

**Longitudinale *in vivo* Charakterisierung
patientenabgeleiteter Kolonkarzinom-
Modelle mittels PET und die Evaluierung
von Seneszenz-spezifischen Tracern**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Anna Kühn

aus Stawropol (Russland)

Tübingen

2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	01.07.2019
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Pichler
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	10
Danksagung.....	15
1 Einleitung.....	16
1.1 Krebs in der Gesellschaft	17
1.1.1 Die Entstehung von Krebs.....	19
1.2 Das kolorektale Karzinom.....	24
1.2.1 Die Risikofaktoren	25
1.2.2 Die Vorsorgeuntersuchungen.....	25
1.2.3 Die Darmkrebsentwicklung	26
1.2.4 Die Tumorklassifizierung	29
1.2.5 Die Darmkrebsbehandlung.....	31
1.3 Die Tumorstressantwort	31
1.3.1 Die Nekrose	32
1.3.2 Die zelluläre Seneszenz.....	32
1.4 Zwei Enzyme als Target-Moleküle für neue PET-Tracer.....	40
1.4.1 Die β -D-Galactosidase	40
1.4.2 Die α -L-Fucosidase	41
1.5 Vorhandene Tiermodelle	42
1.5.1 PDX-Tiermodelle	42
1.5.2 Tiermodelle für die Evaluierung neuer PET-Tracer.....	43
1.6 Bildgebende Verfahren.....	44
1.6.1 Positronenemissionstomographie.....	44
1.6.2 Die Magnet-Resonanz-Tomographie.....	49
1.6.3 Optische Bildgebung	52
2 Fragestellung.....	55
3 Material und Methoden	57
3.1 Zellkultur.....	57
3.1.1 Bestimmung der Zellzahl	57
3.1.2 Kultivierung der verschiedenen Zelllinien.....	57
3.1.3 Seneszenz-Induktion <i>in vitro</i>	58

3.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen	58
3.2.1	SA- β -Galactosidase-Assay in Zellkultur.....	59
3.2.2	Durchflusszytometrie.....	59
3.2.3	<i>In vitro</i> Evaluierung neuer PET-Tracer zur Detektion der Seneszenz	61
3.3	Bildgebende Verfahren zur <i>in vivo</i> Tumorcharakterisierung.....	62
3.3.1	PET.....	62
3.3.2	MRT	63
3.3.3	Optisches System	65
3.4	Herstellung von Radiotracern	66
3.4.1	Herstellung von radioaktiven Nukliden.....	66
3.4.2	Synthese etablierter PET-Tracern	67
3.4.3	Synthese von neuentwickelten PET-Tracern	69
3.5	<i>In vivo</i> Untersuchungen von experimentellen Tiermodellen	70
3.5.1	Haltungsbedingungen der Versuchstiere	70
3.5.2	Vorbereitung der Versuchstiere für die <i>in vivo</i> Untersuchungen	70
3.5.3	Tiermodelle	71
3.6	<i>Ex vivo</i> Untersuchungen.....	77
3.6.1	Tötung der Tiere und Gewebeentnahme für <i>ex vivo</i> Versuche	77
3.6.2	Vorbereitung von Kryogewebe für <i>ex vivo</i> Untersuchungen	78
3.6.3	<i>Ex vivo</i> SA- β -Gal-Assay auf Tumorkryoschnitten	79
3.6.4	Autoradiographie.....	79
3.6.5	Histologie	79
3.7	Datenanalyse	81
3.7.1	Die Analyse von PET- und MRT-Datensätzen	81
3.7.2	Die Voxel-basierte-Analyse von [^{18}F]FDG-PET-Daten	82
3.7.3	Die Analyse der Autoradiographie	84
3.7.4	Semi-quantitative Analyse von H&E-Schnitten der PDX-Modellen	84
3.7.5	Statistische Analysen	85
4	Ergebnisse.....	86
4.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Seneszenz-Induktion in Zellkultur.....	86
4.1.1	Seneszenz-Induktion in drei humanen Zelllinien.....	86
4.1.2	Seneszenz-Induktion in murinen GEPiRshp53pWZLHras-Zellen	89
4.2	Evaluierung und Untersuchung subkutaner Tumoren <i>in vivo</i>	90
4.2.1	Die Charakterisierung des subkutanen MCF7-Xenograftmodells.....	90
4.2.2	Die Charakterisierung des subkutanen HCT116-Xenograftmodells	92
4.2.3	Die Charakterisierung des subkutanen Hras-Allograftmodells	96
4.3	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Evaluierung neuer Seneszenz-PET-Tracer	100
4.3.1	Evaluierung von [^{18}F] α -Fuc als Tracer zur Detektion von Seneszenz	101
4.3.2	Evaluierung von [^{18}F] β -Gal als Tracer zur Detektion von Seneszenz.....	109
4.3.3	Maximalwertanalyse der [^{18}F] α -Fuc- und [^{18}F] β -Gal-PET-Daten	116
4.4	Longitudinale <i>in vivo</i> Charakterisierung des vom Patienten abgeleiteten CR-LRB-018P-Modells mittels PET und MRT.....	117

4.4.1	Wachstumsverhalten von PDSX- gegenüber PDOX-Tumoren	117
4.4.2	Longitudinale Untersuchung des Glukosestoffwechsels mittels [¹⁸ F]FDG-PET in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren	119
4.4.3	Longitudinale Untersuchung der Proliferation mittels [¹⁸ F]FLT-PET in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren.....	121
4.4.4	Longitudinale Untersuchung der Hypoxie mittels [¹⁸ F]FMISO-PET in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren.....	122
4.4.5	Untersuchung der [⁶⁸ Ga]RGD-Anreicherung in den PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren.....	124
4.4.6	Longitudinale Untersuchung der Diffusion in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren.....	126
4.4.7	Voxel-basierte GMM-Analyse der [¹⁸ F]FDG-PET-Daten in PDOX- und PDSX-Tumor-tragenden Tieren.....	128
5	Diskussion	139
5.1	Evaluierung von <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Seneszenz-Modelle	139
5.1.1	MCF7-, HCT116- und Hras-Zellen als geeignete <i>in vitro</i> Modelle für die Induktion der Seneszenz	140
5.1.2	Die Tumormodelle für TIS	142
5.1.3	Das Tumormodell für OIS.....	146
5.1.4	[¹⁸ F]α-Fuc als möglicher Tracer zur Visualisierung von Seneszenz <i>in vivo</i>	148
5.1.5	[¹⁸ F]β-Gal als möglicher Tracer zur Visualisierung von Seneszenz <i>in vivo</i>	152
5.2	Longitudinale <i>in vivo</i> Charakterisierung der PDX-Modelle mit PET und MRT	156
5.2.1	Das unterschiedliche Wachstumsverhalten von PDOX- und PDSX-Tumoren.....	157
5.2.2	Die Beurteilung von Angiogenese in PDSX- und PDOX-Tumoren.....	161
5.2.3	Die Unterschiede im Glukosestoffwechsel in PDOX- und PDSX-Tumoren	161
5.2.4	Die Untersuchung der intratumoralen Heterogenität in PDSX- und PDOX-Tumoren mittels GMM.....	162
5.2.5	Das Diffusionsverhalten von PDSX- und PDOX-Tumoren	166
5.2.6	Die klinische Relevanz von PDSX- und PDOX-Tumormodellen	168
6	Zusammenfassung.....	170
7	Erklärung zum Eigenanteil.....	174
8	Erklärung	176
9	Publikationsverzeichnis.....	177
9.1	Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften	177
9.2	Vorträge auf wissenschaftlichen Konferenzen	177
9.3	Posterpräsentationen auf wissenschaftlichen Konferenzen	177
10	Literaturverzeichnis	178
11	Anhang.....	201

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die häufigsten Krebserkrankungen bei Männern und Frauen.....	18
Abbildung 2: Eine Übersicht über die zehn „Hallmarks“ der Krebszellen	24
Abbildung 3: Die stufenweise Entwicklung von Darmkrebs nach der Vogelsteinhypothese.....	28
Abbildung 4: Die zelluläre Seneszenz.....	36
Abbildung 5: Telomerenverkürzung nach einer DNA-Replikation	38
Abbildung 6: Das Prinzip eines SA-β-Gal-Aktivitäts-Assays	41
Abbildung 7: Das Prinzip der PET-Bildgebung	45
Abbildung 8: Mögliche Ereignisse der Koinzidenzdetektion	47
Abbildung 9: PET-Tracer in der Tumorbilogie	49
Abbildung 10: Die Grundlagen der MRT	51
Abbildung 11: Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten	61
Abbildung 12: Inveon Kleintier PET-Scanner von Siemens	62
Abbildung 13: ClinScan 7T-Kleintier MRT-Scanner von Bruker	64
Abbildung 14: Optisches System IVIS Spectrum von PerkinElmer	66
Abbildung 15: Strukturformel von [¹⁸ F]FDG	67
Abbildung 16: Strukturformel von [¹⁸ F]FLT	68
Abbildung 17: Strukturformel von [¹⁸ F]FMISO	68
Abbildung 18: Strukturformel von [⁶⁸ Ga]-NODAGA-RGD	69
Abbildung 19: Strukturformel von [¹⁸ F]α-Fuc a) und [¹⁸ F]β-Gal b)	70
Abbildung 20: Versuchsübersicht für das <i>in vivo</i> MCF7-Xenograftmodell	72
Abbildung 21: Versuchsübersicht für das <i>in vivo</i> HCT116-Xenograftmodell	73
Abbildung 22: Versuchsübersicht für Hras-Allograftmodell	74
Abbildung 23: Schematische Darstellung der schrittweisen Erstellung des PDX-Modells.....	75
Abbildung 24: Übersicht über die longitudinalen PET- und MRT-Messungen.....	76
Abbildung 25: Gewebepreparation aus einer Ratte	78
Abbildung 26: Aufbereitung von PDSX Tumoren	80
Abbildung 27: Voxel-basierte-Analyse von [¹⁸ F]FDG-PET-Daten.....	82
Abbildung 28: AIC und BIC Kriterien	83
Abbildung 29: Semi-quantitative Analyse von H&E-Tumorschnitten.....	85
Abbildung 30: <i>In vitro</i> SA-β-Gal-Assay	87
Abbildung 31: <i>In vitro</i> BrdU-Proliferations-Assay	88
Abbildung 32: <i>In vitro</i> SA-β-Gal-Assay und GFP-Expression von Hras-Zellen.....	89
Abbildung 33: Tumorwachstumskurve für das MCF7-Xenograftmodell	91
Abbildung 34: Charakterisierung des MCF7-Xenograftmodells	92
Abbildung 35: Tumorwachstumskurve für das HCT116-Xenograftmodell.....	93
Abbildung 36: Charakterisierung des HCT116-Xenograftmodells	94
Abbildung 37: Histologie und IHC-Analyse der HCT116-Xenografttumoren.....	96
Abbildung 38: Tumorwachstumskurve für das Hras-Allograftmodell	97

Abbildung 39: GFP-Signaldetektion im Hras-Allograftmodell.....	98
Abbildung 40: Charakterisierung des Hras-Allograftmodells	99
Abbildung 41: Histologie und IHC-Analyse der Hras-Allografttumoren	100
Abbildung 42: <i>In vitro</i> Untersuchung von [¹⁸ F]α-Fuc in HCT116 und Hras Zellen	102
Abbildung 43: TACs der [¹⁸ F]α-Fuc-Anreicherung im HCT116- Xenograftmodell	103
Abbildung 44: [¹⁸ F]α-Fuc-PET im HCT116-Xenograftmodell	104
Abbildung 45: Übersicht der [¹⁸ F]α-Fuc-Akkumulation im HCT116- Xenograftmodell	105
Abbildung 46: TACs der [¹⁸ F]α-Fuc-Anreicherung im Hras-Allograftmodell.....	106
Abbildung 47: [¹⁸ F]α-Fuc-PET im Hras-Allograftmodell.....	107
Abbildung 48: Übersicht der [¹⁸ F]α-Fuc-Akkumulation im Hras- Allograftmodell	108
Abbildung 49: <i>In vitro</i> Untersuchung des [¹⁸ F]β-Gal-Tracers in HCT116- und Hras-Zelllinien.....	109
Abbildung 50: TACs der [¹⁸ F]β-Gal-Anreicherung im HCT116- Xenograftmodell	110
Abbildung 51: [¹⁸ F]β-Gal-PET im HCT116-Xenograftmodell	111
Abbildung 52: Übersicht der [¹⁸ F]β-Gal-Akkumulation im HCT116- Xenograftmodell.....	112
Abbildung 53: TACs der [¹⁸ F]β-Gal-Anreicherung im Hras-Allograftmodell.....	113
Abbildung 54: [¹⁸ F]β-Gal-PET im Hras-Allograftmodell	114
Abbildung 55: Übersicht der [¹⁸ F]β-Gal-Akkumulation im Hras- Allograftmodell	115
Abbildung 56: Maximalwertanalyse der [¹⁸ F]α-Fuc- und [¹⁸ F]β-Gal-PET- Daten	116
Abbildung 57: Tumorwachstum von PDSX- und PDOX-Tumoren	118
Abbildung 58: Longitudinale Analyse der [¹⁸ F]FDG-PET-Daten in PDSX- und PDOX-Tumoren	120
Abbildung 59: Longitudinale Analyse der [¹⁸ F]FLT-PET-Daten in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren	122
Abbildung 60: Longitudinale Analyse der [¹⁸ F]FMISO-PET-Daten in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren.....	123
Abbildung 61: IHC-Färbung mit Glut1- und Ki67-Antikörper.....	124
Abbildung 62: Analyse der [⁶⁸ Ga]RGD-PET-Daten in PDSX- und PDOX- Tumor-tragenden Tieren	126
Abbildung 63: Longitudinale Analyse der Diffusion in PDSX- und PDOX- Tumoren	127
Abbildung 64: Korrelationsverhalten der ADC-Werte mit Tumolvolumina.....	128
Abbildung 65: Die Voxel-basierte Analyse von statischen [¹⁸ F]FDG-PET- Daten	129
Abbildung 66: Longitudinale Voxel-basierte GMM-Analyse der [¹⁸ F]FDG- PET-Daten	131
Abbildung 67: Tumorcharakterisierung mittels [¹⁸ F]FDG-Autoradiographie und GMM-Analyse in PDSX-Tumoren	133

Abbildung 68: Tumorcharakterisierung mittels [¹⁸F]FDG-Autoradiographie und GMM-Analyse in PDOX-Tumoren	134
Abbildung 69: Tumorcharakterisierung mittels ICH-Färbungen und GMM-Analyse in PDSX-Tumoren.....	136
Abbildung 70: Tumorcharakterisierung mittels IHC-Färbungen und GMM-Analyse in PDOX-Tumoren	137
Abbildung 71: Sequentielle DW-MRT- und [¹⁸F]FDG-PET-Aufnahmen von PDSX- und PDOX-Tumoren in Woche 30	168
Abbildung 72: Ergebnisse der PET-Messungen für PDSX-Tumoren.....	201
Abbildung 73: Ergebnisse der PET-Messungen für PDOX-Tumoren	202

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eine Einstufung von Darmkrebs nach TNM-Klassifikation	30
Tabelle 2: Aufteilung von Darmkrebsstadien nach UICC	30
Tabelle 3: Gruppenübersicht der Zelllinien für <i>in vitro</i> Versuche	58
Tabelle 4: PET-Messparameter für etablierte Tracer	63
Tabelle 5: PET-Messparameter für Seneszenz-Tracer	63
Tabelle 6: Übersicht der Ratten-Versuchsreihen	75
Tabelle 7: Individuelle Scanübersicht für PDOX- und PDSX-Tumor-tragende Tiere	77
Tabelle 8: Antikörper für die ICH-Färbungen	81
Tabelle 9: Die Aufteilung der Voxel-Populationen nach der GMM-Verteilung.....	84
Tabelle 10: [¹⁸F]α-Fuc-Anreicherung im HCT116- und Hras-Tiermodell	108
Tabelle 11: [¹⁸F]β-Gal-Anreicherung im HCT116- und Hras-Tiermodell.....	115

Abkürzungsverzeichnis

%ID/cc	Prozent der injizierten Dosis pro Kubikzentimeter Volumen
5-Fu	Fluorouracil
7AAD	7-Aminoactinomycin
A	Adenin
ADC	Diffusionskoeffizient („ <i>apparent diffusion coefficient</i> “)
AG	Aktiengesellschaft
AIC	Akaike Informationskriterium („ <i>akaike information criterion</i> “)
AK	Antikörper
APC	„ <i>adenomatous polyposis coli</i> “
ATCC	„ <i>American Type Culture Collection</i> “
ATM	„ <i>ataxia telangiectasia mutated</i> “
ATR	„ <i>ataxia telangiectasia and Rad3-related</i> “
ATR	„ <i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i> “
BER	„ <i>base-excision-repair</i> “
BIC	Bayesian Informationskriterium („ <i>bayesian information criterion</i> “)
BMDCs	Knochenmarkzellen („ <i>bone marrow-derived cells</i> “)
BRAF	Isoform des „ <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> “
BRCA1	Brustkrebsgen 1 („ <i>breast cancer 1</i> “)
BrdU	Bromdesoxyuridin
CCD	„ <i>charge coupled device</i> “
CDK	Cyclin-abhängige Kinase („ <i>cyclin dependent kinase</i> “)
CIMP	„ <i>CpG Island Methylation Pathway</i> “
CIN	Chromosomen-Instabilität
CNT1	„ <i>Concentrative nucleoside transporter 1</i> “
COX	Cyclooxygenase
CRC	Kolorektales Karzinom („ <i>colorectal cancer</i> “)
CT	Computertomographie
d	Tag
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
DDR	„ <i>DNA damage response</i> “
DMEM	„ <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („ <i>desoxyribonucleic acid</i> “)
Doxo	Doxorubicinhydrochlorid

Doxy	Doxycyclin
DW	Diffusionsgewichtet („ <i>diffusion weighted</i> “)
ECM	Extrazelluläre Matrix („ <i>extracellular matrix</i> “)
EGFR	„ <i>epidermal growth factor receptor</i> “
EM	Emissionsmessung
EM	„ <i>expectation maximization</i> “
EMT	„ <i>Epitheliale-mesenchymale-Transition</i> “
engl.	englisch
ENT	„ <i>equilibrative nucleoside transporter</i> “
ERK	„ <i>extracellular signal–regulated kinase</i> “
FACS	Durchflusszytometrie („ <i>fluorescence activated cell sorting</i> “)
FAP	familiären adenomatösen Polyposis coli
FBP	„ <i>filtered back projection</i> “
FCS	Fetales Kälberserum („ <i>fetal calf serum</i> “)
FDG	2-Fluor-2-Desoxy-D-Glucose
FGF	„ <i>fibroblast growth factor</i> “
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT	3-Deoxy-3-Fluorothymidin
FMISO	Fluoromisonidazol
FOBT	Fäkaler okkultter Bluttest
FoV	Gesichtsfeld („ <i>field of view</i> “)
FSC	Vorwärtsstreuung („ <i>forward scatter</i> “)
FUCA1	α -L-Fucosidase Typ 1
G	Guanin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLB1-Gen	Galactosidase Beta-1 Gen
Glut	Glucosetransporter
Gly	Glycin
GM-CSF	„ <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> “
GMM	„ <i>gaussian mixture model</i> “
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HASTE	„ <i>half fourier-acquired single shot turbo spin echo</i> “
HHC	hepatozelluläres Karzinom
HK	Hexokinase
HNPCC	„ <i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i> “
HP1γ	Heterochromatinprotein 1 γ
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie („ <i>high-performance liquid chromatography</i> “)

HWZ	Halbwertszeit
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intavenös
IAW	„ <i>Inveon Acquisition Workplace</i> “
ICH	Immunhistochemie
IL	Interleukin
INF	Interferon
IRA	„ <i>Innovative Research of America</i> “
IRW	„ <i>Inveon Research Workplace</i> “
IVC	Individuell belüfteter Käfig („ <i>individually ventilated cages</i> “)
kb	Kilobasenpaare
KRAS	„ <i>kirsten rat sarcoma</i> “
lacZ	Lactoseoperon
LOR	„ <i>line of response</i> “
LPS	Lipopolysaccharid
LSO	Lutetiumoxyorthosilikat
MAP	„ <i>mitogen-activated protein</i> “
MAP	„ <i>maximum a posteriori</i> “
MeV	Megaelektronenvolt
MHz	Megahertz
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MMR	„ <i>mismatch-repair</i> “
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MSI	Mikrosatellit-Instabilität
Myc	Myelocytomatose-Epitop
NEMA	„ <i>National Electrical Manufacturers Association</i> “
NER	„ <i>nucleotide-excision</i> “
NF1	Neurofibromin1
NF-κB	„ <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer</i> “
NODAGA	1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarat-4,7-acetat
OI	Optische Bildgebung („ <i>optical imaging</i> “)
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
OSEM	„ <i>ordered subset expectation maximation</i> “
PBS	Phosphatpuffer („ <i>phosphate buffered saline</i> “)
PD-1	„ <i>programed cell death protein-1</i> “
PDOX	„ <i>patient derived orthotopic xenograft</i> “
PDSX	„ <i>patient derived subcutaneous xenograft</i> “
PDX	„ <i>patient derived xenograft</i> “

PET	Positronenemissionstomographie
PI3K	Phosphoinosid-3-Kinase
pRB	hypophosphoryliertes Retinoblastomprotein
PTEN	„ <i>phosphatase and tensin homolog</i> “
R	Korrelationskoeffizient
RAS	„ <i>rat sarcoma</i> “
RB	Retinoblastom-assoziiertes Protein
RF	Radian Efficiency
RF	Hochfrequenzimpuls („ <i>radiofrequency impuls</i> “)
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Peptid
RIP1	„ <i>receptor-interacting serin/threonine-protein kinase 1</i> “
ROI	„ <i>region of interest</i> “
ROS	Radioaktive Sauerstoffspezies („ <i>reactive oxygen species</i> “)
rpm	„ <i>revolutions per minute</i> “
RPMI	„ <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> “
RS	Replikative Seneszenz
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
SAHF	„ <i>senescence associated heterochromatin foci</i> “
SASP	„ <i>senescence associated secretory phenotype</i> “
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-D-Galactosidase
SCARS	„ <i>segments with chromatin alterations reinforcing senescence</i> “
SD	Standardabweichung („ <i>standard deviation</i> “)
SEM	„ <i>standard error of the mean</i> “
Ser	Serin
SGLT1	„ <i>sodium/glucose cotransporter 1</i> “
shRNA	„ <i>small hairpin ribonucleic acid</i> “
SMAD	„ <i>small mothers against decapentaplegic homolog</i> “
SOP	Standardprotokoll („ <i>standard operating procedure</i> “)
SSC	Seitwärtsstreulicht („ <i>side scatter</i> “)
SUV	„ <i>standardized uptake value</i> “
T	Thymin
TAC	Zeitaktivitätskurve („ <i>time activity curve</i> “)
TE	Echozeit
TIS	Therapie-induzierte Seneszenz
TK1	Thymidinkinase 1
TM	Transmissionsmessung
TME	Tumormikroumgebung („ <i>tumor microenvironment</i> “)

TMR	<i>„tumor to muscle ratio“</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor, Lymphknoten („ <i>Nodus</i> “), Metastase
TP53	Tumorprotein 53
TR	Repetitionszeit
TRAIL	<i>„tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand“</i>
TSE	<i>„turbo spin echo“</i>
TSP	Thrombospondin-1
TV	Tumorvolumen
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
UICC	<i>„Union for International Cancer Control“</i>
UK	<i>„united kingdome“</i>
USA	<i>„united states of america“</i>
VEGF	<i>„vascular endothelial growth factor“</i>
VHL	von Hippel-Lindau
VOI	<i>„volume of interest“</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation („ <i>World Health Organisation</i> “)
WSIC	Werner Siemens Imaging Center
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZS	Zelluläre Seneszenz

Danksagung

Als allererstes möchte ich mich beim Herrn Professor Dr. Bernd J. Pichler für die Bereitstellung der Doktorandenstelle im Werner Siemens Imaging Center in der Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie wie auch für die exzellente Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit bedanken. Besonders möchte ich ihm für die Möglichkeit danken an einem sehr spannenden Thema zu arbeiten und dabei sehr viel zu lernen wie auch für die Möglichkeit an mehreren wissenschaftlichen Kongressen teilzunehmen.

Bei Dr. Kerstin Fuchs möchte ich mich für ihre beratende und unterstützende Rolle während meiner gesamten Promotionszeit sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Mein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Lars Zender und Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff für die kompetenten und sehr wertvollen Beratungsgespräche im Seneszenz-Projekt während meiner Promotionszeit.

Für die großartige Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der PET/MRT-Messungen möchte ich mich bei Julia Mannheim, Funda Cay, Maren Harant, Sandro Aidone, Daniel Bukala und Natali Altmeyer ganz herzlich bedanken. Außerdem möchte ich mich beim gesamten Team des Werner Siemens Imaging Centers für die hilfreichen Diskussionen und Anregungen sowie für die angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner Promotionszeit bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei der gesamten Abteilung der Radiopharmazie für die zuverlässigen Tracer-Synthesen, welche für diese Arbeit essentiell waren. Zusätzlich bedanke ich mich bei Dr. Jonathan Cotton für die erfolgreiche Zusammenarbeit und für die Synthese neuer PET-Tracer in unserem gemeinsamen Seneszenz-Projekt.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Bruder Eduard Teske und bei meinen Kollegen und Freunden Dr. Christof Gießinger, Dr. Anna-Maria Wild, Dr. Jennifer Gießinger, Dr. Andreas Mauer und Kerstin Kelkenberg für das Korrekturlesen dieser Dissertation herzlich bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich natürlich ganz besonders bei meinen Eltern Nadja und Andre Teske sowie meinem Mann Artjom Kühn bedanken, die mich während der gesamten Studienzeit und Promotionszeit grenzenlos unterstützt haben und mir genug Freiraum für die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten.

1 Einleitung

Gibt man in eine Internetsuchmaschine das Wort „Krebs“ ein, so erscheinen circa 30 Millionen Ergebnisse, von denen die Meisten sich jedoch auf den Krebs als Krankheitsbild beziehen. Krebserkrankungen gehören zu der zweithäufigsten Todesursache in Europa und in jedem Jahr steigt die Zahl der Neuerkrankungen weiter an (Jemal, Bray et al. 2011). Bereits aus den Zeiten der früheren menschlichen Vorfahren ist der erste, 1,7 Millionen Jahre alte fossile Knochentumor (Osteosarkom) bekannt (Odes, Randolph-Quinney et al. 2016). Erste Aufzeichnungen über das Krankheitsbild Krebs, ohne die Verwendung des Wortes „Krebs“ selbst, stammen aus einer alten ägyptischen Schrift, die als „Edwin Smith Papyrus“ bekannt ist. Hier wurden zum ersten Mal acht Geschwülste der Brust und deren chirurgische Entfernung durch Verätzung beschrieben (Breasted 1930, Hajdu 2011). Im Altertum beschrieb Hippokrates von Kos, der sogenannte „Vater der Medizin“, mehrere Geschwulstarten und verwendete dabei erstmalig die Wörter „*carcinos*“ und „*carcinoma*“. Der römische Physiologe Aulus Cornelius Celsus übersetzte den griechischen Terminus „*carcinos*“ dann ins Lateinische als „*canser*“ (Hajdu 2004). Ein anderer griechischer Wissenschaftler, Galenos von Pergamon, benutzte seinerzeit das Wort „*oncos*“, um Tumoren zu beschreiben (Pasipoularides 2014). Alle diese Begriffe haben sich im Laufe der Zeit fest manifestiert und werden bis heute verwendet, um maligne Tumoren zu beschreiben.

Gleichzeitig mit der Entdeckung von Krebs wurde klar, dass die Therapie von Tumoren eine große Herausforderung darstellt. Breasted beschreibt in seiner Abhandlung über die alte ägyptische Schrift „Edwin Smith Papyrus“, dass diese bezüglich der Geschwülste der Brust besagt: „*Es gibt keine Therapie*“ (Breasted 1930). Jedoch hat die Krebsforschung bis zum heutigen Tage große Fortschritte erzielt und Krebspatienten profitieren immer stärker von den Erfolgen der modernen Medizin. Auch hält die sogenannte „personalisierte Medizin“ immer mehr Einzug in klinische Anwendungen. Das Behandlungskonzept zielt hier auf eine personalisierte Diagnose und Therapie ab, wie auch auf die fortlaufende Überwachung und individuelle Anpassung der therapeutischen Maßnahmen für jeden einzelnen Patienten. Als wichtigste Erkenntnis der personalisierten Medizin gilt die Individualität jedes einzelnen Tumors, da jeder Tumor in seiner Entstehung und seinem molekularen Muster einmalig ist. Das Hauptziel der personalisierten Medizin ist es, langfristig die Lebenserwartung der Patienten zu erhöhen und bessere Behandlungsergebnisse durch eine individuelle Therapie zu erzielen.

Durch die zahlreichen Früherkennungsuntersuchungen können die Heilungschancen deutlich erhöht werden, da die meisten Krebsarten in sehr frühen Stadien erkannt und erfolgreich behandelt werden können. Als nichtinvasives, molekulares und funktionales, bildgebendes Verfahren findet die Positronenemissionstomographie (PET) in Kliniken häufig Anwendung. Die PET-Bildgebung spielt hinsichtlich der personalisierten

Medizin, der Einstufung von Tumoren (Stadien), der Diagnose und Lokalisation von Metastasen sowie der langfristigen Überprüfung von Therapie-Effekten eine große Rolle. Diese Methode ermöglicht das Monitoring verschiedener Tumoreigenschaften, wie z.B. den Energiestoffwechsel, den Proteinstoffwechsel, die Proliferation, die Angiogenese und die Hypoxie. Besonders [^{18}F]2-Fluor-2-Desoxy-D-Glukose ([^{18}F]FDG) findet in Kliniken als Standard-Tracer zur Detektion unterschiedlicher Krebsarten eine große Anwendung.

Doch nicht immer reichen die standardisierten Methoden und Tracer aus, um jeden einzelnen Tumor in seinen Eigenschaften einschätzen zu können. Es besteht ein stetiger und anhaltender Bedarf für neu entwickelte Tracer, um immer differenziertere Eigenschaften einzelner Tumoren visualisieren zu können und Therapien möglichst effektiv und individuell anpassen und gestalten zu können. So wäre es beispielsweise ideal wenn der heutzutage anerkannte therapeutische Endpunkt der Tumorseneszenz mit einem geeigneten Marker mittels PET (siehe Abschnitt 1.4) visualisiert werden könnte. Diese Erkenntnis wäre von sehr großer Bedeutung für das weitere therapeutische Vorgehen. In dieser Arbeit wurden zwei Seneszenz-Tracer für die PET-Bildgebung anhand von *in vitro* und *in vivo* Modellen etabliert und somit ein Grundbaustein für dessen weitere Evaluierung gelegt.

Des Weiteren spielen zahlreiche bereits vorhandene Tiermodelle in der präklinischen Forschung eine wichtige Rolle für das weitere Verständnis unterschiedlicher Krebserkrankungen. Im Zuge der personalisierten Medizin wurden sehr hilfreiche Tiermodelle entwickelt, die direkt aus humanen Tumoren abgeleitet werden. Dabei werden den Versuchstieren meist subkutane Tumoren gesetzt, die zuvor mittels Biopsie oder Resektion aus humanem Gewebe gewonnen wurden. Subkutane Tumoren sind mittels *in vivo* Bildgebung in Versuchstieren am einfachsten zu monitoren und zu implantieren. Dennoch spiegelt eine derartige Lokalisation nicht die natürliche Mikroumgebung des ursprünglichen Entstehungsortes der Tumoren in Patienten wider. Durch die veränderte Mikroumgebung im subkutanen Tiermodell können sich Verhalten und Eigenschaften der Tumoren im Vergleich zum Patienten stark unterscheiden. Orthotope Tumoren sind komplizierter zu implantieren und zu monitoren. Dennoch spiegelt sich bei diesem Modell die natürliche Mikroumgebung des ursprünglichen Entstehungsortes der Tumoren in Patienten wieder (Hidalgo, Amant et al. 2014). Demnach simulieren die orthotopen Tiermodelle die physiologische Tumorsituation im Patienten besser als die subkutanen Tiermodelle.

1.1 Krebs in der Gesellschaft

Einige der ersten Krebsstatistiken stammen aus dem 19. Jahrhundert zu dieser Zeit wurde zum ersten Mal ein vermehrtes Auftreten von Tumorerkrankungen beobachtet. Zeitgleich stieg die Lebenserwartung unter anderem durch den Rückgang von Infektionskrankheiten, bedingt durch eine verbesserte Hygiene, deutlich an. Heute ist be-

kannt, dass das Risiko, an Krebs zu erkranken, mit dem Alter zunimmt. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl. „World Health Organisation“) erkranken jährlich weltweit ca. 14 Millionen Menschen an Krebs, mit steigender Tendenz (Jemal, Bray et al. 2011). Mögliche Gründe für das erhöhte Krebsrisiko sind unter anderem demographische Veränderungen, Viruserkrankungen, Strahlung sowie schlechte Lebensgewohnheiten wie z.B. das Rauchen, erhöhter Alkoholkonsum und eine unausgewogene Ernährung.

Außerdem sind geschlechtsspezifische Unterschiede im Auftreten von Tumor-Neuerkrankungen bekannt. 2015 erkrankten 21 % der Männer an Prostatakrebs, wohingegen bei den Frauen (29 %) Brustkrebs diagnostiziert wurde (Siegel, Miller et al. 2015). Bedingt durch bestehende erfolgreiche Therapiekonzepte gehören diese beiden Krebserkrankungen heutzutage nicht zu den häufigsten Tumorentitäten mit letalem Ausgang. Die tödlichste Krebserkrankung bei Männern und Frauen ist der Lungenkrebs (26-27 %), gefolgt von Prostata- (8 %) bzw. Brustkrebs (14 %). Die dritthäufigste mit einer Krebserkrankung assoziierte Todesursache bei Männern und Frauen ist mit 8 % der Darmkrebs (Abbildung 1) (Siegel, Miller et al. 2015).

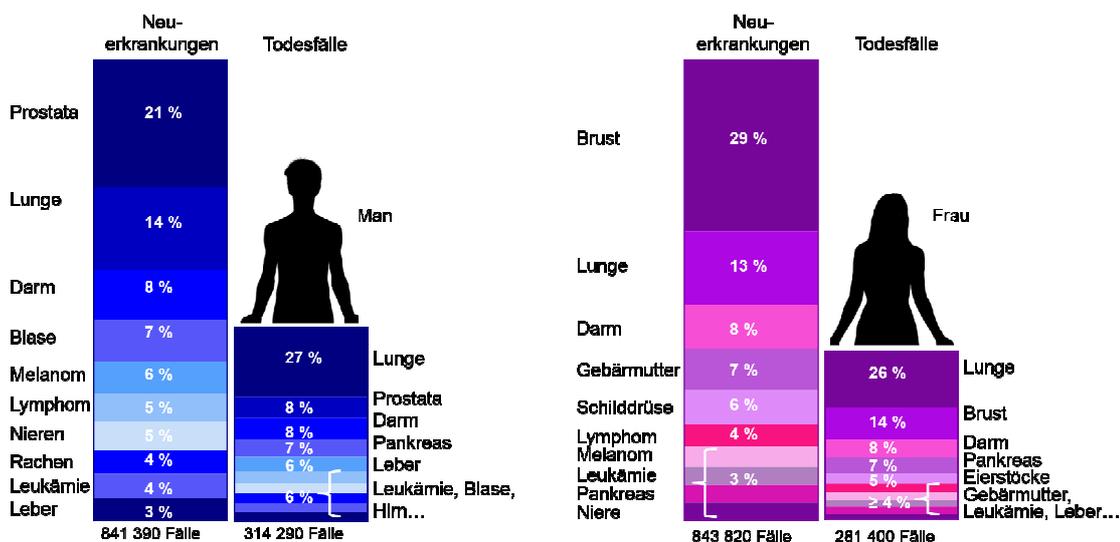


Abbildung 1: Die häufigsten Krebserkrankungen bei Männern und Frauen

Die Angaben in Prozent beziehen sich auf die jeweils ca. 840 000 Neuerkrankungen und 300 000 Todesfälle bei Männern und Frauen im Jahr 2015 in den USA. Verändert nach Siegel et al. (Siegel, Miller et al. 2015).

Durch zahlreiche Vorsorgeuntersuchungen können heutzutage die meisten Krebsarten in sehr frühen Stadien erkannt werden. Dadurch werden die Heilungschancen und somit auch die Überlebensquote deutlich erhöht. Trotz der vielen neuen Erkenntnisse aus der Krebsforschung sind die Prognosen der Neuerkrankungen für die nächsten Dekaden sehr ernüchternd. Basierend auf der Entwicklung der letzten Jahre wurde eine Voraussage für die Jahre 2020 bis 2030 getroffen. Demnach wird ein Anstieg an Schilddrüsen-, Leber- und Pankreaskrebs bei Männern und bei Frauen erwartet. Au-

ßerdem werden Prostata-, Brust- und Lungenkrebs an der Spitze aller Krebserkrankungen bleiben, allerdings assoziiert mit einer niedrigeren Sterberate bis zum Jahr 2030 (Rahib, Smith et al. 2014). Außerdem soll auch die Sterberate bei Brust-, Prostata- und Darmkrebs im Jahr 2030 sinken. Nichtsdestotrotz soll die Gesamtzahl der Neuerkrankungen und der Krebs-assoziierten Todesfälle weiterhin ansteigen (Jemal, Bray et al. 2011).

Die Vielfalt der einzelnen Krebsarten basiert auf dem Gewebsursprung der Krebszellen, es werden hier verschiedene maligne Krebsarten unterschieden. Solide Tumoren, wie zum Beispiel Sarkome, die mesenchymalen Ursprungs sind, sowie Karzinome, die von Platten- oder Drüsenepithelen ausgehen, repräsentieren den größten Teil aller vorkommenden Krebsarten. Seltener Krebsarten sind unter anderem die nicht soliden Leukämien und Lymphome, die aus den Blut- bzw. Knochenmarkszellen entstehen. Im nächsten Abschnitt wird die Entstehung und Entwicklung von Krebs kurz beschrieben.

1.1.1 Die Entstehung von Krebs

Ein tieferes Verständnis molekularer Mechanismen der Krebsentstehung ist essentiell für die Prävention, die Früherkennung, die molekulare Diagnostik sowie die innovativen Fortschritte bei Therapien. Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahr 2001 trug maßgeblich zu einer Verbesserung der wissenschaftlichen Krebsgrundlagenforschung in den darauffolgenden Jahren bei (Lander, Linton et al. 2001, Venter, Adams et al. 2001). Der Ursprung der Karzinogenese liegt in der Mutation von bestimmten Genen in der Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. „*desoxyribonucleic acid*“). Der menschliche Organismus verfügt über mehrere sehr effiziente DNA-Reparaturmechanismen. Somit ist eine einzige Genveränderung, die der betroffenen Zelle dadurch einen Selektionsvorteil verschafft, für eine maligne Zellentartung in der Regel nicht ausreichend. Nichtsdestotrotz kann eine Mutation in jeder Körperzelle entstehen. Mutationen an Keimbahnzellen können vererbt werden wie, z.B. bei Brustkrebs. Hier kann das Brustkrebsgens 1 (BRCA1, engl. „*breast cancer 1*“) vererbt werden, wodurch es innerhalb einer Familie zum vermehrten Auftreten einer bestimmten Krebsart kommen kann. Falls Mutationen an somatischen Zellen stattfinden, kann die betroffene Zelle erst nach dem Auftreten mehrerer Mutationen an derselben Zelle entarten, was dann wiederum die Entstehung von Krebs initiiert (Komarova, Sengupta et al. 2003, Vogelstein und Kinzler 2015).

1.1.1.1 Maligne Zelltransformationen

Es sind zwei Arten von Mutationen (engl. „*gain-of-function*“, „*loss-of-function*“) sowie drei Klassen von Genen (die Protoonkogene, die Tumorsuppressorgene und die Stabilitätsgene) bekannt, die zu einer malignen Zellveränderung führen können (Griffiths 2005, Hanahan und Weinberg 2011). Onkogene entstehen meist durch „*gain-of-function*“-Mutationen (eine Punktmutation, eine Translokation oder eine Amplifikation) in den Protoonkogenen, deren Produkte an der Proliferationskontrolle in gesunden

Zellen beteiligt sind. Durch die Veränderung an der DNA kann es zu einer dauerhaften Aktivierung der Proliferation und so zu einer Transformation normaler Zellen in maligne Zellen kommen. Zu den bekanntesten Onkogenen gehören unter anderem Ras (engl. „*rat sarcoma*“), EGFR (engl. „*epidermal growth factor receptor*“), Myelocytomatose-Epitop (Myc) und BRAF (Isoform des engl. „*rapidly accelerated fibrosarcoma*“) (Davies, Bignell et al. 2002, Jiang und Liu 2009, Kress, Sabò et al. 2015).

„*Loss-of-function*“-Mutationen kommen meist in Tumorsuppressorgenen vor, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind. Zu den Tumorsuppressorproteinen gehören die Checkpoint-Kontrollproteine, die Kinaseinhibitoren, die Hormonrezeptoren sowie Apoptose-aktivierende Proteine. Hervorgerufen durch die „*Missense*“-Mutation, die sich in der veränderten Proteinstruktur bemerkbar macht, wird die Aktivität der Genendprodukte reduziert und die Zelle bekommt einen Überlebensvorteil gegenüber der nicht mutierten Zelle.

Mutationen in sogenannten Stabilitätsgenen, die für verschiedene Proteine der DNA-Reparaturmechanismen kodieren, können ebenso zur Entartung von Zellen beitragen. Dazu gehören die „*mismatch-repair*“-Gene (MMR), die „*nucleotide-excision*“-Gene (NER) und die „*base-excision-repair*“-Gene (BER) (Vogelstein und Kinzler 2004). Sind die Reparaturmechanismen fehlerhaft, können Veränderungen an einem Protoonkogen oder Tumorsuppressorgen nicht mehr erkannt und repariert werden und ermöglichen eine Zellentartung. Die beschriebenen Modifikationen in den betroffenen Genen sind für veränderte Genprodukte verantwortlich, die wiederum zu weiteren Veränderungen in der gesamten Zellbiologie führen und zu einem gemeinsamen Ziel beitragen: eine ungehinderte Zellvermehrung.

1.1.1.2 Tumoreigenschaften

Ein Tumor ist nicht nur eine Ansammlung unkontrolliert proliferierender Krebszellen, sondern eine Vereinigung aus verschiedenen Zelltypen mit definierten Aufgaben. Diese Zellen sind in der Lage miteinander zu kommunizieren und stellen somit ein komplex funktionierendes Gewebe dar. Demnach ist die Tumorentstehung ein mehrstufiger Mechanismus, der nicht nur durch die Initiation, Proliferation, Progression und Fernmetastasierung, sondern vielmehr durch das Erwerben von zehn biologischen Fähigkeiten der entarteten Zellen gekennzeichnet ist. Die Wissenschaftler Douglas Hanahan und Richard A. Weinberg fassten zum ersten Mal die bereits in zahlreichen einzelnen Publikationen beschriebenen Erkenntnisse über die Tumorbiologie in ihrer Übersichtsarbeit „*Hallmarks of cancer*“ zusammen (Hanahan und Weinberg 2000, Hanahan und Weinberg 2011).

Im Weiteren werden die Eigenschaften der Krebszellen basierend auf zwei Übersichtsarbeiten von Douglas Hanahan und Richard A. Weinberg aus den Jahren 2000 und 2011 zusammenfassend dargestellt (Hanahan und Weinberg 2000, Hanahan und

Weinberg 2011). Sie beschreiben zehn charakteristische Zelleigenschaften, die letztendlich zu einer invasiven malignen Tumorerkrankung führen.

Ein Merkmal entarteter Zellen ist die ungehinderte Proliferation, die durch die zwei Zelleigenschaften „eine ständige Aktivierung von Proliferations-Signalwegen“ und „das Umgehen wachstumshemmender Signalwege“ beschrieben wird (Perona 2006, Witsch, Sela et al. 2010, Hanahan und Weinberg 2011). Durch Überexpression verschiedener Wachstumsfaktoren kann es zu andauernden autokrinen und parakrinen (durch Stroma-Zellen) Proliferationssignalen kommen und somit zu einer ständigen Aktivierung von Signalkaskaden, die zu einer uneingeschränkten Vermehrung von Krebszellen führen (Bhowmick, Neilson et al. 2004, Perona 2006, Cheng, Chytil et al. 2008, Lemmon und Schlessinger 2010). Eine permanente Aktivierung der Proliferation kann aber auch durch eine somatische Mutation in einem der nachgeschalteten Proteine bzw. Rezeptoren der Signalkaskade hervorgerufen werden. Dazu gehört z.B. die aktivierende Mutation im BRAF-Protein, die zu einer ständigen Aktivierung des „*mitogen-activated-protein*“ (MAP)-Kinase-Signalwegs führt (Davies und Samuels 2010). Zusätzlich gehören Mutationen in anderen Signalproteinen z.B. „*phosphatase and tensin homolog*“ (PTEN) und RAS, die zur Aktivierung des Phosphoinosid-3-Kinasen (PI3K)-Signalwegs oder des Ras-Signalwegs und somit zu vermehrter Proliferation in den betroffenen Zellen führen (Yuan und Cantley 2008, Jiang und Liu 2009). Das Umgehen von wachstumshemmenden Signalwegen erfolgt meist durch die oben beschriebenen Mutationen in den Tumorsuppressorgenen. Die häufigsten Mutationen finden in den Tumorprotein 53 (TP53) und den Retinoblastom-assoziierten Protein (RB)-Genen statt. Diese fungieren als Schlüsselkontrollpunkte im Zellzyklus und steuern wichtige Zellfunktionen wie die Seneszenz und die Apoptose (Hanahan und Weinberg 2011).

Daraus leitet sich ein weiteres charakteristisches Merkmal der neoplastischen Zelle ab: „das Entgehen des Zelltodes“ (Lowe, Cepero et al. 2004, Adams und Cory 2007). Durch die Apoptose wird der Tod einer Zelle gezielt induziert, was eine natürliche Barriere zur Krebsentwicklung darstellt. Um der Apoptose zu entgehen, muss ein abschalten bzw. hemmen beider hierfür verantwortlichen Signalwege stattfinden (extrinsisch und intrinsisch). Bei der Auslösung von Caspase-Signalkaskaden, welche zu einem kontrollierten Zellabbau führen, spielt das Gleichgewicht von bestimmten pro-apoptotischen (Bax/Bac) und anti-apoptotischen (Bcl2/BclXL) mitochondrialen Membranproteinen eine entscheidende Rolle (Lowe, Cepero et al. 2004). Die aktivierende Mutation im anti-apoptotischen Bcl2-Protein und die Deaktivierung des TP53-Proteins führen dann zum Verlust der Zellzykluskontrolle, wodurch eine entartete Zelle die Apoptose umgehen kann (Hanahan und Weinberg 2011).

Eine weitere typische Eigenschaft von Krebszellen ist die Fähigkeit der „nicht limitierten Replikation“. Für jede somatische Zelle gibt es eine limitierte Anzahl an Zellteilungen, resultierend aus der Verkürzung der Telomere an den Chromosomenenden (siehe Abschnitt 1.3.2.3). Sobald die Telomere eine kritische Länge erreichen, werden die ent-

sprechend gealterten Zellen in die Seneszenz oder Apoptose geleitet (Hanahan und Weinberg 2011). Eine entartete Zelle teilt sich jedoch öfters als eine gesunde Zelle und müsste dementsprechend schneller altern, jedoch können entartete Zellen ihren Alterungsprozess mittels des Enzyms Telomerase, welches eine wichtige Funktion während der Embryonalentwicklung hat und in adulten, gesunden Zellen nicht vorkommt, verhindern. Dieses Enzym wird in den meisten immortalisierten Krebszellen exprimiert und verschafft ihnen durch die Verlängerung der verkürzten Telomere einen großen Selektionsvorteil (Shay und Wright 2000, Blackburn 2005, Blasco 2005).

Außerdem ist für eine verstärkte Proliferation der Tumorzellen auch eine erhöhte Versorgung durch Nährstoffe und Sauerstoff von großer Bedeutung. Bis zu einer bestimmten Tumorgroße ist die Nährstoffversorgung durch Diffusion ausreichend, doch nach dem Erreichen einer bestimmten Größe benötigt auch der Tumor ein gut ausgebautes Blutgefäßsystem für die Versorgung, welches ein expandierendes Tumorstadium ermöglicht. Die Bildung neuer Blutgefäße wird als „Angiogenese“ bezeichnet und ist eine weitere typische Eigenschaft des Tumorgewebes, welche durch die bereits beschriebenen „Hallmarks“ aktiviert wird (Hanahan und Weinberg 2011).

Dieser Prozess wird normalerweise vom Gleichgewicht zahlreicher Substanzen bestimmt, unter anderem durch Wachstumsfaktoren wie den „*vascular endothelial growth factor*“ (VEGF) und den „*fibroblast growth factor*“ (FGF), die eine Gefäßneubildung fördern, wohingegen Interleukin-8 (IL-8), Thrombospondin-1 (TSP-1), Angiostatin, Interferon- α (INF- α) und INF- γ , dem entgegen wirken (Bergers und Benjamin 2003, Baeriswyl und Christofori 2009, Ferrara 2009). Die Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der aktivierenden Faktoren wirkt als Initiator für die Angiogenese (engl. „*angiogenic switch*“). Durch eine verstärkte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (VEGF) aus den Tumorzellen in die Umgebung werden umliegende Blutgefäße erreicht und zum Wachsen entlang des VEGF-Gradienten in Richtung der Tumormasse angeregt. Daraus resultiert, dass das Tumorgewebe mit neuen Blutgefäßen vaskularisiert wird und somit ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden kann (Carmeliet und Jain 2000, Ferrara 2002).

Eine weitere Eigenschaft einer Krebszelle ist ihr „Potential des invasiven Tumorstadiums und der Metastasierung“ (Hanahan und Weinberg 2011). Die „*epithelial-mesenchymal transition*“ (EMT) spielt bei der „Auswanderung“ von Krebszellen ins ferne Gewebe eine wichtigste Rolle und beschreibt die Differenzierung von einer epithelialen Tumorzelle in eine Tumorzelle mit mesenchymalen Phänotyp. Dadurch verliert die Tumorzelle den Halt zur extrazellulären Matrix und kann als mesenchymale Zelle über die Blutbahn oder das Lymphsystem zum Ort der Metastasierung wandern. In den meisten Tumorarten ist hierfür die aktivierende Mutation des c-Myc-Proteins, welches die EMT in den Körperzellen reguliert, verantwortlich (Cho, Cho et al. 2010). Die entscheidende Umwandlung von einer mesenchymalen Zelle zurück in eine epitheliale Tumorzelle erfolgt im Zielorgan der Metastasierung (Klymkowsky und Savagner 2009).

Ein weiterer wichtiger Adaptionsmechanismus der Tumorzellen, welcher durch Douglas Hanahan und Richard A. Weinberg definiert wurde, ist die Fähigkeit der Zellen ihren Energiehaushalt umzustellen. Dabei wird der Metabolismus der Tumorzelle an die extremen Bedingungen, wie einen vermehrten Nährstoff- und Sauerstoffmangel, angepasst, indem sie auf die anaerobe Glykolyse umsteigen (Warburg 1931, Denko 2008).

Eine weitere überlebenswichtige Fähigkeit einer Tumorzelle ist es, die Mechanismen der Immunüberwachung zu umgehen. Normalerweise werden präkanzeröse Läsionen durch das Immunsystem erkannt und bekämpft (Smyth, Dunn et al. 2006). Tumorzellen können dieser Erkennung erfolgreich entkommen und somit ungehindert weiter wachsen (Teng, Swann et al. 2008, Hanahan und Weinberg 2011).

Die „Induktion der Tumorprogression fördernden Entzündung“ ist eine weitere spezifische Eigenschaft von Tumorzellen (Abbildung 2). Dabei wird der Tumor mit Immunzellen infiltriert, die bestimmte Botenstoffe wie Zytokine sezernieren. Dadurch wird eine der Entzündung sehr ähnliche Situation in gesunden Zellen ausgelöst (Dvorak 1986, Hanahan und Weinberg 2011). Momentan wird die Auswirkung der Entzündung auf die Tumorentwicklung gegensätzlich interpretiert. Zum einen gibt es Anhaltspunkte für eine tumorfördernde Wirkung, zum anderen wird aber auch eine Immunantwort gegen das Tumorstadium diskutiert (Hanahan und Weinberg 2011, Fridman, Pagès et al. 2012).

Durch die Deaktivierung von DNA-Reparaturmechanismen (siehe oben „Mutation in Stabilitätsgenen“) in Tumorzellen kommt es zu „Genominstabilitäten und Genmutationen“, die an Tumortochterzellen weitergegeben werden (Hanahan und Weinberg 2011). In Abbildung 2 werden alle zehn genannten Merkmale in einer Übersicht dargestellt.

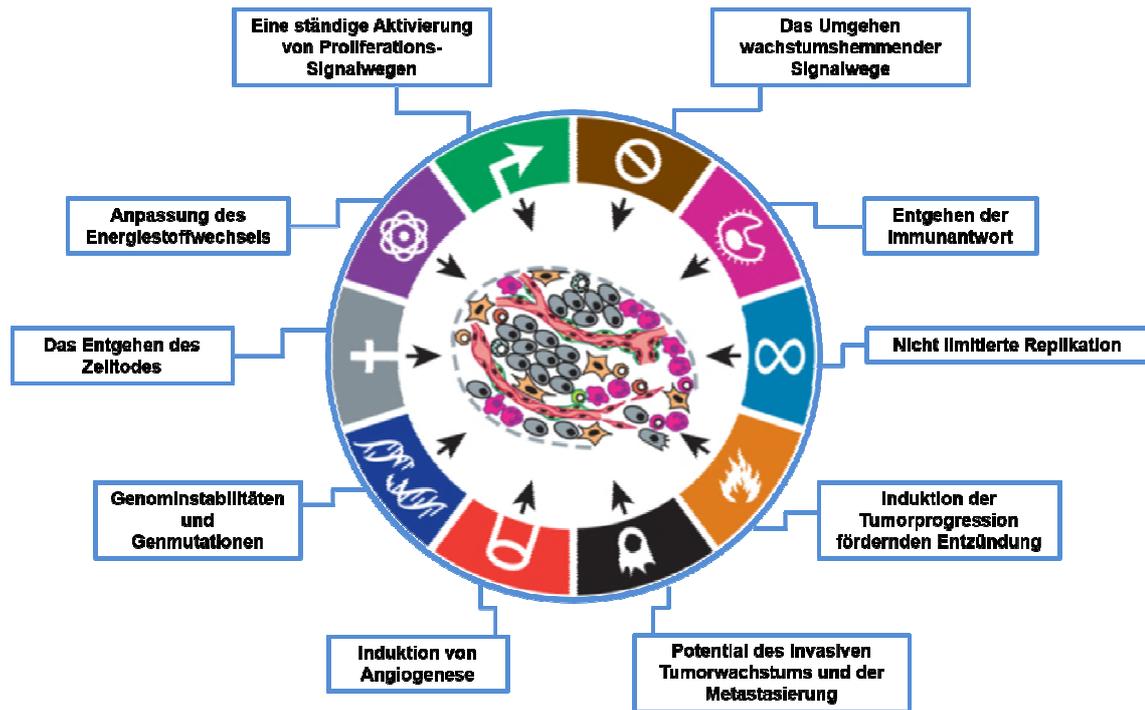


Abbildung 2: Eine Übersicht über die zehn „Hallmarks“ der Krebszellen

In der Übersicht werden die zehn Haupteigenschaften von Krebszellen dargestellt, die benötigt werden, um eine maligne Erkrankung zu entwickeln (abgewandelt nach „*Hallmarks of cancer: The next generation*“ (Hanahan und Weinberg 2011)).

Die beschriebenen Eigenschaften stellen ein Netzwerk aus zahlreichen regulierenden und gegenregulierenden molekularbiologischen und biochemischen Mechanismen dar. Diese kommen nicht unbedingt alle gleichzeitig in einer Zelle vor, sondern vielmehr in verschiedenen Kombinationen unterschiedlicher Zellen, die zusammen ein sehr komplex funktionierendes „Tumorgan“ ausbilden. Außerdem darf die Tumormikroumgebung (TME, engl. „*tumor microenvironment*“) nicht außer Acht gelassen werden. Die den Tumor umgebenden Strukturen interagieren mit dem Tumorgewebe und beeinflussen das invasive Wachstum, die Angiogenese sowie die Metastasierung massiv (Koontongkaew 2013). Neben Tumorzellen selbst zählen auch gesunde Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten, Makrophagen, Stammzellen, Lymphozyten, Knochenmarkszellen (BMDCs, engl. „*bone marrow-derived cells*“) sowie die extrazelluläre Matrix (ECM, engl. „*extracellular matrix*“), Blutgefäße und Lymphgefäße zum TME (Pietras und Östman 2010, Koontongkaew 2013).

1.2 Das kolorektale Karzinom

Krebserkrankungen des Dickdarms (Kolon) oder des Mastdarms (Rektum) werden zusammen als kolorektales Karzinom (CRC, engl. „*colorectal cancer*“) bzw. Darmkrebs bezeichnet. CRC ist die dritthäufigste Krebserkrankung in den USA bei Männern und

Frauen (Siegel, Miller et al. 2015). Das Risiko daran zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter, doch aufgrund der gut etablierten Vorsorgeuntersuchungen geht die Zahl der Neuerkrankungen stetig zurück (Jemal, Bray et al. 2011). In ca. 90 % der Fälle entsteht CRC sporadisch, d.h. ohne genetische Prädisposition (Bogaert und Prenen 2013).

1.2.1 Die Risikofaktoren

Es existieren mehrere Risikofaktoren, welche die Wahrscheinlichkeit, an Darmkrebs zu erkranken, erhöhen.

Neben dem sporadisch auftretenden CRC gibt es durchaus Patienten, die eine genetische Prädisposition für CRC besitzen (Patel und Ahnen 2012). Dazu gehören definierte genetische Krankheitsbilder, die Keimbahnmutationen in „*adenomatous polyposis coli*“ (APC) oder PTEN-Genen enthalten und das vermehrte Auftreten von Darmkrebs innerhalb der Familie. Keimbahnmutationen beschleunigen die Tumorentstehung, wodurch CRC auch bei jungen Patienten vermehrt auftreten kann. Das Krankheitsbild der familiären adenomatösen Polyposis coli (FAP) zeigt hunderte bis tausende adenomatöse Polypen im Dickdarm (Jasperson, Tuohy et al. 2010). Beim Lynch-Syndrom hingegen ist keine extensive Polypenbildung zu beobachten (Lynch, Shaw et al. 1966), dennoch haben die Betroffenen ein deutlich erhöhtes Risiko, an CRC und anderen Krebsarten wie z.B. Magenkarzinom, Eierstockkarzinom, Dünndarm-, Nieren- und Leberkrebs zu erkranken (Watson und Riley 2005). Auch andere Erkrankungen des Darmes können letztendlich zu Darmkrebs führen. Dazu gehören chronisch entzündliche Krankheiten wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa. Die genannten Prädispositionen können durch äußere Risikofaktoren wie das Rauchen, den Lebensstil und die Ernährungsgewohnheiten zusätzlich verstärkt werden. Demnach haben Menschen mit Übergewicht und Bewegungsmangel sowie Menschen mit übermäßigem Alkoholkonsum, ballaststoffarmer, fleischreicher und fetthaltiger Ernährung ein deutlich höheres Risiko, an Darmkrebs zu erkranken (Siegel, Miller et al. 2017).

1.2.2 Die Vorsorgeuntersuchungen

Die Progression einer Darmkrebs-Erkrankung verläuft in der Anfangsphase zumeist ohne Beschwerden. Außerdem sind erste Symptome der Erkrankung meist sehr allgemeine Beschwerden, die nicht für Darmkrebs spezifisch sind wie z.B. Müdigkeit, veränderte Stuhlgewohnheit, Blut im Stuhl, Bauchschmerzen, Krämpfe sowie unerklärlicher Gewichtsverlust. Alle genannten Symptome könnten unabhängig voneinander auftreten und auf viele andere Erkrankungen hindeuten. Demzufolge gibt es keine spezifischen Merkmale für die Früherkennung von Darmkrebs. Die beste Darmkrebsprävention heutzutage ist eine regelmäßige Vorsorgeuntersuchung. Im Folgenden wird eine kurze Übersicht über bereits angewandte Methoden der Darmkrebsfrüherkennung gegeben.

Es existieren verschiedene Verfahren für die Darmkrebsfrüherkennung wie z.B. die Koloskopie, die Sigmoidoskopie, ein Test auf okkultes Blut im Stuhl (FOBT, Fäkaler okkultes Bluttest), eine spezielle Computertomographie (CT)-Kolonographie, eine Kapselendoskopie sowie genetische und andere Stuhltests (Schmiegel, Reinacher-Schick et al. 2008).

Im Vergleich zu allen hier genannten Methoden erhält man mittels der Endoskopie die höchste Sensitivität und Spezifität, um Neoplasien, wie Adenome und Karzinome, im Darmgewebe frühzeitig zu erkennen. Daher wird die Endoskopie als Goldstandard-Methode angesehen. Außerdem ist sie das einzige Verfahren, welches gleichzeitig diagnostisch und therapeutisch angewandt werden kann und es dadurch ermöglicht, die bereits während der Untersuchung festgestellten Polypen bzw. Adenome sofort abzutragen. Studien haben bereits gezeigt, dass diese Maßnahme zur Unterbrechung der Adenom-Karzinom-Sequenz führen kann und somit die Darmkrebs-bedingte Mortalität verringert (Citarda, Tomaselli et al. 2001, Zauber, Winawer et al. 2012). Alle alternativen Methoden können teilweise nur Hinweise auf eine mögliche Erkrankung geben.

1.2.3 Die Darmkrebsentwicklung

Im Jahr 1990 stellten Eric Fearon und Bert Vogelstein ein Modell über die genetische Basis der Darmkrebsentwicklung vor (Fearon und Vogelstein 1990). Es handelt sich dabei um einen mehrstufigen Prozess von genetischen Mutationen und chemischen Modifikationen während der Darmkrebsentwicklung (Abbildung 3), wobei nicht die Reihenfolge, sondern die Akkumulation der Ereignisse für die letztendliche Darmkrebs-Erkrankung entscheidend ist (Fearon 2011).

Eine Darmkrebs-Erkrankung beginnt zunächst mit einer harmlosen Bildung von Polypenknospen an der inneren Seite des ca. 1,5 m langen Kolons bzw. am ca. 15-20 cm langen Rektum. 95 % der CRC Patienten leiden an einem Adenokarzinom, welches sich ursprünglich aus Drüsenzellen (Mukosa) durch monoklonale Expansion einer einzigen Zelle entwickeln konnte. Bei den restlichen 5 % wurden entweder Sarkome, Lymphome, Plattenepithelkarzinome oder neuroendokrine Tumoren diagnostiziert (Kinzler und Vogelstein 1996, Fearon 2011). In neuesten klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass große, gezahnte und nicht dysplastische Polypen mit einem erhöhten Darmkrebsrisiko assoziiert werden können (Bettington, Walker et al. 2013). Dabei wird die Entwicklung von einem Polypen zu einem Karzinom als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet und kann bis zu 10 Jahre dauern (Abbildung 3).

Insgesamt können fünf verschiedene Entwicklungsstadien (Stadium 0 bis 4) unterschieden werden. Die Aufteilung erfolgt dabei nach den Richtlinien der UICC (engl. „*Union for International Cancer Control*“) (Sobin, Gospodarowicz et al. 2011) (siehe Tabelle 1 in Abschnitt 1.2.4).

Heute gehört CRC zu einer der am besten genetisch untersuchten Krebserkrankungen (Network 2012, Sottoriva, Kang et al. 2015, Hardiman, Ulintz et al. 2016). Es werden

insgesamt drei verschiedene molekulare Wege der Darmkrebsentstehung beschrieben: 1) die Chromosomen-Instabilität (CIN), 2) die Mikrosatellit-Instabilität (MSI) und 3) die Hypermethylierung von CpG-reichen DNA-Abschnitten (CIMP, engl. „*CpG Island Methylation Pathway*“) (Bogaert und Prenen 2013).

Die CIN wird durch eine Akkumulation von somatischer Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen sowie durch verschiedene abnormale strukturelle Chromosomenveränderungen definiert (Lengauer, Kinzler et al. 1997). Die häufigste und zugleich frühzeitigste genetische Veränderung der Tumorgenese in der Entstehungsphase von CRC findet bereits im ersten Stadium (0) während der Entwicklung eines leicht hyperproliferativen Epithels mit einer beginnenden Polypenbildung statt. Hierbei handelt es sich um eine mögliche Mutation im APC-Gen des Chromosom 5q21, die eine Störung des Wnt-Signalweges der betroffenen Zellen hervorruft (Kinzler, Nilbert et al. 1991, Thorstensen, Lind et al. 2005). APC, ein Tumorsuppressorgen, liegt in 95 % aller sporadisch auftretenden Darmkrebstumoren mutiert vor. Dabei mutieren entweder beide Allele oder es kommt zu einer Mutation von nur einem Allel des APC-Gens und zusätzlich zu einem gleichzeitigen Verlust des zweiten Allels (Powell, Zilz et al. 1992). Eine besonders schlechte Prognose haben Patienten mit mutierter β -Catenin-Bindungsstelle im APC-Gen des Chromosom 5q21 (Fearon 2011).

Nach Vogelsteins Theorie sind nur sieben verschiedene Mutationen für die Tumorgenese verantwortlich. Jedoch konnten durch eine Genomsequenzierung des CRC bereits über 80 verschiedene Mutationen pro Tumor detektiert werden, wobei 15 dieser Mutationen als besonders einflussreich erfasst wurden (Wood, Parsons et al. 2007). Unter anderem handelt es sich um Mutationen in den folgenden Genen: BRAF, „*kirsten rat sarcoma*“ (KRAS), PI3K, EGFR, TP53, Cyclooxygenase 2 (COX2) und „*small mothers against decapentaplegic homolog 4*“ (SMAD4). Die meisten dieser Genveränderungen fördern die Stadien 1 und 2 der Tumorgenese des CRC (vom frühen bis zum späten Adenom). Dabei gibt es mehrere Kombinationsmöglichkeiten zwischen den Mutationen, woraus sich die unterschiedlichen CRC-Phänotypen erklären lassen (Wood, Parsons et al. 2007, Vogelstein, Papadopoulos et al. 2013). In der späten Phase der Tumorgenese (Stadien 3 und 4) kann es zu einer Mutation im Gen-TP53 und dadurch zum Funktionsverlust des p53-Proteins kommen, welches eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus spielt. Als Folge dessen kann es zur Entwicklung eines invasiven Karzinoms und zur Metastasen Bildung in anderen Organen wie z.B. der Leber und der Lunge kommen (Abbildung 3) (Pfannschmidt, Dienemann et al. 2007, Andres, Mentha et al. 2015).

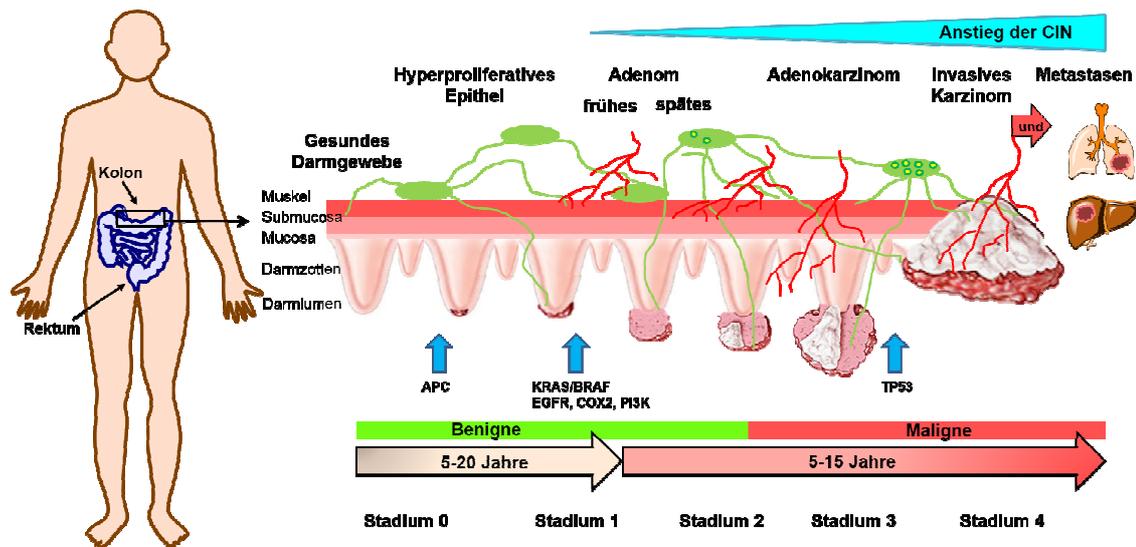


Abbildung 3: Die stufenweise Entwicklung von Darmkrebs nach der Vogelsteinhypothese

Hier ist der sukzessive Übergang eines gesunden Darmepithels zum Adenom und anschließend zu einem invasiven Karzinom mit Metastasenbildung dargestellt. Dabei spielen somatische Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen eine große Rolle für die Tumorgenese des sporadisch vorkommenden CRC (Pfannschmidt, Dienemann et al. 2007, Andres, Mentha et al. 2015, Vogelstein und Kinzler 2015).

Eine weitere genetische Instabilität des CRC ist die Dysfunktion der MMR, die sogenannte MSI, die bei ca. 15 % der sporadisch entstandenen CRC-Fälle auftritt und als Marker für „*hereditary nonpolyposis colorectal cancer*“ (HNPCC) gilt (Lengauer, Kinzler et al. 1997). Hier liegt eine Mutation in DNA-Mismatch-Reparaturgenen (z.B. MLH1, MSH2, MSH6 und PMS2) vor. In diesem Zusammenhang kommt es oft zu einer epigenetischen Modifikation (Hypermethylierung) der Promotorregion für MMR-Enzyme wie MLH1. Diese führt zur Stilllegung der betroffenen Gene (Weisenberger, Siegmund et al. 2006, Bogaert und Preen 2013).

Die weitverbreitete Hypermethylierung der CpG-reichen DNA-Abschnitte wird oft mit MSI-positiven, sporadisch auftretenden CRC-Tumoren assoziiert. Dabei werden CIMP-positive Tumoren in zwei Gruppen aufgeteilt: 1) „CIMP-high“, welche mit aktivierenden BRAF-Mutationen und MLH1-Promotorregion-Methylierungen assoziiert werden, sowie 2) „CIMP-low“, mit KRAS-Mutationen (Shen, Toyota et al. 2007).

In den letzten Jahren wurde CRC immer häufiger als eine heterogene Erkrankung beschrieben. Dabei wird die intratumorale Heterogenität im CRC durch die Lokalisierung von verschiedenen Mutationen und deren unterschiedliche Anzahl in den einzelnen Adenomknospen gekennzeichnet, wobei die molekularen und genetischen Eigenschaften des Tumors die Prognose und den Therapieerfolg bestimmen können (Preen, Vecchione et al. 2013, Sottoriva, Kang et al. 2015).

Ein Beispiel hierfür ist die aktivierende Mutation im BRAF(V600E)-Gen, die bei 7 % der auftretenden CRC-Tumoren vorkommt (Kalady, DeJulius et al. 2012). Dabei wird durch

eine Punktmutation im BRAF-Gen am Codon 600 (V600E) eine Pyrimidinbase Thymin gegen eine Purinbase Adenin (CTG → CAG) ausgetauscht, wodurch es nach der Translation zum Einbau von Valin anstatt Glutaminsäure in das BRAF-Protein kommt (Ikenoue, Hikiba et al. 2003). Als Folge dessen kommt es zu einer permanenten Aktivierung des „*extracellular signal-regulated kinase / mitogen-activated protein*“ (ERK/MAP)-Signalweges und zur Förderung des unkontrollierten Zellwachstums (Davies, Bignell et al. 2002). Die betroffenen Patienten haben eine besonders schlechte Überlebensprognose und zeigen eine bis zu 70 % höhere Mortalitätsrate als Patienten ohne mutiertes BRAF(V600E)-Gen (Hutchins, Southward et al. 2011). Diese Patienten sprechen sehr schlecht auf eine systemische Chemotherapie an, entwickeln schnell Therapieresistenzen und haben eine hohe Rückfallquote (De Roock, Claes et al. 2010, Jemal, Bray et al. 2011, Van Cutsem, Köhne et al. 2011). Interessanterweise erwies sich eine sehr effektive BRAF-Inhibitor-Therapie mit PLX4032 (Vemurafenib) für BRAF-mutierte Melanome als ineffektiv für äquivalente BRAF-mutierte CRC-Tumoren (Prahallad, Sun et al. 2012).

1.2.4 Die Tumorklassifizierung

Eine Klassifizierung von Darmkrebs in die unterschiedlichen Krankheitsstadien erfolgt nach den Richtlinien der UICC. Bei der TNM-Klassifikation steht (T) für Tumor, (N) für Lymphknoten (lat. *Nodus*) und (M) für Metastase (Tabelle 1) (Compton und Greene 2004). Für die Einteilung werden verschiedene Tumormerkmale wie die Tumorausdehnung im Gewebe, der Befall von Lymphknoten sowie die Existenz von Metastasen berücksichtigt.

Tabelle 1: Eine Einstufung von Darmkrebs nach TNM-Klassifikation

Tx	Tumor kann nicht bewertet werden
T0	Kein Tumor vorhanden
Tis	Karzinom in situ; Krebszellen nur in der obersten Darmschleimhaut
T1	Tumor ist auf die Mukosa beschränkt
T2	Tumor ist in der Mukosa und im Muskelgewebe integriert
T3	Tumor ist in alle Schichten der Darmwand eingewachsen
T4	Tumor ist in das benachbarte Gewebe und / oder andere Organe eingewachsen
Nx	Benachbarte Lymphknoten können nicht bewertet werden
N0	Benachbarte Lymphknoten sind frei von Krebszellen
N1	Einer bis drei der benachbarten Lymphknoten sind befallen
N2	Vier oder mehr Lymphknoten sind befallen
Mx	Vorhandensein von Metastasen kann nicht bewertet werden
M0	Keine Metastasen
M1	Metastasen in anderen Organen oder in ferne Lymphknoten

Aus der in Tabelle 1 aufgezeigten TNM-Klassifikation können die Krankheitsstadien ermittelt werden. Die in Tabelle 2 aufgezeigte Methode der UICC ist eine der gebräuchlichsten für die Einstufung von Darmkrebstumoren (Gospodarowicz, Brierley et al. 2017).

Tabelle 2: Aufteilung von Darmkrebsstadien nach UICC

Stadium (UICC)	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium 1	T1, T2	N0	M0
Stadium 2	T3, T4	N0	M0
Stadium 3	jedes T	N1, N2	M0
Stadium 4	jedes T	jedes N	M1

Für die Überlebensprognose von CRC-Patienten wird zusätzlich der Differenzierungsgrad der einzelnen Tumoren berücksichtigt. Die meisten Adenome sind durch eine drüsenförmige Struktur charakterisiert, was als ein Anhaltspunkt für die Beurteilung des Differenzierungsgrades verwendet wird. Dabei bestehen gut differenzierte Tumoren zu über 95 %, mäßig differenzierte Tumoren zu 50-95 % und schlecht differenzierten Tumoren zu unter 50 % aus drüsenförmigen Strukturen (Fleming, Ravula et al. 2012).

Patienten mit geringerem Differenzierungsgrad haben jedoch eine schlechtere Prognose als Patienten mit gut differenzierten CRC-Tumoren.

1.2.5 Die Darmkrebsbehandlung

Heutzutage werden Therapiepläne an den individuellen Krankheitsverlauf jedes CRC-Patienten angepasst. Wichtige Informationen sind hierbei das Tumorstadium, die Tumorgroße und die Tumorlokalisation. Des Weiteren spielen der Allgemeinzustand sowie das Alter und eventuelle Begleiterkrankungen des jeweiligen Patienten für die spezifische Therapieplanung eine bedeutende Rolle. Im Folgenden werden Therapieaspekte des CRC nach Brenner et al. zusammenfassend beschrieben (Hermann Brenner 2014).

Unter Verwendung nichtinvasiver bildgebender Verfahren wie der PET/CT oder der PET und Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) kann eine bessere Therapieplanung für einzelne Patienten ermöglicht werden. Kawada et al. konnten beobachten, dass [¹⁸F]FDG stärker in CRC-Tumoren mit KRAS/BRAF-Mutationen akkumulierte als in Tumoren ohne diese Mutationen. Potentiell könnte [¹⁸F]FDG also zur Identifikation therapieresistenter Tumoren, basierend auf KRAS/BRAF Mutationen, in den frühen Stadien des CRC eingesetzt werden (Kawada, Nakamoto et al. 2012). Dies ermöglicht den Kliniken, die CRC-Patienten in zwei Gruppen aufzuteilen, die „Therapie-Responder“, die auf die Therapie ansprechen, sowie die „Non-Responder“, die nicht auf die Therapie ansprechen. Durch die Aufteilung profitieren besonders die „Non-Responder“-Patienten, wobei diese direkt mit einer passenden Alternativ-Therapie behandelt werden können (Capirci, Rampin et al. 2007, Grassetto, Marzola et al. 2011).

Als eine mögliche Zellreaktion auf die Chemotherapie können im Tumorgewebe verschiedene Prozesse ausgelöst werden, unter anderem eine Nekrose, eine Apoptose und/oder eine Seneszenz. Da die Apoptose bereits in 1.1.1.2 erwähnt wurde, wird im Weiteren zunächst die Nekrose beschrieben. Der Prozess der zellulären Seneszenz stellt einen großen Bestandteil dieser Forschungsarbeit dar und wird ausführlich im Abschnitt 1.3.2 erläutert.

1.3 Die Tumorstressantwort

Die zelluläre Tumorstressantwort ist ein wichtiger Mechanismus mit pathophysiologischer Bedeutung. Sie stellt eine Abwehrreaktion der Tumorzelle auf Schäden dar, die unter anderem durch die Chemotherapie mit zytotoxischen Substanzen oder durch Nährstoff- und Sauerstoffmangel entstehen. Dabei gibt es zahlreiche Möglichkeiten einer Tumorantwort auf zellulären Stress. Dazu gehören unter anderem Apoptose, Nekrose, Autophagie und Seneszenz (Berghe, Linkermann et al. 2014, Mukhopadhyay, Panda et al. 2014, de Magalhães und Passos 2017).

Der Prozess der Seneszenz stellt eine zentrale Rolle in dieser Arbeit dar und wird in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben. Außerdem wird im Rahmen dieser Arbeit auf die Nekrose während der longitudinalen *in vivo* Charakterisierung patienten-abgeleiteter Kolonkarzinom-Modellen eingegangen. Diese wird im nächsten Abschnitt im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen in Kürze beschrieben.

1.3.1 Die Nekrose

Nach aktuellen Erkenntnissen der Wissenschaft kann die Nekrose in stark regulierter und genetisch kontrollierter Weise auftreten (Berghe, Linkermann et al. 2014). Die Regulation der Nekrose auf der molekularen Ebene ermöglicht diesen Prozess in Zukunft besser zu verstehen und therapeutisch anzugehen.

Eine vorhandene Nekrose wird in Bezug auf die Tumorbiologie während der Tumorentwicklung mit einer sehr aggressiven Form der Erkrankung und damit einer schlechten Überlebensprognose für die Patienten assoziiert (Richards, Mohammed et al. 2011). In klinischen Studien wurden bereits hunderte von Darmkrebspatienten untersucht, der Zusammenhang zwischen einer vorhandenen Nekrose im Tumor und der Assoziation einer sich daraus ergebenden schlechteren Überlebensprognose konnte bestätigt werden (Pollheimer, Kornprat et al. 2010, Richards, Mohammed et al. 2011). Im Gegensatz dazu kann die Entwicklung einer Nekrose während einer Krebstherapie auf einen Therapieerfolg hindeuten. Durch diesen Prozess kann eine Entzündungsreaktion des Immunsystems ausgelöst werden, welche zu einer Tumorregression führen kann (Zhang und Chen 2016).

1.3.2 Die zelluläre Seneszenz

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Etablierung von spezifischen Seneszenz-Tracern für die PET-Diagnostik. An dieser Stelle werden die Grundlagen der Seneszenz beschrieben.

Leonard Hayflick und Gareth F. Moorhead konnten Anfang der sechziger Jahre zum ersten Mal zeigen, dass humane diploide Fibroblasten unter *in vitro* Bedingungen eine begrenzte Proliferationskapazität besitzen und nannten dieses Phänomen die „zelluläre Seneszenz“ (Hayflick und Moorhead 1961, Hayflick 1965, Shay und Wright 2000). Damals wurde die Seneszenz lediglich als Alterungsprozess der Zellen angesehen (Hayflick 1965). Heutzutage ist bekannt, dass Seneszenz ein sehr komplexes und vielseitiges zellulär gesteuertes Programm ist, welches eine große Rolle bei altersassoziierten Erkrankungen spielt, wie z.B. bei der Arteriosklerose, der pulmonalen Hypertonie, bei Alzheimer, Parkinson, Emphysem, Insulinresistenzen sowie malignen und kardiovaskulären Erkrankungen (Campisi und Robert 2014). Außerdem spielt die zelluläre Seneszenz eine wichtige Rolle bei der Umgestaltung von Gewebe während der Embryonalentwicklung und der Eliminierung von zerstörten Zellen z.B. bei der Wundheilung (Muñoz-Espín und Serrano 2014).

Dabei wird zwischen der replikativen und der prämaternen Seneszenz unterschieden (Campisi und di Fagagna 2007). Die replikative Seneszenz entsteht durch die mitotische Verkürzung von Telomeren. Die prämatere Seneszenz kann durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden wie z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. „*reactive oxygen species*“), Chemotherapeutika, DNA-Schäden, Chromatin-Störungen und die Aktivierung von Onkogenen (te Poele, Okorokov et al. 2002, Mallette und Ferbeyre 2007, Adams 2009, Prieur, Besnard et al. 2011, Campisi 2013).

