

Aus dem Institut für Medizintechnik

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Thorsten M. Buzug

„Orthotopes Tumormodell zur Validierung von
Fluoreszenzendoskopie und Kontrastmitteln
für die optische Bildgebung“

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Informatik / Technik

vorgelegt von

Iryna Kruse

aus Nishnegorsk

Lübeck 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thorsten M. Buzug

2. Berichterstatter: PD. Dr. Andreas Frey

Tag der mündlichen Prüfung: 8.10.2013

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 8.10.2013

MEINEN ELTERN UND MEINER TOCHTER EWA MARIA

МОИМ РОДИТЕЛЯМ И ДОЧЕРИ ЕВЕ МАРИЕ

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Darm- und Lungenkrebs	2
2.2 Diagnoseverfahren	2
2.3 Endoskopische Fluoreszenzdiagnostik	5
2.3.1 Autofluoreszenz zur Detektion der Tumore.....	5
2.3.2 Exogene Fluoreszenzmittel für die Fluoreszenzendoskopie	6
2.4 Tiermodelle für die Krebsforschung	9
2.5 Fluoreszenzproteine	13
2.6 Ziel der Arbeit	16
3 Materialien.....	17
3.1 Verwendete Organismen.....	17
3.1.1 Tierstamm	17
3.1.2 Zelllinien	17
3.2 Spezielle Geräte	17
3.3 Spezielle Materialien	18
3.4 Verwendete Chemikalien und Medikamente	18
3.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur	19
3.6 Häufig verwendete Puffer	20
3.7 Software.....	20
4 Methoden	21
4.1 Allgemeines zur Verwendung der Endoskope.....	21
4.2 Weißlicht- und Fluoreszenzendoskopie mit Xenon-Lichtquelle.....	21
4.3 Mehrkanal-Endoskopsystem	22
4.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen <i>in vitro</i>	24
4.4.1 Kultivierung der Zellen	24
4.4.2 Einfrieren von Zellen	25
4.4.3 Vorbereitung der Zellen für die Implantation.....	25
4.4.4 Endoskopische Untersuchung der Zellen.....	26

4.4.4.1	Vorbereitung der Zellen	26
4.4.4.2	Kontrastierung der Zellen.....	27
4.4.4.3	Endoskopie der Zellen	27
4.4.5	Durchflusszytometrie	27
4.4.6	Ausbleichversuche.....	29
4.4.7	Fixierung der Zellen	30
4.4.8	Cryoeinbettung der Zellen	31
4.5	Arbeiten mit Gewebe	32
4.5.1	Behandlung der Darmschleimhaut mit Trypsin	32
4.5.2	Elektronenmikroskopie	33
4.5.3	Molekularbiologisches Arbeiten	35
4.5.3.1	DNA-Isolierung	35
4.5.3.2	PCR-Analyse.....	36
4.6	Arbeiten zur Etablierung eines orthotopen Tumormodells	37
4.6.1	Tierhaltung	37
4.6.2	Narkose.....	37
4.6.2.1	Inhalationsnarkose	38
4.6.2.2	Ketamin-Xylazin Narkose.....	38
4.6.3	Zellimplantation	38
4.6.3.1	Zellimplantation in den Darm	39
4.6.3.2	Zellimplantation in die Trachea.....	40
4.6.4	Endoskopie der Tiere.....	41
5	Ergebnisse	42
5.1	Auswahl der Zelllinien zur Transplantation	42
5.2	Charakterisierung der ausgewählten Zelllinien	45
5.2.1	Morphologie der Zellen.....	45
5.2.2	Stabilität und Homogenität der Transfektion	47
5.2.2.1	Durchflusszytometrie	47
5.2.2.1	Mikroskopische und endoskopische Betrachtung der Zellen	49
5.3	Charakterisierung des Fluoreszenzproteins TurboFP635.....	51
5.3.1	Ausbleichverhalten des Fluoreszenzproteins.....	51
5.3.2	Einfluss von Zellfixierungsmaßnahmen auf das Fluoreszenzverhalten von TurboFP635	53
5.4	Charakterisierung der verwendeten Endoskope <i>in vitro</i>	55
5.4.1	Fluoreszenzendoskopische Nachweisbarkeit der transfizierten Tumor-zellen	56
5.4.2	Einzelzellnachweis	56

5.5	Kontrastierung der Tumorzellen für endoskopische Untersuchungen <i>in vitro</i>	60
5.5.1	Validierung des Mehrkanalendoskops unter Verwendung von Kontrastmitteln ..	62
5.6	Etablierung eines orthotopen Tumormodells	64
5.6.1	Enzymatische Reizung der Schleimhäute.....	65
5.6.2	Zellimplantation	65
5.6.3	Endoskopie	66
5.6.3.1	Koloskopie	66
5.6.3.1	Bronchoskopie.....	67
5.6.4	PCR.....	70
5.6.5	Zusammenfassung der Pilotstudie	71
5.7	Validierung eines Mehrkanal-Endoskopsystems unter Verwendung von Kontrastmitteln <i>in vivo</i>	73
5.7.1	Validierung der Fluoreszenzendoskopie im orthotopen Lungen-Tumormodell....	74
5.7.2	Validierung des Mehrkanal-Endoskopsystems im orthotopen Lungen- Tumormodell mit fluoreszenten Kontrastmitteln.....	76
5.7.2.1	D1ATTO495-Peptid-Bindung an Matrigel.....	76
5.7.2.2	<i>In vivo</i> -Kontrastierung der Tumore mit D1ATTO495-Peptid.....	77
5.7.2.3	<i>In vivo</i> -Kontrastierung der Tumore mit Radachlorin	81
6	Diskussion	85
6.1	Aufbau des Modellsystems.....	85
6.1.1	Auswahl der Systemkomponenten	85
6.1.2	Aufbau eines orthotopen Darm-Tumormodells	87
6.1.3	Aufbau eines orthotopen Lungen-Tumormodells.....	90
6.2	Validierung der Fluoreszenzendoskopie	93
6.3	Detektion der Tumore mit Hilfe von Kontrastmitteln	96
6.4	Schlussfolgerungen.....	100
7	Literatur	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Bronchoskopie	5
Abbildung 2:	Orthotopes Tumormodell.....	16
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Mehrkanal-Endoskopsystems	23
Abbildung 4:	Kamerasynchrone Beleuchtung und Auslesen/Sortieren der Bildinformation.....	23
Abbildung 5:	Setzung der <i>gates</i> für die Durchflusszytometrie	28
Abbildung 6:	Applikation der Zellen.....	41
Abbildung 7:	Morphologie der ausgewählten Zelllinien.....	46
Abbildung 8:	Durchflusszytometrische Analyse der Homogenität und Stabilität der Transfektion.....	48
Abbildung 9:	Aufnahmen der Zellen nach 3 Monate Inkubation	50
Abbildung 10:	Verhalten des Fluoreszenzproteins in den SK-MES1FP635 Zellen unter Lichteinfluss	52
Abbildung 11:	Abnahme der Fluoreszenz in den SK-MES1FP635 Zellen während der Zellfixierung	54
Abbildung 12:	Sensitivität des Mehrkanal-Endoskopsystems mit Stablinsenendoskop	57
Abbildung 13:	Nachweis einzelner Zellen mit Xenon-basierten Systems mit Stablinsen- endoskop	58
Abbildung 14:	Einzelzellnachweis mittels Xenon-basierten Systems mit Stablinsen- endoskop	59
Abbildung 15:	Aufnahme der Kontrastmittel durch und Stabilität in SK-MES1FP635- Zellen	61
Abbildung 16:	Versuchsordnung zur vergleichenden Betrachtung unterschiedlich behandelter Zellen in drei Endoskop-Kanälen.	63
Abbildung 17:	Evaluation des endoskopischen Dreikanalsystems an kultivierten Zellen nach Kontrastmittelbehandlung	64
Abbildung 18:	Trypsinbehandlung des Gewebes	65
Abbildung 19:	Endoskopische Untersuchung des Tumorwachstums nach Zellinokulation ..	68
Abbildung 20:	Bronchoskopie	69
Abbildung 21:	Lunge der tumortragenden Ratte	69
Abbildung 22:	PCR-Gel	70
Abbildung 23:	PCR-Gel	71
Abbildung 24:	Bronchoskopie mit Mehrkanal-Endoskopsystem.....	75
Abbildung 25:	Bindung des D1ATTO495-Peptides an in Matrigel suspendierte Zellen	77
Abbildung 26:	Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten in auffälligen und unauffälligen Gewebebereichen	78
Abbildung 27:	Anwendung des D1ATTO495-Peptides <i>in vivo</i>	80
Abbildung 28:	Bronchoskopie der Tiere nach der Behandlung mit Radachlorin	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mastermix für PCR	36
Tabelle 2: Gruppeneinteilung für die Zellimplantation – Zielorgan Darm	39
Tabelle 3: Gruppeneinteilung für die Zellimplantation – Zielorgan Trachea	40
Tabelle 4: Charakteristika der infrage kommenden Darmkrebszelllinien.....	43
Tabelle 5: Charakteristika der infrage kommenden Lungenkrebszelllinien	44
Tabelle 6: Bestimmung der Zellzahl	58
Tabelle 7: Zusammenfassung der Pilotstudie.....	73

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
CAE	Carcinoembryonales Antigen
CYFRA 21-1	Cytokeratinfragment 21-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FOBT	fecal occult blood test
FP	Fluoreszenzprotein
GFP	Grünes Fluoreszenzprotein
IP	intraperitoneal
NSE	Neuron-spezifische-Enolase
OD	Optische Dichte
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDD	Photodynamische Diagnostik
PDT	Photodynamische Therapie
SD	Standardabweichung
SK	subkutan
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
5-ALA	5-Aminolevulinsäure

1 Zusammenfassung

Um die Mortalität von Tumorerkrankungen zu senken, ist eine sichere Diagnostizierung und frühzeitige Entfernung der Tumore notwendig. Dabei ist die Größe des Tumors entscheidend. Je größer der Tumor ist, desto einfacher wird er detektiert, umso kleiner sind jedoch die Überlebenschancen eines Patienten. Eine Behandlung bzw. Entfernung der Tumore in frühen Stadien erhöhen die Überlebenschancen und verbessern die Lebensqualität des Patienten. Von den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden bei Verdacht auf Darm- und Lungentumor kommt der Endoskopie als „Goldstandard“ eine besondere Bedeutung zu. Die Ergebnisse der Endoskopie sind allerdings von der Erfahrung des durchführenden Arztes abhängig, wobei insbesondere kleine oder flache Tumore in den früheren Entwicklungsstadien oft übersehen werden. Die fluoreszenzunterstützte Endoskopie kann die Detektion solcher Tumore erleichtern und die Rate der übersehenen Tumore reduzieren.

In Rahmen dieser Arbeit wurde ein Lungen-Tumormodell in der RNU-Ratte entwickelt, das zur Validierung der Fluoreszenzendoskopie genutzt werden sollte. In diesem Modell wurden in die Trachea der Versuchstiere endogen fluoreszierende Tumorzellen implantiert, so dass die Entwicklung der Tumore sowohl weißlicht- als auch fluoreszenzendoskopisch verfolgt werden konnte. In diesem Aufbau wurden ein fluoreszentes peptidisches Kontrastmittel sowie der Photosensibilisator Radachlorin in Verbindung mit einem neuartigen Laser-basierten Mehrkanal-Fluoreszenzendoskop getestet.

Eine ausgezeichnete Sensitivität des Laser-basierten Mehrkanal-Endoskopsystems mit einer Auflösungsmöglichkeit bis hin zu einzelnen Zellen konnte *in vitro* demonstriert werden.

Bei der *in vivo* Anwendung des Endoskops in Kombination mit den Kontrastmitteln konnte im Lungen-Tumormodell gezeigt werden, dass die Fluoreszenz-basierte Endoskopie als Ergänzung zur Weißlichtendoskopie eine sichere Detektion von flachen Tumoren bietet. Eine kombinierte Endoskopie bei der geeignete fluoreszente Kontrastmittel eingesetzt werden und die eine parallele Betrachtung des Organes im Weißlicht- und Fluoreszenzmodus erlaubt, würde somit die Diagnose-Stellung bei Tumorerkrankungen insbesondere im Frühstadium wesentlich erleichtern.

2 Einleitung

2.1 Darm- und Lungenkrebs

Laut statistischem Bundesamt ist Krebs nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Im Jahre 2011 verstarben über 220.000 Personen an bösartigen Gewebeneubildungen (Statistisches Bundesamt 2012). Mit über 65.000 und knapp 50.000 Neuerkrankungen im Jahre 2008 sind Darm- und Lungenkrebs hierbei die beiden häufigsten geschlechtsunabhängigen Tumorarten in Deutschland (Kaatsch & Kraywinkel 2012). Die 5-Jahre Überlebensrate für Darmkrebs liegt zwischen 52-63 % und für Lungenkrebs unter 20 %, was Lungenkrebs zu einer der häufigsten tumorbasierten Todesursachen macht.

Die Ursache für viele Krebsarten bleibt unbekannt. In Bezug auf die Krebsprävention lassen sich selbst die bekannten Auslöser nur schlecht beeinflussen (Kaatsch & Kraywinkel 2012). Aus diesem Grund ist es notwendig die Dysplasien oder Tumore sicher und rechtzeitig detektieren zu können. Eine frühe Diagnose erhöht in vielen Fällen die Überlebenschancen des Patienten. Eine operative Entfernung der Darmtumore in Stadium I und die Behandlung von Lungentumoren in frühen Stadien ermöglicht eine Heilung in bis zu 90 % der Fälle (Furuse et al 1993, Lee & Sutedja 2007, Markowitz et al 2002). Auch durch die Resektion bereits kleiner Dickdarm-Adenome wird die Lebenserwartung eines Patienten erhöht (Citarda et al 2001). Um diese Frühstadien der Tumore detektieren zu können, wird bei älteren und zu Risikogruppen gehörenden Patienten eine regelmäßige Untersuchung empfohlen. Zu Risikogruppen zählen Patienten mit vererbten Prädispositionen und für Lungenkrebs unter anderem Raucher und Personen, welche einer Radon- oder Asbestbelastung ausgesetzt waren (Drechsel-Schlund et al 2002, Pesch et al 1995).

2.2 Diagnoseverfahren

Bei Patienten aus Risikogruppen werden zunächst nichtinvasive Untersuchungsmethoden bevorzugt, die jedoch meist nur einen Hinweis auf eine mögliche Erkrankung liefern, ohne Informationen über Ort und Entwicklungsgrad des Tumors zu vermitteln. Bei Patienten mit Verdacht auf Darmkrebs wird zuerst der sogenannte *fecal occult blood test* (FOBT) empfohlen (Kronborg et al 1996, Mandel et al 1993). Dieses Verfahren beruht auf der

Detektion des Hämoglobins im Stuhl, welches aus blutenden Tumoren austritt (Greegor 1971, Mandel et al 2000). Die Spezifität dieser schnellen, einfach durchführbaren und kostengünstigen Methode liegt bei über 90 %. Allerdings sind Blutungen für viele Darmtumore und Adenome in Frühstadien eher untypisch. Dadurch sinkt die Sensitivität des Testes auf unter 25 % (Lieberman et al 2001). Der Übergang eines normalen Darmepithels in ein hochproliferatives Epithel ist zudem meist mit Gendefekten verbunden, die sich molekularbiologisch nachweisen lassen (Fearon & Vogelstein 1990). Für die Detektion von Adenomen kommt deshalb auch ein molekulares Screeningverfahren infrage, bei welchem die in den Stuhl-Proben enthaltenen Epithelzellen auf spezifische, tumorassoziierte Mutationen hin untersucht werden. Die Sensitivität dieser Methode liegt jedoch nur bei knapp über 60 % und ist zudem kostenintensiv (Traverso et al 2002). Bei einem positiven Testergebnis mit Hilfe dieser Voruntersuchungen wird zu einer klassischen Koloskopie geraten. Eine Koloskopie gilt als die sensitivste und spezifischste Untersuchungsmethode und stellt derzeit den „Goldstandard“ dar (Schrock 1993). Während dieser Untersuchung können sowohl blutende und nicht blutende Tumore als auch Adenome detektiert werden (Miller & Lehman 1978, Rex et al 1997b).

Bei Patienten mit Verdacht auf Lungenkrebs wird als erste nichtinvasive Untersuchungsmethode eine Thorax-Übersichtsaufnahme empfohlen (Wilde 1989), wobei hierbei sogar 3 Zentimeter große Karzinome übersehen werden können (Austin et al 1992). Einen im Vergleich dazu sensitiveren Nachweis von Lungentumoren bietet die Spiral-Computertomographie. Sie hat eine bessere Nachweisgrenze, kann jedoch kleinere Tumore auch nicht aufdecken (Gurney 1996, Kaneko et al 1996). Keine dieser beiden Methoden führt zu einer Mortalitätssenkung. Daher werden die oben genannten Methoden nicht zur Diagnose von Lungentumoren im Frühstadium empfohlen (Goeckenjan et al 2011). Hierfür können Tests auf Lungenkrebs-Serummarker wie Carcinoembryonales Antigen (CEA), Cytokeratinfragment 21-1 (CYFRA 21-1), Neuron-spezifische-Enolase (NSE) ohne großen Aufwand durchgeführt werden und weisen eine Spezifität von bis zu 95 % auf. Allerdings macht eine niedrige Sensitivität zwischen 15 und 53 % diese Verfahren unzuverlässig. Außerdem können Tumorlokalisierung und Tumorart auf diesem Wege nicht geklärt werden (Ferrigno et al 1994, Stieber et al 1993).

Ergänzend kann bei Patienten mit Tumor-Verdacht oder aus Risikogruppen eine Sputumzytologie durchgeführt werden. Anhand der gewonnenen Sputum-Proben können erste

Veränderungen an in Proben ausgeschwemmtem Epithelzellen detektiert werden, wobei das Ergebnis von der Qualität der Probe abhängt und die Sensitivität mit der Anzahl der Proben steigt (Goeckenjan et al 2011). Besonders die Lage und die Größe des Tumors spielen hierbei eine wichtige Rolle. Vor allem für zentrale Tumore ist diese Methode geeignet (Risse et al 1987). Allerdings steht der hohen Spezifität für Tumore von über 90 % eine geringe Sensitivität von nur knapp über 40 % gegenüber und macht die Sputumzytologie als Hauptuntersuchungsmethode ungeeignet (Agusti et al 2001, Goeckenjan et al 2011).

Bei Verdacht auf einen Lungentumor oder bei auffälligen nichtinvasiven Untersuchungsergebnissen wird in der Regel eine Bronchoskopie durchgeführt. Diese bietet eine sichere Diagnosestellung. Hierbei kann das Gewebe eingehend betrachtet und zeitgleich können Proben für Zytologie und Histologie entnommen werden (Kawaraya et al 2003, Laroche et al 2000). Gegenwärtig wird die Bronchoskopie als die wichtigste Methode zur Diagnosesicherung empfohlen. Mit steigender Zahl der Biopsien steigt die Trefferquote für Tumore (Goeckenjan et al 2011, Rubin et al 1992). Allerdings sind die Ergebnisse einer Endoskopie von Größe und Position der Tumore und der Erfahrung des durchführenden Arztes abhängig. Durch langjährige Trainings kann die Qualität der Endoskopie erhöht werden, wobei aber selbst erfahrene Endoskop-Anwender immer noch bis zu 15 % der Polypen kleiner 1 cm übersehen (Enns 2007, Hixson et al 1990, Rex et al 1997a). Zusätzlich führt die allgemein anerkannte Theorie der Tumorentstehung aus Polypen dazu, dass Ärzte während der Endoskopie vornehmlich nach Polypen und nicht nach flachen Veränderungen suchen. In einer prospektiven Studie mit 1000 Koloskopien konnte jedoch gezeigt werden, dass mindestens 36 % der Adenome in frühen Stadien flach und nicht polypoid waren (Rembacken et al 2000). Auch bei Bronchoskopien werden oft flache Veränderungen auf Schleimhautniveau wie Dysplasien, Karzinome *in situ* und frühe invasive Karzinome übersehen (Goeckenjan et al 2011). Dies macht die Grenzen der klassischen Weißlichtendoskopie deutlich. Zur Erkennung von diesen sogenannten *flat lesions* und sehr kleinen Tumoren kann die Endoskopie deshalb durch Fluoreszenz unterstützt werden. Dadurch erhält auch ein weniger erfahrener Endoskop-Anwender eine Unterstützung während der Untersuchung und kann Biopsien gezielter entnehmen. So zeigte Shibuya et al (2001), dass während der Fluoreszenzbronchoskopie im Vergleich zur klassischen Weißlichtbronchoskopie eine signifikant höhere Zahl an Tumoren detektierbar war.

2.3 Endoskopische Fluoreszenzdiagnostik

Die Fluoreszenzdiagnostik beruht auf dem Prinzip der Verwendung von unterschiedlichen Fluorophoren, welche Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und dies in Form einer langwelligeren Fluoreszenz wieder abgeben. Hierbei muss zwischen Fluorophoren des Gewebes (endogen, Autofluoreszenz) und von außen zugefügten Fluorophoren (exogen, Kontrastmittelfluoreszenz) unterschieden werden (Messmann et al 2002).

2.3.1 Autofluoreszenz zur Detektion der Tumore

Die Autofluoreszenz basiert auf der Anregung von im Gewebe enthaltenen endogenen Fluorophoren wie Tryptophan, Porphyrin, Flavin oder bestimmten Proteinen, wie Kollagen und Elastin. Zudem spielt die Verteilung des nicht fluoreszierenden Hämoglobins im Gewebe eine wichtige Rolle. Unter Lichteinfluss mit Wellenlängen aus dem blauen Spektrum erscheint das normale, gesunde Gewebe grün. Das im veränderten bzw. tumorösen Gewebe in höherer Konzentration vorhandene Hämoglobin absorbiert jedoch das Licht und verhindert damit die Gewebeeigenfluoreszenz, wodurch die Areale dunkler als das umliegende Gewebe erscheinen (Abbildung 1) (Chhajed et al 2005, Hung et al 1991, Marcon 1999).

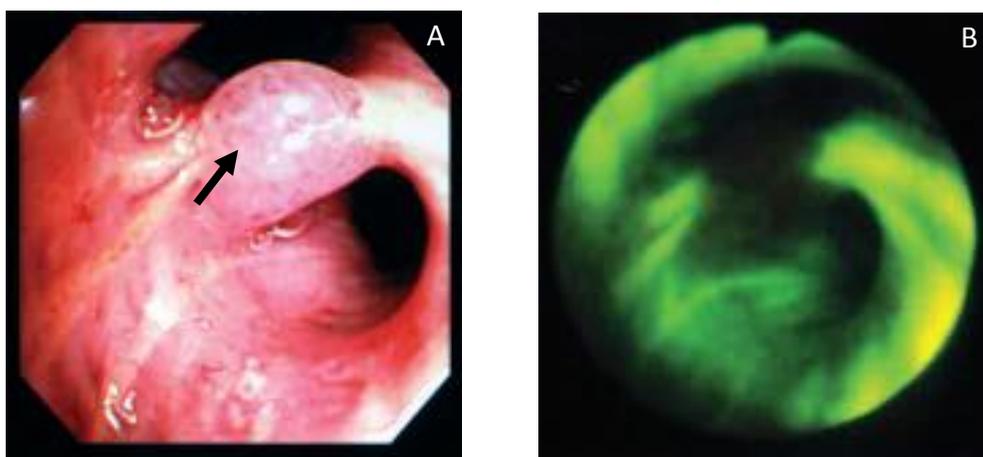


Abbildung 1: Bronchoskopie

Das Weißlichtbild (A) zeigt eine verdächtige Stelle (s. Pfeil). Im Autofluoreszenzmodus (B) erscheint diese Stelle dunkler als das umgebende Gewebe. Modifiziert nach Chhajed et al (2005).

Die Autofluoreszenz-basierte Bronchoskopie wurde als erste Fluoreszenz-unterstützte Methode zur Detektion der Frühstadien von Lungentumoren genutzt (Lam et al 1998).

Während der Autofluoreszenz-basierten Bronchoskopie können bis zu 40 % zusätzlich zu den im Weißlicht gefundenen Tumorherden detektiert werden (Lam et al 2000, Zaric et al 2009). Auch bei der Autofluoreszenz-basierten Endoskopie des Darmes konnte eine höhere Findungsrate der Tumore demonstriert werden (Haringsma et al 2001). Ein Nachteil der Autofluoreszenz-basierten Endoskopie ist jedoch die hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen, die beispielsweise durch eine starke Proliferation des Gewebes mit einhergehender erhöhter Durchblutung oder eine Entzündung wie z.B. eine Bronchitis hervorgerufen werden können (Lee & Sutedja 2007). Ebenso können vorausgegangene Biopsien und Therapien (Radiotherapie, Photodynamische Therapie) durch Beeinträchtigung des Gewebes die Zahl der falsch-positiven Interpretationen beeinflussen (Borisova et al 2011). Die Autofluoreszenz-basierte Bronchoskopie ist daher nicht als eigenständige Untersuchungsmethode geeignet (Haussinger et al 2005). Da die Nachteile der Tumordetektion mittels Autofluoreszenz nicht zu missachten sind, ist eine gezielte Markierung der Tumore mittels von außen (exogen) verabreichter Fluorophore, d.h. mit Hilfe fluoreszierender Kontrastmittel, sinnvoll. So kann die Qualität durch die sogenannte „Molekulare Bildgebung“ deutlich verbessert werden. Im Vergleich zur Autofluoreszenz kann die Kontrastmittel-induzierte Fluoreszenz gezielt an die diagnostischen Anforderungen angepasst werden (Goetz & Wang 2010, Weissleder & Mahmood 2001).

2.3.2 Exogene Fluoreszenzmittel für die Fluoreszenzendoskopie

Photosensibilisatoren wie Photosan, 5-Aminolevulinsäure (5-ALA) und seine Derivate sowie Radachlorin werden für die photodynamische Diagnostik (PDD) unterschiedlicher Tumorerkrankungen verwendet. Zudem können sie gleichzeitig für die photodynamische Therapie (PDT) genutzt werden. Diese Substanzen akkumulieren in Tumorgewebe deutlich stärker als in gesundem Gewebe. Dadurch ist bei Verwendung dieser Kontrastmittel eine stärkere Fluoreszenz im Tumorgewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe zu beobachten. (Bäumler et al 2003, Douillard et al 2009, Maier et al 2002, Orth et al 1994, Wilson 2002). 5-ALA und seine Derivate sind mittlerweile gut erforscht und werden erfolgreich zur endoskopischen PDD und PDT eingesetzt. Unter Verwendung von 5-ALA im Bereich der Diagnostik von Blasen Tumoren wurden fluoreszenzendoskopisch 18 bis 76 % mehr Tumore als weißlichtendoskopisch detektiert (Jichlinski et al 1997, König et al 1999). In einer

klinischen Studie mit dem Hexylester-Derivat von 5-ALA wurden im Darm über 38 % Neoplasien mehr als im Weißlicht detektiert und damit der Vorteil der Fluoreszenz gegenüber der Weißlichtendoskopie insbesondere bei *flat lesions* gezeigt (Mayinger et al 2010). Bei sieben Patienten mit positivem oder verdächtigem zytologischen Befund und negativen Ergebnissen bei der Weißlichtbronchoskopie wurden nach Inhalation von 5-ALA-Lösung mehrere Tumore während der Fluoreszenzbronchoskopie detektiert (Baumgartner et al 1996). Die Autoren berichteten von einer hohen Sensitivität für 5-ALA und dessen Derivate. Allerdings macht die von verschiedenen Faktoren abhängige niedrige Spezifität von 50 % eine 5-ALA-basierte Fluoreszenzdiagnostik nicht ausreichend zuverlässig.

Radachlorin (auch Bremachlorin) gehört zu den neuen Photosensibilisatoren der zweiten Generation und besteht zu 90 % aus dem gut erforschten Photosensibilisator Chlorin e6. Das darin enthaltene Purpurin 5 trägt zur vermehrten Anreicherung in Tumorzellen im Vergleich zu gesundem Gewebe bei (Uzdensky et al 2004). Ein Fluoreszenzverhältnis von 2:1 zwischen Tumor- und gesundem Gewebe wurde in einem Lungen-Tumormodell gefunden. Radachlorin zeichnet sich durch einen schnellen Abbau, schnelle Ausscheidung aus dem Körper und niedrige Phototoxizität in der Haut aus (Douillard et al 2009). In klinischen Studien wurde Radachlorin bei Hauttumoren erfolgreich für PDD und PDT eingesetzt. Dabei konnten unter Verwendung der Radachlorin-Fluoreszenz über 28 % zusätzliche Tumorareale zu den bereits klinisch identifizierten detektiert werden. Es wurde von einer 100 %igen Spezifität und Sensitivität des Radachlorins bei Hauttumoren berichtet. In diesen Fällen wurde ein Fluoreszenzkontrast von 3:1 bis 6:1 zwischen Tumor- und gesundem Gewebe beschrieben (Vakulovskaya et al 2004).

Weitere im Versuchsstadium befindende Kontrastmittel für die „Molekulare Bildgebung“, sind unter anderem Nanopartikel, Quantum dots, Antikörper und Peptide, welche gezielt als Biosonden komplementär zu den Biomarkern der jeweiligen Krankheit eingesetzt werden (Pierce et al 2008). Metall-Nanopartikel und Quantum dots werden hierbei mit geeigneten Fluorophoren und Liganden entsprechend dem Biomarker für die Zielstruktur gekoppelt. Mit Nanopartikeln wurden bereits erfolgreiche Untersuchungen in Zellkultur- und Tierexperimenten durchgeführt. So konnte Barret et al (2007) Nanopartikel zur Positron Emission Tomography (PET)-basierten Detektion von subkutan wachsenden Neuro2A Tumoren einsetzen. Da für diese Materialien bisher keine ausreichenden Daten über potentielle Toxizität bzw. metabolische (Un-) Bedenklichkeit vorliegen, stehen eine breite

Anwendung sowie umfassende klinische Humanstudien noch aus (Goetz & Wang 2010, Lewinski et al 2008).

Eine weitere Möglichkeit die Tumore zu visualisieren, wäre die Anwendung von durch Tumor-Proteasen aktivierbaren Substraten (Marten et al 2002). Funovics et al (2006) konnte mit derartigen Kontrastmitteln in seinem Darm-Tumormodell die Tumore fluoreszenz-endoskopisch detektieren. Das aktivierbare Kontrastmittel Catepsin B wurde von Alencar et al (2007) zur fluoreszenzendoskopischen Detektion implantierter Tumore im Darm verwendet. Allerdings sind diese Substrate auch durch andere Proteasen aktivierbar und daher nicht Tumor-Protease-spezifisch, was deren Nutzung limitiert (Yang et al 2009b).

Als tumorspezifische Sonden können auch Antikörper gegen auf dem Tumor überexprimierte Epitope verwendet werden. In *in vivo* Studien mit entsprechenden Tumormodellen und *ex vivo* Experimenten wurden verschiedene Antikörper gegen CEA, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) und weitere Antigene umfassend untersucht und lieferten erfolgsversprechende Ergebnisse (Barrett et al 2007, Hsu et al 2006, Ito et al 2001). Eine mögliche allergische Reaktion auf den Antikörper nach systemischer Verabreichung, sowie die zu hohe molekulare Masse schränken allerdings die breite Nutzung der Antikörper ein (Aina et al 2007, Pierce et al 2008).

Eine vielversprechende Alternative zu den oben genannten Tumorsonden auf Antikörperbasis bilden die aus nur wenigen Aminosäuren bestehenden Peptide. Aufgrund der kleinen Größe haben sie weniger Probleme mit dem Überwinden von epithelialen Grenzen und dem Erreichen von Zielstrukturen als Antikörper (Goetz et al 2010), und sind dennoch in der Zielerkennung hochspezifisch. Peptid-basierte Kontrastmittel weisen zudem eine niedrige Toxizität und geringe Immunogenität auf. Des Weiteren sind sie unkompliziert in der Herstellung und einfach veränderbar (Scott & Smith 1990). So kann die Peptid-Sequenz beispielsweise mit Hilfe eines genetischen Algorithmus modifiziert und auf die gewünschten Kriterien wie Spezifität der Bindung aber auch Zellpenetration und minimale Toxizität optimiert werden (Röckendorf et al 2012). Eine hohe Sensitivität bis zu 81 % und eine Spezifität von 78 % konnte unter Verwendung eines Septapeptids in einer klinischen Studie über Darmtumore erreicht werden (Hsiung et al 2008). In der Studie von Kelly et al (2004) wurde in einem Darm-Tumormodell entartetes Gewebe mittels fluoreszenz-markierter Peptide endoskopisch nachgewiesen. Speziell die Visualisierung der frühen

Tumore-Stadien über Fluoreszenzendoskopie ist wesentlich durch die Verwendung von Peptid-basierten Kontrastmitteln verbessert (Kelly et al 2004).

Damit macht die bisherige Datenlage deutlich, dass optische Kontrastmittel ein großes Potential für eine gezielte Visualisierung maligner Gewebeareale haben. Bisher mangelt es jedoch an geeigneten Modellen und Verfahren, um diese optischen Kontrastmittel optimal weiterentwickeln und validieren zu können.

2.4 Tiermodelle für die Krebsforschung

Um die Früherkennung von Tumoren zu verbessern und weiter zu entwickeln, ist die Etablierung klinisch-relevanter Tiermodelle notwendig. Von den ersten Tumormodellen wurde bereits im Jahre 1960 berichtet (Teicher 2006). Aktuell werden viele unterschiedliche Tiermodelle in der Krebsforschung genutzt. Je nach Fragestellung gibt es verschiedene Möglichkeiten ein angepasstes Modell zu etablieren. Grundsätzlich wird zwischen spontanen, chemisch induzierten, Transgenen- und Transplantationsmodellen unterschieden (Heijstek et al 2005).

Eine spontane Tumorbildung in unterschiedlichen Organen wird bei Tieren in fortgeschrittenem Alter beobachtet. Die Wartezeit für die Tumorentstehung kann in diesem Fall bis zu 34 Wochen betragen. Art und Anzahl der Tumore sind vom Tierstamm, Geschlecht und Alter der Tiere abhängig. Mit zunehmendem Alter wächst auch die Zahl der altersbedingten Krankheiten (Anisimov et al 2001). Die Unvorhersehbarkeit des Krankheitsverlaufs bei dieser Art von Modellen erschwert die Versuchsplanung oder macht diese sogar unmöglich (Heijstek et al 2005).

Bei den chemisch-induzierten Modellen wird die Tumorentstehung mittels karzinogener Substanzen erreicht. Je nach Tumorart werden unterschiedliche Substanzen in verschiedenen Konzentrationen und auf verschiedenen Applikationsrouten eingesetzt. So wurde beispielsweise die intraperitoneale Applikation des Karzinogens Azoxymethan mit nachfolgender Gabe von Dextrannatriumsulfat (DSS) in Getränkeform zur Erzeugung von Darmtumoren bei Nagern angewandt (Tanaka et al 2003).

Eine chemische Induktion von Lungentumoren wurde durch submukosale oder intraperitoneale Injektionen von karzinogenen Substanzen oder durch intrabronchiale

Instillation von Kapseln erreicht. Benfield et al (2009b) konnten mittels submukosaler Injektion von Reagentien wie Nitrosomethylharnstoff und Dimethylbenzanthracen in die Lunge erfolgreich die Entstehung von intratrachealen Tumoren bei Hunden hervorrufen. Je nach Substanz und Tierart können Tumore induziert werden, die histopathologisch nicht von einem humanen Tumor unterscheidbar sind, allerdings entstehen auch oft Zelltypen die keine Projektion auf humane Lungentumore erlauben (Liu & Johnston 2002). Während einerseits viele ausgetestete Chemikalien eine sichere Reproduzierbarkeit im Versuch bieten (Malkinson 1989), machen andererseits lange Wartezeiten und die seltene Metastasenbildung das Modell der chemischen Tumorinduktion für viele Fragestellungen ungeeignet.

Transgene Tumormodelle werden durch das Einbringen von Fremd-DNA in das Genom der Tiere mittels Mikroinjektion in Eizellen oder retrovirale Infektion der Embryonen hergestellt (Brinster et al 1985, Jaenisch 1980). Anhand dieser Modelle kann die Expression von Onkogenen und das Wachstumsverhalten des Tumors studiert werden. Außerdem können sie in therapeutischen Studien eingesetzt werden (Adams & Cory 1991, Liu & Johnston 2002). Allerdings bedeutet eine rasche Entwicklung der Tumore gleich nach der Geburt der Tiere oft einen schnellen Tod und grenzt damit den Nutzen des Modells ein (Zhao et al 2000). Auch *knock-out* Modelle, bei denen Gene ausgeschaltet werden, zeichnen sich durch eine schnelle Tumorentwicklung aus. Auch hier ist ein Auftreten von unerwünschten Tumoren und ein nachfolgender Tod des Tieres noch bevor der Zieltumor beobachtet werden kann möglich, was den Nutzen des Modells sehr einschränkt (Macleod & Jacks 1999).

Eine verbreitete Anwendung in der Krebsforschung haben Transplantationsmodelle gefunden, die durch die Transplantation von Zellen oder Gewebestücken hergestellt werden. In diesem Fall lässt sich zum einen der Zeitpunkt der Tumorentstehung bestimmen und zum anderen sind Tumortyp und Tumorlokalisation präzise festlegbar. Bei diesen Tumormodellen wird allgemein zwischen xenogenen, syngen, ektopen und orthotopen Modellen unterschieden.

A) syngen - Spender- und Empfängerorganismen gehören zur gleichen Spezies. In diesem Fall ist keine Immundefizienz der Tiere erforderlich, allerdings enthält der sich entwickelnde Tumor keine humanen Zellen/Anteile und eine direkte Übertagung der Ergebnisse auf

humane Tumore ist so schwer möglich. Um der Situation bei humanen Tumoren auch im Tiermodell näher zu kommen, wurden deshalb xenogene Modelle entwickelt.

B) xenogen – Spender- und Empfängerorganismen gehören zu unterschiedlichen Spezies. In diesem Fall müssen humane Tumorzelllinien einem immundefizienten Nagetier verabreicht werden, um das Abstoßen des neuwachsenden Tumors zu verhindern. Dadurch lassen sich „humane Tumore“ nachahmen.

Zusätzlich können, unabhängig vom Organismus, die Implantationsmodelle je nach Ort der Isolierung der Zellen / des Gewebefragmentes und der Implantation variieren. Man unterscheidet hier zwischen ektop und orthotop.

C) ektop – Spender- und Empfängerorgane sind unterschiedlich. Hierbei können beispielsweise Darm- oder Lungen-Tumorzellen subkutan injiziert werden. Die subkutane Implantationsmethode ist einfach durchzuführen. Der Verlauf der Tumorentwicklung ist gut planbar und detektierbar, wodurch entsprechende Modelle eine verbreitete Anwendung in der Krebsforschung finden (Kelland 2004). Allerdings sind die Tumorzellen und die sich daraus entwickelnden Tumore in einem fremden Gewebe lokalisiert. In Abhängigkeit vom Implantationsort der Tumorzellen wurden Unterschiede bei der Tumorentwicklung und Metastasenbildung in verschiedenen Organen gezeigt. Außerdem wurde auch eine veränderte Reaktion der subkutanen Tumore auf Chemotherapeutika und eine Abhängigkeit ihrer Sensitivität vom Transplantationsort demonstriert (Kerbel 1998, Takimoto 2001, Wilmanns et al 1992). Ein optimales Tumormodell welches die Situation der humanen Tumore möglichst gut abbildet, sollte daher den implantierten Zellen die Möglichkeit bieten, in der Umgebung, d.h. in dem Organ, zu wachsen, aus dem sie stammen. Dies lässt sich durch eine orthotope Implantation erreichen (Manzotti et al 1993).

