

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Thoraxchirurgie des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof Dr. med. Prof. h.c. Jakob R. Izbicki

Magnetresonanztomographie und in-vivo
Fluoreszenzbildgebung an einem neu etablierten
orthotopen Ösophaguskarzinommodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Universität Hamburg vorgelegt von

Thorsten Wolfgang Dohrmann
aus
Henstedt-Ulzburg

Hamburg, 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 23.02.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. T. Strate

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. E. Yekebas

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. G. Sauter

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Das Ösophaguskarzinom	9
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	9
1.1.2	Lokalisation des Primärtumors und Metastasierung	10
1.1.3	Staging und Diagnostik	10
1.1.4	Therapie und Prognose	11
1.1.5	Die Ösophaguskarzinomzelllinien PT1590 und LN1590	12
1.1.6	Stabile Transfektion von PT1590 und LN1590 mit GFP	12
1.2	Metastasierungsmodelle	12
1.2.1	Experimentelle Metastasierungsmodelle	13
1.2.2	Spontan metastasierende orthotope Tumormodelle	14
1.2.3	Bisherige Modelle für das Ösophaguskarzinom	15
1.3	Fluoreszenzbildgebung	16
1.3.1	Das Green Fluorescent Protein (GFP)	16
1.3.2	GFP exprimierende Tumormodelle und in-vivo Fluoreszenzimaging	17
1.4	Experimentelle Magnetresonanztomographie von Kleintieren	18
1.5	Zielsetzung und Studiendesign	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Zellkultur	20
2.2	Vorbereitung der Zellen zur Injektion	21
2.3	Anästhesieverfahren	22
2.4	Das orthotope Ösophaguskarzinom-Mausmodell	22
2.4.1	Subkutane Injektion in NMRI/nu Mäuse	23
2.4.2	Explantation des subkutanen Tumors	23
2.4.3	Surgical Orthotopic Implantation (SOI)	23
2.5	Postoperatives Monitoring	24
2.5.1	Klinisches Monitoring	24
2.5.2	In-vivo Fluoreszenzimaging	24
2.5.3	Magnetresonanztomographie	26
2.6	Sektion der Versuchstiere und ex-vivo Fluoreszenzimaging	27
2.7	Vergleich von MRT und Fluoreszenzimaging	28

3	Ergebnisse	29
3.1	Etablierung des orthotopen Tiermodells	29
3.2	Darstellung des Primärtumors durch MRT und Fluoreszenzimagining . . .	29
3.3	Darstellung der Metastasierung durch MRT und Fluoreszenzimagining . . .	35
4	Diskussion	40
4.1	Orthotopes Modell	40
4.2	Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzimagining	41
4.2.1	Darstellung des Primärtumors	42
4.2.2	Darstellung der Metastasen	42
4.2.3	Praktische Durchführbarkeit	43
4.3	Verbesserungsmöglichkeiten	43
4.4	Fazit	44
A	Zusammenfassung	45
B	Literaturverzeichnis	46
C	Danksagungen	56
D	Curriculum Vitae	57

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aequorea victoria	16
2.1	Operationssitus orthotope Implantation	25
3.1	Coronale MR-Schichten Maus 5	31
3.2	Saggitale MR-Schichten Maus 5	32
3.3	MR-tomographische Messung des Tumorprogress	33
3.4	Erstes Fluoreszenzsignal Maus 3	34
3.5	Überlagerung des Tumors durch Organe	36
3.6	Korrelation der Imaging-Modalitäten mit dem Sektionsbefund	37
3.7	Offenes Imaging und MRT	38
3.8	Lebermetastase makroskopisch und Fluoreszenzimaging	39

Tabellenverzeichnis

2.1	Zusätze Zellkulturmedium	21
2.2	Grundansatz für intraperitoneale Injektionsnarkose	22
2.3	Technische Daten LT9MACIMSYS	24
2.4	Parameter der verwendeten MRT-Sequenz	27
2.5	MRT: Field-of-View und Matrixgröße	27
3.1	Sektionsbefund Tumorgewicht und Metastasierung	30
3.2	Erstes Auftreten von Fluoreszenzsignalen	35

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
eGFP	enhanced Green FLuorescent Proteine
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
GFP	Green Fluorescent Proteine
KG	Körpergewicht
LK ax	Lymphknoten axillär
LK coel	Lymphknoten coeliac
LK med	Lymphknoten mediastinal
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Positronenemissionstomographie
PT	Primärtumor
RFP	Red Fluorescent Proteine
RPM	Rounds per Minute, Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transcripase-PCR
SNR	Signal-to-Noise-Ratio
SOI	Surgical Orthotopic Implantation
SPECT	Single Proton Emission Tomographie
SPIO	Small Particles of Iron Oxide
TNM	Tumor-Node-Metastasis Klassifikation
UICC	Union internationale contre cancer

1 Einleitung

1.1 Das Ösophaguskarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Maligne epitheliale Erkrankungen zählen weltweit zu den Haupttodesursachen. Das Ösophaguskarzinom ist hierbei weltweit die sechsthäufigste zum Tode führende Krebserkrankung [1, 2]. In Deutschland betrug die Inzidenz im Jahr 2004 9,6 von 100.000 bei der männlichen und 2,5 von 100.000 bei der weiblichen Bevölkerung [3].

Die Inzidenz variiert weltweit sehr stark. Hochinzidenzgebiete sind beispielsweise Japan und China. In der chinesischen Provinz Lixian erreicht die Inzidenz einen Wert von 130/100.000 [4]. Histologisch kommen im wesentlichen das Plattenepithelkarzinom und das Adenokarzinom vor. Bei diesen beiden Haupttypen sind unterschiedliche Risikofaktoren bekannt. Während für das Plattenepithelkarzinom vorwiegend exogene Noxen wie Alkoholkonsum, Tabakkonsum, heiße Speisen und Getränke und bestimmte Nahrungsinhalte wie Nitrosamine genannt werden [5], basiert das Adenokarzinom auf einer spezifischen Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz. Bei Patienten, die unter einer Refluxerkrankung leiden, kommt es durch die ständige Reizung der Ösophagusschleimhaut zu einer chronischen Ösophagitis, auf die die Schleimhaut mit einer intestinalen Metaplasie reagiert (Barret-Ösophagus) [6]. Auf dem Boden dieser Metaplasie entwickelt sich dann das Adenokarzinom. Lebergren et al. konnten 1999 in einer landesweiten Fallkontrollstudie in Schweden eine starke Korrelation zwischen Refluxerkrankung und Adenokarzinom nachweisen [7].

Während die Inzidenz der Plattenepithelkarzinome weitgehend gleich bleibend ist, hat der Anteil der Adenokarzinome in den USA, dem westlichen Europa und den skandinavischen Ländern deutlich zugenommen. Besonders deutlich ist diese Tendenz in den USA zu beobachten. Um 1960 betrug der Anteil der Adenokarzinome unter den Ösophaguskarzinomen in den USA nur etwa zehn Prozent. Bis heute ist der Anteil der Adenokarzinome deutlich gestiegen und macht jetzt die Mehrzahl der Ösophaguskarzinome aus. Diese Zunahme wird im Wesentlichen durch die große Verbreitung der gastroösophagealen Refluxerkrankung in den westlichen Industrieländern zurück geführt. [8, 9, 10, 11, 12, 13] In Japan ist

die Inzidenz des Adenokarzinoms dagegen stabil, somit ist das Plattenepithelkarzinom in Japan noch deutlich häufiger. [14]

1.1.2 Lokalisation des Primärtumors und Metastasierung

Für die Klassifikation der Tumorlokalisation wird der Ösophagus in einen zervikalen und einen intrathorakalen Abschnitt eingeteilt. Der intrathorakale Ösophagus unterteilt sich wiederum in ein oberes, mittleres und unteres Drittel. Das Plattenepithelkarzinom finden sich im Wesentlichen im oberen und mittleren Drittel des intrathorakalen Ösophagus sowie im zervikalen Ösophagus. Adenokarzinome sind vorwiegend im unteren Drittel des Ösophagus, ausgehend meist vom ösophagogastralen Übergang, zu finden. [15, 16]

Bereits 1903 berichtete Sakata über das komplexe Lymphabflusssystem des Ösophagus [17]. Im Gegensatz zu anderen Abschnitten des Verdauungstraktes erfolgt der Lymphabfluss im Ösophagus nicht segmental, sondern entlang von in der Tunica submucosa longitudinal verlaufenden Lymphgefäßen. Des Weiteren finden sich Lymphgefäße im Unterschied zu anderen gastrointestinalen Organen auch in der Tunica mucosa. Dies ermöglicht schon in frühen Stadien eine massive Ausdehnung des Tumors intramural in longitudinaler Richtung, vor allem nach proximal. 30 Prozent der Patienten mit auf Mukosa und Submukosa begrenzten Tumoren und 70 Prozent der Patienten mit nicht wandüberschreitenden Tumoren weisen bei Diagnosestellung eine Lymphknotenmetastasierung auf. [18, 19] Die regionalen Lymphknoten des zervikalen Ösophagusabschnitts sind im Wesentlichen zervikale Lymphknotengruppen (V. jugularis interna, Skalenuslymphknoten, obere und untere zervikale Lymphknoten, supraklavikuläre Lymphknoten). Der Lymphabfluss des intrathorakalen Ösophagus erfolgt vorwiegend in periösophageale, mediastinale und subkarinäre Lymphknoten. Für Tumore des gastroösophagealen Übergangs ist eine Metastasierung in zöliakale und perigastrale Lymphknoten sowie in das Ligamentum hepatoduodenale typisch. Eine Metastasierung in zöliakale oder zervikale Lymphknoten bei intrathorakal gelegenen Tumoren wird bereits als Fernmetastasierung gewertet. [16] Der venöse Abfluss der Speiseröhre erfolgt nach cranial hauptsächlich über die Venae azygos und hemiazygos in die Vena cava superior. Nach caudal erfolgt der Abfluss über die Vena coronaria ventriculi in die Vena portae. Dementsprechend kommt es bei proximalen Tumoren eher zu einer Lungenmetastasierung, bei distalen Tumoren eher zu einer Lebermetastasierung [18, 19, 20].

1.1.3 Staging und Diagnostik

Das Ausmaß der Tumorerkrankung wird nach der TNM-Klassifikation der UICC eingeteilt. Die Klassifikation berücksichtigt die Invasion des Primärtumors, die Metastasierung in regionale Lymphknoten und die Fernmetastasierung. Hierbei wird nicht zwischen den

verschiedenen histologischen Typen unterschieden. Man unterscheidet abhängig von der angewandten diagnostischen Methode verschiedene Einteilungen: das cTNM-System basierend auf klinischen Daten, das rTNM-System für radiologische Befunde und das pTNM-System für die pathologische Untersuchung. Hierbei ist das pTNM-Stadium das relevanteste. Der Grad der Differenzierung des Karzinoms wird in vier Graden angegeben, hierbei entspricht Grad eins einem hochdifferenzierten Karzinom und Grad vier einem entdifferenzierten Karzinom.

Die Methode der Wahl zum Staging des Primärtumors ist die transösophageale Endosonographie. Hierbei können Tumorausdehnung und Infiltrationstiefe präzise beurteilt werden. Des Weiteren können endoskopisch Schleimhautbiopsien zur histologischen Sicherung der Diagnose entnommen werden. Das Staging bezüglich Lymphknoten und Fernmetastasen erfolgt mittels thorako-abdomineller Computertomographie. Lokale Lymphknoten können ebenfalls mittels Endosonographie beurteilt werden. Insbesondere bei der Suche nach Fernmetastasen gewinnt das PET-CT in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung. [15, 21]

1.1.4 Therapie und Prognose

Ösophaguskarzinome im UICC Stadium I-III können primär kurativ angegangen werden. Die operativen Standardverfahren sind die subtotale thorako-abdominelle Ösophagektomie, beziehungsweise die transhiatale Ösophagusresektion. Hierbei wird der thorakale Ösophagus und das mediastinale lymphatische Gewebe en-bloc reseziert. Außerdem erfolgt eine abdominelle Lymphadenektomie, bei der unter anderem zöliakale und in der kleinen Kurvatur gelegene Lymphknoten reseziert werden. Die Rekonstruktion der Speisepassage erfolgt im Regelfall durch Magenhochzug und zervikale extrathorakale Anastomose mit dem verbliebenen Ösophagusstumpf. Alternativ kann auch ein Kolon- oder Dünndarminterponat eingesetzt werden.[22] Aufgrund des schlechten Outcome, insbesondere bei Tumoren im Stadium III, hat sich in letzter Zeit auch die kombinierte Radiochemotherapie als Option für eine definitive Therapie etabliert. [23] Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung können zum Downstaging präoperativ neo-adjuvant radiochemotherapiert werden. Karzinome im Stadium IV, also bei erfolgter Fernmetastasierung, werden palliativ mit 5-Fluorouracil und Cis-Platin chemotherapiert. Die lokalen Symptome wie Dysphagie können durch diverse lokale Therapiemethoden, beispielsweise Bestrahlung oder Einsetzen von metallischen Stents, gemindert werden. [23]

Die Prognose des Ösophaguskarzinoms wird im wesentlichen vom Tumorstadium, und hierbei insbesondere vom Ausmaß der nodalen Metastasierung bestimmt. Im Vergleich von Patienten ohne nodale Metastasierung sinkt die Fünfjahresüberlebensrate bei Patienten mit drei oder mehr positiven Lymphknoten von 55 Prozent auf sieben Prozent. Bei Patienten mit Fernmetastasen beträgt die Fünfjahresüberlebensrate ebenfalls etwa sieben Prozent [24]. Weitere mit schlechter Prognose einhergehende Faktoren sind

unter Anderem Verlust von mehr als zwei Prozent Körpergewicht oder erhöhtes CRP. Nicht prognoserelevant sind dagegen Tumorlage (oberes, mittleres, unteres Drittel) oder histologisches Grading [25].

1.1.5 Die Ösophaguskarzinomzelllinien PT1590 und LN1590

Die Zelllinien PT1590 und LN1590 konnten aus Gewebeproben eines Patienten des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf etabliert werden [26]. Der Patient litt an einem Adenokarzinom des distalen Ösophagus, das nach der TNM-Klassifikation der UICC als pT1pN0M0 klassifiziert wurde. Hierbei wurde die Zelllinie PT1590 aus dem Primärtumor gewonnen. Die Zelllinie LN1590 stammt aus einem makroskopisch und in der pathologischen Routinefärbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) als tumorfrei klassifizierten Lymphknoten. Jedoch konnten Mikrometastasen (etwa 3 positive Zellen pro 10^5 Zellen) mit einer EP-CAM spezifischen immunhistochemischen Färbung mittels des Antikörpers Ber-Ep4 nachgewiesen werden [26]. EP-CAM ist ein membranständiges Antigen, das von verschiedenen Karzinomen überexprimiert wird [27]. Nach mehreren Passagen in der Zellkultur zeigte sich eine spontane Immortalität beider Zelllinien. Die Tumorgenität beider Zelllinien konnte durch subkutane Xenotransplantation in SCID-Mäuse nachgewiesen werden [28].

1.1.6 Stabile Transfektion von PT1590 und LN1590 mit GFP

Für das *in-vivo* Fluoreszenz Imaging wurde eine stabile Transfektion der Zelllinien PT1590 und LN1590 mit enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) durchgeführt. Hierzu wurden pEGFP-N1 Vektoren (Clontech, Palo Alto, CA, USA) verwendet. Das verwendete Plasmid trägt das eGFP-Gen sowie eine Neomycinresistenz zur Selektion der transfizierten Klone. Die Transfektion erfolgte durch Lipofektion mittels eines FuGene6 Transfektionskits (Roche). Die transfizierten Klone wurden dann mittels steigender Neomycinkonzentration im Kulturmedium selektiert. Die Expression von eGFP wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Für die Etablierung des Tiermodells wurde ein Subklon von PT1590 selektiert, der sowohl eine starke Fluoreszenz als auch ein gutes Wachstum *in-vitro* und *in-vivo* aufwies.

1.2 Metastasierungsmodelle

Die Metastasierung maligner Tumore und damit das Vorhandensein einer systemischen Erkrankung ist nach wie vor die Haupttodesursache onkologischer Patienten. Eine bereits erfolgte Metastasierung stellt also den wesentlichen limitierenden Faktor in der kurativen

Behandlung der meisten malignen Tumore dar. Der hämatogenen Metastasierung maligner Tumore liegt ein komplexer mehrstufiger Prozess zu Grunde. Zunächst lösen sich einzelne Tumorzellen oder Tumorzellcluster aus dem Zellverband des Primärtumors und dringen in die Blutbahn oder Lymphgefäße ein (Intravasation). Im Gefäßsystem widerstehen die Tumorzellen physischem Stress, immunologischen Prozessen und Anoikisis, und werden so in die Zielorgane beziehungsweise Lymphknoten verteilt (Dissemination). Letztendlich kommt es im Zielorgan zu einer Durchwanderung der Gefäßwände und Proliferation mit Angiogenese, bis es zur Formation einer klinisch relevanten soliden Metastase kommt. [29, 30] Aufgrund der Komplexität des Metastasierungsprozesses sind ebenso komplexe Modelle notwendig, um eine repräsentative Situation zu schaffen. Prinzipiell gibt es zwei Gruppen von Tiermodellen: syngene Tumormodelle, bei denen murine Zellen in Ratten oder Mäusen eingesetzt werden, und Modelle mit xenotransplantierten humanen Tumorzellen. Syngene Tumormodelle haben den Vorteil, dass der transplantierte Tumor in einem Milieu der selben Spezies wächst, was zu einer optimalen Tumor-Wirt-Interaktion führt. Allerdings fehlt es den verwendeten Zelllinien und Tieren aufgrund starker Inzucht meist an genetischer Variabilität. Außerdem entsprechen viele kanzerogene Mutationen und Expressionsmuster in Nagetieren nicht den humanen Gegebenheiten [31]. Xenotransplantatmodelle haben diesen Nachteil nicht, allerdings ist der hier wachsende Tumor eine Mischung aus humanen Tumorzellen und murinen Stromazellen, was unter Umständen zu einer veränderten Tumor-Wirt-Interaktion führt und erhebliche Einflüsse auf Prozesse wie beispielsweise die Angiogenese hat [32, 33]. Außerdem erfordert der Einsatz von körperfremden Transplantaten eine Immunsuppression beim Empfängertier, was ebenfalls erhebliche Einflüsse auf die Kanzerogenese hat und vor allem die Beurteilung der Rolle des Immunsystems erschwert [34].

