-
Pan-Zytokeratin 8018	Maus monoklonal	IgG1	Santa Cruz	1:50
CD31 (550274)	Ratte monoklonal	IgG2a, κ	BD Pharmingen	1:50

Sekundäre Antikörper

GAM-POD: Ziege Anti-Maus IgG, Peroxidase-konjugiert (800 µg/ml; Dianova)

4.1.4 Kits

ABC-Kit Vectastain PR-6100	Vector Laboratories
Animal Research Kit	DAKO

4.1.5 Puffer und Lösungen

PBS (pH 7,2)	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Glucoselösung 10 %	100 ml Leitungswasser+10 g Glucose

4.1.6 Chemikalien/Reagenzien

AEC Chromogen Substrat	GibcoBRL
Bepanthen Augensalbe	Bayer
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma
Ethanol absolut	Merck
Hämatoxylin	Vector Laboratories
Isofluran	Baxter
Isopropanol	Merck
Kaisers Microscopy Glyceringelatine	Merck
Ketamin 10 %	WDT
D-Luciferin	Caliper
Natriumchlorid	Merck, Sigma
PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	GibcoBRL
Paraformaldehyd	Merck
Rompun 2 %	Bayer
Temgesic	Essex Chemie AG
Wasser steril, doppelt destilliert	Braun
Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂ , 30 %	Merck

4.1.7 NIR-Kontrastmittel

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation kamen folgende Kontrastmittel zum Einsatz, die zur Vereinfachung in Tabelle 2 aufgelistet sind.

Tabelle 2: Darstellung der verwendeten NIR-Kontrastmittel

Gezeigt werden die Emissions- (E-Max.) und Absorptionsmaxima (A-Max.) sowie die Farbstoffeigenschaften

Farbstoff	E- Max.	A-Max.	Farbstoffeigenschaften
IDCC	646 nm	664 nm	Unspezifischer Farbstoff
CG8	646 nm	664 nm	An Somatostatin gekoppelt
IntegriSense680	693 nm	675 +/-5 nm	$\alpha_v\beta_3$ Integrin-Antagonist
ProSense750	750 nm	780 +/-10 nm	Durch Cathepsin aktivierbarer Ligand

4.1.8 Sonstige Materialien

Materialien	Firma
DAKO Cytometion Pen	Dako Cytometion
Deckgläser 20 x 26 mm ²	Superior
Deckgläser 22 x 22 mm ²	Menzel-Gläser
Digitalkamera Nikon Coolpix 4500	Nikon
Combitips plus 5 ml	Eppendorf
Einmalküvetten	Sarstedt
Einmalskalpelle	Feather
Einmalspritzen 20 ml	Braun
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml, Safe Lock)	Eppendorf
Filter 0,22 μ m	Millipore
Gewebekulturflaschen: 50, 250, 750 ml	Falcon
Gewebekulturplatten: 6 well, 24 well	Falcon
Gewebekulturschalen (10 cm Durchmesser)	Falcon
Gewebekulturschalen mit Raster (3,5 cm)	Nunc
Gewebekulturschalen mit Raster (13,5 cm)	Falcon
Hämacytometer	Neubauer

Material und Methoden

Insulinspritzen Micro-Fine 0,3 ml	BD
Kryoröhrchen (2 ml)	Nalgene
Mikroliter Spritze (50 µl)	Hamilton
Nahtmaterial 5-0 (70 cm)	Ethicon
OP-Abdecktuch, 2-lagig (75 x 90 cm ²)	Lohmann&Reuscher
OP-Besteck	VWR
Optilux-Platten (schwarz, 96 well)	BD
Parafilm	Menasha
Pasteurpipetten	Brand

4.1.9 Bildgebende Untersuchungsgeräte

Die im Rahmen dieser Dissertation angewandten bildgebenden Untersuchungsgeräte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Bildgebende Geräte

Darstellung der Geräte, ihre Typenbezeichnung, ihre technischen Eigenschaften sowie deren Absorptions- und Emissionsspektren

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller	Eigenschaften/ Verwendung	Kanäle (Absorption/ Emission)
Faserendoskop	FCM1000	Cellvizio	NIR-Laser-Sonde	680 - 900 nm 660 nm
Endoskop	Coloview-System Mainz	Storz	minimalinvasive Untersuchung	Weißlicht
IVIS	IVIS 200	Caliper	BLI / Fluoreszenz	400 - 900 nm
Odyssey	Odyssey CLx	LI-COR Biosciences	NIR-Scanner; Untersuchung von Zellen, histologischen Präparaten, Organen	685 / 720 nm 785 / 820 nm
Pearl	Pearl Impulse	LI-COR Biosciences	NIR zur <i>in vivo</i> - Untersuchung von Versuchstieren	685 / 720 nm 785 / 820 nm

4.1.10 Software der Bildgebungsgeräte

Die Auswertung der aus den bildgebenden Experimenten gewonnenen Daten erfolgte mit der jeweiligen zu den Geräten gehörigen Software.

- Ivis Biolumineszenz Software „Living 4.0“
- Mauna Kea Software „Leica FCM1000 IC, Version 3.7“
- Odyssey-Software 2.1
- Sonstige Software: Excel 2003, Graph Pad Prism 4.0

4.1.11 Geräte für die Zellkultur

Zur Vereinfachung wurden die Geräte für die Zellkultur in Tabelle 4 aufgelistet. Darin enthalten sind die jeweilige Bezeichnung des Gerätes und der Hersteller.

Tabelle 4: Sonstige Geräte

Geräte (Bezeichnung)	Hersteller
Sterile Werkbank	Bio Rad Consord
Mikroskop	Carl Zeiss
Tischzentrifuge	Beckmann/Eppendorf
Brutschrank für Gewebezellkultur	Labotec
Grobwaage	Kern
Magnetrührer	Variomag
Wasserbäder	Julabo
Vortex Relax Control	Heidolph
Autoclav Jumbo Comp LS	Webeco
Trockenschrank	Memmert

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

4.2.1.1 Kultivierung und Passagieren

Alle Zelllinien wurden bei 37°C kultiviert, wobei die Luft 5 % CO₂ enthielt und die Luftfeuchtigkeit 80 % betrug. Die Medien wurden alle zwei bis drei Tage gewechselt.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 70-80 % herangezogen. Zur Zellaussaat wurden die Zellen zunächst mit PBS (ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (1-2 ml/25 cm² Zellkulturflasche) bei 37°C für zwei bis fünf Minuten inkubiert. Das Abstoppen der Trypsin-Wirkung erfolgte mit dem entsprechenden Zellkulturmedium inklusive 10 % FCS. Im Anschluss folgte die Homogenisierung der Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. 1/5 bis 1/10 der homogenen Zellsuspension wurden dann in eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

4.2.1.2 Einfrieren und Auftauen

Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in einem Gemisch von 90 % FCS und 10 % DMSO eingefroren und anschließend in Flüssigstickstoff gelagert. Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Die Zellen wurden mit Medium aufgenommen, in ein 15 ml Falcon überführt und bei 180 x g fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das dabei entstandene Zellpellet wurde in 10 ml 10 % FCS-haltigem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

24 Stunden nach der oben beschriebenen Kultivierung wurde erneut ein Mediumwechsel durchgeführt, um die toten, nicht adhärenen Zellen zu entfernen.

4.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zellzahlbestimmungen von adhärenen Zellkulturen sowie von Suspensionszellen wurden mittels Trypanblau-Färbung und der Neubauer Zählkammer durchgeführt.

Die ermittelte Zellzahl wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der Großquadrate}} = \text{Zellzahl/ml Medium}$$

4.2.1.4 Messung der Luciferaseaktivität *in vitro*

Die vom Hersteller angegebene Luciferaseaktivität der Zellen über die Zeit wurde *in vitro*, vor der Implantation in das Versuchstier, mittels einer Verdünnungsreihe auf schwarzen Optilux Platten von BD überprüft. Hierfür wurden verschiedene Zellzahlen, wie in Abbildung 1 dargestellt, ausgesät und deren Luciferaseaktivität über einen Zeitraum von 60 Minuten gemessen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10.000	10.000	8.000	8.000	6.000	6.000	4.000	4.000	2.000	2.000	10.000	Medium
B	10.000	10.000	8.000	8.000	6.000	6.000	4.000	4.000	2.000	2.000	10.000	Medium
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Abbildung 1: Schema zur Aussaat der Zellen auf einer schwarzen Optilux Platte zur Überprüfung der Luciferaseaktivität

Die Zellen wurden in absteigender Konzentration von Spalte eins bis zwölf in Quadruplikaten ausgesät. Spalte elf und zwölf dienten als Kontrolle. In Spalte elf befanden sich nur Zellen und in Spalte zwölf nur Medium, das D-Luciferin enthält. Die Luciferaseaktivität der Zellen wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten alle 10 Minuten gemessen. Die Überprüfung fand bei den drei verwendeten Zelllinien auf separaten Platten in drei unabhängigen Experimenten statt.

Nach Aussaat der Zellen wurden sie über 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und die Anzahl der Photonen/Sekunde/Zelle wurde am nächsten Tag ermittelt. Dafür wurde unmittelbar vor der Messung das Medium von den Zellen abgesaugt,

100 μ l der D-Luciferin-Lösung (150 μ g/ml in Medium) pro well auf die Zellen gegeben und sofort gemessen. Zur Kontrolle befanden sich in Spalte elf Zellen mit Medium ohne D-Luciferin und in Spalte zwölf lediglich D-Luciferin-Lösung ohne Zellen.

Die Messung erfolgte mit dem IVIS 200 Lumina Imaging System. Die Exposition erfolgte in sechs Segmenten (alle 10 Minuten) für eine Sekunde und für zehn Sekunden. Die Auswertung der Photonen/Sekunde/Zelle erfolgte mittels der Software "Living Image 4.0". Hierbei wurde ein Grid über die 96 well-Platte gelegt, die totale Photonenzahl pro well ermittelt und die Photonen pro Sekunde pro Zelle berechnet. Die Werte der Kontrollspalten wurden als Hintergrundsignal gewertet und von den übrigen gemessenen Biolumineszenzsignalen der anderen wells abgezogen. Dadurch konnte die emittierte Photonenzahl pro Zelle in Abhängigkeit zur Zeit ermittelt werden. Diese Messung wurde pro Zelllinie an drei unterschiedlichen Tagen wiederholt, um die Verlässlichkeit der Daten zu verifizieren.

4.2.2 Tierexperimentelle Methoden

Die Haltung der Tiere und die Experimente erfolgten in der Tierhaltung im Campus Virchow Klinikum der Charité Universitätsmedizin Berlin.

4.2.2.1 Versuchstiere und Haltung

Als Modell für das Studium des Tumorwachstums wurden Nacktmäuse (NMRI nu/nu Mäuse der Firma Charles River) im Alter von 3-6 Monaten verwendet. Die Nahrung der Tiere bestand aus Sniff-Trockenfutterpellets und Leitungswasser. Vier Wochen nach Versuchsbeginn wurden die Tiere auf ein manganarmes Alleinfuttermittel „Sonderdiät C 1039 Manganarme Diät“ der Firma Altromin umgestellt. Die Tiere unterlagen während der gesamten Versuchsdauer einem 12-stündigen Tages- bzw. Nachtrhythmus.

4.2.2.2 *Subcutane* Implantation

HT 29-Luc-Zellen und HCT 116-Luc-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80 % in 13,5 cm² großen Zellkulturschalen kultiviert. Die semiadhärenten

Suspensionszellen Colo 205-Luc wurden ähnlich behandelt. Hatten die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht, wurde das Medium abpipettiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen abtrypsiniert, gezählt und auf 1×10^6 Zellen pro ml aufgeteilt. Diese Menge wurde dann in sterile Eppendorfgeläße aufgeteilt und im Anschluss bei $180 \times g$ über fünf Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit $50 \mu\text{l}$ des entsprechenden FCS-freien Mediums resuspendiert. In vielen Publikationen wird die Transplantation von Zellen mit PBS durchgeführt. Aufgrund der langjährigen, besseren Erfahrung in der Arbeitsgruppe von Herrn Grötzinger wurden die Zellen in FCS-freiem Medium transplantiert.

Die Zellen wurden bis zur orthotopen Implantation auf Eis gelagert. Unmittelbar vor der Implantation wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert, mit einer Insulinspritze aufgezogen und dem Versuchstier *subcutan* in die Flanken implantiert.

4.2.2.3 Vorbereitung zur orthotopen Implantation

Die Vorbereitung zur orthotopen Implantation glich der *subcutanen* Implantation (siehe 4.2.2.2).

4.2.2.4 Implantation der Tumorzellen ins Kolon

Zur Verringerung des postoperativen Infektionsrisikos wurden die Tiere vor der Operation in einen neuen und sauberen Käfig gesetzt, um den Keimdruck im Käfig zu senken. Die Tiere begannen sofort mit dem Markieren des neuen Käfigs, indem sie vermehrt Kot absetzten. Dadurch war das *Colon descendens* entleert, was die Operation erleichterte.

Vor der Operation erhielten die Tiere $0,05 \text{ mg/kg}$ Buprenorphin *subcutan* injiziert. Die Tiere wurden durch eine *intra peritoneale* Injektion von Ketamin (80 mg/kg) und Xylazin (16 mg/kg) narkotisiert. Die Narkosetiefe konnte durch Kneifen in die hinteren Zehen festgestellt werden. Im Falle des Toleranzstadiums 2/3 nach Guedel (Frey und Löscher, 2002) konnte keine Abwehrreaktion von Seiten des Tieres beobachtet werden. Die Maus wurde aus dem Käfig entnommen und ihre Augen zum Schutz vor dem Austrocknen mit Bepanthensalbe benetzt. Unter der Sterilbank wurden die Tiere auf einer Wärmematte mittels Klebestreifen fixiert. Der Operationsbereich wurde chirurgisch vorbereitet, d. h. zunächst wurde das

Abdomen mit warmem Wasser und Seife gereinigt und mit einem sterilen Tupfer abgetrocknet. Im Anschluss wurde die im Operationsfeld befindliche Haut mit 70 % Isopropanol benetzt und gewartet, bis die Fläche vollständig getrocknet war. Das Abdomen wurde über die *Linea alba* im Bereich der Beckenhöhle und des *caudalen* Abdomens eröffnet. Das *Peritoneum* wurde durch leichten Zug mit der Pinzette angehoben und vorsichtig mit der Metzenbaumschere durchstoßen. Beim weiteren Eröffnen wurde das Bauchfell angezogen, um der Verletzung innerer Organe vorzubeugen.

War das *Abdomen* eröffnet, wurde das *Colon descendens* aufgesucht. Befand sich kein Kot mehr im Enddarm, wurde ein mit Gleitgel benetzter 16 G Venenkatheter in den Anus eingeführt. Dieser wurde soweit vorgeschoben, dass er durch die Darmwand sichtbar wurde. Der eingeführte Venenkatheter diente als Führungsschiene, der es ermöglichte, bei der Injektion zu fühlen, ob sich die Injektionsnadel noch in der Darmwand oder schon innerhalb des Lumens befand.

Das *Colon descendens* wurde nun vorsichtig mit einer Pinzette extraperitoneal gelagert. Mittels einer Einweginsulinspritze wurden die kolorektalen Tumorzellen humanen Ursprungs in die Kolonwand injiziert.

Tiere, bei denen der Austritt von Tumorzellen in die Bauchhöhle zu beobachten war, wurden noch intraoperativ durch *zervikale Dislokation* getötet. Nach erfolgreicher Injektion wurde der Venenkatheter vorsichtig entfernt und das Kolon in die Bauchhöhle reponiert. Im Anschluss wurde die Bauchdecke mit Vicryl 5-0 genäht und die Haut mittels Hautklammern verschlossen.

4.2.2.5 Postoperatives klinisches Management der Versuchstiere

Postoperativ erfolgte die Lagerung der Mäuse auf einer Wärmematte. Die *Cornea* der Tiere wurde erneut mit Bepanthenalbe benetzt.

In den drei nach der Operation folgenden Tagen wurde das Gewicht kontrolliert und den Tieren Buprenorphin in einer Dosierung von 0,05-2,5 mg/kg zwei- bis dreimal täglich verabreicht. Kam es in den ersten Tagen zu einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes einzelner Tiere, so wurden sie durch Maßnahmen wie Injektion von angewärmter Glucoselösung und mit warmem Wasser gefüllten

Einmalhandschuhen unterstützt. Die Handschuhe fungierten als „Wärmflaschen“, so dass die Tiere nur noch wenig Energie aufwenden mussten, um ihre Körpertemperatur aufrecht zu erhalten.

4.2.3 Bildgebende Verfahren

4.2.3.1 Endoskopische Untersuchung der Tiere

Die Koloskopie der Tiere wurde einmal wöchentlich durchgeführt. Zur Vorbereitung auf den bevorstehenden Eingriff wurde den Tieren ca. 12 Stunden zuvor das Futter aus dem Käfig entnommen. Zusätzlich zu dem normalen Trinkwasser erhielten die Tiere eine Glucoselösung (10 %) aus einer Trinkflasche, zu welcher sie *ad libitum* Zugang hatten. Eine Stunde vor dem Eingriff wurden die Tiere in einen neuen Käfig gesetzt, um den Kotabsatz zu forcieren.

Die Koloskopie wurde unter Isoflurannarkose durchgeführt. Hierbei lagen die Tiere auf einer 37°C warmen Untersuchungsplatte (Abbildung 2).

Bei der Koloskopie wurde der narkotisierten Maus die starre Optik des "Koloskopiesets Mainz" der Firma Storz rektal eingeführt. Durch den angeschlossenen Bildschirm war es dem Untersuchenden möglich, sich einen Überblick über die anatomischen und pathologischen Gegebenheiten im *Rectum* und *Colon descendens* zu verschaffen. Durch parallel stattfindende Videoaufzeichnungen bzw. Fotodokumentationen konnten die Ergebnisse aufgenommen und später beurteilt werden, so dass die Tiere nicht unnötig lange in Narkose bleiben mussten.



Abbildung 2: Isoflurananlage zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose
 Nach der Einleitung der Narkose (A, B) wurden die Tiere an speziell für Mäuse angefertigte Masken (C) gelegt, über welche die Narkose weiter aufrecht erhalten wurde. Die Mäuse befanden sich während der Untersuchung auf einer beheizbaren Platte (C).

4.2.3.2 Versuchsablauf

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstum der orthotop implantierten Tumorzellen im Bereich des *Colon descendens* untersucht. Der Ablauf der Versuche ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

Der Tag der Zellinjektion wurde als Tag 0 definiert; der Endpunkt war Tag 35. Die Tiere wurden einmal wöchentlich mittels Biolumineszenz und Koloskopie untersucht. Die Tiere wurden täglich gewogen und ihr klinischer Allgemeinzustand zweimal täglich bewertet. Tiere, die vor Tag 35 eines der Abbruchkriterien (Tabelle 11) erreicht hatten, wurden unter Isoflurannarkose durch *zervikale Dislokation* vorzeitig getötet. Nach Ablauf der Versuchsdauer erfolgte die Sektion inklusive Organentnahme.

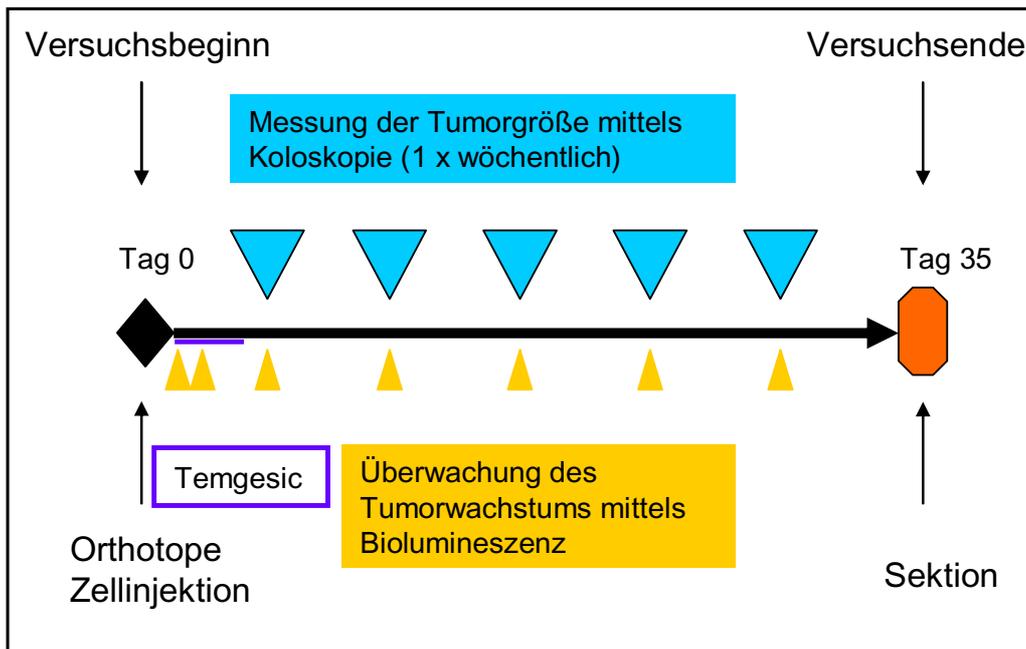


Abbildung 3: Schematischer Versuchsablauf nach orthotoper Zellinjektion

Nach Zellimplantation an Tag 0 erfolgte eine Schmerzbehandlung mit Temgesic über 3 Tage. 24 h und 48 h nach der Implantation wurden Biolumineszenz-Aufnahmen angefertigt. Anschließend wurde das Tumorwachstum einmal wöchentlich mittels Endoskopie und Biolumineszenz überprüft. Am Tag 35 erfolgte die Sektion.

4.2.3.3 Biolumineszenz-Bildgebung

Zur Erfassung der Biolumineszenz wurde das Gerät IVIS Lumina der Firma Caliper verwendet. Dieses Gerät beinhaltet eine gekühlte CCD Kamera (-96°C) mit einem Bildverstärker. Ferner war es mit einer computergestützten Bildanalyse und Bildverarbeitungssoftware verbunden. Die hochauflösende Kamera erfasste das Lichtspektrum von 350 nm bis 850 nm und war somit für die Darstellung des bei der Luciferin-Luciferase-Reaktion entstehenden Lichtes mit der Wellenlänge von 562 nm sehr gut geeignet.

Die drei verwendeten Tumorzelllinien exprimierten stabil das Luciferase-Gen.

Zur Biolumineszenzmessung *in vivo* wurde den Tieren zehn Minuten vor der Messung *intra peritoneal* D-Luciferin in einer Dosis von 150 mg/kg appliziert. Im Anschluss wurden die Tiere in die Narkosebox gesetzt. Die Narkosebox wurde zur Narkoseeinleitung mit einem 2 %igen Isofluran-Sauerstoffgemisch geflutet. Waren die Tiere vollständig anästhesiert, wurden sie zur Messung in das IVIS Biolumineszenzgerät gelegt. Die Aufrechterhaltung der Narkose während der Biolumineszenz-Messung erfolgte über die sich in dem IVIS befindlichen „nose cones“ (Abbildung 2). In diesem Gerät befand sich eine eingebaute Wärmematte, welche während der gesamten Messung eine Temperatur von 37°C hielt. Zuerst wurden zur Identifikation und Darstellung der Lagerung Hellfeld-Aufnahmen angefertigt. Sofort im Anschluss erfolgte die Biolumineszenzaufnahme zur Erfassung des Biolumineszenz-Signales des Tumors. Hierbei wurde die Emission gemessen. Die Aufnahmezeit der Emission lag, je nach Tumoridentität, zwischen 10 und 300 Sekunden.

Die Quantifizierung der Biolumineszenz erfolgte über die zum Gerät gehörige Software (Living Image) und wurde in Photonen pro Sekunde angegeben. Die Auswertung konnte nach abgeschlossener Untersuchung der Tiere erfolgen. So mussten die Tiere nicht unnötig lange in Narkose bleiben. Hierbei wurde die Lichtemission der Tumorzellen in Photonen/Sekunde/Tier innerhalb einer definierten „Region of Interest“ (ROI) durch Subtraktion des Hintergrundsignals bestimmt.

Die Biolumineszenzmessung wurde in den ersten beiden Tagen nach der Operation durchgeführt und erfolgte anschließend einmal wöchentlich.

4.2.3.4 Erstellung einer *in vivo*-Kinetik

Um den optimalen Zeitpunkt für eine *in vivo*-BLI-Bildgebung zu bestimmen, wurde eine Maus mit einem *subcutanen* HCT 116-Luc-Tumor verwendet. Dies diente der Bestimmung des optimalen Zeitpunkts für die Bildgebung nach i.p. Verabreichung des Luciferins. Zur Biolumineszenzmessung *in vivo* wurde dem Tier unmittelbar vor der Messung intraperitoneal D-Luciferin in einer Dosis von 150 mg/kg appliziert. Danach wurde es, wie unter 4.2.3.3 beschrieben, anästhesiert und die Messung der Photonenausbeute wurde gestartet. Bei der Messung wurde ebenfalls eine Kinetik mit 6 Segmenten gewählt, wobei alle 10 Minuten je eine neue Messung, mit einer gemessenen Emissionszeit von 1 Sekunde und 10 Sekunden, vorgenommen wurde. Die Auswertung der Photonen/Sekunde/Tier erfolgte mittels der Software "Living Image".

4.2.3.5 Nah-Infrarotfluoreszenz-Bildgebung

Zusätzlich zur Endoskopie und Biolumineszenz sollte das Tumormodell in der Nah-Infrarotfluoreszenz-Bildgebung eingesetzt werden. Zielstellung war es, die implantierten kolorektalen Karzinome mittels eines Nah-Infrarot (NIR) gekoppelten Liganden detektieren zu können.

Um die vom Gastrointestinaltrakt ausgehende Fluoreszenz als ein spezifisches Signal werten zu können, musste zunächst die Eigenfluoreszenz im Bereich des Magen-Darmtraktes bestimmt werden. In der Literatur wird beschrieben, dass pflanzliche Nahrungsbestandteile in Futtermitteln im NIR-Spektrum eine starke Eigenfluoreszenz aufweisen (Kwon et al., 2012). Diese wurde in einem Vorversuch zur Autofluoreszenz bestimmt.

4.2.3.6 Vorversuch zur Autofluoreszenz

Für den Vorversuch wurden neun Tiere in drei Gruppen aufgeteilt, so dass jede Gruppe aus drei Tieren bestand.

Die Tiere der Gruppe eins („F 1“) erhielten über einen Zeitraum von fünf Tagen normales Erhaltungsfutter und Trinkwasser *ad libitum*. Die Gruppe zwei („F 2“) und drei („F 3“) erhielten über denselben Zeitraum ein spezielles Chlorophyll- bzw. manganfreies Diätfutter der Firma Sniff („F 2“) bzw. Altromin („F 3“) und Wasser *ad libitum*. Eine Darstellung der Gruppen ist in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Einteilung der Gruppen im Vorversuch zur Beurteilung der Autofluoreszenz

Gruppe	Futter	Wasser	Verabreichungsdauer
F 1	Normalfutter (Sniff)	Ad libitum	5 Tage
F 2	Chlorophyll free Experimentalfutter (Sniff)	Ad libitum	5 Tage
F 3	Sonderdiät C 1039 Manganarme Diät (Altromin)	Ad libitum	5 Tage

Die Tiere wurden täglich gewogen und mit Hilfe des „LI-COR Pearl Imagers“ im 700 nm Kanal untersucht. Für den Untersuchungszeitraum von zwei Minuten wurden die Tiere mit Hilfe von Isoflurangas narkotisiert. Die Bildaufnahmen wurden immer von der linken Körperseite des Tieres getätigt, da aufgrund der Magennähe zur linken Bauchwand dort das stärkste Signal zu erwarten war.

Die Auswertung des Fluoreszenzsignales erfolgte nach dem Versuch an der gerätespezifischen Software.

Hierfür wurde der Kontrast der Fluoreszenzsignale im Magen im Vergleich zum Hintergrund ermittelt.

4.2.3.7 Vorversuch: NIR-Kontrastmittel für das NIR-Faserendoskop

Zur Ermittlung des optimalen Kontrastmittels für das Mauna Kea FCM1000-Faserendoskop wurde zunächst ein Vorversuch durchgeführt, in dem zunächst acht gesunde Mäuse verwendet wurden. Diesen Mäusen wurden verschiedene NIR-Kontrastmittel jeweils in einer Dosierung von 80 mmol/kg Körpergewicht i.v. verabreicht. Eine Maus erhielt als „Kontrolle“ PBS injiziert. Jeder Farbstoff wurde je zwei Mäusen injiziert. Ausnahme bildete hier der Farbstoff Prosense750,

welcher nur einer Maus injiziert wurde, da eine Maus unter der Injektion verstarb. Verabreicht wurden IDCC, CG8, IntegriSense680 und ProSense750. Die Aufnahmen und Messungen wurden 10 Minuten und 24 Stunden *post injectionem* durchgeführt. Das Faserendoskop wurde den Tieren unter Isoflurannarkose rektal eingeführt. Alle Aufnahmen wurden mit einem *Threshold* von 1209 bis 0 *Arbitrary Digital Units* (ADU) ausgewertet (Ignat et al., 2009).

4.2.3.8 Integrin-Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop

Das FCM1000-Faserendoskop ist explizit für das Imaging von Kleintieren im Nah-Infrarotbereich hergestellt worden. Bei diesem Faserendoskop handelt es sich um ein konfokales Lasermikroskop, mit welchem feingewebliche Strukturen *in vivo* angeschaut und bewertet werden können (Martirosyan et al., 2012). Dieses Faserendoskop wurde von der Firma Mauna Kea hergestellt. 24 h vor dem Einsatz des Faserendoskopes wurde den Tieren 100 μ l IntegriSense 680, was einer Konzentration von 2 nmol/ Maus entspricht, verabreicht.

4.2.3.9 *Ex vivo* Einsatz des NIR-Faserendoskopes

Im Anschluss an die zuvor beschriebenen bildgebenden Verfahren wurden *ex vivo* Untersuchungen an den Tieren mittels des NIR-Faserendoskopes durchgeführt. Hierfür wurde das unter Isofluran narkotisierte Tier durch *zervikale Dislokation* getötet, das Abdomen eröffnet und das Kolon entnommen. Der Darm wurde vorsichtig vom Kolon in *cranialer* Richtung *longitudinal* eröffnet, wenn möglich, im Bereich des mesenterialen Ansatzes. Das Faserendoskop wurde unter visueller Kontrolle über die Mukosa geführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Faserendoskop zunächst auf einem gesunden Mukosaareal platziert war. Es wurde von *cranial* nach *caudal* über den Darm bewegt, so dass es über den Tumor geführt wurde, bevor es zum Ende der Aufnahme wieder auf einem gesunden Mukosaareal endete. Zur Veranschaulichung ist die Untersuchungsmethode in Abbildung 4 dargestellt. Das Faserendoskop nahm dabei Fluoreszenzsignale auf, die der Untersucher in Form von aufgenommenen Videos auswerten konnte.

Bei der Auswertung wurde das Augenmerk auf die feingeweblichen Veränderungen, aber auch auf die Verteilung von IntegriSense680 über den untersuchten Ab-

schnitt gelegt. Die hierbei sichtbaren Veränderungen konnten mittels gerätespezifischer Software in Diagrammen dargestellt werden.

Dafür wurde der zuvor aufgenommene Videofilm angehalten und ein *Region of Interest* (ROI) über einen Bildausschnitt gelegt. Über dieses ROI war es nun möglich, die Konzentration des Farbstoffes in der Darmschleimhaut über den Videozeitraum und damit über den untersuchten Darmabschnitt zu messen und sichtbar zu machen.



Abbildung 4: Darstellung des *ex vivo* Einsatzes der Nah-Infrarot-Laser-Sonde
Die Sonde wird auf die gesunde Mukosa des *longitudinal* eröffneten Darmes platziert und von *cranial* nach *caudal* über das Tumorgewebe geführt.

4.2.4 *Ex vivo* Aufarbeitung

4.2.4.1 Sektion

Sechs Wochen nach Versuchsbeginn wurden die Tiere unter Isoflurannarkose durch *zervikale Dislokation* getötet. Zur Obduktion wurde eine paramediane Laparotomie vom *Processus xiphoideus* bis zum *Rectum* durchgeführt. Mittels Digitalkamera wurden Auffälligkeiten dokumentiert. Nach Inspektion aller Bauchorgane wurde das *Os pubis* durch das Einführen einer Schere parallel zum *Canalis analis* durch das *Foramen obturatorium* frakturiert und der ventrale Anteil der Beckenhöhle samt Bauchfell und Muskulatur entfernt. Das *Ligamentum duodeno-colicum* und das *Mesenterium* wurden stumpf vom Darmkanal entfernt und der

Kolon am Zäkum abgesetzt. Der Darm wurde *longitudinal* eröffnet und die *mucosale* Seite auf makroskopisch sichtbare Veränderungen hin untersucht. Der Enddarm wurde anschließend in drei Abschnitte geteilt: das *Rectum* und der *caudale* Anteil des *Colon descendens* wurden mit Kolonabschnitt eins (C 1) betitelt. Der mittlere Abschnitt des *Colon descendens* wurde als Kolonabschnitt zwei (C 2), der *craniale* Abschnitt des *Colon descendens*, inklusive des *caudalen* Bereiches des *Colon transversum* wurde als Kolonabschnitt drei (C 3) bezeichnet. Eine Einteilung des Darmes ist in Abbildung 5 dargestellt.