D) orthotop – Spender und Empfängerorgane sind gleich. Die Tumorzellen werden hierbei in die entsprechenden Organe des Empfängertieres implantiert. In der Krebsforschung finden überwiegend die orthotopen, xenograften Tumormodelle Anwendung. Die Entwicklung des Tumors sowie dessen Chemosensitivität werden durch die organspezifischen Mechanismen beeinflusst (Fidler et al 1994). In vielen Studien konnte bestätigt werden, dass ein orthotopes Tumormodell einen humanen Tumor von allen bis jetzt bekannten Modellen am besten widerspiegelt. Sowohl die Morphologie als auch Metastasenbildung und

Chemosensitivität entsprechen am ehesten dem originalen humanen Tumor (Hoffman 1999, March et al 2001).

Allerdings ist die Einbringung der Zellen aufwändiger als bei der subkutanen Implantation und erfordert mehr Geschick und Erfahrung in den Operationsmethoden. Je nach Zielorgan müssen optimale Implantationsmethoden ausgearbeitet werden. Zur Etablierung von Lungen- und Darm-Tumormodellen wurde beispielsweise die Injektion der Tumorzellen in die entsprechenden Organe Lunge, Darm oder Blinddarm beschrieben (Mordant et al 2011, Zigmond et al 2011). Zudem können die Zellen auch in die Organe eingespült werden. Um das Anwachsen der Zellen zu optimieren, wird die Vorbehandlung der Schleimhäute mit Trypsin, Elastase, EDTA, Salzsäure und anderen Reagenzien empfohlen. Auch die Induktion von Kolitis oder eine mechanische Zerstörung der Schleimhäute kann die Entwicklung eines Tumors nach der Zellimplantation in den Darm begünstigen (Alencar et al 2005, Bhullar et al 2011, March et al 2001).

Aufgrund des organspezifischen Wachstums ist die Detektion orthotoper Tumore im Tier wesentlich schwieriger als im subkutanen Modell. Eine elegante Lösung für dieses Problem wäre die zur Transplantation vorgesehenen Tumorzellen vorher zu markieren. Eine Möglichkeit ist z.B. die Tumorzellen mit Luciferin zu transfizieren und die sich entwickelnden Tumore *in vivo* mit einem nichtinvasiven „Ganzkörper Imager“ zu detektieren (Mordant et al 2011). Allerdings ist das Luciferase-basierte Fluoreszenzsignal eher schwach und instabil (Hoffman 2005, Ray et al 2004). Eine andere Möglichkeit ist die stabile Transfektion mit einem Gen für ein Fluoreszenzprotein. Das in den Zellen nachfolgend produzierte Fluoreszenzprotein dient als Reporter und macht es möglich, die im Gewebe wachsenden humanen Tumore fluoreszenzoptisch zu detektieren und vom umliegenden Gewebe in histologischen Schnitten fluoreszenzmikroskopisch zu unterscheiden (Alencar et al 2005). So konnte Yang et al (2009a) mit Hilfe von Fluoreszenzproteinen in den Zellen die Tumorentwicklung vor und nach der Behandlung mit Medikamenten mit einem „Laser Scanning Microscope“ *in vivo* studieren. Auch Zigmond et al (2011) konnte erfolgreich nach der Implantation von stabil transfizierten Tumorzellen in den Darm einer Maus die Fluoreszenz der Tumore sowohl mikroskopisch in histologischen Schnitten als auch *in vivo* fluoreszenzstereomikroskopisch detektieren.

2.5 Fluoreszenzproteine

Nachdem bereits in den 60er Jahren das Grüne Fluoreszenzprotein (GFP) aus *Aequorea victoria* isoliert und in den 90er Jahren das erste Mal erfolgreich kloniert wurde (Prasher et al 1992, Shimomura & Johnson 1969), hielt es Einzug in eine Vielzahl von wissenschaftlichen Bereichen. Seitdem findet GFP und seine Farbmутanten auch in der Krebsforschung eine breite Anwendung. Über die gentechnisch in Tumorzellen eingebrachten Fluoreszenzproteine kann zum Beispiel die Entwicklung eines Tumors und seine Angiogenese beobachtet werden. Zudem ist es auch möglich pharmakologische Studien während der Tumorentwicklung durchzuführen und zu bewerten (Hoffman 2002). Nach der Transfektion der Tumorzellen mit dem GFP-Gen und Implantation in Versuchstiere wurden unter anderem Lungen-, Darm-, Prostata- und Brust-Tumormodelle erfolgreich hergestellt (Chishima et al 1997, Peyruchaud et al 2001, Yang et al 2000, Yang et al 1999). Auch konnte sowohl die Metastasenentwicklung in einem subkutanen Lungen-Tumormodell als auch die Entwicklung eines Tumors im orthotopen Lungen-Tumormodell visualisiert und beobachtet werden (Chishima et al 1997, Hastings et al 2001). Ferner wurde gezeigt, dass die Transfektion der Zellen den Entwicklungsprozess des Tumors nicht beeinflusst (Chishima et al 1997). Unter Verwendung stabil-transfizierter, humaner Tumorzellen ist auch die Etablierung eines orthotopen Darm-Tumormodells gelungen, an dem die Entwicklung der Tumore und der Metastasen mittels Fluoreszenz detektiert und verfolgt wurden (Yang et al 2000).

Eine große Vielfalt an Proteinen isoliert aus verschiedenen Organismen steht heute der Forschung für das *Live Cell Imaging* zu Verfügung. Je nach Fragestellung kann ein dafür optimales Protein ausgesucht verwendet werden (Sample et al 2009, Shaner et al 2005). Eine Reihe an Faktoren müssen jedoch bei der Wahl des Proteins beachtet werden. Alle Fluoreszenzproteine unterscheiden sich unter anderem in ihrem Anregungs- und Emissionsspektrum, ihrer Photostabilität, Toxizität für die Zelle und ihrer Helligkeit.

Für die Visualisierung des Fluoreszenzproteins vor dem Hintergrund von Gewebe (Autofluoreszenz) liegt das optimale sogenannte „Optische Fenster“ zwischen 650 und 1100 nm (König 2000). Aus diesem Grund ist ein rotes Fluoreszenzprotein (RFP) optimal für die Visualisierung im Körper. Zudem ermöglicht die Anregung eines Fluoreszenzproteins im roten Bereich, also mit langwelligem Licht, ein tieferes Eindringen des Lichtes in das Gewebe

(Shcherbo et al 2009). DsRed isoliert aus *Discosoma striata* war das erste klonierte rote Fluoreszenzprotein (Sample et al 2009). Mit dem Gen für das DsRed-Fluoreszenzprotein stabil-transfizierte Tumorzellen wurden erfolgreich zur Detektion der Tumorentwicklung im GFP-transgenen Maus-Darmmodell eingesetzt (Alencar et al 2005). Allerdings erfordert die fluoreszierende Form des Proteins eine tetramere Struktur, was zu einer drastischen Vergrößerung der molekularen Masse und zur Aggregation der Proteine in der Zelle führen kann und die Fluoreszenz dadurch negativ beeinflusst. Dazu ein langsames und zum Teil unvollständiges Reifen des Proteins in den Zellen findet keine große Akzeptanz in der Forschung (Campbell et al 2002). Mittels Mutationen im DsRed Protein wurden unter anderem die Monomere mCherry, mRaspberry, mPlum hergestellt, die sich durch bessere Eigenschaften im Vergleich zu dem Ursprungprotein auszeichnen. Allerdings weisen diese Monomere eine geringere Quantenausbeute auf, welche sich in einer relativ niedrigen Helligkeit des Proteins widerspiegelt (Yang et al 2009a).

Unter den verschiedenen Mutanten des aus der Seeanemone *Entacmaea quadricolor* isolierten Fluoreszenzproteins eqFP578 befindet sich ein rotes Fluoreszenzprotein namens Katushka, auch TurboFP635 genannt. Dieses ist eine dimere Mutante mit einem Absorptionsmaximum bei 588 nm und einem Emissionsmaximum bei 635 nm. Katushka zeichnet sich durch eine hohe pH-Stabilität, Photostabilität, einen schnellen Reifeprozess in der Zelle und eine außerordentliche Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den anderen roten Fluoreszenzproteinen aus. Im optischen Fenster 650 bis 800 nm ist Katushka wesentlich heller als alle anderen bekannten roten oder tief-roten Proteinfluorophore. Im Vergleich zu mPlum weist Katushka dank hoher Quantenausbeute eine zehnfach höhere Helligkeit auf. Beim *in vivo* Einsatz des Katushka-Proteins im Froschembryo konnte eine starke Fluoreszenz auch in tieferen Gewebsschichten detektiert werden. Trotz der dimeren Struktur des gereiften Proteins wurden in transfizierten HeLa-Zellen keine sichtbaren Aggregate oder Zellschädigungen beobachtet. All diese „positiven“ Eigenschaften des Fluoreszenzproteins Katushka machen es zu einem der optimalsten Kandidaten für Visualisierungsprozesse im Körper (Shcherbo et al 2009) sowie zur stabilen Markierung von Tumorzellen, welche nachfolgend zur Etablierung eines orthotopen Tumormodells genutzt werden sollen.

Wie in Abschnitten 2.3 bis 2.5 dargelegt, wurden bisher entweder gentechnisch eingebrachte Fluoreszenzproteine oder exogen verabreichte fluoreszente Kontrastmittel zur Visualisierung der Tumore in Tiermodellen verwendet. Nach unserem Wissen wurde jedoch

noch nie eine Kombination beider Visualisierungsmethoden (intrinsische und extrinsische Fluoreszenz) im orthotopen Tumormodell in einer parallelen endoskopischen Detektion umgesetzt. Dieses sollte in Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals erreicht werden.

Unsere Hypothese ist, dass durch die intrinsische Fluoreszenz von orthotop eingebrachten Tumoren in einem Tumormodell ein geeignetes Werkzeug für die Validierung von Kontrastmitteln bereitgestellt werden kann.

2.6 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Qualitätsunterschiede bezüglich Tumordetektion mit einem herkömmlichen Weißlichtendoskop und einem neuartigem Mehrkanal-Fluoreszenzendoskop in Verbindung mit Kontrastmitteln zu evaluieren.

Um die endoskopischen Untersuchungen durchführen zu können, war es notwendig orthotope Tumor-Modelle zu etablieren. Hierzu sollten Darm- bzw. Lungen-Tumormodelle der Ratte durch die Implantation von organspezifischen, fluoreszenten humanen Tumorzelllinien hergestellt werden. Diese Modelle sollten dann zur Validierung der Fluoreszenzendoskopie genutzt werden. Zudem sollten experimentelle Kontrastmittel - Radachlorin und tumorspezifische Peptide - auf ihre Tumor-Spezifität und Sensitivität getestet werden. Der generelle Versuchsaufbau ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Anhand der Ergebnisse sollte beurteilt werden, welche Sensitivität der fluoreszenzendoskopische Nachweis von Tumorzellen prinzipiell erreichen kann (Bestimmung der Nachweisgrenze des Fluoreszenzendoskops) und welchen Vorteil die Fluoreszenzendoskopie mit einem Mehrkanalsystem unter Verwendung von Kontrastmitteln dem endoskopierenden Arzt im Vergleich zu einer Weißlichtendoskopie bietet.

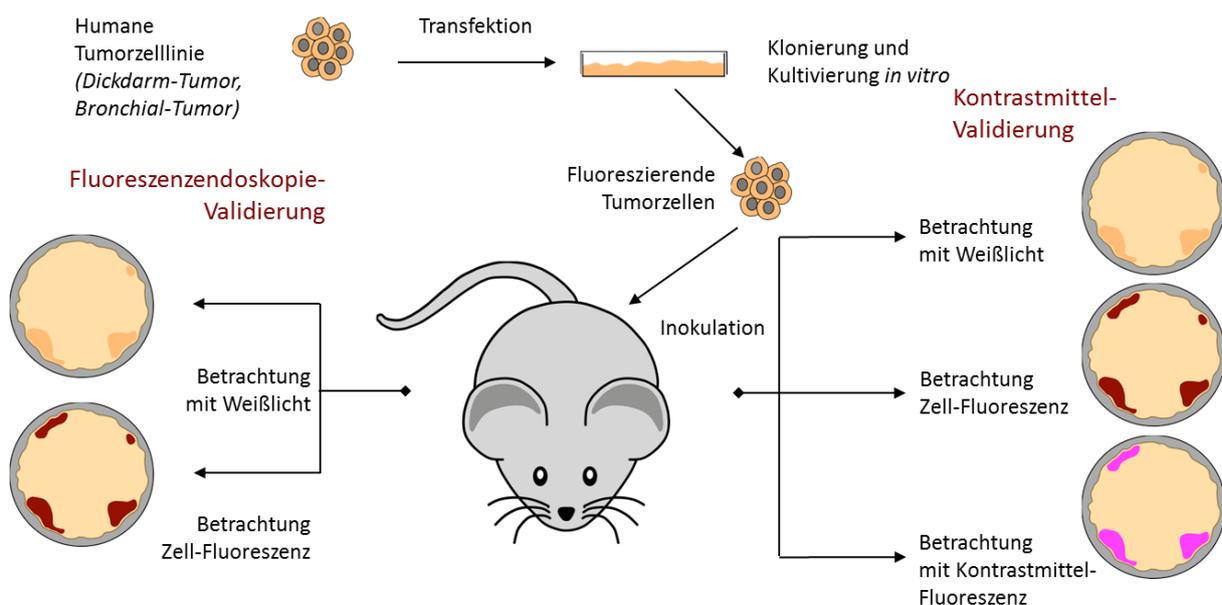


Abbildung 2: Orthotopes Tumormodell

3 Materialien

3.1 Verwendete Organismen

3.1.1 Tierstamm

Bezeichnung

RNU-Ratte – Immundefiziente Ratte (weiblich)

Vertrieb

Charles River (Sulzfeld)

3.1.2 Zelllinien

Bezeichnung

LS-174T – Humanes Kolon Adenokarzinom

LS-174TFP635 – Humanes Kolon Adenokarzinom

SK-MES1 - Humanes Lungenkarzinom

SK-MES1FP635 - Humanes Lungenkarzinom

SW480 – Humanes Kolon Adenokarzinom

SW480FP635 – Humanes Kolon Adenokarzinom

Vertrieb

CLS (Eppelheim)

transfiziert von Marinpharm
(Lückenwalde)

CLS

transfiziert von Marinpharm

CLS

transfiziert von Marinpharm

3.2 Spezielle Geräte

Bezeichnung

Anästhesieanlage

BioPhotometer

Electrophoresis Power Supply E835

Elektrophoresekammer E-H1

GelDoc

Fluoreszenzendoskop

Fluoreszenzmikroskop MORE

Fluoreszenzmikroskop Olympus IX-81

Kaltlicht-Generator

LSR II

Vertrieb

Groppler Medizintechnik
(Deggendorf)

Eppendorf (Hamburg)

Consort (Turnhout, Belgium)

Febikon (Wermelskirchen)

Bio-Rad Laboratories (Milan, Italy)

Karl Storz GmbH (Tuttlingen)

Till Photonics (Gräfelfing)

Olympus (Hamburg)

Hengtech (Viernheim)

BD Biosciences (Heidelberg)

Mikroskop DMIL	Leica (Wetzlar)
Optisches Energiemessgerät	Thorlabs (Dachau)
Transmissionselektronenmikroskop EM910	Zeiss (Oberkochen)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf

3.3 Spezielle Materialien

Bezeichnung

Cryo Einbettförmchen
 6-Kavität Platte
 12-Kavität Platte
 24-Kavität Platte
 96-Kavität Platte
 8-Kavität Zellkulturkammer
 LümoX Dish 50

Vertrieb

Polysciences (Warrington, USA)
 Nunclon (Roskilde, Denmark)
 Nunclon
 Nunclon
 Nunclon
 Sarstedt (Nümbrecht)
 Sarstedt

3.4 Verwendete Chemikalien und Medikamente

Bezeichnung

Agarose NEEO-Ultra Qualität
 Aprotinin
 Bepanthen
 DNA-Kit (innu PREP DNA Mini Kit)
 DNA Away
 DreamTagDNA-Polymerase
 d-NTP
 Gentamicin
 Ketamin
 Lysine
 Matrigel
 Metacam
 Natriumazid

Vertrieb

Carl Roth (Karlsruhe)
 AppliChem (Darmstadt)
 Bayer (Leverkusen)
 Analytic Jena (Jena)
 Sigma – Aldrich Chemie
 (Schnelldorf)
 Fermentas (St. Leon-Rot)
 Fermentas
 AniMedica (Senden-Bösensell)
 Bela-Pharm (Vechta)
 MERCK (Darmstadt)
 BD Biosciences (Heidelberg)
 Boehringer (Ingelheim)
 Sigma - Aldrich Chemie

Natriummetaperiodat	Sigma - Aldrich Chemie
PFA 16 %	Electron Microscopy Sciences (München)
Primer	MWG (Ebersberg)
Radachlorin	Rada-Pharma (Moskau, Russland)
Sevofluran	Albrecht GmbH (Aulendorf)
Synergel	Carl Roth
TissueTec	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen)
Thymidin	Sigma – Aldrich Chemie
Trypanblau	Invitrogen (Darmstadt)
Xylazin (Handelsname Rompun)	Bayer Vital (Leverkusen)

3.5 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Bezeichnung

Dimethylsulfoxid (DMSO)
 DMEM:Ham's F12 Medium (1:1)
 Dulbecco's PBS (1X) mit Ca & Mg
 Dulbecco's PBS (1X) ohne Ca & Mg
 Fötales Kälberserum (FCS)
 L-Glutamin
 MEM in Earles BSS
 Nichtessentielle Aminosäuren
 Penicillin/Streptomycin
 Natriumpyruvat

Vertrieb

Sigma – Aldrich Chemie
 PAA Laboratories (Pasching)
 PAA Laboratories
 PAA Laboratories
 Allgaeu BioTech (Görisried)
 PAA Laboratories
 PAA Laboratories
 PAA Laboratories
 PAA Laboratories
 PAA Laboratories

3.6 Häufig verwendete Puffer

0,1 M Tris Puffer pH 7,4	12,1 g Tris Base
	81,5 ml 1N HCl
	900 ml <i>A. bidest.</i>
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3	23 ml Lösung A
	77 ml Lösung B
	<u>Lösung A</u>
	13,9 g NaH ₂ PO ₄
	Auf 1000 ml mit <i>A. bidest.</i> auffüllen.
	<u>Lösung B</u>
	26,825 g NaHPO ₄ X7H ₂ O
	Auf 1000 ml mit <i>A. bidest.</i> auffüllen.

3.7 Software

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
EndNote 5	Thomson ResearchSoft (Carlsbad, CA, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
FlowJo 7.6.4	Tree Star (Ashland, OR, USA)
ImageJ 1.46a	NIH (Bethesda, MD, USA)

4 Methoden

4.1 Allgemeines zur Verwendung der Endoskope

Im Rahmen des Projektes wurde zunächst ein Endoskopsystem mit konventioneller Xenon-Lichtquelle, in späteren Versuchen ein auf schnell schaltbaren Laserdioden basierendes System der Firma KARL STORZ eingesetzt. Während das Xenon-basierte System ein manuelles Schalten von Weißlicht in den Fluoreszenz-Beobachtungsmodus erlaubte, war mit dem Laserdioden-basierten System eine parallele Erfassung eines Weißlichtbildes und zusätzlich zweier Fluoreszenzbilder möglich.

Zur Kleintierendoskopie wurde entweder ein Endoskop mit geordnetem Faserbündel ($d=1,2$ mm) oder ein Stablinsenendoskop ($d=2$ mm) verwendet. Für die Bronchoskopie lag auf Grund der Größe der Trachea der maximal verwendbare Durchmesser bei unter 2 mm, so dass hier nur das Bildleiter-basierte Endoskop (Faserbündel) verwendet werden konnte. Bei der Koloskopie und den *in vitro* Versuchen wurde das Stablinsenendoskop mit dem Durchmesser von 2 mm verwendet, womit auch eine bessere Bildqualität erreicht werden konnte.

4.2 Weißlicht- und Fluoreszenzendoskopie mit Xenon-Lichtquelle

Bei der Verwendung einer Xenon-Lichtquelle wird für die Fluoreszenzendoskopie in die Lichtquelle ein optischer Sperrfilter eingeschwenkt. Dieser Filter transmittiert Licht in einem bestimmten, auf das Anregungsspektrum der vorgesehenen Fluorophore angepassten Wellenlängenbereich. Ein komplementärer Filter wird manuell vor der Endoskopkamera mittels eines Halters eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei auf einem Filterrad in der Xenon-Lichtquelle montierte Anregungsfilter verwendet. Der erste Filter stellt Licht im Wellenlängenbereich von 506 - 594 nm zur Anregung des TurboFP635-Fluoreszenzproteins der transfizierten Zellen zur Verfügung. Ein zweiter Filter liefert Licht im Bereich von ca. 380 - 431 nm zur Anregung der Kontrastmittel. Die dazu komplementären Beobachtungsfiler transmittieren entsprechend > 620 nm für den ersten Filter (intrinsische Fluoreszenz der Zellen) bzw. > 450 nm für den zweiten Filter (Fluoreszenz des Kontrastmittels). Die Verwendung des Weißlichtmodus sowie der jeweiligen Anregungs- und Detektionsfilter ist nur getrennt voneinander möglich. Dafür wird jeweils ein Umschalten der

Lichtquelle sowie der manuelle Ein- bzw. Ausbau des Beobachtungsfilters vor der Kamera erforderlich.

4.3 Mehrkanal-Endoskopsystem

Unter Verwendung des neuartigen Mehrkanal-Endoskopsystems mit synchroner Beleuchtung und Bildaufnahme kann die Fluoreszenz unterschiedlicher Wellenlängen in getrennten Kanälen quasi-simultan beobachtet werden. Die elektronische Nacheinanderschaltung der für drei Beleuchtungsmodi vorgesehenen Laser ermöglicht eine parallele Betrachtung eines Weißlichtbildes in einem Kanal, die Fluoreszenz der implantierten Zellen in einem zweitem und die Fluoreszenz der Kontrastmittel in einem dritten Kanal.

Für das Weißlicht werden gleichzeitig ein blauer (450 nm), roter (635 nm) und grüner (532 nm) Laser geschaltet. Das Verhältnis der Laser und die Gesamtintensität können manuell reguliert werden. Zur Anregung des Fluoreszenzproteins der transfizierten Zellen und der Fluoreszenz der Kontrastmittel werden zwei Laser mit Wellenlängen von 589 nm und 405 nm Kamerasynchron angesteuert. Ein vor der Kamera platzierter Kerbfilter blockiert selektiv reflektiertes Laserlicht und ermöglicht somit eine parallele Weißlicht-/Fluoreszenz-Darstellung aller drei Modi (Abbildung 3). Nach Bedarf kann die Intensität der Laser angepasst werden.

Die Belichtungszeit für die Kamera kann im entsprechenden User Menü eingestellt werden. Für die Belichtungszeit der Kamerasynchronen Ansteuerung der 405 nm, 589 nm und RGB Laser können Werte von 1/8 Sek, 1/15 Sek, 1/30 Sek und 1/50 Sek gewählt werden. Je langsamer die Schaltung der Laserdiode, desto länger wird das beobachtete Objekt belichtet und desto heller erscheint das Bild, wobei eine umso größere Verzögerung des nächstkommenden Bildes entsteht.

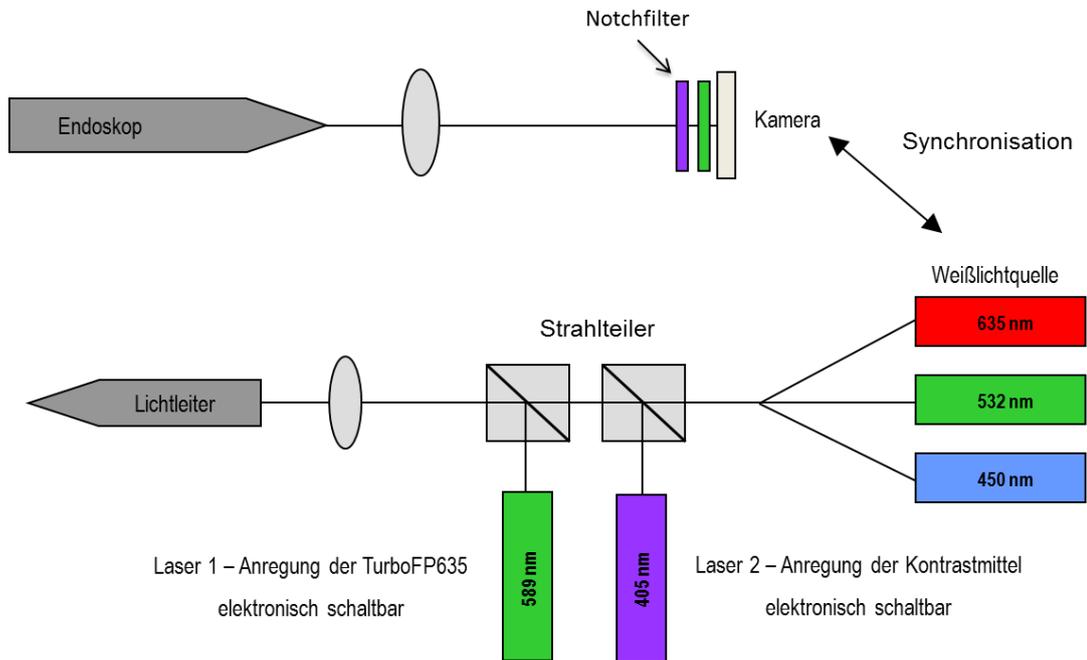


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Mehrkanal-Endoskopsystems

Abbildung freundlicherweise von W. Göbel (Karl Storz GmbH) zur Verfügung gestellt.

Mittels speziell für das System konfigurierter Software wurde ein Kamerasynchrones Auslesen der Bildinformationen ermöglicht (Abbildung 4). Somit wurde für jeden Modus ein getrenntes Video produziert, was eine quasi-simultane Betrachtung der Weißlicht- und beider Fluoreszenzlicht-Bilder erlaubt.

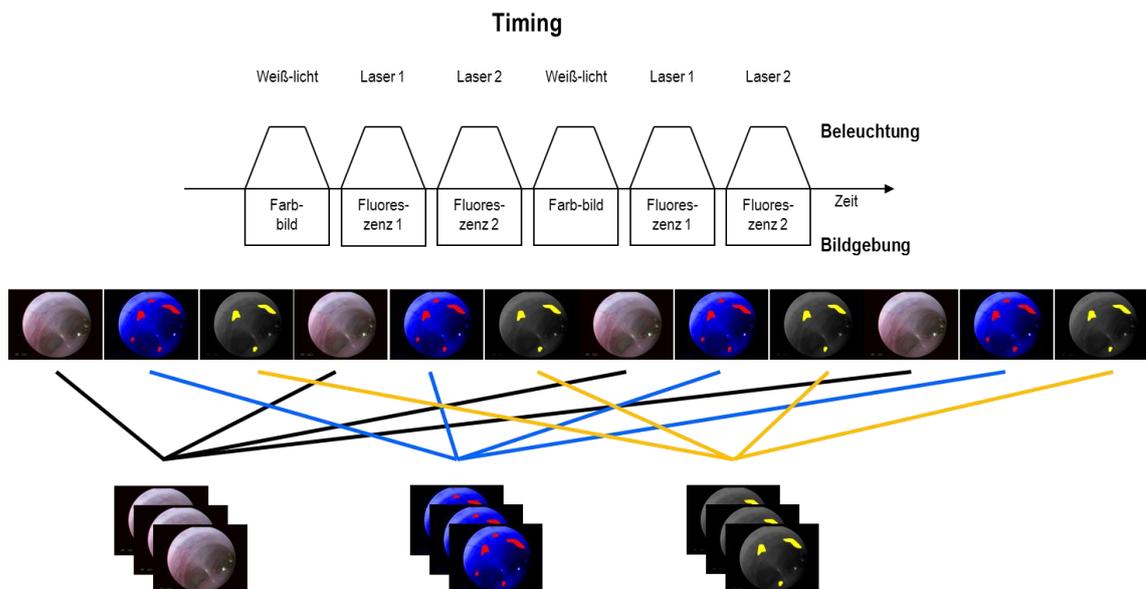


Abbildung 4: Kamerasynchrone Beleuchtung und Auslesen/Sortieren der Bildinformation

Abbildung freundlicherweise von W. Göbel (Karl Storz GmbH) zur Verfügung gestellt.

4.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen *in vitro*

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Werkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellkulturmedien wurden nach dem Ansetzen maximal 14 Tage verwendet. Sofern nicht anders beschrieben, wurden die Zellkulturmedien, PBS und Trypsin kurz vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37°C temperiert. Alle Medien und Puffer wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden nach maximal 20 Passagen entsorgt und durch neu aufgetaute Zellen ersetzt.

4.4.1 Kultivierung der Zellen

Zwei humane Darmkrebszelllinien (LS-174T, SW480) und eine humane Lungenkrebszelllinie (SK-MES1) wurden zur Implantation ausgewählt (s. 5.1). Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Die Zellen wurden in den von CLS empfohlenen Medien in 25 cm² oder 75 cm² Zellkulturflaschen gehalten und 2-3 mal wöchentlich im Verhältnis 1:2 bis 1:5 passagiert. Hierfür wurden die Zellen nach dem Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in frisches Medium aufgenommen. Die LS-174T-Zellen wurden nach dem Trypsinieren mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle durch mehrmaliges Aufziehen der Zellsuspension zusätzlich vereinzelt. Dann wurde ein Teil der Suspension in neue Flaschen ausgesät.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Um den Anteil der toten Zellen zu bestimmen, wurde bei der Zellzählung Trypanblau verwendet.

Verwendete Medien:

LS-174T	500 ml MEM in Earles BSS Medium
	57,5 ml FCS
	5,75 ml L-Glutamin
	5,75 ml Penicillin/Streptomycin
	5,75 ml nichtessentielle Aminosäuren

SW480	500 ml DMEM:Ham's F12 Medium (1:1) 57 ml FCS 5,7 ml L-Glutamin 5,7 ml Penicillin/Streptomycin
SK-MES1	500 ml MEM in Earles BSS Medium 58 ml FCS 5,8 ml L-Glutamin 5,8 ml Penicillin/Streptomycin 5,8 ml Natriumpyruvat 5,8 ml nichtessentielle Aminosäuren

4.4.2 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen trypsinisiert, in Medium aufgenommen und 5 Min bei 125 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, á 1 ml in Einfrierröhrchen aliquotiert und zunächst für mindestens 24 h bei -80°C in Einfrierboxen gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt.

Einfriermedium Medium mit einem Zusatz von 10 % DMSO

4.4.3 Vorbereitung der Zellen für die Implantation

Zur Implantation der Zellen (s. 4.6.3) wurde zum einen eine Zellsuspension in Medium verwendet. Zum anderen wurde die Zellsuspension mit Matrigel gemischt. Diese extrazelluläre Matrix soll die Anwachsrate der humanen Zellen nach der Implantation erhöhen und die Entwicklung des Tumors im Tier begünstigen.

Zehn Tage vor der Zellimplantation wurden die Zellen aufgetaut und vermehrt. Am Tag der Implantation wurden sie trypsinisiert, in Medium aufgenommen und 5 Min bei 125 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und die Zellzahl und der Anteil toter Zellen bestimmt. Die Zellzahl wurde für den jeweiligen

Versuch auf die vorgesehene Konzentration eingestellt. Die Zellsuspension wurde entsprechend der Tierzahl in Reaktionsgefäße aufgeteilt und bis zur Implantation auf Eis gelagert.

Für die Zellsuspension mit Matrigel wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben vorbereitet. Da Matrigel bei über 7°C gelartig wird, wurden alle Arbeiten auf Eis durchgeführt. Nach dem Abkühlen der Zellsuspension wurde Matrigel im gleichen Volumen zugegeben und die Lösung unter Vermeidung von Luftblasen gemischt.

4.4.4 Endoskopische Untersuchung der Zellen

Zur Validierung und Bestimmung der Nachweisgrenze der verwendeten Endoskope wurden *in vitro* Untersuchungen mit SK-MES1- und SK-MES1FP635- Zellen durchgeführt. Hierzu wurden zum einen 3D-Modelle mit SK-MES1FP635-Zellen in unterschiedlicher Konzentration und zum anderen eine Mischung aus transfizierten und untransfizierten Zellen hergestellt. Außerdem wurden konfluent gewachsene SK-MES1- und SK-MES1FP635-Zellen mit einem peptischen Kontrastmittel (D1ATTO495) bzw. Radachlorin kontrastiert und die Kontrastmittelaufnahme der Zellen beobachtet.

4.4.4.1 Vorbereitung der Zellen

Für die endoskopische Untersuchung konfluent gewachsener Zellen wurden diese auf Glasdeckgläschen ausgesät. Dazu wurden sterile Deckgläschen in 24-Kavitäten Platten vorgelegt. Dann wurden 5×10^5 Zellen in die Kavitäten pipettiert. Nach 20-24 h waren die Zellen konfluent gewachsen.

Zur Imitation der Tumore *in vitro* wurden die 3D-Modelle produziert. Dafür wurde die SK-MES1FP635-Zellsuspension 1:1 mit Matrigel gemischt. Von dieser Mischung wurden 1 µl-Tropfen auf die Oberfläche einer LümoX Schale oder einer 8-Kavitäten Zellkulturkammer pipettiert. Die Proben wurden für 1-2 Min bei 37°C inkubiert, wodurch die Tropfen eine feste Konsistenz annahmen. Anschließend wurden die Proben mit warmem Medium überschichtet und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die dreidimensionalen Zellkulturen untersucht.

4.4.4.2 Kontrastierung der Zellen

Die Kontrastierung der konfluent gewachsenen Zellen bzw. der dreidimensionalen Zellkultur wurde entweder durch die Behandlung mit fluoreszierender Peptidlösung oder mit Radachlorin erreicht. Die Kontrastmittel wurden mit warmem Medium auf die gewünschte Konzentration verdünnt (D1ATTO495 10 μ M, Radachlorin 50 μ g/ml) und unmittelbar nach dem Ansetzen auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 60 bzw. 90 Min im Brutschrank. Danach wurden die Kontrastmittellösungen abgenommen und die Proben 2-3 mal mit warmem PBS gewaschen, bevor sie endoskopisch untersucht wurden. Alle Arbeiten wurden bei möglichst wenig Licht durchgeführt.

4.4.4.3 Endoskopie der Zellen

Die endoskopischen Untersuchungen der Zellen wurden in einem dunklen Raum durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit temperiertem PBS bedeckt und entweder mit dem Xenon-basiertem Endoskop oder mit dem Mehrkanal-Endoskopsystem betrachtet. Dafür wurden die Endoskope an einem Stativ fixiert und in einem Winkel von 20-60° auf die Zellen ausgerichtet.

4.4.5 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der quantitativen und qualitativen Analyse der Fluoreszenzeigenschaften und Morphologie von Zellen. Hierzu werden die Zellen mittels eines Flüssigkeitsstroms vereinzelt und durch eine Kapillare geleitet. In dieser wird jede Zelle nacheinander mit verschiedenen Lasern bestrahlt und das emittierte Licht analysiert. Der Hauptvorteil dieser Technik ist die Charakterisierung einer großen Zahl an Zellen in kurzer Zeit.

Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen nach dem Trypsinieren in kaltem FACS (fluorescence activated cell sorting) Puffer aufgenommen und auf 1×10^6 lebende Zellen/ml eingestellt. Tote Zellen wurden durch Verwendung von Trypanblau beim Zählen markiert und bei der Bestimmung der Zellzahl nicht mit einbezogen. Der Anteil an toten Zellen lieferte einen wichtigen Hinweis auf die Vitalität der Zellen.

Wichtig bei der Probenvorbereitung ist, dass die Zellen gut vereinzelt werden, um die Verstopfung der Kapillare im Durchflusszytometer zu vermeiden. Zudem müssen die Proben bis zur Vermessung bei 4°C gelagert werden. Pro Messung wurden bis zu 0,5 ml Zellsuspension (entspricht 5×10^5 Zellen) verwendet. Die Fluoreszenzanalyse erfolgte am Gerät LSR II (BD Biosciences).

Um die Fluoreszenz der Zellen zu messen, wurden sie mit einem blauen Laser bei 488 nm angeregt und die emittierte Fluoreszenz mittels eines 675-715 nm Filters detektiert. Für die Analyse mittels der Auswertesoftware FlowJo wurden so genannte *gates* gesetzt, die eine Trennung der relevanten Zellen von toten Zellen oder Zelltrümmern ermöglichte (Abbildung 5, *gate* P1). Außerdem wurde mit Hilfe der *gates* ein *cutoff* zwischen untransfizierten, nicht fluoreszierenden und transfizierten, fluoreszierenden Zellen festgelegt. Die Grenze wurde so definiert, dass mindestens 95 % der untransfizierten Zellen im negativen *gate* P2 lagen (Abbildung 5, *gate* P2).

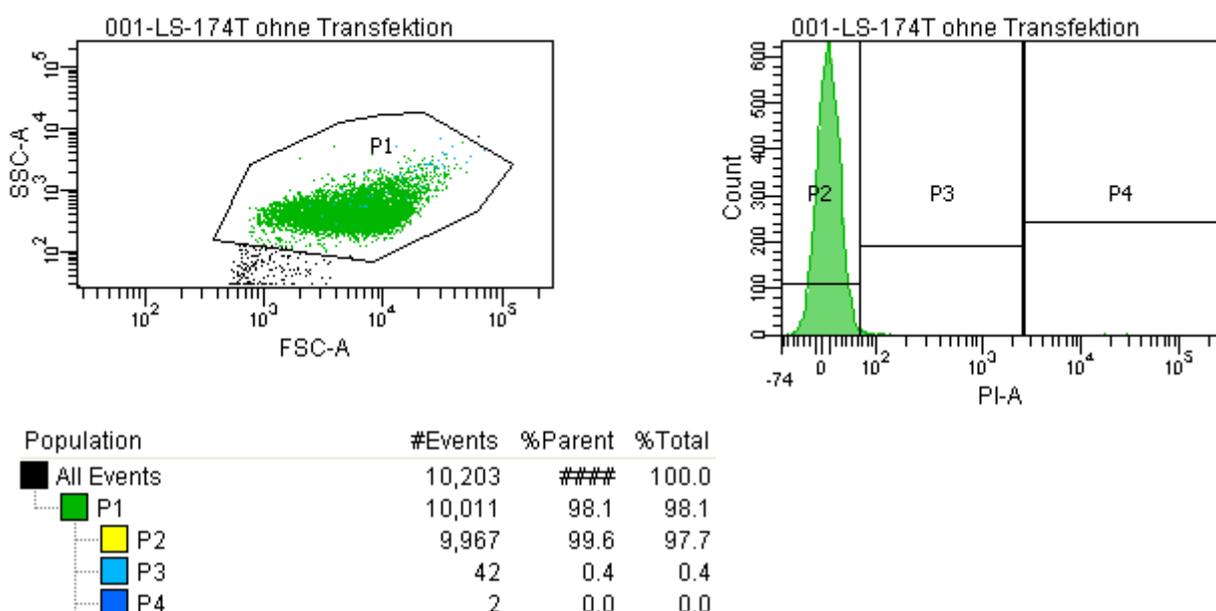


Abbildung 5: Setzung der *gates* für die Durchflusszytometrie

Die Fluoreszenzanalyse erfolgte alle 14 Tage über einen Zeitraum von sechs Wochen. Nach dem Auftauen und ersten Passagieren der Zellen wurde Messung 1 durchgeführt (Tag 0 genannt). Die an Tag 0 für jede Zelllinie festgelegten Einstellungen wurden innerhalb des Untersuchungszeitraums von 42 Tagen nicht verändert, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Zudem wurden die untransfizierten Zellen bei jeder Messung als Kontrolle mitgeführt.