1.2.1 Experimentelle Metastasierungsmodelle

Als experimentelle Metastasierungsmodelle werden Modelle beschrieben, bei denen eine Injektion von Tumorzellen direkt in das Gefäßsystem durchgeführt wird. Die am meisten genutzte Methode ist hierbei die Injektion in die laterale Schwanzvene. Hierbei kommt es vor allem zu Lungenmetastasen [30, 35]. Eine weitere weit verbreitete Technik ist die Injektion in Pfortader oder Milz, was vor allem zu Lebermetastasen führt [36]. Diese Metastasierung entweder in Lunge oder Leber ist dadurch zu erklären, dass die injizierten Tumorzellen im ersten Kapillarbett hängen bleiben. Allerdings zeigen sich auch spezifische Absiedelungen von Tumorzellen. So kommt es bei intrakardialer Injektion zu Tumorzellembolisation in alle Organe, jedoch bilden sich nur im Knochen echte Metastasen [37]. Wesentliche Vorteile der experimentellen Metastasierungsmodelle sind die Kontrolle über die Anzahl der applizierten Zellen, die hohe Reproduzierbarkeit gleicher Ergebnisse und das schnelle Wachstum der Metastasen. Ein potentieller Nachteil könnte jedoch sein, dass die frühen Schritte der Metastasierungskaskade übersprungen werden [30]. Des Weiteren unterscheiden sich die Metastasen in vielen Fällen von den

spontan entstandenen Metastasen und werden oft als viele disseminierte Primärtumoren charakterisiert [38].

1.2.2 Spontan metastasierende orthotope Tumormodelle

Ein wesentlicher Anwendungsbereich von Tiermodellen ist die Erprobung neuartiger Therapien. Aus diesem Grund kann es von Vorteil sein, wenn ein Tumormodell so exakt wie möglich die klinische Situation repräsentiert. Es hat sich gezeigt, dass Modelle in denen Tumorzellen subkutan implantiert werden, die klinische Erkrankung nur sehr schlecht wiedergeben, da das Milieu, in dem der Primärtumor wächst, nicht der Realität entspricht. Des Weiteren kommt es bei subkutaner Implantation selten zu einer Metastasierung [39]. Andere Arten der Modellierung von Metastasierung, wie die Injektion von Zellen direkt in Blutgefäße oder Milz, überspringen wichtige Punkte der Metastasierungskaskade, wie beispielsweise die Tumorzell dissemination. Orthotope Tumormodelle bieten betreffend Morphologie und Wachstumscharakteristik des Primärtumors eine wesentlich bessere Repräsentation der klinischen Tumorerkrankung unter Einbeziehung aller Schritte der Metastasierung [40, 41]. Der Nachteil solcher Modelle ist, dass in den meisten Fällen die orthotope Implantation technisch aufwendig ist und somit entsprechende Erfahrung erfordert. Das Konzept der orthotopen Tumorimplantation ist nicht neu. Bereits 1977 implantierten Tan et al. murine Colonkarzinomzellen orthotop in das Kolon von Mäusen, was zu lokalem Tumorwachstum und Lebermetastasen führte [42].

Heute existieren zahlreiche orthotope Tiermodelle für verschiedene Tumortypen, in denen unterschiedliche Techniken angewendet werden. Im Folgenden soll ein grober Überblick über die drei Haupttechniken gegeben werden.

Orthotope Injektion von Tumorzellsuspension:

Eine Tumorzellsuspension kann direkt in das Zielorgan injiziert werden. Dies wurde zum Beispiel für das Colonkarzinom praktiziert, und führte zu ausgedehnter Metastasierung [43]. McLemore et al. injizierten in ihrem Modell Tumorzellen intrabronchial und erreichten auch mit dieser Methode gute Ergebnisse [44]. Durch Injektion von Tumorzellen wurden für diverse weitere Tumorentitäten Modelle entwickelt, beispielsweise das Harnblasenkarzinom [45], Magenkarzinom [46], malignes Melanom [47] sowie das Mundbodenkarzinom [48].

Surgical Orthotpic Implantation:

Eine Alternative zur Injektion von Tumorzellen direkt in das Zielorgan ist die Methode der Surgical Orthotpic Implantation (SOI). Bei dieser Methode wird einem Versuchstier zunächst eine Suspension von in Zellkultur gezüchteten Tumorzellen subkutan injiziert. Der entstehende subkutane Tumor wird dann explantiert und solide Tumorstücke einem

neuen Versuchstier direkt an das Zielorgan implantiert. Tiermodelle wurden für viele verschiedene Tumorentitäten entwickelt. Es existieren diverse Modelle für das Colonkarzinom [49, 50, 51], Bronchialkarzinom [52, 53], Mammakarzinom [54] und das Prostatakarzinom [55].

Direkte Xenotransplantation von intaktem Tumorgewebe:

Es konnten auch metastasierende Tiermodelle durch Xenotransplantation von intaktem Tumorgewebe direkt aus dem Patienten etabliert werden. Dies gelang mit verschiedenen Tumorentitäten, beispielsweise Mammakarzinom [56], Prostatakarzinom [57], Kolonkarzinom [58], Ovarialkarzinom [59], Pankreaskarzinom [60], Magenkarzinom [61] und Blasenkarzinom [62].

1.2.3 Bisherige Modelle für das Ösophaguskarzinom

Es wurden in der Vergangenheit diverse Versuche unternommen, Tiermodelle für das Ösophaguskarzinom zu etablieren. Es existieren verschiedene Xenograft-Modelle für das Plattenepithelkarzinom. Deng et al. erreichten durch subkutane Injektion von Tumorzellen zwar ein lokales Tumorwachstum, aber keine Metastasierung [63]. Estensen et al. gelang es, durch chemische Reizung des Epithels mittels oraler Applikation spezieller Reagenzien in Goldhamstern verschiedene Karzinome im Bereich des oberen Verdauungstraktes zu provozieren. Es entwickelten sich hierbei auch Plattenepithelkarzinome des Ösophagus. Auch hier zeigte sich keine Metastasierung [64]. Den Ansatz der orthotopen Implantation verfolgten Hori et al. In ihrem Modell des cervicalen Plattenepithelkarzinoms konnten in 3 von 17 Versuchstieren metastatische Lymphknoten, jedoch keine Organmetastasierung gefunden werden [65]. Für das distale Plattenepithelkarzinom konnte zwar ein lokales Tumorwachstum, jedoch keine Metastasierung erreicht werden [66]. Für das Adenokarzinom gibt es verschiedene Ansätze durch operativ herbeigeführten gastro- beziehungsweise duodenoösophagealen Reflux in Ratten ein Karzinom zu induzieren [67, 68]. Hierbei zeigte sich zwar eine chronische Entzündungsreaktion der Schleimhaut mit intestinaler Metaplasie und der Entwicklung von Adenokarzinomen, jedoch konnten auch hier keine Metastasen beobachtet werden.

Insgesamt ist in der Literatur kein zuverlässig metastasierendes Modell des distalen ösophagealen Adenokarzinoms beschrieben, das sowohl ein zuverlässiges Wachstum des Primärtumors als auch eine adäquate Metastasierung erzeugt.



Abbildung 1.1: Die Biolumineszenz der Pazifikqualle „*Aequorea victoria*“. Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Aequorea_victoria

1.3 Fluoreszenzbildgebung

1.3.1 Das Green Fluorescent Protein (GFP)

Das Green Fluorescent Protein wurde erstmals 1962 von Shimomura et al. aus der Pazifikqualle *Aequorea victoria* (Abbildung 1.1) extrahiert [69]. In den Tentakeln dieser Qualle liegt es in feinen Granula vor und wandelt durch Biolumineszenz eines *Aequorea*-artigen Aquaeorins entstandene Energie in grünes Licht um. Das Absorptionsmaximum des ursprünglichen GFP liegt hierbei bei 395 nm, sein Emissionsmaximum bei 509 nm [70]. Prasher et al. gelang 1992 die Aufklärung der Struktur von GFP und die Klonierung [71]. Chalfie et al. klonierten GFP in pro- und eukaryontische Zellen. Hierbei zeigte sich bei der Anregung mit blauem Licht (395 bis 470 nm) in beiden Fällen eine grüne Fluoreszenz. Das GFP hat keine toxischen Effekte und scheint keine Veränderungen des Zellstoffwechsels zu verursachen [72]. Zur Funktion des GFP ist keine posttranslationale Modifikation durch

spezielle Enzyme von *Aequorea victoria* notwendig. Unter diesen Voraussetzungen und durch seine einfache Anwendung hat sich die Klonierung von GFP an zu untersuchende Gene oder die Transfektion von Zellen zu einem wesentlichen Bestandteil biochemischer und molekularbiologischer Forschung entwickelt [73].

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Varianten des ursprünglichen GFP durch Aminosäureaustausch entwickelt. Cormack et al. entwickelten 1996 neue Varianten durch zufälligen Austausch einzelner Basen und Selektion der Klone mit hoher Leuchtintensität mittels FACS [74]. Hierbei entstanden drei neue Varianten, jeweils mit unterschiedlichen Absorbtionsspektren und mit insgesamt etwa 100-fach erhöhter Fluoreszenzintensität im Vergleich zum ursprünglichen GFP. Die in dieser Studie verwendete Variante GFPmut1 hat ein Absorbtionsmaximum bei 488 nm und ein Emissionsmaximum bei 511 nm.

1.3.2 GFP exprimierende Tumormodelle und *in-vivo* Fluoreszenzimaging

Die Arbeitsgruppe um Robert M. Hoffman in San Diego nutzten 1997 als erste stabil mit GFP transfizierte Zellen als Basis für ihre orthotopen Modelle. Hierdurch war es erstmals möglich, Metastasierungsvorgänge *in-vivo* mit einfachen Methoden zu visualisieren [75, 76, 77]. Makroskopische Bilder können beispielsweise mittels Anregung durch Licht und Aufnahmen des Bildes mit einer Kamera erstellt werden. Zur Darstellung mikroskopischer Anatomie, beispielsweise einzelner disseminierter Tumorzellen können einfache Fluoreszenzmikroskope benutzt werden [53]. Ein wesentlicher limitierender Faktor beim Fluoreszenzimaging generell ist die Absorption und Streuung des emittierten Lichts im Gewebe. Insbesondere die Haut und die Behaarung führen zu einer massiven Streuung und damit Signalverlust. Um die Qualität der Bilder zu verbessern kann ein Imaging in Skin-Flap-Technik durchgeführt werden. Hierbei wird die Haut über der zu untersuchenden Körperregion gefenstert und nach dem Imaging wieder verschlossen [78].

In den folgenden Jahren wurden die Techniken zum *in-vivo* Imaging deutlich verfeinert. Die Arbeitsgruppe nutzt beispielsweise transgene GFP-exprimierende Nacktmäuse und RFP-transfizierte Tumorzellen zur detaillierten Darstellung von Tumor-Wirt-Interaktion [79]. Hierdurch können beispielsweise die im Rahmen der Angiogenese im Primärtumor wachsenden murinen Gefäße dargestellt werden [80]. Die Formation von Lebermetastasen und die Rolle der Wirtszellen können visualisiert werden [36]. Sogar die Visualisierung von Vorgängen auf subzellulärem Niveau kann mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie in Echtzeit dargestellt werden [81]. Werden orthotope Tumormodelle mit diesen Imaging-techniken kombiniert ergeben sich breite Anwendungsmöglichkeiten, beispielsweise als Modell für die Entwicklung neuer Chemotherapeutika [82, 83, 84, 78].

1.4 Experimentelle Magnetresonanztomographie von Kleintieren

Die Kleintierbildgebung mittels Magnetresonanztomographie hat eine lange Geschichte. Bereits 1979 berichtete Bottomley von der Möglichkeit der *in-vivo* Diskriminierung eines Tumors in der Ratte [85]. Er benutzte hierfür ein eigens angefertigtes spezielles Spektrometer mit einer Feldstärke von 0,7 Tesla. Bereits 1980 konnten Hansen et al detaillierte anatomische Aufnahmen von Ratten anfertigen [86].

Heute spielt die experimentelle Kleintierbildgebung allgemein in der präklinischen Forschung eine wesentliche Rolle. Sie kann beispielsweise der Darstellung von transplantierten Stammzellen [87] sowie der Evaluation neuer Substanzen anhand von Krankheitsmodellen [88] dienen und ist von großer Bedeutung für die onkologische Forschung mit Tiermodellen [89]. Grundsätzlich stehen verschiedenste Modalitäten für die Bildgebung von Kleintieren zur Verfügung. So gibt es im Grunde für jedes klinisch angewendete bildgebende Verfahren ein entsprechendes Analog im Kleintierbereich. Es existieren dedizierte CT-, MRT-, PET-, Fluoreszenzimagining- oder SPECT-Geräte für Kleintiere. Auch die Kombination der verschiedenen Modalitäten um funktionelle und morphologische Bildgebung zu kombinieren ist möglich.

Von allen Methoden bietet die Kleintier-MRT sowohl morphologische Bildgebung bei hohem Weichteilkontrast, als auch die Möglichkeit der funktionellen Bildgebung. Hierbei besteht nicht die Notwendigkeit Kontrastmittel oder radioaktiv markierte Substanzen zu spritzen. Wird im MRT Kontrastmittel verwendet, so sind die notwendigen zu applizierenden Mengen deutlich geringer als beispielsweise im CT [90].

Dedizierte Kleintier-MRT-Scanner arbeiten gewöhnlich mit magnetischen Flussdichten zwischen 4,7 Tesla bis 7 Tesla. Es gibt aber ein extrem breites Spektrum an magnetischen Flussdichten. In der Literatur findet sich die Verwendung von Geräten mit einer magnetischen Flussdichte von 2 Tesla [91] bis hin zu hochexperimentellen Geräten mit Flussdichten von 17,6 Tesla [92]. Theoretisch ermöglichen höhere Flussdichten ein besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR). In praxi ist die Bildqualität aber nicht nur vom SNR, sondern auch von anderen Faktoren wie beispielsweise dem Durchmesser der verwendeten Spule abhängig, so dass die Bildqualität nicht alleine durch eine Verstärkung des B_0 -Feldes gesteigert werden kann [90]. Die Erhöhung der magnetischen Flussdichte bewirkt zum Beispiel eine Verminderung des T1-Kontrastes oder führt zu erhöhter Artefaktanfälligkeit [93].

Eine gute Alternative zu speziellen Kleintierscannern stellt die Verwendung von klinischen MRT-Scannern dar. Betrachtet man nur die Technischen Daten wie B_0 -Flussdichte, Gradientenstärke oder Slew Rate sind diese Geräte den experimentellen Kleintierscannern zwar zum Teil deutlich unterlegen. Es hat sich aber gezeigt, dass für rein morphologische Darstellungen die Qualität der Aufnahmen positiv mit der Flussdichte des B_0 -Feldes

korreliert [94]. Wolf et al. weisen in ihrer Arbeit ausdrücklich auch auf das Potenzial einer klinischen MRT-Ausstattung bei 1,5T für die experimentelle Kleintierbildgebung hin [95]. Hierbei wurde eine 4 cm durchmessende Oberflächenspule im single-loop Design verwendet, die in der klinischen Routine beispielsweise für die Untersuchung der Orbita angewendet wird. Eine weitere Qualitätsverbesserung bietet die Anwendung von speziell angefertigten Kleintierspulen. So verwenden Ittrich et al in ihrer Studie eine speziell auf die Größe von Kleintieren angepasste Volumenspule (89)[96]. Peldschus et al gelangen mit einer solchen Spule an einem klinischen 3 Tesla Gerät sogar die Darstellung von einzelnen SPIO-markierten Stammzellen [97]. Die Verwendung speziell angepasster Empfangsspulen ermöglicht also problemlos auch hohe Auflösungen bei akzeptablem SNR.

Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung klinischer MRT-Ausrüstung, wie beispielsweise von normalerweise für Extremitäten verwendeten Volumenspulen, ist die Möglichkeit mehrere Tiere pro Messung zu scannen. Die Auflösung ist hierbei ausreichend für eine grobe anatomische Darstellung. Hierdurch lassen sich große Durchsatzraten erzielen, wie sie zum Beispiel bei *in-vivo* Versuchen in der pharmakotherapeutischen Forschung notwendig sind [98].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass aktuell ein breites Spektrum an Bildgebungsverfahren zum Einsatz in der präklinischen Forschung existiert. Die Magnetresonanztomographie ist hierbei ein vielfach angewendetes Verfahren. Hierbei werden unter Anderem spezielle Kleintier-MRT-Geräte benutzt. Die Bildgebung mit klinischem Equipment und eventuell zusätzlichen Spezialspulen kann aber in vielen Fällen gleichwertige Ergebnisse liefern.

1.5 Zielsetzung und Studiendesign

In dieser Studie soll ein orthotopes Modell für das Adenokarzinom des Ösophagus etabliert werden. Des Weiteren sollen Fluoreszenz imaging und Magnetresonanztomographie in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und Durchführbarkeit evaluiert werden.

Hierzu wird eine Gruppe von 6 Versuchstieren nach der orthotopen Implantation regelmäßigen follow-up Untersuchungen unterzogen. Die klinische Untersuchung und das *in-vivo* Fluoreszenz imaging finden hierbei täglich statt, während die Magnetresonanztomographie alle drei Tage durchgeführt wird. Die Beobachtungen enden, wenn der individuelle Zustand der Tiere ein Weiterführen des Versuchs aus tierethischen Gründen nicht mehr zulässt. Dann werden die Versuchstiere einer Sektion unterzogen und die Größe der Primärtumore sowie die Metastasierungsrate mittels Fluoreszenzbildgebung bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die humane eGFP exprimierende Adenokarzinomzelllinie GFP-PT1590 wurde wie oben beschrieben durch Transfektion der ursprünglichen Zelllinie PT1590 generiert. Für die Kultivierung der Zellen wurde ein Zellkulturmedium mit den bereits bei der Etablierung der ursprünglichen Zelllinie PT1590 vorgeschlagenen Zusätzen verwendet [28]. Hierbei diente RPMI1640 Medium + Glutamax als Grundmedium. Tabelle 2.1 zeigt die verwendeten Zusätze.

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Reinluftwerkbank (*Hera Safe, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland*) und unter Verwendung steriler Einmalmaterialien durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im Inkubator (*Hera Cell 240, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland*) bei 37° C in einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre und bei gesättigter Luftfeuchtigkeit in 25 cm² Zellkulturflaschen (*Canted Neck, Polystyrene red, Sarstaedt*). Alle zwei bis drei Tage wurde das alte Zellkulturmedium mit Hilfe einer Vakuumpumpe (*BioChem-VacuCenter BVC 21 NT, vacuubrand*) und sterilen Pasteurpipetten abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Eine Passagierung der an der Zellkulturflasche adhärent wachsenden Tumorzellen wurde bei Erreichen einer Konfluenz von 80 Prozent durchgeführt.

