

**Surrogatmarker
des Glukosestoffwechsels
und der DNS-Synthese
zur Response-Prädiktion
maligner Lymphome**

Barbara Numberger

München 2012

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

**Surrogatmarker
des Glukosestoffwechsels
und der DNS-Synthese
zur Response-Prädiktion
maligner Lymphome**

Barbara Maria Numberger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät der Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ. - Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. - Prof. Dr. A. K. Buck,
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

2. Univ. - Prof. Dr. M. Schwaiger

Die Dissertation wurde am 15.02.12 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät der Medizin am 21.11.12 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Non-Hodgkin-Lymphome	9
1.2 Beurteilung des therapeutischen Ansprechens	10
1.3 Nuklearmedizinische Grundlagen	12
1.4 Positronen-Emissions-Tomographie	16
2 Problemstellung und Zielsetzung	21
3 Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Zellen	23
3.1.2 Kulturmedium und Zusätze	23
3.1.3 Radioaktive Substanzen	23
3.1.4 Medikamente	24
3.1.5 Chemikalien	24
3.1.6 Geräte	24
3.1.7 Gebrauchsmaterial	24
3.1.8 Software	24
3.1.9 Versuchstiere	24
3.2 In vitro Methoden	24
3.2.1 Zellkultivierung	25
3.2.1.1 Auftauen von Zellen	25
3.2.1.2 Passagieren von Zellen	26
3.2.1.3 Einfrieren der Zellen	26

3.2.2	Vorbereitung der Versuche	27
3.2.2.1	Zellzahlbestimmung	27
3.2.2.2	Viabilitätstest mit Trypanblau	27
3.2.2.3	Herstellung der Doxorubicinlösung	27
3.2.3	Durchführung des Zytotoxizitätstests mittels MTT-Assay .	29
3.2.3.1	Herstellung des Ansatzes	29
3.2.3.2	Vorbereitung zur Messung mit dem Farbstoff MTT	29
3.2.3.3	Messung des Ansatzes	30
3.2.4	Vitalitätsprüfung und Proliferationsbestimmung mit Trypan- blau	30
3.2.5	Durchführung der Aufnahmeversuche	30
3.2.5.1	^{18}F FDG-Aufnahmeversuch	30
3.2.5.2	^{18}F FLT-Aufnahmeversuch	31
3.2.5.3	Konzentrationsabhängige Hemmung der Tracer- aufnahme	31
3.2.6	Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie - Zellzyklusanalyse	32
3.2.6.1	Herstellung des Ansatzes	32
3.2.6.2	Fixierung der Proben	33
3.2.6.3	Vorbereitung zur Messung und Messung der Proben	33
3.3	In vivo Methoden	34
3.3.1	Xenotransplantation der humanen Lymphomzellen	34
3.3.2	Tumorvolumenmessung	34
3.3.3	Therapievorgehen	34
3.3.4	Bildgebung der Versuchstiere in der Kleintier-PET	35
3.3.5	Messung der ^{18}F FDG- und ^{18}F FLT-Aufnahme mittels Bildbearbeitung und Bildanalyse	35
3.3.6	Organentnahme und Organverwertung der Versuchstiere .	36
3.3.7	Histologie und Immunhistochemie	36
3.4	Auswertung der Versuchsergebnisse	37
3.4.1	Berechnungen und statistische Auswertung	37
3.4.2	Berechnungen und graphische Darstellung	40
4	Ergebnisse	41
4.1	In vitro Studie	41

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	5
4.1.1 Zytotoxizitätstest mit dem MTT-Assay	42
4.1.2 Vitalitätsprüfung und Proliferationsbestimmung mit Trypan- blau	44
4.1.3 In vitro ¹⁸ F FDG- und ¹⁸ F FLT-Aufnahme der Lymphom- zellen	45
4.1.4 Zellzyklusanalyse	49
4.2 In vivo Studie	53
4.2.1 Änderung des Tumolvolumens nach Doxorubicintherapie .	53
4.2.2 Beurteilung des frühen Therapieansprechens mit ¹⁸ F FLT- und ¹⁸ F FDG-PET	55
4.2.3 Organentnahme und Organverwertung der Versuchstiere	58
4.2.4 Histologie und Immunhistochemie der entnommenen Xe- notransplantate	60
5 Diskussion	65
5.1 In vitro Studie	67
5.2 Tierexperimentelle Studie	77
5.3 Kritische Betrachtung	84
6 Zusammenfassung	87
7 Tabellen	91
Abbildungsverzeichnis	95
Literaturverzeichnis	99
Danksagung	118

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
Ara-C	Arabinofuranosylcytosin
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	arbitrary unit
Bq	Becquerel
c	Konzentration
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin-dependent kinase
CHOP	Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Oncovin® (Vincristin), Prednison
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute
CT	Computertomographie
d	Tag
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dTDP	Desoxythymidindiphosphat
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
FACS	fluorescence activated cell sorting
FDG	2'-Fluoro-2'-Desoxyglukose
FKS	fetales Kälberserum
FLT	3'-Fluoro-3'-Desoxythymidin
G1	gap 1
G2	gap 2

h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	human immunodeficiency virus
HWZ	Halbwertszeit
KG	Körpergewicht
M	Mitose
MRT	Magnetresonanztomographie
mSv	Millisievert
mTOR	mammalian target of Rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MTX	Methotrexat
n	Fallzahl
NaCl	Natriumchlorid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NSCLC	non small cell lung cancer
O	Sauerstoff
p	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PET	Positronenemissionstomographie
PI	propidium iodide
r	Korrelationskoeffizient
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
s	Sekunde
S	Synthese
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	standard deviation
SE	standard error
S-Phase	Synthese-Phase
SUV	standardized uptake value
TBR	tumor-background-ratio
TMR	tumor-muscle-ratio
TK	Thymidinkinase
U	Umdrehungen
V	Volumen

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Non-Hodgkin-Lymphome

Aktuell erkranken jährlich ca. 13000 Menschen in Deutschland an einem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), wobei etwa gleich viele Frauen und Männer betroffen sind. Die 5-Jahres-Überlebensraten in Deutschland liegen bei 56 bis 69 % für Frauen und 45 bis 62 % für Männer; die 5-Jahres-Prävalenz lag 2006 bei ca. 20700 (Frauen) bzw. 22000 (Männer). [97]

Die NHL werden gemäß Weltgesundheitsorganisation in indolente, aggressive und sehr aggressive Lymphome eingeteilt. Insbesondere hochmaligne NHL weisen eine rasche Progredienz auf und sind ohne Therapie durch eine kurze Überlebenszeit gekennzeichnet.

Momentan ist die Standardbehandlung für das fortgeschrittene Non-Hodgkin-Lymphom die Chemotherapie. Patienten mit hochgradigem NHL erhalten ein Chemotherapieschema, bestehend aus Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin (Doxorubicin), Vincristin (Oncovin®) und Prednison (CHOP) oder CHOP-ähnliche Behandlungsregimes, die meist ein gutes Therapieansprechen zeigen und langfristige Überlebensraten ermöglichen. Indolente NHL einschließlich der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) werden üblicherweise mit CHOP-ähnlichen oder anderen Kombinationen, die u.a. Chlorambucil, Fludarabin und Bendamustin enthalten, behandelt. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Kombination von Chemotherapie mit dem chimärischen CD-20-Antikörper Rituximab das Gesamtüberleben verbessern kann [104]. Dennoch gibt es eine beachtliche Zahl an

Patienten ohne ausreichendes Therapieansprechen, mit therapierefraktärer Erkrankung oder frühem Rückfall. Für diese Patienten könnten aggressivere, dosissteigernde Behandlungsstrategien oder neuartige Therapien von Vorteil sein. Diese zielgerichteten Therapien werden gerade in klinischen Studien getestet und enthalten Medikamente wie mTOR-Inhibitoren (RAD001), CDK-Inhibitoren (Flavopiridol), Proteasom-Inhibitoren (Bortezomib), Aurorakinase Inhibitoren (MK-1195) oder Immunmodulatoren (Thalidomid, Lenalidomid). Aufgrund dieser großen Auswahl an Behandlungsstrategien ist eine individuelle Beurteilung des frühen Therapieansprechens notwendig, um den klinischen Nutzen der angewandten Therapie abschätzen zu können.

1.2 Beurteilung des therapeutischen Ansprechens

Bisher war die nicht-invasive Abschätzung des Therapieansprechens im Bereich der klinischen Onkologie das Einsatzgebiet morphologischer Bildgebung wie Computertomographie (CT), Ultraschall oder Magnetresonanztomografie (MRT) [57] [17]. Jedoch verändern maligne Läsionen oft erst mit einer Latenz von mehreren Wochen nach Behandlungsbeginn ihre Größe. In diesem Fall wird eine Anpassung der Behandlung bei Therapieresistenz verzögert und es können sowohl unnötige Nebenwirkungen als auch Kosten entstehen. Therapeutische Effekte von zytostatischen Medikamenten, die nicht direkt zu einer Verkleinerung der Tumormasse führen, können durch morphologische Bildgebung nicht sichtbar gemacht werden [56]. Anhand von CT-Aufnahmen können Größe und Lokalisation des Restgewebes beschrieben werden, eine Unterscheidung zwischen vitalem Tumor und Nekrose oder Narbengewebe ist jedoch nicht möglich [103][17][56].