FACS-Puffer PBS ohne Ca&Mg
1 % FCS
0,05 % NaN₃

4.4.6 Ausbleichversuche

Das Verhalten des Fluoreszenzproteins TurboFP635 unter Lichteinfluss wurde an SK-MES1FP635-Zellen untersucht. Hierfür wurden 5×10^5 Zellen/Kavität in eine 24-Kavitäten Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium der über Nacht konfluent gewachsenen Zellen durch Medium ausgetauscht, dem Thymidin in einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt war. Thymidin unterdrückt die Zellteilung, so dass die Zellen in der S-Phase (Synthesephase) synchronisiert werden. Nach 20-24-stündiger Inkubation im Thymidin-haltigen Medium wurde mit den Ausbleichversuchen gestartet.

Das Ausbleichen der Fluoreszenz wurde am Mikroskop Olympus IX-81 mit integriertem „Live-Cell-Imaging-System“ und 103 W Quecksilberlampe als Lichtquelle durchgeführt. Zur Anregung und Detektion der Fluoreszenz wurde ein Filterwürfel 530-550 nm und 570-590 nm verwendet. Die Zellen wurden mit einer Lichtleistung von $0,8 \text{ W/cm}^2$ belichtet. Die Ausbleichversuche wurden in der am Mikroskop integrierten Klimakammer mit 5 % CO₂, 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-80 % durchgeführt.

Die Fluoreszenz der SK-MES1FP635-Zellen wurde an definierten Stellen im Zellrasen durch eine 35-minütige permanente Belichtung ausgebleicht. Während des Ausbleichens wurden automatisch im Abstand von 5 Min Fotos mit einer Belichtungszeit von 2 Sek aufgenommen.

Nach 35 Min, als in den ausgebleichten Bereichen im Zellrasen kaum noch Fluoreszenz sichtbar war, wurde die Belichtung gestoppt und mit der Regenerationsphase begonnen. Die Veränderung der Fluoreszenzintensität in den Zellen wurde für weitere 42 h beobachtet. Hierzu wurden die ausgebleichten Stellen alle 20 Min mit denselben Einstellungen wie beim Ausbleichen fotografiert.

Zur Beurteilung des Verhaltens des Fluoreszenzproteins wurden die Fotos aus drei unabhängigen Versuchen mit der Bildanalyse-Software FIJI ausgewertet. Für jedes Foto wurde die mittlere Graustufe über das gesamte Bild bestimmt. Dann wurde jeweils der Mittelwert aus den Fotos der drei Versuche errechnet. Der Mittelwert der unbehandelten

Zellen zum Zeitpunkt 0 wurde als 100 % definiert. Alle weiteren Werte wurden im Verhältnis dazu berechnet. Für die Hintergrundwerte wurde eine Kavität mit Medium ohne Zellen fotografiert.

4.4.7 Fixierung der Zellen

Verdächtiges Gewebe der Versuchstiere, welches sich nach der Zellimplantation gebildet hat, sollte histologisch auf Tumore untersucht werden. Hierzu könnte die intrinsische Fluoreszenz der implantierten Tumorzellen genutzt werden. Für die histologische Untersuchung musste allerdings das Gewebe fixiert werden. Um das Verhalten des Fluoreszenzproteins in den SK-MES1FP635-Zellen während der Fixierung beurteilen zu können, wurden daher folgende Fixative getestet: 4 % Paraformaldehyd (Kim et al), Zink-Fixativ, PLP-Fixativ und Glutaraldehyd.

5×10^5 SK-MES1FP635- bzw. SK-MES1-Zellen wurden in 24-Kavitäten Platten ausgesät und über Nacht konfluent werden lassen, bevor sie mit den genannten Fixativen behandelt wurden. Hierzu wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen 1x mit PBS mit Ca&Mg gewaschen. Dann wurde je 1 ml Fixativ-Lösung in die Kavitäten gegeben und die Fluoreszenz der Zellen am Mikroskop Olympus IX-81 bei RT beobachtet. Über einen Zeitraum von 3 h wurden im Abstand von 15 Min Fotos an definierten Stellen im Zellrasen aufgenommen.

Je 2 Fotos aus 3 unabhängigen Versuchen wurden wie unter 4.4.6 beschrieben ausgewertet. Der Mittelwert unbehandelter Zellen wurde als 100 % definiert und alle weiteren Werte im Verhältnis dazu errechnet. Für die Hintergrundwerte wurden untransfizierte SK-MES1-Zellen fotografiert.

4 % PFA pH 7-7,2

25 ml 16 % PFA

75 ml 0,125 M Phosphatpuffer

Zink-Fixativ

0,5 g Calciumacetat

5 g Zinkacetat

5 g Zinkchlorid

Auf 1 L mit Tris Puffer auffüllen.

PLP-Fixativ pH 7,4	50 ml 0,1 M Phosphatpuffer
	33,3 ml 8 % PFA
	50 ml 0,2 M Lysin HCl
	0,3 g Natriummetaperiodat
	<u>0,2 M Lysin HCl</u>
	7,32 g Lysin HCl
	200 ml 0,1 M Phosphatpuffer
	<u>8 % PFA</u>
	20 ml 16 % PFA
	20 ml <i>A. bidest.</i>
Glutaraldehyd-Fixativ pH 7,4	8 ml 25 % Glutaraldehyd
	25 ml 8 % PFA
	66 ml 0,15 M Phosphatpuffer

4.4.8 Cryoeinbettung der Zellen

Zusätzlich zur Fixierung (s.4.4.7) wurde auch die klassische Cryoeinbettung als eine mögliche Vorbereitungsmethode zur histologischen Untersuchung von Gewebeproben getestet. Auch hier wurde das Verhalten des Fluoreszenzproteins beobachtet.

Für die Cryoeinbettung wurden 5×10^5 SK-MES1FP635- bzw. SK-MES1-Zellen wie unter 4.4.4.1 beschrieben auf Glasdeckgläschen ausgesät und über zwei Tage konfluent werden lassen. Dann wurden die bewachsenen Deckgläschen der 24-Kavitäten Platte entnommen, mit der Zellseite nach oben auf Objektträger platziert und mit TissueTec-Einfriermedium überdeckt. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Zellen aufgetaut und wie unter 4.4.7 beschrieben am Mikroskop fotografiert.

4.5 Arbeiten mit Gewebe

4.5.1 Behandlung der Darmschleimhaut mit Trypsin

Um vor den *in vivo* Versuchen, bei denen die Schleimhäute des Darms und der Trachea von RNU-Ratten mit Trypsin behandelt wurden (s. 4.6.3.1 und 4.6.3.2), die Wirkung von Trypsin auf die Schleimhäute abschätzen zu können, wurde diese Wirkung an explantiertem Darmgewebe einer Ratte untersucht.

Der frisch präparierte Dickdarm einer Ratte wurde in ca. 1 cm lange Abschnitte geteilt. Das eine Ende der Abschnitte wurde mit einem Faden verschlossen. Dann wurden 150 µl Trypsin-Lösung (0,5 mM bzw. 1 mM) in das Innere pipettiert und das andere Ende ebenso verschlossen. Die Darm-Abschnitte wurden in eine 12-Kavitäten Platte mit 100 µl PBS platziert und bei 37°C für 15 Min inkubiert. Danach wurden die Darm-Abschnitte an einem Ende geöffnet, 150 µl 0,1 mM Aprotinin-Lösung zugegeben und wieder verschlossen. Nach weiteren 5 Min der Inkubation wurden die Darmstücke geöffnet und mit PBS gespült. Die Enden der Darmstücke wurden abgeschnitten und verworfen. Das verbliebene Gewebe wurde in ca. 2x2x2 mm kleine Stücke geschnitten und für die Untersuchung im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) weiter bearbeitet (s. 4.5.2). Für die Kontrollreihe wurde das Gewebe mit PBS anstatt Trypsin behandelt.

Trypsin-Lösung 1 mM	Trypsin (10x) pur in PBS Gekauft bei PAA, die Aktivität betrug 20819,1 Unit/ml
Trypsin-Lösung 0,5 mM	5 ml Trypsin (10x) in PBS 5 ml PBS
Aprotinin-Lösung 0,1 mM	6,7 mg Aprotinin 1 ml PBS

4.5.2 Elektronenmikroskopie

Der Zustand des Darmgewebes nach der Behandlung mit Trypsin im Vergleich zum Kontrollgewebe ohne Trypsinbehandlung wurde elektronmikroskopisch untersucht.

Während der Fixierung wird das Gewebe hart und brüchig. Um ein Zerstören des Gewebes während der Fixierung und Entwässerung zu vermeiden, wurden alle Lösungen vorsichtig seitlich in die Gläschen pipettiert und abpipettiert, ohne das Gewebe zu berühren.

Die ca. 2x2x2 mm kleinen Gewebestücke wurden in Gläschen mit 5 ml Natriumcacodylatpuffer gegeben. Nach kurzer Inkubation wurde der Puffer durch 1 ml frisch angesetztes Fixativ ersetzt. Die Fixierung dauerte 90 Minuten. In dieser Zeit wurde das Fixativ alle 10 Min durch frisches ersetzt. Danach wurde das Gewebe für 10 Min in 5 ml Natriumcacodylatpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe mittels einer Ethanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 2 mal 100 %, jeweils 15 Min) entwässert. Danach folgte zweimalig eine fünfminütige Inkubation in 2 ml Propylenoxid. Nach der Fixierung und Entwässerung wurden die Gewebestücke über Nacht bei 4°C mit einem Gemisch aus 50 % Epon 1:1 und 50 % Propylenoxid behandelt. Am nächsten Tag wurde die Mischung durch Epon 1:1 ersetzt und die Proben für 3 h bei RT inkubiert. Die Gewebestücke wurden zusammen mit Beschriftungsschildern in Einbettformen platziert, diese wurden mit Epon 1:1 aufgefüllt. Anschließend folgte eine 48 stündige Aushärtung bei 60°C.

Von den ausgehärteten Gewebelöckchen wurden mittels eines Pyramitoms und Glasmessern Semidünnschnitte von etwa 200 nm Dicke angefertigt. Anhand der Schnitte wurden die Bereiche ausgewählt, die im TEM untersucht werden sollten.

Zur Herstellung der Ultradünnschnitte wurde zunächst am Pyramitom eine Pyramide um den ausgewählten Bereich des Gewebes geschnitten. Dann wurden am Mikrotom Ultradünnschnitte von 50-100 nm Dicke hergestellt. Diese wurden auf Dünnsteg-Netzchen aufgezogen und getrocknet. Die Schnitte wurden kontrastiert, indem die Dünnsteg-Netzchen erst 5 Min mit den Schnitten nach unten auf einen Tropfen Uranylacetatlösung und nach einem kurzen Waschgang in *A. bidest.* für 15 Min auf einen Tropfen Bleicitratlösung gelegt wurden. Danach wurden die Schnitte kurz in Waschlösung sowie in *A. bidest.* gewaschen und getrocknet, bevor sie im TEM untersucht und fotografiert wurden.

Natriumcacodylatpuffer	0,1 M Cacodylsäure, Natriumsalz (pH 7,4)
Fixativ	0,25 ml Kaliumhexacyanoferrat(II)-Stammlösung (SL) 0,25 ml 2 % Osmiumtetroxid 0,5 ml Fixativ-Vormischung
Kaliumhexacyanoferrat(II)-SL	1,5 g Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat ad 100 ml <i>A. bidest.</i> (Lösung nicht länger als einen Tag verwenden)
2 % Osmiumtetroxid (w/v)	1 g Osmiumtetroxid 50 ml <i>A. bidest.</i>
Fixativ-Vormischung	2 ml 25 %ige Glutaraldehydlösung 5 ml 0,2 M Cacodylsäure, Natriumsalz (pH 7,4) 3 ml <i>A. bidest.</i> (Lösung nicht länger als einen Tag verwenden)
Epon 1:1	2 Teile Epon-SL A 1 Teil Epon-SL B 2 % (v/v) DMP 30
Epon-SL A	6,2 ml Epon 812 10 ml DDSA
Epon-SL B	10 ml Epon 812 8,9 ml NMA
Uranylacetatlösung	1 ml Uranylacetat-SL 1 ml Aceton
Uranylacetat-SL	1,6 g Uranylacetat ad 20 ml <i>A. bidest.</i>

Bleicitratlösung	0,665 g Blei(II)nitrat 0,88 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat 20 ml kochendes <i>A. bidest.</i> 20 min schütteln 0,16 g Natriumhydroxid ad 25 ml <i>A. bidest.</i> Ultraschallbehandlung, bis Lösung klar ist pH mit NaOH auf 12,0 einstellen
Waschlösung	10 ml <i>A. bidest.</i> 1 Tropfen 1 M NaOH

4.5.3 Molekularbiologisches Arbeiten

Nach der Implantation von humanen transfizierten Tumorzellen in die Ratte (s. 4.6.3) wurde verändertes Gewebe mit Tumorverdacht mittels PCR-Analyse als eine von der Endoskopie unabhängige Methode untersucht, um eine mögliche humane Tumorentwicklung bestätigen zu können. Hierfür wurden die Tiere maximal 16 Wochen nach der Zellimplantation getötet, der Darm bzw. die Trachea entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

4.5.3.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA von verdächtigem Gewebe wurde ein „innuPREP DNA Mini Kit“ (Analytik Jena) verwendet. Arbeitsflächen, Geräte und Pipetten wurden mit „DNA-Away“ (Sigma – Aldrich) gereinigt. Das zu untersuchende Gewebe wurde mit einem Einmal-Skalpell in 15 - 20 mg Stücke geschnitten. Die Gewebestücke wurden in Reaktionsgefäße überführt und gemäß Protokoll bearbeitet.

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am BioPhotometer (Eppendorf) mittels OD-Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zudem wurden die Verhältnisse 260/280 nm und 260/230 nm bestimmt, um Aussagen über die Reinheit der Proben machen zu können.

Die Proben wurden zur kurzfristigen Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Zur späteren Verwendung wurde das Material bei -20°C gelagert.

4.5.3.2 PCR-Analyse

Für die PCR-Analyse der isolierten DNA (s. 4.5.3.1) wurden mittels der Webseite „Primer3 Input“ Version 4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) Primer kreiert. Um das Anwachsen der Tumorzellen im Tier nachweisen zu können, wurden Primer ausgesucht, die spezifisch für das Fluoreszenzprotein TurboFP635 sind, mit den Sequenzen 5'-CCTGGCTACCAGCTTCATGT und 5'-AGTTCACCCGTTGATCTTG. Die Produktgröße beträgt 206 Basenbare (bp). Die DNA einer unbehandelten Ratte, DNA der SK-MES1FP635-Zellen und Wasser wurden als Kontrollen verwendet.

Es wurde ein gemeinsamer Mastermix angesetzt (Tabelle 1). Von diesem Mastermix wurden je 19 µl zu 1 µl der zu untersuchenden DNA-Proben in PCR-Reaktionsgefäße pipettiert. Die Konzentration der DNA betrug je nach Ansatz 10-20 ng/µl. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler mit dem auf die Primer und die Polymerase angepassten Programm „95°C 3 Min, {95°C 30 Sek, 57° 30 Sek, 72°C 30 Sek}39x, 72°C 5 Min, 10°C“.

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurde ein Agarose-Gel gegossen und in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die PCR-Produkte wurden mit je 3,8 µl Loading Dye (6 x) gemischt und je 15 µl Probe in die Geltaschen pipettiert. In eine Tasche wurden 4 µl DNA Marker (50 bp) pipettiert. Für die Elektrophorese wurde das Programm „5 Min – 65 V und 50 Min – 95 V“ verwendet. Im Anschluss wurde das Gel unter UV-Licht am „Electrophoresis Power Supply“ fotografiert.

Tabelle 1: Mastermix für PCR

Mastermix Bestandteile	Endkonzentration
Primer vorwärts	0,3 µM
Primer rückwärts	0,3 µM
dNTP	0,4 µM
Reaktionspuffer	1 x
Polymerase	1 Unit/Reaktion

Agarose-Gel:	0,7 g Agarose 1,65 g Synergel ad 100 ml 1xTAE Puffer 10 µl Ethidiumbromid (1 %)
10xTAE Puffer:	48,46 g Tris 20 ml 0,5 M EDTANa ₂ xH ₂ O 2,9 ml 100 % Essigsäure ad 1000 ml <i>A. bidest.</i> pH 8 mit Essigsäure einstellen. Für PCR 1:10 mit <i>A. bidest.</i> verdünnt.

4.6 Arbeiten zur Etablierung eines orthotopen Tumormodells

Alle Untersuchungen an den Tieren wurden entsprechend dem genehmigten Tierschutzantrag G266 durchgeführt.

4.6.1 Tierhaltung

Alle *in vivo* Untersuchungen wurden an RNU-Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden bei Charles River im Alter von 5 - 7 Wochen gekauft und in der Tierhaltung des Forschungszentrums Borstel bei 21-23°C und 65 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Adaptionsphase zwischen Transport der Tiere von Charles River und Versuchsbeginn betrug eine Woche. Die Tiere wurden im Laufe des Versuches einmal pro Woche gewogen und der Allgemeinzustand beobachtet.

4.6.2 Narkose

Zwei Narkosearten wurden während der *in vivo* Versuche angewandt: bei den Tieren mit dem Zielorgan Darm wurde eine Inhalationsnarkose mit Sevofluran verwendet, die Tiere mit dem Zielorgan Trachea bekamen eine Injektionsnarkose mit Ketamin-Xylazin.

4.6.2.1 Inhalationsnarkose

Zum Einleiten der Inhalationsnarkose wurde eine Kleintier-Anästhesieanlage verwendet. Als Narkosegas wurde Sevofluran mit dem Trägergas O₂ verdampft. Zunächst wurden die Tiere in eine mit Sevofluranatmosphäre geflutete Induktionskammer gesetzt. Nach eingetretener Narkose wurden die Tiere der Kammer entnommen und an eine Gesichtsmaske angeschlossen. Die Narkose wurde mit 3 - 4 % Sevofluran und 1 L/min O₂ aufrechterhalten. Die Lid- und Zwischenzehenreflexe wurden vor und während des Eingriffes überprüft.

4.6.2.2 Ketamin-Xylazin Narkose

Die Ketamin-Xylazin Mischung wurde intraperitoneal (IP) verabreicht. 10 – 20 Min nach der Injektion wurden die Reflexe überprüft. Die Gesamtdauer der Narkose betrug 1 - 1,5 h. Um den Kreislauf aufrecht zu erhalten, wurden die Tiere vor und nach dem Eingriff unter einer Rotlichtlampe platziert.

Ketamin-Xylazin Mischung	1 ml Ketamin (100 mg/ml)
	250 µl Xylazin (20 mg/ml)
	Arbeitskonzentration: (100+5) mg/kg Ratte

Beispiel: Eine 200 g schwere Ratte bekam 250 µl der Mischung.

4.6.3 Zellimplantation

Die Zellen zur Implantation wurden je nach Versuchsgruppe (Tabelle 2 und 3) entweder in Medium aufgenommen oder zur Erhöhung der Anwachsrate der Zellen im Tier zusätzlich mit Matrigel gemischt.

Vor der Zellimplantation wurden die Tiere gewogen und am Ohr markiert. Nach der Zellimplantation wurde den Tieren subkutan (SC) einmalig Metacam (2 mg/kg) zur Analgesie und Gentamicin (5 mg/kg) zum Verhindern von Entzündungen verabreicht.

4.6.3.1 Zellimplantation in den Darm

Für die Zellimplantation in den Darm wurden LS-174TFP635- und SW480FP635-Zellen verwendet. Die Zellen wurden wie unter 4.4.3 beschrieben vorbereitet.

Die Tiere wurden mittels Inhalationsnarkose betäubt (s. 4.6.2.1). Nach Eintreten der Toleranzphase wurden sie auf eine Thermomatte in Rückenlage platziert. Auf die Augen der Tiere wurde Bepanthen Salbe aufgetragen, um ein Austrocknen zu vermeiden. Bei der Methode 1 wurden die Zellen ohne Trypsinvorbehandlung des Darms appliziert (Tabelle 2). Für die Methoden 2 und 3 wurde der Darm gemäß Tabelle 2 für 15 Min mit Trypsin vorbehandelt, gefolgt von einer fünfminütigen Aprotininbehandlung zum Abstoppen der Trypsinaktivität. Vor der Zellimplantation in den Darm wurden Trypsin und Aprotinin durch vorsichtiges Einführen eines Q-Tips in den Darm abgetupft. Alle Applikationen erfolgten mit 200 µl Spitzen und der entsprechenden Pipette. Die Pipettenspitze wurde ca. 5 mm in den Enddarm eingeführt und die Lösung appliziert. Im Anschluss an die Behandlung wurden Metacam und Gentamicin verabreicht. 10 Min später wurde den Tieren die Narkosemaske entfernt.

Tabelle 2: Gruppeneinteilung für die Zellimplantation – Zielorgan Darm

Methoden	LS-174TFP635	SW480FP635
M1	G 1	G 4
Ohne Trypsinvorbehandlung	Zellen: 4×10^6 - 10 Min	Zellen mit Matrigel: 9×10^6 - 10 Min
M2	G 2	G 5
Trypsin 0,1 mM	Trypsin: 100 µl - 15 Min 0,1 mM Aprotinin: 100 µl - 5 Min Zellen in Matrigel: 4×10^6 - 10 Min	Trypsin: 70 µl - 15 Min 0,1 mM Aprotinin: 70 µl - 5 Min Zellen: 1×10^7 - 10 Min
M3	G 3	G 6
Trypsin 1 mM	Trypsin: 100 µl - 15 Min 0,1 mM Aprotinin: 100 µl - 5 Min Zellen: 4×10^6 - 10 Min	Trypsin: 70 µl - 15 Min 0,1 mM Aprotinin: 70 µl - 5 Min Zellen in Matrigel: 1×10^7 - 10 Min

G 1 - G 6: Gruppennummer

4.6.3.2 Zellimplantation in die Trachea

Für die Zellimplantation in die Trachea wurden SK-MES1FP635-Zellen verwendet. Die Zellen wurden wie unter 4.4.3 beschrieben vorbereitet.

Die Tiere wurden mit einer Ketamin-Xylazin Mischung narkotisiert (s. 4.6.2.2) und die Augen mit Bepanthen Salbe befeuchtet. Nach Erreichen der Toleranzphase wurden die Tiere mit den oberen Zähnen an einer Halterung fixiert (Abbildung 6). Um die Sichtbarkeit im Maul zu verbessern, wurde eine Kaltlichtlampe verwendet. Mit einem abgerundeten Spatel wurde der Kehlkopf geöffnet, indem er von oben nach unten leicht angedrückt wurde. Dann wurde eine 20G Kanüle mit abgeschliffener stumpfer Spitze in die Trachea eingeführt. Bei der Methode 1 wurden die Zellen ohne Trypsinvorbehandlung der Trachea mit einer 1 ml Spritze durch die Kanüle in die Trachea appliziert (Tabelle 3). Bei den Methoden 2 und 3 hingegen wurden gemäß dem in Tabelle 3 gezeigten Schema zunächst Trypsin, gefolgt von Aprotinin und schließlich die Zellen verabreicht. Zwischen den Applikationen wurde die Kanüle aus der Trachea entfernt. Nach dem Eingriff wurden Metacam und Gentamicin verabreicht und die Tiere zum Aufwachen unter einer Rotlichtlampe platziert.

Tabelle 3: Gruppeneinteilung für die Zellimplantation – Zielorgan Trachea

M1	M2	M3
Ohne Trypsinvorbehandlung	Trypsin 0,1 mM	Trypsin 1 mM
G 1	G 4	G 5
Zellen: 50 µl – 7x10 ⁴	Trypsin: 50 µl – 10 Min	Trypsin: 50 µl – 10 Min
G 2	0,1 mM Aprotinin: 50 µl - 5 Min	0,1 mM Aprotinin: 50 µl - 5 Min
Zellen in Matrigel: 100 µl - 2,5x10 ⁶	Zellen in Matrigel: 50 µl - 0,9x10 ⁶	Zellen: 50 µl – 7x10 ⁴
G 3		
Zellen in Matrigel: 100 µl - 2,5x10 ⁶		

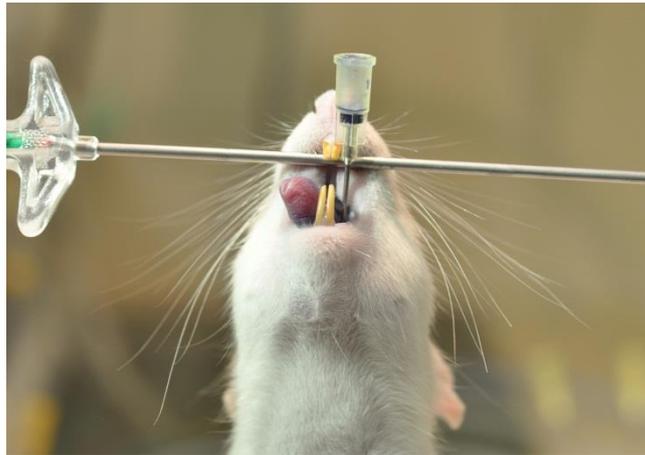


Abbildung 6: Applikation der Zellen

4.6.4 Endoskopie der Tiere

Die Endoskopie des Darmes (Koloskopie) wurde bei den Ratten unter Sevofluran-Narkose (s. 4.6.2.1) durchgeführt. Es wurde ein Stablinsenendoskop mit einem Arbeitskanal für die Luftzufuhr verwendet. Mittels einer kleinen Luftpumpe wurde der Darm kontrolliert insuffliert. Um den Kreislauf zu unterstützen, wurden die Tiere auf eine Wärmematte gelegt. Die Dauer der Endoskopie einer Ratte betrug zwischen fünf und zehn Minuten.

Die Bronchoskopie erfolgte unter Ketamin-Xylazin Narkose (s. 4.6.2.2) mit einem Faserbündelendoskop ($d=1,2\text{ mm}$). Aufgrund der geometrischen Verhältnisse der Rattentrachea musste die Bronchoskopie zügig, innerhalb von ein bis zwei Minuten durchgeführt werden. Die Augen wurden mit Bepanthen vor dem Austrocknen geschützt. Nach der Bronchoskopie wurden die Tiere bis zum Aufwachen unter einer Rotlichtlampe platziert.

Die Lid- und Zwischenzehenreflexe wurden vor und während der Endoskopie des Darms und der Trachea überprüft.

5 Ergebnisse

5.1 Auswahl der Zelllinien zur Transplantation

Zur Beantwortung der Fragestellung des Projekts war es notwendig die Entwicklung von Tumoren im Tiermodell in einem für die nachfolgenden Endoskopieuntersuchungen akzeptablen Zeitrahmen induzieren zu können. Hierfür waren geeignete Zellen von entscheidender Bedeutung. Nach intensiver Literaturrecherche wurde eine Vorauswahl der in Frage kommenden Zelllinien getroffen, wobei folgende Kriterien herangezogen wurden: bereits publizierte erfolgreiche Anwendung in Tumormodellen, häufiger Tumortyp, isoliert aus einem solidem Tumor, kommerzielle Verfügbarkeit. Die nach diesen Kriterien potentiell zur Inokulation geeigneten Tumorzelllinien sind in Tabelle 4 (humane Darmtumorzelllinien) und Tabelle 5 (humane Lungenzelllinien) zusammenfassend aufgeführt.

Zur Etablierung der Tumormodelle wurden aus diesen Tabellen anhand der Häufigkeit der Tumorart und der Herkunft drei Zelllinien ausgesucht:

Für das Zielorgan Darm wurde die metastasenbildende Adenokarzinom-Zelllinie LS-174T und weniger aggressive SW480 mit adenokarzinomem Ursprung gewählt. Adenokarzinome zählen zu den besonders häufigen Tumorarten. Beide Zelllinien wurden aus primären soliden Tumoren gewonnen. Ferner wurden sie bereits in unterschiedlichen Tiermodellen erfolgreich eingesetzt.

Aus einer Metastase isolierte Zellen können ihre Eigenschaften verändern, was spätere Schlussfolgerungen auf den primären Tumor im Frühstadium erschwert. Dies galt als ein wichtiges Ausschlusskriterium für die Auswahl der Zelllinie (z.B. bei Zelllinie SW620). Ebenfalls nicht in Betracht gezogen wurden Zellen, für die nach erfolgter Implantation nur eine geringe Anwachsrate im Zielgewebe beschrieben wurde (z.B. bei Zelllinie Caco-2).

Für das Zielorgan Trachea wurde die aus dem häufig vorkommenden Plattenepitheltumor isolierte SK-MES1 Zelllinie ausgewählt. Diese Zelllinie wurde ebenfalls bereits erfolgreich bei Tiermodellversuchen verwendet. Zelllinien mit unklarem oder Metastasen-Ursprung, wie Calu-6 und H-209, kamen für das Lungen-Tumormodell nicht in Frage.

Die drei ausgewählten Zelllinien wurden von der Firma Marinpharm (Luckenwalde) mit dem Gen für das Fluoreszenzprotein TurboFP635 stabil transfiziert. Die Zelllinien erhielten entsprechend die Bezeichnungen LS-174TFP635, SW480FP635 und SK-MES1FP635.

Tabelle 4: Charakteristika der infrage kommenden Darmkrebszelllinien

Zelllinie	Herkunft	Tumorentwicklung im Tiermodell	Morphologie	Zelltyp	Referenz
Caco-2	Darmtumor	In immundefizienten Mäusen bei der Implantation in den Blinddarm von 2x2x2mm subkutan gewachsenen Tumorstücken zu 40%, LKM-25%.	Epithelial/ Monolayer	Adeno- karzinom	(Flatmark et al 2004) CLS
DLD-1	Darmtumor	In immundefizienten Mäusen bei der Injektion in den Blinddarm zu 88%, davon LKM-57%.	Epithelial/ adhärent	Adeno- karzinom	(Cespedes et al 2007)
HT-29	Darmtumor	In immundefizienten Mäusen bei der Implantation in den Blinddarm von 2x2x2mm subkutan gewachsenen Tumorstücken zu 69%, LKM-83%.	Epithelial/ Monolayer	Adeno- karzinom	(Flatmark et al 2004) CLS
HCT116	Darmtumor	In immundefizienten Mäusen bei der Implantation in den Blinddarm von 2x2x2mm subkutan gewachsenen Tumorstücken zu 100%, LKM-70%. Bei der Injektion in den Blinddarm zu 75%, davon LKM-100%.	Epithelial/ adhärent	Kolorektales Karzinom	(Cespedes et al 2007, Flatmark et al 2004) ATCC
LS-174T	Adeno- karzinom	In immundefizienten Mäusen bei der submukosalen Injektion in den Darm zu 80%, LKM-0%. Zellimplantation in den Darm mit beschädigter Mukosaschicht 100%.	Epithelial/ adhärent	Adeno- karzinom	(Bhullar et al 2011, Kashtan et al 1992) CLS
SW480	Darmtumor	In immundefizienten Mäusen bei der Implantation in den Blinddarm von 2x2x2mm subkutan gewachsenen Tumorstücken zu 100%, LKM-0%.	Epithelial/ Monolayer	Adeno- karzinom	(Flatmark et al 2004) CLS
SW620	Aus der Metastase im Lymphknoten von SW480	In immundefizienten Mäusen bei der Injektion in den Blinddarm zu 75%, davon LKM-50-100%.	Epithelial/ adhärent	Adeno- karzinom	(Cespedes et al 2007, Witty et al 1994)

CLS – Cell Line Service, ATCC - American Type Culture Collection, LKM-Lymphknotenmetastase.

Tabelle 5: Charakteristika der infrage kommenden Lungenkrebszelllinien

Zelllinie	Herkunft	Tumorentwicklung im Tiermodell	Morphologie	Zelltyp	Referenz
A549	Lungentumor	Bei bestrahlten Ratten 100 % Tumorentwicklung nach intratrachealer Injektion.	Epithelial/ Monolayer	Adeno- karzinom	(Mase et al 2002) ATCC
Calu-6	Ana- plastisches Karzinom vermutlich Lunge	In immundefizienten Ratten bei der intratrachealen Calu-6 Zellimplantation mit EDTA 100%.	Epithelial/ Monolayer	Anaplast- isches Karzinom	(March et al 2001) CLS
H-209	Metastase im Knochenmark SCLC	In immundefizienten Mäusen bei der intra-trachealen Injektion 50-80%.	Sphäroid, vereinzelt und im Klumpen/ in Suspension	SCLC	(Iochmann et al 2012) CLS
H-441	Perikardiale Flüssigkeit bei Patient mit Adeno- karzinom der Lunge	In immundefizienten Ratten bei der intrapleurale Injektion-100%.	Epithelial/ Monolayer	Adeno- karzinom	(Nagamachi et al 1998) ATCC
H-460	Lungen Tumor	In immundefizienten Mäusen bei der orthotopen Injektion der Zellen.	Epithelial	LCLC	(McLemore et al 1987) ATCC
PC-14	Adenokarzi- n der Lunge	In immundefizienten Mäusen bei der intratrachealen Injektion 25 %.	Sphäroide, Runde Zellen/ in Suspension und adhärent	Aden- okarzinom	(Mase et al 2002) Sigma-Aldrich
SK- MES1	Pleuraerguss der Lunge	In immundefizienten Mäusen bei der subkutanen Injektion.	Epithelial/ Monolayer	Platten- epithel- karzinom	(Li et al 2011) CLS

CLS – Cell Line Service, ATCC - American Type Culture Collection, SCLC – small cell lung cancer, LCLC – large cell lung cancer.

5.2 Charakterisierung der ausgewählten Zelllinien

Nach stabiler Transfektion wurden die Zellen über mehrere Passagen kultiviert und sowohl fluoreszenzmikroskopisch als auch durchflusszytometrisch charakterisiert. Die Parameter Fluoreszenzstärke sowie die Homogenität und Stabilität der Transfektion wurden dabei überprüft.

5.2.1 Morphologie der Zellen

Zunächst wurden Morphologie und Wachstumsverhalten der LS-174TFP635, SW480FP635 und SK-MES1FP635 Zellen in unterschiedlichen Wachstumsstadien mikroskopisch untersucht.

Die Zellen aller drei Zelllinien haben eine epitheliale Form. Ein adhärentes Wachstum ist typisch. Die Zelllinie SW480FP635 beinhaltet einen zweiten, runden Zelltypus, welcher oberhalb des Zellrasens als Suspensionskultur wächst (Abbildung 7C, D). Die LS-174TFP635 Zellen bilden keinen konfluenten Zellrasen aus, sondern wachsen in Inselstrukturen, was das Passagieren und Vereinzeln der Zellen erschwert (Abbildung 7A, B).

Die SK-MES1FP635 hingegen ist eine als homogener Zellrasen wachsende Zelllinie, welche eine konfluente Schicht ausbildet und sich gut vereinzeln lässt (Abbildung 7E, F). Aus diesem Grund wurde die Lungenkrebszelllinie SK-MES1FP635 vorwiegend in den nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen verwendet.

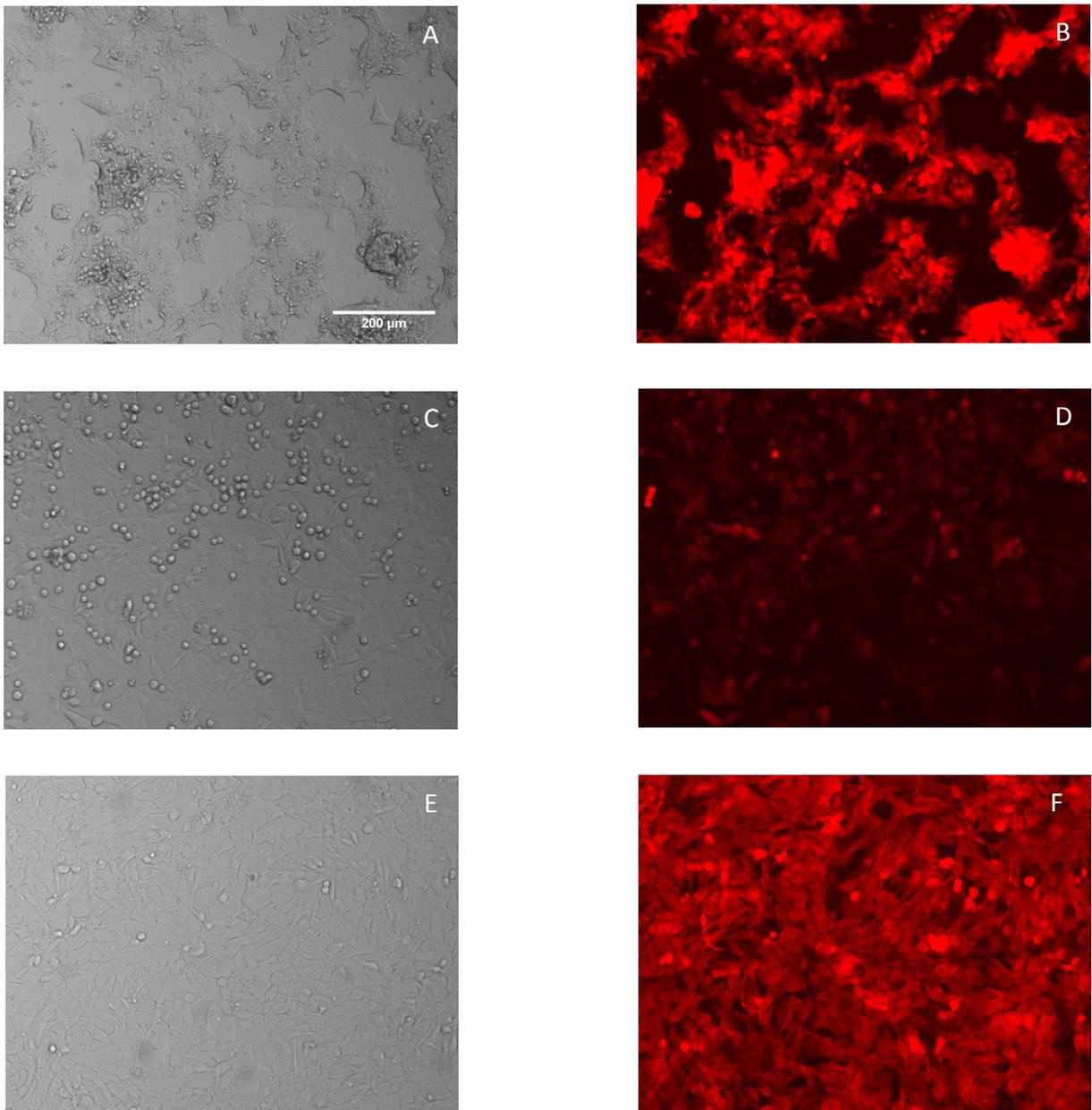


Abbildung 7: Morphologie der ausgewählten Zelllinien

LS174TFP635 (A, B), SW480FP635 (C, D), SK-MES1FP635 (E, F) jeweils Durchlichtbild und Fluoreszenzbild (TRITC-Kanal). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem 10x Objektiv und einer Belichtungszeit von 500 ms am Olympus IX-81 Mikroskop aufgenommen.

5.2.2 Stabilität und Homogenität der Transfektion

5.2.2.1 Durchflusszytometrie

Die Tumorentwicklung im Tiermodell benötigt Zeiträume von wenigen Wochen bis hin zu mehreren Monaten. Für die nachfolgende Fluoreszenzendoskopie war es essentiell, dass die Stabilität der Transfektion über den gesamten Zeitraum gewährleistet war. Als wichtige Parameter wurden daher die Intensität der Fluoreszenz in den einzelnen Zellen, die Verteilung fluoreszenter Zellen innerhalb der Population sowie die Langzeitstabilität der Fluoreszenz über mehrere Passagen angesehen. Mittels durchflusszytometrischer Messungen wurden diese Parameter für alle drei Zelllinien über mehrere Zellteilungen hinweg für insgesamt 42 Tage untersucht.