Hierzu wurden die konfluierend wachsenden Zellen nach Absaugen des alten Mediums mit einer sterilen Pasteurpipette zunächst für eine Minute mit Trypsin-EDTA-Lösung 0,25% (*Invitrogen, Paisley, England*) behandelt, um die an der Zellkulturflasche adhärenen Zellen zu lösen. Nach einer Minute wurde die Trypsin-EDTA-Lösung wieder abgesaugt. Die Ablösung der Zellen wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop (*Axiocvert 40 CFL, Carl Zeiss, Jena*) kontrolliert. Die gelösten Zellen wurden mittels einer sterilen Plastikeinmalpipette (*BD Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA*) und einer Pipettierhilfe (*Pipet-aid, Drummond Scientific, Broomall, USA*) in 5 ml Zellkulturmedium suspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde dann in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit frischem Medium aufgefüllt.

Tabelle 2.1: Verwendete Zusätze zum Zellkulturmedium RPMI1640

Zusatz	Endkonzentration	Hersteller
Fetales Kälberserum	10%	Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland
Penicillin	10 μ g/ml	Invitrogen, Paisley, England
Streptomycin	10 μ g/ml	Invitrogen, Paisley, England
Gentamycin	0,1mg/ml	Biochrome KG, Berlin, Deutschland
Transferrin	5nmol/ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Insulin	10ng/ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fibroblast Growth Factor	10ng/ml	Pepto Tech, Rocky Hill, USA
Epidermal Growth Factor	10ng/ml	Pepto Tech, Rocky Hill, USA

2.2 Vorbereitung der Zellen zur Injektion

Zum Herstellen einer zur subkutanen Injektion in die Versuchstiere geeigneten Zellsuspension wurden die in mehreren 75 cm² Zellkulturflaschen angezüchteten Zellen nach Absaugen des Zellkulturmediums mit einer sterilen Pasteurpipette zunächst für eine Minute mit Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Die von den Zellkulturflaschen gelösten Zellen wurden dann in 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (*D-PBS, Invitrogen, Paisley, England*) suspendiert. Ein 50 μ l Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl wurde entnommen. Die Zellen wurden zum Anfärben mit der gleichen Menge Trypanblau 0,5% versetzt. Dies diente zur Unterscheidung von viablen und toten Tumorzellen. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde dann bei 1500 RPM für 5 Minuten in einem 15 ml Zellkulturröhrchen (*Cellstar, Greiner Bio-One*) zentrifugiert (*Rotina 35R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland*), der Überstand mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml PBS-Puffer resuspendiert. Auf diese Weise wurden die gewonnenen Zellen dreimal gewaschen. Nach dem letzten Abzentrifugieren wurde das Zellpellet in einem nach der Zellzahl berechneten Volumen D-HANKS Medium (*Invitrogen, Paisley, England*) suspendiert, um eine Konzentration von 25×10^6 Zellen/ml zu erreichen. Die Zellsuspension wurde auf Eis gekühlt und innerhalb von maximal 45 Minuten die subkutane Injektion durchgeführt.

Tabelle 2.2: Grundansatz für intraperitoneale Injektionsnarkose

Substanz	Menge	Endkonzentration	Dosis	Hersteller
Esketamin 2,5%	5 ml	12,5 $\frac{mg}{ml}$	125 $\frac{mg}{kgKG}$	Ketanest S, Pfizer, Berlin, Deutschland
Xylazin 2%	0,8 ml	1,6 $\frac{mg}{ml}$	16 $\frac{mg}{kgKG}$	Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
NaCl	4,2 ml			BBraun, Melsungen, Deutschland
Gesamt	10 ml			

2.3 Anästhesieverfahren

Zur Anästhesie der Versuchstiere wurden im Wesentlichen zwei Narkoseverfahren angewendet:

Intraperitoneale Injektionsnarkose:

Für die Operation der Versuchstiere sowie die Magnetresonanztomographie wurde eine intraperitoneale Injektionsnarkose mit einem Ketamin/Xylazingemisch durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine Grundmischung entsprechend Tabelle 2.2 hergestellt. Zur Narkotisierung wurde den Tieren intraperitoneal 0,1 ml/10g KG der Ketamin/Xylazin Mischung injiziert. Nach fünf Minuten war eine gute Narkosetiefe erreicht. Die Spontanatmung der Tiere war hierbei unbeeinträchtigt.

Kurzarkose mit CO₂:

Zur kurzzeitigen Immobilisation der Tiere, beispielsweise im Rahmen des Fluoreszenzimaings bei längerer Belichtungszeit, sowie für schmerzhafte Eingriffe wie Blutentnahmen wurde eine Gasarkose mit CO₂ durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere bis zur Bewusstlosigkeit in einem mit CO₂/O₂ Gemisch (Verhältnis 80:20) gefüllten Glasbehältnis gehalten. Hierdurch wurde eine Narkosedauer von 30 Sekunden erreicht.

2.4 Das orthotope Ösophaguskarzinom-Mausmodell

Das Prinzip der Surgical Orthotopic Implantation basiert auf der chirurgischen Implantation von soliden Tumorstücken direkt an den Ösophagus. Um diese Tumorstücke zu gewinnen, wurde zunächst eine Suspension aus GFP-transfizierten PT1590 Zellen Versuchstieren subkutan injiziert. Die subkutan gewachsenen Tumore wurden dann für die eigentliche Implantation verwendet.

Als Versuchstiere dienten 10 Wochen alte immundefiziente NMRI/nu Nacktmäuse (*Charles River Deutschland*). Die Tiere wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter standardisierten Bedingungen und tierärztlicher Aufsicht gehalten. Für die Tierversuche lag ein durch die Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigter Tierversuchsantrag vor.

2.4.1 Subkutane Injektion in NMRI/nu Mäuse

Von der wie oben beschrieben hergestellten Zellsuspension wurden mittels einer 27G Subkutannadel (*Sterican, BBraun, Melsungen, Deutschland*) und einer 1ml Spritze (*BD Plastipak, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA*) 200 μl unter manueller Fixation der Versuchstiere subkutan in die Flanke injiziert. Dies entspricht einer applizierten Dosis von 5×10^6 Zellen pro Tier. Das Wachstum der subkutanen Tumore wurde regelmäßig sowohl inspektorisch, als auch durch *in-vivo* Fluoreszenz imaging kontrolliert. Nach Erreichen einer Größe des subkutanen Tumors von etwa 1 cm^3 erfolgte die Explantation und orthotope Implantation.

2.4.2 Explantation des subkutanen Tumors

Sobald die subkutan wachsenden Tumore eine Größe von einem Kubikzentimeter erreichten, wurde die Explantation vorgenommen. Hierfür wurde bei narkotisiertem Versuchstier nach Hautinzision der Tumor freipräpariert und entnommen. Anschließend erfolgte der Wundverschluss mit 6.0 Vicryl Fäden (*Ethicon, Norderstedt, Deutschland*) in Einzelknopftechnik. Der entnommene Tumor wurde in eine Petrischale (*Nunclon Surface, Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA*) mit PBS-Puffer überführt. Unter dem Fluoreszenz imager wurden die explantierten Tumore geteilt und die wenig fluoreszierenden Anteile als Nekrose identifiziert. Diese nekrotischen Anteile wurden verworfen und die viablen, gut GFP exprimierenden Tumoranteile mit einem sterilen Skalpell in etwa ein Kubikmillimeter große Stücke geteilt. Die Tumorstücke wurden bis zur Implantation im unmittelbaren Anschluss in PBS-Puffer aufbewahrt.

2.4.3 Surgical Orthotopic Implantation (SOI)

Nach intraperitonealer Injektionsnarkose wie oben beschrieben wurde das zu operierende Versuchstier in Rückenlage fixiert. Die Operation erfolgte als Schutz vor Hypothermie auf einer beheizten Unterlage.

Unter dem Operationsmikroskop (*Carl Zeiss, Jena, Deutschland*) bei sechsfacher Vergrößerung erfolgte zunächst die quere Hautinzision von 0,8 cm Länge unterhalb des

linken Rippenbogens. Nach scharfer Durchtrennung der Bauchmuskulatur und des Peritoneums wurde ein Mikrowundspreizer eingesetzt, um die Laparotomie offen zu halten. Der Magen wurde an der großen Kurvatur mit einer Pinzette gegriffen und hervorluxiert. Sodann wurde der distale abdominelle Ösophagus aufgesucht, stumpf aus dem umgebenden Gewebe mobilisiert und angeschlungen. Nach der Präparation stand ein etwa fünf Millimeter langes Stück distaler Ösophagus zur Implantation der Tumorstücke zur Verfügung. Die Serosa des Ösophagus wurde scharf eröffnet, um ein besseres Einwachsen des implantierten Tumors zu gewährleisten. Unter zehnfacher Vergrößerung wurden nun insgesamt 4 der zuvor präparierten Tumorstücke mit einem 8.0 Prolene Faden (*Ethicon, Norderstedt, Deutschland*) am Ösophagus fixiert. Die Instrumente wurden entfernt und die Bauchdecke mit einem 6.0 Vicryl Faden mittels Einzelknopfnähten verschlossen. Der Operations situs ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die postoperative Analgesie erfolgte mit Metamizol 1 mg/ml (*Novaminsulfon Tropfen, Ratiopharm, Ulm, Deutschland*) per os über das Trinkwasser.

2.5 Postoperatives Monitoring

2.5.1 Klinisches Monitoring

Die Versuchstiere wurden postoperativ täglich gewogen und inspiziert. Hierbei wurde insbesondere auch auf ausgeprägte Tumorkachexie oder Verhaltensauffälligkeiten geachtet.

2.5.2 In-vivo Fluoreszenzimagining

Für das *in-vivo* Fluoreszenzimagining benutzten wir ein LT9MACIMSYS Makroimaging System (*Lighttools Research, Encinitas, USA*). Das System besteht aus einem Metallgehäuse, in dem das zu untersuchende Objekt und das Ausleuchtungssystem platziert werden, und einer räumlich und zeitlich hochauflösenden CCD-Kamera. Die Kameradaten sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Technische Daten LT9MACIMSYS

Auflösung:	1360x1036 pixel
Pixelgröße:	6,45x6,45 μ m
Belichtungszeit:	40 μ s bis 15 Minuten
Brennweite:	11 – 69mm
Emissionsfilter:	515nm

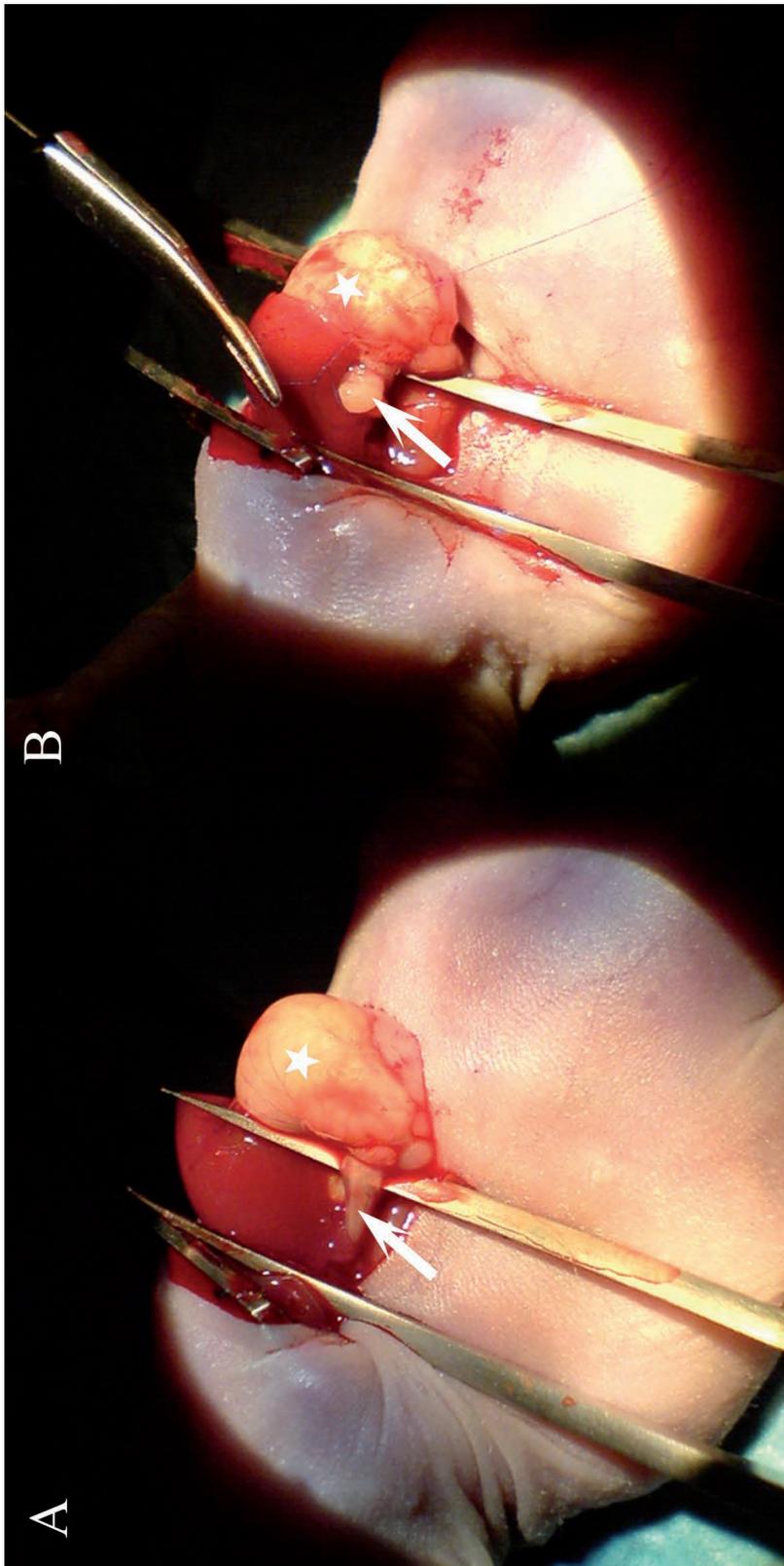


Abbildung 2.1: Abb. A zeigt den Operationsstatus vor Implantation des Tumors. Die Laparotomie wird durch einen Wundspreizer (im Bild nicht sichtbar) offen gehalten. Der Magen (*) wurde mit einer anatomischen Pinzette vorsichtig hervorluxiert. Der distale Ösophagus (→) ist bereits stumpf aus dem umgebenden Gewebe freipräpariert und wird mit einer gebogenen Pinzette fixiert. Abb. B zeigt das Fixieren von Tumorstücken (→) an den Ösophagus mit 8.0 Prolene Fäden.

Die Ausleuchtung des Objekts erfolgte mit einem Pan-a-see-ya Panoramic Imaging System (Lighttools Research, Encinitas, USA). Das System besteht aus einer Lichtquelle mit einer Leistung von 300 Watt sowie einem fiberoptischen Ausleuchtungssystem mit vier Emittlern, die seitlich und oberhalb des Objekts positioniert werden. Zur Anregung des GFP wurde ein Exzitationsfilter mit 470 nm Wellenlänge benutzt.

Die Versuchstiere wurden beginnend mit dem vierten Tag post operationem täglich im Fluoreszenzimager untersucht. Hierfür wurde standardmäßig eine Belichtungszeit von 350 μ s gewählt. Aufgrund der kurzen Belichtungszeit war für die Bildgebung keine Narkotisierung der Tiere notwendig, sondern eine manuelle Fixation ausreichend. Für die Untersuchung mit längerer Belichtungszeit wurde eine kurze Gasnarkose mit CO₂ durchgeführt.

2.5.3 Magnetresonanztomographie

Die Versuchstiere wurden alle 3 Tage einer Magnetresonanztomographie unterzogen. Die letzte Untersuchung fand an Tag 55 post operationem unmittelbar vor der Sektion der Versuchstiere statt. Für die Untersuchung im Magnetresonanztomographen wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin/Xylazin narkotisiert. Hierbei ist eine gute Narkosetiefe mit möglichst geringer Atemfrequenz notwendig, um Atemartefakte bei der Magnetresonanztomographie zu vermeiden.

Als Magnetresonanztomograph wurde ein konventioneller klinischer Ganzkörperscanner mit einer magnetischen Flussdichte von 3 Tesla benutzt. Das Standardgradientensystem erreicht eine maximale Gradientenstärke von 30 mT/m. Zur Signalmessung wurde eine spezielle Empfangsspule für Kleintiere mit einem Innendurchmesser von 40 mm (*Philips Research, Hamburg, Deutschland*) benutzt. Als Sendespule diente die geräteeigene Körperspule. Um die Körpertemperatur der Versuchstiere während der Untersuchung aufrecht zu erhalten, wurde das in der Kleintierspule eingebaute Heizsystem benutzt. So konnte während der gesamten Untersuchung eine konstante Körpertemperatur von 39° C gewährleistet werden.

Zunächst wurden niedrig aufgelöste T1-gewichtete Gradientenechosequenzen in drei orthogonal zueinander stehenden Ebenen als Übersicht zur Planung der folgenden Messsequenzen akquiriert. Das MRT Protokoll bestand aus drei T2-gewichteten zweidimensionalen Turbospinechosequenzen in transversaler, coronaler und saggitaler Orientierung. Die spezifischen Sequenzparameter sind in Tabelle 2.4 angegeben.

Das Field-of-View wurde groß genug gewählt, so dass immer das komplette Tier abgebildet war, um Einfaltungsartefakte zu vermeiden. Besonders in Phasenkodierrichtung wählten wir ein möglichst kleines Field-of-View, um Untersuchungszeit zu sparen. Die Matrixgröße wurde passend zum Field-of-View so gewählt, dass eine konstante Auflösung von 200 \times 200 μ m in allen Orientierungen gewährleistet wurde. Die nach diesen Kriterien optimierten

Tabelle 2.4: Parameter der verwendeten MRT-Sequenz

Parameter	Wert
Repetitionszeit (TR)	2674ms
Echozeit (TE)	90ms
Echozuglänge	10
Zahl der Anregungen	2

Parameter sind in Tabelle 2.5 dargestellt. Für alle drei Orientierungen wurden 14 Schichten mit einer Schichtdicke von 800 μm benutzt. Die reine Scanzeit pro Tier betrug bei diesen Sequenzparametern 10 Minuten und 42 Sekunden.

Tabelle 2.5: MRT: Field-of-View und Matrixgröße

Schichtorientierung	Field-of-view	Matrixgröße
Coronal	80 mm x 40 mm	400 x 200 pixel
Saggital	80 mm x 40 mm	400 x 200 pixel
Axial	32 mm x 25,6 mm	160 x 128 pixel

Die Auswertung der MRT-Bilder erfolgte an der dem MRT-Scanner zugehörigen Workstation durch einen erfahrenen und einen unerfahrenen Gutachter im Konsensusverfahren. Hierbei wurden suspekte Läsionen als Tumor gewertet, wenn diese in der T2-gewichteten Sequenz hyperintens erschienen und mindestens einen Millimeter Durchmesser aufwiesen. Der maximale Tumordurchmesser und der minimale Abstand des Tumors zur Bauchwand wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt gemessen.