Im Gegensatz dazu ermöglicht es die Positronenemissionstomographie (PET), funktionelle und metabolische Veränderungen innerhalb der Tumorzelle sichtbar zu machen und dadurch das Therapieansprechen auf Chemotherapie frühzeitig zu visualisieren.

Die PET mit dem radioaktiv markierten Glukoseanalogon ^{18}F 2'-Fluoro-2'-Desoxyglukose (^{18}F FDG) zeigt eine hohe Sensitivität und Spezifität bei Patienten mit Morbus Hodgkin und bei den meisten Subtypen der indolenten (z.B.

Mantelzell-Lymphom) und aggressiven (z.B. follikuläres Lymphom, diffus großzelliges B-Zell-Lymphom) Non-Hodgkin Lymphome und ist der alleinigen CT überlegen [103][84][122][10]. Dabei konnte insbesondere in aggressiven Lymphomen in der PET eine verstärkte Aufnahme von ^{18}F FDG beobachtet werden [101][98].

Besser als mit konventioneller Bildgebung wie der CT konnte gezeigt werden, dass eine anhaltende ^{18}F FDG-Aufnahme im Lymphom nach Chemotherapie ein starker Prädiktor für ein frühes Rezidiv oder Therapieversagen ist [57][56][17]. Somit wurde die Überlegenheit der ^{18}F FDG-PET gegenüber der CT hinsichtlich der Vorhersage des Therapieansprechens dargestellt [17][57][56].

Die PET ist auch der $^{67}\text{Gallium}$ -Szintigraphie im prätherapeutischen Staging und Re-Staging von diversen Subtypen des Lymphoms, insbesondere der follikulären Varianten, bei dem die Sensitivität von $^{67}\text{Gallium}$ niedrig ist, überlegen [21][37][64][126]. Zudem ist die ^{18}F -PET schneller durchzuführen als die $^{67}\text{Gallium}$ -Szintigraphie, da sie nur ca. 2 Stunden Zeit ab der Injektion des radioaktiven Tracers benötigt.

Demzufolge wurde die ^{18}F FDG-PET vorgeschlagen, um das Tumorgrading zu beurteilen und um Patienten, die einer intensivierten Behandlung bedürfen, zu identifizieren. Weiterhin wurde die ^{18}F FDG-PET als Standard für die Bildgebung des Therapieansprechens von Lymphomen eingeführt und standardisierte Response-Kriterien wurden kürzlich veröffentlicht [17].

Die Kombination aus PET und CT ist in letzter Zeit der wichtigste Fortschritt in der nicht-invasiven Beurteilung von Lymphomen und ersetzt die alleinstehende PET.

PET-CT kombiniert ein Vollring PET-Detektorsystem mit einem Multidetektor Spiral-CT, sodass die PET-Aufnahme sofort nach bzw. vor der Computertomographie (CT) angefertigt werden kann. Die Bilder werden im Anschluss überlagert, um die metabolischen Veränderungen genau lokalisieren zu können. PET/CT gewährleistet eine sensitivere und spezifischere Bildgebung als jede einzelne Modalität [1][100][121][68][92][93].

Die zunehmende Verfügbarkeit der PET-CT führte zu einer weitverbreiteten Nutzung der ^{18}F -PET-CT bei Diagnostik und Staging maligner Erkrankungen [56][57][17].

1.3 Nuklearmedizinische Grundlagen

Die für die Positronenemissionstomographie benötigten Radionuklide, zum Beispiel ^{18}F , emittieren Positronen, die in unmittelbarer Umgebung mit je einem Elektron zusammenstoßen. Positron und Elektron werden dabei beide vernichtet (Annihilation) und durch die freiwerdende Energie entstehen zwei Photonen, die in die entgegengesetzte Richtung (180°) abgestrahlt werden. Das ringförmig um den Patienten angeordnete PET-Aufnahmeggerät erfasst diese durch den Zerfall von ^{18}F entstehenden Photonen und registriert die zeitliche und räumliche Verteilung der Photonen. Dadurch können die Regionen mit erhöhtem Glukosestoffwechsel (z.B. Tumore, Entzündung) bei ^{18}F FDG bzw. mit erhöhter Proliferation (z.B. Tumore) bei ^{18}F 3'-Fluoro-3'-Desoxythymidin (^{18}F FLT) millimetergenau im Körper lokalisiert werden und eine Serie von Schnittbildern angefertigt werden. Die PET ist also eine nicht-invasive, 3-dimensionale, metabolische Bildgebungstechnik, die ein Radiopharmakon benutzt, um einen spezifischen physiologischen Prozess semiquantitativ zu messen (z.B. Glukosemetabolismus, Aminosäuremetabolismus, DNS-Synthese). [103]

Positive PET-Befunde werden definiert als lokalisierte oder diffuse gesteigerte Traceraufnahme gegenüber dem umgebenden Hintergrund an einem Ort, an welchem diese mit normaler Anatomie und Physiologie nicht vereinbar ist [103]. Der standardisierte Aufnahme Wert (standardized uptake value, SUV) zeigt das Verhältnis der Tracerkonzentration des Tumors zur durchschnittlichen Tracerkonzentration im gesamten Körper an. Dieser SUV wird oft als ein semiquantitatives Maß des Grades der Traceraufnahme benutzt und hilft in der Beurteilung von PET-Aufnahmen [58][56][57]. Da Tumorzellen wegen des erhöhten Stoffwechsels viel Glukose bzw. wegen der erhöhten Zellproliferation viel Thymidin verbrauchen und folglich ^{18}F FDG bzw. ^{18}F FLT anreichern, kann die Aktivität eines Tumors durch den SUV-Wert semiquantitativ beschrieben werden.

Die für die PET verwendeten radioaktiv markierten Stoffe (Tracer) sind den ursprünglichen Metaboliten des Körpers sehr ähnlich. Um der Anreicherung des radioaktiv markierten Stoffes in einer Körperregion die richtige Bedeutung zuschreiben zu können, muss sowohl der Metabolismus des ursprünglichen Stoffes als auch die Verstoffwechslung und die Pharmakokinetik des Tracers bekannt sein.

Das Fluor-Isotop ^{18}F wird im Zyklotron hergestellt, indem das schwere Sauerstoff-Isotop ^{18}O mit Protonen beschossen wird. In dieser Kernreaktion wird ein kleiner Teil des ^{18}O -Sauerstoffs unter Aufnahme je eines Protons und der Abgabe eines Neutrons in das radioaktive Fluor-Isotop ^{18}F umgewandelt. Die Halbwertszeit (HWZ) beträgt 109,8 Minuten.

Das erste Radionukleosid, das der Beurteilung der Therapieresponse diente, war das radioaktiv markierte Glukoseanalogon ^{18}F 2'-Fluoro-2'-Desoxyglukose ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FO}_5$) [96], bei dem eine Hydroxylgruppe der D-Glukose durch das Radionuklid ^{18}F ersetzt wurde (siehe Abb. 1.1).

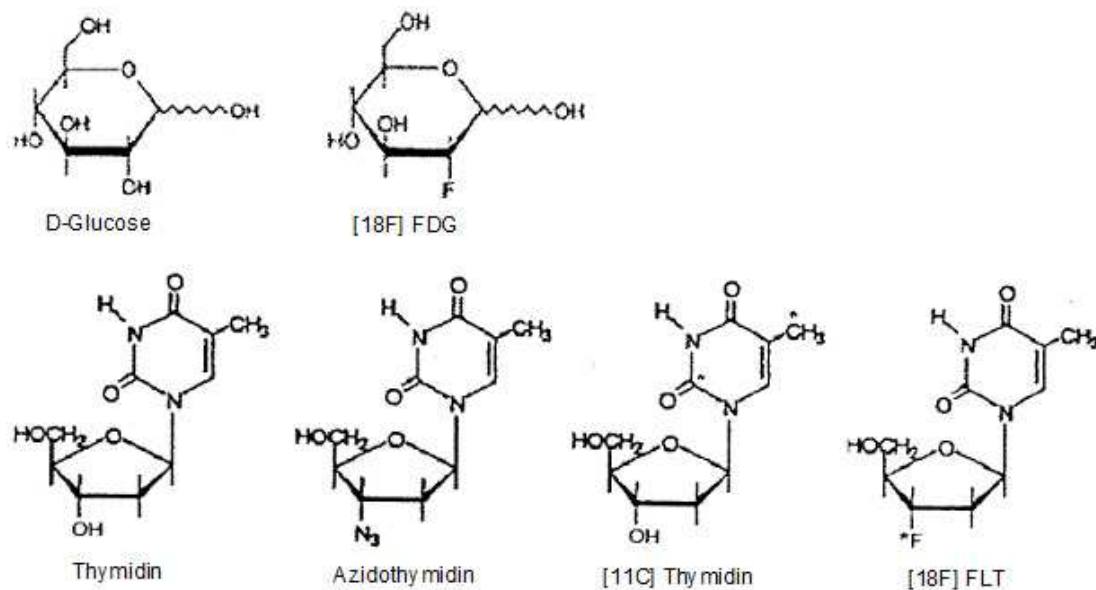


Abbildung 1.1: Molekulare Struktur der Metaboliten D-Glukose und Thymidin, deren zugehörige Radiotracer ^{18}F FDG, ^{11}C Thymidin und ^{18}F FLT und des Pharmakons Azidothymidin.