1.3.2.1 Merkmale der zellulären Seneszenz

Senescente Zellen unterliegen einem Zellzyklusarrest, der in allen betroffenen Zellen meist in der G1-Phase nachweisbar ist und von einem komplexen Phänotyp begleitet wird (Campisi und di Fagagna 2007). Um einen Proliferationsarrest nachzuweisen, können der Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay und eine Ki67 immunhistochemische (IHC)-Färbung als etablierte Methoden eingesetzt werden. Als Goldstandard für den Nachweis einer zellulären Seneszenz hat sich jedoch der seneszenz-assoziierte β -D-Galactosidase (SA- β -Gal) Aktivitäts-Assay etabliert (Dimri, Lee et al. 1995). SA- β -Gal ist ein lysosomales Enzym, auf welches in Abschnitt 1.4.1 näher eingegangen wird. Als ein zweiter lysosomaler seneszenz-assoziiertes Marker wurde vor wenigen Jahren die α -L-Fucosidase Typ1 (FUCA1) identifiziert, welche in Abschnitt 1.4.2 näher beschrieben wird (Hildebrand, Lehle et al. 2013).

Senescente Zellen zeigen *in vitro* eine charakteristisch veränderte Zellmorphologie. Die Zellen formen mehr Vakuolen, sind deutlich flacher und größer und weisen höhere Anteile an granulösen Strukturen auf. Diese Veränderungen können durch die Zunahme der zytosolischen Masse, einer erhöhten Proteinproduktion und Autophagie erklärt werden (Goldstein 1990, Young, Narita et al. 2009). Die seneszenten Zellen befinden sich zwar in einem irreversiblen Zellzyklusarrest, bleiben dennoch vital und metabolisch sehr aktiv (Campisi und di Fagagna 2007, Collado, Blasco et al. 2007).

Eine weitere wichtige Veränderung in einer seneszenten Zelle ist die permanente Aktivierung der zellulären Antwort auf DNA-Schäden (DDR, engl. „*DNA damage response*“) (Von Zglinicki, Saretzki et al. 2005). Bei der zellulären DDR wird zwischen der DNA-„*segments with chromatin alterations reinforcing senescence*“ (SCARS) und der DNA-„*senescence associated heterochromatin foci*“ (SAHF) unterschieden (Campisi 2011, Rodier, Muñoz et al. 2011).

Die DNA-SAHF führt zur Formation von sogenannten Heterochromatin-Körpern, die durch die Kondensierung einzelner Chromosomen entstehen und somit kleine subnukleäre, rundliche Strukturen bilden. Diese können mit Hilfe des Heterochromatinproteins 1 γ (HP1 γ) in der IHC oder mit 4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI) detektiert werden (Narita, Nuñez et al. 2003, Bartkova, Rezaei et al. 2006). Dabei sorgen die DNA-SAHF für die Stilllegung von bestimmter Genen, die für die Zellproliferation notwendig sind und es kommt somit zu einem Zellzyklusarrest (Narita, Nuñez et al. 2003, Zhang,

Poustovoitov et al. 2005). Außerdem sind die DNA-SAHF mit der Expression von p16INKa4, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK, engl. „*cyclin dependent kinase*“), des hypophosphorylierten RB und dem HP1 γ assoziiert (Ohtani, Yamakoshi et al. 2004).

Die DNA-SCARS beschreiben bestimmte DNA-Segmente die beschädigt wurden, wodurch es zu einer Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 kommt und zu einer Stimulation der Transkription von Genen, die zu der Inhibierung der Zellzyklusprogression führen (Campisi und di Fagagna 2007, Campisi 2011). Außerdem wurde gezeigt, dass Zellen mit DNA-SCARS eine Reihe von verschiedenen Zytokinen (z.B. IL-6, IL-8), Proteasen (Matrix-Metalloproteasen: MMPs) und Wachstumsfaktoren (VEGF, „*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*“: GM-CSF) mit autokriner und parakriner Wirkung sekretieren (SASP, engl. „*senescence associated secretory phenotype*“) (Young und Narita 2009).

1.3.2.2 Signalwege der Seneszenz

Obwohl unzählige Auslöser für die Seneszenz bekannt sind, läuft die Induktion der replikativen und prämaturnen Seneszenz teilweise über die gleichen molekularen Mechanismen ab, die durch Schäden an der DNA aktiviert werden. Dabei werden zwei zentrale Signalwege (p53/p21 und p16INKa4/pRB) unterschieden, in welchen die Tumorsuppressorproteine p53 und RB eine entscheidende Rolle spielen (Ben-Porath und Weinberg 2005). Beide Signalwege, p53/p21 und p16INKa4/pRB, sind sehr komplex und besitzen multiple Regulatoren und Effektoren. Die gemeinsame Schnittstelle beider Wege repräsentiert das RB Tumorsuppressorprotein (Chau und Wang 2003, Levine und Oren 2009).

Der p53/p21-Weg wird auch oft als DDR-Signalweg bezeichnet. Dabei sorgen die Proteinkinasen „*ataxia telangiectasia mutated*“ (ATM) oder „*ataxia telangiectasia and Rad3-related*“ (ATR) durch die Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53 für seine posttranslationale Stabilisierung (di Fagagna, Reaper et al. 2003). Dadurch sammeln sich in den Zellen p53-Protein, welches als Transkriptionsfaktor für p21 fungiert und dessen Expression aktiviert (Kulju und Lehman 1995). Das Protein p21 ist ein CDK-Inhibitor, welcher den CyclinE/CDK2 Komplex hemmt. Dadurch kann die Phosphorylierung und somit die Inaktivierung des RB-Proteins durch den CyclinE/CDK2 Komplex nicht erfolgen. Das RB-Protein bleibt in seiner hypophosphorylierten aktiven Form (pRB) und bindet an die Transkriptionsfaktorfamilie E2F, womit die Transkription von Effektorproteinen aus dem Zellzyklus nicht stattfinden kann und es zu einem Proliferationsstopp kommt (Narita, Nuñez et al. 2003). Abbildung 4 zeigt eine schematische Übersicht über die Signalwege der Seneszenz.

Der p16INKa4/pRB-Signalweg wird meist durch Onkogene (z.B. Ras) aktiviert (Loaiza und Demaria 2016). Dabei werden durch die Bindung von p16 (ein CDK-Inhibitor) an CDK4 und CDK6, beide Kinasen gehemmt und können RB nicht mehr phosphorylie-

ren. Somit kann das hypophosphorylierte RB akkumulieren, wobei beide Signalwege bei der Inaktivierung der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie zusammenlaufen.

Ein weiterer Signalweg für die Induktion einer Seneszenz durch DDR wurde vor kurzem von Chanhee Kang et al. beschrieben (Kang, Xu et al. 2015). Die Autoren konnten zeigen, dass über GATA4 (an „GATA“-DNA-Sequenz bindender Transkriptionsfaktor) und „*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer*“ (NF- κ B) insbesondere die SASP-Produktion hochreguliert wird. In Abbildung 4 ist dieser Signalweg schematisch dargestellt. Auch hier dienen DDRs als Initiatoren einer Seneszenz und aktivieren ATM und ATR Proteinkinasen. Diese wiederum hemmen durch eine Phosphorylierung das Nukleoprotein 62 (p62), welches als Adapterprotein für die Autophagie dient. Dadurch wird die Interaktion zwischen p62 und GATA4 verhindert und die Autophagozytose gestoppt, wodurch es zu einer Akkumulation von GATA4 im Zellkern kommt. GATA4 gehört zur Familie der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren und aktiviert die Transkription von Seneszenz-assoziierten SASP-Genen für IL-6, IL-8, IL-1 α und GM-CSF-Proteine (Dennis Jr, Sherman et al. 2003). Außerdem wird die Transkription von Traf3ip2, einer E3 Ubiquitin-Ligase, hochreguliert (Kang, Xu et al. 2015). IL1 α und Traf3ip2 initiieren die Aktivierung von NF- κ B, was für die Sekretionsanregung von SASP-Molekülen verantwortlich ist, die eine Seneszenz in anderen Zellen parakrin aktivieren können (Muñoz-Espín und Serrano 2014). Durch die Sekretion von Chemokinen und weiteren SASP-Molekülen wird eine entzündungsfördernde Mikroumgebung geschaffen, die verschiedene Immunzellen (z.B. Makrophagen) für die Entsorgung der seneszenten Zellen aus dem Gewebe anlockt (Acosta, O’Loghlen et al. 2008, Burton und Krizhanovsky 2014).

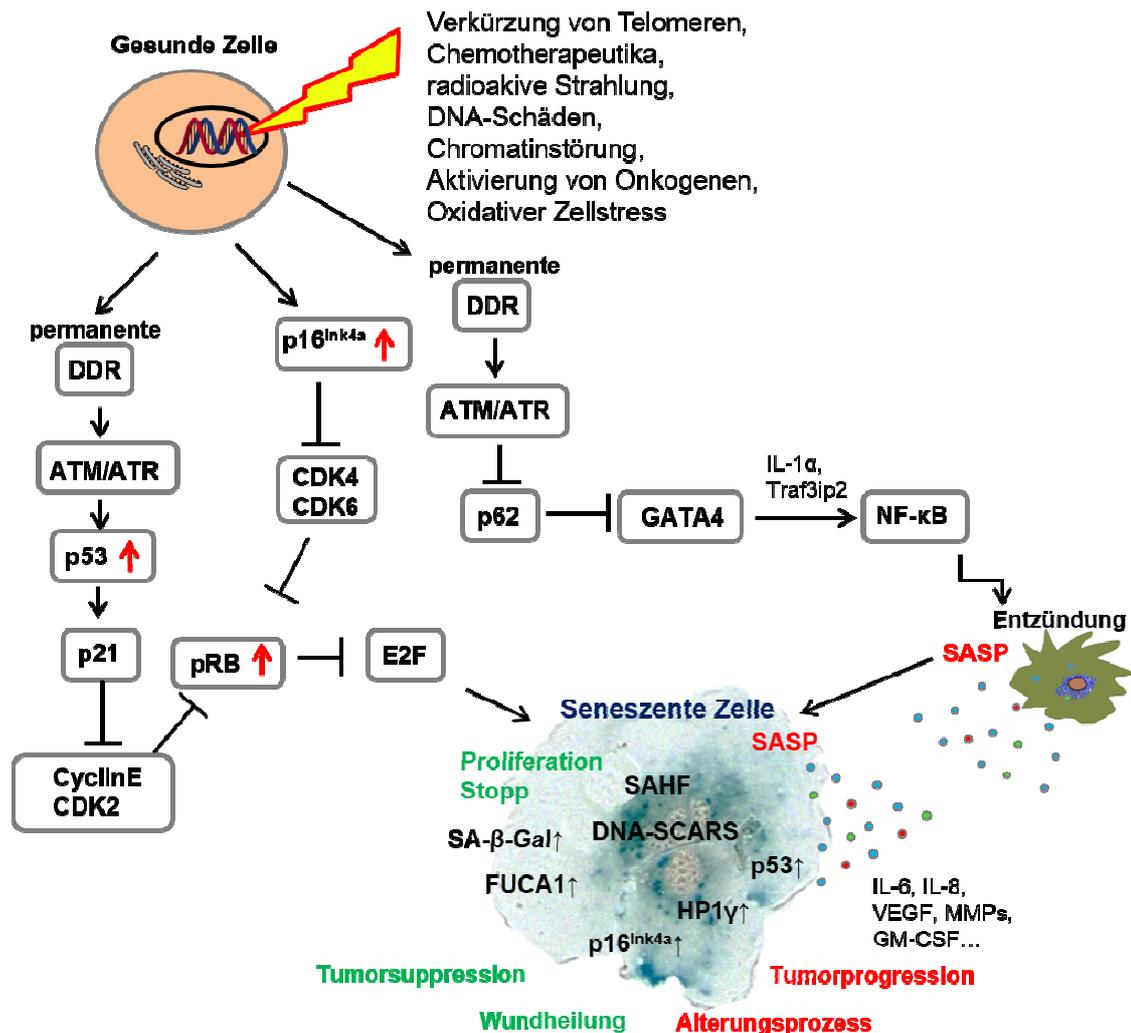


Abbildung 4: Die zelluläre Seneszenz

Schematische Darstellung verschiedener Seneszenz-assoziiierter Signalwege, einigen Seneszenz-induzierenden Faktoren, den wichtigsten bekannten Seneszenz-Markern und die mögliche Seneszenz-Auswirkung (Verändert nach (Loaiza und Demaria 2016)).

Zusammenfassend: Es existieren eine Reihe von Biomarkern für eine Seneszenz, wie z.B. Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren (p16^{Ink4a}, p53 und GATA4), Marker für DNA-Modifikationen (HP1γ, H2AX), Proliferationsmarker (Ki67), SASP (IL-6, IL-8, MMPs), SA-β-Gal und FUCA1, die zum Nachweis von Seneszenz detektiert werden können (di Fagagna, Reaper et al. 2003). Ein großes Problem ist immer noch die spezifische Detektion einer zellulären Seneszenz, da viele Seneszenz-assoziierte Marker nicht ausschließlich in seneszenten Zellen exprimiert werden (Campisi 2011, Sharpless und Sherr 2015). Es ist daher üblich, möglichst viele unterschiedliche Seneszenz-assoziierte Biomarker innerhalb eines Gewebes oder einer Zellkultur nachzuweisen. Eine mögliche Kombination stellt der Nachweis des Proliferationsarrests zusammen mit einer p16^{Ink4a}-Überexpression dar (Sharpless und Sherr 2015).

Auswirkungen einer Seneszenz könnten sowohl positiv als auch negativ sein. Ein positiver Aspekt stellt der Proliferationsarrest dar, ebenso die Unterstützung der Wundheilung durch die Seneszenz sowie die Tumorsuppression. Negativen Auswirkungen eines seneszenten Zustandes sind z.B. der Alterungsprozess und die Tumorpromotion (Campisi 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Seneszenz auftretende Nebenwirkungen einer Chemotherapie verstärken und so zu einem Rückfall beitragen kann (Demaria, O'Leary et al. 2016).

1.3.2.3 Die replikative Seneszenz

Die replikative Seneszenz (RS) wird auch als natürliche Zellalterung bezeichnet und resultiert aus einer schrittweisen Verkürzung der Telomere an den Chromosomenenden durch die DNA-Polymerase während der Zellteilung (Campisi 1997). Telomere übernehmen eine entscheidende Funktion in Bezug auf den Schutz der linearen Chromosomen vor der Degradation, Fusion und Rekombination. Nachdem eine kritische Telomerlänge von ca. 4 Kilobasenpaaren (kb) erreicht ist, aktiviert die betroffene Zelle ein Seneszenz-Programm und kann sich nicht mehr weiter teilen. Diese begrenzte Zellteilungskapazität wird als Hayflick-Limit bezeichnet (Hayflick und Moorhead 1961). Im Alter kommt es somit zur Akkumulation seneszenten Zellen im Organismus, welche zu altersassoziierten Erkrankungen, wie z.B. Arteriosklerose und Nierenschädigung führen (Ding, Franki et al. 2001, Erusalimsky und Kurz 2005, Jeyapalan, Ferreira et al. 2007).

Schon Anfang der 70er Jahre publizierten Olovnikov und Watson unabhängig voneinander das sogenannte „*end replication problem*“ (Olovnikov 1970, Watson 1972). Dahinter steht die biochemische Charakterisierung der DNA-Polymerase, welche unidirektional (DNA-Synthese von 5' zu 3') ist und spezielle RNA-Primer benötigt, um am 3'-Ende der parentalen DNA anzudocken. Nach der Entfernung des 5'-terminalen RNA-Primers bleiben nach jedem Replikationszyklus am 3'-Ende der parentalen DNA einige Basen nicht repliziert und der neu synthetisierte DNA-Tochterstrang ist um diese RNA-Primerlänge verkürzt (Shay, Wright et al. 1991, Levy, Allsopp et al. 1992). Die DNA-Replikation ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

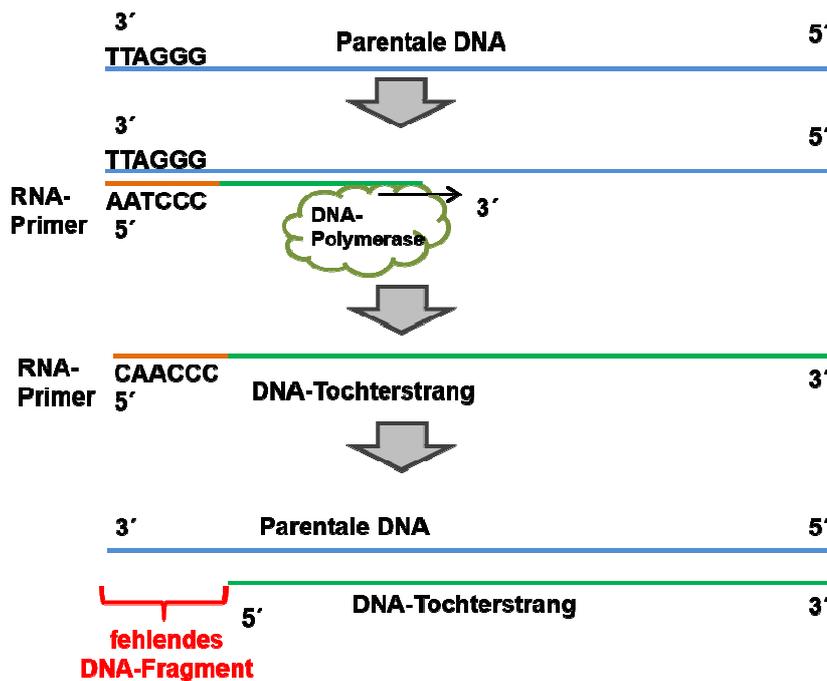


Abbildung 5: Telomerenverkürzung nach einer DNA-Replikation

Schematische Darstellung der Verkürzung von Telomeren nach einer DNA-Replikation (Shay und Wright 2000).

Telomere bestehen aus bis zu 50 kb nicht kodierter repetitiver DNA-Sequenz, in Vertebraten aus der hundert- bis tausendfachen Wiederholung des Hexanukleotids TTAGGG (Tommerup, Dousmanis et al. 1994). Bei der Länge der Telomere bestehen Spezies-spezifische Unterschiede (bei Mäusen um ein Vielfaches länger als bei Menschen), außerdem variiert die Länge innerhalb der Spezies in Abhängigkeit des Gewebes und teilweise sogar innerhalb der Zellen sowie zwischen den einzelnen Chromosomenarmen (Martens, Zijlmans et al. 1998). Zum Schutz vor zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen interagieren einzelne Telomer-Abschnitte mit verschiedenen Heterochromatinproteinen. Wenn die Telomere eine kritische Länge (z.B. 4 kb) erreicht haben, können die Proteine nicht mehr andocken und die schützende Telomerefunktion geht somit verloren (Harley, Futcher et al. 1990, Campisi 1997, Kuilman, Michaloglou et al. 2010). Dadurch wird wiederum der Seneszenz-assoziierte DDR-Signalweg aktiviert (siehe Abbildung 4).

1.3.2.4 Die zelluläre Seneszenz und der Krebs

Ein erster Zusammenhang zwischen einer Seneszenz und der Tumorsuppression wurde bereits im Jahr 1961 von Ruth Sager et al. dargelegt (Sager und Ryan 1961, Sager 1991). Sie beschrieben einen permanenten Proliferationsarrest der zu einem Stopp der Krebsentwicklung führt. Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 beschrieben wurde, umgehen die immortalisierten Zellen die replikative Seneszenz indem sie das Enzym Telomerase

exprimieren und die Neusynthese der repetitiven DNA-Sequenzen an den Chromosomenenden katalysieren. Dadurch können immortalisierte Zellen ungehindert proliferieren. Abgesehen davon kann der Organismus auf potentielle Karzinogene mit einer verfrühten sogenannten Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS), unabhängig von der Telomerlänge, reagieren. Seneszente Zellen konnten bereits in der frühen Phase der Tumorgenese in verschiedenen Krebsarten nachgewiesen werden (Collado und Serrano 2010). Erst wenn die Barriere der OIS in den betroffenen Zellen überwunden wurde, entwickelt sich eine maligne Erkrankung. Zusätzlich besteht in malignen Tumoren die Möglichkeit eine Seneszenz mittels Chemotherapie auszulösen. Diese wird als Therapie-induzierte Seneszenz (TIS) bezeichnet (Chang, Swift et al. 2002, Ewald, Desotelle et al. 2010).

Neben der Tumorsuppression, welche zu den positiven Aspekten der Seneszenz gehört, gibt es auch negative Aspekte, die zu einer Förderung der Tumorprogression führen. Dabei handelt es sich um den SASP-Phänotypen, der zur Entstehung von malignen Erkrankungen beitragen kann (Campisi, Andersen et al. 2011).

Im nächsten Abschnitt werden die beiden genannten prämaternen Arten der Seneszenz näher beschrieben.

1.3.2.4.1 Die Onkogen-induzierte Seneszenz

Die OIS wird auch als „Anti-Tumor-Barriere“ bezeichnet und ist mit der Tumorsuppression assoziiert. Zum ersten Mal wurde die OIS im Jahr 1997 von Serrano et.al detailliert beschrieben (Serrano, Lin et al. 1997). Die Liste der Seneszenz auslösenden Onkogene ist sehr lang, die bekanntesten sind E2F1, Ras^{V12}, Raf, Myc und BRAF^{E600} (Gorgoulis und Halazonetis 2010). Die OIS kann auch durch die DDR oder Mutationen von Tumorsuppressoren wie PTEN, Neurofibromin 1 (NF1), von Hippel-Lindau (VHL) sowie durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorproteinen (p53, RB) ausgelöst werden (Bartkova, Rezaei et al. 2006, Courtois-Cox, Williams et al. 2006, Young, Schlisio et al. 2008, Alimonti, Nardella et al. 2010, Gorgoulis und Halazonetis 2010).

Durch einige Forschungsarbeiten wurden die Onkogene Ras/Raf als Aktivatoren für den p38 MAP-Kinase-Weg identifiziert (Bulavin, Demidov et al. 2002, Wang, Chen et al. 2002, Iwasa, Han et al. 2003). Dieser führt zu einem vorzeitigen Proliferationsstopp und zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration von p16^{Ink4a} und p53, was die Seneszenz in den betroffenen Zellen auslöst (Xu, Li et al. 2014). Basierend auf dieser Erkenntnis wurde in dieser Arbeit eine transgene Zelllinie (GEPiRshp53pWZLHras) (Zender, Xue et al. 2005) aus dem Labor von Prof. Dr. Lars Zender (Universitätsklinikum Tübingen, Abt. Innere Medizin VIII, Klinische Tumorbiologie) verwendet, um neue PET-Tracer für die Detektion der Seneszenz *in vivo* zu untersuchen. Das auf dieser Zelllinie basierende Tiermodell wird in Abschnitt 1.5.2 näher beschrieben.

1.3.2.4.2 Die Therapie-induzierte Seneszenz

Die Therapie-induzierte Seneszenz (TIS) wird durch eine Bestrahlung oder eine Chemotherapie in den Tumorzellen ausgelöst (Roninson 2003). TIS ist ein potentieller Mechanismus für die Induktion von Zytostase in Tumoren mit dem Ziel, das Tumorstadium zu inhibieren (Ewald, Desotelle et al. 2010).

Die Krebszellen umgehen während der Karzinogenese die OIS. Dafür spricht auch, dass die am häufigsten mutierten Gene bei malignen Erkrankungen p16^{Ink4a}, p53 und RB sind. Allerdings müssen alle drei Mutationen in einer Krebszelle vorliegen, um diese vor TIS zu bewahren (Gonzalez, Ghadaouia et al. 2016). Demnach entwickeln die meisten p53-Wildtyp (WT) Krebszellen nach einer Strahlen- und/oder Chemotherapie mit z.B. Doxorubicin oder Cisplatin die TIS (Chang, Broude et al. 1999, Ewald, Desotelle et al. 2010).

Für die Induktion einer TIS *in vitro* und *in vivo* wurde in dieser Arbeit das Chemotherapeutikum Doxorubicin (Doxo) verwendet, ein sehr effektives Zytostatikum, welches zur Stoffgruppe der Anthracycline gehört. Seine Wirkung entfaltet sich durch die Interkalation in die DNA, wobei eine zelluläre Seneszenz durch das Akkumulieren von DNA-Schäden induziert wird (Sliwinska, Mosieniak et al. 2009).

1.4 Zwei Enzyme als Target-Moleküle für neue PET-Tracer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Enzyme β -D-Galactosidase und α -L-Fucosidase als mögliche Zielmoleküle zur Detektion von *in vivo* Seneszenz mittels PET verwendet. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle genauer auf die einzelnen Enzyme eingegangen werden.

1.4.1 Die β -D-Galactosidase

β -D-Galactosidase ist ein ubiquitäres Enzym, das zur Klasse der Hydrolasen gehört und welches Disaccharid Lactose zur Glukose und Galactose spaltet. Dieses Enzym wird vom Galactosidase Beta 1 Gen (GLB1-Gen) kodiert und kommt in Lysosomen von Eukaryonten vor (Desnick 2001).

β -D-Galactosidase findet oft Anwendung als enzymatisches Reporterenzym im Lactoseoperon (*lacZ*), welches zum ersten Mal 1961 von Jacob und Monod als Operonmodell vorgeschlagen wurde (Jacob und Monod 1961). Seit 1972 wird Nitrophenyl-Galactosid als Substrat der β -D-Galactosidase für die Verfolgung räumlicher und zeitlicher Gen- und Proteinexpressionsmuster erfolgreich eingesetzt (Miller 1972).

Als möglicher Marker für die Detektion der Seneszenz *in vitro* und *in vivo* wurde β -D-Galactosidase zum ersten Mal im Jahr 1995 von Dimri et al. beschrieben (Dimri, Lee et al. 1995). Dabei wurde gezeigt, dass die SA- β -Gal bei suboptimalen Bedingungen

(pH 6) aktiv ist. Seitdem hat es sich erfolgreich als Goldstandard für die Detektion der Seneszenz etabliert (Debacq-Chainiaux, Erusalimsky et al. 2009).

Die zytochemische Färbung der SA- β -Gal-Aktivität basiert auf der Verwendung von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal), ein chromogenes Substrat für das Enzym β -D-Galactosidase. Das Enzym hydrolysiert das Substrat zu β -D-Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, wobei letzteres nach Oxidation durch Luftsauerstoff und Dimerisierung, zu einem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo umgewandelt wird (Abbildung 6) (Dimri, Lee et al. 1995, Debacq-Chainiaux, Erusalimsky et al. 2009, Itahana, Itahana et al. 2013).

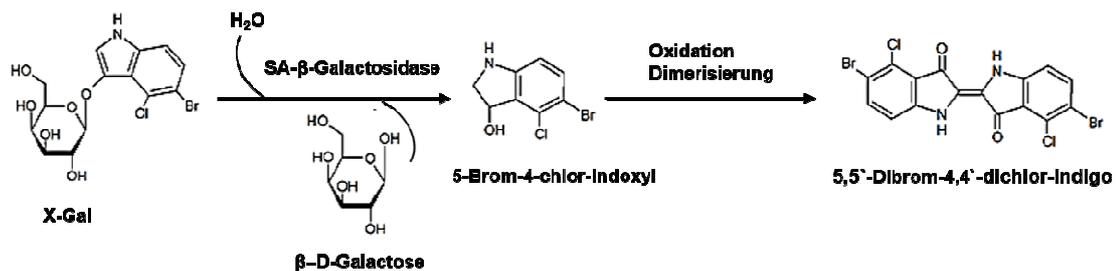


Abbildung 6: Das Prinzip eines SA- β -Gal-Aktivitäts-Assays

X-Gal wird enzymatisch durch β -Galactosidase zu β -D-Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl gespalten. Anschließend entsteht durch die Oxidation an der Luft und die Dimerisierung der tiefblaue Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo. Dieser ist mit bloßem Auge bei ca. 610 nm Absorptionsmaximum sehr gut sichtbar (Christie 2007).

Im Jahr 2000 klärten Kurz und Kollegen die Ursache für die gesteigerte β -Galactosidase-Aktivität seneszenten Zellen auf (Kurz, Decary et al. 2000). Dabei wurde anhand humaner Endothelzellen eine Zunahme der lysosomalen Masse und somit auch der lysosomalen β -Galactosidase gezeigt. Der Grund hierfür ist die erhöhte Autophagie seneszenten Zellen (Young, Narita et al. 2009). Bis heute ist der SA- β -Gal-Aktivitäts-Assay die Goldstandard-Methode für die Identifikation von seneszenten Zellen *in vitro* und *ex vivo*. Aus diesem Grund wurde die SA- β -Gal als ein Zielmolekül für die Tracer Entwicklung zur Detektion von Seneszenz *in vivo* ausgewählt.

1.4.2 Die α -L-Fucosidase

Das Enzym α -L-Fucosidase gehört zur Enzymklasse der Glycosid-Hydrolasen und katalysiert die Abspaltung der α -L-Fucose von Glycoproteinen, Oligosacchariden und Glycolipiden (Tu, Lin et al. 2013). Beim Menschen gibt es zwei Arten dieses Enzyms: Typ 1 welches ein lysosomales Protein darstellt und Typ2, ein sekretorisches Protein. In dieser Arbeit wurde das Augenmerk auf α -L-Fucosidase Typ 1 (FUCA1) gelegt. FUCA1 spielt eine Schlüsselrolle bei vielen Erkrankungen wie z.B. bei der lysosomalen Speicherkrankheit, bei Entzündungen sowie beim kolorektalen und hepatozellulären Karzinomen (Du, Hutchinson et al. 1991, Willems, Gatti et al. 1991, Ayude, Fernández-

Rodríguez et al. 2000, Hooper und Gordon 2001, Gan, Liang et al. 2014). Außerdem identifizierten Hildebrand et al. das FUCA1-Enzym als einen neuen Biomarker für die Seneszenz (Hildebrand, Lehle et al. 2013). Dabei konnten die Autoren in zahlreichen *in vitro* Experimenten die Hochregulation von FUCA1 auf mRNA-Ebene sowie eine erhöhte Enzymaktivität in replikativer Seneszenz, OIS und TIS nachweisen. Aus diesem Grund wurde FUCA1 ebenfalls als Zielmolekül für die Entwicklung neuer Tracer ausgewählt.

1.5 Vorhandene Tiermodelle

1.5.1 PDX-Tiermodelle

Im Jahr 1969 erfolgte die Einführung des ersten Xenograftmodells für die Untersuchung von humanen Tumor-Fragmenten. Das sogenannte, von Patienten abgeleitete Xenograftmodell (PDX, engl. „*patient derived xenograft*“) wurde von Jörgen Rygaard und Carl O. Poulsen entwickelt. Dabei implantierten die Wissenschaftler erfolgreich die Darmkrebszellen eines 71-jährigen Patienten subkutan in immundefiziente nu/nu Mäuse (Rygaard und Poulsen 1969). Die athymischen immundefizienten nu/nu Mäuse eignen sich aufgrund des Fehlens von Thymus und T-Zellen hervorragend für die Implantation von Xenograftmaterial und werden bis heute erfolgreich in der präklinischen Forschung eingesetzt.

Die erste orthotope Implantation eines humanen Tumors wurde Anfang der 80er Jahre von W.R. Wang und B. Sordat et al. beschrieben (Wang, Sordat et al. 1984). Schon damals konnte gezeigt werden, dass eine orthotope Implantation von Patientenzellen zu Tumoren führt, welche viele Gemeinsamkeiten mit den ursprünglichen Patiententumoren aufweisen – im Vergleich zu den subkutan implantierten Zellen. Außerdem konnte nach einer orthotopen Implantation von Tumorzellen eine Entwicklung von Metastasen bei verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen werden (Fidler 1990).

Der erste orthotope Eingriff zur Implantation von intaktem Darmkrebsgewebe wurde 1991 von Fu X. et al. beschrieben (Fu, Besterman et al. 1991). Anschließend folgte die Etablierung weiterer orthotoper PDX (PDOX)-Modelle wie z.B. Pankreas-, Brust-, Eierstock-, Lungenkrebs und vielen mehr (Fu, Guadagni et al. 1992, Wang, Fu et al. 1992, Fu, Le et al. 1993, XINYU und ROBERT 1993). Insbesondere gibt es heutzutage eine breite Auswahl an PDX-Modellen für die Forschung an CRC (Julien, Merino-Trigo et al. 2012, McIntyre, Buczacki et al. 2015).

Gegenüber klassischen Zellkulturmodellen, in welchen neoplastische Zellsuspension subkutan oder orthotop in die Tiere injiziert wird, weisen Transplantationsmodelle einige Vorteile auf (Sottoriva, Kang et al. 2015). Ein wichtiger Vorteil ist die Tumorerogenität, da Tumorzellen vor allem *in vitro* eine klonale Selektion durchlaufen und dabei die Komplexität der Genexpression verlieren (Daniel, Marchionni et al. 2009, Zoubeidi,

Chi et al. 2010). Außerdem zeigen PDX-Modelle eine verzögerte Reaktion gegenüber dem speziesspezifischen Tumorstroma, wodurch die Mikroumgebung um den Tumor derjenigen im Patienten sehr ähnlich bleibt (Hylander, Punt et al. 2013, McIntyre, Buczacki et al. 2015). Somit sind diese Modelle viel besser mit der physiologischen Situation im Patiententumor zu vergleichen und eignen sich hervorragend für präklinische Studien (Hidalgo, Amant et al. 2014, Gao, Korn et al. 2015).

Aus diesem Grund wurde für die longitudinalen präklinischen Untersuchungen des CRCs ein Rattenmodell des Unternehmens Oncodesign Biotechnologie (Dijon, Frankreich) verwendet. Dabei handelt es sich um ein CR-LRB-018P-PDX-Tumormodell, welches ursprünglich als Fragment einer 85 Jahre alten Patientin mit BRAF-mutiertem und MSI-positivem Adenokarzinom entnommen wurde (Julien, Merino-Trigo et al. 2012).

1.5.2 Tiermodelle für die Evaluierung neuer PET-Tracer

Die Evaluierung neuer Tracer für die Detektion von Seneszenz erfolgte mit subkutanen Mausmodellen. Zunächst wurden die ausgewählten Zelllinien *in vitro* auf die Induzierbarkeit von Seneszenz getestet (Abschnitt 3.1.3). Doxo ist ein in Kliniken verwendetes Chemotherapeutikum, welches in humanen MCF7- (Brustkrebs), in HCT116- (Kolonkarzinom) sowie in HCT116PTTG1^{-/-}-Zelllinien *in vitro* eine Seneszenz induzieren kann (Chang, Swift et al. 2002, Elmore, Rehder et al. 2002, Tong, Zhao et al. 2011). Aufgrund der positiven *in vitro* Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit die Zelllinien MCF7 und HCT116 für die Etablierung des subkutanen Xenograftmodells der TIS durch Doxo verwendet.

Eine weitere transgene Zelllinie wurde bereits zur Erforschung der Seneszenz und Tumor-„clearance“ erfolgreich eingesetzt (Xue, Zender et al. 2007). Es handelt sich dabei um transduzierte murine embryonale Lebervorläuferzellen, die GEPiRshp53pWZLHras-Zellen (Hras-Zellen), die aus der fetalen Leber von C57BL/6 Mäusen gewonnen wurden (Zender, Xue et al. 2005). Diese wurden zunächst mit einem Plasmid (pWZL hygro HrasV12) und anschließend mit einem durch Tetracyclin (Doxycyclin, Doxy) regulierbaren Tet-ON-Vektor (RT3GEPiR), der eine p53-spezifische „small hairpin ribonucleic acid“ (shRNA) und Grün fluoreszierendes Protein (GFP) enthält, transduziert (Serrano, Lin et al. 1997, Xue, Zender et al. 2007, Fellmann, Hoffmann et al. 2013). Hras-Zellen, die mit Doxy behandelt wurden, exprimieren HrasV12, GFP, p53shRNA und sollen eine negative SA-β-Gal-Färbung aufweisen. Im Gegensatz dazu exprimieren Hras-Zellen ohne Doxy-Behandlung keines der drei oben genannten Gene, wodurch die p53-Proteinbiosynthese nicht mehr durch p53shRNA blockiert wird und diese Zellen eine positive SA-β-Gal Färbung aufweisen. Die Hras-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit für die Etablierung eines subkutanen Allo-graftmodells der OIS verwendet.

1.6 Bildgebende Verfahren

Zu den bildgebenden Verfahren gehören nichtinvasive *in vivo* Untersuchungsmethoden, die in der Forschung und in der Klinik für Diagnostik, Therapie- und Krankheitsverlaufskontrollen, Vorsorgeuntersuchungen sowie für die Überwachung operativer Eingriffe eingesetzt werden. Im folgenden Abschnitt werden die Grundlagen der in dieser Arbeit eingesetzten Modalitäten näher erläutert. Dazu gehören die PET, die MRT sowie die optische Bildgebung (engl. „*optical imaging*“, OI).

1.6.1 Positronenemissionstomographie

Die PET ist ein nichtinvasives, präzises bildgebendes Verfahren, welches in der Nuklearmedizin sowie in der präklinischen und klinischen Forschung seine Anwendungen findet. Dabei wird die Verteilung von einem radioaktiv-markierten Biomarker (Tracer) im Körper detektiert. Somit können funktionelle zelluläre Prozesse dargestellt werden (Ter-Pogossian 1992, Muehlechner und Karp 2006).

Gordon Brownell und William Sweet bauten in den 50er Jahren den ersten Prototypen eines Kopfscanners und setzten dabei die geradlinige Detektortechnik ein (Brownell 1999). Der erste ringförmige Ganzkörper-PET-Scanner wurde Mitte der 70er Jahre von Michel Ter-Pogossian und Michael E. Phelps entwickelt (Phelps, Hoffman et al. 1975, Ter-Pogossian, Phelps et al. 1975). Weitere Forschung und Entwicklung auf diesem Gebiet ermöglichte die Verbesserung der Auflösung von PET-Bildern und die Automatisierung der Scanprozesse (Brownell, Burnham et al. 1985, Burnham, Bradshaw Jr et al. 1985, Brownell 1999, Muehlechner und Karp 2006, Kadrmaz, Casey et al. 2009). Seit Beginn der 90er Jahre werden PET-Scanner immer häufiger in Kliniken eingesetzt, was durch kleinere und bedienerfreundlichere PET-Scanner mit ringförmig angeordneten Detektoren ermöglicht werden konnte. Mittlerweile stellt die PET eine sehr gut etablierte Methode für die Diagnostik und Einstufung von Tumoren sowie für die Ermittlung und Überwachung von Krebstherapien dar (Kelloff, Hoffman et al. 2005, Wahl, Jacene et al. 2009, Jensen und Kjaer 2015).

1.6.1.1 Das Grundprinzip der PET

Das Grundprinzip der PET basiert auf dem Nachweis von radioaktiver Gammastrahlung. Dabei kann ein protonenreicher Atomkern durch seinen Zerfall (β^+ Zerfall) ein Positron abgeben. Das Positron kann nur über eine kurze Distanz (0,5-4 mm) im Gewebe wandern, bis es zu einer Annihilation (Paarvernichtung) mit einem Elektron kommt, wobei zwei hochenergetische Photonen (511 keV) emittiert werden. Beide Photonen werden als γ -Strahlung in einem Winkel von $\pm 180^\circ$ voneinander ausgesendet (Abbildung 7 a). Die gerade Flugbahn beider γ -Quanten wird „*line of response*“ (LOR) genannt (Cherry 2001). Nachdem beide γ -Quanten den Körper verlassen, treffen diese gleichzeitig, im Zeitfensterbereich von Nanosekunden, auf zwei gegenüber-

liegende Detektorblöcke. Die Koinzidenz wird dabei erfasst und mithilfe der LOR kann der Ort der Emission errechnet werden (Cherry und Dahlbom 2006).

Ein Detektorblock besteht aus einem Szintillationskristall und Photomultiplier (Abbildung 7 b). Die Szintillationskristalle, die meist aus Bismuth-Germanat oder Lutetiumoxyorthosilikat (LSO) bestehen, absorbieren die ankommenden γ -Quanten ab und wandeln diese in die Lichtphotonen um. Der nachgeschaltete Photomultiplier verstärkt die ankommenden Lichtphotonen, indem er sie an einer Kathode auffängt und dabei Photoelektronen freisetzt. An einem Sekundärelektronenvervielfacher werden die freigesetzten Elektronen zu einem messbaren elektronischen Signal umwandelt (Pichler, Wehrl et al. 2008, Wells, de Kemp et al. 2009).

Während der Akquisition werden alle erfassten Daten wie z.B. die Detektorposition und die Zeit als „listmode“-Datensatz abgespeichert und anschließend histogrammiert. Dazu werden die gemessenen Daten entsprechend der Scannergeometrie umsortiert, wobei die Daten jeder einzelnen LOR einkalkuliert werden. Aus dem entstandenen Histogramm wird ein zweidimensionales Sinogramm berechnet, in welchem jeder einzelne Punkt eine LOR darstellt (Abbildung 7 b). Anschließend werden dreidimensionalen Bilddaten rekonstruiert. Dabei können verschiedene Rekonstruktionsalgorithmen verwendet werden: analytische Verfahren wie „filtered back projection“ (FBP) und iterative Verfahren wie „expectation maximization“ (EM), „maximum a posteriori“ (MAP) und das am häufigsten eingesetzte iterative Verfahren „ordered subset expectation maximization“ (OSEM) (Erdogan und Fessler 1999, Reader und Zaidi 2007).

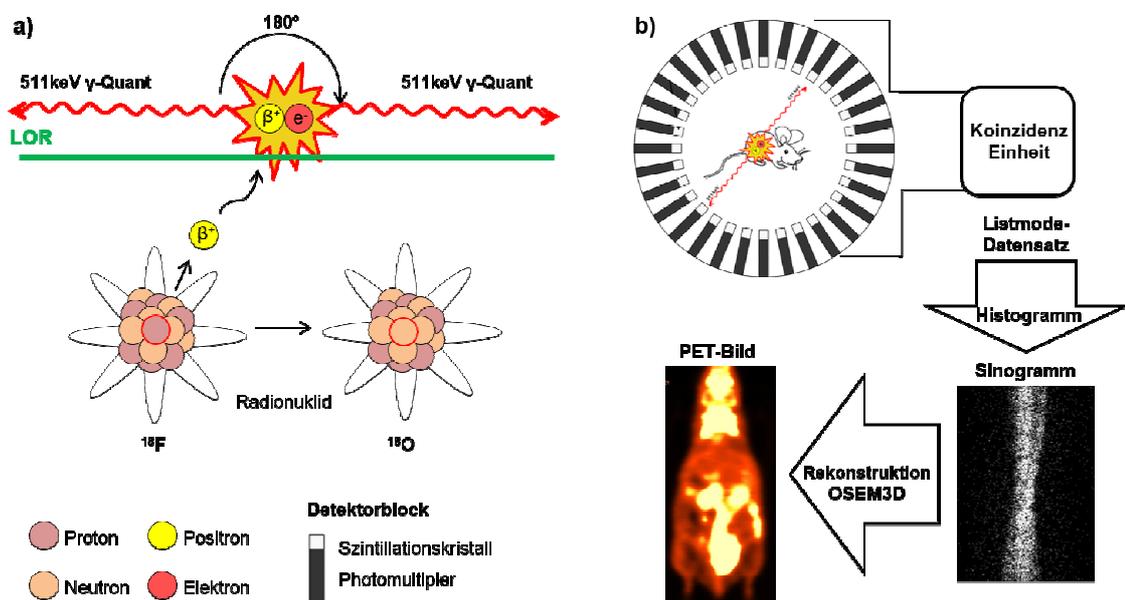


Abbildung 7: Das Prinzip der PET-Bildgebung

a) Bei der Annihilation eines Positrons und eines Elektrons entstehen zwei γ -Quanten, die sich in einem Winkel von 180° voneinander entfernen (nach (Cherry 2001)). b) Schematische Darstellung der Koinzidenzen im Detektor eines Detektorblockringes und der Verarbeitung von aufgenommenen Daten bis zu einem rekonstruierten PET-Bild einer mit $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ injizierten Maus.

1.6.1.2 Mögliche Fehlerquellen bei der PET

Für die quantitative Analyse der aufgenommenen PET-Daten müssen einige Korrekturverfahren auf die Scans und Bilddaten angewendet werden. Eines der wichtigsten davon ist die Normalisierung der Detektoren. Dafür sollten regelmäßig sogenannte Normalisierungsscans unter Verwendung eines homogenen Phantoms mit einer definierten Menge an Aktivität und einer definierten Geometrie am entsprechenden PET-Scanner durchgeführt werden. Die gewonnenen Daten ermöglichen die Bildkorrektur auf die jeweils verwendeten PET-Scanner-spezifischen, unterschiedlichen Kristallsensitivitäten, die aus leichten Unterschieden im Kristallmaterial sowie aus kleinsten nicht sensitiven Kristallzwischenräumen resultieren (Karp, Daube-Witherspoon et al. 1991).

Eine weitere Limitation der PET-Bildgebung ist die Signalschwächung („*Attenuation*“, Abbildung 8 a). Dabei können energiereiche Photonen auf dem Weg zum Detektor durch das umliegende Gewebe oder die Probandenliege abgeschwächt werden. Dadurch verliert das Photon an Energie und wird von seiner normalen Trajektorie abgelenkt bzw. es wird komplett abgeschwächt und geht für die Detektion verloren. Für die Korrektur der Bilddaten kann bei jeder PET-Messung ein Transmissionsscan mit einer um das Objekt rotierenden ^{57}Co - oder ^{68}Ge -Transmissionsquelle durchgeführt werden. Bei der Rekonstruktion wird die errechnete Schwächungskarte für die Korrektur der Originaldaten verwendet (Mannheim, Judenhofer et al. 2012).

Als Folge einer hohen injizierten Aktivität kann es zu sehr vielen Emissionsereignissen und zur Überlastung der Detektoren und der Elektronik kommen (Abbildung 8 b). Der Detektor ist somit nicht mehr in der Lage, alle ankommenden Signale zu verarbeiten und es kommt zu einer sogenannten Totzeit des Detektors zwischen den einzelnen Detektionen. Für die Korrektur der Bilddaten wird deshalb ein statistisches Korrekturverfahren, genannt „*dead time correction*“, angewendet (Bailey, Townsend et al. 2005).

Abbildung 8 c) visualisiert ein weiteres Zufallsereignis („*Random*“), bei dem zwei Photonen, die bei zwei unterschiedlichen Annihilationsprozessen entstanden sind, vom Detektor als ein Annihilationsereignis erfasst werden. Dadurch wird eine falsche LOR berechnet und somit auch ein falscher Ursprung der Annihilation angenommen. Außerdem kann eine inkorrekte LOR durch die Detektion von zwei gestreuten Photonen desselben Annihilationsereignisses entstehen (Abbildung 8 d). Die Bildkorrektur bei Randoms und Streuung („*Scatter*“) kann unter Verwendung der Schwächungskarte aus dem Transmissionsscan vorgenommen werden (Watson, Byars et al. 2008).

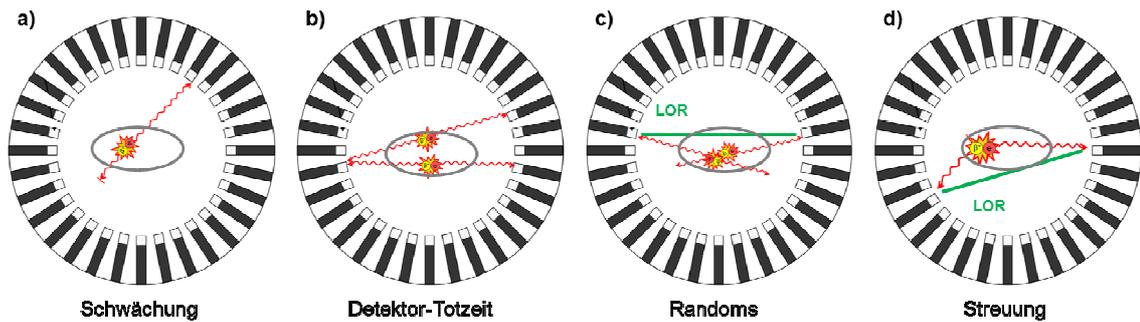


Abbildung 8: Mögliche Ereignisse der Koinzidenzdetektion

Aufgrund der hier dargestellten möglichen fehlerhaften Koinzidenzdetektionen wie Schwächung **a)**, Detektor-Totzeit **b)**, Randoms **c)** und Streuung **d)** müssen die PET-Daten korrigiert werden.

Eine weitere Fehlerquelle stellt der Partialvolumeneffekt da. Dabei wird bei sehr kleinen Strukturen, die unterhalb der räumlichen Auflösung des PET-Scanners liegen, die eigentlich vorhandene Aktivität unter- oder überschätzt (Mannheim, Judenhofer et al. 2012).

1.6.1.3 Die Vielfalt der PET-Tracer

Es existiert eine große Auswahl an Radioisotopen, die mithilfe eines Teilchenbeschleunigers (Zyklotron) hergestellt und für die PET verwendet werden können. Die am häufigsten verwendeten Radioisotope sind ^{18}F , ^{11}C , ^{15}O , ^{68}Ga und ^{64}Cu . Diese unterscheiden sich alle durch ihre isotoptypische Halbwertszeit (HWZ). Der Grund für ihre breite Anwendung ist ihre einfache Substituierung direkt mit den verwendeten Biomolekülen und die relativ kurze, isotoptypische HWZ (Schlyer 2004). Die Verteilung sowie die Kinetik des markierten Biomoleküls kann je nach HWZ des Isotops über einen bestimmten Zeitraum im Körper beobachtet werden. Es werden beispielsweise kleine Moleküle (verschiedene Zucker), Peptide, Proteine, Antikörper sowie Pharmazeutika radioaktiv markiert und diese entsprechend Radiopharmaka bzw. Tracer genannt. Dabei muss die Verbindung stabil sein und die biologische Funktion des Moleküls darf nicht beeinträchtigt werden. Der Organismus kann zwischen den Originalmolekülen und den radioaktiv markierten Ersatzmolekülen bzw. Derivaten nicht unterscheiden und setzt diese in die entsprechenden biochemischen Zellprozesse ein. Zusätzlich darf der Tracer keine toxische Wirkung auf den Organismus haben. Durch die äußerst hohe PET-Sensitivität vom pico- bis in den femtomolaren Bereich können auch kleinste Tracer-Mengen im Organismus nachgewiesen werden (Cherry 2001). Georg de Hevesy, der Entdecker dieses sogenannten Tracer-Prinzips, wurde hierfür im Jahr 1943 mit einem Nobelpreis der Chemie geehrt.

Unter Verwendung verschiedener Tracer ist eine *in vivo* Visualisierung unterschiedlicher dynamischer Zellprozesse möglich. Der am häufigsten verwendete PET-Tracer in der Klinik und Forschung ist die mit dem ^{18}F -Isotop markierte Fluordesoxyglukose (^{18}F FDG) (Wadsak und Mitterhauser 2010). Dieses Radiopharmakon ermöglicht die

Untersuchung des Glukosestoffwechsels *in vivo* (Gambhir 2002). Durch das Ersetzen der Hydroxygruppe am zweiten Kohlenstoffatom der Glukose durch das radioaktive [^{18}F]-Isotop entsteht ein Glukose-Analogon, welches von Zellen über membranständige Glukosetransporter aufgenommen wird. Anschließend wird [^{18}F]FDG im ersten Schritt der Glykolyse durch das Enzym Hexokinase (HK) zu [^{18}F]FDG-6-Phosphat phosphoryliert und kann dann aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe nicht weiter zu Fructose-6-Phosphat umgewandelt werden. Durch die negative Ladung der Phosphatgruppe kann [^{18}F]FDG-6-Phosphat das Zytoplasma nicht mehr verlassen und wird intrazellulär angereichert. Dieser Vorgang wird als „*metabolic trapping*“ bezeichnet und wurde von Gallagher et al. im Jahr 1978 zum ersten Mal als Grundlage der Tracer-Anreicherung beschrieben (Gallagher, Fowler et al. 1978).

Für die quantitative Analyse der Zellproliferation in der PET, wird das mit ^{18}F markierte 3-Deoxy-3-fluorothymidin ([^{18}F]FLT) verwendet. [^{18}F]FLT ist ein Thymidin-Analogon, welches als Proliferationsmarker für Zellen in der S-Phase eingesetzt wird (Apisarnthanarax, Alauddin et al. 2006). Nach der Aufnahme von [^{18}F]FLT durch Nucleosidtransporter (z.B. „*Concentrative nucleoside transporter*“, CNT; „*equilibrative nucleoside transporter*“, ENT) ins Zytoplasma wird der Tracer durch die Thymidinkinase 1 (TK1) phosphoryliert und getrappt, ohne dass er in die DNA eingebaut wird (Soloviev, Lewis et al. 2012).

Seit Anfang der 80er Jahre werden auch Nitroimidazole als Marker für hypoxische Zellen eingesetzt. Herrscht ein hypoxischer Zustand, kommt es zur Aktivierung der Nitroreduktase. Diese reduziert [^{18}F]-Fluoromisonidazol ([^{18}F]FMISO), welches sich dann in hypoxischen Arealen und Tumorzellen anreichert (Dubois, Landuyt et al. 2004, Krohn, Link et al. 2008).

Ein weiterer interessanter Biomarker zur Untersuchung von Angiogenese ist ein zyklisches Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Peptid (RGD), welches mit einem Linker (1,4,7-Triazacyclononan-1-glutarat-4,7-acetat-RGD; NODAGA-RGD) versehen und mit ^{68}Ga markiert ist ([^{68}Ga]RGD). Die Synthese des RGD-Peptids wurde im Jahr 2001 von Roland Haubner et al. und die Herstellung des Radiopharmakons ^{68}Ga -NODAGA-RGD im Jahr 2011 von Peter A. Knetsch et al. beschrieben (Haubner, Wester et al. 2001, Knetsch, Petrik et al. 2011). Nach der Injektion in den Organismus, zirkuliert das [^{68}Ga]RGD im Blut und bindet in den neugebildeten Blutgefäßen zahlreich aktivierten $\alpha\beta_3$ -Integrine (Niu und Chen 2009).

Abbildung 9 fasst alle oben genannten und in dieser Arbeit verwendeten klassischen und neuen Tracer zusammen und stellt eine Übersicht über die *in vivo* PET-Bildgebung der Tumorbiologie dar.

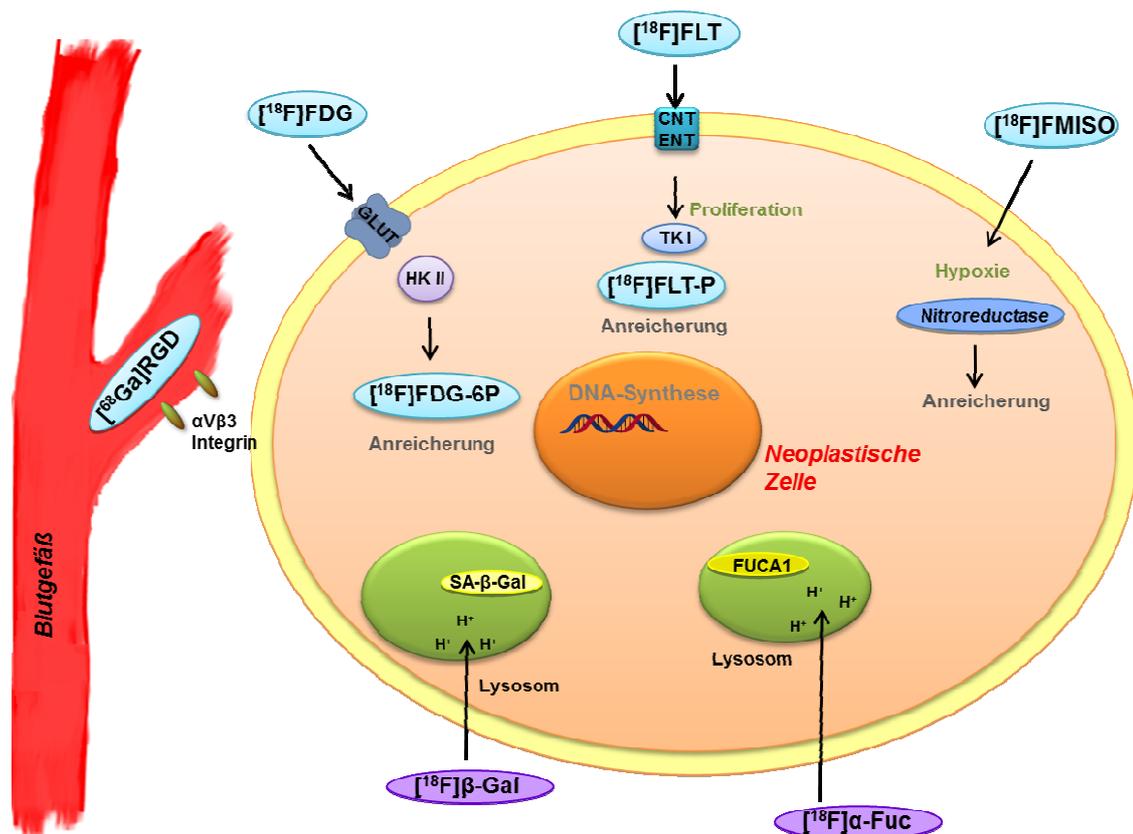


Abbildung 9: PET-Tracer in der Tumorbilogie

Darstellung der Aufnahme, Verteilung und Umsetzung von klassischen und neuen PET-Tracern in einer neoplastischen Zelle.

1.6.2 Die Magnet-Resonanz-Tomographie

Um die Ko-Registrierung der PET-Signale in entsprechenden Scans auf anatomische Strukturen zu ermöglichen, werden oft PET/CT- oder PET/MRT-Messungen durchgeführt (Judenhofer, Wehrl et al. 2008). Die MRT ist ein nichtinvasives bildgebendes Verfahren für die *in vivo* Darstellung und Untersuchung des Weichteilgewebes.

Mit der Entdeckung der Kernspinresonanz durch Felix Bloch und Edward Mills Purcell im Jahre 1948 wurde ein Meilenstein in der Entwicklung der Kernspintomographie, heute meist als MRT bezeichnet, gelegt. Hierfür wurden die Entdecker vier Jahre später mit dem Nobelpreis in Physik geehrt (Shampo und Kyle 1997). Bereits Ende der 70er Jahre wurde ein Verfahren entwickelt, das erste Magnet-Resonanz (MR)-Bildaufnahmen ermöglichte. Dafür wurde den Entwicklern Paul C. Lauterbur und Peter Mansfield im Jahre 2003 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen (Behrens und Normann 2004, Weishaupt, Köchli et al. 2009). Seit Anfang der 80er Jahre ist die MRT ein fester Bestandteil in der klinischen Diagnostik und findet außerdem eine breite Anwendung in der präklinischen Forschung.

Im Weiteren werden die Grundlagen der MRT vereinfacht dargestellt. Das Grundprinzip der MRT basiert auf der Kernspinresonanz. Einige Atomkerne besitzen ein magnetisches Moment und können deshalb durch ein Magnetfeld beeinflusst werden. Die häufigsten Atomkerne die mittels MRT gemessen werden sind ^1H , ^{13}C , ^{19}F und ^{31}P . Dabei ist ^1H der am meisten in der Klinik verwendete Atomkern (Weishaupt, Köchli et al. 2000). Im Folgenden soll nur auf die ^1H -Kerne eingegangen werden, da keine anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Ein Proton ist eine rotierende Ladung, denn es besitzt einen Eigendrehimpuls, den sogenannten Spin, und eine positive Ladung. Dadurch verhält es sich wie ein schwacher Magnet und kann durch ein Magnetfeld oder elektromagnetische Wellen beeinflusst werden. In der normalen Umgebung außerhalb eines Magnetfeldes ($B_0=0$) sind alle Spins willkürlich angeordnet. Sobald jedoch ein homogenes Magnetfeld ($B_0 \neq 0$) angelegt wird, richten sich alle Spins entweder parallel oder antiparallel entlang des Magnetfeldes aus (Abbildung 10 a, b) (Weishaupt, Köchli et al. 2009). Dabei ist die parallele Ausrichtung des Spins die energieärmste und damit auch die bevorzugte Ausrichtung. Die antiparallele Ausrichtung ist somit energiereicher und ungünstiger. Aus der Differenz der beiden Ausrichtungen resultiert die Nettomagnetisierung aller Spins. Die Spins rotieren mit einer bestimmten Resonanzfrequenz, der sogenannten Larmorfrequenz, im angelegten homogenen Magnetfeld (van Geuns, Wielopolski et al. 1999). Um das MR-Signal zu detektieren erfolgt die Anregung der Spins aus einer Sendespule mit einem Hochfrequenzimpuls (RF: „radiofrequency impuls“), der in der Regel im Frequenzbereich der Larmorfrequenz liegt. Daraufhin erfolgt die transversale und longitudinale Auslenkung der Spins, in das nächst günstigste Energieniveau, im 90° Winkel zum Magnetfeld (Weishaupt, Köchli et al. 2000). Nach dem Ende des RF-Impulses kippen die Spins in die stabile longitudinale Richtung entlang des Magnetfeldes zurück und geben dabei Energie an die Umgebung ab. Diese wird als Spin-Gitter-Wechselwirkung bzw. T1-Relaxation bezeichnet. T1 ist dabei die von der Stärke des Magnetfeldes abhängige, gewebespezifische Zeitkonstante und beschreibt die Zeit, welche die Spins benötigen, um in den Ausgangszustand zurück zu gelangen. Gleichzeitig zur T1-Relaxation findet die transversale Relaxation bzw. T2-Relaxation statt. Diese wird auch als Spin-Spin-Wechselwirkung bezeichnet. Direkt nach der Anregung mit dem RF-Impuls bewegen sich einige der Spins synchron, also in Phase, doch bereits nach kürzester Zeit dephasieren die Spins aufgrund ihrer unterschiedlichen Geschwindigkeit (Weishaupt, Köchli et al. 2009). Die Spins beeinflussen sich gegenseitig und beginnen, sich aufzuheben, bis die transversale Magnetisierung verschwindet. Dabei wird keine Energie an die Umgebung abgegeben, da die Spins die Energie untereinander austauschen (Weishaupt, Köchli et al. 2000). In diesem Zusammenhang soll auch die kürzere T2*-Zeitkonstante, die durch Heterogenität des Gewebes beeinflusst wird, der Vollständigkeit halber genannt werden.

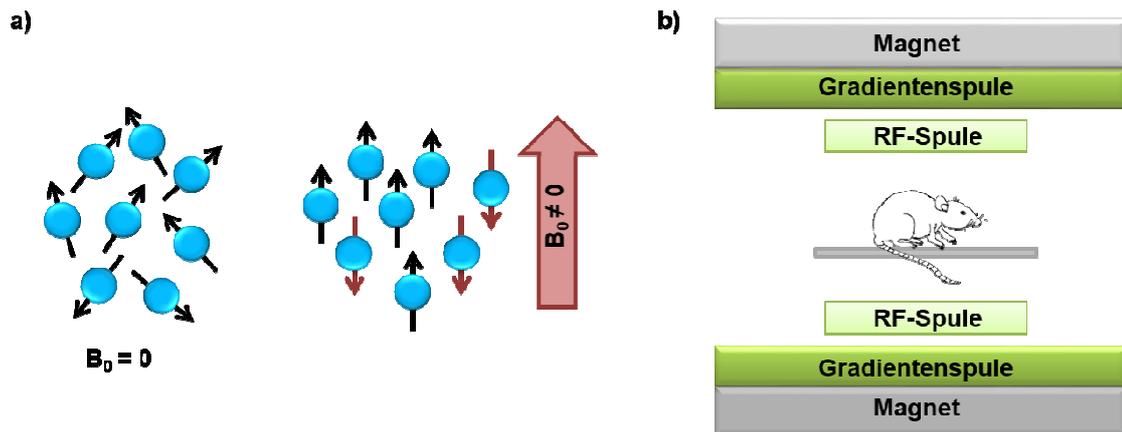


Abbildung 10: Die Grundlagen der MRT

a) Schematische Darstellung der Spin-Ausrichtung außerhalb ($B_0=0$) und innerhalb ($B_0 \neq 0$) des Magnetfeldes **b)** Schematischer Aufbau eines MRT-Gerätes (Weishaupt, Köchli et al. 2009).

Um eine räumliche Bildauflösung zu erstellen, werden mithilfe der Gradientenspule zusätzliche Gradientenfelder in drei Raumdimensionen mit unterschiedlich langer Dauer ausgelegt. Dadurch ändert sich die Larmorfrequenz der Spins in den Gradientenfeldern und einzelne Schichten des Körpers können angeregt werden. Wenn die angeregten Atomkerne anschließend in ihren Ausgangszustand zurückkehren und dabei die Energie an die Umgebung abgeben, wird diese als Spannung in der Empfängerspule detektiert (Weishaupt, Köchli et al. 2009). In einem Phasen-Frequenz-Diagramm wird diese getrennt und enthält die Information über die Strukturen innerhalb einer Schicht. Für die Erfassung aller Schichten aus einem Gesichtsfeld (FoV, engl. „*Field-of-View*“) ist eine Abfolge von Anregungsimpulsen sowie das Ein- und Ausschalten verschiedener Gradienten, die sogenannte MRT-Sequenz, erforderlich. Am Ende der Sequenz werden alle detektierten Signale unter Verwendung der Fourier-Transformation zu einem dreidimensionalen Bild umgerechnet und somit visualisiert (Weishaupt, Köchli et al. 2009).

Die unterschiedlichen Gewebearten können aufgrund der spezifischen ^1H -Atomkernzahl und der damit verbundenen unterschiedlichen T1- und T2-Relaxationszeit auf dem MRT-Bild im Kontrast der Schwarz-Graustufen unterschieden werden. Durch verschiedene Einstellungen bestimmter Messparameter kann der Gewebekontrast und somit die Bildqualität noch verbessert werden. Dazu gehören unter anderem die Schichtdicke, das Gesichtsfeld, die Repetitionszeit (TR: Zeit zwischen zwei Anregungen) und die Echozeit (TE: Zeit zwischen der Anregung und Signalerfassung an der Empfängerspule). Viele MRT-Sequenzen sind bereits etabliert, dennoch sind für die bestimmten Fragestellungen feine Optimierungen erforderlich (Nitz 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die MRT für die anatomische Darstellung der Tiere mit einer T2-gewichtete Messsequenz gewählt (Weishaupt, Köchli et al. 2000), die das Tumorgewebe auf dem Bild hell erscheinen lässt.

Die MRT ermöglicht unter Verwendung unterschiedlicher Spulen, zusätzlicher Kontrastmittel und spezieller Sequenzen eine Reihe von funktionellen, spektroskopischen und kontrastverstärkten Messungen, die je nach Fragestellung individuell einsetzbar sind. Die diffusionsgewichtete (DW, engl. „*diffusion weighted*“) MRT ermöglicht die Messung der Diffusionsbewegung von Wassermolekülen im Gewebe (Le Bihan, Breton et al. 1986). In Kliniken wird die DW-MRT überwiegend in der Neurologie als Standardmethode für die Identifikation pathologischer Veränderungen im Gehirn verwendet (Mukherji, Chenevert et al. 2002). DW-MRT findet in der Onkologie vermehrt Anwendung z.B. für die Charakterisierung von Tumoren oder bei der Überwachung eines Therapieverlaufs (Koh und Collins 2007, Padhani, Liu et al. 2009). Unter Verwendung einer speziellen MRT-Sequenz „*half fourier-acquired single shot turbo spin echo*“ (HASTE), die eine längere TE-Zeit zur Erfassung von Geweben mit langen T2-Zeiten enthält, können spezielle Körperbereiche mit viel Flüssigkeit dargestellt werden (Weishaupt, Köchli et al. 2000, Koh und Collins 2007). Die Aufnahme der Sequenz wird mit verschiedenen B-Werten, welche die Signalabschwächung der angeregten Regionen beschreiben, mehrmals wiederholt (Stejskal und Tanner 1965). Diese ermöglichen die Berechnung des daraus resultierenden Diffusionskoeffizienten (ADC, engl. „*apparent diffusion coefficient*“) (Weishaupt, Köchli et al. 2000). Auf diese Weise können Geweberegionen mit erhöhter Diffusion, wie z.B. Zysten oder Nekrosen, erfasst werden.

1.6.3 Optische Bildgebung

Ein weiteres nichtinvasives bildgebendes Verfahren ist die optische Bildgebung (OI, engl. „*optical imaging*“). Das Grundprinzip basiert auf der Verwendung von Lichtquellen, die Licht in einem Wellenlängenbereich von ca. 400–800 nm emittieren. Generell werden zwei Formen der Lichtemission bei OI eingesetzt: Fluoreszenz und Biolumineszenz (Hof, Fidler et al. 2005). Außerdem kann unter Verwendung von ionisierender Strahlung die Cerenkov-Lumineszenz im OI erfasst werden (Hillas 1985, Robertson, Germanos et al. 2009). Im Weiteren soll nur auf die Fluoreszenz-Bildgebung, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, eingegangen werden.

Fluorophore sind chemische Stoffe mit konjugierten π -Elektronen-Systemen, meist aus aromatischen oder zyklischen Gruppen. Über eine Lichtquelle mit Photonen im entsprechenden Wellenlängenbereich können Fluorophore angeregt werden („*Excitation*“). Dabei werden die Photonen absorbiert. Die Detektion der emittierten Photonen niedrigerer Energie erfolgt in einer vor Außenlicht geschützten Box mittels „*charge coupled device*“ (CCD)-Sensoren, die in eine gekühlte Kamera integriert sind. Für die Entwicklung von CCD-Sensoren, die auch in modernen Digitalkameras und anderen optischen Systemen verbaut werden, wurde im Jahre 2009 der Nobelpreis in Physik an die Entdecker George Smith und Willard Boyle vergeben (Boyle und Smith 1976). Durch die Kühlung der CCD-Kamera auf ca. -90° C wird das thermische Rauschen reduziert und die Sensitivität erhöht. Ein Emissionsfilterrad ermöglicht die Detektion von Photonen in

spezifischen Spektralbereichen. Ein schematischer Aufbau des OI-Systems wurde in Abbildung 14 im Abschnitt 3.3.3 dargestellt.

Die Weiterentwicklung der CCD-Kameras sowie neuer Farbstoffe im Nahinfrarotbereich ermöglicht die Detektion von sehr schwachen Signalen in einer Gewebetiefe von bis zu 2-3 cm (Rice, Cable et al. 2001, Ntziachristos, Bremer et al. 2003). Die geringe Auflösung sowie die geringe Durchdringungstiefe schränkt die Verwendung des OI in den Kliniken ein, findet jedoch in der präklinischen Forschung eine sehr breite Anwendung (Schwenck, Fuchs et al. 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die optische Bildgebung für die Detektion des grün fluoreszierenden Protein (GFP)-Signals eingesetzt. GFP wurde als zuerst entdeckter und charakterisierter Fluorophor im Jahr 1962 beschrieben. Seinen drei Entdeckern Roger Tsien, Osamu Shimomura und Martin Chalfie wurde im Jahre 2009 der Nobelpreis für Chemie verliehen (Shimomura, Chalfie et al. 2014). GFP ist ein in der Quallenart *Aequoria victoria* natürlich vorkommendes, aus 238 Aminosäuren aufgebautes und 26,9 kDa großes Protein (Tsien 1998). Bereits im Jahr 1979 wurde die chemische Struktur des Chromophors p-Hydroxybenzyliden charakterisiert, welches für die Fluoreszenz verantwortlich ist. Dieses Chromophor wird autokatalytisch über sequentielle Zyklisierungs- und Oxidationsschritte aus dem Tripeptid Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ gebildet und befindet sich in der Mitte der sogenannten β -Fass-Struktur (Zimmer 2002). Die Fluoreszenzeigenschaften des Chromophors werden durch die Bildung von Wasserstoffbrücken mit Wassermolekülen, die sich im Inneren der β -Fass-Struktur befinden, sowie durch das konjugierte π -Elektronensystem ermöglicht (Tsien 1998). Das native GFP-Protein besitzt zwei Extinktionsmaxima bei 395 nm und 475 nm und emittiert entsprechend Licht bei 508 nm und 503 nm (Heim, Prasher et al. 1994). So werden durch die Energie der absorbierten Photonen die Chromophor-Elektronen aus dem Grundzustand (S_0) in den angeregten, instabilen Singulettzustand (S_1) (nach Jablonski-Thermschema) versetzt (Jabłoński 1935). Das Elektron kehrt in den Grundzustand zurück. Dabei wird die Energiedifferenz zwischen dem angeregten und dem Grundzustand in Form von Photonen mit einer niedrigeren Energie emittiert. Die restliche Energie wird meist in Form von Wärme freigesetzt (Hassan und Klaunberg 2004).

Die Erfolgsgeschichte von GFP als Reporterprotein beginnt in den frühen 90er Jahren, damals gelang Douglas Prasher die Isolierung, Sequenzierung und Klonierung der GFP-cDNA (Prasher, Eckenrode et al. 1992). Aufgrund seiner nahezu nicht-toxischen Eigenschaften kann es in beinahe allen eukaryotischen Zellen exprimiert werden und eignet sich hervorragend zur Untersuchung von biochemischen und molekularbiologischen Prozessen *in vivo* (Cheng, Fu et al. 1996). Heutzutage existieren eine Reihe von unterschiedlichen Fluorophoren über den gesamten Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts, die nicht nur in der OI zum Einsatz kommen, sondern auch für weitere molekularbiologische Methoden, wie die Durchflusszytometrie oder die konfokale Mikroskopie, essentiell sind. Solche Fluorophore sind diverse modifizierte GFP-Formen (Creemers, Lock et al. 1999, Fedoroff und Fontana 2002) sowie auch modifizierte For-

men von fluoreszierenden Proteinen aus Korallen und Fluorophore, die ihre Fluoreszenz mit der Zeit verändern (Terskikh, Fradkov et al. 2000, Verkhusha und Lukyanov 2004, Licha, Schirner et al. 2008).

2 Fragestellung

Das Ziel dieser Dissertation war zum einen die Evaluierung neuer PET-Tracer für die *in vivo* Visualisierung von senescentem Gewebe. Zum anderen sollte das CR-LRB-018P-PDX-Modell unter Berücksichtigung verschiedener Implantationsbedingungen mittels nichtinvasiver, bildgebender Verfahren longitudinal auf die Expression verschiedener Biomarker und metabolischer Vorgänge untersucht werden.

Basierend auf den beiden Projekten wurden folgende Fragestellungen untersucht.

Seneszenz-Projekt:

- Welche Zelllinien eignen sich am besten für die Evaluierung der neuen Seneszenz-spezifischen Tracer *in vitro* und *in vivo*? Hierfür wurden drei verschiedene Zelllinien, HCT116, HCT116PTTG^{-/-} und MCF7, auf ihre Seneszenz-Entwicklung nach Doxorubicin-Behandlung (TIS) untersucht. Diese wurde anhand der Zellmorphologie und eines SA-β-Gal-Assays überprüft. Hierbei stand die Etablierung geeigneter *in vitro* Assays sowie geeigneter Nachweisverfahren für die Seneszenz in Zellkultur im Vordergrund.
- Welche der *in vitro* untersuchten Zelllinien eignen sich am besten als *in vivo* Xenograftmodelle für die Bildung der TIS in Kleintieren? Die TIS wurde *ex vivo* mittels eines SA-β-Gal-Assays und IHC-Färbungen (mit p16-, p53-, Ki67-, HP1γ- und FUCA1-Antikörpern) beurteilt. Die Etablierung eines geeigneten *in vivo* Modells für die Untersuchung der induzierten Seneszenz *in vivo* mittels molekularer Seneszenz-Marker, sowie die Evaluierung geeigneter *ex vivo* Nachweisverfahren standen hier im Vordergrund.
- Stellt die bereits für Seneszenz-Untersuchungen gut etablierte GE-PIRshp53pWZLHras-Zelllinie ein geeignetes *in vivo* Allograftmodell der OIS dar? Die OIS in Tumoren wurde *ex vivo* mittels eines SA-β-Gal-Assays und IHC-Färbungen (mit p16-, p53-, Ki67-, HP1γ- und FUCA1-Antikörpern) beurteilt. Eignet sich das Hras-Allograftmodell zur Visualisierung der OIS mit Hilfe von neu entwickelter Seneszenz-PET Tracer?
- Ist eine Identifikation senescenter Areale in Zellkultur und Tumorgewebe mittels der entwickelten Seneszenz-Tracer [¹⁸F]β-Gal und [¹⁸F]α-Fuc *in vitro* und *in vivo* mit Hilfe von PET möglich? Hierfür wurde die jeweilige Tracer-Akkumulation *in vivo* im HCT116-Xenograftmodell und Hras-Allograftmodell mit Hilfe von bildgebenden Verfahren evaluiert.

CR-LRB-018P-PDX-Modelle-Projekt:

- Unser Ziel war es in erster Linie, komplementäre Informationen, wie z.B. den Metabolismus, die Proliferation, die Hypoxie und die Angiogenese mit Hilfe nichtinvasiver PET- und MRT-Bildgebung zu generieren und ein longitudinales *in vivo* Tumor-Profil während der Tumor-Progression zu erstellen. Hierfür wurden die PDSX- und PDOX-CR-LRB-018P-Tumoren anhand molekularer Marker der PET- und funktioneller MRT-Messungen longitudinal *in vivo* untersucht.
- Ist eine Identifizierung eines *in vivo* Phänotyps anhand der molekularer Marker, in Bezug auf die unterschiedliche Platzierung der BRAF(V600E)-mutierten CR-LRB-018P-Tumor-Fragmenten (orthotop oder subkutan) in Ratten, longitudinal mit Hilfe der PET und MRT möglich?
- Wie ist das Diffusionsverhalten der PDSX- und PDOX-CR-LRB-018P-Tumoren unter Berücksichtigung der *in vivo* untersuchten Tumoreigenschaften longitudinal zu beurteilen?
- Kann die intratumorale Heterogenität von PDSX- und PDOX-CR-LRB-018P-Tumoren charakterisiert werden? Kann eine Voxel-basierte Analyse der Daten näheren Aufschluss über die Tumorerogenität geben?

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

Alle, im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Thermo Fisher Scientific, Hyclone, Waltham, USA) mit einer konstanten Temperatur von 37° C und einem CO₂-Gehalt der Luft von 5 % kultiviert. Das Passagieren und die Vorbereitung für alle *in vitro* und *in vivo* Experimente erfolgte unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank (Heraeus HERAsafe KS, Thermo Fisher Scientific).

3.1.1 Bestimmung der Zellzahl

Für die Vorbereitung der *in vitro* Experimente und für *in vivo* Injektionen wurde für alle Zelllinien dieselbe Methode zur Zellzahlbestimmung durchgeführt. Dafür wurde die jeweilige Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim, Deutschland) gezählt. Dabei wurden hell leuchtende, ungefärbte Zellen als vital erachtet und gezählt, dunkelblau gefärbte Zellen hingegen wurden als tot angesehen und nicht in die Bestimmung der Gesamtzellzahl einbezogen.

3.1.2 Kultivierung der verschiedenen Zelllinien

3.1.2.1 Humane Zelllinien HCT116 und HCT116PTTG^{-/-}

Für die Kultivierung der humanen HCT116-Zellen (ATCC, engl. „*American Type Culture Collection*“; Manassas, Virginia, USA) wurde McCoy's 5a Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml; 10.000 µg/ml, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 10 % fetalem Kälberserum (FCS, engl. „*fetal calf serum*“; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) eingesetzt. Dazu wurde das Kälberserum zuvor 30 min im Wasserbad bei 56° C (Thermo Fisher Scientific) hitzeinaktiviert.

3.1.2.2 Humane Zelllinie MCF7

Die Kultivierung der humanen MCF7-Zellen erfolgte im RPMI-1640 Zellkulturmedium (engl. „*Roswell Park Memorial Institute Medium*“; Biochrom AG) mit 1 % Penicillin/Streptomycin Lösung (Biochrom AG) und 10 % hitzeinaktiviertem FCS (Sigma-Aldrich).

3.1.2.3 Murine Zelllinie PIRshp53pWZLHras

Die murinen PIRshp53pWZLHras-Zellen wurden in DMEM (engl. „*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*“; Biochrom AG) mit 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG), 10 % thermoinaktiviertem FCS (Sigma-Aldrich), 1mM Natrium-Pyruvat (Biochrom AG) und 1 % MEM Aminosäurelösung (Gibco, Eggenstein, Deutschland) kultiviert. Für das Wachstum dieser Zelllinie wurde dem Medium zusätzlich Doxy (Sigma-Aldrich) mit einer Konzentration von 5 µg/ml zugesetzt.

3.1.3 Seneszenz-Induktion *in vitro*

Für die Induktion der Seneszenz wurden 60 bis 70 % konfluente HCT116-, HCT116PTTG^{-/-} und MCF7-Zellen in Sechswell-Zellkulturplatten verwendet. Zunächst wurde die optimale Konzentration des Chemotherapeutikums Doxo (Cell Pharm GmbH, Bad Vilben, Deutschland) ermittelt. Hierfür wurden alle Zellkulturen 24 h mit drei unterschiedlichen Doxo-Konzentrationen (150, 250, 500 nM) inkubiert und für weitere drei Tage im jeweiligen frischen Medium zur Seneszenz-Entwicklung kultiviert. Am vierten Tag wurden mit den unterschiedlich behandelten Zellen verschiedene *in vitro* Experimente zur Seneszenz-Detektion durchgeführt. Anhand der SA-β-Gal-Färbung (siehe 3.2.1) und der unterschiedlichen Zellmorphologie wurde festgelegt, dass eine Doxo-Konzentration von 250 nM in allen drei Zelllinien optimal Seneszenz induzieren kann (siehe 4.1.1). Diese Konzentration wurde folglich für alle weiteren *in vitro* Experimente mit HCT116-, HCT116PTTG^{-/-} und MCF7-Zellen verwendet.

Für die Induktion der Seneszenz in murinen Hras-Zellen wurden zu 50 % konfluente Kulturen aus Zellpassage drei bis fünf dieser Zelllinie in Sechswell-Zellkulturplatten verwendet und für drei Tage im entsprechenden Medium (siehe 3.1.2.3) ohne Doxy kultiviert.

3.2 *In vitro* Untersuchungen

Im folgenden Abschnitt sollen die *in vitro* Experimente beschrieben werden. Hierfür wurde jede Zelllinie in zwei Gruppen aufgeteilt: Kontrolle und Seneszenz. Die Seneszenz-Induktion erfolgte wie im Abschnitt 3.1.3 beschrieben. Tabelle 3 stellt eine Übersicht über alle verwendeten Zellkultur-Gruppen da.