2.6 Sektion der Versuchstiere und ex-vivo Fluoreszenzimaging

Am Tag 55 post operationem erfolgte die Euthanasie und Sektion der Versuchstiere. Für die tierschutzgerechte Euthanasie wurde zunächst eine CO₂-Narkose durchgeführt. Unter der Narkose erfolgte dann die zervikale Dislokation zur Tötung der Versuchstiere. Die Mäuse wurden in Rückenlage mit Nadeln auf einer Korkplatte fixiert. Während der Sektion wurden zwischen jedem Sektionsschritt Fluoreszenzaufnahmen angefertigt, beginnend vor der Eröffnung der Haut. Bei der Sektion erfolgte zunächst die Eröffnung der Haut durch eine lange Inzision von der Symphyse bis zum Unterkiefer. Die Haut wurde von Muskulatur und Peritoneum gelöst und zur Seite geklappt. Danach wurde das Peritoneum eröffnet. Nach und nach wurden die parenchymatösen Oberbauchorgane,

Ösophagus, Magen, Primärtumor sowie das gesamte Intestinum einzeln entnommen. Im nächsten Schritt wurden coeliacale und mesenteriale Lymphknoten asserviert. Nach der Entnahme der Bauchorgane wurden nach Absetzen der Musculi pectorales die axillären Lymphknoten beidseits entnommen. Danach erfolgte die Eröffnung des Thorax mittels Sternotomie und abspreizen der Thoraxwände nach lateral. Das Herz-Lungen-Paket, sowie Ösophagus und mediastinale Lymphknoten wurden entnommen.

Abschließend wurden die entnommenen Organe und Lymphknoten einzeln im Fluoreszenzimager untersucht. Hierbei wurden Belichtungszeiten von einer bis zehn Sekunden gewählt. Die Asservation der Proben für weitere Untersuchungen erfolgte durch Schockfrieren in flüssigem Stickstoff und der anschließenden Aufbewahrung bei -80° C.

2.7 Vergleich von MRT und Fluoreszenzimagining

Das durch Fluoreszenzbildgebung und Magnetresonanztomographie gewonnene Bildmaterial wurde bezüglich Kontrast, Helligkeit und Farbe mit einem kommerziellen Grafikbearbeitungsprogramm optimiert. In den MRT-Bildern wurde bei jeder Messung der maximale Tumordurchmesser in coronaler Orientierung als Maß für die individuelle Tumorlast bestimmt und hieraus Wachstumskurven generiert. Der minimale Abstand des Tumors zur Bauchdecke wurde zum Zeitpunkt des ersten Auftretens eines sicheren Fluoreszenzsignals im *in-vivo* Fluoreszenzimagining beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des orthotopen Tiermodells

Das Ziel der Studie war unter Anderem, ein orthotopes Tiermodell für das ösophageale Adenokarzinom zu entwickeln. Durch die orthotope Implantation von subkutan gewachsenen soliden Tumorstücken direkt an den distalen abdominalen Ösophagus konnte eine sehr effektive Methode zur Xenotransplantation gefunden werden. Ein Versuchstier verstarb an Tag 7 post operationem im Rahmen einer intraperitonealen Injektionsnarkose während der MRT-Untersuchung und wurde aus der Auswertung ausgeschlossen. Bei allen anderen operierten Versuchstieren zeigte sich ein sicheres Anwachsen des Tumors. Alle implantierten Tumore befanden sich bei der Sektion am Ort der Implantation und zeigten ein infiltratives Wachstum in die benachbarten Organe. So zeigte sich bei allen 5 Versuchstieren eine Infiltration der Ösophaguswand. Bei einem Tier wuchs der Tumor in die Leber ein. Tabelle 3.1 stellt die unterschiedlichen Gewichte der gewachsenen Tumore zum Zeitpunkt der Sektion nach 55 Tagen dar. Die Wachstumsgeschwindigkeit des orthotop implantierten Tumors zeigt eine hohe Varianz zwischen den einzelnen Versuchstieren.

Die bei der Sektion gefundenen Metastasen sind ebenfalls in Tabelle 3.1 dargestellt. Die Metastasierung des orthotop implantierten Ösophagustumors findet in die Leber, in die Lunge und in die regionären Lymphknotenabflussgebiete (insbesondere coeliacal und mediastinal) statt. Bei einem Versuchstier ließ sich schon makroskopisch bei der Sektion eine Lebermetastase erkennen, bei 3 weiteren Tieren konnten kleine, makroskopisch nicht sichtbare Lebermetastasen mittels Fluoreszenzimaging der entnommenen Organe nachgewiesen werden. Es zeigten sich also insgesamt in 80% der Versuchstiere eine Lebermetastasierung, eine nodale Metastasierung konnte ebenfalls in 80% der Tiere nachgewiesen werden.

3.2 Darstellung des Primärtumors durch MRT und Fluoreszenzimaging

Die engmaschige sequenzielle Untersuchung der 5 Versuchstiere mittels der alle 3 Tage durchgeführten Magnetresonanztomographie und der täglichen *in-vivo* Fluoreszenzima-

Tabelle 3.1: Sektionsbefund Tumorgewicht und Metastasierung. Die Tabelle zeigt die bei der Sektion makroskopisch und durch Fluoreszenzimagining gefundenen Metastasen (+)

Maus	Gewicht PT	Leber	Lunge	LK coel.	LK mediast.	LK ax.
1	1,2g	+	-	+	-	-
2	0,2g	-	-	-	-	-
3	4,5g	+	+	-	+	-
4	1,3g	+	-	+	-	+
5	4,6g	+	-	-	-	-

ging Untersuchung erlaubte eine Einschätzung der Sensitivität beider Verfahren bezüglich der Detektion des Primärtumors. Die Magnetresonanzbildgebung bietet durch die Möglichkeit der freien Schichtwahl eine detaillierte anatomische Darstellung der implantierten Tumore.

Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2 zeigen exemplarisch einige Bilder einer MRT-Untersuchung von Maus 5 am zwölften Tag nach Operation. Der implantierte Tumor ist in beiden Abbildungen als scharf begrenzte, in der T2-Wichtung hyperintense Struktur zu erkennen. Die orthotope Lage des Tumors und die Lagebeziehung zu den benachbarten Organen wird hierbei deutlich. Man sieht besonders in sagittaler Orientierung die im MRT durch Bewegung auftretenden Ghosting-Artefakte in Richtung des Phasenkodiergradienten. Diese resultieren aus den schnellen Atembewegungen der Versuchstiere. Die auftretenden Artefakte erschweren die Beurteilung von Leber und Lunge erheblich, so dass kleine Metastasen schwer oder gar nicht detektiert werden können. Ein MR-tomographischer Nachweis des orthotop wachsenden Tumors gelang bei Maus 5 bereits ab dem vierten postoperativen Tag. Allerdings ist im Allgemeinen die Beurteilung der Bilder so kurz nach der Operation stark durch postoperative Entzündungsreaktion mit entsprechendem Ödem, das in den T2-gewichteten Sequenzen ebenfalls hyperintens erscheint, erschwert. Eine sichere Tumordetektion war ab Tag 14 bei allen Versuchstieren möglich. Ein stetiges Wachstum zeigte sich ab Tag 18, so dass es möglich war für jedes Tier individuelle Wachstumskurven aufzunehmen. Diese sind in Abbildung 3.3 dargestellt.

Der Tumornachweis mittels *in-vivo* Fluoreszenzimagining gelang erstmals an Tag 21. Abbildung 3.4 zeigt exemplarisch das erste Auftreten eines Fluoreszenzsignals bei Maus 3. Abbildung 3.4 A zeigt die von ventral im Fluoreszenzimager aufgenommene Maus mit einem median gelegenen schwachen abdominalen Fluoreszenzsignal. Im dazugehörigen sagittalen T2-gewichteten MRT-Bild (Abb. 3.4 B) lässt sich der Abstand des Tumors zur ventralen Bauchwand mit 4,2 mm sicher bestimmen. Analog wurde bei allen Versuchstieren verfahren. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Das erste Fluoreszenzsignal trat jeweils bei einem Abstand des Tumors zur ventralen Bauchwand von 4,2 mm oder weniger auf. Somit kann ein Wert von circa 4 mm als die maximale Eindringtiefe angenommen werden. Bei tiefer liegenden Tumoren reicht die Intensität der emittierten Fluoreszenz

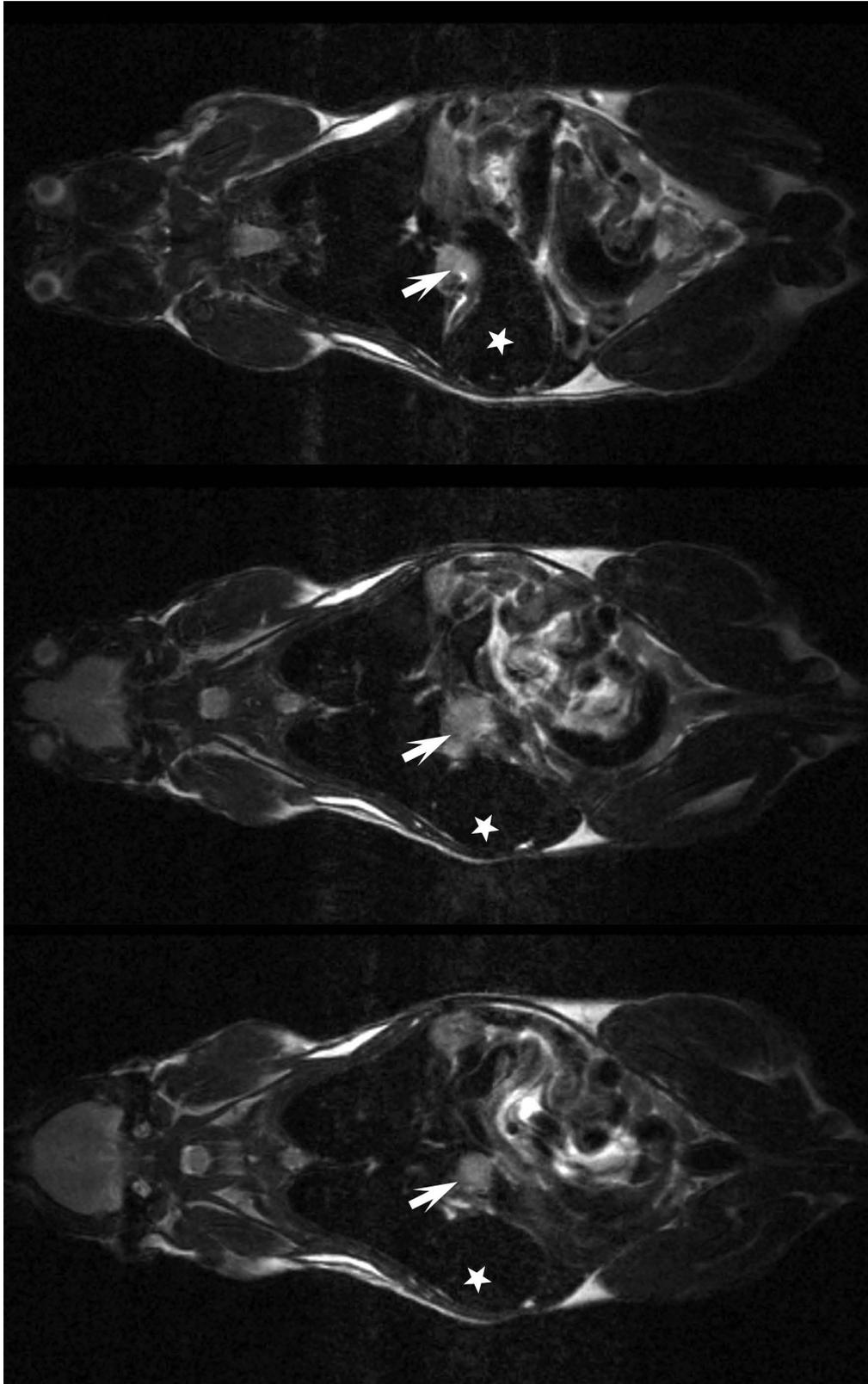


Abbildung 3.1: Coronale MR-Schichten Maus 5 Die Abb. zeigt drei aufeinander folgende coronale MR-Schnittbilder von dorsal nach ventral. Der Tumor (→) liegt mediokranial des luftgefüllten Magens (*) orthotop am distalen Ösophagus. Man erkennt weiterhin luftgefüllte Darmschlingen

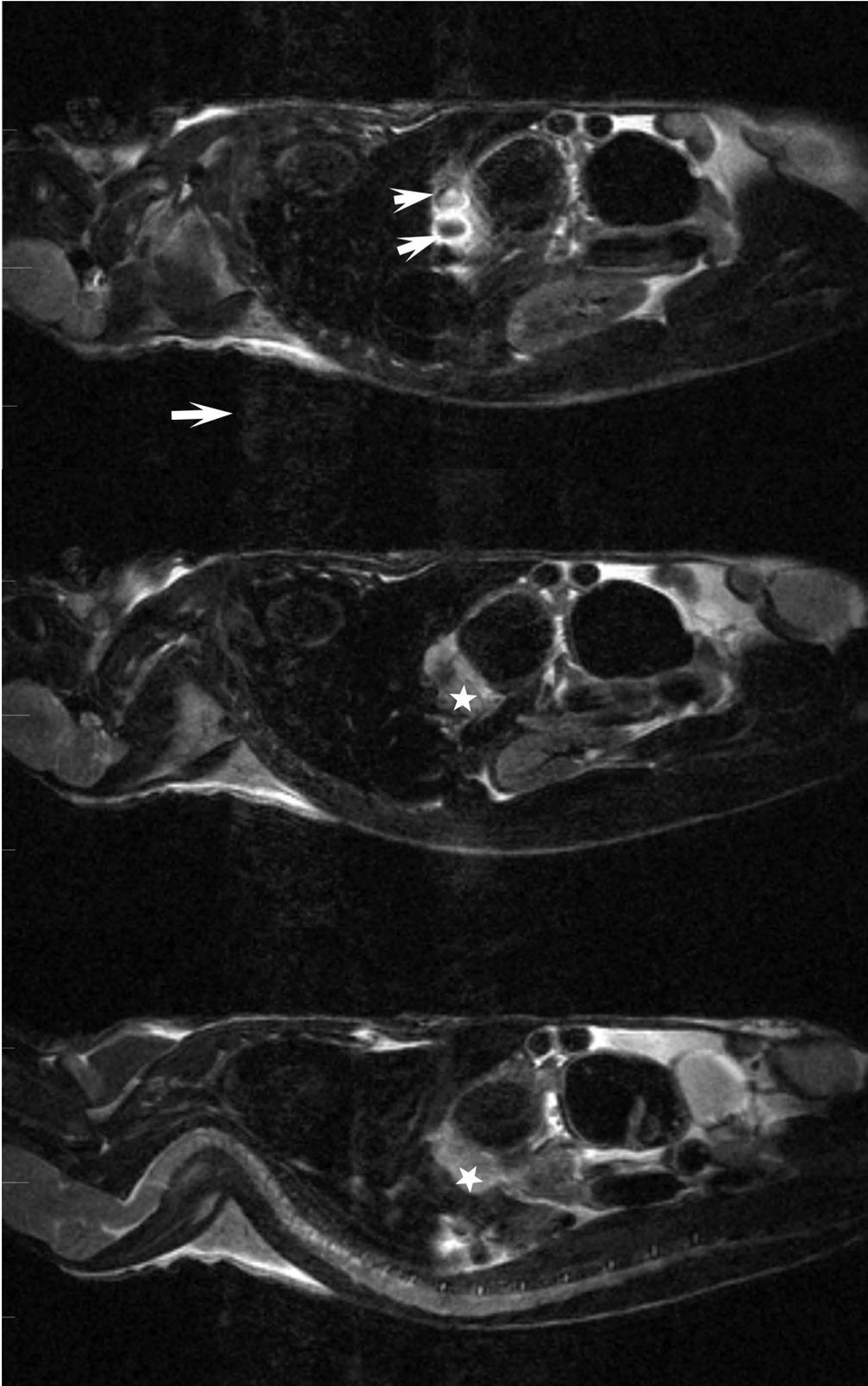


Abbildung 3.2: Saggitale MR-Schichten Maus 5. Die Abb. zeigt drei aufeinander folgende saggitale MR-Schnittbilder durch den Tumor (*). Man erkennt deutliche Ghosting-Artefakte in Richtung des Phasencodiergradienten (\rightarrow).

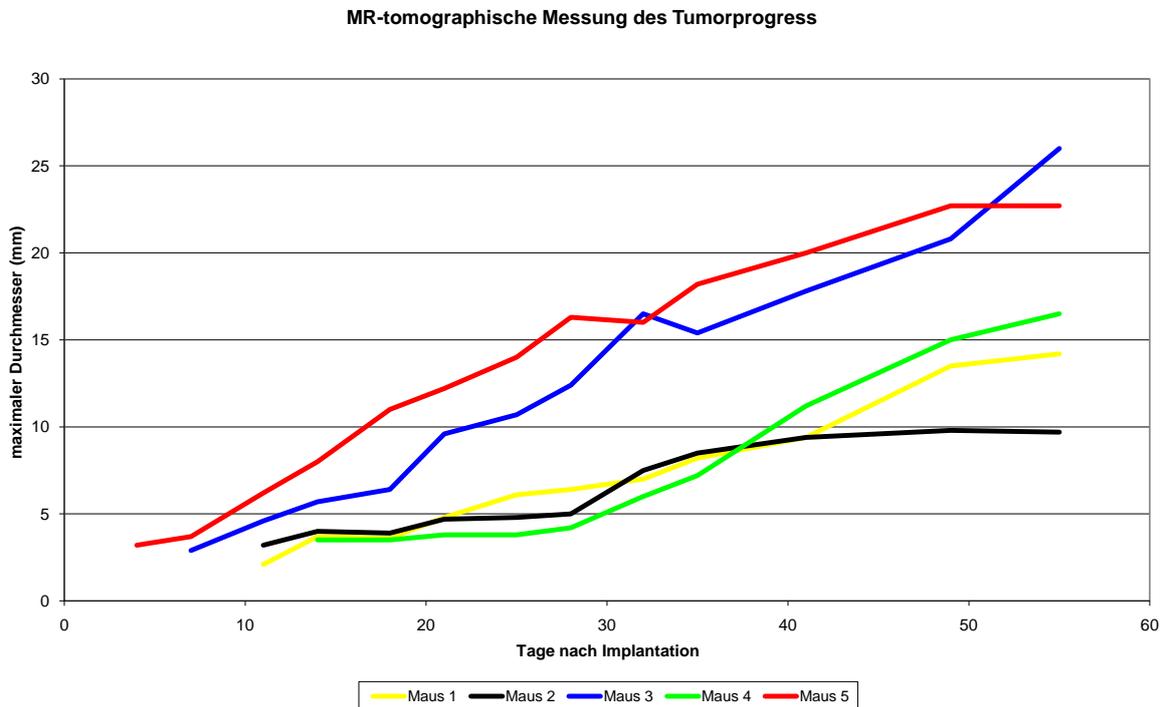


Abbildung 3.3: MR-tomographische Messung des Tumorprogress. Der maximale Tumordurchmesser wurde zu jedem Untersuchungszeitpunkt an der MRT-Konsole bestimmt und für jede Maus eine einzelne Wachstumskurve erstellt.

für eine Detektion durch das Gewebe hindurch nicht aus. Die Absorption der Strahlung im Gewebe, und somit der Abstand des Tumors zur Bauchdecke, ist also der limitierende Faktor bei der Fluoreszenzbildgebung. Ob ein Tumor im Fluoreszenz Imaging sichtbar ist, ist weitgehend unabhängig von der Größe der Tumore. Große tief liegende Tumore können zum Teil schlechter detektiert werden als beispielsweise 1 mm durchmessende subkutane Tumore.