^{18}F FDG wird wie physiologische Glukose passiv mittels Glukosetransporter (v.a.

Glut-1 bei Tumoren und Hirngewebe) in die Zellen aufgenommen und durch das Enzym Hexokinase phosphoryliert. Da das ^{18}F FDG-6-Phosphat anschließend nicht weiter metabolisiert wird und der Umkehrweg, die Dephosphorylierung, in der Regel nur sehr langsam abläuft, wird es in der Zelle retiniert und erreicht ein Gleichgewicht ca. 60 Minuten nach Injektion [103]. Physiologischerweise reichert sich FDG in Niere, ableitende Harnwege und wegen des hohen Glukosebedarfs v.a. im Gehirn an, wo es problemlos die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Nach dem Zerfall von ^{18}F in ^{18}O entsteht Glukose mit einem schweren Sauerstoffkern (ein mit 0,2% natürlich vorkommendes Isotop des Sauerstoffs), die auf konventioneller Weise verstoffwechselt wird.

Die weite Verbreitung des Glukoseanalogons ^{18}F FDG bei Krebsdiagnose und Staging liegt in seiner hohen Sensitivität hinsichtlich des Nachweises maligner Erkrankungen begründet [54][57][17][56]. FDG ist jedoch nicht tumorspezifisch, sondern reichert sich auch in entzündetem Gewebe, Tuberkulosegranulome, Abszessen oder Sarkoidoseherden an [110][66]. Die unspezifische Anreicherung in entzündlichem Gewebe [99][61][110] liegt in der höheren metabolischen als proliferativen Aktivität der ^{18}F FDG begründet. Da Proliferation für vitales Tumorgewebe jedoch spezifischer ist als der Anstieg des Glukosemetabolismus als Ausdruck metabolischer Aktivität [128], scheinen bildgebende Veränderungen der Proliferation geeigneter für die Abschätzung des Therapieansprechens zu sein. Um die Spezifität maligner Läsionen zu erhöhen, sind demzufolge andere Tracer notwendig, die den FDG-Einsatz ergänzen. Für die Beurteilung der proliferativen Aktivität in malignen Tumoren könnten Messungen des Tumorwachstums und der DNA-Synthese von Nutzen sein. Eine Alternative wäre die Positronenemissionstomographie mit ^{18}F FLT. ^{18}F FLT reichert sich in proliferierendem Gewebe und malignen Tumoren an und kann somit unter Verwendung der PET proliferative Aktivität visualisieren [107].

Die Entdeckung des Proliferationsmarkers ^{18}F FLT hat seine Ursprünge in der Forschung an antiretroviralen Medikamenten gegen HIV. Thymidinanaloga wie Azidothymidin (siehe 1.1) oder Alovudin (FLT) als nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren wurden entwickelt, um die Transkription von viraler RNS in DNS zu hemmen [63][94][6][57]. Es zeigte sich, dass FLT zwar in therapeutischer Dosierung bei AIDS-Patienten zu viele Nebenwirkungen hat [35], doch zur

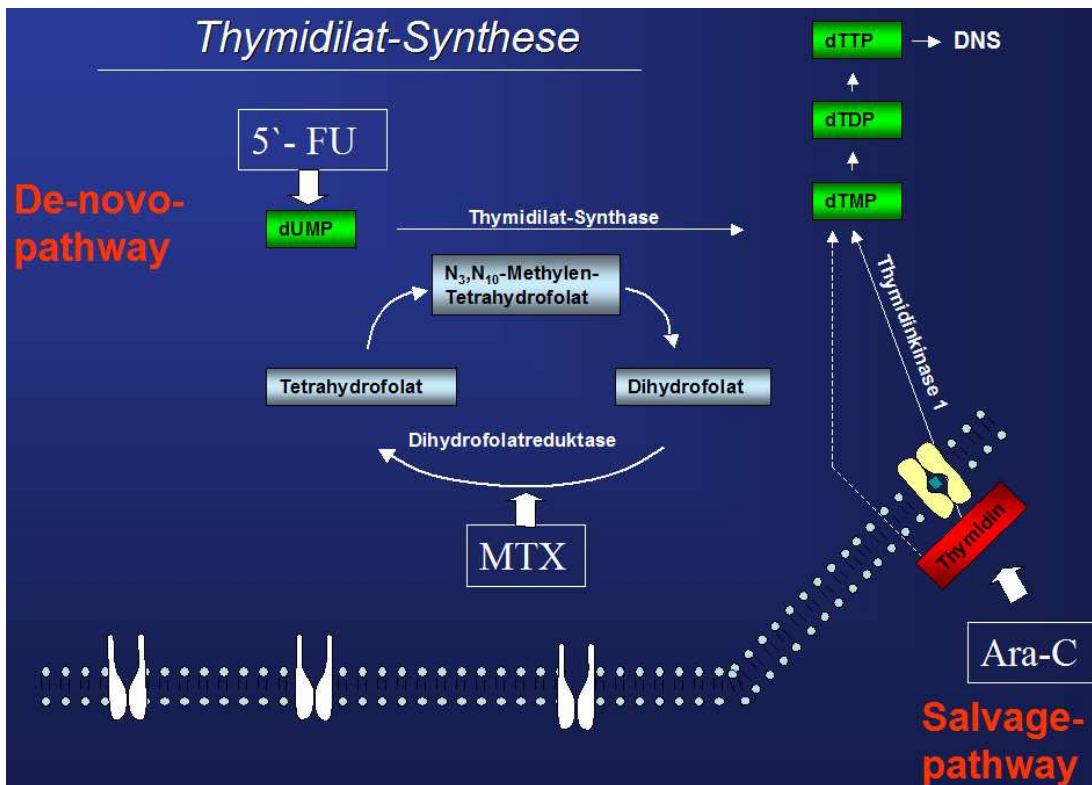


Abbildung 1.2: Synthesewege der Thymidinmetaboliten. Das durch den salvage pathway aus Thymin gewonnene Nukleotid Thymidin wird wie das ^{18}F 3'-Fluoro-3'-Desoxythymidin (^{18}F FLT) von der Thymidinkinase 1 unter ATP-Verbrauch zu Thymidinmonophosphat (TMP) phosphoryliert. Im de-novo-pathway katalysiert die Thymidylatsynthase aus Uridin-5'-monophosphat (UMP) unter Beteiligung der Tetrahydrofolsäure Thymidinmonophosphat (TMP). Gehemmt werden kann dieser Syntheseweg durch das Pyrimidinanalogon 5-Fluoro-Uracil (5'-FU) oder dem Dihydrofolatreduktasehemmer Methotrexat (MTX), wohingegen der salvage-pathway durch den Nukleotidreduktasehemmer 1-Beta-D-Arabinofuranosylcytosin (Ara-C) inhibiert werden kann. Thymidinmonophosphat (TMP) wird zu Thymidindiphosphat (TDP) und dieses zu Thymidintriphosphat (TTP) phosphoryliert, das als einziges in die DNS eingebaut werden kann.

Diagnostik als radioaktiv markiertes ^{18}F FLT ohne wesentliches Nebenwirkungsrisiko verwendet werden kann [76][35]. Sowohl die Ganzkörperstrahlenbelastung (5 bis 10 mSv) als auch die Strahlenbelastung der einzelnen Organe entspricht in etwa der anderer nuklearmedizinischer Untersuchungen [114].

Der Tracer ^{18}F FLT wurde als eine metabolisch stabile Alternative zum instabilen, nativen Molekül ^{11}C Thymidin entwickelt [75][109]. ^{11}C Thymidin war ein

Tracer, der erfolgreich für die Beurteilung des Therapieansprechens eingesetzt wurde [133]. Jedoch ist die klinische Einsetzbarkeit durch die kurze Halbwertszeit von ^{11}C (20 Minuten) und dem schnellen Metabolismus in vivo stark begrenzt. Durch seine Abbauprodukte entsteht außerdem eine hohe Hintergrundaktivität [118][129][108][107]. Das Thymidinanalogon ^{18}F FLT hat dagegen eine längere Halbwertszeit und eine bessere Stabilität in vivo, was die klinische Anwendung erleichtert [107]. Der Aufwand zur Herstellung von ^{18}F FLT entspricht inzwischen in etwa dem für ^{18}F FDG. Die Molekülstrukturen sind in Abb. 1.1 dargestellt.