Nach dem Auftauen und ersten Splitten wurde mit einem Teil der Zellen die erste Messung durchgeführt (Tag 0), die restlichen Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ weiter kultiviert. Im Rhythmus von zwei Wochen folgten weitere durchflusszytometrische Analysen. Das Fluoreszenzprotein TurboFP635 wurde hierbei jeweils mit dem 488 nm-Laser des Durchflusszytometers angeregt. Das emittierte Licht wurde nach Passieren eines 700/30 nm Filters detektiert.

Als Kontrolle dienten die jeweils untransfizierten Zellen, welche bei jeder Messung mitgeführt wurden. Als fluoreszenz-negativ wurde der Bereich definiert in welchem ≥ 95 % der untransfizierten Zellen lagen.

Bei den Darmkrebszelllinien LS-174FP635 und SW480FP635 war jeweils eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz über mehrere Zellteilungen zu beobachten. Schon bei der ersten Messung, Tag 0 (Abbildung 8A, B blaue Linie) war eine Inhomogenität der Population festzustellen. 17 % der LS-174TFP635 und 10 % der SW480FP635 lagen im Bereich der untransfizierten Kontrollzellen. Nach 42 Tagen (Abbildung 8A, B rote Linie) war eine deutliche Zunahme der Zellzahl im Bereich der untransfizierten Zellen zu beobachten. Bis zu 37 % der LS174TFP635 und 17 % der SW480FP635 wiesen keine detektierbare Fluoreszenz mehr auf. Die Fluoreszenzintensität in allen Zellen war zudem unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies bestätigt die schon mikroskopisch beobachtete unregelmäßige Verteilung der Fluoreszenz in den Zellpopulationen (Abbildung 7B und D).

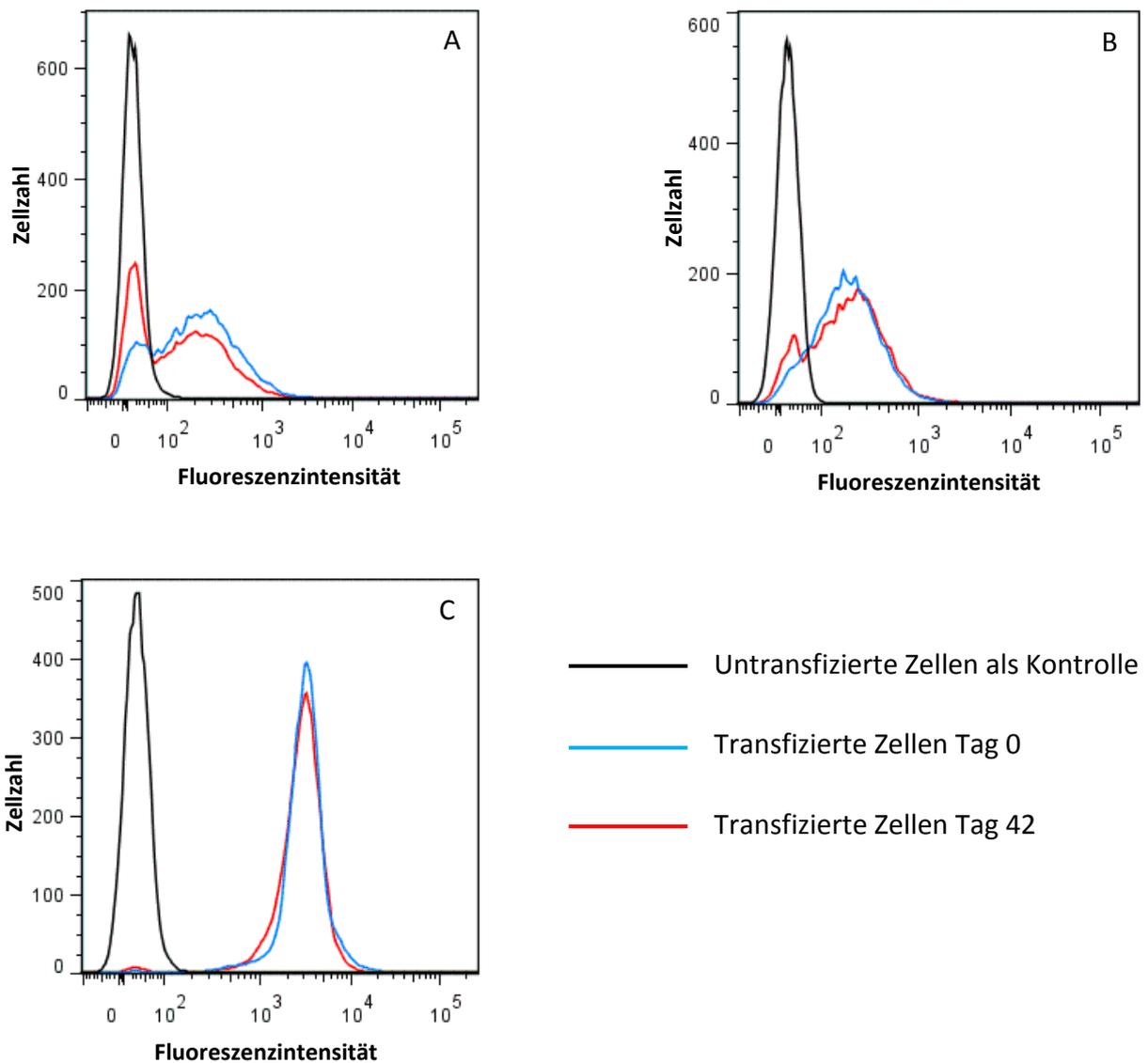


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse der Homogenität und Stabilität der Transfektion

LS-174TFP635 (A), SW480FP635 (B), SK-MES1FP635 (C). Die gezeigten Grafiken basieren auf der Messung von je 10.000 Ereignissen.

Für die Lungenkrebszelllinie SK-MES1FP635 war hingegen eine hohe Stabilität der Transfektion über 42 Tage zu beobachten (Abbildung 8C). Im Zeitraum der Untersuchung wurde eine Zunahme des Anteils nicht fluoreszierender Zellen von 0,5 % am Tag 0 auf lediglich 1,2 % am Tag 42 festgestellt. Die beiden Populationen der untransfizierten und transfizierten Zellen ließen sich zudem gut voneinander abgrenzen. Dies ist auf die starke Fluoreszenzintensität und homogene Verteilung der Fluoreszenz innerhalb der Zellpopulation SK-MES1FP635 zurückzuführen, was sich ebenfalls durch die mikroskopischen Beobachtungen bestätigen ließ (Abbildung 7F).

5.2.2.1 Mikroskopische und endoskopische Betrachtung der Zellen

Für die tierexperimentellen Studien wurde geplant die Tiere bis zu drei Monaten nach der Zellimplantation zu beobachten und zu endoskopieren. Es war wichtig zu wissen, ob bzw. wie sich die Zellen in diesem Zeitraum in Bezug auf die visuelle Betrachtung verändern.

Die Fluoreszenz und Morphologie der Zellen wurden nach drei Monaten kontinuierlichen Wachstums in der Zellkultur sowohl mikroskopisch als auch endoskopisch untersucht.

LS-174TFP635 Zellen wiesen nach drei Monaten Kultur ein klumpiges Wachstum ohne konfluente Schicht auf. Eine schwache Fluoreszenz innerhalb der Inseln konnte sowohl mikroskopisch als auch endoskopisch identifiziert werden (Abbildung 9A und B). Dabei war die Fluoreszenz jedoch nicht so intensiv wie bei den frisch aufgetauten und analysierten Zellen (Abbildung 7B).

SW480FP635 Zellen bildeten nach drei Monaten Kultur einen Zellrasen mit wenigen mehrschichtigen Strukturen aus. Eine schwache Fluoreszenz war mikroskopisch und endoskopisch zu beobachten (Abbildung 9C und D). Trotz doppelter Belichtungszeit beim Fotografieren wurde die Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Zellen direkt nach dem Auftauen schwächer (Vergleich Abbildung 7D).

SK-MES1FP635 Zellen bildeten im Verlauf einer längeren Kultivierung einen Zellrasen mit sternförmigen Zellhaufen aus. Auch nach drei Monate der Inkubation blieb die Fluoreszenz stark und konnte sowohl mikroskopisch als auch endoskopisch gut beobachtet werden (Abbildung 9E und F).

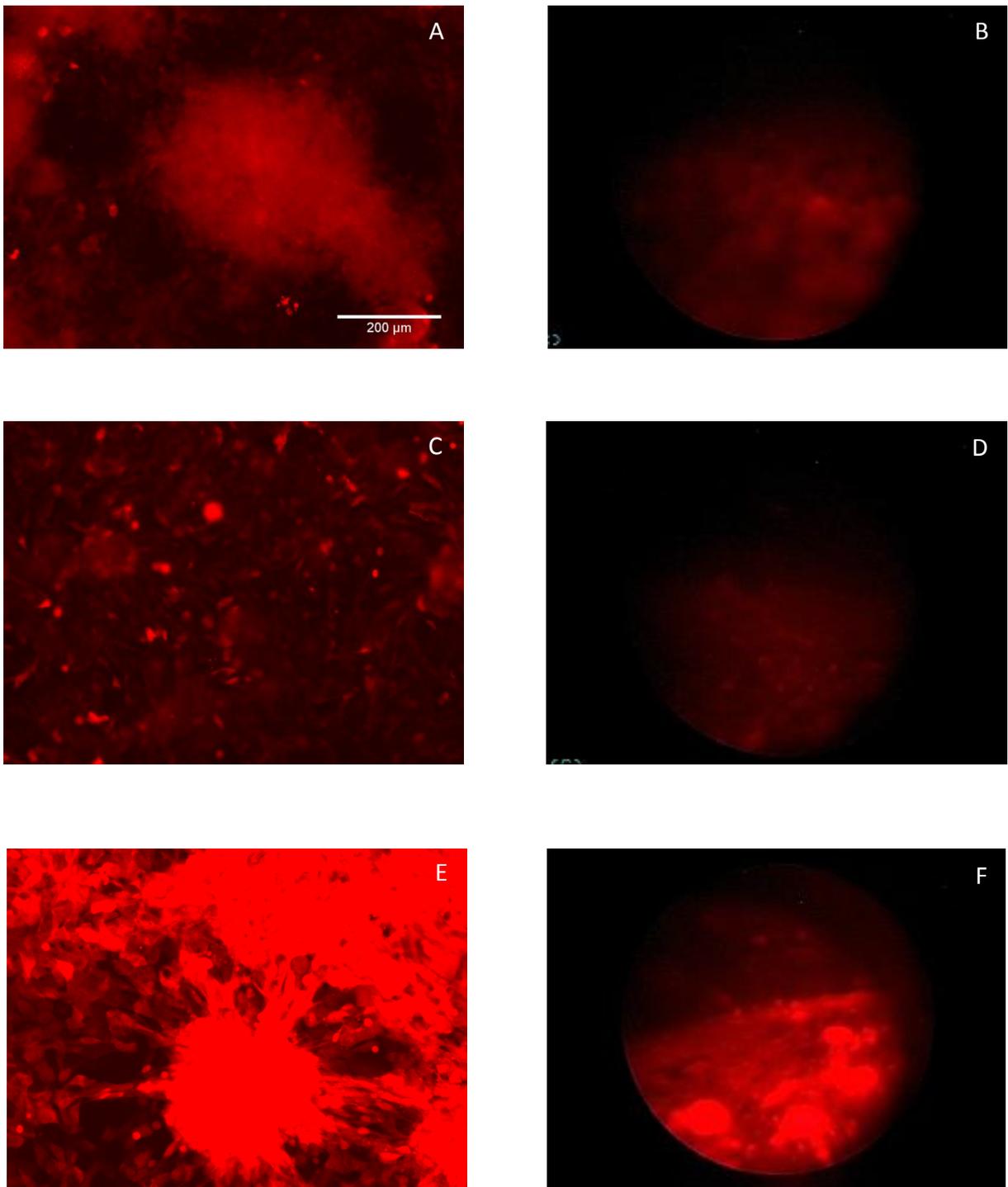


Abbildung 9: Aufnahmen der Zellen nach 3 Monate Inkubation

LS174FP635: mikroskopisch (A), endoskopisch (B), SW480FP635: mikroskopisch (C), endoskopisch (D), SK-MES1FP635: mikroskopisch (E), endoskopisch (F). Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einer Belichtungszeit von 1000 ms mittels 10x Objektiv des Olympus IX-81 Mikroskops gemacht. Die endoskopischen Aufnahmen erfolgten mit einer Xenonlichtquelle mit Stablinsenendoskop (d=2 mm). Die Kamera wurde auf die maximale Belichtung eingestellt.

5.3 Charakterisierung des Fluoreszenzproteins TurboFP635

5.3.1 Ausbleichverhalten des Fluoreszenzproteins

Zur Durchführung fluoreszenzendoskopischer Untersuchungen im Tiermodell waren folgende Fragen zu beantworten:

- a) Wie stabil ist die Fluoreszenz in den Zellen bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge?
- b) Wird nach dem Ausbleichen neues Protein in den Zellen synthetisiert?

Um das Verhalten des Proteins unter Lichteinfluss zu analysieren, wurden fluoreszierende SK-MES1FP635-Zellen *in vitro* im Fluoreszenzmikroskop mit einer Wellenlänge von 530-550 nm und einer Leistung von $0,8 \text{ W/cm}^2$ 35 Minuten permanent belichtet. Die Zellfluoreszenz wurde im Abstand von 5 Minuten fotografisch dokumentiert. Um das Regenerationsverhalten der Fluoreszenz nach abgeschlossenem Ausbleichen zu beobachten, wurden die so behandelten SK-MES1FP635 über 40 Stunden in Abständen von jeweils 15 Minuten fotografiert. Während des gesamten Versuchs standen die Zellen unter regulärem Kulturmedium bei einer Atmosphäre von 5 % CO_2 und 37 °C. Zur Verhinderung der Zellteilung wurde zudem 20 Stunden vor Versuchsbeginn zum Wachstumsmedium Thymidin gegeben. Hierdurch wurde die Beobachtung der gleichen Zellen über den gesamten Zeitraum des Experiments gewährleistet.

Zur Beurteilung des Fluoreszenzverhaltens wurde die Fluoreszenz der Zellen vor der Belichtung als 100 % definiert, die Fluoreszenz der behandelten Zellen wurde hierzu prozentual ins Verhältnis gesetzt.

Innerhalb der ersten 5 Minuten der Belichtung war eine leichte Zunahme der Fluoreszenz zu beobachten. Im weiteren Verlauf nahm die Fluoreszenz erwartungsgemäß ab. Nach 35 Minuten Belichtung reduzierte sich die Fluoreszenzintensität auf 38 % (Abbildung 10C) und war somit kaum noch sichtbar (Abbildung 10B). In der Regenerationsphase nahm die Fluoreszenz wieder zu (Abbildung 10D), bis sie nach 40 Stunden wieder 68 % des Ausgangswertes erreicht hatte (Abbildung 10E).

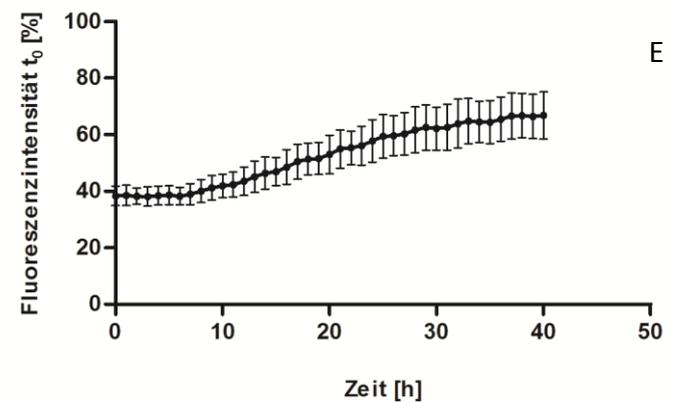
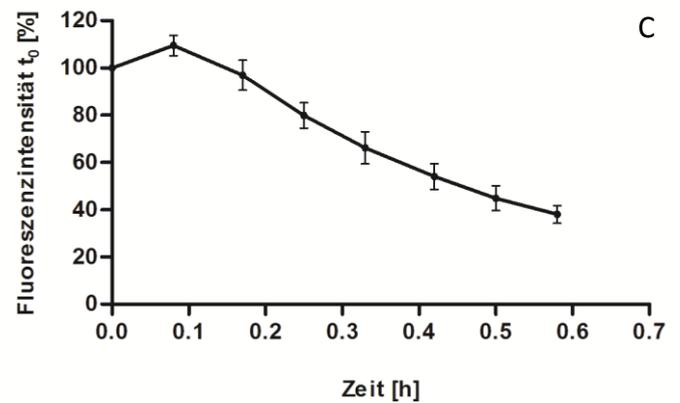
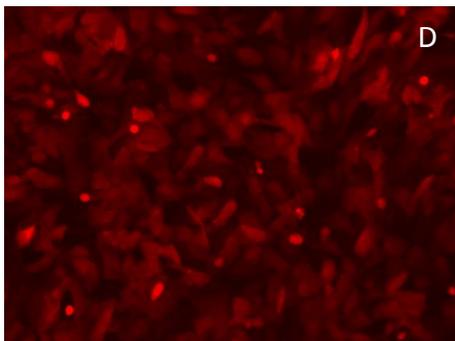
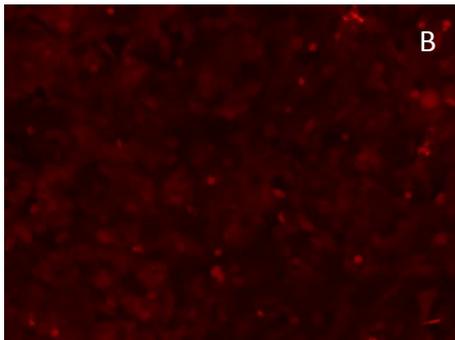
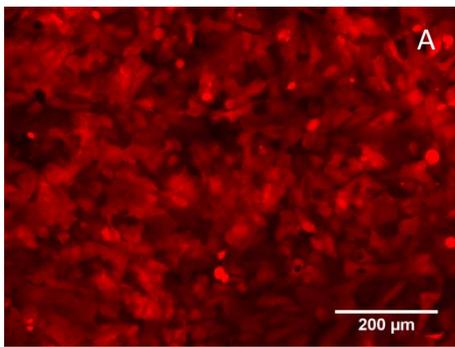


Abbildung 10: Verhalten des Fluoreszenzproteins in den SK-MES1FP635 Zellen unter Lichteinfluss

Zellen vor der Belichtung (A), Zellen nach 35 Min permanenter Belichtung (B), graphische Darstellung der Fluoreszenzabnahme während des Ausbleichens, $n=3$ (C), ausgebleichte Zellen nach 42 Std Regeneration (D), graphische Darstellung der Fluoreszenzzunahme während der Regenerationsphase, $n=3$ (E).

5.3.2 Einfluss von Zellfixierungsmaßnahmen auf das Fluoreszenzverhalten von TurboFP635

Die histologische Beurteilung des Tiergewebes nach der Zellimplantation sollte durch einen visuellen Nachweis des Fluoreszenzproteins erfolgen. Um ein optimales Fixierungsverfahren zu ermitteln, die eine Gewebeeinbettung unter Erhaltung der Fluoreszenz erlauben würde, wurden an konfluent gewachsenen SK-MES1FP635-Zellen verschiedene Fixierungs- und Einbettungsmethoden erprobt. Die Testreihen wurden fortlaufend fotografisch dokumentiert und die Fluoreszenz wurde anhand der Grauwerte der Bilder unter Verwendung der Bildverarbeitungssoftware FIJI bestimmt.

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Cryoeinbettung und der Behandlungen mit unterschiedlichen Fixantien dargestellt.

Nach Cryoeinbettung im *TissueTec* Medium war keine Fluoreszenz mehr sichtbar (Abbildung 11B). Bei Inkubation der Zellen mit Zink-Fixativ oder 4 % PFA sank die Fluoreszenz bereits nach der ersten Stunde auf 40 bzw. 30 % des Ausgangswertes ab (Abbildung 11D und F). Nach drei Stunden war in beiden Fällen ein Wert nahe 30 % erreicht und die Fluoreszenz war kaum mehr sichtbar (Abbildung 11C und E). Im Gegensatz dazu wurde bei Verwendung von Glutaraldehyd-Fixativ nach 3 Stunden eine hohe Fluoreszenzintensität beobachtet (Abbildung 11G). Allerdings wiesen auch die untransfizierte Kontrollzellen nach Inkubation mit Glutaraldehyd-Fixativ eine vorher nicht vorhandene Fluoreszenz auf (Abbildung 11H). Hier muss also von einer hohen unspezifischen Fluoreszenz unter diesen experimentellen Bedingungen ausgegangen werden, was diese Fixierungsmethode für unsere Zwecke ungeeignet macht. Bei der Verwendung von PLP als Fixativ wurden während der Fixierung sogenannte *blebs* gebildet (Abbildung 11I): das Fluoreszenzprotein trat offenbar aus den Zellen in das umgebende Medium. Auch dieser Effekt macht eine korrekte Auswertung unmöglich und diese Methodik für eine Analytik der fluoreszierenden Tumorzellen im Gewebe unbrauchbar.

Zusammengenommen zeigten die Fixierungs-Experimente mit transfizierten Zellen, dass keines der standardmäßig in histologischen Untersuchungen verwendeten Verfahren auf TurboFP635-enthaltende Proben unter Erhalt der Fluoreszenz angewendet werden kann.

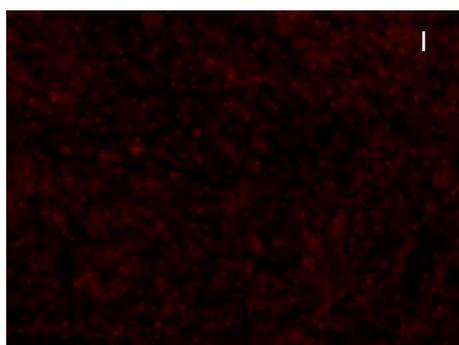
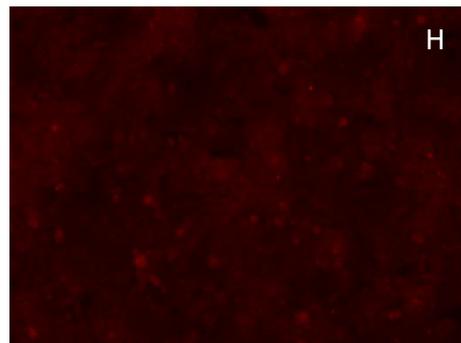
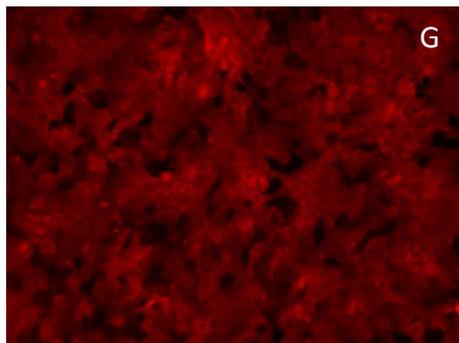
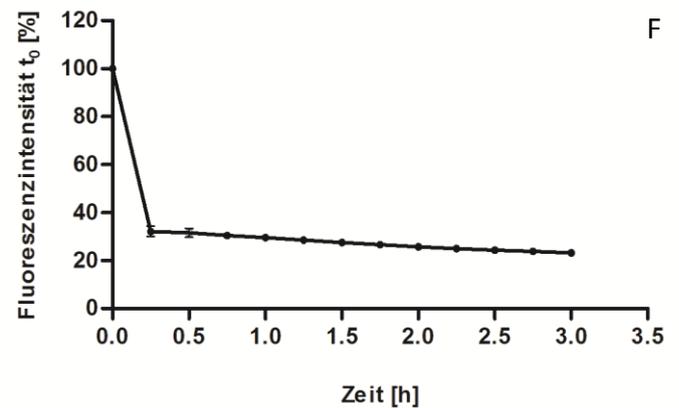
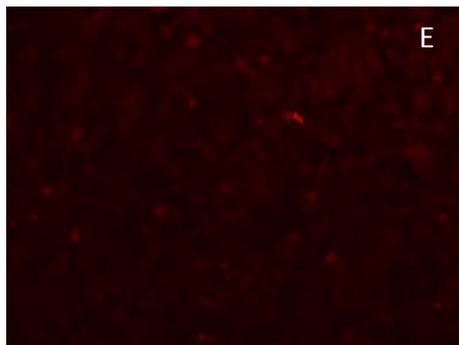
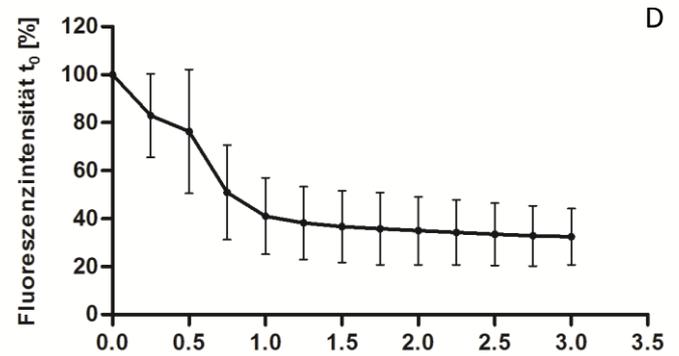
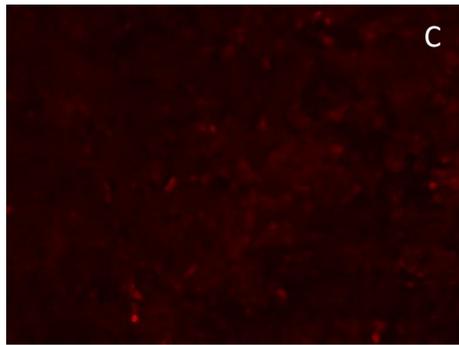
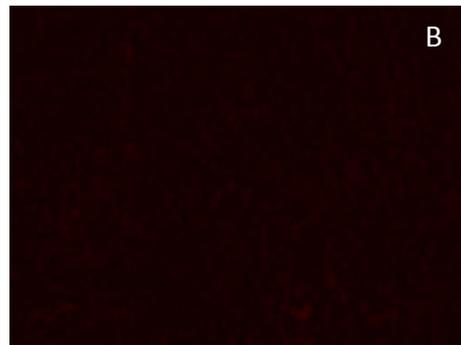
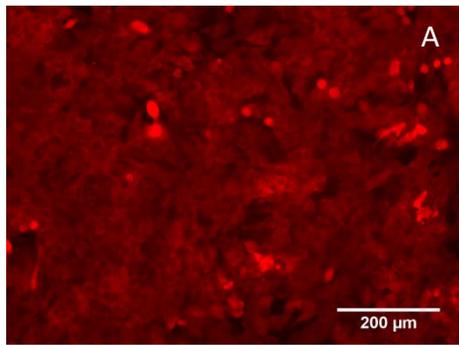


Abbildung 11: Abnahme der Fluoreszenz in den SK-MES1FP635 Zellen während der Zellfixierung

Unbehandelte Zellen (A), nach Cryoeinbettung (B), 3 Stunden in Zink-Fixativ (C), in PFA 4 % (E), in Glutaraldehyd-Fixativ SK-MES1FP635 (G), untransfizierte SK-MES1 in Glutaraldehyd-Fixativ (H), SK-MES1FP635-Zellen in PLP-Fixativ (I). Graphische Darstellung der Fluoreszenzabnahme während der Zellfixierung mit Zink-Fixativ, $n=3$ (D) und mit PFA 4 %, $n=3$ (F).

5.4 Charakterisierung der verwendeten Endoskope *in vitro*

Neben der Etablierung eines orthotopen Tumormodells war es eine der Hauptaufgaben des Projektes, die von der Firma Karl Storz GmbH zu Verfügung gestellte Endoskope zu validieren. Hierfür sollte zunächst *in vitro* unter Verwendung der zuvor charakterisierten Zellen die endoskopische Nachweisgrenze bestimmt werden.

In Rahmen des Projektes wurde ein Endoskopsystem mit konventioneller Xenon-Lichtquelle, und ein auf schnell schaltbaren Laserdioden basierendes Mehrkanal-Endoskopsystem eingesetzt. Während das Xenon-basierte System ein manuelles Schalten von Weißlicht in den Fluoreszenz-Beobachtungsmodus erforderte, war mit dem Laserdioden-basierten Mehrkanal-Endoskopsystem eine parallele Erfassung eines Weißlichtbildes und zusätzlich zweier Fluoreszenzbilder möglich.

Bei der Verwendung einer Xenon-Lichtquelle wird für die Fluoreszenzendoskopie in die Lichtquelle ein optischer Sperrfilter eingeschwenkt. Der erste Filter stellt Licht im Wellenlängenbereich von 506 - 594 nm zu Anregung des TurboFP635-Fluoreszenzproteins der transfizierten Zellen zur Verfügung. Ein zweiter Filter liefert Licht im Bereich von ca. 380 - 431 nm zur Anregung der Kontrastmittel. Die dazu komplementären Beobachtungsfiler transmittieren entsprechend > 620 nm für den ersten Filter (intrinsische Fluoreszenz der Zellen), bzw. > 450 nm für den zweiten Filter (Fluoreszenz des Kontrastmittels). Die Verwendung des Weißlichtmodus sowie der jeweiligen Anregungs- und Detektionsfilter ist nur getrennt, für die jeweiligen Fluoreszenzen möglich.

Das Prinzip des verwendeten Mehrkanal-Endoskopsystems beruht auf quasi-simultaner Beobachtung des Weißlichts und unterschiedlicher Fluoreszenzen in getrennten Kanälen. Die unterschiedlichen Beleuchtungsmodi werden anhand der elektronischen Nacheinanderschaltung der integrierten Laser verwirklicht. Das Weißlichtbild wird durch simultane Einstrahlung von Licht aus drei Lasern (blau, 450 nm, rot, 635 nm, und grün, 532 nm) erzeugt. Zur Anregung des Fluoreszenzproteins der transfizierten Zellen wird ein Laser bei einer Wellenlänge von 589 nm und der Fluoreszenz der Kontrastmittel bei einer Wellenlänge von 405 nm Kamerasynchron angesteuert. Ein vor der Kamera platzierter Kerbfilter blockiert selektiv reflektiertes Laserlicht und ermöglicht somit eine parallele Weißlicht-/Fluoreszenz-Darstellung aller drei Modi (s. Abbildung 3). Bei den Endoskopen wurde entweder ein Endoskop mit geordnetem Faserbündel ($d=1,2$ mm) oder ein Stablinsenendoskop ($d=2$ mm) verwendet.

5.4.1 Fluoreszenzendoskopische Nachweisbarkeit der transfizierten Tumorzellen

Für die *in vitro* Experimente sollte versucht werden, die *in vivo*-Situation eines Tumors zu simulieren. Dies sollte durch Suspendieren der Zellen in flüssigem Matrigel und anschließendem Aushärten in eine dreidimensionale Struktur erreicht werden. Zur Ermittlung der Nachweisgrenze des Fluoreszenzendoskops wurden 1 µl Matrigel-Tropfen mit unterschiedlicher Zahl an SK-MES1FP635-Zellen mit einem Stablinsenendoskop (d=2 mm) untersucht.

Während der Endoskopie ließen sich die 1 mm³ großen Klumpen gut detektieren. Die stärkste Fluoreszenz wurde bei der Zellzahl 1x10⁵ beobachtet (Abbildung 12A), 1x10⁴ Zellen lieferten ebenfalls eine starke Fluoreszenz und waren gut detektierbar (Abbildung 12B). Bei einer Zellzahl von 1x10³ war die Gesamtfluoreszenz schwächer, jedoch immer noch gut sichtbar (Abbildung 12C). Selbst bei unter 100 Zellen konnte die Fluoreszenz noch detektiert werden und sogar einzelne fluoreszierende Ereignisse waren zu erkennen (Abbildung 12D).

5.4.2 Einzelzellnachweis

Um dies detaillierter zu untersuchen und die Einzelzellnachweisgrenze zu definieren, wurden SK-MES1FP635 Zellen durch Trypsinieren vereinzelt und exakt ausgezählt. Die Zellen wurden dann in Matrigel in einer Konzentration von 30 Zellen/1 µl aufgenommen. 1-µl-Tropfen wurden sowohl mikroskopisch als auch endoskopisch untersucht und jeweils die Anzahl an zu detektierenden Zellen bestimmt, wobei während der mikroskopischen Analyse alle Ebenen des dreidimensionalen Tropfens untersucht wurden.

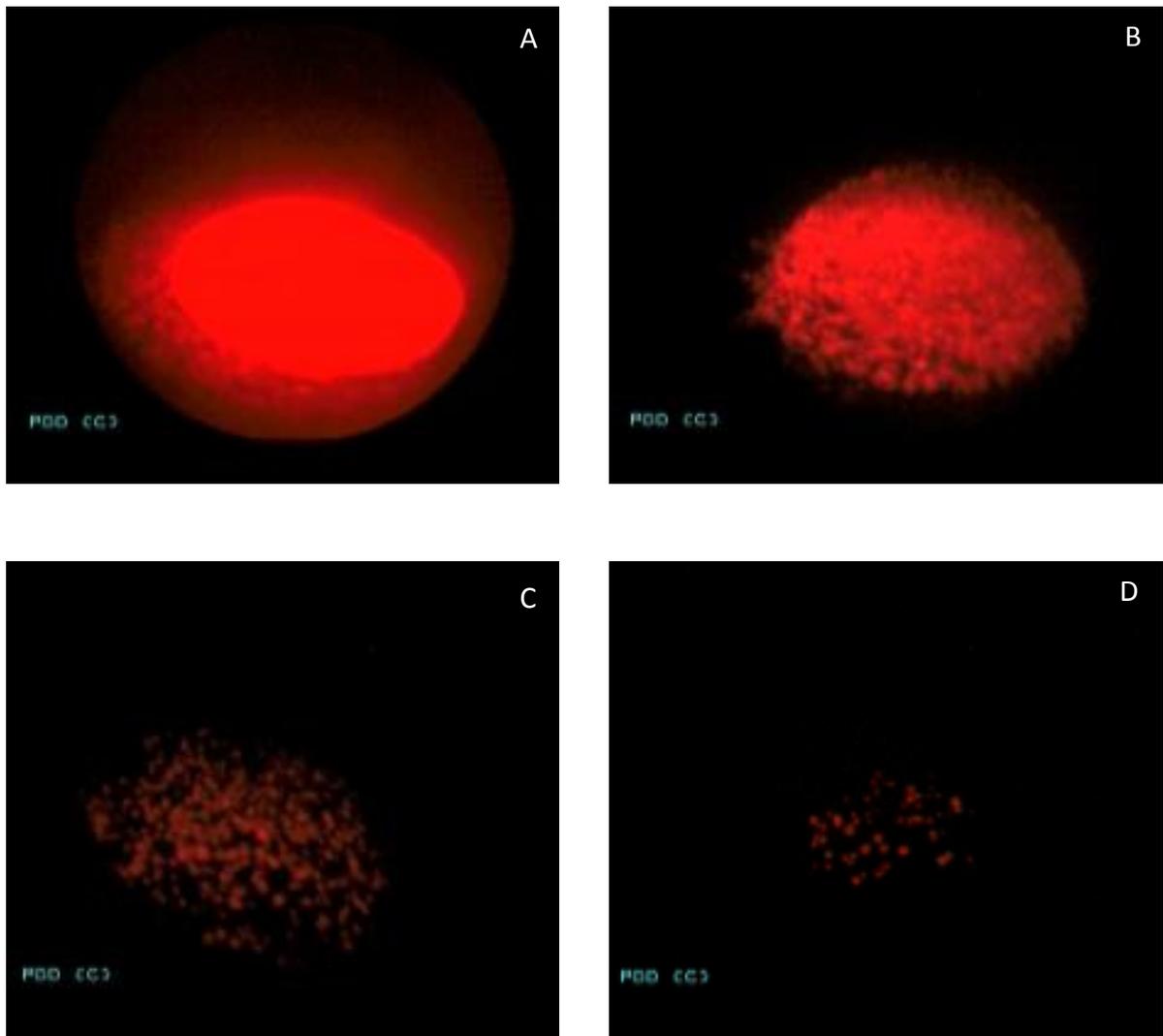
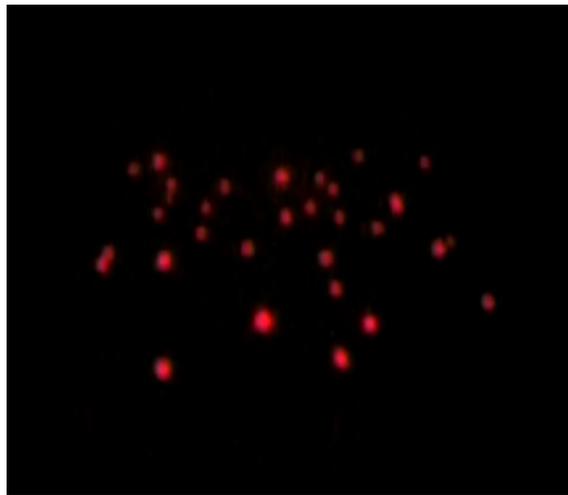


Abbildung 12: Sensitivität des Mehrkanal-Endoskopsystems mit Stablinsenendoskop

SK-MES1FP635 Zellen in 1 μ l Matrigel in unterschiedlicher Konzentration: 1×10^5 Zellen (A), 1×10^4 Zellen (B), 1×10^3 Zellen (C), unter 100 Zellen (D). Der Laser für die Anregung des Fluoreszenzproteins TurboFP635 wurde auf die maximale Leistungsstärke, die Kamera auf die maximale Belichtungszeit eingestellt.



**Abbildung 13: Nachweis einzelner Zellen mit Xenon-basierten Systems mit Stablinse-
endoskop**

Momentaufnahme aus der Endoskopie

Die endoskopischen Aufnahmen wurden mit einem 2 mm dünnen Kleintierendoskop mit Stablinse durchgeführt. Einzelne Zellen waren sehr gut sichtbar (Abbildung 13). Nach der Auswertung der Momentaufnahmen aus den Videos zeigte sich eine hohe endoskopische Wiederfindungsrate. Insgesamt wurden mikroskopisch durchschnittlich 28,8 und endoskopisch 29,3 Zellen je untersuchtem Klumpen detektiert (Tabelle 6). Die maximalen Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Methoden lagen bei vier Zellen, wobei keine der unterschiedlichen Quantifizierungen (Mikroskop oder Endoskop) zu konstant höheren bzw. niedrigeren Zahlen führte.

Tabelle 6: Bestimmung der Zellzahl

Klumpen Nr.	Zellzahl Mikroskop	Zellzahl Endoskop	SD
1	34	32	
2	30	30	
3	34	37	
4	27	31	
5	29	26	
6	19	20	
Mittelwert	28,8	29,3	1,61

Ferner wurde überprüft, ob sich vereinzelte fluoreszierende Zellen in einem Zellrasen aus nicht-fluoreszierenden Zellen endoskopisch detektieren lassen. Dafür wurden Mischungen aus 5×10^5 untransfizierten SK-MES1- (ohne Fluoreszenzprotein) und 1×10^3 SK-MES1FP635-Zellen in eine 24-Kavitäten-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurde der Zellrasen mikroskopisch und im Anschluss endoskopisch untersucht (Abbildung 14).