Die Beurteilung der tatsächlichen Tumorgröße im Fluoreszenz Imaging ist neben der oben geschilderten Problematik der begrenzten Eindringtiefe auch durch die Lage des Ösophagustumors eingeschränkt. In den meisten Fällen liegt der Tumor ganz oder zum Teil hinter Magen und Leber. Die Problematik der Überlagerung durch benachbarte Organe wird in Abbildung 3.5 deutlich. Hier zeigt sich eine deutliche Diskrepanz zwischen Inspektionsbefund und Fluoreszenzsignal. Im Fluoreszenzsignal besteht eine deutliche zentrale Aussparung, die sich in der Sektion und im MRT als Überlagerung durch Magen und Leber darstellt. Liegt der Tumor jedoch oberflächlich und wird nicht wesentlich von umgebenden Organen überlagert, ergibt sich eine gute Korrelation der beiden Imaging-

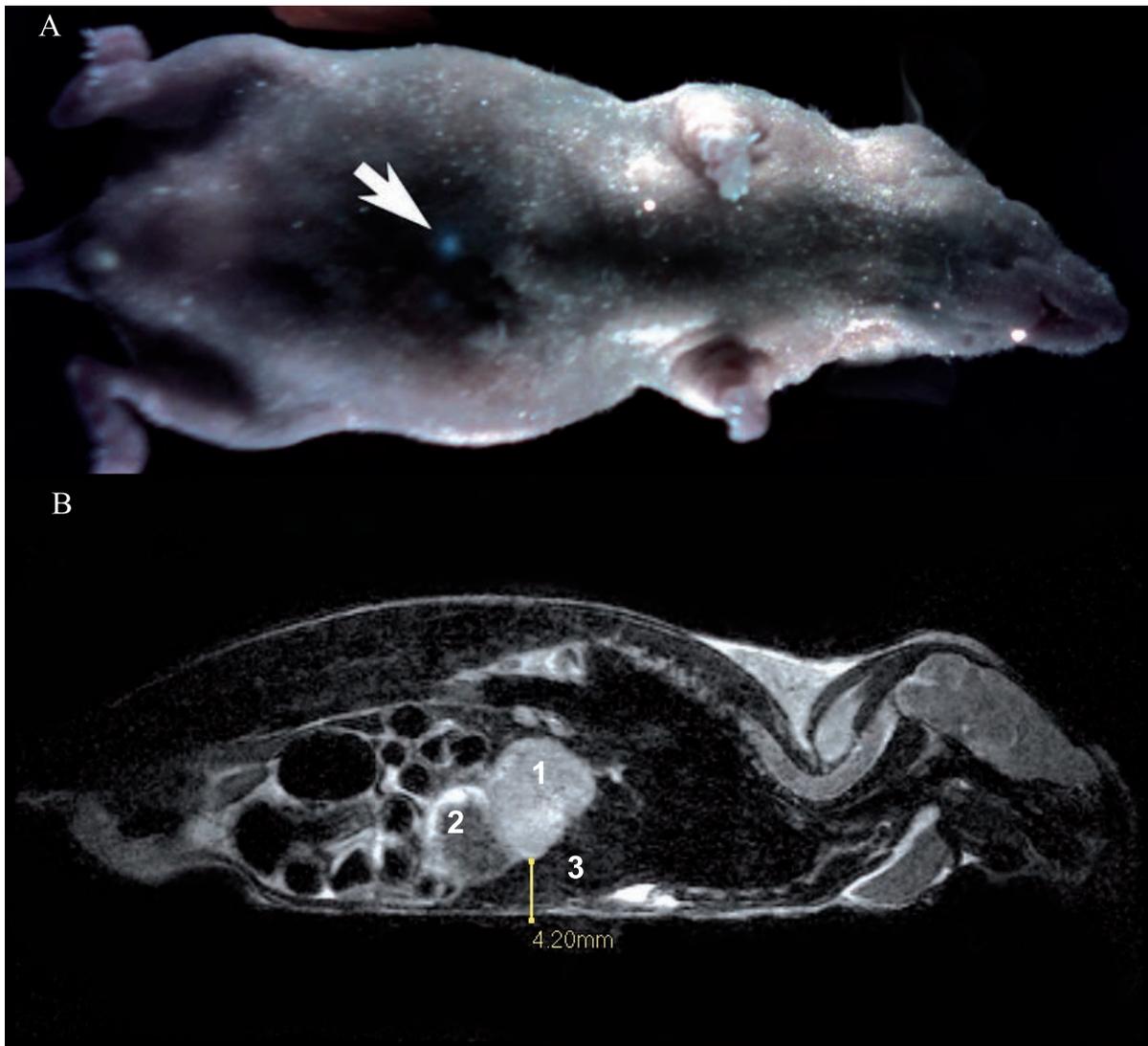


Abbildung 3.4: Erstes Fluoreszenzsignal Maus 3. Der Abstand des Tumors zur Bauchdecke wurde an der MRT-Workstation gemessen. Der Tumor (1) ist als hyperintense homogene Raumforderung ausgehend vom distalen Ösophagus und in der kleinen Magenkurvatur gelegen erkennbar. Das Magenantrum (2) ist mit angeschnitten. Nach ventral wird der Tumor von Leberparenchym (3) überdeckt.

Tabelle 3.2: Erstes Auftreten von Fluoreszenzsignalen

Maus	Tag	Tumordurchmesser	Abstand zur Bauchdecke
1	41	9,4 mm	2,4 mm
2	54	9,7 mm	4 mm
3	21	9,6 mm	4,2 mm
4	49	15 mm	3,2 mm
5	32	16 mm	1 mm

Modalitäten untereinander sowie mit der tatsächlichen Tumorgroße und -lage. Abbildung 3.6 zeigt exemplarisch MRT, Fluoreszenzimaging und Sektionsbefund einer Maus.

3.3 Darstellung der Metastasierung durch MRT und Fluoreszenzimaging

Beide *in-vivo* Imagingverfahren wurden bezüglich der Detektion von Metastasen untersucht. Hierbei konnten in der Magnetresonanztomographie *in-vivo* keine Metastasen nachgewiesen werden. Im *in-vivo* Fluoreszenzimaging gelang der Nachweis von Metastasen durch offenes Imaging. Abbildung 3.7 A zeigt eine bei geöffneter Haut sichtbare Lymphknotenmetastase. Das Fluoreszenzsignal des Primärtumors ist hier bei abpräparierter Haut deutlicher zu erkennen als bei transkutanem Imaging. Nach Entnahme der Organe und der Lymphknotenpakete (Abbildung 3.7 C) lassen sich die Lymphknotenmetastasen noch deutlicher erkennen. Außerdem kommen zwei kleine, makroskopisch nicht sichtbare Lebermetastasen zur Darstellung. Auf den MRT-Bildern (Abbildung 3.7 B) sind weder die Leber- noch die Lymphknotenmetastasen zu erkennen. Abbildung 3.8 zeigt eine weitere, bereits makroskopisch sichtbare Lebermetastase. Auch diese war im MRT nicht darstellbar.

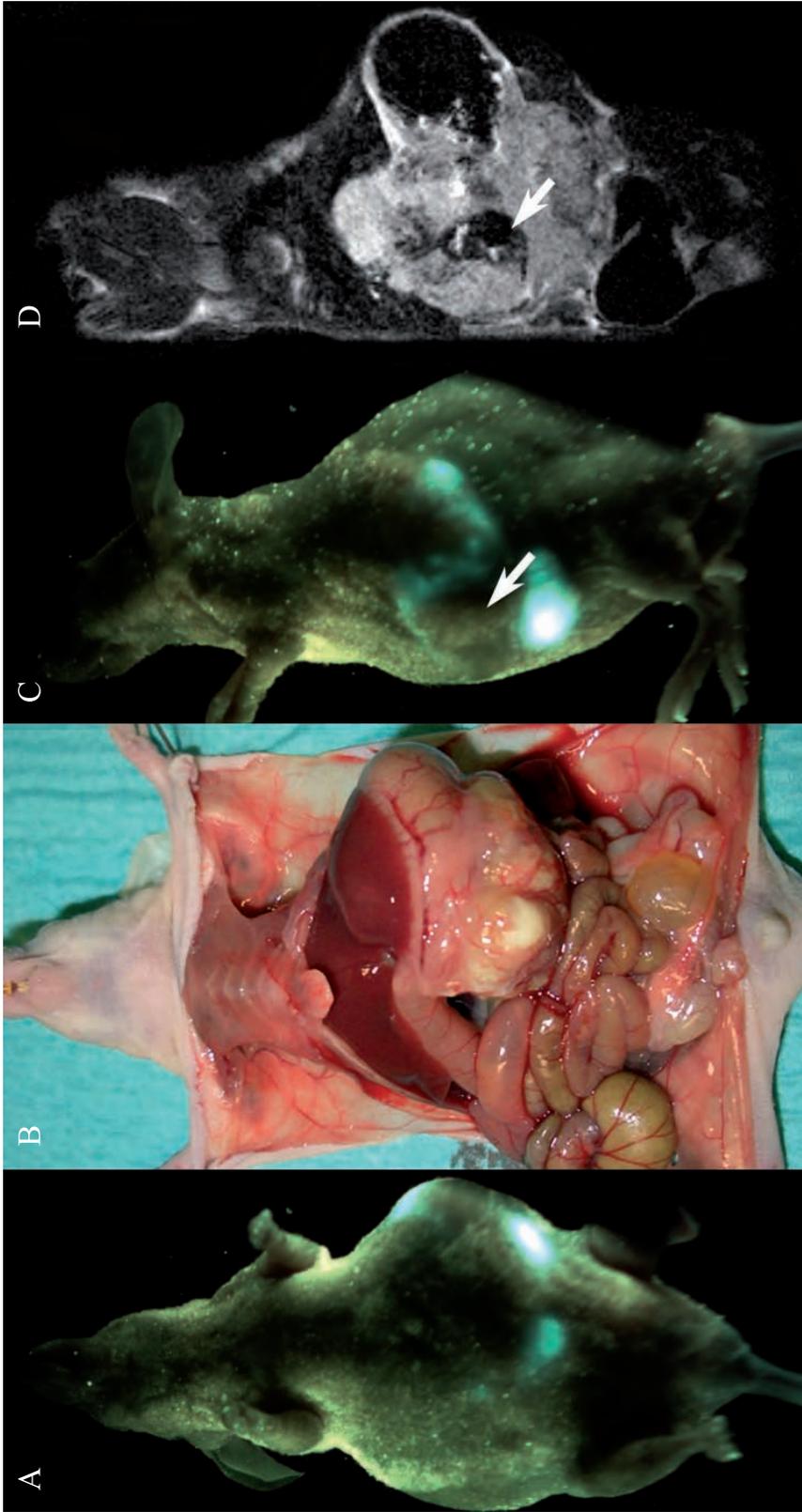


Abbildung 3.5: Überlagerung des Tumors durch Organe. Abb. A zeigt eine Maus mit inspektorisch großem Tumor. Das Fluoreszenzbild deckt sich allerdings nicht mit dieser Annahme. Während der Sektion (Abb. B) zeigt sich als Grund für das zentral in Abb. A fehlende Fluoreszenzsignal eine Überlagerung des Tumors durch Magen und Leber. In seitlicher Aufnahme (Abb. C) zeigt sich ebenfalls eine Aussparung des Fluoreszenzsignals (\rightarrow), welche im entsprechenden sagittalen MRT-Bild (Abb. D) Magenanteilen (\rightarrow) entspricht.

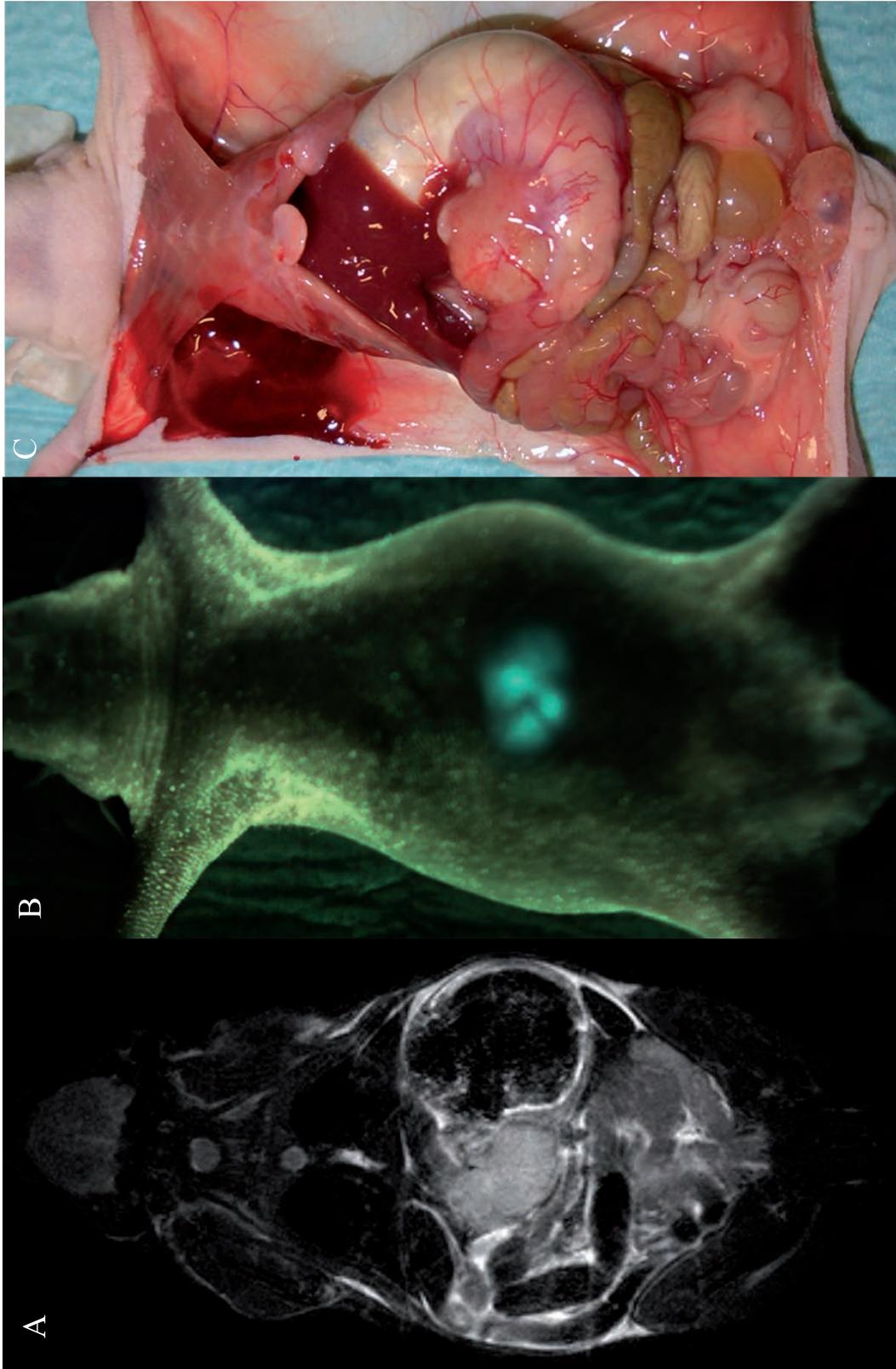


Abbildung 3.6: Korrelation der Imaging-Modalitäten mit dem Sektionsbefund. Abb. A zeigt das koronale MRT-Bild mit dem zentral liegenden Tumor. Abb. B zeigt das entsprechende von ventral aufgenommene Fluoreszenzbild. Abb. C zeigt den Sektionsbefund. Beide Imagingmodalitäten geben den tatsächlichen Befund adäquat wieder.