Tabelle 3: Gruppenübersicht der Zelllinien für *in vitro* Versuche

	HCT116 PTTG ^{-/-}	MCF7	HCT116	Hras
Kontrolle	ohne Doxo	ohne Doxo	ohne Doxo	mit Doxy
Seneszenz	mit Doxo	mit Doxo	mit Doxo	ohne Doxy

3.2.1 SA- β -Galactosidase-Assay in Zellkultur

Die *in vitro* Detektion von SA- β -Gal in Zellen erfolgte nach einem bereits von anderen Arbeitsgruppen etablierten Protokoll (Debacq-Chainiaux, Erusalimsky et al. 2009). Zuerst wurden die Zellen mit Phosphatpuffer (PBS, engl. „*phosphate buffered saline*“; Gibco, DPBS, Life Technologies Corporation, Paisley, Schottland, UK) gewaschen und anschließend mit 0,5 % Glutaraldehyd-Lösung (in PBS, pH 7,4) für 5 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Die fixierten Zellen wurden 2 min mit PBS und zweimal 5 min mit 1 mM MgCl₂ in PBS (pH 5,5) bei RT gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit frischer X-Gal-Färbelösung bei 37° C in einem Wärmeschrank (MaxQ6000; Thermo Fischer Scientific) für wenige Stunden im Dunkeln inkubiert. Um eine unspezifische Färbung während der Inkubation zu vermeiden, wurde die Farbentwicklung stündlich kontrolliert.

Verwendete Lösungen:

- PBS-Puffer (pH 7,4)
- 0,5 % Glutaraldehyd-Lösung (Sigma-Aldrich) in PBS (pH 7,4)
- 1 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich) in PBS (pH 5,5 mit HCl eingestellt)
- X-Gal-Färbelösung 40 ml
- 1 mM MgCl₂/PBS (pH 5,5) 37 ml
- 0,2 M K₃Fe(CN)₆ (Merck, Darmstadt, Deutschland) 1 ml
- 0,2 M K₄Fe(CN)₆ x 3H₂O (Sigma-Aldrich) 1 ml
- 40 mg/ml X-Gal (PEQLAB GmbH, Erlangen, Deutschland) 1 ml

Nach der Färbung wurden die Zellen 5 min mit PBS gewaschen, getrocknet und anschließend mit einem Lichtmikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) untersucht. Dabei wurden ausschließlich die blau gefärbten Zellen im SA- β -Gal-Assay positiv gewertet und für die Interpretation der Ergebnisse als seneszent erachtet.

3.2.2 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie (FACS, engl. „*fluorescence activated cell sorting*“) handelt es sich um eine Methode für die Identifizierung und Quantifizierung von Zellpopulationen in einer Zellsuspension anhand der Markierung bestimmter extrazellulärer oder intrazellulärer Proteine. Dafür werden die Zellen mit spezifischen Fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert und anschließend in einem Durchflusszytometer analysiert. Hierfür fließt die Einzelzellsuspension an einem gebündelten Lichtstrahl, der sich aus mehreren Anregungswellenlängen zusammensetzt, vorbei. Das von der Zelle ausgehende Fluoreszenzsignal wird von einem Detektor erfasst und ausgewertet. Zum anderen wird der Lichtstrahl an der Zelle gebrochen bzw. gebeugt und als Vorwärts-

streulicht (FSC, engl. „*forward scatter*“) sowie Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. „*side scatter*“) erfasst, was Aufschluss über die Zellgröße bzw. Granularität gibt. Unter Verwendung von verschiedenen Fluoreszenz-markierten Antikörpern (AK) ermöglicht diese Methode die gleichzeitige Identifizierung verschiedener Proteine auf bzw. in der gleichen Zelle derselben Zellsuspension.

3.2.2.1 Bromdesoxyuridin-Assay

Zur Beurteilung der Zellproliferation wurde in dieser Arbeit das Bromdesoxyuridin (BrdU) Flow Kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) verwendet und die Analysen mit Hilfe eines Durchflusszytometers durchgeführt. BrdU ist ein Thymidin-Analogon und kann in phosphorylierter Form während der S-Phase in die DNA eingebaut werden. Anti-BrdU-spezifische, Fluoreszenz-markierte AK ermöglichen die Identifizierung von proliferierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Die Vorbereitung von allen Lösungen und Puffern sowie die Durchführung des Experiments erfolgten streng nach Protokollvorgaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Chemikalien. Alle Zellproben (Seneszenz- und Kontrollgruppen) wurden jeweils ohne BrdU und mit BrdU (1mM) für 24 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin (Gibco) von der Zellkulturflasche abgelöst und in PBS-Puffer 5 min bei 1500 rpm in einer Zentrifuge (Multifuge 3SR+, Thermo Fisher Scientific) gewaschen. Anschließend erfolgten mehrere Inkubations- und Waschschriffe pro Probe:

- 20 min mit *Cytofix/Cytoperm* bei 4° C
- 1 ml Perm-Waschpuffer / 5 min bei 1500 rpm
- 10 min auf Eis mit 50 µl *Cytoperm-Plus*
- 1 ml Perm-Waschpuffer / 5 min bei 1500 rpm
- 1 h bei 37° C mit 50 µl DNase
- 1 ml Perm-Waschpuffer / 5 min bei 1500 rpm
- 20 min bei RT mit 25 µl anti-BrdU AK (1:100) + 20 µl 7-Aminoactinomycin (7AAD) pro Probe (dunkel)
- 1 ml Perm-Waschpuffer / 5 min bei 1500 rpm
- Zellen in 150 µl Färbepuffer im FACS-Röhrchen (BD Biosciences) auflösen

Anschließend erfolgte die FACS-Analyse aller Proben mit einem Durchflusszytometer.

3.2.2.2 Auswertung der FACS-Daten am Durchflusszytometer

Die Analyse der Zellsuspensionen für den BrdU-Assay wurde am LSR-II Durchflusszytometer (BD Biosciences) durchgeführt. Es wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt: Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertes BrdU, welches in die DNA der

proliferierenden Zellen eingebaut wurde und 7AAD, der die gesamte DNA der Zelle markiert.

Zunächst wurde die gesamte Zellpopulation, unter Ausschluss von Zellen, die sich am Rand des Diagramms befanden, in dem FSC-SSC-Dot-Plot mit einem großen Gate eingegrenzt und für die weiteren Analysen ausgewählt (Abbildung 11, links). Anschließend wurden, für die Kompensation von FITC- und 7AAD-Signalen, die jeweiligen Einfachfärbungen der Zellsuspensionen erfasst und korrigiert, um eine Überlagerung beider Signale zu vermeiden. Die doppelt gefärbten Zellsuspensionen wurden nacheinander mit jeweils 150 000 Zellen pro Probe erfasst und die Daten anschließend mit dem Programm FACSDiva 5.1 (BD Biosciences) ausgewertet.

Dabei wurde in einem Dot-Plot-Diagramm das FITC-Signal gegen das 7AAD-Signal der Zellen aufgetragen. Anhand der jeweiligen Kontrollen ohne BrdU wurden fünf Gates festgelegt, die für die Auswertung der doppelt gefärbten Zellproben eingesetzt wurden (Abbildung 11, rechts). Dabei wurde auf die Empfehlung des Herstellers für die Auswertung des BrdU Flow Kits (BD Biosciences) geachtet.

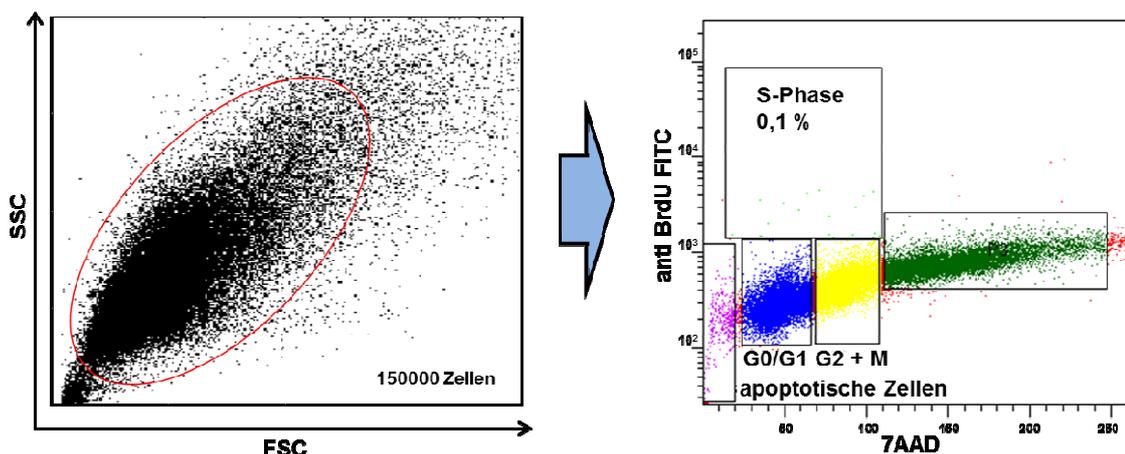


Abbildung 11: Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten

Darstellung eines FSC-SSC-Dot-Plot-Diagramms mit allen aufgenommenen Zellen sowie einem Gate (rot markiert, links im Bild). Die Bestimmung von fünf Gates in Assoziation mit Zellzyklus Phasen wird anhand des BrdU-FITC-7AAD-Dotplot-Diagrammes durchgeführt (rechts im Bild). Apoptotische Zellen (lila), G0/G1-Phase (blau), G2+M (gelb), S-Phase (hellgrün) und die Zellen mit x-fachem Chromosomensatz (dunkelgrün).

3.2.3 *In vitro* Evaluierung neuer PET-Tracer zur Detektion der Seneszenz

Für die *in vitro* Analyse neuer, mit ¹⁸F radioaktiv markierter, PET-Tracer wurden HCT116- und Hras-Zelllinien verwendet. Eine jeweilige Seneszenz- und der Kontrollgruppe der beiden Zelllinien wurde, wie in Tabelle 3 beschrieben, vorbereitet. Alle Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen, für 50 min mit 100 µCi [¹⁸F]α-Fuc oder 150 µCi [¹⁸F]β-Gal-Tracers in 10 ml PBS im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Die unterschiedli-

chen Tracerkonzentrationen resultieren in unterschiedlich starker Anreicherung des jeweiligen Moleküls in den Zellen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin vom Flaschenboden gelöst und mit jeweils 10 ml PBS zweimal gewaschen. In jeweils einer Zellkulturflasche wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf 5 Aliquots in Plastik-Röhrchen (BD Biosciences) verteilt. Anschließend wurden Aliquots von allen Proben im Gammacounter Wizard 2480 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) mit einem Energiefenster von 350 bis 650 keV gemessen. Zusätzlich wurden fünf Standardlösungen des jeweiligen Tracers zusammen mit den Proben gemessen. Die in einer Minute gemessenen „Counts“ pro Probe wurden zerfallsspezifisch für ^{18}F korrigiert und auf die Zellzahl der jeweiligen Probe normiert.

3.3 Bildgebende Verfahren zur *in vivo* Tumorcharakterisierung

3.3.1 PET

Alle PET-Messungen erfolgten mittelst zwei identischer dedizierter Kleintier PET-Scanner (Inveon, Siemens Preclinical Solution, Knoxville, TN, USA; Abbildung 12). Die Steuerung der PET-Scanner erfolgt über die zugehörige Inveon Acquisition Workplace (IAW) Software.

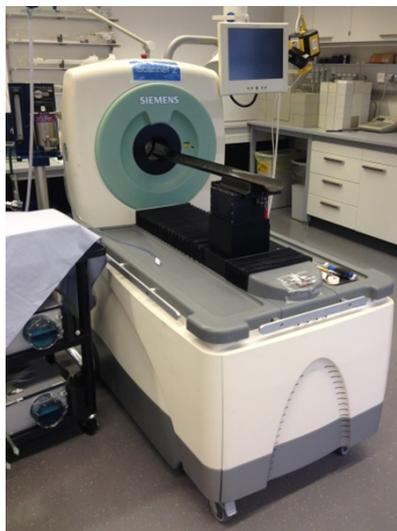


Abbildung 12: Inveon Kleintier PET-Scanner von Siemens

Beide Scanner haben die gleichen technischen Daten, die von Brad J. Kemp im Jahr 2009 nach den Richtlinien der „*national electrical manufacturers association*“ (NEMA) bewertet wurden (Kemp, Hruska et al. 2009). Die gesamte Detektoreinheit besteht aus 80 axialen Kristallelementringen mit einem Ringdurchmesser von 161 mm, welche jeweils aus 320 Szintillationskristallen pro Ring aufgebaut sind. Die PET-Scanner verfügen über ein axiales Gesichtsfeld von 12,7 cm und ein transaxiales FoV von 10 cm mit

einer räumlichen Auflösung von 1,4 mm (Kemp, Hruska et al. 2009). Alle PET-Messungen erfolgten in einem Energiefenster von 350-650 keV und einem Koinzidenzfenster von 3,432 ns (Kemp, Hruska et al. 2009).

Die Datenaufnahme erfolgte für alle durchgeführten Experimente aus der Emissionsmessung (EM) in Form von Listmode-Datensätzen. Dabei wurden entweder statische 10-minütige oder dynamische 60 bzw. 90-minütige Messprotokolle für die EM durchgeführt. Anschließend an jedes EM-Protokoll folgte eine 13-minütige Transmissionsmessung (TM) mit Hilfe einer ^{57}Co -Quelle. Um die aufgenommene Rohinformation auswerten zu können, mussten die Listmode-Datensätze im 3D-Modus histogrammiert werden. Die so errechneten Sinogramme wurden unter Einbezug der TM mittels OSEM3D ohne MAP-Iteration rekonstruiert. Eine Übersicht über die durchgeführten PET-Messungen mit den verschiedenen Tracern wurde in Tabelle 4 und 5 dargestellt.

Tabelle 4: PET-Messparameter für etablierte Tracer

Tracer	Statische PET-Messung	
	Anreicherung [min]	EM/TM [min]
[^{18}F]FDG	50 ± 1	10/13,4
[^{18}F]FLT	50 ± 1	10/13,4
[^{18}F]FMISO	50 ± 1	10/13,4
[^{68}Ga]RGD	80 ± 1	20/13,4

Tabelle 5: PET-Messparameter für Seneszenz-Tracer

Tracer	Dynamische PET-Messung	Statische PET-Messung	
	EM/TM [min]	Anreicherung [min]	EM/TM [min]
[^{18}F] α -Fuc	60/13,4	50 ± 1	10/13,4
[^{18}F] β -Gal	60 bzw. 90/13,4	50 ± 1	10/13,4

3.3.2 MRT

Alle MRT-Messungen wurden an einem 7 Tesla MRT-Scanner für Kleintiere (ClinScan 7T-MRI, Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt (Abbildung 13). Das Gerät besitzt ein horizontal ausgerichtetes, aktiv abgeschirmtes (engl. „*ultra shielded refrigerated*“) Magnetfeld. Der Magnet hat einen Gesamtdurchmesser von 1,65 m und eine Länge von 1,44 m. Im Zentrum über die gesamte Länge befindet sich eine Bohrung mit einem Durchmesser von 30 cm. Weitere Ausstattungsmerkmale sind die eingebaute Gradientenspule und eine RF (Radiofrequenz)-Spule im Inneren des Scan-

ners. Das System arbeitet mit der ^1H -Resonanzfrequenz von 300,4 MHz und einem B-GA 20S Gradientensystem mit einer Amplitude von 290 mT/m. Die Bedienung des MRT-Scanners erfolgte über die klinische Software Syngo[®] MR VB 15 (Siemens Medical Solutions USA, Malvern, USA).

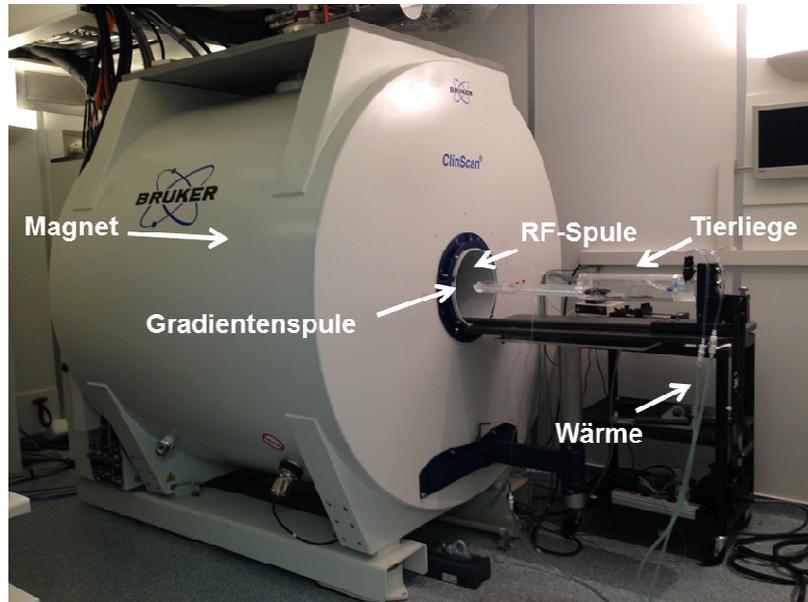


Abbildung 13: ClinScan 7T-Kleintier MRT-Scanner von Bruker

Ein MRT-Scanner mit horizontal ausgerichtetem Magnetfeld sowie einer Gradienten- und RF-Spule im Zentrum der Bohrung. Eine gewärmte Tierliege kann mithilfe der Halterung über die Führung in das Innere des Scanners geschoben werden.

Die Erfassung der anatomischen Struktur von Mäusen und Ratten erfolgte mittels einer Ratten-Ganzkörperspule. Dabei handelt es sich um eine Volumen-Array-Spule, die gleichzeitig als Transmitter und Empfänger wirkt. Für die anatomische Bildgebung wurde eine T2 gewichtete 3D „turbo spin echo“ (TSE) MRT-Sequenz verwendet. Die Messparameter für Maus und Ratte sind hierbei unterschiedlich. Die Mäuse wurden mit einer TR von 2500 ms, einer TE von 202 ms und einer Voxelgröße von $(0,27 \times 0,27 \times 0,27) \text{ mm}^3$ mit zwei Durchläufen (engl. „averages“) gemessen. Die Erfassung der Rattenanatomie erfolgte mit einer TE von 124 ms, TR von 5000 ms und zwei „averages“ mit einem FoV von 89 mm.

Während der gesamten Messung lagen die Tiere auf einer gewärmten Tierliege und wurden mit 1,5 % Isofluran-Sauerstoffgemisch (Mäuse) oder 1,5 % Isofluran-Luftgemisch (21 % O_2 ; Ratten) in Narkose gehalten. Dabei wurde die Atemfrequenz der Tiere mittels einer entsprechenden Kontrolleinheit überwacht und durch Rückkopplung mit dem MRT konnte die Messung auf die Atmung getriggert werden, was für eine bessere Bildauflösung sorgt, da Bewegungsartefakte durch die Atmung minimiert werden können.

Für die Messung der Diffusion in den Tumoren der Ratten wurden HASTE Sequenzen mit drei verschiedenen B-Werten (150, 600 und 1000), einer TR von 5000 ms, einer TE von 121 ms, vier „averages“ und einer transversalen Schichtdicke von 1 mm verwendet. Für die Etablierung der Diffusionsgewichtung (B-Werte) wurden zuerst an drei Tieren die Goldstandardwerte unseres Labors (B-Werte: 50, 150, 300, 600, 1000) gemessen. Der aus fünf B-Werten berechnete ADC-Wert wurde mit dem aus drei B-Werten errechneten ADC-Wert verglichen. Die Abweichung zwischen den beiden Werten betrug bei allen drei Tieren <10 %. Aus Gründen der Messzeiterparnis wurden für alle weiteren Diffusionsmessungen nur die drei oben genannten B-Werte verwendet.

3.3.3 Optisches System

Alle in dieser Arbeit durchgeführten optischen Messungen erfolgten am IVIS Spectrum System von PerkinElmer (Abbildung 14). Ausschließlich das GEPIRshp53pWZLHras-Allograftmodell wurde auf die Expression des Reporterproteins GFP in den subkutanen Tumoren untersucht. Die Aufnahme und die Analyse der Daten erfolgte mittels der Living Image® 4.4 Software (Caliper Life Sciences, PerkinElmer). Das Gerät bietet Platz für bis zu fünf Tiere und verfügt über 28 Filter in einem Bereich von 430 bis 850 nm. Die Einstellungen für die Fluoreszenz-Messung zum Erfassen des GFP-Signals wurden mit Hilfe des Imaging Wizard vorgenommen. Im Epi-Illumination Modus wurde die Emission auf 520 nm und die Extinktion auf 465 nm eingestellt. Mit einem Gesichtsfeld von 25 cm und bei höchster Lichtintensität erfolgten zunächst eine Hellfeldaufnahme und anschließend eine Fluoreszenzaufnahme. Alle Versuchstiere wurden während der Messung mit 1,5 % Isofluran (Isofluran CP®, CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) narkotisiert und durch eine eingebaute Wärmeplatte bei 37° C gehalten.

Es erfolgte eine semi-quantitative Prüfung auf das Vorhanden- bzw. Nichtvorhandensein eines GFP-Signals in den Tumoren der unterschiedlichen Gruppen. Die Überlagerung von Hellfeld- und Fluoreszenzaufnahmen erfolgte automatisch über die Gerätesoftware. Die Einstellungen für die Intensität des GFP-Signals „*Radian Efficiency*“ (RF), wobei das Detektierte Signal pro Fläche auf die Anregung pro Fläche normiert wird, erfolgte für alle Messungen gleich (minimal: $1,25 \cdot 10^9$ und maximal: $8,05 \cdot 10^9$ RF).

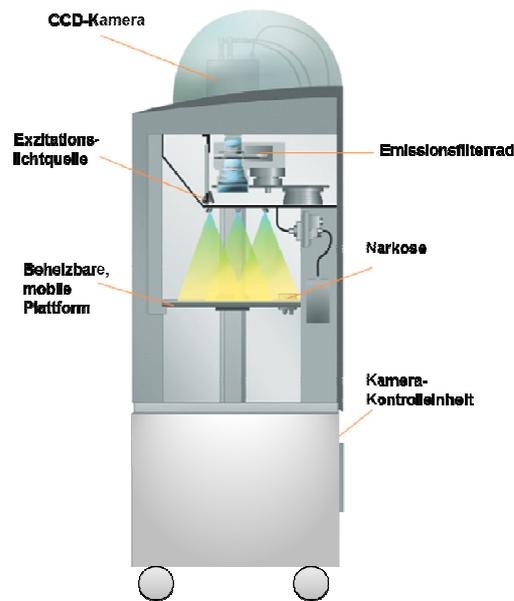


Abbildung 14: Optisches System IVIS Spectrum von PerkinElmer

Eine schematische Darstellung des OI-Systems (verändert nach PerkinElmer).

3.4 Herstellung von Radiotracern

Alle in dieser Arbeit verwendeten radioaktiv markierten Tracer wurden in der Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie des Werner Siemens Imaging Centers (WSIC) in Tübingen nach teilweise leicht veränderten oder neu etablierten Protokollen hergestellt. Anschließend wurden Qualitätskontrollen aller hergestellten Tracer nach standardisierten Protokollen durchgeführt.

3.4.1 Herstellung von radioaktiven Nukliden

Die Herstellung des radioaktiven Nuklides ^{18}F erfolgte in einem Teilchenbeschleuniger, dem Zyklotron (PETtrace, GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Dabei wurde das Target, ^{18}O -angereichertes Wasser, mit 16,5 MeV-Protonen beschossen. Die gewünschte Kernreaktion wurde durch die Wechselwirkung von stabilen Target-Isotopen mit dem Protonenstrahl ausgelöst. Das radioaktive ^{18}F -Isotop entsteht, wenn Sauerstoff ein Proton aufnimmt und ein Neutron abgibt. Anschließend wurde das radioaktive ^{18}F -Isotop auf einer Anionenaustauscher-Kartusche (SEP-PAK QMA Plus light, Waters, Eschborn, Deutschland) fixiert (Reischl, Ehrlichmann et al. 2002).

Die Herstellung des Radioisotops ^{68}Ga erfolgte mit einem ^{68}Ge - ^{68}Ga -Generator (IGG100 Gallium-68 Generator, 50 mCi, Eckert & Ziegler Eurotope GmbH, Berlin, Deutschland) in der Radiopharmazie des WSIC in Tübingen. Dabei wurde das radioaktive ^{68}Ga (HWZ 68 min) aus dem instabilen ebenfalls radioaktiven ^{68}Ge (HWZ 271 Ta-

ge) erzeugt. Im Generator liegt ^{68}Ge an einer Trägersubstanz (Titandioxid) gebunden vor. Durch den kontinuierlichen Zerfall von ^{68}Ge zu ^{68}Ga reichert sich ^{68}Ga im Generator an und kann mit 0,1 M Salzsäure eluiert werden.

3.4.2 Synthese etablierter PET-Tracern

Zu den etablierten PET-Tracern, die in dieser Arbeit verwendet wurden, gehören ^{18}F FDG, ^{18}F FLT, ^{18}F FMISO und ^{68}Ga NODAGA-RGD. Im Weiteren werden die Synthesen der genannten Radiopharmaka in Kürze beschrieben werden.

3.4.2.1 ^{18}F FDG

^{18}F FDG wurde in Synthesemodulen des Typs TRACERlab MXFDG (GE Healthcare, Münster, Deutschland) produziert. Alle benötigten Chemikalien wurden einem speziell hierfür zusammengesetzten Kit (ABX, Advanced Biomedical Compounds, Dresden, Deutschland) entnommen. Als Precursor für ^{18}F FDG wurde Peracetyl-Mannose-triflat verwendet. Die Markierungsreaktion fand über eine nukleophile Substitution mit getrocknetem ^{18}F Fluorid an Peracetyl-Mannose-triflat statt. Durch anschließende Entfernung der Acetyl-Schutzgruppen mit Natronlauge entstand das ^{18}F FDG Endprodukt, welches noch steril filtriert und mit 0,75 % Ethanol verdünnt wurde (Abbildung 15; Quelle: SOP, engl. „*standard operating procedure*“ der Herstellung des ^{18}F FDG-Radiopharmazie Tübingen).

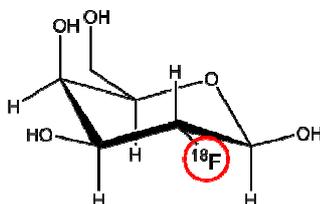


Abbildung 15: Strukturformel von ^{18}F FDG

Verändert nach der SOP zur Herstellung von ^{18}F FDG der Radiopharmazie Tübingen.

3.4.2.2 ^{18}F FLT

Für die Synthese von ^{18}F FLT wurde das Modul „NINA“ (GE Healthcare, Münster, Deutschland) verwendet (Reischl, Blocher et al. 2006). Bei der Markierungsreaktion handelte es sich ebenfalls um eine nukleophile Substitution, wobei das ^{18}F -Fluorid am 2'-Desoxyribose-Ring des Präkursors 5'-Benzoyl-2,3'-anhydrothymidin (ABX, Advanced Biomedical Compounds) eingebracht wurde. Nach Entfernung der 5'-Benzoyl Schutzgruppe durch alkalische Hydrolyse wurde das ^{18}F FLT-Endprodukt gereinigt und anschließend steril filtriert (Abbildung 16).

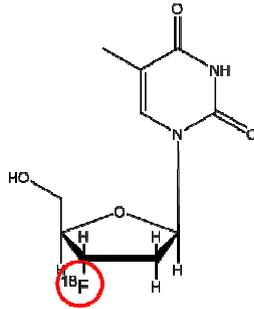


Abbildung 16: Strukturformel von [¹⁸F]FLT

Verändert nach der SOP zur Herstellung von [¹⁸F]FLT der Radiopharmazie Tübingen.

3.4.2.3 [¹⁸F]FMISO

Die Herstellung von [¹⁸F]FMISO wurde mit Hilfe des Moduls „NINA“ (GE Healthcare) nach einem veröffentlichten Protokoll von Patt *et al.* durchgeführt (Patt, Kuntzsch *et al.* 1999). Die Markierungsreaktion erfolgte auch hier durch nukleophile Substitution des [¹⁸F]Fluorids an den Precursor 1-(2'-Nitro-1'-imidazolyl)-2-O-tetrahydropyranyl-3-O-toluolsulfonylpropandiol (NITTP; ABX, Advanced Biomedical Compounds). Die Tetrahydropyranyl-Schutzgruppe wurde durch Hydrolyse mit Salzsäure abgespalten. Anschließend wurde das [¹⁸F]FMISO-Endprodukt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. „*high-performance liquid chromatography*“) mit einer LUNA-C8-Säule (250 x 10 mm, 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) isoliert und im letzten Schritt der Herstellung steril filtriert (Abbildung 17).

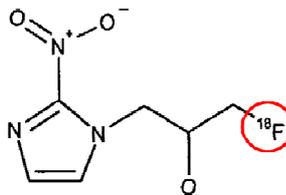


Abbildung 17: Strukturformel von [¹⁸F]FMISO

Verändert nach der SOP zur Herstellung von [¹⁸F]FMISO der Radiopharmazie Tübingen.

3.4.2.4 [⁶⁸Ga]NODAGA-RGD

[⁶⁸Ga]NODAGA-RGD besteht aus drei Komponenten: dem Chelator NODAGA, dem Radioisotop ⁶⁸Ga und dem zyklischen RGD-Peptid. Der Precursor cyclo RGDfK (NODAGA) wurde von Dr. R. Haubner (Medizinische Universität Innsbruck, Österreich) zu Verfügung gestellt. Während der Markierungsreaktion wurde ⁶⁸Ga in einer mit Natriumacetat gepufferten Lösung zusammen mit dem Precursor bei Raumtemperatur inku-

biert. Dabei bildete sich ein Chelatkomplex, wobei ^{68}Ga im Liganden NODAGA über mehrere Koordinationsstellen gebunden wurde. Anschließend wurde das Endprodukt durch Festphasenextraktion aufgereinigt und mit PBS verdünnt (Abbildung 18) (Knetsch, Petrik et al. 2011).

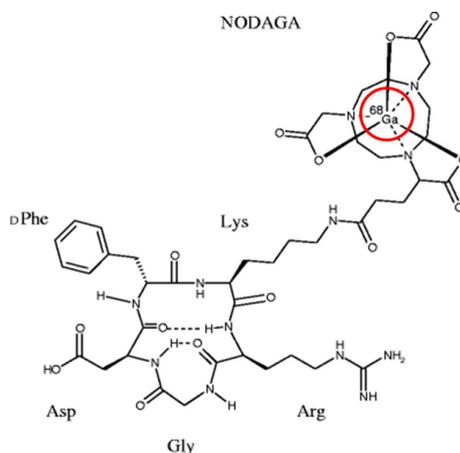


Abbildung 18: Strukturformel von ^{68}Ga -NODAGA-RGD

Verändert nach (Knetsch, Petrik et al. 2011).

3.4.3 Synthese von neuentwickelten PET-Tracern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue PET-Tracer in verschiedenen Experimenten *in vitro* und *in vivo* getestet. Die Entwicklung und Charakterisierung beider Precursor-Moleküle sowie die Etablierung der Herstellungsprozesse der neuen ^{18}F -basierten Radiotracer für α -L-Fucosidase (^{18}F α -Fuc) und β -Galactosidase (^{18}F β -Gal) erfolgte im Rahmen der Dissertation von Jonathan Cotton am WSIC in Tübingen. Außerdem führte Jonathan Cotton die Herstellung und Markierung aller in dieser Arbeit verwendeten neuen Tracer durch. Im Weiteren sollen die Syntheseschritte für diese beiden Tracer kurz beschrieben werden (Cotton 2017).

Die Herstellung des Tracers ^{18}F α -Fuc und ^{18}F β -Gal erfolgte mittels der Syntheseinheit TRACERlab FX N Pro (GE Healthcare). Hierfür wurde zunächst das am Zyklotron hergestellte und in ^{18}O -Wasser gelöste radioaktive ^{18}F Fluorid auf einer Ionentauscher-Kartusche (SEP-PAK QMA light, Waters) fixiert. Die Elution erfolgte mittels 90 %igem Acetonitril in einer wässrigen Lösung aus Kryptofix® 2.2.2 (K2.2.2; Merk Millipore, Darmstadt, Deutschland) und Kaliumcarbonat (K_2CO_3 ; Sigma-Aldrich). Anschließend wurde das eluierte ^{18}F Fluorid bei erhöhter Temperatur in einem Inertgasstrom (Argon) getrocknet.

Die Markierungsreaktion mit radioaktivem ^{18}F -Fluorid erfolgte an beiden Präkursormolekülen (für ^{18}F α -Fuc: α -Iodoethylfucose; für ^{18}F β -Gal: β -Nitropyridinolgalactose)

durch nukleophile Substitution. Die Markierungsreaktion für [^{18}F] α -Fuc erfolgte dabei für 10 min bei 100° C in Acetonitril und für [^{18}F] β -Gal für 5 min bei 150° C in Dimethylsulfoxid (DMSO). Die erhaltenen Reaktionslösungen wurden mittels semipräparativer HPLC auf einer LUNA-C18(2)-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) aufgereinigt. Anschließend wurden die Schutzgruppen durch alkalische Hydrolyse mit Natronlauge von beiden aufgereinigten Intermediaten entfernt. Die erhaltenen Endprodukte [^{18}F] α -Fuc oder [^{18}F] β -Gal wurden mit 0,2 M HCl neutralisiert und mittels 1 M NaHCO_3 und Wasser auf einen pH-Wert von 7,5 sowie eine isotonische Na^+ -Konzentration eingestellt. Außerdem wurden beide Tracer steril filtriert (Abbildung 19 a und b).

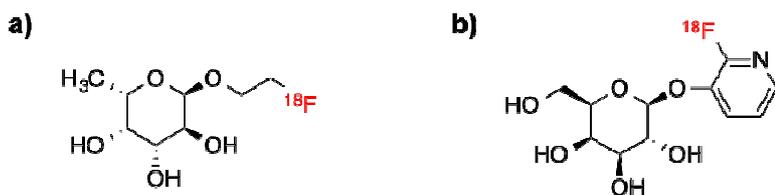


Abbildung 19: Strukturformel von [^{18}F] α -Fuc a) und [^{18}F] β -Gal b)

3.5 *In vivo* Untersuchungen von experimentellen Tiermodellen

Im folgenden Abschnitt sollen die in dieser Arbeit eingesetzten Tiermodelle beschrieben sowie der Versuchsablauf erläutert werden.

3.5.1 *Haltungsbedingungen der Versuchstiere*

Für die *in vivo* Untersuchungen in dieser Arbeit wurden BALB/c nu/nu Mäuse und RNU Ratten verwendet. Die weiblichen BALB/c nu/nu Mäuse im Alter von sieben Wochen wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) und die weibliche RNU Ratten (180-230 g) mit implantierten Tumoren von Oncodesign Biotechnologies (Dijon, Frankreich) bezogen. Anschließend wurden alle Tiere in die Tierhaltung des WSIC in Tübingen überführt. Beide Tierarten wurden unter standardisierten Haltungsbedingungen ($20 \pm 1^\circ \text{C}$ Raumtemperatur, $50 \pm 10\%$ relative Luftfeuchtigkeit und 12 h Tag-Nacht-Rhythmus) unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen in „*Individually Ventilated Cages*“ (IVC) gehalten. Dabei wurden maximal fünf Mäuse in einen „*Typ2 Long*“ Käfig und maximal vier Ratten in einen „*Typ IV*“ Käfig gesetzt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

3.5.2 *Vorbereitung der Versuchstiere für die in vivo Untersuchungen*

Alle Versuchstiere (Mäuse und Ratten) wurden nach dem gleichen Prinzip für die *in vivo* Experimente vorbereitet. Zunächst wurden die Tiere mittels Isofluran Narkose in

einer, mit einer Wärmematte (Thermolux® Wärmeunterlagen, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, Deutschland) gewärmten, Narkosebox anästhesiert. Um ein schnelles Einschlafen zu erreichen, wurde den Tieren 3,5 - 4 % Isofluran in Atemluft über einen kalibrierten Vaporizer (Vetland, Louisville, KY, USA) zugeführt. Nach Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes und damit dem Erreichen einer tiefen Narkose, wurde die Isoflurankonzentration auf 1,5 % reduziert und die Augen der Tiere mit einer Augensalbe (Corneregel, Hornhautregenerativum, Dr. Mann Pharma und Bausch und Lomb GmbH, Berlin, Deutschland) vor Austrocknung geschützt. Anschließend wurde den Tieren ein Schwanzvenenkatheter zur Verabreichung von Doxo oder zur Injektion der PET-Tracer gelegt. Für jedes Tier wurde ein neuer Katheter verwendet, welcher aus einer Injektionsspritze mit 0.9 % Natrium-Chlorid (Fresenius Kabi, Deutschland GmbH) und 2 % Medunalsan-Heparin 100 I.U./ml (Meduna Arzneimittel GmbH, Aschaffenburg, Deutschland) Injektionslösung, einem 0,28 mm Katheter-Schlauch und der abgebrochenen Spitze einer 30G Kanüle zusammengesetzt wurde. Die *i.v.* Doxo-Behandlung oder die Tracerinjektion für die statischen PET-Messungen erfolgte direkt am Injektionsplatz. Anschließend wurde den Tieren der Katheter entfernt und diese wieder zurück in den Käfig (nach Doxo-Behandlung) oder in die gewärmte Narkosebox überführt, für den Fall, dass die Anreicherung des Tracers im Schlafzustand erfolgen sollte.

Für dynamische PET-Messungen wurde der Katheter am Schwanz des Tieres fixiert und das Tier auf eine gewärmte Tierliege (Bruker) platziert. Die Tracerinjektion erfolgte fünf Sekunden nachdem die PET-Messung gestartet wurde. Nach jeder *i.v.* Injektion wurde der Katheter vor dem Entfernen mit ca. 50 µl Injektionslösung (s.o.) gespült.

3.5.3 Tiermodelle

In den folgenden Unterkapiteln werden die in dieser Arbeit verwendeten Tiermodelle beschrieben. Dabei handelt es sich um drei Seneszenz-Tiermodelle für die Etablierung neuer Seneszenz-Tracer und zwei PDX-Modelle für die longitudinale *in vivo* Charakterisierung des Kolonkarzinoms.

3.5.3.1 Seneszenz-Tiermodelle

3.5.3.1.1 Subkutanes MCF7-Xenograftmodell

Für das erste Xenograftmodell wurde eine Estrogen-sensitive, humane Brustkrebs-Zelllinie MCF7 verwendet. Um diese Tumorzellen *in vivo* zu untersuchen ist es notwendig 17β-Estradiol (72 mg) in Versuchstiere zu implantieren (Johnson, Manna et al. 2013). Für die Injektion des 17β-Estradiol Pellets (Innovative Research of America (IRA), Sarasota, Florida, USA) wurden sieben Wochen alte BALB/c nu/nu Mäuse mit 1,5 % Isofluran narkotisiert. Anschließend wurde das 17β-Estradiol-Pellet *s.c.* an der lateralen Halsseite zwischen den Schulterblättern mit einem entsprechenden Applikator (MP-182 10 „Gauge Precision Trochar“; IRA) eingesetzt (Abbildung 20). Drei Tage später wurden $1,5 \cdot 10^6$ MCF7-Zellen in 100 µl PBS *s.c.* in die rechte Flanke der Tiere inji-

ziert. Das Tumorstadium wurde mit einer Schieblehre regelmäßig überprüft und das Tumorstadium wurde berechnet:

$$\text{Volumen} = (\text{Länge} \cdot \text{Breite}^2) / 2 \quad (1)$$

22 Tage nach der MCF7 Zellinjektion wurden die Versuchstiere nach ihrer Tumorstadiumgröße randomisiert und in zwei Gruppen (Kontrolle und Doxo) aufgeteilt. Dabei repräsentieren die Tiere aus der Kontrollgruppe die nicht seneszenten und die Tiere aus der Doxo-Gruppe die seneszenten Tumore. Am selben Tag erfolgte eine *i.v.* Applikation von 75 µl PBS in Kontroll-Tiere oder 10 mg/kg Doxo in die Gruppe der seneszenten Tiere. An Tag 4 nach Behandlung der Tiere, wurden beide Gruppen mittels [¹⁸F]FDG-PET/MRT gemessen, an Tag 5 folgte eine [¹⁸F]FLT-PET/MRT-Messung (Abbildung 20). Nach Abschluss der PET/MRT-Messungen an Tag 5 wurden alle Versuchstiere unter tiefer Narkose getötet und die Tumore für einen SA-β-Gal-Assay präpariert (siehe Abschnitt 3.6.1).

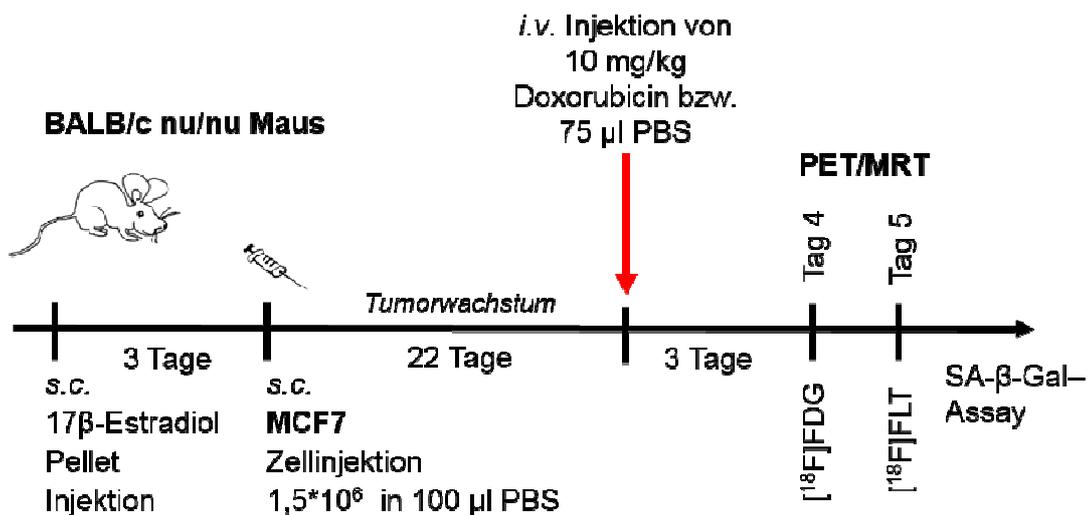


Abbildung 20: Versuchsübersicht für das *in vivo* MCF7-Xenograftmodell

Die Versuchsdurchführung für das subkutane MCF7-Xenograftmodell ist hier schematisch dargestellt.

3.5.3.1.2 Subkutanes HCT116-Xenograftmodell

Für das zweite Xenograftmodell wurden die humanen Kolonkarzinomzellen HCT116 in dieser Arbeit verwendet. Zur Induktion der HCT116-Tumoren wurden sieben Wochen alten BALB/c nu/nu Mäusen 10⁶ HCT116-Zellen in 100 µl PBS s.c. in die rechte Flanke injiziert. Das Tumorstadium wurde mit einer Schieblehre regelmäßig überprüft und das Tumorstadium ebenfalls nach Formel 1 berechnet. Zwei Wochen nach Zellinjektion wurden die Tiere der Tumorstadiumgröße nach randomisiert und in zwei Gruppen (Kontrolle

und Doxo) aufgeteilt. Dabei repräsentieren die Tiere aus der Kontrollgruppe die nicht seneszenten und die Tiere aus der Doxogruppe die seneszenten Tumoren. Am gleichen Tag erfolgte die *i.v.* Applikation von 75 μ l PBS oder 10 mg/kg Doxo in die entsprechenden Versuchsgruppen. PET/MRT-Messungen wurden an drei aufeinander folgenden Tagen, beginnend an Tag 4 nach Behandlung, durchgeführt. [18 F]FDG an Tag 4, [18 F]FLT an Tag 5 und ein neu entwickelter PET-Tracer zur Detektion der Seneszenz wurde an Tag 6 mittels PET/MRT gemessen. Anschließend wurden alle Versuchstiere unter tiefer Narkose getötet und die Tumoren für Autoradiographie, H&E-Färbung und SA- β -Gal-Assay präpariert (Abbildung 21).

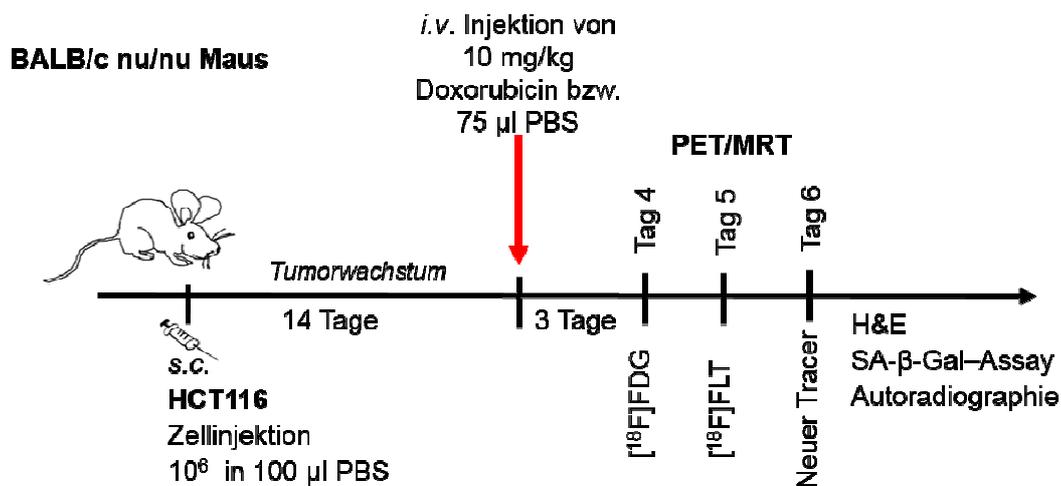


Abbildung 21: Versuchsübersicht für das *in vivo* HCT116-Xenograftmodell

Die Versuchsdurchführung für das subkutane HCT116-Xenograftmodell ist hier schematisch dargestellt.

3.5.3.1.3 Subkutanes Hras-Allograftmodell

Für die *in vivo* Induktion der Hras-Zellen wurden sieben Wochen alte BALB/c nu/nu-Mäuse vier Tage vor der Tumorzellen Injektion mit Pulmodox (Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Deutschland) über das Trinkwasser (0,2 mg/ml Doxy) vorbehandelt. Anschließend wurden den Tieren $1,5 \cdot 10^6$ GEPIRshp53pWZLHras-Zellen in 100 μ l PBS s.c. in die rechte Flanke injiziert. Für ein optimales Tumorwachstum wurde das Doxy-haltige Trinkwasser alle drei Tage ausgetauscht. Die Tumorentwicklung wurde mit einer Schieblehre regelmäßig überprüft und das Tumolvolumen mit der bereits oben angegebenen Formel 1 berechnet.

Die transgene Hras-Zelllinie exprimiert durch die Doxy-Behandlung das Protein-GFP. Eine Untersuchung der GFP-Expression in den Tumoren stellte eine Kontrolle für erfolgreiche Doxy-Behandlung und erfolgte zwei Wochen nach Zellinjektion mit Hilfe des

OI „IVIS Spectrum“. Danach wurden die Versuchstiere randomisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Während die Kontrolltiere weiterhin Doxy als Zusatz im Trinkwasser erhielten, erfolgte in der zweiten Gruppe die Umstellung auf Trinkwasser ohne Zusätze, um dadurch eine Seneszenz in den Tumoren zu induzieren. Nach weiteren zwei Wochen des Tumorwachstums wurden an drei aufeinander folgenden Tagen PET/MRT-Messungen mit Hilfe der Tracer $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ und einem neu entwickelten PET-Tracer für die Seneszenz-Detektion sowie eine zusätzlich OI-Messung durchgeführt. Direkt im Anschluss an den letzten Scan wurden alle Versuchstiere unter beibehalten der Narkose getötet und die Tumoren für Autoradiographie, H&E-Färbung und den SA- β -Gal-Assay präpariert (Abbildung 22).

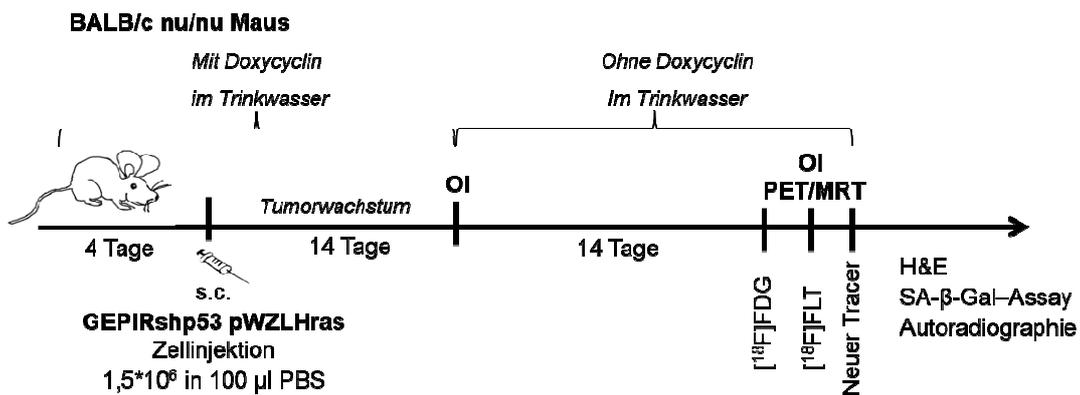


Abbildung 22: Versuchsübersicht für Hras-Allograftmodell

Die Versuchsdurchführung für das subkutane Hras-Allograftmodell wurde hier schematisch dargestellt.

3.5.3.2 PDX CR-LRB-018P-Modelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das kolorektale Karzinom CR-LRB-018P des Unternehmens Oncodesign für longitudinale PET/MRT-Untersuchungen verwendet. Weibliche RNU-Ratten mit subkutanen (PDSX) oder orthotopen (PDOX) CR-LRB-018P-Tumoren wurden eine Woche nach Tumortransplantation durch Oncodesign verschickt. Anschließend wurden beide Modelle, PDSX und PDOX, des kolorektalen Karzinoms CR-LRB-018P in dieser Arbeit untersucht.

Während des gesamten Projekts wurden zwei Lieferungen des Unternehmens mit einer Gesamtanzahl von 11 Versuchstieren mit subkutanen und 9 Versuchstiere mit orthotopen Tumoren zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht für die zwei entsprechenden Versuchsreihen ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht der Ratten-Versuchsreihen

	PDSX-Modell	PDOX-Modell
1. Versuchsreihe	5	3
2. Versuchsreihe	6	6
Gesamtanzahl	11	9

3.5.3.2.1 Tumortransplantation

Alle nachfolgenden Schritte: die Gewinnung des Tumorfragments sowie die Implantation in die Versuchstiere, wurden vom Unternehmen Oncodesign durchgeführt (Julien, Merino-Trigo et al. 2012). Zur Etablierung des Modells wurde das Fragment-CR-LRB-018P (50 mm³) eines kolorektalen Karzinoms einer Patientin schnellstmöglich (2-24 h) nach der Entnahme subkutan in zwei Swiss *nude*-Mäuse implantiert. Bei einem Tumolvolumen von 700-800 mm³ wurde das entnommene Material auf 3 bis 5 weitere Mäuse verteilt. Nach mindestens drei erfolgreichen Amplifikationen in Mäusen wurden die Tumorfragmente in RNU Ratten transplantiert bzw. in flüssigem Stickstoff (N₂) gelagert. Für die Versuche in dieser Arbeit wurde allen Versuchsratten die gleiche CR-LRB-018P-Tumor-Passage (P7) subkutan (PDSX) oder orthotop (PDOX) von der Firma Oncodesign implantiert (Siehe Abbildung 23).

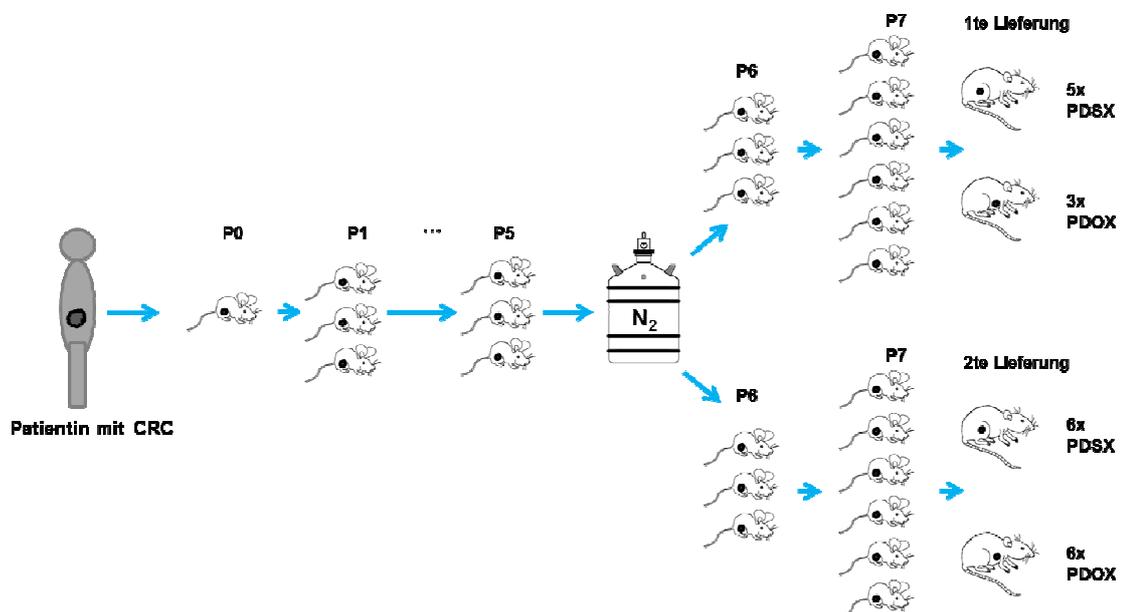


Abbildung 23: Schematische Darstellung der schrittweisen Erstellung des PDX-Modells

Alle Versuchsratten wurden 24 h vor der Tumortransplantation mit 5 Gy (BioMep, Brenneries, Frankreich) bestrahlt. Für das PDSX-Modell wurde das Tumorfür CR-LRB-018P (50 mg) aus P7 unter Isofluran-Narkose s.c. in die rechte Flanke implantiert.

Für die orthotope Implantation des PDOX-Modells wurde allen Tieren 30 min vor dem Eingriff das Analgetikum Flunixin (5 mg/kg) intraperitoneal (*i.p.*) verabreicht. Unter sterilen Bedingungen wurde das Abdomen, der mittels Xylazine/Tiletamine narkotisierten Ratten, geöffnet und der Blinddarm freigelegt. Das Tumorfragment (20 mg) wurde mit sechs Stichen am Blinddarm angenäht und das Abdomen in zwei Schichten mit jeweils vier Stichen wieder verschlossen. Anschließend bekamen alle operierten Ratten das schmerzlindernde Medikament Carprofen verabreicht.

3.5.3.2.2 Versuchsaufbau

Zwei Tage nach Eintreffen der Versuchstiere im WSIC Tübingen wurden die ersten PET- und MRT-Messungen durchgeführt. Die Tumorentwicklung wurde in einem Zeitraum von 30 Wochen überwacht. Insgesamt wurden vier verschiedene Tracer ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$, $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{RGD}$) verwendet. Um die Belastung für die Versuchstiere aus Gründen des Tierschutzes zu reduzieren, konnten nicht alle Tiere zu allen Zeiten mit allen Tracern gemessen werden. Eine Übersicht der PET- und MRT-Messungen für die verwendeten Tracer zu den verschiedenen Zeitpunkten der einzelnen Versuchsreihen ist in Abbildung 24 dargestellt.

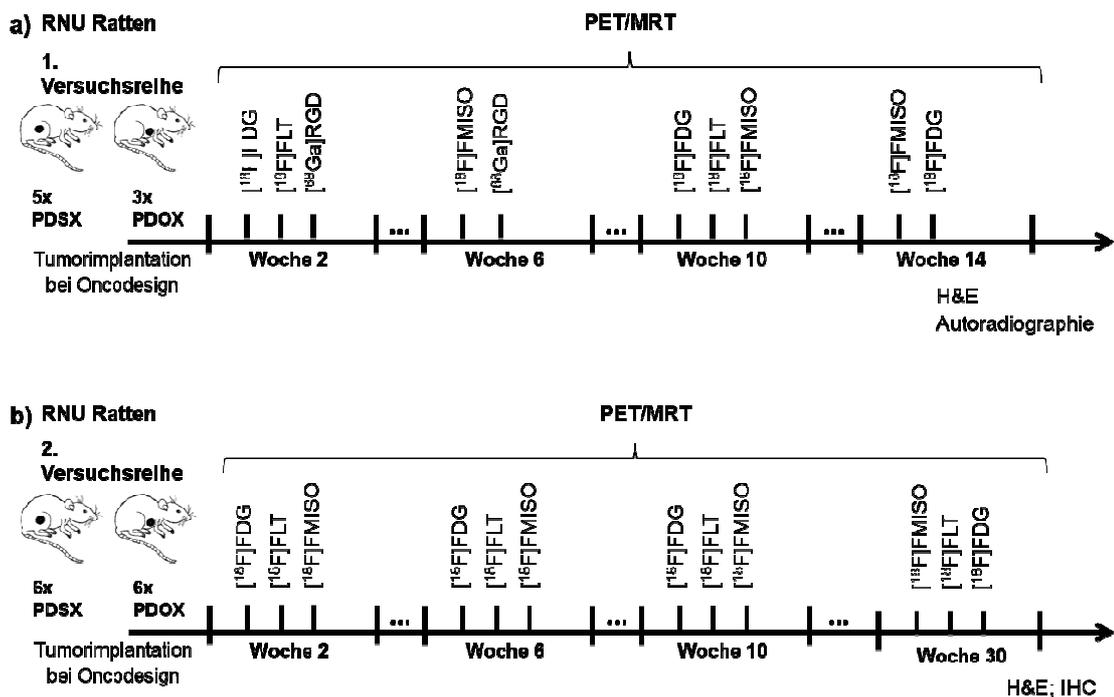


Abbildung 24: Übersicht über die longitudinalen PET- und MRT-Messungen

Eine Übersicht über die PET- und MRT-Messungen von Tieren aus der ersten a) und der zweiten b) Lieferung mit den verschiedenen Tracern ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$, $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ und $[^{68}\text{Ga}]\text{RGD}$) zu den verschiedenen Zeitpunkten ist dargestellt.

Dabei wurde jeweils ein Tier zu drei verschiedenen Zeitpunkten mit maximal drei verschiedenen PET-Tracern gemessen. Eine genaue Scanübersicht für die einzelnen Tiere sowie die Gruppenzusammensetzung für die einzelnen Messzeitpunkte pro Tracer wurde in Tabelle 7 zusammengefasst. Durch das Zusammenführen der Daten aus den beiden Versuchsreihen konnten insgesamt bis zu fünf Zeitpunkte (W2, W6, W10, W14 und W30) pro Tracer generiert werden. Tabelle 7 veranschaulicht die Zusammensetzung der einzelnen Gruppen und gibt die Gesamtzahl der Tiere pro gemessenem Zeitpunkt und jeweiligen Tracer an.

Tabelle 7: Individuelle Scanübersicht für PDOX- und PDSX-Tumor-tragende Tiere

Folgende Abkürzungen wurden in der unteren Tabelle verwendet: para inj. = para injiziert; überstr. = Überstrahlung des Tumors durch die Urinblase.

PDOX Tier Nr.	¹⁸ F]FDG					¹⁸ F]FLT				¹⁸ F]FMISO					⁶⁸ Ga]RGD	
	w2	w6	w10	w14	w30	w2	w6	w10	w30	w2	w6	w10	w14	w30	w2	w6
1/1	x		x	x		x		x			x	überstr.	überstr.		x	überstr.
2/1	x		x	x		x		x			x	x	überstr.		x	x
3/1	para. inj.		x	x		x		para. inj.			x	x	x		x	
1/2	x	x	x			x	x	x		überstr.	x	x				
2/2	x	x	x			x	para. inj.			überstr.	x	überstr.				
3/2	x	x	x			x	x			überstr.	x	überstr.				
4/2	x		x		x	x		x	x	x		x		x		
5/2	x		x		x	x		x	x	x		x		x		
6/2	para. inj.	x	x			x		x		x	x					
Tierzahl	n=7	n=4	n=9	n=3	n=2	n=9	n=3	n=5	n=2	n=3	n=7	n=5	n=1	n=2	n=3	n=1

PDSX Tier Nr.	¹⁸ F]FDG					¹⁸ F]FLT				¹⁸ F]FMISO					⁶⁸ Ga]RGD	
	w2	w6	w10	w14	w30	w2	w6	w10	w30	w2	w6	w10	w14	w30	w2	w6
1/1	x		x			x					x				x	x
2/1	x		x	x		x		x			x	x	para. inj.			
3/1	x		x	x		x		x			x	x	x			
4/1	x		x	x		x		x			x	x	x			
5/1	x		x	x		x		x			x	x	x		x	x
1/2	x	x	x			x	x	para. inj.		x	x	x				
2/2	x	x				para. inj.	x			para. inj.	x					
3/2	x	x				x	x			x	x					
4/2	x	para. inj.				x	x			x	x					
5/2	x	x				x	x			x	x					
6/2	para. inj.	x	x		x	para. inj.	x	x	x		x	x		x		
Tierzahl	n=10	n=6	n=7	n=4	n=1	n=9	n=6	n=5	n=1	n=4	n=11	n=8	n=3	n=1	n=2	n=2

3.6 Ex vivo Untersuchungen

3.6.1 Tötung der Tiere und Gewebeentnahme für ex vivo Versuche

Die Tötung aller Versuchstiere erfolgte unter tiefer Narkose durch zervikale Dislokation nach Abschluss der letzten PET- und MRT-Messung. Für die Entnahme des s.c. Tumors aus den Mäusen und Ratten wurde das tote Tier in Rückenlage fixiert, die Haut wurde mit einer Schere ventral mittig von den Genitalien bis zum Schlüsselbein aufgeschnitten und an den Seiten fixiert. Der Tumor wurde somit freigelegt und konnte mit einem Skalpell und mit Hilfe einer Pinzette herauspräpariert werden. Für die Muskelentnahme wurde die Haut der Tiere an einem der Hinterbeine aufgeschnitten und ein Teil des Oberschenkelmuskels entfernt.

Für die Präparation der orthotopen Tumoren aus Ratten wurde das getötete Tier in Rückenlage fixiert, die Haut am Abdomen mit einer Schere geöffnet, separiert und seitlich mit Kanülen fixiert. Das Peritoneum wurde entlang der alten Operationsnaht vorsichtig geöffnet und der am Blinddarm sitzender Tumor freigelegt und anschließend entfernt (Abbildung 25).

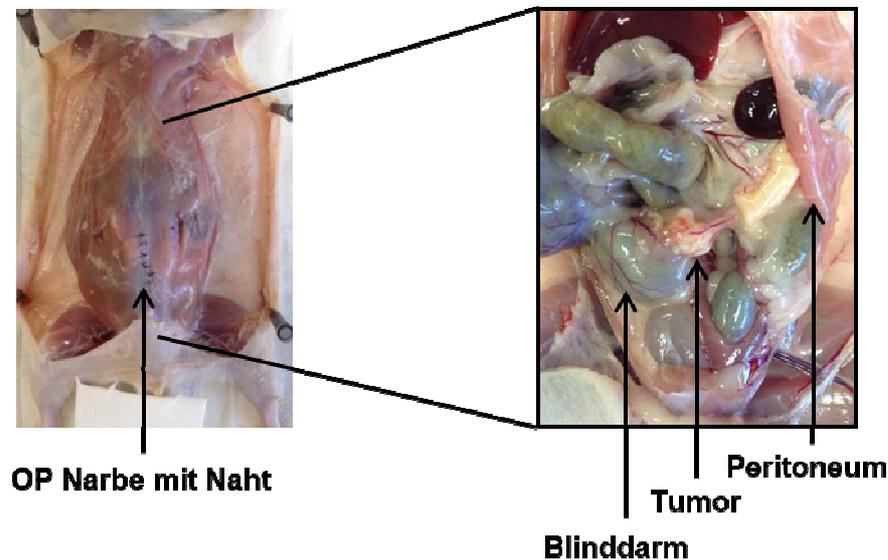


Abbildung 25: Gewebepräparation aus einer Ratte

Präparation von orthotopen Tumoren am Beispiel eines Tieres.

3.6.2 Vorbereitung von Kryogewebe für *ex vivo* Untersuchungen

Tumor und Muskelgewebe wurden im Anschluss an die letzte PET/MRT-Messung nach Tötung und Präparation der Mäuse und Ratten möglichst schnell isoliert und sofort in O.C.T. TissueTec (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) mithilfe von Solidofix®-Kältespray (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingefroren. Anschließend wurden 20 µm dicke Schnitte von den Organen am Kryotom (CM1850; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) vorbereitet. Drei aufeinander folgende Gewebeschnitte wurden auf drei separate Objektträger (SuperFrost® Plus Objektträger, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgenommen und zehn weitere wurden verworfen. Auf diese Weise konnten aufeinander folgende Schnitte für verschiedene *ex vivo* Experimente verwendet werden. Die Gewebeschnitte von Ratten wurden sofort für die Autoradiographie verwendet. Das geschnittene Gewebe von Mäusen wurde ebenso für die Autoradiographie eingesetzt und zusätzlich für die spätere SA-β-Gal-Aktivitäts-Analyse bei -80° C für wenige Tage (max. sieben) gelagert.

3.6.3 *Ex vivo* SA- β -Gal-Assay auf Tumorkryoschnitten

Die *ex vivo* Detektion der SA- β -Gal-Aktivität in den entnommenen Tumoren der Mäuse erfolgte auf 20 μ m dicken Kryoschnitten, die bei -80° C gelagert wurden (Debacq-Chainiaux, Erusalimsky et al. 2009). Es wurde jeweils ein Objektträger aus jeder Schnittebene entnommen. Zuerst wurde das Gewebe mit 0,5 % Glutaraldehyd (in PBS, pH 7,4) für 15 min bei RT fixiert und dann 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend folgte eine zweimal fünfminütige Inkubation in 1 mM $MgCl_2$ /PBS-Puffer (pH 5,5). Danach wurde das Gewebe mit frischer X-Gal-Lösung (siehe 3.2.1) bei 37° C in einem Wärmeschrank (MaxQ6000; Thermo Fischer Scientific) im Dunkeln für wenige Stunden inkubiert. Um eine unspezifische oder zu starke Hintergrundfärbung auf Grund zu langer Inkubationszeiten zu vermeiden, wurde die Farbentwicklung stündlich kontrolliert. Das gefärbte Gewebe wurde anschließend zweimal 5 min mit PBS gewaschen und mit 4 % Formalin 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Objektträger mit Hilfe eines Slide-Scanners (Nano-Zoomer-XR C12000, Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu-City, Japan) digitalisiert.

3.6.4 Autoradiographie

Diese Methode wurde sowohl bei den Seneszenz-Tiermodellen als auch bei den PDX-Modellen aus der ersten Versuchsreihe (Abbildung 24) eingesetzt. Jeweils ein Objektträger aus jeder Schnittebene wurde auf einem Phosphorschirm (Molekular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) für 10 Halbwertszeiten des entsprechenden Isotops inkubiert. Danach wurde der Phosphorschirm mit einem Phosphorimager Storm 840 (Molecular Dynamics) mit einer Auflösung von 50 μ m ausgelesen und die Daten mit der Open Source Software Image J (National Institut of Health, Bethesda, MD, USA) ausgewertet. Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden anschließend in einem Histologie Routinelabor der Hautklinik Tübingen mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt.

3.6.5 Histologie

Die PDX-Tumoren der Ratten aus der zweiten Versuchsreihe (Abbildung 24) und ein paar exemplarischer Tumoren der Seneszenz-Tiermodelle wurden für die Paraffinschnitte vorbereitet.

Im Falle der großen PDSX- und PDOX-Tumoren wurden diese für 24 h in 4 % Formalinlösung (Carl Roth) fixiert, dann in kleinere Fragmente geschnitten und für weitere 24 h fixiert (Abbildung 26). Kleinere Tumoren konnten am Stück 48 h in 4 % Formalinlösung fixiert werden. Anschließend erfolgten die Entwässerung und die Einbettung in Paraffin von allen Tumoren. Davon wurden dann 5 μ m dicke Schnitte angefertigt, welche sowohl mit H&E als auch IHC gefärbt wurden.

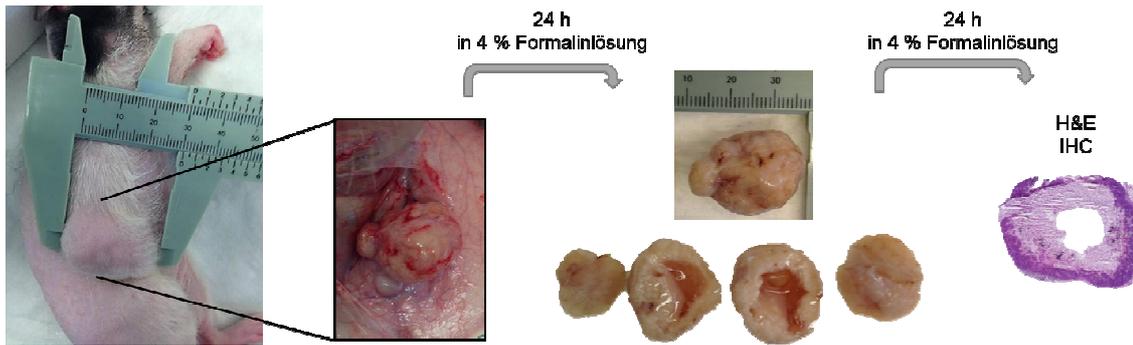


Abbildung 26: Aufbereitung von PDSX Tumoren

Nach 24 h Inkubationszeit in 4 % Formalinlösung wurden alle Tumoren mit einer Größe über 1 cm in ca. 0,5 cm große Fragmente geschnitten und weitere 24 h fixiert bevor Immunhistochemische-Färbungen oder H&E erfolgten.

3.6.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die 20 µm dicken Kryoschnitte, die zuvor autoradiographisch untersucht worden sind, wurden mit Hilfe entsprechend standardisierter Protokolle im Histologie Routinelabor der Hautklinik Tübingen mit H&E gefärbt. Diese Methode wurde bei Seneszenz-Tumormodellen der Mäuse und bei der ersten Versuchsreihe von PDX-Tiermodellen (Abbildung 24) eingesetzt.

Die H&E-Färbung an 5 µm dicken Paraffinschnitten von PDSX und PDOX Tumoren aus der zweiten Versuchsreihe sowie von exemplarischen Tumoren der Seneszenz-Tiermodellen wurde in der Pathologie der Universität Tübingen nach einem etablierten Protokoll durchgeführt.

3.6.5.2 Immunhistochemische-Färbungen

Für die Charakterisierung von Tumoren der Seneszenz-Tiermodelle wurden IHC-Färbungen von Fuca1, p16, p53, Ki67, Caspase3, Glut1 und TK1 durchgeführt. Die Tumoren aus der zweiten Versuchsreihe der PDX-Tiermodelle wurden mit Glut1 und Ki67 immunhistochemisch untersucht.

Alle hier gezeigten IHC-Färbungen wurden von den Mitarbeitern des Instituts der Pathologie der Universität Tübingen durchgeführt und interpretiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Antikörper für die ICH-Färbungen

Antikörper	Spezifität	Unternehmen
FUCA1 (H-87)	Human, Maus, Ratte	Santa Cruz Biotechnology
p16 (F-12)	Human, Maus, Ratte	Santa Cruz Biotechnology
p53	Human, Maus, Ratte	BD Pharmingen
Ki67	Human, Maus, Ratte	DCN Innovative Diagnostic Systeme, Hamburg, DE
<i>cleaved</i> Caspase3	Human, Maus, Ratte	Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, DE
Glut1	Human, Maus, Ratte	Abcam, Cambridge, UK
TK1	Human, Maus, Ratte	Abcam, Cambridge, UK

3.7 Datenanalyse

3.7.1 Die Analyse von PET- und MRT-Datensätzen

Alle PET-Datensätze wurden mittels OSEM3D ohne MAP-Iterationen unter Verwendung der Inveon Acquisition Workplace Software (IAW, Siemens Preclinical Solution) rekonstruiert. Für die Auswertung der *in vivo* PET- und MRT-Daten wurde die Inveon Research Workplace Software (IRW, Siemens Preclinical Solution) verwendet. Zuerst wurden der PET- und der zugehörige MRT-Datensatz eingeladen und manuell überlagert. Anhand der anatomischen Information aus den MRT-Daten wurde der gesamte Tumor eingezeichnet (VOI, engl. „*volume of interest*“). Die jeweilige VOI gibt Information über das Tumolvolumen aus den MRT-Daten und über die mittlere bzw. maximale Aktivität [Bq/ml] im Zielgewebe aus den PET-Daten. Außerdem wurde zusätzlich eine VOI in das Muskelgewebe des jeweiligen Tieres (ca. 50 mm³ bei den Ratten und ca. 20 mm³ bei den Mäusen) als Kontrollregion eingezeichnet.

Für die Auswertung wurde ein prozentualer Anreicherungs-Wert (% injizierte Dosis pro cm³ (%ID/cc)) im Gewebe berechnet. Dabei wurde die %ID/cc aus dem Mittelwert bzw. Maximalwert der Aktivität im Zielgewebe und der tatsächlichen, zerfallskorrigierten injizierten Aktivität errechnet.

Für die Analyse der dynamischen PET-Daten wurde die %ID/cc gegen die Zeit [min] in einem Diagramm als Zeit-Aktivitätskurve (TAC, engl. „*time activity curve*“) aufgetragen. Dies ermöglicht eine Evaluation der Anreicherung und somit der Pharmakokinetik des jeweiligen PET-Tracers im jeweiligen Zielgewebe über die Zeit.

Die PET-Daten der verschiedenen Gruppen und Tracer (in %ID/cc) wurden untereinander und über die Zeit verglichen. Im Falle der dynamischen PET-Messungen wurden die letzten 10 min des jeweiligen PET-Scans in die Auswertung zur Ermittlung der mittleren %ID/cc einbezogen.

Die Auswertung der ADC-Werte erfolgte ebenfalls durch das Einzeichnen eines VOI im Tumorgewebe. Hierfür wurden die MRT-Daten der Anatomie und die DW-MRI-Daten in die IRW-Software eingeladen. Die ADC-Werte [$\cdot 10^{-6}$ mm²/s] der verschiedenen Gruppen wurden untereinander und über die Zeit verglichen.

3.7.2 Die Voxel-basierte-Analyse von [¹⁸F]FDG-PET-Daten

Für eine genaue Analyse der statischen [¹⁸F]FDG-PET-Daten aus den PDX-Modellen wurde eine Voxel-basierte-Analyse angewandt. Dieses wurde von den Mitarbeitern des WSIC, Dr. Jennifer Schmitz, Dr. Andreas Schmid und Julian Schwab, entwickelt und in Form einer Software implementiert (Schmitz, Schwab et al. 2016). Dabei wurde das Grundprinzip der Gauß-Verteilung (GMM, engl. „*gaussian mixture model*“) eingesetzt. Zunächst wurde die [¹⁸F]FDG-Tumor-Traceranreicherung aller PDSX- und PDOX-Tiere zum jeweilig gemessenen Zeitpunkt für jedes einzelne Tumor-Voxel in %ID/cc aus der IRW Software einzeln aufgearbeitet. Die Werte aller Voxel, die sich in der Tumor-VOI jedes einzelnen Tieres befanden, wurden unter Verwendung des Programms MatLab (Version: R2010b, MathWorks, Natick, MA, USA) histogrammiert (Abbildung 28 linke Seite). Anschließend wurden die Histogramme von allen Tieren und Zeitpunkten aufsummiert und ein Gesamthistogramm errechnet (Abbildung 27 Mitte).

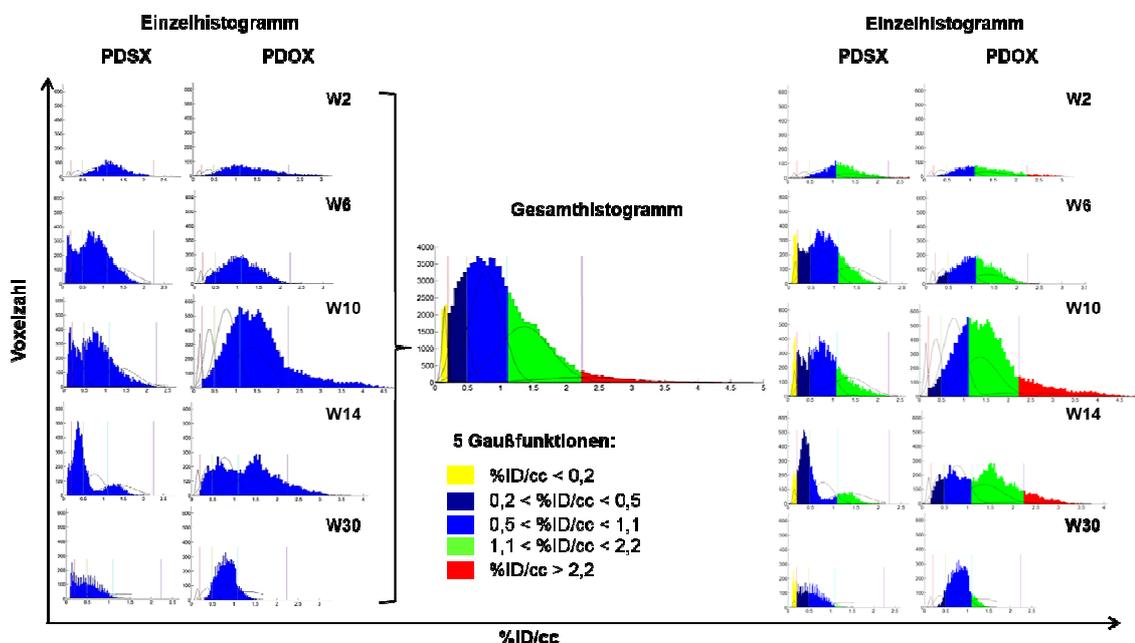


Abbildung 27: Voxel-basierte-Analyse von [¹⁸F]FDG-PET-Daten

Die Voxel-basierte-Analyse der [¹⁸F]FDG-PET-Daten für die PDSX- und PDOX-Modelle ist hier dargestellt. Links im Bild sind Einzelhistogramme (Voxelzahl gegen %ID/cc der [¹⁸F]FDG-

Anreicherung) von exemplarischen Tumoren zu verschiedenen Zeitpunkten (Woche 2 (W2) bis W30) dargestellt. In der Bildmitte ist das Gesamthistogramm aus dem GMM-Fit der Voxel-Summe aller Tumoren zu allen Zeitpunkten, überlagert mit dem Fit der Summe aus fünf Gaußfunktionen abgebildet. Die Einzelhistogramme der PDSX- und PDOX-Tumoren mit fünf verschiedenen Voxel-Populationen sind rechts im Bild gezeigt.

Für die Analyse der Populationen wurde die Gesamtverteilung mit Hilfe des GMM in MatLab gefittet (McLachlan und Peel 2004). Dabei wurde das Gesamthistogramm mit bis zu maximal sieben aufsummierten Gaußfunktionen gefittet. Die Informationskriterien nach Akaike (AIC, engl. „*akaike information criterion*“) und Bayesian (BIC, engl. „*bayesian information criterion*“) wurden zum Beurteilen der gefitteten Gaußfunktionen verwendet. Die Anzahl von fünf Gaußfunktionen wurde anhand des minimalen AIC und BIC Wertes als bester GMM-Fit bestimmt (Abbildung 28, siehe Pfeile).

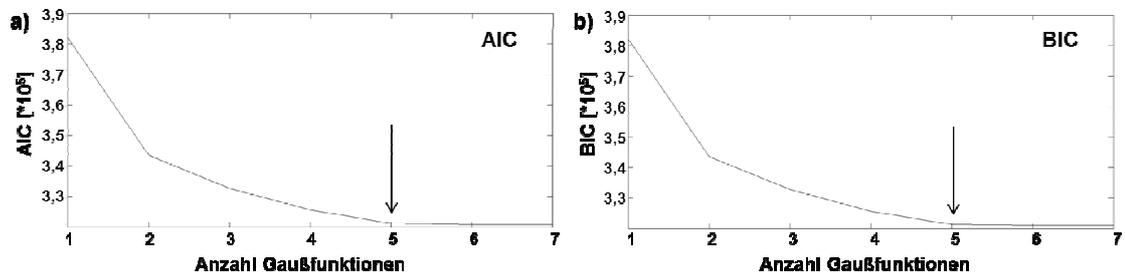


Abbildung 28: AIC und BIC Kriterien

Die Diagramme zur Ermittlung der AIC **a)** und BIC **b)** Kriterien für den besten GMM-Fit sind hier dargestellt und zeigen, dass die Summe aus fünf Gaußfunktionen das beste Ergebnis ergab (siehe Pfeile).

Im erstellten Gesamthistogramm mit fünf Gaußkurven wurden die Schnittstellen (Wert in %ID/cc) der einzelnen Glockenkurven als Schwellenwerte zur Trennung der einzelnen Voxel-Populationen verwendet (Abbildung 27 Mitte). Es wurden fünf verschiedene Populationen mit unterschiedlicher [^{18}F]FDG-Anreicherung definiert. Dabei wurde jeder Population eine bestimmte Farbe zugewiesen (siehe Tabelle 9). Unter Verwendung dieser Populations-Daten wurden für jedes Tier parametrische Karten errechnet und diese später zusammen mit der H&E-Histologie analysiert.

Tabelle 9: Die Aufteilung der Voxel-Populationen nach der GMM-Verteilung

Farbe	Voxel-Bereich [%ID/cc]	[¹⁸ F]FDG-Anreicherung
	$\%ID/cc < 0,2$	keine [¹⁸ F]FDG-Anreicherung
	$0,2 < \%ID/cc < 0,5$	sehr schwache [¹⁸ F]FDG-Anreicherung
	$0,5 < \%ID/cc < 1,1$	schwache [¹⁸ F]FDG-Anreicherung
	$1,1 < \%ID/cc < 2,2$	hohe [¹⁸ F]FDG-Anreicherung
	$\%ID/cc > 2,2$	sehr hohe [¹⁸ F]FDG-Anreicherung

3.7.3 Die Analyse der Autoradiographie

Die Analyse der Autoradiographie wurde mit Hilfe des Programmes Image J durchgeführt. Zunächst wurden mehrere ROIs, im Hintergrund an unterschiedlichen Stellen der Platte eingezeichnet. Aus den einzelnen Intensitätswerten dieser ROIs wurde dann ein Mittelwert errechnet und von der gesamten Platte abgezogen. Damit konnte das Hintergrundsignal korrigiert werden. Anschließend wurden die Daten auf die injizierte Aktivität in MBq des Tieres normalisiert. Dazu wurde die Platte durch die in diesem Tier injizierte Dosis in MBq dividiert. Somit wurde eine semi-quantitative Darstellung der Autoradiographie-Ergebnisse der Tumoren erreicht.