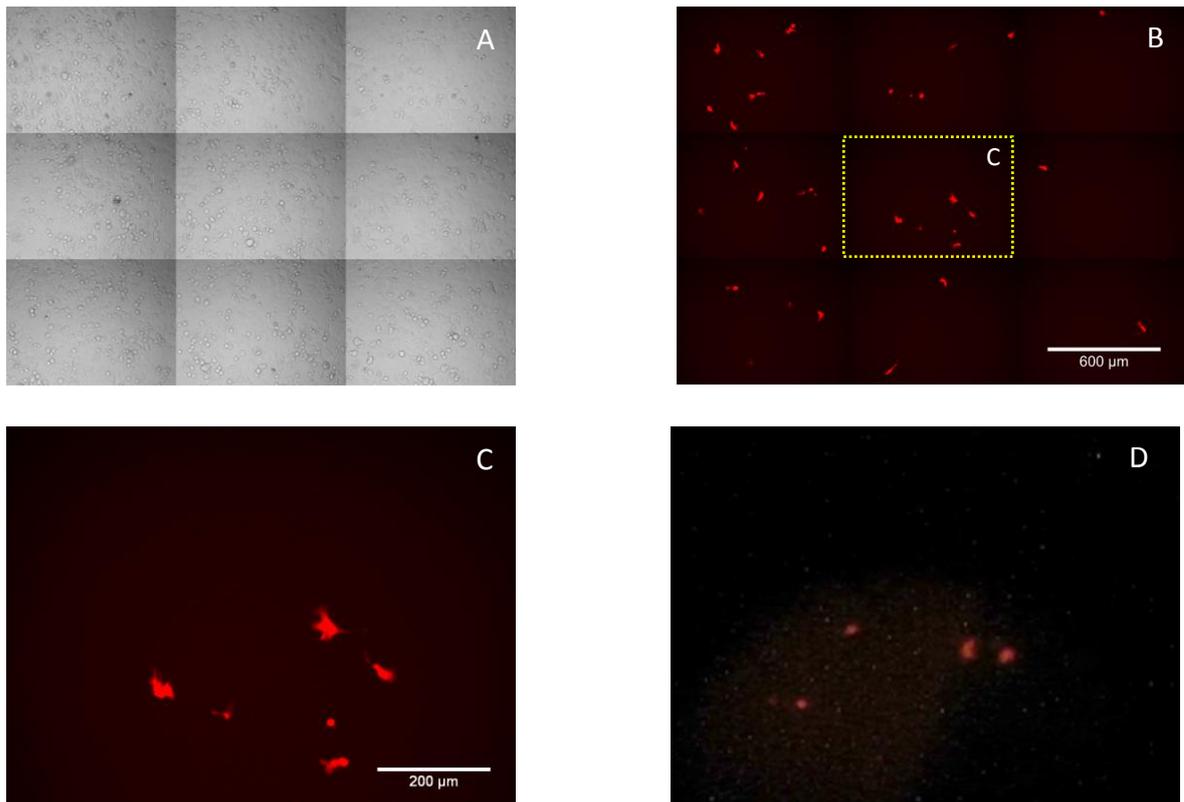


Abbildung 14: Einzelzellnachweis mittels Xenon-basierten Systems mit Stablinsenendoskop

Mikroskopische Aufnahme von vereinzelten fluoreszierenden SK-MES1FP635-Zellen in nicht fluoreszierendem SK-MES1-Zellrasen: Übersichtsbild Durchlicht (A), Fluoreszenzbild mit Rhodamin-Filter (B), Ausschnitt aus dem Übersichts-Fluoreszenzbild B (C), Momentaufnahme aus dem Endoskopie-Video der fotografierten Kavität (D).

5.5 Kontrastierung der Tumorzellen für endoskopische Untersuchungen *in vitro*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte weiterhin ermittelt werden, ob es möglich ist, spezifisch an die SK-MES1FP635-Tumorzellen bindende, fluoreszierende Kontrastmittel während einer endoskopischen Untersuchung zu detektieren. Zusätzlich sollte die Stabilität der Kontrastmittel-Fluoreszenz während einer endoskopischen Untersuchung geklärt werden.

Als Kontrastmittel mit selektiver Tumor-Anreicherung wurden 1) ein in der Literatur (Aina et al 2007) als lungentumorspezifisch beschriebenes Peptid („D1“, Sequenz: RGDLATLRQLAQEDGVVGVGR) und 2) der in der photodynamischen Tumorthherapie verwendete Photosensibilisator Radachlorin verwendet. Das Peptid wurde nach der Synthese mit dem Fluoreszenzfarbstoff ATTO495 versehen und erhielt dann die Bezeichnung „D1ATTO495“.

Für die endoskopischen Untersuchungen wurden konfluent gewachsene SK-MES1FP635-Tumorzellen für eine Stunde mit 10 μ M D1ATTO495- oder 50 μ g/ml Radachlorin-Lösung inkubiert, gewaschen und anschließend für drei Minuten unter permanenter Belichtung endoskopisch betrachtet und gefilmt. Sowohl nach der Behandlung mit D1ATTO495 als auch mit Radachlorin war eine deutliche Fluoreszenz im Endoskop zu detektieren (Abbildung 15A und B). Die Belichtungszeit für die Kamera des Endoskops wird abhängig von der Helligkeit der Fluoreszenz automatisch angepasst und ist während der endoskopischen Untersuchungen nicht konstant, was ein Vergleich der Fluoreszenzhelligkeiten nur bedingt erlaubt. Unter diesen Bedingungen wurde die Photostabilität der verwendeten Kontrastmittel untersucht, um Rückschlüsse auf eine *in vivo* Situation ziehen zu können.

Unter konstanter Bestrahlung nahm die unter Anpassung der Kamerabelichtungszeit ermittelte Fluoreszenz bei dem peptidischen Kontrastmittel in den ersten 90 Sekunden um ca. 10 % ab und war nach drei Minuten mit ca. 85 % des ursprünglichen Wertes noch gut detektierbar (Abbildung 15C und E). Unter Verwendung dieser Kamera während der Endoskopie *in vivo* ist eine für die Beobachtungszeit ausreichend lange Fluoreszenz des D1ATTO495-Peptids zu erwarten.

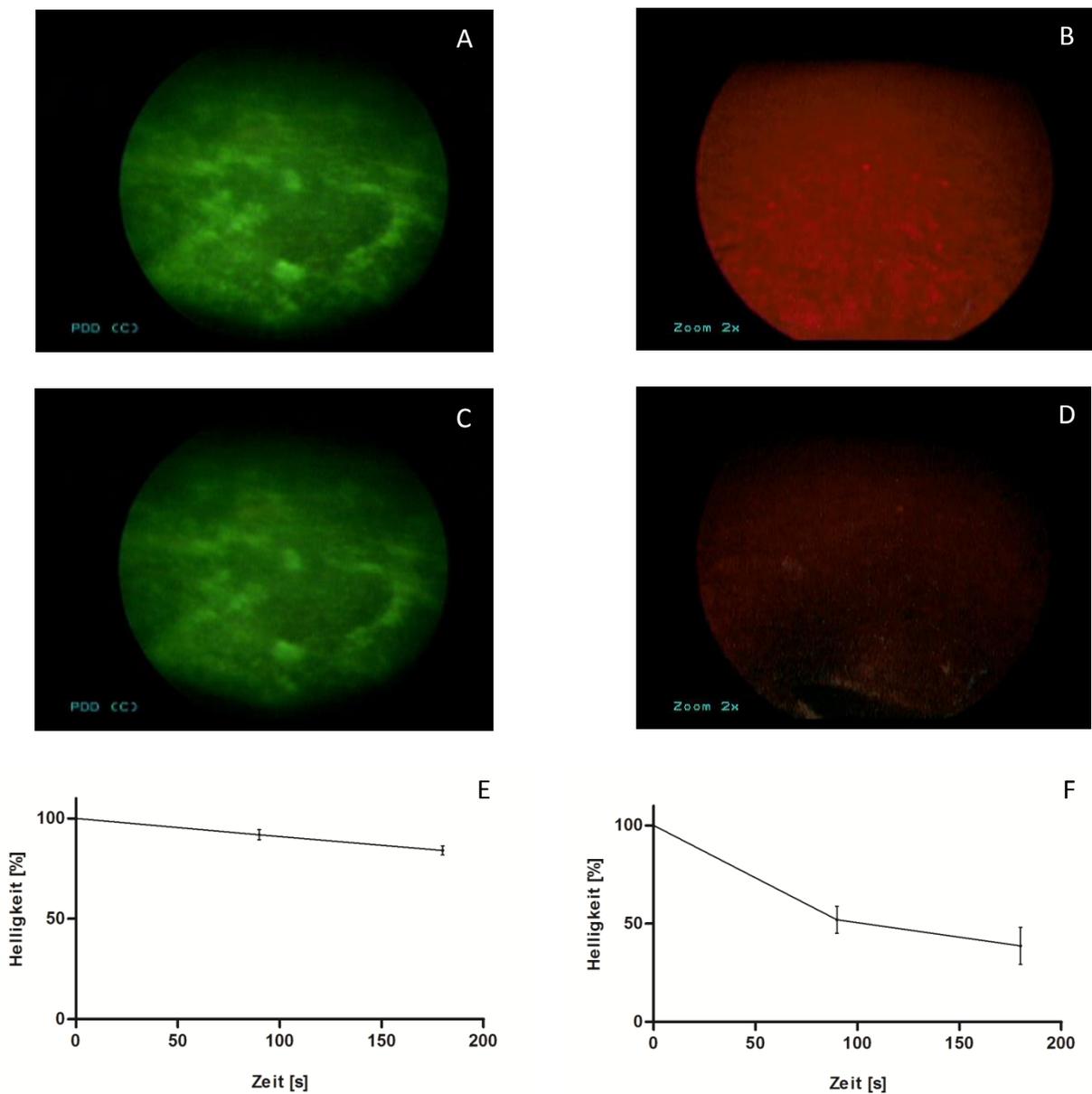


Abbildung 15: Aufnahme der Kontrastmittel durch und Stabilität in SK-MES1FP635-Zellen

Endoskopische Detektion der Kontrastmittelfluoreszenz nach 1 Stunde Inkubation mit dem Peptid D1ATTO495 (A, C, E) oder Radachlorin (B, D, F). Momentaufnahme aus dem Endoskopvideo unmittelbar zu Beginn (A, B) bzw. nach drei Minuten permanenter Belichtung (C, D). Graphische Darstellung der Helligkeitsveränderung von D1ATTO495, n=3 (E) und Radachlorin n=3 (F). Die Aufnahmen wurden mit einem Stablinsenendoskop (d=2 mm) mit Xenonlichtquelle (Anregungsfilter bis 431 nm, Kamerafilter zur Beobachtung der Fluoreszenz ab 450 nm; automatische Belichtungszeit) durchgeführt.

Im Falle des Radachlorins sank die Fluoreszenzintensität - trotz Anpassung der Kamerabelichtungszeit - innerhalb von 90 Sekunden auf ca. 50 % des ursprünglichen Wertes, nach drei Minuten waren die Zellen bei lediglich 38 % des Ausgangswerts kaum noch detektierbar (Abbildung 15D und F). Daraus lässt sich schließen dass Radachlorin einen stärkeren Fluoreszenzverlust bei Bestrahlung aufweist, was die Detektierbarkeit bei *in vivo* Untersuchungen erschweren kann.

Die präsentierten Zahlen können nicht als absolute Werte angesehen werden, sondern liefern nur Anhaltspunkte für das Verhalten der Fluoreszenz unter Verwendung der Endoskop-Kamera mit automatischer Belichtungszeit bei den Videoaufnahmen.

5.5.1 Validierung des Mehrkanalendoskops unter Verwendung von Kontrastmitteln

Unter Verwendung des neuartigen Mehrkanal-Endoskopsystems mit synchroner Beleuchtung und Bildaufnahme der Firma Karl Storz GmbH können Fluoreszenzaufnahmen bei unterschiedlichen Wellenlängen in getrennten Kanälen erstellt werden. Der hier verfügbare Demonstrator des Mehrkanal-Endoskopsystems war so ausgelegt, dass durch elektronische Nacheinander-Schaltung der für drei Beleuchtungsmodi vorgesehenen Laser die parallele Betrachtung eines Weißlichtbildes in einem Kanal, der Fluoreszenz der implantierten Zellen in einem zweiten und der Fluoreszenz der Kontrastmittel in einem dritten Kanal ermöglichte.

Zunächst wurde untersucht, ob die Markierung der Zellen, die mit dem zuvor beschriebenen D1ATTO495-Peptid oder Radachlorin erreichbar ist, eine für die Detektion im Mehrkanalendoskop ausreichende Fluoreszenzintensität liefert. Zusätzlich wurde analysiert, ob die Fluoreszenz des TurboFP635-Proteins, des D1ATTO495-Peptides und des Radachlorins sich in den dafür vorgesehenen Kanälen – und auch nur dort – detektieren lässt. Zu diesem Zweck wurden SK-MES1- und SK-MES1FP635-Zellen konfluent auf Deckgläschen wachsen gelassen. Nach Inkubation ohne oder mit Kontrastmittel (10 μ M D1ATTO495 für 60 min oder 50 μ g/ml Radachlorin für 90 Min) wurden die Zellen gewaschen und mit dem endoskopischen Mehrkanalsystem untersucht (Abbildung 17).

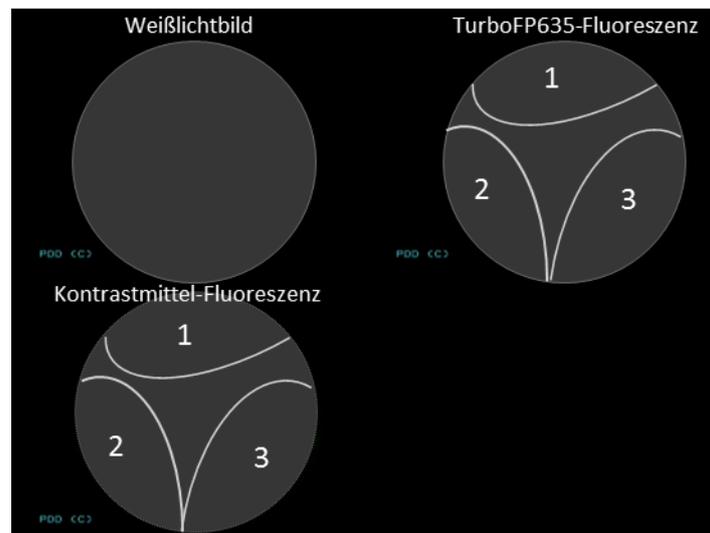


Abbildung 16: Versuchsanordnung zur vergleichenden Betrachtung unterschiedlich behandelter Zellen in drei Endoskop-Kanälen.

Schematische Darstellung der Deckgläschen bei Visualisierung durch die drei unterschiedlichen Farbkanäle im Mehrkanal-Endoskopsystem. Die Zahlen bezeichnen die mit unterschiedlich behandelten Zellen belegten Bereiche des Deckgläschens: SK-MES1FP635 mit TurboFP635-Protein, kein Kontrastmittel (Feld 1), SK-MES1 ohne TurboFP635-Protein, mit Kontrastmittel behandelt (Feld 2), SK-MES1FP635 mit TurboFP635-Protein, mit Kontrastmittel behandelt (Feld 3). Im Weißlicht-Kanal (Kreis oben links) ist aufgrund der schwarzen Unterlage kein Phasenkontrastbild erkennbar. Im TurboFP635-Kanal (Kreis oben rechts) sollte die intrinsische Fluoreszenz des TurboFP635-Proteins detektiert werden, im Kontrastmittel-Kanal (Kreis unten links) die Fluoreszenz des D1ATTO495-Peptides und des Radachlorins. Für das Weißlichtbild werden blauer (450 nm), roter (635 nm) und grüner (532 nm) Laser zusammen eingeschaltet. Zur Anregung der intrinsischen Fluoreszenz der transfizierten Zellen wird ein Laser von 589 nm und der Fluoreszenz der Kontrastmittel bei einer Wellenlänge von 405 nm Kamerasynchron angesteuert.

Die Auswertung der Endoskopaufnahmen zeigte, dass die Fluoreszenz des Proteinfluorophors in den unbehandelten SK-MES1FP635-Zellen tatsächlich nur im TurboFP635-Kanal zu detektieren ist (Abbildung 17A und B, Feld 1). Ein Übersprechen der TurboFP635-Fluoreszenz in den Kontrastmittelkanal war nicht erkennbar (Abbildung 17A und B, Kontrastmittelkanal, Feld 1). Im Gegensatz dazu war die Fluoreszenz der mit Kontrastmittel behandelten, Proteinfluorophor-freien SK-MES1-Zellen nur im Kontrastmittelkanal zu detektieren (Abbildung 17A, B, Feld 2). Ebenso war bei den mit Kontrastmittel behandelten, Proteinfluorophor-tragenden SK-MES1FP635-Zellen die intrinsische Fluoreszenz des Proteins klar getrennt von der Fluoreszenz des Kontrastmittels (Abbildung 17A, B, Feld 3). Ein Übersprechen der TurboFP635-Fluoreszenz in den Kontrastmittel-Kanal und umgekehrt wurde weder bei Verwendung des D1ATTO495-Peptids noch bei Radachlorin beobachtet.

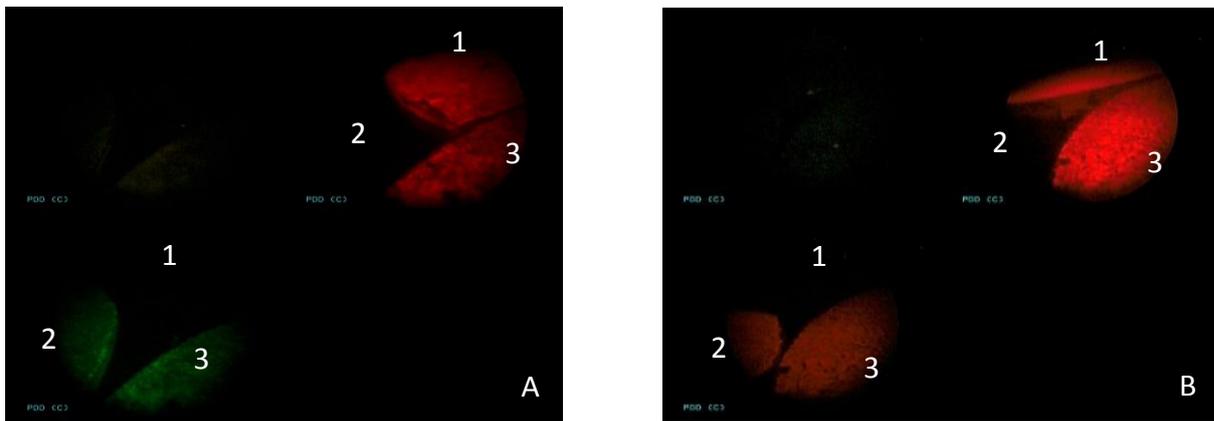


Abbildung 17: Evaluation des endoskopischen Dreikanalsystems an kultivierten Zellen nach Kontrastmittelbehandlung

Bilder aus Videoaufnahmen mit dem endoskopischen Dreikanalsystem. Zellen wurden für eine Stunde mit D1ATTO495-Peptid (A) oder für eineinhalb Stunden mit Radachlorin (B) behandelt. SK-MES1FP635-Zellen mit intrinsischer Fluoreszenz des Proteins unbehandelt (Feld 1), mit Kontrastmittel behandelt (Feld 3), SK-MES1 ohne TurboFP635-Protein mit Kontrastmittel behandelt (Feld 2). Die Leistung der Laser für TurboFP635 und das Kontrastmittel wurde bei diesen Untersuchungen auf Maximum gestellt.

Durch die simultane Bildaufnahme der unbehandelten SK-MES1FP635-Zellen (Fluoreszenz ausschließlich im TurboFP635-Kanal), der behandelten SK-MES1FP635-Zellen (Fluoreszenz im TurboFP635-Kanal und Kontrastmittel-Kanal) und der behandelten SK-MES1-Zellen (Fluoreszenz im Kontrastmittel-Kanal, aber keine Fluoreszenz im TurboFP635-Kanal) konnte gezeigt werden, dass eine klare Unterscheidung der verschiedenen Fluoreszenzentitäten erreicht wird.

5.6 Etablierung eines orthotopen Tumormodells

Als Zielspecies für die Etablierung eines orthotopen Tumormodells wurden RNU-Ratten gewählt, da sie aufgrund einer Immundefizienz die implantierten humanen Tumorzellen nicht abstoßen können. Für diese Tiere sollte in einer Pilotstudie eine optimale Implantationsmethode für die zuvor *in vitro* charakterisierten, humanen Tumorzellen gefunden werden. Außerdem sollte die Tumorentwicklung beobachtet und aus ihrem Verlauf die optimale Versuchsdauer und die Endoskopiefrequenz ermittelt werden. Im Laufe der gesamten Pilotstudie wurde für die Endoskopien ein Kleintierendoskop mit geordnetem Faserbündel oder ein Stablinsenendoskop mit Xenonlichtquelle verwendet.

5.6.1 Enzymatische Reizung der Schleimhäute

Um die Anwachsrate der Zellen nach Implantation zu erhöhen, sollten die Schleimhäute des Zielorgans mit Trypsin gereizt werden ohne das Gewebe irreversibel zu schädigen. Daher wurden zunächst aus Versuchstieren isolierte Gewebestücke unter physiologischen Bedingungen mit 1 mM Trypsin inkubiert (s. 4.5.1) und nachfolgend elektronenmikroskopisch analysiert, um die Wirkung des Trypsin auf das Gewebe *in vivo* abzuschätzen.

Anhand der erhaltenen EM-Bilder (Abbildung 18) konnte man eine deutliche Veränderung an den Schleimhäuten des mit Trypsin behandelten Darms erkennen. Im Kontrollgewebe (Abbildung 18A) liegen die Zellen dicht beieinander, die *tight junctions* sind vorhanden und die Zellorganellen sind erkennbar. Das mit Trypsin behandelte Gewebe weist hingegen eine aufgelockerte Struktur mit schwer erkennbaren Organellen und *tight junctions* auf (Abbildung 18B).

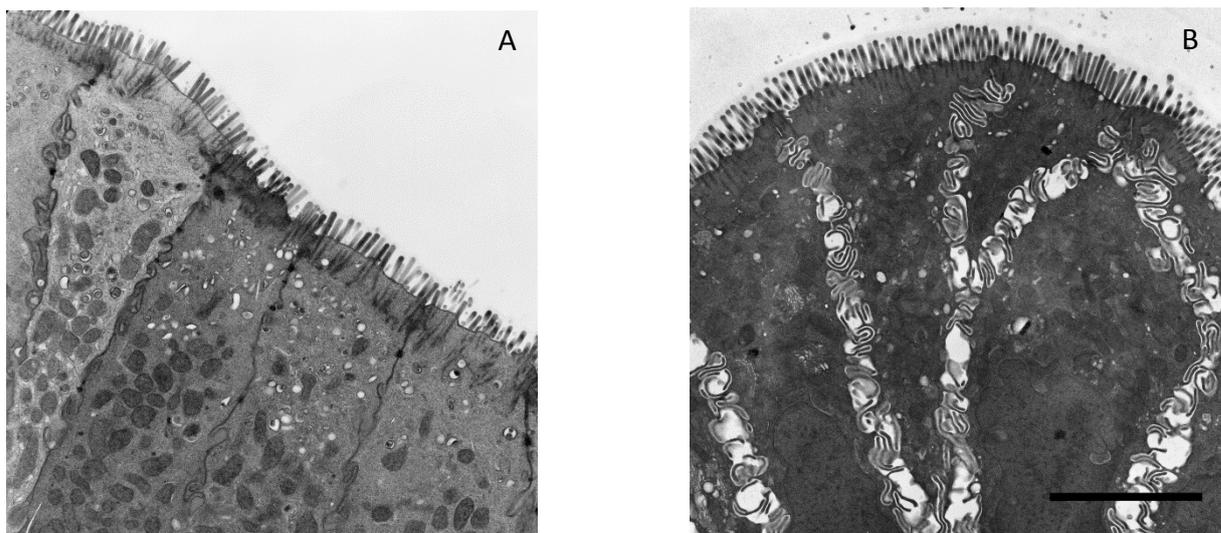


Abbildung 18: Trypsinbehandlung des Gewebes

Darmgewebe der Ratte: unbehandelt (A), behandelt mit 1 mM Trypsin (B). Balken: 4 µm.

5.6.2 Zellimplantation

Im Rahmen der Pilotstudie wurden Zellimplantationen mit unterschiedlicher Schleimhautvorbehandlung getestet. Die Schleimhäute des Zielorgans wurden mit entweder 1 mM oder 0,1 mM Trypsinlösung gereizt oder es fand keine Trypsinvorbehandlung statt. Außerdem wurden die Zellen vor der Implantation entweder nur im Medium oder mit Zugabe von Matrigel aufgenommen.

Für die Etablierung eines orthotopen Darmtumormodells wurden insgesamt 15 RNU Ratten mit Zellen der humanen Linie LS-174TFP635 und 15 Ratten mit Zellen der Linie SW480FP635 (s. Tabelle 2) inokuliert. Für die Zellimplantation in den Darm wurden die Tiere jeweils mit Sevofluran betäubt, sodann durch Injektion in den Enddarm fakultativ mit Trypsin behandelt und nachfolgend mit einer Zellsuspension (4×10^6 bis 1×10^7 Zellen pro Tier) inokuliert.

Die Versuche zur Etablierung eines orthotopen Lungen-Tumormodells wurden mit der humanen Zelllinie SK-MES1FP635 durchgeführt (s. Tabelle 3). Die Zellimplantation erfolgte unter Ketamin-Xylazin-Narkose. Die Trypsinlösung und nachfolgend die Zellsuspension (7×10^4 bis 9×10^5 Zellen pro Tier) wurden in die obere Trachea injiziert. Durch die aufrechte Haltung der Tiere während des Inokulationsvorgangs konnten die injizierten Flüssigkeiten in der Luftröhre nach unten laufen.

5.6.3 Endoskopie

Das Anwachsen der Tumorzellen und die Entwicklung von Tumoren wurden durch endoskopische Untersuchungen der inokulierten Organe in Abständen von 7 bis 28 Tagen über einen Maximalzeitraum von 16 Wochen verfolgt. Im Laufe der 16-Wöchigen Versuchsdauer wurden alle Tiere sowohl einer Weißlicht- als auch Fluoreszenzendoskopie unterzogen. Bei den endoskopischen Untersuchungen wurde ein Xenon-basiertes System verwendet, wobei für die fluoreszenzendoskopischen Untersuchungen ein Einschwenkfilter für das TurboFP635-Protein der Zellen eingesetzt wurde (s. 4.2).

5.6.3.1 Koloskopie

Zwei Wochen nach der Zellimplantation in den Darm wurden alle Tiere das erste Mal endoskopisch untersucht. Die Koloskopien wurden unter Sevofluranatmosphäre durchgeführt (s. 4.6.2.1). Während der Koloskopien wurden die Schleimhäute des Darmes auf die Entwicklung eines Tumors nach der Zellimplantation geprüft.

Mit Weißlichtendoskopie wurden in allen 15 mit LS-174TFP635- oder SW480FP635-Zellen inokulierten Tiere im Zeitraum von 14 Tage bis 16 Wochen nach der Inokulation minimale Veränderungen der Darmschleimhäute beobachtet. Es konnte kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Implantationsmethoden festgestellt werden (Abbildung 19).

Wenige Tiere wiesen kleine blutige Stellen auf, die bei den folgenden Endoskopien nicht mehr detektierbar waren. Lediglich bei einer Ratte wurde die Entwicklung einer polypenartigen Struktur festgestellt (Abbildung 19C).

In der Fluoreszenzendoskopie konnten die verdächtigen Stellen jedoch nicht als fluoreszierende Tumore identifiziert werden. Weder eine Trypsinvorbehandlung noch die Verwendung von Matrigel bei der Zellimplantation lieferten einen Vorteil für die Entwicklung eines Tumors im Darm der Tiere. Zudem erzeugte keine der beiden zur Transplantation vorgesehenen Zelllinien ein sichtbar besseres Ergebnis. Hohe Hintergrundfluoreszenz im Darm und nicht vollständig entfernbare Kotreste erschwerten zusätzlich die Beurteilung der Veränderungen.

5.6.3.1 Bronchoskopie

Während der Bronchoskopie wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den verwendeten Implantationsmethoden beobachtet. In der Trachea jener Tiere, die Zellen ohne Matrigel erhalten hatten, konnte innerhalb von 16 Wochen Versuchsdauer kein sichtbarer Tumor in der Trachea identifiziert werden. Während der Weißlichtendoskopie waren nur leichte Veränderungen an den Schleimhäuten der Trachea erkennbar (Abbildung 20A). Diese konnten fluoreszenzendoskopisch nicht als fluoreszierende Tumore bestätigt werden. Endoskopisch konnte auch kein Einfluss der unterschiedlichen Trypsin-Vorbehandlungen der Schleimhaut auf die Tumorbildung gefunden werden. Im Gegensatz dazu, zeigten Tiere, welche eine Zell-Matrigel-Mischung bekommen hatten, ab der ersten Bronchoskopie (2 Wochen nach Inokulation) ein Anhaften der Zellen auf den Schleimhäuten der Trachea. Es wurden deutlich sichtbare Klumpen an der Tracheawand der Ratte beobachtet (Abbildung 20B). Auch nach mehreren Wochen waren diese Klumpen noch sichtbar, wobei mit der Zeit eine zunehmende Verflachung beobachtet werden konnte (Abbildung 20C).

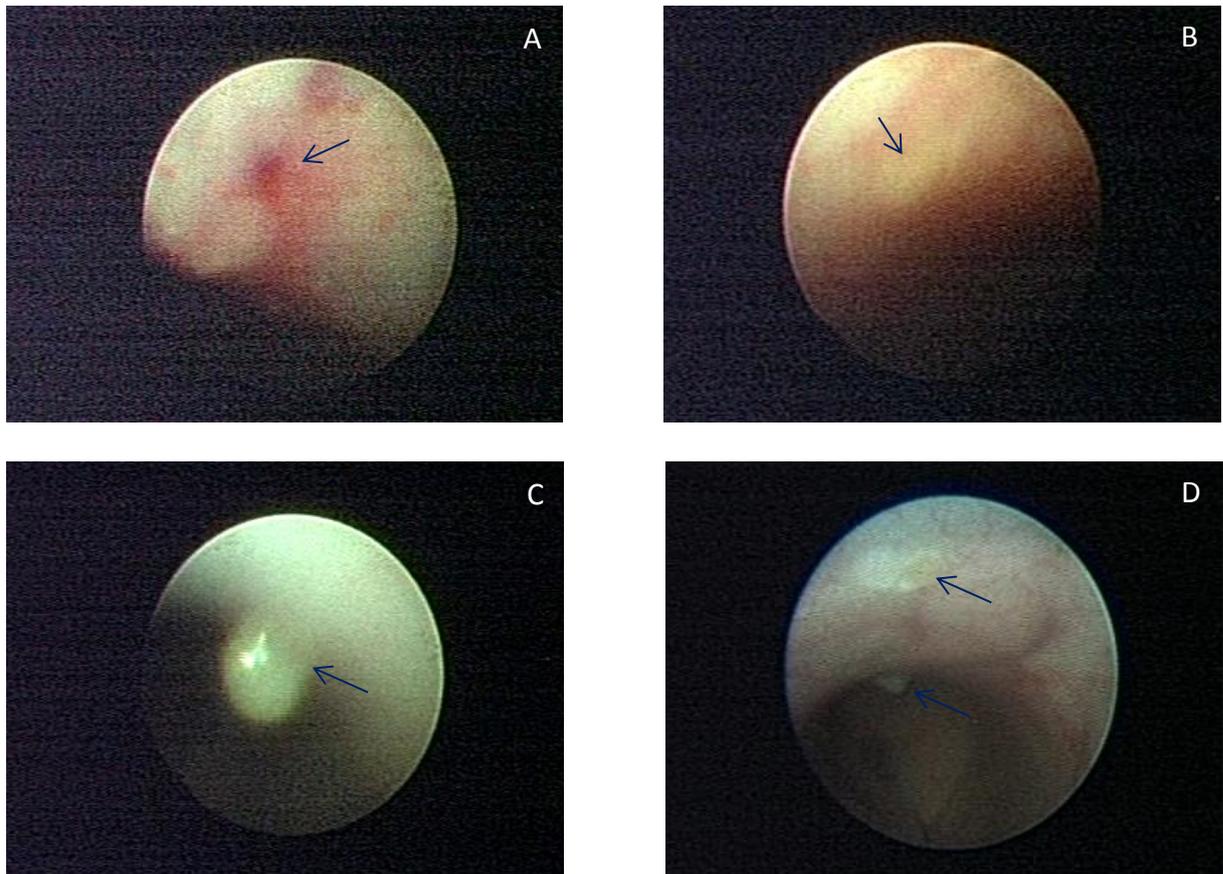


Abbildung 19: Endoskopische Untersuchung des Tumorwachstums nach Zellinokulation

Momentaufnahmen aus Endoskopien mit Stablinsen-Endoskop: (A, C): 16 Wochen nach Implantation von LS-174TFP635-Zellen; mit Schleimhautvorbehandlung mit 1 mM Trypsin (A) oder ohne Vorbehandlung (C); (B, D): 13 Wochen nach Implantation von SW480FP635 Zellen; mit Schleimhautvorbehandlung mit 0,1 mM Trypsin (B) bzw. ohne Vorbehandlung (D). Pfeile markieren auffällige Stellen.

Nach 14 Wochen gab es nur wenige ausgeprägte Erhebungen und mehrere Stellen mit einer deutlichen Veränderung. Während der Fluoreszenzbronchoskopie konnten die verdächtigen Stellen als implantierte Zellen mit roter Fluoreszenz bestätigt werden (Abbildung 20C und D). Je nach Größe des Klumpens in der Trachea und Zeitraum nach der Zellimplantation wurden Bereiche mit Fluoreszenz unterschiedlicher Intensität beobachtet. Die Fluoreszenzstärke korrelierte mit der Größe des Klumpens im Weißlichtmodus. Je flacher die Erhebungen wurden, desto schwächer war die Fluoreszenz.

Nach maximal 16 Wochen wurden die Tiere getötet. Teile der tumortragenden Organe wurden für die PCR-Analyse entnommen. Während der Präparation wurden an der Lunge mehrere weiße knotenartige Stellen beobachtet (Abbildung 21A, B), welche ebenfalls der PCR-Analyse zugeführt wurden.

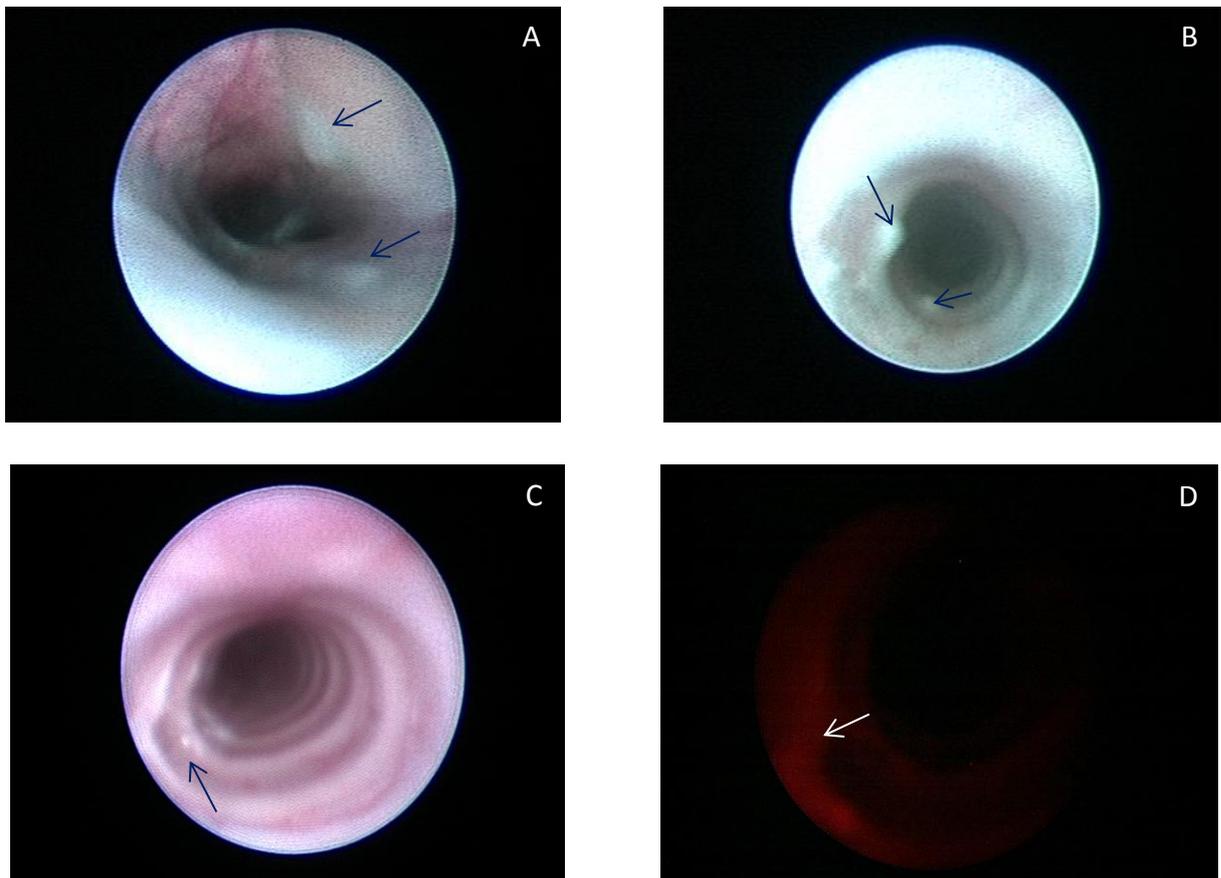


Abbildung 20: Bronchoskopie

Momentaufnahmen aus Bronchoskopien mit geordnetem Faserbündel-Endoskop: (A-C) Weißlicht; (A) sieben Wochen nach Zellimplantation ohne Schleimhautvorbehandlung und ohne Matrigel; (B) drei Wochen nach Zellimplantation mit Matrigel; (C) 12 Wochen nach Zellimplantation mit Matrigel (D) Endoskopieaufnahme aus (C) im Fluoreszenzkanal. Mit Pfeilen sind sich entwickelnde Tumore bzw. verdächtige Stellen markiert.