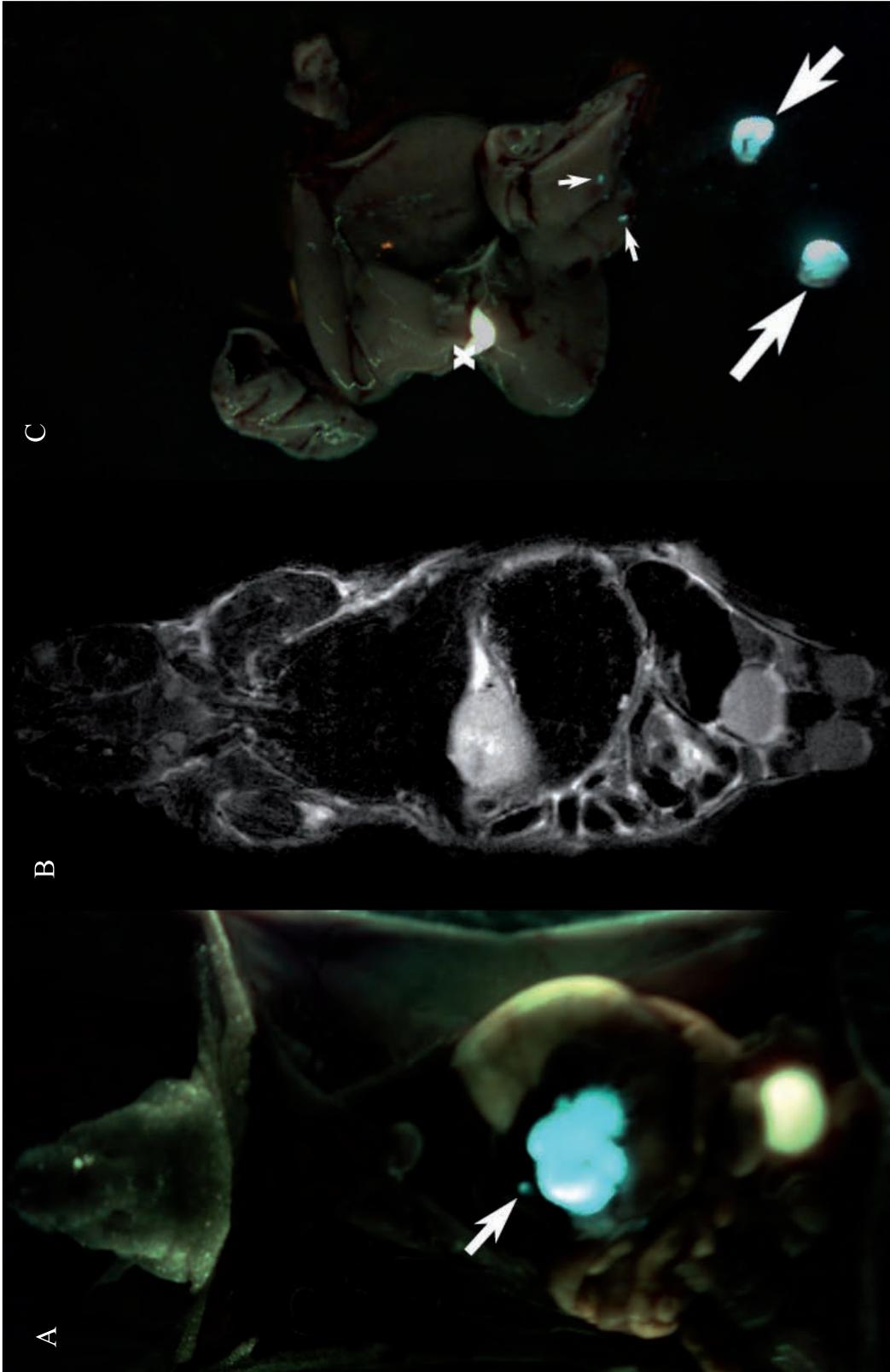


Abbildung 3.7: Offenes Imaging und MRT. Abb. A zeigt das Bild des im Rahmen der Sektion durchgeführten offenen Imagings. Man erkennt ein vom Primärtumor distantes Signal (\rightarrow), das einer Lymphknotenmetastase entspricht. Im dazugehörigen MRT-Bild (Abb. B) lässt sich diese Metastase nicht erkennen. Abb. C zeigt die Fluoreszenzaufnahme der entnommenen Organe und Lymphknoten. Die entnommenen Lymphknoten sind hier ebenfalls deutlich positiv (große Pfeile). Mit kleinen Pfeilen gekennzeichnet erkennt man 2 Lebermetastasen. Die Gallenblase (X) zeigt ebenfalls eine Fluoreszenz.

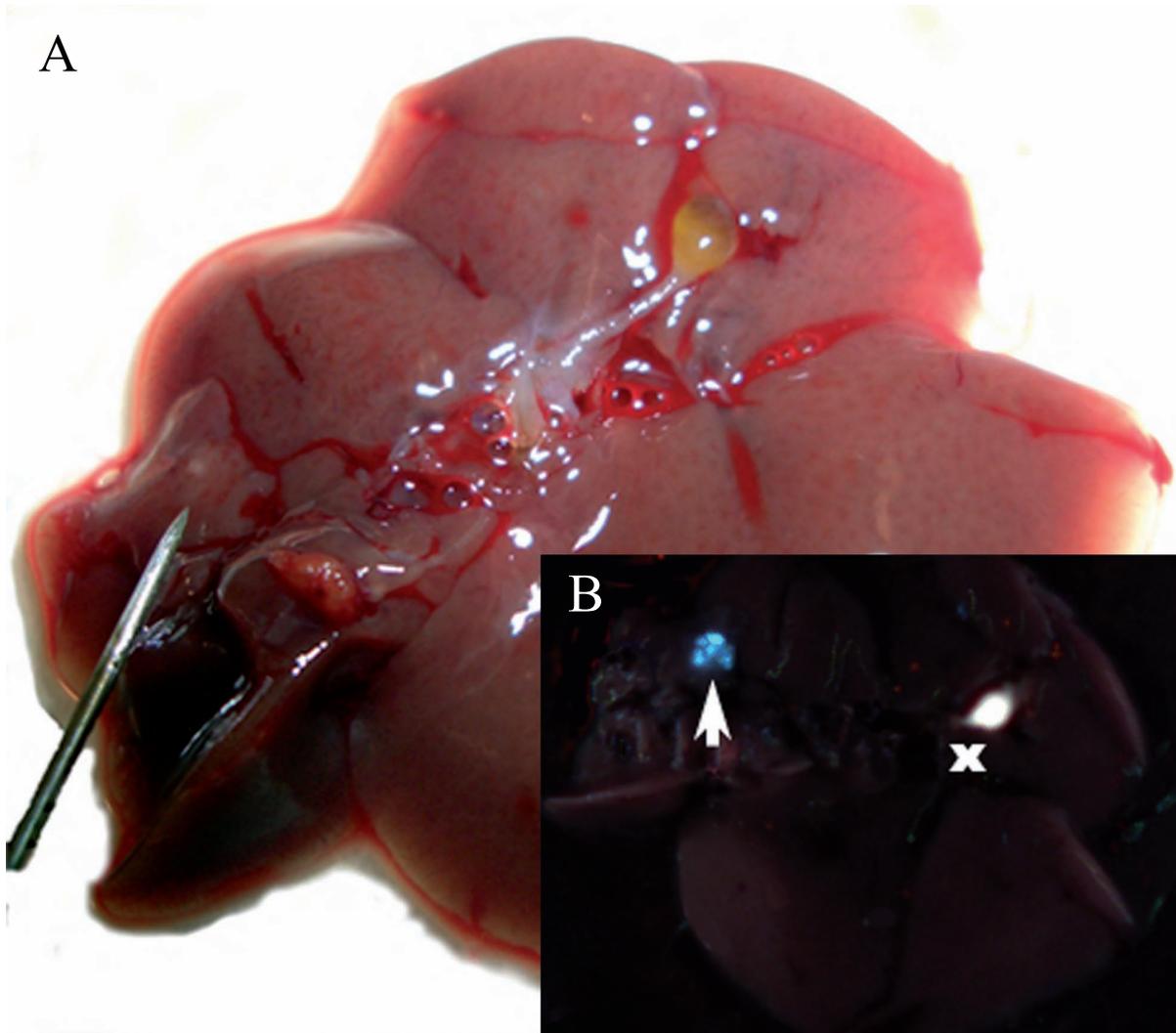


Abbildung 3.8: Lebermetastase makroskopisch und Fluoreszenz imaging. Die Abbildung zeigt eine weitere große Lebermetastase. Diese ist sowohl makroskopisch (Abb. A) als auch im Fluoreszenzbild (Abb. B) deutlich zu erkennen. Mit X markiert ist die Gallenblase

4 Diskussion

4.1 Orthotopes Modell

Der Anteil der distalen Adenokarzinome des Ösophagus hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen und beträgt heute in einigen Regionen fast 50% aller Ösophaguskarzinome. Aufgrund der fehlenden Frühsymptome des Ösophaguskarzinoms und der damit einhergehenden späten Diagnose findet sich in bis zu 70% der Fälle bereits eine Metastasierung [19, 18]. Diese bestimmt im Wesentlichen die Prognose [24]. Insofern ist es sinnvoll neue gegen die Metastasierung gerichtete Therapien zu erforschen. Orthotope Tumormodelle haben sich als außerordentlich geeignet für die Evaluation von neuen therapeutischen Strategien erwiesen, da solche Modelle die klinische Tumorerkrankung auch insbesondere in Bezug auf die Metastasierung repräsentieren [99]. Modelle mit GFP markierten Tumoren sind hierbei besonders nützlich, da sie eine einfache Möglichkeit der Identifizierung von Tumorzellen *in-vivo* als auch im histologischen Präparat ermöglichen [100, 83, 84, 78]. Solche Modelle sind für diverse Tumorentitäten bereits etabliert worden. Für das Adenokarzinom des Ösophagus gibt es bis jetzt kein metastasierendes orthotopes Modell. Ziel dieser Studie war es deshalb ein orthotopes Tiermodell für das Adenokarzinom des Ösophagus zu etablieren. Hierfür wurde eine GFP-transfizierte Adenokarzinomzelllinie „GFP-PT1590“ verwendet.

Es zeigte sich bei allen operierten Versuchstieren ein orthotopes Wachstum des Primärtumors. Hierbei kam es zum Einwachsen des Tumors in Nachbarorgane, bei allen Tieren in Magen und Ösophagus, zum Teil ins Duodenum und in die Leber. Gerade im Hinblick auf die Anwendung neuer therapeutischer Strategien ist ein sicheres Wachstum des Primärtumors wichtig. Eine detaillierte Untersuchung neuer zytotoxischer Chemotherapien oder der Modulation des Tumorstwachstums durch Antikörper erfordert eine präzise Modellierung der Tumor-Wirt-Interaktion. Orthotope Modelle bieten hierfür als einzige die optimalen Bedingungen [41]. Bei subkutaner Implantation kommt es fast nie zu einer spontanen Metastasierung [39]. Das veränderte Mikromilieu bei subkutan implantierten Tumoren führt außerdem zu deutlich anderem Wachstumsverhalten. Dies äußert sich etwa durch massive Unterschiede betreffend die Ansprechrate von zu evaluierenden Therapien im Vergleich zu orthotop implantierten Tumoren [101, 102]. Das neu etablierte orthotope Modell bietet für solche Therapieversuche einen im natürlichen Milieu wachsenden Primärtumor, an dem Prozesse wie Tumorigenese oder Infiltration und Intravasation

untersucht werden können. Dies ist der entscheidende Vorteil im Vergleich zu anderen Metastasierungsmodellen. Der entscheidende Nachteil des orthotopen Modells ist der technische und zeitliche Aufwand. Die Implantation erfordert ein hohes Maß an operativen Fertigkeiten, um eine niedrige perioperative Mortalität sowie konsistente Ergebnisse zu gewährleisten.

Eine Metastasierung in die Leber konnte in 80 Prozent der Fälle beobachtet werden. 20 Prozent der Versuchstiere zeigten Lungenmetastasen. Eine nodale Metastasierung fand sich in 80 Prozent der Fälle, im wesentlichen in coeliacale, mesenteriale und mediastinale Lymphknoten. Insgesamt konnten ähnliche Metastasierungsraten bei vielen anderen orthotopen Modellen erreicht werden. Diese hohe Metastasierungsrate und das der klinischen Erkrankung entsprechende Metastisierungsmuster, sowohl bei der lymphogenen als auch der hämatogenen Metastasierung, ermöglichen ebenfalls die Beurteilung von neuen antimetastatischen Therapien. Die intravasale Injektion von Tumorzellen bei experimentellen Tumormodellen führt zwar zu einer sicheren und besser kontrollierbaren Metastasierung, allerdings unterscheiden sich die entstehenden Metastasen zum Teil deutlich von spontan entstandenen. Sie entsprechen vielmehr einzelnen kleinen disseminierten Primärtumoren [38]. Eine noch höhere Metastasierungsrate könnte durch Selektion der metastatischen Zellen erreicht werden. Dies kann durch Anlegen neuer Zellkulturen aus den Leber- oder Lymphknotenmetastasen und anschließender Implantation der gewonnenen Zelllinie erfolgen. Auf diese Weise können nach mehrfacher Reimplantation Metastasierungsraten von 100 Prozent erreicht werden [49]. Dies könnte in Zukunft zur weiteren Optimierung des Ösophaguskarzinommodells durchgeführt werden. Die statistische Aussagekraft über Metastasierungsraten und Anwachsen des Primärtumors ist in dieser Studie aufgrund der geringen Fallzahl von fünf Tieren limitiert. Die Ergebnisse sollten in einer Studie mit größeren Fallzahlen verifiziert werden.

4.2 Magnetresonanztomographie und Fluoreszenzimaging

Die Kleintierbildgebung ist mittlerweile zu einer wesentlichen Methode in der präklinischen tierexperimentellen Forschung geworden. Sie bietet hohen Weichteilkontrast und hohe Auflösung, was zu detaillierter anatomischer Darstellung führt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit von funktioneller Bildgebung [90]. Optische Fluoreszenzbildgebung ist als Verfahren gut etabliert. Mit der Einführung von GFP als Marker für Tumorzellen *in-vivo* bietet sich eine einfache Möglichkeit Tumorzellen sowohl *in-vivo* als auch im histologischen Präparat nachzuweisen. Die Vorteile dieses Verfahrens wurden hinlänglich demonstriert [82].

4.2.1 Darstellung des Primärtumors

In dieser Studie konnten die orthotop wachsenden Primärtumore *in-vivo* mittels Magnetresonanztomographie mit hoher Sensitivität dargestellt werden. Ein Tumornachweis gelang im Einzelfall schon am vierten postoperativen Tag. Ab Tag 14 nach OP konnte in allen Tieren sicher ein orthotopes Wachstum diagnostiziert werden. Dies konnte im Rahmen der Sektion verifiziert werden. Die ersten sichtbaren Signale im Fluoreszenz-imaging traten erst an Tag 21 post operationem auf. Bekannte limitierende Faktoren bei der *in-vivo* Fluoreszenzbildgebung sind die Absorption im Gewebe und die Streuung des Lichts, die im wesentlichen an der Haut stattfindet [53]. Der Maximale Abstand zur Bauchdecke, bei dem ein Fluoreszenzsignal noch detektiert werden konnte liegt in diesem Versuch bei circa 4 mm. Die Lage des orthotopen Ösophagustumors zum Teil hinter Leber und Magen stellt ein weiteres Problem dar. Sie erschwert eine Beurteilung der tatsächlichen Tumorgöße. Das MRT bietet die Möglichkeit der freien Schichtwahl, beziehungsweise Darstellung in mehreren Raumebenen und gibt damit einen guten Eindruck der anatomischen Verhältnisse, den das Fluoreszenzimaging nicht bieten kann. Regelmäßige Messungen von Tumordurchmesser oder Tumolvolumen ermöglichen das Erstellen von individuellen Wachstumskurven. Dies ist essentiell bei der Evaluation neuer Therapiestrategien. Unter guten Bedingungen, also einem Tumor der nicht durch Organe verdeckt wird und nicht zu tief liegt, ergibt sich eine hohe Korrelation zwischen Fluoreszenzbildgebung, Magnetresonanztomographie und Sektionsbefund. Diese Korrelation konnte bereits für ein orthotopes Pankreaskarzinommodell gezeigt werden [103].

4.2.2 Darstellung der Metastasen

Bezüglich der Detektion von Metastasen *in-vivo* fehlt es sowohl dem Fluoreszenzimaging als auch der Magnetresonanztomographie an Sensitivität. Beim Fluoreszenzimaging ist dies durch die im Verhältnis zu Absorption und Streuung zu geringe Fluoreszenzintensität zu begründen. Im MRT führt die Atembewegung des Zwerchfells und damit auch der parenchymatösen Oberbauchorgane zu Phasenartefakten. Dies erschwert eine Beurteilung der Leber sowie der Lunge erheblich. Im Rahmen der Sektion wurde ein offenes Imaging durchgeführt. Hier zeigte sich das Fluoreszenzsignal der Primärtumoren deutlich intensiver und es waren einzelne Lymphknotenmetastasen sichtbar. Insgesamt bietet also das offene Imaging, beziehungsweise die Skin-Flap-Technik, eine deutliche Verbesserung der Bildqualität. Dies ist auf die fehlende Streuung des Lichts in der Haut zurück zu führen, und wurde mehrfach vorbeschrieben [53]. Die Untersuchung der einzelnen entnommenen Zielorgane mit langen Belichtungszeiten im Fluoreszenzimaginer zeigte mehrere, zum Teil makroskopisch nicht sichtbare Leber- und Lungenmetastasen. Metastatische Lymphknoten konnten mit dieser Methode ebenfalls hochspezifisch identifiziert werden. Die Untersuchung der Organe im Rahmen der Sektion ist unkompliziert und bietet damit

gerade in Studien mit vielen Versuchstieren eine sinnvolle Alternative zu konventionellen Methoden, wie beispielsweise histologischer Untersuchung.

Für die Detektion von Mikrometastasen können falls nötig verschiedene auf der GFP-Expression beruhende Techniken herangezogen werden. Mittels Fluoreszenzmikroskopie können einzelne Tumorzellen in angefertigten Gefrierschnitten nachgewiesen werden. Des Weiteren kann nach Homogenisation ganzer Organe und RNA-Extraktion ein hochspezifischer und sensitiver Nachweis von GFP-RNA mittels RT-PCR erfolgen. *In-vivo* können einzelne Tumorzellen beispielsweise mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie dargestellt werden [81]. Die Benutzung von GFP-transfizierten Zelllinien für das Tumormodell ermöglicht also die Anwendung einer Reihe von Methoden zum Nachweis von Makro- und Mikrometastasen.

4.2.3 Praktische Durchführbarkeit

Vergleicht man *in-vivo* Fluoreszenz imaging und Magnetresonanztomographie bezüglich der praktischen Durchführbarkeit, so stellt sich das Fluoreszenz imaging als die kostengünstigere, zeitlich weniger aufwändige und tierschonendere Methode heraus, da die Tiere bei einer Routineuntersuchung im Fluoreszenz imager maximal einer dreißigsekündigen CO₂-Narkose unterzogen werden. Die kurze Untersuchungszeit ermöglicht die regelmäßige Untersuchung von großen Tiermengen, beispielsweise im Rahmen von Therapieversuchen. Die Magnetresonanztomographie ist ein zeitaufwändiges Verfahren, bei dem die Tiere durch eine Narkose immobilisiert werden müssen. Selbst bei der Untersuchung von mehreren Tieren gleichzeitig in einer Spule [98] ist der Zeitaufwand immer noch deutlich höher als beim Fluoreszenz imaging.