Desoxyribonukleotide werden zur Replikation und Reparatur von DNS benötigt. Zu den bereitstellenden Stoffwechselwegen zählen die de-novo-Synthese und der salvage pathway. Bei dem salvage pathway wird die zelluläre Aufnahme von Thymidin und Thymidinanaloga wie ^{18}F FLT aus dem Blut durch membranständige Nukleosidtransporter vermittelt [42]. Nach nachfolgender Phosphorylierung des ^{18}F FLT-Monophosphats durch das zytosolische, ATP-abhängige Enzym Thymidinkinase 1 (TK1) [63][6][83] kann die Zelle weder verlassen [63][94][6] noch weiter metabolisiert werden. Zusätzlich verhindert das eingebaute Fluor an der 3'-Position der Ribose den eigenen Abbau durch die Thymidinphosphorylase. Es akkumuliert in der Zelle [6][94]. Ein weiterer Effekt des eingefügten Fluors ist der Kettenabbruch bei der DNS-Synthese aus Nukleotiden in der Synthese (S)-Phase der Replikation [74][94]. Da allerdings nur vernachlässigbar wenig FLT (0,2 %) [63][94][6] in die DNS eingebaut wird, weist FLT die Zellproliferation nicht direkt nach [74][94].

Zur bildlichen Darstellung der Zusammenhänge bei der Metabolisierung der Thymidinmetaboliten und deren pharmakologische Beeinflussbarkeit siehe Abb. 1.2.

1.4 Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie ermöglicht eine nicht-invasive funktionelle Beurteilung des Tumors und hat in den vergangenen Jahren stark an Bedeutung gewonnen.

Allerdings weist die PET auch einige Limitationen auf, die den weiteren Krankheitsverlauf negativ beeinflussen können.

Dazu gehören insbesondere die falsch positiven Ergebnisse der ^{18}F FDG PET. Falsch-positive Ergebnisse entstehen, weil ^{18}F FDG bei jedem Vorgang aufgenommen wird, der mit vermehrter Glykolyse einhergeht wie z.B. Entzündungen, Infektionen, granulomatöse Erkrankungen wie Sarkoidose [19][50], oder braunes Fettgewebe [136]. Abnorme FDG Aufnahme ist zudem mit der Thymushyperplasie bei Patienten mit Morbus Hodgkin assoziiert [9]. Das trifft auch auf die Hyperplasie des Knochenmarks und der Milz bei Patienten, die nach Chemotherapie granulocyte-colony stimulating factor (g-CSF) erhalten haben, zu [116][117]. Bei 21,3% aller positiven PET-Aufnahmen (n=134) von Patienten mit malignem Lymphom wurde eine nicht-tumorale Aufnahme beobachtet [15]. Da die ^{18}F FDG-PET in Zeiten von Immunotherapie wie z.B. mit dem CD20-Antikörper Rituximab, und dosisintensivierten Therapieschemata wie z.B. 2- statt 3-wöchiger Therapieintervalle, aufgrund falsch positiver Ergebnisse stark an prädiktiven und prognostischen Wert verloren hat, wurden bereits Empfehlungen für eine Biopsie bei PET-positiven Läsionen ausgesprochen [80][44].

Um die Häufigkeit falsch-positiver Ergebnisse zu vermindern, wird empfohlen, die PET frühestens 3 Wochen nach Chemotherapie und vorzugsweise 8 bis 12 Wochen nach Strahlentherapie durchzuführen [57]. Diese Empfehlungen beinhalten auch eine standardisierte Definition für PET-positives Restgewebe. Definitionsgemäß werden Restmassen von mindestens 2 cm im größten diagonalen Durchmesser mit einer FDG Aktivität, die optisch höher ist als die von mediastinalen bluthaltigen Strukturen, als PET positiv bezeichnet, wohingegen Restgewebe von 1,1 bis 1,9 cm nur dann als PET positiv gilt, wenn ihre Aktivität die des Umgebungshintergrunds überschreitet [103]. Unter Gebrauch dieser Definition konnte ein hoher prädiktiver Wert bei der posttherapeutischen Evaluation von Restgewebe sowohl beim Morbus Hodgkin als auch beim aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom erzielt werden [57].

Zum anderen gehören zu den Limitationen der PET die Gründe für falsch negative Ergebnisse, zu denen u.a. die technischen Schwierigkeiten zählen. Falsch negative Ergebnisse können von Läsionen kommen, die die Auflösung des Tomographen unterschreiten; in der Regel liegt die Grenze bei 5 bis 10 mm. Wegen unterschiedlicher Herstellung, Rekonstruktion und Analyse von Bildern können Serienaufnahmen vom gleichen Patienten bei verschiedenen PET-Aufnahmegäräten

unterschiedliche Ergebnisse liefern [105].

Nicht zu vernachlässigen ist außerdem der Zeitpunkt der PET-Bildgebung. Wird zu früh nach Tracerinjektion gemessen, kann der Tumor verfehlt werden und es kommt zu einem falsch negativen Ergebnis. Es konnte gezeigt werden, dass die PET-Bildgebung 2 Stunden nach FDG Injektion den Nachweis verschiedener Tumortypen inklusive des Lymphoms verbessert [65].

Ein weiterer Störfaktor ist die Hyperglykämie, wodurch die FDG-Aufnahme in das Tumorgewebe reduziert sein kann [103].

Außerdem ist es möglich, dass die physiologisch gesteigerte FDG-Aufnahme in Gehirn, Herz und Verdauungstrakt die Detektierbarkeit von Tumoren reduziert [103].

Ein weiterer wichtiger Punkt, der die PET limitiert, ist die große Variabilität der ^{18}F FDG-Aufnahme zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen maligner Lymphome. Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom oder Mantelzelllymphom wurden zu 100 % durch FDG-PET erkannt, Patienten mit Morbus Hodgkin oder follikulärem Lymphom zu 98 % [30]. Patienten mit Marginalzonen-Lymphom und mit peripherem T-Zell-Lymphom hingegen konnten nur zu 67 % bzw. 40 % erfasst werden [30]. Insbesondere bei den extranodalen Marginalzonen-Lymphomen wird kaum FDG aufgenommen [49]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die PET im Vergleich zur CT in Patienten mit kleinzelligem Lymphom 58 % weniger veränderte Lymphknoten ausfindig machen konnte, wohingegen es beim follikulären Non-Hodgkin-Lymphom 40 % mehr erfassen konnte [55]. Aufgrund der geringeren Anreicherung von ^{18}F FDG ist die PET zur Diagnostik indolenter Lymphome schlechter geeignet als zur Diagnostik aggressiver Lymphome [101][98].

Schließlich gibt es noch weitere Einschränkungen der Indikationsstellung zur PET. So kann es zwar fokale oder multifokale Knochenmarksinfiltration mit einer negativen Beckenkammbiopsie erkennen, wie nachträglich mit Histopathologie und MRT bestätigt werden konnte [14][79][87]. Jedoch ist die PET allein darin nicht verlässlich, insbesondere nicht bei begrenztem Ausmaß (z.B. 10-20 % des Knochenmarks) [87][30]. Die geschätzte PET Sensitivität bei NHL und Morbus Hodgkin liegt hier bei 43 % bzw. 76 % [87]. Die Patienten, bei denen die PET

eine ausgedehnte diffuse Knochenmarksinfiltration anzeigt, haben meist auch eine positive Knochenmarksbiopsie. Außerdem kann eine diffus erhöhte Aufnahme im Knochenmark bei der PET auch durch reaktive myeloide Hyperplasie verursacht sein, weshalb eine solche Anreicherung mit Vorsicht interpretiert werden muss [14]. PET positive Knochenmarksbefunde sollten durch Biopsie oder MRT bestätigt werden, bevor sie zu einer Änderung der Behandlungsstrategie führen. Die PET kann die Knochenmarksbiopsie im Lymphomstaging also noch nicht ersetzen. [103]

Aufgrund bedeutender Limitationen der PET, insbesondere der falsch-positiven Resultate, die unter Verwendung des Tracers ^{18}F FDG auftreten, erscheint es sinnvoll, einen Tracer zu etablieren, der eine spezifischere Anreicherung aufweist.

Kapitel 2

Problemstellung und Zielsetzung

Da durch herkömmliche Diagnostik ein Ansprechen der Chemotherapie bei malignen Tumoren erst nach mehreren Wochen beurteilbar ist, in denen im Falle eines Nichtansprechens der Behandlung unnötige Nebenwirkungen und Kosten entstehen, ist es notwendig, eine Diagnostik zu etablieren, mit welcher der Effekt einer eingeleiteten Therapie schneller beurteilt werden kann. Dies gilt insbesondere für Non-Hodgkin-Lymphome, bei denen die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten und Therapieerfolge oft unzureichend sind.

Da sich zudem mit konventioneller Diagnostik wie der CT schlecht zwischen vitalem Tumorgewebe und Fibrose unterscheiden lässt [119], hat die PET als nicht-invasives funktionelles Bildgebungsverfahren in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen.

Der für die Erstdiagnostik und das Staging maligner Erkrankungen weithin verwendete Tracer, das Glukoseanalogon ^{18}F FDG, erzeugt jedoch durch die unspezifische Anreicherung in Arealen, in denen vermehrt Glykolyse erfolgt, wie z.B. Entzündungsherde, häufig falsch positive Ergebnisse [99][61].