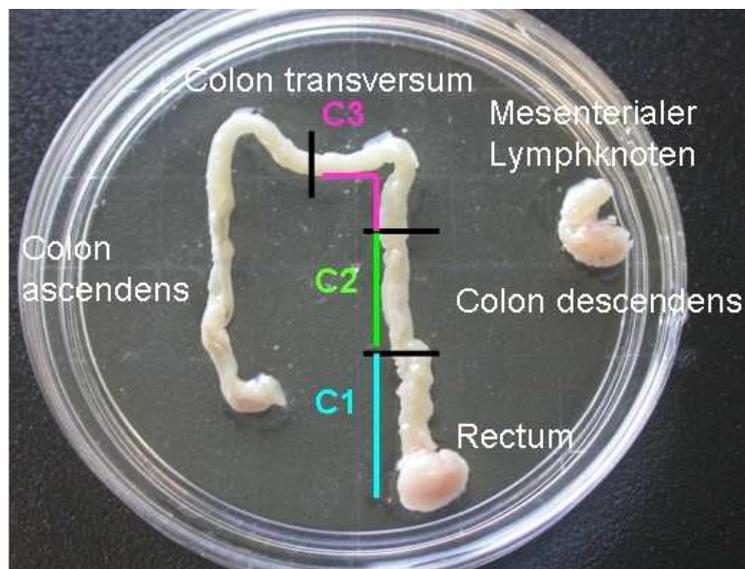


Abbildung 5: Separationsschema des Enddarmes

Das Colon wird, von *caudal* nach *cranial*, in drei Abschnitte unterteilt: C 1, C 2 und C 3.

Die Abschnitte wurden auf ein zugeschnittenes Stück Kork platziert. Dieses wurde mit *Tissue Tek* beschichtet und der jeweilige Darmabschnitt mit der Serosaseite auf den Kork gelegt. Die Mukosaseite wurde im Anschluss mit *Tissue Tek* bedeckt. *Tissue Tek* besitzt eine Elastizität, die ähnlich der des Gewebes ist, und dient sowohl zur Fixierung als auch dem Schutz vor Erwärmung bzw. vor Schäden durch das Einfrieren. Die auf Kork platzierten Darmabschnitte wurden nun in Kryogefäßen verstaut. Der Vorgang ist in Abbildung 6 dargestellt. Des Weiteren wurden mesenteriale Lymphknoten, der Leberhilus und eventuelle Metastasen

entnommen, in *Tissue Tek* eingebettet und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden alle Gewebeprobe bei -80°C gelagert.

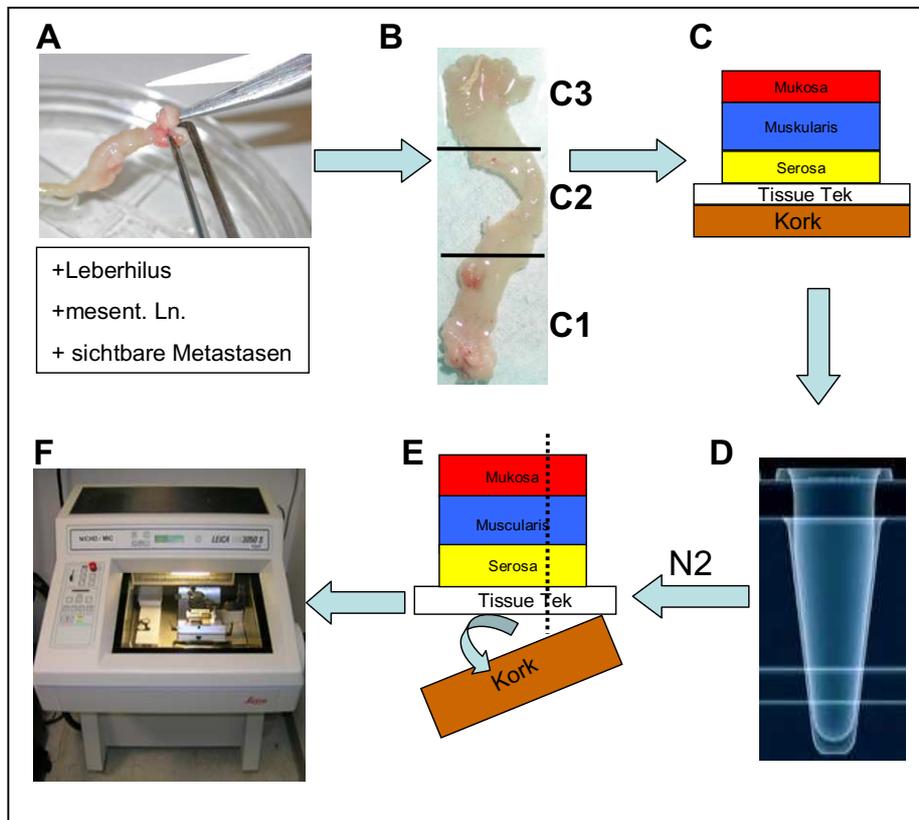


Abbildung 6: Vorgehensweise zur Herstellung der Kryopräparate

Entnahme und longitudinale Eröffnung des Enddarmes, Entnahme des Leberhilus, des mesenterialen Lymphknoten und sichtbarer Metastasen (A). Separation des Kolon in drei Abschnitte: C1, C2, C3 (B), Platzierung des Gewebes auf Kork. Anschließend erfolgte die Einlagerung in einem Kryogefäß in Flüssigstickstoff (D). Zum Herstellen der Kryoschnitte (F) wurde der Kork entfernt (E).

4.2.5 HE-Färbung und immunhistochemische Methoden

4.2.5.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die in *Tissue Tek* eingebetteten Darmabschnitte auf einem Aluminiumzylinder horizontal aufgeblockt, so dass alle drei Gewebeschichten, Serosa, Muskularis und Mukosa durch einen Schnitt ange-schnitten wurden und unter dem Mikroskop zu sehen waren. Die Gefrierschnitte

wurden in einer Dicke von 7 μm mit einem Leica CM 3050 Kryostat hergestellt. Die Gewebeschnitte wurden mit einem warmen Glasobjektträger (Super Frost/Plus) aufgenommen. Im Anschluss wurden sie gefärbt oder bei -80°C gelagert.

4.2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung handelt es sich um eine Kern-Plasma-Färbung, welche für die Routineuntersuchung von histologischen Schnitten angewendet wird. Hämalaun färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau an. Das sind insbesondere die Zellkerne mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure und das mit Ribosomen angereicherte endoplasmatische Retikulum. Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff und färbt alle azidophilen beziehungsweise basischen Strukturen rosa-rot, was vor allem zytoplasmatische Bestandteile sind. Im Färbevorgang wurden die Schnitte fünf Minuten in die Hämalaunlösung getaucht und anschließend für fünf Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Danach wurde das Wasser entfernt und die Schnitte für zehn Sekunden in der Eosinlösung gefärbt. Im Anschluss wurde das Eosin ebenfalls durch vorsichtiges Spülen mit Wasser entfernt und die Schnitte mit 37°C warmer Glyceringelantine und Deckgläschen eingedeckt.

4.2.5.3 Immunhistochemische Färbungen

Der immunhistochemische Nachweis der Proteine CD31, Ki 67 und Zytokeratin erfolgte an Gefrierschnitten mittels Immunperoxidase-Technik der Avidin-Biotin Komplex-Methode (ABC-Methode). Dafür wurden die Schnitte in eine 4 % Formalinlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss erfolgte ein dreimaliges Waschen über jeweils fünf Minuten mit PBS. Im Anschluss wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem „Dako Pen Stift“ (einer Art Fettstift) umrandet. Das Gewebe wurde zur Blockierung der endogenen Peroxydasen für 15 Minuten mit einer 0,3 %igen H_2O_2 Lösung inkubiert. Darauf folgend wurden die Schnitte wieder dreimal für 5 Minuten mit PBS gespült. Als Nächstes wurden die primären Antikörper (Tabelle 1) auf die Schnitte pipettiert. Dabei wurde von einem Volumen von 100 μl pro Schnitt ausgegangen. Auf die Negativ-

kontrolle wurde PBS anstelle des Primärantikörpers pipettiert. Die Inkubation erfolgte 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Im Anschluss wurden die nicht gebundenen Antikörper durch Spülung mit PBS entfernt. Danach wurden die Schnitte mit dem zuvor biotinylierten sekundären Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal mit PBS gewaschen. Später erfolgte die Inkubation mit dem ABC Kit für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen wurde das AEC Substrat (DAKO) auf die Schnitte pipettiert und 15-20 Minuten inkubiert. Die sich dabei entwickelnde Rotfärbung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und nach Erreichen der gewünschten Intensität mit PBS gestoppt. Alle Schnitte wurden für 3-5 Minuten mit Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend mit Wasser für 10 Minuten gebläut. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Glyceringelantine und Deckgläschen eingedeckt.

5 Ergebnisse

Zur Validierung tumorspezifischer Kontrastmittel werden geeignete orthotope kolorektale Tumormodelle gebraucht.

In der Literatur werden für diesen Zweck keine überzeugenden Tumormodelle beschrieben, so dass ein neues, xenogenes, orthotopes Tumormodell in der Nacktmaus etabliert werden sollte. Ziel war es, das Tumorstadium minimalinvasiv mittels Endoskopie und Biolumineszenz zu überwachen. Um dies zu ermöglichen, war es notwendig, Zelllinien zu verwenden, die stabil Luciferase exprimieren. Diese wurden zunächst *in vitro* charakterisiert und die Photonenausbeute bestimmt.

5.1 Charakterisierung der kolorektalen Zelllinien

Zur Etablierung eines xenogenen Tumormodells wurden drei kolorektale Zelllinien humanen Ursprungs verwendet: HT 29-Luc, Colo 205-Luc und HCT 116-Luc. Diese Zelllinien zeichnen sich dadurch aus, dass sie das Luciferase-Gen des Glühwürmchens stabil exprimieren. Dies ermöglicht, das Wachstum und die Vitalität der Zellen *in vitro* und *in vivo* zu beobachten.

Als Erstes wurde eine *in vitro*-Charakterisierung der verwendeten Zellen durchgeführt. Dies umfasste die Ermittlung der Photonenausbeute pro Zelle und die Stabilität der Luciferaseaktivität. Dafür wurden die Zellen auf einer 96 well schwarzen Optilux-Platte der Firma BD in absteigender Dichte ausgesät (Abbildung 1). Unmittelbar vor der Messung wurde das Substrat D-Luciferin hinzugegeben und die emittierten Photonen gemessen. Exemplarisch sind in Abbildung 36 (Anhang) drei Platten während der Biolumineszenzmessung gezeigt.

5.1.1 Ermittlung der Photonenausbeute

Je höher die Photonenausbeute, desto sensitiver ist die Biolumineszenz als Untersuchungsmethode. Zur Ermittlung der Photonenausbeuten wurden die Zellen wie oben beschrieben ausgesät und die Photonen/Zelle/Sekunde (P/Z/S) eine Minute nach Substratzugabe mittels Biolumineszenzmessung ermittelt. Die vom Hersteller getätigten Angaben sind vergleichend zu der eigenen gemessenen Photonenausbeute in Abbildung 7 dargestellt.

Die HT 29-Luc- und Colo 205-Luc-Zelllinien stimmten fast mit den Herstellerangaben überein. Die HCT 116-Luc-Zellen dagegen wiesen eine deutlich geringere Ausbeute als die vom Hersteller angegebene auf; zudem wurde hier die niedrigste Ausbeute innerhalb der untersuchten Zelllinien gemessen.

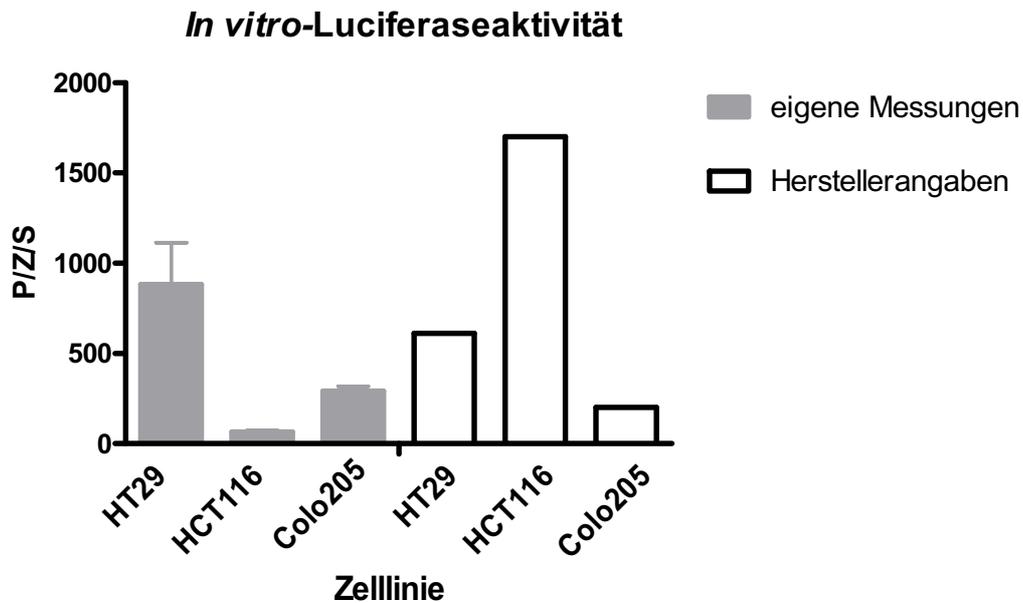


Abbildung 7: *In vitro*-Luciferaseaktivität eigens kultivierter Zellen im Vergleich zu den Herstellerangaben

Dargestellt ist die Photonenausbeute pro Zelle pro Sekunde (P/Z/S) der entsprechenden Zelllinie eine Minute nach Substratzugabe. Die dargestellten Werte sind das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte + Standardfehler.

5.1.2 *In vitro*-Luciferasestabilität

Zusätzlich wurden Kinetiken erstellt, um die Stabilität der Luciferaseaktivität über die Zeit zu ermitteln. Dazu wurden verschiedene Zellzahlen ausgesät und über den Zeitraum von einer Stunde alle 10 Minuten eine Biolumineszenzmessung durchgeführt.

Aus den gemessenen Daten wurden die Mittelwerte der Photonen/Zelle/Sekunde (P/Z/S) errechnet und als eine Kinetik dargestellt (Abbildung 8). Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die Zugabe des Substrates; eine Minute später erhält man die höchste Photonenausbeute. Das Signal nimmt über die Zeit von 60 Minuten um durch-

schnittlich 49 % bei HT 29-Luc-, um 65 % bei Colo 205-Luc- und um 72 % bei HCT 116-Luc-Zellen ab.

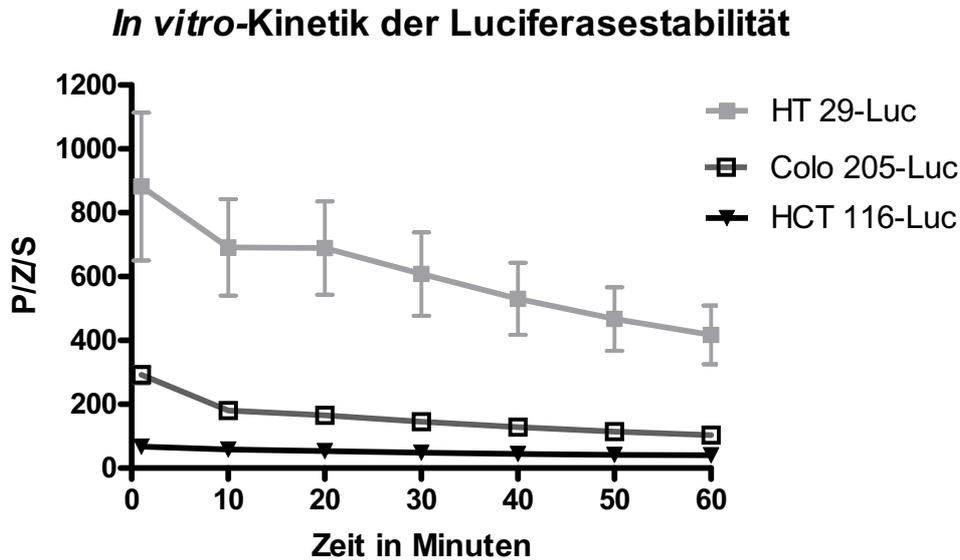


Abbildung 8: Luciferasestabilität *in vitro* über den Zeitraum von 60 Minuten

Für alle drei Zelllinien wurde eine Kinetik erstellt. Die dargestellten Werte sind das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. Zur Erstellung der HT 29-Luc-Kinetik wurden die Zellpassagen 29, 30, und 31 verwendet. Für die Colo 205-Luc-Kinetik die Zellpassagen 28, 29, 31 und für die HCT 116-Luc-Kinetik die Passagen 30, 31 und 32. Gezeigt wird die Photonenausbeute pro Zelle pro Sekunde (P/Z/S) über einen Zeitraum von 60 Minuten. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die HT 29-Luc-Zelllinie *in vitro* die stärkste Luciferaseaktivität aufwies. Die Photonemission der Colo 205-Luc-Zellen und HCT 116-Luc-Zellen lagen deutlich darunter. Der Verlauf der Kinetiken war bei allen drei Zelllinien ähnlich. In den ersten zehn Minuten kam es zu einem deutlichen Abfall der Photonemission, danach nahm die Anzahl der emittierten Photonen langsamer ab.

Von den Zellen konnten jedoch zu jedem Messzeitpunkt Photonen gemessen und visualisiert werden. In der Literatur wird beschrieben, dass weniger als 100 Photonen/Sekunde/cm²/Steradian ($p/s/cm^2/sr$) detektiert werden können (Roncali et al., 2008). Aufgrund dessen wurde die in den Experimenten ermittelte Luciferaseaktivität der Zellen als ausreichend angesehen, um sie *in vivo* einsetzen zu kön-

nen. Die Luciferasestabilität wurde nach der *in vitro*-Charakterisierung zunächst in einem *subcutanen* Tumormodell überprüft.

5.1.3 *In vivo*-Luciferasestabilität

Nach der Auswertung der Luciferaseaktivität *in vitro* wurde die Luciferasestabilität bei Versuchstieren in einem *subcutanen* Tumormodell untersucht. Es sollte der optimale Zeitpunkt für die Bildgebung, nach i.p. Verabreichung des Luciferins, ermittelt werden. Aufgrund einer ausgebrochenen Parvovirose mussten die Experimente vorzeitig abgebrochen werden, so dass die Photonenausbeute nur an einer Maus mit einem HCT 116-Luc-Tumor bestimmt werden konnte. Im *subcutanen* Modell zeigte sich, dass das Biolumineszenzsignal ab der siebten Minute stabil war. Deshalb wurden alle weiteren Biolumineszenz-Messungen jeweils zehn Minuten nach Substrat-Injektion durchgeführt. Die Ergebnisse der *in vivo*-Kinetik sind in Abbildung 9 gezeigt.

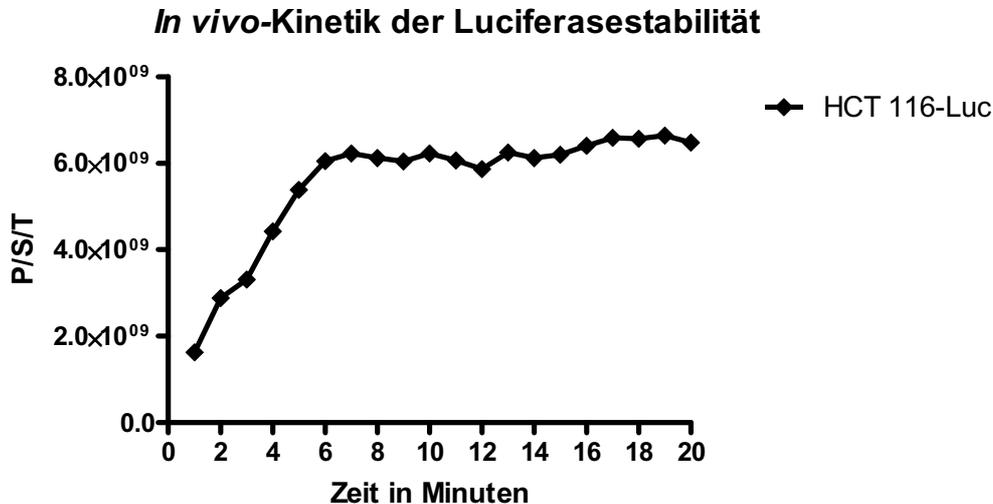


Abbildung 9: Kinetik zur Überprüfung der Luciferasestabilität *in vivo*

Die Messung wurde an einer Maus mit einem *subcutanen* HCT 116-Luc-Tumor durchgeführt. Nach Injektion des Substrates wurde jede Minute die Emission der Photonen bestimmt. Es wurde ein *Region of Interest* (ROI) über das Tier gelegt und die Photonen pro Sekunde pro Tier ermittelt (P/S/T). Die Ergebnisse sind dargestellt als Einzelwerte.

Nach Überprüfung der Luciferasestabilität im *subcutanen* Tumormodell sollten die humanen kolorektalen Tumorzelllinien im orthotopen Tumormodell Anwendung finden. Dazu wurde zunächst die orthotope Tumorimplantation etabliert.

5.2 Etablierung der orthotopen Implantation

Die Zielsetzung dieser Dissertation lag darin, aufgrund der in der Einleitung beschriebenen Vorteile ein xenogenes orthotopes Tumormodell in der Nacktmaus zu etablieren. Die orthotope Zellimplantation, die Gruppeneinteilung und die Überwachung des Tumorwachstums werden im Folgenden beschrieben.

5.2.1 Orthotope Tumorimplantation

Die in der Literatur publizierten orthotopen Tumormodelle kamen aufgrund aufwendiger Induktion (Takahashi et al., 2004) oder aus Tierschutzgründen (Takahashi et al., 2004; Tseng et al., 2007) nicht infrage. Einige Tumormodelle wiesen das Tumorwachstum an einer für unsere Experimente ungeeigneten Lokalisation auf (Tseng et al., 2007). Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Dissertation eine neue Art der orthotopen Tumorimplantation (Abbildung 10) etabliert.

Zur Implantation der humanen Tumorzellen wurde zunächst das Abdomen des narkotisierten Tieres eröffnet und das *Colon descendens* aufgesucht. Ein Venenkatheter wurde rektal in das leere Kolon eingeführt. Der absteigende Ast des Kolons wurde nach extraperitoneal verlagert (Abbildung 10 A). Mit Hilfe einer Insulinspritze wurde die Zellsuspension in die Darmwand injiziert (Abbildung 10 B). Danach wurden die Organe wieder in das Abdomen zurückverlagert und die Bauchdecke in zwei Lagen verschlossen.

Bei der im Anschluss durchgeführten Endoskopie konnte nach erfolgreicher Implantation eine Blasenbildung lumenwärts beobachtet werden (Abbildung 10 C). Zu Beginn der Versuche wurde nach 21 Tagen eine Probelaparotomie durchgeführt, um das Wachstum der Tumoren makroskopisch zu bestätigen. Nach erfolgreicher Tumorimplantation waren deutlich stecknadelkopfgrosse Tumoren auf der antimesenterialen Seite des Kolons erkennbar (Abbildung 10 D).

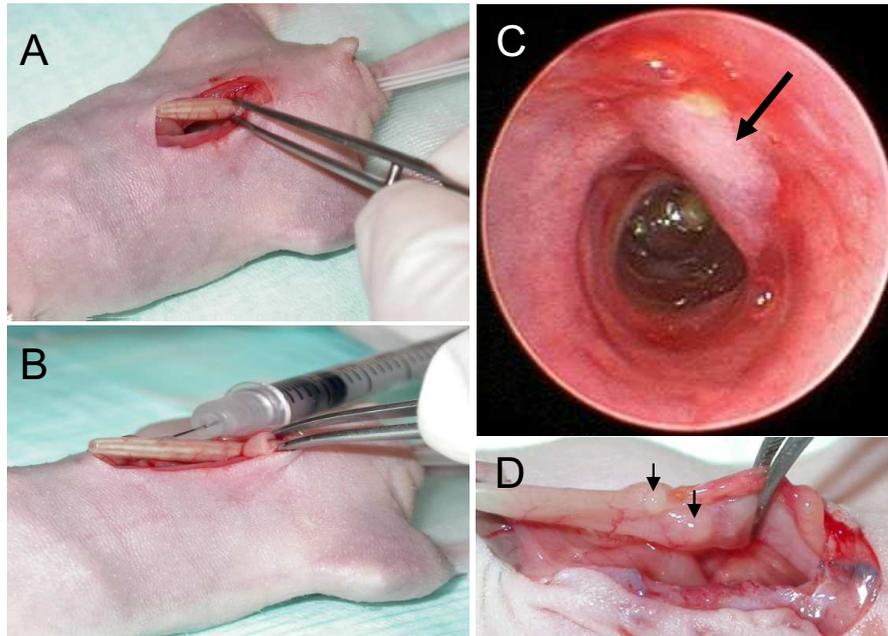


Abbildung 10: Orthotope Zellimplantation ins Kolon

Für die Implantation wurde die Abdominalwand im Bereich der *Linea alba* eröffnet und ein Venenkatheter rektal in das Kolon eingeführt. Durch vorsichtigen Zug wurde das Kolon samt Katheter nach extraperitoneal verlagert (A). Die Zellen wurden mit einer Insulinspritze in die Kolonwand injiziert (B). Der Venenkatheter wurde entfernt und die Bauchdecke verschlossen. In der anschließend durchgeführten Koloskopie war eine erfolgreiche Injektion durch eine blasenartige Aufweitung der Mukosa lumenwärts erkennbar, die Aufweitung ist durch einen Pfeil markiert (C). Eine repräsentative Fotoaufnahme einer nach 21 Tagen durchgeführten Laparotomie zeigte deutliches Wachstum von Tumoren auf der antimesenterialen Seite, die Tumoren sind durch Pfeile markiert (D).

5.2.2 Gruppenaufteilung

Das Ziel, ein humanes, orthotopes, kolorektales Tumormodell zu entwickeln, durchlief mehrere Stadien der Entwicklung und Optimierung, die zeitlich aufeinander folgten und an dieser Stelle zusammenfassend dargestellt werden. Zur Vereinfachung werden die Gruppen in Tabelle 6 gezeigt.

Zunächst wurde eine operative Methode entwickelt, welche eine Injektion von 1×10^6 Zellen/40 μ l FCS-freiem Zellmedium beinhaltete (Gruppe A). Hierbei wurden die drei Zelllinien verwendet, die *in vitro* charakterisiert worden waren.

Aufgrund der schlechten Anwachsrate kam es nach Abschluss des ersten Operationsversuches zu einer Veränderung der injizierten Volumina und der Zellzahl. Es wurde die Überlegung angestellt, dass bei der Implantation von doppelt so vie-

len Zellen eine größere Anzahl anwachsen müsste. Jedoch konnte nicht die Zellzahl beliebig multipliziert werden, ohne die Viskosität der Zellsuspension stark zu erhöhen. Aufgrund dessen musste ein Kompromiss gefunden werden. Ein wesentlich größeres Volumen zu injizieren, fiel aufgrund der geringen Größe des murinen Kolons aus. Die Anzahl der injizierten Zellen und das Volumen wurden verdoppelt, so dass die Tiere 80 µl FCS freies Medium mit 2×10^6 Zellen bekamen (Gruppe B). In dieser Operationsgruppe kam es zu einer Verbesserung der Anwachsrate, die weiter optimiert werden sollte. Die Frage war, wie für die injizierten Zellen optimale Wachstumsbedingungen geschaffen werden konnten. Experimentell bestätigt ist, dass Polymere, Wachstumsfaktoren und Agarose das Anwachsen von Zellen im xenogenen Organismus fördern (Fridman et al., 1990; Fridman et al., 1991). Diese Stoffe sind in Matrigel vorhanden. Hierbei handelt es sich um ein Gel, welches die extrazelluläre Matrix von Zellen nachempfinden soll. Im gekühlten Zustand ist es flüssig und kann durch dünne Kanülen injiziert werden. Bei Körpertemperatur wird es gelartig und haftet an (Organ-) Oberflächen.

Die letzte Modifikation der Zellsuspension bestand im Hinzufügen von Matrigel. Die injizierte Zellzahl und das Volumen blieben gleich. Diese Gruppe wurde als Gruppe C bezeichnet.

Die Anwachsrate der einzelnen Operationsgruppen werden unter Punkt 5.2.4 diskutiert.

Tabelle 6: Einteilung der Tierversuchsgruppen

Die Tiere wurden in die Gruppen A, B und C aufgeteilt. Aufgelistet sind die Bezeichnung der Gruppe, die verwendeten Zellen, die Zellzahl, die Anzahl der Tiere pro Gruppe (n) und ob Matrigel angewandt wurde (+) oder nicht (-). In rot werden die jeweiligen Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellsuspension hervorgehoben.

Gruppe	Zellen	Zellzahl	n	Matrigel
A1	HT 29-Luc	1x 10 ⁶	14	-
A2	HCT 116-Luc	1x 10 ⁶	8	-
A3	Colo 205- Luc	1x 10 ⁶	16	-
B1	HT 29-Luc	2x 10 ⁶	5	-
B2	HCT 116-Luc	2x 10 ⁶	4	-
B3	Colo 205- Luc	2x 10 ⁶	3	-
C1	HT 29-Luc	2x 10 ⁶	6	+
C2	HCT 116-Luc	2x 10 ⁶	6	+
C3	Colo 205- Luc	2x 10 ⁶	9	+

5.2.2.1 Klinische Symptome für das Tumorwachstum

Bei der Etablierung neuer Tiermodelle muss während des Versuches das klinische Gesamtbild der Tiere stärker ins Auge gefasst werden als bei schon etablierten Tumormodellen. Bei neuen Modellen ist das klinische Krankheitsbild der Tiere im Vorfeld nicht bekannt, so dass die Tiere engmaschiger überwacht werden müssen, um unnötiges Leiden der Versuchstiere zu verhindern. Orthotope, kolorektale Tumoren können einen mechanischen Dickdarmileus verursachen oder durch die Freisetzung von Mediatoren (Zytokine, Hormone) das Auftreten eines paraneoplastischen Syndroms hervorrufen, was zu einer Verschlechterung des Allgemeinbefindens führt. Aufgrund dessen wurde ein Datenblatt zur Überwachung des Allgemeinbefindens entwickelt, dessen Punkte täglich bei jedem Versuchstier überprüft wurden. Dieses Datenblatt zur Überwachung ist im Anhang in Tabelle 11 dargestellt. Hierfür wurden sieben unterschiedliche Parameter zur Einschätzung des Gesundheitszustandes der Tiere herangezogen. Hierzu zählte das äußere Erscheinungsbild, das Körpergewicht, Futter- bzw. Wasseraufnahme, Kot und-

Urinabsatz. Ferner wurde das beobachtete und provozierte Verhalten der Tiere als Surrogatmarker für die Tumorbilastung betrachtet. Auffälligkeiten bei diesen Parametern wurden als Symptom für ein Tumorstachstum im Abdomen interpretiert. Diese Überwachung diente der besseren Einschätzung des Allgemeinbefindens der Tiere und erlaubte den vorzeitigen Versuchsabbruch. Je nach deskriptivem Kriterium, welches den Zustand des einzelnen Tieres beschreibt, wurden Punkte von null bis drei vergeben. Die Punkte der einzelnen Parameter wurden dann nach Abschluss der Untersuchung bzw. der Beobachtung addiert. Je höher die Summe, desto schlechter war der Zustand des Tieres. Ergab sich dabei eine Summe von fünf Punkten, musste das Tier täglich klinisch untersucht werden. Bei einer Summe zwischen fünf und zehn Punkten musste ein Tierarzt hinzugezogen werden. Bei einem Wert von über zehn Punkten wurde das Tier sofort getötet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich bei den Tieren kaum klinisch auffällige Befunde erheben ließen. Lediglich drei von 39 Tieren mit einem orthotopen Tumor wiesen in dem gesamten Versuchszeitraum einen schlechten Allgemeinzustand auf. Zwei Tiere zeigten aufgrund von *subcutanen* Ödemen ein schlechtes Allgemeinbefinden und wurden vorzeitig euthanasiert. Im Anschluss folgte eine sofortige Sektion zur makroskopischen Begutachtung der Tiere. Eine Ursache für die Ödeme konnte dabei nicht gefunden werden. Eine weitere Maus zeigte in der letzten Versuchswoche Blut im Kot. Bei der durchgeführten Koloskopie zeigte sich eine Blutung aus dem Tumor. Auch dieses Tier wurde vorzeitig euthanasiert. Alle anderen Versuchstiere zeigten während der gesamten Versuchsdauer nie mehr als einen Punkt, so dass ihr Allgemeinbefinden als ungestört angesehen werden konnte.

5.2.2.2 Gewichtsentwicklung

Die Tiere wurden einmal wöchentlich sowie nach klinisch auffälligem Befund gewogen, um sicher zu stellen, dass kein Tier mehr als 20 % des Gewichtes im Vergleich zu dem Gewicht der vorhergehenden Woche verloren hat. In diesem Falle wäre ein Abbruchkriterium erreicht gewesen und die Maus hätte vor Versuchsende getötet werden müssen. Jedoch wurde auch eine starke Gewichtszunahme, nach klinisch auffälligem Allgemeinzustand als Abbruchkriterium verstanden.

Der Gewichtsverlauf der Tiere der verschiedenen Gruppen ist in Abbildung 11 gezeigt.