4.3 Verbesserungsmöglichkeiten

Eine Möglichkeit um die Sensitivität der Fluoreszenzbildgebung zu erhöhen wäre die Verwendung fluoreszierender Proteine mit anderem Emissionsspektrum. Die größere Emissionswellenlänge von rotverschobenen Fluoreszenzproteinen, wie beispielsweise RFP, führt zu reduzierter Absorption im Gewebe. Damit erhöht sich die Eindringtiefe bei der *in-vivo* Untersuchung. Außerdem könnte die Hintergrundstrahlung, die vor allem auf der Fluoreszenz von Zellbestandteilen beruht und bei Wellenlängen zwischen 300 nm und 600 nm auftritt, reduziert werden. Dies führt zu einem besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnis [104]. Die auftretenden Atemartefakte im MRT könnten durch die Verwendung von atemgetriggerten Sequenzen reduziert werden. Die zusätzliche Anwendung von T1-gewichteten Sequenzen und die Verwendung von Kontrastmitteln könnte die Detektion von Metastasen erheblich steigern. Außerdem besteht die Möglichkeit tumorspezifische Kontrastmittel in Form von antikörpergekoppelten SPIOs einzusetzen. Alle aufgeführten

Änderungen am Untersuchungsprotokoll würden allerdings zu einer erheblich längeren Untersuchungszeit führen und sind damit für das Screening von großen Tiermengen ungeeignet.

4.4 Fazit

In dieser Studie konnte erstmals die erfolgreiche Etablierung eines orthotopen Tumormodells für das humane Adenokarzinom des Ösophagus gezeigt werden. Das Modell zeigt sicheres Wachstum des Primärtumors und hohe Metastasierungsraten. Um sichere Zahlen zu erhalten, sollten allerdings noch Experimente mit größeren Tiergruppen erfolgen. Das Tumormodell ist optimal geeignet für die Erprobung neuer Therapien. Die Verwendung GFP-transfizierter Zellen ermöglicht die einfache Detektion von Tumorzellen durch verschiedene Methoden sowohl *in-vivo* als auch *ex-vivo*. Die Magnetresonanztomographie bietet exakte anatomische Darstellung und korreliert mit dem Fluoreszenzimaging. Durch die Kombination beider Imagingverfahren wird eine optimale Analyse des orthotop wachsenden und metastasierenden Tumors erreicht.

A Zusammenfassung

Orthotope Tiermodelle eignen sich in besonderer Weise, um die klinische Tumorerkrankung sowohl in Bezug auf Wachstum des Primärtumors als auch in Bezug auf die Metastasierung zu repräsentieren. Die Verwendung von GFP-transfizierten Zellen ermöglicht hierbei eine Tumorzelldetektion *in-vivo* und *ex-vivo* mittels Fluoreszenzbildgebung. In dieser Studie sollen *in-vivo* Fluoreszenz imaging und Kleintier-MRT an einem orthotopen Ösophaguskarzinommodell für das Adenokarzinom etabliert und evaluiert werden. Nach dem Anzüchten von GFP-transfizierten humanen Ösophaguskarzinomzellen in der Zellkultur wurden diese zunächst in Nacktmäusen subkutan injiziert und der subkutan wachsende Tumor orthotop an den distalen abdominalen Ösophagus implantiert. Nach der Operation erfolgte für 55 Tage die tägliche Untersuchung durch *in-vivo* Fluoreszenz imaging und alle drei Tage die Untersuchung durch Magnetresonanztomographie. Nach 55 Tagen wurden die Tiere sakrifiziert und sezirt. Die entnommenen Organe wurden hierbei einzeln mittels Fluoreszenzbildgebung untersucht. Alle operierten Tiere zeigten ein orthotopes Tumorwachstum. Hierbei bietet die Magnetresonanztomographie eine ausgezeichnete anatomische Darstellung und die Möglichkeit zur akkuraten Messung des Tumordurchmessers. Metastasen konnten im MRT artefaktbedingt nicht nachgewiesen werden. Im *in-vivo* Fluoreszenz imaging ist die Darstellung des Primärtumors durch die Streuung und Absorption im Gewebe limitiert. Dies führt zu einer begrenzten Eindringtiefe. Die Überlagerung des orthotopen Tumors durch Leber und Magen verhindert zum Teil das Auftreten von Fluoreszenzsignalen. Von fünf Tieren zeigten insgesamt vier Tiere eine Metastasierung in Leber oder Lunge sowie vier Tiere eine Metastasierung in lokoregionäre Lymphknoten. Die Metastasen ließen sich *ex-vivo* durch die Untersuchung der einzelnen Organe mittels Fluoreszenz imaging detektieren. In dieser Studie konnte erstmals die Etablierung eines zuverlässig metastasierenden orthotopen Modells für das ösophageale Adenokarzinom gezeigt werden. Dieses kann zum Beispiel im Rahmen von Therapieversuchen eingesetzt werden. Durch Kombination der beiden bildgebenden Verfahren wird eine optimale Analyse des Tumorwachstums ermöglicht.

B Literaturverzeichnis

- [1] PISANI, P. ; PARKIN, D.M. ; BRAY, F. ; FERLAY, J.: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. In: *Int.J.Cancer* 83 (1999), September, Nr. 1, 18–29. PM:10449602
- [2] PISANI, P. ; PARKIN, D.M. ; BRAY, F. ; FERLAY, J.: Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer*, 83, 18-29 (1999). In: *Int.J.Cancer* 83 (1999), Dezember, Nr. 6, 870–873. PM:10602059
- [3] ROBERT-KOCH-INSTITUT: *Krebsneuerkrankungen in Deutschland*. www.RKI.de
- [4] LI, J.Y. ; ERSHOW, A.G. ; CHEN, Z.J. ; WACHOLDER, S. ; LI, G.Y. ; GUO, W. ; LI, B. ; BLOT, W.J.: A case-control study of cancer of the esophagus and gastric cardia in Linxian. In: *Int.J.Cancer* 43 (1989), Mai, Nr. 5, 755–761. PM:2714880
- [5] SZUMILO, Justyna: [Epidemiology and risk factors of the esophageal squamous cell carcinoma]. In: *Pol Merkur Lekarski* 26 (2009), Jan, Nr. 151, S. 82–85
- [6] SPECHLER, S.J. ; GOYAL, R.K.: Barrett's esophagus. In: *N.Engl.J.Med.* 315 (1986), August, Nr. 6, 362–371. PM:2874485
- [7] LAGERGREN, J. ; BERGSTROM, R. ; LINDGREN, A. ; NYREN, O.: Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. In: *N.Engl.J.Med.* 340 (1999), März, Nr. 11, 825–831. PM:10080844
- [8] BAREISS, D. ; STABENOW, R. ; MULLER, R. ; EISINGER, B. ; STEGMAIER, C. ; DAUBLER, P. ; ZEITZ, M. ; SCHERUBL, H.: Current epidemiology of carcinoma of the esophagus and cardia in Germany. In: *Dtsch.Med.Wochenschr.* 127 (2002), Juni, Nr. 25-26, 1367–1374. PM:12075496
- [9] BREWSTER, D.H. ; FRASER, L.A. ; MCKINNEY, P.A. ; BLACK, R.J.: Socioeconomic status and risk of adenocarcinoma of the oesophagus and cancer of the gastric cardia in Scotland. In: *Br.J.Cancer* 83 (2000), August, Nr. 3, 387–390. PM:10917556
- [10] HANSEN, S. ; WIIG, J.N. ; GIERCKSKY, K.E. ; TRETTLI, S.: Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992: incidence time trend variability according to morphological subtypes and organ subsites. In: *Int.J.Cancer* 71 (1997), Mai, Nr. 3, 340–344. PM:9139864

- [11] LIABEUF, A. ; FAIVRE, J.: Time trends in oesophageal cancer incidence in Cote d'Or (France), 1976-93. In: *Eur.J.Cancer Prev.* 6 (1997), Februar, Nr. 1, 24–30. PM:9161809
- [12] MOLLER, H.: Incidence of cancer of oesophagus, cardia and stomach in Denmark. In: *Eur.J.Cancer Prev.* 1 (1992), Februar, Nr. 2, 159–164. PM:1463978
- [13] POWELL, J. ; ALLUM, W.H.: Oesophageal cancer in Britain. In: *BMJ* 304 (1992), Mai, Nr. 6838, 1380–. PM:1611353
- [14] SHIBATA, Akiko ; MATSUDA, Toru ; AJIKI, Wakiko ; SOBUE, Tomotaka: Trend in incidence of adenocarcinoma of the esophagus in Japan, 1993-2001. In: *Jpn J Clin Oncol* 38 (2008), Jul, Nr. 7, 464–468. <http://dx.doi.org/10.1093/jjco/hyn064>. – DOI 10.1093/jjco/hyn064
- [15] GORE, Richard M. ; MEHTA, Uday K. ; BERLIN, Jonathan W. ; RAO, Vikram ; NEWMARK, Geraldine M.: Upper gastrointestinal tumours: diagnosis and staging. In: *Cancer Imaging* 6 (2006), 213–217. <http://dx.doi.org/10.1102/1470-7330.2006.0032>. – DOI 10.1102/1470-7330.2006.0032
- [16] SHARMA, Amita ; FIDIAS, Panos ; HAYMAN, L. A. ; LOOMIS, Susanne L. ; TABER, Katherine H. ; AQUINO, Suzanne L.: Patterns of lymphadenopathy in thoracic malignancies. In: *Radiographics* 24 (2004), Nr. 2, 419–434. <http://dx.doi.org/10.1148/rg.242035075>. – DOI 10.1148/rg.242035075
- [17] SAKATA, K.: Über die Lymphgefäße des Ösophagus und über seine regionären Lymphdrüsen mit Berücksichtigung der Verbreitung des Karzinoms. In: *Mitt.Grenzgeb.Med.Chir* (1903), S. 634–
- [18] SIEWERT, J.R. ; FINK, U. ; BECKURTS, K.T. ; RODER, J.D.: Surgery of squamous cell carcinoma of the esophagus. In: *Ann.Oncol.* 5 Suppl 3 (1994), 1–7. PM:8204524
- [19] SIEWERT, J.R. ; HOLSCHER, A.H. ; BOLLSCHWEILER, E. ; STEIN, H.J. ; FINK, U.: [Surgery of Barrett carcinoma]. In: *Chirurg* 65 (1994), Februar, Nr. 2, 102–109. PM:8162810
- [20] *Kapitel Speiseröhre.* In: SIEWERT, J.R. ; STEIN, H.J.: *Siewert Chirurgie.* 6. Springer, 1998. – ISBN 3-540-61411-7, S. 559–566
- [21] *Kapitel Ösophaguskarzinom.* In: HEROLD, Gerd (Hrsg.): *Innere Medizin.* 2007, S. 393–395
- [22] KHUSHALANI, Nikhil: Cancer of the esophagus and stomach. In: *Mayo Clin Proc* 83 (2008), Jun, Nr. 6, S. 712–722
- [23] MACKAY, S. ; STEFANO, G.: Management of oesophageal carcinoma. In: *Aust.Fam.Physician* 35 (2006), April, Nr. 4, 202–206. PM:16642235

- [24] WIJNHOFEN, B.P. ; TRAN, K.T. ; ESTERMAN, A. ; WATSON, D.I. ; TILANUS, H.W.: An evaluation of prognostic factors and tumor staging of resected carcinoma of the esophagus. In: *Ann.Surg.* 245 (2007), Mai, Nr. 5, 717–725. PM:17457164
- [25] IKEDA, M. ; NATSUGOE, S. ; UENO, S. ; BABA, M. ; AIKOU, T.: Significant host- and tumor-related factors for predicting prognosis in patients with esophageal carcinoma. In: *Ann.Surg.* 238 (2003), August, Nr. 2, 197–202. PM:12894012
- [26] SCHEUNEMANN, P. ; IZBICKI, J.R. ; PANTEL, K.: Tumorigenic potential of apparently tumor-free lymph nodes. In: *N.Engl.J.Med.* 340 (1999), Mai, Nr. 21, 1687–. PM:10348686
- [27] PANTEL, K. ; SCHLIMOK, G. ; ANGSTWURM, M. ; PASSLICK, B. ; IZBICKI, J.R. ; JOHNSON, J.P. ; RIETHMULLER, G.: Early metastasis of human solid tumours: expression of cell adhesion molecules. In: *Ciba Found.Symp.* 189 (1995), 157–170. PM:7587630
- [28] HOSCH, S. ; KRAUS, J. ; SCHEUNEMANN, P. ; IZBICKI, J.R. ; SCHNEIDER, C. ; SCHUMACHER, U. ; WITTER, K. ; SPEICHER, M.R. ; PANTEL, K.: Malignant potential and cytogenetic characteristics of occult disseminated tumor cells in esophageal cancer. In: *Cancer Res.* 60 (2000), Dezember, Nr. 24, 6836–6840. PM:11156375
- [29] FIDLER, I.J. ; POSTE, G.: The seed and soil hypothesis revisited. In: *Lancet Oncol.* 9 (2008), August, Nr. 8, 808–. PM:18672217
- [30] KHANNA, C. ; HUNTER, K.: Modeling metastasis in vivo. In: *Carcinogenesis* 26 (2005), März, Nr. 3, 513–523. PM:15358632
- [31] GONZALEZ, F.J. ; KIMURA, S.: Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. In: *Mutat.Res.* 477 (2001), Juni, Nr. 1-2, 79–87. PM:11376689
- [32] DE, Wever O. ; MAREEL, M.: Role of tissue stroma in cancer cell invasion. In: *J.Pathol.* 200 (2003), Juli, Nr. 4, 429–447. PM:12845611
- [33] SIKDER, H. ; HUSO, D.L. ; ZHANG, H. ; WANG, B. ; RYU, B. ; HWANG, S.T. ; POWELL, J.D. ; ALANI, R.M.: Disruption of Id1 reveals major differences in angiogenesis between transplanted and autochthonous tumors. In: *Cancer Cell* 4 (2003), Oktober, Nr. 4, 291–299. PM:14585356
- [34] GAROFALO, A. ; CHIRIVI, R.G. ; SCANZIANI, E. ; MAYO, J.G. ; VECCHI, A. ; GIAVAZZI, R.: Comparative study on the metastatic behavior of human tumors in nude, beige/nude/xid and severe combined immunodeficient mice. In: *Invasion Metastasis* 13 (1993), Nr. 2, 82–91. PM:8225855

- [35] ELKIN, M. ; VLODAVSKY, I.: Tail vein assay of cancer metastasis. In: *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 19 (2001), Nov, S. Unit 19.2. <http://dx.doi.org/10.1002/0471143030.cb1902s12>. – DOI 10.1002/0471143030.cb1902s12
- [36] BOUVET, M. ; TSUJI, K. ; YANG, M. ; JIANG, P. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: In vivo color-coded imaging of the interaction of colon cancer cells and splenocytes in the formation of liver metastases. In: *Cancer Res.* 66 (2006), Dezember, Nr. 23, 11293–11297. PM:17145875
- [37] HOLLERAN, Julianne L. ; MILLER, Carson J. ; EDGEHOUSE, Nancy L. ; PRETLOW, Theresa P. ; CULP, Lloyd A.: Differential experimental micrometastasis to lung, liver, and bone with lacZ-tagged CWR22R prostate carcinoma cells. In: *Clin Exp Metastasis* 19 (2002), Nr. 1, S. 17–24
- [38] YAMAMOTO, N. ; YANG, M. ; JIANG, P. ; XU, M. ; TSUCHIYA, H. ; TOMITA, K. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: Determination of clonality of metastasis by cell-specific color-coded fluorescent-protein imaging. In: *Cancer Res.* 63 (2003), November, Nr. 22, 7785–7790. PM:14633704
- [39] BIBBY, M.C.: Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. In: *Eur.J.Cancer* 40 (2004), April, Nr. 6, 852–857. PM:15120041
- [40] FIDLER, I.J.: Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. In: *Cancer Metastasis Rev.* 5 (1986), Nr. 1, 29–49. PM:2942306
- [41] KILLION, J.J. ; RADINSKY, R. ; FIDLER, I.J.: Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. In: *Cancer Metastasis Rev.* 17 (1998), Nr. 3, 279–284. PM:10352881
- [42] TAN, M.H. ; HOLYOKE, E.D. ; GOLDROSEN, M.H.: Murine colon adenocarcinoma: syngeneic orthotopic transplantation and subsequent hepatic metastases. In: *J.Natl.Cancer Inst.* 59 (1977), November, Nr. 5, 1537–1544. PM:909110
- [43] BRESALIER, R.S. ; RAPER, S.E. ; HUJANEN, E.S. ; KIM, Y.S.: A new animal model for human colon cancer metastasis. In: *Int.J.Cancer* 39 (1987), Mai, Nr. 5, 625–630. PM:3032811
- [44] MCLEMORE, T.L. ; LIU, M.C. ; BLACKER, P.C. ; GREGG, M. ; ALLEY, M.C. ; ABBOTT, B.J. ; SHOEMAKER, R.H. ; BOHLMAN, M.E. ; LITTERST, C.C. ; HUBBARD, W.C. ; .: Novel intrapulmonary model for orthotopic propagation of human lung cancers in athymic nude mice. In: *Cancer Res.* 47 (1987), Oktober, Nr. 19, 5132–5140. PM:3621199

- [45] AHLERING, T.E. ; DUBEAU, L. ; JONES, P.A.: A new in vivo model to study invasion and metastasis of human bladder carcinoma. In: *Cancer Res.* 47 (1987), Dezember, Nr. 24 Pt 1, 6660–6665. PM:3677100
- [46] YAMASHITA, T.: Manifestation of metastatic potential in human gastric cancer implanted into the stomach wall of nude mice. In: *Jpn.J.Cancer Res.* 79 (1988), August, Nr. 8, 945–951. PM:3141329
- [47] KOZLOWSKI, J.M. ; FIDLER, I.J. ; CAMPBELL, D. ; XU, Z.L. ; KAIGHN, M.E. ; HART, I.R.: Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. In: *Cancer Res.* 44 (1984), August, Nr. 8, 3522–3529. PM:6744277
- [48] DINESMAN, A. ; HAUGHEY, B. ; GATES, G.A. ; AUFDEMORTE, T. ; VON HOFF, D.D.: Development of a new in vivo model for head and neck cancer. In: *Otolaryngol.Head Neck Surg.* 103 (1990), November, Nr. 5 (Pt 1), 766–774. PM:2126099
- [49] RASHIDI, B. ; GAMAGAMI, R. ; SASSON, A. ; SUN, F.X. ; GELLER, J. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: An orthotopic mouse model of remetastasis of human colon cancer liver metastasis. In: *Clin.Cancer Res.* 6 (2000), Juni, Nr. 6, 2556–2561. PM:10873112
- [50] RASHIDI, B. ; SUN, F.X. ; JIANG, P. ; AN, Z. ; GAMAGAMI, R. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: A nude mouse model of massive liver and lymph node metastasis of human colon cancer. In: *Anticancer Res.* 20 (2000), März, Nr. 2A, 715–722. PM:10810345
- [51] SUN, F.X. ; SASSON, A.R. ; JIANG, P. ; AN, Z. ; GAMAGAMI, R. ; LI, L. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: An ultra-metastatic model of human colon cancer in nude mice. In: *Clin.Exp.Metastasis* 17 (1999), Februar, Nr. 1, 41–48. PM:10390146
- [52] HOFFMAN, R.M.: Metastatic orthotopic mouse models of lung cancer. In: *Methods Mol.Med.* 74 (2003), 457–464. PM:12415714
- [53] YANG, M. ; BARANOV, E. ; WANG, J.W. ; JIANG, P. ; WANG, X. ; SUN, F.X. ; BOUVET, M. ; MOOSSA, A.R. ; PENMAN, S. ; HOFFMAN, R.M.: Direct external imaging of nascent cancer, tumor progression, angiogenesis, and metastasis on internal organs in the fluorescent orthotopic model. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (2002), März, Nr. 6, 3824–3829. PM:11891294
- [54] LI, X. ; WANG, J. ; AN, Z. ; YANG, M. ; BARANOV, E. ; JIANG, P. ; SUN, F. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: Optically imageable metastatic model of human breast cancer. In: *Clin.Exp.Metastasis* 19 (2002), Nr. 4, 347–350. PM:12090475
- [55] YANG, M. ; JIANG, P. ; SUN, F.X. ; HASEGAWA, S. ; BARANOV, E. ; CHISHIMA, T. ; SHIMADA, H. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: A fluorescent orthotopic bone metastasis model of human prostate cancer. In: *Cancer Res.* 59 (1999), Februar, Nr. 4, 781–786. PM:10029062