Da im Hinblick auf die Visualisierung eines Malignoms und der Wirksamkeitsbeurteilung eines Chemotherapeutikums das Ausmaß der proliferativen Aktivität spezifischer ist als die Intensität des Glukosemetabolismus [128], ist es sinnvoll, einen Proliferationsmarker für die bildgebenden Verfahren zu etablieren.

Der Proliferationsmarker ^{18}F FLT weist hierfür mehrere günstige Eigenschaften auf.

Ziel dieser Arbeit ist ein Vergleich der beiden Tracer ^{18}F FDG und ^{18}F FLT in Bezug auf die Erfassung des frühen Therapieansprechens beim aggressiven Non-Hodgkin-Lymphom unter Berücksichtigung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell.

Insbesondere sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern die Traceraufnahme mit Veränderungen des Tumolvolumens, des Zellzyklus und der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen in Zusammenhang steht.

Im Falle einer Überlegenheit des ^{18}F FLT gegenüber der ^{18}F FDG und einer Dosis-Wirkungs-Beziehung kann diese Dissertation einen Beitrag zur Etablierung des Tracers ^{18}F FLT in der Klinik leisten.

Kapitel 3

Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Die verwendeten Tumorzelllinien SUDHL-4 und EHEB wachsen in Suspension. Humane diffus-großzellige B-Zell-Lymphom-Zelllinie SUDHL-4: DSMZ (Nummer ACC 495), Braunschweig, Deutschland.

Humane chronische B-Zell-Leukämie-Zelllinie EHEB: DSMZ (Nummer ACC 67), Western General Hospital, Edinburgh, UK.

3.1.2 Kulturmedium und Zusätze

Als Kulturmedium für die beiden Zelllinien wurden folgende Substanzen verwendet: - RPMI 1640 - 10 % fetales Kälberserum (FCS) - 1 % Penicillin/Streptomycin - 1 % L-Glutamin

3.1.3 Radioaktive Substanzen

^{18}F FDG: Nuklearmedizinische Klinik, Technische Universität München

^{18}F FLT: Nuklearmedizinische Klinik, Technische Universität München

^{18}F HWZ 109,71 min

Die Produktion von ^{18}F FDG erfolgte in einer standardisierten Technik, die von der bei Hamacher et al. [43] beschriebenen Technik abgewandelt ist. Die Synthese von ^{18}F FLT erfolgte wie bei Grierson J. R. et al. [41] beschrieben. Beide Tracer

wurden von der Radiopharmacy Unit der TU München hergestellt.

3.1.4 Medikamente

Doxorubicin: Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland

3.1.5 Chemikalien

Siehe Kapitel 7, Tabelle 7.1

3.1.6 Geräte

Siehe Kapitel 7, Tabelle 7.2

3.1.7 Gebrauchsmaterial

Siehe Kapitel 7, Tabelle 7.3

3.1.8 Software

Siehe Kapitel 7, Tabelle 7.4

3.1.9 Versuchstiere

Für die Tierversuche wurden sechs bis acht Wochen alte weibliche Mäuse mit dem kombinierten Immundefekt CB-17 SCID von der Firma Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland, aus spezifisch pathogenfreier Zucht verwendet. In Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz wurden die Mäuse in Käfigen mit jeweils höchstens 5 Mäusen in einem Tierstall mit 26°C und 50 bis 60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Zur Ernährung wurde ein Spezialfutter für immundefiziente Versuchstiere (Zuchtdiät), Altromin 1314, und Leitungswasser ad libitum in Flaschen bereitgestellt.

3.2 In vitro Methoden

Bei allen in vitro Methoden wird eine ausreichende Beschriftung der Kryoröhrchen, Testplatten, Eppendorf-Gefäße o.ä. vorausgesetzt. Zudem wurde für alle Versu-

chen die Zelllinie SUDHL-4 verwendet. Der Zytotoxizitätstest mit MTT wurde zusätzlich mit der Zelllinie EHEB durchgeführt.

3.2.1 Zellkultivierung

Folgende Beschreibungen treffen auf beide Tumorzelllinien zu. Auf Unterschiede wird im entsprechenden Abschnitt hingewiesen. Die gesamte Zellkultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dabei wurde eine Laminair-Flow-Arbeitsbank verwendet. Außerhalb der Versuchsdurchführungen befanden sich die Zellkulturen in einem Brutschrank mit 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit und 37°C.

Als Kulturmedium wurde RPMI 1640, versetzt mit 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin, verwendet (s. 3.1.2), das im Wasserbad bei 37°C vorgewärmt wurde.

Das im Handel erhältliche 100 %ige FKS in 500ml Flaschen wurde dazu im 37°C Wärmebad aufgetaut und anschließend eine dreiviertel Stunde im 56°C Wärmebad inkubiert, um das für die Zellen unzutragliche Komplement zu inaktivieren. Sämtliche Zusätze zum Kulturmedium wurden aliquotiert, um bei Bedarf nur jeweils eine Probe davon im 37°C Wärmebad aufzutauen.

3.2.1.1 Auftauen von Zellen

Die verwendeten Tumorzelllinien befanden sich zur Langzeitaufbewahrung in 1,8 ml Kryoröhrchen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff.

Um die Zellen aufzutauen, wurde zuerst 18 ml vom erwärmten Kulturmedium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Kryoröhrchen wurde solange in der Faust erwärmt bis sich nur noch ein Eisklumpen von etwa ein Millimeter Durchmesser darin befand. Der Inhalt wurde sodann zügig in das im Zentrifugenröhrchen befindliche Kulturmedium pipettiert und resuspendiert, bevor dies bei 1500 U/min 5 Minuten lang bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Zügiges Vorgehen ist wegen des bei dem Auftauen zytotoxischen DMSO in der Einfrierlösung angebracht.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 8 ml Kulturmedium aufgenommen und in einer 25 cm² Kulturflasche mit Filter überführt.

Die Flasche wurde stehend im oben beschriebenen Brutschrank inkubiert und nach einem Tag mit Kulturmedium 1:1 verdünnt und in eine 75 cm² Kulturfla-

sche überführt.

3.2.1.2 Passagieren von Zellen

Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte nach Bedarf, d.h. wenn der Farbumschlag des Mediums von orange nach gelb saure Metabolite anzeigte. Dies war bei den SUDHL-4 Zellen zweimal wöchentlich der Fall. Dazwischen, nach zwei Tagen, wurde einmal wöchentlich eine 1:2 Verdünnung der Zellsuspension mit Kulturmedium durchgeführt. Die Zellen wurden somit dreimal wöchentlich passagiert. Bei der Tumorzelllinie EHEB war dies zweimal wöchentlich der Fall.

Vor dem Mediumwechsel wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer ermittelt (siehe 3.2.2.1). Dann wurden die gezählten Suspensionszellen in einem Zentrifugenröhrchen bei 1500 U/min 5 Minuten lang abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit soviel frischem Medium wieder aufgenommen, dass anschließend eine Konzentration von 0,5 Millionen/ml vorhanden war. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Volumen} = \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{\text{Zellkonzentration}}$$

Die Zellkulturflaschen mit der Zellsuspension wurden danach in den Brutschrank gestellt. Dabei ist zu beachten, dass sich nur soviel Volumen in den Flaschen befindet, dass der Filter trocken bleibt.

3.2.1.3 Einfrieren der Zellen

Die dauerhafte Lagerung der Tumorzellen erfolgte in einem Tank mit flüssigem Stickstoff.

Dazu wurde zuerst eine Einfrierlösung aus 10 % DMSO und 90 % FKS hergestellt und auf Eis gelegt. Die Zellzahl wurde gemäß 3.2.2.1 mit der Neubauer Zählkammer bestimmt, die Zellen bei 1500 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde gelöst, indem das Zentrifugenröhrchen etwa 3-mal über den Gitterboden in der Arbeitsbank gezogen wurde. Zügig wurde nun das Zellpellet mit soviel Einfrierlösung resuspendiert, dass anschließend eine Konzentration von 10 Millionen/ml vorhanden war. Sogleich wurde das Gemisch auf die vorbereiteten 1,8 ml Kryoröhrchen (ca. 10 Millionen Zellen pro Röhrchen) verteilt und 1 Tag bis 2 Wochen lang im -70°C Gefrier-

schränk gelagert, bevor die Proben dann in einen Tank mit flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.2.2 Vorbereitung der Versuche

3.2.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde bei jedem Versuch mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurde von der zuvor gut resuspendierten Zellsuspension in der Kulturflasche 20 μl entnommen und in einem well einer 96er Wellplatte mit 80 μl Trypanblaulösung vermischt. Die Zählkammer wurde mit diesem Gemisch befüllt, die vitalen Zellen aller 4 Quadranten ausgezählt und die Zellzahl pro ml nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times 5 \times 10000}{4}$$

3.2.2.2 Viabilitätstest mit Trypanblau

In gleicher Weise wie die Zellzahlbestimmung, aber mit einem Gemisch aus 100 μl Zellsuspension und 100 μl Trypanblaulösung, wurde in der Neubauer Zählkammer eine Viabilitätsprüfung vorgenommen.

Denn Zellen mit intakter Stoffwechselfunktion färben sich nicht an, weil sie den Farbstoff nicht aufnehmen können. Bei toten Zellen hingegen führt der Zellmembrandefekt dazu, dass der Farbstoff innerhalb weniger Minuten in die Zelle eindringen kann; sie lassen sich infolgedessen blau anfärben.