3.7.4 Semi-quantitative Analyse von H&E-Schnitten der PDX-Modellen

Um das Ausmaß der nekrotischen-Areale in PDSX- und PDOX-Tumoren anhand von H&E-Schnitten (5 µm Parafin- und 20 µm Kryo-Schnitten) mikroskopischen einzuschätzen, wurde eine semi-quantitative Analyse durchgeführt. Hierfür wurden alle Tumorschnitte mit Hilfe eines Slide-Scanner (Hamamatsu Photonics K.K.) digitalisiert. Nach Absprache mit Prof. Dr. Quintanilla-Fend und Dr. Kohlhofer aus der Pathologie der Universität Tübingen wurden Kernreiche-Bereiche (mittels Hämatoxylin lila gefärbt) als vitale und Kernarme-Bereiche (leicht lila gefärbt) als abgestorbenes nekrotisches Gewebe angesehen. Die Analyse der Tumorschnitte erfolgte mit der Software NDP.view 1.2.41. (Hamamatsu) indem für jeden Tumor eine ROI über das komplette Tumoreal per Hand eingezeichnet wurde. Weitere ROIs wurden entweder um das vitale Gewebe (Abbildung 29 a) oder um die nekrotischen Regionen (Abbildung 29 b) ebenso per Hand eingezeichnet. Aus der Fläche [mm²] der ROIs wurde dann das prozentuale Verhältnis der nekrotischen Regionen zur Gesamtfläche des Schnittes berechnet.

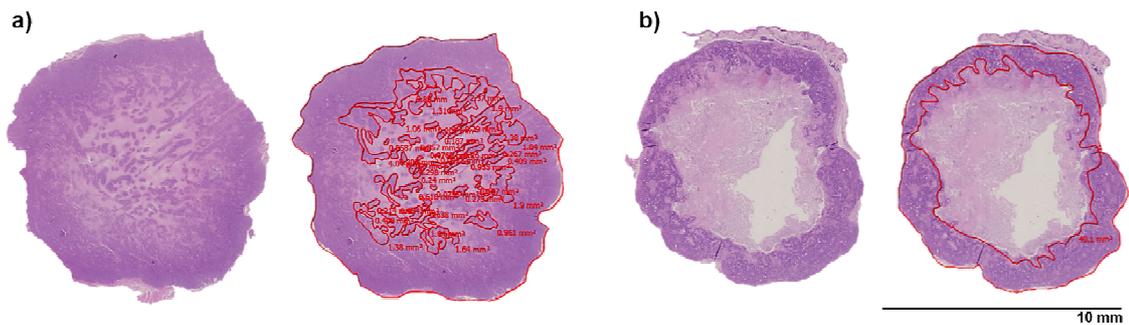


Abbildung 29: Semi-quantitative Analyse von H&E-Tumorschnitten

Für die Ermittlung der nekrotischen Tumorbereiche wurde zunächst eine ROI um das komplette Tumorareal per Hand eingezeichnet (NDP.view 1.2.41). Als nächstes wurden weitere ROIs um die intakte, blau gefärbte **a)** oder um die nekrotische, leicht rosa gefärbte Tumorbereiche **b)** eingezeichnet.

3.7.5 Statistische Analysen

Die Ergebnisse der *in vivo* PET-Daten, die Analysen der *in vitro* Experimente sowie die Tumolvolumenänderung bei PDSX- und PDOX-tragenden Tieren wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD, engl. „*standard deviation*“) dargestellt. Diese Werte wurden einer statistischen Analyse mittels eines Zweistichproben-t-Testes von jeweils zwei unabhängigen Stichproben unterzogen. Hierfür wurde ein Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Außerdem wurden die Ergebnisse der DW-MRT-Datenanalyse über einen Zeitraum von 30 Wochen als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM, engl. „*standard error of the mean*“) dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms JMP® (SAS Institute, Cary, USA) durchgeführt.

Um den Zusammenhang zwischen den ADC-Werten und den Tumolvolumen in den PDSX- und PDOX-Tumoren zu beschreiben, wurde eine Pearson-Korrelations-Analyse durchgeführt. Dabei wird der Zusammenhang zwischen zwei Variablen unter Verwendung des Pearson-Korrelationskoeffizienten (R) beschrieben. Es gilt: je höher der R-Wert desto größer die Korrelation.

Die genannten statistischen Analysen wurden in Absprache mit dem Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie in Tübingen angewendet.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Untersuchungen zur Seneszenz-Induktion in Zellkultur

4.1.1 Seneszenz-Induktion in drei humanen Zelllinien

Die Literaturrecherche zeigte, dass in den humanen HCT116-, HCT116PTTG^{-/-}- und MCF7-Tumorzelllinien eine Seneszenz mittels des Chemotherapeutikums Doxorubicin *in vitro* induziert werden kann (Chang, Swift et al. 2002, Elmore, Rehder et al. 2002, Tong, Zhao et al. 2011). Aufgrund dessen wurden die genannten Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

Zunächst wurden für die humanen HCT116-, HCT116PTTG^{-/-}- und MCF7-Tumorzelllinien untersucht, ob Seneszenz mittels Doxo *in vitro* im Einklang mit der Literatur im WSIC induziert werden kann. Hierfür wurden alle drei genannten Zelllinien mit drei unterschiedlichen Doxo-Konzentrationen behandelt und drei Tage später mikroskopisch mittels eines SA- β -Gal-Assays evaluiert.

In Abbildung 30 sind alle Versuchsergebnisse in einer Übersicht dargestellt. Eine blaue Färbung der Zellen wurde als Zeichen einer induzierten Seneszenz gewertet. Alle Zellen, die nicht behandelt wurden, wiesen im SA- β -Gal-Assay ein negatives Ergebnis ohne Zellverfärbung auf und wurden in allen folgenden Versuchen als entsprechende Kontrollzellen ohne Seneszenz-Entwicklung angesehen.

Nach einer Doxo-Behandlung mit 250 nM zeigten die drei getesteten Zelllinien jeweils eine veränderte Zellmorphologie. Die behandelten Zellen zeigten sich deutlich größer und flacher im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Der durchgeführte SA- β -Gal-Assay zeigte eine positive blaue Färbung von mehreren Zellen (Abbildung 30, dritte Spalte).

Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen bei einer geringeren Doxo-Dosierung (200 nM) nicht eindeutige Veränderungen der Zellmorphologie. Die behandelten Zellen zeigten keine für die seneszenten Zellen *in vitro* charakteristischen flachen Zellstruktur, trotz des teilweise positiven Ergebnisses im SA- β -Gal-Assay (Abbildung 30).

Hingegen, nach Verwendung der höchsten Doxo-Konzentration von 500 nM, lösten sich bei allen drei Zellkulturen ca. 90% der Zellen vom Flaschenboden ab und wurden mittels Trypanblau-Färbung mikroskopisch als tot identifiziert. Die noch wenigen lebenden Zellen konnten jedoch nicht als SA- β -Gal positiv identifiziert werden. Die Dosierung von 500 nM wurde daher als nicht geeignet für die Induktion der Seneszenz erachtet (Abbildung 30 zweite Spalte).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für weitere Untersuchung eine Doxo-Konzentration von 250 nM verwendet.

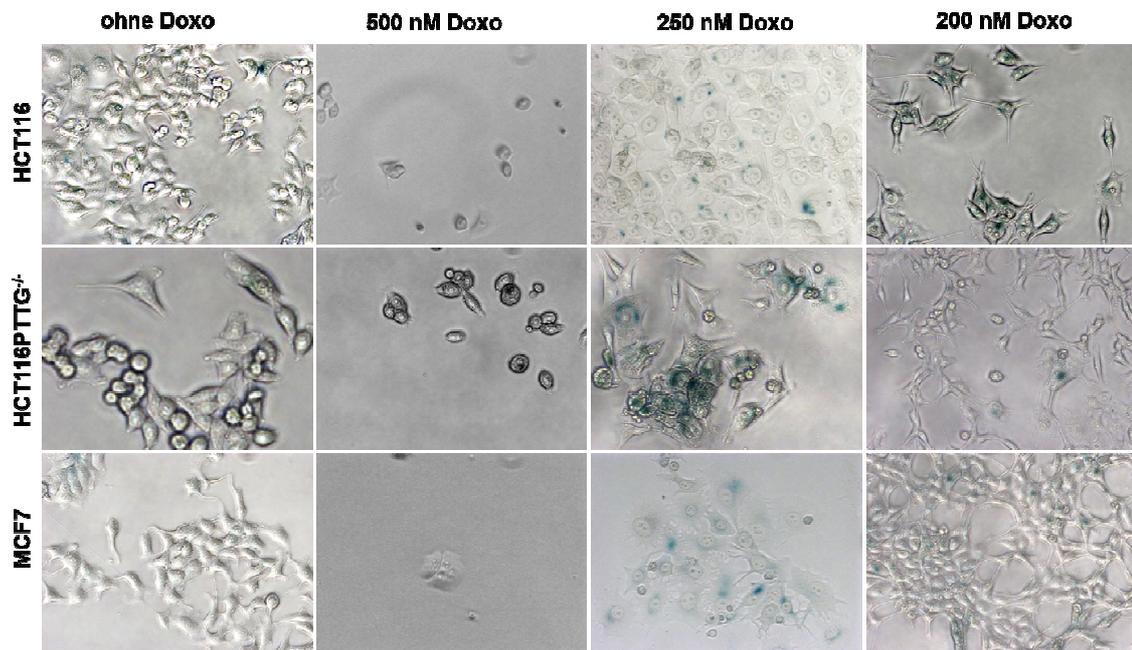


Abbildung 30: *In vitro* SA- β -Gal-Assay

Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen der HCT116-, HCT116PTTG^{-/-} und MCF7-Zelllinien unter Einfluss verschiedener Doxo-Konzentrationen (200, 250, 500 nM) nach Durchführung des SA- β -Gal-Assays. Gezeigt ist eine 43,5-fache Vergrößerung am Lichtmikroskop.

Neben dem positiven SA- β -Gal-Assay und der veränderten Morphologie seneszenten Zellen ist ein permanenter Proliferationsarrest der Zellen ein weiteres charakteristisches Kriterium zellulärer Seneszenz. Seneszente Zellen sind in der G0/G1-Phase des Zellzyklus arretiert und nicht in der Lage, in die S-Phase einzutreten (Sherwood, Rush et al. 1988). Aus diesem Grund wurden HCT116-, HCT116PTTG^{-/-} und MCF7-Zelllinien mit Hilfe eines BrdU-Assays auf ihre Proliferationseigenschaften (Zellen in der S-Phase) untersucht. In Abbildung 31 sind die Ergebnisse des BrdU-Proliferations-Assays unter drei verschiedenen Konditionen (ohne BrdU; mit BrdU und ohne Doxo; mit BrdU und 250 nM Doxo) für alle drei Zelllinien dargestellt. Die Gesamtzellzahl pro Probe (150 000 Zellen) im gesetzten Gate (Abbildung 11) wurde als 100 % erachtet, daraus wurde dann nur der S-Phase-Quadrant berechnet. Diese Methode erlaubt die zuverlässige Bestimmung von Zellen in der S-Phase, da die BrdU-Verbindung bei der DNA-Synthese in die DNA eingebaut wird und dann mittels der FITC-Markierung sichtbar gemacht werden kann (Abbildung 31).

In Kulturen ohne BrdU-Zusatz wurden keine Zellen (0,1 %) im S-Phase-Quadranten detektiert (Abbildung 31, erste Spalte). Alle drei Zelllinien „mit BrdU und ohne Doxo“ wiesen unterschiedlich viele BrdU-positive Zellen auf. Demnach befanden sich in den

jeweiligen Proben ohne Doxo 8,3 % der HCT116-, 9,2 % der HCT116PTTG^{-/-}- und 29,2 % der MCF7-Zellen in der S-Phase (Abbildung 31, mittlere Spalte). Alle Kulturen, die mit 250 nM Doxo behandelt wurden, wiesen deutlich weniger Zellen in der S-Phase auf: HCT116 (2,9 %), HCT116PTTG^{-/-} (4,5 %) und MCF7 (0,8 %) (Abbildung 31, rechte Spalte). Die Zellzyklusphasen G0/G1 und G2/M konnten mit Hilfe des BrdU-Proliferations-Assays nicht eindeutig voneinander getrennt werden und wurden deshalb nicht in die Analyse miteinbezogen.

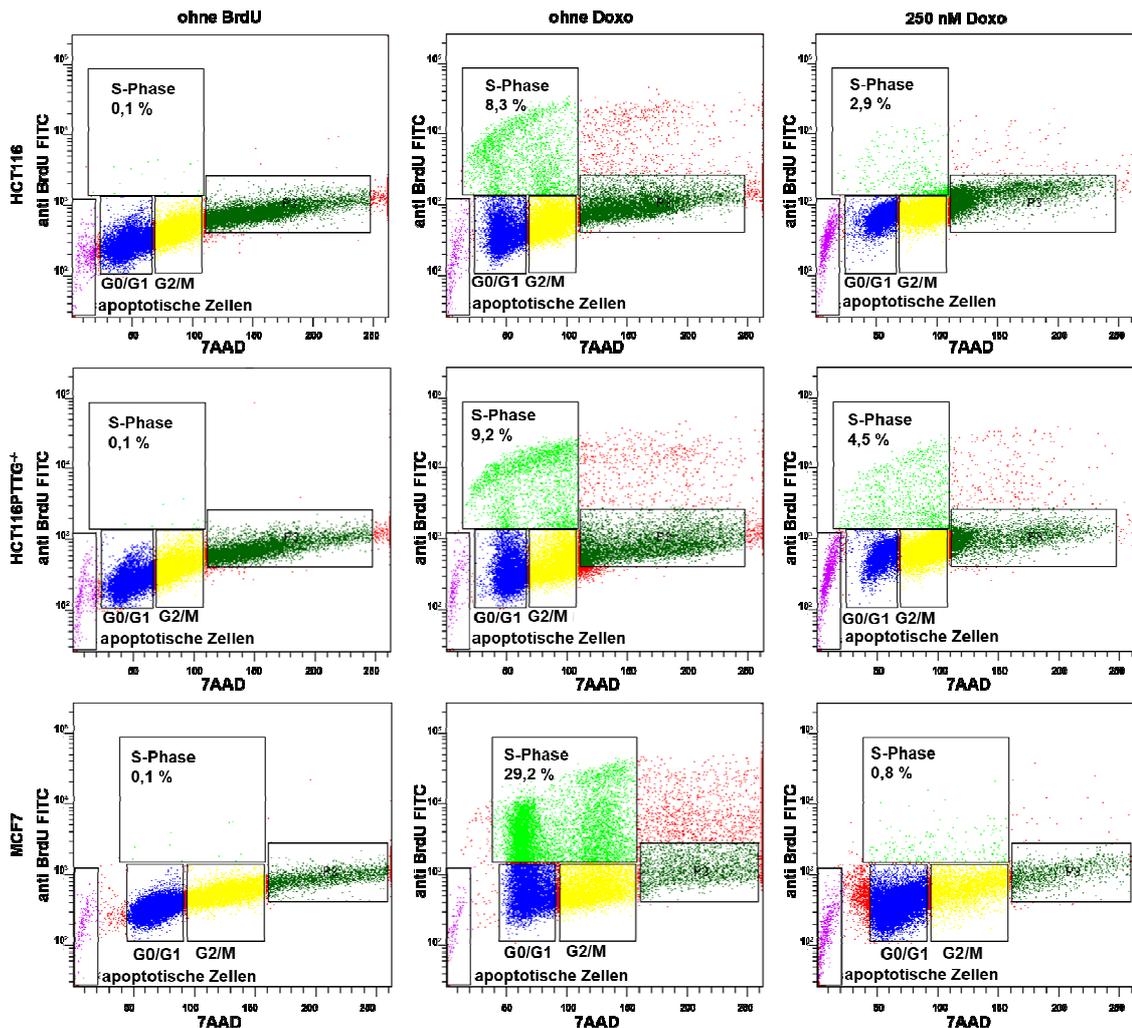


Abbildung 31: In vitro BrdU-Proliferations-Assay

Ergebnisse des BrdU-Proliferations-Assays für HCT116-, HCT116PTTG^{-/-}- und MCF7-Zelllinien in drei verschiedenen Konditionen (ohne BrdU, ohne Doxo, 250 nM Doxo).

Anhand der Resultate des BrdU-Proliferations-Assays und dem zuvor durchgeführten SA- β -Gal-Assay wurde die Etablierung von subkutanen Xenograftmodellen nur mit MCF7- und HCT116-Zelllinien fortgesetzt. Die mit Doxo-behandelten HCT116PTTG^{-/-}-

Zellen zeigten im BrdU-Assay mit 4,5 % der Zellen in der S-Phase das schlechteste Ergebnis und wurden daher nicht für die Xenograft-Etablierung verwendet.

4.1.2 Seneszenz-Induktion in murinen GEPIRshp53pWZLHras-Zellen

Die GEPIRshp53pWZLHras-Zellen wurden bereits im Bezug auf die Erforschung von Seneszenz und Tumor-„clearance“ in der Literatur gut beschrieben (Zender, Xue et al. 2005, Xue, Zender et al. 2007). Unter Zugabe von Doxy exprimieren die Hras-Zellen GFP, H-Ras^{V12} sowie p53shRN und können ungehindert proliferieren. Die Ko-Expression von GFP in Doxy-behandelten Zellen erlaubt eine zusätzliche Kontrolle der Zellproliferation. Sobald Doxy dem Zellkulturmedium nicht mehr zugesetzt wird, stoppt die Expression von GFP, H-Ras^{V12} sowie p53shRNA, wodurch die Synthese des p53-Proteins startet und die Zellen nicht mehr proliferieren können und somit in Seneszenz gehen. Mittels Fluoreszenzaufnahme kann der Stopp von GFP-Expression und somit der Stopp von Zellproliferation kontrolliert werden. Mittels eines SA- β -Gal-Assays wurden diese Zellen *in vitro* auf Seneszenz getestet. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse des SA- β -Gal-Assays sowie die Detektion des GFP-Signals dargestellt. Es konnten deutliche Unterschiede in der β -Gal-Färbung sowie der Stärke des GFP-Signals zwischen Doxy-behandelten und unbehandelten Zellen detektiert werden. Zellen ohne Doxy-Behandlung zeigen eine stark positive β -Gal-Färbung und ein Hintergrund-GFP-Signal (Abbildung 32). Im Gegensatz hierzu zeigen Kontrollzellen mit Doxy-Behandlung ein schwach positives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay, sowie ein eindeutiges GFP-Signal. Die Hras-Zelllinie wurde für die Etablierung des subkutanen Allograftmodells verwendet.

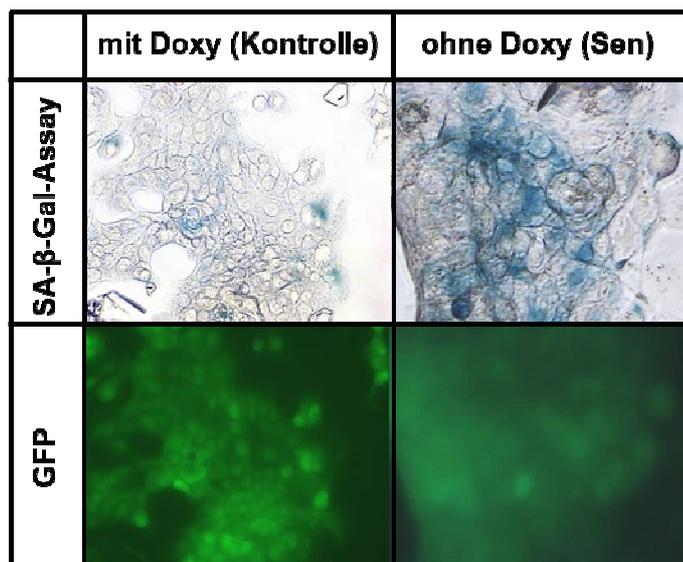


Abbildung 32: *In vitro* SA- β -Gal-Assay und GFP-Expression von Hras-Zellen

Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der Hras-Zellen mit und ohne Doxy-Behandlung nach SA- β -Gal-Assay (obere Zeile). Zellen ohne Doxy-Behandlung wiesen eine stark positive SA- β -

Gal-Färbung auf im Vergleich zu Zellen nach Doxy-Behandlung (43,5-fache Vergrößerung). Fluoreszenzaufnahmen des GFP-Signals in gleichen Hras-Zellen (untere Zeilen). Zellen nach Doxy-Behandlung zeigen ein starkes GFP-Signal im Vergleich zu Zellen ohne Doxy-Behandlung (43,5-fache Vergrößerung). Verändert nach J. Cotton.

4.2 Evaluierung und Untersuchung subkutaner Tumoren *in vivo*

Aufgrund vorangegangener *in vitro* Experimente wurden drei unterschiedliche Zelllinien für die *in vivo* Charakterisierung von subkutanen Tumoren ausgewählt. Dazu gehören zwei Xenograftmodelle mit MCF7- und HCT116-Zellen, sowie ein Allograftmodell mit GEPiRshp53pWZLHras-Zellen. Im Vordergrund der Tumorcharakterisierung stand die Frage welches dieser Modelle sich für die *in vivo* Induktion von Seneszenz und somit für die Evaluierung neuer Seneszenz-Tracer am besten eignet? Außerdem wurde der optimale Zeitpunkt für die PET-Untersuchung mit dem neuen Seneszenz-Tracer ermittelt.

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der Tumorcharakterisierung anhand von Tumorwachstumskurven, der PET/MRT-Untersuchungen mit [¹⁸F]FDG zur Charakterisierung des Glukosemetabolismus und [¹⁸F]FLT zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens, sowie SA-β-Gal-Assay zum Nachweis der Seneszenz *ex vivo* dargestellt. Zusätzlich wurden mit zwei der geeignetsten Modelle einige IHC-Färbungen von bestimmten Seneszenz-Markern zu einem weiterem *ex vivo* Nachweis der Seneszenz durchgeführt.

4.2.1 Die Charakterisierung des subkutanen MCF7-Xenograftmodells

Insgesamt 20 BALB/c nu/nu-Mäuse wurden jeweils mit $1,5 \cdot 10^6$ MCF7-Zellen s.c. injiziert. Acht Tiere (40 % Anwachsrate) entwickelten nach 22 Tagen einen subkutanen Tumor, alle anderen 12 Tiere blieben bis zu diesem Zeitpunkt ohne Tumor und wurden aus dem Versuch genommen. Die tumortragenden Tiere wurden randomisiert und in 2 Gruppen (mit oder ohne Doxo-Behandlung) aufgeteilt. Das mittlere Tumolvolumen von $31,7 \pm 13,5 \text{ mm}^3$ (n=4) wurde in der Doxo-Gruppe gemessen, ein Volumen von $34,5 \pm 12,8 \text{ mm}^3$ in der Kontrollgruppe. Die Tiere wurden zum Messzeitpunkt (22 Tage nach Zellinjektion) mit jeweils 10 mg/kg Doxo (Seneszenzgruppe) oder 75 μl PBS (Kontrolle) *i.v.* behandelt (Abbildung 33). Fünf Tage nach der Behandlung wurden leichte Unterschiede im Tumorwachstum zwischen der Doxo-behandelten Seneszenzgruppe ($27,5 \pm 12,7 \text{ mm}^3$) und der PBS-behandelten Kontrollgruppe ($40,0 \pm 14,2 \text{ mm}^3$) detektiert. Die Tumorgrößen der Tiere wurden mit einer Schieblehre an Tag 10, 16, 22 und 27 nach Tumordinjektion gemessen und das Tumolvolumen jeweils mittels Formel 1 (Abschnitt 3.5.3) berechnet (Abbildung 33).

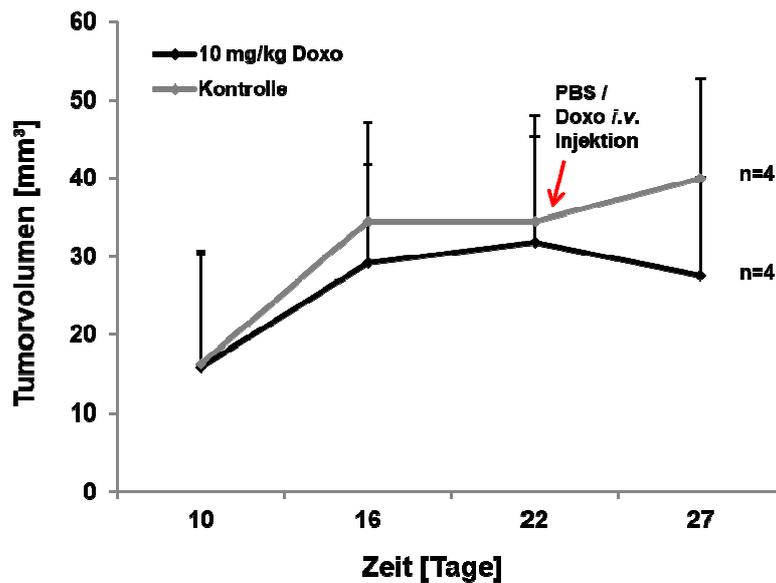


Abbildung 33: Tumorwachstumskurve für das MCF7-Xenograftmodell

Darstellung des Tumorwachstums (Mittelwerte in $\text{mm}^3 \pm \text{SD}$) über die Zeit. Die Tumorgrößen der Tiere wurden mit einer Schieblehre an Tag 10, 16, 22 und 27 gemessen und das Tumolvolumen wurde mit Hilfe von Formel 1 berechnet. Beide Gruppen zeigen ähnliche Verläufe des Tumorwachstums. Fünf Tage nach Behandlung konnte ein leicht reduziertes Tumolvolumen in der Doxo-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden.

Beide Gruppen (Doxo- oder PBS-Behandlung) wurden an Tag vier nach Behandlung mit $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ und an Tag fünf mit $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ im PET/MRT gemessen (siehe Abschnitt 3.5.3). Abbildung 34 a) zeigt eine quantitative Mittelwertanalyse der akquirierten PET-Daten aus den jeweiligen Tumoren. Der Tracer $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ zur Darstellung des Glukosestoffwechsel sowie $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ zur Detektion des Proliferationsverhaltens zeigten jeweils keine signifikanten Unterschiede im Tumoruptake zwischen den beiden Behandlungsgruppen ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$: Doxo ($2,5 \pm 1,2 \text{ \%ID/cc}$); Kontrolle ($2,4 \pm 0,4 \text{ \%ID/cc}$); $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$: Doxo ($3,7 \pm 0,8 \text{ \%ID/cc}$); Kontrolle ($4,1 \pm 0,6 \text{ \%ID/cc}$). Abbildung 34 b) zeigt eine exemplarische Darstellung der PET/MRT-Bilder von Doxo-behandelten und Kontrolltieren mit den jeweiligen Tracern. Es sind keine visuellen Unterschiede der beiden Gruppen festzustellen. Die Auswertung des SA- β -Gal-Assays der Tumorkryoschnitte zeigte keine farblichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, es konnten keine Blaufärbung detektiert werden. Demnach wurde das Ergebnis des SA- β -Gal-Assays in beiden Behandlungsgruppen als negativ erachtet (Abbildung 34 c).

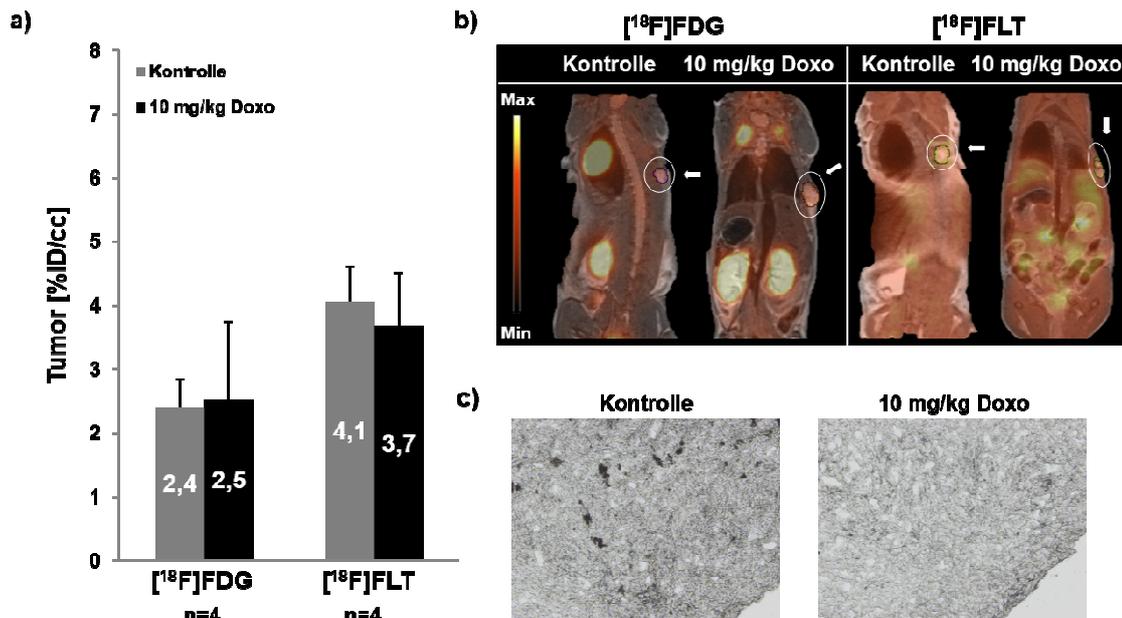


Abbildung 34: Charakterisierung des MCF7-Xenograftmodells

(a) Quantitative Mittelwertanalyse (%ID/cc ± SD im Tumor) der statischen [¹⁸F]FDG- und [¹⁸F]FLT-PET-Messungen von Tieren nach Doxo- oder PBS- (Kontrolle) Behandlung. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in der Tracer-Akkumulation von [¹⁸F]FDG oder [¹⁸F]FLT detektiert. (b) Exemplarische Darstellung eines PET/MRT-Scans ([¹⁸F]FDG- und [¹⁸F]FLT) pro Behandlungs-Gruppe. (c) Ex vivo SA-β-Gal-Assay in MCF7-Tumorschnitten aus beiden Gruppen zeigt keine Unterschiede. Dargestellt ist eine 43,5-fache Vergrößerung am Lichtmikroskop.

Aufgrund des sehr heterogenen Anwachsens der Tumoren, des unregelmäßigen Tumorstadiums, den ermittelten PET-Ergebnissen, die *in vivo* keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigten, sowie der negativen Ergebnissen des SA-β-Gal-Assays, sowohl in Doxo- als auch in PBS-behandelten MCF7-Tumoren, wurde das MCF7-Xenograftmodell als nicht geeignetes *in vivo* Modell für die Untersuchung der Seneszenz beurteilt. In diesem Fall konnten die *in vitro* Ergebnisse mit MCF7-Zellen nicht mit dem MCF7-Xenograftmodell *in vivo* bestätigt werden. Es konnte keine Seneszenz mittels Doxo in MCF7-Tumoren induziert werden. Dieses Modell wurde als nicht geeignet für die Evaluierung neuer Seneszenz-Tracer angesehen. Aus diesem Grund wurden keine weiteren *in vivo* und *ex vivo* Versuche mittels des MCF7-Xenograftmodells durchgeführt.

4.2.2 Die Charakterisierung des subkutanen HCT116-Xenograftmodells

20 BALB/c nu/nu-Mäuse wurden jeweils mit 10⁶ HCT116-Zellen s.c. injiziert. Alle Tiere entwickelten innerhalb von zwei Wochen subkutane Tumoren (100 % Anwachsrate). Am Tag der *i.v.* Behandlung (Tag 14 nach Zellinjektion) mit 10 mg/kg Doxo oder 75 µl

PBS betrug die mittlere Tumorgroße aller Tiere $30,1 \pm 8,3 \text{ mm}^3$ ($n=20$). Ab Tag drei nach Behandlung konnten bereits leichte Unterschiede im Tumorstadium der beiden Gruppen detektiert werden (Doxo: $46,1 \pm 14,1 \text{ mm}^3$; Kontrolle: $60,6 \pm 28,4 \text{ mm}^3$). Danach blieb das Tumorstadium in dieser Gruppe nahezu unverändert ($n=10$; d18: $49,3 \pm 14,4 \text{ mm}^3$; d19: $54,8 \pm 14,6 \text{ mm}^3$), während das Tumorstadium der Kontrollgruppe über die Zeit stark zunahm (d18: $95,8 \pm 47,6 \text{ mm}^3$; d19: $134,3 \pm 74,8 \text{ mm}^3$) (Abbildung 35). Somit wurde am Tag 19 ein signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied im Tumorstadium zwischen den beiden Gruppen ermittelt. Auch bei diesem Modell, insbesondere in den Kontrollgruppen, wurde ein heterogenes Tumorstadium beobachtet, welches zu einer hohen Standardabweichung führt.

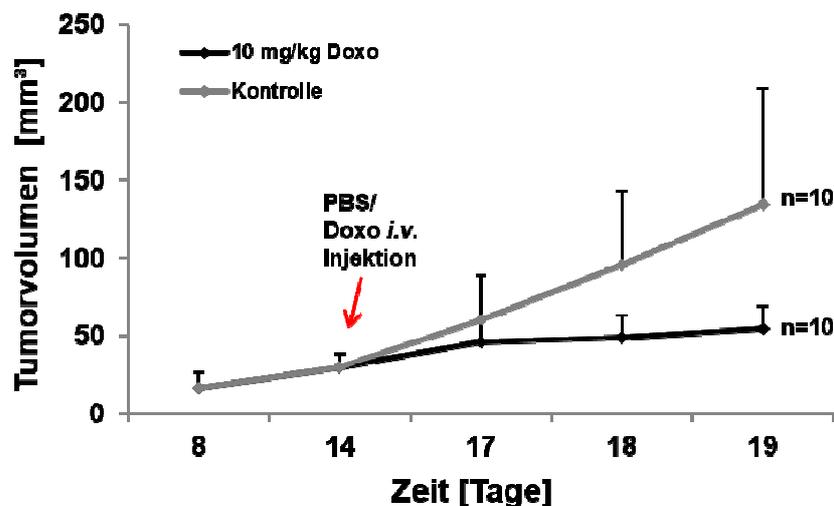


Abbildung 35: Tumorstadiumskurve für das HCT116-Xenograftmodell

Das Diagramm stellt die Volumenänderung der s.c. HCT116-Tumoren (Mittelwerte in $\text{mm}^3 \pm \text{SD}$) gegen die Zeit [Tage] in zwei Versuchsgruppen (PBS: ($n=10$), mit Doxo (10 mg/kg, $n=10$)) dar. Zwei Wochen nach s.c. Zellinjektion wurden die Tiere randomisiert, in zwei Gruppen aufgeteilt und entsprechend mit Doxo oder PBS behandelt. Es wurde ein verlangsamtes Tumorstadium in der Doxo-Gruppe drei Tage nach Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede der ^{18}F FDG-Aufnahme in HCT116-Tumoren zwischen der Doxo- ($4,7 \pm 1,1 \text{ \%ID/cc}$) oder Kontrollgruppe ($4,3 \pm 1,4 \text{ \%ID/cc}$) am vierten Tag nach Behandlung ermittelt, somit gibt es auch keinen Unterschied des Glukosestoffwechsels der Tumoren beider Gruppen. Interessanterweise wurden auch keine signifikanten Unterschiede in der Anreicherung von ^{18}F FLT zwischen den beiden Gruppen (Doxo: $6,2 \pm 1,2 \text{ \%ID/cc}$; Kontrolle: $5,9 \pm 0,6 \text{ \%ID/cc}$) am fünften Tag nach Behandlung ermittelt (Abbildung 36 a), obwohl aufgrund der Tumorstadiumskurve eine höhere Anreicherung von ^{18}F FLT in den Kontrolltumoren im Vergleich zu Doxo-behandelten Tumoren erwartet wurde.

Die Anreicherung von [^{18}F]FDG und [^{18}F]FLT in BALB/c nu/nu-Mäusen mit HCT116-Tumoren ist exemplarisch in den PET/MRT-Aufnahmen in Abbildung 36 b) dargestellt. Dabei wurde eine sehr homogene [^{18}F]FDG- und [^{18}F]FLT-Akkumulation in beiden Behandlungsgruppen beobachtet. Am sechsten Tag nach Behandlung, dem Zeitpunkt der für die folgenden PET-Untersuchungen mithilfe der neuen Seneszenz-Tracer vorgesehen war, wurden die Tumoren entnommen, geschnitten und mittels eines SA- β -Gal-Assays untersucht. Die mit Doxo-behandelten Tumoren zeigten eine deutlich stärkere β -Gal Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. In Abbildung 36 c) ist jeweils ein exemplarischer Schnitt eines Tumors aus der Doxo-Gruppe sowie aus der Kontrollgruppe dargestellt.

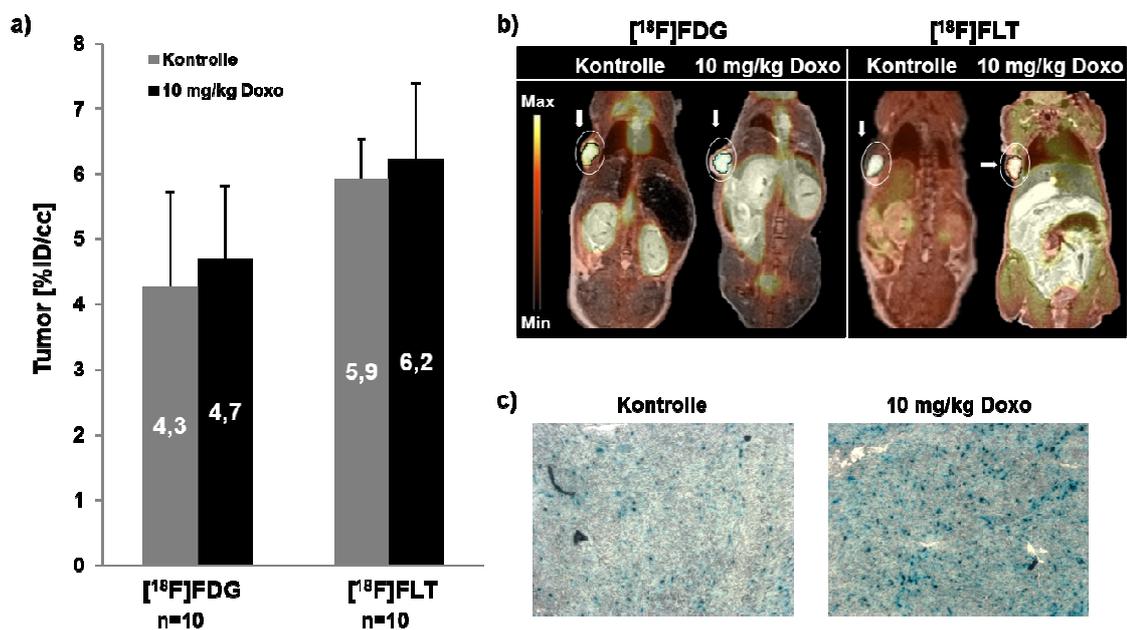


Abbildung 36: Charakterisierung des HCT116-Xenograftmodells

(a) Quantitative Mittelwertanalyse (%ID/cc \pm SD im Tumor) der statischen [^{18}F]FDG- und [^{18}F]FLT-PET-Messungen von Tieren nach Doxo- oder PBS- (Kontrolle) Behandlung. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in der Tracer-Akkumulation von [^{18}F]FDG oder [^{18}F]FLT detektiert. (b) Exemplarische Darstellung eines PET/MRT-Scans ([^{18}F]FDG- und [^{18}F]FLT) pro Behandlungs-Gruppe. (c) Ex vivo SA- β -Gal-Assay in HCT116-Tumorschnitten aus beiden Gruppen ist gezeigt, wobei Doxo-behandelte Tumoren im Vergleich zu Kontrolltumoren eine stärkere blaue Färbung aufweisen. Dargestellt ist eine 43,5-fache Vergrößerung am Lichtmikroskop.

Das veränderte Tumorwachstum nach Doxo-Behandlung und das positive Ergebnis des SA- β -Gal-Assays in dieser Gruppe lieferte eindeutige Hinweise auf die erfolgreiche Seneszenzinduktion im HCT116-Xenograftmodell. Zur weiteren HCT116-

Tumorcharakterisierung und für einen Seneszenz-Nachweis wurden *ex vivo* histologische Untersuchungen für beide Gruppen durchgeführt.

Die im Abschnitt 1.3.2 beschriebenen Seneszenz-Marker HP1 γ , p53, p16 und FUCA1 wurden zum Nachweis der Seneszenz, Ki67 und TK1 zum Nachweis von Proliferation sowie Caspase3 zum Nachweis der Apoptose verwendet. Zu diesem Zweck wurde ihre Expression in HCTT116-Tumoren mit Hilfe von IHC-Färbungen für beide Gruppen evaluiert und in Abbildung 37 dargestellt. Beide Gruppen wiesen eine ähnliche Morphologie mit großen Tumorzellen sowie ungleichmäßig großen Zellkernen, reichhaltigem Zytoplasma, einer hohen Zellteilungsrate und teilweise nekrotischen Bereichen auf. Außerdem wurde an der Grenze zwischen lebendigen und nekrotischen Tumorarealen eine verstärkte Caspase3-Expression in beiden Gruppen beobachtet. Aufgrund des veränderten Tumorwachstums nach Doxo- bzw. PBS-Behandlung wurden auch Unterschiede in der IHC-Färbung von den Proliferationsmarkern (Ki67 und TK1) zwischen beiden Gruppen erwartet. Es wurden jedoch keine eindeutigen Unterschiede in der Proliferation anhand der Ki67- und TK1-IHC-Färbung zwischen der Doxo- und der Kontrollgruppe detektiert. Dennoch konnte mit der IHC-Untersuchung eine stärkere Expression der Seneszenz-Marker HP1 γ , p53, p16 sowie FUCA1 in den Tumoren der Doxo-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abbildung 37).

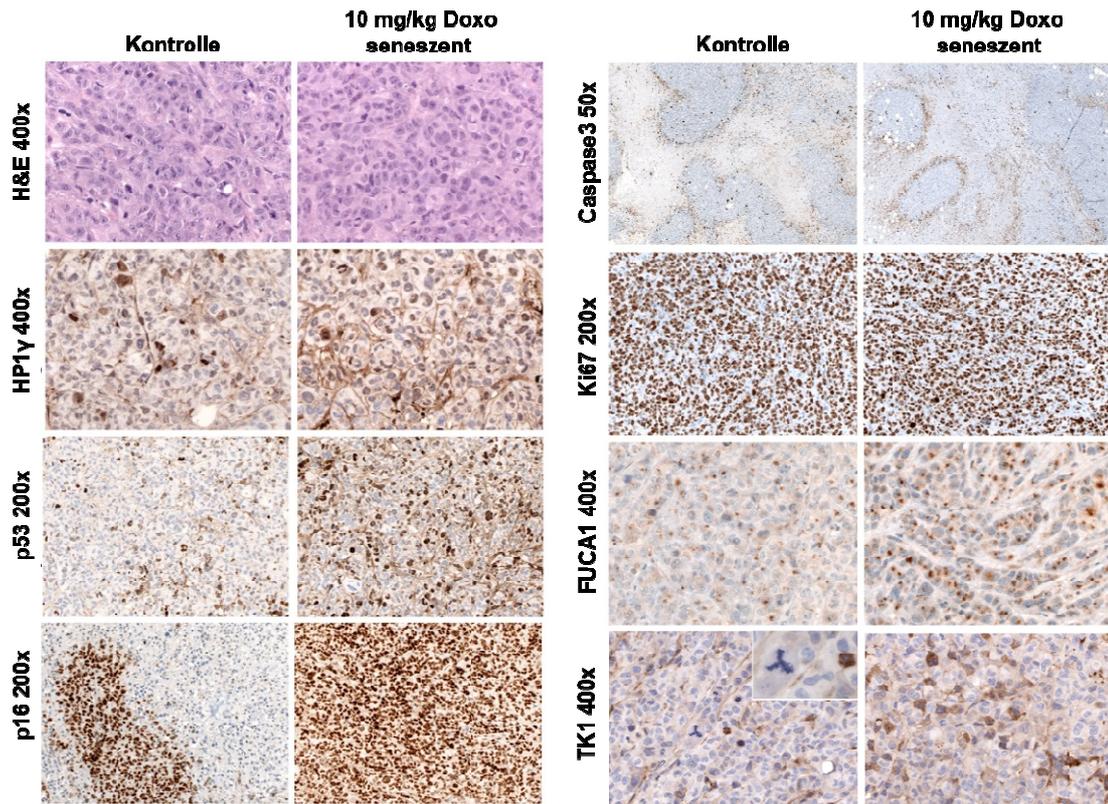


Abbildung 37: Histologie und IHC-Analyse der HCT116-Xenografttumoren

Kontrolltumoren und Doxo-behandelte Tumorschnitte wurden mit H&E gefärbt und die Expression von HP1 γ , p53, p16, Caspase3, Ki67, TK1 und FUCA1 wurde mit Hilfe einer IHC-Färbung evaluiert. Alle Aufnahmen in 50-, 200- oder 400-facher Vergrößerung wurden in der Pathologie Tübingen (Prof. L. Quintanilla-Fend und Dr. U. Kohlhofer) aufgenommen.

4.2.3 Die Charakterisierung des subkutanen Hras-Allograftmodells

Für die Etablierung des Hras-Allograftmodells wurden 20 BALB/c nu/nu-Mäuse verwendet. Die Hras-Zellen benötigen zusätzlich Doxy für ihre Vermehrung, folglich wurden alle Tiere bereits vor der Zelinjektion mit Doxy-haltigem Trinkwasser versorgt. Vier Tage später erfolgte die s.c. Injektion von $1,5 \cdot 10^6$ Hras-Zellen pro Maus und nach weiteren zwei Wochen die Randomisierung in zwei verschiedene Behandlungsgruppen. Eine Gruppe wurde weiterhin mit Doxy-haltigem Trinkwasser versorgt und die andere Gruppe bekam Trinkwasser ohne Doxy. Dieser Tag wurde in Abbildung 38 als Tag null bezeichnet (0). Die durchschnittliche Tumorgroße aller Tumoren (n=20) betrug an diesem Tag $22,8 \pm 16,6 \text{ mm}^3$. Bis zum Tag acht wurden keine eindeutigen Unterschiede im Tumorwachstum zwischen den Gruppen beobachtet. Erst ab Tag zehn waren die Unterschiede im Tumorwachstum ersichtlich. Am letzten Versuchstag (Tag 15) betrug das Tumolvolumen bei Tieren mit Doxy-haltigem Trinkwasser $169 \pm 76,9 \text{ mm}^3$ und bei Tieren ohne Doxy-Behandlung $72 \pm 19,1 \text{ mm}^3$, wobei bei den Tieren ohne Doxy-Behandlung signifikant ($p < 0,01$) kleinere Tumore ermittelt wurden als bei den Kontrolltieren mit Doxy-Behandlung.

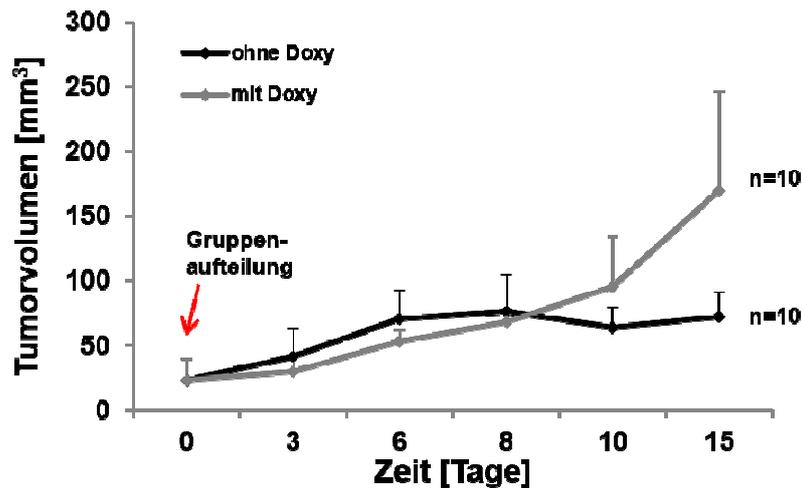


Abbildung 38: Tumorwachstumskurve für das Hras-Allograftmodell

Das Diagramm stellt die Volumenänderung von Hras-Tumoren (Mittelwerte in $\text{mm}^3 \pm \text{SD}$) gegen die Zeit [Tage] in zwei Versuchsgruppen (mit Doxy- ($n=10$) bzw. ohne Doxy-Behandlung ($n=10$)) dar. Ab dem zehnten Tag nach Randomisierung wurde unterschiedliches Tumorwachstum zwischen den beiden Gruppen beobachtet.

Die zusätzliche Expression von GFP, unter der Einwirkung von Doxy in Hras-Zellen, ermöglicht gleichzeitig die Kontrolle der p53shRNA-Expression, welche wiederum für die Inhibierung der Seneszenz-Induktion verantwortlich ist. Demnach wurden alle Tiere am Tag der Gruppenaufteilung (Tag 0) und nach weiteren 14 Tagen mittels OI auf GFP-Signal in Tumoren untersucht. Abbildung 39 zeigt exemplarische Bilder von zwei Tieren zu den oben genannten Zeitpunkten. Unter Einwirkung von Doxy, am Tag 0, wurde bei beiden Tieren ein GFP-Signal in der Tumorregion detektiert (Abbildung 39, links). 14 Tage nach Gruppenaufteilung wurde in Tumoren von Tieren ohne Doxy-Behandlung kein GFP-Signal mehr detektiert. Im Gegensatz dazu wurde in Tumoren von Tieren mit Doxy-Behandlung weiterhin ein starkes GFP-Signal lokalisiert (Abbildung 39, rechts).

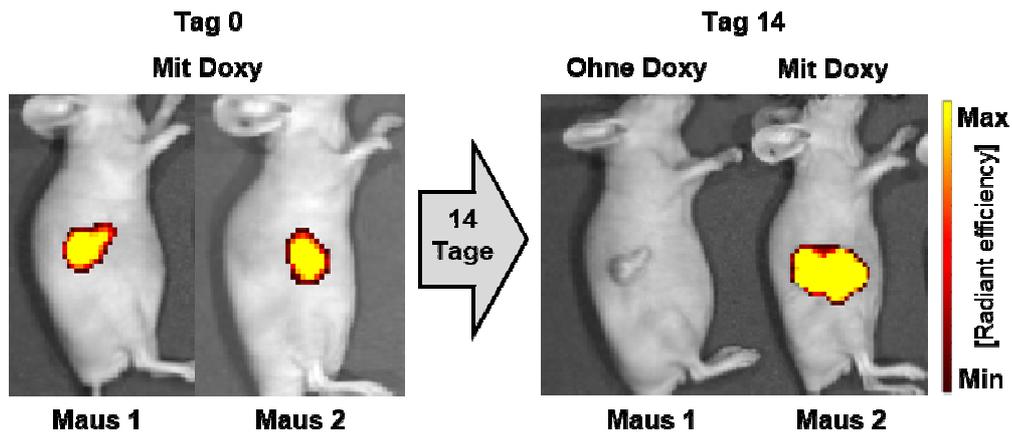


Abbildung 39: GFP-Signaldetektion im Hras-Allograftmodell

Exemplarische *in vivo* OI-Fluoreszenzaufnahmen von jeweils einem Tier mit Hras-Tumor pro Gruppe zum Zeitpunkt der Gruppenaufteilung (Tag 0) und zwei Wochen später (Tag 14). Maus 1 (ohne Doxy-Behandlung) zeigt den Verlust des GFP-Signals im Tumor und Maus 2 (mit Doxy-Behandlung) zeigt weiterhin ein GFP-Signal im Tumor nach zwei Wochen.

Am Tag 14 und 15 nach Gruppenaufteilung wurden entsprechend [^{18}F]FDG- bzw. [^{18}F]FLT-PET- und MRT-Untersuchungen mit beiden Behandlungsgruppen durchgeführt. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anreicherung von [^{18}F]FDG in den Tumoren zwischen den beiden Gruppen (ohne Doxy (n=10): $3,4 \pm 0,8$ %ID/cc und mit Doxy (n=10): $3,5 \pm 0,5$ %ID/cc) detektiert. Demnach konnten keine Unterschiede im Glukosestoffwechsel der Tumoren zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden. Die Proliferation der Tumoren wurde auch bei diesem Tumormodell zunächst mittels [^{18}F]FLT-PET untersucht. Dabei wurde eine nicht signifikant höhere Anreicherung von [^{18}F]FLT in den Tumoren mit Doxy ($4,1 \pm 0,7$ %ID/cc) verglichen mit Tumoren ohne Doxy ($3,7 \pm 0,6$ %ID/cc) im Trinkwasser ermittelt (Abbildung 40 a). Die exemplarischen [^{18}F]FDG- und [^{18}F]FLT-PET-Aufnahmen sind von jeweils einem Tier aus jeder Behandlungsgruppe in Abbildung 40 b) dargestellt. Dabei wurde eine vorwiegend homogene [^{18}F]FDG- und [^{18}F]FLT-Anreicherung in Tumoren beider Gruppen beobachtet.

An Tag 16 nach der Gruppenaufteilung, der Zeitpunkt, der auch für die PET-Messung mit den neuen Seneszenz-Tracern vorgesehen war, wurden die Tumoren entnommen, geschnitten und mittels eines SA- β -Gal-Assays untersucht. In den Tumorschnitten der Tiere ohne Doxy-Behandlung wurde eine stärkere blaue Färbung detektiert als in den Tumorschnitten der Tiere mit Doxy-Behandlung (Abbildung 40 c).

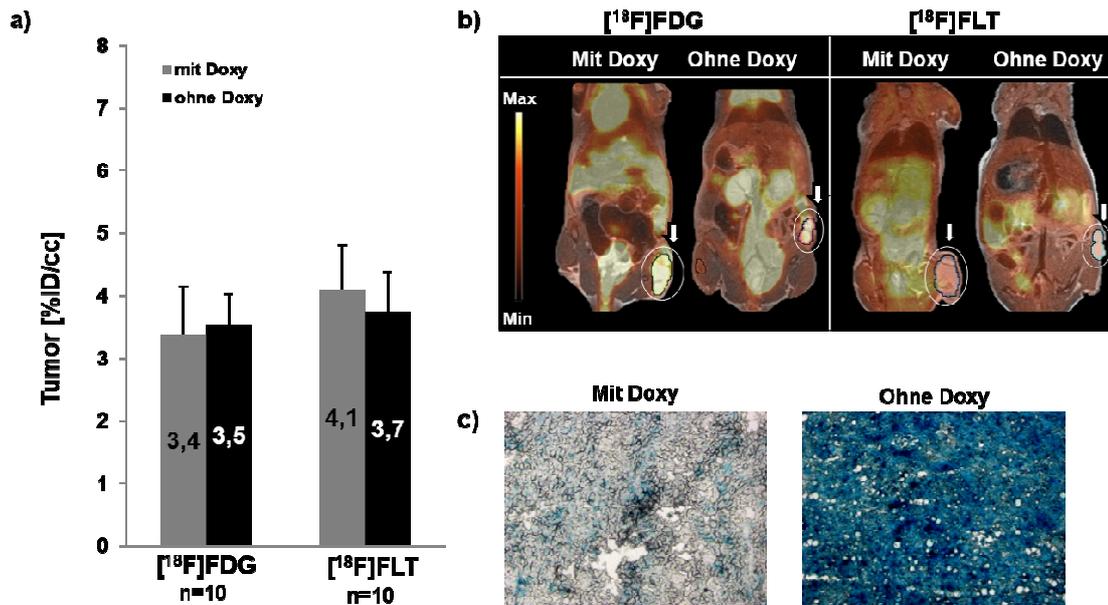


Abbildung 40: Charakterisierung des Hras-Allograftmodells

(a) Quantitative Mittelwertanalyse (%ID/cc \pm SD im Tumor) der statischen $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ - und $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ -PET-Messungen von Tieren mit Doxy- oder ohne Doxy-Behandlung. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in der Tracer-Akkumulation von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ oder $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ detektiert. (b) Exemplarische Darstellung eines PET/MRT-Scans ($[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ - und $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$) pro Versuchsgruppe. (c) *Ex vivo* SA- β -Gal-Assay in Hras-Tumorschnitten aus beiden Gruppen ist gezeigt, wobei Tumoren ohne Doxy im Vergleich zu Tumoren mit Doxy im Trinkwasser eine stärkere blaue Färbung aufweisen. Dargestellt ist eine 43,5-fache Vergrößerung am Lichtmikroskop.

Aufgrund der eindeutigen Unterschiede im Tumorwachstum und im SA- β -Gal-Assay zwischen den beiden Gruppen wurden weitere *ex vivo* Untersuchungen zur Hras-Tumorcharakterisierung durchgeführt. Abbildung 41 fasst die IHC-Färbungen der HP1 γ -, p53-, p16-, Caspase3-, Ki67- und FUCA1-Expression in Hras-Tumoren aus beiden Gruppen zusammen. Alle Tumoren wurden anhand von H&E-Färbungen als pleomorph beschrieben, charakterisiert durch reichhaltiges Zytoplasma, eine hohe Zellteilungsrate und ungleichmäßig große Zellkerne. Dabei war die Pleomorphie in den Tumoren der mit Doxy-behandelten Tieren im Vergleich zu Tumoren ohne Doxy-Behandlung stärker ausgeprägt. Außerdem wurde mittels IHC-Färbung in den Tumoren von Tieren ohne Doxy-Behandlung eine erhöhte Expression von HP1 γ , p53, p16 und FUCA1 im Vergleich zu Doxy-behandelten Tumoren detektiert (Abbildung 41). Dabei wurde die Proliferationsrate anhand der Ki67-Expression in Tumoren von Tieren ohne Doxy-Behandlung als sehr niedrig und in Tumoren von Doxy-behandelten Tieren als sehr hoch eingestuft. Mit Hilfe der TK1-Färbung wurden keine Proliferationsunterschiede zwischen den Versuchsgruppen ermittelt. Die IHC-Färbung von Caspase3 zeigt sehr kleine apoptotische Tumorareale in Tieren ohne Doxy-Behandlung und deut-

lich größere apoptotische Tumorbereiche in Tieren mit Doxy-Behandlung (Abbildung 41).

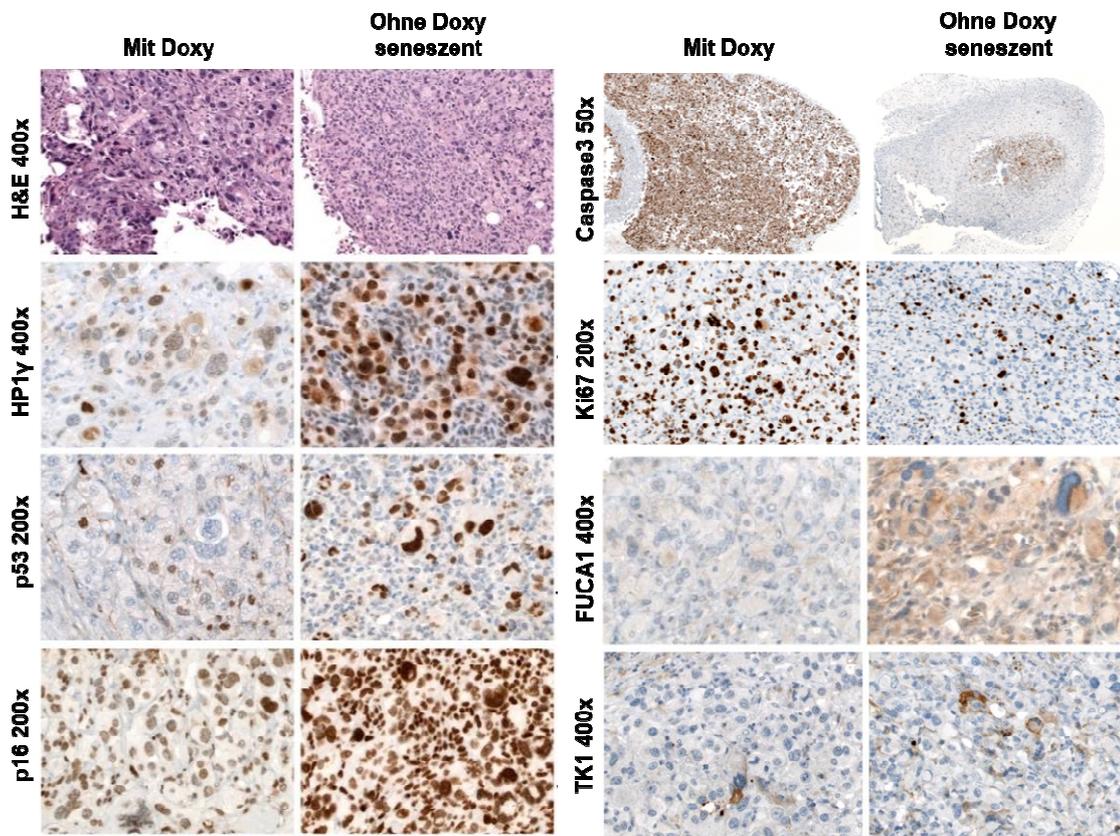


Abbildung 41: Histologie und IHC-Analyse der Hras-Allografttumoren

Doxy-behandelte und Doxy-unbehandelte Tumorschnitte wurden mit H&E gefärbt und die Expression von HP1 γ , p53, p16, Caspase3, Ki67, TK1 und FUCA1 wurde mit Hilfe einer IHC-Färbung evaluiert. Alle Aufnahmen in 50-, 200- oder 400-facher Vergrößerung wurden in der Pathologie Tübingen (Prof. Dr. L. Quintanilla-Fend und Dr. U. Kohlhofer) aufgenommen.

4.3 *In vitro* und *in vivo* Evaluierung neuer Seneszenz-PET-Tracer

Aufgrund vorangegangener Untersuchungen zur Etablierung von *in vitro* und *in vivo* Seneszenz-Modellen wurden die Zelllinien HCT116 und Hras sowie dazu das entsprechende subkutane HCT116-Xenograftmodell und das Hras-Allograftmodell ausgewählt und für die Evaluierung neuer PET-Tracer *in vitro* und *in vivo* verwendet.

Für die hierfür geplanten *in vitro* Versuche wurden die Gruppen entsprechend der in Tabelle 3 gezeigten Aufteilung für HCT116- und Hras-Zelllinien vorbereitet. Zellen aus allen Behandlungsgruppen wurden mit einem neuen Radiotracer im Zellkulturbrut-

schrank inkubiert und danach mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die in die Zellen aufgenommene Aktivität mittels eines Gammacounters bestimmt, zerfallsspezifisch korrigiert und auf die Zellzahl normiert. Die Ergebnisse für die Kontroll- und Seneszenz-Gruppe wurden in μCi pro 10^7 Zellen angegeben und verglichen.

Für die Evaluierung neuer Tracer *in vivo* wurde das HCT116-Xenograftmodell und das Hras-Allograftmodell, wie bereits in Abschnitt 3.5.3.1.2 bzw. 3.5.3.1.3 beschrieben, vorbereitet. Sowohl statische als auch dynamische PET-Untersuchungen wurden durchgeführt. Nach jedem PET-Scan mit einem jeweiligen neuen Tracer wurden die Tiere für die Autoradiographie, einen SA- β -Gal-Assay und eine H&E-Färbung von Gewebeschnitten geopfert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen der neuen Seneszenz-PET-Tracer [^{18}F] α -Fuc und [^{18}F] β -Gal dargestellt.

4.3.1 Evaluierung von [^{18}F] α -Fuc als Tracer zur Detektion von Seneszenz

4.3.1.1 *In vitro* Untersuchungen des [^{18}F] α -Fuc-Tracers

Die *in vitro* Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc wurde mit unterschiedlich behandelten HCT116- und Hras-Zellen untersucht. Dabei wurde die Akkumulation des Tracers zwischen der Gruppe mit induzierter Seneszenz und der Kontrollgruppe der jeweiligen Zelllinie nach Inkubation mit [^{18}F] α -Fuc quantitativ miteinander verglichen.

Abbildung 42 a) zeigt die Ergebnisse der Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in HCT116-Zellen [μCi pro 10^7 Zellen]. Es wurden signifikante Unterschiede ($p=0,004$) zwischen den beiden HCT116-Behandlungsgruppen ermittelt, wobei die Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in seneszenten Zellen (250 nM Doxo) mit $3,9 \pm 0,1 \mu\text{Ci}$ ($n=10$) fast doppelt so hoch wie die der Kontrollzellen ($n=10$; $2,2 \pm 0,0 \mu\text{Ci}$) war.

Abbildung 42 b) zeigt die Ergebnisse der Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in Hras-Zellen. Auch bei dieser Zelllinie wurden signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen ermittelt. Dabei lag die Anreicherung in seneszenten Hras-Zellen ($n=10$; $8,8 \pm 0,2 \mu\text{Ci}$) signifikant ($p<0,001$) 3,5-fach höher als in Hras-Kontrollzellen ($n=10$; $2,5 \pm 0,6 \mu\text{Ci}$).

In den Kontrollgruppen der HCT116- und Hras-Zelllinien war die Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc vergleichbar niedrig. Hingegen wiesen die seneszenten Hras-Zellen im Vergleich zu seneszenten HCT116-Zellen eine doppelt so hohe Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc auf (Abbildung 42).

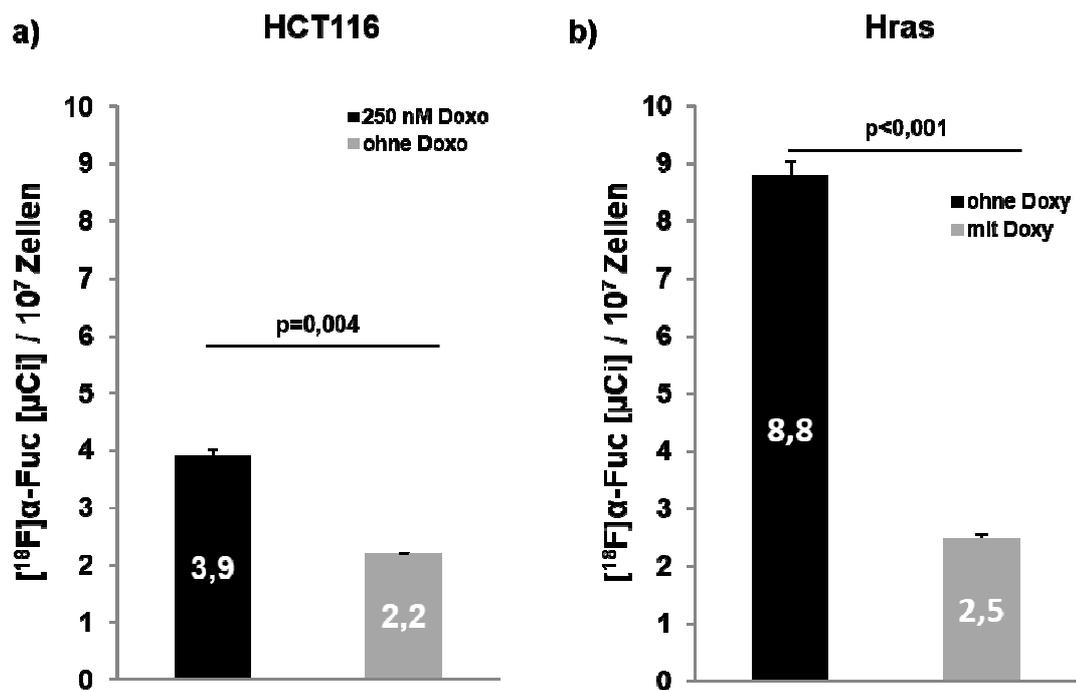


Abbildung 42: *In vitro* Untersuchung von [¹⁸F]α-Fuc in HCT116 und Hras Zellen

Die Anreicherung von [¹⁸F]α-Fuc wurde in unterschiedlich behandelten HCT116- a) und Hras- b) Zellen dargestellt. Die schwarzen Diagrammbalken repräsentieren jeweils die seneszenten Zellen und die grauen die Kontrollzellen. Alle Werte wurden als Mittelwerte in μCi aus zehn Proben mit 10⁷ Zellen ± SD aufgeführt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen durchgeführt (mit p<0,05 signifikant).

4.3.1.2 Evaluierung von [¹⁸F]α-Fuc *in vivo* im HCT116-Xenograftmodell

Für die *in vivo* Untersuchung von [¹⁸F]α-Fuc wurde zunächst das subkutane HCT116-Xenograftmodell verwendet (siehe 3.5.3.1.2). Dynamische PET-Messungen wurden mit zwei PBS- (Kontrolle) und drei Doxo-behandelten Mäusen durchgeführt. Dabei wurde über 60 Minuten die Anreicherung von [¹⁸F]α-Fuc mittels PET detektiert. Abbildung 43 zeigt die [¹⁸F]α-Fuc-Anreicherung (als Mittelwerte der %ID/cc ± SD) im Tumor (a) und im Oberschenkelmuskel (b) als Referenzgewebe gegen die Zeit [min]. Anhand der Zeiktaktivitätskurve (TAC) wurden in den ersten fünf Minuten keine Unterschiede in der [¹⁸F]α-Fuc-Anreicherung zwischen den beiden Behandlungsgruppen erkannt. In den restlichen 50 Minuten blieb die TAC der Kontrolltumoren auf konstantem Niveau zwischen 3,8 ± 0,5 %ID/cc bis 3,5 ± 0,7 %ID/cc und die TAC der mit Doxo-behandelten Tumoren stieg langsam auf 4,8 ± 0,7 %ID/cc an. Die TAC der mit Doxo-behandelten Tiere verlief bereits ab der fünften Minute nach der Tracerinjektion höher als die der Kontrolltumoren (Abbildung 43 a).

In Abbildung 43 b) sind die TACs für die Anreicherung von [¹⁸F]α-Fuc im Muskel der beiden Gruppen gezeigt. In den ersten 30 Minuten verliefen beide TACs fast identisch mit einem langsamen Anstieg der [¹⁸F]α-Fuc-Aufnahme im Muskelgewebe bis

$4,0 \pm 0,8$ %ID/cc in Doxo-behandelten und bis $3,9 \pm 0,4$ %ID/cc in Kontrolltieren. In den letzten 25 Minuten der Messung stieg die [^{18}F] α -Fuc-Anreicherung im Muskel der Doxo-behandelten Tiere auf ca. $4,4 \pm 0,8$ %ID/cc weiter an, während die Anreicherung im Kontrollmuskel fast unverändert bei ca. $3,8 \pm 1,1$ %ID/cc blieb (Abbildung 43 b).

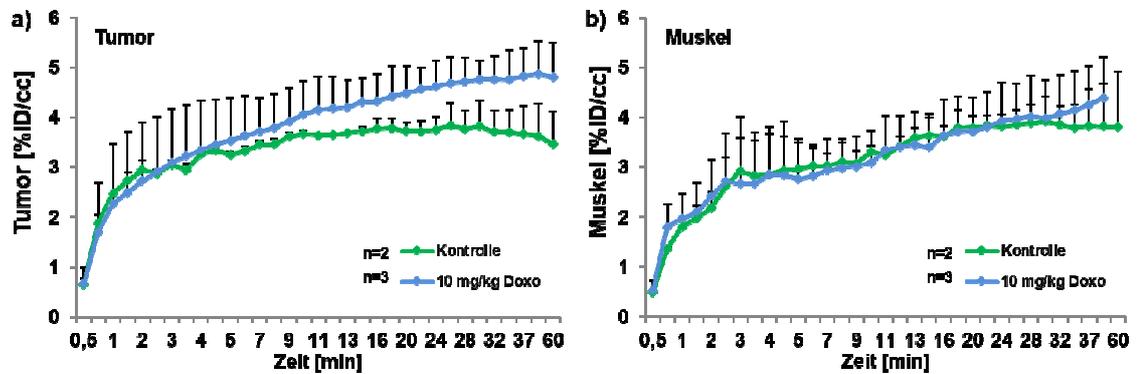


Abbildung 43: TACs der [^{18}F] α -Fuc-Anreicherung im HCT116-Xenograftmodell

Quantitative Darstellung der Dynamik von [^{18}F] α -Fuc-Tracer-Anreicherung im Tumor- **a)** und Muskelgewebe **b)** der Tiere aus der Kontrollgruppe (n=2) und Doxo-Gruppe (n=3) des HCT116-Xenograftmodells. Die [^{18}F] α -Fuc-Anreicherung (Mittelwert \pm SD [%ID/cc]) wurde gegen die Zeit [min] nach Tracerinjektion aufgetragen. Die Daten wurden auf die injizierte Aktivitätsmenge normiert.

Des Weiteren wurden statische und die letzten zehn Minuten von den dynamischen PET-Scans mittels quantitativer Mittelwertanalyse ausgewertet. Dabei wurden nahezu gleiche Werte für die [^{18}F] α -Fuc-Anreicherung im Tumor- (n=12; $4,2 \pm 1,0$ %ID/cc) und im Muskelgewebe ($3,9 \pm 0,9$ %ID/cc) bei den mit Doxo-behandelten Tieren detektiert (Abbildung 44 a). Außerdem wurden signifikante Unterschiede zwischen den Tumoren (p=0,0003) und den Muskeln (p=0,03) beider Behandlungsgruppen detektiert, wobei die Kontrolltiere (n=5) im Tumor ($2,0 \pm 0,2$ %ID/cc) und Muskel ($2,4 \pm 0,5$ %ID/cc) eine geringe Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc zeigten. Damit zeigt die Behandlung mit Doxo einen Einfluss nicht nur auf das Tumorgewebe, sondern auch auf das Muskelgewebe der Tiere (Abbildung 44 a).

Anhand der PET-Bilder wurde eine heterogene [^{18}F] α -Fuc-Akkumulation in allen Tumoren visualisiert, wobei in Tumoren von Doxo-behandelten Tieren ein stärkeres PET-Signal detektiert wurde (Abbildung 44 b).

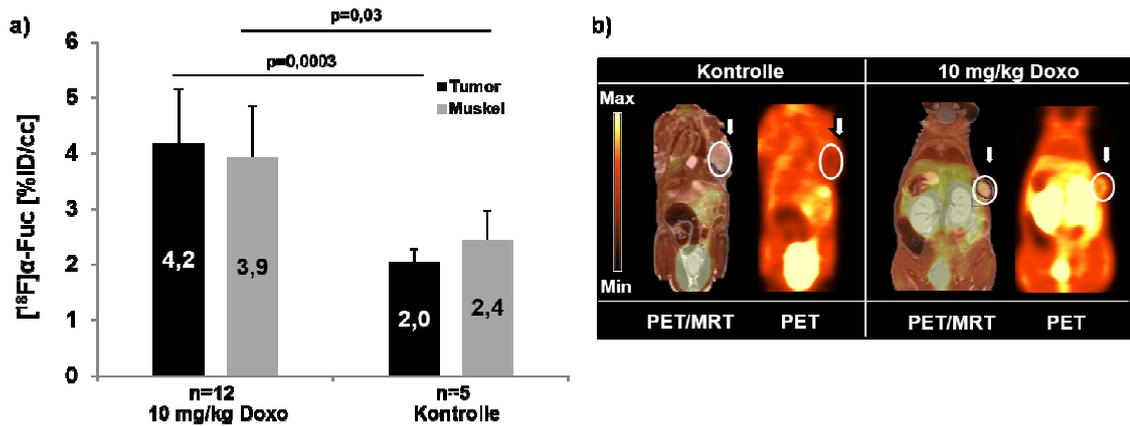


Abbildung 44: [¹⁸F]α-Fuc-PET im HCT116-Xenograftmodell

(a) Darstellung der quantitativen Mittelwertanalyse ± SD [%ID/cc] der [¹⁸F]α-Fuc-PET-Daten im Tumor- und Muskelgewebe beider Gruppen. (b) Exemplarisch sind überlagerte [¹⁸F]α-Fuc-PET/MRT- und [¹⁸F]α-Fuc-PET-Abbildungen von jeweils einem Tier aus jeder Behandlungsgruppe gezeigt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen durchgeführt (mit p<0,05 signifikant).

Abbildung 45 zeigt eine Übersicht von *in vivo* und *ex vivo* Analysen zur [¹⁸F]α-Fuc-Anreicherung im Tumor- und Muskelgewebe für beide Versuchsgruppen. Dabei ist für jede Gruppe der PET/MRT-Datensatz eines repräsentativen Tumors mit korrespondierender H&E-Histologie, Autoradiographie und dem Ergebnis des SA-β-Gal-Assays dargestellt. Ein repräsentatives Muskelfragment wurde in korrespondierender H&E-Histologie, Autoradiographie und SA-β-Gal-Assays-Ergebnis gezeigt.

Die Ergebnisse der Autoradiographie und des SA-β-Gal-Assays konnten die eindeutigen Unterschiede aus der Mittelwertanalyse der PET-Daten zwischen den beiden Gruppen bestätigen. Dabei wurde im Tumor von mit Doxo-behandelten Tieren im Vergleich zum Tumor der Kontrolltiere ein stärkeres [¹⁸F]α-Fuc-Autoradiographie-Signal detektiert. Außerdem zeigte der SA-β-Gal-Assay eine stärkere blaue Färbung der Tumorschnitten von Doxo-behandelten im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 45).

Die mittels PET ermittelte, hohe [¹⁸F]α-Fuc-Anreicherung im Muskelgewebe von Doxo-behandelten Tieren wurde mit einem starken Autoradiographiesignal bestätigt (Abbildung 45). Trotz der hohen [¹⁸F]α-Fuc-Anreicherung wurde in allen untersuchten Muskeln von Doxo-behandelten Tieren ein negatives Ergebnis im SA-β-Gal-Assay ermittelt. Die Muskeln von Kontrolltieren wiesen ein sehr schwaches Signal in der Autoradiographie sowie ein negatives Ergebnis im SA-β-Gal-Assay auf (Abbildung 45).

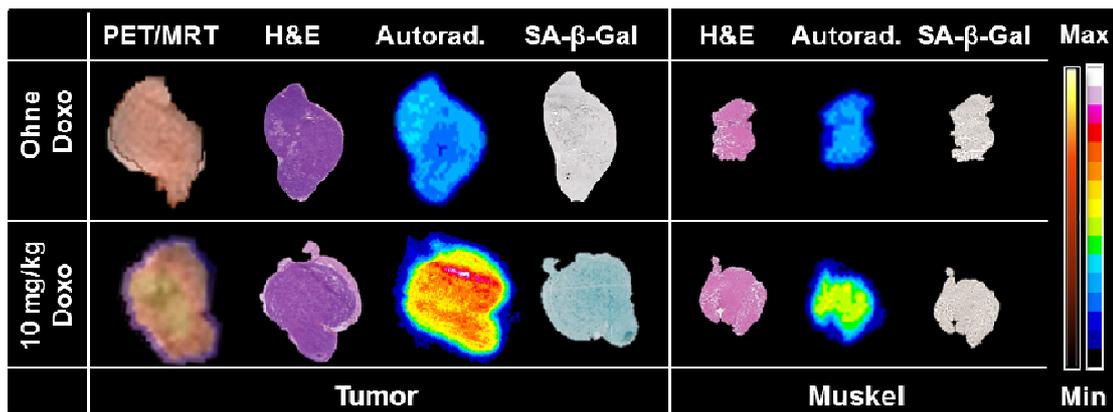


Abbildung 45: Übersicht der $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Akkumulation im HCT116-Xenograftmodell

Die Korrelation der PET/MRT-Daten mit Ergebnissen aus den *ex vivo* Versuchen (H&E-Histologie, Autoradiographie und SA-β-Gal-Assay) ist an jeweils einem exemplarischen Tumor und Muskel aus jeder Gruppe nach der $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Tracerinjektion dargestellt.

4.3.1.3 Evaluierung von $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ *in vivo* im Hras-Allograftmodell

Als nächstes wurde das subkutane Hras-Allograftmodell (siehe 3.5.3.1.3) für die Etablierung des neuen $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Tracers verwendet. Es wurden dynamische PET-Messungen (60 min) mit jeweils zwei Tieren aus jeder Behandlungsgruppe durchgeführt, wobei die Tumoren aus der Doxy-behandelten Gruppe als Kontroll- und aus der Doxy-unbehandelten Gruppe als seneszente Tumoren betrachtet wurden.

Abbildung 46 zeigt die TACs der $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Anreicherung im Tumor- und Muskelgewebe in beiden Versuchsgruppen. Beide Tumor-TACs verlaufen sehr ähnlich, wobei Tumoren aus der Gruppe ohne Doxy-Behandlung von der ersten Minute nach Injektion generell eine höhere Aufnahme von $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ zeigten (Abbildung 46 a). In den folgenden 40 Minuten der PET-Messung nach Tracerinjektion lag die Anreicherung in den Tumoren ohne Doxy-Behandlung zwischen $3,2 \pm 1,5$ %ID/cc und $4,6 \pm 0,7$ %ID/cc sowie bei den Tumoren der Doxy-behandelten Tiere zwischen $2,5 \pm 1,7$ %ID/cc und $3,0 \pm 1,8$ %ID/cc. In den letzten 20 Minuten der Messung wurde eine schwache Regression im Verlauf beider Tumor-TACs beobachtet, was auf den Abtransport des Tracers aus dem Tumorgewebe hindeutet (Abbildung 46 a).

Beide Muskel-TACs verliefen unterschiedlich (Abbildung 46 b). Die Muskel-TAC der Doxy-behandelten Tiere schwankte ab der ersten bis zu 40ten Minute zwischen $3,5 \pm 1,2$ %ID/cc und $4,3 \pm 1,2$ %ID/cc und fiel in den letzten 20 Minuten auf $3,0 \pm 0,0$ %ID/cc ab (Abbildung 46 b). Im Gegensatz dazu stieg die Muskel-TAC der Doxy-unbehandelten Tiere, 11 Minuten nach Tracerinjektion, langsam bis $2,8 \pm 0,3$ % an und verlief schließlich für ca. 30 weitere Minuten im Bereich bis $3,0 \pm 0,4$ %ID/cc relativ konstant, bis sie anschließend auf $2,6 \pm 0,9$ %ID/cc abfiel.