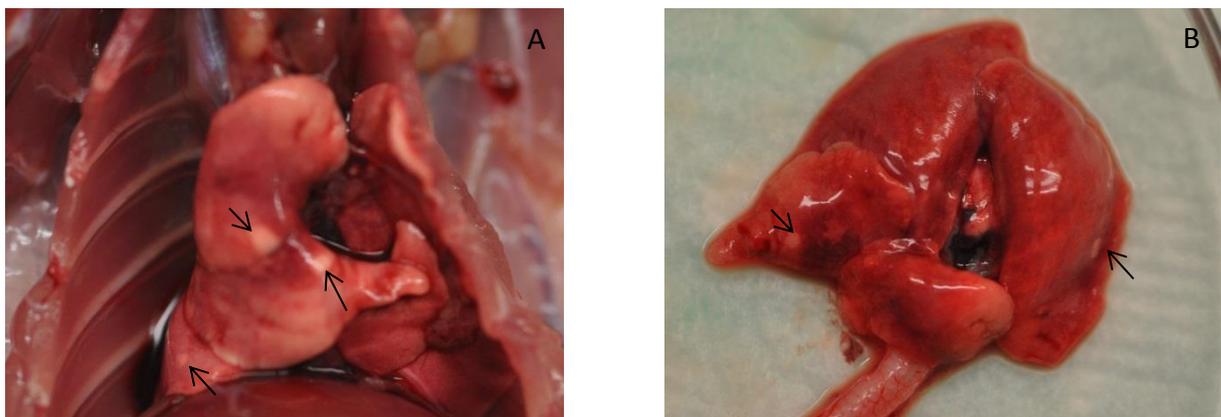
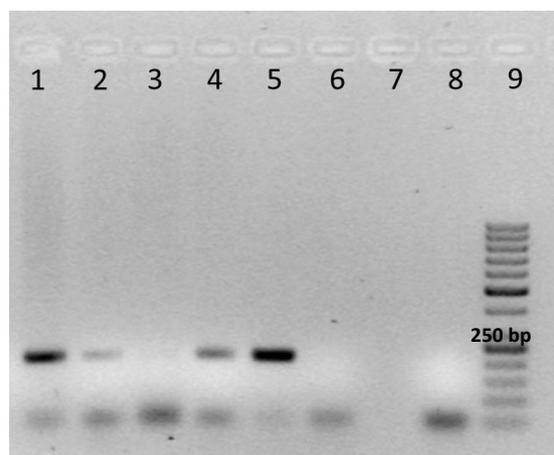


Abbildung 21: Lunge der tumortragenden Ratte

Tumorentwicklung 13 Wochen nach der Implantation von SK-MES1FP635-Zellen (Implantation in Matrigel nach Vorbehandlung der Schleimhäute mit 1 mM Trypsin). Verdächtige Stellen sind mit Pfeilen markiert.

5.6.4 PCR

Die PCR-Analyse wurde als unabhängige und hochsensitive Methode gewählt, um den Ursprung der Veränderungen an den Schleimhäuten des Darmes und der Trachea zu überprüfen. Um die humanen Tumorzellen in den Organen nachzuweisen, wurden Primer spezifisch für das Gen des zur Transfektion der Zellen genutzten TurboFP635 Fluoreszenzproteins verwendet. Zunächst wurde die Spezifität der Primer verifiziert sowie optimale Versuchsbedingungen und Konzentrationen für die PCR ermittelt. Bei den Tieren mit Zielorgan Darm wurde ein für die Endoskopie zugänglicher Bereich präpariert. Die aus dem Gewebe isolierte DNA wurde in der TurboFP635-PCR eingesetzt. Bei 24 von insgesamt 30 Versuchstieren konnte die Anwesenheit des TurboFP635 Gens und damit humaner Tumorzellen bestätigt werden (Abbildung 22).



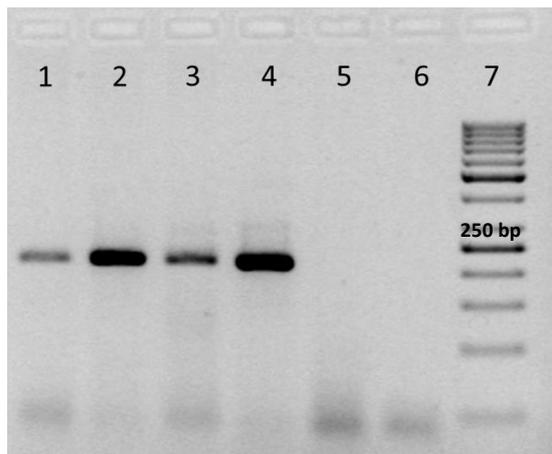
- 1: Versuchstier 1
- 2: Versuchstier 2
- 3: Versuchstier 3
- 4: Versuchstier 4
- 5: Positivkontrolle: LS174TFP635-Zellen
- 6: Negativkontrolle: unbehandelte Ratte
- 7: leer
- 8: Wasserprobe
- 9: 50 bp Marker

Abbildung 22: PCR-Gel

1-4: DNA isoliert aus dem Darm der Tiere 16 Wochen nach Implantation von LS174TFP635-Zellen wurde zum PCR-basierten Nachweis des Gens des Fluoreszenzproteins TurboFP635 verwendet. Die Produktgröße betrug 206 bp.

Für die DNA-Isolierung aus den Atemorganen wurden sowohl für das Endoskop zugängige Trachea als auch die Lungenflügel entnommen. Die Trachea wurde vollständig für die DNA-Isolierung verarbeitet. Bei der Präparation der Lunge wurden an mehreren Stellen weiße Punkte beobachtet (Abbildung 21). Diese Stellen wurden ausgeschnitten und die daraus isolierte DNA wurde in der PCR eingesetzt.

In fünf DNA-Proben der zehn Tiere nach der Zellimplantation ohne Matrigel konnte die Anwesenheit der transfizierten humanen Tumorzellen entweder im Trachea- oder im Lungengewebe nachgewiesen werden. Die TurboFP635-spezifischen PCR-Banden der Trachea-Proben waren hierbei jedoch nur schwach (Daten nicht gezeigt). Bei Tieren, welchen die Zell-Matrigel-Mischung implantiert wurde, konnten die endoskopischen Ergebnisse jedoch eindeutig bestätigt werden. Die endoskopisch detektierten Tumore wurden in 100 % der Fälle durch die PCR-Analysen (Abbildung 23) verifiziert.



- 1: Versuchstier 1
- 2: Versuchstier 2
- 3: Versuchster 3
- 4: Positivkontrolle: SK-MES1FP635-Zellen
- 5: Negativkontrolle: unbehandelte Ratte
- 6: Wasserprobe
- 7: 50 bp Marker

Abbildung 23: PCR-Gel

1-3: DNA aus der Trachea der tumortragenden Tiere wurde zum PCR-basierten Nachweis des Gens des Fluoreszenzprotein TurboFP635 verwendet. Die Produktgröße betrug 206 bp.

5.6.5 Zusammenfassung der Pilotstudie

Tabelle 7 zeigt eine Zusammenfassung der Pilotstudie, wobei auf Details zu den einzelnen Tieren verzichtet wurde.

Bei den Implantationsversuchen am Darm konnte für keine der verwendeten Zelllinien Unterschiede in der Tumoranwachsrate aufgrund der unterschiedlichen Trypsin-Vorbehandlungen beobachtet werden.

Bei allen Tieren, welchen LS174TFP635-Zellen in den Darm implantiert wurden, waren leichte Veränderungen an den Schleimhäuten zu beobachten (Abbildung 19A und B). In Darmgewebeproben von 11 der 15 Tiere wurde die Anwesenheit von TurboFP635-DNA mittels PCR bestätigt. Während Fluoreszenzendoskopie konnte allerdings keine Fluoreszenz der implantierten Zellen detektiert werden.

Auch nach der Implantation der SW480FP635-Zellen in den Darm konnten bei allen Tieren Veränderungen an den Schleimhäuten unter Weißlicht beobachtet werden (Abbildung 19C und D). In Darmgewebe von 13 der 15 Versuchstiere wurde mittels PCR TurboFP635-DNA nachgewiesen. In der Fluoreszenzendoskopie wurden aber keine fluoreszierenden Zellen gefunden.

Da es für die im Mittelpunkt des Projektes stehende Validierung von Mehrkanalendoskop und Kontrastmitteln eine zwingende Voraussetzung ist, die Fluoreszenz implantierter Zellen detektieren zu können, kann als erstes Ergebnis aus der Pilotstudie geschlossen werden, dass das orthotope Tumor-Modell im Rattendarm unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen für die Fragestellung nicht anwendbar ist. Obwohl während der Weißlichtendoskopie mehrere Veränderungen im Darm der Tiere beobachtet wurden (Abbildung 19) und die PCR-Analyse die Befunde bestätigte, war die Fluoreszenz während der Fluoreszenzendoskopie in den verdächtigen Bereichen nicht detektierbar.

Im Gegensatz dazu wurden in den Experimenten mit der Zelllinie SK-MES1FP635 fluoreszenzendoskopisch deutlich detektierbare Veränderungen in der Trachea erzielt, wobei eine klare Abhängigkeit der Anwachsrate von der Darreichungsform der implantierten Zellsuspension bestand. Zellen mit Matrigel bildeten endoskopisch gut detektierbare Strukturen in der Trachea der Ratte aus (Abbildung 20B), welche mittels PCR als tumorpositiv bestätigt werden konnten (Tabelle 7, Methode M1A und M2A).

Das Tumormodell in der Trachea der RNU-Ratte hat sich entsprechend als geeignet für fluoreszenzendoskopische Untersuchungen erwiesen. Aus diesem Grund wurde die Hauptstudie zur Validierung des Mehrkanal-Endoskops am Lungen-Tumormodell in der Trachea der Ratte durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mittels Matrigel angebracht. Da sich die Vorbehandlung der Tiere mit Trypsin nicht als vorteilhaft für das Anwachsen der Zellen erwies, wurde in der Hauptstudie darauf verzichtet.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Pilotstudie

	LS174TFP635		SW480FP635		SK-MES1FP635	
Methode	Endoskopie	PCR	Endoskopie	PCR	Bronchoskopie	PCR
	WE/FE		WE/FE		WE/FE	
M1	Leichte Veränderungen an den Schleimhäuten. Keine eindeutig detektierbaren Tumore.	4/5	Leichte Veränderungen an den Schleimhäuten. Keine eindeutig detektierbaren Tumore.	3/5	Keine deutlichen Veränderungen im Bereich der Trachea.	2/5
M1A					Im WE und FE detektierbare Tumorzellcluster.	8/8
M2			Wenige deutliche Veränderungen an den Schleimhäuten. Keine eindeutig detektierbaren Tumore.	5/5		
M2A	Leichte Veränderungen an den Schleimhäuten. Keine eindeutig detektierbaren Tumore.	4/5			Im WE und FE detektierbare Tumorzellcluster.	3/3
M3	Leichte Veränderungen an den Schleimhäuten. Keine eindeutig detektierbaren Tumore.	3/5			Keine deutlichen Veränderungen im Bereich der Trachea.	3/5
M3A			Leichte Veränderungen an den Schleimhäuten. Keine eindeutig detektierbaren Tumore.	5/5		

Methode: M1(A): keine Schleimhautvorbehandlung, M2(A): Schleimhautvorbehandlung mit 0,1 mM Trypsin, M3(A): Schleimhautvorbehandlung mit 1 mM Trypsin. M1-M3: die Zellen wurden vor der Implantation in Medium aufgenommen; M1A-M3A: die Zellen wurden vor der Implantation in Matrigel aufgenommen. PCR: Anzahl der Tiere mit positivem PCR-Befund für die humanen Tumorzellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der behandelten Tiere. WE: Weißlichtendoskopie, FE: Fluoreszenzendoskopie.

5.7 Validierung eines Mehrkanal-Endoskopsystems unter Verwendung von Kontrastmitteln *in vivo*

Als vorrangiges Projektziel sollte ein neuartiges Mehrkanal-Fluoreszenzendoskop unter Verwendung von Kontrastmitteln *in vivo* validiert werden. Hierfür wurden zunächst anhand der fluoreszenzendoskopischen Detektion die fluoreszenten Tumorzellen untersucht und beurteilt, welche Vorteile die Fluoreszenz- im Vergleich zur Weißlichtendoskopie bietet.

Darüber hinaus wurde die Detektion der Tumorzellen durch Fluoreszenzbronchoskopie nach Anfärbung mit fluoreszenten Kontrastmitteln analysiert.

5.7.1 Validierung der Fluoreszenzendoskopie im orthotopen Lungen-Tumormodell

Anhand des in der Pilotstudie aufgebauten Lungen-Tumormodells mit TurboFP635-exprimierenden Tumorzellen war es möglich das neuartige Mehrkanal-Endoskopsystem zu validieren. Dafür wurden die sich in der Trachea entwickelnden Tumore bei 17 Ratten endoskopisch untersucht. Zwei Wochen nach der Zellimplantation mit Matrigel wurden die Tiere alle zwei bis vier Wochen 16 Wochen lang mit einem Laser-basierten Mehrkanal-Endoskopsystem untersucht. Es wurde beurteilt ob die Tumore durch die intrinsische Fluoreszenz der Zellen gut detektierbar sind und es ein Übersprechen der Tumor-Fluoreszenz in anderen Kanälen zu beobachten war. Außerdem konnte eine Detektionsgrenze für die Tumore ermittelt werden.

Zur Verfolgung der Tumorentwicklung wurden die Tiere nach Zellimplantation in Abständen von 2 bis 4 Wochen mit dem Mehrkanal-Endoskopsystem bronchoskopiert. Dabei waren von der ersten Bronchoskopie an bei allen Tieren im Weißlicht-Kanal Veränderungen an der Trachea-Wand sichtbar. Der Großteil dieser Veränderungen (ca 95 %) war auch im TurboFP635-Kanal detektierbar, womit gezeigt wurde, dass es sich dabei um fluoreszente Tumorzellen handelte (Abbildung 24A, B). Die Fluoreszenzstärke der Tumore korrelierte mit deren Größe im Weißlicht-Kanal. Die Größe der knotenartigen Veränderungen in der Trachea wurde im Verhältnis zur Größe der Trachea auf 0,2 bis 1 mm Durchmesser eingeschätzt. Bei wenigen der größten Tumore ca. 1 mm konnte während der Bronchoskopie zwei Wochen nach der Zellimplantation ein leichtes Übersprechen der intrinsischen Fluoreszenz in den Kontrastmittel-Kanal bei der vollen Leistung der Laser beobachtet werden (Abbildung 24A). Dies konnte durch das Minimieren der Intensität des 408 nm Lasers zu Anregung der Kontrastmittel vermieden werden. Im Verlauf der Entwicklung verflachten die Tumore, und die Fluoreszenzintensität nahm ab. Bereits nach drei Wochen wurde kein Übersprechen der Tumor-Fluoreszenz in den Kontrastmittel-Kanal beobachtet.

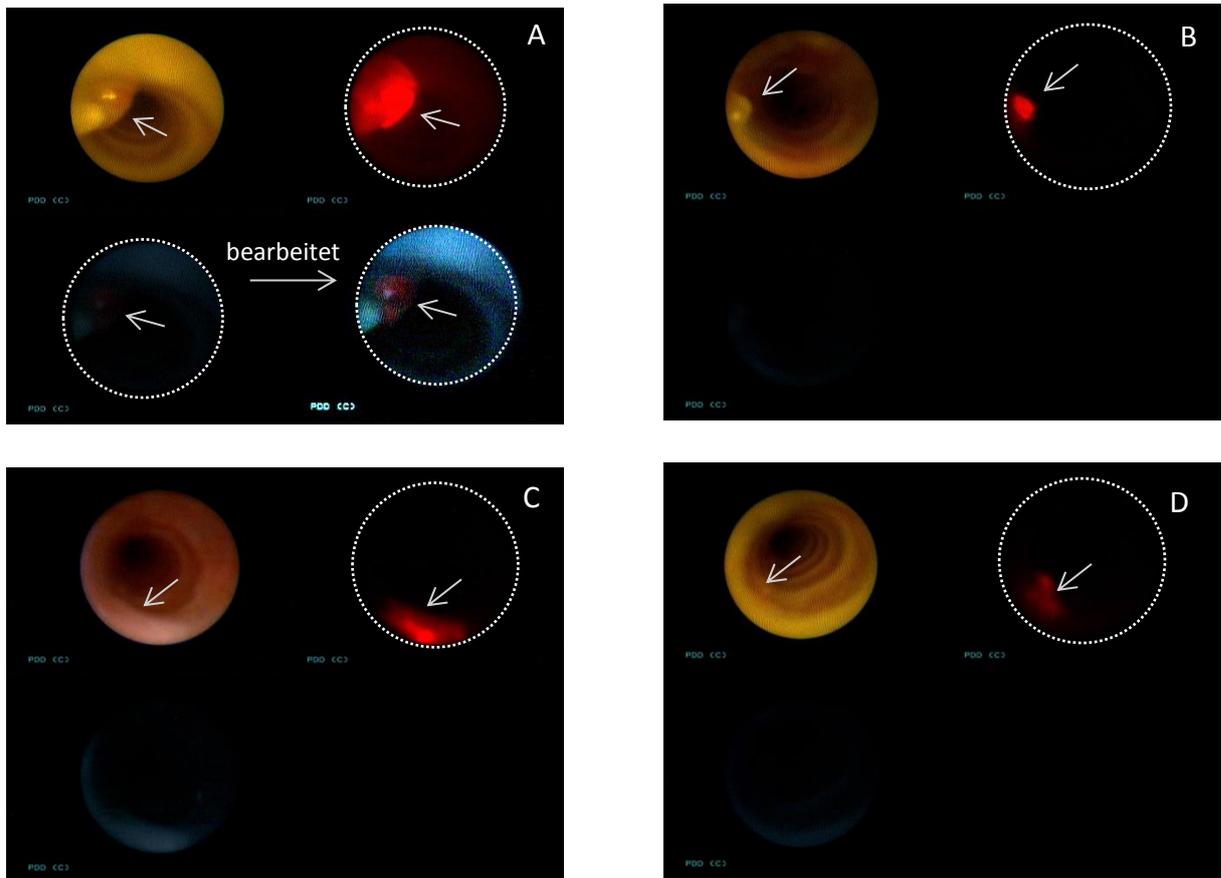


Abbildung 24: Bronchoskopie mit Mehrkanal-Endoskopsystem

Momentaufnahmen aus Bronchoskopien der Ratten-Trachea zwei Wochen nach Zellimplantation mit einem endoskopischen Mehrkanalsystem. Auf jedem Bild sind die Kanäle für Weißlichtbild (oben links), TurboFP635-Protein der implantierten Tumorzellen (oben rechts) und Fluoreszenz der Kontrastmittel (unten links) zu sehen.

Zusätzlich wurde während den Bronchoskopien im Fluoreszenzkanal mehrere Stellen detektiert, welche im Weißlichtbild zunächst nicht auffällig waren (Abbildung 24C und D). Erst bei genauer Betrachtung der durch die Fluoreszenz aufgefallenen Stellen konnten die geringen Veränderungen auch im Weißlicht bestätigt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzendoskopie bei einer auffälligen, fluoreszenz-markierten Modifikation, wie sie durch die intrinsische Fluoreszenz der implantierten Tumorzellen gegeben ist, eine sensitivere Detektion der Veränderungen an der Schleimhaut-Oberfläche erlaubt als die Weißlichtendoskopie alleine.

5.7.2 Validierung des Mehrkanal-Endoskopsystems im orthotopen Lungen-Tumormodell mit fluoreszenten Kontrastmitteln

Ein weiteres Ziel des Projektes war es, das Mehrkanal-Fluoreszenzendoskop im orthotopen Tumormodell in Verbindung mit Fluoreszenz-Kontrastmitteln zu testen.

Um die Tumore im Vergleich zum unveränderten Gewebe selektiv zu kontrastieren, sollten die in der Zellkultur getesteten Kontrastmittel D1ATTO495-Peptid (5.7.2.2) und Radachlorin (5.7.2.3) verwendet werden. Die Tiere sollten nach Gabe eines der Kontrastmittel bronchoskopiert und anhand der dabei aufgenommenen Videos sollte beurteilt werden, ob ein zur Detektion der Tumore ausreichender Kontrast erhalten wird und wie effektiv die Fluoreszenzbronchoskopie in Verbindung mit den ausgewählten Kontrastmitteln ist.

5.7.2.1 **D1ATTO495-Peptid-Bindung an Matrigel**

Für das peptidische Kontrastmittel sollte in Vorversuchen ausgeschlossen werden, dass eine unspezifische Bindung an Matrigel erfolgt. Matrigel wird durch die Proteasen der Tumorzellen mit der Zeit abgebaut (Baum et al 2007), es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in der Trachea auch mehreren Wochen nach der Zellimplantation Reste von Matrigel im sich entwickelnden Tumor vorhanden sind. Sollte eine Bindung des Peptids an Matrigel erfolgen, würde dies die Bronchoskopie-Ergebnisse verfälschen. Daher wurden SK-MES1FP635-Zellen in Matrigel aufgenommen, 1- μ l-Tropfen auf die Platte abgesetzt und nach Festwerden mit 10 μ M Peptid-Lösung für 30 Min inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Tropfen endoskopisch untersucht. Die Zellkonzentration wurde mit 1×10^3 Zellen/ μ l so gewählt, dass ein großer Volumenanteil des Tropfens zellfrei war. So konnte ein direkter Vergleich der Helligkeiten zwischen „Zellen“ und „Matrigel“ nach der Peptidinkubation durchgeführt werden. Dazu wurden die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Bereiche als Helligkeitswerte mit Hilfe der Bildbearbeitungs-Software FIJI vermessen und ins Verhältnis zueinander gesetzt. In Abbildung 25 ist eine deutliche Fluoreszenz des D1ATTO495-Peptides im Kontrastmittel-Kanal zu erkennen, welche kongruent mit der intrinsischen Fluoreszenz der Zellen ist. Die Vermessung der Bilder von drei Zell-Matrigel-Tropfen zeigte im Kontrastmittel-Kanal ein mittleres Verhältnis der Fluoreszenz des Zell-assoziierten Peptides und der Fluoreszenz in den zellfreien Arealen von 8:1.

Auf den Videos ist die Fluoreszenz im Matrigel nur als ein Hintergrundrauschen zu erkennen und während der Endoskopie per Auge kaum sichtbar.

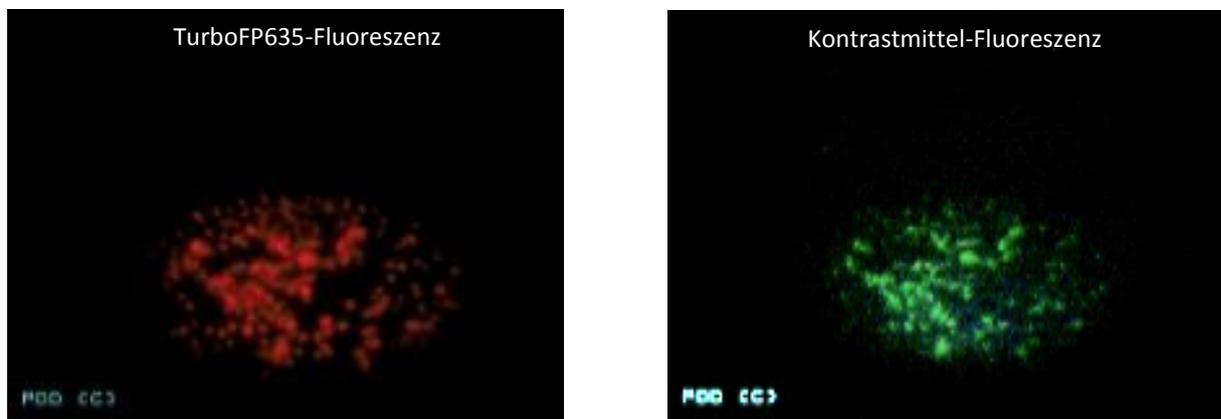


Abbildung 25: Bindung des D1ATTO495-Peptides an in Matrigel suspendierte Zellen
Endoskopische Aufnahmen mit Mehrkanal-Endoskopsystem und Stablinsenendoskop (d=2 mm)

5.7.2.2 *In vivo*-Kontrastierung der Tumore mit D1ATTO495-Peptid

Drei Wochen nach der Zellimplantation wurde den Tieren unter Ketamin-Xylazin-Narkose 10 μ M D1ATTO495-Peptid-Lösung intratracheal mit dem MicroSprayer (IA-1C; Penn Century, Philadelphia, PA, USA) instilliert und 30-40 Minuten danach bronchoskopiert. Auf diese Weise wurden an 12 Tieren insgesamt 26 Bronchoskopien durchgeführt, die sich auf einen Zeitraum von 3 bis 11 Wochen nach Zellimplantation verteilten.

Während der Bronchoskopie wurden mehrere auffällige Stellen mit übereinstimmenden Ergebnissen in allen drei Kanälen des Systems detektiert (Abbildung 27). Zum Teil war die intrinsische Fluoreszenz der Tumore schwach. Zur besseren Visualisierung wurde deshalb während der Auswertung die Helligkeit der Bilder linear erhöht (Abbildung 27B, D). Die grüne Fluoreszenz des D1ATTO495-Peptides war deutlich und gut detektierbar. Die mit Peptid angereicherten auffälligen Areale ließen sich klar von dem umgebenden, im Kontrastmittelkanal bläulich erscheinenden Gewebe unterscheiden. Die Helligkeit der Fluoreszenz war vom Winkel und der Entfernung des Endoskops zum Tumor abhängig. Infolgedessen können die Fluoreszenzintensitäten der Tumore in unterschiedlichen Bereichen der Trachea nicht in absoluten Werten miteinander verglichen werden. Um ein angemessenes Urteil über den tumorselektiven Kontrastierungseffekt des verwendeten D1ATTO495-Peptides zu fällen, wurde die Helligkeit jeweils eines auffälligen Areals ins

Verhältnis zum umliegenden Gewebe gesetzt (Abbildung 26). Dafür wurden die Videos in die drei Grundfarben-Kanäle blau, rot und grün getrennt und die Grauwerte mittels FIJI bestimmt. Da D1ATTO495-Peptid grün fluoresziert, wurde der im grünen Kanal gemessene Grauwert zur Auswertung der Helligkeit verwendet. Auf diese Weise wurde ein Kontrast zwischen unverändertem Gewebe und mit D1ATTO495-Peptid markierten Arealen von 1:2 bis 1:6 ermittelt, welcher während der Bronchoskopie gut sichtbar war (Abbildung 27A-D).

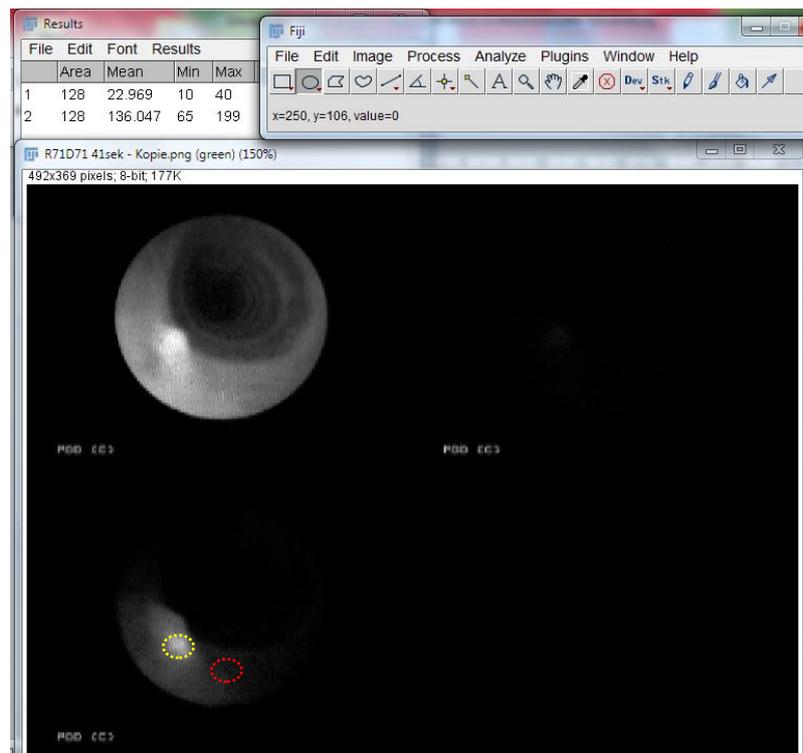


Abbildung 26: Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten in auffälligen und unauffälligen Gewebebereichen

Zu Berechnung der Fluoreszenzunterschiede wurde das Videobild des Kontrastmittelkanals des Endoskops mittels FIJI in die Grundfarben zerlegt und die Helligkeit im grünen Farbbereich analysiert. Dazu wurden gleich große Areale eines in der Fluoreszenz auffälligen Bereichs (gelb) und unauffälligen Gewebes (rot) in vergleichbarer Entfernung zum Endoskop markiert, die Grauwerte vermessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Die Qualität eines Kontrastmittels in Verbindung mit der verwendeten Detektionsmethode lässt sich durch Bestimmung der richtig-positiven, richtig-negativen, falsch-positiven und falsch-negativen Befunde ermitteln. Zur Beurteilung der richtig- und falsch-positiven Einordnung wurde die intrinsische TurboFP635-Fluoreszenz der Tumorzellen als „Gold-Standard“ angesehen. Als „Auffällig“ galten alle durch die Fluoreszenz im Kontrastmittel- oder TurboFP635-Kanal aufgefallenen Stellen. Diese wurden in die Berechnung der

Gesamtzahl der „Auffälligen Stellen“ einbezogen. Die im Weißlicht-Kanal beobachteten Veränderungen wurden hierfür nicht berücksichtigt.

Als richtig-positiv wurden Befunde definiert, bei denen Stellen mit intrinsischer Fluoreszenz im TurboFP635-Kanal und deckungsgleicher Fluoreszenz im Kontrastmittel-Kanal detektiert wurden. (Abbildung 27A - D). Anhand der Videoaufnahmen wurden 52 % der insgesamt 81 fluoreszenz-auffällige Stellen als richtig-positiv identifiziert.

Unter Verwendung von D1ATTO495-Peptid war es möglich, Stellen in der Trachea zu entdecken, welche im Weißlichtbild zuerst unauffällig blieben, nach genauer Betrachtung jedoch sowohl im Weißlicht Veränderungen der Schleimhäute zeigten als auch durch intrinsische Fluoreszenz des TurboFP635-Proteins als richtig-positiv bestätigt werden konnten (Abbildung 27C und D).

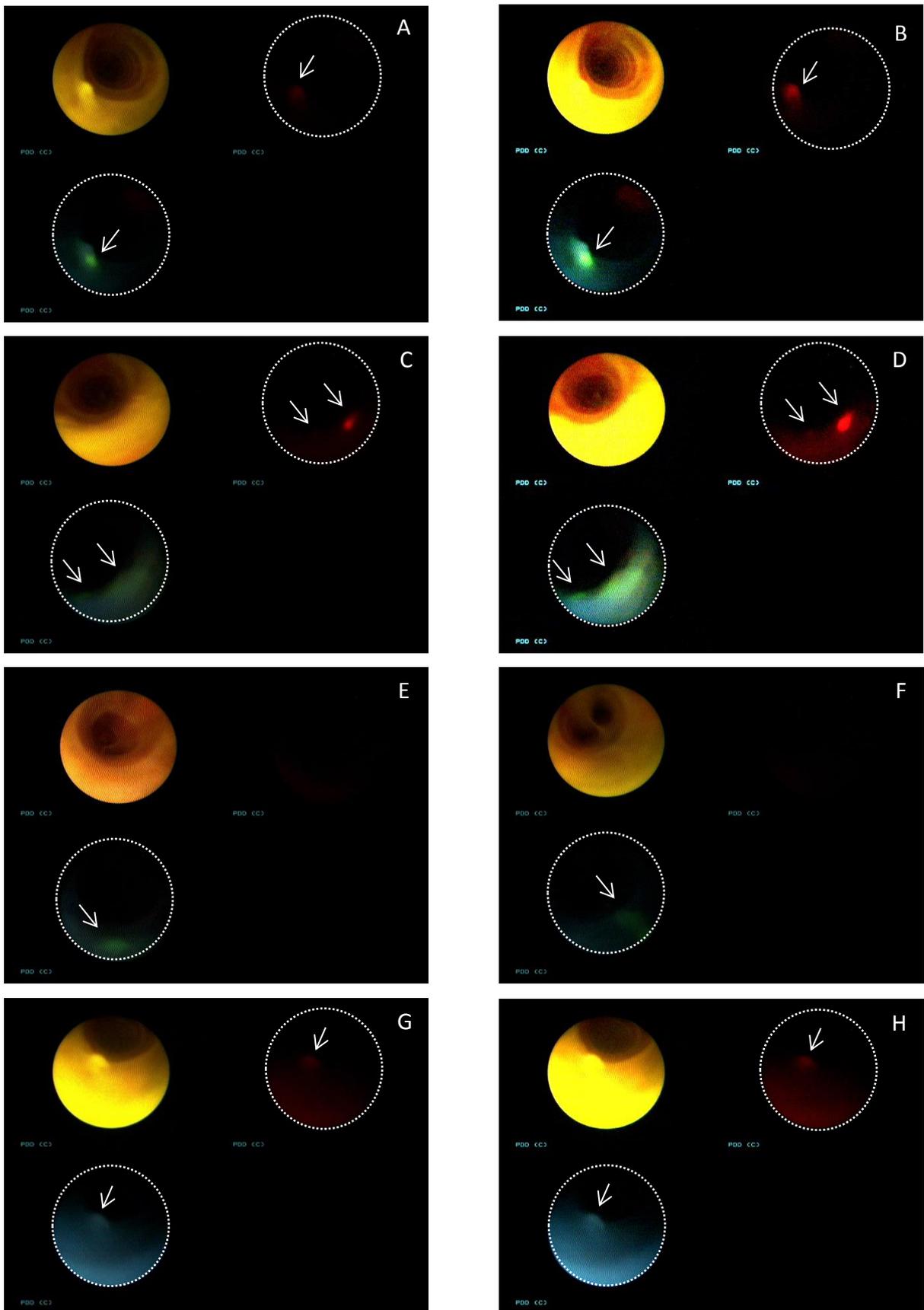


Abbildung 27: Anwendung des D1ATTO495-Peptides *in vivo*

Bronchoskopie einer Ratte nach 40 minütiger Inkubation mit D1ATTO495-Peptid unter Verwendung eines bildleiterbasierten Mehrkanal-Endoskopsystems (geordnetes Faserbündel). Richtig-Positive: Originalaufnahmen (A, C), bearbeitet (B, D); Falsch-Positive (E, F); Falsch-Negative: Originalaufnahme (G), bearbeitet (H). Mit Pfeilen sind Verdächtige Stellen bzw. Tumore gezeigt.

Zusätzlich traten bei der Analyse der Kontrastmittelfluoreszenz falsch-positive Befunde auf. Als solche wurden Areale definiert, welche durch die Fluoreszenz im Kontrastmittel- jedoch nicht im TurboFP635-Kanal detektierbar waren (Abbildung 27E und F). Insgesamt waren 32 % aller ausgewerteten Kontrastmittel-Fluoreszenzsignale falsch-positiv.

Außerdem wurden in TurboFP635-Kanal Tumore durch die intrinsische Fluoreszenz erkannt, welche keine Fluoreszenz im Kontrastmittel-Kanal aufwiesen. Hinsichtlich tumorspezifischer Peptid-Bindung wurden diese als falsch-negativ definiert und betrug 16 % der fluoreszenz-auffälligen Stellen.

5.7.2.3 *In vivo*-Kontrastierung der Tumore mit Radachlorin

Radachlorin (Bremachlorin) ist als Photosensibilisator der zweiten Generation bekannt. Eine selektive Anreicherung des Radachlorins in Tumoren nach systemischer Gabe erlaubt seine Nutzung zu Zwecken der photodynamischen Therapie und Fluoreszenzdiagnostik. In der Humanmedizin wird Radachlorin bereits für die Hautkrebs-Diagnostik und Therapie angewandt. Hierfür werden in der Regel 0,5-2,4 mg Radachlorin pro kg Körpergewicht drei Stunden vor der Behandlung verabreicht (Datenblatt des Herstellers Radapharma).

Für Ratten als Versuchstiere liegen bisher keine ausreichenden Daten zur Verwendung von Radachlorin vor. Aus diesem Grund mussten in Rahmen der vorliegenden Studie entsprechende Parameter wie Konzentration und Inkubationszeit zunächst optimiert werden. Die für Mäuse mit 20 bis 40 mg/kg empfohlene Konzentration erwies sich für Ratten als zu hoch. Bei systemischer Gabe einer solchen Konzentration an Radachlorin trat bei nachfolgender Bronchoskopie eine extrem starke Gewebefluoreszenz, die auch nach 32 Stunden der Inkubation ein überbelichtetes Bild während der Bronchoskopie lieferte. Ein Unterschied zwischen gesundem und tumorösem Gewebe war nicht feststellbar. Daher wurden weitere Vorversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen Radachlorin, systemisch verabreicht, unternommen. Der Effekt des Kontrastmittels auf unspezifische Gewebefluoreszenz wurde mittels Bronchoskopie in Zeitabständen von 3,5 Stunden verfolgt. In diesen Versuchen erwiesen sich 3,5 mg Radachlorin pro kg Körpergewicht als optimal.

Zur Ermittlung der optimalen Kontrastierungsdauer wurde tumortragenden Ratten intraperitoneal 3,5 mg/kg Radachlorin gespritzt. Nach dreieinhalb und sechs bzw. sieben Stunden wurden die Tiere bronchoskopiert.

Bei der Bronchoskopie nach dreieinhalb Stunden hatten die Schleimhäute auf den Knorpelspangen einen bläulichen Stich, was auf eine unzureichende Akkumulation des Radachlorins im Gewebe hindeutet. Nach sechs bis sieben Stunden Inkubationszeit war jedoch ein gleichmäßiger Anreicherungsgrad des Radachlorins im gesamten Gewebe zu beobachten. Aus diesem Grund wurden die Bronchoskopien in den weiteren Versuchen sechs bis sieben Stunden nach der Injektion des Radachlorins durchgeführt.

Die Beurteilung des Kontrastes direkt während der Bronchoskopie erwies sich als nicht trivial, da wegen der hohen Hintergrundfluoreszenz des Gewebes nach systemischer Gabe von Radachlorin die gesamte Trachea eine rote Farbe aufwies. Während der Bronchoskopie musste deshalb eine optimale Laserstärke zu Anregung Radachlorins gefunden werden, um einen maximalen Kontrast zwischen verdächtigem und unverändertem Gewebe zu erzeugen. Bei minimalen Veränderungen der Laserintensitäten wurde das Bild schnell über- oder unterbelichtet, was die Beurteilung des Gewebes zusätzlich erschwerte.

Insgesamt wurden an 12 Tieren 33 Bronchoskopien nach Verabreichung von Radachlorin als Kontrastmittel durchgeführt. Die Untersuchungen erstreckten sich auf einen Zeitraum von 3 bis 9 Wochen nach Zellimplantation. Während der Bronchoskopie hoben sich im Kontrastmittel-Kanal Areale durch eine hellere Erscheinung vom umliegenden Gewebe ab. Videos und einzelne Bilder wurden wie zuvor für das D1ATTO495-Peptid beschrieben ausgewertet (s. 5.7.2.2). Nach der Trennung der Farb-Kanäle wurde die emittierte Fluoreszenz des Radachlorins im Rot-Kanal vermessen. Es wurde ein Kontrast-Verhältnis zwischen unverändertem Gewebe und auffällig helleren Arealen von 1:1,5 bis 1:4 gemessen.

Ein Teil der im Kontrastmittel-Kanal aufgefallenen Stellen wurden durch die intrinsische Fluoreszenz des TurboFP635-Proteins als implantierte Tumorzellen bestätigt.

Abbildung 28A und B zeigen zwei Tumore. Der größere Tumor ist in allen drei Modi sichtbar (Pfeil 1) während der kleinere Tumor in beiden Fluoreszenz-Kanälen, nicht jedoch im Weißlicht-Bild erkennbar ist (Pfeil 2). Areale die sowohl im TurboFP635- als auch im Kontrastmittel-Kanal eine Fluoreszenz über dem Hintergrund aufwiesen gelten als richtig-positiv.