Gemeinsam war allen Untergruppen der Gruppe A, dass die Tiere in der ersten Woche Gewicht verloren. Im weiteren Verlauf nahmen die Tiere der einzelnen Gruppen wieder unterschiedlich stark an Gewicht zu. Die Tiere der Gruppe B zeigten eine gleichmäßigere Gewichtsverteilung zwischen den Untergruppen. Auffällig bei dieser Gruppe war die starke Gewichtsabnahme zwischen Woche drei und vier. Bei den Tieren der Gruppe C verloren die Tiere in den ersten zwei Wochen fünf bis zehn Prozent an Gewicht. In der darauffolgenden Woche erlangten die Tiere wieder ihr Ausgangsgewicht.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Tiere aller Versuchsgruppen bis zum Versuchsende nur gering- bis mittelgradig an Gewicht verloren. Dies wurde als gering- bzw. mittelgradige Belastung der Tiere interpretiert.

5.2.3 Monitoring des Tumorwachstums

Entscheidend für ein neues Modell ist die Beobachtung des Tumorwachstums, um spätere Therapieversuche beurteilen zu können. Die Größe orthotop wachsender Darmtumoren war von außen ohne technische Hilfsmittel nicht zu bestimmen. Aufgrund dessen wurde die Größe der Tumoren mittels Koloskopie und Biolumineszenz überwacht.

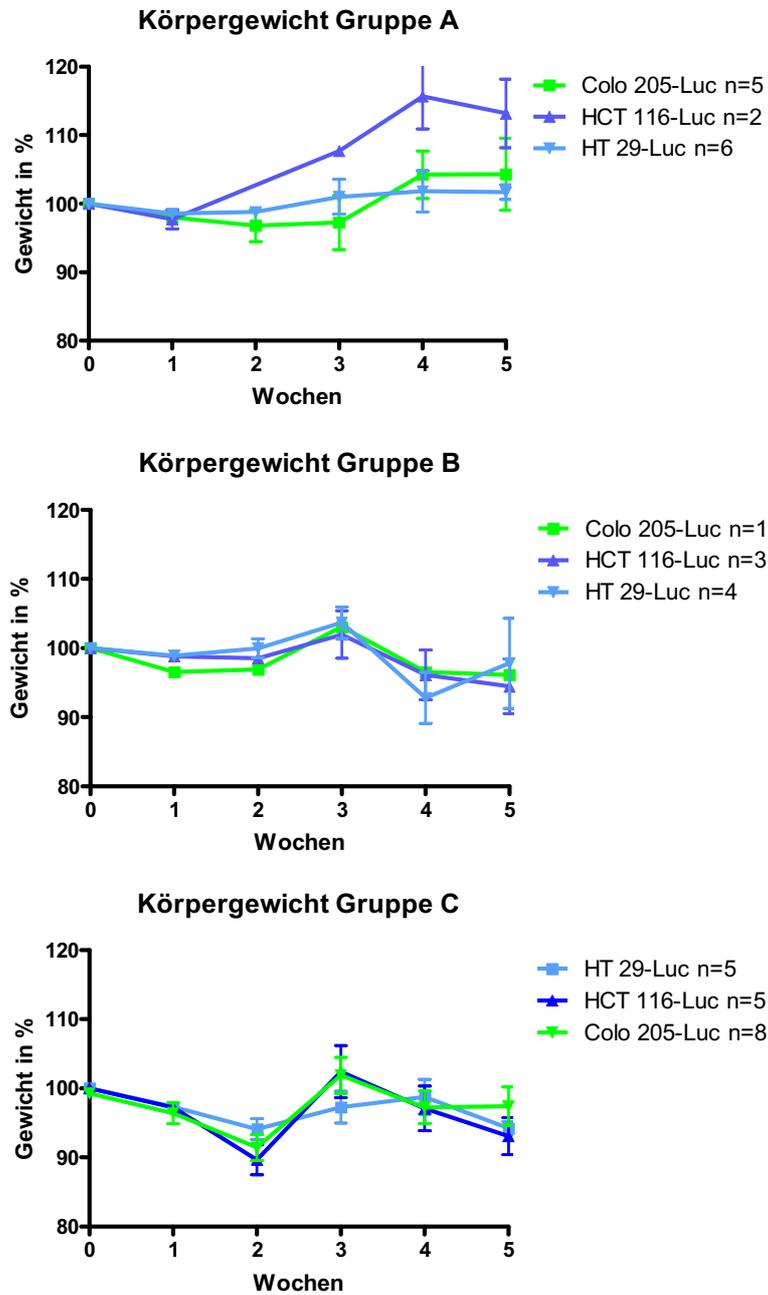


Abbildung 11: Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere

Dargestellt ist die Entwicklung des Körpergewichts der Tiere der unterschiedlichen Versuchsgruppen. Das Körpergewicht wurde in Prozent dargestellt. Das Gewicht der Tiere zu Versuchsbeginn (Woche 0) wurde als 100 % gewertet; der Gewichtsverlust bzw. die Gewichtszunahme wurde in Relation dazu errechnet. Die Ergebnisse sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

5.2.3.1 Koloskopie und Beurteilung der Tumorgröße

Zur Beurteilung der makroskopisch sichtbaren Veränderungen im Kolon wurde der von der Mainzer Gruppe entwickelte Kolitis-Score (Becker et al., 2006) modifiziert angewandt. Von dem Kolitis-Score wurde lediglich ein deskriptiver Parameter zur Beurteilung herangezogen: die Tumorgröße. Die Modifikation dieses Scores bestand darin, dass für jeden im *Colon descendens* auftretenden Tumor der Score einzeln erhoben wurde. Fanden sich im Darm einer Maus mehrere Tumoren, so wurden die Punkte der einzelnen Tumoren addiert.

Hierbei wurde die Größe des Tumors im Verhältnis zum Darmlumen beschrieben. Repräsentative Bilder zu jedem Score sind in Abbildung 12 gezeigt.

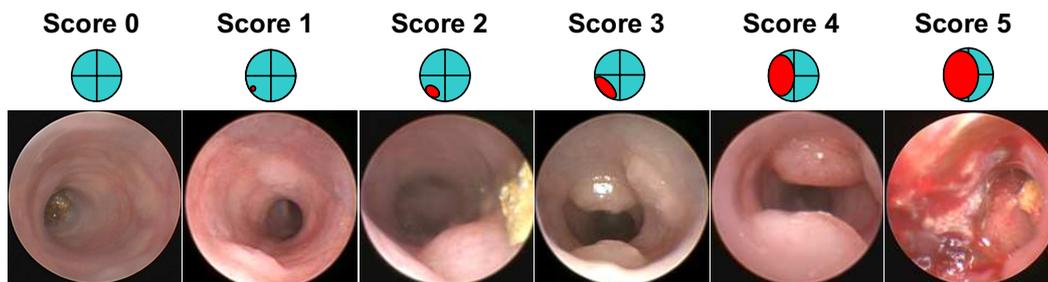


Abbildung 12: Monitoring des Tumorwachstums durch die Koloskopie

Repräsentative Bilder verschiedener Stadien des Tumorwachstums über einen Versuchszeitraum von fünf Wochen zeigen die entsprechende Vergabe des Scores (Punkte). Null Punkte wurden vergeben, wenn kein Tumor zu sehen war. Ein Punkt bedeutete, dass der Tumor gerade sichtbar war. Bei zwei Punkten wurde das Lumen etwa zu 1/8 eingeengt, bei drei Punkten war das Lumen etwa zu 1/4 eingeengt. Vier Punkte bedeuteten, dass nur noch die Hälfte des Darmlumens frei passierbar war. Bei fünf Punkten war mehr als die Hälfte des Darmlumens durch den Tumor eingeengt.

5.2.3.2 Biolumineszenz Bildgebung (BLI)

Biolumineszenz-Bildgebung visualisiert die Emission von Licht, die bei der Umsetzung des Substrates D-Luciferin durch Luciferase freigesetzt wird. Durch die Verwendung stabil Luciferase-exprimierender Zelllinien konnte die Aktivität der Zellen im Versuchstier (*in vivo*) untersucht und somit das Wachstum des Tumors nachgewiesen werden. BLI ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis biologischer Prozesse *in vivo* (Keyaerts et al., 2012), da Luciferase nicht endogen vorkommt. So konnte ein erfolgreiches Anwachsen der Tumorzellen in den ersten beiden Tagen nach Tumorzellinjektion mittels Biolumineszenz nachgewiesen werden (Abbildung 13).

Die *in vivo*-Darstellung des xenotransplantierten Tumors ergab aufgrund der anatomischen Lage des murinen Kolon eine sehr gute Darstellung von *ventral*. In Abbildung 14 ist repräsentativ die Biolumineszenzentwicklung einer HCT 116-Tumor-tragenden Maus über den Zeitraum von fünf Wochen gezeigt. Zusätzlich wird die Aufnahme einer Maus nach Luciferin-Injektion, jedoch vor der Tumorzellimplantation gezeigt (Woche 0). Als weitere Kontrolle wird eine Tumor-tragende Maus vor Luciferin-Injektion gezeigt (letztes Bild).

Im Rahmen dieser Experimente wurden Differenzen zwischen der *in vitro* und *in vivo* Photonenausbeuten nachgewiesen. Dies war insbesondere bei der HCT 116-Luc-Zelllinie festzustellen. In der Literatur werden ebenfalls Diskrepanzen zwischen der Biolumineszenz von Zellen *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Keyaerts et al., 2011).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Koloskopie und das BLI ein vollständiges Bild über das Tumorwachstum *in vivo* liefern. Repräsentativ ist in Abbildung 15 das Tumorwachstum für jede Zelllinie im Versuchstier gezeigt. Anhand der Bilder erkennt man deutlich, dass die Tumorzellen anwachsen und über einen Zeitraum von fünf Wochen mittels beider Bildgebungsmodalitäten gut beobachtet werden konnten. Die Endoskopie gab genauen Aufschluss über die Größe und Anzahl der Primärtumoren, während die BLI einen allgemeinen

Wachstumsverlauf anzeigte und vorhandene Metastasen sichtbar machte, wie z. B. im Fall von einem Colo 205-Luc Tumor (Abbildung 15; Pfeile, letztes Bild).

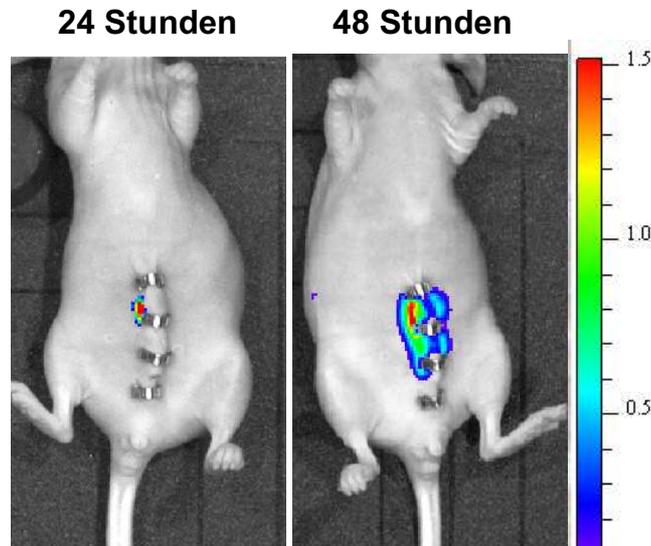


Abbildung 13: Darstellung des Biolumineszenzsignals 24 Stunden und 48 Stunden nach Implantation

Repräsentative Biolumineszenz-Aufnahmen einer HT 29-Luc-Tumor-tragenden Maus 24 Stunden und 48 Stunden nach orthotoper Implantation. Die Werte der Skala sind in Photonen/Sekunde/Quadratcentimeter/Steradian ($\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) $\times 10^8$ angegeben.

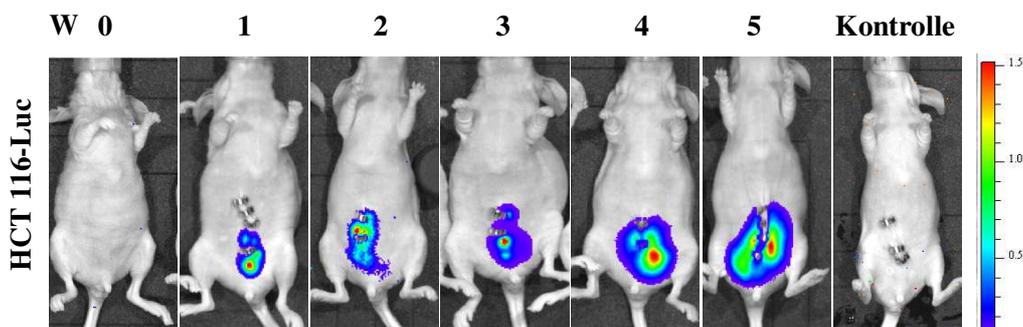


Abbildung 14: Monitoring des Tumorwachstums über Biolumineszenz-Bildgebung

Das erste Bild zeigt die Biolumineszenzaufnahme einer Maus vor Zellimplantation, nach Luciferin-Injektion in Woche 0 (W 0). Im Folgenden ist die Biolumineszenz-Entwicklung einer Maus nach der Implantation von HCT 116-Luc-Zellen über einen Zeitraum von fünf Wochen dargestellt (W 0-5). Als Kontrolle wird im letzten Bild eine Maus nach Tumorzellimplantation, aber vor Luciferin-Injektion gezeigt. Die Werte der Skala sind in Photonen/Sekunde/Quadratcentimeter/Steradian ($\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) $\times 10^8$ angegeben.

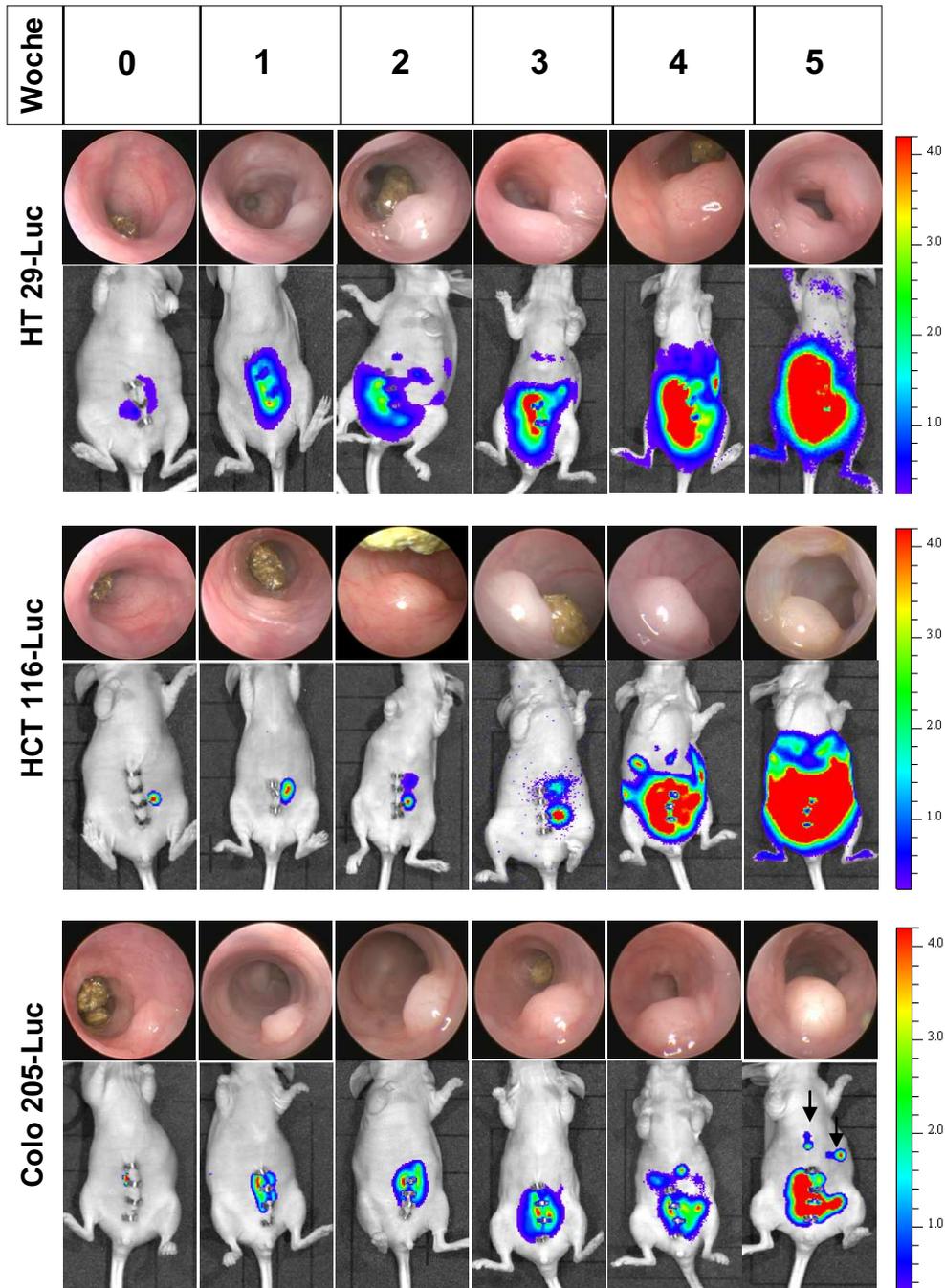


Abbildung 15: Überwachung des Tumorwachstums durch Endoskopie und Biolumineszenz

In den gezeigten Bildern ist das Tumorwachstum der drei verwendeten Zelllinien über fünf Wochen gezeigt. Die Pfeile im letzten Bild markieren Metastasen in der Leber. Die Werte der Skala sind in Photonen/Sekunde/Quadratmeter/Steradian ($\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) $\times 10^6$ angegeben.

5.2.4 Anwachsrate in Abhängigkeit von der Operationsmethode

Die Anwachsrate (engl. *take rate*), d. h. die Anzahl der Tiere, bei denen nach Tumorzellimplantation ein Tumorwachstum nachgewiesen wurde, wurden mittels Endoskopie und Biolumineszenz bestimmt. Sie war je nach angewandter Operationsmethode sehr unterschiedlich; die Ergebnisse der einzelnen Methoden sind in Tabelle 7 gezeigt.

Von den Anwachsrate der Gruppe A wies die HT 29-Luc-Zelllinie mit 43 % die höchste Prävalenz bei den Versuchstieren auf. Bei sechs der 14 operierten Tiere konnten innerhalb von fünf Wochen Tumoren nachgewiesen werden. Die Colo 205-Luc-Zelllinie konnte bei 31 % der Tiere und die HCT 116-Luc-Zelllinie bei 25 % der Versuchstiere einen Tumor verursachen. Die von allen Zelllinien gemittelte Anwachsrate der Operationsmethode A lag bei 34 %.

Aufgrund der unbefriedigenden Anwachsrate der Tumorzellen bei den ersten Versuchen (Gruppe A) wurde eine Modifizierung dieser Operationsmethode durchgeführt. Wie zuvor erwähnt, wurde die Anzahl der zu injizierenden Zellen von 1×10^6 auf 2×10^6 erhöht. In Gruppe B konnte die HT 29-Luc-Zelllinie bei 80 % der Versuchstiere einen Tumor erzeugen. Damit wies diese Zelllinie die beste Anwachsrate auf. Die HCT 116-Luc-Zelllinie verursachte bei 75 % der Versuchstiere Tumoren. Die Anwachsrate der Colo- 205-Luc-Zelllinie betrug 33 %. Durch Verdopplung der injizierten Zellen betrug die gemittelte Anwachsrate aller Zelllinien 66 %.

Zur weiteren Optimierung der Operationsmethode wurde der Zellsuspension Matrigel hinzugefügt. Matrigel enthält eine Reihe von Wachstumsfaktoren, die das Anwachsen der Zellen im xenogenen Organismus fördern sollen (Fridman et al., 1990; Fridman et al., 1991). Diese Gruppe wird als Operationsgruppe C bezeichnet. In Gruppe C unterschieden sich die Anwachsrate der einzelnen Zelllinien nur wenig. Die Colo 205-Luc-Zelllinie wies mit 88 % die beste Anwachsrate auf. Die HCT 116-Luc- und die HT 29-Luc-Zelllinie zeigten beide eine Anwachsrate von 83 %. Durch das Hinzufügen von Matrigel zur Zellsuspension (Gruppe C) konnte eine gemittelte Anwachsrate von 86 % erreicht werden.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Anwachsrate in den unterschiedlichen Operationsgruppen

In Klammern dargestellt ist die Anzahl der tumortragenden Tiere im Verhältnis zu der Anzahl der operierten Tiere.

	Ohne Matrigel		Mit Matrigel
	A	B	C
	1 x 10 ⁶ Zellen	2 x 10 ⁶ Zellen	2 x 10 ⁶ Zellen
OP-Methode			
Zelllinie			
HCT 116-Luc	25 % (2/8)	75 % (3/4)	83 % (5/6)
HT 29-Luc	43 % (6/14)	80 % (4/5)	83 % (5/6)
Colo 205-Luc	31 % (5/16)	33 % (1/3)	88 % (8/9)
Total (Anwachsrate)	34 % (13/38)	66 % (8/12)	85 % (18/21)

5.2.4.1 Orthotopes Tumorwachstum

Zur Beobachtung des Tumorwachstums wurde bei allen Tieren einmal wöchentlich eine Koloskopie und BLI zur Beobachtung durchgeführt. Aus den ermittelten Daten resultierten die Wachstumsverläufe, die in den Abbildungen 16 bis 18 dargestellt sind.

Zunächst werden im Folgenden die Ergebnisse der Gruppe A erläutert.

Das Biolumineszenzsignal der HT 29-Luc-Mäuse stieg über fünf Wochen an, wobei zwischen der dritten und vierten Versuchswoche ein kurzzeitiger Abfall der Biolumineszenz auffällig war. Die Daten der Tumorgröße aus dem modifizierten *Kolitis Score* (Becker et al., 2006) zeigten ebenfalls ein stetiges Wachstum von einem auf drei Punkte an.

Versuchstiere mit HCT 116-Luc-Tumoren zeigten über einen Versuchszeitraum von vier Wochen einen starken Anstieg der Biolumineszenzkurve im Mittel von 1×10^8 Photonen pro Sekunde pro Tier auf 5×10^{10} Photonen pro Sekunde pro Tier. In der letzten Woche kam es zu einem Abfall des Biolumineszenz-Signales. Die Tumorgröße nach dem *Score* blieb von der ersten bis zur dritten Woche konstant. In Woche vier stieg die Größe sprunghaft auf acht Punkte an.

Die Biolumineszenzkurve der Colo 205-Luc-Tiere stieg über den gesamten Versuchszeitraum moderat an. Die Wachstumskurve der Tumoren stieg ebenfalls stetig. Insgesamt zeigten die Tiere der Gruppe A ein sehr heterogenes Tumorstadium auf. Auffallend waren zwischenzeitliche Abfälle in der Biolumineszenz.

Die Kurvenentwicklung der Gruppe B verlief im Vergleich zu denen der Gruppe A heterogener und ungleichmäßiger.

Die Kurve des Biolumineszenz-Signales der HT 29-Luc-Tumor-tragenden Mäuse wies in den ersten vier Wochen nach der Implantation eine starke Entwicklung von 1×10^7 zu 1×10^9 Photonen pro Sekunde pro Tier auf. Nach der vorzeitigen Tötung einer Maus in der vierten Woche fiel der Graph des Biolumineszenz-Signales stark ab. Die durch Endoskopie ermittelte Tumorstadiumgröße stieg bis zur dritten Woche an. In der vierten Woche wurden die Tumoren etwas kleiner, in der darauffolgenden Woche hatten sie jedoch das Niveau der Woche drei wieder erreicht.

Die Biolumineszenzkurve der HCT 116-Luc-Zelllinie zeigte einen ähnlichen Wachstumsverlauf. Auch hier kam es zu einem deutlichen Anstieg der Biolumineszenz-Signale bis zur vierten Woche. In der darauffolgenden Woche war ein starkes Absinken des Graphen ersichtlich. Entsprechend verhielt es sich mit der Tumorstadiumgröße. In den ersten vier Wochen konnte ein stetiges Tumorstadiumwachstum beobachtet werden. In der letzten Woche schien es zu einer Verkleinerung der Tumoren zu kommen, was sich ebenfalls im Biolumineszenzverlauf widerspiegelt.

Aufgrund einer ausgebrochenen Parvovirose in der Tierhaltung bestand die Gruppe der Colo 205-Luc-Tiere aus nur einer Maus. Das Biolumineszenzsignal dieses Tieres verlief gegensätzlich im Vergleich zu den Graphen der anderen beiden Zelllinien. Hier kam es in den ersten drei Wochen zu einer Abnahme der Biolumineszenz. In der vierten Woche kam es zu einem Anstieg, in der darauffolgenden Woche jedoch wieder zu einem Abfall des Signals. Die durch Endoskopie ermittelte Tumorstadiumgröße verlief konträr zum Biolumineszenzsignal: in den ersten vier Wochen kam es zu einem deutlichen Größenwachstum, welches in der fünften Woche stagnierte. Vermutlich ist dieser individuelle Verlauf der Biolumines-

zenzkurve und der Tumorgröße durch die geringe Anzahl an Versuchstieren zu erklären.

Betrachtet man dagegen die Ergebnisse der Operationsgruppe C, lässt sich eine deutliche Verbesserung des Wachstumsverhaltens der Tumoren feststellen: bei der Entwicklung der Biolumineszenz der Tumoren aller drei Zelllinien war eine deutliche Steigerung des Signals zu beobachten. Die HT 29-Luc- und HCT 116-Luc-Tumor-tragenden Mäuse begannen mit einer Intensität von 1×10^8 Photonen/Sekunde/Tier in den ersten beiden Tagen nach der Operation. Über den Versuchszeitraum konnte ein Ansteigen der Biolumineszenzkurve um etwas mehr als zwei Zehnerpotenzen beobachtet werden. Auch das Größenwachstum der HT 29-Luc- und HCT 116-Luc-Tumoren nach dem endoskopischen *Score* in den Mäusen verhielt sich ähnlich. Bei beiden Gruppen kam es zu einem Größenwachstum der Tumoren bis zur vierten Woche, wobei die Tumoren eine Größe von fünf bis sechs Punkten erlangten. Diese Punktzahl wiesen die Tumore auch zum Versuchsende auf.

Das Biolumineszenzsignal der Colo 205-Luc-Tiere schien schon zu Versuchsbeginn mit 1×10^7 Photonen/ Sekunde etwas niedriger zu sein, als das der Gruppen mit den HT 29-Luc- bzw. HCT 116-Luc-Tumoren. Dennoch kam es auch bei dieser Gruppe zu einem Anstieg des Signals um zwei Zehnerpotenzen.

Insgesamt führte der Einsatz von Matrigel zu einem deutlich homogeneren Tumorwachstum, was sich auch in den Anwachsrate widerspiegelte. Matrigel enthält Wachstumsfaktoren, die das Anwachsen der Tumorzellen im xenogenen Organismus fördern. Zudem wird es bei Körpertemperatur gelartig und haftet dadurch an Organoberflächen. Dadurch haften die im Matrigel suspendierten Zellen ebenfalls an dem entsprechenden Organ.

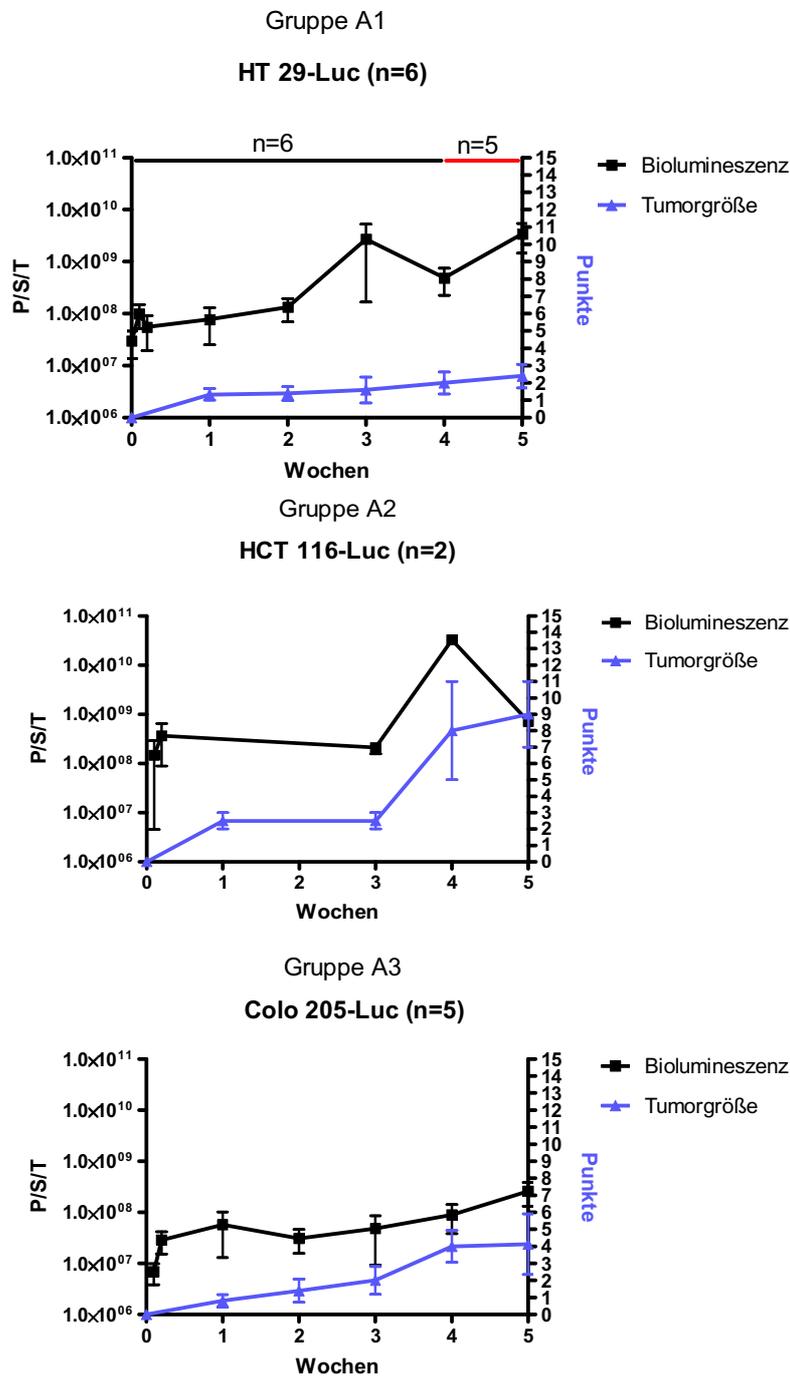


Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der Biolumineszenz- und Tumorgrößenentwicklung der Operationsgruppen A1-A3

Gezeigt werden das von den Tumoren ausgehende Biolumineszenzsignal in Photonen pro Sekunde pro Tier (P/S/T) und die durch Endoskopie ermittelte Tumorgröße. Die Tiere wurden 24 Stunden und 48 Stunden nach der Implantation, dann einmal wöchentlich mittels Biolumineszenz untersucht. Die Endoskopie wurde einmal wöchentlich durchgeführt. Ergebnisse sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

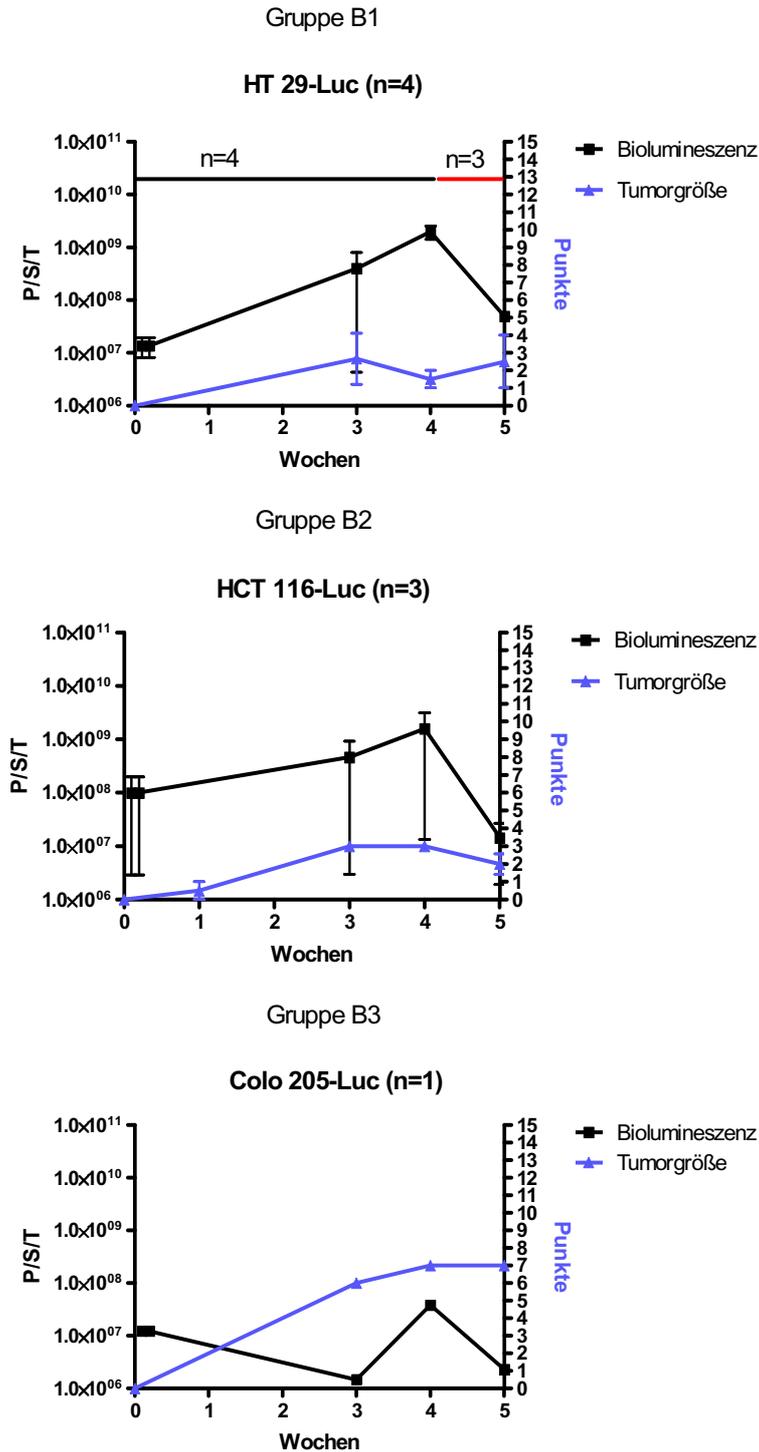


Abbildung 17: Vergleichende Darstellung der Biolumineszenz- und Tumorgrößenentwicklung der Operationsgruppen B1-B3