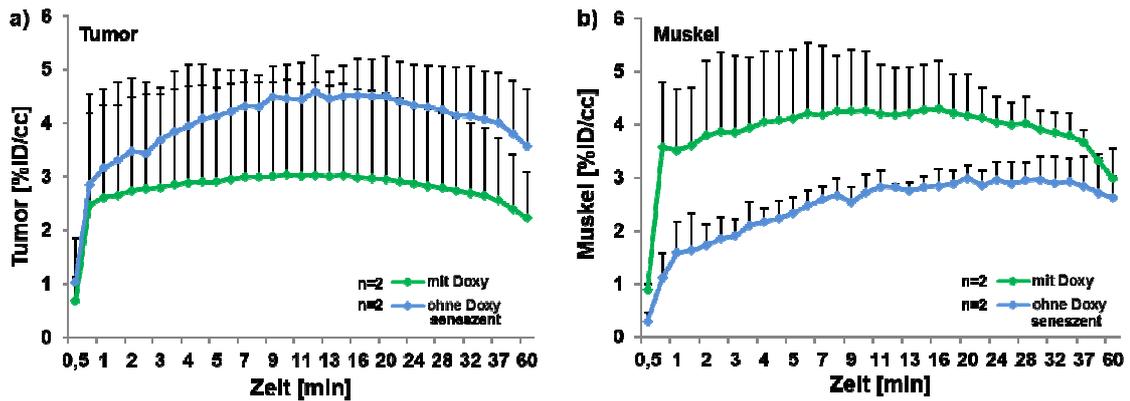


Abbildung 46: TACs der $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Anreicherung im Hras-Allograftmodell

Quantitative Darstellung der Dynamik der $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Tracer-Anreicherung im Tumor- **a)** und Muskelgewebe **b)** der Versuchsgruppen mit Doxy- ($n=2$) und ohne Doxy-Behandlung ($n=2$). $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Anreicherung (Mittelwert \pm SD [%ID/cc]) wurde gegen die Zeit [min] nach Tracerinjektion aufgetragen.

Es wurden statische PET-Messungen 50 min nach $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Tracerinjektion durchgeführt. Diese wurden gemeinsam mit den letzten zehn Minuten von den dynamischen $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -PET-Messungen mittels quantitativer Mittelwertanalyse ausgewertet. Dabei wurde eine signifikant ($p < 0,001$) höhere $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Anreicherung in den Tumoren der Tiere ohne Doxy-Behandlung ($n=14$; $3,3 \pm 0,5$ %ID/cc) im Vergleich zu Tumoren der Tiere mit Doxy-Behandlung ($n=6$; $1,5 \pm 0,2$ %ID/cc) ermittelt (Abbildung 47 a). Die $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Anreicherung im Muskel der Doxy-behandelten Tiere ($2,1 \pm 0,8$ %ID/cc) war ähnlich zu der von Tieren ohne Doxy-Behandlung ($2,3 \pm 0,5$ %ID/cc); Abbildung 47 a). Die Analyse der PET/MRT-Bilder zeigte eine heterogene Aufnahme von $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ in allen Tumoren, wobei die Tumoren ohne Doxy-Behandlung ein stärkeres PET-Signal aufwiesen (Abbildung 47 b). Für eine zusätzliche Prüfung der p53hpRNA gekoppelten GFP-Expression wurde am Tag der PET-Messungen eine OI-Messung mit allen Tieren durchgeführt. Dabei wurde ein GFP-Signal ausschließlich in den Tumoren der Tieren mit Doxy-Behandlung detektiert (Abbildung 47 b).

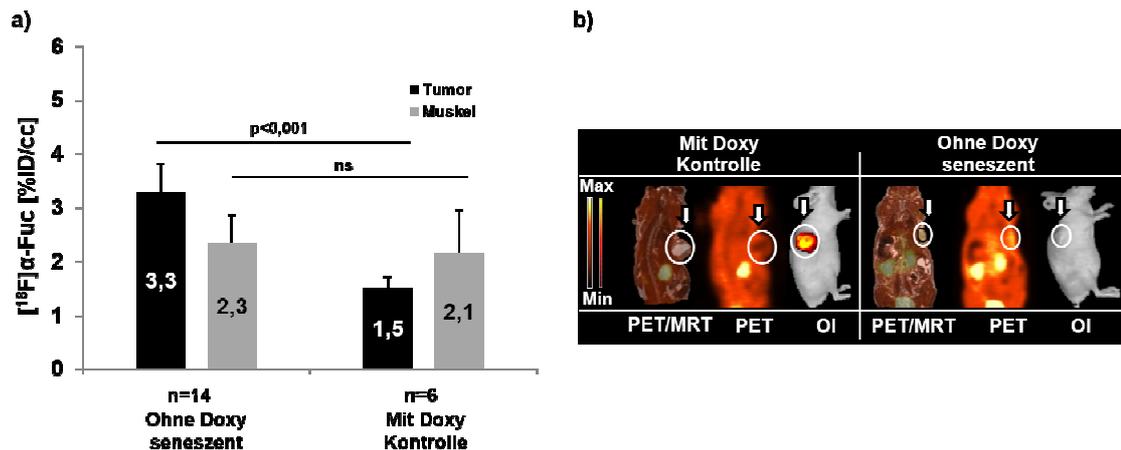


Abbildung 47: $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -PET im Hras-Allograftmodell

(a) Darstellung der quantitativen Mittelwertanalyse \pm SD [%ID/cc] der $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -PET-Daten im Tumor- und Muskelgewebe beider Gruppen. (b) Exemplarisch sind überlagerte $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -PET/MRT, $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -PET-Abbildungen und OI-Aufnahmen von jeweils einem Tier aus jeder Behandlungsgruppe gezeigt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen durchgeführt (mit $p < 0,05$ signifikant).

Die Ergebnisse der *ex vivo* Untersuchungen zur Anreicherung von $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ im Hras-Allograftmodell wurden in Abbildung 48 dargestellt. Jeweils ein repräsentativer Tumor aus jeder Gruppe ist mit dem korrespondierenden PET/MRT-Datensatz, der H&E-Histologie, der Autoradiographie und den Ergebnissen des SA- β -Gal-Assays gezeigt. Die Tumoren der Tiere mit Doxy-Behandlung zeigten ein schwaches Signal im PET, in der Autoradiographie sowie ein negatives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay. Diese Ergebnisse bekräftigen die quantitative Mittelwertanalyse der PET-Daten.

Außerdem bestätigt die Autoradiographie die beobachtete höhere $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Anreicherung in Tumoren ohne Doxy-Behandlung. Dabei korrelieren die Bereiche mit hoher Intensität in der Autoradiographie mit den Bereichen hoher Intensität des PET/MRT-Bildes. Zusätzlich wurde ein stark positives Ergebnis des SA- β -Gal-Assays in Tumoren ohne Doxy-Behandlung im Vergleich zu Tumoren mit Doxy-Behandlung ermittelt. Die blaue Färbung des SA- β -Gal-Assays korrespondiert wiederum mit dem starken Signal im PET und in der Autoradiographie von Tumoren ohne Doxy-Behandlung (Abbildung 48 links). Die *ex vivo* Untersuchung des Muskelgewebes beider Versuchsgruppen wies keinerlei Unterschiede auf. Des Weiteren wurde im Muskelgewebe beider Gruppen ein sehr schwaches Signal in der Autoradiographie sowie ein negatives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay ermittelt (Abbildung 48 rechts).

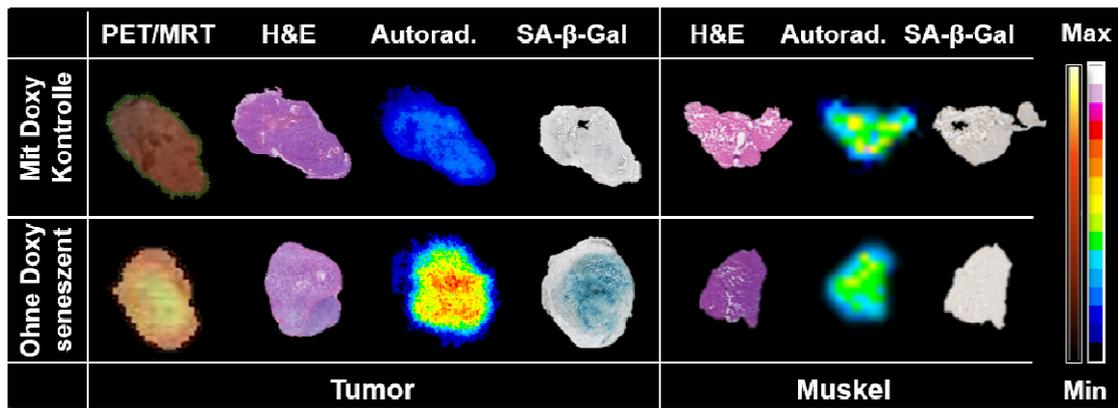


Abbildung 48: Übersicht der $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Akkumulation im Hras-Allograftmodell

Die Korrelation der PET/MRT-Daten ist mit den Ergebnissen aus den *ex vivo* Versuchen (H&E-Histologie, Autoradiographie und SA- β -Gal-Assay) an jeweils einem exemplarischen Tumor und Muskel aus jeder Gruppe nach der $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Tracerinjektion dargestellt.

Zusammenfassend wurden in beiden Modellen bei der $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Anreicherung im Tumor signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen mittels der quantitativen Mittelwertanalyse errechnet, wobei eine signifikant höhere Anreicherung von $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ jeweils in den seneszenten Tumoren detektiert wurde. Außerdem scheint die Behandlung mit Doxo im HCT116-Modell eine Veränderung der Muskulatur hervorzurufen, die mit dem $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Tracer erfassbar ist. Zusätzlich wurden in Tabelle 10 die Ergebnisse der quantitativen Mittelwertanalyse der $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -PET-Daten zusammengefasst und als %ID/cc für Tumor- und Muskelgewebe sowie als „*tumor to muscle ratio*“ (TMR) und „*standardized uptake value*“ (SUV) aller Gruppen von beiden Tiermodellen dargestellt.

Tabelle 10: $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$ -Anreicherung im HCT116- und Hras-Tiermodell

	$[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$			
	HCT116 ohne Doxo Kontrolle	HCT116 10 mg/kg Doxo seneszent	Hras mit Doxy Kontrolle	Hras ohne Doxy seneszent
%ID/cc Tumor	2,0 ± 0,2	4,2 ± 1,0	1,5 ± 0,2	3,3 ± 0,5
%ID/cc Muskel	2,4 ± 0,5	3,9 ± 0,9	2,1 ± 0,8	2,3 ± 0,5
TMR	0,8 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,7 ± 0,4	1,4 ± 0,2
SUV	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,1
Tierzahl	n=5	n=12	n=6	n=14

4.3.2 Evaluierung von [^{18}F] β -Gal als Tracer zur Detektion von Seneszenz

4.3.2.1 *In vitro* Untersuchung des [^{18}F] β -Gal-Tracers

In vitro Anreicherung von [^{18}F] β -Gal wurde ebenfalls mit HCT116- und Hras-Zelllinien untersucht. Die Behandlung der Zellen erfolgte wie bereits in Tabelle 3 beschrieben. Pro Zelllinie wurden jeweils eine Kontrollgruppe und eine seneszente Gruppe gebildet. Nach Inkubation von Zellen mit [^{18}F] β -Gal wurden diese gewaschen und die angereicherte Aktivität mittels eines Gammacounters erfasst und ausgewertet.

Abbildung 49 zeigt die Ergebnisse der [^{18}F] β -Gal-Anreicherung in beiden Zelllinien, dabei ist die Aktivität jeweils in $\mu\text{Ci}/10^7$ Zellen angegeben. Zwischen den Behandlungsgruppen der HCT116 Zellen wurde ein signifikanter ($p < 0,001$) Unterschied detektiert, wobei eine 3-fach höhere [^{18}F] β -Gal-Akkumulation in der mit 250 nM Doxo behandelten seneszenten Gruppe ($n=5$; $0,3 \pm 0,0 \mu\text{Ci}$) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe ($n=5$; $0,1 \pm 0,0 \mu\text{Ci}$) detektiert wurde (Abbildung 49 a).

In den Hras-Zellen wurde ebenso ein signifikanter ($p < 0,001$) Unterschied zwischen den Gruppen detektiert. Dabei war die [^{18}F] β -Gal-Anreicherung in seneszenten Hras-Zellen ohne Doxy-Behandlung ($n=5$; $5,2 \pm 0,2 \mu\text{Ci}$) ebenfalls um das 3-fache höher als in den Kontrollzellen, die mit Doxy behandelt wurden ($n=5$; $1,7 \pm 0,2 \mu\text{Ci}$; Abbildung 49 b).

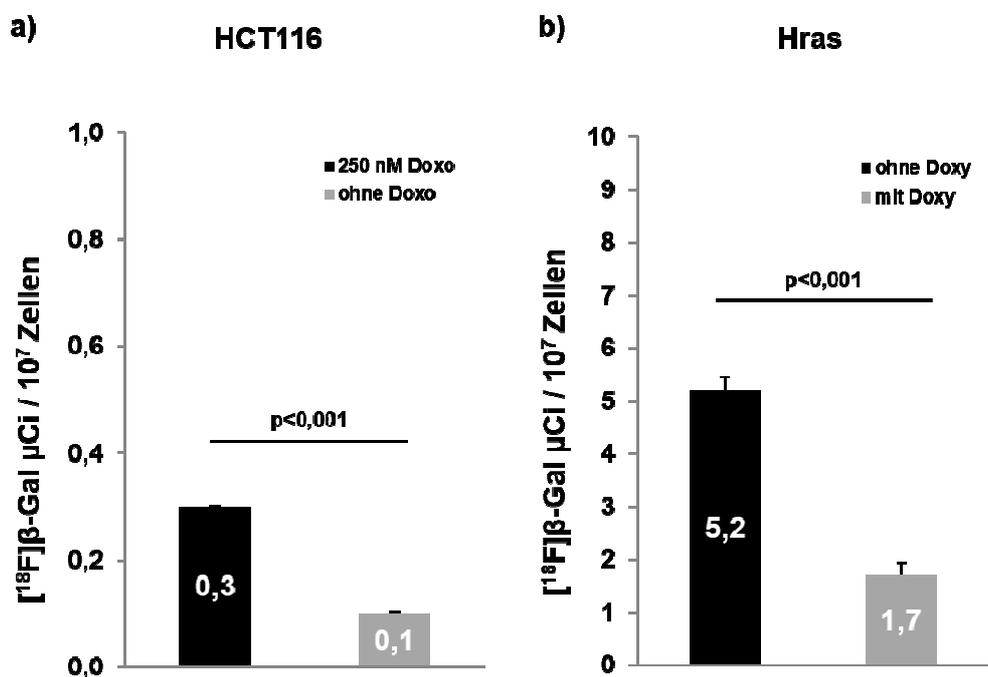


Abbildung 49: *In vitro* Untersuchung des [^{18}F] β -Gal-Tracers in HCT116- und Hras-Zelllinien

Die Anreicherung von [^{18}F] β -Gal wurde in unterschiedlich behandelten HCT116- a) und Hras- b) Zellen dargestellt. Die schwarzen Diagrammbalken repräsentieren jeweils die seneszenten Zellen und die grauen Diagrammbalken die Kontrollzellen. Alle Werte wurden als Mittelwerte in

μCi aus zehn Proben mit 10^7 Zellen \pm SD aufgeführt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen durchgeführt (mit $p < 0,05$ signifikant).

4.3.2.2 Evaluierung von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ *in vivo* im HCT116-Xenograftmodell

$[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ wurde, wie bereits $[^{18}\text{F}]\alpha\text{-Fuc}$, zunächst am subkutanen HCT116-Xenograftmodell untersucht (siehe 3.5.3.1.2).

Die dynamische $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -PET-Messung wurde in jeweils zwei mit PBS (Kontrolle) oder Doxo-behandelten Tieren über eine Zeitdauer von 60 Minuten durchgeführt. Die Ergebnisse der quantitativen Mittelwertanalyse von dynamischen PET-Daten gegen die Zeit [min] wurden für Tumor- und Muskelgewebe [%ID/cc] in Abbildung 50 dargestellt. Die Tumor-TACs beider Gruppen stiegen in den ersten zwei Minuten an und erreichten anschließend im Bereich zwischen $2,0 \pm 2,2$ %ID/cc und $2,2 \pm 1,0$ %ID/cc in der Doxo-behandelten Gruppe sowie im Bereich $1,9 \pm 0,8$ %ID/cc und $1,7 \pm 0,7$ %ID/cc in der Kontrollgruppe einen Gleichgewichtszustand. In den letzten 20 Minuten der PET-Messung wurde ein leichter Abfall der beiden Tumor-TACs beobachtet (Abbildung 50 a).

Die Muskel-TACs beider Gruppen verliefen in beiden Gruppen sehr ähnlich, wobei beide TACs zwei Minuten nach Injektion einen Gleichgewichtszustand im Bereich zwischen $1,3 \pm 0,5$ %ID/cc und $1,5 \pm 0,4$ %ID/cc in Doxo-behandelten sowie im Bereich zwischen $1,1 \pm 1,0$ %ID/cc und $1,5 \pm 0,2$ %ID/cc in der Kontrollgruppe erreichten. In den letzten 20 Minuten wurde ein Abfallen beider Muskel-TACs beobachtet (Abbildung 50 b).

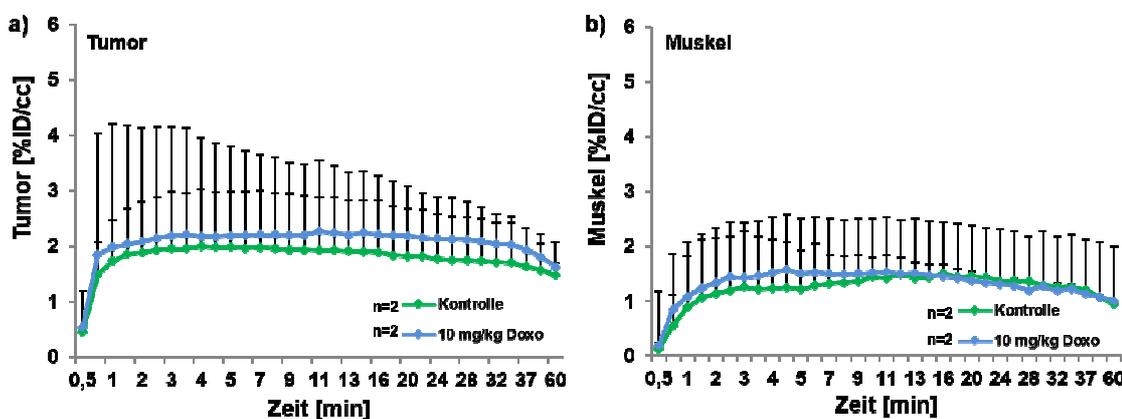


Abbildung 50: TACs der $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Anreicherung im HCT116-Xenograftmodell

Quantitative Darstellung der Dynamik von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Anreicherung im Tumor- **a)** und Muskelgewebe **b)** der Tiere aus Kontroll- ($n=2$) und Doxo-Gruppe ($n=2$). Die Akkumulation von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ (Mittelwerte \pm SD [%ID/cc]) wurde gegen die Zeit [min] nach Tracerinjektion aufgetragen.

Die quantitative Mittelwertanalyse der statischen PET-Daten zeigt eine Tendenz zur höheren $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Anreicherung in Doxo-behandelten Tumoren ($n=5$; $1,9 \pm 0,7$ %ID/cc) im Vergleich zu Kontrolltumoren ($n=5$; $1,1 \pm 0,4$ %ID/cc; Abbildung 51 a). Au-

ßerdem liegt die [^{18}F] β -Gal-Anreicherung in den Kontrolltumoren in derselben Größenordnung wie die Tracer-Akkumulation im Referenzgewebe Muskel beider Gruppen ($1,0 \pm 0,2$ und $1,1 \pm 0,4$ %ID/cc; Abbildung 51 a).

Bei der Betrachtung der PET-Bilder konnte eine heterogene Anreicherung von [^{18}F] β -Gal in beiden Gruppen detektiert werden, wobei deutliche Hotspots mit einem sehr starken PET-Signal in den Tumoren der mit Doxo-behandelten Gruppe detektiert wurde (Abbildung 51 b).

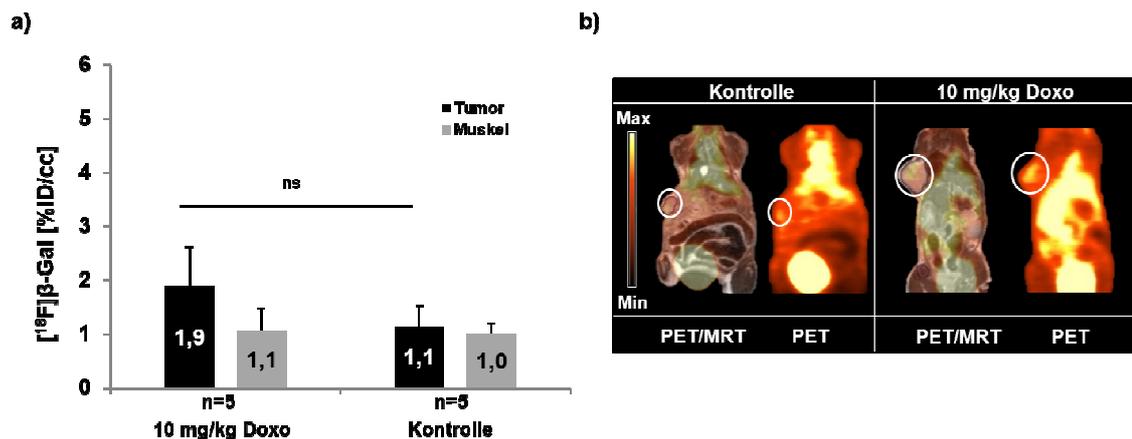


Abbildung 51: [^{18}F] β -Gal-PET im HCT116-Xenograftmodell

(a) Darstellung der quantitativen Mittelwertanalyse \pm SD [%ID/cc] der [^{18}F] β -Gal -PET-Daten im Tumor- und Muskelgewebe beider Gruppen. (b) Exemplarisch sind überlagerte [^{18}F] β -Gal-PET/MRT und [^{18}F] β -Gal-PET-Abbildungen von jeweils einem Tier aus jeder Behandlungsgruppe gezeigt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen durchgeführt (mit $p < 0,05$ signifikant)

Abbildung 52 zeigt die Ergebnisse aus den *ex vivo* Untersuchungen zur [^{18}F] β -Gal-Anreicherung im HCT116-Xenograftmodell. Die [^{18}F] β -Gal-Autoradiographie bestätigten die PET-Daten beider Behandlungsgruppen. Es wurde ein schwaches Signal im PET und in der Autoradiographie in den Kontrolltumoren ermittelt. Der hierfür repräsentative Tumorbereich mit geringer PET-Signalintensität zeigte in korrespondierenden Tumorfragmenten ein schwaches Signal in der Autoradiographie und ein negatives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay. Dagegen, wurde ein stärkeres PET- und Autoradiographie-Signal sowie eine positive SA- β -Gal-Aktivität in den korrespondierenden Doxo-behandelten Tumorfragmenten detektiert (Abbildung 52 links).

Im Muskelgewebe der beiden Gruppen wurden keine Unterschiede in den *ex vivo* Untersuchungen detektiert. Die geringe [^{18}F] β -Gal-Anreicherung im Muskelgewebe beider Gruppen wurde durch ein schwaches Signal in der Autoradiographie bestätigt. Außerdem wurde in allen Muskeln ein negatives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay detektiert (Abbildung 52 rechts).

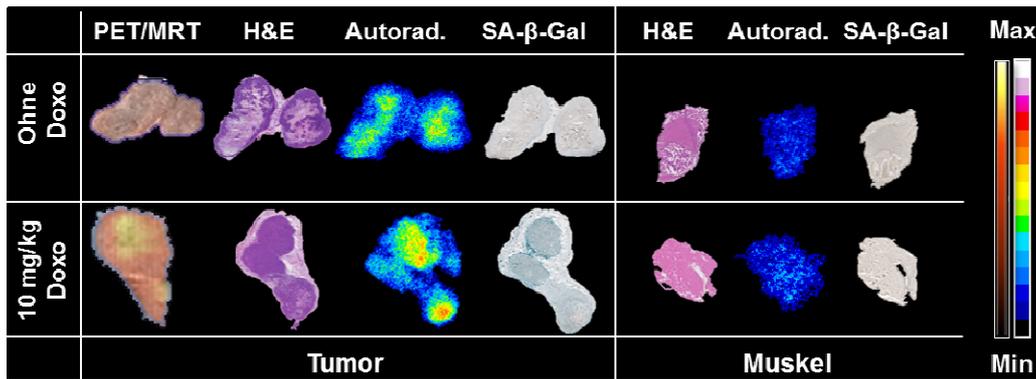


Abbildung 52: Übersicht der $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Akkumulation im HCT116-Xenograftmodell

Die Korrelation der PET/MRT-Daten mit den entsprechenden Ergebnissen aus den *ex vivo* Versuchen (H&E-Histologie, Autoradiographie und SA- β -Gal-Assay) ist an jeweils einem exemplarischen Tumor und Muskel aus jeder Gruppe nach der $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Tracerinjektion dargestellt.

4.3.2.3 Evaluierung von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ *in vivo* im Hras-Allograftmodell

Als nächstes wurde das Hras-Allograftmodell für die Evaluierung des $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Tracers verwendet (siehe 3.5.3.1.3). Hierfür wurden über 90 Minuten dynamische PET-Messungen mit drei Tieren aus der Doxy-behandelten und fünf Tieren aus der Doxy-unbehandelten Gruppe nach der Injektion von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ durchgeführt. Die Ergebnisse der quantitativen Mittelwertanalyse [%ID/cc] gegen die Zeit [min] wurden in Abbildung 53 als TACs dargestellt.

Die Tumor-TAC der Tiere ohne Doxy-Behandlung verlief über die gesamte Messdauer oberhalb der Tumor-TAC von Tieren mit Doxy-Behandlung. Außerdem stellte sich in der Tumor-TAC der Gruppe ohne Doxy-Behandlung zwischen der zweiten Minute ($3,4 \pm 0,9$ %ID/cc) und der 18ten Minute ($3,3 \pm 1,1$ %ID/cc) nach Tracerinjektion ein Gleichgewicht ein. Danach fiel die Tumor-TAC auf $1,6 \pm 1,3$ %ID/cc stetig ab (Abbildung 53 a). Die Tumor-TAC der Tiere mit Doxy-Behandlung blieb von der vierten ($2,3 \pm 0,7$ %ID/cc) bis zu zwölften Minute ($2,2 \pm 0,5$ %ID/cc) nach Injektion von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ konstant und fiel anschließend bis $1,3 \pm 0,6$ %ID/cc stetig ab (Abbildung 53 a).

Im Verlauf der Muskel-TACs konnten keine eindeutigen Unterschiede detektiert werden. Beide Kurven stiegen in den ersten zwei Minuten steil an und fielen ab der vierten Minute kontinuierlich ab (Abbildung 53 b).

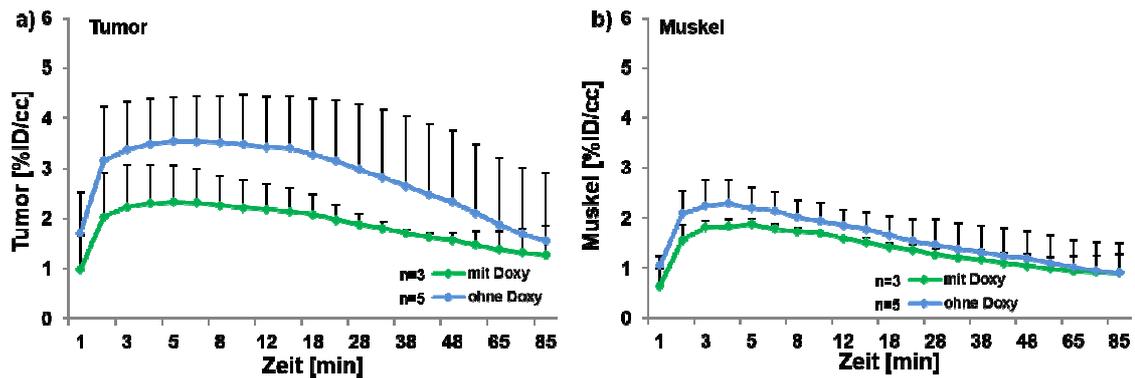


Abbildung 53: TACs der $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Anreicherung im Hras-Allograftmodell

Die Dynamik der Anreicherung von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ im Hras-Modell wurde quantitativ im Tumor- **a)** und Muskelgewebe **b)** der Tiere mit Doxy- ($n=3$) und ohne Doxy-Behandlung ($n=5$) dargestellt. Die $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Anreicherung (Mittelwerte \pm SD [%ID/cc]) wurde gegen die Zeit [min] nach Tracerinjektion aufgetragen. Die Daten wurden auf die injizierte Aktivitätsmenge normiert.

Die quantitative Mittelwertanalyse der statischen $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -PET-Daten im Hras-Allograftmodell ist in Abbildung 54 a) dargestellt. Die PET-Daten wurden 60 Minuten nach Tracerinjektion ausgewertet. Es wurde eine signifikante ($p=0,002$) 2,3-fach erhöhte Anreicherung in den Tumoren der Tiere ohne Doxy-Behandlung ($n=14$: $1,6 \pm 0,6$ %ID/cc) im Vergleich zu Tumoren von Tieren mit Doxy-Behandlung ($n=6$: $0,7 \pm 0,1$ %ID/cc) detektiert (Abbildung 54 a).

Es wurden sehr geringe Unterschiede in der $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Anreicherung im Muskelgewebe beider Gruppen (ohne Doxy: $0,8 \pm 0,3$ %ID/cc; mit Doxy: $0,6 \pm 0,2$ %ID/cc) detektiert. Dabei war die Anreicherung von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ im Muskelgewebe beider Gruppen vergleichbar mit der Anreicherung im Kontrolltumor (Abbildung 54 a).

Bei der Betrachtung der PET-Bilder wurde ein stärkeres Signal in den seneszenten Tumoren von Tieren ohne Doxy-Behandlung detektiert. Außerdem wurde, wie erwartet, nur in Kontrolltumoren mit Doxy-Behandlung ein GFP-Signal detektiert (Abbildung 54 b).

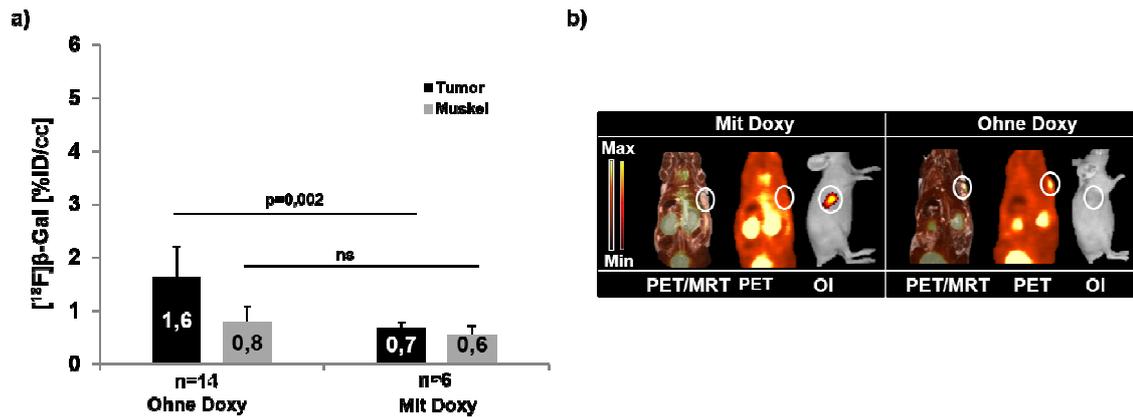


Abbildung 54: $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -PET im Hras-Allograftmodell

(a) Darstellung der quantitativen Mittelwertanalyse \pm SD [%ID/cc] der $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -PET-Daten im Tumor- und Muskelgewebe beider Gruppen. (b) Exemplarisch sind überlagerte $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -PET/MRT-, $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -PET-Abbildungen und OI-Aufnahmen von jeweils einem Tier aus jeder Behandlungsgruppe gezeigt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen durchgeführt (mit $p < 0,05$ signifikant).

Die *ex vivo* Untersuchungsergebnisse bestätigen die Resultate aus der $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -PET-Analyse im Hras-Allograftmodell (Abbildung 55). In den Kontrolltumoren von Doxy-behandelten Tieren wurde ein schwaches Signal in der Autoradiographie detektiert, was in der Abbildung durch Bereiche mit geringer Intensität zu erkennen ist. Die korrespondierenden PET/MRT-Abbildungen zeigten ebenfalls ein schwaches PET-Signal und das korrespondierende Tumorfragment wies ein negatives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay auf (Abbildung 55 links oben). Im Gegensatz dazu wurde ein stärkeres Signal in der Autoradiographie und PET in den seneszenten Tumoren der Tiere ohne Doxy-Behandlung detektiert. Zusätzlich korrelieren die Bereiche des positiven SA- β -Gal-Assays mit den Bereichen der höheren $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Akkumulation in PET/MRT und Autoradiographie in den seneszenten Tumoren (Abbildung 55 links unten).

Es wurde kein Unterschied in der Anreicherung von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ im Muskelgewebe zwischen den beiden Gruppen in der Autoradiographie detektiert. Des Weiteren erwies sich der SA- β -Gal-Assay von korrespondierenden Muskelgeweben als negativ (Abbildung 55 rechts).

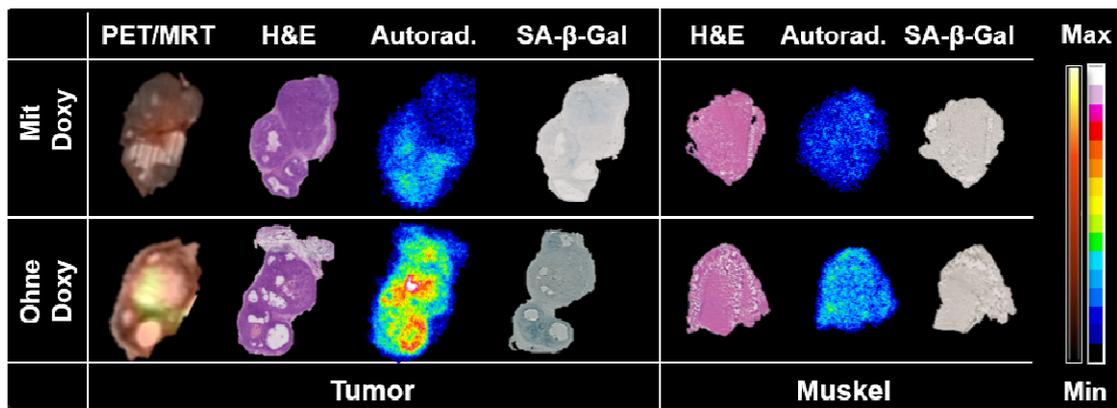


Abbildung 55: Übersicht der $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Akkumulation im Hras-Allograftmodell

Die Korrelation der PET/MRT-Daten ist mit den Ergebnissen aus den *ex vivo* Versuchen (H&E-Färbung, Autoradiographie und SA- β -Gal-Assay) an jeweils einem exemplarischen Tumor und Muskel aus jeder Gruppe nach der $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Tracerinjektion dargestellt.

Der neu entwickelte $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Tracer zeigte in beiden ausgewählten Tiermodellen Unterschiede bei der Anreicherung im Tumor zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Im Hras-Allograftmodell wurde eine signifikante und im HCT116-Xenograftmodell nur eine tendenziell stärkere $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Akkumulation in den jeweiligen seneszenten Tumoren ermittelt. Die Anreicherung von $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ im Muskelgewebe zeigte in beiden Mausmodellen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Tabelle 11 stellt eine Übersicht aller Ergebnisse aus der quantitativen Mittelwertanalyse der statischen $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -PET-Daten in $\%ID/cc \pm SD$ für Tumor und Muskel sowie TMR und SUV von allen Versuchsgruppen beider Modelle zusammen.

Tabelle 11: $[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$ -Anreicherung im HCT116- und Hras-Tiermodell

	$[^{18}\text{F}]\beta\text{-Gal}$			
	HCT116 ohne Doxy Kontrolle	HCT116 10 mg/kg Doxo seneszent	Hras mit Doxy Kontrolle	Hras ohne Doxy seneszent
%ID/cc Tumor	1,1 \pm 0,4	1,9 \pm 0,7	0,7 \pm 0,2	1,6 \pm 0,6
%ID/cc Muskel	1,0 \pm 0,2	1,1 \pm 0,4	0,6 \pm 0,2	0,8 \pm 0,3
TMR	1,1 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	2,0 \pm 0,4
SUV	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1
Tierzahl	n=5	n=5	n=6	n=14

4.3.3 Maximalwertanalyse der [^{18}F] α -Fuc- und [^{18}F] β -Gal-PET-Daten

Die Maximalwertanalyse (siehe 3.7.1) der statischen PET-Daten wurde aufgrund der beobachteten heterogenen Anreicherung beider neuen Tracer [^{18}F] α -Fuc und [^{18}F] β -Gal im Tumorgewebe beider Mausmodelle vorgenommen. Die Ergebnisse für beide Tracer sind in Abbildung 56 zusammengefasst.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Maximalwerten [%ID/cc] der [^{18}F] α -Fuc-Akkumulation zwischen den Behandlungsgruppen des HCT116-Xenograftmodells detektiert. Dabei wurde lediglich eine Tendenz zu einer höheren Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in seneszenten Tumoren ($5,0 \pm 1,2$ %ID/cc) von Tieren mit Doxo-Behandlung im Gegensatz zu Kontrolltumoren ($3,6 \pm 1,4$ %ID/cc) von Tieren mit PBS-Behandlung ermittelt (Abbildung 56 a).

Im Hras-Allograftmodell hingegen wurde ein signifikanter ($p < 0,001$) Unterschied in der [^{18}F] α -Fuc-Akkumulation zwischen den beiden Behandlungsgruppen detektiert, wobei die seneszenten Tumoren ($4,1 \pm 0,6$ %ID/cc) der Tiere ohne Doxy-Behandlung höhere Maximalwerte bei der Akkumulation von [^{18}F] α -Fuc aufweisen als die Kontrolltumoren ($3,4 \pm 0,6$ %ID/cc; Abbildung 56 b).

Es wurden signifikante Unterschiede in der [^{18}F] β -Gal-Anreicherung zwischen den Behandlungsgruppen in beiden Tiermodellen detektiert. Dabei waren die Maximalwerte bei beiden Tiermodellen annähernd doppelt so hoch in seneszenten Tumoren (HCT116: $2,3 \pm 0,7$ %ID/cc; Hras: $2,2 \pm 0,7$ %ID/cc) im Vergleich zu Kontrolltumoren (HCT116: $1,2 \pm 0,3$ %ID/cc; Hras: $1,1 \pm 0,2$ %ID/cc; Abbildung 56 a, b). Diese Ergebnisse bestätigen die Mittelwertanalyse aller PET-Daten und kristallisieren [^{18}F] β -Gal als möglichen Tracer für die *in vivo* Detektion von Seneszenz heraus.

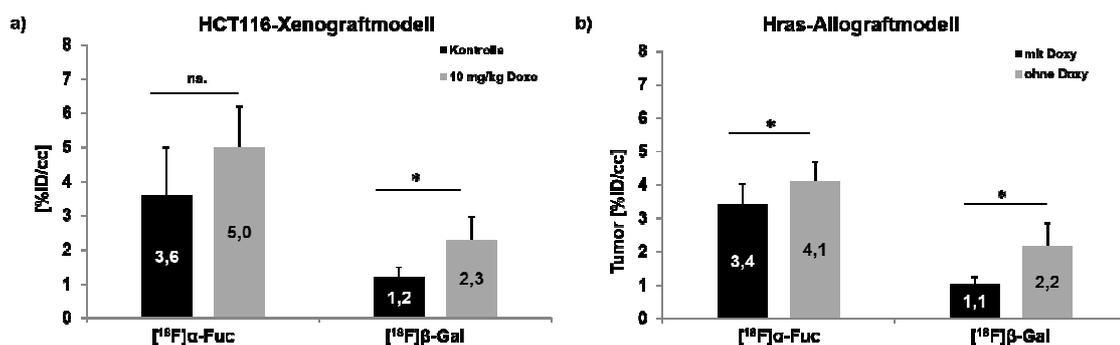


Abbildung 56: Maximalwertanalyse der [^{18}F] α -Fuc- und [^{18}F] β -Gal-PET-Daten

Die Ergebnisse aus der quantitativen Maximalwertanalyse der PET-Daten wurden für die Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc und [^{18}F] β -Gal in den Tumoren beider Versuchsgruppen des HCT116- **a)** und Hras-Modells **b)** dargestellt (Mittelwert \pm SD [%ID/cc]). Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen durchgeführt ($p < 0,05$ signifikant).

4.4 Longitudinale *in vivo* Charakterisierung des vom Patienten abgeleiteten CR-LRB-018P-Modells mittels PET und MRT

In diesem Abschnitt der Arbeit wurden die Ergebnisse der longitudinalen *in vivo* und *ex vivo* Untersuchungen zum CR-LRB-018P-Modell für das kolorektale Karzinom dargestellt. Die Tiere aus zwei Versuchsreihen wurden in jeweils eine PDSX- und eine PDOX-Gruppe zusammengefügt (siehe 3.5.3.2). Insgesamt wurden elf Ratten als PDSX- und neun Ratten als PDOX-Modell zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit vier verschiedenen Tracern [¹⁸F]FDG, [¹⁸F]FLT, [¹⁸F]FMISO, [⁶⁸Ga]RGD untersucht (siehe 3.5.3.2.2). Dabei wurde auf die Unterschiede in der Tracer-Anreicherung im Tumor zur verschiedenen Messzeitpunkten eingegangen. Zusätzlich wurde das Augenmerk auf das Tumorwachstum und die Tracer-Akkumulation zwischen den räumlich unterschiedlich implantierten Tumoren gelegt.

Der Oberschenkelmuskel-Wert [%ID/cc] aus der quantitativen Mittelwertanalyse der PET-Daten wurde als Kontrollgewebe für die Tracer-Anreicherung verwendet. In den exemplarischen PET- und PET/MRT-Abbildungen wurden jeweils ein gleiches Tier pro Zeitpunkt für alle Tracer und die DW-MRT dargestellt. Dabei zeigt die jeweilige Abbildung c) das PDSX-Tier 1.2 und PDOX-Tier 1.2 sowie die jeweilige Abbildung d) PDSX-Tier 6.2 und PDOX-Tier 2.2. Da nicht alle Tiere zu allen Zeitpunkten und mit allen Tracern gemessen wurden, gibt Tabelle 7 eine Übersicht über den Messzeitplan jedes einzelnen Tieres (siehe 3.5.3.2.2). Zusätzlich wurde die individuelle Tracer-Akkumulation in PDSX- und PDOX-Tumoren für alle verwendeten Tracer zu allen untersuchten Zeitpunkten im Anhang 1 dargestellt.

4.4.1 Wachstumsverhalten von PDSX- gegenüber PDOX-Tumoren

Das Volumen der PDSX- und PDOX-Tumoren wurde mittels MRT [mm³] ermittelt. Zwei Wochen nach Tumorimplantation betrug die Tumorgöße aller elf PDSX-Tumoren 172 ± 43 mm³. In Woche sechs stieg das mittlere Tumolvolumen (n = 11) signifikant (p = 0,0003) auf 2487 ± 1768 mm³ an (Abbildung 57 a). Fünf PDSX-Tumoren erreichten bereits in der sechsten Versuchswoche einen Durchmesser von 3 cm und damit das Abbruchkriterium für die Studie. In der zehnten Woche wurde ein weiteres PDSX-Tumor-tragendes Tier aufgrund der Tumorgöße aus dem Versuch genommen. Dabei lag der Mittelwert des Tumolvolumens von sechs Tieren in Woche zehn bei 1915 ± 1980 mm³. In Woche 14 änderte sich die Tumorgöße dieser Tiere kaum (1225 ± 865 mm³; n = 5). Zu diesem Zeitpunkt wurden vier Tiere für die *ex vivo* Untersuchungen getötet und ein Tier wurde für die Untersuchungen in Woche 30 am Leben gelassen (Abbildung 57 a, c).

Das Volumen der PDOX-Tumoren betrug in der zweiten Versuchswoche 317 ± 124 mm³ (n=9) und stieg signifikant (p=0,0001) in Woche sechs auf

1458 ± 423 mm³ (n=9) an (Abbildung 57 b). Die Änderung des Tumorzvolumens zu Woche zehn war sehr gering (1504 ± 919 mm³; n=9). In dieser Woche wurden ein Tier aufgrund des Tumordurchmessers und drei weitere Tiere aufgrund der Entwicklung von zusätzlichen subkutanen Tumoren an der Operationsnarbe für IHC-Analysen getötet. Die restlichen fünf Tiere entwickelten in Woche 14 Tumorzvolumina von 1152 ± 1135 mm³. Zu diesem Zeitpunkt wurden drei der Tiere für die Autoradiographie nach [¹⁸F]FDG-Injektion getötet und zwei Tiere für die Untersuchungen in Woche 30 am Leben gelassen (Abbildung 57 b, d).

Es wurden deutliche Unterschiede in der Zunahme des Tumorzvolumens zwischen den subkutan und orthotop implantierten Tumoren beobachtet. Dabei stieg in PDSX-Tumor-tragenden Tieren das Tumorzvolumen zwischen Woche zwei und Woche sechs um das 14-fache an, wobei das Tumorzvolumen der PDOX-Tumor-tragenden Tieren zu selben Zeit nur um das 4,5-fache anstieg.

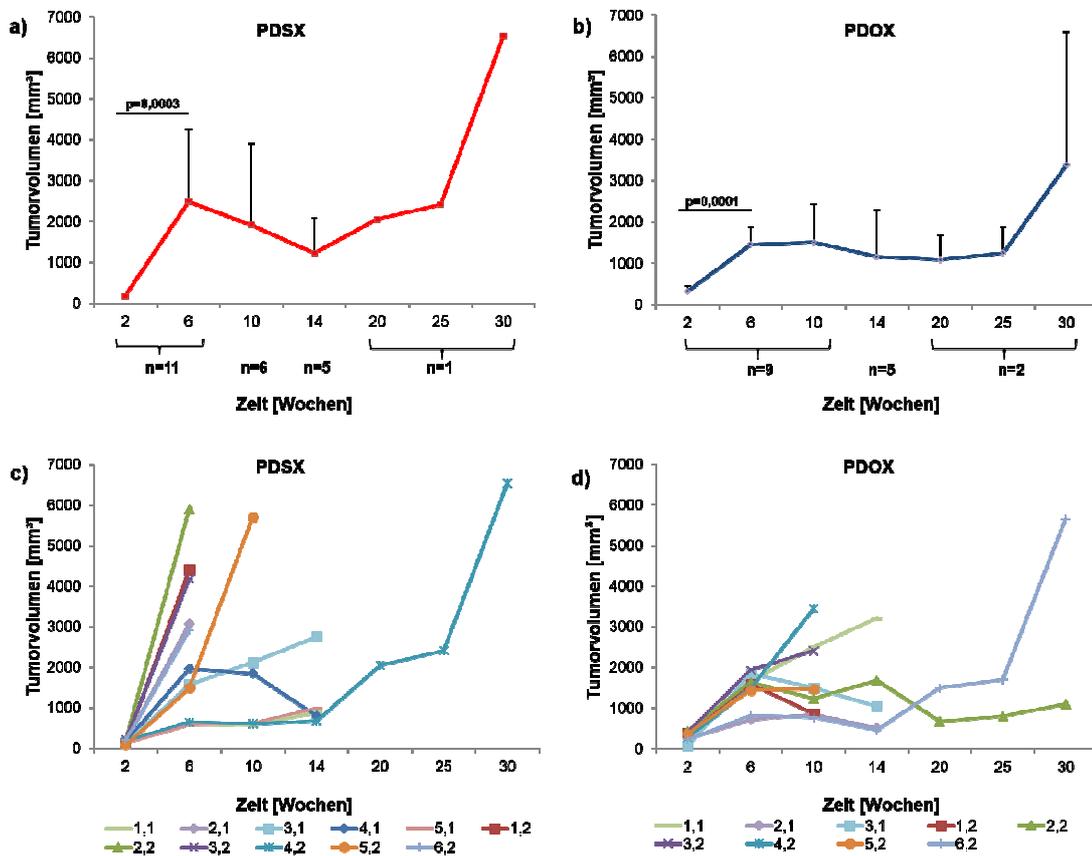


Abbildung 57: Tumorwachstum von PDSX- und PDOX-Tumoren

Die Tumorzvolumina (Mittelwerte ± SD [mm³]) der PDSX- (n=11) a) und PDOX- (n=9) b) Tumor-tragenden Tiere sowie das individuelle Tumorwachstum jedes einzelnen PDSX- c) und PDOX- d) Tumor-tragenden Tieres wurde dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den Zeitpunkten innerhalb der jeweiligen Gruppe durchgeführt.

4.4.2 Longitudinale Untersuchung des Glukosestoffwechsels mittels [¹⁸F]FDG-PET in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren

Mit Hilfe der longitudinalen *in vivo* [¹⁸F]FDG-PET-Studie wurde der Glukosestoffwechsel in subkutanen und orthotopen Tumoren über einen Zeitraum von 30 Wochen beobachtet. Die Ergebnisse der [¹⁸F]FDG-Akkumulation im Tumor und im Referenzgewebe Muskel wurden als Mittelwerte \pm SD in %ID/cc (Abbildung 58 a, b) und als exemplarische PET- und fusionierte PET/MRT-Bilder dargestellt (Abbildung 58 c, d).

Die höchste Anreicherung von [¹⁸F]FDG in PDSX-Tumoren (n=10; $1,3 \pm 0,3$ %ID/cc) wurde in der zweiten Woche nach Tumorimplantation detektiert. In den folgenden acht Wochen nahm die [¹⁸F]FDG-Akkumulation in den PDSX-Tumoren (W6: n=5; $0,9 \pm 0,3$ %ID/cc; W10: n=7; $0,9 \pm 0,3$ %ID/cc) im Vergleich zu Woche zwei signifikant (W6: p=0,04; W10: p=0,009) ab. Außerdem wurden keine Unterschiede in der [¹⁸F]FDG-Anreicherung in PDSX-Tumoren zwischen Woche sechs und Woche 14 (n=4; $1,0 \pm 0,2$ %ID/cc) detektiert. Die geringste [¹⁸F]FDG-Anreicherung (n=1; $0,5$ %ID/cc) wurde mit nur einem PDSX-Tumor in Woche 30 ermittelt (Abbildung 58 a, rote Kurve).

Die Werte der [¹⁸F]FDG-Anreicherung im Muskel von PDSX-Tumor-tragenden Tieren lagen über den gesamten Untersuchungszeitraum (W2 bis W14) auf demselben Niveau mit $0,2 \pm 0,0$ %ID/cc und erreichten den höchsten Wert (n=1) von $0,3$ %ID/cc in Woche 30 (Abbildung 58 a, schwarze Kurve).

Die höchste [¹⁸F]FDG-Anreicherung in PDOX-Tumoren wurde in Woche zwei (n=7; $1,3 \pm 0,2$ %ID/cc) und Woche zehn (n=9; $1,4 \pm 0,3$ %ID/cc) detektiert. In Woche sechs wurde eine signifikante Abnahme der [¹⁸F]FDG-Akkumulation in PDOX-Tumoren (n=4; $1,0 \pm 0,1$ %ID/cc) detektiert (Abbildung 58 b, blaue Kurve). Zwischen Woche zehn und Woche 14 (n=3; $1,2 \pm 0,2$ %ID/cc) wurde eine Tendenz zur sinkenden [¹⁸F]FDG-Anreicherung in PDOX-Tumoren beobachtet (Abbildung 58 b, blaue Kurve). Ähnlich zu PDSX- wurde auch bei PDOX-Tumoren die geringste [¹⁸F]FDG-Anreicherung in Woche 30 (n=2; $0,7 \pm 0,2$ %ID/cc) detektiert (Abbildung 58 a, b).

Die [¹⁸F]FDG-Akkumulation im Muskel der PDOX-Tumor-tragenden Tiere verhielt sich ähnlich der PDSX-Tumor-tragenden Tiere und lag konstant bei $0,2 \pm$ SD %ID/cc über die gesamte Beobachtungszeit von 30 Wochen (Abbildung 58 b, schwarze Kurve).

Beide Gruppen zeigten eine identische [¹⁸F]FDG-Anreicherung in den Tumoren in Woche zwei sowie eine signifikante Abnahme der [¹⁸F]FDG-Akkumulation in Woche sechs. Diese Veränderung konnte auch anhand von PET/MRT-Abbildungen beobachtet werden (Abbildung 58 c). Bei beiden Versuchsgruppen wurde in Woche zwei eine homogene Anreicherung von [¹⁸F]FDG im Tumor detektiert. Zu allen anderen Zeitpunkten wurde in den meisten PDSX- und PDOX-Tumoren eine heterogene [¹⁸F]FDG-Anreicherung beobachtet.

In PDSX-Tumoren wurden größere Bereiche, vorzugsweise im Zentrum des Tumors, detektiert, in denen keine Aufnahme von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ detektiert werden konnte (Abbildung 58 c, oben). Solche Bereiche waren in PDOX-Tumoren nicht nachweisbar, lediglich Regionen mit schwacher $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Anreicherung wurden detektiert (Abbildung 58 c, unten). Außerdem konnten in PDOX-Tumoren über den gesamten Untersuchungszeitraum mehrere Tumorbereiche mit einer erhöhten Akkumulation von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ detektiert werden (Abbildung 58 c und d, unten). Demnach wurden deutliche Unterschiede in der $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Anreicherung im Tumor zwischen den beiden Gruppen detektiert (Abbildung 58 c, d). Die hiermit aufgefassten Unterschiede zwischen den fünf Zeitpunkten in beiden Versuchsgruppen weisen auf die Veränderungen im Glukosestoffwechsel während der Tumorentwicklung hin.

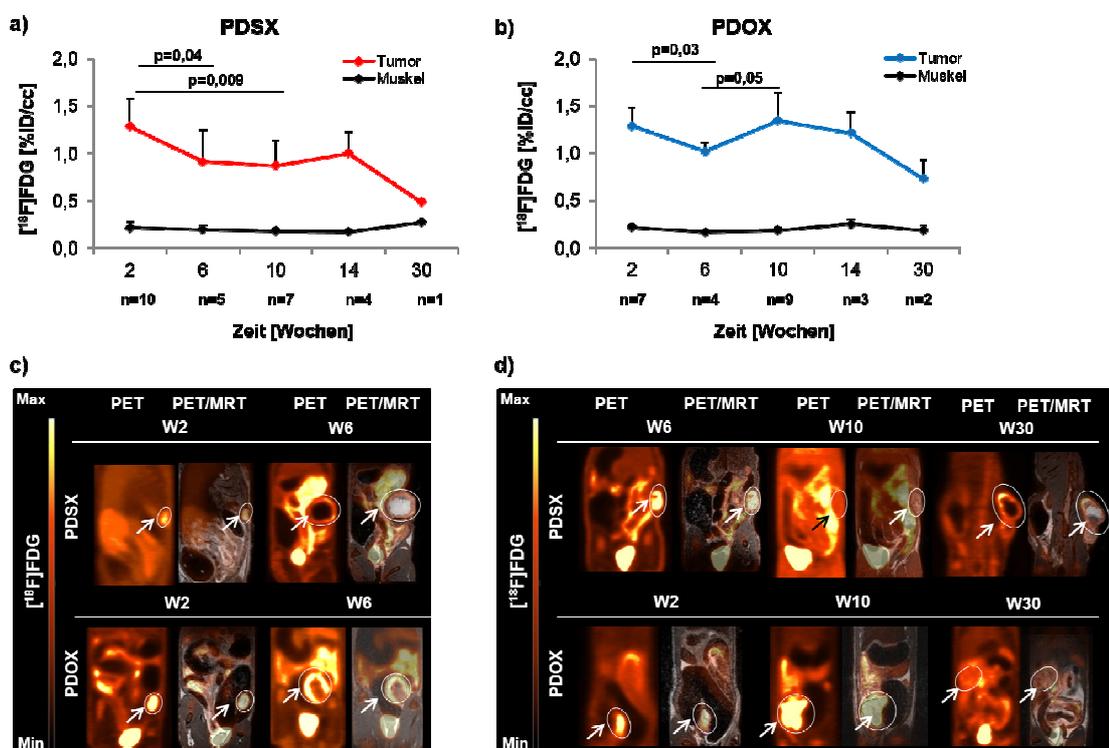


Abbildung 58: Longitudinale Analyse der $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET-Daten in PDSX- und PDOX-Tumoren

Quantitative Mittelwertanalyse \pm SD in %ID/cc von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET im Tumor und Muskel zu fünf verschiedenen Zeitpunkten in PDSX- a) und in PDOX- b) Tumor-tragenden Tieren. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der jeweiligen Versuchsgruppe durchgeführt (mit $p < 0,05$ signifikant). Exemplarisch sind die PET- und die fusionierten PET/MRT-Daten der $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Anreicherung im PDSX-1.2 und PDOX-1.2 Tier in W2 und W6 c) sowie im PDSX-6.2 und PDOX-2.2 Tier in W2 bzw. W6, W10 und W30 d) gezeigt. Die Tumorkonturen wurden weiß markiert und mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.4.3 Longitudinale Untersuchung der Proliferation mittels [¹⁸F]FLT-PET in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren

Es wurden [¹⁸F]FLT-PET-Messungen zur Untersuchung der Tumorphilierung zu vier Zeitpunkten (W2, W6, W10 und W30) durchgeführt. In Woche 14 konnte das [¹⁸F]FLT aus technischen Gründen nicht gemessen werden. Die Ergebnisse der [¹⁸F]FLT-Akkumulation im Tumor und im Referenzgewebe Muskel wurden als Mittelwerte \pm SD in %ID/cc (Abbildung 59 a, b) und als exemplarische PET- und fusionierte PET/MRT-Bilder dargestellt (Abbildung 59 c, d).

In der zweiten Woche wurde die höchste [¹⁸F]FLT-Anreicherung in PDSX-Tumoren (n=9; $1,1 \pm 0,1$ %ID/cc) detektiert. In allen nachfolgenden Wochen lag die Anreicherung im Bereich des Referenzgewebes bei $0,5$ %ID/cc. Dabei nahm die %ID/cc von [¹⁸F]FLT in PDSX-Tumoren von Woche zwei zu Woche sechs (n=6; $0,5 \pm 0,1$ %ID/cc) und zehn (n=5; $0,4 \pm 0,1$ %ID/cc) signifikant ($p < 0,0001$) ab (Abbildung 59 a, rote Kurve). Am letzten Zeitpunkt, in Woche 30, wurde bei dem einzigen untersuchten PDSX-Tumor eine [¹⁸F]FLT-Anreicherung von $0,2$ %ID/cc ermittelt, was unter der Anreicherung von [¹⁸F]FLT im Muskel ($0,4$ %ID/cc) lag (Abbildung 59 a).

Ähnlich wie bei den PDSX-Tumor-tragenden Tieren wurde auch bei den PDOX-Tumor-tragenden Tieren in Woche zwei die höchste [¹⁸F]FLT-Anreicherung (n=9; $1,0 \pm 0,5$ %ID/cc) im Tumor ermittelt. Im Vergleich dazu wurde in Woche sechs (n=3; $0,5 \pm 0,0$ %ID/cc), zehn (n=5; $0,6 \pm 0,1$ %ID/cc) und 30 (n=2; $0,4 \pm 0,0$ %ID/cc) eine starke Tendenz zur Abnahme der [¹⁸F]FLT-Anreicherung in den PDOX-Tumoren detektiert (Abbildung 59 b, blaue Kurve). Die [¹⁸F]FLT-Akkumulation im Muskel der PDOX-Tumor-tragenden Tiere lag über den gesamten Zeitraum im Bereich zwischen $0,6 \pm 0,2$ %ID/cc und $0,2 \pm 0,2$ %ID/cc und ähnelte somit sehr der [¹⁸F]FLT-Anreicherung in den PDSX-Tumoren (Abbildung 59 b, schwarze Kurve).

Demnach verhielt sich die [¹⁸F]FLT-Anreicherung über den Zeitraum von 30 Wochen in beiden Gruppen sehr ähnlich, wobei die höchste Tracer-Akkumulation in Woche zwei detektiert wurde. Dies konnte anhand von PET/MRT-Bildern nicht bestätigt werden, denn es wurden kaum visuelle Unterschiede in der [¹⁸F]FLT-Anreicherung in allen Tumoren zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten detektiert (Abbildung 59 c, d). Lediglich subkutane Tumoren wiesen in Woche sechs und 30 eine heterogene [¹⁸F]FLT-Akkumulation mit deutlichen Bereichen ohne PET-Signal auf. Außerdem wurden bei keinem der Tumoren Regionen mit einem starken PET-Signal, wie beispielsweise im [¹⁸F]FDG-PET, detektiert.

Die erhöhte Proliferation, die anhand der Tumorzunahme in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren zwischen Woche zwei und sechs beobachtet wurde, konnte mit Hilfe von [¹⁸F]FLT-PET bestätigt werden. Ab der sechsten Woche wurde keine Proliferation mittels [¹⁸F]FLT in PDSX- und PDOX-Tumoren detektiert.

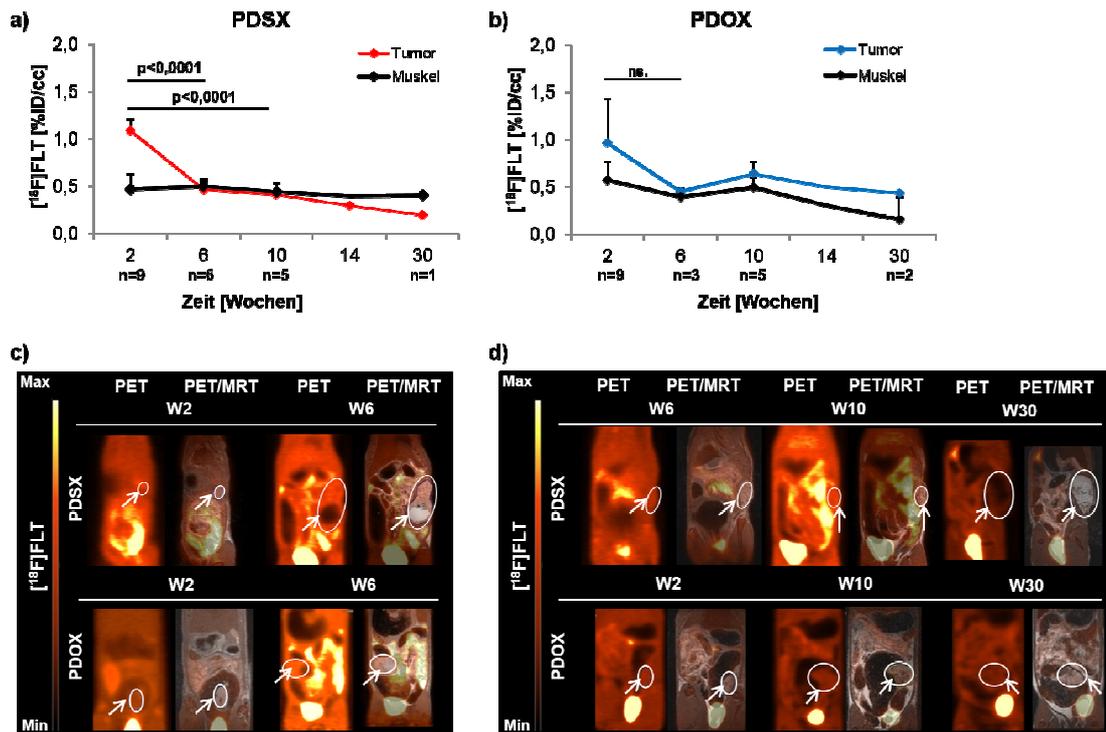


Abbildung 59: Longitudinale Analyse der [^{18}F]FLT-PET-Daten in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren

Quantitative Mittelwertanalyse \pm SD von [^{18}F]FLT-PET im Tumor und Muskel zur vier verschiedenen Zeitpunkten in PDSX- **a)** und in PDOX- **b)** Tumor-tragenden Tieren. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der jeweiligen Versuchsgruppe durchgeführt (mit $p < 0,05$ signifikant). Exemplarisch sind die PET- und die fusionierten PET/MRT-Daten der [^{18}F]FLT-Anreicherung im PDSX-1.2 und PDOX-1.2 Tier in W2 und W6 **c)** sowie im PDSX-6.2 und PDOX-2.2 Tier in W2 bzw. W6, W10 und W30 **d)** gezeigt. Die Tumorkonturen wurden weiß markiert und mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.4.4 Longitudinale Untersuchung der Hypoxie mittels [^{18}F]FMISO-PET in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren

Die Hypoxie wurde mit Hilfe der [^{18}F]FMISO-PET zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb von 30 Wochen in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren untersucht. Die Ergebnisse der [^{18}F]FMISO-Akkumulation im Tumor und im Muskel wurden als Mittelwerte \pm SD in %ID/cc (Abbildung 60 a, b) und als exemplarische PET- und fusionierte PET/MRT-Bilder dargestellt (Abbildung 60 c, d).

Die höchste Anreicherung von [^{18}F]FMISO wurde in PDSX-Tumoren in Woche zwei ($n=4$; $0,9 \pm 0,1$ %ID/cc) detektiert. In Woche sechs fiel die Anreicherung von [^{18}F]FMISO in PDSX-Tumoren ($n=11$; $0,5 \pm 0,1$ %ID/cc) auf das Muskelniveau ($0,6 \pm 0,1$ %ID/cc) ab und blieb über die nachfolgenden Wochen unverändert (Abbildung 60 a, rote Kurve).

Die Akkumulation von [^{18}F]FMISO in PDOX-Tumoren zeigte über den gesamte Untersuchungszeitraum von 30 Wochen keinerlei signifikante Veränderungen (z.B. W2: $0,6 \pm 0,1$ %ID/cc) und lag damit im Anreicherungsereich des Referenzgewebes (W2: $0,5 \pm 0,1$ %ID/cc; Abbildung 60 d). In dieser Gruppe mussten ausgewählte PDOX-Tumor-tragende Tiere aufgrund sehr starker Hintergrundstrahlung des Darmgewebes aus der Auswertung ausgeschlossen werden.

In PDSX-Tumoren wurde im Vergleich zur PDOX-Tumoren eine signifikant ($p=0,037$) höhere [^{18}F]FMISO-Anreicherung in Woche zwei detektiert, was auf hypoxische Tumorregionen hindeuten könnte. Außerdem erreichten alle, in Woche zwei mit [^{18}F]FMISO gemessenen, PDSX-Tumor-tragenden Tiere bereits in Woche sechs und zehn die Abbruchkriterien dieser Studie aufgrund der TumorgroÙe.

Außer in Woche zwei konnten zu keinen späteren Zeitpunkten weitere hypoxischen Regionen mittels [^{18}F]FMISO-PET in den Tumoren beider Gruppen detektiert werden (Abbildung 60 a, b). Dies konnte auch anhand von PET/MRT-Bildern beobachtet werden (Abbildung 60 c, d). Dabei wurde eine heterogene [^{18}F]FMISO-Anreicherung in den PDSX- und PDOX-Tumoren in Woche zwei beobachtet (Abbildung 60 c). Zu allen späteren Zeitpunkten war die Anreicherung von [^{18}F]FMISO im Tumor mit der im Muskel vergleichbar (Abbildung 60 d).

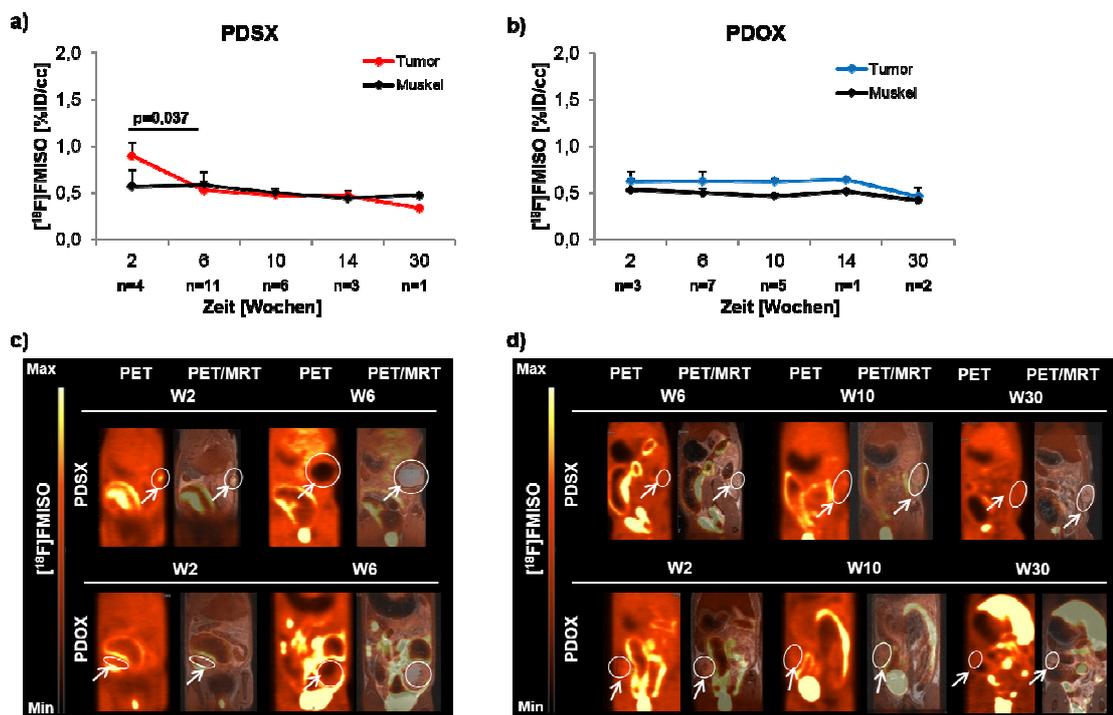


Abbildung 60: Longitudinale Analyse der [^{18}F]FMISO-PET-Daten in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren

Quantitative Mittelwertanalyse \pm SD in %ID/cc von [^{18}F]FMISO-PET im Tumor und Muskel zu fünf verschiedenen Zeitpunkten in PDSX- **a)** und in PDOX- **b)** Tumor-tragenden Tieren. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den verschiedenen Zeit-

punkten der jeweiligen Tiergruppe durchgeführt (mit $p < 0,05$ signifikant). Exemplarisch sind die PET- und die fusionierten PET/MRT-Daten der [^{18}F]FMISO-Anreicherung im PDSX-1.2 und PDOX-1.2 Tier in W2 und W6 **c**) sowie im PDSX-6.2 und PDOX-2.2 Tier in W2 bzw. W6, W10 und W30 **d**) gezeigt. Die Tumorkonturen wurden weiß markiert und mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Überexpression von Glut1 kann auf den Zustand der Hypoxie hindeuten, aus diesem Grund wurden Glut1-Färbungen in subkutanen und orthotopen CR-LRB-018P-Tumoren durchgeführt. Abbildung 61 zeigt exemplarisch die korrespondierenden Tumorbereiche eines orthotopen Tumors aus Woche 30 nach Glut1- und Ki67-Färbung. Die Glut1-Färbung war sehr inhomogen und zeigte eine intensive Membranfärbung an der Grenzregion zu den nekrotischen Tumorbereichen mit negativer Ki67-Färbung (siehe rote Pfeile). Auffallend war die stark positive Glut1-Färbung in den nekrotischen Randregionen, sowohl bei subkutanen als auch bei orthotopen Tumoren. Um diesen Bereich wurde eine Reihe von vitalen Tumorzellen mit positiver Ki67-Färbung und mit schwächerer Glut1-Färbung (siehe grüne Pfeile) detektiert. Demnach könnten Tumorbereiche mit einer stark positiven Glut1-Färbung einen Hinweis auf Hypoxie und eine anschließende Entwicklung von Nekrose in dieser Region geben. Solche Regionen wurden in unterschiedlichem Ausmaß in allen gefärbten Tumoren detektiert.

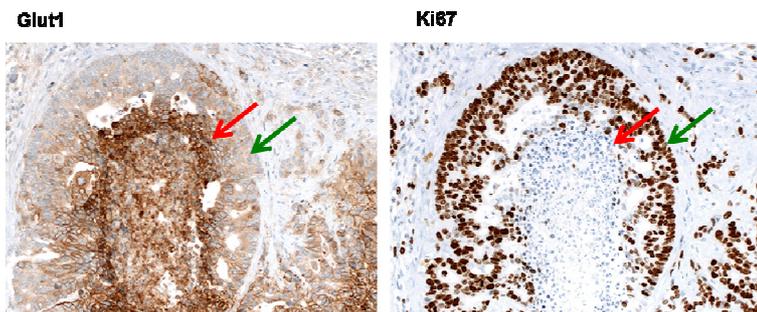


Abbildung 61: IHC-Färbung mit Glut1- und Ki67-Antikörper

Eine 200-fache Vergrößerung von Glut1- und Ki67-Färbung eines exemplarischen PDOX-Tumors aus Woche 30.

4.4.5 Untersuchung der [^{68}Ga]RGD-Anreicherung in den PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren

Mit Hilfe des Angiogenese Tracers [^{68}Ga]RGD für PET wurde die Ausbildung von neuen Blutgefäßen in den PDSX- und PDOX-Tumoren untersucht. Die Messungen wurden mit beiden Versuchsgruppen an nur zwei Zeitpunkten, in Woche zwei und sechs, durchgeführt. Die Ergebnisse der [^{68}Ga]RGD-Akkumulation im Tumor und im Muskel wurden als Mittelwerte \pm SD in %ID/cc (Abbildung 62 a, b) und als exemplarische PET- und fusionierte PET/MRT-Bilder dargestellt (Abbildung 62 c).

Es wurde eine identische Anreicherung von [^{68}Ga]RGD in PDSX-Tumoren in Woche zwei ($n=3$; $0,2 \pm 0,0$ %ID/cc) und sechs ($n=3$; $0,2 \pm 0,0$ %ID/cc) ermittelt (Abbildung 62 a, rote Kurve). Ähnliche Werte wurden für die Akkumulation von [^{68}Ga]RGD im Muskel (W2: $0,2 \pm 0,0$ %ID/cc; W6: $0,1 \pm 0,0$ %ID/cc) ermittelt und somit als Hintergrundstrahlung betrachtet (Abbildung 62 a).

In PDOX-Tumoren wurden auch keine Unterschiede zwischen Woche zwei ($n=2$; $0,4 \pm 0,0$ %ID/cc) und Woche sechs ($n=1$; $0,4$ %ID/cc) in der [^{68}Ga]RGD-Anreicherung detektiert. Da auch diese Werte im Bereich der Muskelanreicherung lagen, wurden die Ergebnisse ebenso als Hintergrundstrahlung angesehen (Abbildung 62 b). Zudem wurden keine statistischen Tests zur Beurteilung der Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten innerhalb der Gruppen durchgeführt.

Abbildung 62 c) zeigt exemplarische PET- und MRT-Aufnahmen der Anreicherung von [^{68}Ga]RGD in PDSX- und PDOX-Tumoren und bestätigt die mittels PET ermittelte schwache Tracer-Anreicherung. Anhand der PET-Bilder konnten die einzelnen Tumoren kaum von dem Muskelgewebe unterschieden und somit nicht detektiert werden (Abbildung 62 c). Demnach konnte die Angiogenese mittels [^{68}Ga]RGD-Tracer im CR-LRB-018P-Modell nicht dargestellt werden und wurde auf die Tiere aus der ersten Versuchsreihe beschränkt.

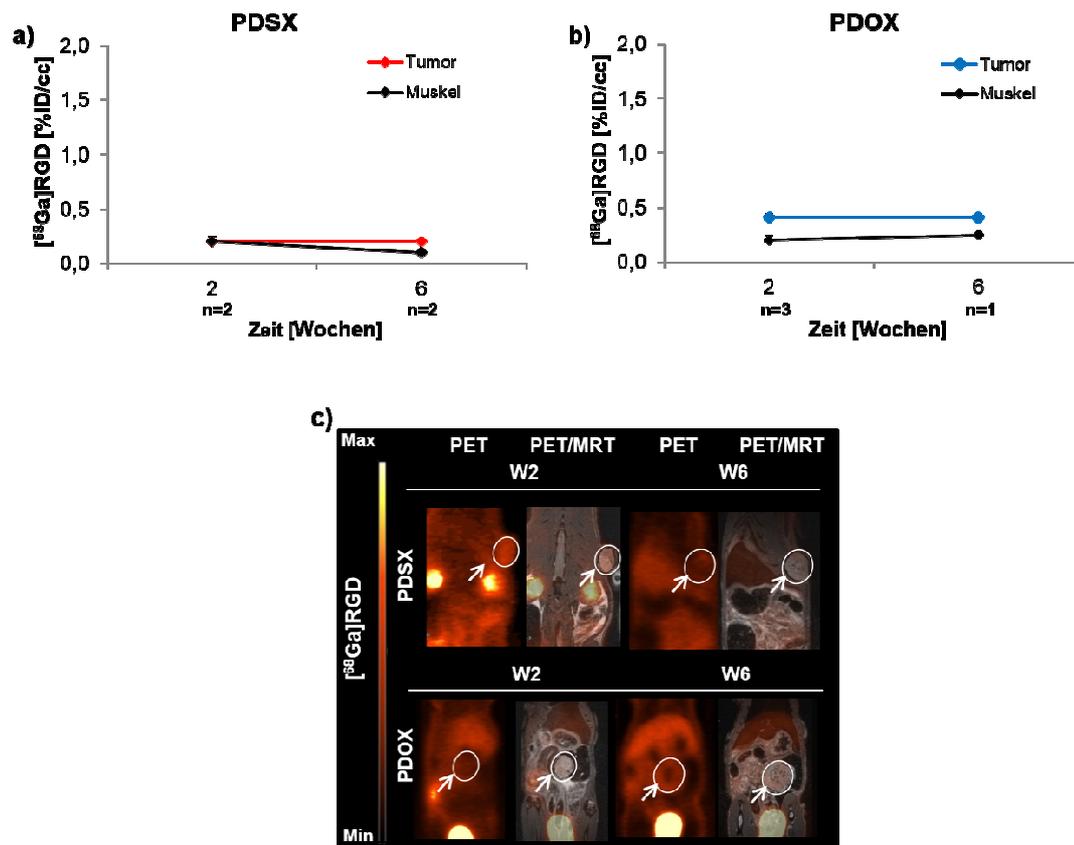


Abbildung 62: Analyse der $[^{68}\text{Ga}]\text{RGD}$ -PET-Daten in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren

Die Mittelwertanalysen \pm SD in %ID/cc der Anreicherung von $[^{68}\text{Ga}]\text{RGD}$ in Tumoren und Muskel für PDSX- **a)** und PDOX- **b)** Tumor tragenden Tieren an zwei Messzeitpunkten (W2 und W6) wurden im jeweiligen Diagramm dargestellt. Exemplarisch sind PET- und fusionierte PET/MRT-Aufnahmen der $[^{68}\text{Ga}]\text{RGD}$ -Anreicherung in jeweils einem PDSX- und PDOX-Tier in W2 und W6 gezeigt **c)**. Die Tumorkonturen wurden weiß markiert und mit Pfeilen gekennzeichnet.

4.4.6 Longitudinale Untersuchung der Diffusion in PDSX- und PDOX-Tumor-tragenden Tieren

Es wurde DW-MRT zur Untersuchung von Diffusion in PDSX- und PDOX-Tumoren an fünf verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als ADC-Mittelwerte \pm SEM pro Zeitpunkt angegeben.

In den PDSX- und PDOX-Tumoren wurde ein signifikanter Anstieg ($p < 0,01$) der ADC-Werte zwischen Woche zwei (PDSX: $n=7$; $246 \pm 40 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$; PDOX: $n=7$; $174 \pm 33 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$) und Woche sechs (PDSX: $n=5$; $566 \pm 103 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$; PDOX: $n=5$; $642 \pm 27 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$) ermittelt (Abbildung 63 a, b).

Die ADC-Werte der PDSX-Tumoren stiegen in Woche zehn ($n=5$; $1043 \pm 161 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$) weiter an. Anschließend nahm der ADC-Wert in Woche 14 ($n=4$; $870 \pm 64 \cdot 10^{-6}$

mm²/s) etwas ab und stieg in Woche 30 wieder sehr stark (n=1; 1518 mm²/s) an (Abbildung 63 a). Damit wurden starke Unterschiede im Diffusionsverhalten der PDSX-Tumoren zwischen den Zeitpunkten detektiert.

In PDOX-Tumoren wurde ein anderes Diffusionsverhalten ermittelt. Nach dem Anstieg der ADC-Werte in den ersten sechs Wochen blieben die ADC-Werte zu allen nachfolgenden Messzeitpunkten relativ konstant. Dabei lag der ADC-Wert in Woche zehn bei $621 \pm 38 \cdot 10^{-6}$ mm²/s (n=5), in Woche 14 bei $608 \pm 98 \cdot 10^{-6}$ mm²/s (n=5) und in Woche 30 bei $698 \pm 90 \cdot 10^{-6}$ mm²/s (n=2; Abbildung 63 b).

Ein signifikanter Unterschied (p=0,03) zwischen den ADC-Werten von PDSX- und PDOX-Tumoren wurde nur in Woche zehn detektiert, wobei die ADC-Werte der PDSX-Tumoren 1,7-fach höher waren als die der PDOX-Tumoren (Abbildung 63 a, b).

Abbildung 63 c) und d) zeigt exemplarisch die DW-MRT-Bilder von jeweils zwei PDSX- und PDOX-Tumoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten. In Woche zwei und sechs wurden keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden (Abbildung 63 c). Erst in Woche zehn und 30 wurden in PDSX-Tumoren große Bereiche mit einem starken ADC-Signal detektiert (Abbildung 63 c). In PDOX-Tumoren blieb das ADC-Signal zur allen Untersuchungszeitpunkten schwach (Abbildung 63 c, d).