Nur wenn nach 3 Minuten Inkubation mit Trypanblau genug vitale Zellen gezählt wurden (wenigstens 80 %), waren die Zellen viabel und konnten für Versuche verwendet werden.

3.2.2.3 Herstellung der Doxorubicinlösung

Bei fast allen Versuchen wie den Zellproliferationstests, der Aufnahmeversuche, der Zellzyklusbestimmungen und den in vivo Versuchen wurde das Chemotherapeutikum Doxorubicin eingesetzt. Die Konzentration der in der Apotheke des Klinikums rechts der Isar erhältlichen Stammlösung Doxorubicin betrug 2 mg/ml. Daraus wurde unter sterilen Bedingungen eine Verdünnungsreihe mit Medium wie folgt durchgeführt:

Von der Stammlösung Doxorubicin wurden 50 μl zu 9,95 ml Medium in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben (Konzentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Nach gutem Resuspendieren dieser 1:100 Verdünnung wurde davon durch eine 1:5 Verdünnung eine Lösung mit einer Konzentration von 2000 ng/ml hergestellt. Auch wurde von der 1:100 Verdünnung eine Lösung mit der Konzentration 800 ng/ml gemischt. Als drittes wurde von der ersten Lösung eine 1:10 Verdünnung mit der daraus resultierenden Konzentration von 1000 ng/ml vorgenommen. Davon wurde durch eine 1:2,5 Verdünnung eine Lösung mit der Konzentration 400 ng/ml und durch eine 1:5 Verdünnung eine Lösung mit der Konzentration 200 ng/ml hergestellt. Zudem wurde von der 1000 ng/ml konzentrierten Lösung durch eine 1:10 Verdünnung eine Lösung mit der Konzentration 100 ng/ml erreicht. Von dieser Suspension wurden schrittweise durch 1:2 Verdünnungen Lösungen mit Konzentrationen von 50 ng/ml, 25 ng/ml und 12,5 ng/ml hergestellt.

Ein Gefäß wurde mit purem Medium befüllt (0 ng/ml).

Zu beachten gilt dass die Suspensionen vor Fortsetzung der Verdünnungsreihe stets gut resuspendiert werden müssen. Als Gefäße wurden neben den oben genannten 15 ml Zentrifugenröhrchen 6er Wellplatten verwendet. Da bei jedem der folgenden Versuche zu der Doxorubicinlösung noch genauso viel Zelllösung zugegeben wurde, wurden die oben genannten Konzentrationen jeweils auf die Hälfte reduziert (1:2 Verdünnung).

Für die aufgelisteten Versuche wurden folgende Doxorubicinkonzentrationen hergestellt:

Zytotoxizitätstest mit MTT: 800, 200, 100, 50, 25, 12,5 und 0 (Negativkontrolle) ng/ml

Vitalitätstest mit Trypanblau: 1600, 400, 50, 25 und 0 (Negativkontrolle) ng/ml

FDG-Aufnahmeversuch in vitro: 800, 200, 100, 50, 25, 12,5 und 0 (Negativkontrolle) ng/ml

FLT- Aufnahmeversuch in vitro: 800, 200, 100, 50, 25 und 0 (Negativkontrolle) ng/ml

Zellzyklusbestimmungen: 800, 400, 200, 50, 12,5 und 0 (Negativkontrolle) ng/ml

Die Konzentrationen stimmen nicht mit denen im Ergebnisteil (siehe 4 erwähnten) überein, da alle Konzentrationen im well durch Zugabe der Zellsuspension noch auf die Hälfte reduziert werden.

3.2.3 Durchführung des Zytotoxizitätstests mittels MTT-Assay

3.2.3.1 Herstellung des Ansatzes

Auch die Herstellung des Ansatzes für diesen Viabilitätstest erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Dazu wurde gemäß 3.2.1.2 nach Mediumwechsel eine Zellsuspension (ca. 8 ml) mit einer Konzentration von 0,5 Millionen Zellen/ml hergestellt. Dieser Versuch wurde sowohl mit der Zelllinie SUDHL-4 als auch mit der Zelllinie EHEB durchgeführt.

Es erfolgte bei 7 verschiedenen konzentrierten Doxorubicinlösungen (siehe 3.2.2.3) je eine 3fach Bestimmung auf drei 96er Wellplatten, deshalb wurden $7 \times 3 \times 3 = 63$ wells dreier 96er Wellplatten mit je 100 μl , entsprechend 50 000 Zellen, dieser Zellsuspension mit einer Mehrfachpipette befüllt. Anschließend wurde in je drei dieser wells mit der Mehrfachpipette 100 μl der entsprechend konzentrierten Doxorubicinlösung pipettiert.

Für den Leerwert wurden außerdem je Wellplatte 3 wells mit je 200 μl Medium befüllt. Wegen der Verdunstung wurde zudem um die befüllten wells herum jedes well mit 200 μl Medium befüllt. Durch die 1:2 Verdünnung der Doxorubicinlösungen mit Zellsuspension (je 100 μl) im well verringerten sich die in 3.2.2.3 beschriebenen Doxorubicinkonzentrationen auf die Hälfte.

Die drei 96er Wellplatten wurden anschließend im 37°C Brutschrank 24 bzw. 48 bzw. 72 Stunden lang inkubiert.

3.2.3.2 Vorbereitung zur Messung mit dem Farbstoff MTT

Nach 24 Stunden wurde eine Wellplatte aus dem Wärmeschrank entnommen. Unter der Laminair-Flow-Arbeitsbank wurde in jedes tags zuvor befüllte well 40 μl des gelben, wasserlöslichen Farbstoffes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), ein Tetrazoliumsalz, pipettiert.

Anschließend wurde die Testplatte wieder für 1,5 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Ebenso wurde mit den übrigen Wellplatten 48 bzw. 72 Stunden nach Ansatz des Versuchs verfahren.

3.2.3.3 Messung des Ansatzes

Zur Messung des Ansatzes wurde nach 1,5 Stunden die mit MTT versetzte 96er Wellplatte aus dem Wärmeschrank zur besseren Verteilung des Farbstoffes vorsichtig geschüttelt und dann in einem ELISA 96-well plate reader gemessen. Dazu wurde das Photometer auf 570 nm eingestellt. Es wurde 1,5 Stunden, 2,5 Stunden und 3,5 Stunden nach Farbstoffzusatz gemessen; dazwischen wurde die Testplatte stets im Wärmeschrank inkubiert. Ebenso wurde mit den Ansätzen für die 48 und 72 Stunden Messung nach entsprechender Zeit verfahren. Die Messung erfolgte mit dem Programm KC Junior.

3.2.4 Vitalitätsprüfung und Proliferationsbestimmung mit Trypanblau

Zur Durchführung dieses Viabilitätstests wurden Doxorubicinlösungen gemäß 3.2.2.3 in den Konzentrationen 1600, 400, 50, 25 und 0 ng/ml hergestellt. In je drei der wells einer 96er Testplatte wurden jeweils 100 μ l der entsprechenden Doxorubicinlösung pipettiert. Zudem wurden 4 ml einer Zellsuspension gemäß 3.2.1.2 mit der Konzentration 5 Mio. Zellen/ml zubereitet und 100 μ l davon in jedes der zuvor befüllten wells pipettiert, so dass sich in jedem well 500 000 Zellen befanden. Die oben angegebenen Doxorubicinkonzentrationen wurden somit auf die Hälfte reduziert. Der gleiche Vorgang wurde bei einer zweiten 96er Testplatte wiederholt. Beide Testplatten wurden nun für 24 bzw. 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die vitalen und die toten Zellen gemäß 3.2.2.1 mit Hilfe des Farbstoffs Trypanblau in jedem well gezählt und berechnet.

3.2.5 Durchführung der Aufnahmeversuche

3.2.5.1 ^{18}F FDG-Aufnahmeversuch

Zur Durchführung des Aufnahmeversuchs wurden zunächst Doxorubicinlösungen mit den Konzentrationen 800, 200, 100, 50, 25, 12,5 und 0 ng/ml gemäß 3.2.2.3 hergestellt. Von jeder dieser Lösungen wurden in 3 wells einer 24er Wellplatte (Dreifachbestimmung) nach gutem Resuspendieren je 0,5 ml pipettiert, sodass $3 \times 7 = 21$ wells befüllt wurden. Zusätzlich wurden 3 wells mit je 1 ml Medium versetzt (Leerwert).

Zudem wurde ein Mediumwechsel gemäß 3.2.1.2 mit Herstellung von 25ml einer Zellsuspension mit Konzentration $c = 1$ Mio/ml vorgenommen. Davon wurde in alle wells außer denen zur Leerwertmessung jeweils 0,5 ml dieser zuvor gut resuspendierten Zellsuspension pipettiert. Es befanden sich nun 500 000 Zellen in jedem dieser wells. Die Doxorubicinkonzentrationen wurden durch Zugabe der Zellsuspension jeweils auf die Hälfte reduziert. Dieselbe Vorgehensweise wurde bei einer zweiten 24er Wellplatte durchgeführt. Beide Testplatten wurden anschließend für 24 bzw. 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach 24 Stunden wurden die Inhalte der wells einer Platte in Eppendorf-Gefäße umpipettiert. In jedes Eppendorf Gefäß wurde nun 100 μ l einer ^{18}F FDG Lösung, bestehend aus ^{18}F FDG und 0,9% Natriumchlorid, mit einer Aktivität von je 370 kBq hinzugegeben.