Gezeigt werden das von den Tumoren ausgehende Biolumineszenzsignal in Photonen pro Sekunde pro Tier (P/S/T) und die durch Endoskopie ermittelte Tumorgröße. Die Tiere wurden 24 Stunden und 48 Stunden nach der Implantation, dann einmal wöchentlich mittels Biolumineszenz untersucht. Die Endoskopie wurde einmal wöchentlich durchgeführt. Ergebnisse sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

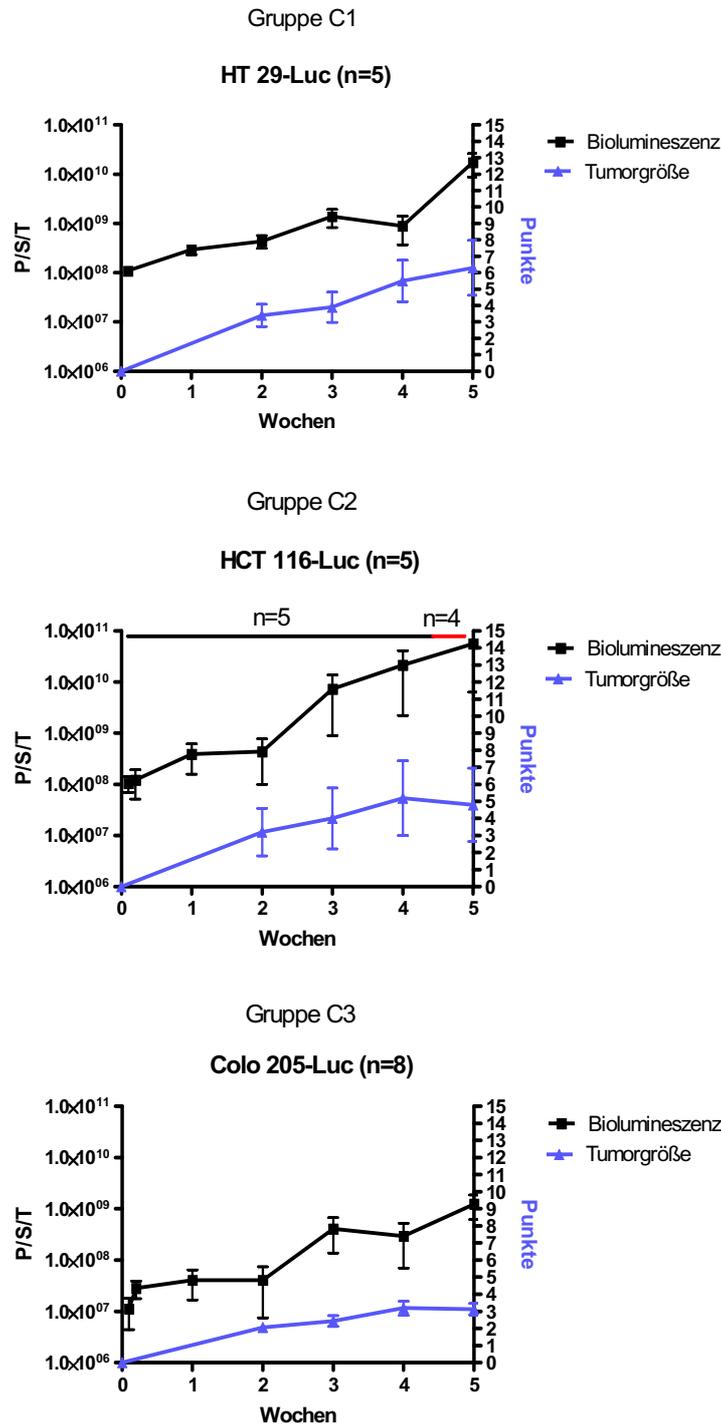


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der Biolumineszenz- und Tumorgrößenentwicklung der Operationsgruppen C1-C3

Gezeigt werden das von den Tumoren ausgehende Biolumineszenzsignal in Photonen pro Sekunde pro Tier (P/S/T) und die durch Endoskopie ermittelte Tumorgröße. Die Tiere wurden 24 Stunden und 48 Stunden nach der Implantation, dann einmal wöchentlich mittels Biolumineszenz untersucht. Die Endoskopie wurde einmal wöchentlich durchgeführt. Ergebnisse sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung.

5.2.4.2 *Ex vivo*-Charakterisierung

Zur weiteren Charakterisierung des Modells wurde die Anwachsrate dokumentiert, die sich bei der Sektion präsentierte. Bei der Sektion wurde makroskopisch und mittels Biolumineszenz das Vorhandensein oder Fehlen eines Tumors am *Colon descendens* protokolliert (Abbildung 19). Die Anwachsraten wurden an Hämatoxylin-Eosin (HE) und immunhistologisch gefärbten Kryoschnitten mikroskopisch untersucht und bestätigt.

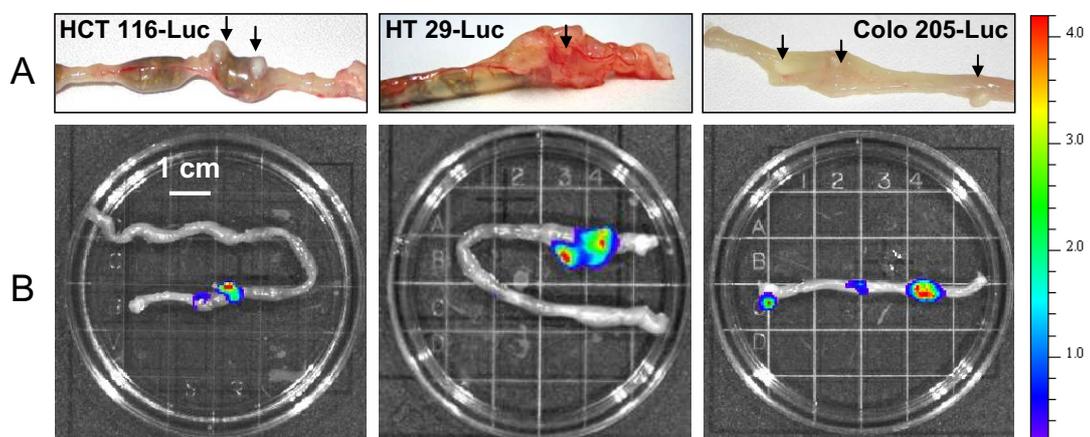


Abbildung 19: Ex vivo-Aufnahmen von neoplastisch veränderten Kolonabschnitten und den dazugehörigen Biolumineszenz-Aufnahmen

Auf den Fotos (A) ist das Kolon dreier unterschiedlicher Mäuse mit Tumoren (Pfeile) zu sehen. Auf den darunter abgebildeten Biolumineszenz-Aufnahmen (B) ist das von den Tumoren ausgehende Biolumineszenzsignal zu beobachten. Die Werte der Skala sind in Photonen/Sekunde/Quadratmeter/Steradian ($\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) $\times 10^6$ angegeben.

Es lässt sich festhalten, dass die endoskopisch gestellte Diagnose in Kombination mit der *in vivo* durchgeführten Biolumineszenz-Bildgebung immer durch den Sektionsbefund bestätigt wurde. Fanden sich im Bereich des Kolon bei der *ex vivo*-Bildaufnahme Luciferase produzierende Zellen, so wurde die Verdachtsdiagnose „kolorektales Karzinom“ gestellt (Abbildung 19). Dies wurde durch die sich anschließende histologische Untersuchung verifiziert (Abschnitt 5.2.4.4).

5.2.4.3 Metastasierung

Die bei der Sektion entnommenen Organe (mesenterialer Lymphknoten, Leberhilus und Leber) wurden mittels Biolumineszenz auf das Vorhandensein möglicher Metastasen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Metastasenentwicklung der einzelnen Operationsgruppen

Dargestellt ist die Metastasenentwicklung im Bereich des Peritoneums und in anderen Organen. Andere betroffene Organe waren das *Duodenum*, mesenteriale Lymphknoten (*mes. Lnn.*) und die Leber (*Proc. caud.*). In Klammern ist die Anzahl Metastasen-tragender Tiere im Verhältnis zu den operierten Versuchstieren dargestellt.

	Ohne Matrigel		Mit Matrigel
	A	B	C
OP-Methode	1 x 10 ⁶ Zellen	2 x 10 ⁶ Zellen	2 x 10 ⁶ Zellen
Zelllinie			
HCT 116-Luc	50 % (4/8) <i>Peritoneum</i>	75 % (3/4) <i>Peritoneum</i> 25 % (1/4) <i>Duodenum</i> 25 % (1/4) <i>mes. Lnn.</i>	67 % (4/6) <i>Peritoneum</i>
HT 29-Luc	43 % (6/14) <i>Peritoneum</i>	80 % (4/5) <i>Peritoneum</i>	50 % (3/6) <i>Peritoneum</i> 17 % (1/6) <i>mes. Lnn.</i>
Colo 205-Luc	38 % (6/16) <i>Peritoneum</i>	33 % (1/3) <i>Peritoneum</i>	67 % (6/9) <i>Peritoneum</i> 11 % (1/9) <i>mes. Lnn.</i> 11 % (1/9) <i>Proc. caud.</i>

Bei der Metastasenentwicklung in Bezug auf die verwendeten Zelllinien ist auffällig, dass die HCT 116-Luc-Zelllinie in Gruppe A mit 50 % den höchsten Prozentsatz an Peritonealmetastasen aufwies. Die HT 29-Luc- und Colo 205-Luc-Zelllinie lagen 7 bzw. 12 Prozentpunkte darunter.

In der Operationsgruppe B wies die HT 29-Luc-Zelllinie mit 80 % Peritonealmetastasen die höchste Metastasierungstendenz auf. Die HCT 116-Luc-Zelllinie konnte bei 75 %, die Colo 205-Luc-Zelllinie bei 33 % der Versuchstiere peritoneale Metastasen erzeugen.

Ergebnisse

In Gruppe C wiesen die HCT 116-Luc- und Colo 205-Luc-Zelllinie mit einer Metastasenentwicklung bei 67 % der Versuchstiere die höchste Metastasierungstendenz auf. Bei der HT 29-Luc-Zelllinie zeigten 50 % der Versuchstiere Peritonealmetastasen. Die Tiere der Gruppe C wiesen im Vergleich zu Gruppe B einen geringeren Prozentsatz an Peritonealmetastasen auf. Ursächlich dafür könnte der gelierende Effekt des Matrigels sein. Durch die gelartige Struktur des Matrigels wird die Injektionsstelle schneller wieder verschlossen, so dass weniger Zellen austreten können.

Bei der Metastasierungstendenz in andere Organe ist auffällig, dass Tochtergeschwülste in *mesenteriale Lymphknoten* bzw. andere gastrointestinale Organe nur in den Gruppe B und Gruppe C zu finden sind. So zeigten sich in Gruppe B bei 25 % der Tumor-tragenden Versuchstiere Metastasen im Bereich des *mesenterialen Lymphknotens (mes. Lnn.)* und am *Duodenum*. In Gruppe C konnte bei 17 % der Versuchstiere, die der HT 29-Luc-Zellen injiziert bekommen haben, Metastasen im *mesenterialen Lymphknoten* nachgewiesen werden. Bei den Tieren, die eine Colo 205-Luc-Zellinjektion bekamen, traten bei 11 % Metastasen im Bereich des *mesenterialen Lymphknoten* und 11 % in der Leber auf (*Proc. caudatus*).

In Abbildung 20 ist der Nachweis Biolumineszenz positiver Zellen im Kolon und mesenterialen Lymphknoten derselben Maus gezeigt.

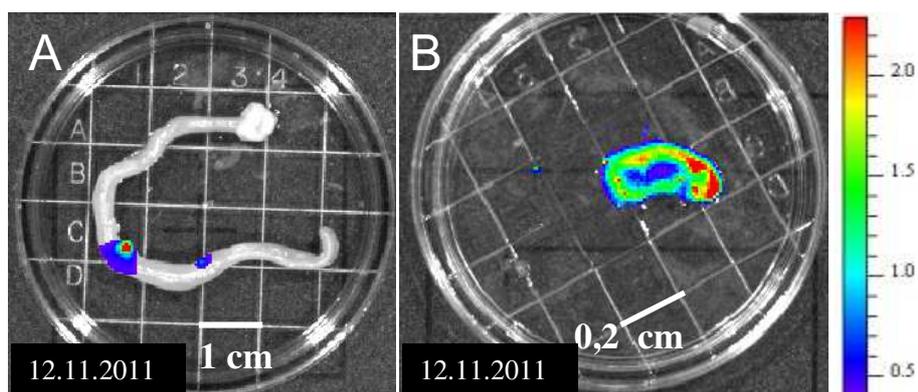


Abbildung 20: Nachweis Biolumineszenz-positiver Zellen im Kolon und mesenterialen Lymphknoten derselben Maus

Es sind Biolumineszenz-positive Colo 205-Luc-Zellen im Kolon (A) und im mesenterialen Lymphknoten (B) nachweisbar. Die Werte der Skala sind in Photonen/Sekunde/Quadratcentimeter/Steradian ($\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) $\times 10^9$ angegeben.

5.2.4.4 Immunhistochemischer Nachweis humaner Tumorzellen

Zur Überprüfung der Anwachsrate humaner kolorektaler Tumorzellen im murinen Enddarm wurden 7 μm dicke Gefrierschnitte des Primärtumors angefertigt und mit Hilfe verschiedener immunhistochemischer Färbungen untersucht. Repräsentative Färbungen jeder verwendeten Zelllinie sind in den Abbildungen 21-23 gezeigt.

Zunächst wurde von jedem Schnitt eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefertigt. Die HE-Färbungen zeigten, dass die Tumorzellen in die Subserosa wuchsen und auch in einigen Fällen in die glatte Muskulatur reichten.

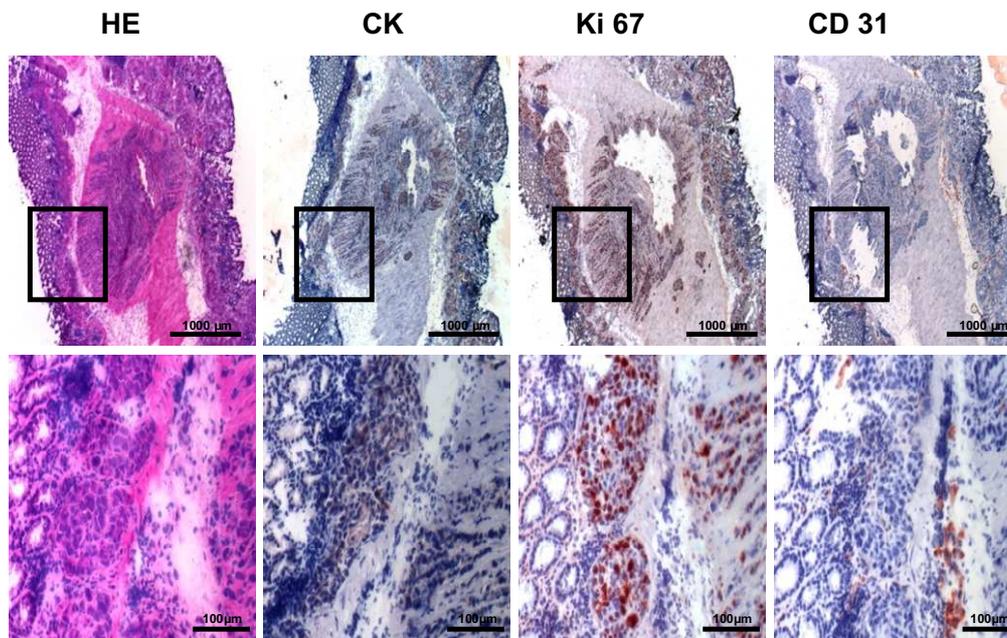


Abbildung 21: HE- und Immunhistochemische Färbungen von humanen, kolorektalen Tumorzellen (Colo 205-Luc) im murinen Kolon

Von den Primärtumoren wurden Gefrierschnitte angefertigt und mit einem monoklonalen Antikörper gegen Pan-Zytokeratin (CK), Ki67 oder murines CD31 gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin und 3-Amino-9-Ethyl Carbazole (AEC). Letztere führt zu einer rot-braunen Färbung des Gewebes. Zusätzlich wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt.

Die Pan-Zytokeratin-Färbung diente dem Nachweis von Zytokeratin in histologischen Strukturen. Der Antikörper detektiert laut Datenblatt Zytokeratine von Maus, Ratte und Menschen (Zytokeratin 4, 5, 6, 10, 13 und 18). Zytokeratine sind

Ergebnisse

Proteine, die an der interzellulären Filamentbildung beteiligt sind. Sie dienen der Stabilisierung des Zytoskeletts und werden von epithelialen Zellen gebildet. In der Pathologie wird der Nachweis dazu genutzt, um epitheliale Zellen zu färben. Die Zytokeratin-Färbungen zeigten in allen Tumoren eine Anfärbbarkeit von epithelialen Tumorzellen. Insbesondere konnte in keiner immunhistochemischen CK-Färbung murines Epithel angefärbt werden. In allen histologischen Präparaten wurde lediglich das Tumorgewebe bräunlich angefärbt. Dies wird in Abbildung 22 gezeigt.

Zusätzlich wurden Ki67-Färbungen angefertigt. Ki67 ist ein Protein, welches in der Phase der Zellteilung (G1-, S-, G2- und M- Phase) exprimiert wird (Scholzen und Gerdes, 2000). Dadurch lassen sich proliferierende von ruhenden Zellen unterscheiden. Durch die Verwendung eines humanspezifischen monoklonalen Antikörpers konnten humane proliferierende Zellen im murinen Kolon nachgewiesen werden. Sehr ausgeprägt ist dies in Abbildung 21 zu sehen.

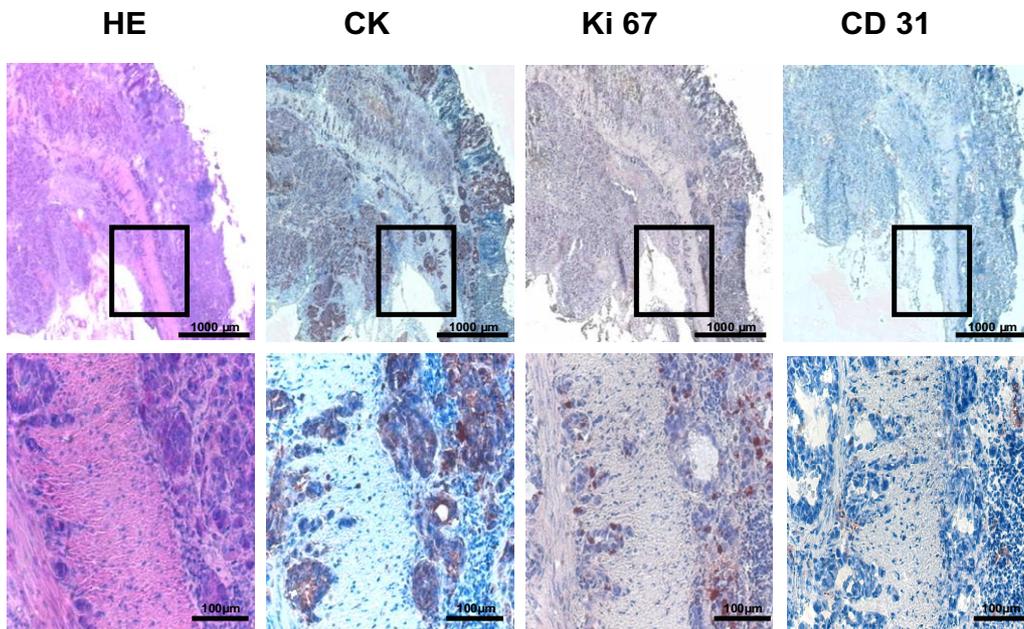


Abbildung 22: HE- und Immunhistochemische Färbungen von humanen, kolorektalen Tumorzellen (HT 29-Luc) im murinen Kolon

Von den Primärtumoren wurden Gefrierschnitte angefertigt, welche mit einem monoklonalen Antikörper gegen Pan-Zytokeratin (CK), Ki67 oder murines CD31 gefärbt wurden. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin und 3-Amino-9-Ethyl Carbazole (AEC). Letztere führt zu einer rot-braunen Färbung des Gewebes. Zusätzlich wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt.

Durch den mausspezifischen CD 31-Antikörper wird das Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) nachgewiesen, das sich auf adulten und embryonalen Endothelzellen, Blutplättchen und peripheren Leukozyten befindet. Die Färbungen zeigten in allen drei Modellen vaskuläre Strukturen auf, die unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Dies ist gut in Abbildung 21 ersichtlich.

Durch die Färbungen wurde nachgewiesen, dass alle kolorektalen Tumoren aus humanen, epithelialen Zellen bestanden, die im hohen Maße proliferierten, in die murine Muskularis und Serosa einwuchsen und von murinen Gefäßen infiltriert wurden.

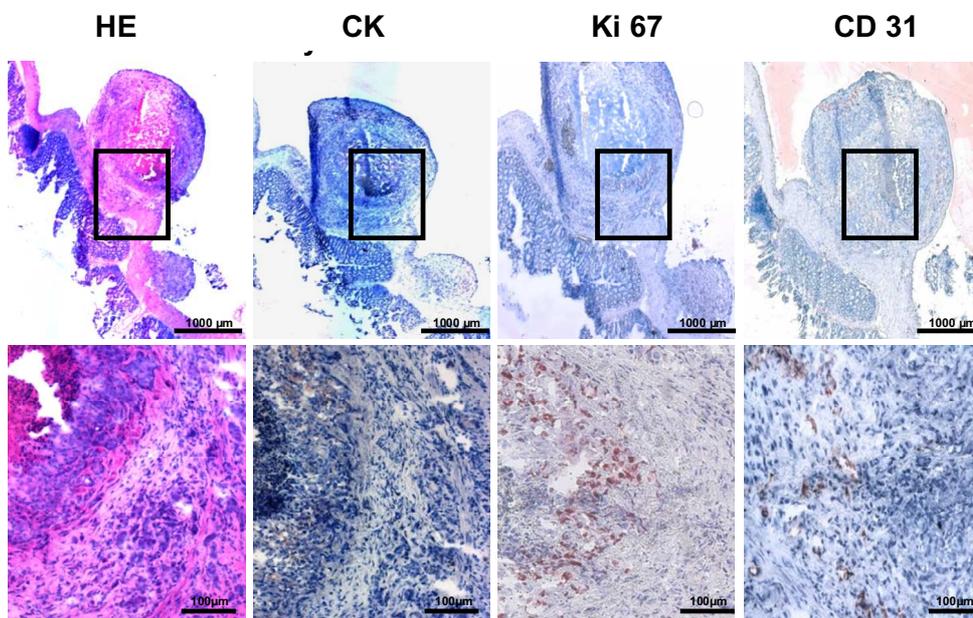


Abbildung 23: HE- und immunhistochemische Färbungen von humanen, kolorektalen Tumorzellen (HCT 116-Luc) im murinen Kolon

Von den Primärtumoren wurden Gefrierschnitte angefertigt und mit einem monoklonalen Antikörper gegen Pan- Zytokeratin (CK), Ki67 oder murines CD31 gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin und 3-Amino-9-Ethyl Carbazole (AEC). Letztere führt zu einer rot-braunen Färbung des Gewebes. Zusätzlich wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt.

5.3 Nahinfrarot Experimente

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Detektion des implantierten kolorektalen Karzinoms mittels Nahinfrarot-gekoppelter-Liganden.

Um die vom Gastrointestinaltrakt ausgehende Fluoreszenz als ein spezifisches Signal werten zu können, musste zunächst die Eigenfluoreszenz im Bereich des Magen-Darmtraktes bestimmt werden. Insbesondere pflanzliche Bestandteile, die einen großen Anteil von omnivoren Futtermitteln ausmachen, zeigen im NIR-Spektrum eine starke Eigenfluoreszenz. Diese wurde in einem Vorversuch gemessen und ist bereits experimentell bestätigt worden (Kwon et al., 2012).

Hierfür wurden die Tiere in drei Gruppen zu je drei Tieren aufgeteilt. Die Gruppen werden im Folgenden als „F 1“, „F 2“ und „F 3“ bezeichnet.

5.3.1 Analyse der Autofluoreszenz verschiedener Futtermittel

Um die aus dem Futter resultierende Fluoreszenz zu minimieren, wurden zwei verschiedene Spezialfuttermittel mit dem Standardfutter auf deren Fluoreszenz im murinen Gastrointestinaltrakt verglichen. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 24 A gezeigt. Die beiden Futtermittel wiesen einen geringen Anteil fluoreszierender Stoffe aus. Bei den fluoreszierenden Stoffen handelt es sich primär um Mangan und Chlorophyll. Im Standardfuttermittel befinden sich 100,88 mg/kg Mangan, während manganarme Diäten nur 0,41 mg/kg Mangan enthalten. In der Literatur wird das Spurenelement Mangan als potenter NIR-Fluoreszenzfarbstoff beschrieben (Perlitz et al., 2005).

Die Tiere der Gruppe „F 1“ bekamen über den Zeitraum von vier Tagen Sniff-Standardfutter als Alleinnahrung. Hierbei zeigte sich eine Zunahme der Fluoreszenz im Bereich des Gastrointestinaltraktes.

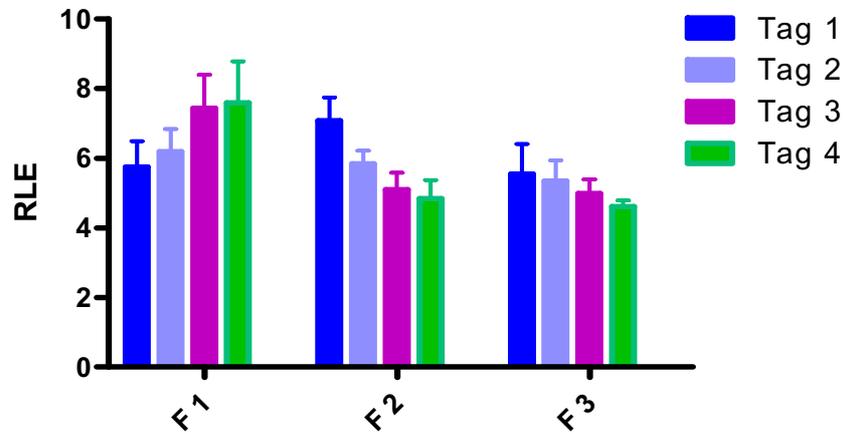
Die Tiere der Gruppe „F 2“ bekamen über vier Tage chlorophyllfreies Futter („Sniff EFM Chlorophyll free Experimentalfutter“) als Alleinfuttermittel. Es kam über den Versuchszeitraum zu einer starken Reduktion des Fluoreszenzsignales.

Ähnlich verhielt es sich mit den gemessenen Fluoreszenzsignalen der Gruppe „F 3“. Dieser Gruppe wurde über den Versuchszeitraum manganarmes Futter („Son-

derdiät C1039-Manganarme Diät“) verabreicht. Es kam ebenfalls zu einem starken Absinken des Fluoreszenzsignales über den Versuchszeitraum.

Wie in Abbildung 24 A gezeigt, kam es durch die Verfütterung der manganarmen Diäten zur deutlichsten Reduktion der Eigenfluoreszenz im Bereich des Magen-Darmtraktes. Die Tiere der Gruppe „F 3“ zeigten in den Versuchen die geringste Eigenfluoreszenz. Aufgrund dessen wurde die „Sonderdiät C1039-manganarme Diät“ von Altromin für alle Bildgebungsversuche verwendet. Ebenfalls zeigte die Analyse, dass die Gabe des Futters zwei bis drei Tage vor den Aufnahmen ausreichte, um die fütterungsbedingte Autofluoreszenz zu verringern. Da die Tiere über den gesamten Versuchszeitraum nur geringgradig an Gewicht verloren, wurde die Verfütterung des Futters als unbedenklich eingestuft. Der Gewichtsverlauf der Tiere ist in Abbildung 24 B dargestellt.

A Einfluss von Futter auf die Fluoreszenz



B Gewichtsverlauf der Versuchstiere

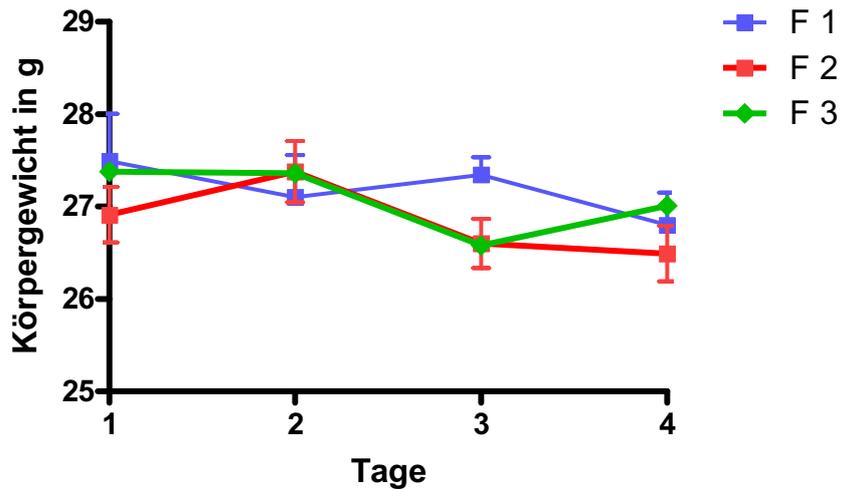


Abbildung 24: Einfluss des Futtermittels auf Autofluoreszenz und Körpergewicht

Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt (F 1, F 2, F 3); die Gruppe „F 1“ bekam normales Alleinfutter, die Gruppe „F 2“ chlorophyllfreies Futter, die Gruppe „F 3“ manganarmes Futter über einen Zeitraum von vier Tagen verabreicht. Die relativen Licht-Einheiten (RLE) wurden aus dem Verhältnis des Fluoreszenzsignales im Gastrointestinaltrakt zum Hintergrund berechnet (A). Die Ergebnisse werden gezeigt als Mittelwert + Standardabweichung.

Die Gewichts-differenz zwischen den Gruppen ist nicht signifikant (B). Die Signifikanzen wurden mittels two way ANOVA berechnet. Die Ergebnisse werden gezeigt als Mittelwert ± Standardabweichung.

5.3.2 NIR-Bildgebung der orthotopen kolorektalen Tumoren

Zur Detektion von frühen bzw. sehr kleinen Läsionen im Darm werden neue Kontrastmittel benötigt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz des neu etablierten Tumormodells für die zukünftige Evaluierung von Kontrastmitteln getestet. Die endoskopisch-mikroskopischen Untersuchungen der Darmstrukturen wurden mit einem NIR-Laser-Faserendoskop durchgeführt. Die Anregung des Lasers liegt bei 660 nm. Ferner kann das Faserendoskop die vom Kontrastmittel ausgehende Fluoreszenz im Bereich von 680 bis 900 nm detektieren.

5.3.2.1 Auswahl eines geeigneten Kontrastmittels

Zur Darstellung feingeweblicher Strukturen bzw. Tumoren wurden vier unterschiedliche NIR-Kontrastmittel getestet, die sich in ihren Mechanismen der Kontrastgebung unterschieden.

Für die Gruppe der ungerichteten Kontrastmittel wurde der freie Farbstoff Indodicarbocyanine (IDCC) eingesetzt.

Als gerichtetes Kontrastmittel wurde ein an Octreotat gekoppeltes IDCC (CG8) verwendet. Octreotat ist ein Somatostatinanalogon, welches an Somatostatinrezeptoren bindet und eine wesentlich längere Halbwertszeit besitzt ($t_{1/2}=90-120$ Minuten) als das natürliche Somatostatin ($t_{1/2}=2-4$ Minuten; Becker et al., 2001).

Als weiteres gerichtetes NIR-Kontrastmittel kam IntegriSense 680 zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um einen Integrin-Antagonisten. Dieser bindet an $\alpha_v\beta_3$ Integrine, die bei Neoangiogenese und einigen Tumoren vermehrt exprimiert werden (Desgrosellier und Cheresh, 2009).

Ebenfalls getestet wurde das Kontrastmittel ProSense750. Hierbei handelte es sich um ein sogenanntes aktivierbares Kontrastmittel. Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch Cathepsin B, L, S oder Plasmin aktiviert.