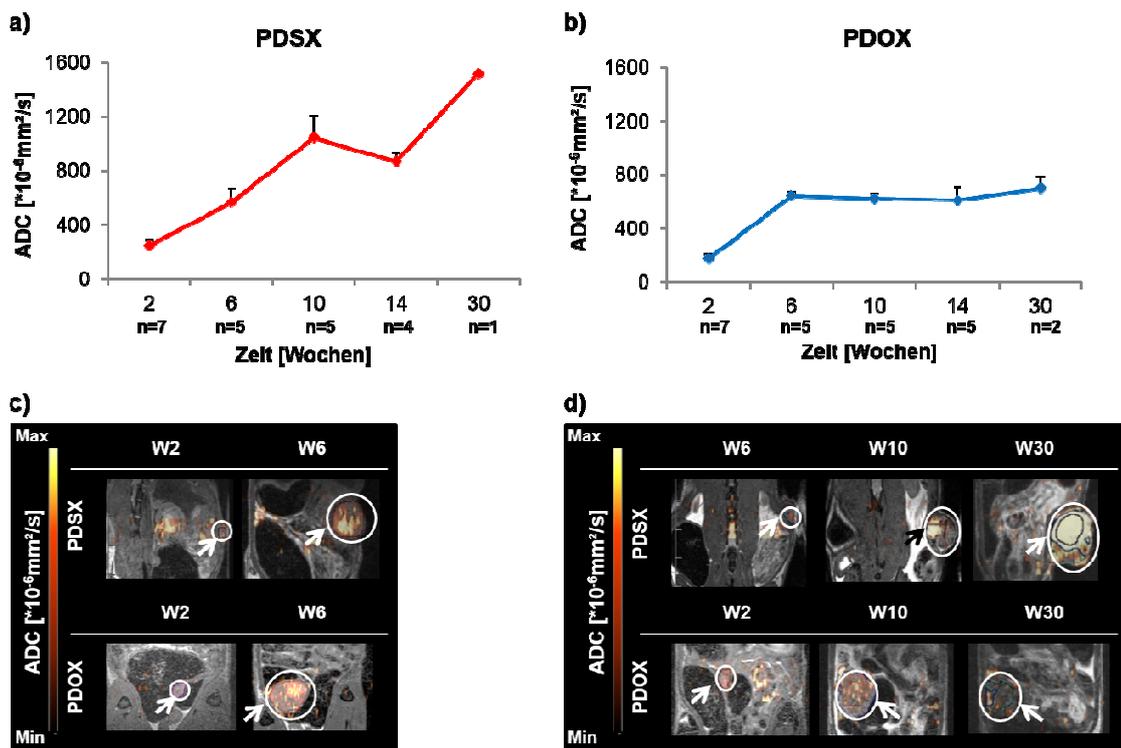


Abbildung 63: Longitudinale Analyse der Diffusion in PDSX- und PDOX-Tumoren

Das Diffusionsverhalten in PDSX- a) und in PDOX- b) Tumoren ist zu fünf verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Die ADC-Werte [$\cdot 10^{-6}$ mm²/s] wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde ein Zweistichproben-t-Test zwischen den verschiedenen Zeitpunkten der jeweiligen Versuchsgruppe durchgeführt (mit p<0,05 signifikant). Die Überlagerung

der anatomischen mit den ADC-Daten zeigt die ADC-Anreicherung im jeweiligen Tumor in W2 und W6 **c)** sowie W6, W10, und W30 **d)** an. Die Tumorkonturen wurden weiß markiert und mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die stetig steigenden ADC-Werte in den PDSX- und PDOX-Tumoren zwischen Woche zwei und sechs spiegeln die Tumorumfangszunahme zu den genannten Zeitpunkten wieder. Korrelationsverhalten zwischen Tumorumfang und ADC-Werten wurde mit einer Pearson-Analyse für beide Versuchsgruppen untersucht (Abbildung 64). Erwartungsgemäß wurde eine stärkere Korrelation in PDSX-Tumoren ($R=0,83$) im Vergleich zu den PDOX-Tumoren ($R=0,68$) detektiert.

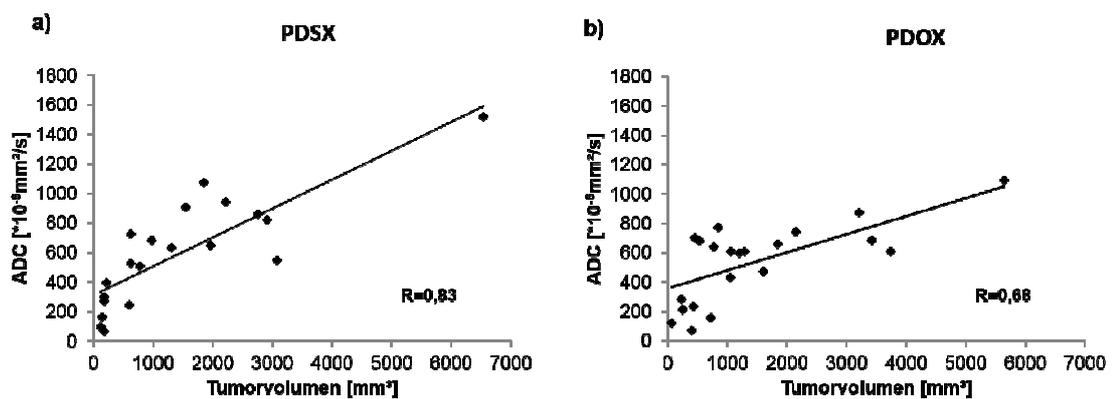


Abbildung 64: Korrelationsverhalten der ADC-Werte mit Tumorumfang

Die Pearson-Korrelation ist zwischen den einzelnen ADC-Werten [10^{-6} mm²/s] mit den zugehörigen Tumorumfangen [mm³] in PDSX- **a)** und PDOX- **b)** Tumoren dargestellt. Der Korrelationskoeffizient (R) gibt den Wert des linearen Zusammenhangs zwischen den ADC-Werten und den Tumorumfangen an.

4.4.7 Voxel-basierte GMM-Analyse der [¹⁸F]FDG-PET-Daten in PDOX- und PDSX-Tumor-tragenden Tieren

Insbesondere bei der Akkumulation von [¹⁸F]FDG wurde eine sehr heterogene Anreicherung des Tracers im Tumorgewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten detektiert. Dabei fielen vor allem im PDSX-Modell größere Bereiche im Zentrum des Tumors mit einer sehr geringen Akkumulation von [¹⁸F]FDG auf. Des Weiteren wiesen einige PDSX- und PDOX-tragende Tiere Tumorbereiche mit einer hohen Akkumulation von [¹⁸F]FDG auf (Abbildung 58 c, d). Um die beobachtete Heterogenität im Tumor zu untersuchen und die unterschiedlichen Tumorbereiche genauer einzugrenzen, wurde mit allen statischen PET-Datensätzen von [¹⁸F]FDG sowohl für das PDSX- als auch für das PDOX-Modell eine Voxel-basierte GMM-Analyse durchgeführt.

Die schrittweise Ermittlung der fünf Voxel-Populationen wurde bereits in Abschnitt 3.7.2 beschrieben. Nach Identifikation der fünf Populationen in der Gesamtverteilung wurden die Histogramme der Anreicherung jeweils einzeln für die gesamte Gruppe der PDSX-

und PDOX-Tumoren für alle fünf Zeitpunkte zusammen betrachtet (Abbildung 65 a, b). Es wurden jedoch nur jeweils vier Voxel-Populationen in PDSX- und PDOX-Tumoren ermittelt, wobei die gelbe Population ($\%ID/cc < 0,2$) nur in PDSX- und die rote Population ($\%ID/cc > 2,2$) nur in PDOX-Tumoren vorhanden war (Abbildung 65 a, b).

Alle Voxel in einem Histogramm wurden als 100 % angesehen und die einzelnen Populationsanteile in Prozent entsprechend der Voxel-Zahl berechnet. Demnach wurden in der PDSX-Gruppe 11 % der gelben, 27 % der dunkelblauen, 45 % der blauen und 17 % der grünen Population berechnet. Die rote Population mit 0,1 % aller Voxel wurde aufgrund der sehr geringen Voxel-Zahl als vernachlässigbar betrachtet (Abbildung 65 a). Somit stellten nur 17 % aller PDSX-Voxel die Tumorbereiche mit hoher $[^{18}F]FDG$ -Anreicherung $> 1,1 \%ID/cc$ (grün) dar und 38 % aller PDSX-Voxel präsentierten die Tumorregionen mit geringer Anreicherung von $[^{18}F]FDG < 0,5 \%ID/cc$ (dunkelblau und gelb; Abbildung 65 a).

In der PDOX-Gruppe war die gelbe Population nicht vorhanden, sondern die dunkelblaue mit 6 %, die blaue mit 41 %, die grüne mit 45 % und die rote mit 8 % (Abbildung 65 b). Demnach wurden nur 6 % aller PDOX-Voxel mit einer geringen $[^{18}F]FDG$ -Anreicherung $< 0,5 \%ID/cc$ (dunkelblau) und 53 % aller PDOX-Voxel mit einer hohen $[^{18}F]FDG$ -Anreicherung $> 1,1 \%ID/cc$ (grün und rot) detektiert (Abbildung 65 b).

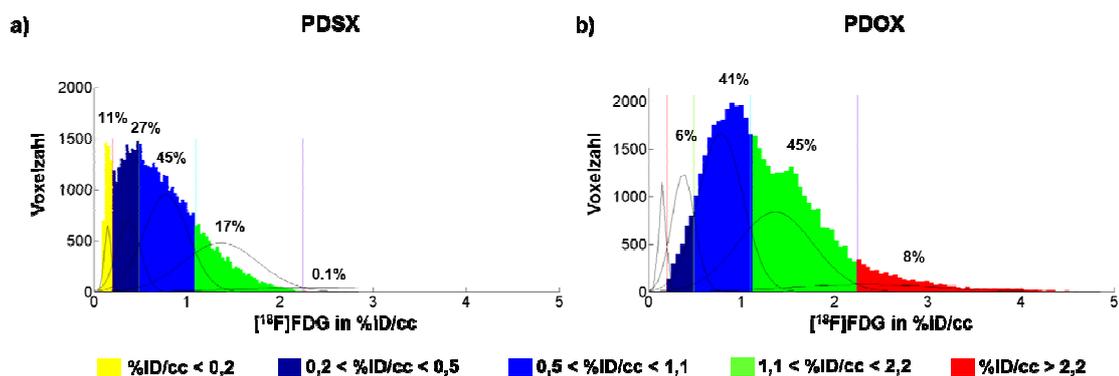


Abbildung 65: Die Voxel-basierte Analyse von statischen $[^{18}F]FDG$ -PET-Daten

Ein PDSX- a) und ein PDOX-Gesamthistogramm b) ist für alle Zeitpunkte mit fünf Gaußfunktionen und den berechneten Prozentangaben für jede einzelne Voxel-Population gezeigt. Die verschiedenen Farben repräsentieren dabei verschiedene Voxel-Populationen.

Für die Betrachtung der longitudinalen Populationsverteilung wurden für jeden Untersuchungszeitpunkt (W2 bis W30) entsprechende Histogramme für alle Versuchsgruppen errechnet. Die Populationsanteile in Prozent wurden in Abbildung 66 für PDSX- a) und für PDOX- b) Tumoren dargestellt. Diese Darstellung der Populationsverteilung berücksichtigt nicht das Gesamtvolumen der Tumoren und zeigt nicht immer die gleichen Tiere zu jedem einzelnen Zeitpunkt. Dadurch kann die longitudinale Entwicklung von einzelnen Populationen innerhalb des Modells nicht beurteilt werden. Dennoch

erlaubt diese Art der Datendarstellung einen Vergleich zwischen dem PDOX- und PDSX-Modell zu gleichen Zeitpunkten.

Dabei unterschied sich die Populationsverteilung in Woche zwei zwischen den Gruppen kaum, mit Ausnahme der roten Population, die in PDOX-Tumoren mit 7 % deutlich stärker vertreten war als in den PDSX-Tumoren mit 2 %. Ansonsten wurde die grüne Population für PDSX-Tumoren mit 58 % und für PDOX-Tumoren mit 55 % sehr ähnlich berechnet. Auch die blaue (PDSX: 38 %; PDOX: 35 %) und die dunkelblaue (PDSX: 1,6 %; PDOX: 2,8 %) Population wiesen eine vergleichbare Verteilung zwischen den Versuchsgruppen in Woche zwei auf (Abbildung 66 a, b). Die gelbe Voxel-Population konnte in Woche zwei bei beiden Gruppen nicht detektiert werden.

In den folgenden Wochen verlief die Verteilung der Voxel-Populationen zwischen den beiden Gruppen sehr unterschiedlich. Der Hauptunterschied zwischen den beiden Gruppen ist die Präsenz der gelben Population und das Fehlen der roten Population in PDSX-Tumoren zu jedem weiteren Zeitpunkt. Bei PDOX-Tumoren wurde die rote Population in Woche zehn und vierzehn detektiert, wobei die gelbe zu keinem der Zeitpunkte vorhanden war. Außerdem wurden deutliche Unterschiede bei der dunkelblauen Population zwischen den Gruppen detektiert. Dabei lag ihr Anteil in PDSX-Tumoren bei 18-50 % und in PDOX-Tumoren bei 3-11 % zwischen Woche sechs und 30. Zusätzlich dominierte die grüne Population mit 47-55 % zwischen Woche sechs und vierzehn in den PDOX-Tumoren, wohingegen in PDSX-Tumoren diese zu gleichen Zeiten zwischen 15 und 21 % lag. In Woche 30 wurden zwischen einem PDSX-Tumor und zwei PDOX-Tumoren ebenso deutliche Unterschiede erfasst. Dabei repräsentierte der PDSX-Tumor 34 % der Voxel als dunkelblau und nur 2 % der Voxel als grüne Population, wobei die PDOX-Tumoren nur 6 % der Voxel als dunkelblau und 11 % der Voxel als grün repräsentierten (Abbildung 66 a, b).

Beim Vergleich beider Gruppen untereinander wurde deutlich, dass die PDOX-Tumoren mehr Bereiche mit einer hohen Anreicherung von [¹⁸F]FDG enthalten als die PDSX-Tumoren. Außerdem deuten diese Resultate auf eine ungleiche Entwicklung von PDSX- und PDOX-Tumoren nach der Implantation hin.

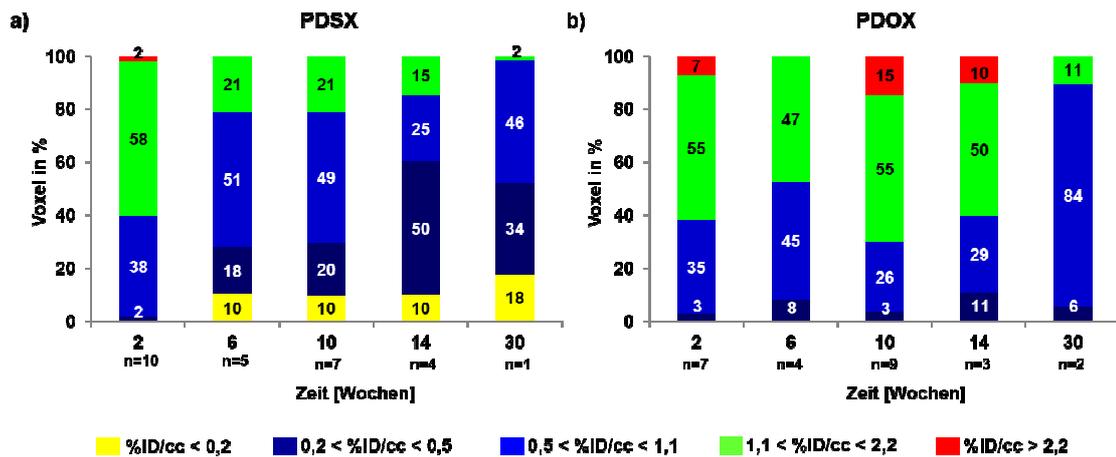


Abbildung 66: Longitudinale Voxel-basierte GMM-Analyse der $[^{18}\text{F}]$ FDG-PET-Daten

Die Diagramme zeigen die prozentuellen Angaben der Voxel-Populationsanteile für jeden untersuchten Zeitpunkt der PDSX- a) und PDOX- b) Tumoren. Die verschiedenen Farben repräsentieren verschiedene Voxel-Populationen mit Angabe der Prozentanteile aus der Gesamt-Voxel-Zahl zum jeweiligen Zeitpunkt.

4.4.7.1 Korrelation der $[^{18}\text{F}]$ FDG-Autoradiographie und GMM-Analyse

In diesem Abschnitt sollen die Ergebnisse der GMM-Analyse mit der $[^{18}\text{F}]$ FDG-Autoradiographie und den histologischen Analysen am Beispiel von einzelnen Tieren korreliert und verglichen werden. Die Autoradiographie zur Erfassung der regionalen $[^{18}\text{F}]$ FDG-Akkumulation im Tumor wurde nur mit den Tieren aus der ersten Versuchsreihe in Woche 14 durchgeführt. Die für die Autoradiographie verwendeten Tumorschnitte wurde anschließend H&E gefärbt und digitalisiert. Es sollen bestimmte Tumorbereiche in einzelnen H&E-Schnitten, die zuvor mittels semi-quantitativer Analyse als vital oder nekrotisch identifiziert wurden, anhand der korrespondierenden Tumorbereichen in der parametrischen $[^{18}\text{F}]$ FDG-Karte mit Voxel-Populationen der GMM-Analyse charakterisiert werden.

Abbildung 67 zeigt zwei repräsentative Beispiele von PDSX-Tieren. In der Mittelwertanalyse der $[^{18}\text{F}]$ FDG-PET-Daten wurde im ersten Tumorbeispiel PDSX-2.1 mit der Anreicherung von 0,7 %ID/cc ermittelt (Abbildung 67 a). Anhand der PET-Daten wurde eine inhomogene $[^{18}\text{F}]$ FDG-Anreicherung im Tumor beobachtet und mittels der GMM-Analyse wurden vier verschiedene Voxel-Populationen identifiziert, die in der parametrischen Karte dargestellt wurden (Abbildung 67 a). Dabei befand sich die gelbe Population umgeben von der dunkelblauen Population im Zentrum des Tumors. Die Randbereiche des Tumors repräsentierten die blaue und teilweise die grüne Population. Bei der Betrachtung von korrespondierenden H&E-Schnitten wurden vor allem im Zentrum des Tumors nekrotische Areale und am Tumorrand eher vitale Regionen identifiziert. Ebenso zeigte der korrespondierende Autoradiographie-Datensatz eine sehr schwache bzw. keine Akkumulation von $[^{18}\text{F}]$ FDG im Zentrum des Tumors (Abbildung 67 a; rote

Pfeile), während die Randregion eine stärkere Anreicherung von [^{18}F]FDG aufwies (Abbildung 67 a; weiße Pfeile).

Beim Vergleich der parametrischen Karte aus der GMM-Analyse mit der H&E-Färbung und der Autoradiographie konnte die gelbe und die dunkelblaue Population als nekrotische Tumorbereiche, die eine sehr schwache bis keine [^{18}F]FDG-Anreicherung aufwiesen, identifiziert werden. In der semi-quantitativen H&E-Analyse wurde im gezeigten Tumorfragment ca. 60 % des Tumorgewebes als nekrotisch ermittelt. Im Gesamttumor mit einem Volumen von 993 mm³ wurde hingegen mit der gelben und der dunkelblauen Population ca. 31 % des Tumors als nekrotisch bestimmt (Abbildung 67 a). Zusätzlich konnten die vitalen Tumorbereiche mit einer hohen [^{18}F]FDG-Anreicherung teilweise der grünen Population zugeordnet werden. Die blaue Population konnte nicht eindeutig identifiziert werden, da hier teilweise vitale und nekrotische Tumorbereiche vorhanden waren (Abbildung 67 a).

Im zweiten Tumorbeispiel PDSX-4.1 konnten diese Beobachtungen bestätigt werden (Abbildung 67 b). Auch hier wurde die nekrotische Region im Zentrum des Tumors und vitales Gewebe in der Randregion detektiert. Die korrespondierende Autoradiographie zeigte eine stärkere [^{18}F]FDG-Anreicherung in den vitalen Tumorbereichen, die teilweise der grünen Population (Abbildung 67 b; weiße Pfeile) und eine schwache [^{18}F]FDG-Anreicherung in nekrotischen Tumorbereichen der gelben und der dunkelblauen Population (Abbildung 67 a; siehe rote Pfeile) zugeordnet werden konnten. Bei diesem exemplarischen Tier wurde mittels semi-quantitative H&E-Analyse ca. 50 % des Tumorfragmentes als nekrotisch identifiziert. Die GMM-Analyse des gesamten PDSX-Tumors mit einem Volumen von 2760 mm³ lieferte eindeutige Hinweise darauf, dass ca. 20 % dieses Tumors nekrotisch sein könnten (Abbildung 67 b). Um die Ergebnisse der [^{18}F]FDG-basierten GGM-Analyse für die Detektion der Nekrose zu bestätigen, sollte dieser Versuch mit größeren N-Zahlen und weiteren Versuchsgruppen nach dem Prinzip des Trainings- und Testdatensatzes wiederholt werden, was im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr möglich war.

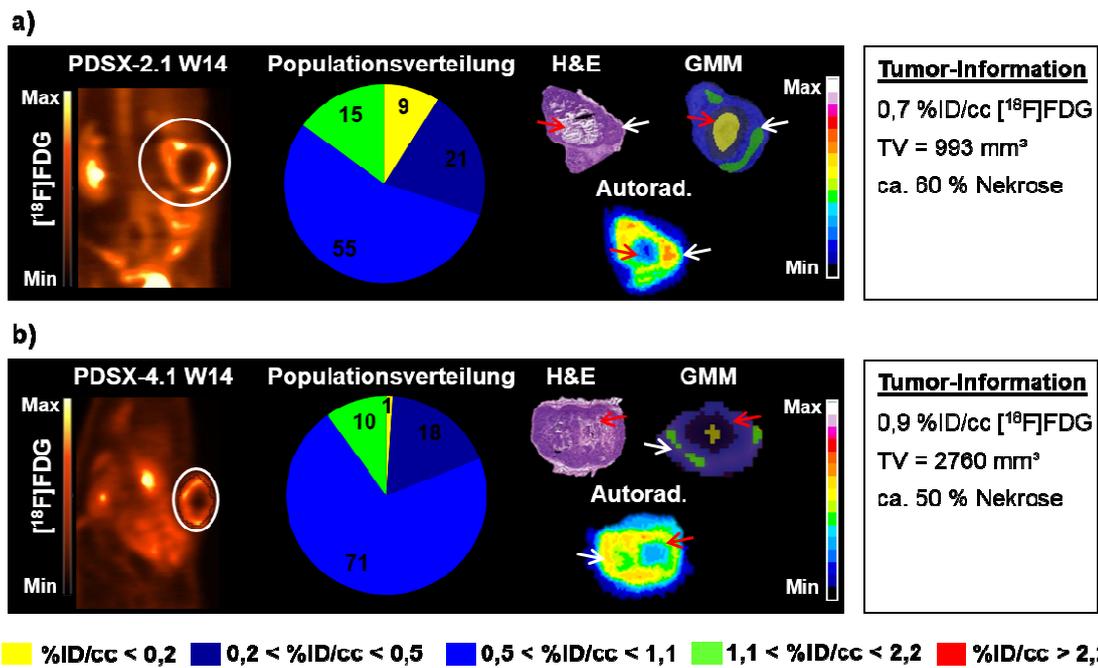


Abbildung 67: Tumorcharakterisierung mittels [¹⁸F]FDG-Autoradiographie und GMM-Analyse in PDSX-Tumoren

Gezeigt sind zwei repräsentative Beispiele von PDSX-Tumor-tragenden Tieren nach der [¹⁸F]FDG-PET in Woche 14 mit den zugehörigen GMM-Analysen des jeweiligen Tumors sowie der korrespondierenden H&E-Färbung, Autoradiographie und einer parametrischen GMM-Karte. Die Tumor-Information enthält Angaben zur [¹⁸F]FDG-Anreicherung, Tumolvolumen (TV) und Nekrose-Anteil im H&E-Tumorfragment für jedes Beispiel.

Mit den Daten der PDOX-Tumor-tragenden Tiere in Woche 14 wurde die gleiche Analyse durchgeführt. Abbildung 68 zeigt zwei exemplarische PDOX-Tumor-tragende Tiere nach [¹⁸F]FDG-PET-Messung und *ex vivo* Untersuchungen.

Im ersten PDOX-1.1 Beispiel wurde in der Mittelwertanalyse 1,4 %ID/cc [¹⁸F]FDG im Tumor ermittelt. Außerdem konnte anhand des PET-Bildes eine homogene Tracer-Anreicherung im Tumor beobachtet werden. Mittels der GMM-Analyse wurden jedoch vier Voxel-Populationen in diesem Tumor ermittelt, wobei die grüne und die rote Populationen den höchsten Voxel-Anteil von 67 % darstellten. In der semi-quantitativen H&E-Analyse wurden nur kleine einzelne nekrotische Bereiche (ca. 13 %), über das Tumorfragment verteilt, identifiziert. Diese korrelierten mit kleinen Bereichen die eine schwache [¹⁸F]FDG-Anreicherung im korrespondierenden Autoradiographie-Datensatz aufwiesen (Abbildung 68 a; siehe rote Pfeile). In der parametrischen Karte des Tumorfragments wurde hauptsächlich die grüne Population ermittelt, die vorwiegend mit den vitalen Bereichen des Tumorfragments korrelierte (Abbildung 68 a).

Im zweiten PDOX-2.1 Beispiel wurden ebenso vier Voxel-Populationen ermittelt, wobei auch hier die meisten Voxel (76 %) der grünen und der roten Population angehörten. Der Tumor zeigte, mit einer [¹⁸F]FDG-Anreicherung von 1,3 %ID/cc, eine sehr hetero-

gene Anreicherung des Tracers, welche anhand von H&E-Färbung und Autoradiographie bestätigt werden konnte. Dabei wurde im Zentrum des Tumors ein Bereich mit nekrotischem Gewebe (Abbildung 68 b; rote Pfeile) und umliegend vitale Tumoreareale (Abbildung 68 b; weiße Pfeile) detektiert. Im korrespondierenden Autoradiographie-Datensatz konnte dies anhand von schwacher bzw. starker [^{18}F]FDG-Anreicherung gezeigt werden. Die nekrotischen Tumorbereiche mit einer schwachen Akkumulation von [^{18}F]FDG korrelierten mit der dunkelblauen und blauen Population im Zentrum des PDOX-Tumorfragments, die rote Population konnte den vitalen Bereichen mit einer sehr hohen [^{18}F]FDG-Anreicherung zugeordnet werden.

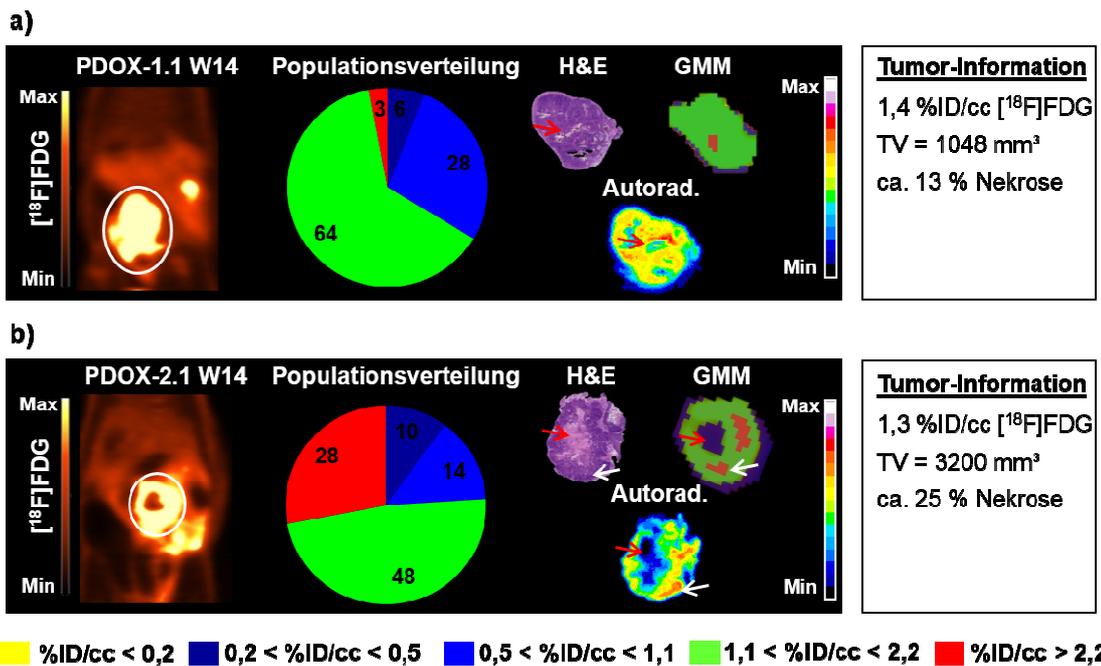


Abbildung 68: Tumorcharakterisierung mittels [^{18}F]FDG-Autoradiographie und GMM-Analyse in PDOX-Tumoren

Gezeigt sind zwei repräsentative Beispiele von PDOX-Tumor-tragenden Tieren nach der [^{18}F]FDG-PET in Woche 14 mit den zugehörigen GMM-Analysen des jeweiligen Tumors sowie der korrespondierenden H&E-Färbung, Autoradiographie und einer parametrischen GMM-Karte. Die Tumor-Information enthält Angaben zur [^{18}F]FDG-Anreicherung, Tumolvolumen (TV) und Nekrose-Anteil im H&E-Tumorfragment für jedes Beispiel.

Anhand der gezeigten Beispiele konnten die gelbe und die dunkelblaue Population eindeutig den nekrotischen Tumorbereichen zugeordnet werden, wobei die gelbe Population sich ausschließlich in der Tumormitte befand und verflüssigtes Gewebe repräsentierte. Außerdem konnten die grüne und die rote Population den vitalen Tumorregionen zugewiesen werden. Dennoch war es nicht möglich die blaue Population einer der Tumorregionen zuzuordnen, da diese teilweise mit nekrotischen und vitalen Regionen in den H&E-Färbungen der Tumorfragmente korrelierte und somit eine Mischpopulation darstellte. Vielmehr wurde an diesen Beispielen deutlich, dass die PDSX- und

PDOX-Tumoren unabhängig von der Tumorgöße unterschiedlich viel nekrotisches Tumorgewebe zum gleichen Zeitpunkt nach der Tumorimplantation aufweisen. Für eine eindeutige Zuordnung der Populationen sollte auch dieser Versuch wiederholt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

4.4.7.2 Korrelation von IHC-Histologie und GMM-Analyse

Mit den PDSX- und PDOX-Tumoren von Tieren aus der zweiten Versuchsreihe wurden nach dem letzten [^{18}F]FDG-Scan IHC-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die Tumorfragmente mit Ki67- und Glut1-Antikörpern gefärbt.

In Abbildung 69 sind zwei Beispiele von PDSX-Tumor-tragenden Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Das erste Beispiel PDSX-3.2 zeigt ein Tier nach [^{18}F]FDG-PET in Woche sechs mit einer [^{18}F]FDG-Tumoranreicherung von 0,7 %ID/cc (Abbildung 69 a). Dabei wurde eine heterogene Anreicherung des Tracers beobachtet, wobei nur am Rand des Tumors eine [^{18}F]FDG-Akkumulation erkennbar war. Mittels GMM-Analyse wurden vier Voxel-Populationen ermittelt, wobei die rote Population nicht identifiziert wurde und nur 21 % aller Voxel der grünen Population angehörten. Die gelbe und die dunkelblaue Population repräsentierten 30 % aller Voxel in diesem Tumor. Anhand der semi-quantitativen H&E-Analyse wurden nur am Rand des Tumorfragmentes vitale Regionen detektiert (Abbildung 69 a; weiße Pfeile). Bei der Betrachtung der Ki67-IHC-Färbung in den korrespondierenden Tumorfragmenten konnten Ki67-positive Zellen ebenso wie vitale Zellen nur am Rand des Tumors detektiert werden, was ein Hinweis auf vitale neoplastische Zellen ist, die sich in der Zellteilung befinden (Abbildung 69 a; weiße Pfeile). Damit konnten die vitalen Tumorbereiche anhand von zwei histologischen Analysen bestätigt werden. Die grüne Voxel-Population lag am Rand des Tumors, wo sich auch die vitalen Regionen des Tumors befanden, konnte aber nicht eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 69 a; weiße Pfeile).

Im Zentrum des H&E-Tumorschnittes befanden sich nur abgestorbene Zellen mit negativen Ki67-Färbung (Abbildung 69 a; rote Pfeile). In der korrespondierenden parametrischen GMM-Karte des Tumorfragmentes wurde im Zentrum die gelbe Population detektiert, welche von der dunkelblauen Population umgeben ist. Somit korrelieren die nekrotischen Tumorregionen mit den Voxel-Populationen der niedrigsten [^{18}F]FDG-Anreicherung (Abbildung 69 a; rote Pfeile). Demnach konnten anhand der H&E- und der IHC-Färbungen (Ki67) nur die gelbe und dunkelblaue Voxel-Population eindeutig der nekrotischen Region im Tumor zugeordnet werden. In diesem Tumorbeispiel wurde eine positive Glut1-Färbung nicht nur wie erwartet am Tumorrand, sondern auch in den nekrotischen Bereichen detektiert.

Anhand des zweiten PDSX-6.2 Beispiels aus Woche 30 konnten die bisherigen Populations-Zuordnungen bestätigt werden. Mit einer sehr geringen [^{18}F]FDG-Anreicherung (0,5 %ID/cc) zeigte der Tumor eine heterogene Tracer-Anreicherung, ähnlich dem vorausgehenden Beispiel. Es wurden ebenso vier Voxel-Populationen detektiert, darunter

nur 2 % der Voxel aus der grünen und 52 % der Voxel aus der gelben und der dunkelblauen Population sowie keine rote Population. In der H&E-Analyse konnten 90 % des Tumorfragmentes als nekrotisch identifiziert werden. Die IHC-Analyse bestätigte dies indem nur in den vitalen korrespondierenden Tumorbereichen eine positive Ki67-Färbung detektiert wurde (Abbildung 69 b; weiße Pfeile). Demnach konnte dieser Bereich der grünen Population und der nekrotische Bereich im Zentrum des Tumors der gelben und der dunkelblauen Voxel-Population zugeordnet werden (Abbildung 69 b; rote Pfeile). Auch in diesem Beispiel wurde eine positive Glut1-Färbung zusätzlich in den nekrotischen Tumorbereichen detektiert.

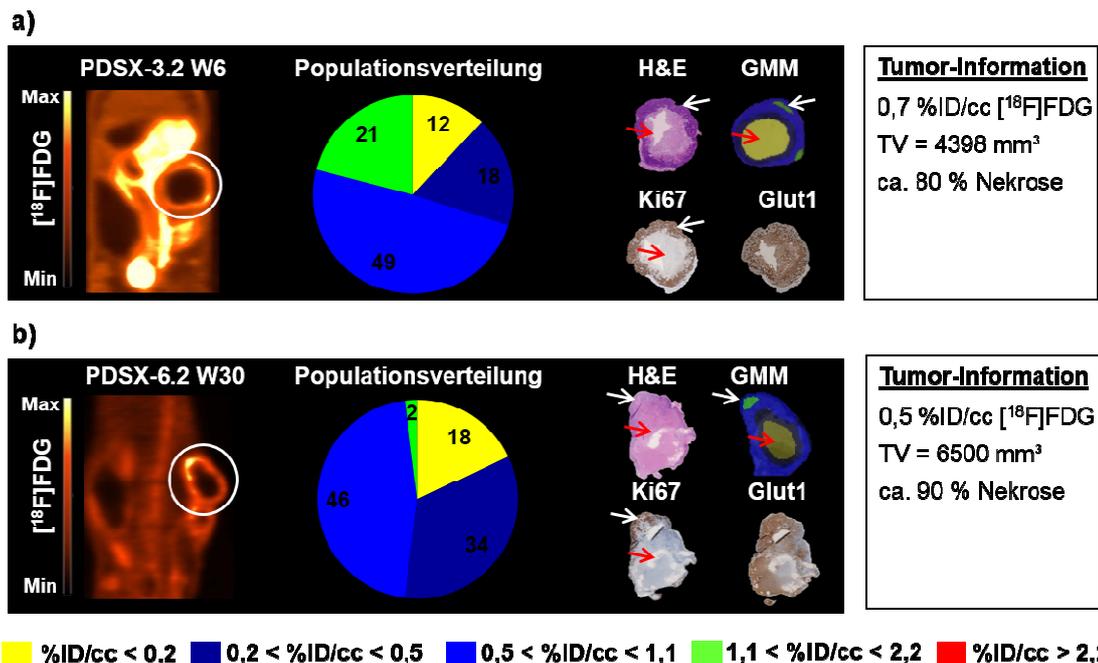


Abbildung 69: Tumorcharakterisierung mittels ICH-Färbungen und GMM-Analyse in PDSX-Tumoren

Gezeigt sind zwei repräsentative Beispiele von PDSX-Tumor-tragenden Tieren nach der $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET in Woche sechs und Woche 30 mit den zugehörigen GMM-Analysen des jeweiligen Tumors sowie der korrespondierenden H&E-Färbung, einer parametrischen GMM-Karte sowie Ki67- und Glut1-Färbung. Die Tumor-Information enthält Angaben zur $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Anreicherung, Tumolvolumen (TV) und Nekrose-Anteil im H&E-Tumorfragment für jedes Beispiel.

Zur Bestätigung der Zuordnung von Voxel-Populationen zu bestimmten Tumorbereichen anhand der IHC-Färbung wurden noch zwei weitere Beispiele der PDOX-Tumoren zu verschiedenen Zeitpunkten betrachtet. Abbildung 70 a) zeigt einen PDOX-1.2 Tumor in Woche zehn nach der $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET-Messung. Mit einer $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Anreicherung von 1,4 %ID/cc im Tumor wurde anhand der PET-Bilder eine heterogene Tracer-Anreicherung beobachtet. Dabei wurde erneut eine höhere $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Akkumulation am Tumorrand als in der Tumormitte beobachtet. Mit der GMM-Analyse

wurden nur drei Voxel-Populationen identifiziert. Darunter befanden sich die grüne Population mit 47 %, die blaue Population mit 40 % sowie die dunkelblaue Population mit 13 % aller Voxel. Durch die semi-quantitative Analyse der H&E-Färbung wurden im Zentrum des Tumorfragmentes ca. 20 % nekrotischer Regionen ermittelt. Diese sind jedoch von zahlreichen, einzelnen, kleinen „Inseln“ vitaler Zellen umgeben. Diese Bereiche korrelieren sehr gut mit den negativen (Abbildung 70 a; rote Pfeile) bzw. positiven Ki67-Färbungen (Abbildung 70 a; weiße Pfeile) im korrespondierenden Tumorfragment. Mittels der parametrischen GMM-Karte konnte nur die grüne Population dem vitalen Tumorbereich zugeordnet werden (Abbildung 70 a; weiße Pfeile). Die im Zentrum liegende blaue Population stellte den Mischbereich aus vitalen und nekrotischen Tumorbereichen dar (Abbildung 70 a).

Das zweite Beispiel PDOX-5.2 zeigt ein Tier in Woche 30 nach dem letzten [^{18}F]FDG-Scan dar. Auch hier wurden drei Voxel-Populationen mittels GMM-Analyse ermittelt. Dabei stellt die blaue Population mit 84 % aller Voxel die größte Population dar. Mittels H&E-Färbung wurden 65 % des Tumorfragmentes als nekrotisch identifiziert. Es wurden aber nur 6 % der dunkel blauen und keine gelbe Population in diesem Tumor detektiert. Die positive Ki67-Färbung im korrespondierenden Tumorfragment wurde nur in manchen Randregionen detektiert (Abbildung 70 b; weiße Pfeile). Diese konnten den wenigen grünen Bereichen in der parametrischen GMM-Karte zugeordnet werden. Die dunkelblauen und blauen Populationen konnten in diesem Tumorbeispiel nicht eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 70 b).

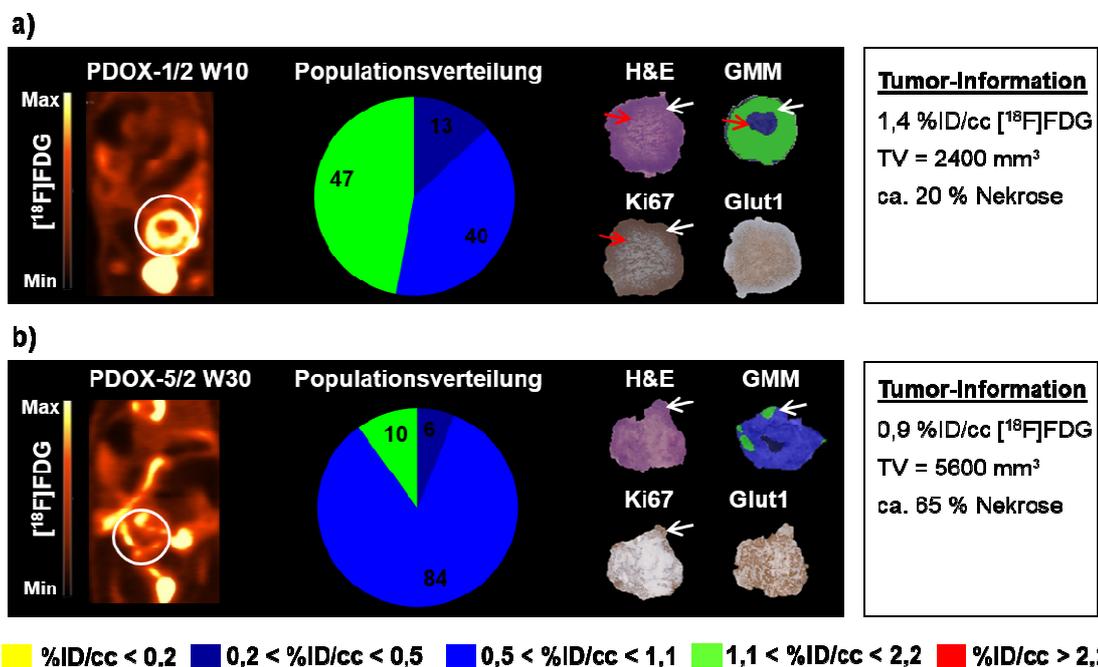


Abbildung 70: Tumorcharakterisierung mittels IHC-Färbungen und GMM-Analyse in PDOX-Tumoren

Gezeigt sind zwei repräsentative Beispiele von PDOX-Tumor-tagenden Tieren nach der [^{18}F]FDG-PET in Woche zehn und Woche 30 mit den zugehörigen GMM-Analysen des jeweili-

gen Tumors sowie der korrespondierenden H&E-Färbung, einer parametrischen GMM-Karte sowie Ki67- und Glut1-Färbung. Die Tumor-Information enthält Angaben zur [¹⁸F]FDG-Anreicherung, Tumolvolumen (TV) und Nekrose-Anteil im H&E-Tumorfragment für jedes Beispiel.

Anhand von jeweils 4 exemplarischen Tieren aus der PDSX- und PDOX-Versuchsgruppe konnten die gelbe und die dunkelblaue Population den nekrotischen sowie die grüne und die rote Population den vitalen Tumorregionen eindeutig zugeordnet werden. Außerdem wurden klare Unterschiede in der Entwicklung von Nekrose zwischen den PDOX- und PDSX-Tumoren detektiert. Durch die Zuordnung der Populationen wurde in der longitudinalen Populations-Analyse (Abbildung 66 a, b) ab der sechsten Woche ein mindestens 3-fach erhöhter Anteil an nekrotischen Populationen (gelb und dunkel blau) in PDSX-Tumoren im Vergleich zu PDOX-Tumoren detektiert. Die vitalen Populationen (grün und rot) wurden ab der sechsten Woche in den PDOX-Tumoren mit einem mindestens 2-fach erhöhten Voxelanteil als in den PDSX-Tumoren ermittelt. Somit wurde eine unterschiedliche Tumorentwicklung des gleichen Patientenfragments in unterschiedlichen Körperregionen der Ratte detektiert. Folglich hatten subkutan und orthotop implantierte Tumorfragmente in der zweiten Woche einen sehr ähnlichen Ausgangszustand, entwickelten sich aber zunehmend unterschiedlich.

5 Diskussion

5.1 Evaluierung von *in vitro* und *in vivo* Seneszenz-Modelle

Die Seneszenz ist ein wichtiger Zellzustand welcher beim Alterungsprozess, in prä-maturen Läsionen sowie in soliden Tumoren beobachtet wurde. Der Zustand der Seneszenz stoppt beschädigte Zellen in ihrer Proliferation, wodurch sie in einen Ruhezustand versetzt werden, aber dennoch metabolisch aktiv bleiben. Dadurch wird der Organismus vor eventuellen Entartung der Zelle und vor einer möglichen Entstehung von Krebserkrankungen geschützt (Campisi 2011). Kommt es dennoch zu einer malignen Tumorentwicklung, kann eine Seneszenz durch eine entsprechende Krebstherapie induziert werden, denn während einer Chemotherapie sterben nicht immer alle Tumorzellen ab, manche Zellen gehen in den sogenannten Zustand der TIS über (LLeonart, Artero-Castro et al. 2009).

Die Seneszenz bringt jedoch nicht nur Vor- sondern auch Nachteile mit sich. Zum einen wirkt eine Seneszenz suppressiv auf das Tumorstadium, zum anderen bringt sie aber auch Gefahren mit sich, da seneszente Tumorzellen tumorfördernd wirken können und pro-inflammatorische Botenstoffe produzieren, die unter anderem das Tumorstadium begünstigen können (Lecot, Alimirah et al. 2016). Außerdem wird aktuell in der Literatur die Bedeutung der Seneszenz bei der Krebsentstehung im Alter diskutiert. Dabei sollen die drei altersspezifischen Merkmale wie die Fehlregulierung des SASPs, die abgeschwächte Immunsystemfunktion und die Genominstabilität unabhängig voneinander oder gemeinsam zu einer verschlechterten tumorsuppressiven Seneszenz-Antwort beitragen. Als Konsequenz können seneszente Zellen als prä-maligne Zellen betrachtet werden. Die Behandlung von seneszenten Zellen könnte somit eine präventive und therapeutische Strategie gegen Krebs sein (Loaiza und Demaria 2016).

Eine nicht invasive quantitative und qualitative Darstellung des seneszenten Gewebes im Patienten würde einen großen Nutzen für therapeutische Maßnahmen darstellen. So könnte im Anschluss an eine Krebstherapie eine weitere Therapie zur Vernichtung seneszenten Zellen stattfinden. Dies wird durch die neue Medikamentengruppe der Senolytika ermöglicht, die gezielt gegen seneszente Zellen wirksam sind (Zhu, Tchkonja et al. 2015). Dabei gibt es drei wichtige Vertreter: Quercetin, welches den PI3K-Signalweg inhibiert, Dasatinib, welches mit dem Ephrinrezeptor interagiert und Navitoclax, welches die Proteine Bcl2 und BclxL bindet (Zhu, Tchkonja et al. 2015, Chang, Wang et al. 2016, Zhu, Tchkonja et al. 2016). Dennoch entwickeln nicht alle Tumoren nach einer identischen Krebstherapie die TIS im gleichen Ausmaß, so dass die Therapie mit Senolytika nicht immer angebracht ist. Die nicht invasive Visualisierung seneszenten Tumorbereichen könnte an dieser Stelle von großem Nutzen sein.

Bildgebende Verfahren PET und MRT tragen bereits zur Optimierung der Krebstherapien bei (Pantel und Mankoff 2017). Dennoch ist es bis heute nicht möglich, trotz der hohen Sensitivität der PET, die Seneszenz *in vivo* im Tumor zu visualisieren. Diese Arbeit liefert die ersten präklinischen Untersuchungen für den ersten direkten Nachweis von Seneszenz *in vivo* mittels PET.

5.1.1 MCF7-, HCT116- und Hras-Zellen als geeignete *in vitro* Modelle für die Induktion der Seneszenz

Um geeignete Tiermodelle für die Etablierung neuer Seneszenz-Tracer zu ermitteln, wurden zunächst vier ausgewählte Zelllinien *in vitro* auf ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Seneszenz getestet. Dabei wurde die Induktion von zwei verschiedenen Seneszenz-Arten angestrebt, die TIS in HCT116-, HCT116PTTG^{-/-}- und MCF7-Zellen und die OIS in Hras-Zellen.

Die Induktion von Seneszenz mit Hilfe des Chemotherapeutikums Doxo wurde bereits in der Literatur anhand von *in vitro* Versuchen mit HCT116-Zellen beschrieben (Sliwinska, Mosieniak et al. 2009). Die Auswahl der geeigneten Doxo-Konzentration orientierte sich ebenfalls an der Literatur, wobei für unterschiedliche Zelllinien auch unterschiedliche Doxo-Konzentrationen für die Induktion von Seneszenz eingesetzt werden können (Chang, Swift et al. 2002, Schwarze, Fu et al. 2005, Taylor, Lehmann et al. 2011). Bei der Entscheidung über den Erfolg bzw. Misserfolg der Seneszenz-Induktion *in vitro* wurde auf die Ausprägung von anerkannten Seneszenz-Markern, wie einem positiven SA- β -Gal-Assay, einer veränderten Zellmorphologie sowie einem Proliferationsarrest in den betroffenen Zellen geachtet (Muñoz-Espín und Serrano 2014).

In dieser Arbeit wurde die Seneszenz-Induktion *in vitro* an drei unterschiedlichen Zelllinien (HCT116, HCT116PTTG^{-/-} und MCF7) mit jeweils drei unterschiedlichen Doxo-Konzentrationen getestet. Für allen drei Zelllinien wurde ein ähnliches Ergebnis erreicht, wobei sich eine Doxo-Konzentration von 500 nM als ungeeignet erwiesen hat, da diese ein Absterben beinahe aller Zellen in allen Zelllinien zur Folge hatte. Das entspricht der Beschreibung aus der Literatur, denn aufgrund der hohen Doxo-Konzentration in den meisten Zellen ein biologisch programmierter Zelltod, die sogenannte Apoptose, ausgelöst werden kann (Chang, Broude et al. 1999, Chang, Xuan et al. 1999).

Eine Doxo-Konzentration von 200 nM stellte sich für die Induktion von Seneszenz ebenso als unzureichend für alle drei Zelllinien heraus. Hier sind die zelleigenen Reparaturmechanismen in der Lage, die durch Doxo verursachten DNA-Schäden in den betroffenen Zellen auszugleichen (Kaina 2003). Aus diesem Grund konnte nur ein kleiner Anteil der Zellen im SA- β -Gal-Assays blau angefärbt und somit als seneszente Zellen identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Behandlung aller Zelllinien mit 250 nM Doxo für 24 h als die beste Methode zur Induktion von Seneszenz *in vitro* ermittelt. Die Durchführung des SA- β -Gal-Assays gilt als Goldstandard-Methode bei der Beurteilung von Seneszenz. Diese zeigte bei einer Doxo-Konzentration von 250 nM ein positives Ergebnis. Außerdem wiesen die untersuchten Zelllinien *in vitro* die für seneszenten Zellen typische Morphologie auf, wie von Ewald et. al. beschrieben (Ewald, Desotelle et al. 2010).

Die vorangegangenen Untersuchungen wurden im BrdU-Assay verifiziert, wobei alle genannten Zelllinien in drei verschiedenen Doxo-Konditionen untersucht wurden (Abbildung 31). Die Ermittlung des Proliferationszustandes der Zellen spielt für die Identifikation der Seneszenz, aufgrund des permanenten Proliferationsarrestes, eine wichtige Rolle (Gire und Dulić 2015). Serrano et al. zeigten mit Hilfe des BrdU-Assays am Beispiel von HrasV12-Zelllinie die Unterschiede in der S-Phase zwischen den Kontrollzellen und seneszenten Zellen (Serrano, Lin et al. 1997). In dieser Arbeit wurden vor allem in HCT116- und MCF7-Zelllinien mit Hilfe des BrdU-Assays eindeutige Proliferations einschränkungen nach 250 nM Doxo-Behandlung nachgewiesen, die durch eine sehr geringe Zellzahl in der S-Phase charakterisiert wurden.

Bei der Gesamtbetrachtung aller *in vitro* Ergebnisse (SA- β -Gal-Assay, BrdU-Assay und Zellmorphologie) wurde in HCT116- und MCF7-Zellen eine erfolgreiche Induktion von Seneszenz mit 250 nM Doxo erreicht. Diese beiden Zelllinien wurden daher für weitere Etablierung als Xenograftmodelle der TIS eingesetzt.

Für das *in vitro* Modell der OIS wurde die bereits gut beschriebene und untersuchte Zelllinie GEPIRshp53WZLHras (Hras), mit freundlicher Unterstützung von Prof. Lars Zender, verwendet (Serrano, Lin et al. 1997, Zender, Xue et al. 2005). Aus diesem Grund wurden die Hras-Zellen *in vitro* nur morphologisch und mittels SA- β -Gal-Assays auf ihre Eigenschaft, Seneszenz zu entwickeln, untersucht. Prof. Lars Zender konnte bereits zeigen, dass diese Zellen HrasV12, p53shRNA und GFP unter einem Tetracyclin-Promotor exprimieren, der über die Gabe von Doxy aktiviert wird. Unter der verstärkten Expression von HrasV12 und der gleichzeitigen Hemmung der p53RNA-Translation kann die Zelle ungehindert proliferieren (Xue, Zender et al. 2007). Außerdem wurde bereits gezeigt, dass dieser Zellzustand durch die Ko-Expression von GFP mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden kann (Abbildung 32) (Zender, Xue et al. 2005). Zusätzlich wurde in diesen Zellen wie erwartet ein negatives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay detektiert.

Sobald das Doxy der Zelle nicht mehr zu Verfügung steht, stoppt die Expression der genannten Proteine und der p53shRNA. Nun kann die Translation von p53RNA und somit die Synthese des p53 Proteins wieder stattfinden, wodurch die Zelle in die OIS geleitet wird (Xue, Zender et al. 2007). Dieser Zellzustand wird nicht mit dem GFP-Signal in Zellen begleitet, womit das Fehlen des GFP-Signals in dieser Arbeit als eine weitere Kontrolle der Seneszenz-Induktion in den sich morphologisch veränderten

Hras-Zellen genutzt wurde (Abbildung 32). Zusätzlich wurde ein positives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay in den morphologisch sich stark veränderten Hras-Zellen detektiert, was die Ausbildung von Seneszenz bestätigte. In Übereinstimmung mit den Daten aus der oben beschriebenen Literatur, wurde die OIS in Hras-Zellen erfolgreich induziert und für diese Arbeit als ein neues *in vivo* Allograftmodell etabliert.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung der vier Zelllinien eine erfolgreiche *in vitro* Seneszenz-Induktion in nur drei Zelllinien: HCT116, MCF7 und Hras. Diese drei Zelllinien wurden als drei subkutane Tumormodelle für die Induktion der Seneszenz *in vivo* weiter eingesetzt.

5.1.2 Die Tumormodelle für TIS

Für die Etablierung der TIS *in vivo* wurden die MCF7- und HCT116-Zellen in subkutanen Xenograftmodellen verwendet.

5.1.2.1 MCF7-Xenograftmodell

Obwohl die *in vitro* Versuche vielversprechende Resultate mit der MCF7-Zelllinie repräsentierten, erwies sich diese im Tumormodell aus mehreren Gründen als nicht stabil und für die Etablierung der neuen Seneszenz-Tracer ungeeignet.

Zunächst wurde eine sehr geringe Anwachsrate von MCF7-Zellen beobachtet, da bei 12 von 20 Tieren kein Tumor detektiert werden konnte. Außerdem zeichneten sich die acht angewachsenen Tumoren durch eine verringerte Wachstumsrate aus. Erst 10 Tage nach der *s.c.* Zellinjektion konnten in einigen Tieren ein Tumor detektiert und vermessen werden (Abbildung 33). Auch in den folgenden zwei Wochen änderte sich das Tumolvolumen nur gering, so dass es für einen Einzeltumor maximal 53 mm³ betrug. Die schlechte Anwachsrate wurde bereits von Vickers et al. beobachtet, wobei sechs von zehn mit MCF7-Zellen injizierten Tieren einen Tumor entwickelten (Vickers, Dickson et al. 1988). Als Resultat wurden in dieser Arbeit zu jedem untersuchten Zeitpunkt sehr unterschiedliche Tumolvolumina gemessen, was zu einer großen Standardabweichung führte.

Das Hormon 17 β -Estradiol ist für das MCF7-Tumorstadium essentiell, daher könnte ein Mangel an 17 β -Estradiol ein zusätzlicher Grund für das schlechte Wachstumsverhalten der MCF7-Tumoren sein (Detre, Salter et al. 1999). Die unzureichende Versorgung mit 17 β -Estradiol könnte durch das Verrutschen des *s.c.* injizierten 17 β -Estradiol-Pellets entstanden sein, da die Tiere dieses als Fremdkörper erkannten und teilweise versuchten, es sich zu entfernen. Die Verwendung von 17 β -Estradiol-Pellets ist eine gängige Methode und wurde bereits mehrmals beschrieben, wobei Ju et al. die Abhängigkeit des MCF7-Tumorstadiums von der Menge der 17 β -Estradiol-Zufuhr zeigten (Ju, Allred et al. 2001, Appleyard, O'neill et al. 2009). Eine alternative Verabreichungsform stellt die Gabe des 17 β -Estradiols über das Trinkwasser dar und wurde bereits von Dubois et al. erfolgreich eingesetzt (Dubois, Dasnois et al. 2002). Im Rahmen die-

ser Arbeit wurden jedoch keine weiteren Versuche mit MCF7-Xenografttumoren durchgeführt, wodurch die Verabreichung von 17β -Estradiol über das Trinkwasser nicht mehr getestet wurde.

Des Weiteren wurden geringe Unterschiede in den Tumolvolumina zwischen der mit Doxo-behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe detektiert. Dieses Ergebnis deutete einerseits auf das kaum veränderte Tumor-Proliferationsverhalten beider Versuchsgruppen hin, veranschaulicht aber gleichzeitig den Therapiemisserfolg mit Doxo. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden beide Versuchsgruppen im [^{18}F]FLT-PET zur Detektion von Proliferation untersucht (Toyohara, Waki et al. 2002). Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in der Tracer-Akkumulation zwischen den Versuchsgruppen beobachtet, was einen weiteren Hinweis auf die unveränderte Proliferation nach der jeweiligen Behandlung darstellt (Abbildung 34).

Die Untersuchung des Glukosestoffwechsel mittels [^{18}F]FDG-PET zeigte erwartungsgemäß keine Unterschiede zwischen den Doxo-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe (Abbildung 34). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur, denn der Glukosemetabolismus im Tumor soll durch die Induktion von Seneszenz mittels Doxo unbeeinflusst bleiben (Burton und Krizhanovsky 2014). Ob Seneszenz in MCF7-Tumoren mittels Doxo induziert werden konnte, wurde an Tumorschnitten im SA- β -Gal-Assay getestet. Für beide Gruppen wurde ein negatives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay detektiert, was auf ein Fehlen von seneszenten Zellen in den untersuchten MCF7-Tumoren hindeutet. Die in dieser Arbeit und von anderen Autoren erfolgreich gezeigte *in vitro* Seneszenz-Induktion in MCF7-Zellen mittels Doxo konnte hier nicht auf ein *in vivo* MCF7-Seneszenz-Modell übertragen werden (Fornari Jr, Jarvis et al. 1996, Elmore, Rehder et al. 2002, Di, Shiu et al. 2009).

Unter Beachtung der genannten Aspekte: des sehr langsamen Tumorwachstums mit kleinen Tumolvolumina, dem ähnlichem Proliferationsverhalten der Tumoren zwischen den Versuchsgruppen sowie dem negativen SA- β -Gal-Assay in beiden Versuchsgruppen, konnte nur eine Schlussfolgerung zugelassen werden: das MCF7-Tumormodell eignet sich nicht als TIS-Modell für die Etablierung neuer Seneszenz-Tracer *in vivo*.

5.1.2.2 HCT116-Xenograftmodell

Im Gegensatz zu MCF7-Zelllinie wurde die HCT116-Zelllinie sowohl in den *in vitro* als auch in den *in vivo* Versuchen für die Etablierung neuer Seneszenz-Tracer verwendet.

Anders als beim MCF7-Xenograftmodell lag die Erfolgsquote der Tumorentwicklung nach der s.c. Injektion von HCT116-Zellen bei 100 %. Zwei Wochen nach Injektion der Tumorzellen konnte ein einheitliches Tumorwachstum in allen Tieren beobachtet werden (Abbildung 35). Diese Ergebnisse entsprechen den Literaturangaben mit ebenso erfolgreicher Anwachsrate von HCT116-Tumoren in immundefizienten Mäusen (Dimas, Hatziantoniou et al. 2007). Außerdem zeigte das HCT116-Xenograftmodell deutliche Unterschiede im Tumorwachstumsverhalten zwischen beiden Versuchsgruppen nach

der entsprechenden Behandlung (PBS oder Doxo), wobei die Kontrolltiere fünf Tage nach der PBS-Behandlung deutlich größere Tumoren entwickelten als die 10 mg/kg Doxo-behandelten Tiere. Diese Unterschiede wurden als erfolgreiche Doxo-Behandlung angesehen, denn nach Literaturangaben kann mit 10 mg/kg Doxo eine TIS in den HCT116-Zellen induziert werden (Tong, Zhao et al. 2011). Außerdem wurde bereits die Volumenreduktion in mit Mitose-Inhibitor-behandelten HCT116-Xenografttumoren in Vergleich mit Kontrolltumoren von Cullinane et al. beschrieben (Cullinane, Waldeck et al. 2014). Demnach wurde ein Proliferationsstopp in den mit Doxo-behandelten HCT116-Tumoren vermutet.

Hier wurde eine entsprechend höhere Akkumulation von [^{18}F]FLT in den Kontrolltumoren im Vergleich zu einer geringeren Akkumulation des Tracers in den Doxo-behandelten Tumoren erwartet (Abbildung 36). In der Literatur werden unterschiedliche Ergebnisse über die [^{18}F]FLT-Akkumulation im HCT116-Xenograftmodell berichtet. In einer Studie konnte [^{18}F]FLT-PET als nichtinvasiver Biomarker für eine frühe Therapieantwort in HCT116-Tumoren verwendet werden (Cullinane, Waldeck et al. 2014). In einer anderen Studie hingegen konnte am HCT116-Xenograftmodell gezeigt werden, dass [^{18}F]FLT nicht als zuverlässiger und alleiniger Proliferationsmarker angesehen werden kann (McKinley, Ayers et al. 2013). In dieser Arbeit konnte weder die erhöhte Proliferation einerseits, noch der vermutete Proliferationsstopp andererseits mittels [^{18}F]FLT-PET bestätigt werden. Beide Versuchsgruppen wiesen eine ähnliche [^{18}F]FLT-Anreicherung in den Tumoren auf, wobei sich [^{18}F]FLT nicht als zuverlässiger Proliferationsmarker erwies. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit die anerkannten Proliferationsmarker Ki67 und TK1 untersucht. Basierend auf der Literaturrecherche wurde höhere Expression dieser Marker in den unbehandelten Zellen erwartet (Schlüter, Duchrow et al. 1993, Rahmanzadeh, Hüttmann et al. 2007, Zheng, Pei et al. 2009). Dennoch lieferte die IHC-Untersuchung keine Unterschiede in der Expression beider Zellproliferationsmarker zwischen den einzelnen Versuchsgruppen und bestätigte somit die Ergebnisse der [^{18}F]FLT-PET.

Das Zellkernprotein Ki67 kann außer in der G0- auch in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus detektierbar sein (Gerdes, Lemke et al. 1984). Das liefert eine mögliche Erklärung für die positive Ki67-Färbung in den HCT116-Tumoren der Doxo-Gruppe, die sich aufgrund der vermuteten Seneszenz-Induktion in der G1-Phase befinden sollten. Außerdem ist bekannt, dass sich seneszente Zellen auch im G2-Arrest befinden können (Gire und Dulić 2015). Für einen eindeutigen Beweis des Proliferationsstopps müsste demnach gezeigt werden, in welcher Zellzyklusphase die Tumorzellen sich befinden. Ein möglicher Test hierfür wäre der BrdU-Assay mit Tumorzellen aus den jeweiligen Versuchsgruppen.

Die Aktivität der Zellzyklus abhängigen TK1 ist während der G1/S-Phase am höchsten (Aufderklamm, Todenhöfer et al. 2012). Die Ergebnisse der histologischen Untersu-

chung zeigten nur wenige TK1 positive Zellen in der Kontrollgruppe. Nach Absprache mit dem Team der Pathologie Tübingen, befanden sich beide Tumorgruppen zum untersuchten Zeitpunkt nicht mehr in der S-Phase. Dennoch wiesen die Wachstumskurven beider Tumorgruppen eindeutige Unterschiede im Proliferationsverhalten auf. Eine Untersuchung beider Gruppen zum früheren Zeitpunkt könnte hier von Bedeutung sein.

Die Literatur beschreibt einen aktiven Glukosemetabolismus in TIS und OIS, demnach wurden wie erwartet keine signifikanten Unterschiede im Glukosestoffwechsel mittels [¹⁸F]FDG-PET zwischen den beiden Gruppen im HCT116-Xenograftmodell ermittelt (Abbildung 36) (Perez-Mancera, Young et al. 2014). Dies bestätigt wiederum die Erwartung eines unveränderten Energieverbrauches in seneszenten Zellen, trotz des sehr geringen Tumorwachstums der mit Doxo-behandelten Gruppe.

Im *ex vivo* Versuch zur Überprüfung der Seneszenz-Induktion wurde mittels SA-β-Gal-Assays eine klare Divergenz zwischen den beiden Versuchsgruppen gezeigt (Abbildung 36). Die Tumortragmente der mit Doxo-behandelten Gruppe wiesen eine deutlich stärkere blaue Färbung im Gegensatz zu Kontrollgruppe auf, welche aus der erhöhten SA-β-Gal-Expression resultiert. Der SA-β-Gal-Assay wird als Goldstandardmarker für Seneszenz angesehen und wurde bereits mehrmals von zahlreichen Wissenschaftlern als Nachweis für Seneszenz in Tumoren verwendet (Shabbeer, SQ Kortenhorst et al. 2007, Pacheco-Rivera, Fattel-Fazenda et al. 2016, Zou, Baitei et al. 2016). Die positiven SA-β-Gal-Assay-Ergebnisse in dieser Arbeit geben einen zuverlässigen Hinweis auf die erfolgreiche Seneszenz-Induktion in den jeweiligen Tumoren. Dennoch gibt es keinen ultimativen Marker für den Nachweis einer Seneszenz, vielmehr sollen weitere anerkannte intrazelluläre Seneszenz-Marker wie p16, p53 und HP1γ untersucht werden, um zusätzliche Anhaltspunkte für eine erfolgreiche Seneszenz-Induktion *in vivo* zu erhalten (Sharpless und Sherr 2015).

Hierfür wurden die Paraffinschnitte der Tumoren beider Versuchsgruppen mittels IHC-Färbung auf die Expression genannter Proteine überprüft. Dabei wurde, wie erwartet, eine erhöhte Proteinexpression von p16, p53 und HP1γ in den Tumoren der mit Doxo-behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert (Abbildung 37). Diese Ergebnisse deuten auf die Induktion von Seneszenz in HCT116-Tumoren der mit Doxo-behandelten Tiere hin. Zusätzlich liefert die eindeutig höhere p16-Expression in den HCT116-Tumoren von Doxo-behandelten Tieren einen wichtigen Hinweis auf den Proliferationsstopp. Denn durch die Inhibierung von CDK4 und CDK6 verhindert das Protein p16 den weiteren Zellzyklusverlauf aus der G1- in die S-Phase und löst damit einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase aus (Sherr und Roberts 1999). Der damit verbundene Proliferationsstopp ist ein sehr wichtiger Marker für Seneszenz und darf nicht ignoriert werden (Campisi und di Fagagna 2007, Schmitt 2007).

Hildebrand et al. beschrieben FUCA1 als einen neuen Marker für Seneszenz und konnten anhand von *in vitro* Untersuchungen die Expression von FUCA1 in seneszenten Zellen nachweisen (Hildebrand, Lehle et al. 2013). In dieser Arbeit wurde FUCA1

mittels IHC-Färbung in den Tumoren beider Versuchsgruppen untersucht. Wie angenommen wurden eindeutige Unterschiede in der Expression zwischen den beiden Gruppen ermittelt, wobei eine stärkere FUCA1-Expression in Tumoren von mit Doxo-behandelten Tieren detektiert wurde. Somit wurde ein weiterer Nachweis für die Induktion einer Seneszenz in den mit Doxo-behandelten HCT116-Zellen erbracht.

Zusammen mit dem positiven SA- β -Gal-Assay weisen alle *ex vivo* Untersuchungen auf eine erfolgreiche Seneszenz-Entwicklung in den HCT116-Tumoren von Doxo-behandelten Tieren hin. Dennoch konnten die Unterschiede im Tumorwachstum und somit im Proliferationsverhalten zwischen den Versuchsgruppen nicht mit Untersuchungsmethoden wie [18 F]FLT-PET und IHC-Färbung der Proliferationsmarker Ki67 und TK1 bestätigt werden.

Die Behandlung von Tieren mit einem Chemotherapeutikum löst höchstwahrscheinlich eine gemischte Zellantwort im Tumor aus. Wie bereits in anderen Arbeiten an mehreren Zelllinien z.B. MCF7, HCT116 und H1299 gezeigt wurde, können die Zellen nach einer entsprechenden Chemotherapie in einen Zustand der Apoptose und/oder Seneszenz übergehen (Chang, Xuan et al. 1999, Suzuki, Mori et al. 2001, Chang, Swift et al. 2002, Roberson, Kussick et al. 2005, Gewirtz, Holt et al. 2008). Es ist anzunehmen, dass sich darunter Zellen befinden, die erfolgreich den DNA-Schaden reparieren und weiter proliferieren, sowie Zellen, die durch die Induktion von Apoptose absterben und Zellen, die in einen seneszenten Zustand übergehen (Lee und Schmitt 2003). Demnach war die teilweise positive Caspase3-Färbung in der Histologie zu erwarten, womit die Apoptose-Induktion in den betroffenen Tumoren gezeigt wurde.

Zusammenfassend wurde das HCT116-Xenograftmodell für TIS erfolgreich im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Demnach wurden die Tumoren der Doxo-behandelten Tiere als seneszent und die der PBS-behandelten Tiere als Kontrolltumoren bezeichnet und für die Evaluierung neuer Seneszenz-Tracer eingesetzt.

5.1.3 Das Tumormodell für OIS

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die bereits beschriebene und *in vitro* untersuchte GEPiRshp53WZLHras-Zelllinie zum ersten Mal als subkutanes *in vivo* Hras-Allograftmodell der OIS etabliert (Zender, Xue et al. 2005, Xue, Zender et al. 2007).

Zunächst wurden alle Tiere mit Doxy über das Trinkwasser versorgt. Dabei wurde nach der s.c. Zellinjektion eine 100 %ige Anwachsrate der Tumoren beobachtet, wodurch bereits zwei Wochen nach Zellinjektion die Tiere in zwei Gruppen randomisiert werden konnten. Auch hier wurden anhand der Tumorwachstumskurven eindeutige Unterschiede in der Tumorgröße zwischen den Tieren mit und ohne Doxy im Trinkwasser beobachtet (Abbildung 38). Wodurch der erste Hinweis auf die erfolgreiche Induktion einer Seneszenz geliefert wurde. Im Einklang mit der Literatur bestätigte das vorhandene GFP-Signal die Expression von HrasV12 und p53shRNA in den Tumoren der Tiere mit Doxy-Behandlung und das fehlende GFP-Signal deren Expressionsstopp in

Tumoren der Tiere ohne Doxy-Behandlung, wodurch diese Tiere Seneszenz in ihren Tumoren entwickeln sollten (Abbildung 39)(Xue, Zender et al. 2007).

Ähnlich zu den PET-Ergebnissen aus den beiden oben beschriebenen Mausmodellen, konnten auch beim Hras-Allograftmodell mittels der [¹⁸F]FDG- und [¹⁸F]FLT-PET keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen detektiert werden (Abbildung 40). Es wurde lediglich eine leicht erhöhte Anreicherung von [¹⁸F]FLT in den Tumoren der Tiere mit Doxy-Behandlung ermittelt. Die Untersuchung des Glukosestoffwechsels lieferte wie erwartet keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Dies spiegelt die Ergebnisse aus dem HCT116-Xenograftmodell wieder.

Eine Tendenz zu höheren Akkumulation von [¹⁸F]FLT in den Tumoren der Tiere mit Doxy-Behandlung konnte mittels TK1-Färbung in der Histologie der Tumorschnitten nicht bestätigt werden. Hier wurden keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Gruppen in der TK1-Expression detektiert. Daraus lässt sich schließen, dass die TK1-Färbung und somit auch die [¹⁸F]FLT-PET nicht für eine Untersuchung der Proliferation in den Hras-Tumoren geeignet ist.

Die Untersuchung von Ki67-Expression in der IHC-Färbung offenbarte hingegen eindeutige Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen und bestätigte die beobachteten Größenunterschiede der Tumoren mit deutlich mehr Ki67-positiven Zellen in den Tumoren der Tiere mit Doxy-Behandlung (Abbildung 41). Die Tumoren der Tiere ohne Doxy-Behandlung weisen nur eine geringe Anzahl von Ki67-positiven Zellen auf, was darauf hindeutet, dass sich Ki67-negative Zellen im Zellzyklusarrest und somit im Zustand der Seneszenz befanden. Die Detektion von Ki67 zur Bestätigung der Seneszenz wurde bereits in wissenschaftlichen Arbeiten publiziert, wodurch vorliegende Ergebnisse bestätigt wurden (Collado und Serrano 2006, Zalzal, Harajly et al. 2012). Außerdem zeigten Cathy et al. in ihrer Arbeit ähnliche Ergebnisse zur Ki67- und TK1-Färbung in verschiedenen Xenograftmodellen, wobei wie in der vorliegenden Arbeit auch Ki67 stärker als TK1 in proliferierenden Tumorzellen exprimiert wurde (Zhang, Yan et al. 2012).

Mit Hilfe weiterer IHC-Färbungen, welche die Expression von HP1 γ , p16, p53 und FUCA1 darstellen, wurde die Seneszenz-Entwicklung in den Tumoren von Tieren ohne Doxy-Behandlung bestätigt (Abbildung 41). Die genannten Proteine waren in diesen Tumoren stärker exprimiert als in Tumoren von Tieren mit Doxy-Behandlung. Außerdem wurde ein positives Ergebnis im SA- β -Gal-Assays von Tumoren der Tiere ohne Doxy-Behandlung detektiert, was ebenfalls auf die Entwicklung der Seneszenz hinweist. Demnach wurden die Tumoren der Tiere ohne Doxy-Behandlung als seneszent und die Tumoren der Tiere mit Doxy-Behandlung als Kontrolltumoren bezeichnet.

Zusammenfassend konnte anhand der Charakterisierung der drei unterschiedlichen subkutanen Tumormodelle ermittelt werden, welches Modell am besten für die *in vivo* Induktion von Seneszenz geeignet ist. Dabei wurde das MCF7-Xenograftmodell aufgrund des schlechten Anwachsens der Tumoren sowie der sehr kleinen Tumorgößen

und dem negativen SA- β -Gal-Assay als ungeeignet für die weitere Traceretablierung erachtet. Dahingegen wurden die HCT116- und Hras-Tumormodelle aufgrund des positiven SA- β -Gal-Assays und der zusätzlich positiven Färbung von p53, p16, HP1 γ und FUCA1 in der Histologie als *in vivo* Seneszenz-Tumormodelle für weitere Versuche zur Etablierung neuer Seneszenz-Tracer ausgewählt. Dabei zeigte sich das Hras-Allograftmodell, aufgrund der negativen Ki67-Expression, als ein sehr vielversprechendes Seneszenz-Modell. Zusätzlich wurde die Vermutung bestätigt, dass die Darstellung von Unterschieden zwischen den seneszenten Tumoren und den Kontrolltumoren anhand von bereits gut etablierten PET-Tracern wie [^{18}F]FLT und [^{18}F]FDG nicht an diesen Modellen möglich war.

5.1.4 [^{18}F] α -Fuc als möglicher Tracer zur Visualisierung von Seneszenz *in vivo*

In dieser Arbeit wurde der Tracer [^{18}F] α -Fuc als ein möglicher Seneszenz-PET-Tracer evaluiert. Hildebrand et al. haben das lysosomale Enzym FUCA1 als einen neuen Seneszenz-Marker identifiziert (Hildebrand, Lehle et al. 2013). Aufgrund ihrer Ergebnisse wurde das Enzym FUCA1 als Zielmolekül für den neuen [^{18}F] α -Fuc-Seneszenz-PET-Tracer in dieser Arbeit verwendet. Die α -L-Fucose gelangt über spezifischen Transport mithilfe von Fucosetransportern in die Zellen (Wiese, Dunlap et al. 1994, Dang, Sun et al. 2010). Demnach wird davon ausgegangen, dass auch der Tracer [^{18}F] α -Fuc auf demselben Weg in die Zelle gelangt.

Der Tracer [^{18}F] α -Fuc wurde zunächst *in vitro* mit Hilfe des Gammacounters und anschließend *in vivo* mit Hilfe der PET und MRT sowie *ex vivo* mit Hilfe der Autoradiographie und des SA- β -Gal-Assays untersucht. Hierfür wurden die beiden zuvor etablierten HCT116- und Hras-Seneszenz-Modelle nacheinander verwendet.

5.1.4.1 *In vitro* Evaluierung von [^{18}F] α -Fuc

Die *in vitro* Versuche mit den Zelllinien HCT116 und Hras lieferten klare Ergebnisse, wobei in beiden Zellkulturmodellen signifikante Unterschiede in der Traceranreicherung zwischen der Seneszenz- und der Kontrollgruppe ermittelt wurden. Die Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in seneszenten HCT116-Zellen lag 2-fach und in Hras-Zellen 3,5-fach höher im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen (Abbildung 42). Außerdem wurde eine ähnliche Traceranreicherung in den HCT116- und Hras-Zellen in beiden Kontrollgruppen ermittelt, was einen Hinweis auf ein ähnliches Verhalten des [^{18}F] α -Fuc-Tracers in allen nicht-seneszenten Zellen lieferte. Dennoch wurde anhand der durchgeführten *in vitro* Versuche nicht geklärt, ob die Tracer-Akkumulation bei beiden Zelllinien ausschließlich intrazellulär oder teilweise auch extrazellulär stattfand. Durch ausgiebige Waschschriffe aller Zellen mit PBS nach Inkubation mit dem Tracer, konnten eventuell unspezifisch gebundene Tracerrückstände an der Zelloberfläche minimiert werden.

5.1.4.2 *In vivo* Evaluierung von [^{18}F] α -Fuc im HCT116-Xenograftmodell

Die Untersuchung des Tracers [^{18}F] α -Fuc im HCT116-Xenograftmodell konnten die vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse leider nicht bestätigen. Anhand der dynamischen PET-Scans wurde die Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in Tumor und Muskel 60 min lang beobachtet. Bei der Betrachtung der TACs für die Tumoren konnte in den ersten paar Sekunden nach Tracerinjektion ein steiler Anstieg beider TACs entsprechend der Perfusion beobachtet werden (Abbildung 43). Dennoch wurde an keiner der Kurven ein Perfusionspeak beobachtet, sondern vielmehr ein flacher Anstieg. Dies deutet auf einen langsamen Einstrom und den Verbleib von [^{18}F] α -Fuc im Tumorgewebe hin. Im weiteren Verlauf erreichte die TAC der Kontrollgruppe einen Gleichgewichtszustand bei ca. 3,7 %ID/cc, was auf eine gleichmäßige Diffusion des Tracers zwischen dem Tumorgewebe und Blutgefäßen hindeutete. Im Gegensatz dazu zeigte die TAC der Tumoren der Doxo-Gruppe einen stetigen, flachen Anstieg bis 4,8 %ID/cc, was auf die andauernde Anreicherung des Tracers im Tumorgewebe hinwies. Für eine eindeutige Aussage über die Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc ist die Anzahl der untersuchten Tiere nicht ausreichend. Aus diesem Grund konnte nur eine Hypothese bezüglich der langsamen Tracerdynamik von [^{18}F] α -Fuc und der tendenziell höheren Tracer-Akkumulation in seneszenten HCT116-Tumoren aufgestellt werden. Für eine weitere Beschreibung der Tracerdynamik von [^{18}F] α -Fuc sind weitere Versuche notwendig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich waren.

Die Muskel-TACs beider Versuchsgruppen verliefen in den ersten 30 Minuten der [^{18}F] α -Fuc-Anreicherung identisch. Dieses Verhalten gab zunächst einen Hinweis darauf, dass der Muskel das ideale Referenzgewebe darstellte. Dennoch wurden anhand der Mittelwertanalyse von statischen [^{18}F] α -Fuc-PET-Daten signifikante Unterschiede in der Tracer-Akkumulation zwischen den Muskelgeweben der Doxo-behandelten und der PBS-behandelten Tieren ermittelt. Dies deutet darauf hin, dass das Muskelgewebe durch die Behandlung mit Doxo in irgendeiner Form beeinflusst wird, was durch die *ex vivo* Untersuchungen bestätigt werden konnte. Dabei zeigten die Muskelfragmente der mit Doxo-behandelten Tiere ein stärkeres Signal in der Autoradiographie als die der Kontrolltiere. Zusätzlich wurden sehr ähnliche Ergebnisse in der Autoradiographie zwischen Tumor und Muskel in den Kontrolltieren detektiert. Daher wird vermutet, dass [^{18}F] α -Fuc unspezifisch im Muskelgewebe angereichert wird. Denn zu den häufigsten Nebenwirkungen von Doxo gehört die Kardiotoxizität. Dabei werden die Herzmuskelzellen stark beschädigt, wodurch es zu einer Herzinsuffizienz kommen kann. Es ist bekannt, dass diese Substanz auch eine Wirkung auf die Skelettmuskulatur hat. Die C-13 Hydroxy-Metabolite der Anthracycline (Doxo) wirken unter anderem als ATPase-Hemmer im sarkoplasmatischen Retikulum der Muskelzellen und beeinträchtigen somit stark die Muskelfunktion (Olson und Mushlin 1990). Außerdem wird die Expression bestimmter Autophagie-Proteine nach Doxo-Gabe in den Skelettmuskelzellen hochreguliert, was wiederum auf die Erhöhung von Lysosomenmasse und somit von lysosomalen Enzyme mit sich bringt (Kroemer und Jäättelä 2005, Mizushima und Komatsu

2011, Smuder, Kavazis et al. 2011). Zwar wurde bislang die Wirkung von Doxo auf die Expression von FUCA1 nicht untersucht, dennoch wäre es möglich, dass aufgrund der erhöhten Anzahl von Lysosomen auch das Protein FUCA1 überexprimiert wird. Das würde die erhöhte Akkumulation von [^{18}F] α -Fuc in der Muskulatur der mit Doxo-behandelten Tiere erklären. An dieser Stelle der Tracerevaluierung wurden mehrere erfolglose Versuche unternommen das Enzym FUCA1 in unterschiedlichen Zelllinien und Gewebeproben nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde die bereits von Hildebrand et al. verwendete Methode angewendet (Hildebrand, Lehle et al. 2013). Die Ergebnisse des SA- β -Gal-Assays waren negativ und zeigten keine Unterschiede zwischen den beiden Muskelgruppen, was darauf hindeutet, dass nicht alle lysosomalen Proteine von Doxo beeinflusst werden.