Dieser Ansatz wurde im Brutschrank bei 37°C 45 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Gefäße dreimal mit PBS gewaschen (Zentrifuge: 5 Minuten, 1500 U) und am Ende die trocken abgesaugten Zellpellets im γ -Counter als counts per minute (cpm) gemessen.

Nach 48 Stunden wurde ebenso mit der zweiten Testplatte verfahren.

3.2.5.2 ^{18}F FLT-Aufnahmeversuch

Der Aufnahmeversuch mit ^{18}F FLT erfolgte analog zu 3.2.5.1, nur wurde anstatt der radioaktiven Glukose ^{18}F FDG das Thymidinanalogon ^{18}F FLT verwendet. Es wurden für diesen Versuch die Doxorubicinlösungen in den Konzentrationen 400, 100, 50, 25 und 12,5 ng/ml verwendet.

3.2.5.3 Konzentrationsabhängige Hemmung der Traceraufnahme

Um zu messen, inwiefern die Zellkonzentration die Aufnahme der radioaktiven Substanzen beeinflusst, wurde ein Mediumwechsel gemäß 3.2.1.2 mit Herstellung von 6 ml einer Zellsuspension mit Konzentration $c = 5$ Mio/ml vorgenommen. 3 ml dieser Zellsuspension wurden mit 3 ml Medium 1:2 verdünnt, um zudem eine Lösung mit der niedrigeren Zellkonzentration $c = 2,5$ Mio/ml herzustellen.

Zudem wurden Doxorubicinlösungen mit einer Konzentration von 800 ng/ml und 100 ng/ml gemäß 3.2.2.3 hergestellt.

Für den Ansatz mit der hohen Zellkonzentration wurden von der Lösung mit der Zellkonzentration $c = 5$ Mio/ml je 100 μ l, entsprechend 500 000 Zellen, in

$3 \times 3 = 9$ wells einer 48er Wellplatte pipettiert. In je 3 wells (Dreifachbestimmung) wurde dazu pro well $100 \mu\text{l}$ der Doxorubicinlösung mit den Konzentrationen 800 ng/ml und 100 ng/ml dazugegeben. In den restlichen drei mit Zellsuspension befüllten wells wurden $100 \mu\text{l}$ Medium pro well dazu pipettiert (Negativkontrolle). In weiteren drei wells wurden je $200 \mu\text{l}$ Medium gegeben (Leerwert).

Für den Ansatz mit der niedrigen Zellkonzentration wurden von der Lösung mit der Zellkonzentration $c=2,5 \text{ Mio/ml}$ je $200 \mu\text{l}$, entsprechend $500\,000$ Zellen, in weitere 12 wells der Wellplatte pipettiert. In je 3 dieser wells wurde dazu pro well $200 \mu\text{l}$ der Doxorubicinlösung mit den Konzentrationen 800 ng/ml und 100 ng/ml dazugegeben.

In den restlichen drei mit Zellsuspension befüllten wells wurden $200 \mu\text{l}$ Medium pro well dazu pipettiert (Negativkontrolle). In weiteren drei wells wurden zur Leerwertmessung je $400 \mu\text{l}$ Medium gegeben.

Auf einer weiteren 48er Wellplatte wurde derselbe Ansatz wiederholt.

Beide Testplatten wurden nun 24 bzw. 48 Stunden im Wärmeschrank bei 37°C inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurde ebenso wie in 3.2.5.1 mit dem ^{18}F FDG-Aufnahmeversuch verfahren.

3.2.6 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie - Zellzyklusanalyse

3.2.6.1 Herstellung des Ansatzes

Gemäß 3.2.2.3 wurden Doxorubicinlösungen in den Konzentrationen 800 , 400 , 200 , 50 , $12,5$ und 0 ng/ml hergestellt. In 12er Wellplatten wurden je Konzentration 3 wells mit je $1,5 \text{ ml}$ dieser Lösungen befüllt.

Außerdem wurde nach Mediumwechsel gemäß 3.2.1.2 eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 1 Mio Zellen/ml hergestellt. In den 15 mit Doxorubicin versetzten wells und zusätzlichen drei wells für die Negativkontrolle dieser 12er Wellplatte wurden dann jeweils $1,5 \text{ ml}$ der Zelllösung, entsprechend $1,5 \text{ Millionen Zellen}$, pipettiert. Die drei mit Zellsuspension befüllten wells der Negativkontrolle wurden außerdem noch mit je $1,5 \text{ ml}$ Medium versetzt.

Der gleiche Ansatz wurde auf zweiten 12er Wellplatten durchgeführt.

Die Wellplatten wurden anschließend im Brutschrank 24 bzw. 48 Stunden lang inkubiert.

3.2.6.2 Fixierung der Proben

70%iger Ethanol wurde mindestens eine Stunde lang im -20°C Gefrierschrank gekühlt.

Dann wurden nach 24 bzw. 48 Stunden die entsprechende Testplatte aus dem Wärmeschrank entnommen und die Inhalte der wells in FACS (fluorescence activated cell sorting) Röhrchen überführt.

Diese wurden bei 1700 U/min 7 Minuten lang zentrifugiert und anschließend der Überstand gründlich abgekippt.

Während die Proben im Vortexer behandelt wurden, wurde je Probe tröpfchenweise 3 ml gekühltes Ethanol dazugegeben.

Alle Proben wurden anschließend mindestens einen Tag und höchstens eine Woche im -20°C Gefrierschrank aufbewahrt.

3.2.6.3 Vorbereitung zur Messung und Messung der Proben

Am Tag der Messung, einen Tag bis eine Woche nach der Fixierung, wurden die FACS Röhrchen bei 1700 U/min 7 Minuten lang zentrifugiert. Nach dem gründlichen Abkippen des Überstandes wurden die Proben auf Eis gelegt.

Dann wurden 9 ml PBS ($300\ \mu\text{l}$ pro Probe, vorsichtshalber mit 30 Proben gerechnet) in ein 45 ml Röhrchen pipettiert. Um später nur die DNS zu messen wurde nun unter Vortexen eine Spatelspitze Ribonuclease A dazugegeben. Anschließend wurde 95%iges Propidiumjodid (PI, $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{I}_2\text{N}_4$) im Verhältnis 1:500, d.h. $9\text{ml}/500 = 18\ \mu\text{l}$ dazupipettiert.

Nach gutem Vermischen wurden $300\ \mu\text{l}$ von dieser Lösung zu jeder Probe gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen wegen des Farbstoffes in Alufolie verpackt und eine halbe Stunde im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach einer halben Stunde wurde jede Probe gevortext und gesiebt. Anschließend wurde der fluorszierende Farbstoff PI in den Proben für die Zellzyklusanalyse gemessen.

3.3 In vivo Methoden

Für sämtliche Tierversuche wurde die Genehmigung der Regierung von Oberbayern mit der Versuchsanzugsnummer 55.2-1-54-2531-52-07 eingeholt.

3.3.1 Xenotransplantation der humanen Lymphomzellen

Für die Xenotransplantation wurden für jede Maus 10 Millionen Lymphomzellen der Zelllinie SUDHL-4 mit 100 μl sterilen PBS in Lösung gebracht. Dies wurde dann den etwa sieben Wochen alten weiblichen SCID Mäusen subkutan in die rechte Schulterregion injiziert.

3.3.2 Tumolvolumenmessung

Dazu wurde der Längendurchmesser, entsprechend einer Parallele der Longitudinalachse, und der Breitendurchmesser, entsprechend einer Parallele der Sagittalachse, der Tumormasse mit einer Schublehre täglich gemessen. Zugunsten der Messgenauigkeit wurden beide Achsen auf den Mäusen markiert. Das Tumolvolumen konnte mit der Formel

$$V [\text{cm}^3] = \frac{\text{Länge} [\text{cm}] \times (\text{Breite} [\text{cm}])^2}{2}$$

abgeschätzt werden.

3.3.3 Therapievorgehen

Spätestens vier Wochen nach der Tumorzellinjektion konnte bei den verwendeten Tieren ein Tumor in der rechten Schulterregion festgestellt werden. Bei einem berechneten Volumen von ca. 0,5 cm^3 wurde den Mäusen einmalig 100 μl des Medikaments Doxorubicin in unterschiedlichen Dosen (25 μg , 50 μg , 100 μg und 200 μg) intraperitoneal appliziert. Den Kontrollmäusen wurden jeweils 100 μl einer 0,9% igen Kochsalzlösung injiziert.