Die Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Kontrastmittel sind Tabelle 9 zu entnehmen.

Die Farbstoffe wurden den Tieren in einer Konzentration von 80 nmol/kg i.v. verabreicht. Zehn Minuten und 24 Stunden nach der Injektion wurden Aufnahmen

Ergebnisse

mit dem NIR-Faserendoskop angefertigt. Repräsentative Aufnahmen sind in Abbildung 25 gezeigt.

Die mikro-endoskopischen Aufnahmen zeigten, dass es unter Verwendung von IDCC und CG8 zu keiner Anfärbung der Darmstrukturen kam. Tiere, die als Kontrolle PBS injiziert bekommen hatten, zeigten ebenfalls keine Fluoreszenzanreicherung. Nach Injektion von ProSense750 zeigte sich eine geringgradige Darstellung der Kryptenstrukturen. Dabei waren vereinzelt hell aufleuchtende Punkte sichtbar. Dagegen zeigten die Aufnahmen nach IntegriSense680-Injektion eine deutlich sichtbare Fluoreszenz, mittels welcher histologische Strukturen der Darmwand sichtbar wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahmen 24 Stunden nach Injektion das beste Signal/Rausch-Verhältnis aufwiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den folgenden Versuchen der NIR-Bildgebung das Kontrastmittel IntegriSense680 verwendet.

Tabelle 9: Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Kontrastmittel

Die Daten der kommerziell erhältlichen Farbstoffe wurden vom Hersteller PerkinElmer übernommen. Die Werte vom IDCC wurden von Jan Körner in der Arbeitsgruppe bestimmt und wurden mit seiner Genehmigung übernommen.

Farbstoff	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
IDCC	646 nm	664,5 nm
ProSense750	750 nm	780+/-10 nm
IntegriSense680	675+/-5 nm	693 nm

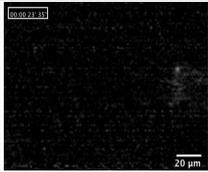
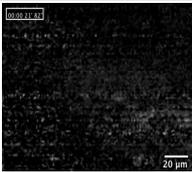
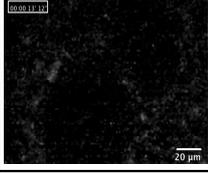
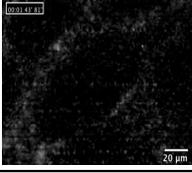
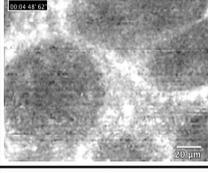
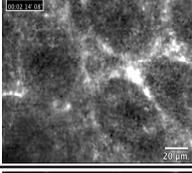
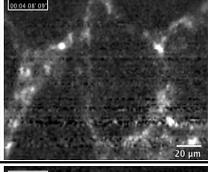
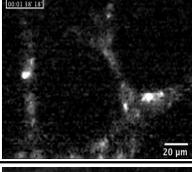
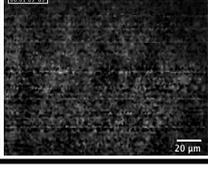
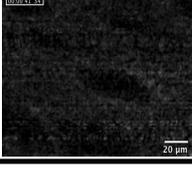
Farbstoff (80nmol/kg)	Farbstoffeigenschaften	10 Min p.i.	24 h p.i.
IDCC	Freier Farbstoff (unspezifisch)		
CG8	Gerichteter GPCR- Peptidligand		
IntegriSense	$\alpha\beta3$ Integrin Antagonist		
ProSense	Aktivierbarer Ligand		
PBS	-		

Abbildung 25: Darstellung der *in vivo* verwendeten NIR-Sonden zur Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop

Jeder Farbstoff wurde an zwei unterschiedlichen Tieren getestet. Gezeigt werden repräsentative Aufnahmen der Tiere 10 Minuten und 24 Stunden nach Sonden-Injektion (*post injectionem*; p.i.).

5.3.2.2 Kolokalisation von Fluoreszenz und Biolumineszenz

Um die spezifische Bindung des IntegriSense680 Farbstoffes nachzuweisen, wurde das Biolumineszenzsignal mit dem Nahinfrarotsignal verglichen. Es sollte gezeigt werden, dass sich der verwendete Farbstoff primär in den Biolumineszenz positiven Arealen der Versuchstiere nachweisen lässt. Dazu wurden 24 Stunden nach Gabe von IntegriSense680 die Biolumineszenz- und Fluoreszenzsignale miteinander verglichen. Repräsentative Aufnahmen zeigten sowohl *in vivo* als auch

ex vivo eine deutliche Kolokalisation von Fluoreszenz- und Biolumineszenzsignalen (Abbildung 26).

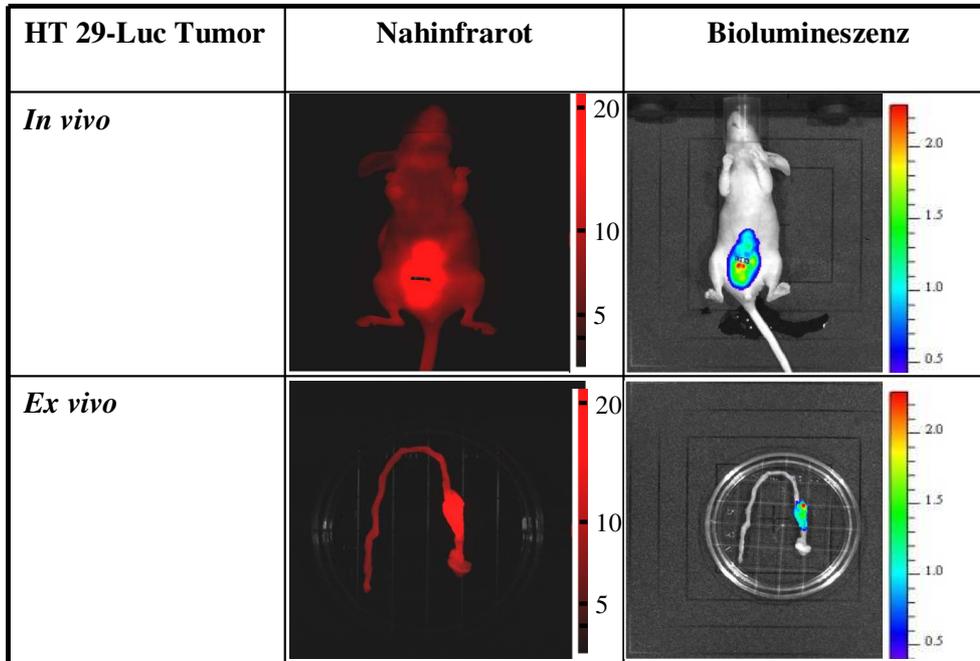


Abbildung 26: Nahinfrarot- und Biolumineszenzsignal

Gezeigt werden eine Maus mit einem orthotopen Kolonkarzinom und ein herausgenommener Darm. 24 Stunden vor der Nahinfrarot-Bildgebung wurde dem Tier IntegriSense680 injiziert. Die Skala zeigt die Fluoreszenz in Relativen Lichteinheiten (RLE) an. Die Luciferin-Injektion zur Biolumineszenz-Aufnahme (BLI) erhielt das Tier unmittelbar vor der Untersuchung. Die Werte der Skala sind in Photonen/Sekunde/Quadratmeter/Steradian ($\text{p/sec/cm}^2/\text{sr}$) $\times 10^9$ angegeben.

5.3.2.3 Etablierung der NIR-Bildgebung mit dem Faserendoskop

Die Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop sollte eine Ergänzung zur Weißlichtendoskopie sein. Für den Einsatz bei kleinen Versuchstieren gibt es bisher kein kommerziell erhältliches System, welches sowohl Weißlicht als auch Nahinfrarotlicht in einem Gerät beinhaltet. Aufgrund dessen erfolgte in der vorliegenden Arbeit ein kombiniertes Arbeiten mit dem Weißlichtendoskop und dem NIR-Faserendoskop.

Erste Versuche dazu zeigten, dass eine zeitgleiche Anwendung beider Modalitäten im Mäusedarm nicht möglich war. Zum einen war der Arbeitskanal des Weißlich-

tendoskopes zu klein, um das Faserendoskop einzuführen, zum anderen zeigte sich, dass der Mäusedarm zu klein war, um beide Geräte gleichzeitig einzuführen. Aufgrund dessen wurde in allen folgenden Versuchen die Sonde *ex vivo* verwendet. Dazu wurden den Tieren 2 nmol IntegriSense680 pro Tier intravenös verabreicht und 24 Stunden später die *ex vivo* Bildgebung des entnommenen Kolons mittels Sonde durchgeführt. Dazu wurde die Sonde wie in Abbildung 4 dargestellt, auf der gesunden Mukosa *cranial* des Tumors in Richtung Tumor bewegt. Die Sonde wurde über das Tumorgewebe geführt und auf gesunder Mukosa, *caudal* des Tumors, platziert.

Die Führung der Sonde wurde unter visueller Kontrolle des Untersuchers durchgeführt und drei Mal pro Tier wiederholt. Dabei wurden die emittierten Fluoreszenzen detektiert und zur späteren Analyse aufgezeichnet. Die makroskopisch gesunde Mukosa zeigte deutliche, gleichmäßige Kryptenstrukturen auf (Abbildung 27). Es waren feingewebliche Strukturen erkennbar: die Krypten waren im Querschnitt zu sehen und zusätzlich waren die sie auskleidenden Becherzellen apikal sichtbar. Die Fluoreszenz auf der gesunden Mukosa war gleichmäßig verteilt. Das gleiche Bild präsentierte sich in der Histologie. Im Bereich des Tumorgewebes präsentierte sich ein sehr ungleichmäßiges Bild; sehr helle Strukturen lagen neben grauen bzw. komplett schwarzen Bereichen. Es waren keine regelmäßigen Grundformen erkennbar. Durch die im Anschluss angefertigten HE-Färbungen konnten die Tumorareale zusätzlich bestätigt werden. Repräsentative Bilder sind in Abbildung 27 gezeigt.

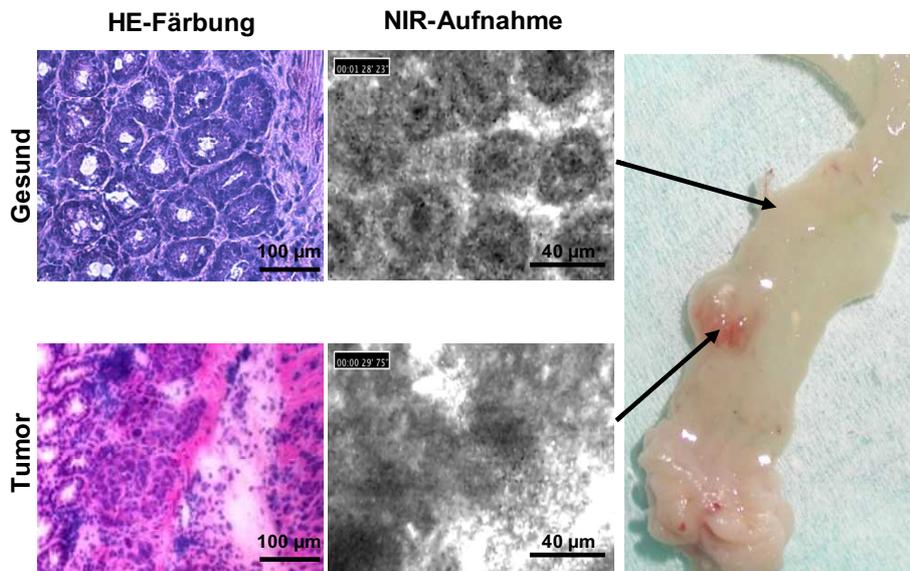


Abbildung 27: Faserendoskopische Darstellung gesunder Mukosa und Tumorgewebe

Gezeigt werden Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung) und Nahinfrarot-Aufnahmen (NIR-Aufnahmen) desselben Darmes mit einem HCT 116-Luc-Tumor. Die Pfeile markieren die Lokalisationen, auf welchen das Faserendoskop platziert wurde.

5.3.2.4 Quantitative Analyse der NIR-Fluoreszenzsignale

Nach erfolgter Aufzeichnung der Untersuchung des Darmabschnittes wurden die Messungen einzeln analysiert und ausgewertet. Repräsentativ für die Analyse sind zur Veranschaulichung für jede verwendete Tumorentität (HT 29-Luc, HCT 116-Luc, Colo 205-Luc) Aufnahmen mit den dazugehörigen Bildern in den Abbildungen 28 bis 30 gezeigt.

Zur Auswertung wurde zunächst die Fluoreszenzverteilung in der Darmwand untersucht. Dafür wurde zu Beginn der Aufnahmen über den gesamten Bildausschnitt ein *Region of Interest* (ROI) gelegt. Über diese ROI konnte mithilfe der gerätespezifischen Software die Farbstoffverteilung in der Darmwand gemessen werden (Abbildungen 28 B, 29 B und 30 B). Dabei wurde die von der Sonde detektierte Fluoreszenz über den Zeitraum gemessen, in welchem die Sonde von *cranial* nach *caudal* über die Darmmukosa bewegt wurde (Abbildungen 28 A, 29 A und 30 A). Einzelne Bilder gesunder Darmstrukturen und deren dazugehörige Histogramme sind jeweils in den Abbildungen 28 C/E, 29 C/E und 30 C/E darge-

stellt. Man erkennt deutlich in den gesunden Darmabschnitten (rot und grün) die klaren und gleichmäßigen Strukturen der Krypten. Dagegen zeigten die Aufnahmen aus dem Tumorabschnitt die typischen hellen unregelmäßigen Strukturen (Abbildung 28 D, 29 D und 30 D).

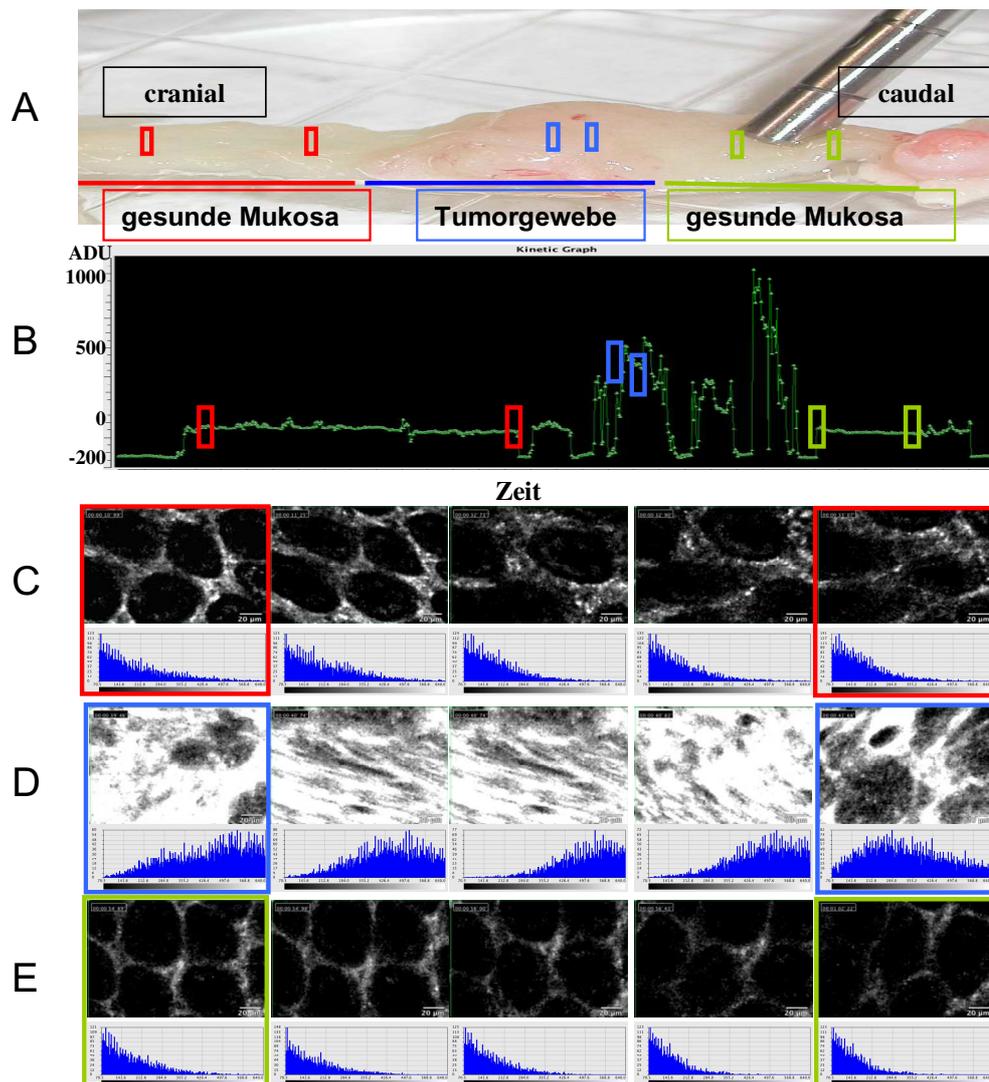


Abbildung 28: Darstellung eines HT 29-Luc-Tumors in der NIR-Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop

Die Untersuchung wurde 24 Stunden nach IntegriSense680-Injektion (2 nmol/Tier) durchgeführt. Das Faserendoskop wurde von cranial nach caudal über das Tumorgewebe bewegt (A). Eine repräsentative Messung des Fluoreszenzsignales in diesem Zeitraum ist in B dargestellt. Jeweils fünf repräsentative Bilder der Fluoreszenzmessung cranial des Tumors (C, rote Markierung), des Tumorgewebes (D, blaue Markierung) und caudal des Tumors (E, grüne Markierung) werden gezeigt. Die farbigen Markierungen auf dem Graphen und dem Foto entsprechen den darunter farbig umrandeten Aufnahmen und den dazugehörigen Histogrammen.

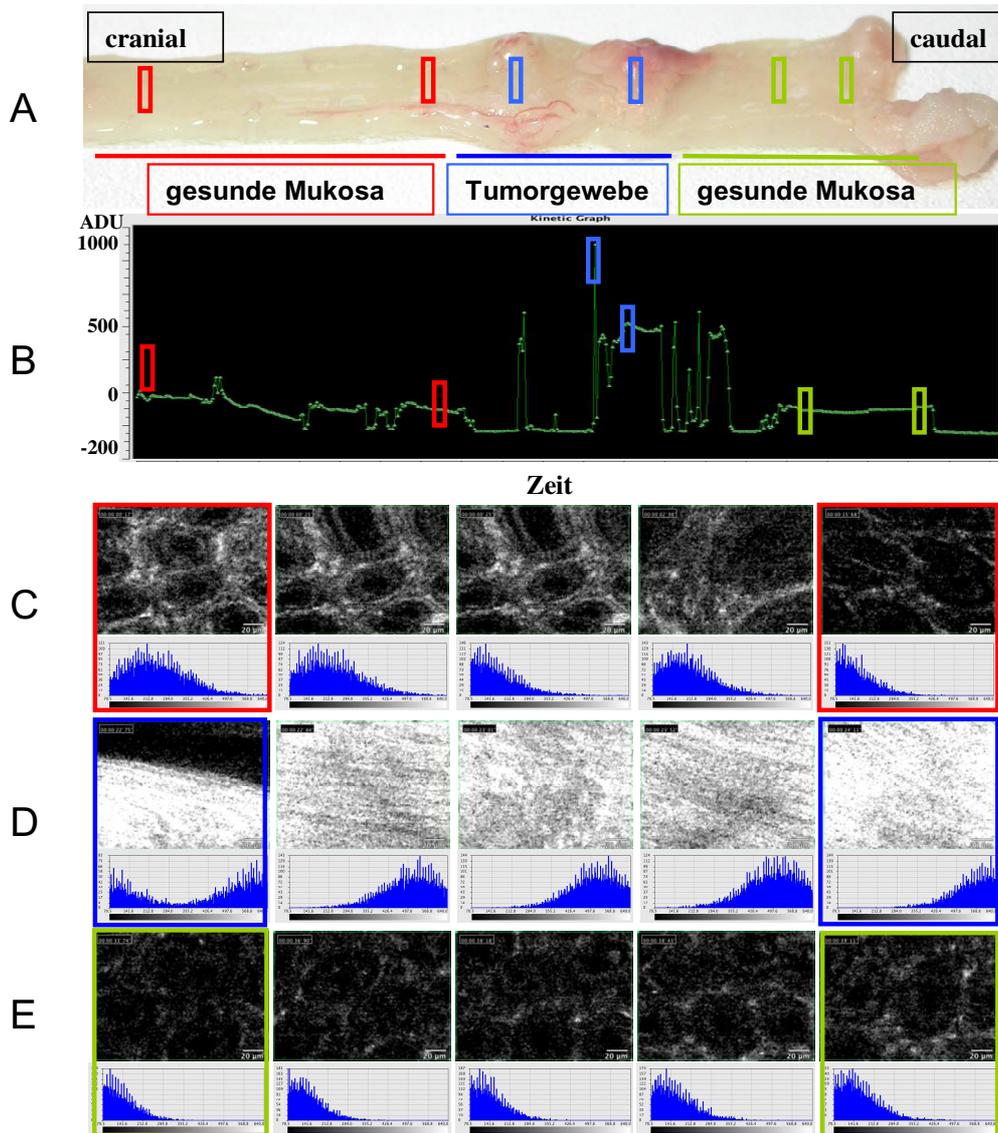


Abbildung 29: Darstellung eines HCT 116-Luc-Tumors in der NIR-Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop

Die Untersuchung wurde 24 Stunden nach IntegriSense-Injektion (2 nmol/Tier) durchgeführt. Das Faserendoskop wurde von cranial nach caudal über das Tumorgewebe bewegt (A). Eine repräsentative Messung des Fluoreszenzsignales in diesem Zeitraum ist in B dargestellt. Jeweils fünf repräsentative Bilder der Fluoreszenzmessung cranial des Tumors (C, rote Markierung), des Tumorgewebes (D, blaue Markierung) und caudal des Tumors (E, grüne Markierung) werden gezeigt. Die farbigen Markierungen auf dem Graphen und dem Foto entsprechen den darunter farbig umrandeten Aufnahmen und den dazugehörigen Histogrammen.

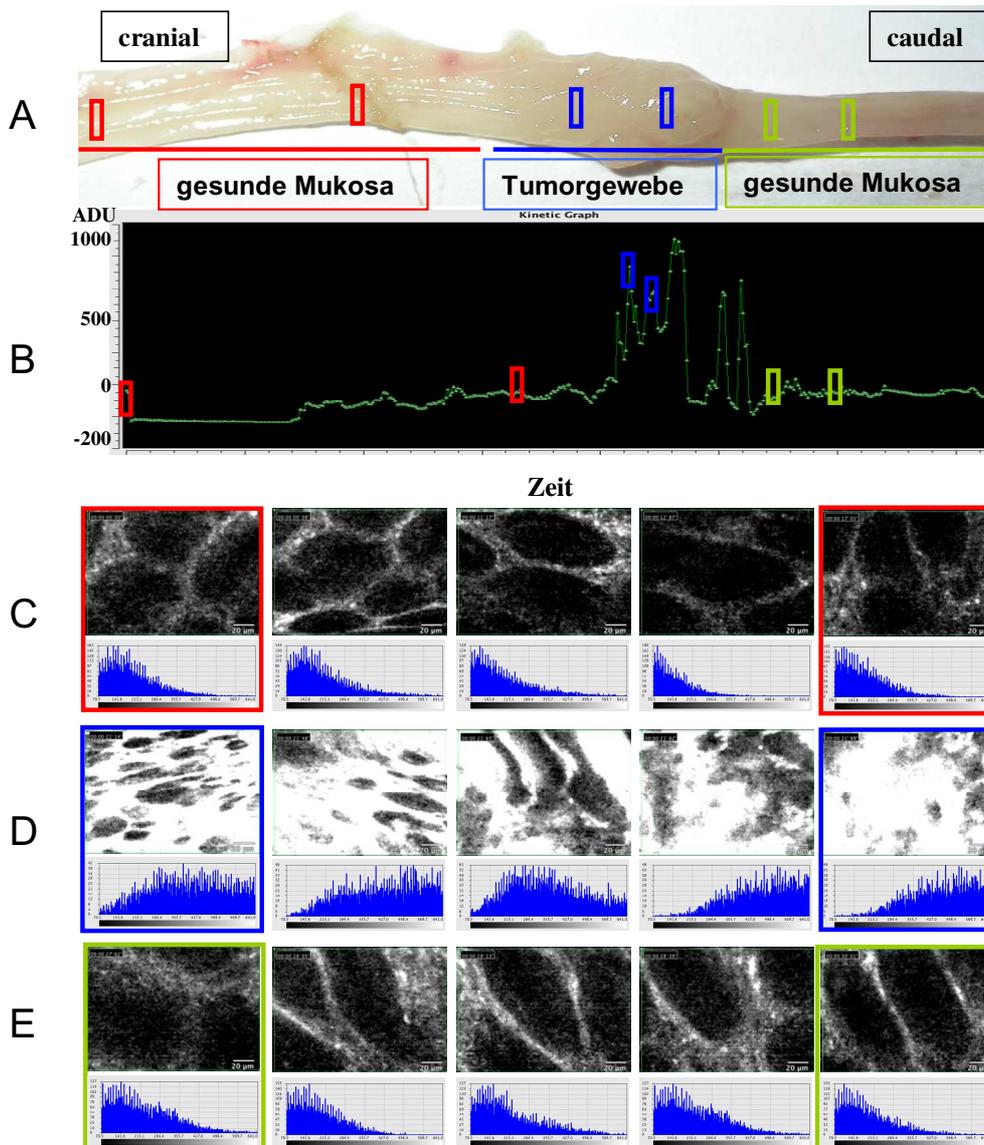


Abbildung 30: Darstellung eines Colo 205-Luc-Tumors in der NIR-Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop

Die Untersuchung wurde 24 Stunden nach IntegriSense680-Injektion (2 nmol/Tier) durchgeführt. Das Faserendoskop wurde von cranial nach caudal über das Tumorgewebe bewegt (A). Eine repräsentative Messung des Fluoreszenzsignales in diesem Zeitraum ist in Abbildung B dargestellt. Jeweils fünf repräsentative Bilder der Fluoreszenzmessung cranial des Tumors (C, rote Markierung), des Tumorgewebes (D, blaue Markierung) und caudal des Tumors (E, grüne Markierung) werden gezeigt. Die farbigen Markierungen auf dem Graphen und dem Foto entsprechen den darunter farblich umrandeten Aufnahmen und den dazugehörigen Histogrammen.

Die Fluoreszenzintensitäten wurden in *Arbitrary Digital Units* (ADU) gemessen (Ignat et al., 2009). Die Histogramme zeigen graphisch die Häufigkeitsverteilung der dunklen und hellen Fluoreszenzareale an. Waren auf den Fotos primär dunkle Areale (geringe Fluoreszenz) zu sehen, so befanden sich die Balken des Histogrammes im linken Bereich (70,5 ADU bis 355 ADU). Wurden dagegen helle Bereiche (starke Fluoreszenzen) gemessen, so verschob sich das Histogramm nach rechts (355 ADU bis 640 ADU). Wie in den obigen Abbildungen deutlich zu sehen ist, wiesen die verschiedenen Darmabschnitte die zuvor beschriebenen Eigenschaften auf. Man erkennt deutlich die Rechtsverschiebung des Histogramms in den Tumorarealen (Abbildung 28 D, 29 D und 30 D). Die statistische Auswertung dieser Fluoreszenzdaten ist in Abbildung 31 graphisch dargestellt.

Insgesamt wurden Daten von sechs HT 29-Luc, drei HCT 116-Luc und fünf Colo 205-Luc-Tumor tragenden Tieren ausgewertet. Die Tiere stammten aus Gruppe B und C. Für diesen Versuch wurden Tiere ausgewählt, die in der Endoskopie große Tumoren (*Score* >3) zeigten. Bei diesen Tieren wurde davon ausgegangen, dass die Tumoren nach longitudinaler Eröffnung des Darmes zu sehen sind. Dadurch konnte makroskopisch sichergestellt werden, dass die Sonde sowohl über gesunde Mukosa als auch über Tumorgewebe geführt wurde.

Bei der quantitativen Auswertung der Fluoreszenzintensitäten wurden die gesunden Mukosaareale *cranial* des Tumorgewebes, analog zu den Markierungen rot, das Tumorgewebe blau und die Mukosa *caudal* des Tumors in grün dargestellt (Abbildung 31).

Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die gesunden Mukosaareale, wie auch schon in der Fluoreszenzverteilung im Kolon gezeigt, ein wesentlich geringeres Fluoreszenzsignal als das Tumorgewebe aufwiesen.

Bei allen drei Zelllinien konnte *ex vivo* ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal in dem Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe gemessen werden. Die Signifikanzen wurden mit dem „one way ANOVA-Test“ berechnet. Als „post Test“ wurde der „Dunnett's-Test“ angewandt.

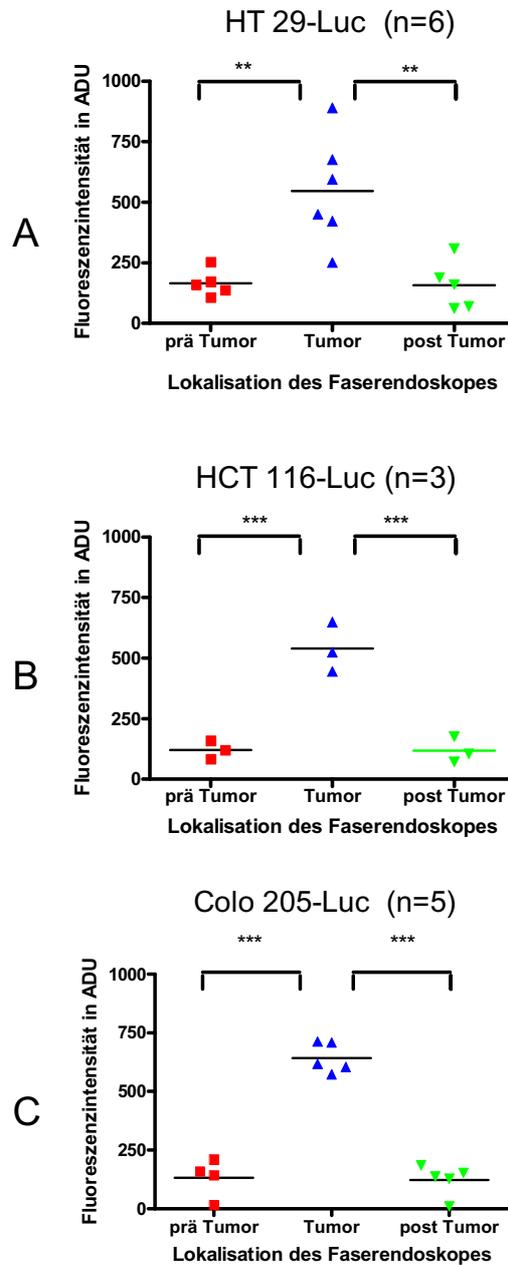


Abbildung 31: Quantifizierung der Fluoreszenzsignale der kolorektalen Tumoren

Zur Quantifizierung wurden die aufgenommenen Fluoreszenzsignale des Faserendoskopes in *Arbitrary Digital Units* (ADU) anhand der Histogramme analysiert. Dargestellt sind die Intensitäten der Fluoreszenzsignale der HT 29-Luc- (A), der HCT 116-Luc- (B) und Colo 205-Luc-Tumoren (C). Die Signifikanzen wurden mittels „one way ANOVA“ und dem post Test „Dunnett's“ berechnet. Als Referenz zu der Tumorgruppe dienten die Mukosaareale *cranial* und *caudal* der Tumoren (prä/post Tumor) Ergebnisse sind als Mittelwerte (Balken) und Einzelwerte dargestellt. Die aufgeführten Signifikanzen stellen folgende p-Werte dar: **<0,01;***<0,001.

Vereinzelt wurden auch nicht Tumor tragende Tiere mittels NIR-Faserendoskop untersucht (Abbildung 34, Anhang). Die Fluoreszenz war dabei auf der Mukosa gleichmäßig verteilt. Verglichen mit den Tumorarealen Tumor tragender Mäuse fielen Fluoreszenzintensitäten gering aus; die Fluoreszenzintensitäten waren vergleichbar mit den gesunden Mukosaarealen der Tumor tragenden Tiere. Jedoch war die Anzahl der gesunden untersuchten Tiere zu gering, um eine statistische Aussage treffen zu können.

5.3.2.5 NIR-Fluoreszenzbildgebung der Kryoschnitte

Um die Fluoreszenzsignale auf histologischer Ebene zu verifizieren, wurden 7 µm-dicke Kryoschnitte angefertigt. Die Kryoschnitte wurden auf einem Gerät zur Detektion des Nah-Infrarot-Signals untersucht. Dafür wurden sie bei 680 nm angeregt und im Emissionsbereich von 700 nm gemessen. Hierbei wurden Schnitte verwendet, bei denen sowohl Tumorgewebe als auch gesundes Gewebe sichtbar war. Zur genaueren Lokalisation des Fluoreszenzsignales wurden die Schnitte zusätzlich mit einem Zeiss-Mikroskop im Cy 5 Kanal analysiert. Die maximale Absorption liegt in diesem Kanal bei 650 nm, die Messung der Emission bei 670 nm. Hierbei konnten ähnliche Strukturen wie im HE-Bild sichtbar gemacht werden. Da dieser Wellenlängenbereich für die Anregung dieses Kontrastmittels nicht optimal war, wurden die histologischen Strukturen kaum dargestellt und die Lokalisation, an welcher sich der Farbstoff anlagerte, konnte nicht bestimmt werden. In Abbildung 32 ist die vergleichende Darstellung der Kryoschnitte jeder Tumorentität im NIR-Scanner mit dem entsprechenden HE-Bild und der NIR-Mikroskopieaufnahme gezeigt. Als Kontrolle diente der Darm einer Maus mit einem kolorektalen Tumor, die eine PBS-Injektion erhalten hatte.