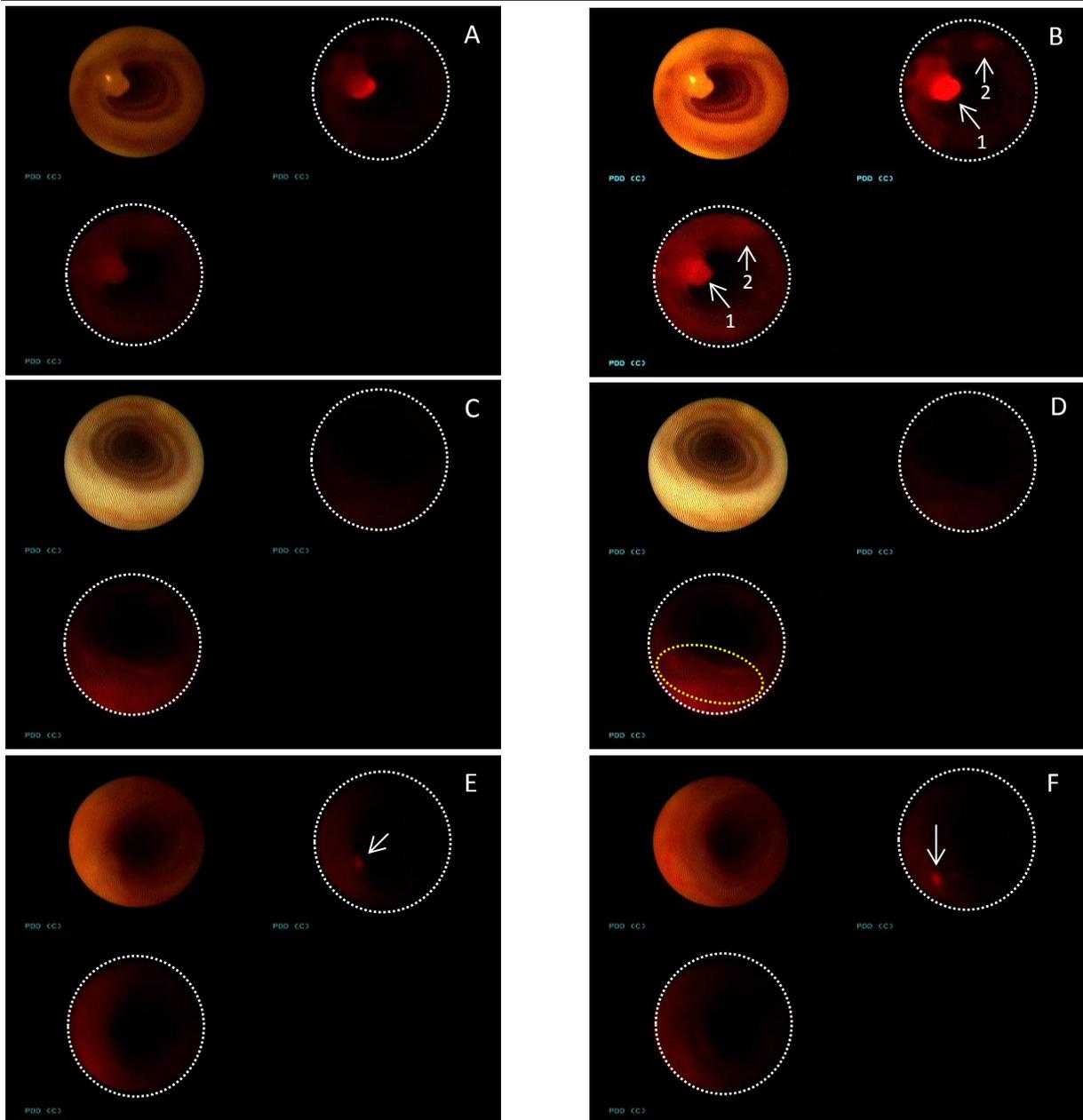


Abbildung 28: Bronchoskopie der Tiere nach der Behandlung mit Radachlorin

Bronchoskopie einer Ratte 6,5 Stunden nach Radachlorin-Injektion unter Verwendung eines bildleiterbasierten Endoskop-Systems (geordnetes Faserbündel). Richtig-Positive: Originalaufnahme (A), bearbeitet (B); Falsch-Positive: Originalaufnahme (C), bearbeitet (D); Falsch-Negative (E, F). Mit Pfeilen sind die Tumore gezeigt.

Zusätzlich sind im Kontrastmittel-Kanal hellere Areale sichtbar, die nicht durch die intrinsische Fluoreszenz bestätigt werden konnten (Abbildung 28C und D). Diese werden als falsch-positiv bezeichnet. Darüber hinaus konnten im TurboFP635-Kanal kleine Tumorstellen durch die Fluoreszenz des TurboFP635-Proteins detektiert werden, die im Kontrastmittel-Kanal nicht heller als die umgebenden Areale waren (Abbildung 28E und F). In Bezug auf die Kontrastierung der Tumore mit Radachlorin waren diese entsprechend falsch-negativ.

Nach der Auswertung der Videos wurden insgesamt 55 fluoreszenz-auffällige Stellen aus 13 Bronchoskopien analysiert. Davon waren 63,5 % (35 Stellen) richtig-positiv, 23,5 % (13 Stellen) falsch-positiv und 13 % (7 Stellen) falsch-negativ.

Damit lassen sich die Ergebnisse des Projektes wie folgt zusammenfassen:

- Es wurde ein orthotopes Tumormodell mit intrinsisch fluoreszierenden Lungen-Tumoren in der Trachea von Ratten etabliert.
- Es konnte eine exzellente Auflösungsfähigkeit der verwendeten Fluoreszenzendoskope bis auf die Ebene einzelner Zellen demonstriert werden.
- Fluoreszierende Tumore in der Trachea konnten mit Fluoreszenzendoskopen detektiert werden.
- Bei Endoskopien mit fluoreszierenden Kontrastmitteln konnte eine spezifische Anreicherung von Radachlorin und von dem Peptid-basiertem Kontrastmittel D1ATTO495 im Tumorgewebe detektiert werden.
- Insgesamt konnte gezeigt werden, dass fluoreszenz-markierte flache Veränderungen an den Schleimhäuten sich einfacher und sicherer mittels Fluoreszenzendoskopie als mit Weißlichtendoskopie detektieren lassen.

6 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das diagnostische Potential eines fluoreszenzendoskopischen Nachweises von Tumorzellen zu ermitteln und in Relation zur herkömmlich verwendeten Weißlichtendoskopie zu stellen.

Dazu sollten folgende Teilziele erarbeitet werden:

die Etablierung von orthotopen Darm- und Lungen-Tumormodellen

die Validierung eines Mehrkanal-Fluoreszenzendoskopsystems

die Validierung fluoreszierender Kontrastmittel am Beispiel des Radachlorin und des tumorspezifischen Peptids RGD₂LRQLAQEDGVVGV₂R (D1ATTO495)

6.1 Aufbau des Modellsystems

6.1.1 Auswahl der Systemkomponenten

Zur Etablierung der orthotopen Tumor-Modelle mussten zunächst die optimalen Zelllinien und die Implantationsmethoden ausgewählt werden.

Bezüglich der humanen Tumor-Zelllinien wurden der Tumortyp und die Herkunft der Zellen als Hauptkriterien definiert. Die Zelllinien sollten zum einen häufig vorkommenden Tumortyp repräsentieren, zum anderen aus einem soliden Tumor isoliert worden sein.

De Both et al (1999) zeigten in ihrer Studie eine Abhängigkeit der Anwachsrate und der Aggressivität einer Zelllinie im Tiermodell von der Zellmorphologie und dem Ursprungsort. Anhand von SW480 (kolorektales Adenokarzinom) und SW620 (Metastase des SW480-Adenokarzinoms) konnte gezeigt werden, dass selbst verwandte Tumorzellen unterschiedliche Eigenschaften im Tumormodell aufweisen. Die aus Metastasen isolierten Zelllinien können sich sowohl morphologisch als auch in der Substanz-Aufnahme und Reaktion auf Medikamente verändern und bilden daher die humane Tumorsituation in früheren Tumorstadien nicht adäquat ab (Flatmark et al 2004, Leibovitz et al 1976). Aus diesem Grund ist die Übertragung der an solch einem Tumormodell erzielten Ergebnisse auf

die Ursprungstumore bzw. Tumorfrühstadien nur eingeschränkt möglich. Deshalb wurden Zelllinien aus Metastasen aus der Auswahl für das Tumormodell ausgeschlossen.

Für das Darm-Tumormodell wurde nach einer Zelllinie gesucht, welche ein Adenokarzinom repräsentiert, da dies ein häufig auftretender Tumortyp bei den Darmtumoren ist (Hemminki et al 2010). Die Zelllinien LS-174T und SW480 waren entsprechend für dieses Tumormodell prädestiniert, weil sie erstens aus humanen Adenokarzinomen gewonnen wurden und zweitens bereits mit Erfolg in orthotopen Tumormodellen des Darms Verwendung gefunden haben (Bhullar et al 2011, Flatmark et al 2004). Für das Lungen-Tumormodell wurde nach einem Vertreter des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms gesucht, da diese Tumore bis zu 85 % der Tumore in den Atemorganen ausmachen (Molina et al 2008). Mit 30 % der Bronchialkarzinome ist das Plattenepithelkarzinom eines der häufigsten Lungen-Tumortypen (Garber et al 2001). Für das orthotope Lungen-Tumormodell wurde deshalb die Plattenepithelkarzinom-Zelllinie SK-MES1 ausgewählt. Sie wurde bereits erfolgreich zur Tumormodell-Herstellung verwendet und erfüllt auch alle oben aufgeführten Kriterien. (Luis-Ravelo et al 2011).

Ein wesentliches Projektziel der Arbeit war es, die Detektionsfähigkeit eines Fluoreszenzendoskops auszuloten und mit der Weißlichtendoskopie zu vergleichen. Dazu war es notwendig, dass die endoskopisch nachzuweisenden Zielzellen, d.h. die implantierten Tumorzellen, eine intrinsische Fluoreszenz besaßen. Dies wurde durch die Transfektion der Zellen mit dem Gen für einen Proteinfluorophor erreicht. Für die Auswahl eines geeigneten Proteinfluorophors war zunächst die optische Konfigurierbarkeit des Endoskopsystems hinsichtlich Anregungs- und Emissionswellenlänge entscheidend. Außerdem musste berücksichtigt werden, dass die fluoreszierenden Tumore auch mit ebenfalls fluoreszierenden Kontrastmitteln analysiert werden sollten, deren optische Charakteristika sich ausreichend von denen des Proteinfluorophors bzw. des fluoreszierenden Tumors unterscheiden.

Die Wahl fiel auf das TurboFP635-Fluoreszenzprotein, da dessen Anregung mit langwelligem Licht eine im Vergleich zu kürzeren Wellenlängen tiefere Penetration des Anregungslichtes in das Gewebe erlaubt (Shcherbo et al 2007). Das optimale optische Fenster für Gewebeimaging, welches sich durch eine geringe Autofluoreszenz auszeichnet, liegt zwischen $\sim 650 - 700 \text{ nm}$ und 1100 nm (König 2000). Das zur Transfektion der Zellen verwendete Fluoreszenzprotein TurboFP635 mit einem Absorptionsmaximum bei 588 nm

und Emissionsmaximum bei 635 nm liegt nahe diesem Fenster und wird als eines der optimalsten Fluoreszenzproteine zum Gewebeimaging bezeichnet (Shcherbo et al 2009). Des Weiteren liegt das Anregungsspektrum des TurboFP635 mit einem Maximum bei 588 nm in einem Wellenlängenbereich, innerhalb dessen die Anregungseffizienz der für die späteren Untersuchungen vorgesehenen Kontrastmittel minimal ist (Douillard et al 2009).

Die für die orthotopen Tumormodelle ausgewählten humanen Tumorzellen wurden stabil mit dem Gen für das rote Fluoreszenzprotein TurboFP635 transfiziert (Auftragsarbeit Fa. Marinpharm) und erhielten dann die Bezeichnungen LS-174FP635, SW480FP635 und SK-MES1FP635. Für die nachfolgenden Experimente im Tiermodell wurde eine hohe Stabilität der Transfektion als eines der wichtigsten Merkmale der Zellen angesehen, da die Fluoreszenz auch nach mehreren Monaten der Tumorentwicklung detektierbar bleiben sollte. Im optimalen Fall sollte die möglicherweise während der endoskopischen Untersuchungen ausgeblichene Fluoreszenz durch die Zellen bis zu der nächsten Endoskopie im Tier wiederhergestellt werden. Nach dem die Qualität der Transfektion überprüft wurde, wurden die ausgewählte Klone für die Entwicklung der Tumormodelle verwendet.

6.1.2 Aufbau eines orthotopen Darm-Tumormodells

In der Literatur sind unterschiedliche Implantationsmethoden beschrieben, mit denen optimale und reproduzierbare Tumormodelle für die Krebsforschung etabliert wurden. So hat Takahashi et al (2004) nach Induktion einer Kolitis LS-174T-Zellen in Matrigel in den Darm von Mäusen appliziert. Die Anwachsrate der Tumorzellen lag bei 27,8 %. Die Applikation von HT-29-Zellen in Medium in den Darm einer Maus nach Trypsinvorbehandlung erbrachte eine Anwachsrate von 100 % (Alencar et al 2005). Nach Verletzung der Schleimhäute mit einer Elektrodiode konnten Anwachsrate von 100 % bei Applikation der LS-174T-Zelllinie mit Matrigel und von 58 % bei Applikation der HT-29-Zelllinie in Medium detektiert werden (Bhullar et al 2011).

Um aus diesen unterschiedlichen Verfahren die für die Aufgabenstellung am besten geeignete Methode zu finden, wurde in dieser Arbeit eine Reihe von Vorexperimenten durchgeführt, bei denen die Zellanwachstumsrate in Abhängigkeit von einer Trypsinvorbehandlung und von der Anwesenheit eines extrazellulären Matrixproteins als Anwachshilfe („Matrigel“) untersucht wurde. So wurde bei Implantation von LS-174FP635-

Zellen in den Darm von RNU-Ratten mit Trypsinvorbehandlung bei 70 % der Tiere Tumorzellen mittels PCR nachgewiesen. Auch bei vier von fünf Tieren ohne Trypsinvorbehandlung konnten positive PCR-Ergebnisse gezeigt werden. Keinen messbaren Vorteil hatte die Verwendung von Matrigel bei der Zellimplantation, denn auch hier wurden vergleichbare positive PCR-Ergebnisse gemessen.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei Implantation von SW480FP635-Zellen in den Darm: Hier wiesen drei von fünf Tieren der Gruppe ohne Trypsinvorbehandlung und jeweils alle fünf Tiere aus den Gruppen mit Trypsinvorbehandlung und bei Applikation der Zellen mit Matrigel ein positives PCR-Ergebnis auf. Witty et al (1994) und Flatmark et al (2004) beschrieben ebenso, dass über 90% der Tiere angewachsene Tumorzellen im Darm trugen.

Die in der PCR auch nach einer Versuchsdauer von 10-16 Wochen nach Zellimplantation nachweisbare Anwesenheit der Tumorzellen im Darm der Versuchstiere ließ sich mit endoskopischen Verfahren allerdings kaum verifizieren. Während der Weißlichtendoskopie konnten bei beiden Zelllinien leichte Veränderungen detektiert werden, die sich allerdings auch in 10-16 Wochen nach der Implantation nicht in große, eindeutig detektierbare Tumore entwickelt hatten. Diese Veränderungen weckten den Eindruck eines flachen Wachstums, wodurch sie schwer von gesundem Gewebe zu unterscheiden waren. Mit den von Bhullar et al 2011 publizierten Bildern waren die hier entstandenen Aufnahmen visuell vergleichbar.

Allerdings konnte keine der während der Weißlichtendoskopie detektierten Veränderungen während der Fluoreszenzendoskopie anhand der intrinsischen Fluoreszenz der implantierten Zellen als Tumor bestätigt werden, auch nicht in den Tieren, in denen im Rahmen der PCR-Analyse das TurboFP635-Gen nachgewiesen wurde. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte darin liegen, dass die Insufflation des Darms während der Endoskopie die Beurteilung des Gewebes erschwert und möglicherweise zu einer Fehlinterpretation führt, denn bei zu viel Luft im Darm werden die Darmwände gegen die inneren Organe gedrückt und erscheinen quasi „transparent“. Denkbar ist auch, dass die Transfektion der Tumorzellen nicht vollständig stabil war, und dass die Zellen nach längerer Zeit in der *in vivo*-Anwendung keine detektierbare Fluoreszenz mehr aufwiesen.

Eine gewisse Inhomogenität in der Fluoreszenz der LS-174TFP635 und SW480-Zellen hatte sich bereits in den *in vitro* Experimenten bei der durchflusszytometrischer Analyse angedeutet, wobei die LS-174TFP635-Zellen im Vergleich zu den SW480FP635-Zellen ein

insgesamt helleres Bild lieferten. Eine kontinuierliche Abnahme der Anzahl an Zellen mit detektierbarer Fluoreszenz wurde bei beiden Zelllinien über einen längeren Beobachtungszeitraum festgestellt (s. 5.2.2). Obwohl nicht unmittelbar nach stabiler Transfektion von einer Abnahme der Fluoreszenz ausgegangen wird, ist dies kein ungewöhnliches Ereignis, denn mit der Zeit kann auch die Expression eines Genes nach der Transfektion abnehmen (Migliaccio et al 2000).

Möglicherweise war auch eine Restfluoreszenz der implantierten Tumorzellen noch vorhanden, aber bei der Fluoreszenzendoskopie von der hohen Autofluoreszenz im Darm nicht zu unterscheiden. So liegt beispielsweise die Emission des TurboFP635-Proteins und des durch die Darmbakterien synthetisierten Porphyrins im gleichen Wellenlängenbereich (Bottiroli & Croce 2004). Obgleich die bei diesen Experimenten verwendete breitbandige Anregung (s. 4.2) das Absorptionsmaximum des Porphyrins bei 405 nm nicht umfasst, ist aufgrund des breiten Porphyrin-Anregungsspektrums dennoch mit dessen sowie der Anregung anderer körpereigener Stoffe zu rechnen. Hier könnte die Verwendung eines Fluoreszenzproteins aus einem noch längerwelligen Bereich den Einfluss der Autofluoreszenz reduzieren.

Eine weitere Möglichkeit, weswegen sich die Tumorzellen nicht fluoreszenzendoskopisch nachweisen ließen, könnte das Einwachsen der Tumorzellen in die submukosalen Gewebereiche liegen. Bei der Verwendung der Maus Darmkrebs-Zelllinie CT26 wurde 14 Tage nach der Zellimplantation mit Trypsinvorbehandlung ein Eindringen des Tumors in tiefere Darmschichten gezeigt, was die fluoreszenzendoskopische Detektion erschwerte (Alencar et al 2005). Auch Bhullar et al (2011) zeigte zuerst oberflächlich wachsende Tumore nach der Elektrokoagulation der Schleimhäute in dem Darm der Maus, die nach wenigen Wochen des Wachstums in submukosale und intramuskuläre Schichten eingedrungen sind.

Faktoren wie eine schwaches Fluoreszenzsignal in den implantierten Zellen, möglicherweise submukosal wachsende Tumore und die Rest-Autofluoreszenz des Darmes, selbst in dem verwendeten Wellenlängenbereich, haben insgesamt die fluoreszenzendoskopische Detektion der Tumore verhindert. Damit konnte in dieser Arbeit kein orthotopes Darm-Tumormodell etabliert werden, dass sich zur Validierung des Fluoreszenzendoskops und der Kontrastmittel eignen würde.

6.1.3 Aufbau eines orthotopen Lungen-Tumormodells

Bei der Etablierung des Lungen-Tumormodells war eine der Hauptbedingungen die Tumore endoskopisch auch detektieren zu können. Aufgrund der geometrischen Verhältnisse der Ratten-Atemorgane mussten die Tumorherde im Bereich der Trachea liegen. Mit einem im Projekt zur Verfügung stehenden Endoskop mit 1,2 mm Durchmesser konnte die Trachea inklusive der Areale knapp unterhalb der Bifurkation gut bronchoskopiert werden. Weitere Verzweigungen der Bronchien konnten jedoch aufgrund der anatomischen Gegebenheiten nicht endoskopisch untersucht werden. Dementsprechend sollte die Implantation der Tumorzellen im oberen Bereich der Luftröhre erfolgen.

Aus der Literatur ließ sich entnehmen, dass bei gleicher Implantationsmethode die Anwachsrate unterschiedlicher Zelllinien sehr stark variiert. Mase et al (2002) beschreibt, dass die Entwicklung der Tumore je nach Zelllinie zwischen 0 und 100% bei der intratrachealen Zellimplantation in die Maus-Lunge liegen kann. Eine 80%ige Entwicklungsrate der Tumore in der Lunge konnte unter Verwendung von Elastase beobachtet werden (March et al 2001).

In den *ex vivo* Versuchen dieser Arbeit wurde die Elastase-Wirkung mit Trypsin verglichen (Daten nicht gezeigt). Es wurde kein sichtbarer Unterschied bezüglich der Schleimhautauflockerung beobachtet. Aus diesem Grund wurde Trypsin für die *in vivo*-Versuche gewählt, um eine mögliche Induktion von Asthma bei Elastase-Verwendung zu vermeiden (Voynow et al 2004).

Wie zuvor bei den Versuchen zur Etablierung eines Darm-Tumormodells wurde auch bei der intratrachealen Zellimplantation von SK-MES1FP635-Zellen unterschiedliche Vorgehensweisen getestet. So wurden zunächst Zellen in Puffer ohne Matrigel in die Trachea instilliert. Dabei wurden zum einen Tiere ohne weitere Vorbehandlung verwendet, in einer zweiten Gruppe wurden die Schleimhäute der Atemorgane mit Trypsin vorbehandelt, um die Anwachsrate zu erhöhen. Bei den Tieren aus diesen beiden Gruppen konnte während der Weißlichtendoskopie keine Entwicklung eines Tumors im für das Endoskop zugängigen Bereich festgestellt werden. Auch bei der Fluoreszenzbronchoskopie konnte keine intrinsische Fluoreszenz der implantierten Zellen in der Trachea detektiert werden. Eine schwache bzw. instabile Fluoreszenz der Zellen, wie sie bei den Darmtumorzellen beobachtet wurde, wurde für die SK-MES1FP635-Zellen nicht angenommen, da sich diese

Zellen in der Durchflusszytometrie durch hohe und andauernde Fluoreszenzstärke auszeichneten (Abbildung 9F). Es musste daher davon ausgegangen werden, dass sich bei diesem Implantationsverfahren keine Tumorzellen in der oberen Trachea angeheftet hatten. Demgegenüber wurden 16 Wochen nach der Zellimplantation bei der Präparation der Lunge mehrere knotenartige grau-weiße Stellen bzw. Tumore beobachtet. Derartige Tumorbildungen wurden bei analogem Versuchsansatz auch von Mase et al (2002) und March et al (2001) beschrieben. Dies deutet darauf hin, dass sowohl Trypsin als auch die Zellen während der Implantation in die Alveolen eingeflossen sind und sich dort Tumore entwickelten. Mittels PCR wurden diese verdächtigen Stellen an der Lunge auch als tumorpositiv identifiziert. Diese sich in der Lunge entwickelten Tumore waren allerdings nicht zur Bearbeitung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit verwendbar, da die Tumore nicht mittels Endoskop erreicht werden konnten.

Um das Herablaufen der Zellsuspension in der Trachea zu verlangsamen und das Anhaften der Zellen im oberen Atemwegsbereich zu erleichtern, wurde in weiteren Versuchen der Zellsuspension Matrigel hinzugefügt. Diese Mischung aus extrazellulären Matrix-Komponenten ist bei niedrigen Temperaturen flüssig und wird bei über 4°C zunächst gelartig und verfestigt sich rasch bei Körpertemperatur. Dadurch sollte sich ein „Auslaufen“ der Implantations-Suspension vermeiden lassen (Doki et al 1999) und ein Anhaften der Zellen im Bereich der Trachea erleichtern. So wurde in mehreren Arbeiten beschrieben, dass es bei Verwendung von Matrigel während der orthotopen Zellinjektion zur Bildung von kompakt lokalisierten Tumorknoten in der Lunge kam (Lavergne et al 2012, Mordant et al 2011, Saha et al 2010). Im Einklang mit diesen Arbeiten konnte auch in Rahmen der vorliegenden Arbeit bei der intratrachealen Implantation von SK-MES1FP635-Zellen unter Zugabe von Matrigel bei allen Tieren eine Tumorbildung in der Trachea erreicht werden. Die Tumore waren bei der Bronchoskopie sowohl im Weißlicht- als auch im Fluoreszenz-Kanal deutlich erkennbar, wobei sich ihr Aussehen im Beobachtungszeitraum von bis zu 16 Wochen nach Implantation veränderte. Zu Versuchsbeginn waren die im Bronchoskop detektierten Veränderungen in der Luftröhre noch als deutliche „Klumpen“ erkennbar, welche vermutlich auch noch Restanteile von Matrigel enthielten. Im Versuchsverlauf verflachten diese Strukturen jedoch, was mit einem Auswandern der Tumorzellen und einem Abbau des Matrigels begründet werden kann. Da Matrigel aus der extrazellulären Matrix (ECM) von Maus-Sarkom-Zellen gewonnen wird und die ECM durch Matrixmetalloproteinasen degradiert wird (Stetler-Stevenson et al 1993), sollte sich die Menge an Matrigel im Tumor bei Anwesenheit von

Matrixmetalloproteasen reduzieren. Die Expression solcher Matrixmetalloproteasen unterscheidet sich von Zelllinie zu Zelllinie (Roomi et al 2009), konnte aber für die SK-MES1-Zelllinie eindeutig nachgewiesen werden (Luis-Ravelo et al 2011). Dies lässt einen Abbau von Matrigel durch diese Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* erwarten.

Einhergehend mit einer Verflachung der Tumorstrukturen war eine Abnahme der Fluoreszenzstärke zu detektieren. Sehr kleine Tumore (deutlich kleiner als 1 mm) waren 16 Wochen nach der Zellimplantation nur noch schwer detektierbar. Eine Instabilität der Transfektion oder eine Abnahme der Proteinfluorophor-Expression über einen längeren Zeitraum erscheint aufgrund der *in vitro*-Daten mit den SK-MES1FP635-Zellen aber eher unwahrscheinlich. Eine mögliche Ursache für die verschlechterte Detektierbarkeit nach mehreren Wochen kann (ähnlich wie beim Darm-Tumormodell) das Überwachsen durch Epithelzellen der Ratte oberhalb des implantierten Matrigel-Zell-Knoten sein, wobei Matrigel in diesem Fall als Substrat für das Rattenepithel dienen könnte. Zur besseren Beurteilung der Tumorentwicklung müsste das Gewebe entsprechend histologisch begutachtet werden. Dafür würden Cryo- oder Paraffin-Einbettungen infrage kommen. Allerdings zeigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien zu histologischer Analysierbarkeit des Tumorgewebes, dass die intrinsische Fluoreszenz der SK-MES1FP635-Zellen sowohl durch Fixierung mit PFA als auch durch Cryo-Einbettung in einem erheblichen Maß zerstört wird. Bei der Paraffin-Einbettung stieg zudem die Eigenfluoreszenz des Gewebes deutlich an. Dies macht die histologische Detektion der Tumore anhand der intrinsischen Fluoreszenz extrem schwierig. Eine Möglichkeit die Fluoreszenz der implantierten Tumore im Gewebe zu erhalten wäre die Verwendung von Lebendschnitten. Hierbei wird das Gewebe in Agarose eingebettet und bei 4°C geschnitten. Dabei bleiben alle Eigenschaften des Gewebes und die Fluoreszenz der implantierten Zellen weitgehend erhalten. Alternativ dazu könnten die eingebetteten Gewebeschnitte mittels Antikörper untersucht werden, zum Beispiel gegen das TurboFP635 Fluoreszenzprotein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gelang, ein orthotopes Tumormodell mit intrinsisch fluoreszierenden Tumorzellen in der Trachea der Ratte als Modellsystem zu etablieren, mit dem eine Validierung sowohl des Mehrkanal-Fluoreszenzendoskops als auch von fluoreszierenden Kontrastmitteln möglich ist.

6.2 Validierung der Fluoreszenzendoskopie

Ziel dieser Arbeit war es ein Tumormodell speziell zur endoskopischen Detektion von Tumorfürstadien zu etablieren. Diese Frühstadien zeichnen sich insbesondere durch sehr kleine, unter Umständen nur wenige Zellen umfassende Tumorherde oder flache Tumore sog. „flat lesion“ aus. Während der Weißlichtendoskopie des Darmes werden bis zu 20 % der Adenome ≤ 1 cm sowie flache Veränderungen an den Schleimhäuten häufig übersehen, ausgeprägte Tumore werden dagegen gut erkannt. Die Qualität der Endoskopie ist unter anderem von der Erfahrung des Arztes abhängig. Erst nach mindestens drei Jahre intensiver Übung steigt die Quote der erkannten veränderten Gewebeareale während der Endoskopie (Goekenjan et al 2011, Rex et al 1997a, Tassios et al 1999). Davon unabhängig kann die Qualität der Endoskopie und die Erkennung der Tumore in frühen Stadien anhand der Fluoreszenzendoskopie verbessert werden. Im Vergleich zur herkömmlichen Weißlichtbronchoskopie können während der Fluoreszenzbronchoskopie basierend auf der Autofluoreszenz bis zu 40 % zusätzliche Tumorherde detektiert werden. Auch bei der Autofluoreszenz-basierenden Fluoreszenzendoskopie des Darmes wurde eine höhere Findungsrate der Tumore demonstriert (Haringsma et al 2001, Lam et al 2000). Ein Nachteil der Autofluoreszenz-induzierten Endoskopie ist jedoch die hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen die durch eine erhöhte Autofluoreszenz in Entzündungsbereichen zustande kommen kann (Borisova et al 2011). Allerdings kann die Qualität der Endoskopie anhand „Molekularer Bildgebung“ deutlich verbessert werden (Chang et al 2010, Weissleder & Mahmood 2001). In der vorliegenden Arbeit umfasste die Arbeitshypothese, dass die endoskopische Detektion kleiner und flacher Tumorbereiche erleichtert wird, wenn sich das entartete Gewebe durch eine exogene tumorspezifische Fluoreszenzmarkierung von nicht fluoreszierendem, gesundem Umgebungsgewebe abhebt. Dies wurde bereits erfolgreich mit dem Photosensibilisator 5-ALA im Bereich der Diagnostik von Blasen Tumoren erreicht, wodurch im Vergleich zur Weißlichtendoskopie zwischen 18 und 76 % der Tumore fluoreszenzendoskopisch zusätzlich detektiert worden sind (Jichlinski et al 1997, König et al 1999). In der klinischen Studie mit dem Hexylesterderivat von 5-ALA wurden während der Fluoreszenzendoskopie des Darmes über 38 % Neoplasien mehr als im Weißlicht detektiert, der Vorteil der Fluoreszenz- gegenüber der Weißlichtendoskopie insbesondere bei den „flat lesion“ ist damit gezeigt (Mayinger et al 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst anhand intrinsisch fluoreszierender Tumorzellen in dem zuvor etablierten Modellsystem analysiert werden, wie empfindlich die Fluoreszenzendoskopie tatsächlich im Vergleich zur Weißlichtendoskopie ist. Im diagnostischen Anwendungsfall könnte eine derartige Markierung durch entsprechende Kontrastmittel erreicht werden, demzufolge sollte auch eine Fluoreszenzendoskopische Untersuchung kontrastmittelmarkierter Tumorzellen erfolgen. Bei der Untersuchung der transfizierten SK-MES1FP635-Zellen *in vitro* mit einem Xenon-basierten Endoskopsystem konnte nachgewiesen werden, dass Tumorzellen basierend auf ihrer intrinsischen Fluoreszenz visualisiert werden können, und dass die Auflösung des Endoskops bis zur Diskriminierung einzelner Zellen reicht. Damit konnte gezeigt werden, dass das Fluoreszenzendoskop eine im Rahmen der Fehlerungenauigkeit ähnliche Nachweisgrenze für die Einzelzell-Detektion wie ein herkömmliches Xenon-basierte Fluoreszenzmikroskop (Olympus) aufweist. Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass die Auflösung eines Fluoreszenzendoskops ausreicht, um einzelne fluoreszenz-markierte Zellen *in vitro* detektieren zu können. Das dafür verwendete herkömmliche Xenon-basierte Endoskopsystem ermöglicht die Fluoreszenzdetektion nur unter Verwendung eines einschwenkbaren optischen Filters. Deshalb ist die Betrachtung der Veränderungen im Weißlicht- oder Fluoreszenzmodus nur nacheinander möglich, und erfordert ein Umschalten zwischen den Modi. Die Betrachtung der intrinsischen Zell- oder der Kontrastmittel-fluoreszenz ist nach dem Umbau der Filter vor der Endoskopkamera möglich, was jedoch keine Beobachtung der gleichen Stellen erlaubt. Für die sichere Validierung der Kontrastmittel war ein Mehrkanal-Endoskopsystem erforderlich, das einen direkten Vergleich in beiden Fluoreszenzmodi parallel gestattet. In diesem Fall ist kein Umbau vom Endoskop und Schalten zwischen unterschiedlichen Modi notwendig. Die oben beschriebene hohe Auflösung und Diskriminierung bis zu einzelnen Zellen wurde ebenso mit dem Laser-basierten Mehrkanal-Endoskopsystem verifiziert.

Mit dem so *in vitro* getesteten neuen Mehrkanal-Endoskopsystem wurden dann die *in vivo* Untersuchungen am orthotopen Tumormodell in der Trachea durchgeführt. Dabei wurde sowohl im Weißlicht- wie auch im Fluoreszenz-Kanal nach Auffälligkeiten gesucht. Bei allen Untersuchungen wurden im Weißlicht-Kanal im Bereich der Trachea knotenartige Strukturen detektiert. Von diesen Strukturen wurden 95 % auch im TurboFP635-Kanal gefunden und damit durch die intrinsische Fluoreszenz der implantierten Tumorzellen als tumor-positiv bestätigt. Ferner wurden mehrmals im Fluoreszenz-Kanal Bereiche detektiert, die zuerst nur

durch die intrinsische Fluoreszenz der implantierten Zellen, nicht jedoch im Weißlicht-Kanal auffielen. Nach genauerer Betrachtung dieser verdächtigen Stellen, die insgesamt 29 % von insgesamt 29 fluoreszenz-auffälligen Regionen ausmachten, konnte zum Teil auch eine Veränderung der Schleimhäute der Trachea im Weißlicht-Kanal detektiert werden. Mindestens vier im TurboFP635-Kanal auffällige Stellen blieben jedoch nach genauer Betrachtung im Weißlichtbild unsichtbar (s. Abbildung 24C). In dieser Auswertung wurden exemplarisch Bronchoskopien von drei Tieren einbezogen. Die Form der Tumore während der Implantation konnte nicht beeinflusst werden und entstand zufällig, je nachdem wie ein Zell-Tropfen auf die Tracheawand fiel und sich verfestigte. Alencar et al (2005) und Habibollahi et al (2012) konnten im Darm- und Ösophagus-Tumormodell anhand der Fluoreszenzendoskopie, basierend auf exogene Fluoreszenz, die im Weißlichtbild nicht sichtbaren Tumore detektieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzendoskopie eine hochempfindliche Methode darstellt, die vor allem bei der Detektion von kleinen und flachen Läsionen, welche im Weißlicht oft unentdeckt bleiben, von großem Vorteil ist. Insgesamt hat sich das Arbeiten mit dem Laser-basierten Mehrkanal-Endoskopsystem als praktisch und bequem gezeigt. Durch die parallele Betrachtung aller Modi konnte die Dauer der Bronchoskopie erheblich verkürzt werden. Die quasi-simultane Betrachtung der Tumore im Weißlicht- und im Fluoreszenzlichtmodus ermöglichte den direkten Vergleich der Tumore, und erlaubte die Aussage über die Empfindlichkeit der Fluoreszenzendoskopie für sehr kleine und flache Läsionen. Dies war während der Untersuchungen mit dem Xenon-basierten System mit einschwenkbaren Filter nur bedingt möglich, da bereits eine minimale Bewegung der Hand während der Endoskopie, die Atembewegungen des Tieres durch eine 2-3 mm große Trachea und das Umschalten der Modi dazu geführt haben, dass nicht immer die gleiche Stelle angeschaut werden konnte. Dadurch konnten nur sehr ausgeprägte Stellen im Weißlicht- und Fluoreszenzmodus angeschaut werden. Da für die Betrachtung der Kontrastmittel-Fluoreszenz ein kompletter Umbau der Filter notwendig ist, was das Entfernen des Endoskops aus der Trachea erfordert, wäre dieses System für die Validierung der Kontrastmittel sehr schwierig und nicht zuverlässig.

6.3 Detektion der Tumore mit Hilfe von Kontrastmitteln

Zur fluoreszenzendoskopischen Detektion der Tumore im menschlichen Körper müssen die Tumore mit Hilfe von fluoreszierenden Kontrastmitteln extrinsisch markiert werden. Ein solches Vorgehen sollte beispielhaft anhand zweier experimenteller fluoreszierender Kontrastmittel untersucht werden. Dabei wurden die Kontrastmittel-Fluorophore so gewählt, dass ihre Anregungs- und Emissionswellenlängen einerseits minimal mit denen des TurboFP635 aus den Tumorzellen überlappen und andererseits auf die Laser- und Filterausrüstung des neu entwickelten Mehrkanal-Fluoreszenzendoskops ausgerichtet waren. Dies wurde erreicht durch die Wahl des Fluoreszenzfarbstoffes ATTO495 zur Markierung eines tumorspezifischen Peptides (Anregungsmaximum 495 nm, Emissionsmaximum 527 nm) und des Photosensibilisators Radachlorin (Anregungsmaximum 405 nm, Emissionsmaximum 668 nm).

Das in der vorliegenden Studie verwendete Peptid mit der Sequenz RGDLATLRQLAQEDGVVGVGR wird in der Literatur als spezifisch für Tumorzellbindung beschrieben und wurde auch schon in entsprechenden Zellkulturstudien eingesetzt. Ferner konnte ein Rezeptor in Lungen-Tumorzelllinien nachgewiesen werden (Elayadi et al 2007, Zhou et al 2004).

Nach der Synthese und Markierung mit dem ATTO495-Farbstoff wurde das als D1ATTO495 bezeichnete Peptid hinsichtlich der Eignung als Kontrastmittel in Verbindung mit dem Mehrkanal-Fluoreszenzendoskop untersucht (s. 5.5). Die *in vitro* Untersuchungen ergaben eine fluoreszenzendoskopisch gut detektierbare Anfärbung der SK-MES1FP635-Zellen. Dabei zeichnete sich der an das Peptid gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff ATTO495 durch eine hohe Photostabilität während der endoskopischen Untersuchungen aus.

Bei den *in vivo* Bronchoskopien wurden 30–40 Minuten nach der intratrachealen Applikation von D1ATTO495 (s. 5.7.2.2) im Kontrastmittel-Kanal des Mehrkanal-Endoskops mehrere Peptid-markierte Stellen detektiert, die sich deutlich vom umliegenden Gewebe abhoben. Zur quantitativen Auswertung der Videoaufnahmen wurde die Fluoreszenzhelligkeit der Tumore zu der des umliegenden Gewebes ins Verhältnis gesetzt. Da diese Werte sehr vom Winkel und Abstand des Endoskops von den untersuchenden Arealen abhängig sind (Weissleder & Mahmood 2001), konnten nur relative Werte ermittelt werden, und es kann somit nur von einer semi-quantitativen Auswertung der Endoskopien

gesprochen werden. Außerdem wird die Belichtungszeit für die Kamera des Endoskops abhängig von der Helligkeit der Fluoreszenz automatisch angepasst und ist während der Endoskopie nicht konstant, was das Ermitteln von absoluten Werten für die Fluoreszenzhelligkeit nicht zulässt. Die Schwierigkeit der quantitativen Auswertung der endoskopisch erzeugten Fluoreszenzbilder wurde unter anderem vom Upadhyay et al (2007) eingehend beschrieben.