Anhand der Mittelwertanalyse der statischen [^{18}F] α -Fuc-PET-Daten wurden signifikante Unterschiede in der Tracer-Akkumulation in den seneszenten und den Kontrolltumoren ermittelt (Abbildung 44). Die erhöhte Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in den seneszenten Tumoren wurde mit Autoradiographie und SA- β -Gal-Assay eindeutig bestätigt (Abbildung 45). Zusätzlich wurde die erhöhte Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in den korrespondierenden Tumorfragmenten der mit Doxo-behandelten Tiere in Form eines starken Signals in der Autoradiographie detektiert und durch positives SA- β -Gal-Assay bestätigt. Dennoch wurde vor allem durch die ähnliche Tracer-Akkumulation im Tumor- und Muskelgewebe dieser Tiere deutlich, dass dieses Modell für die Traceretablierung von [^{18}F] α -Fuc nicht geeignet ist.

5.1.4.3 *In vivo* Evaluierung von [^{18}F] α -Fuc im Hras-Allograftmodell

Die Evaluierung des Tracers [^{18}F] α -Fuc *in vivo* im OIS-Mausmodell mit Hras-Zellen lieferte vielversprechende Ergebnisse. Bei der Betrachtung der TACs für das Tumorgewebe wurden eindeutige Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen erfasst (Abbildung 46). In der ersten Sekunde nach Tracerinjektion wurde ein sehr steiler Tumorkurvenanstieg bei beiden Versuchsgruppen beobachtet. Das entspricht der gleichen Anflutung des [^{18}F] α -Fuc-Tracers im Tumorgewebe beider Gruppen. Bereits nach einer Minute erreichte die Tumorkurve der Kontrolltiere bei ca. 2,5 %ID/cc einen Gleichgewichtszustand und fiel in den letzten ca. 25 min leicht ab. Diese Art der Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in den Kontrolltumoren wurde als konstant angesehen. Im Gegensatz dazu stieg die Tumorkurve in den seneszenten Tumoren bis auf ca. 4,3 %ID/cc an und fiel in den letzten 30 min der Messung auf ca. 3,5 %ID/cc langsam ab. Diese Abflachung der TAC könnte auf den Abtransport des [^{18}F] α -Fuc-Tracers aus dem Tumorgewebe und somit auf eine unzureichende Tracerkopplung in der Tumorzelle hinweisen (van der Veldt, Smit et al. 2013).

Dennoch war die Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in den seneszenten Tumoren im gesamten Beobachtungszeitraum höher als die Tracer-Akkumulation in den Kontrolltumoren, was wiederum auf eine höhere Affinität von [^{18}F] α -Fuc zu den seneszenten Tumoren des Hras-Allograftmodells hindeutet. Die Mittelwertanalyse der [^{18}F] α -Fuc-PET-Daten

lieferte hierfür einen weiteren Hinweis, da signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen ermittelt werden konnten, wobei die Akkumulation von [^{18}F] α -Fuc in den seneszenten Tumoren 2-fach höher war als in den Kontrolltumoren (Abbildung 47).

Analog zu den Ergebnissen aus dem HCT116-Xenograftmodell wurde auch im Hras-Allograftmodell zunächst ein Einfluss der Behandlung, in diesem Fall mit Doxy, auf das Muskelgewebe detektiert. Dabei zeigten die Ergebnisse der dynamischen PET-Messung in den ersten Sekunden nach Injektion ein sehr starkes Einfluten, bis 3,7 %ID/cc, des [^{18}F] α -Fuc-Tracers ins Muskelgewebe der Kontrolltiere, welche Doxy im Trinkwasser bekamen. Im Vergleich dazu zeigte das Muskelgewebe der seneszenten Tiere ohne Doxy-Behandlung eine langsame Tracer-Anreicherung über die gesamte PET-Messzeit. Um den Verlauf der Trace-Anreicherung im Muskelgewebe beider Tiergruppen genauer zu untersuchen, sollten die dynamischen PET-Messungen wiederholt werden, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich war. Da jedoch nach 60 min in beiden Muskelgruppen eine sehr ähnliche Tracer-Anreicherung detektiert wurde, erwies sich der Einfluss von Doxy auf das Muskelgewebe für die hier vorliegende Fragestellung als irrelevant.

Anhand von *ex vivo* Versuchen wurde die erhöhte Affinität von [^{18}F] α -Fuc zu den seneszenten Hras-Tumoren bestätigt. Mit Hilfe der PET konnte eine erhöhte Tracer-Akkumulation in den seneszenten Tumoren visualisiert werden, wobei eine heterogene Tracer-Anreicherung in allen untersuchten Tumoren detektiert wurde. In den korrespondierenden seneszenten Tumorbereichen wurde in derselben Region eine erhöhte Tracer-Akkumulation mittels PET, ein starkes Signal in der Autoradiographie sowie ein positives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay detektiert (Abbildung 48). Im Gegensatz dazu wiesen die korrespondierenden Bereiche in Kontrolltumoren nur eine geringe Tracer-Anreicherung im PET, ein sehr schwaches Signal in der Autoradiographie sowie ein negatives Ergebnis im SA- β -Gal-Assay auf. Demnach kommt [^{18}F] α -Fuc als möglicher Tracer für die Detektion von Seneszenz in Frage.

Aufgrund der heterogenen Anreicherung von [^{18}F] α -Fuc in den Tumoren beider Mausmodelle wurde eine Maximalwertanalyse der statischen PET-Daten durchgeführt (Tabelle 10). Dabei wurde nur im Hras-Allograftmodell ein signifikantes Ergebnis zwischen den beiden Versuchsgruppen errechnet. Dadurch wurden die Daten aus der Mittelwertanalyse für beide Modelle bestätigt, womit sich das HCT116-Xenograftmodell als unpassend für die Evaluierung von [^{18}F] α -Fuc als Tracer zur Detektion von Seneszenz erwies.

Zusammenfassend weisen die gewonnenen Daten auf eine mögliche Anwendung von [^{18}F] α -Fuc für die Visualisierung von Seneszenz mittels nichtinvasiver PET hin, dennoch sollten weitere Untersuchungen mit anderen Tiermodellen für die endgültige Etablierung des [^{18}F] α -Fuc als Seneszenz-Tracer durchgeführt werden. Außerdem gelang es noch nicht, das Enzym FUCA1 als Ziel für [^{18}F] α -Fuc mit Hilfe von HPLC nach-

zuweisen. Zusätzlich bestehen noch Einsatzmöglichkeiten für den [^{18}F] α -Fuc-Tracer in der Früherkennung von Tumorerkrankungen. Es wurde gezeigt, dass FUCA1 in Tumorgewebe des CRC überexprimiert wird und als Früherkennungsmarker verwendet werden kann (Otero-Estévez, Martínez-Fernández et al. 2013). Außerdem wurde FUCA1 als Tumormarker für das hepatozelluläres Karzinom (HHC) gezeigt, dabei wurde eine höhere Serumaktivität von FUCA1 in HCC-Patienten als im Serum von Patienten mit anderen Lebererkrankungen nachgewiesen (Gan, Liang et al. 2014). Hier könnte der neue [^{18}F] α -Fuc-Tracer bei der *in vivo* Erforschung des HHC eingesetzt werden.

5.1.5 [^{18}F] β -Gal als möglicher Tracer zur Visualisierung von Seneszenz *in vivo*.

Aufgrund der hohen Stellung des Enzyms β -Gal als Goldstandard zur Detektion von Seneszenz wurde der Tracer [^{18}F] β -Gal für die nichtinvasive Visualisierung der Seneszenz *in vivo* entwickelt. [^{18}F] β -Gal wurde mittels HPLC eindeutig als Substrat für das Enzym β -Gal identifiziert. Außerdem wurde die Stabilität des Tracers [^{18}F] β -Gal im Blutserum ebenso mittels HPLC nachgewiesen (diese Ergebnisse sind in der Dissertation von Jonathan Cotton dargestellt). [^{18}F] β -Gal wurde an denselben Modellen wie bereits [^{18}F] α -Fuc evaluiert.

5.1.5.1 *In vitro* Evaluierung von [^{18}F] β -Gal

Die Untersuchung der Anreicherung des Tracers *in vitro* lieferte in HCT116- und Hras-Zellen signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen Kontroll- und seneszenten Zellkultur, wobei jeweils die seneszenten Zellen höhere Werte in der Anreicherung des Tracers im Bindungs-Assay zeigten (Abbildung 49). Mit Hilfe dieser Methode ist es nicht möglich, eine Aussage über den Ort der Tracer-Akkumulation, d.h. ob die gemessene Aktivität außerhalb oder innerhalb der Zelle akkumulierte, zu treffen. Zwar sollte der Transport des Tracers [^{18}F] β -Gal in die Zelle durch das Transmembranprotein Natrium/Glukose-Ko-Transporter 1 (SGLT1, engl. „*sodium/glucose cotransporter 1*“) erfolgen, dennoch ist trotz des gründlichen Waschens aller Zellproben nicht auszuschließen, dass der Tracer teilweise an der Zelloberfläche haften blieb (Blondal, Dick et al. 1985, Wood und Trayhurn 2003). Denn dadurch, dass seneszente Zellen auch ihre Oberflächenbeschaffenheit verändern, kann eine erhöhte unspezifische Bindung des Tracers an ihrer Zelloberfläche nicht ausgeschlossen werden (Hampel, Fortschegger et al. 2006).

Allgemein wurde eine schwächere Anreicherung von [^{18}F] β -Gal in HCT116-Zellen im Vergleich zu Hras-Zellen beobachtet. Dennoch wurde bei beiden Zelllinien eine 3-fach höhere [^{18}F] β -Gal-Akkumulation in den seneszenten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert. Demnach konnte anhand von *in vitro* Versuchen die Anreicherung von [^{18}F] β -Gal in beiden Seneszenz-Modellen *in vitro* gezeigt werden. Im nächsten Schritt wurde [^{18}F] β -Gal *in vivo* in zwei Mausmodellen getestet.

5.1.5.2 In vivo Evaluierung von [^{18}F] β -Gal im HCT116-Xenograftmodell

Die dynamische PET-Messung, über einen Zeitraum von 60 Minuten zur Erfassung der Anreicherung von [^{18}F] β -Gal im HCT116-Seneszenz-Modell zeigte keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 50). Dabei zeichnete sich eine ähnliche Tracer-Akkumulation zwischen den Tumoren und den Muskelgeweben beider Versuchsgruppen ab. Die Tracer-Akkumulation im Muskel ist wie erwartet in beiden Gruppen sehr ähnlich und geringer als in den Tumoren. Eine konkrete Aussage über die Tracerdynamik von [^{18}F] β -Gal anhand von zwei Tieren pro Gruppe ist nicht möglich. Für ein besseres Verständnis der Tracerdynamik sind zusätzliche dynamische PET-Messungen erforderlich.

Die Mittelwertanalyse der statischen [^{18}F] β -Gal-PET-Daten wurde mit jeweils fünf Tieren pro Gruppe durchgeführt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der Tracer-Anreicherung im Tumor zwischen den Gruppen erfasst werden (Abbildung 51). Es konnte lediglich eine Tendenz für eine höhere [^{18}F] β -Gal-Tracer-Akkumulation in den seneszenten Tumoren im Vergleich zu Kontrolltumoren detektiert werden. Dennoch zeigten die zugehörigen PET-Bilder eine sehr heterogene Tracer-Anreicherung innerhalb der seneszenten Tumoren. Es wurden Tumorbereiche mit sehr hohen Aktivitäten detektiert, welche die seneszenten Areale im SA- β -Gal-Assay widerspiegeln konnten. Aufgrund der Behandlung mit Doxo war es zu erwarten, dass eine heterogene Tumorzellenantwort innerhalb der einzelnen Tumoren auf die Therapie erfolgt. Demnach ist es anzunehmen, dass Tumorbereiche mit unterschiedlicher Tracer-Akkumulation detektiert werden. Die seneszenten Tumoren zeigten alle eine deutlich stärkere SA- β -Gal-Aktivität. Diese Bereiche korrelierten stark mit den Tumorbereichen, welche ein auffälliges Signal in PET und Autoradiographie zeigten, was auf die erfolgreiche Detektion von Seneszenz mit Hilfe des Tracers [^{18}F] β -Gal hindeutet (Abbildung 52).

Der Mittelwert der [^{18}F] β -Gal-Akkumulation in den Kontrolltumoren lag in dem gleichen Wertebereich wie der im Muskel. Außerdem wurden in den Kontrolltumoren keine Bereiche mit hoher Tracer-Akkumulation anhand der PET-Bilder beobachtet. Ebenso zeigte die Analyse der Autoradiographie-Daten hier ein schwächeres Signal als in den seneszenten Tumoren.

Unter Betrachtung all dieser Ergebnisse und besonders der negativen SA- β -Gal-Aktivität in den Kontrolltumoren, sind die Unterschiede in der [^{18}F] β -Gal-Tracer-Akkumulation im Vergleich zu den seneszenten Tumoren eindeutig. Außerdem ist die Tracer-Akkumulation im Muskel beider Versuchsgruppen sehr ähnlich, womit Doxo keine erkennbaren Veränderungen im Muskelgewebe verursacht, die mittels [^{18}F] β -Gal-Tracer zu erfassen sind. Dies ermöglicht eine Unterscheidung von seneszenten und nicht seneszenten Tumoren mit dem Tracer [^{18}F] β -Gal. Somit liefert das HCT116-Xenograftmodell die ersten Hinweise auf die erfolgreiche Funktion des [^{18}F] β -Gal-Tracers im Tumorgewebe.

5.1.5.3 *In vivo* Evaluierung von [^{18}F] β -Gal im Hras-Allograftmodell

Anhand des Hras-Allograftmodells für OIS wurden die bereits aus dem HCT116-Xenograftmodell gewonnenen Hinweise auf die Funktionalität des neuen [^{18}F] β -Gal-Tracers bestätigt.

Die 90-minütigen dynamischen [^{18}F] β -Gal-PET-Messungen wurden an fünf Tieren mit seneszenten Tumoren und an drei Tieren mit Kontrolltumoren durchgeführt (Abbildung 53). Dabei konnte während der gesamten Messung eine höhere Tracer-Akkumulation in den seneszenten Tumoren beobachtet werden. Die TAC der seneszenten Tumoren befand sich zwischen der zweiten und der 20ten Minute nach der Injektion im Gleichgewicht, anschließend konnte eine leichte Auswaschung des Tracers aus dem Tumorgewebe beobachtet werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass [^{18}F] β -Gal-Tracer spezifischer in den seneszenten Tumorzellen akkumuliert, wird jedoch vermutlich schwach in der Zelle gebunden oder schnell weiter verstoffwechselt, wobei die Aktivität aus der Zelle wieder langsam heraus geht.

Die TAC von den Kontrolltumoren verlief zwischen der zweiten und zwölften Minute relativ konstant und fiel anschließend sehr langsam und stetig ab. Das deutet auf die sehr schnelle Verstoffwechslung des [^{18}F] β -Gal-Tracers oder auf eine schlechte Rückhaltung in den Kontrolltumoren hin. Außerdem wurde bei keiner Behandlungsgruppe ein Perfusionspeak beobachtet. Der Tracer wurde von den Tumorzellen aufgenommen und erst nach einiger Zeit konnte dessen langsame Auswaschung beobachtet werden.

Die Muskel-TACs beider Gruppen verliefen sehr ähnlich mit kaum unterschiedlichen Akkumulationswerten des Tracers. Das zeigt, dass die Therapie mit Doxy keinen erkennbaren Einfluss auf die Muskulatur nimmt, welche mit [^{18}F] β -Gal detektiert werden kann.

In der Mittelwertanalyse der PET-Daten wurden signifikante Unterschiede in der [^{18}F] β -Gal-Tracer-Akkumulation zwischen den seneszenten und den Kontrolltumoren detektiert (Abbildung 54). Dabei lagen die Werte der Kontrolltumoren auf demselben Niveau wie die des Muskels. Das zeigt, dass nur in den Tumoren mit induzierter Seneszenz der [^{18}F] β -Gal-Tracer akkumuliert und nicht in anderen Geweben oder nicht in seneszenten Tumoren. Ein Hinweis für [^{18}F] β -Gal-Tracerspezifität konnte durch die Korrelation von Tumorbereichen mit starkem PET-Signal mit der korrespondierenden Autoradiographie und der SA- β -Gal-Aktivität in den seneszenten Tumoren erbracht werden. Zusätzlich wurde nur ein schwaches Signal in der Autoradiographie und keine SA- β -Gal-Aktivität in den korrespondierenden Kontrolltumoren erfasst, was erneut auf die Spezifität des [^{18}F] β -Gal-Tracers hindeutet (Abbildung 55). Demnach lieferte Hras-Zelllinie sehr zuverlässige Versuchsergebnisse in der Etablierung des [^{18}F] β -Gal-Tracers *in vitro* und *in vivo*.

Die Ergebnisse aus beiden Tiermodellen (HCT116 und Hras) deuten auf eine spezifische Detektion seneszenten Tumorzellen mittel des Tracers [^{18}F] β -Gal hin. Dabei zeigen beide Tiermodelle eine stärkere [^{18}F] β -Gal-Tracer-Akkumulation in den seneszenten Tumoren. Außerdem konnten Bereiche, die ein starkes Signal in der Autoradiographie zeigten, mit Bereichen, die eine positive SA- β -Gal-Aktivität aufwiesen, in beiden Modellen korreliert werden. Zusätzlich wurde bei beiden Tiermodellen im Muskel mittels PET und Autoradiographie keine [^{18}F] β -Gal-Akkumulation nachgewiesen.

Aufgrund der heterogenen [^{18}F] β -Gal-Tracer-Anreicherung wurde die Maximalwertanalyse in beiden Modellen durchgeführt. Ihre Ergebnisse bestätigen die Annahme einer höheren Tracer-Akkumulation in den seneszenten Tumoren. In beiden Modellen wurden signifikante Unterschiede zwischen der jeweiligen seneszenten und der Kontrollgruppe ermittelt. Demnach zeigen diese Daten, dass die Detektion von seneszenten Tumorearealen mit Hilfe von [^{18}F] β -Gal *in vivo* möglich ist und deuten auf eine mögliche Verwendung von [^{18}F] β -Gal als Seneszenz-Tracer hin.

Heutzutage gibt es keinen bekannten universalen Biomarker, durch den sich seneszenzente Zellen von quieszenten Zellen (ruhenden Zellen) und anderen sich nicht teilenden Zellen unterscheiden lassen würden. Yegorov et al. konnten anhand von Swiss 3T3-Zellen zeigen, dass das Enzym β -Gal auch in quieszenten Zellen exprimiert wird (Yegorov, Akimov et al. 1998). Aus diesem Grund wurden zur Bestimmung von Seneszenz mehrere Marker wie die Expression der Proteine p16 und p53, die Detektion von HP1 γ und der Nachweis einer erhöhten SA- β -Gal Enzymaktivität in allen verwendeten Modellen überprüft. Dennoch erfordert die weitere Evaluierung von [^{18}F] β -Gal als eindeutigem Seneszenz-Tracer weitere Tiermodelle. Hierfür könnten beispielsweise das Lymphommodell oder das Modell der Lungenfibrose, welches mittels Bleomycin induziert wird, verwendet (Aoshiba, Tsuji et al. 2003, Braig und Schmitt 2006, Aoshiba, Tsuji et al. 2013).

Die Seneszenz nimmt mit fortschreitender Forschung immer mehr an Bedeutung zu und eröffnet neue Zusammenhänge mit z.B. Stammzellenforschung. So zeigt die neueste Forschung, dass seneszenzente Zellen durch die Sekretion von SASP, besonders mittels IL-6, die Reprogrammierung von adulten ausdifferenzierten Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen begünstigt (*iPSCs*, engl. „*induced pluripotent stem cells*“) (Mosteiro, Pantoja et al. 2016). Demnach ist es nicht auszuschließen, dass die Verwendung des Seneszenz-Tracers nicht nur bei der Krebstherapie, sondern auch bei anderen Indikationen und Forschungsgebieten möglich wäre.

Parallel zur [^{18}F] β -Gal-Tracerevaluierung in anderen Tiermodellen wäre ein weiterer möglicher Schritt: die Translation in die Klinik. Dabei könnte die Prüfung des [^{18}F] β -Gal-Tracers nach dem Mikrodosis-Prinzip direkt am Patienten erfolgen (Bergström, Grahn et al. 2003).

5.2 Longitudinale *in vivo* Charakterisierung der PDX-Modelle mit PET und MRT

Eines der sehr beliebten und verbreiteten Modelle in der präklinischen Forschung ist das PDX-Modell, da es zahlreiche Vorteile gegenüber den *in vitro* und *in vivo* Zellkulturmodellen bietet (Hidalgo, Amant et al. 2014). Es wurde gezeigt, dass das PDX-Modell sehr gut für die Evaluierung von Chemotherapien geeignet ist und im Vergleich zu anderen Modellen die Reaktion des Patienten auf die Therapie deutlich besser prognostizieren kann (Talmadge, Singh et al. 2007, Garrido-Laguna, Uson et al. 2011, Tentler, Tan et al. 2012). Außerdem zeigen PDX-Tumoren in Histologie und Genexpression eine große Ähnlichkeit mit dem ursprünglichen Patiententumor (DeRose, Wang et al. 2011, Julien, Merino-Trigo et al. 2012, Zhao, Liu et al. 2012, Zhang, Claerhout et al. 2013). Dennoch darf nicht vergessen werden, dass alle PDX-Modelle lediglich eine Annäherung an die reale Situation im menschlichen Organismus darstellen. Umso wichtiger ist die richtige und individuelle Auswahl des Modells für die einzelnen Fragestellungen in der präklinischen Forschung.

In dieser Arbeit wurde das PDX-Modell des kolorektalen Karzinoms CR-LRB-018P mit einer Mutation im BRAF(V600E)-Gen, das für die Kodierung wichtiger Komponenten im ERK/MAP-Signalweg verantwortlich ist, verwendet (Julien, Merino-Trigo et al. 2012, Lavoie und Therrien 2015). Dabei wurde die Entwicklung der orthotop und subkutan implantierten Tumorfragmente aus dem gleichen Transplantationszyklus erstmalig longitudinal mittels nichtinvasiver bildgebender Verfahren untersucht.

An dieser Stelle sollen zunächst die unerwarteten Probleme mit den PDOX-Tumortragenden Tieren diskutiert werden. Wie bereits beschrieben wurde die Implantation aller Tumorfragmente nach einem etablierten Protokoll durch ein routiniertes Labor des Unternehmens Oncodesign in Frankreich übernommen und die entsprechenden Tiere in das WSIC Laboratorium geliefert (Julien, Merino-Trigo et al. 2012).

Zunächst wurde die Schwierigkeit beim Anwachsen von orthotop platzierten Tumoren beobachtet. Mittels der MRT-Untersuchung konnte bereits in der zweiten Woche nach der Operation der Implantationsmisserfolg erfasst und in der sechsten Woche bestätigt werden. Aus diesem Grund konnten insgesamt nur neun von 12 angeforderten und gelieferten Tieren mit PDOX-Tumoren in die Versuche aufgenommen werden.

Ein weiteres Problem wurde erst in der 10ten Woche ersichtlich. Drei der PDOX-Tumortragenden Tiere entwickelten an der Stelle der Operationsnarbe zusätzliche subkutane Tumoren. Es ist bekannt, dass CRC vor allem Leber- und Lungenmetastasen bildet (Fusai und Davidson 2003, Pfannschmidt, Dienemann et al. 2007, Andres, Mentha et al. 2015). Die Entwicklung von subkutanen Metastasen wurde demnach ausgeschlossen: zum einen weil es hierfür keine wissenschaftlichen Belege gibt und zum anderen, weil die Tumoren direkt aus der Operationsnarbe heranwuchsen. Sehr

wahrscheinlich entstanden diese durch Verunreinigungen mit kleinsten Zellresten des implantierbaren Tumorfragmentes beim chirurgischen Nähen der Tiere während der Operation. Aus diesem Grund mussten die betroffenen Tiere aus den weiteren Versuchen ausgeschlossen werden. Da dieses Problem rechtzeitig erkannt wurde und die subkutanen Tumoren bei allen drei Tieren noch sehr klein ($< 60 \text{ mm}^3$) und eindeutig von dem orthotopen Tumor abzugrenzen waren, wurden die zuvor ermittelten PET und MRT-Datensätze der orthotopen Tumoren in die Gesamtauswertung einbezogen.

5.2.1 Das unterschiedliche Wachstumsverhalten von PDOX- und PDSX-Tumoren

Die Detektion des Tumorwachstums mittels MRT ermöglichte die Erfassung des unterschiedlichen Wachstumsverhaltens zwischen subkutan und orthotop implantierten CR-LRB-018P-Tumoren (Abbildung 57).

Die stärkste Tumolvolumenzunahme wurde in beiden Gruppen zwischen Woche zwei und sechs beobachtet. Dabei stieg das Volumen in den PDSX-Tumoren 14-fach und in den PDOX-Tumoren 4,5-fach an, wobei fünf der PDSX-Tumoren bereits zu diesem Zeitpunkt die Abbruchkriterien für die Studie erreichten und die Tiere aus dem Versuch genommen werden mussten. Im Gegensatz dazu musste erst in Woche zehn ein PDOX-Tumor-tragendes Tier aufgrund der Tumorgroße aus dem Versuch genommen werden.

Diese enormen Wachstumsunterschiede zwischen den unterschiedlich platzierten Tumoren in den ersten sechs Wochen deuten auf ein unterschiedliches Proliferationsverhalten sowie eine unterschiedliche Versorgung der einzelnen Tumoren mit Nährstoffen und Sauerstoff hin. Dies könnte mit dem unterschiedlichen Verhalten der Tumoren beim Anwachsen zusammenhängen. Denn ausschließlich bei den orthotop platzierten Tumoren kam es zu Ausfällen der Tiere durch das nicht angewachsene Tumorfragment und bei den subkutan platzierten Tumoren wurden die Tiere aufgrund der Tumorgroße frühzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen.

Im weiteren Verlauf der Studie bis Woche 25 wurden sowohl innerhalb der einzelnen Gruppen als auch zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Tumorwachstum anhand der Volumenmittelwerte detektiert. Allgemein nahmen die orthotop platzierten Tumoren zwischen Woche sechs und 25 kaum an Volumen zu, was zunächst auf einen unveränderten Zustand der Tumoren hindeutete. Dennoch wird bei der Betrachtung von einzelnen Tumorwachstumskurven deutlich, dass manche Tumoren zwischen den einzelnen Messzeitpunkten eine Volumenreduktion mit anschließender Volumenzunahme zeigten. Diese Schwankung könnte aus der Methode der Ermittlung des Tumolvolumens mittels MRT resultieren, da es vor allem durch die Darmbewegungen zu Veränderungen in der Tumorage zwischen den einzelnen MRT-Messungen und somit zu möglichen Messabweichungen kommen könnte.

Die sehr hohen Standardabweichungen in den Mittelwerten der Tumorumfängen von PDSX-Tumor-tragenden Tieren zwischen Woche sechs und 14 spiegeln das unterschiedliche Wachstumsverhalten der einzelnen subkutan platzierten Tumoren wieder.

In den letzten fünf Wochen der longitudinalen Studie wurde eine sehr starke Volumenzunahme in einem verbliebenem subkutanen und in zwei orthotopen Tumoren beobachtet. Als Grund wird an dieser Stelle die in den durchgeführten *ex vivo* Experimenten detektierte fortgeschrittene Entwicklung von nekrotischen Tumorbereichen vermutet.

Die beschriebenen Wachstumsunterschiede in den orthotop und subkutan platzierten Tumoren deuten unter anderem auf ein unterschiedliches Proliferationsverhalten hin. Mittels nichtinvasiver [¹⁸F]FLT-PET ist es möglich, die Tumorphilierung zu visualisieren und nachzuweisen. Obwohl die erhöhte Aktivität von TK1 in den Zellen des CRC gezeigt wurde, ist die Verwendung von [¹⁸F]FLT bei der Untersuchung des CRC nicht weit verbreitet und auf bestimmte CRC-Phänotypen beschränkt (Sakamoto, Sagara et al. 1985). Beispielsweise haben klinische Studien gezeigt, dass [¹⁸F]FLT-PET in KRAS-Wildtyp-Tumoren und im metastasierenden CRC die Therapieantwort prognostizieren kann (Hong, Kim et al. 2013, McKinley, Watchmaker et al. 2015).

In dieser Arbeit wurde mittels [¹⁸F]FLT-PET die Tumorphilierung in beiden Versuchsgruppen überprüft (Abbildung 59). Aufgrund der enormen Zunahme des Tumorumfanges zwischen Woche zwei und sechs in den subkutanen Tumoren wurde hier eine stärkere [¹⁸F]FLT-Akkumulation als in den orthotopen Tumoren erwartet. Dennoch lieferte die PET-Mittelwertanalyse keine signifikanten Unterschiede in der Anreicherung von [¹⁸F]FLT zwischen den genannten Versuchsgruppen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte. Die stärkste Tumorphilierung wurde in beiden Gruppen in Woche zwei mit der höchsten [¹⁸F]FLT-Anreicherung im Vergleich zu allen späteren Zeitpunkten ermittelt. Dies spiegelt eine hohe Zellproliferation, sowohl in orthotopen als auch in subkutanen Tumoren, kurz vor dem Anstieg des Tumorumfanges wieder. Da auch im weiteren Versuchsverlauf beide Versuchsgruppen sehr ähnliche [¹⁸F]FLT-Anreicherungen in den Tumoren aufwiesen, die sich teilweise auf dem Niveau des Referenzgewebes Muskel befanden, wurde der Tracer [¹⁸F]FLT als unpassend für die zuverlässige Ermittlung der Proliferationsunterschiede angesehen.

Bei der Betrachtung von einzelnen [¹⁸F]FLT-PET-Bildern wurden kaum Unterschiede in der Tracer-Anreicherung detektiert. Subkutane Tumoren zeigten eine heterogene Anreicherung von [¹⁸F]FLT innerhalb des Tumors, wobei Regionen mit besonders schwacher bzw. keiner Tracer-Akkumulation auffielen. Diese Tumorbereiche deuten auf abgestorbenes, nekrotisches Gewebe hin. Ansonsten war das PET-Signal sehr schwach, weshalb die Tumordetektion nur mit zusätzlichen MRT-Aufnahmen möglich war. Demnach konnte die Tumorphilierung nur zur Beginn der Studie in Woche zwei mit Hilfe der Anreicherung von [¹⁸F]FLT in beiden Gruppen gezeigt werden. Diese Ergebnisse

bestätigen die seltene Verwendung von [¹⁸F]FLT in präklinischen Studien zum kolorektalen Karzinom (Francis, Visvikis et al. 2003).

Dennoch zeigte eine klinische Studie die gelungene Detektion von primären CRC-Tumoren ohne Angabe der zugrunde liegenden Mutationen mittels [¹⁸F]FLT, aber gleichzeitig wurde in dieser Studie eine schwache Sensitivität der [¹⁸F]FLT-PET in Bezug auf Lebermetastasen beobachtet (Francis, Visvikis et al. 2003). Eine weitere präklinische Studie mit der BRAF(V600E)-mutierten CRC-Zelllinie zeigte den Tracer [¹⁸F]FLT als vielversprechenden PET-Biomarker für das Ansprechen der Zellen auf die BRAF-Inhibitor-Therapie (McKinley, Smith et al. 2013). In der vorliegenden präklinischen Studie konnte [¹⁸F]FLT jedoch nicht als Biomarker für CRC bestätigt werden. Die abweichenden Ergebnisse könnten dabei aus den verschiedenen Tumormodellen resultieren; in der oben genannten Studie wurde mit der BRAF(V600E)-mutierten CRC-Zelllinie gearbeitet, wohingegen in dieser Arbeit das BRAF(V600E)-mutierte CRC-Tumorfragment verwendet wurde. Diese Vermutung wird durch eine klinische Studie bestätigt, welche die Insuffizienz der oben erwähnten BRAF-Inhibitor-Therapie im BRAF(V600E)-mutierten CRC zeigten (Kopetz, Desai et al. 2010, Prahallad, Sun et al. 2012, Scialfani, Gullo et al. 2013). Dieses Beispiel verdeutlicht die Relevanz der PDX-Modelle gegenüber den Zellkulturmodellen für die onkologische Forschung und bekräftigt die gewonnene Erkenntnis, dass sich [¹⁸F]FLT nicht als eindeutiger Proliferationsmarker für das BRAF(V600E)-mutierte CRC eignet.

Ein weiterer Grund für das unterschiedliche Wachstumsverhalten zwischen den orthotop und subkutan platzierten Tumoren kann eine vorherrschende Hypoxie sein. Hypoxische Tumore entstehen durch eine Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und werden mit aggressiven Tumorphänotypen und schlechten Prognose für die Patienten mit CRC assoziiert (Richards, Mohammed et al. 2011, Kalady, DeJulius et al. 2012). [¹⁸F]FMISO ist eines der am meisten verwendeten PET-Tracer zur Detektion der Hypoxie für die nichtinvasive *in vivo* Bildgebung und findet auch in klinischen Studien für den Nachweis hypoxischer Arealen im CRC Anwendung (Loi, Ngan et al. 2005). De Bruycker et al. haben in ihrer präklinischen Arbeit an einem subkutanen CRC-Xenograftmodell [¹⁸F]FMISO-PET als einen prognostischen Biomarker für eine Chemotherapie verwendet (De Bruycker, Vangestel et al. 2016). Aufgrund der hohen Hintergrundanreicherung von [¹⁸F]FMISO im Darmgewebe wird es in der klinischen Routine nicht angewendet (Loi, Ngan et al. 2005). Auch in der vorliegenden Arbeit traten in orthotopen Tumoren ähnliche Probleme auf. Durch die starke unspezifische Tracer-Akkumulation im Darmgewebe, kommt es zu einem Spillover Effekt, der weit in die orthotopen Tumoren der Tiere hineinreichte. Aus diesem Grund wurden wenige PDOX-Tumor-tragende Tiere in die Mittelwertanalyse von [¹⁸F]FMISO-PET-Daten aufgenommen.

Nur in der zweiten Woche konnte eine erhöhte Anreicherung von [¹⁸F]FMISO in den PDSX-Tumoren detektiert werden (Abbildung 60). Das deutet auf eine sehr schlechte Sauerstoffversorgung der subkutan platzierten Tumoren in den ersten zwei Wochen

nach Tumorimplantation hin. Zu allen anderen Zeitpunkten lag die [¹⁸F]FMISO-Akkumulation bei PDSX-Tumoren und im Muskelgewebe im gleichen Wertebereich, was wiederum auf eine verbesserte Sauerstoffversorgung der subkutanen Tumoren ab Woche zehn hindeutet.

Im Vergleich zu den subkutanen Tumoren wurde in den orthotopen Tumoren kein Unterschied in der Anreicherung von [¹⁸F]FMISO über die Zeit detektiert. Dabei war die Tracer-Akkumulation bei PDOX-Tumoren identisch zu der Anreicherung des Tracers im Muskelgewebe. Demnach konnte keine Sauerstoffunterversorgung in orthotopen Tumoren mit Hilfe von [¹⁸F]FMISO-PET nachgewiesen werden.

Aufgrund der signifikant erhöhten Anreicherung von [¹⁸F]FMISO in subkutanen Tumoren im Vergleich zu orthotopen Tumoren in Woche zwei und unter der Betrachtung der erhöhten Tumorproliferation in den subkutanen Tumoren zum selben Zeitpunkt, wird die Ausbildung von hypoxischen Arealen in diesen Tumoren als sehr wahrscheinlich erachtet. Zusätzlich wurde bei allen vier PDSX-Tumor-tragenden Tieren, die in Woche zwei mit [¹⁸F]FMISO untersucht wurden, in der sechsten bzw. in der zehnten Woche nekrotische Bereiche in den Gewebeschnitten der Tumoren in *ex vivo* Untersuchungen mittels semi-quantitativer H&E-Analyse nachgewiesen. Es ist bekannt, dass hypoxische Zellareale nekrotisch werden können, wie bereits von Shimizu et al. mit Hilfe von Konfokal- und Fluoreszenzmikroskopie anhand von Zellkulturmodellen gezeigt wurde (Shimizu, Eguchi et al. 1996). Dies bekräftigt zusätzlich die Hypothese, dass sich hypoxische Areale in den subkutanen Tumoren entwickelt haben.

Eine der wichtigsten Auswirkungen von Hypoxie auf die Tumorentwicklung ist die Induktion von Tumornekrose durch den Transkriptionsfaktor HIF1 α , der für die Regulation der Versorgung der Tumorzelle mit Sauerstoff verantwortlich ist (Nagaraju, Bramhachari et al. 2015, Zhang und Chen 2016). Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Expression von HIF1 α in CRC erhöht ist und belegen dessen Auswirkung auf die Entwicklung von Nekrose (Zhong, De Marzo et al. 1999, Yoshimura, Dhar et al. 2004). Demnach würde die Detektion von HIF1 α in subkutanen CR-LRB-018P-Tumoren den hypoxischen Tumorzustand bestätigen. Es war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die hierfür benötigten *ex vivo* Versuche in Woche zwei durchzuführen. Daher sind weitere Studien erforderlich, um CR-LRB-018P-Tumoren zu frühen Zeitpunkten nach der Implantation auf die Expression von HIF1 α zu untersuchen.

Da laut Literatur die Überexpression von Glut1 ebenso auf den Zustand der Hypoxie hindeuten kann, wurden Glut1-Färbungen in subkutanen und orthotopen CR-LRB-018P-Tumoren durchgeführt (Cooper, Sarioğlu et al. 2003, Zhang und Chen 2016). Wie in den Abbildungen 69 und 70 zu erkennen ist, wurden dabei kaum Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen detektiert. Die genaue Betrachtung und die Überlagerung von Glut1- und Ki67-Färbung mit starker Glut1-Färbung in Ki67 negativen Tumorbereichen (Abbildung 61), lieferten einen Hinweis auf die Entwicklung von Hypoxie in subkutan und orthotop platzierten CR-LRB-018P-Tumoren. Da jedoch in

orthotopen Tumoren im Vergleich zu subkutanen Tumoren zu frühen Zeitpunkten (vor Woche 30) generell mehr vitale Tumorbereiche mittels semi-quantitativer H&E-Analyse und positiver Ki67-Färbung nachgewiesen wurden (Abschnitt 4.4.7.2), konnten bei näherer Betrachtung von PDSX- und PDOX-Tumoren in W6 und W10 (Abbildung 69 und 70) tendenziell weniger Tumorbereiche mit starker Glut1-Färbung beobachtet werden. Diese Annahme wurde, aufgrund der unzureichenden Anzahl an Tumorfrementen, mit Glut1-Färbung (nur Tumoren aus der zweiten Lieferung wurden IHC durchgeführt), nicht mittels semi-quantitativer Analyse überprüft. Daher liefert die Glut1-Färbung lediglich einen weiteren Hinweis auf die stärkere Entwicklung von Hypoxie in subkutanen im Vergleich zu orthotopen CR-LRB-018P-Tumoren.

5.2.2 Die Beurteilung von Angiogenese in PDSX- und PDOX-Tumoren

Für eine Beurteilung der Angiogenese wurde der Tracer [⁶⁸Ga]RGD verwendet, der das $\alpha\beta_3$ -Integrin an der Zelloberfläche von neu gebildeten Blutgefäßen detektieren kann (Haubner, Wester et al. 2001). Damit kann das wachsende Kapillarnetz, welches für die Entwicklung und das Wachstum von Tumoren sehr wichtig ist, beurteilt werden (Haubner, Wester et al. 2001). Außerdem ist bekannt, dass Hypoxie ein wichtiger Stimulus für die Ausbildung neuer Blutgefäße bzw. Kapillaren ist. (Dang, Chun et al. 2008). Zusätzlich konnte Vonlaufen et al. anhand von klinischen *ex vivo* Untersuchungen die unterschiedliche Expression von $\alpha\beta_3$ -Integrin im CRC nachweisen und diese als prognostischen Marker verwenden (Vonlaufen, Wiedle et al. 2001). Demnach wurde aufgrund des unterschiedlichen Hypoxiezustandes zwischen den subkutan und orthotop platzierten Tumoren eine höhere [⁶⁸Ga]RGD-Akkumulation in den PDOX-Tumoren erwartet. Diese Annahme wurde bei den untersuchten Tieren nicht bestätigt, da die erfasste Anreicherung von [⁶⁸Ga]RGD in allen Tumoren im Bereich der [⁶⁸Ga]RGD-Anreicherung des Referenzgewebes Muskel lag (Abbildung 62). Die $\alpha\beta_3$ -Integrin-Expression in BRAF(V600E)-mutierten CR-LRB-018P-Tumoren wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Daher wird vermutet, dass die $\alpha\beta_3$ -Integrin-Expression in betroffenen Tumoren für eine Detektion mittels [⁶⁸Ga]RGD nicht ausreichend war.

5.2.3 Die Unterschiede im Glukosestoffwechsel in PDOX- und PDSX-Tumoren

Die [¹⁸F]FDG-PET ist eine sehr gut etablierte und hilfreiche Methode für die Untersuchung von Patienten mit CRC und gehört mittlerweile zum Klinikalltag (Herbertson, Scarsbrook et al. 2009). Es wird für die Beurteilung des Behandlungserfolges und für die Einstufung des Krankheitsgrades vor dem operativen Eingriff eingesetzt (Paspulati, Partovi et al. 2015, Spick, Herrmann et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde [¹⁸F]FDG-PET zur Beurteilung des Glukosemetabolismus in subkutan und orthotop platzierten BRAF(V600E)-mutierten CR-LRB-018P-Tumoren verwendet. Die höchste [¹⁸F]FDG-Akkumulation (1,3 %ID/cc) wurde in beiden

Gruppen in der zweiten Versuchswoche ermittelt. Anschließend zeigten PDSX- und PDOX-Tumoren in Woche sechs eine signifikante Reduktion der [^{18}F]FDG-Anreicherung, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen detektiert wurde (Abbildung 58).

Anhand dieser Daten wurden keine Unterschiede im Glukosestoffwechsel zwischen subkutanen und orthotopen Tumoren in den ersten sechs Wochen erfasst. Daher wurde die Annahme getroffen, dass PDSX- und PDOX-Tumoren in den ersten sechs Wochen nach Implantation einen ähnlichen Glukosestoffwechsel aufwiesen, obwohl aufgrund der enorm unterschiedlichen Tumorgößen zwischen den beiden Versuchsgruppen Unterschiede in Woche zwei erwartet wurden.

Präklinische Studien mit verschiedenen Zelllinien konnten die Bedeutung von [^{18}F]FDG-PET in der Prognose des Proliferationsverhaltens von CRC zeigen (Burt, Humm et al. 2001). In dieser Arbeit wurden mittels [^{18}F]FDG-PET keine Unterschiede im Proliferationsverhalten ermittelt. Auch hier könnten die verschiedenen Tiermodelle ein Grund für die Diskrepanz zwischen Literatur und in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen sein.

Im weiteren Verlauf des Versuchs ab Woche zehn zeigte sich die Tendenz zu einer höheren Anreicherung von [^{18}F]FDG in den orthotopen Tumoren im Vergleich zu subkutanen Tumoren. Die Betrachtung der PET-Abbildungen bestätigt dies und offenbart außerdem eine sehr heterogene [^{18}F]FDG-Anreicherung, sowohl in subkutanen als auch in orthotopen CR-LRB-018P Tumoren während der gesamten Versuchszeit. Die Beurteilung des Glukosestoffwechsels mit Hilfe der Mittelwertanalyse der [^{18}F]FDG-PET-Daten erschien nicht ausreichend. Außerdem bestätigt die Literatur eine sehr hohe intratumorale Heterogenität des CRC, welche einen Einfluss auf die unterschiedliche Dynamik des Tumorwachstums nehmen kann (Sottoriva, Kang et al. 2015).

5.2.4 Die Untersuchung der intratumoralen Heterogenität in PDSX- und PDOX-Tumoren mittels GMM

Bei der Betrachtung der [^{18}F]FDG-PET-Bilder von subkutanen und orthotopen CR-LRB-018P-Tumoren wurden Regionen mit heterogener [^{18}F]FDG-Anreicherung detektiert. Es wurden Bereiche mit einer sehr hohen und Bereiche mit einer geringen [^{18}F]FDG-Akkumulation in mehreren Tumoren beobachtet. Zur näheren Betrachtung einzelner Tumorbereiche wurden die [^{18}F]FDG-PET-Daten für eine Voxel-basierte Analyse herangezogen. Dieser Verfahren wurde bereits erfolgreich von Schmitz et al. anhand eines Brustkrebsmodells etabliert (Schmitz, Schwab et al. 2016).

Obwohl dieses Verfahren im vorliegenden Modell noch weiterer Validierung bedarf, zeigt es gegenüber der Mittelwertauswertung von Tumor-ROI-Daten, bereits folgenden Vorteil: die genaue Betrachtung der heterogenen Tracer-Verteilung im untersuchten Tumorgewebe. Dabei werden die einzelne PET-Voxel entsprechend ihres Wertes [%ID/cc] mittels Gauß-Verteilung in verschiedene Populationen eingeteilt und diese

Daten dann zurück in das PET-Bild übertragen. Anhand der damit ermittelten parametrischen Tumorkarte kann die Anreicherung von [^{18}F]FDG definiert dargestellt und besser verglichen werden. Da alle implantierten Tumoren des gleichen Ursprungs sind, wurden alle Voxel der PDSX- und PDOX-Tumoren von allen Zeitpunkten aufsummiert. Außerdem konnte so ausgeschlossen werden, dass eine Population, die sich über einen Zeitraum entwickelt, übersehen wurde.

In Abbildung 65 ist die Aufteilung der Voxel-Populationen für subkutane und orthotope Tumoren dargestellt. Anhand dieser Histogramme konnte bereits die Beobachtung bestätigt werden, dass PDOX-Tumoren generell eine höhere [^{18}F]FDG-Akkumulation vorweisen als PDSX-Tumoren. Mit 45 % der vorhandenen grünen Population und mit 8 % der roten Population, präsentieren 53 % aller untersuchten Voxel in den orthotopen Tumoren eine hohe [^{18}F]FDG-Anreicherung (über 1,1 %ID/cc). Dahingegen sind es insgesamt nur 17 % aller Voxel in den PDSX-Tumoren, die eine hohe [^{18}F]FDG-Anreicherung repräsentieren. Außerdem wurde die gelbe Population, mit der geringsten Akkumulation von [^{18}F]FDG (unter 0,2 %ID/cc), mit 11 % aller Voxel ausschließlich in den subkutanen Tumoren und die rote Population, mit der höchsten Akkumulation von [^{18}F]FDG (über 2,2 %ID/cc), mit 8 % aller Voxel vorwiegend in orthotopen Tumoren detektiert. In subkutanen Tumoren konnten lediglich 0,1 % aller Voxel der roten Population zugeordnet werden, womit diese vernachlässigbar wurde. Demzufolge lieferte bereits die erste Betrachtung der aufsummierten Voxel aus allen Zeitpunkten eine Bestätigung über die unterschiedliche intratumorale Heterogenität zwischen subkutanen und orthotopen Tumoren.

Anhand der Mittelwertanalyse der [^{18}F]FDG-PET-Daten wurde die Annahme getroffen, dass subkutan und orthotop platzierte Tumoren in der zweiten und sechsten Woche nach Tumorimplantation einen ähnlichen Glukosemetabolismus vorwiesen. Diese Annahme wurde für Woche zwei teilweise durch die Populationsverteilung bestätigt (Abbildung 66). Die Verteilung der Populationen zeigte leichte Unterschiede im Ausgangszustand beider Tumorgruppen, da die rote Population mit 7 % stärker in den orthotopen Tumoren vertreten war im Vergleich zu 2 % in den subkutanen Tumoren. Die restlichen Populationen wiesen kaum Unterschiede in ihrer Verteilung zwischen den beiden Gruppen auf. Diese leichten Unterschiede im Glukosestoffwechsel und die zusätzliche Betrachtung der Daten aus der [^{18}F]FMISO-PET in Woche zwei liefern einen Hinweis auf die vermutlich schlechtere Nährstoff- und Sauerstoffversorgung und eine mögliche Hypoxie-Entwicklung in subkutanen Tumoren bereits in der zweiten Woche nach Tumorimplantation.

Die weitere Betrachtung der Populationsverteilung widerlegte die getroffene Annahme, dass subkutane und orthotope Tumoren in Woche sechs einen ähnlichen Glukosestoffwechsel aufweisen. Obwohl die Mittelwerte der [^{18}F]FDG-PET-Analyse zwischen den PDSX- und PDOX-Tumoren sehr ähnlich waren, wurden zu demselben Zeitpunkt deutliche Unterschiede in der Populationsverteilung ermittelt (Abbildung 66). Dabei repräsentierten subkutane Tumoren die grüne Population mit 21,2 % und orthotope

Tumoren mit 47 %, somit zeigten orthotope Tumoren einen 2,2-fach höheren Anteil der grünen Population mit einer [¹⁸F]FDG-Anreicherung zwischen 1,1 - 2,2 %ID/cc. Zusätzlich kam die gelbe Population mit 10 % aller Voxel, die Bereiche mit weniger als 0,2 %ID/cc repräsentiert, ausschließlich in den subkutanen Tumoren vor. Demnach kann nicht mehr angenommen werden, dass PDSX- und PDOX-Tumoren in Woche sechs einen ähnlichen Glukosestoffwechsel haben. Die Voxel-basierte Analyse offenbart deutliche Unterschiede im Glukosestoffwechsel und liefert Hinweis auf einen geringeren Stoffwechsel in den subkutanen Tumoren.

Die gelbe und dunkelblaue Populationen mit den geringsten [¹⁸F]FDG-Anreicherungen waren zwischen Woche sechs und vierzehn in den subkutanen Tumoren mit 28-60 % stark vertreten, dahingegen war die grüne Population mit hohen [¹⁸F]FDG-Anreicherungen mit 15-21 % schwächer vertreten. Das deutet auf die Reduktion des Glukosestoffwechsels und den Verlust der Zellvitalität in den subkutanen Tumoren hin. Im Gegensatz dazu war in PDOX-Tumoren zu gleichen Zeit die grüne Population mit 47-55 % und die rote Population mit 7-15% aller Voxel vertreten, somit dominierten in den PDOX-Tumoren die Bereiche mit einer hohen [¹⁸F]FDG-Akkumulation. Ausnahme stellt hier das Fehlen der roten Population in Woche sechs dar. In Woche zehn und vierzehn war die rote Population wieder mit 10-15 % vertreten. Das könnte daran liegen, dass nicht alle Tiere zu allen Zeitpunkten mit [¹⁸F]FDG-PET untersucht wurden. Dennoch weisen die orthotope Tumoren einen höheren Glukosestoffwechsel im Vergleich zu subkutanen Tumoren auf, was einen Hinweis auf vitale Tumorzellen mit einer sehr guten Nährstoff- und Sauerstoffversorgung gibt.

In Woche 30 war die Nekrose in allen drei untersuchten Tumoren sehr fortgeschritten, was anhand der semi-quantitativen H&E-Analyse festgestellt werden konnte, wobei ein subkutaner Tumor zu 52 % aus der gelben und dunkelblauen Population und die zwei orthotopen Tumoren nur zu 6 % aus der dunkelblauen und zu 84 % aus der blauen Population bestanden. Demnach ist in beiden Modellen von einem geringen Glukosestoffwechsel auszugehen.

Aufbauend auf der Identifizierung von fünf verschiedenen Populationen mittels der GGM-Analyse wurden parametrische Tumorkarten erstellt. Diese wurden dann mit den Daten der [¹⁸F]FDG-Autoradiographie, H&E-Färbung und IHC-Färbung mit Ki67- und Glut1-Antikörpern der korrespondierenden Tumorfragmente verglichen (Abschnitt 4.4.7.1 und 4.4.7.2). Die Zuordnung einzelner Populationen zu vitalen und nekrotischen Tumorbereichen erfolgte in subkutanen und orthotopen Tumoren getrennt voneinander. Dadurch wurde gezeigt, dass unabhängig von der Tumorplatzierung die gleiche Voxel-Population den bestimmten, durch die Histologie definierten, Tumorbereichen zugeordnet werden können.

Die semi-quantitative H&E-Analyse ermöglicht die genaue Untersuchung einzelner Tumorschnitte, um die Vitalität der Tumorzellen in dem betroffenen Tumorfragment zu beurteilen. Anhand dessen konnten vitale, nekrotische und gemischte Tumorbereiche

identifiziert werden. Durch den Vergleich der H&E-Histologie mit der GMM-Analyse der korrespondierenden Tumorfragmente konnten gelbe und dunkelblaue Populationen den nekrotischen sowie grüne und rote Populationen den vitalen Tumorregionen zugeordnet werden.

Zusätzlich wurde die Anreicherung von [^{18}F]FDG in der Autoradiographie mit den korrespondierenden Populationskarten verglichen. Dadurch konnte die gelben und dunkelblauen Populationen zu den Tumorregionen mit der geringsten [^{18}F]FDG-Anreicherung sowie die rote und grüne Population zu den Tumorregionen mit der höchsten [^{18}F]FDG-Anreicherung zugeordnet werden, was die Ergebnisse der semiquantitative H&E-Analyse bekräftigte.

Die Ki67-Färbung ermöglichte eine weitere erfolgreiche Zuordnung der Voxel-Populationen zu den vitalen und nekrotischen Tumorregionen. In Übereinstimmung mit der höchsten Anreicherung von [^{18}F]FDG in den vitalen Tumorarealen, zeigte sich in den korrespondierenden subkutanen und orthotopen Tumorfragmenten mit der positiven Ki67-Färbung. In den Tumorbereichen mit der geringsten [^{18}F]FDG-Anreicherung wurde in den korrespondierenden Tumoren keine Ki67-Färbung detektiert.

Demzufolge wurde die gelbe und dunkelblaue Population eindeutig den nekrotischen Tumorbereichen sowohl in subkutanen als auch in orthotopen Tumoren zugeordnet. Die mittels H&E-Analyse definierten nekrotischen Tumorregionen korrelierten mit den gelben und dunkelblauen Populationen in der parametrischen Tumorkarte und zeigten in der [^{18}F]FDG-PET sowie in der [^{18}F]FDG-Autoradiographie keine Tracer-Anreicherung mit einer zusätzlichen negativen Ki67-Färbung. Dabei wurde die gelbe Population ausschließlich in der Mitte des Tumors detektiert und repräsentierte die verflüssigte Tumormasse, wobei die dunkelblaue Population vor allem das nekrotische Tumorgewebe repräsentierte.

Die Zuordnung der roten und der grünen Population zu den vitalen Tumorregionen in subkutanen und orthotopen Tumoren war mittels der durchgeführten Analysen ebenso möglich. Hierbei korrelierten die mittels H&E-Analyse definierten vitalen Tumorregionen mit der roten und grünen Population in den parametrischen Tumorkarten und zeigten in der [^{18}F]FDG-PET sowie [^{18}F]FDG-Autoradiographie eine hohe Tracer-Anreicherung und eine zusätzliche positive Ki67-Färbung.

Die blaue Population konnte anhand der durchgeführten Analysen nicht genau definiert werden, da diese Bereiche der parametrischen Tumorkarte in der korrespondierenden H&E-Färbung vorwiegend vitale Tumorzellen, aber dennoch keine durchgehend positive Ki67-Färbung zeigten. Zusätzlich wurde eine positive GLUT1-Färbung in diesen Tumorregionen detektiert. Die zugehörige [^{18}F]FDG-Autoradiographie und [^{18}F]FDG-PET zeigten eine schwache Tracer-Anreicherung. Aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse wird vermutet, dass die blaue Population eine Art Mischpopulation der Tumorzellen darstellt. Ein deutliches Beispiel hierfür zeigt Abbildung 70 a) eines orthotopen Tumors in Woche zehn. Hier wurden einzelne nekrotische Tumorregionen umgebend

vom vitalen Tumorgewebe beobachtet. Da die Histologie sehr genau ist, konnten bei der Voxel-Analyse aufgrund der festen Voxel-Größe die kleinen nekrotischen Bereiche zwischen dem vorwiegend gesunden und vitalen Tumorgewebe nicht erfasst werden. Demnach wird angenommen, dass die blaue Population eine Mischpopulation aus noch vitalen, hypoxischen und bereits nekrotischen Zellen darstellt.

Zusammengefasst verdeutlichen diese Untersuchungen, dass in den subkutanen Tumoren die Entwicklung der Nekrose nach einer hypoxischen Phase bereits zwischen der zweiten und sechsten Woche deutlich schneller voranschreitet als in den orthotopen Tumoren, bei denen keine hypoxische Phase in der zweiten Woche detektiert werden konnte. Außerdem wird deutlich, dass nicht der Zeitpunkt nach der Implantation für die Entwicklung der Nekrose entscheidend ist, da alle Tumorfragmente zum selben Zeitpunkt eingesetzt wurden, sondern vielmehr sorgt der Implantationsort für die unterschiedliche Tumorentwicklung. Dies könnte teilweise auf die unterschiedliche räumliche Einschränkung beim Tumorwachstum zurückzuführen sein. Die subkutan implantierten Tumoren haben räumlich gesehen keine Einschränkungen für Volumenzunahme. Da die Haut ein sehr dehnbares Organ ist wird kein Druck auf den Tumor ausgeübt und dieser nicht in seinem Wachstum behindert. Die orthotop implantierten Tumoren befinden sich hingegen in ihrer natürlichen Umgebung am Darm, wobei der Tumor von allen Seiten mit benachbartem Darmgewebe und anderen Organen umgeben ist. Diese üben einen gewissen Druck auf den Tumor aus und können somit Einfluss auf das Tumorwachstum nehmen.

Hieraus konnte geschlossen werden, dass die Ursache der unterschiedlichen intratumoralen Heterogenität in subkutanen und orthotopen BRAF(V600E)-mutierten CR-LRB-018P-Tumorfragmenten an den unterschiedlichen Implantationsorten liegen könnte.

5.2.5 Das Diffusionsverhalten von PDSX- und PDOX-Tumoren

Die Untersuchungen des Diffusionsverhaltens der Tumoren mittels funktioneller MRT verdeutlichten und bestätigten die bereits ermittelten Unterschiede zwischen den subkutanen und orthotopen Tumoren. Bei diesem Verfahren wird die Diffusion der Wassermoleküle gemessen, wobei ein hoher ADC-Wert mit einer hohen Zellularität in nekrotischen Tumorbereichen assoziiert wird (Herneth, Guccione et al. 2003).

Eine Übersicht des Diffusionsverhaltens der subkutanen und orthotopen Tumoren über die Zeit ist in der Abbildung 63 dargestellt. Wie erwartet stieg zusammen mit dem Tumorumfang auch der ADC-Wert in den subkutanen und orthotopen Tumoren signifikant zwischen Woche zwei und sechs an. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Entwicklung von Nekrose, denn wie bereits Lyng et al. anhand von mehreren Xenograftmodellen gezeigt haben, besteht eine Korrelation zwischen dem steigenden ADC-Wert und der Nekrose im untersuchten Tumorgewebe (Lyng, Haraldseth et al. 2000). Außerdem konnte Dzik-Jurasz et al. anhand des rektalen Karzinoms aufgrund von Nekro-

se steigender ADS-Werte den Erfolg bzw. Misserfolg einer Chemotherapie voraussagen (Dzik-Jurasz, Domenig et al. 2002).

In dieser Arbeit wurden in der zehnten Woche signifikante Unterschiede in den ADC-Werten der subkutanen und orthotopen Tumoren erfasst. Dabei lag der ADC-Wert der PDSX-Tumoren wie erwartet über dem ADC-Wert der PDOX-Tumoren. Auffallend war das Verhalten der ADC-Werte der PDOX-Tumoren, denn diese stiegen nur innerhalb der ersten sechs Wochen an und blieben anschließend bis Woche 30 relativ konstant. Im Gegensatz dazu stieg der ADC-Wert in PDSX-Tumoren in den ersten zehn Wochen kontinuierlich an, nahm in der 14ten Woche etwas ab und stieg sehr stark in Woche 30 wieder an. Die Abnahme des ADC-Wertes in Woche 14 ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ein PDSX-Tumor-tragendes Tier aufgrund der Tumorgröße in Woche zehn aus dem Versuch genommen werden musste.

Die Ergebnisse aus der DW-MRT Analyse deuten erneut auf die stärker ausgeprägten nekrotischen Tumorregionen in subkutanen Tumoren im Vergleich zu orthotopen Tumoren hin. Der Zusammenhang zwischen Tumolvolumen und ADC-Wert wurde mittels Pearson-Analyse für beide Versuchsgruppen bestimmt (Abbildung 64). Dabei konnte gezeigt werden, dass orthotope Tumoren eine schwache Korrelation mit $R=0,68$ und subkutane Tumoren eine starke Korrelation mit $R=0,83$ aufwiesen. Demnach scheint das Tumolvolumen nicht entscheidend für die Entwicklung von Nekrose in orthotopen Tumoren zu sein. Dies konnte auch anhand des Vergleichs von einem subkutanen und orthotopen Tumor in derselben Woche mit ähnlichen Tumolvolumen mittels semi-quantitative H&E-Analyse gezeigt werden (Abbildung 67 a, und 68 a). Dabei wurde ein 3-fach höherer Anteil nekrotischer Areale im subkutanen als im orthotopen Tumorschnitt ermittelt. Demzufolge konnten eindeutig unterschiedliche Diffusionsverhalten zwischen den subkutanen und orthotopen Tumoren ermittelt werden.

Interessant wäre die Korrelation von ADC-Werten mit den $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET-Daten und den ermittelten Voxel-Populationen. Aufgrund der Versuchsplanung wurden die DW-MRT-Messungen während der longitudinalen Studie nicht am selben Tag wie die $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET-Messungen durchgeführt. Ausschließlich in Woche 30 wurden die genannten Untersuchungen am selben Tag vorgenommen. Am Beispiel von jeweils einem subkutanen und orthotopen Tumor wurden die ADC-Werte und die Mittelwerte der $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET-Daten in den einzelnen Voxel-Populationen für Woche 30 betrachtet. Die Abbildung 71 a) zeigt jeweils eine Schicht des subkutanen und orthotopen Tumors als überlagertes $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET/MRT-Bild, als parametrische Tumorkarte mit der Verteilung von Voxel-Populationen und als DW-MRT-Bild mit ADC-Werten einzelner Populationen. Dabei wurde der ADC-Wert für jede, mittels GMM-Analyse der $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET-Daten ermittelte Population pro Tumor betrachtet (Abbildung 71 b). Die Berechnung der Korrelation zwischen den ADC-Werten und den Mittelwerten der $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -PET-Daten der einzelnen Populationen erfolgte mittels Pearson-Analyse (Abbildung 71 c, d). Diese lieferte einen weiteren Beweis für die richtige Zuordnung der einzelnen Populationen. Beide Tumoren zeigten eine sehr starke Korrelation zwischen den hohen

ADC-Werten und den niedrigen Mittelwerten der [^{18}F]FDG-PET-Daten mit einem sehr ähnlichen Korrelationskoeffizienten von 0,96 und 0,91 (Abbildung 73 c, d). Demnach entspricht die gelbe Population mit nekrotischen Tumorbereichen einem sehr hohen ADC-Wert, welcher wiederum als Indikator für die fortgeschrittene Nekrose angesehen wird (Divine, Katiyar et al. 2016). Zusätzlich weist die grüne Population in beiden Tumoren die niedrigsten ADC-Werte auf und deutet auf vitale Tumoreale hin.

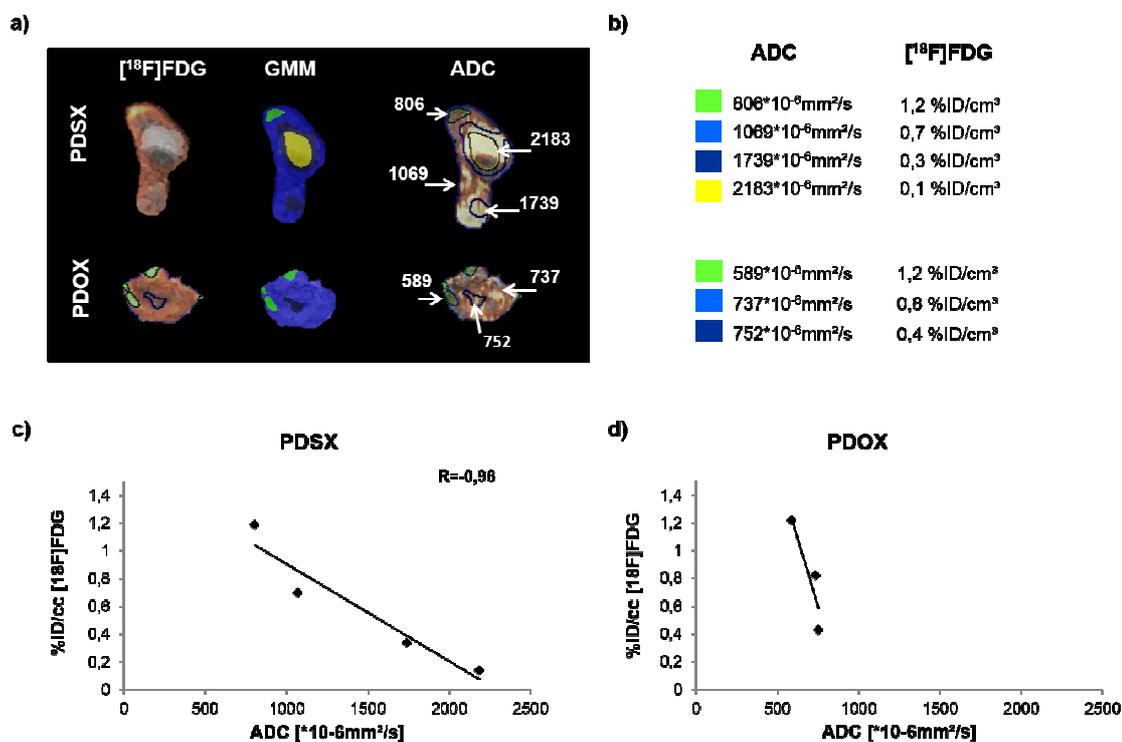


Abbildung 71: Sequentielle DW-MRT- und [^{18}F]FDG-PET-Aufnahmen von PDSX- und PDOX-Tumoren in Woche 30

Jeweils ein exemplarischer subkutaner und orthotoper Tumor ist als [^{18}F]FDG-PET/MRT-Bild, parametrische Tumorkarte mit Populationsverteilung und DW-MRT-Bild mit ADC-Werten gezeigt **a)**. Die ADC-Werte und [^{18}F]FDG-Mittelwerte der einzelnen Voxel-Populationen sind für den jeweils zugehörigen PDSX- und PDOX-Tumor tabellarisch dargestellt **b)**. Die Korrelation zwischen den ADC-Werten und den [^{18}F]FDG-PET-Mittelwerten aus denselben Voxel-Populationen wurde als Diagramm für einen subkutanen **(c)** und einen orthotopen **(d)** Tumor aus Woche 30 dargestellt. Die Korrelation wurde mittels Pearson-Analyse errechnet und ist im jeweiligen Diagramm als Korrelationskoeffizient (R-Wert) gezeigt.

5.2.6 Die klinische Relevanz von PDSX- und PDOX-Tumormodellen

Die Auswahl eines geeigneten Tumormodells ist stark von der Fragestellung abhängig. Um näher an der klinisch relevanten Forschung zu bleiben, werden oft PDX-Modelle verwendet (Hidalgo, Amant et al. 2014, Gao, Korn et al. 2015). Diese erhalten die speziesspezifischen Tumor-Stroma-Zellinteraktionen länger aufrecht und gewährleisten somit eine natürliche Tumorumgebung (Hylander, Punt et al. 2013, McIntyre, Buczacki

et al. 2015). Dabei können diese als orthotope oder heterotope Tumormodelle eingesetzt werden. Für beide Modelle gibt es Vorteile. Das heterotope PDSX-Modell ist aufgrund der unkomplizierten subkutanen Tumorimplantation und der Möglichkeit der visuellen Tumorwachstumsüberwachung einfach in der Handhabung und daher sehr beliebt in der präklinischen Forschung. Das PDOX-Modell bietet eine natürliche Tumorumgebung und wird oft in der Erforschung von Metastasen eingesetzt (Hiroshima, Zhang et al. 2015). Dennoch ist das PDOX-Modell komplizierter in der Tumorimplantation, die meist intraperitoneal erfolgt, sowie in der Überwachung des Tumorwachstums im Gegensatz zu dem PDSX-Modell. Mehrere Studien zeigen die Bedeutung und die klinische Relevanz des PDX-Modells für die personalisierte Medizin bei der Abschätzung des Erfolges der Chemotherapie und für die Medikamentenentwicklung (Talmadge, Singh et al. 2007, Garrido-Laguna, Uson et al. 2011, Tentler, Tan et al. 2012).

Laut Literatur wurde anhand klinischer Studien gezeigt, dass die moderat und schlecht differenzierten CRC-Tumoren mehr und öfter Nekrose aufwiesen als die gut differenzierten CRC-Tumoren (Gao, Arbman et al. 2005). In dieser Arbeit wurde das gut differenzierte PDX-Modell eingesetzt, dennoch wurde in den subkutanen Tumoren eine enorme Ausprägung von Nekrose zu sehr frühen Zeitpunkten beschrieben. Im Gegensatz dazu verhielten sich die orthotopen Tumoren ähnlich zu den Tumoren in Patienten und wiesen nur wenig Nekrose im späteren Versuchsverlauf auf. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten bestätigen, dass sich orthotope Tumoren, im Gegensatz zu subkutanen Tumoren, im Tiermodell ähnlich zu Tumoren in Patienten verhalten (Rubio-Viqueira und Hidalgo 2009). Außerdem demonstrieren diese Ergebnisse die klinische Relevanz von orthotopen Tumoren, vor allem im Hinblick auf die personalisierte Medizin, besonders bei Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung bei der Wahl der erfolgreichsten Chemotherapie (Killion, Radinsky et al. 1998, Hidalgo, Bruckheimer et al. 2011). Dennoch könnte der Einsatz von subkutanen PDX-Modellen zur Ermittlung des Therapieerfolges, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen in Hinblick auf die frühe Entwicklung von Nekrose, zu einer falschen Bewertung des Ergebnisses führen. Das Auftreten von Nekrose nach der Chemotherapie würde auf einen Behandlungserfolg deuten. Demnach verfügt das PDOX-Modell über ein stärkeres Potential, sich gegenüber dem PDSX-Modell in der präklinischen Forschung in Zukunft durchzusetzen.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit ist in zwei thematisch unterschiedliche Teile untergliedert. Zu einem wurden jeweils zwei *in vitro* und *in vivo* Seneszenz-Modelle etabliert, mit deren Hilfe anschließend jeweils [^{18}F] α -Fuc- und [^{18}F] β -Gal-PET-Tracer für die nichtinvasive *in vivo* Detektion von seneszentem Tumorgewebe evaluiert wurde. Zum anderen wurden grundlegende Unterschiede in der Entwicklung von gleichen PDX-Tumorfragmenten in Abhängigkeit vom Implantationsort gezeigt.

In erstem Abschnitt dieser Arbeit wurden zwei neue Seneszenz-Tracer [^{18}F] α -Fuc und [^{18}F] β -Gal evaluiert. Der [^{18}F] α -Fuc-Tracer soll als Substrat für das lysosomale Enzym FUCA1 agieren und aufgrund der Überexpression von FUCA1 in seneszenten Zellen stärker angereichert werden. Der [^{18}F] β -Gal-Tracer wirkt als Substrat für das lysosomale Enzym SA- β -Gal, das als eines der angesehensten Seneszenz-Marker bekannt ist. Beide hier verwendeten Seneszenz-Tracer wurden im WSIC von dem Dr. Jonathan Cotton entwickelt und hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden letztendlich jeweils zwei verschiedene Zellkultur- und Tiermodelle für die Austestung und Etablierung dieser Tracer evaluiert. Zunächst wurden die Tracer *in vitro* und anschließend *in vivo* an jeweils zwei zuvor etablierten Seneszenz-Modellen getestet. Das HCT116-Xenograftmodell für TIS ist näher an der klinischen Situation des Patienten als das Hras-Allograftmodell der OIS, da im präklinischen TIS-Modell, wie beim Patienten auch, nach der Chemotherapie mit Doxo eine gemischte Zellantwort im Tumorgewebe ausgelöst wird. Dabei geht ein Teil der Zellen in den Zustand der Apoptose, Nekrose und in Seneszenz über, wodurch das Tumorgewebe sehr heterogen wird. Das OIS-Modell wird durch ein Tet-on-Konstrukt kontrolliert und somit eine homogene Reaktion ausgelöst. Es eignet sich sehr gut für die Evaluierung neuer PET-Tracer, ist aber nicht klinisch relevanter. Die Detektion der Seneszenz in beiden Tiermodellen erfolgte durch mehrere Seneszenz-Biomarker wie p16, p53, HP1 γ , FUCA1, Ki67, TK1 und SA- β -Gal-Assay. Dadurch konnte die Seneszenz-Induktion in beiden Modellen bestätigt werden, sodass diese für die Evaluierung von Seneszenz-Tracer verwendet werden konnten.

Anhand von *in vitro* Zellkultur-Versuchen wurden [^{18}F] α -Fuc- und [^{18}F] β -Gal-Tracer als Seneszenz-Tracer erkannt. Für die weitere Etablierung wurden anschließend dynamische und statische *in vivo* PET- und MRT-Scans mit beiden Tiermodellen und jeweiligem Tracer durchgeführt. Dabei konnten unterschiedliche Tracer-Akkumulationen zwischen den seneszenten- und den Kontrolltumoren in beiden Tiermodellen mit beiden Tracern detektiert werden. Dennoch wurden hohe [^{18}F] α -Fuc-Tracer-Akkumulation im Muskelgewebe beider Gruppen beobachtet, die im HCT116-Xenograftmodell über der Akkumulation im Kontrolltumor lag. Aufgrund der niedrigen Muskelakkumulation des [^{18}F] β -Gal-Tracers in beiden Tiermodellen, die im Bereich von jeweiligen Kontrolltumo-

ren lag, kristallisierte sich [^{18}F] β -Gal als ein vielversprechender Seneszenz-Tracer heraus.

Zur Bestätigung der *in vivo* PET-Daten wurden die Muskel- und Tumorgewebe aus den jeweiligen Versuchen in verschiedenen *ex vivo* Experimenten wie Autoradiographie, SA- β -Gal-Assay und H&E-Färbung untersucht, wodurch sich [^{18}F] β -Gal-Tracer erneut als ein besserer Seneszenz-Tracer hervorhob. Der Einsatz des [^{18}F] α -Fuc-Tracers zur Visualisierung von Seneszenz ist nicht ausgeschlossen, dennoch wären auch andere Indikationen wie z.B. als Früherkennungsmarker bei HHC denkbar. Bis heute gibt es keinen Marker, der alleine in der Lage wäre, die Seneszenz eindeutig zu identifizieren. Es bedarf der Detektion von mehreren Seneszenz-Markern, um eindeutig auf die Seneszenz schließen zu können. Hinzu kommt noch, dass nicht alle seneszenten Zellen auch alle bekannten Seneszenz-Marker exprimieren. Dennoch wird bis heute SA- β -Gal-Assay als Methode der Wahl zum Seneszenz-Nachweis eingesetzt. Demnach hat der neue [^{18}F] β -Gal-Tracer sehr hohes Potential als Seneszenz-Tracer in die klinische Praxis einzusteigen.

In zweitem Abschnitt dieser Arbeit wurde ein BRAF(V600E)-mutiertes CR-LRB-018P-Tumormodell des kolorektalen Karzinoms des Unternehmens Oncodesign für die longitudinale Untersuchung der Tumorentwicklung an zwei verschiedenen Implantationsorten (orthotop und subkutan) verwendet. Dabei wurden subkutan und orthotop implantierte Tumoren über 30 Wochen lang mittels nichtinvasiver bildgebender Verfahren wie PET und MRT untersucht.

Zunächst wurden deutliche Unterschiede in der Zunahme der Tumorumfänge zwischen den beiden Tumorgruppen detektiert. Im weiteren Versuchsverlauf entwickelten sich die orthotopen Tumoren deutlich einheitlicher als subkutane.

Anhand der PET-Ergebnisse wurde zu Beginn der longitudinalen Studie in der zweiten Woche nach der Implantation ein gleiches Verhalten der subkutanen und orthotopen Tumoren bezüglich des Glukosestoffwechsels, der Tumorgöße und des Proliferationszustandes erfasst. Nur im Hinblick auf die Ergebnisse der Hypoxie-Analyse mittels PET wurde in den subkutanen Tumoren bereits in der zweiten Woche nach Implantation eine Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen vermutet. Als Folge dessen entwickelten die subkutanen Tumoren in den nächsten Wochen mehr nekrotische Tumoreareale als die vergleichbaren orthotopen Tumoren. Die Identifikation von nekrotischen Tumorbereichen erfolgte anhand mehrerer Analyseverfahren, deren Ergebnisse sich gegenseitig bestätigt haben. Es wurden mittels semi-quantitativer H&E-Analyse bestimmte Tumorregionen als eindeutig vital oder nekrotisch identifiziert. Da diese Methode nicht auf den gesamten Tumor anwendbar war, wurden die korrespondierenden Tumorbereiche auf die [^{18}F]FDG-Autoradiographie und in parametrische Tumorkarten nach GMM-Analyse übertragen. Auf diese Art und Weise wurden die mittels GMM-Analyse ermittelten Populationen den bestimmten Tumorregionen zugeordnet. Dem-

nach konnten gelbe und dunkel-blaue Voxel-Populationen den nekrotischen sowie die rote und grüne Voxel-Populationen den vitalen Tumorregionen zugewiesen werden. Die blaue Population wurde anhand von Glut1- und KI67-Färbungen als eine Art Mischpopulation bezeichnet und nicht weiter spezifiziert.

Aufgrund der definierten Voxel-Populationen konnte die unterschiedliche Verteilung der einzelnen Populationen und somit das unterschiedliche Tumorverhalten über die Zeit von 30 Wochen zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden. Dabei wurde nur in Woche zwei eine ähnliche Populationsverteilung zwischen den PDSX- und PDOX-Tumoren beobachtet, wobei bereits zu diesem Zeitpunkt PDOX-Tumoren mehr Voxeln der roten Population mit der stärksten Intensität vorwiesen und somit auf die leichten Unterschiede in der Nährstoffversorgung hinwiesen.

Im weiteren Zeitverlauf zwischen Woche sechs und 14 waren die gelbe und dunkel-blaue Population der nekrotischen Tumorareale in den subkutanen Tumoren deutlich stärker vertreten als in den PDOX-Tumoren ohne gelbe Population und demonstrierten damit stärker fortschreitende Nekrose in PDSX-Tumoren. In den PDOX-Tumoren waren hingegen rote und grüne Populationen, die das vitale Tumorgewebe repräsentierten, am stärksten vertreten. Das zeigte den stabilen Glukosestoffwechsel und offenbarte ein weniger aggressives Wachstumsverhalten mit geringeren nekrotischen Bereichen des orthotopen Tumors.

Mittels der Korrelation der ADC-Werte mit den Tumorumfängen innerhalb der Gruppen wurde gezeigt, dass bei den subkutanen Tumoren ein stärkerer Zusammenhang zwischen dem Tumorumfang und der Nekrose als in den orthotopen Tumoren besteht. Zusätzlich konnte mittels PET- und DW-MRT-Daten von jeweils einem PDSX- und einem PDOX-tragenden Tier aus Woche 30 eine Bestätigung der Zuordnung von Voxel-Populationen eingeholt werden. Dabei wurden die vitalen Tumorregionen den Tumorumfängen mit den niedrigsten ADC-Werten und nekrotische Tumorregionen den Tumorumfängen mit den höchsten ADC-Werten erfolgreich zugeordnet.

Demnach konnte mittels verschiedener Analyseverfahren ein entscheidender Unterschied zwischen den subkutan und orthotop platzierten BRAF(V600E)-mutierten CR-LRB-018P-Tumoren bewiesen werden. Die PDSX-Tumoren entwickelten Nekrose zum früheren Zeitpunkt und im größeren Ausmaß als die orthotopen Tumoren. Das entspricht dem natürlichen Verhalten mit geringer Entwicklung von Nekrose des gut differenzierten kolorektalen Karzinoms im Patienten (Gao, Arbman et al. 2005). Daraus resultiert, dass das PDOX-Modell ähnliches Tumorverhalten wie beim Patienten aufweist und somit ein klinisch relevanteres Modell darstellt als das meist verwendete PDSX-Tumormodell.

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit sollen dazu beitragen, die weitere Entwicklung der personalisierten Medizin zu unterstützen. Durch die Gewinnung eines neuen Tracers zur Darstellung von Seneszenz *in vivo* könnten entsprechende Bereiche in Tumoren von Patienten detektiert werden, um anschließend Maßnahmen zu ergreifen, die einen

optimalen Therapieerfolg für jeden einzelnen Patienten gewährleisten. Durch die Erkenntnis, dass orthotope CR-LRB-018P-Xenograftmodelle weniger Nekrose entwickeln und dadurch deutlich besser die Situation im Patienten nachahmen als die subkutanen CR-LRB-018P-Xenograftmodelle, können aus den orthotopen PDX-Modellen zuverlässigere Ergebnisse bei der Suche nach der geeigneten Chemotherapie gewonnen werden.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die hier vorgelegte Arbeit wurde im Werner Siemens Imaging Center in der Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie unter Betreuung von Prof. Dr. Bernd J. Pichler angefertigt.

Die hier aufgeführten Versuche und Tätigkeiten wurden eigenständig von mir durchgeführt. Dazu gehören:

- Literaturrecherche für alle auftretende Fragestellungen zu allen Themenbereichen in dieser Doktorarbeit
- Kultivierung aller verwendeter Zelllinien (HCT116, MCF7, HCT116PTTG^{-/-}, Hras)
- Etablierung der *in vitro* Seneszenz-Modellen
- Planung und Durchführung aller *in vitro* Experimenten (BrdU-Assay, β -Gal-Assay, Mikroskopie, Seneszenz-Induktion)
- Evaluierung neuer Seneszenz-Tracer [¹⁸F] β -Gal und [¹⁸F] α -Fuc *in vitro*
- Darstellung und Interpretation aller *in vitro* Ergebnisse
- Etablierung von subkutanen MCF7-, HCT116-Xenograft- und Hras-Allograftmodellen *in vivo*
- *In vivo* Seneszenz-Induktion in HCT116- und Hras-Mausmodellen
- Evaluierung neuer Seneszenz-Tracer [¹⁸F] β -Gal und [¹⁸F] α -Fuc *in vivo*
- Regelmäßige Pflege und Kontrolle des Gesundheitszustandes aller in dieser Arbeit verwendeten Tieren
- Regelmäßige Kontrolle der Tumorgöße aller tumortragenden Tieren
- Erarbeitung von Scan-Plänen für PET- und MRT-Messungen von allen in dieser Arbeit verwendeten Tracern
- Planung und Vorbereitung der Tiere für alle *in vivo* PET- und MRT-Messungen
- Planung und Durchführung der OI-Messungen mit dem Hras-Allograftmodell
- Tötung der Tiere und die Gewebeentnahme für *ex vivo* Experimente
- Planung, Durchführung, Auswertung und Interpretation folgender *ex vivo* Experimente:
 - β -Gal-Assay, Autoradiographie
- Planung und Auswertung von Histologischen-Analysen

- Durchführung und Interpretation der semi-quantitativen Analyse von H&E gefärbten Schnitten
- Auswertung aller PET- und MRT-Messungen für alle verwendeten Tracer bei allen gemessenen Tieren
 - Rekonstruktion von PET-Datensätzen, die Überlagerung von PET- und MRT-Datensätzen jedes einzelnen Tieres, sowie das Zeichnen von ROI in jedes einzelne Tumor
 - Auswertung von DW-MRT-Messungen
- Durchführung und Interpretation der Voxel-basierten Analyse von [¹⁸F]FDG-PET-Daten
- Interpretation der PET-Daten für alle Fragestellungen
- Erstellung von im Ergebnissteil gezeigten Diagrammen und Bildern

Herr Jonathan Cotton entwickelte eigenständig die Precursor der verwendeten Tracer sowie die Radiomarkierung von [¹⁸F]β-Gal und [¹⁸F]α-Fuc.