Die NIR-Bildgebung im NIR-Scanner zeigte eindeutig ein verstärktes Fluoreszenzsignal im Bereich des Tumorgewebes und im Bereich der Muskularis. Des Weiteren konnte eine geringgradige Anfärbung der Mukosa beobachtet werden.

Durch die vergleichende Darstellung mit den HE-Färbungen konnte der Ort der Fluoreszenz verifiziert werden. Nicht mit Kontrastmittel angefärbte Areale im Bereich des Tumors konnten in der HE-Färbung als Nekrosen identifiziert wer-

den. Darmtumoren ohne Integrise680 zeigten – wie erwartet – kaum Fluoreszenzen auf (Abbildung 32). Die Fluoreszenzintensitäten der Kryoschnitte wurden in einem weiteren Schritt quantifiziert.

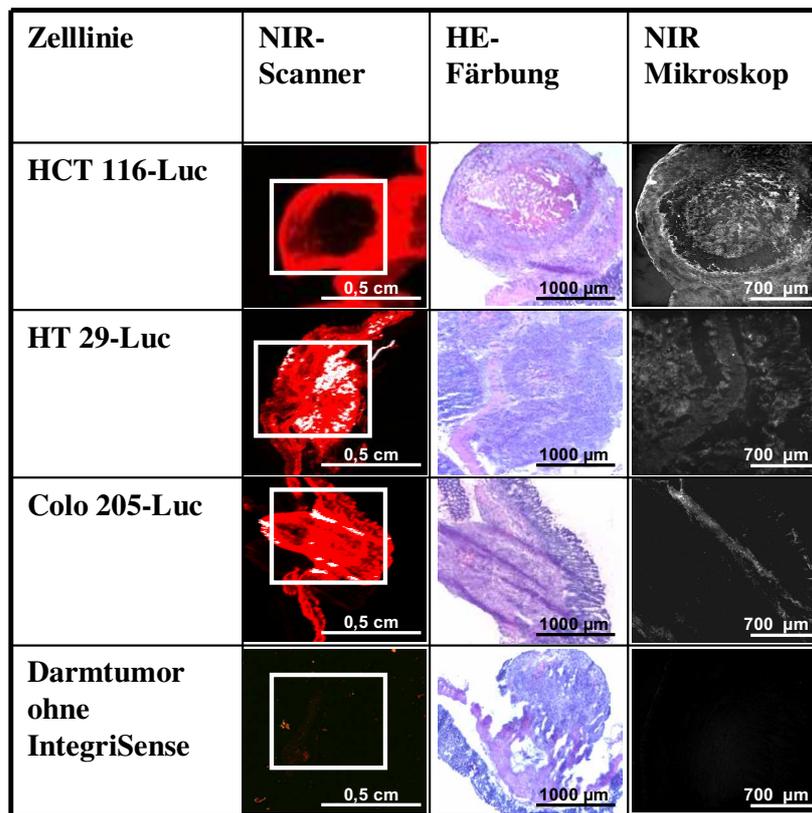


Abbildung 32: Vergleichende Darstellung orthotoper Tumoren im NIR-Fluoreszenzscanner mit HE-Färbungen und NIR-Mikroskopie

Die Mäuse der drei obersten Reihen bekamen 24 Stunden vor der Euthanasie 2 nmol Integrise680 i.v. verabreicht. Die Anregung der Kryoschnitte erfolgte auf dem NIR-Scanner bei 680 nm, die Absorption bei 700 nm. Bei den weißen Arealen auf den Tumoren handelt es sich um gesättigte Signale. Die Anregung im NIR-Mikroskop erfolgte bei 650 nm, die Messung der Emission bei 670 nm. Die Bilder der untersten Zeile zeigen einen HCT 116-Luc-Tumor im Darm einer Maus, die i.v. PBS injiziert bekam.

5.3.2.6 Quantifizierung des Fluoreszenzsignales der Kryoschnitte

Die Quantifizierung des NIR-Fluoreszenzsignales erfolgte mittels spezifischer Software. Dabei wurden verschiedene Areale (Tumor, Muskularis, Mukosa), als sogenannte *Regions of Interest* (ROI) definiert (Abbildung 33 A), die Fluoreszenzen ermittelt und Kontraste (Tumor/Muskularis bzw. Tumor/Mukosa) berechnet.

Durch die Betrachtung von Mukosa und Tumor (Abbildung 33 B) konnte gezeigt werden, dass es zu einer starken Anreicherung des Fluoreszenzsignales im Tumorgewebe kam. Die Fluoreszenz war bei Colo 205-Luc-Tumor tragenden Tieren am stärksten ausgeprägt. Bei den Fluoreszenzsignalen von Tumor und Muskularis (Abbildung 33 C) konnte aufgrund der verstärkten Anreicherung der Fluoreszenz in der Muskularis ein deutlich niedrigeres Fluoreszenzverhältnis nachgewiesen werden.

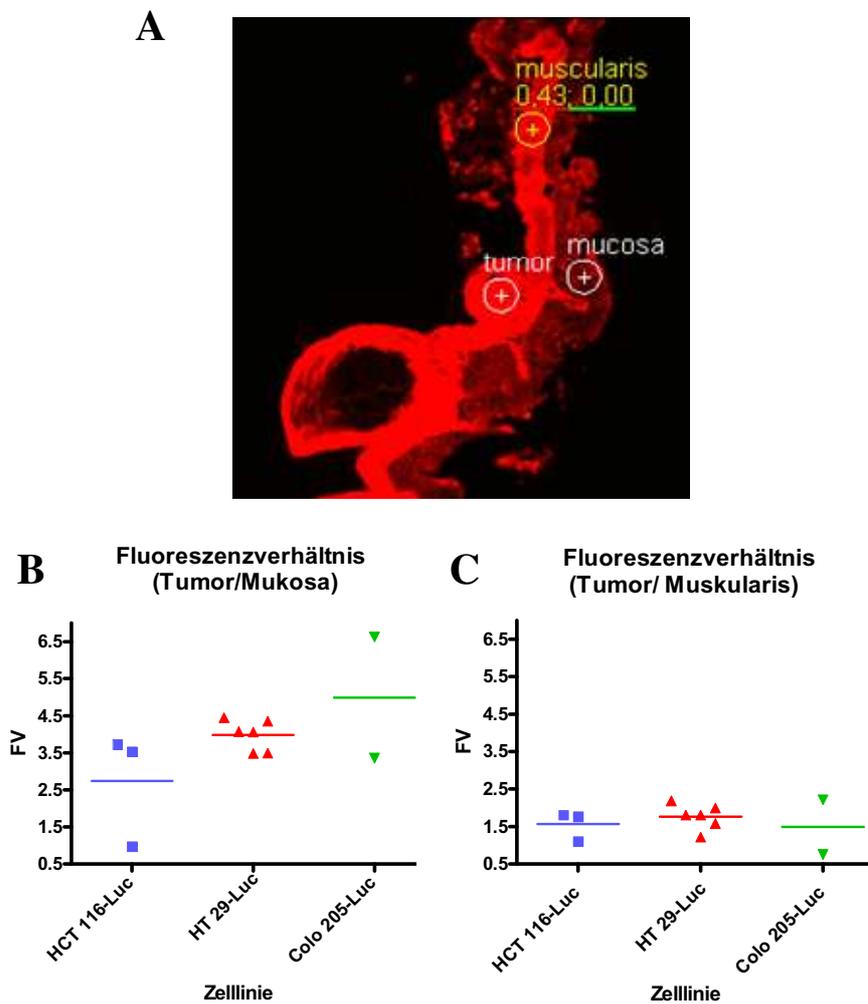


Abbildung 33: Quantifizierung des NIR-Fluoreszenzsignales der Kryoschnitte

Für die Quantifizierung wurden drei gleich große Bereiche, sog. *Regions of Interest* (ROI), ausgewählt (A). Ein ROI wurde auf dem Tumorgewebe, ein Weiteres auf die Muskularis und das Dritte auf der Mukosa platziert (A). Zur Berechnung der Fluoreszenzverhältnisse (FV) wurde die gemessene Signalintensität vom Tumorgewebe durch die gemessene Signalintensität von Mukosa bzw. Muskelgewebe geteilt. Ergebnisse sind gezeigt als Mittelwerte (Linie) und Einzelwerte (B, C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in dem hier durchgeführten Experiment und den eingesetzten Parametern gelungen ist, mittels eines Integrin-Antagonisten und einem NIR-Faserendoskop *ex vivo* Tumorgewebe von gesunder Mukosa zu unterscheiden, da es zu einer starken Farbstoffanreicherung im Tumorgewebe kam. Mithilfe des Faserendoskopes konnten die Tumoren spezifisch erkannt werden. Mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und NIR-Mikroskopie konnte bestätigt werden, dass es sich um Tumorgewebe handelt. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die Detektierung kolorektaler Karzinome im Mäusedarm auch *in vivo* funktionieren würde, wenn ein Kombinationsgerät aus einem Weißlichtendoskop und einem NIR Faserendoskop zur Verfügung stünde.

Die Fluoreszenz wurde zur näheren Lokalisation zusätzlich mit einem Gerät zur Detektierung der NIR-Fluoreszenz untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass es zu einer starken Farbstoffanreicherung im Bereich der glatten Muskulatur und des Tumorgewebes kam. Die Mukosa wurde nur geringgradig angefärbt. Aufgrund der geringen Auflösung, die mit diesem Gerät erreicht werden konnte, war eine weitere Lokalisation des Fluoreszenzsignals nicht möglich.

Ob mit dieser Untersuchungsmethode auch ulzerative Veränderungen der Darmschleimhaut oder kanzerogene Frühstadien zu differenzieren wären, ist im Rahmen dieser Dissertation nicht untersucht worden.

6 Diskussion

Das kolorektale Karzinom ist die zweithäufigste Krebserkrankung und krebbsbedingte Todesursache in Deutschland (Ferlay et al., 2010). Präventive Untersuchungen mittels endoskopischer Verfahren sind heutzutage weit entwickelt und werden routinemäßig angewendet (Schmiegel et al., 2000). Dennoch bleiben 20 % der Krebsvorstufen bei diesen Untersuchungen unentdeckt (van Rijn et al., 2006). In der Endoskopie eingesetzte Kontrastmittel sind neue Möglichkeiten, diese Präkanzerosen sichtbar zu machen (Waldner et al., 2011).

Solange adenomspezifische Kontrastmittel nicht verfügbar sind, muss die technische Entwicklung solcher Konzepte an Tiermodellen und Kontrastmitteln für Adenokarzinome verfolgt werden. Zu Beginn der Dissertation war ein orthotop implantierbares Karzinommodell im Bereich des *Colon descendens* für die endoskopische Beobachtung im Kleintier bisher nicht verfügbar.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein neues orthotopes kolorektales Tumormodell zu etablieren. Im weiteren Verlauf sollte das Modell in der NIR-Bildgebung mit zielgerichteten Kontrastmitteln zum Einsatz kommen.

6.1 Das orthotope kolorektale Tumormodell

In der vorliegenden Arbeit sollte ein orthotopes, xenogenes Modell in der Nacktmaus etabliert werden. Unter xenogener Transplantation wird die Übertragung von lebensfähigen Zellen zwischen verschiedenen Spezies verstanden (Pschyrembel, 2002d). Xenogene Modelle sind sehr gut zur Validierung targetorientierter Therapeutika und Diagnostika geeignet (Fichtner, 2008).

Orthotope Modelle zeigen, im Gegensatz zu *subcutanen* Modellen, höhere Anwachsrate und ein höheres Potential zur Metastasierung (Tan und Chu, 1985; Marincola et al., 1989). Das liegt vor allem darin begründet, dass die Tumorzellen in das Tumormikromilieu gebracht werden, aus welchem sie entstammen (Loi et al., 2011). Es ist bekannt, dass das Tumormikromilieu eine entscheidende Rolle für das Tumorstadium und die Metastasierung spielt (Hwang et al., 2008; Liao et al., 2009; Rasanen und Vaheri, 2010; Loi et al., 2011).

Ferner sind die Zielstrukturen in Form von Rezeptoren homogener ausgebildet (Fichtner, 2008). Dieses Wissen macht man sich zu Nutze, indem in der onkologischen Forschung orthotope Tumormodelle Anwendung finden (Heijstek et al., 2005; Liao et al., 2009). Zudem ähnelt das Krankheitsgeschehen des Versuchstieres dem des humanen Patienten: Je nach Krankheitsstadium entwickeln die Tiere bei kolorektalen Tumoren Obstipationen oder weisen Blut im Kot auf.

Nachteilig ist das Monitoring des Tumor-Größenwachstums; dieses ist bei orthotopen Modellen aufwendiger als bei ektopen Modellen, da die Tumormasse dem Untersucher nicht direkt zugänglich ist. Orthotope Tumormodelle werden oft aufgrund fehlender bildgebender Untersuchungseinheiten in der Forschung mittels Probelaparatomie oder Sektion von Versuchstieren überwacht, so dass die Tumoren manuell ausgemessen werden können (Takahashi et al., 2004).

Das Tumorwachstum im vorliegenden Modell wurde minimalinvasiv mittels Koloskopie und Biolumineszenz beobachtet. Durch den Einsatz dieser minimalinvasiven Untersuchungsmethoden konnte die Anzahl der Versuchstiere reduziert und das Tumorwachstum dennoch gut überwacht werden.

Zu Beginn der praktischen Versuche der vorliegenden Arbeit gab es noch kein publiziertes Modell, das für die oben genannte Zielstellung optimal geeignet war. Die in der Literatur bisher beschriebenen kolorektalen Modelle waren aufgrund ihrer *cranialen* Lage nicht mit dem starren Endoskop überwachbar (Tseng et al., 2007) oder in der Induktion zu aufwendig (Takahashi et al., 2004; Alencar et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit kann die Etablierung eines orthotopen kolorektalen Tumormodells gezeigt werden, das durch eine zehnminütige Operation induziert wurde. Jedoch ist auch für das vorliegende Modell die Eröffnung der Bauchhöhle notwendig, wodurch dem Versuchstier Schmerzen zugefügt werden. Nach Beendigung der praktischen Versuche dieser Arbeit wurde ein Tumormodell publiziert, bei welchem Tumorzellen in die durch Elektrokoagulation zerstörte Mukosa implantiert wurden (Bhullar et al., 2011). Dadurch konnte den Versuchstieren Schmerzen infolge der Bauchdeckeninzision erspart bleiben und das Infektionsrisiko minimiert werden. Bei dem Tumormodell der vorliegenden Ar-

beit erhielten die Tiere zur Verringerung des Operationsschmerzes ein Schmerzmittel.

Die Anwachsrate, das heißt der Prozentsatz der Tiere, bei denen ein Tumorstadium festgestellt werden konnte, ist ein wichtiges Kriterium für die Reproduzierbarkeit und für den präklinischen Einsatz von Tumormodellen (Killian et al., 1998). Bei dem vorliegenden Modell kam es durch Erhöhung der injizierten Zellen zu einer Verdopplung der Anwachsrate. So konnte mit 1×10^6 Zellen eine Anwachsrate von 34 % und bei Verwendung von 2×10^6 Zellen eine Anwachsrate von 66 % erzielt werden. Durch die Verwendung von Matrigel konnte eine weitere Steigerung von 20 Prozentpunkten erreicht werden. Dies wird auch von anderen Forschungsansätzen bestätigt (Fridman et al., 1990; Fridman et al., 1991). Matrigel enthält Wachstumsfaktoren, die die extrazelluläre Matrix nachempfinden und das Anwachsen der Zellen erleichtern sollen (Fridman et al., 1991). Dadurch finden die Zellen im xenogenen Wirtsorganismus in der kritischen Anfangsphase optimale Wachstumsbedingungen vor. Dabei ist die Anwachsrate unabhängig von der verwendeten Zelllinie. Andere Forscher konnten im orthotopen, xenogenen Tumormodell mit denselben Zelllinien und Matrigel in Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-Mäusen bessere Anwachsrate verzeichnen (Bhullar et al., 2011). SCID-Mäuse besitzen im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten nu/nu Nacktmäusen keine funktionstüchtigen B- und T-Lymphozyten und keine Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen; Ito et al., 2002). Nu/nu Nacktmäuse hingegen besitzen lediglich keine funktionstüchtigen T-Lymphozyten (Kelland, 2004). Dementsprechend ist ihr Immunsystem aktiver gegenüber xenogenen Zellen als das der SCID-Mäuse. Die Anwachsrate scheint somit von den Zelllinien und den verwendeten Mäusestämmen abhängig zu sein.

Mit der Verbesserung der Anwachsrate wurde durch die Erhöhung der injizierten Zellzahl auch der prozentuale Anteil der Peritonealmetastasen an den Versuchstieren erhöht (Vergleich der Injektion von 1×10^6 Zellen und 2×10^6 Zellen pro Tier). Ursächlich für das Ansteigen der Metastasen dürfte ebenfalls die höhere Anzahl der überlebenden Zellen sein, die in das Tier gelangen. Bei der Injektion der Zellen in die Darmwand entsteht ein Stichkanal. Durch die Injektion von 80 µl

Zellsuspension herrscht zum Zeitpunkt der Injektion ein großer Druck zwischen den Darmschichten. Dadurch kann es beim Retrahieren der Kanüle zum Austreten von Zellsuspension kommen. Die austretenden Zellen lagern sich bevorzugt in gut durchbluteten Arealen an, wie z. B. im Bereich der Bauchdeckeninzision. Aufgrund dessen sind die Peritonealmetastasen als operationsbedingte Abklatschmetastasen zu bewerten. Vergleicht man die Tiergruppe die 2×10^6 Zellen (Gruppe B) mit der Gruppe die 2×10^6 Zellen in Matrigel (Gruppe C) injiziert bekommen hat, so ist ein geringerer Prozentsatz an Peritonealmetastasen in Gruppe C zu beobachten. Dies kann auf den gelierenden Effekt des Matrigels zurückzuführen sein. Durch die gelartige Struktur des Matrigels wird die Injektionsstelle schneller wieder verschlossen, so dass weniger Zellen austreten können.

Das Auftreten von Metastasen im Bereich der mesenterialen Lymphknoten ist auf eine lymphogene Streuung zurückzuführen. Diese Art der Metastasierung konnte nur bei 25 % der Tiere aus Gruppe B (Injektion von 2×10^6 Zellen) der HCT 116-Luc-Zelllinie und bei 17 % der Tiere aus Gruppe C (Injektion von 2×10^6 Zellen mit Matrigel) mit einer HT 29-Luc-Zellinjektion beobachtet werden. Ferner war dies bei 11 % der Tiere mit einer Colo 205-Luc-Injektion der Gruppe C zu beobachten. Auch andere xenogene Tumormodelle weisen keine lymphogene Metastasierung auf (Jin et al., 2011). Die Literaturangaben bezüglich der Metastasierung bei xenogenen Tumormodellen variieren erheblich und scheinen wie oben beschrieben u. a. von den Zelleigenschaften und von den Versuchstieren abhängig zu sein (Tan und Chu, 1985; Marincola et al., 1989; Takahashi et al., 2004; Bhullar et al., 2011).

Zusammenfassend ist das vorliegende Modell hinsichtlich spezifischer Untersuchungen lymphogener Metastasierung nicht geeignet.

6.2 Monitoring des Tumorwachstums

Ein Nachteil orthotoper Modelle war bislang die eingeschränkte Beobachtbarkeit des Tumorwachstums. Neben der klinischen Überwachung der Versuchstiere (Abschnitt 6.2.1), war dies nur durch invasive Methoden wie Probelaparatomie (Jin et al., 2010) bzw. durch ungenaue Abschätzung wie Palpation möglich. In den

letzten Jahren ist die Bildgebung im Versuchstierbereich weit entwickelt worden (Ferris et al., 2011; Spinelli et al., 2011), so dass die Tiere minimalinvasiv über einen längeren Zeitraum untersucht werden können. Durch sequentielle Aufnahmen im μ CT kann das Tumorwachstum sehr gut über einen längeren Zeitraum verfolgt werden, ohne die Versuchstiere dafür töten zu müssen (Kersemans et al., 2011). Nachteilig daran ist, dass es hierbei zu Strahlenbelastungen der Versuchstiere kommen kann, die bei regelmäßiger Untersuchung erheblich sein können (Kersemans et al., 2011). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden wie Biolumineszenz (Funao et al., 2011; Menon et al., 2011) und Endoskopie (Alves et al., 2011; Bhullar et al., 2011) eignen sich zur Beobachtung von kolorektalen Karzinomen im Tumormodell sehr gut und beinhalten keine Gefahr der Strahlenbelastung. Durch diese bildgebenden Verfahren (Abschnitt 6.2.2) ist es möglich, die Erkrankung der Versuchstiere über die gesamte Versuchsdauer zu beobachten, ohne sie töten zu müssen.

6.2.1 Klinische Überwachung

Die Gewichtsentwicklung und das Allgemeinbefinden der Tiere sind wichtige Parameter, um deren Belastung während des Versuches einschätzen zu können (Deshpande et al., 2011; Matsunaga et al., 2011; Murase et al., 2011). Die Versuchstiere im orthotopen kolorektalen Tumormodell verloren je nach Versuchsgruppe kein Gewicht bzw. fünf bis zehn Prozent (Gruppe B und C). Es konnte kein Unterschied zwischen der Implantation unterschiedlicher Zelllinien festgestellt werden. Bei allen Tieren stabilisierte sich das Körpergewicht bis zum Versuchsende. Ein Gewichtsverlust von mehr als 20 % wird vom UK Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) als Abbruchkriterium definiert verstanden (Workman et al., 1997). In einem solchen Fall ist davon auszugehen, dass das Tier unter den Belastungen massiv leidet. Die Tiere, die im Rahmen dieser Dissertation für das Modell verwendet wurden, zeigten Gewichtsverluste von maximal 10 %. Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass das Befinden der Tiere zwar beeinträchtigt war, was jedoch durch Schmerzmanagement ausgeglichen werden konnte. Bei dem verwendeten Schmerzmittel handelte es sich um ein

Buprenorphin, einem Opiat. Opiate haben die unerwünschte Arzneimittelwirkung, dass das Hungergefühl des Patienten vermindert wird. Dies wird auch in der Entwicklung des Körpergewichtes der Tiere sichtbar. Aufgrund der Cyclooxygenase-2-Expression vieler kolorektaler Tumorzellen (Jonker et al., 2007) konnten keine nichtsteroidalen-Antiphlogistika zur Schmerzmedikation eingesetzt werden, da dies vermutlich zu einem schlechteren Anwachsen der Tumorzellen geführt hätte. Aufgrund des Gewichtsverlustes wurden die Tiere klinisch engmaschig kontrolliert. In dieser Arbeit konnte ein Untersuchungsbogen entwickelt werden, der u. a. auch dafür von Nutzen war, zu klären, ob die Tiere ein paraneoplastisches Syndrom entwickelten (Wu et al., 2002; Peluffo et al., 2004). Jedoch konnten dafür bei keinem Versuchstier Anzeichen beobachtet werden. Aufgrund dessen muss die Frage gestellt werden, ob der entwickelte Untersuchungsbogen wirklich alle möglichen Symptome des Versuchstieres „Maus“ behandelt. Aufgrund ihres Fluchttierverhaltens zeigen sie die Symptome möglicherweise in einer ganz anderen Form als humane Patienten.

Zusätzlich wurden alle Versuchstiere mit bildgebenden Verfahren untersucht, die im Folgenden diskutiert werden.

6.2.2 Bildgebende Verfahren

Im Rahmen dieser Dissertation kamen verschiedene bildgebende Verfahren zum Einsatz, um das Tumorwachstum beobachten bzw. um Tumor- von Normalgewebe unterscheiden zu können. Endoskopie und Biolumineszenz dienten der Beobachtung der Tumorentwicklung *in vivo*. Hierbei handelte es sich um minimal-invasive Diagnostikmethoden, von denen sich die Tiere sehr schnell wieder erholten. Biolumineszenz wird mitunter auch als nicht invasive Untersuchungsmethode angesehen (Pribaz et al., 2011). Beide Untersuchungsmethoden verursachten keine Schmerzen, so dass Isofluran als Anästhetikum als ausreichend angesehen wurde. Auch bei humanen Patienten wird die Koloskopie lediglich unter Propofolnarkose bzw. unter Benzodiazepinen durchgeführt (Sipe et al., 2002; Assmann und Martin, 2009), die ebenfalls keine anästhesierende Wirkung aufweisen. Durch die Durchführung der Untersuchungen unter Isoflurannarkose waren die Tiere

innerhalb von 60 Sekunden nach dem Eingriff vollständig wach und konnten am Sozialverhalten der Gruppe teilnehmen.

Die Nahinfrarot-Fluoreszenzbildgebung sollte parallel zur Endoskopie eingesetzt werden, um mit Hilfe des Fluoreszenzsignals Tumorgewebe von gesundem Gewebe unterscheiden zu können. Jedoch stellte sich im Laufe der Experimente heraus, dass dies nur eingeschränkt möglich war. Eine Orientierung im murinen Kolon war mit dem NIR-Faserendoskop nicht möglich und es konnte *in vivo* nicht zeitgleich mit dem Weißlichtendoskop und der NIR-Sonde gearbeitet werden. Aufgrund dessen wurden die Geräte einzeln verwendet: das Weisslichtendoskop und Biolumineszenz *in vivo*, das NIR-Faserendoskop *ex vivo*.

6.2.2.1 Endoskopie

Durch die Verwendung eines starren Endoskops konnte das Wachstum der kolorektalen Tumoren gut beobachtet und beurteilt werden. Vergleichbare Untersuchungen bestätigen dies (Becker et al., 2006; Neufert et al., 2007). Einmal wöchentlich wurde eine Koloskopie durchgeführt, wodurch die Situation der Versuchstiere gut eingeschätzt werden konnte. Es konnte unnötiges Leiden der Versuchstiere verhindert werden, indem der Versuch vor Eintreten klinischer Symptome beendet wurde. Zudem konnte durch die Endoskopie das Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Tumorzelllinien im orthotopen Modell gut charakterisiert werden. In orthotopen Tumormodellen zeigen die Tumorzellen, aufgrund des umgebenden Mikromilieus, oft ein anderes Wachstumsverhalten als *subcutane* Modelle oder *in vitro* (McMillin et al., 2011). Aufgrund dessen ist es bei der Etablierung neuer Tumormodelle sehr wichtig, das Wachstum der Tumorzellen genau charakterisieren zu können, um im Falle von Therapiestudien die Wirksamkeit der Medikamente beurteilen zu können.

Zusätzlich zur Verfolgung des Tumorwachstums bietet die endoskopische Untersuchung die Möglichkeit, Parameter wie die Dicke der Darmwand, die Granularität der Schleimhaut und die Gefäßeinsprossung zu erheben und den Verlauf zu dokumentieren (Becker et al., 2006; Neurath et al., 2010). Solche Veränderungen können durch die Tumorerkrankung bedingt sein, im Sinne einer Immunreaktion,

oder einen unabhängigen Nebenfund darstellen. Auch bei Versuchstieren sollte differentialdiagnostisch bei Umfangsvermehrungen im Darm an andere Ursachen gedacht werden. Grundsätzlich könnten lymphoglanduläre Komplexe in der Darmschleimhaut oder ulzerative Entzündungen ein ähnliches Bild entstehen lassen. Durch regelmäßig durchgeführte Koloskopien konnte ein endoskopischer *Score* (Becker et al., 2006) modifiziert angewandt werden, welcher die oben genannten Parameter berücksichtigt. Im Falle von angeschwollenen lymphoglandulären Komplexen ist von einer Immunreaktion des Organismus auszugehen. Diese könnte auf die durchgeführte Operation, eine Infektion oder auf den im Darm wachsenden Tumor zurückzuführen sein. Jedoch ist davon auszugehen, dass diese Reaktion nicht nur direkt neben dem Tumor bzw. der Infektion stattfindet, sondern dass mehrere lymphoglanduläre Komplexe in der Darmwand reagieren würden. Bei einer gesunden Maus ist die Darmwand so dünn, dass die an den Darm angrenzenden Organe bei der Koloskopie betrachtet werden können. Im Falle einer Immunreaktion auf den Tumor oder eine Infektion wäre die Darmwand verdickt und angrenzende Organe könnten nicht, wie beim gesunden Tier, beobachtet werden (Becker et al., 2006). Des Weiteren wäre eine erhöhte Granularität der Schleimhaut zu beobachten (Becker et al., 2006). Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnten solche Veränderungen nicht beobachtet werden, so dass immer die Verdachtsdiagnose „kolorektales Adenokarzinom“ gestellt wurde. Zudem wurde mit immunsupprimierten Tieren gearbeitet, die auf xenogenes Gewebe wenig reagieren sollten. Jedoch ist eine lokale Reaktion deshalb nicht auszuschließen. In den durchgeführten histologischen Untersuchungen konnten in den angrenzenden Arealen am Tumorgewebe keine Lymphfollikel gefunden werden.

6.2.2.2 Biolumineszenz

Ein weiteres Verfahren zur minimal-invasiven Darstellung des Tumorwachstums, welches in vielen Forschungsbereichen angewendet wird, ist die Biolumineszenz-Bildgebung (Godechal et al., 2011; Hwang et al., 2011; Keerweer et al., 2011; Massey et al., 2011).

Mit Hilfe der Biolumineszenz ist es möglich, das Wachstumsverhalten des Tumors über die Lichtemission der Tumorzellen nach Substratapplikation zu beurteilen. Ein Nachteil ist jedoch, dass hiermit nur metabolisch aktive Zellen untersucht werden können (Hochgraefe und Manelkow, 2013), das heißt, dass Nekrosen oder metabolisch inaktive Zellen mit dieser Untersuchung nicht erfasst werden.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte mit dieser Methode schon in den ersten Tagen nach der Operation beurteilt werden, ob die Implantation erfolgreich war. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine Differenz der *in vitro*- und *in vivo*-Photonenausbeuten zu beobachten war. Dies war insbesondere bei der HCT 116-Luc-Zelllinie festzustellen. Es werden auch in der Literatur Diskrepanzen zwischen der Biolumineszenz von Zellen *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Keyaerts et al., 2011). In der Literatur wird die Verabreichung von Narkosemedikamenten dafür verantwortlich gemacht, dass *in vivo* eine geringere Photonenausbeute gemessen werden kann als *in vitro* (Keyaerts et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine geringe Photonenausbeute *in vitro* dennoch zu einem hohen Biolumineszenzsignal *in vivo* führen kann. Dies ist bislang nicht publiziert worden.

Durch die Biolumineszenz kann, neben dem Tumorwachstum, das Auftreten von Metastasen detektiert werden (Podsypanina et al., 2008; Madero-Visbal et al., 2010). Dies lässt sich durch die Ergebnisse dieser Dissertation ebenfalls bestätigen. Da im Säugetier das Enzym Luciferase nicht vorkommt, ist mit einem sehr geringen Hintergrundsignal zu rechnen (Dothager et al., 2009). Nachteilig an diesem Verfahren ist, dass das Versuchstier eine *intra peritoneale* Injektion des Luciferins erhält. Dies geschieht in der Regel vor Narkoseeinleitung, um eine gute Resorption des Luciferins gewährleisten zu können. Diese Injektion bedeutet für das Versuchstier Stress (Drude et al., 2011) und es besteht immer die Gefahr der Fehlinjektion, wobei innere Organe verletzt werden können. Des Weiteren ist zu bedenken, dass durch den hohen interstitiellen Druck innerhalb des Tumors die Penetration des Luciferins gehemmt wird, was die Effizienz der Messung vermutlich beeinflusst.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass eine Kombination von Endoskopie und Biolumineszenz zur *in vivo*-Überwachung orthotoper kolorektaler Tumormodelle große Vorteile bietet: bei einer in der Koloskopie detektierten Umfangsvermehrung, in Kombination mit einem positiven Biolumineszenz-Signal konnte die Verdachtsdiagnose „kolorektales Karzinom“ gestellt werden. Dies wurde durch die im Anschluss durchgeführte Histologie bestätigt. Jedoch sollte einschränkend gesagt werden, dass im Rahmen dieser Dissertation keine echten Eichkurven des Verhältnisses zwischen Biolumineszenz und Tumorgroße aufgenommen werden konnten, da die Biolumineszenz, wie oben erwähnt, nur metabolisch aktive Zellen untersucht (Hochgraefe und Manelkow, 2013). Nekrotische Bereiche, die sich erst in der Histologie präsentierten, blieben damit unbeobachtet. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die Tumorgroße und die Biolumineszenz im Rahmen dieser Experimente miteinander korrelieren.

Ein weiteres Ziel dieser Dissertation war der Einsatz des xenogenen, kolorektalen Tumormodells in der Validierung von zielgerichteten Nahinfrarot-Kontrastmitteln. Als Zielstrukturen wurden Integrine ausgewählt.