- [56] FU, X. ; LE, P. ; HOFFMAN, R.M.: A metastatic orthotopic-transplant nude-mouse model of human patient breast cancer. In: *Anticancer Res.* 13 (1993), Juli, Nr. 4, 901–904. PM:8352558
- [57] FU, X. ; HERRERA, H. ; HOFFMAN, R.M.: Orthotopic growth and metastasis of human prostate carcinoma in nude mice after transplantation of histologically intact tissue. In: *Int.J.Cancer* 52 (1992), Dezember, Nr. 6, 987–990. PM:1459741
- [58] FU, X.Y. ; BESTERMAN, J.M. ; MONOSOV, A. ; HOFFMAN, R.M.: Models of human metastatic colon cancer in nude mice orthotopically constructed by using histologically intact patient specimens. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88 (1991), Oktober, Nr. 20, 9345–9349. PM:1924398
- [59] FU, X. ; HOFFMAN, R.M.: Human ovarian carcinoma metastatic models constructed in nude mice by orthotopic transplantation of histologically-intact patient specimens. In: *Anticancer Res.* 13 (1993), März, Nr. 2, 283–286. PM:8517640
- [60] FU, X. ; GUADAGNI, F. ; HOFFMAN, R.M.: A metastatic nude-mouse model of human pancreatic cancer constructed orthotopically with histologically intact patient specimens. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (1992), Juni, Nr. 12, 5645–5649. PM:1608975
- [61] FURUKAWA, T. ; KUBOTA, T. ; WATANABE, M. ; KUO, T.H. ; KITAJIMA, M. ; HOFFMAN, R.M.: Differential chemosensitivity of local and metastatic human gastric cancer after orthotopic transplantation of histologically intact tumor tissue in nude mice. In: *Int.J.Cancer* 54 (1993), Mai, Nr. 3, 397–401. PM:8509214
- [62] FU, X.Y. ; THEODORESCU, D. ; KERBEL, R.S. ; HOFFMAN, R.M.: Extensive multi-organ metastasis following orthotopic onplantation of histologically-intact human bladder carcinoma tissue in nude mice. In: *Int.J.Cancer* 49 (1991), Dezember, Nr. 6, 938–939. PM:1959996
- [63] DENG, Y.J. ; RONG, T.H. ; ZHOU, J. ; SONG, H.F. ; WANG, Q.J. ; HUANG, L.X. ; CHEN, S.P. ; LI, Y.Q. ; XIA, J.C.: [Establishment of a human esophageal carcinoma transplantation model with MUC1 high expression in nude mice]. In: *Ai.Zheng.* 26 (2007), Juli, Nr. 7, 693–697. PM:17626742
- [64] ESTENSEN, R.D. ; ANDERSON, W.R. ; GALBRAITH, A.R. ; HARTLE, D.E. ; JORDAN, M.M. ; ONDREY, F.G. ; WATTENBERG, L.W.: A method of producing carcinoma in upper aerodigestive tree and esophagus of the Syrian golden hamster using wounding and instillation of N-methylnitrosourea. In: *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 16 (2007), August, Nr. 8, 1644–1650. PM:17684140
- [65] HORI, T. ; YAMASHITA, Y. ; OHIRA, M. ; MATSUMURA, Y. ; MUGURUMA, K. ; HIRAKAWA, K.: A novel orthotopic implantation model of human esophageal

- carcinoma in nude rats: CD44H mediates cancer cell invasion in vitro and in vivo. In: *Int.J.Cancer* 92 (2001), Mai, Nr. 4, 489–496. PM:11304682
- [66] FURIHATA, T. ; SAKAI, T. ; KAWAMATA, H. ; OMOTEHARA, F. ; SHINAGAWA, Y. ; IMURA, J. ; UEDA, Y. ; KUBOTA, K. ; FUJIMORI, T.: A new in vivo model for studying invasion and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. In: *Int.J.Oncol.* 19 (2001), November, Nr. 5, 903–907. PM:11604986
- [67] SZENTPALI, K. ; SZELL, M. ; PASZT, A. ; WOLFARD, A. ; DOBOZY, A. ; NEMETH, I. ; TISZLAVICZ, L. ; IVAN, L. ; BOROS, M.: Simultaneous adeno- and squamous cell carcinoma with different phenotypic profiles in a rat model of chronic gastroesophageal reflux. In: *Dis.Esophagus.* 20 (2007), Nr. 4, 305–310. PM:17617879
- [68] ZHANG, T. ; ZHANG, F. ; HAN, Y. ; GU, Z. ; ZHOU, Y. ; CHENG, Q. ; ZHU, Y. ; ZHANG, C. ; WANG, Y.: A rat surgical model of esophageal metaplasia and adenocarcinoma-induced by mixed reflux of gastric acid and duodenal contents. In: *Dig.Dis.Sci.* 52 (2007), November, Nr. 11, 3202–3208. PM:17393326
- [69] SHIMOMURA, O. ; JOHNSON, F.H. ; SAIGA, Y.: Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. In: *J.Cell Comp Physiol* 59 (1962), Juni, 223–239. PM:13911999
- [70] MORISE, H. ; SHIMOMURA, O. ; JOHNSON, F.H. ; WINANT, J.: Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. In: *Biochemistry* 13 (1974), Juni, Nr. 12, 2656–2662. PM:4151620
- [71] PRASHER, D.C. ; ECKENRODE, V.K. ; WARD, W.W. ; PRENDERGAST, F.G. ; CORMIER, M.J.: Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. In: *Gene* 111 (1992), Februar, Nr. 2, 229–233. PM:1347277
- [72] CHALFIE, M. ; TU, Y. ; EUSKIRCHEN, G. ; WARD, W.W. ; PRASHER, D.C.: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. In: *Science* 263 (1994), Februar, Nr. 5148, 802–805. PM:8303295
- [73] TSIEN, R.Y.: The green fluorescent protein. In: *Annu.Rev.Biochem.* 67 (1998), 509–544. PM:9759496
- [74] CORMACK, B.P. ; VALDIVIA, R.H. ; FALKOW, S.: FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). In: *Gene* 173 (1996), Nr. 1 Spec No, 33–38. PM:8707053
- [75] CHISHIMA, T. ; MIYAGI, Y. ; LI, L. ; TAN, Y. ; BARANOV, E. ; YANG, M. ; SHIMADA, H. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: Use of histoculture and green fluorescent protein to visualize tumor cell host interaction. In: *In Vitro Cell Dev.Biol.Anim* 33 (1997), November, Nr. 10, 745–747. PM:9466677

- [76] CHISHIMA, T. ; MIYAGI, Y. ; WANG, X. ; BARANOV, E. ; TAN, Y. ; SHIMADA, H. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: Metastatic patterns of lung cancer visualized live and in process by green fluorescence protein expression. In: *Clin.Exp.Metastasis* 15 (1997), September, Nr. 5, 547–552. PM:9247257
- [77] CHISHIMA, T. ; MIYAGI, Y. ; WANG, X. ; TAN, Y. ; SHIMADA, H. ; MOOSSA, A. ; HOFFMAN, R.M.: Visualization of the metastatic process by green fluorescent protein expression. In: *Anticancer Res.* 17 (1997), Juli, Nr. 4A, 2377–2384. PM: 9252650
- [78] HOFFMAN, R.M.: In vivo imaging of metastatic cancer with fluorescent proteins. In: *Cell Death.Differ.* 9 (2002), August, Nr. 8, 786–789. PM:12107821
- [79] YANG, M. ; REYNOSO, J. ; JIANG, P. ; LI, L. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: Transgenic nude mouse with ubiquitous green fluorescent protein expression as a host for human tumors. In: *Cancer Res.* 64 (2004), Dezember, Nr. 23, 8651–8656. PM:15574773
- [80] YANG, M. ; LI, L. ; JIANG, P. ; MOOSSA, A.R. ; PENMAN, S. ; HOFFMAN, R.M.: Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100 (2003), November, Nr. 24, 14259–14262. PM:14614130
- [81] YANG, M. ; JIANG, P. ; HOFFMAN, R.M.: Whole-body subcellular multicolor imaging of tumor-host interaction and drug response in real time. In: *Cancer Res.* 67 (2007), Juni, Nr. 11, 5195–5200. PM:17545599
- [82] HOFFMAN, R.M.: Recent advances on in vivo imaging with fluorescent proteins. In: *Methods Cell Biol.* 85 (2008), 485–495. PM:18155476
- [83] HOFFMAN, R.M.: Orthotopic metastatic (MetaMouse) models for discovery and development of novel chemotherapy. In: *Methods Mol.Med.* 111 (2005), 297–322. PM:15911987
- [84] HOFFMAN, R.M.: Whole-body fluorescence imaging with green fluorescence protein. In: *Methods Mol.Biol.* 183 (2002), 135–148. PM:12136749
- [85] BOTTOMLEY, P.A.: In vivo tumor discrimination in a rat by proton nuclear magnetic resonance imaging. In: *Cancer Res.* 39 (1979), Februar, Nr. 2 Pt 1, 468–470. PM:761219
- [86] HANSEN, G. ; CROOKS, L.E. ; DAVIS, P. ; DE, Groot J. ; HERFKENS, R. ; MARGULIS, A.R. ; GOODING, C. ; KAUFMAN, L. ; HOENNINGER, J. ; ARAKAWA, M. ; MCREE, R. ; WATTS, J.: In vivo imaging of the rat anatomy with nuclear magnetic resonance. In: *Radiology* 136 (1980), September, Nr. 3, 695–700. PM:7403549

- [87] LUCIANI, A. ; PAROUCHEV, A. ; SMIRNOV, P. ; BRAGA, G. ; WILHELM, C. ; GAZEAU, F. ; BOUDECHICHE, L. ; L'HERMINE-COULOMB, A. ; DAGHER, I. ; FRANCO, D. ; RAHMOUNI, A. ; HADCHOUEL, M. ; WEBER, A. ; CLEMENT, O.: In vivo imaging of transplanted hepatocytes with a 1.5-T clinical MRI system—initial experience in mice. In: *Eur.Radiol.* 18 (2008), Januar, Nr. 1, 59–69. PM:17917732
- [88] POMPER, M.G. ; LEE, J.S.: Small animal imaging in drug development. In: *Curr.Pharm.Des* 11 (2005), Nr. 25, 3247–3272. PM:16250853
- [89] LEWIS, J.S. ; ACHILEFU, S. ; GARBOW, J.R. ; LAFOREST, R. ; WELCH, M.J.: Small animal imaging. current technology and perspectives for oncological imaging. In: *Eur.J.Cancer* 38 (2002), November, Nr. 16, 2173–2188. PM:12387842
- [90] PINKERNELLE, J.G. ; STELTER, L. ; HAMM, B. ; TEICHGRABER, U.: [Small animal MRI: clinical MRI as an interface to basic biomedical research]. In: *Rofo* 180 (2008), Juni, Nr. 6, 505–513. PM:18504664
- [91] MANDEVILLE, J.B. ; JENKINS, B.G. ; KOSOFSKY, B.E. ; MOSKOWITZ, M.A. ; ROSEN, B.R. ; MAROTA, J.J.: Regional sensitivity and coupling of BOLD and CBV changes during stimulation of rat brain. In: *Magn Reson.Med.* 45 (2001), März, Nr. 3, 443–447. PM:11241702
- [92] STROH, A. ; FABER, C. ; NEUBERGER, T. ; LORENZ, P. ; SIELAND, K. ; JAKOB, P.M. ; WEBB, A. ; PILGRIMM, H. ; SCHOBER, R. ; POHL, E.E. ; ZIMMER, C.: In vivo detection limits of magnetically labeled embryonic stem cells in the rat brain using high-field (17.6 T) magnetic resonance imaging. In: *Neuroimage.* 24 (2005), Februar, Nr. 3, 635–645. PM:15652299
- [93] BERNSTEIN, M.A. ; HUSTON, III J. ; WARD, H.A.: Imaging artifacts at 3.0T. In: *J.Magn Reson.Imaging* 24 (2006), Oktober, Nr. 4, 735–746. PM:16958057
- [94] SCHMIDT, G.P. ; WINTERSPERGER, B. ; GRASER, A. ; BAUR-MELNYK, A. ; REISER, M.F. ; SCHOENBERG, S.O.: High-resolution whole-body magnetic resonance imaging applications at 1.5 and 3 Tesla: a comparative study. In: *Invest Radiol.* 42 (2007), Juni, Nr. 6, 449–459. PM:17507818
- [95] WOLF, R.F. ; LAM, K.H. ; MOOYAART, E.L. ; BLEICHRODT, R.P. ; NIEUWENHUIS, P. ; SCHAKENRAAD, J.M.: Magnetic resonance imaging using a clinical whole body system: an introduction to a useful technique in small animal experiments. In: *Lab Anim* 26 (1992), Juli, Nr. 3, 222–227. PM:1501439
- [96] ITTRICH, H. ; LANGE, C. ; TOGEL, F. ; ZANDER, A.R. ; DAHNKE, H. ; WESTENFELDER, C. ; ADAM, G. ; NOLTE-ERNSTING, C.: In vivo magnetic resonance imaging of iron oxide-labeled, arterially-injected mesenchymal stem cells in kidneys of rats with acute ischemic kidney injury: detection and monitoring at 3T. In: *J.Magn Reson.Imaging* 25 (2007), Juni, Nr. 6, 1179–1191. PM:17520738

- [97] PELDSCHUS, K. ; KAUL, M. ; LANGE, C. ; NOLTE-ERNSTING, C. ; ADAM, G. ; ITTRICH, H.: [Magnetic resonance imaging of single SPIO labeled mesenchymal stem cells at 3 Tesla]. In: *Rofo* 179 (2007), May, Nr. 5, 473–479. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-927370>. – DOI 10.1055/s-2006-927370
- [98] BOCK, N.A. ; KONYER, N.B. ; HENKELMAN, R.M.: Multiple-mouse MRI. In: *Magn Reson.Med.* 49 (2003), Januar, Nr. 1, 158–167. PM:12509832
- [99] TALMADGE, J.E. ; SINGH, R.K. ; FIDLER, I.J. ; RAZ, A.: Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. In: *Am.J.Pathol.* 170 (2007), März, Nr. 3, 793–804. PM:17322365
- [100] HOFFMAN, R.M.: Green fluorescent protein imaging of tumor cells in mice. In: *Lab Anim (NY)* 31 (2002), April, Nr. 4, 34–41. PM:11927960
- [101] WILMANN, C. ; FAN, D. ; O'BRIAN, C. A. ; BUCANA, C. D. ; FIDLER, I. J.: Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. In: *Int J Cancer* 52 (1992), Aug, Nr. 1, S. 98–104
- [102] KUO, T. H. ; KUBOTA, T. ; WATANABE, M. ; FURUKAWA, T. ; KASE, S. ; TANINO, H. ; SAIKAWA, Y. ; ISHIBIKI, K. ; KITAJIMA, M. ; HOFFMAN, R. M.: Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. In: *Anticancer Res* 13 (1993), Nr. 3, S. 627–630
- [103] BOUVET, M. ; SPERNYAK, J. ; KATZ, M.H. ; MAZURCHUK, R.V. ; TAKIMOTO, S. ; BERNACKI, R. ; RUSTUM, Y.M. ; MOOSSA, A.R. ; HOFFMAN, R.M.: High correlation of whole-body red fluorescent protein imaging and magnetic resonance imaging on an orthotopic model of pancreatic cancer. In: *Cancer Res.* 65 (2005), November, Nr. 21, 9829–9833. PM:16267005
- [104] CORREIA, JJ ; DETRICH, W.: *Biophysical Tools for Biologists, Volume Two (Methods in Cell Biology)*. Bd. 89. 1. Academic Press, 2008. – 41 S. – ISBN 978-0123725219

C Danksagungen

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Stephanie Gros für die außerordentlich engagierte und herzliche Betreuung. Während meiner Arbeit hatte ich durchgehend die Möglichkeit meine eigenen Ideen einzubringen und zu verwirklichen, neue Methoden zu lernen und die ersten Schritte auf wissenschaftlichem Gebiet zu machen. Und ich bedanke mich für eine schöne Zeit mit OP-Tagen, Labortagen, MR-Wochenenden und Truthahnabenden.

Ich danke auch meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Tim Strate für das freundliche Überlassen des Promotionsthemas. Herrn Prof. Jakob Robert Izbicki und Herrn Prof. Gerhard Adam danke ich für die Möglichkeit die Doktorarbeit in ihren Kliniken durchzuführen.

Herrn Dr. Kersten Peldschus danke ich für die faszinierenden Einblicke in die Welt der MRT-Physik, für wissenschaftliche (auch nicht themenbezogene) Diskussionen, für die Demonstration des besten Beachclubs Ostdeutschlands und nicht zuletzt auch für die vielen gemeinsam am MRT verbrachten unterhaltsamen Stunden.

Frau Dr. Tatiana Kalinina und Frau Antje Heineke danke ich für die Unterstützung bei den in-vitro Versuchen, das Vermitteln von labortechnischen Grundfertigkeiten, für Kritik und wissenschaftlichen Diskurs.

Frau Dr. Nina Kurschat danke ich für die Korrektur meiner Arbeit und die konstruktiven Vorschläge.

Zuletzt danke ich Freunden und Familie die während Promotion und Studium immer ein offenes Ohr hatten und in „Krisensituationen“ mit aufmunternden Worten und Ratschlägen zur Seite standen.

D Curriculum Vitae

Entfällt aus Datenschutzgründen

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Thorsten Dohrmann