Histologie Routinelabor der Hautklinik Tübingen übernahm die histologische H&E-Färbung der von mir vorbereiteten Paraffin- und Kryo-Schnitte.

Die Mitarbeiter des Instituts der Pathologie der Universität Tübingen übernahmen die IHC-Färbung der von mir vorbereiteten in Paraffin eingelegten Tumoren. Zusammen mit Prof. Dr. L. Quintanilla-Fend und Dr. U. Kohlhofer erfolgte die Interpretation der IHC gefärbten Schnitten.

Funda Cay, Maren Harant, Sandro Aidone, Daniel Bukala und Natali Altmeyer übernahmen abwechselnde technische Unterstützung in der von mir geplanten und koordinierten Durchführung von PET- und MRT-Messungen.

Das Unternehmen Oncodesign Biotechnologie lieferte Ratten mit bereits implantierten subkutanen und orthotopen CR-LRB-018P-PDX-Tiermodellen.

8 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

9 Publikationsverzeichnis

9.1 Publikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften

1. Fuchs K, Kuehn A, Mahling M, Guenthoer P, Hector A, Schwenck J, Hartl D, Laufer S, Kohlhofer U, Quintanilla-Martinez L, Reischl G, Röcken M, Pichler B.J and Kneilling M "In Vivo Hypoxia PET Imaging Quantifies the Severity of Arthritic Joint Inflammation in Line with Overexpression of Hypoxia-Inducible Factor and Enhanced Reactive Oxygen Species Generation" **Journal of Nuclear Medicine 2017**
2. Guenova E¹, Hoetzenecker W, Kisuze G, Teske A, Heeg P, Voykov B, Hoetzenecker K, Schippert W, Moehrle M. "Banana leaves as an alternative wound dressing." **Dermatologic Surgery 2013**
3. Guenova E, Hoetzenecker W, Teske A, Biedermann T. „IL-23 expression in pyoderma gangrenosum and targeted therapy with ustekinumab - anti-IL-12/IL-23p40 monoclonal antibody". **Archives of Dermatology 2011**
4. Hoetzenecker W, Echtenacher B, Guenova E, Hoetzenecker K, Teske A, Fuchs K, Woelbing F, Brueck J, Krenn C, Hai T, Ghoreschi K, Biedermann T, Röcken M. ROS-induced ATF3 causes susceptibility to opportunistic infections during post-septic immunosuppression. **Nature Medicine 2011**

9.2 Vorträge auf wissenschaftlichen Konferenzen

- | | |
|---------|---|
| 03.2016 | European Molecular Imaging Meeting , März 2016, Utrecht, Niederlande, "Non-invasive in vivo PET imaging of senescence in a GEPiRshp53pWZLHras xenograft mouse model" |
| 09.2015 | World Molecular Imaging Congress , September 2015, Honolulu, USA "Multiparametric longitudinal in vivo PET/MRI imaging of patient derived orthotope and subcutaneous colorectal cancer in rats." |
| 03.2015 | European Molecular Imaging Meeting , März 2015, Tübingen, Deutschland "The in vitro evaluation of a new synthesized compound for imaging of senescence and the verification of an animal model for in vivo senescence imaging" |

9.3 Posterpräsentationen auf wissenschaftlichen Konferenzen

- | | |
|---------|---|
| 07.2014 | European Molecular Imaging Meeting , June 2014, Antwerpen, Belgien, "The in vitro evaluation of a new synthesized compound for imaging of senescence and the verification of an animal model for in vivo senescence imaging" |
|---------|---|

10 Literaturverzeichnis

- Acosta, J. C., A. O'Loughlen, A. Banito, M. V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown and N. Popov (2008). "Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence." Cell **133**(6): 1006-1018.
- Adams, J. and S. Cory (2007). "The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy." Oncogene **26**(9): 1324-1337.
- Adams, P. D. (2009). "Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence." Molecular cell **36**(1): 2-14.
- Alimonti, A., C. Nardella, Z. Chen, J. G. Clohessy, A. Carracedo, L. C. Trotman, K. Cheng, S. Varmeh, S. C. Kozma and G. Thomas (2010). "A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis." The Journal of clinical investigation **120**(3): 681-693.
- Andres, A., G. Mentha, R. Adam, E. Gerstel, O. Skipenko, E. Barroso, S. Lopez-Ben, C. Hubert, P. Majno and C. Toso (2015). "Surgical management of patients with colorectal cancer and simultaneous liver and lung metastases." British Journal of Surgery **102**(6): 691-699.
- Aoshiba, K., T. Tsuji, S. Kameyama, M. Itoh, S. Semba, K. Yamaguchi and H. Nakamura (2013). "Senescence-associated secretory phenotype in a mouse model of bleomycin-induced lung injury." Experimental and Toxicologic Pathology **65**(7): 1053-1062.
- Aoshiba, K., T. Tsuji and A. Nagai (2003). "Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells." European Respiratory Journal **22**(3): 436-443.
- Apisarnthanarax, S., M. M. Alauddin, F. Mourtada, H. Ariga, U. Raju, O. Mawlawi, D. Han, W. G. Bornmann, J. A. Ajani and L. Milas (2006). "Early detection of chemoradioresponse in esophageal carcinoma by 3'-deoxy-3'-H-fluorothymidine using preclinical tumor models." Clinical cancer research **12**(15): 4590-4597.
- Appleyard, M. V. C., M. A. O'Neill, K. E. Murray, F. E. Paulin, S. E. Bray, N. M. Kernohan, D. A. Levison, D. P. Lane and A. M. Thompson (2009). "Seliciclib (CYC202, R-roscovitine) enhances the antitumor effect of doxorubicin in vivo in a breast cancer xenograft model." International journal of cancer **124**(2): 465-472.
- Aufderklamm, S., T. Todenhöfer, G. Gakis, S. Kruck, J. Hennenlotter, A. Stenzl and C. Schwentner (2012). "Thymidine kinase and cancer monitoring." Cancer letters **316**(1): 6-10.
- Ayude, D., J. Fernández-Rodríguez, F. J. Rodríguez-Berrocal, V. S. Martínez-Zorzano, A. de Carlos, E. Gil and M. Páez de la Cadena (2000). "Value of the serum alpha-L-fucosidase activity in the diagnosis of colorectal cancer." Oncology **59**(4): 310-316.
- Baeriswyl, V. and G. Christofori (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. Seminars in cancer biology, Elsevier.
- Bailey, D. L., D. W. Townsend, P. E. Valk and M. N. Maisey (2005). Positron emission tomography, Springer.
- Bartkova, J., N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L.-V. F. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou and V. C. Zoumpourlis (2006). "Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints." Nature **444**(7119): 633-637.

- Behrens, R. and J. Normann (2004). "Nobelpreis Medizin/Physiologie 2003: Forschung mit Resonanz." Der Anaesthesist **53**(2): 175-176.
- Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2005). "The signals and pathways activating cellular senescence." The international journal of biochemistry & cell biology **37**(5): 961-976.
- Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nature reviews cancer **3**(6): 401-410.
- Berghe, T. V., A. Linkermann, S. Jouan-Lanhouet, H. Walczak and P. Vandenabeele (2014). "Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways." Nature reviews Molecular cell biology **15**(2): 135.
- Bergström, M., A. Grahnén and B. Långström (2003). "Positron emission tomography microdosing: a new concept with application in tracer and early clinical drug development." European journal of clinical pharmacology **59**(5-6): 357-366.
- Bettington, M., N. Walker, A. Clouston, I. Brown, B. Leggett and V. Whitehall (2013). "The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges." Histopathology **62**(3): 367-386.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson and H. L. Moses (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." Nature **432**(7015): 332-337.
- Blackburn, E. H. (2005). "Telomerase and cancer." Molecular cancer research **3**(9): 477-482.
- Blasco, M. A. (2005). "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond." Nature Reviews Genetics **6**(8): 611-622.
- Blondal, J. A., J. E. Dick and J. A. Wright (1985). "Membrane glycoprotein changes during the senescence of normal human diploid fibroblasts in culture." Mechanisms of ageing and development **30**(3): 273-283.
- Bogaert, J. and H. Prenen (2013). "Molecular genetics of colorectal cancer." Annals of Gastroenterology **27**(1): 9.
- Boyle, W. S. and G. E. Smith (1976). "The inception of charge-coupled devices." IEEE Transactions on Electron Devices **23**(7): 661-663.
- Braig, M. and C. A. Schmitt (2006). "Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development." Cancer research **66**(6): 2881-2884.
- Breasted, J. (1930). "The Edwin Smith Surgical Papyrus." Chicago: University of Chicago Press.
- Brownell, G., C. Burnham and D. Chesler (1985). High resolution tomography using analog coding. Metabolism of the human brain studied with positron emission tomography.
- Brownell, G. L. (1999). "A history of positron imaging." Physics Research Laboratory, Massachusetts General Hospital, MIT.
- Bulavin, D. V., O. N. Demidov, S. i. Saito, P. Kauraniemi, C. Phillips, S. A. Amundson, C. Ambrosino, G. Sauter, A. R. Nebreda and C. W. Anderson (2002). "Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity." Nature genetics **31**(2): 210-215.
- Burnham, C. A., J. F. Bradshaw Jr, D. E. Kaufman, D. A. Chesler and G. L. Brownell (1985). Positron source position sensing detector and electronics, Google Patents.

- Burt, B. M., J. L. Humm, D. A. Kooby, O. D. Squire, S. Mastorides, S. M. Larson and Y. Fong (2001). "Using positron emission tomography with [18 F] FDG to predict tumor behavior in experimental colorectal cancer." Neoplasia **3**(3): 189-195.
- Burton, D. G. and V. Krizhanovsky (2014). "Physiological and pathological consequences of cellular senescence." Cellular and Molecular Life Sciences **71**(22): 4373-4386.
- Campisi, J. (1997). "The biology of replicative senescence." European Journal of Cancer **33**(5): 703-709.
- Campisi, J. (2011). "Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective." Current opinion in genetics & development **21**(1): 107-112.
- Campisi, J. (2013). "Aging, cellular senescence, and cancer." Annual review of physiology **75**: 685.
- Campisi, J., J. K. Andersen, P. Kapahi and S. Melov (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? Seminars in cancer biology, Elsevier.
- Campisi, J. and F. d. A. di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nature reviews Molecular cell biology **8**(9): 729-740.
- Campisi, J. and L. Robert (2014). Cell senescence: role in aging and age-related diseases. Aging, Karger Publishers. **39**: 45-61.
- Capirci, C., L. Rampin, P. A. Erba, F. Galeotti, G. Crepaldi, E. Banti, M. Gava, S. Fanti, G. Mariani and P. C. Muzzio (2007). "Sequential FDG-PET/CT reliably predicts response of locally advanced rectal cancer to neo-adjuvant chemo-radiation therapy." European journal of nuclear medicine and molecular imaging **34**(10): 1583-1593.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." nature **407**(6801): 249-257.
- Chang, B.-D., E. V. Broude, M. Dokmanovic, H. Zhu, A. Ruth, Y. Xuan, E. S. Kandel, E. Lausch, K. Christov and I. B. Roninson (1999). "A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents." Cancer research **59**(15): 3761-3767.
- Chang, B.-D., M. E. Swift, M. Shen, J. Fang, E. V. Broude and I. B. Roninson (2002). "Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(1): 389-394.
- Chang, B.-D., Y. Xuan, E. V. Broude, H. Zhu, B. Schott, J. Fang and I. B. Roninson (1999). "Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs." Oncogene **18**(34): 4808-4818.
- Chang, J., Y. Wang, L. Shao, R.-M. Laberge, M. Demaria, J. Campisi, K. Janakiraman, N. E. Sharpless, S. Ding and W. Feng (2016). "Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice." Nature medicine **22**(1): 78-83.
- Chau, B. N. and J. Y. Wang (2003). "Coordinated regulation of life and death by RB." Nature Reviews Cancer **3**(2): 130-138.
- Cheng, L., J. Fu, A. Tsukamoto and R. G. Hawley (1996). "Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells." Nature biotechnology **14**(5): 606-609.

- Cheng, N., A. Chytil, Y. Shyr, A. Joly and H. L. Moses (2008). "Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion." Molecular Cancer Research **6**(10): 1521-1533.
- Cherry, S. R. (2001). "Fundamentals of positron emission tomography and applications in preclinical drug development." The Journal of Clinical Pharmacology **41**(5): 482-491.
- Cherry, S. R. and M. Dahlbom (2006). PET: physics, instrumentation, and scanners. PET, Springer.
- Cho, K. B., M. K. Cho, W. Y. Lee and K. W. Kang (2010). "Overexpression of c-myc induces epithelial mesenchymal transition in mammary epithelial cells." Cancer letters **293**(2): 230-239.
- Christie, R. (2007). "Why is indigo blue?" Biotechnic & Histochemistry **82**(2): 51-56.
- Citarda, F., G. Tomaselli, R. Capocaccia, S. Barcherini, M. Crespi and I. M. S. Group (2001). "Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence." Gut **48**(6): 812-815.
- Collado, M., M. A. Blasco and M. Serrano (2007). "Cellular senescence in cancer and aging." Cell **130**(2): 223-233.
- Collado, M. and M. Serrano (2006). "The power and the promise of oncogene-induced senescence markers." Nature Reviews Cancer **6**(6): 472-476.
- Collado, M. and M. Serrano (2010). "Senescence in tumours: evidence from mice and humans." Nature Reviews Cancer **10**(1): 51-57.
- Compton, C. C. and F. L. Greene (2004). "The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond." CA: a cancer journal for clinicians **54**(6): 295-308.
- Cooper, R., S. Sarioğlu, S. Sökmen, M. Füzün, A. Küpelioglu, H. Valentine, I. Görken, R. Airley and C. West (2003). "Glucose transporter-1 (GLUT-1): a potential marker of prognosis in rectal carcinoma?" British journal of cancer **89**(5): 870-876.
- Cotton, J. M. (2017). "Synthesis and Evaluation of Novel PET Probes for *in Vivo* Imaging of Cellular Senescence." Eberhard Karls Universität Tübingen.
- Courtois-Cox, S., S. M. G. Williams, E. E. Reczek, B. W. Johnson, L. T. McGillicuddy, C. M. Johannessen, P. E. Hollstein, M. MacCollin and K. Cichowski (2006). "A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence." Cancer cell **10**(6): 459-472.
- Creemers, T., A. Lock, V. Subramaniam, T. Jovin and S. Völker (1999). "Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning." Nature Structural & Molecular Biology **6**(6): 557-560.
- Cullinane, C., K. L. Waldeck, D. Binns, E. Bogatyreva, D. P. Bradley, R. de Jong, G. A. McArthur and R. J. Hicks (2014). "Preclinical FLT-PET and FDG-PET imaging of tumor response to the multi-targeted Aurora B kinase inhibitor, TAK-901." Nuclear medicine and biology **41**(2): 148-154.
- Dang, D. T., S. Y. Chun, K. Burkitt, M. Abe, S. Chen, P. Havre, N. J. Mabweesh, E. I. Heath, N. J. Vogelzang and M. Cruz-Correa (2008). "Hypoxia-inducible factor-1 target genes as indicators of tumor vessel response to vascular endothelial growth factor inhibition." Cancer research **68**(6): 1872-1880.
- Dang, S., L. Sun, Y. Huang, F. Lu, Y. Liu, H. Gong, J. Wang and N. Yan (2010). "Structure of a fucose transporter in an outward-open conformation." Nature **467**(7316): 734.

- Daniel, V. C., L. Marchionni, J. S. Hierman, J. T. Rhodes, W. L. Devereux, C. M. Rudin, R. Yung, G. Parmigiani, M. Dorsch and C. D. Peacock (2009). "A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro." Cancer research **69**(8): 3364-3373.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett and W. Bottomley (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-954.
- Davies, M. and Y. Samuels (2010). "Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma." Oncogene **29**(41): 5545-5555.
- De Bruycker, S., C. Vangestel, T. Van den Wyngaert, A. Wouters, P. Pauwels, S. Staelens and S. Stroobants (2016). "Baseline [18F] FMISO μ PET as a Predictive Biomarker for Response to HIF-1 α Inhibition Combined with 5-FU Chemotherapy in a Human Colorectal Cancer Xenograft Model." Molecular Imaging and Biology: 1-11.
- de Magalhães, J. P. and J. F. Passos (2017). "Stress, cell senescence and organismal ageing." Mechanisms of ageing and development.
- De Roock, W., B. Claes, D. Bernasconi, J. De Schutter, B. Biesmans, G. Fountzilias, K. T. Kalogerias, V. Kotoula, D. Papamichael and P. Laurent-Puig (2010). "Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis." The lancet oncology **11**(8): 753-762.
- Debacq-Chainiaux, F., J. D. Erusalimsky, J. Campisi and O. Toussaint (2009). "Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo." Nature protocols **4**(12): 1798-1806.
- Demaria, M., M. N. O'Leary, J. Chang, L. Shao, S. Liu, F. Alimirah, K. Koenig, C. Le, N. Mitin and A. M. Deal (2016). "Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse." Cancer Discovery: CD-16-0241.
- Denko, N. C. (2008). "Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour." Nature Reviews Cancer **8**(9): 705-713.
- Dennis Jr, G., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane and R. A. Lempicki (2003). "DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery." Genome bio **4**(5): P3.
- DeRose, Y. S., G. Wang, Y.-C. Lin, P. S. Bernard, S. S. Buys, M. T. Ebbert, R. Factor, C. Matsen, B. A. Milash and E. Nelson (2011). "Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes." Nature medicine **17**(11): 1514-1520.
- Desnick, R. J. (2001). " α -Galactosidase A." Encyclopedia Of Molecular Medicine.
- Detre, S., J. Salter, D. M. Barnes, S. Riddler, M. Hills, S. R. Johnston, C. Gillett, R. A'Hern and M. Dowsett (1999). "Time-related effects of estrogen withdrawal on proliferation-and cell death-related events in MCF-7 xenografts." International journal of cancer **81**(2): 309-313.
- di Fagagna, F. d. A., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter and S. P. Jackson (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." Nature **426**(6963): 194-198.
- Di, X., R. P. Shiu, I. F. Newsham and D. A. Gewirtz (2009). "Apoptosis, autophagy, accelerated senescence and reactive oxygen in the response of human breast tumor cells to adriamycin." Biochemical pharmacology **77**(7): 1139-1150.

- Dimas, K., S. Hatziantoniou, S. Tseleni, H. Khan, A. Georgopoulos, K. Alevizopoulos, J. H. Wyche, P. Pantazis and C. Demetzos (2007). "Sclareol induces apoptosis in human HCT116 colon cancer cells in vitro and suppression of HCT116 tumor growth in immunodeficient mice." Apoptosis **12**(4): 685-694.
- Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj and O. Pereira-Smith (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences **92**(20): 9363-9367.
- Ding, G., N. Franki, A. A. Kapasi, K. Reddy, N. Gibbons and P. C. Singhal (2001). "Tubular cell senescence and expression of TGF- β 1 and p21 WAF1/CIP1 in tubulointerstitial fibrosis of aging rats." Experimental and molecular pathology **70**(1): 43-53.
- Divine, M. R., P. Katiyar, U. Kohlhofer, L. Quintanilla-Martinez, B. J. Pichler and J. A. Disselhorst (2016). "A population-based Gaussian mixture model incorporating 18F-FDG PET and diffusion-weighted MRI quantifies tumor tissue classes." Journal of Nuclear Medicine **57**(3): 473-479.
- Du, M. Q., W. L. Hutchinson, P. J. Johnson and R. Williams (1991). "Differential alpha-fetoprotein lectin binding in hepatocellular carcinoma. Diagnostic utility at low serum levels." Cancer **67**(2): 476-480.
- Dubois, L., W. Landuyt, K. Haustermans, P. Dupont, G. Bormans, P. Vermaelen, P. Flamen, E. Verbeken and L. Mortelmans (2004). "Evaluation of hypoxia in an experimental rat tumour model by ^{18}F Fluoromisonidazole PET and immunohistochemistry." British journal of cancer **91**(11): 1947-1954.
- Dubois, V., L. Dasnois, K. Lebtahi, F. Collet, N. Heylen, N. Havaux, A.-M. Fernandez, T. J. Lobl, C. Oliyai and M. Nieder (2002). "CPI-0004Na, a new extracellularly tumor-activated prodrug of doxorubicin." Cancer research **62**(8): 2327-2331.
- Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal." New England Journal of Medicine **315**(26): 1650-1659.
- Dzik-Jurasz, A., C. Domenig, M. George, J. Wolber, A. Padhani, G. Brown and S. Doran (2002). "Diffusion MRI for prediction of response of rectal cancer to chemoradiation." The Lancet **360**(9329): 307-308.
- Elmore, L. W., C. W. Rehder, X. Di, P. A. McChesney, C. K. Jackson-Cook, D. A. Gewirtz and S. E. Holt (2002). "Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction." Journal of Biological Chemistry **277**(38): 35509-35515.
- Erdogan, H. and J. A. Fessler (1999). "Ordered subsets algorithms for transmission tomography." Physics in medicine and biology **44**(11): 2835.
- Erusalimsky, J. D. and D. J. Kurz (2005). "Cellular senescence in vivo: its relevance in aging and cardiovascular disease." Experimental gerontology **40**(8): 634-642.
- Ewald, J. A., J. A. Desotelle, G. Wilding and D. F. Jarrard (2010). "Therapy-induced senescence in cancer." Journal of the National Cancer Institute **102**(20): 1536-1546.
- Fearon, E. R. (2011). "Molecular genetics of colorectal cancer." Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease **6**: 479-507.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- Fedoroff, N. and W. Fontana (2002). "Small numbers of big molecules." Science **297**(5584): 1129-1131.

- Fellmann, C., T. Hoffmann, V. Sridhar, B. Hopfgartner, M. Muhar, M. Roth, D. Y. Lai, I. A. Barbosa, J. S. Kwon and Y. Guan (2013). "An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi." Cell reports **5**(6): 1704-1713.
- Ferrara, N. (2002). "VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors." Nature Reviews Cancer **2**(10): 795-803.
- Ferrara, N. (2009). "Vascular endothelial growth factor." Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology **29**(6): 789-791.
- Fidler, I. J. (1990). "Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award lecture." Cancer research **50**(19): 6130-6138.
- Fleming, M., S. Ravula, S. F. Tatishchev and H. L. Wang (2012). "Colorectal carcinoma: pathologic aspects." Journal of gastrointestinal oncology **3**(3): 153-173.
- Fornari Jr, F. A., W. D. Jarvis, S. Grant, M. S. Orr, J. K. Randolph, F. K. White and D. A. Gewirtz (1996). "Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin." Biochemical pharmacology **51**(7): 931-940.
- Francis, D., D. Visvikis, D. Costa, T. Arulampalam, C. Townsend, S. Luthra, I. Taylor and P. Ell (2003). "Potential impact of [18F] 3'-deoxy-3'-fluorothymidine versus [18F] fluoro-2-deoxy-D-glucose in positron emission tomography for colorectal cancer." European journal of nuclear medicine and molecular imaging **30**(7): 988-994.
- Fridman, W. H., F. Pagès, C. Sautès-Fridman and J. Galon (2012). "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome." Nature Reviews Cancer **12**(4): 298-306.
- Fu, X., J. M. Besterman, A. Monosov and R. M. Hoffman (1991). "Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens." Proceedings of the National Academy of Sciences **88**(20): 9345-9349.
- Fu, X., F. Guadagni and R. M. Hoffman (1992). "A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(12): 5645-5649.
- Fu, X., P. Le and R. M. Hoffman (1993). "A metastatic orthotopic transplant nude-mouse model of human patient breast cancer." Anticancer research **13**: 901-901.
- Fusai, G. and B. Davidson (2003). "Management of colorectal liver metastases." Colorectal disease **5**(1): 2-23.
- Gallagher, B. M., J. S. Fowler, N. I. Gutterson, R. R. MacGregor, C.-N. Wan and A. P. Wolf (1978). "Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [18F] 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose." Journal of Nuclear Medicine **19**(10): 1154-1161.
- Gambhir, S. S. (2002). "Molecular imaging of cancer with positron emission tomography." Nature Reviews Cancer **2**(9): 683-693.
- Gan, Y., Q. Liang and X. Song (2014). "Diagnostic value of alpha-L-fucosidase for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis." Tumor Biology **35**(5): 3953-3960.
- Gao, H., J. M. Korn, S. Ferretti, J. E. Monahan, Y. Wang, M. Singh, C. Zhang, C. Schnell, G. Yang and Y. Zhang (2015). "High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response." Nature medicine **21**(11): 1318-1325.

- Gao, J.-F., G. Arberman, T. I. Wadhwa, H. Zhang and X.-F. Sun (2005). "Relationships of tumor inflammatory infiltration and necrosis with microsatellite instability in colorectal cancers." World journal of gastroenterology: WJG **11**(14): 2179-2183.
- Garrido-Laguna, I., M. Uson, N. Rajeshkumar, A. C. Tan, E. De Oliveira, C. Karikari, M. C. Villaroel, A. Salomon, G. Taylor and R. Sharma (2011). "Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer." Clinical Cancer Research **17**(17): 5793-5800.
- Gerdes, J., H. Lemke, H. Baisch, H.-H. Wacker, U. Schwab and H. Stein (1984). "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67." The Journal of Immunology **133**(4): 1710-1715.
- Gewirtz, D. A., S. E. Holt and L. W. Elmore (2008). "Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation." Biochemical pharmacology **76**(8): 947-957.
- Gire, V. and V. Dulić (2015). "Senescence from G2 arrest, revisited." Cell Cycle **14**(3): 297-304.
- Goldstein, S. (1990). "Replicative senescence: the human fibroblast comes of age." Science **249**(4973): 1129-1133.
- Gonzalez, L. C., S. Ghadaouia, A. Martinez and F. Rodier (2016). "Premature aging/senescence in cancer cells facing therapy: good or bad?" Biogerontology: 1-17.
- Gorgoulis, V. G. and T. D. Halazonetis (2010). "Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response." Current opinion in cell biology **22**(6): 816-827.
- Gospodarowicz, M. K., J. D. Brierley and C. Wittekind (2017). TNM classification of malignant tumours, John Wiley & Sons.
- Grassetto, G., M. C. Marzola, A. Minicozzi, A. Al-Nahhas and D. Rubello (2011). "F-18 FDG PET/CT in rectal carcinoma: where are we now?" Clinical nuclear medicine **36**(10): 884-888.
- Griffiths, A. J. (2005). An introduction to genetic analysis, Macmillan.
- Hajdu, S. I. (2004). "Greco-Roman thought about cancer." Cancer **100**(10): 2048-2051.
- Hajdu, S. I. (2011). "A note from history: landmarks in history of cancer, part 1." Cancer **117**(5): 1097-1102.
- Hampel, B., K. Fortschegger, S. Ressler, M. Chang, H. Unterluggauer, A. Breitwieser, W. Sommergruber, B. Fitzky, G. Lepperdinger and P. Jansen-Dürr (2006). "Increased expression of extracellular proteins as a hallmark of human endothelial cell in vitro senescence." Experimental gerontology **41**(5): 474-481.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." cell **144**(5): 646-674.
- Hardiman, K. M., P. J. Ulintz, R. D. Kuick, D. H. Hovelson, C. M. Gates, A. Bhasi, A. R. Grant, J. Liu, A. K. Cani and J. K. Greenson (2016). "Intra-tumor genetic heterogeneity in rectal cancer." Laboratory Investigation **96**(1): 4-15.
- Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts."
- Hassan, M. and B. A. Klaunberg (2004). "Biomedical applications of fluorescence imaging in vivo." Comparative medicine **54**(6): 635-644.

- Haubner, R., H.-J. Wester, F. Burkhart, R. Senekowitsch-Schmidtke, W. Weber, S. L. Goodman, H. Kessler and M. Schwaiger (2001). "Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics." Journal of Nuclear Medicine **42**(2): 326-336.
- Haubner, R., H.-J. Wester, W. A. Weber, C. Mang, S. I. Ziegler, S. L. Goodman, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler and M. Schwaiger (2001). "Noninvasive imaging of $\alpha v \beta 3$ integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography." Cancer research **61**(5): 1781-1785.
- Hayflick, L. (1965). "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains." Experimental cell research **37**(3): 614-636.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**(585): 621.
- Heim, R., D. C. Prasher and R. Y. Tsien (1994). "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(26): 12501-12504.
- Herbertson, R., A. Scarsbrook, S. Lee, N. Tebbutt and A. M. Scott (2009). "Established, emerging and future roles of PET/CT in the management of colorectal cancer." Clinical radiology **64**(3): 225-237.
- Hermann Brenner, M. K., Christian Peter Pox (2014). "Colorectal Cancer." The lancet oncology **383**: 1490-1502.
- Herneth, A. M., S. Guccione and M. Bednarski (2003). "Apparent diffusion coefficient: a quantitative parameter for in vivo tumor characterization." European journal of radiology **45**(3): 208-213.
- Hidalgo, M., F. Amant, A. V. Biankin, E. Budinská, A. T. Byrne, C. Caldas, R. B. Clarke, S. de Jong, J. Jonkers and G. M. Mælandsmo (2014). "Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research." Cancer discovery **4**(9): 998-1013.
- Hidalgo, M., E. Bruckheimer, N. Rajeshkumar, I. Garrido-Laguna, E. De Oliveira, B. Rubio-Viqueira, S. Strawn, M. J. Wick, J. Martell and D. Sidransky (2011). "A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer." Molecular cancer therapeutics **10**(8): 1311-1316.
- Hildebrand, D., S. Lehle, A. Borst, S. Haferkamp, F. Essmann and K. Schulze-Osthoff (2013). " α -Fucosidase as a novel convenient biomarker for cellular senescence." Cell Cycle **12**(12): 1922-1927.
- Hillas, A. M. (1985). Cerenkov light images of EAS produced by primary gamma. International Cosmic Ray Conference.
- Hiroshima, Y., Y. Zhang, N. Zhang, A. Maawy, S. Mii, M. Yamamoto, F. Uehara, S. Miwa, S. Yano and T. Murakami (2015). "Establishment of a patient-derived orthotopic Xenograft (PDOX) model of HER-2-positive cervical cancer expressing the clinical metastatic pattern." PloS one **10**(2): e0117417.
- Hof, M., V. Fidler and R. Hutterer (2005). "Basics of fluorescence spectroscopy in biosciences." Fluorescence Spectroscopy in Biology: 3-29.
- Hong, Y. S., H. O. Kim, K.-p. Kim, J.-L. Lee, H. J. Kim, S. J. Lee, S. J. Lee, S. J. Oh, J. S. Kim and J.-S. Ryu (2013). "3'-Deoxy-3'-18F-fluorothymidine PET for the early prediction of response to leucovorin, 5-fluorouracil, and oxaliplatin therapy in patients with metastatic colorectal cancer." Journal of Nuclear Medicine **54**(8): 1209-1216.

- Hooper, L. V. and J. I. Gordon (2001). "Glycans as legislators of host–microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity." Glycobiology **11**(2): 1R-10R.
- Hutchins, G., K. Southward, K. Handley, L. Magill, C. Beaumont, J. Stahlschmidt, S. Richman, P. Chambers, M. Seymour and D. Kerr (2011). "Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer." Journal of Clinical Oncology: JCO. 2010.2030. 1366.
- Hylander, B. L., N. Punt, H. Tang, J. Hillman, M. Vaughan, W. Bshara, R. Pitoniak and E. A. Repasky (2013). "Origin of the vasculature supporting growth of primary patient tumor xenografts." J Transl Med **11**(110.10): 1186.
- Ikenoue, T., Y. Hikiba, F. Kanai, Y. Tanaka, J. Imamura, T. Imamura, M. Ohta, H. Ijichi, K. Tateishi and T. Kawakami (2003). "Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors." Cancer research **63**(23): 8132-8137.
- Itahana, K., Y. Itahana and G. P. Dimri (2013). Colorimetric detection of senescence-associated β galactosidase. Cell Senescence, Springer: 143-156.
- Iwasa, H., J. Han and F. Ishikawa (2003). "Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway." Genes to Cells **8**(2): 131-144.
- Jabłoński, A. (1935). "Über den mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren." Zeitschrift für Physik **94**(1-2): 38-46.
- Jacob, F. and J. Monod (1961). On the regulation of gene activity. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Jasperson, K. W., T. M. Tuohy, D. W. Neklason and R. W. Burt (2010). "Hereditary and familial colon cancer." Gastroenterology **138**(6): 2044-2058.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." CA: a cancer journal for clinicians **61**(2): 69-90.
- Jensen, M. M. and A. Kjaer (2015). "Monitoring of anti-cancer treatment with 18F-FDG and 18F-FLT PET: a comprehensive review of pre-clinical studies." American journal of nuclear medicine and molecular imaging **5**(5): 431.
- Jeyapalan, J. C., M. Ferreira, J. M. Sedivy and U. Herbig (2007). "Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates." Mechanisms of ageing and development **128**(1): 36-44.
- Jiang, B. H. and L. Z. Liu (2009). "PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis." Advances in cancer research **102**: 19-65.
- Johnson, C. H., S. K. Manna, K. W. Krausz, J. A. Bonzo, R. D. Divilbiss, M. G. Hollingshead and F. J. Gonzalez (2013). "Global metabolomics reveals urinary biomarkers of breast cancer in a MCF-7 xenograft mouse model." Metabolites **3**(3): 658-672.
- Ju, Y. H., C. D. Allred, K. F. Allred, K. L. Karko, D. R. Doerge and W. G. Helferich (2001). "Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice." The Journal of nutrition **131**(11): 2957-2962.
- Judenhofer, M. S., H. F. Wehrl, D. F. Newport, C. Catana, S. B. Siegel, M. Becker, A. Thielscher, M. Kneilling, M. P. Lichy and M. Eichner (2008). "Simultaneous PET-MRI: a new approach for functional and morphological imaging." Nature medicine **14**(4): 459-465.

- Julien, S., A. Merino-Trigo, L. Lacroix, M. Pocard, D. Goéré, P. Mariani, S. Landron, L. Bigot, F. Nemati and P. Dartigues (2012). "Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer." Clinical Cancer Research **18**(19): 5314-5328.
- Kadmas, D. J., M. E. Casey, M. Conti, B. W. Jakoby, C. Lois and D. W. Townsend (2009). "Impact of time-of-flight on PET tumor detection." Journal of Nuclear Medicine **50**(8): 1315-1323.
- Kaina, B. (2003). "DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling." Biochemical pharmacology **66**(8): 1547-1554.
- Kalady, M. F., K. L. DeJulius, J. A. Sanchez, A. Jarrar, X. Liu, E. Manilich, M. Skacel and J. M. Church (2012). "BRAF mutations in colorectal cancer are associated with distinct clinical characteristics and worse prognosis." Diseases of the Colon & Rectum **55**(2): 128-133.
- Kang, C., Q. Xu, T. D. Martin, M. Z. Li, M. Demaria, L. Aron, T. Lu, B. A. Yankner, J. Campisi and S. J. Elledge (2015). "The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4." Science **349**(6255): aaa5612.
- Karp, J. S., M. E. Daube-Witherspoon, E. J. Hoffman, T. K. Lewellen, J. M. Links, W.-H. Wong, R. D. Hichwa, M. E. Casey, J. G. Colsher and R. E. Hitchens (1991). "Performance standards in positron emission tomography." Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine **32**(12): 2342-2350.
- Kawada, K., Y. Nakamoto, M. Kawada, K. Hida, T. Matsumoto, T. Murakami, S. Hasegawa, K. Togashi and Y. Sakai (2012). "Relationship between 18F-fluorodeoxyglucose accumulation and KRAS/BRAF mutations in colorectal cancer." Clinical Cancer Research **18**(6): 1696-1703.
- Kelloff, G. J., J. M. Hoffman, B. Johnson, H. I. Scher, B. A. Siegel, E. Y. Cheng, B. D. Cheson, J. O'Shaughnessy, K. Z. Guyton and D. A. Mankoff (2005). "Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development." Clinical Cancer Research **11**(8): 2785-2808.
- Kemp, B. J., C. B. Hruska, A. R. McFarland, M. W. Lenox and V. J. Lowe (2009). "NEMA NU 2-2007 performance measurements of the Siemens Inveon™ preclinical small animal PET system." Physics in medicine and biology **54**(8): 2359.
- Killion, J. J., R. Radinsky and I. J. Fidler (1998). "Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice." Cancer and Metastasis Reviews **17**(3): 279-284.
- Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, B. Vogelstein, T. M. Bryan, D. B. Levy, K. J. Smith, A. C. Preisinger, P. Hedge and A. Markham (1991). "Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers." Science **251**(4999): 1366-1370.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-170.
- Klymkowsky, M. W. and P. Savagner (2009). "Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe." The American journal of pathology **174**(5): 1588-1593.
- Knetsch, P. A., M. Petrik, C. M. Griessinger, C. Rangger, M. Fani, C. Kesenheimer, E. von Guggenberg, B. J. Pichler, I. Virgolini and C. Decristoforo (2011). "[68Ga] NODAGA-RGD for imaging $\alpha\beta 3$ integrin expression." European journal of nuclear medicine and molecular imaging **38**(7): 1303-1312.

- Koh, D.-M. and D. J. Collins (2007). "Diffusion-weighted MRI in the body: applications and challenges in oncology." American Journal of Roentgenology **188**(6): 1622-1635.
- Komarova, N. L., A. Sengupta and M. A. Nowak (2003). "Mutation–selection networks of cancer initiation: tumor suppressor genes and chromosomal instability." Journal of theoretical biology **223**(4): 433-450.
- Koontongkaew, S. (2013). "The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas." J Cancer **4**(1): 66-83.
- Kopetz, S., J. Desai, E. Chan, J. Hecht, P. O'dwyer, R. Lee, K. Nolop and L. Saltz (2010). PLX4032 in metastatic colorectal cancer patients with mutant BRAF tumors. ASCO Annual Meeting Proceedings.
- Kress, T. R., A. Sabò and B. Amati (2015). "MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production." Nature Reviews Cancer **15**(10): 593-607.
- Kroemer, G. and M. Jäätelä (2005). "Lysosomes and autophagy in cell death control." Nature Reviews Cancer **5**(11): 886-897.
- Krohn, K. A., J. M. Link and R. P. Mason (2008). "Molecular imaging of hypoxia." Journal of Nuclear Medicine **49**(Suppl 2): 129S-148S.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2010). "The essence of senescence." Genes & development **24**(22): 2463-2479.
- Kulju, K. S. and J. M. Lehman (1995). "Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts." Experimental cell research **217**(2): 336-345.
- Kurz, D. J., S. Decary, Y. Hong and J. D. Erusalimsky (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." Journal of Cell Science **113**(20): 3613-3622.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle and W. FitzHugh (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Lavoie, H. and M. Therrien (2015). "Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling." Nature reviews Molecular cell biology **16**(5): 281-298.
- Le Bihan, D., E. Breton, D. Lallemand, P. Grenier, E. Cabanis and M. Laval-Jeantet (1986). "MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders." Radiology **161**(2): 401-407.
- Lecot, P., F. Alimirah, P.-Y. Desprez, J. Campisi and C. Wiley (2016). "Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development." British journal of cancer.
- Lee, S. and C. A. Schmitt (2003). "Chemotherapy response and resistance." Current opinion in genetics & development **13**(1): 90-96.
- Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141**(7): 1117-1134.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1997). "Genetic instability in colorectal cancers." Nature **386**(6625): 623-627.
- Levine, A. J. and M. Oren (2009). "The first 30 years of p53: growing ever more complex." Nature Reviews Cancer **9**(10): 749-758.
- Levy, M. Z., R. C. Allsopp, A. B. Futcher, C. W. Greider and C. B. Harley (1992). "Telomere end-replication problem and cell aging." Journal of molecular biology **225**(4): 951-960.

- Licha, K., M. Schirner and G. Henry (2008). Optical agents. Molecular Imaging I, Springer: 203-222.
- LLeonart, M. E., A. Artero-Castro and H. Kondoh (2009). "Senescence induction; a possible cancer therapy." Molecular cancer **8**(1): 3.
- Loaiza, N. and M. Demaria (2016). "Cellular senescence and tumor promotion: Is aging the key?" Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer **1865**(2): 155-167.
- Loi, S., S. Ngan, R. Hicks, B. Mukesh, P. Mitchell, M. Michael, J. Zalcborg, T. Leong, D. Lim-Joon and J. Mackay (2005). "Oxaliplatin combined with infusional 5-fluorouracil and concomitant radiotherapy in inoperable and metastatic rectal cancer: a phase I trial." British journal of cancer **92**(4): 655-661.
- Lowe, S. W., E. Cepero and G. Evan (2004). "Intrinsic tumour suppression." Nature **432**(7015): 307-315.
- Lynch, H. T., M. Shaw, C. Magnuson, A. Larsen and A. Krush (1966). "Hereditary factors in cancer: study of two large Midwestern kindreds." Archives of internal medicine **117**(2): 206-212.
- Lyng, H., O. Haraldseth and E. K. Rofstad (2000). "Measurement of cell density and necrotic fraction in human melanoma xenografts by diffusion weighted magnetic resonance imaging." Magnetic resonance in medicine **43**(6): 828-836.
- Mallette, F. A. and G. Ferbeyre (2007). "The DNA damage signaling pathway connects oncogenic stress to cellular senescence." Cell cycle **6**(15): 1831-1836.
- Mannheim, J. G., M. S. Judenhofer, A. Schmid, J. Tillmanns, D. Stiller, V. Sossi and B. J. Pichler (2012). "Quantification accuracy and partial volume effect in dependence of the attenuation correction of a state-of-the-art small animal PET scanner." Physics in medicine and biology **57**(12): 3981.
- Martens, U. M., J. M. J. Zijlmans, S. S. Poon, W. Dragowska, J. Yui, E. A. Chavez, R. K. Ward and P. M. Lansdorp (1998). "Short telomeres on human chromosome 17p." Nature genetics **18**(1): 76-80.
- McIntyre, R. E., S. J. Buczacki, M. J. Arends and D. J. Adams (2015). "Mouse models of colorectal cancer as preclinical models." BioEssays **37**(8): 909-920.
- McKinley, E. T., G. D. Ayers, R. A. Smith, S. A. Saleh, P. Zhao, M. K. Washington, R. J. Coffey and H. C. Manning (2013). "Limits of [18 F]-FLT PET as a biomarker of proliferation in oncology." PLoS One **8**(3): e58938.
- McKinley, E. T., R. A. Smith, P. Zhao, A. Fu, S. A. Saleh, M. I. Uddin, M. K. Washington, R. J. Coffey and H. C. Manning (2013). "3'-deoxy-3'-18F-fluorothymidine PET predicts response to V600EBRAF-targeted therapy in preclinical models of colorectal cancer." Journal of Nuclear Medicine **54**(3): 424-430.
- McKinley, E. T., J. M. Watchmaker, A. B. Chakravarthy, J. A. Meyerhardt, J. A. Engelman, R. C. Walker, M. K. Washington, R. J. Coffey and H. C. Manning (2015). "[18F]-FLT PET to predict early response to neoadjuvant therapy in KRAS wild-type rectal cancer: a pilot study." Annals of nuclear medicine **29**(6): 535-542.
- McLachlan, G. and D. Peel (2004). Finite mixture models, John Wiley & Sons.
- Miller, J. H. (1972). "Experiments in molecular genetics."
- Mizushima, N. and M. Komatsu (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." Cell **147**(4): 728-741.
- Mosteiro, L., C. Pantoja, N. Alcazar, R. M. Marión, D. Chondronasiou, M. Rovira, P. J. Fernandez-Marcos, M. Muñoz-Martin, C. Blanco-Aparicio and J. Pastor (2016). "Tissue

- damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo." Science **354**(6315): aaf4445.
- Muehllehner, G. and J. S. Karp (2006). "Positron emission tomography." Physics in medicine and biology **51**(13): R117.
- Mukherji, S. K., T. L. Chenevert and M. Castillo (2002). "Diffusion-weighted magnetic resonance imaging." Journal of neuro-ophthalmology **22**(2): 118-122.
- Mukhopadhyay, S., P. K. Panda, N. Sinha, D. N. Das and S. K. Bhutia (2014). "Autophagy and apoptosis: where do they meet?" Apoptosis **19**(4): 555-566.
- Muñoz-Espín, D. and M. Serrano (2014). "Cellular senescence: from physiology to pathology." Nature reviews Molecular cell biology **15**(7): 482-496.
- Nagaraju, G. P., P. V. Bramhachari, G. Raghu and B. F. El-Rayes (2015). "Hypoxia inducible factor-1 α : Its role in colorectal carcinogenesis and metastasis." Cancer letters **366**(1): 11-18.
- Narita, M., S. Nuñez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." Cell **113**(6): 703-716.
- Network, C. G. A. (2012). "Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer." Nature **487**(7407): 330-337.
- Nitz, W. (1999). "MR imaging: acronyms and clinical applications." European radiology **9**(5): 979-997.
- Niu, G. and X. Chen (2009). "PET imaging of angiogenesis." PET clinics **4**(1): 17-38.
- Ntziachristos, V., C. Bremer and R. Weissleder (2003). "Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging." European radiology **13**(1): 195-208.
- Odes, E. J., P. S. Randolph-Quinney, M. Steyn, Z. Throckmorton, J. S. Smilg, B. Zipfel, T. N. Augustine, F. De Beer, J. W. Hoffman and R. D. Franklin (2016). "Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa." South African Journal of Science **112**(7-8): 1-5.
- Ohtani, N., K. Yamakoshi, A. Takahashi and E. Hara (2004). "The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression." The Journal of Medical Investigation **51**(3-4): 146-153.
- Olovnikov, A. M. (1970). "[Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]." Doklady Akademii Nauk SSSR **201**(6): 1496-1499.
- Olson, R. D. and P. S. Mushlin (1990). "Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses." The FASEB journal **4**(13): 3076-3086.
- Otero-Estévez, O., M. Martínez-Fernández, L. Vázquez-Iglesias, M. Páez de la Cadena, F. J. Rodríguez-Berrocal and V. S. Martínez-Zorzano (2013). "Decreased Expression of Alpha-L-Fucosidase Gene FUCA1 in Human Colorectal Tumors." International journal of molecular sciences **14**(8): 16986-16998.
- Pacheco-Rivera, R., S. Fattel-Fazenda, J. Arellanes-Robledo, A. Silva-Olivares, L. Alemán-Lazarini, M. Rodríguez-Segura, J. Pérez-Carreón, S. Villa-Treviño, M. Shibayama and J. Serrano-Luna (2016). "Double staining of β -galactosidase with fibrosis and cancer markers reveals the chronological appearance of senescence in liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine." Toxicology letters **241**: 19-31.
- Padhani, A. R., G. Liu, D. Mu-Koh, T. L. Chenevert, H. C. Thoeny, T. Takahara, A. Dzik-Jurasz, B. D. Ross, M. Van Cauteren and D. Collins (2009). "Diffusion-weighted

- magnetic resonance imaging as a cancer biomarker: consensus and recommendations." Neoplasia **11**(2): 102-125.
- Pantel, A. R. and D. A. Mankoff (2017). "Molecular imaging to guide systemic cancer therapy: Illustrative examples of PET imaging cancer biomarkers." Cancer letters **387**: 25-31.
- Pasipoularides, A. (2014). "Galen, father of systematic medicine. An essay on the evolution of modern medicine and cardiology." International journal of cardiology **172**(1): 47-58.
- Paspulati, R. M., S. Partovi, K. A. Herrmann, S. Krishnamurthi, C. P. Delaney and N. C. Nguyen (2015). "Comparison of hybrid FDG PET/MRI compared with PET/CT in colorectal cancer staging and restaging: a pilot study." Abdominal imaging **40**(6): 1415-1425.
- Patel, S. G. and D. J. Ahnen (2012). "Familial colon cancer syndromes: an update of a rapidly evolving field." Current gastroenterology reports **14**(5): 428-438.
- Patt, M., M. Kuntzsch and H. Machulla (1999). "Preparation of [¹⁸F] fluoromisonidazole by nucleophilic substitution on THP-protected precursor: yield dependence on reaction parameters." Journal of radioanalytical and nuclear chemistry **240**(3): 925-927.
- Perez-Mancera, P. A., A. R. Young and M. Narita (2014). "Inside and out: the activities of senescence in cancer." Nature reviews Cancer.
- Perona, R. (2006). "Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors." Clinical and Translational Oncology **8**(2): 77-82.
- Pfannschmidt, J., H. Dienemann and H. Hoffmann (2007). "Surgical resection of pulmonary metastases from colorectal cancer: a systematic review of published series." The Annals of thoracic surgery **84**(1): 324-338.
- Phelps, M. E., E. J. Hoffman, S.-C. Huang and M. M. Ter-Pogossian (1975). "Effect of positron range on spatial resolution." Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine **16**(7): 649-652.
- Pichler, B. J., H. F. Wehrl and M. S. Judenhofer (2008). "Latest advances in molecular imaging instrumentation." Journal of Nuclear Medicine **49**(Suppl 2): 5S-23S.
- Pietras, K. and A. Östman (2010). "Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma." Experimental cell research **316**(8): 1324-1331.
- Pollheimer, M. J., P. Kornprat, R. A. Lindtner, L. Harbaum, A. Schlemmer, P. Rehak and C. Langner (2010). "Tumor necrosis is a new promising prognostic factor in colorectal cancer." Human pathology **41**(12): 1749-1757.
- Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T. M. Bryan, S. R. Hamilton, S. N. Thibodeau, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." Nature **359**(6392): 235-237.
- Prahallad, A., C. Sun, S. Huang, F. Di Nicolantonio, R. Salazar, D. Zecchin, R. L. Beijersbergen, A. Bardelli and R. Bernards (2012). "Unresponsiveness of colon cancer to BRAF (V600E) inhibition through feedback activation of EGFR." Nature **483**(7388): 100-103.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast and M. J. Cormier (1992). "Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein." Gene **111**(2): 229-233.
- Prenen, H., L. Vecchione and E. Van Cutsem (2013). "Role of targeted agents in metastatic colorectal cancer." Targeted oncology **8**(2): 83-96.

- Prieur, A., E. Besnard, A. Babled and J.-m. Lemaître (2011). "p53 and p16INK4A independent induction of senescence by chromatin-dependent alteration of S-phase progression." Nature communications **2**: 473.
- Rahib, L., B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman and L. M. Matrisian (2014). "Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States." Cancer research **74**(11): 2913-2921.
- Rahmanzadeh, R., G. Hüttmann, J. Gerdes and T. Scholzen (2007). "Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis." Cell proliferation **40**(3): 422-430.
- Reader, A. J. and H. Zaidi (2007). "Advances in PET image reconstruction." PET Clinics **2**(2): 173-190.
- Reischl, G., A. Blocher, R. Wei, W. Ehrlichmann, M. Kuntzsch, C. Solbach, B. M. Dohmen and H.-J. Machulla (2006). "Simplified, automated synthesis of 3-[¹⁸F] fluoro-3'-deoxy-thymidine ([¹⁸F] FLT) and simple method for metabolite analysis in plasma." Radiochimica Acta **94**(8/2006): 447-451.
- Reischl, G., W. Ehrlichmann and H.-J. Machulla (2002). "Electrochemical transfer of [¹⁸F] fluoride from [¹⁸O] water into organic solvents ready for labeling reactions." Journal of radioanalytical and nuclear chemistry **254**(1): 29-31.
- Rice, B. W., M. D. Cable and M. B. Nelson (2001). "In vivo imaging of light-emitting probes." Journal of biomedical optics **6**(4): 432-440.
- Richards, C. H., Z. Mohammed, T. Qayyum, P. G. Horgan and D. C. McMillan (2011). "The prognostic value of histological tumor necrosis in solid organ malignant disease: a systematic review." Future oncology **7**(10): 1223-1235.
- Roberson, R. S., S. J. Kussick, E. Vallieres, S.-Y. J. Chen and D. Y. Wu (2005). "Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers." Cancer research **65**(7): 2795-2803.
- Robertson, R., M. Germanos, C. Li, G. Mitchell, S. R. Cherry and M. Silva (2009). "Optical imaging of Cerenkov light generation from positron-emitting radiotracers." Physics in medicine and biology **54**(16): N355.
- Rodier, F., D. P. Muñoz, R. Teachenor, V. Chu, O. Le, D. Bhaumik, J.-P. Coppé, E. Campeau, C. M. Beauséjour and S.-H. Kim (2011). "DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion." Journal of cell science **124**(1): 68-81.
- Roninson, I. B. (2003). "Tumor cell senescence in cancer treatment." Cancer research **63**(11): 2705-2715.
- Rubio-Viqueira, B. and M. Hidalgo (2009). "Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients." Clinical pharmacology & therapeutics **85**(2).
- Rygaard, J. and C. O. Poulsen (1969). "Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice." Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica **77**(4): 758-760.
- Sager, R. (1991). "Senescence as a mode of tumor suppression." Environmental health perspectives **93**: 59.
- Sager, R. and F. J. Ryan (1961). Cell heredity, Wiley New York.

- Sakamoto, S., T. Sagara, T. Iwama, T. Kawasaki and R. Okamoto (1985). "Increased activities of thymidine kinase isozymes in human colon polyp and carcinoma." Carcinogenesis **6**(6): 917-919.
- Schlüter, C., M. Duchrow, C. Wohlenberg, M. Becker, G. Key, H.-D. Flad and J. Gerdes (1993). "The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins." The Journal of cell biology **123**(3): 513-522.
- Schlyer, D. (2004). "PET tracers and radiochemistry." ANNALS-ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE **33**(2): 146-154.
- Schmiegel, W., A. Reinacher-Schick, D. Arnold, U. Graeven, V. Heinemann, R. Porschen, J. Riemann, C. Rçdel, R. Sauer and M. Wieser (2008). "S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom –Aktualisierung 2008. Ergebnis einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz (8.–9. Juni 2007)." Z gastroenterol **46**(8): 799-840.
- Schmitt, C. A. (2007). "Cellular senescence and cancer treatment." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer **1775**(1): 5-20.
- Schmitz, J., J. Schwab, J. Schwenck, Q. Chen, L. Quintanilla-Martinez, M. Hahn, B. Wietek, N. Schwenzer, A. Staebler and U. Kohlhofer (2016). "Decoding intratumoral heterogeneity of breast cancer by multiparametric in vivo imaging: a translational study." Cancer Research **76**(18): 5512-5522.
- Schwarze, S. R., V. X. Fu, J. A. Desotelle, M. L. Kenowski and D. F. Jarrard (2005). "The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells." Neoplasia **7**(9): 816-823.
- Schwenck, J., K. Fuchs, S. Eilenberger, A.-M. Rolle, S. C. Vega, W. Thaiss and F. Maier (2016). "Fluoreszenz-und Cerenkov-Lumineszenz-Bildgebung." Nuklearmedizin **55**(2): 63-70.
- Sclafani, F., G. Gullo, K. Sheahan and J. Crown (2013). "BRAF mutations in melanoma and colorectal cancer: a single oncogenic mutation with different tumour phenotypes and clinical implications." Critical reviews in oncology/hematology **87**(1): 55-68.
- Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16 INK4a." Cell **88**(5): 593-602.
- Shabbeer, S., M. SQ Kortenhorst, S. Kachhap, N. Galloway, R. Rodriguez and M. A. Carducci (2007). "Multiple Molecular pathways explain the anti-proliferative effect of valproic acid on prostate cancer cells in vitro and in vivo." The Prostate **67**(10): 1099-1110.
- Shampo, M. A. and R. A. Kyle (1997). Edward M. Purcell—Nobel Prize for Magnetic Resonance Imaging. Mayo Clinic Proceedings, Elsevier.
- Sharpless, N. E. and C. J. Sherr (2015). "Forging a signature of in vivo senescence." Nature Reviews Cancer **15**(7): 397-408.
- Shay, J. W. and W. E. Wright (2000). "Hayflick, his limit, and cellular ageing." Nature reviews Molecular cell biology **1**(1): 72-76.
- Shay, J. W., W. E. Wright and H. Werbin (1991). "Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer **1072**(1): 1-7.
- Shen, L., M. Toyota, Y. Kondo, E. Lin, L. Zhang, Y. Guo, N. S. Hernandez, X. Chen, S. Ahmed and K. Konishi (2007). "Integrated genetic and epigenetic analysis identifies

three different subclasses of colon cancer." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(47): 18654-18659.

Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes & development **13**(12): 1501-1512.

Sherwood, S. W., D. Rush, J. L. Ellsworth and R. T. Schimke (1988). "Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis." Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(23): 9086-9090.

Shimizu, S., Y. Eguchi, W. Kamiike, Y. Itoh, J.-i. Hasegawa, K. Yamabe, Y. Otsuki, H. Matsuda and Y. Tsujimoto (1996). "Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL." Cancer research **56**(9): 2161-2166.

Shimomura, O., M. Chalfie and R. Tsien (2014). "The Nobel Prize in Chemistry 2008." Back to cited text(19).

Siegel, R. L., K. D. Miller, S. A. Fedewa, D. J. Ahnen, R. G. Meester, A. Barzi and A. Jemal (2017). "Colorectal cancer statistics, 2017." CA: a cancer journal for clinicians.

Siegel, R. L., K. D. Miller and A. Jemal (2015). "Cancer statistics, 2016." CA: A cancer journal for clinicians.

Sliwiska, M. A., G. Mosieniak, K. Wolanin, A. Babik, K. Piwocka, A. Magalska, J. Szczepanowska, J. Fronk and E. Sikora (2009). "Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells." Mechanisms of ageing and development **130**(1): 24-32.

Smuder, A. J., A. N. Kavazis, K. Min and S. K. Powers (2011). "Exercise protects against doxorubicin-induced markers of autophagy signaling in skeletal muscle." Journal of Applied Physiology **111**(4): 1190-1198.

Smyth, M. J., G. P. Dunn and R. D. Schreiber (2006). "Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity." Advances in immunology **90**: 1-50.

Sobin, L. H., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2011). TNM classification of malignant tumours, John Wiley & Sons.

Soloviev, D., D. Lewis, D. Honess and E. Aboagye (2012). "[18 F] FLT: an imaging biomarker of tumour proliferation for assessment of tumour response to treatment." European Journal of Cancer **48**(4): 416-424.

Sottoriva, A., H. Kang, Z. Ma, T. A. Graham, M. P. Salomon, J. Zhao, P. Marjoram, K. Siegmund, M. F. Press and D. Shibata (2015). "A Big Bang model of human colorectal tumor growth." Nature genetics **47**(3): 209-216.

Spick, C., K. Herrmann and J. Czernin (2016). "18F-FDG PET/CT and PET/MRI perform equally well in cancer patients: Evidence from studies in more than 2300 patients." Journal of Nuclear Medicine: jnumed. 115.158808.

Stejskal, E. O. and J. E. Tanner (1965). "Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient." The journal of chemical physics **42**(1): 288-292.

Suzuki, K., I. Mori, Y. Nakayama, M. Miyakoda, S. Kodama and M. Watanabe (2001). "Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening." Radiation research **155**(1): 248-253.

- Talmadge, J. E., R. K. Singh, I. J. Fidler and A. Raz (2007). "Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer." The American journal of pathology **170**(3): 793-804.
- Taylor, J. R., B. D. Lehmann, W. H. Chappell, S. L. Abrams, L. S. Steelman and J. A. McCubrey (2011). "Cooperative effects of Akt-1 and Raf-1 on the induction of cellular senescence in doxorubicin or tamoxifen treated breast cancer cells." Oncotarget **2**(8): 610-626.
- te Poele, R. H., A. L. Okorokov, L. Jardine, J. Cummings and S. P. Joel (2002). "DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo." Cancer research **62**(6): 1876-1883.
- Teng, M. W., J. B. Swann, C. M. Koebel, R. D. Schreiber and M. J. Smyth (2008). "Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer." Journal of leukocyte biology **84**(4): 988-993.
- Tentler, J. J., A. C. Tan, C. D. Weekes, A. Jimeno, S. Leong, T. M. Pitts, J. J. Arcaroli, W. A. Messersmith and S. G. Eckhardt (2012). "Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development." Nature reviews Clinical oncology **9**(6): 338-350.
- Ter-Pogossian, M. M. (1992). The origins of positron emission tomography. Seminars in nuclear medicine, Elsevier.
- Ter-Pogossian, M. M., M. E. Phelps, E. J. Hoffman and N. A. Mullani (1975). "A Positron-Emission Transaxial Tomograph for Nuclear Imaging (PETT) 1." Radiology **114**(1): 89-98.
- Terskikh, A., A. Fradkov, G. Ermakova, A. Zarskiy, P. Tan, A. V. Kajava, X. Zhao, S. Lukyanov, M. Matz and S. Kim (2000). "'Fluorescent timer': protein that changes color with time." Science **290**(5496): 1585-1588.
- Thorstensen, L., G. E. Lind, T. Løvig, C. B. Diep, G. I. Meling, T. O. Rognum and R. A. Lothe (2005). "Genetic and epigenetic changes of components affecting the WNT pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability." Neoplasia **7**(2): 99-108.
- Tommerup, H., A. Dousmanis and T. de Lange (1994). "Unusual chromatin in human telomeres." Molecular and cellular biology **14**(9): 5777-5785.
- Tong, Y., W. Zhao, C. Zhou, K. Wawrowsky and S. Melmed (2011). "PTTG1 attenuates drug-induced cellular senescence." PloS one **6**(8): e23754.
- Toyohara, J., A. Waki, S. Takamatsu, Y. Yonekura, Y. Magata and Y. Fujibayashi (2002). "Basis of FLT as a cell proliferation marker: comparative uptake studies with [³H] thymidine and [³H] arabinothymidine, and cell-analysis in 22 asynchronously growing tumor cell lines." Nuclear medicine and biology **29**(3): 281-287.
- Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." Annual review of biochemistry **67**(1): 509-544.
- Tu, Z., Y.-N. Lin and C.-H. Lin (2013). "Development of fucosyltransferase and fucosidase inhibitors." Chemical Society Reviews **42**(10): 4459-4475.
- Van Cutsem, E., C.-H. Köhne, I. Láng, G. Folprecht, M. P. Nowacki, S. Cascinu, I. Shchepotin, J. Maurel, D. Cunningham and S. Tejpar (2011). "Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status." Journal of Clinical Oncology: JCO. 2010.2033. 5091.

- van der Veldt, A. A., E. F. Smit and A. A. Lammertsma (2013). "Positron emission tomography as a method for measuring drug delivery to tumors in vivo: the example of [11C] docetaxel." Frontiers in oncology **3**.
- van Geuns, R.-J. M., P. A. Wielopolski, H. G. de Bruin, B. J. Rensing, P. M. van Ooijen, M. Hulshoff, M. Oudkerk and P. J. de Feyter (1999). "Basic principles of magnetic resonance imaging." Progress in cardiovascular diseases **42**(2): 149-156.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans and R. A. Holt (2001). "The sequence of the human genome." science **291**(5507): 1304-1351.
- Verkhusha, V. V. and K. A. Lukyanov (2004). "The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins." Nature biotechnology **22**(3): 289-296.
- Vickers, P. J., R. B. Dickson, R. Shoemaker and K. H. Cowan (1988). "A multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cell line which exhibits cross-resistance to antiestrogens and hormone-independent tumor growth in vivo." Molecular Endocrinology **2**(10): 886-892.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." Nature medicine **10**(8): 789-799.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2015). "The Path to Cancer--Three Strikes and You're Out." The New England journal of medicine **373**(20): 1895-1898.
- Vogelstein, B., N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz and K. W. Kinzler (2013). "Cancer genome landscapes." science **339**(6127): 1546-1558.
- Von Zglinicki, T., G. Saretzki, J. Ladhoff, F. d. A. di Fagagna and S. Jackson (2005). "Human cell senescence as a DNA damage response." Mechanisms of ageing and development **126**(1): 111-117.
- Vonlaufen, A., G. Wiedle, B. Borisch, S. Birrer, P. Luder and B. A. Imhof (2001). "Integrin $\alpha\beta3$ expression in colon carcinoma correlates with survival." Modern pathology **14**(11): 1126-1132.
- Wadsak, W. and M. Mitterhauser (2010). "Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT." European journal of radiology **73**(3): 461-469.
- Wahl, R. L., H. Jacene, Y. Kasamon and M. A. Lodge (2009). "From RECIST to PERCIST: evolving considerations for PET response criteria in solid tumors." Journal of nuclear medicine **50**(Suppl 1): 122S-150S.
- Wang, W., J. X. Chen, R. Liao, Q. Deng, J. J. Zhou, S. Huang and P. Sun (2002). "Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence." Molecular and cellular biology **22**(10): 3389-3403.
- Wang, W., B. Sordat, D. Piguet and M. Sordat (1984). Human Colon Tumors in Nude Mice: Implantation Site and Expression of the Invasive Phenotype1. Immune-deficient animals, Karger Publishers: 239-245.
- Wang, X., X. Fu and R. Hoffman (1992). "A new patient-like metastatic model of human lung cancer constructed orthotopically with intact tissue via thoracotomy in immunodeficient mice." International journal of cancer. Journal international du cancer **51**(6): 992-995.
- Warburg, O. u. F. D. (1931). "The metabolism of tumors." The American journal of the Medical Sciences **182** (1).

- Watson, C., L. Byars, C. Michel and H. Rothfuss (2008). Scatter/trues detection efficiency compensation in scatter correction of PET emission data. Nuclear Science Symposium Conference Record, 2008. NSS'08. IEEE, IEEE.
- Watson, J. D. (1972). "Origin of concatemeric T7DNA." Nature **239**(94): 197-201.
- Watson, P. and B. Riley (2005). "The tumor spectrum in the Lynch syndrome." Familial cancer **4**(3): 245-248.
- Weisenberger, D. J., K. D. Siegmund, M. Campan, J. Young, T. I. Long, M. A. Faasse, G. H. Kang, M. Widschwendter, D. Weener and D. Buchanan (2006). "CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer." Nature genetics **38**(7): 787-793.
- Weishaupt, D., V. D. Köchli and B. Marincek (2000). Wie funktioniert MRI, Springer.
- Weishaupt, D., V. D. Köchli and B. Marincek (2009). Wie funktioniert MRI?: eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanztomographie, Springer.
- Wells, R. G., R. de Kemp and R. Beanlands (2009). "Positron emission tomography instrumentation." Nuclear cardiology: Technical applications. New York: McGraw-Hill Companies. Inc: 27.
- Wiese, T. J., J. A. Dunlap and M. A. Yorek (1994). "L-fucose is accumulated via a specific transport system in eukaryotic cells." Journal of Biological Chemistry **269**(36): 22705-22711.
- Willems, P. J., R. Gatti, J. K. Darby, G. Romeo, P. Durand, J. E. Dumon and J. S. O'Brien (1991). "Fucosidosis revisited: a review of 77 patients." American journal of medical genetics **38**(1): 111-131.
- Witsch, E., M. Sela and Y. Yarden (2010). "Roles for growth factors in cancer progression." Physiology **25**(2): 85-101.
- Wood, I. S. and P. Trayhurn (2003). "Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins." British Journal of Nutrition **89**(01): 3-9.
- Wood, L. D., D. W. Parsons, S. Jones, J. Lin, T. Sjöblom, R. J. Leary, D. Shen, S. M. Boca, T. Barber and J. Ptak (2007). "The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers." Science **318**(5853): 1108-1113.
- XINYU, F. and M. ROBERT (1993). "Human ovarian carcinoma metastatic models constructed in nude mice by orthotopic transplantation of histologically-intact patient specimens." Anticancer research **3**: 283-286.
- Xu, Y., N. Li, R. Xiang and P. Sun (2014). "Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence." Trends in biochemical sciences **39**(6): 268-276.
- Xue, W., L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo and S. W. Lowe (2007). "Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas." Nature **445**(7128): 656-660.
- Yegorov, Y. E., S. S. Akimov, R. Hass, A. V. Zelenin and I. A. Prudovsky (1998). "Endogenous β -galactosidase activity in continuously nonproliferating cells." Experimental cell research **243**(1): 207-211.
- Yoshimura, H., D. K. Dhar, H. Kohno, H. Kubota, T. Fujii, S. Ueda, S. Kinugasa, M. Tachibana and N. Nagasue (2004). "Prognostic Impact of Hypoxia-Inducible Factors 1 α and 2 α in Colorectal Cancer Patients Correlation with Tumor Angiogenesis and Cyclooxygenase-2 Expression." Clinical Cancer Research **10**(24): 8554-8560.

- Young, A. P., S. Schlisio, Y. A. Minamishima, Q. Zhang, L. Li, C. Grisanzio, S. Signoretti and W. G. Kaelin (2008). "VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400." Nature cell biology **10**(3): 361-369.
- Young, A. R. and M. Narita (2009). "SASP reflects senescence." EMBO reports **10**(3): 228-230.
- Young, A. R., M. Narita, M. Ferreira, K. Kirschner, M. Sadaie, J. F. Darot, S. Tavaré, S. Arakawa, S. Shimizu and F. M. Watt (2009). "Autophagy mediates the mitotic senescence transition." Genes & development **23**(7): 798-803.
- Yuan, T. and L. Cantley (2008). "PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme." Oncogene **27**(41): 5497-5510.
- Zalzali, H., M. Harajly, L. Abdul-Latif, N. El-Chaar, G. Dbaibo, S. X. Skapek and R. Saab (2012). "Temporally distinct roles for tumor suppressor pathways in cell cycle arrest and cellular senescence in Cyclin D1-driven tumor." Molecular cancer **11**(1): 28.
- Zauber, A. G., S. J. Winawer, M. J. O'Brien, I. Lansdorp-Vogelaar, M. van Ballegooijen, B. F. Hankey, W. Shi, J. H. Bond, M. Schapiro and J. F. Panish (2012). "Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths." New England Journal of Medicine **366**(8): 687-696.
- Zender, L., W. Xue, C. Cordon-Cardo, G. Hannon, R. Lucito, S. Powers, P. Flemming, M. Spector and S. Lowe (2005). Generation and analysis of genetically defined liver carcinomas derived from bipotential liver progenitors, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Zhang, C. C., Z. Yan, W. Li, K. Kuszpit, C. L. Painter, Q. Zhang, P. B. Lappin, T. Nichols, M. E. Lira and T. Affolter (2012). "[¹⁸F] FLT-PET imaging does not always "light up" proliferating tumor cells." Clinical Cancer Research **18**(5): 1303-1312.
- Zhang, R., M. V. Poustovoitov, X. Ye, H. A. Santos, W. Chen, S. M. Daganzo, J. P. Erzberger, I. G. Serebriiskii, A. A. Canutescu and R. L. Dunbrack (2005). "Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA." Developmental cell **8**(1): 19-30.
- Zhang, X. and L. Chen (2016). "The recent progress of the mechanism and regulation of tumor necrosis in colorectal cancer." Journal of cancer research and clinical oncology **142**(2): 453-463.
- Zhang, X., S. Claerhout, A. Prat, L. E. Dobrolecki, I. Petrovic, Q. Lai, M. D. Landis, L. Wiechmann, R. Schiff and M. Giuliano (2013). "A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models." Cancer research **73**(15): 4885-4897.
- Zhao, X., Z. Liu, L. Yu, Y. Zhang, P. Baxter, H. Voicu, S. Gurusiddappa, J. Luan, J. M. Su and H.-c. E. Leung (2012). "Global gene expression profiling confirms the molecular fidelity of primary tumor-based orthotopic xenograft mouse models of medulloblastoma." Neuro-oncology **14**(5): 574-583.
- Zheng, J., D. Pei, L. Mao, X. Liu, D. Mei, B. Zhang, Z. Shi, R. Wen and X. Sun (2009). "Inhibition of renal cancer cell growth in vitro and in vivo with oncolytic adenovirus armed short hairpin RNA targeting Ki-67 encoding mRNA." Cancer gene therapy **16**(1): 20-32.
- Zhong, H., A. M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D. A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W. B. Isaacs, G. L. Semenza and J. W. Simons (1999). "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases." Cancer research **59**(22): 5830-5835.

Zhu, Y., T. Tchkonina, H. Fuhrmann-Stroissnigg, H. M. Dai, Y. Y. Ling, M. B. Stout, T. Pirtskhalava, N. Giorgadze, K. O. Johnson and C. B. Giles (2016). "Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors." *Aging Cell* **15**(3): 428-435.

Zhu, Y., T. Tchkonina, T. Pirtskhalava, A. C. Gower, H. Ding, N. Giorgadze, A. K. Palmer, Y. Ikeno, G. B. Hubbard and M. Lenburg (2015). "The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs." *Aging cell* **14**(4): 644-658.

Zimmer, M. (2002). "Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior." *Chemical reviews* **102**(3): 759-782.

Zou, M., E. Baitei, R. Al-Rijjal, R. Parhar, F. Al-Mohanna, S. Kimura, C. Pritchard, H. Binessa, A. Alzahrani and H. Al-Khalaf (2016). "TSH overcomes BrafV600E-induced senescence to promote tumor progression via downregulation of p53 expression in papillary thyroid cancer." *Oncogene* **35**(15): 1909-1918.

Zoubeydi, A., K. Chi and M. Gleave (2010). "Targeting the cytoprotective chaperone, clusterin, for treatment of advanced cancer." *Clinical Cancer Research* **16**(4): 1088-1093.

11 Anhang

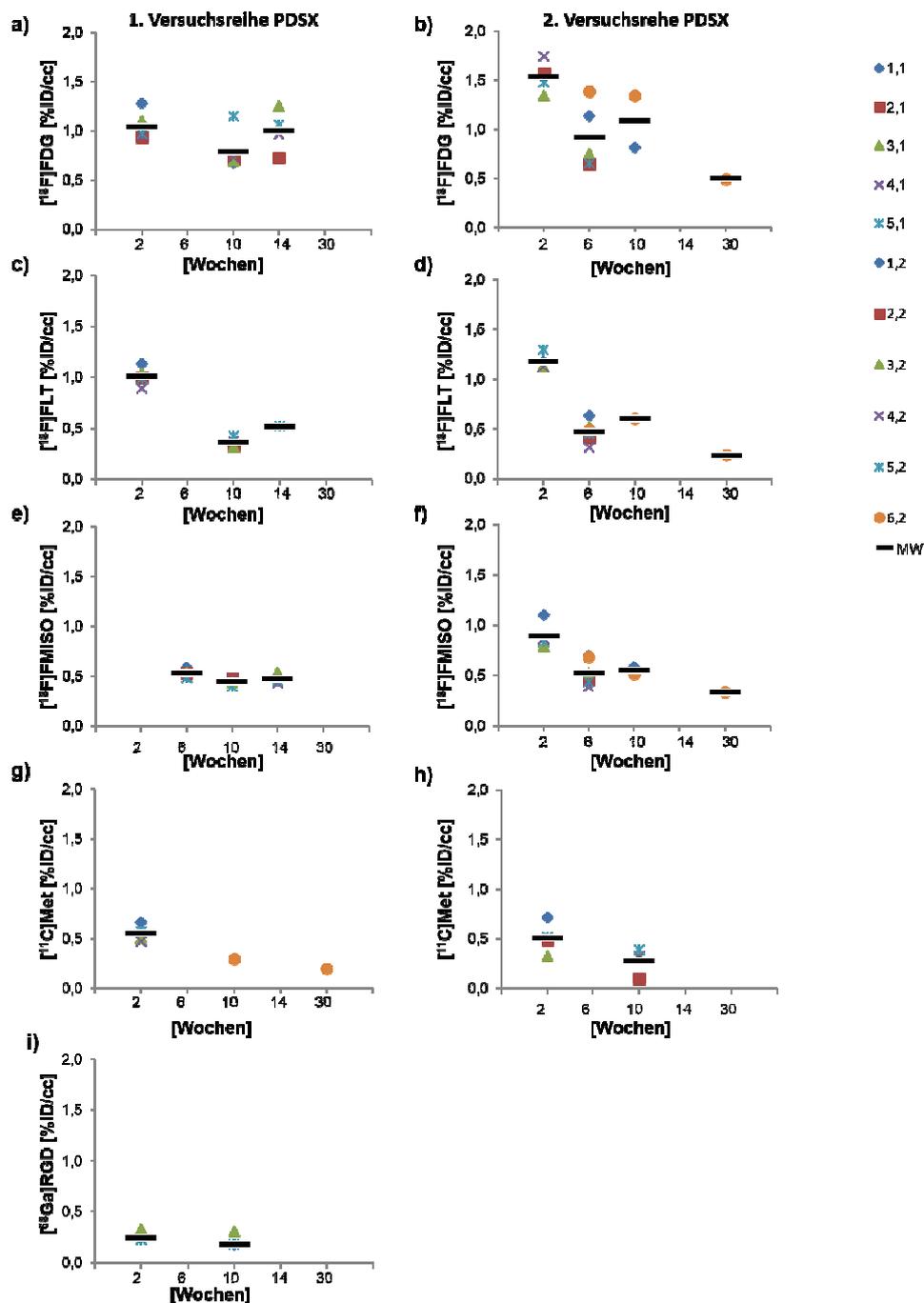


Abbildung 72: Ergebnisse der PET-Messungen für PDSX-Tumoren

Es sind jeweils die PET-Ergebnisse der 1ten und 2ten Versuchsreihe mit fünf verschiedenen Tracern $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (a, b), $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ (c, d), $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ (e, f), $[^{11}\text{C}]\text{Met}$ (g, h) und $[^{68}\text{Ga}]\text{RGD}$ (f) für einzelne PDSX-Tumoren in %ID/cc dargestellt.

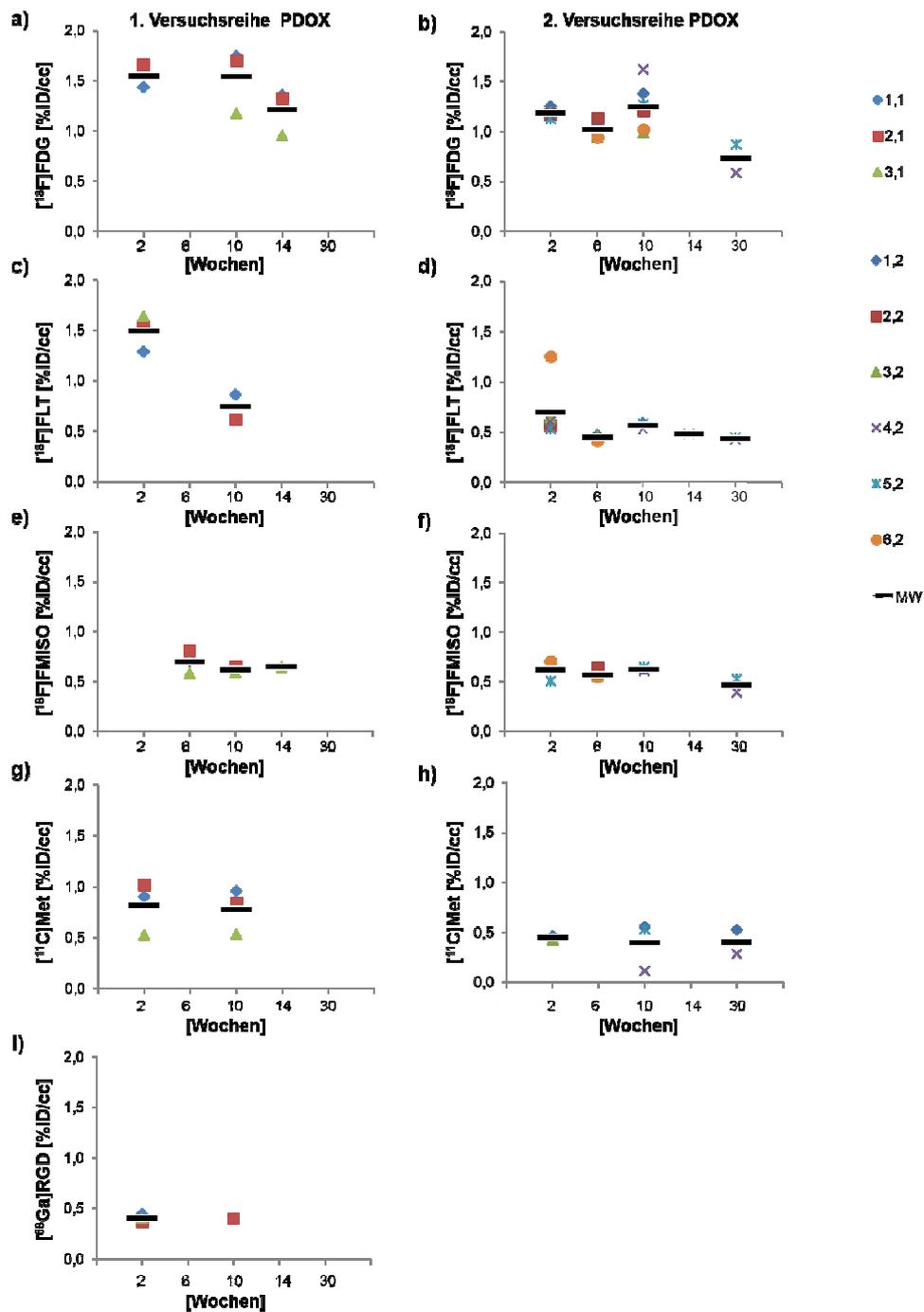


Abbildung 73: Ergebnisse der PET-Messungen für PDOX-Tumoren

Es sind jeweils die PET-Ergebnisse der 1ten und 2ten Versuchsreihe mit fünf verschiedenen Tracern $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ (a, b), $[^{18}\text{F}]\text{FLT}$ (c, d), $[^{18}\text{F}]\text{FMISO}$ (e, f), $[^{11}\text{C}]\text{Met}$ (g, h) und $[^{68}\text{Ga}]\text{RGD}$ (f) für einzelne PDOX-Tumoren in %ID/cc dargestellt.