6.2.2.3 Integrine als Zielstrukturen in der Bildgebung

Integrine sind heterodimere Glycoproteine, die aus einer α - und β -Untereinheit bestehen (Arnaout et al., 2007). Es sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die zu wenigstens 24 unterschiedlichen Integrin-Heterodimeren kombiniert werden können (Guo und Giancotti, 2004; Desgrosellier und Cheresch, 2009). Sie sind für die Adhäsion der Zelle mit der extrazellulären Matrix und für interzelluläre Kontakte verantwortlich. Je nach Kombination der Heterodimere weisen sie eine unterschiedliche Ligandenspezifität auf. Durch ihre Vielseitigkeit sind sie verantwortlich für die zytoskeletale Organisation, die Zellteilung, die Zellmigration, das Zellüberleben und die Zellproliferation (Desgrosellier und Cheresch, 2009). Neben ihren physiologischen Funktionen werden Integrine auch von einigen Tumorentitäten, wie z. B. Glioblastomen, Pankreas- und Prostatakarzinomen, vermehrt exprimiert (Guo und Giancotti, 2004; Desgrosellier und Cheresch, 2009) und sind mit bestimmten Phänotypen bei Krebserkrankungen assoziiert (Desgrosellier und

Cheresh, 2009). Bei kolorektalen Adenokarzinomen konnte ein Zusammenhang zwischen der $\alpha_v\beta_3$ Integrin-Expression und dem Überleben der Patienten nachgewiesen werden (Vonlaufen et al., 2001). Somit sind Integrine möglicherweise vielversprechende Zielmoleküle in der molekularen Bildgebung.

Das neu etablierte Tumormodell kam in der Nahinfrarot-Fluoreszenzbildgebung zum Einsatz. Mit Hilfe des Kontrastmittels und der Nahinfrarot-Fluoreszenzbildgebung sollte Tumorgewebe von gesunder Mukosa abgrenzbar sein. Das zielgerichtete Kontrastmittel sollte sich in den kolorektalen Tumoren anreichern und das gesunde Darmgewebe nur wenig anfärben. Es wurde ein Farbstoff gewählt, welcher an einen Integrin-Antagonisten gekoppelt war.

In den letzten drei Jahrzehnten wurde eine große Anzahl neuer Bildgebungsverfahren entwickelt, von denen sich einige noch in der Validierungsphase befinden, während andere schon in der Klinik eingesetzt werden (Weissleder und Pittet, 2008). Insbesondere die Bildgebung mithilfe von Nahinfrarot (NIR)-Fluoreszenz liefert spezifische Informationen, die andere Untersuchungsmethoden nicht leisten können (Keereweer et al., 2011). Farbstoffe bzw. Kontrastmittel im Nahinfrarotbereich sind von Interesse, da Nahinfrarotlicht kaum von Wasser und Hämoglobin absorbiert wird. Dies führt zu einer höheren Eindringtiefe des Nahinfrarotlichtes im Vergleich zu Weißlicht, was für die Untersuchung tieferliegender Gewebe von Vorteil ist (Grötzinger und Wiedenmann, 2004). Dennoch muss einschränkend gesagt werden, dass NIR-Licht zwar tiefer in das Gewebe eindringt, trotzdem aber das Problem der Autofluoreszenz, Absorption und Streuung bestehen bleibt.

Jedoch ist publiziert, dass mit dieser Methode *in vivo* getestet werden kann, ob bestimmte Rezeptoren auf den zu untersuchenden Geweben vorhanden sind oder nicht (Contag, 2007). Wie im Ergebnisteil erwähnt, war eine Orientierung im murinen Kolon mit dem NIR-Faserendoskop nicht möglich und es konnte *in vivo* nicht zeitgleich mit dem Weißlichtendoskop und dem NIR-Faserendoskop gearbeitet werden. Aufgrund dessen wurden die Geräte einzeln verwendet. Durch die *ex vivo* Anwendung des NIR-Faserendoskopes konnte makroskopisch überprüft werden, ob es sich auf gesunder Mukosa oder Tumorgewebe befand. Durch die vorsichtige Führung des Endoskopes über den Tumor konnten die sich dem Un-

tersucher präsentierenden Bilder eindeutig den entsprechenden Darmarealen zugeordnet werden.

Mit dem in diesem Modell verwendeten NIR-Integrin-Antagonisten ließen sich die Tumoren 24 Stunden nach Applikation *in vivo* darstellen. Dazu wurden einzelne Versuchstiere in einem Gerät zur Detektion der NIR-Fluoreszenz untersucht. Hierbei konnte nach Verabreichung des NIR-Farbstoffes ein Fluoreszenzsignal im Bereich des Abdomen detektiert werden. Wurde innerhalb der nächsten Minuten ebenfalls das Biolumineszenzsignal gemessen, so konnte eine Kolokalisation von Biolumineszenz und Fluoreszenz festgestellt werden. Dieses Bild ließ sich auch in *ex vivo* Aufnahmen bestätigen. Durch die zusätzlich stattfindende makroskopische Beurteilung des entnommenen Enddarmes konnten die fluoreszierenden und Biolumineszenz positiven Areale eindeutig den Tumorarealen zugeordnet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt (Kovar et al., 2007; Kovar et al., 2009).

In der *ex vivo* Darstellung des Darmes mittels gegen Integrin gerichteter Fluoreszenzfarbstoffe und dem NIR-Faserendoskop war es durch die Farbstoffverteilung möglich, gesunde Mukosa von Tumorgewebe zu unterscheiden. Dies konnte von anderen Autoren in xenogenen und syngenem Transplantationsmodellen bestätigt werden (Kelly et al., 2004). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in Mutationsmodellen gewonnen werden (Funovics et al., 2006; Foersch et al., 2010). Andere Autoren berichteten sogar von einer guten Dysplasie-Detektion beim humanen Patienten (Waldner et al., 2011).

In der Quantifizierung bestätigte sich, dass die Tumorareale signifikant höhere Fluoreszenzintensitäten aufwiesen als die gesunde Mukosa. Diese Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen mit ähnlicher Fragestellung bestätigt werden (Hsiung et al., 2008; Foersch et al., 2010).

Die in diesen Experimenten verwendeten HCT 116- und Colo 205-Zelllinien werden in der Literatur als $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor positiv bezeichnet (Shan, 2004; Kossodo et al., 2009). HT 29-Zellen hingegen werden als Integrin-Rezeptor negativ bzw. nur in der frühen Wachstumsphase als positiv beschrieben (Shan, 2004; Kossodo et al., 2009). In den hier aufgeführten Experimenten war kein Unter-

schied zwischen den drei Tumorentitäten hinsichtlich des gebundenen NIR-Kontrastmittels festzustellen. Dies widerspricht den bislang publizierten Angaben bezüglich der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression bei HT 29-Zellen (Shan, 2004). Die Intensität des Fluoreszenzsignals lag bei den implantierten HT 29-Luc und HCT 116-Luc-Tumoren bei 550 *Arbitrary Digital Units* (ADU), bei den Colo 205-Luc Tumoren geringgradig höher. Die gesunde Mukosa wies bei allen Versuchstieren eine Signalintensität von 125 ADU auf. Dadurch wurde gezeigt, dass es sich bei Arealen mit einer höheren Fluoreszenzintensität als 125 ADU um Tumorgewebe handelt. Dies gilt für die Werte, die im Rahmen dieses orthotopen Tumormodells entstanden sind. Wünschenswert wäre in einem nächsten Experiment dieses Tumormodell in einem Kompensationsexperiment zu testen, um die spezifische Bindung des hier verwendeten Liganden nachzuweisen. Leider stand jedoch kein unmarkierter $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Ligand zur Verfügung, so dass diese Frage ungeklärt blieb.

Um das Fluoreszenzsignal näher zu lokalisieren, wurden Kryoschnitte angefertigt und bei 680 nm Anregung im NIR-Scanner untersucht. Hierbei zeigte sich ein deutliches Fluoreszenzsignal im Bereich des Muskulatur- und Tumorgewebes. Dadurch fiel das Fluoreszenzverhältnis von Tumorgewebe zu Muskulatur geringer aus. Auch andere Gruppen beschreiben die Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen in glatter Muskulatur (Vonlaufen et al., 2001; Ishigaki et al., 2010; Jones und Ehrlich, 2011). Bei den errechneten Fluoreszenzverhältnissen zwischen Tumorgewebe und Mukosa zeigte sich hingegen eine deutliche Farbstoffanreicherung im Bereich des Tumorgewebes.

Aufgrund der geringen Auflösung des NIR-Scanners konnte die Fluoreszenz weder im Tumor noch in der Muskulatur näher lokalisiert werden.

Neben der Fluoreszenzanreicherung im Tumorgewebe wäre eine Integrin-Expression auf murinen Zellen denkbar z. B. Endothelzellen (Cai und Chen, 2006). Dies könnte ebenfalls zu einer Anreicherung des IntegriSense680 Kontrastmittels führen und durch immunhistologische Färbungen der orthotopen Tumore untersucht werden. Diese Untersuchung ist Gegenstand aktueller Forschung der Arbeitsgruppe.

Ob mittels dieses experimentellen Aufbaus auch eine Unterscheidung von ulzerativen Veränderungen und Präkanzerosen möglich wäre, konnte im Rahmen dieser Dissertation aus Zeitgründen nicht geklärt werden. Da es bei einer Kolitis zu einer Angiogenese kommt, was mit einer Expression von Integrin-Rezeptoren einhergeht (Cai und Chen, 2006), wäre eine Farbstoffanreicherung denkbar. Zudem käme es zur Migration von Leukozyten in die Mukosa, die für die extravasale Wanderung auf der Zelloberfläche ebenfalls Integrin-Rezeptoren exprimieren. Je nach Spezifität des zielgerichteten Kontrastmittels käme es dann zu falsch positiven Fluoreszenzsignalen.

Leider konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht die Eingangs-Frage beantwortet werden, ob sich Krebsvorstufen von gesunder Mukosa unterscheiden lassen. Es ist vorstellbar, dass gerade ulzerative Veränderungen der Darmschleimhaut im Rahmen einer Kolitis nicht eindeutig von Polypen unterscheidbar wären, da in beiden Fällen die Kryptenstruktur verloren geht. Würde ein zielgerichtetes Tumorspezifisches Kontrastmittel verwendet werden, wäre eine Differenzierung denkbar. Allerdings handelt es sich bei $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen um Oberflächenstrukturen, die ebenfalls auf anderen Zellenoberflächen zu finden sind: Endothelzellen, perivaskuläre Zellen, Fibroblasten, Knochenmarkzellen und Blutplättchen (Desgrosellier und Cheresch, 2009). Aufgrund dessen handelt es sich hierbei nicht um ein krebsspezifisches Zielmolekül.

Zusammenfassend konnte jedoch gezeigt werden, dass das neu entwickelte, orthotope kolorektale Tumormodell zur Validierung von NIR-Kontrastmitteln geeignet ist.

6.3 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Klinik

Zu den größten Herausforderungen der Tumormedizin gehört es, wie eingangs erwähnt, krebsspezifische Zielmoleküle (*Targets*) zu identifizieren. Diese Zielmoleküle sollen möglichst ausschließlich auf Tumorzellen, nicht aber auf gesundem Gewebe zu finden sein. Moleküle, die an diesen Strukturen binden, können an ein Kontrastmittel oder an ein Chemotherapeutikum gekoppelt werden. Auf diese Weise erhalten die Erkrankten ein molekular gerichtetes Kontrastmittel bzw.

Chemotherapeutikum, das sich primär im Tumorgewebe anreichert. Diese Substanzen werden auch als „*Theranostics*“ bezeichnet (Dubernet, 2011; Lammers et al., 2011).

In der onkologischen Chirurgie wird die NIR-Bildgebung in Kombination mit entsprechenden Kontrastmitteln zum Teil schon verfolgt. Bislang werden dabei jedoch nur ungerichtete Kontrastmittel verwendet (Hirche et al., 2011; Inoue et al., 2011). Insbesondere zur Verbesserung der Diagnostik der kolorektalen Polypen werden unspezifische Farbstoffe in der Chromoendoskopie eingesetzt. Dies führt zu einer sensitiveren Detektion der Präkanzerosen als die alleinige Koloskopie (Brown und Baraza, 2010).

Da die NIR-Diagnostik primär an oberflächlich lokalisierten Strukturen angewandt wird (van de Ven et al., 2009; Grenier und Brader, 2010), verspricht die Verwendung der NIR-Fluoreszenzdiagnostika in der Koloskopie eine gute Möglichkeit der Diagnostik des kolorektalen Karzinoms. Bei dieser Art der Untersuchung kann der Kliniker direkt auf das betroffene Organ schauen. Somit wäre die Eindringtiefe der NIR-Strahlen ausreichend, um die Mukosa zu untersuchen. In Pilotversuchen konnte gezeigt werden, dass der Einsatz eines NIR-Faserendoskopes mit NIR-Kontrastmitteln in Kombination mit einer normalen Koloskopie zur Detektion von Präkanzerosen führte (Gheonea et al., 2010; Waldner et al., 2011). Aufgrund des sehr kleinen Bildausschnittes, der durch das Faserendoskop übermittelt wird, konnte jedoch nur ein kleiner Teil der Mukosa betrachtet werden (Gheonea et al., 2010; Waldner et al., 2011).

Im Idealfall würden das Weißlichtbild und das Fluoreszenzbild fusioniert werden. Möglicherweise wären zielgerichtete Kontrastmittel dazu in der Lage, eingesunkene Polypen sichtbar zu machen. Leider handelt es sich bei $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen um Oberflächenstrukturen, die ebenfalls auf anderen Zellenoberflächen zu finden sind (Desgrosellier und Cheresch, 2009), weshalb sie als Zielstrukturen weniger in Frage kommen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in den hier durchgeführten Experimenten gelungen ist, mittels eines Integrin-Antagonisten und einem NIR-Faserendoskop *ex vivo* durch Farbstoffanreicherung Tumorgewebe von gesunder

Mukosa im murinen Tumormodell zu unterscheiden. Mithilfe des NIR-Faserendoskopes konnten die Tumoren spezifisch erkannt werden. Dass es sich um Tumorgewebe handelte, konnte durch Hämatoxylin-Eosin-Färbungen und NIR-Mikroskopie bestätigt werden. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass die Detektierung xenogener, kolorektaler Karzinome zumindest im Mäusedarm auch *in vivo* möglich wäre, wenn ein Kombinationsgerät aus einem Weißlichtendoskop und einem NIR-Faserendoskop zur Verfügung stünde.

Dieses neu etablierte orthotope kolorektale Tumormodell kann nun als Grundlage für die Validierung neuer Kontrastmittel und weitere präklinische Studien verwendet werden. Sobald adenomspezifische Biomarker verfügbar sind, können die hier gewonnenen Erkenntnisse in der Fluoreszenz- und Lumineszenzbildgebung auch als Grundlage für Untersuchungen an Tumorstufen im Versuchstier genutzt werden.

Aufgrund besonders hoher Anwachsraten der Tumorzellen in Operationsgruppe C wird für zukünftige Untersuchungen die Operationsmethode mit der Matrigel-Zellsuspension zum Einsatz kommen.

Im weiteren Verlauf muss geklärt werden, ob mit diesem Versuchsaufbau und den eingesetzten Parametern auch eine Unterscheidung von ulzerativen Veränderungen und Präkanzerosen der Mukosa möglich wäre.

7 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist die zweithäufigste Krebserkrankung in Deutschland. 95 % der kolorektalen Adenokarzinome entwickeln sich als sog. Adenome über dysplastische Veränderungen in der Mukosa. Diese Krebsvorstufen können im Rahmen einer Koloskopie entfernt werden, das von ihnen ausgehende Risiko wird damit stark vermindert. Dennoch werden bei präventiv durchgeführten Koloskopien 25 % bis 30 % der Adenome übersehen, überwiegend kleine und flache. Nahinfrarot (NIR)-Kontrastmittel sind in Kombination mit fluoreszenzunterstützter Koloskopie ein vielversprechendes Konzept, diese Vorstufen sichtbar zu machen. Solange adenomspezifische Kontrastmittel nicht verfügbar sind, muss die technische Evaluierung solcher Konzepte an Tiermodellen und Kontrastmitteln für das entwickelte Adenokarzinom verfolgt werden. Zudem war ein orthotop implantierbares Karzinommodell für die endoskopische Beobachtung im Kleintier bisher nicht verfügbar.

Ziel dieser Dissertation war es daher, auf der Basis humaner Adenokarzinomzellen ein orthotopes kolorektales Tumormodell in der immundefizienten Nacktmaus im Bereich des *Colon descendens* zu etablieren. Das Tumorstadium sollte minimalinvasiv mit einem starren Kleintierendoskop und Biolumineszenz überwacht werden. Im weiteren Verlauf sollte das Modell in der NIR-Bildgebung mit zielgerichteten Kontrastmitteln zum Einsatz kommen.

Um die Situation dem Krankheitsbild des humanen Patienten nachzuempfinden, wurden drei humane kolorektale Adenokarzinom-Zelllinien verwendet. Die Zellen stammten von Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsstadien und unterschieden sich in ihrem Wachstumsverhalten. Die Zellen wurden in unterschiedlichen Zahlen und Suspensionen transplantiert. Durch Verdopplung der injizierten Zellzahl konnte die prozentuale Anwachsrate der Tumorzellen im Versuchstier verbessert werden. Durch zusätzliche Einbettung der Zellen in eine wachstumsfaktorhaltige Gelmatrix wurden besonders hohe Anwachsrate im Versuchstier erzielt.

Die Implantation aller drei Zelllinien war erfolgreich, signifikante Unterschiede in den Anwachsrateen wurden nicht beobachtet. Das Modell wurde zusätzlich im histologischen Präparat und über immunhistochemische Analysen validiert. Tumorstwachstum und Metastasierung konnten durch die stabile Luciferase-Expression der transplantierten Adenokarzinomzellen *in vivo* mittels Luciferin-Injektion und Biolumineszenzmessung am Versuchstier überwacht werden. Durch den Einsatz des Kleintierendoskopes konnte das Tumorstwachstum direkt beobachtet werden.

Integrine spielen u. a. eine Rolle in der Entstehung und im Wachstum kolorektaler Tumoren. Erste NIR-Untersuchungen an tumortragenden Versuchstieren erfolgten mit Hilfe eines gerichteten Kontrastmittels. Dabei konnte die Expression des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins auf den transplantierten Tumorzellen ausgenutzt werden. IntegriSense680 ist ein Integrin-Antagonist, der gegen das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin gerichtet und an einen NIR-Farbstoff gekoppelt ist. Nach einer Injektion in das Versuchstier erfolgte die Analyse der Kontrastmittelverteilung im Darm mit einem NIR-Laser-Faserendoskop *ex vivo*. Damit konnte gesunde Mukosa deutlich vom Tumorgeewebe abgegrenzt werden. Durch die Kolo-kalisation des Fluoreszenz- und Biolumineszenzsignals konnte gezeigt werden, dass sich das verwendete NIR-Kontrastmittel primär in Biolumineszenz-positiven Arealen anreichert. Dies wurde auch an Kryoschnitten mit Hilfe eines NIR-Scanners bestätigt.

Dieses neu etablierte orthotope kolorektale Tumormodell kann als Grundlage für die Validierung neuer Kontrastmittel und therapeutischer Ansätze verwendet werden. Sobald adenomspezifische Biomarker verfügbar sind, können die hier gewonnenen Erkenntnisse in der Fluoreszenz- und Lumineszenzbildgebung auch als Grundlage für Untersuchungen an Tumorstufen genutzt werden. Die Kombination aus resultierenden technischen und molekularen Erkenntnissen sollte langfristig zur Entwicklung eines fluoreszenzbasierten Kontrastmittels für die präventive Koloskopie am Menschen führen.

8 Summary

Validation of fluorescent peptide-conjugates for optical imaging of gastrointestinal tumours in nude mice

Cordula Karthaus

Colorectal cancer (CRC) is the second most common cancer in Germany. 95% of colorectal carcinomas develop via dysplastic changes, so called polyps, in the mucosa of the colon. The limited identification of small polyps and neoplasms with nonpolypliod morphology is a serious problem. During colonoscopy, early dysplastic changes of the mucosa are not recognised in 25-30% of the patients. To improve visualization of surface features of the intestine, detection options need to be optimized. Near infrared (NIR) contrast agents in combination with fluorescence-guided endoscopy are promising approaches to make these precancerous lesions visible. As long as adenoma-specific contrast agents are not available, the technical evaluation of such concepts needs to be developed in animal models and contrast agents for advanced adenocarcinoma.

Orthotopic mouse models of colorectal cancer with cancer cell lines growing in their natural location replicate human disease with high fidelity and are necessary to validate tumour specific contrast agents.

Aim of this dissertation was to develop an orthotopic colorectal cancer model in nude mice with human colorectal cancer cell lines. Tumour growth was monitored by non-invasive bioluminescence imaging as well as by endoscopy. Moreover, the tumour model should be used for NIR imaging with targeted contrast agents.

To replicate human disease with high fidelity three different human colorectal carcinoma cell lines, transfected with a luciferase gene were used. The cells derived from patients with different disease stages and differed in their growth behaviour. The cells were engrafted with different cell suspensions. In different cell suspension groups different take rates were observed.

By doubling the number of injected cells, the take rate was improved. Especially by the use of Matrigel, a substance which contains growth factors for cells, high

Summary

take rates were observed. All three cell lines were implanted successfully into the colon wall of nude mice, differences in take rates between different cell lines were not observed.

Histological and immunohistochemical stainings confirmed the localization of primary tumours in the colon wall and the human origin.

Tumour growth and metastasis were monitored *in vivo* using bioluminescence by the stable luciferase expression of the transplanted cells and luciferin injection in mice. In addition tumour growth was observed directly using a small animal endoscope.

Integrins play an important role in the development and growth of colorectal tumours. First NIR studies on tumor-bearing mice were made using a specific contrast agent, called IntegriSense680. IntegriSense680 is an integrin antagonist for detection of $\alpha_v\beta_3$ integrin and is coupled to a NIR dye. The contrast agent was injected in tumor-bearing animals. After euthanasia the intestine was examined for the distribution of contrast agent with an NIR laser fiber endoscope. Using this contrast agent we could clearly distinguish between normal mucosa and tumour tissue. Colocalization of fluorescence and bioluminescence proofed that the contrast agents was in bioluminescence positive areas. These results were also confirmed by imaging tumour cryosections with a NIR scanner.

The newly established orthotopic CRC tumour model now provides the basis for further pre-clinical studies to validate new contrast agents and new targets for the diagnosis and therapy of colorectal cancer. As soon as adenoma-specific biomarkers are available, the results of fluorescence and bioluminescence imaging can be used as a basic concept for further research. The combination of technical and molecular results will hopefully lead to the development of fluorescence-based contrast agents for preventive colonoscopy in patients.

9 Literaturverzeichnis

- Assmann A, Landauer B, Radke J, Riphhaus, A, Wehrmann T, Martin H (2009) Zusammenfassung der S3 Leitlinie "Sedierung in der gastrointestinalen Endoskopie". *Anästh Intensivmed* 50: 176-181
- Ahlquist DA (2010) Molecular detection of colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 138: 2127-2139
- Alencar H, King R, Funovics M, Stout C, Weissleder R, Mahmood U (2005) A novel mouse model for segmental orthotopic colon cancer. *Int J Cancer* 117: 335-339
- Alves KZ, Borges HL, Soletti RC, Viana AL, Petrella LI, Soldan M, Chagas VL, Schanaider A, Machado JC (2011) Features of in vitro ultrasound biomicroscopic imaging and colonoscopy for detection of colon tumor in mice. *Ultrasound Med Biol* 37: 2086-2095
- Arita K, Mitsuyama K, Kawano H, Hasegawa S, Maeyama Y, Masuda J, Akagi Y, Watanabe Y, Okabe Y, Tsuruta O, Sata M (2011) Quantitative analysis of colorectal mucosal lesions by autofluorescence endoscopy: discrimination of carcinomas from other lesions. *Oncol Rep* 26: 43-48
- Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP (2007) Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 19: 495-507
- Badr CE, Tannous BA (2011) Bioluminescence imaging: progress and applications. *Trends Biotechnol* 29: 624-33

- Banks MR, Haidry R, Butt MA, Whitley L, Stein J, Langmead L, Bloom SL, O'Bichere A, McCartney S, Basherdas K, Rodriguez-Justo M, Lovat LB (2011) High resolution colonoscopy in a bowel cancer screening program improves polyp detection. *World J Gastroenterol* 17: 4308-4313
- Baumgart DC (2011) Endoscopic surveillance in Crohn's disease and ulcerative colitis: who needs what and when? *Dig Dis* 29 Suppl 1: 32-35
- Becker A, Hassenius C, Licha K, Ebert B, Sukowski U, Semmler W, Wiedemann B, Grotzinger C (2001) Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands. *Nat Biotechnol* 19: 327-331
- Becker C, Fantini MC, Neurath MF (2006) High resolution colonoscopy in live mice. *Nat Protoc* 1: 2900-2904
- Bhargava S, (2004) Carbocyanin-markierte Derivate des Vasoaktiven Intestinalen Peptids für die Tumordiagnostik. Dissertation aus dem Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin
- Bhullar JS, Subhas G, Silberberg B, Tilak J, Andrus L, Decker M, Mittal VK (2011) A novel nonoperative orthotopic colorectal cancer murine model using electrocoagulation. *J Am Coll Surg* 213: 54-60
- Bremer C, Tung CH, Weissleder R (2001) In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition. *Nat Med* 7: 743-748
- Brenner H, Haug U, Arndt V, Stegmaier C, Altenhofen L, Hoffmeister M (2009) Low risk of colorectal cancer and advanced adenomas more than 10 years after negative colonoscopy. *Gastroenterology* 138: 870-876

- Brenner H, Hoffmeister M, Stegmaier C, Brenner G, Altenhofen L, Haug U (2007) Risk of progression of advanced adenomas to colorectal cancer by age and sex: estimates based on 840,149 screening colonoscopies. *Gut* 56: 1585-1589
- Bretthauer M (2011) Colorectal cancer screening. *J Intern Med* 270: 87-98
- Brown SR, Baraza W (2010) Chromoscopy versus conventional endoscopy for the detection of polyps in the colon and rectum. *Cochrane Database Syst Rev*. 10: CD006439. doi: 10.1002/14651858
- Cai W, Chen X (2006) Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin alphavbeta3 antagonism. *Anticancer Agents Med Chem* 6: 407-428
- Ciernik IF, Dizendorf E, Baumert BG, Reiner B, Burger C, Davis JB, Lutolf UM, Steinert HC, Von Schulthess GK (2003) Radiation treatment planning with an integrated positron emission and computer tomography (PET/CT): a feasibility study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57: 853-863
- Coe SG, Wallace MB (2011) Colonoscopy: new approaches to better outcomes. *Curr Opin Gastroenterol* 28:70-75
- Contag CH (2007) In vivo pathology: seeing with molecular specificity and cellular resolution in the living body. *Annu Rev Pathol* 2: 277-305
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351: 337-345

- de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A (2000) Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18: 2938-2947
- De Palma M, Lewis CE (2011) Cancer: Macrophages limit chemotherapy. *Nature* 472: 303-304
- Desgrosellier JS, Cheresh DA (2009) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10: 9-22
- Deshpande N, Lutz AM, Ren Y, Foygel K, Tian L, Schneider M, Pai R, Pasricha PJ, Willmann JK (2011) Quantification and Monitoring of Inflammation in Murine Inflammatory Bowel Disease with Targeted Contrast-enhanced US. *Radiology* 262:172-180.
- Dothager RS, Flentie K, Moss B, Pan MH, Kesarwala A, Piwnica-Worms D (2009) Advances in bioluminescence imaging of live animal models. *Curr Opin Biotechnol* 20: 45-53
- Drude S, Geissler A, Olfe J, Starke A, Domanska G, Schuett C, Kiank-Nussbaum C (2011) Side effects of control treatment can conceal experimental data when studying stress responses to injection and psychological stress in mice. *Lab Anim (NY)* 40: 119-128
- Dubernet C (2011) Targeting for drug delivery and imaging: an overview of the state of the art in cancer. *Bull Cancer*: 1363-1371

- Ehrlich P (1909) Chemotherapeutische Trypanosomenstudien. Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie 97-115
- Ehrlich P, Morgenroth J (1901) Über Hämolysine: sechste Mitteilung. Berliner klinische Wochenschrift 38: 251-257
- Ehrlich P, Sachs H (1910) Ist die Ehrlichsche Seitenkettentheorie mit den tatsächlichen Verhältnissen vereinbar. Münchner Medizinische Wochenschrift 57: 1287-1289
- Erarslan E, Turkey C, Isik A, Uz B, Kaya A, Bavbek N (2009) Prevalence of proximal neoplasms among asymptomatic patients according to distal colorectal findings. Dig Dis Sci 54: 1312-1316
- Faiss S (2011) The missed colorectal cancer problem. Dig Dis 29 Suppl 1: 60-63
- Fass L (2008) Imaging and cancer: a review. Mol Oncol 2: 115-152
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E (2010) Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur J Cancer 46: 765-781
- Ferris CF, Smerkers B, Kulkarni P, Caffrey M, Afacan O, Toddes S, Stolberg T, Febo M (2011) Functional magnetic resonance imaging in awake animals. Rev Neuroscince 22: 665-674
- Fichtner I (2008) Präklinische Daten als Grundlage für die Konzeption klinischer Studien. Onkologie 31: 34-38

- Foersch S, Kiesslich R, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Goetz M (2010) Molecular imaging of VEGF in gastrointestinal cancer in vivo using confocal laser endomicroscopy. *Gut* 59: 1046-1055
- Frey H-H, Löscher W (2002) Antineoplastica. In: Frey H-H., Löscher W. (Hrsg): *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Enke Verlag, 485
- Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T, Martin GR, Gazdar AF, Mulshine JL (1990) Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 6698-6702
- Fridman R, Kibbey MC, Royce LS, Zain M, Sweeney M, Jicha DL, Yannelli JR, Martin GR, Kleinman HK (1991) Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel. *J Natl Cancer Inst* 83: 769-774
- Funao H, Ishii K, Nagai S, Sasaki A, Hoshikawa T, Aizawa M, Okada Y, Chiba K, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M (2011) Establishment of a real-time, quantitative and reproducible mouse model of staphylococcal osteomyelitis using bioluminescence imaging. *Infect Immun* 80: 733-741
- Funovics MA, Alencar H, Montet X, Weissleder R, Mahmood U (2006) Simultaneous fluorescence imaging of protease expression and vascularity during murine colonoscopy for colonic lesion characterization. *Gastrointest Endosc* 64: 589-597
- Gheonea DI, Saftoiu A, Ciurea T, Popescu C, Georgescu CV, Malos A (2010) Confocal laser endomicroscopy of the colon. *J Gastrointest Liver Dis* 19: 207-211

- Giulio F, Kerbel RS (2010) Types of mouse model used to test new cancer therapies. *Nature Biotechnology* 28: 561-562
- Godechal Q, Defresne F, Danhier P, Leveque P, Porporato PE, Sonveaux P, Baurain JF, Feron O, Gallez B (2011) Assessment of melanoma extent and melanoma metastases invasion using electron paramagnetic resonance and bioluminescence imaging. *Contrast Media Mol Imaging* 6: 282-288
- Grenier N, Brader P (2010) Principles and basic concepts of molecular imaging. *Pediatr Radiol* 41: 144-160
- Grötzinger C, Wiedenmann B (2004) Somatostatin receptor targeting for tumor imaging and therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1014: 258-264
- Gruber AD, Klopffleisch R (2011) Tumorpathologie. In: Baumgärtner W, Gruber A (Hrsg.): *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin*. Enke Verlag, 301
- Guo W, Giancotti FG (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 816-826
- Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, James PD, Mangham CM (1996) Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 348: 1472-1477
- Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH (2005) Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 22: 16-25
- Hewitson P, Glasziou P, Irwig L, Towler B, Watson E (2007) Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, Hemoccult. *Cochrane Database Syst Rev*: 1469-1493

- Hewitt HB (1979) A critical examination of the foundations of immunotherapy for cancer. *Clin Radiol* 30: 361-369
- Hilderbrand SA, Weissleder R (2009) Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol* 14: 71-79
- Hirche C, Mohr Z, Kneif S, Murawa D, Hunerbein M (2011) High rate of solitary sentinel node metastases identification by fluorescence-guided lymphatic imaging in breast cancer. *J Surg Oncol* 105:162-166
- Hlavaty T, Huorka M, Koller T, Zita P, Kresanova E, Rychly B, Toth J (2011) Colorectal cancer screening in patients with ulcerative and crohn's colitis with use of colonoscopy, chromoendoscopy and confocal endomicroscopy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 23: 680-689
- Hochgraefe K, Mandelkow E (2013) Making the brain glow: in vivo bioluminescence imaging to study neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 47: 868-2
- Hsiung PL, Hardy J, Friedland S, Soetikno R, Du CB, Wu AP, Sahbaie P, Crawford JM, Lowe AW, Contag CH, Wang TD (2008) Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. *Nat Med* 14: 454-458
- Hwang JY, Wachsmann-Hogiu S, Ramanujan VK, Ljubimova J, Gross Z, Gray HB, Medina-Kauwe LK, Farkas DL (2011) A Multimode Optical Imaging System for Preclinical Applications In Vivo: Technology Development, Multiscale Imaging, and Chemotherapy Assessment. *Mol Imaging Biol.* 14:431-442