Auf dieser Basis wurde ein Kontrast zwischen unverändertem Gewebe und Tumorherden von 1:2 bis 1:6 ermittelt. Bei 43 % der durch das Peptid markierten Bereiche konnte im TurboFP635-Kanal ebenfalls die intrinsische Fluoreszenz des Proteinfluorophors beobachtet werden (richtig-positiv). Hierbei fielen mehrere Stellen zunächst nur durch die Fluoreszenz im Kontrastmittel-Kanal auf (s. Abbildung 27C und D). Im Weißlicht-Kanal waren sie zuerst nicht sichtbar. Erst nach genauem Betrachten konnte die intrinsische Fluoreszenz des Tumors und die Veränderungen im Weißlicht-Kanal ebenfalls wahrgenommen werden.

Hingegen wurden 17 % der Tumorareale nur durch die Fluoreszenz im TurboFP635-Kanal und nicht im Peptid-Kanal detektiert (falsch-negativ). Die hohe Zahl an falsch-negativen Befunden könnte an der Art und Weise der Peptid-Applikation liegen. Mit dem verwendeten MicroSprayer (IA-1C; Penn Century, Philadelphia, PA, USA) konnte keine gleichmäßige Verteilung des Peptides in der gesamten Trachea gewährleistet werden, wie es bei einer systemischen Applikation möglich wäre.

Die verbleibenden 40 % der Stellen wurden im Kontrastmittel- aber nicht im TurboFP635-Kanal detektiert. Eine derart hohe Quote an falsch-positiven Befunden könnte durch mehrere Faktoren zustande kommen. Zum einen ist es möglich, dass die intrinsische Fluoreszenz der Tumore nach längerem Wachsen *in vivo* schwächer wird und kaum noch detektierbar ist, wodurch die Tumore ausschließlich durch die Peptid-Markierung mittels Fluoreszenzbronchoskopie visualisiert werden könnten. Zum anderen konnte die Trachea der Ratte aufgrund der geometrischen Gegebenheiten nach der Applikation des Peptides nicht gespült werden, wodurch ein unspezifisches Haften an den Schleimhäuten verstärkt aufgetreten sein könnte.

Die Problematik einer unspezifischen Anfärbung von Schleimhautoberflächen sollte bei systemischer Anwendung geringer sein. Daher wurde als zweites Kontrastmittel Radachlorin gewählt. Eine erfolgreiche Akkumulation von Radachlorin in Tumorzellen wurde in der Studie von Douillart et al (2010) gezeigt. Die *in vitro* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine

gut fluoreszenzendoskopisch detektierbare Anreicherung des Radachlorin in den SK-MES1FP635-Zellen (s. 5.5) und korrelieren mit den Daten aus der Literatur. Unter Verwendung des Mehrkanal-Endoskops *in vitro* war die Radachlorin-Fluoreszenz im Kontrastmittel-Kanal ebenfalls gut detektierbar, allerdings war eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität bereits in der ersten Minute der endoskopischen Untersuchungen zu beobachten (s. Abbildung 15C und D). Das Phänomen der niedrigen Photostabilität des Radachlorins und der Effekt des Ausbleichens musste entsprechend in den *in vivo* Untersuchungen berücksichtigt werden, um die Ergebnisse richtig interpretieren zu können. Eine gute Aufnahme des Radachlorins und ein erfolgreiches Durchführen einer Photodynamischen Therapie (PDT) an Tumorzellen *in vitro* wurde von Bae et al (2004) gezeigt, wobei Konzentration und Inkubationszeit eine wichtige Rolle spielten.

In *in vivo* Vorversuchen der vorliegenden Arbeit wurde den tumortragenden Ratten Radachlorin in Konzentrationen von 2,5 mg/kg, 3,5 mg/kg, 10 mg/kg und 40 mg/kg intraperitoneal (IP) injiziert. Unterschiedliche Transportrouten beeinflussen scheinbar die Akkumulation des Radachlorins in den Tumoren, so verspricht eine IP-Injektion des Radachlorins eine bessere Anreicherung als eine intravenöse (IV) Injektion (Douillard et al 2009). Bei der IP-Injektion wird je nach Tumorart ein Zeitfenster von 5 bis zu 18 Stunden vor der Untersuchung empfohlen (Bae et al 2004). Die für Mäuse empfohlene Konzentration von 40 mg/kg Radachlorin (Bae et al 2004, Douillard et al 2009) wurde in Vorversuchen ausgeschlossen, da während der Bronchoskopie auch nach über 24 Stunden Inkubation die gesamte Trachea eine deutliche Radachlorin-Fluoreszenz zeigte und keine Kontrastierung Tumor- zu Normalgewebe erreicht werden konnte. Eine optimale Kontrastierung ergab sich sechs bis sieben Stunden nach IP-Injektion von 3,5 mg/kg Radachlorin.

Während der Fluoreszenzbronchoskopie *in vivo* konnte nach der intraperitonealen Applikation von Radachlorin (s. 5.7.2.3) eine deutliche rote Fluoreszenz in der Trachea beobachtet werden (s. Abbildung 28A und B). Insgesamt war die Beurteilung des Gewebes durch die Fluoreszenz in der gesamten Trachea relativ kompliziert. Wegen schnellen Ausbleichens des Radachlorins war eine zügige Begutachtung der Fluoreszenzhelligkeiten notwendig. Eine ungleichmäßige Ausleuchtung des Gewebes machte es ebenfalls schwierig zu beurteilen, ob die Fluoreszenz durch eine höhere Radachlorin-Akkumulation oder durch mehr Licht aus dem Endoskop verursacht wurde (Stepp 2005).

Innerhalb der Versuche (n = 13 Bronchoskopien; 55 fluoreszenz-auffällige Stellen) wurden 63,5 % richtig-positive Markierungen der Tumore ermittelt, welche sich durch eine deutlich hellere Fluoreszenz im Vergleich zum umliegenden Gewebe unterschieden. In klinischen Studien der Dermatologie mit dem Ziel der Detektion von Hauttumoren konnten 100 % der richtig-positiven, histologisch bestätigten Tumore, mittels Radachlorin detektiert werden (Vakulovskaya et al 2004). Allerdings liegen zu den falsch-positiven oder falsch-negativen Ereignissen keine Daten vor, und macht damit die Beurteilung der Spezifität von Radachlorin unmöglich.

23,5 % der auffälligen Stellen wurden als falsch-positiv detektiert. Diese Bereiche waren im Kontrastmittel-Kanal deutlich heller als das umliegende Gewebe, jedoch wurde dies nicht durch die intrinsische Fluoreszenz der implantierten Zellen im TurboFP635-Kanal bestätigt. Eine ungleichmäßige Ausleuchtung oder eine zu schwache intrinsische Fluoreszenz der Zellen können Ursachen dafür sein. Ferner wurden 13 % der in die Auswertung einbezogenen Stellen als falsch-negativ definiert, da sie nur im TurboFP635-Kanal aber nicht im Kontrastmittel-Kanal durch Fluoreszenz nachweisbar waren (s. Abbildung 28E und F). Die ausschließlich im TurboFP635-Kanal detektierten Tumorherde waren in diesen Fällen meist sehr klein, so dass möglicherweise das Kontrastverhältnis der Tumore zum umliegenden Gewebe im Kontrastmittel-Kanal nicht ausreichte um sie zu visualisieren.

Insgesamt konnte sowohl mit dem luminal verabreichten Peptid-Kontrastmittel wie auch mit dem systemisch applizierten Radachlorin eine Fluoreszenzmarkierung von Tumorregionen erreicht werden, die sich vom umliegenden Gewebe abhob. Allerdings war das Kontrastverhältnis von Tumor zu gesundem Gewebe teilweise sehr niedrig, so dass verhältnismäßig hohe Raten an falsch-positiven und falsch-negativen Befunden auftraten, deren Ursachen nicht eindeutig abgeklärt werden konnten (Vakulovskaya et al 2004).

6.4 Schlussfolgerungen

Das Ziel ein orthotopes Tumormodell zu entwickeln wurde im Zielorgan Lunge erreicht. In der Trachea wachsende Tumore ließen sich gut mittels intrinsischer Fluoreszenz nachweisen. Die Verflachung der Tumore und mit der Zeit abnehmende Fluoreszenzstärke sind die Schwachstellen dieses Modells. In den ersten Wochen des Versuches ist allerdings eine starke, gut detektierbare Fluoreszenz der Tumore zu beobachten. Dies und eine hohe Reproduzierbarkeit bei der Tumorentwicklung machen das Modell in den Versuchen gut einsetzbar.

Eine hohe Sensitivität des neuartigen Mehrkanal-Endoskopsystems mit der Auflösungsmöglichkeit bis zu einzelnen Zellen konnte *in vitro* gezeigt werden. Daraus lässt sich schließen, dass dies unter Verwendung von stark fluoreszierenden Kontrastmitteln im infraroten Wellenbereich auch *in vivo* ermöglicht werden kann.

Bei der *in vivo* Verwendung des Endoskops im Lungen-Tumormodell konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz-basierte Endoskopie als Ergänzung zur Weißlichtendoskopie eine sichere Detektion von flachen Tumoren bieten kann. Eine kombinierte Endoskopie, die eine parallele Betrachtung des Organes im Weißlicht- und Fluoreszenzmodus erlaubt, würde auch einem weniger erfahrenen Arzt die Diagnosestellung erleichtern.

Welches ist von den zwei verwendeten Kontrastmitteln das Bessere? In Verbindung mit dem etablierten Lungen-Tumormodell konnten bei beiden Kontrastmitteln Vor- und Nachteile beobachtet werden. Nach der intraperitonealen Injektion von Radachlorin ist eine gleichmäßige Verteilung im Körper festzustellen, wodurch eine hohe Sensitivität gewährleistet ist, allerdings die Beurteilung von bestimmten Gewebearealen ohne Farbkontrast ist nur bedingt möglich. Im Lungen-Tumormodell der Ratte dieser Arbeit lagen die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten von gesundem und tumorösem Gewebe zwischen 1:1,5 und 1:4. Zudem wurde ein schnelles Ausbleichen des Radachlorins beobachtet. In klinischen Studien für Hautkrebs wurde von Verhältnissen 1:3 bis 1:6 berichtet (Vakulovskaya et al 2004). Bei der intratrachealen Applikation von D1ATTO495-Peptid wurde sogar ein Kontrast der Fluoreszenzintensitäten von 1:2 bis 1:6 zwischen gesundem und tumorösem Gewebe erreicht. Während der Bronchoskopie ergab sich hier ein klarer Farbkontrast (die gesamte Trachea erscheint blau und markierte Stellen sind grün). D1ATTO495 zeichnete sich ebenfalls durch eine hohe Photostabilität aus. Allerdings konnte

bei der Applikationsmethode keine 100 %ige gleichmäßige Verteilung des Kontrastmittels gewährleistet werden.

Zur Ermittlung der Sensitivität und Spezifität beider Kontrastmittel am etablierten Tumormodell wurden diejenigen Gewebeareale als tumor-positiv bezeichnet, welche im TurboFP635-Kanal durch die intrinsische Fluoreszenz der implantierten Zellen hervortraten. Unabhängig von der Ursache wurden Areale nicht als Tumor definiert, sobald die Fluoreszenz in dem TurboFP635-Kanal nicht detektierbar war, auch wenn im Weißlicht-Kanal Veränderungen an den Schleimhäuten zu beobachten waren. Um die tatsächliche Rate der falsch-negativen Befunde ermitteln zu können, müssten solche Tumore näher untersucht werden, indem eine Biopsie von der verdächtigen Stelle entnommen und diese entweder mittels PCR oder mit histologischen Verfahren genauer beurteilt wird. Für die Biopsieentnahme wäre ein Arbeitskanal im Endoskop erforderlich, dadurch wäre jedoch die zulässige Endoskopgröße für die Bronchoskopie einer Ratte überschritten. Aus diesem Grund kann die Kontrastmittel-Spezifität und Sensitivität nur bezogen auf das etablierte Modell validiert werden. Es ist durchaus möglich, dass sich diese nach einer histologischen oder molekularbiologischen Untersuchung der vermeintlich falsch-positiv markierten Areale als Tumore ohne intrinsische Fluoreszenz herausstellen. Hierdurch würde die Zahl der falsch-positiven Befunde entsprechend sinken.

7 Literatur

- Adams JM, Cory S. 1991. Transgenic models of tumor development. *Science* 254: 1161-7
- Agusti C, Xaubet A, Monton C, Sole M, Soler N, et al. 2001. Induced sputum in the diagnosis of peripheral lung cancer not visible endoscopically. *Respir Med* 95: 822-8
- Aina OH, Liu R, Sutcliffe JL, Marik J, Pan CX, Lam KS. 2007. From combinatorial chemistry to cancer-targeting peptides. *Mol Pharm* 4: 631-51
- Alencar H, King R, Funovics M, Stout C, Weissleder R, Mahmood U. 2005. A novel mouse model for segmental orthotopic colon cancer. *Int J Cancer* 117: 335-9
- Anisimov VN, Zabezhinski MA, Rossolini G, Zaia A, Piantanelli A, et al. 2001. Long-live euthymic BALB/c-nu mice. II: spontaneous tumors and other pathologies. *Mech Ageing Dev* 122: 477-89
- Austin JH, Romney BM, Goldsmith LS. 1992. Missed bronchogenic carcinoma: radiographic findings in 27 patients with a potentially resectable lesion evident in retrospect. *Radiology* 182: 115-22
- Bae SM, Kim YW, Lee JM, Namkoong SE, Han SJ, et al. 2004. Photodynamic effects of Radachlorin on cervical cancer cells. *Cancer Res Treat* 36: 389-94
- Barrett T, Koyama Y, Hama Y, Ravizzini G, Shin IS, et al. 2007. In vivo diagnosis of epidermal growth factor receptor expression using molecular imaging with a cocktail of optically labeled monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* 13: 6639-48
- Baum O, Hlushchuk R, Forster A, Greiner R, Clezardin P, et al. 2007. Increased invasive potential and up-regulation of MMP-2 in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the beta3 integrin subunit. *Int J Oncol* 30: 325-32
- Baumgartner R, Huber RM, Schulz H, Stepp H, Rick K, et al. 1996. Inhalation of 5-aminolevulinic acid: a new technique for fluorescence detection of early stage lung cancer. *J Photochem Photobiol B* 36: 169-74
- Bäumler W, Ackermann G, Abels C, Szeimies RM. 2003. Fluoreszenzdiagnostik in der Dermatologie. *J Dtsch Dermatol Ges* 1: 569-78; quiz 80-1
- Bhullar JS, Subhas G, Silberberg B, Tilak J, Andrus L, et al. 2011. A Novel Nonoperative Orthotopic Colorectal Cancer Murine Model Using Electrocoagulation. *J Am Coll Surg*
- Borisova E, Vladimirov B, Ivanova R, Avramov L. 2011. *Light-Induced Fluorescence Techniques for Gastrointestinal Tumour Detection*. pp. 231-253. InTech. 310 pp.

- Bottiroli G, Croce AC. 2004. Autofluorescence spectroscopy of cells and tissues as a tool for biomedical diagnosis. *Photochem Photobiol Sci* 3: 189-210
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4438-42
- Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, et al. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7877-82
- Cespedes MV, Espina C, Garcia-Cabezas MA, Trias M, Boluda A, et al. 2007. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *Am J Pathol* 170: 1077-85
- Chang CY, Chiu HM, Wang HP, Lee CT, Tai JJ, et al. 2010. An endoscopic training model to improve accuracy of colonic polyp size measurement. *Int J Colorectal Dis* 25: 655-60
- Chhajed PN, Shibuya K, Hoshino H, Chiyo M, Yasufuku K, et al. 2005. A comparison of video and autofluorescence bronchoscopy in patients at high risk of lung cancer. *Eur Respir J* 25: 951-5
- Chishima T, Miyagi Y, Wang X, Baranov E, Tan Y, et al. 1997. Metastatic patterns of lung cancer visualized live and in process by green fluorescence protein expression. *Clin Exp Metastasis* 15: 547-52
- Citarda F, Tomaselli G, Capocaccia R, Barcherini S, Crespi M. 2001. Efficacy in standard clinical practice of colonoscopic polypectomy in reducing colorectal cancer incidence. *Gut* 48: 812-5
- De Both NJ, Vermey M, Dinjens WN, Bosman FT. 1999. A comparative evaluation of various invasion assays testing colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 81: 934-41
- Doki Y, Murakami K, Yamaura T, Sugiyama S, Misaki T, Saiki I. 1999. Mediastinal lymph node metastasis model by orthotopic intrapulmonary implantation of Lewis lung carcinoma cells in mice. *Br J Cancer* 79: 1121-6
- Douillard S, Olivier D, Patrice T. 2009. In vitro and in vivo evaluation of Radachlorin(R) sensitizer for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* 8: 405-13
- Drechsel-Schlund C, Butz M, Haupt B. 2002. Asbestverursachte Berufskrankheiten in Deutschland - Entstehung und Prognose. Sankt Augustin: HVBG
- Elayadi AN, Samli KN, Prudkin L, Liu YH, Bian A, et al. 2007. A peptide selected by biopanning identifies the integrin alphavbeta6 as a prognostic biomarker for nonsmall cell lung cancer. *Cancer Res* 67: 5889-95

- Enns R. 2007. Quality indicators in colonoscopy. *Can J Gastroenterol* 21: 277-9
- Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-67
- Ferrigno D, Buccheri G, Biggi A. 1994. Serum tumour markers in lung cancer: history, biology and clinical applications. *Eur Respir J* 7: 186-97
- Fidler IJ, Wilmanns C, Staroselsky A, Radinsky R, Dong Z, Fan D. 1994. Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. *Cancer Metastasis Rev* 13: 209-22
- Flatmark K, Maelandsmo GM, Martinsen M, Rasmussen H, Fodstad O. 2004. Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice. *Eur J Cancer* 40: 1593-8
- Funovics MA, Alencar H, Montet X, Weissleder R, Mahmood U. 2006. Simultaneous fluorescence imaging of protease expression and vascularity during murine colonoscopy for colonic lesion characterization. *Gastrointest Endosc* 64: 589-97
- Furuse K, Fukuoka M, Kato H, Horai T, Kubota K, et al. 1993. A prospective phase II study on photodynamic therapy with photofrin II for centrally located early-stage lung cancer. The Japan Lung Cancer Photodynamic Therapy Study Group. *J Clin Oncol* 11: 1852-7
- Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, et al. 2001. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13784-9
- Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, Branscheid D, Flentje M, et al. 2011. [Prevention, diagnosis, therapy, and follow-up of lung cancer. Interdisciplinary guideline of the German Respiratory Society and the German Cancer Society--abridged version]. *Pneumologie* 65: e51-75
- Goetz M, Wang TD. 2010. Molecular imaging in gastrointestinal endoscopy. *Gastroenterology* 138: 828-33 e1
- Goetz M, Ziebart A, Foersch S, Vieth M, Waldner MJ, et al. 2010. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* 138: 435-46
- Greegor DH. 1971. Occult blood testing for detection of asymptomatic colon cancer. *Cancer* 28: 131-4
- Gurney JW. 1996. Missed lung cancer at CT: imaging findings in nine patients. *Radiology* 199: 117-22

- Habibollahi P, Figueiredo JL, Heidari P, Dulak AM, Imamura Y, et al. 2012. Optical Imaging with a Cathepsin B Activated Probe for the Enhanced Detection of Esophageal Adenocarcinoma by Dual Channel Fluorescent Upper GI Endoscopy. *Theranostics* 2: 227-34
- Haringsma J, Tytgat GN, Yano H, Iishi H, Tatsuta M, et al. 2001. Autofluorescence endoscopy: feasibility of detection of GI neoplasms unapparent to white light endoscopy with an evolving technology. *Gastrointest Endosc* 53: 642-50
- Hastings RH, Burton DW, Quintana RA, Biederman E, Gujral A, Deftos LJ. 2001. Parathyroid hormone-related protein regulates the growth of orthotopic human lung tumors in athymic mice. *Cancer* 92: 1402-10
- Haussinger K, Becker H, Stanzel F, Kreuzer A, Schmidt B, et al. 2005. Autofluorescence bronchoscopy with white light bronchoscopy compared with white light bronchoscopy alone for the detection of precancerous lesions: a European randomised controlled multicentre trial. *Thorax* 60: 496-503
- Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH. 2005. Mouse models of colorectal cancer and liver metastases. *Dig Surg* 22: 16-25
- Hemminki K, Santi I, Weires M, Thomsen H, Sundquist J, Bermejo JL. 2010. Tumor location and patient characteristics of colon and rectal adenocarcinomas in relation to survival and TNM classes. *BMC Cancer* 10: 688
- Hixson LJ, Fennerty MB, Sampliner RE, McGee D, Garewal H. 1990. Prospective study of the frequency and size distribution of polyps missed by colonoscopy. *J Natl Cancer Inst* 82: 1769-72
- Hoffman RM. 1999. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs* 17: 343-59
- Hoffman RM. 2002. Green fluorescent protein imaging of tumor cells in mice. *Lab Anim (NY)* 31: 34-41
- Hoffman RM. 2005. The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo. *Nat Rev Cancer* 5: 796-806
- Hsiung PL, Hardy J, Friedland S, Soetikno R, Du CB, et al. 2008. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. *Nat Med* 14: 454-8
- Hsu ER, Gillenwater AM, Hasan MQ, Williams MD, El-Naggar AK, Richards-Kortum RR. 2006. Real-time detection of epidermal growth factor receptor expression in fresh oral cavity biopsies using a molecular-specific contrast agent. *Int J Cancer* 118: 3062-71

- Hung J, Lam S, LeRiche JC, Palcic B. 1991. Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers Surg Med* 11: 99-105
- lochmann S, Lerondel S, Blechet C, Lavergne M, Pesnel S, et al. 2012. Monitoring of tumour progression using bioluminescence imaging and computed tomography scanning in a nude mouse orthotopic model of human small cell lung cancer. *Lung Cancer* 77: 70-6
- Ito S, Muguruma N, Kusaka Y, Tadatsu M, Inayama K, et al. 2001. Detection of human gastric cancer in resected specimens using a novel infrared fluorescent anti-human carcinoembryonic antigen antibody with an infrared fluorescence endoscope in vitro. *Endoscopy* 33: 849-53
- Jaenisch R. 1980. Retroviruses and embryogenesis: microinjection of Moloney leukemia virus into midgestation mouse embryos. *Cell* 19: 181-8
- Jichlinski P, Forrer M, Mizeret J, Glanzmann T, Braichotte D, et al. 1997. Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results. *Lasers Surg Med* 20: 402-8
- Kaatsch PS, C. Katalinic, A. Hentschel, S. Baras, N. Barnes, B. Bertz, J. Dahm, S. Haberland, J., Kraywinkel KL, A. Wolf, U. 2012. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft
der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)
- Kaneko M, Eguchi K, Ohmatsu H, Kakinuma R, Naruke T, et al. 1996. Peripheral lung cancer: screening and detection with low-dose spiral CT versus radiography. *Radiology* 201: 798-802
- Kashtan H, Rabau M, Mullen JB, Wong AH, Roder JC, et al. 1992. Intra-rectal injection of tumour cells: a novel animal model of rectal cancer. *Surg Oncol* 1: 251-6
- Kawaraya M, Gemba K, Ueoka H, Nishii K, Kiura K, et al. 2003. Evaluation of various cytological examinations by bronchoscopy in the diagnosis of peripheral lung cancer. *Br J Cancer* 89: 1885-8
- Kelland LR. 2004. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40: 827-36
- Kelly K, Alencar H, Funovics M, Mahmood U, Weissleder R. 2004. Detection of invasive colon cancer using a novel, targeted, library-derived fluorescent peptide. *Cancer Res* 64: 6247-51
- Kerbel RS. 1998. What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing? *Cancer Metastasis Rev* 17: 301-4

- Kim DH, Pickhardt PJ, Taylor AJ, Leung WK, Winter TC, et al. 2007. CT colonography versus colonoscopy for the detection of advanced neoplasia. *N Engl J Med* 357: 1403-12
- König F, McGovern FJ, Larne R, Enquist H, Schomacker KT, Deutsch TF. 1999. Diagnosis of bladder carcinoma using protoporphyrin IX fluorescence induced by 5-aminolaevulinic acid. *BJU Int* 83: 129-35
- König K. 2000. Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc* 200: 83-104
- Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sondergaard O. 1996. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* 348: 1467-71
- Lam S, Kennedy T, Unger M, Miller YE, Gelmont D, et al. 1998. Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest* 113: 696-702
- Lam S, MacAulay C, leRiche JC, Palcic B. 2000. Detection and localization of early lung cancer by fluorescence bronchoscopy. *Cancer* 89: 2468-73
- Laroche C, Fairbairn I, Moss H, Pepke-Zaba J, Sharples L, et al. 2000. Role of computed tomographic scanning of the thorax prior to bronchoscopy in the investigation of suspected lung cancer. *Thorax* 55: 359-63
- Lavergne M, lochmann S, Bléchet C, Lerondel S, Heuze-Vourc'h N, et al. 2012. 805 Monitoring of Human Lung Tumour Progression Inhibited by TFPI-2 Using Imaging in Mice Orthotopic Models. *European Journal of Cancer* 48: S192
- Lee P, Sutedja TG. 2007. Lung cancer screening: has there been any progress? Computed tomography and autofluorescence bronchoscopy. *Curr Opin Pulm Med* 13: 243-8
- Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. 1976. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36: 4562-9
- Lewinski N, Colvin V, Drezek R. 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 4: 26-49
- Li L, Tian H, Chen Z, Yue W, Li S, Li W. 2011. Inhibition of lung cancer cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43: 143-8
- Lieberman DA, Weiss DG, Veterans Affairs Cooperative Study G. 2001. One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon. *N Engl J Med* 345: 555-60
- Liu J, Johnston MR. 2002. Animal models for studying lung cancer and evaluating novel intervention strategies. *Surg Oncol* 11: 217-27

- Luis-Ravelo D, Anton I, Vicent S, Hernandez I, Valencia K, et al. 2011. Tumor-stromal interactions of the bone microenvironment: in vitro findings and potential in vivo relevance in metastatic lung cancer models. *Clin Exp Metastasis* 28: 779-91
- Macleod KF, Jacks T. 1999. Insights into cancer from transgenic mouse models. *J Pathol* 187: 43-60
- Maier A, Tomaselli F, Matzi V, Woltsche M, Anegg U, et al. 2002. Comparison of 5-aminolaevulinic acid and porphyrin photosensitization for photodynamic therapy of malignant bronchial stenosis: a clinical pilot study. *Lasers Surg Med* 30: 12-7
- Malkinson AM. 1989. The genetic basis of susceptibility to lung tumors in mice. *Toxicology* 54: 241-71
- Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, et al. 1993. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 328: 1365-71
- Mandel JS, Church TR, Bond JH, Ederer F, Geisser MS, et al. 2000. The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Engl J Med* 343: 1603-7
- Manzotti C, Audisio RA, Pratesi G. 1993. Importance of orthotopic implantation for human tumors as model systems: relevance to metastasis and invasion. *Clin Exp Metastasis* 11: 5-14
- March TH, Marron-Terada PG, Belinsky SA. 2001. Refinement of an orthotopic lung cancer model in the nude rat. *Vet Pathol* 38: 483-90
- Marcon NE. 1999. Is light-induced fluorescence better than the endoscopist's eye? *Can J Gastroenterol* 13: 417-21
- Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JK. 2002. Focus on colon cancer. *Cancer Cell* 1: 233-6
- Marten K, Bremer C, Khazaie K, Sameni M, Sloane B, et al. 2002. Detection of dysplastic intestinal adenomas using enzyme-sensing molecular beacons in mice. *Gastroenterology* 122: 406-14
- Mase K, Iijima T, Nakamura N, Takeuchi T, Onizuka M, et al. 2002. Intrabronchial orthotopic propagation of human lung adenocarcinoma--characterizations of tumorigenicity, invasion and metastasis. *Lung Cancer* 36: 271-6
- Mayinger B, Neumann F, Kastner C, Haider T, Schwab D. 2010. Hexaminolevulinat-induzierte Fluoreszenzcolonoskopie versus weißes Lichtendoskopie für die Diagnose von neoplastischen Läsionen im Colon. *Endoscopy* 42: 28-33

- McLemore TL, Liu MC, Blacker PC, Gregg M, Alley MC, et al. 1987. Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. *Cancer Res* 47: 5132-40
- Messmann H, Endlicher E, Gelbmann CM, Scholmerich J. 2002. Fluorescence endoscopy and photodynamic therapy. *Dig Liver Dis* 34: 754-61
- Migliaccio AR, Bengra C, Ling J, Pi W, Li C, et al. 2000. Stable and unstable transgene integration sites in the human genome: extinction of the Green Fluorescent Protein transgene in K562 cells. *Gene* 256: 197-214
- Miller RE, Lehman G. 1978. Polypoid colonic lesions undetected by endoscopy. *Radiology* 129: 295-7
- Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. 2008. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 83: 584-94
- Mordant P, Loriot Y, Lahon B, Castier Y, Leseche G, et al. 2011. Bioluminescent orthotopic mouse models of human localized non-small cell lung cancer: feasibility and identification of circulating tumour cells. *PLoS One* 6: e26073
- Nagamachi Y, Tani M, Shimizu K, Tsuda H, Niitsu Y, Yokota J. 1998. Orthotopic growth and metastasis of human non-small cell lung carcinoma cell injected into the pleural cavity of nude mice. *Cancer Lett* 127: 203-9
- Orth K, König K, Genze F, Ruck A. 1994. Photodynamic therapy of experimental colonic tumours with 5-aminolevulinic-acid-induced endogenous porphyrins. *J Cancer Res Clin Oncol* 120: 657-61
- Pesch B, Jöckel KH, Wichmann HE. 1995. Luftverunreinigung und Lungenkrebs. *Biometrie und Epidemiologie in der Medizin und Biologie* 26: 134-53
- Peyruchaud O, Winding B, Pecheur I, Serre CM, Delmas P, Clezardin P. 2001. Early detection of bone metastases in a murine model using fluorescent human breast cancer cells: application to the use of the bisphosphonate zoledronic acid in the treatment of osteolytic lesions. *J Bone Miner Res* 16: 2027-34
- Pierce MC, Javier DJ, Richards-Kortum R. 2008. Optical contrast agents and imaging systems for detection and diagnosis of cancer. *Int J Cancer* 123: 1979-90
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-33
- Ray P, De A, Min JJ, Tsien RY, Gambhir SS. 2004. Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res* 64: 1323-30

- Rembacken BJ, Fujii T, Cairns A, Dixon MF, Yoshida S, et al. 2000. Flat and depressed colonic neoplasms: a prospective study of 1000 colonoscopies in the UK. *Lancet* 355: 1211-4
- Rex DK, Cutler CS, Lemmel GT, Rahmani EY, Clark DW, et al. 1997a. Colonoscopic miss rates of adenomas determined by back-to-back colonoscopies. *Gastroenterology* 112: 24-8
- Rex DK, Rahmani EY, Haseman JH, Lemmel GT, Kaster S, Buckley JS. 1997b. Relative sensitivity of colonoscopy and barium enema for detection of colorectal cancer in clinical practice. *Gastroenterology* 112: 17-23
- Risse EK, Vooijs GP, van't Hof MA. 1987. Relationship between the cellular composition of sputum and the cytologic diagnosis of lung cancer. *Acta Cytol* 31: 170-6
- Röckendorf N, Borschbach M, Frey A. 2012. Molecular evolution of peptide ligands with custom-tailored characteristics for targeting of glycostructures. *PLoS Comput Biol* 8: e1002800
- Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, Rath M, Niedzwiecki A. 2009. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol Rep* 21: 1323-33
- Rubin CE, Haggitt RC, Burmer GC, Brentnall TA, Stevens AC, et al. 1992. DNA aneuploidy in colonic biopsies predicts future development of dysplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 103: 1611-20
- Saha D, Watkins L, Yin Y, Thorpe P, Story MD, et al. 2010. An orthotopic lung tumor model for image-guided microirradiation in rats. *Radiat Res* 174: 62-71
- Sample V, Newman RH, Zhang J. 2009. The structure and function of fluorescent proteins. *Chem Soc Rev* 38: 2852-64
- Schrock TR. 1993. Colonoscopy for colorectal cancer: too much, too little, just right. ASGE Distinguished Lecture 1993. *Gastrointest Endosc* 39: 848-51
- Scott JK, Smith GP. 1990. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249: 386-90
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2: 905-9
- Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Ermakova GV, et al. 2007. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat Methods* 4: 741-6
- Shcherbo D, Murphy CS, Ermakova GV, Solovieva EA, Chepurnykh TV, et al. 2009. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochem J* 418: 567-74

- Shibuya K, Fujisawa T, Hoshino H, Baba M, Saitoh Y, et al. 2001. Fluorescence bronchoscopy in the detection of preinvasive bronchial lesions in patients with sputum cytology suspicious or positive for malignancy. *Lung Cancer* 32: 19-25
- Shimomura O, Johnson FH. 1969. Properties of the bioluminescent protein aequorin. *Biochemistry* 8: 3991-7
- Statistisches Bundesamt. 2012. *Todesursachen in Deutschland*. 51 pp.
- Stepp H. 2005. Physikalische Grundlagen der Fluoreszenzzytostoskopie In *Fluoreszenzdiagnostik des Harnblasenkarzinoms mit 5-Aminolävulinsäure*, ed. R Baumgartner, M Kriegmair, A Hofstetter, pp. 12- 14. Tuttingne: Endo-Press
- Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE, Jr. 1993. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J* 7: 1434-41
- Stieber P, Hasholzner U, Bodenmuller H, Nagel D, Sunder-Plassmann L, et al. 1993. CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer. *Cancer* 72: 707-13
- Takahashi T, Morotomi M, Nomoto K. 2004. A novel mouse model of rectal cancer established by orthotopic implantation of colon cancer cells. *Cancer Sci* 95: 514-9
- Takimoto CH. 2001. Why drugs fail: of mice and men revisited. *Clin Cancer Res* 7: 229-30
- Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. 2003. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 94: 965-73
- Tassios PS, Ladas SD, Grammenos I, Demertzis K, Raptis SA. 1999. Acquisition of competence in colonoscopy: the learning curve of trainees. *Endoscopy* 31: 702-6
- Teicher BA. 2006. Tumor models for efficacy determination. *Mol Cancer Ther* 5: 2435-43
- Traverso G, Shuber A, Levin B, Johnson C, Olsson L, et al. 2002. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 346: 311-20
- Upadhyay R, Sheth RA, Weissleder R, Mahmood U. 2007. Quantitative real-time catheter-based fluorescence molecular imaging in mice. *Radiology* 245: 523-31
- Uzdensky AB, Dergacheva OY, Zhavoronkova AA, Reshetnikov AV, Ponomarev GV. 2004. Photodynamic effect of novel chlorin e6 derivatives on a single nerve cell. *Life Sci* 74: 2185-97
- Vakulovskaya E, Reshetnikov A, Zalevsky I, Kemov I. 2004. Photodynamic therapy and fluorescent diagnostics with "Radachlorin®" in skin cancer patients. 1: 77-82

- Voynow JA, Fischer BM, Malarkey DE, Burch LH, Wong T, et al. 2004. Neutrophil elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1293-302
- Weissleder R, Mahmood U. 2001. Molecular imaging. *Radiology* 219: 316-33
- Wilde J. 1989. A 10 year follow-up of semi-annual screening for early detection of lung cancer in the Erfurt County, GDR. *Eur Respir J* 2: 656-62
- Wilmanns C, Fan D, O'Brian CA, Bucana CD, Fidler IJ. 1992. Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 52: 98-104
- Wilson BC. 2002. Photodynamic therapy for cancer: principles. *Can J Gastroenterol* 16: 393-6
- Witty JP, McDonnell S, Newell KJ, Cannon P, Navre M, et al. 1994. Modulation of Matrilysin Levels in Colon-Carcinoma Cell-Lines Affects Tumorigenicity in-Vivo. *Cancer Research* 54: 4805-12
- Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun FX, Li XM, et al. 2000. Whole-body optical imaging of green fluorescent protein-expressing tumors and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1206-11
- Yang M, Jiang P, Sun FX, Hasegawa S, Baranov E, et al. 1999. A fluorescent orthotopic bone metastasis model of human prostate cancer. *Cancer Res* 59: 781-6
- Yang M, Reynoso J, Bouvet M, Hoffman RM. 2009a. A transgenic red fluorescent protein-expressing nude mouse for color-coded imaging of the tumor microenvironment. *J Cell Biochem* 106: 279-84
- Yang Y, Hong H, Zhang Y, Cai W. 2009b. Molecular Imaging of Proteases in Cancer. *Cancer Growth Metastasis* 2: 13-27
- Zaric B, Canak V, Stojanovic G, Jovelic A, Sarcev T, et al. 2009. Autofluorescence videobronchoscopy (AFI) for the assessment of tumor extension in lung cancer. *Technol Cancer Res Treat* 8: 79-84
- Zhao B, Magdaleno S, Chua S, Wang YL, Burcin M, et al. 2000. Transgenic mouse models for lung cancer. *Exp Lung Res* 26: 567-79
- Zhou X, Chang YC, Oyama T, McGuire MJ, Brown KC. 2004. Cell-specific delivery of a chemotherapeutic to lung cancer cells. *J Am Chem Soc* 126: 15656-7
- Zigmond E, Halpern Z, Elinav E, Brazowski E, Jung S, Varol C. 2011. Utilization of murine colonoscopy for orthotopic implantation of colorectal cancer. *PLoS One* 6: e28858

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Referenten Prof. Dr. T. M. Buzug für die Prüfungsbetreuung und für die Übernahme der Berichterstattung.

Bei meinem Betreuer PD Dr. Andreas Frey bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas und die mir gegebene Möglichkeit an einem sehr spannenden Projekt zu arbeiten. Danke für die hilfreichen Tipps, Anregungen und die Diskussionen.

Besonderes bedanke ich mich bei Dr. Barbara Frey dafür, dass sie mir immer viel Kraft gegeben hat, wenn das Gefühl da war das es nicht mehr weiter geht. Danke für die vielen konstruktiven Diskussionen und das Korrekturlesen vieler Schriftarbeiten und besonders meiner Dissertation.

Bei der Firma Karl Storz bedanke ich mich für die Bereitstellung der Endoskope. Besonders danke ich Dr. Werner Göbel für viele konstruktive Diskussionen und fachliche Unterstützung.

Thorsten, Katrin und Heike danke ich für das Korrekturlesen meiner Dissertation. Danke für die hilfreichen Diskussionen, eure Geduld und für die Unterstützung, insbesondere bei dem Umgang mit so manchen Auswertungsprogrammen, der Erstellung von Postern und für die häufigen, kurzen Einführungen in die mächtige deutsche Sprache.

Niels, Steffen und Maik danke ich für die Diskussionen, wenn es um die Chemie ging. Und an Niels einen besonderen Dank dafür, dass du immer da warst wenn mein Computer und ich wieder einmal Kommunikationsprobleme hatten.

Imke, Özge, Geraldine, Heidi und Verena großen Dank für die tatkräftige Unterstützung im Labor und die vielen zusammen verbrachten Stunden während der Endoskopien. Danke an Jürgen der mich von Anfang an bei den Tierversuchen unterstützt hat und viele Tipps für mich hatte.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich sehr bedanken, dass ihr mich so nett aufgenommen habt und geduldig mit mir wart. Danke für das tolle Arbeitsklima. Ohne euch alle hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mich in der Zeit unterstützt und an mich geglaubt haben und meiner Tochter Ewa Maria die das alles toll mitgemacht hat. Norbert danke an dich, dass du meinen Stress gemildert und an mich geglaubt hast.