- Hwang RF, Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD (2008) Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Res* 68: 918-926
- Ignat M, Aprahamian M, Lindner V, Altmeyer A, Perretta S, Dallemagne B, Mutter D, Marescaux J (2009) Feasibility and reliability of pancreatic cancer staging using fiberoptic confocal fluorescence microscopy in rats. *Gastroenterology* 137: 1584-1592
- Ignatenko NA, Besselsen DG, Stringer DE, Blohm-Mangone KA, Cui H, Gerner EW (2008) Combination chemoprevention of intestinal carcinogenesis in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Nutr Cancer* 60 Suppl 1: 30-35
- Ignatenko NA, Gerner EW, Besselsen DG (2011) Defining the role of polyamines in colon carcinogenesis using mouse models. *J Carcinog* 10: 10
- Imperiale TF, Glowinski EA, Lin-Cooper C, Larkin GN, Rogge JD, Ransohoff DF (2008) Five-year risk of colorectal neoplasia after negative screening colonoscopy. *N Engl J Med* 359: 1218-1224
- Inoue S, Shiina H, Arichi N, Mitsui Y, Hiraoka T, Wake K, Sumura M, Honda S, Yasumoto H, Urakami S, Matsubara A, Igawa M (2011) Identification of lymphatic pathway involved in the spreading of prostate cancer by fluorescence navigation approach with intraoperatively injected indocyanine green. *Can Urol Assoc J* 5: 254-259

- Ishigaki T, Imanaka-Yoshida K, Shimojo N, Matsushima S, Taki W, Yoshida T (2010) Tenascin-C enhances crosstalk signaling of integrin α v β 3/PDGFR- β complex by SRC recruitment promoting PDGF-induced proliferation and migration in smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 226: 2617-2624
- Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T (2002) NOD/SCID/ γ (c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175-3182
- Jin H, Yang Z, Wang J, Zhang S, Sun Y, Ding Y (2011a) A superficial colon tumor model involving subcutaneous colon translocation and orthotopic transplantation of green fluorescent protein-expressing human colon tumor. *Tumour Biol* 32: 391-397
- Jin XF, Chai TH, Shi JW, Yang XC, Sun QY (2011b) A meta-analysis for evaluating the accuracy of endoscopy with narrow band imaging in detecting colorectal adenomas. *J Gastroenterol Hepatol* 27: 882-887
- Jobsis FF (1977) Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 198: 1264-1267
- Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, Kalyandrug S, Christian M, Arbuck S, Hollingshead M, Sausville EA (2001) Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer* 84: 1424-1431
- Jones C, Ehrlich HP (2011) Fibroblast expression of α -smooth muscle actin, α 2 β 1 integrin and α v β 3 integrin: influence of surface rigidity. *Exp Mol Pathol* 91: 394-399

- Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ (2007) Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 357: 2040-2048
- Keereweer S, Mol IM, Kerrebijn JD, Van Driel PB, Xie B, Baatenburg de Jong RJ, Vahrmeijer AL, Lowik CW (2011) Targeting integrins and enhanced permeability and retention (EPR) effect for optical imaging of oral cancer. *J Surg Oncol* 105: 714-718
- Kelland LR (2004) Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40: 827-836
- Kelly K, Alencar H, Funovics M, Mahmood U, Weissleder R (2004) Detection of invasive colon cancer using a novel, targeted, library-derived fluorescent peptide. *Cancer Res* 64: 6247-6251
- Kersemans V, Thompson J, Cornelissen B, Woodcock M, Allen PD, Buls N, Muschel RJ, Hill MA, Smart SC (2011) Micro-CT for anatomic referencing in PET and SPECT: radiation dose, biologic damage, and image quality. *J Nucl Med* 52: 1827-1833
- Keyaerts M, Caveliers V, Lahoutte T (2012) Bioluminescence imaging: looking beyond the light. *Trends Mol Med* 18: 164-172
- Keyaerts M, Remory I, Caveliers V, Breckpot K, Bos TJ, Poelaert J, Bossuyt A, Lahoutte T (2011) Inhibition of firefly luciferase by general anesthetics: effect on in vitro and in vivo bioluminescence imaging. *PLoS One* 7: e30061

- Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ (1998) Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* 17: 279-284
- Kossodo S, Pickarski M, Lin SA, Gleason A, Gaspar R, Buono C, Ho G, Blusztajn A, Cuneo G, Zhang J, Jensen J, Hargreaves R, Coleman P, Hartman G, Rajopadhye M, Duong le T, Sur C, Yared W, Peterson J, Bednar B (2009) Dual in vivo quantification of integrin-targeted and protease-activated agents in cancer using fluorescence molecular tomography (FMT). *Mol Imaging Biol* 12: 488-499
- Kovar JL, Simpson MA, Schutz-Geschwender A, Olive DM (2007) A systematic approach to the development of fluorescent contrast agents for optical imaging of mouse cancer models. *Anal Biochem* 367: 1-12
- Kovar JL, Volcheck W, Sevick-Muraca E, Simpson MA, Olive DM (2009) Characterization and performance of a near-infrared 2-deoxyglucose optical imaging agent for mouse cancer models. *Anal Biochem* 384: 254-262
- Ksienski D (2011) Imatinib mesylate: past successes and future challenges in the treatment of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Med Insights Oncol* 5: 365-379
- Kwon S, Davies-Venn C, Sevick-Muraca EM (2012) In vivo dynamic imaging of intestinal motions using diet-related autofluorescence. *Neurogastroenterol Motil* 24: 494-497
- Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G (2011) Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J Control Release* 161: 175-187

- Lee KS, Jeong YJ, Han J, Kim BT, Kim H, Kwon OJ (2004) T1 non-small cell lung cancer: imaging and histopathologic findings and their prognostic implications. *Radiographics* 24: 1617-1636
- Li Y, Tang ZY, Hou JX (2011) Hepatocellular carcinoma: insight from animal models. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:32-43
- Liao D, Luo Y, Markowitz D, Xiang R, Reisfeld RA (2009) Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *PLoS One* 4: e7965; doi: 10.1371
- Liu Y, Bajjuri KM, Liu C, Sinha SC (2011) Targeting Cell Surface Alpha(v)beta(3,5) Integrins Increases Therapeutic Efficacies of a Legumain Protease-Activated Auristatin Prodrug. *Mol Pharm* 9: 168-175
- Loi M, Paolo D, Becherini A, Alessia Z, PERRI P, Carosio R, Cilli M, RIBATTI D, Brignole C, Pagnan G, Ponzoni M, Pastorino F (2011) The use of the orthotopic model to validate antivasular therapies for cancer. *The International Journal of Developmental Biology* 55: 547-555
- Luo S, Zhang E, Su Y, Cheng T, Shi C (2011) A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials* 32: 7127-7138
- Madero-Visbal RA, Colon JF, Hernandez IC, Limaye A, Smith J, Lee CM, Arlen PA, Herrera L, Baker CH (2010) Bioluminescence imaging correlates with tumor progression in an orthotopic mouse model of lung cancer. *Surg Oncol* 21: 23-29

- Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, Ederer F (1993) Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 328: 1365-1371
- Mandel JS, Church TR, Ederer F, Bond JH (1999) Colorectal cancer mortality: effectiveness of biennial screening for fecal occult blood. *J Natl Cancer Inst* 91: 434-437
- Marincola FM, Drucker BJ, Siao DY, Hough KL, Holder WD, Jr. (1989) The nude mouse as a model for the study of human pancreatic cancer. *J Surg Res* 47: 520-529
- Martirosyan NL, Cavalcanti DD, Eschbacher JM, Delaney PM, Scheck AC, Abdelwahab MG, Nakaji P, Spetzler RF, Preul MC (2012) Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green to detect the boundary of infiltrative tumor. *J Neurosurg* 115: 1131-1138
- Massey S, Johnston K, Mott TM, Judy BM, Kvitko BH, Schweizer HP, Estes DM, Torres AG (2011) In vivo Bioluminescence Imaging of *Burkholderia mallei* Respiratory Infection and Treatment in the Mouse Model. *Front Microbiol* 2: 174
- Matsunaga H, Hokari R, Ueda T, Kurihara C, Hozumi H, Higashiyama M, Okada Y, Watanabe C, Komoto S, Nakamura M, Kawaguchi A, Nagao S, Sekiyama A, Miura S (2011) Physiological stress exacerbates murine colitis by enhancing proinflammatory cytokine expression that is dependent on IL-18. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301: 555-564
- McMillin DW, Delmore J, Negri J, Ooi M, Klippel S, Miduturu CV, Gray NS, Richardson PG, Anderson KC, Kung AL, Mitsiades CS (2011)

Microenvironmental influence on pre-clinical activity of polo-like kinase inhibition in multiple myeloma: implications for clinical translation. *PLoS One* 6: e20226. doi: 10.1371

Menon LG, Pratt J, Yang HW, Black PM, Sorensen GA, Carroll RS (2011) Imaging of human mesenchymal stromal cells: homing to human brain tumors. *J Neurooncol* 107: 257-267

Murase T, Hattori T, Ohtake M, Abe M, Amakusa Y, Takatsu M, Murohara T, Nagata K (2011) Cardiac remodeling and diastolic dysfunction in DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats: a new animal model of metabolic syndrome. *Hypertens Res* 35: 186-193

Muto T, Kamiya J, Sawada T, Konishi F, Sugihara K, Kubota Y, Adachi M, Agawa S, Saito Y, Morioka Y, et al. (1985) Small "flat adenoma" of the large bowel with special reference to its clinicopathologic features. *Dis Colon Rectum* 28: 847-851

Naber HP, Wiercinska E, Pardali E, van Laar T, Nirmala E, Sundqvist A, van Dam H, van der Horst G, van der Pluijm G, Heckmann B, Danen EH, Ten Dijke P (2011) BMP-7 inhibits TGF-beta-induced invasion of breast cancer cells through inhibition of integrin beta(3) expression. *Cell Oncol (Dordr)* 35: 19-28

Neufert C, Becker C, Neurath MF (2007) An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* 2: 1998-2004

Neurath MF, Wittkopf N, Wlodarski A, Waldner M, Neufert C, Wirtz S, Gunther C, Becker C (2010) Assessment of tumor development and wound healing using endoscopic techniques in mice. *Gastroenterology* 139: 1837-1843

- Neves AA, Brindle KM (2006) Assessing responses to cancer therapy using molecular imaging. *Biochim Biophys Acta* 1766: 242-261
- Ochendusko SL, Krzemieniecki K (2010) Targeted therapy in advanced colorectal cancer: more data, more questions. *Anticancer Drugs* 21: 737-748
- Okita NT, Esaki T, Baba E, Sakai D, Tokunaga S, Takiuchi H, Mizunuma N, Nagashima K, Kato K (2011) A multicenter phase II study of the stop-and-go modified FOLFOX6 with bevacizumab for first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs* 4:e7965. doi: 10.1371
- Pawelek JM, Chakraborty AK (2008) The cancer cell--leukocyte fusion theory of metastasis. *Adv Cancer Res* 101: 397-444
- Peluffo GD, Stillitani I, Rodriguez VA, Diament MJ, Klein SM (2004) Reduction of tumor progression and paraneoplastic syndrome development in murine lung adenocarcinoma by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Int J Cancer* 110: 825-830
- Perlitz C, Licha K, Scholle FD, Ebert B, Bahner M, Hauff P, Moesta KT, Schirner M (2005) Comparison of two tricarboyanine-based dyes for fluorescence optical imaging. *J Fluoresc* 15: 443-454
- Pizzo E, Pezzoli A, Stockbrugger R, Bracci E, Vagnoni E, Gullini S (2011) Screenee perception and health-related quality of life in colorectal cancer screening: a review. *Value Health* 14: 152-159
- Podsypanina K, Du YC, Jechlinger M, Beverly LJ, Hambarzumyan D, Varmus H (2008) Seeding and propagation of untransformed mouse mammary cells in the lung. *Science* 321: 1841-1844

- Poellinger A, Burock S, Grosenick D, Hagen A, Ludemann L, Diekmann F, Engelken F, Macdonald R, Rinneberg H, Schlag (2011) PM Breast cancer: early- and late-fluorescence near-infrared imaging with indocyanine green--a preliminary study. *Radiology* 258: 409-416
- Prescher JA, Contag CH (2009) Guided by the light: visualizing biomolecular processes in living animals with bioluminescence. *Curr Opin Chem Biol* 14: 80-89
- Pribaz JR, Bernthal NM, Billi F, Cho JS, Ramos RI, Guo Y, Cheung AL, Francis KP, Miller LS (2011) Mouse model of chronic post-arthroplasty infection: Noninvasive in vivo bioluminescence imaging to monitor bacterial burden for long-term study. *J Orthop Res* 30(3):335-340
- Pschyrembel (2002a) *Klinisches Wörterbuch* 259. Auflage. de Gruyter Verlag, 18
- Pschyrembel (2002b) *Klinisches Wörterbuch* 259. Auflage. de Gruyter Verlag, 836-837
- Pschyrembel (2002c) *Klinisches Wörterbuch* 259. Auflage. de Gruyter Verlag, 294
- Pschyrembel (2002d) *Klinisches Wörterbuch* 259. Auflage. de Gruyter Verlag, 1681
- Pschyrembel (2002e) *Klinisches Wörterbuch* 259. Auflage. de Gruyter Verlag, 984

Pschyrembel (2002f) Klinisches Wörterbuch 259. Auflage. de Gruyter Verlag, 802

Puppa MJ, White JP, Sato S, Cairns M, Baynes JW, Carson JA (2011) Gut barrier dysfunction in the Apc(Min/+) mouse model of colon cancer cachexia. *Biochim Biophys Acta* 1812: 1601-1606

Pysz MA, Gambhir SS, Willmann JK (2010) Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin Radiol* 65: 500-516

Rasanen K, Vaehri A (2010) Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res* 316: 2713-2722

Repici A, Di Stefano AF, Radicioni MM, Jas V, Moro L, Danese S (2011) Methylene blue MMX(R) tablets for chromoendoscopy. Safety tolerability and bioavailability in healthy volunteers. *Contemp Clin Trials* 33: 260-267

RKI, GEKID (2010) Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. In: Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2005/2006; Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe 2010. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 36-40

Roncali E, Savinaud M, Levrey O, Rogers KL, Maitrejean S, Tavitian B (2008) New device for real-time bioluminescence imaging in moving rodents. *J Biomed Opt* 13: 054035. doi 10.1117/1

Schallhorn A (2009) Therapie des metastasierten Rektumkarzinoms. In: *Onkologie, Interdisziplinäre Fortbildung in der Onkologie Sonderdruck*: 43-52

Schmiegel W, Adler G, Frühmorgen P, Folsch H, Graeven U, Layer P, Petrasch S, Porschen R, Pox C, Sauerbruch T, Schmoll H-J, Zeitz M (2000) Kolorektales Karzinom: Prävention und Früherkennung in der asymptomatischen Bevölkerung – Vorsorge bei Risikogruppen – Endoskopische Diagnostik und Therapie von Polypen und Karzinome. *Z Gastroenterol* 38:49-78

Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182: 311-322

Shan L (2004) VivoTag-S680-conjugated 3-aminomethyl alphavbeta3 antagonist derivative for fluorescence molecular tomography of tumors. *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013. 2010 Jan 06 [updated 2010 May 19]

Sipe BW, Rex DK, Latinovich D, Overley C, Kinser K, Bratcher L, Kareken D (2002) Propofol versus midazolam/meperidine for outpatient colonoscopy: administration by nurses supervised by endoscopists. *Gastrointest Endosc* 55: 815-825

Sipkins DA, Cheresch DA, Kazemi MR, Nevin LM, Bednarski MD, Li KC (1998) Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphaVbeta3-targeted magnetic resonance imaging. *Nat Med* 4: 623-626

Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C (2009) *TNM Classification of Malignant Tumours Seventh Edition Changes between the 6th and 7th editions.* Wiley Blackwell. <http://www.uicc.org/node/7735> (date: 20.6.2012)

- Solomon M, Guo K, Sudlow GP, Berezin MY, Edwards WB, Achilefu S, Akers WJ (2011) Detection of enzyme activity in orthotopic murine breast cancer by fluorescence lifetime imaging using a fluorescence resonance energy transfer-based molecular probe. *J Biomed Opt* 16: 066019
- Spinelli AE, Meo SL, Calandrino R, Sbarbati A, Boschi F (2011) Optical imaging of Tc-99m-based tracers: in vitro and in vivo results. *J Biomed Opt* 16: 116023
- Takahashi T, Morotomi M, Nomoto K (2004) A novel mouse model of rectal cancer established by orthotopic implantation of colon cancer cells. *Cancer Sci* 95: 514-519
- Tan MH, Chu TM (1985) Characterization of the tumorigenic and metastatic properties of a human pancreatic tumor cell line (AsPC-1) implanted orthotopically into nude mice. *Tumour Biol* 6: 89-98
- Tanaka T, Kohno H, Yoshitani S, Takashima S, Okumura A, Murakami A, Hosokawa M (2001) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer Res* 61: 2424-2428
- Tseng W, Leong X, Engleman E (2007) Orthotopic mouse model of colorectal cancer. *J Vis Exp*: 484
- van de Ven S, Wiethoff A, Nielsen T, Brendel B, van der Voort M, Nachabe R, Van der Mark M, Van Beek M, Bakker L, Fels L, Elias S, Luijten P, Mali W A novel fluorescent imaging agent for diffuse optical tomography of the breast: first clinical experience in patients. *Mol Imaging Biol* 12: 343-348

- van de Ven S, Wiethoff A, Nielsen T, Brendel B, van der Voort M, Nachabe R, Van der Mark M, Van Beek M, Bakker L, Fels L, Elias S, Luijten P, Mali W (2009) A novel fluorescent imaging agent for diffuse optical tomography of the breast: first clinical experience in patients. *Mol Imaging Biol* 12: 343-348
- van der Horst G, van den Hoogen C, Buijs JT, Cheung H, Bloys H, Pelger RC, Lorenzon G, Heckmann B, Feyen J, Pujuguet P, Blanque R, Clement-Lacroix P, van der Pluijm G (2011) Targeting of alpha(v)-integrins in stem/progenitor cells and supportive microenvironment impairs bone metastasis in human prostate cancer. *Neoplasia* 13: 516-525
- van Rijn JC, Reitsma JB, Stoker J, Bossuyt PM, van Deventer SJ, Dekker E (2006) Polyp miss rate determined by tandem colonoscopy: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 101: 343-350
- Vonlaufen A, Wiedle G, Borisch B, Birrer S, Luder P, Imhof BA (2001) Integrin alpha(v)beta(3) expression in colon carcinoma correlates with survival. *Mod Pathol* 14: 1126-1132
- Waldmann A, Eberle A, Hentschel S, Hollecsek B, Katalinic A (2010) Bevölkerungsbezogene Darmkrebsinzidenz im Zeitraum 2000 bis 2006 –Deuten sich erste Auswirkungen des Koloskopie-Screenings an? Eine gemeinsame Auswertung der Krebsregisterdaten aus Bremen, Hamburg, dem Saarland und Schleswig-Holstein. *Z Gastroenterol* 48: 1358-1366
- Waldner MJ, Wirtz S, Neufert C, Becker C, Neurath MF (2011) Confocal laser endomicroscopy and narrow-band imaging-aided endoscopy for in vivo imaging of colitis and colon cancer in mice. *Nat Protoc* 6: 1471-1481

- Watson AJ, Collins PD (2011) Colon cancer: a civilization disorder. *Dig Dis* 29: 222-228
- Weeraratne D, Chen A, Pennucci JJ, Wu CY, Zhang K, Wright J, Perez-Ruixo JJ, Yang BB, Kaliyaperumal A, Gupta S, Swanson SJ, Chirmule N, Starcevic M (2011) Immunogenicity of panitumumab in combination chemotherapy clinical trials. *BMC Clin Pharmacol* 11: 17
- Weissleder R (2002) Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat Rev Cancer* 2: 11-18
- Weissleder R, Pittet MJ (2008) Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 452: 580-589
- Weissleder R, Tung CH, Mahmood U, Bogdanov A, Jr. (1999) In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol* 17: 375-378
- Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmang C (2003) Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 124: 544-560
- Workman P, Twentyman P, Balkwill F, Balmain A, Chaplin A, Double J, Embleton JCP, Newell D, Raymond R, Stables J, Stephens T, Zeneca, Wallace, Navaratnam (1997) UKCCCR Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). *British Journal of Cancer* 77:1-10

Wu J, Akaike T, Hayashida K, Miyamoto Y, Nakagawa T, Miyakawa K, Muller-Esterl W, Maeda H (2002) Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues. *Int J Cancer* 98: 29-35

Zeng H, Lazarova DL (2011) Obesity-related colon cancer: dietary factors and their mechanisms of anticancer action. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39: 161-167

Zhao Z, Pelletier E, Barber B, Bhosle M, Wang S, Gao S, Klingman D (2011) Patterns of treatment with chemotherapy and monoclonal antibodies for metastatic colorectal cancer in Western Europe. *Curr Med Res Opin* 28: 221-229

10 Anhang

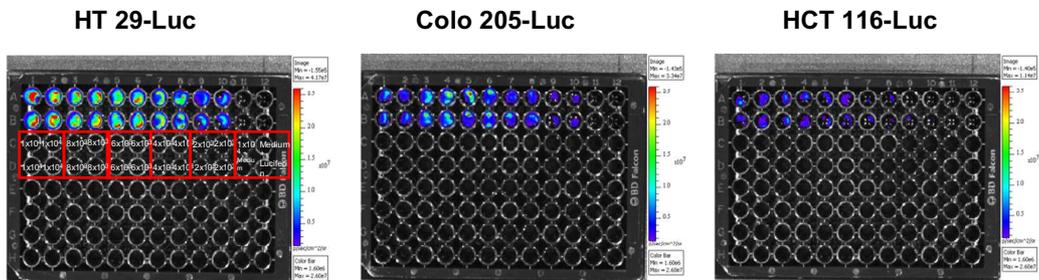


Abbildung 34: Darstellung der Luciferaseaktivität drei verschiedener Zelllinien
Die Zellen wurden von links nach rechts in absteigender Konzentration in Quadruplikaten (roter Kasten) ausgesät. Das Substrat Luciferin (150 $\mu\text{g/ml}$) wurde unmittelbar vor der Messung auf die Zellen gegeben.

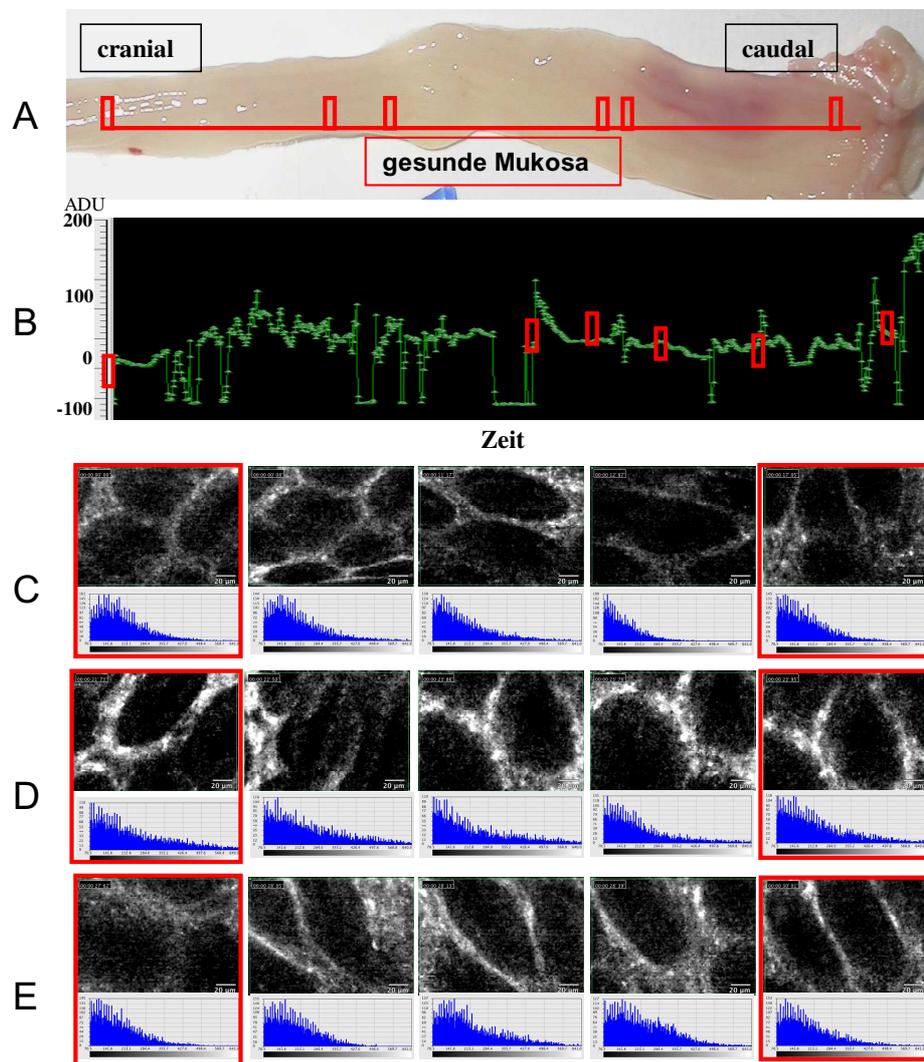


Abbildung 35: Darstellung eines gesunden Kolons in der NIR-Bildgebung mit dem NIR-Faserendoskop

Die Untersuchung wurde 24 Stunden nach IntegriSense680-Injektion (2 nmol/Tier) durchgeführt. Das Faserendoskop wurde von *cranial* nach *caudal* über die Mukosa bewegt (A). Eine repräsentative Messung des Fluoreszenzsignales in diesem Zeitraum ist in Abbildung 34 B dargestellt. Jeweils 15 repräsentative Bilder der Fluoreszenzmessung von *cranial* (34 C) nach *caudal* (34 D und 34 E), über die gesamte Länge des Kolonabschnittes werden gezeigt. Die farbigen Markierungen auf dem Graphen und dem Foto entsprechen den darunter farbig umrandeten Aufnahmen und den dazugehörigen Histogrammen.

Tabelle 10: Ergebnisse der *in vitro*-Messung der drei verschiedenen Zelllinien

Die Messung der einzelnen Kinetiken (K1, K2, K3) wurde an drei unterschiedlichen Tagen mit unterschiedlichen Passagen (p) durchgeführt. Dargestellt ist die gemessene Photonenausbeute in Photonen/Zelle/Sekunde (P/Z/S) zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Messpunkt	HT 29-Luc			Colo 205-Luc			HCT 116-Luc		
	K1 p29	K2 p30	K3 p31	K1 p28	K2 p31	K3 p29	K1 p30	K2 p31	K3 p32
1 Minute	564	1333	749	253	339	283	81	66	53
10 Minuten	389	854	830	170	197	173	73	62	38
20 Minuten	405	890	773	151	183	161	69	57	32
30 Minuten	348	756	720	134	161	140	65	53	27
40 Minuten	306	616	667	119	140	126	62.	48	23
50 Minuten	280	501	619	108	123	112	60	45	20
60 Minuten	256	421	575	98	111	101	58	43	17

Tabelle 11: Score Sheet zur täglichen klinischen Überwachung der Versuchstiere

	Parameter	Befund	Score	Bemerkungen
1	Äußere Erscheinung	normal lebhaft	0	
		ingesunkener Bulbus	1	
		rotes Sekret um Augen und Nase	1	
		blasse Hautfarbe	2	
		verschmutzte Körperöffnung	2	
		aufgekrümmte Haltung	3	
	Gewicht	in g		
2	Nahrungsaufnahme	normal	0	
		Gewicht sinkt < 5 %	1	
		Gewicht sinkt 5-15 %	2	
		Gewicht sinkt >15 % keine Nahrungsaufnahme	3	

Tabelle 11 (fortlaufend)

	Parameter	Befund	Score	Bemerkungen
3	Andere klinische Zeichen	Leibesumfang vergrößert	1	
		Wundheilungsstörung	2	
		Wundinfektion	2	
		laterale Seitenlage	3	
4	Kotbeschaffenheit	normal	0	
		breiig, abgeflacht, aber geformt	1	
		dünnbreiig, ungeformt	2	
		Durchfall: wenn länger andauernd, schwächend	3	
		Obstipation/ kein Kotabsatz	3	
		blutiger Kot	3	
5	Hautturgor	unverändert, elastisch	0	
		leicht verzögert	1	
		langsame Reposition	2	
		Falte bleibt stehen	3	
6	Beobachtetes Verhalten	normal	0	
		verzögert, verlangsamt	1	
		Isolation	2	
		kauernde bewegungslose Haltung	3	
7	Provoziertes Verhalten	normal	0	
		ggr. verändert	1	
		mgr. verändert	2	
		schwache oder keine Reaktion	3	
		Summe (max. 21 Punkte)		

Score	Handlungsanweisung
bis 5 Punkte	täglich kontrollieren
bis 10 Punkte	Tierarzt hinzuziehen
über 10 Punkte	vorzeitige Tötung
einmaliger Wert von 3 Punkten	sofortige Untersuchung durch den Tierarzt und evtl. vorzeitige Tötung

11 Veröffentlichungen

Poster

Cordula Dierkes, Petra Schulz, Annett Rexin, Achim Gruber Carsten Grötzinger
Evaluierung einer Fluoreszenz begleitenden Koloskopie zur Detektion invasiver kolorektaler Tumore

4. Doktorandesymposium am Fachbereich der Veterinärmedizin der freien Universität Berlin, 6. November 2009; Programm & Abstracts, Mensch und Buch Verlag Berlin ISBN 9783866646834, Abstract S.: 56-57.

Cordula Dierkes, Annett Rexin, Bertram Wiedenmann, Petra Schulz and Carsten Grötzinger

Establishment of a new orthotopic tumor model of human colorectal cancer
22nd *EORTC-NCI-AACR* symposium on "Molecular targets and Cancer Therapeutics"; 16. - 19. November 2010 Berlin; Verlag: ELSEVIER; EJC: Vol.8 No.7; ISSN: 1359-6349; p. 86.

Cordula Dierkes, Annett Rexin, Bertram Wiedenmann, Petra Schulz and Carsten Grötzinger

Establishment of a new orthotopic tumor model for fluorescence guided colonoscopy in mice

Jahrestagung des Interdisziplinären Netzwerkes Molekulare Bildgebung; 4.11-6.11.2010, Kultur und Bildungszentrum Kloster Seeon; Abstracts: S. 66.

Cordula Dierkes, Annett Rexin, Bertram Wiedenmann, Petra Schulz and Carsten Grötzinger

Establishment and validation of a new orthotopic tumor model of human colorectal cancer

Treffpunkt Medizintechnik zur nicht-invasiven Diagnostik; Berlin, 26. Mai 2011

Cordula Dierkes, Annett Rexin, Bertram Wiedenmann, Petra Schulz and Carsten Grötzinger

Establishment of an orthotopic tumor model for fluorescence guided colonoscopy in mice

6th European Molecular Imaging Meeting, 19.-21. June 2011, Leiden, the Netherlands Printing: Hundt Druck GmbH Cologne; Layouts Dortis Kracht; Eurogean Society for Molecular Imaging ESMI Management; p 161, poster number 104.

Vorträge

Cordula Dierkes, Annett Rexin, Bertram Wiedenmann, Petra Schulz and Carsten Grötzinger

Orthotope Tumormodelle für die präklinische Evaluierung von molekularen Kontrastmitteln

Arbeitstagung der Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie in Gross-Dölln, 26.-27.08. 2011.

Schriftliche Veröffentlichungen

Cheng-Ying Chiu, Beate Gomolka, **Cordula Dierkes**, Nora R. Huang, Maik Schroeder, Martin Purschke, Dieter Manstein, Bindi Dagi und Karsten H. Weylandt.

Omega-6 docosapentaenoic acid-derived resolvins and 17-hydroxydocosahexaenoic acid modulate macrophage function and alleviate experimental colitis. *Inflammation Research*, Online First™, 23 Mai 2012; DOI: 10.1007/s00011-012-0489-8.

12 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Wiedenmann bedanken, an dessen Klinik die Doktorarbeit erstellt werden konnte.

Meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Gruber möchte ich für die freundliche Unterstützung meiner Doktorarbeit und die überaus hilfreichen Anregungen bedanken.

Herrn PD Dr. Torsten Cramer möchte ich für seinen unkomplizierten Einsatz im Rahmen dieser Dissertation danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Carsten Grötzinger für die Überlassung des interessanten Themas, rege Diskussionen und die Betreuung dieser Arbeit.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. Petra Schulz für die fortwährende Motivation und die herausragende Betreuung bedanken. Ferner möchte ich mich für ihr offenes Ohr in allen Lebenslagen bedanken.

Frau Dr. Celine Schäfer danke ich für den nie endenden Salznachschub.

Annett Rexin danke ich für die grandiose Unterstützung bei den Koloskopien und die vielen lehrreichen Gespräche. Bianca Bolewski für die Klärung aller biologischen Fragen Sebastian Bandholz für die Erläuterung sämtlicher Chemiefragen, Jan Körner für die Hilfe bei Computerproblemen. Quirino Schäfer für anregende Diskussionen am Kryostaten und die erstklassige Korrektur der Ergebnisse. Yvonne Giesicke für die Unterstützung bei immunhistochemischen Färbungen, Ines Eichhorn für die Hilfestellung bei sämtlichen Histofragen. Andrea Bierwagen danke ich für die engagierte und äußerst liebevolle Versorgung unserer Tiere.

Patricia Schlieben danke ich für das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Björn Karthaus danke ich besonders für seine Geduld und seine starken Nerven. Er hat mir wie niemand sonst Mut gemacht und mich aufgefangen, wo immer es ging.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mich immer in jeglicher Hinsicht und in allen Lebenslagen unterstützt haben. Meinen drei Brüdern Frank, Stefan und Thorsten danke ich ebenfalls für jede Unterstützung.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Oldenburg,

Cordula Karthaus