3.3.4 Bildgebung der Versuchstiere in der Kleintier-PET

Für die Bildgebung im Kleintier-PET vor und 24 bzw. 48 Stunden nach Therapie wurde den Mäusen mit dem Anästhesiesystem für Versuchstiere inhalativ zur Einleitung 3 %iges und zur Aufrechterhaltung 1,5 %iges Isofluran zugeführt. Hinsichtlich der Augenpflege der Mäuse wurde eine Augensalbe verwendet und ihre Körpertemperatur über eine in der Liege des Tomographen eingebaute verstellbare Heizung aufrechterhalten. Der verwendete Tracer ^{18}F FDG oder ^{18}F FLT (3.7 - 7.4 MBq pro Maus) wurde über einen Katheter in die Schwanzvene der Maus injiziert. Zur Bestimmung der in der Spritze verbliebenen Aktivität wurde nach Spülung des Katheters und der Kanüle mit physiologischer Kochsalzlösung rückgemessen. Im Vollring-PET für Kleintiere wurde 45 Minuten nach der Traceinjektion 15 Minuten lang statisch gemessen. Nach Umwandlung der Rohdaten in Sinogramme wurden die Daten in ein $128 \times 128 \times 95$ Voxelbild, entsprechend einer Voxelgröße von $0,433 \times 0,433 \times 0,796 \text{ mm}^3$, rekonstruiert. Es erfolgte eine Korrektur der Daten hinsichtlich des physikalischen Zerfalls und der Totzeit.

3.3.5 Messung der ^{18}F FDG- und ^{18}F FLT-Aufnahme mittels Bildbearbeitung und Bildanalyse

Um die Traceraufnahme in das Tumorgewebe semiquantitativ beurteilen zu können, wurde anhand des letzten Frames (PET Aufnahme nach ca. 60 Minuten) eine Berechnung des Tumor-Hintergrund-Quotienten (TBR) vorgenommen. Dazu wurde manuell in der coronaren Schnittbildebene in dem Bereich der höchsten Aktivität im Tumorgewebe eine runde Fläche als 2-dimensionale Region of Interest (ROI) markiert. Um Randvolumeneffekte zu vermeiden, bedeckte die Region of Interest nicht den gesamten Tumor. Außerdem wurde die kontralaterale Seite als korrespondierendes Hintergrund ROI eingezeichnet. Berechnet wurde der Tumor-Hintergrund-Quotient folgendermaßen:

$$\text{TBR} = \frac{\text{mittlere gemessene Aktivität ROI (Tumor) [counts/s]}}{\text{mittlere gemessene Aktivität ROI (kontralateral) [counts/s]}}$$

Als Bildbearbeitungssoftware wurde Inveon Research Workplace 2.2 verwendet.

3.3.6 Organentnahme und Organverwertung der Versuchstiere

90 Minuten nach der Messung der Mäuse im Kleintier-PET wurden die Versuchstiere durch Kohlenstoffdioxid getötet und sezirt. Von den Organen Blut, Herz, Lunge, Leber, Magen, Pankreas, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Niere, Knochen, Gehirn, Muskel und dem Lymphom Xenotransplantat wurde das Gewicht \pm 2 mg und anschließend die Anzahl der Zerfälle pro Minute in einem automatisierten γ -Counter zerfallskorrigiert (^{18}F corrected counts per minute) gemessen.

Im Folgenden wurde daraus der Tumor-Muskel-Quotient (TMR) ermittelt.

Berechnet wurde der Tumor-Muskel-Quotient folgendermaßen:

$$\text{TMR} = \frac{\text{cpm pro g Tumor [counts/s]}}{\text{cpm pro g Muskel [counts/s]}}$$

Die Daten der untherapierten Kontrollmäuse wurden als Basiswerte herangezogen.

3.3.7 Histologie und Immunhistochemie

Ein Teil des entnommenen Tumors wurde nach der Organentnahme über Nacht in 4 %igem Formalin fixiert und durchlief dann eine ca. acht Stunden dauernde Entwässerungsreihe bestehend in aufsteigender Reihenfolge aus Formalin, 70 %igem, 90 %igem und 100 %igem Ethanol. Anschließend wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet. Von dem Paraffinblock wurden von jedem Tumor 3 μm dicke Dünnschnitte hergestellt und auf Glasträgern etwa 12 Stunden lang bei 58°C fixiert. Für die histologische Untersuchung wurde anschließend eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung vorgenommen.

Für die Färbung der proliferierenden Zellen wurden je 100 μl des monoklonalen Ki67-spezifischen Antikörpers MIB-1 als Primärantikörper verwendet. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Das weitere Vorgehen geschah in einem automatisierten Immunostainer mit Diaminobenzin als Chromogen zur Färbung der Ki67 positiven Zellkerne.

Entsprechend dem monoklonalen murinen anti-Ki67-Antikörper (MIB-1) wurde mit dem Anti-Cleaved-Caspase 3-Antikörper vom Kaninchen verfahren. Das Protein Caspase 3 dient als Apoptosemarker. Der Primärantikörper wurde hier-

bei jedoch bei 4 Grad Celsius über Nacht inkubiert. Wieder erfolgte die weitere Vorgehensweise der immunhistochemischen Methoden in einem automatisierten Immunostainer.

Für die quantitative Analyse wurden die Gewebeschnitte mit dem Olympus Dot-Slide Scanner digitalisiert. Für jedes der sich daraus ergebenden digitalen Schnitte wurden regions of interest (ROI) definiert und durch eine kommerziell erhältliche Software (Definiens Enterprise Image Intelligence) analysiert. Auf der Basis der Anwendung von "Definiens TissueMAP" wurden die Grenzwerte optimiert, um maschinell Ki67-positive Zellkerne bzw. Caspase 3-angefärbte Bereiche zu detektieren und zu quantifizieren.

3.4 Auswertung der Versuchsergebnisse

3.4.1 Berechnungen und statistische Auswertung

Für die statistischen Berechnungen wurde R Software, Version 2.11.1, sowie Microsoft Office 2000 verwendet.

Dabei wurden das arithmetische Mittel, der Median, der Wertebereich, die Standardabweichung und der Standardfehler sowohl der Kontrollen als auch der behandelten Gruppen folgendermaßen errechnet:

arithmetischer Mittelwert:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Median:

$$x = \begin{cases} x_{\frac{n+1}{2}} & n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2}(x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n+1}{2}}) & n \text{ gerade} \end{cases}$$

Standardabweichung:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Standardfehler:

$$SE = \frac{\textit{Standardabweichung}}{\sqrt{\textit{Stichprobenumfang}}}$$

Zur statistischen Auswertung wurde als Mittelwertsvergleich die univariate Varianzanalyse, der Bonferroni-Test und der Dunnet-T-Test verwendet.

Die univariate Varianzanalyse wurde bei der statistischen Auswertung der in vivo ^{18}F FDG- und ^{18}F FLT-Aufnahmeversuchen und des Ki67-Indexes durchgeführt. Die Varianzanalyse wurde verwendet, um Veränderungen der TBR sowie der Ki67-Indizes zwischen den verschiedenen Therapiegruppen zu vergleichen. Fahrmeir et al. legen in ihrem Buch die Grundlagen der Varianzanalyse dar [33].

Die statistische Varianzanalyse dient der Fragestellung der Kausalattribution. Als Voraussetzung zur Durchführung dieses Tests gelten die Varianzhomogenität und die Normalverteilung der Stichprobenvariablen. Die Traceraufnahme stellt bei der Varianzanalyse die Zielvariable dar. Sie wird auch abhängige Variable genannt. Als Einflussvariable, auch unabhängige Variable genannt, dient die Doxorubicinkonzentration. Die Doxorubicinkonzentrationen werden in Gruppen unterschiedlicher Konzentration eingeteilt. Da nur eine unabhängige Variable, nämlich die Doxorubicinkonzentration, zur Anwendung kommt, handelt es sich um eine einfaktorielle univariate Varianzanalyse. Zeigt sich ein Unterschied zwischen mindestens zwei Mittelwerte der Gruppen, trifft die Alternativhypothese zu.

Um herauszufinden, zwischen welchen Gruppen der Unterschied liegt, können multiple Vergleichstechniken wie z.B. der Bonferroni-Test angewendet werden. Der angepasste p-Wert nach Bonferroni wurde bei der statistischen Auswertung des Ki67-Indexes berechnet.

Im Folgenden eine kurze Beschreibung zur Durchführung der einfaktoriellen univariaten Varianzanalyse. Zuerst wird durch Zusammenfassen aller Messwerte aus allen Gruppen der Gesamtmittelwert und die Gesamtvarianz berechnet. Auf die Gesamtvarianz haben neben der Einflussvariablen auch Störvariablen und der Zufall einen Einfluss. Um den Anteil der Varianz an der Gesamtvarianz ausfindig zu machen, der auf die Einflussvariable zurückzuführen ist, wird jedem Messwert innerhalb einer Gruppe der Mittelwert der jeweiligen Gruppe zugeschrieben und daraus die sogenannte " Treatment-Varianz " berechnet. Der Quotient aus "

Treatment-Varianz ” und Gesamtvarianz stellt den relativen Anteil der auf die Einflussvariable zurückgehenden Varianz an der Gesamtvarianz dar. Den Anteil an der Gesamtvarianz, der auf Zufall oder Störvariablen zurückzuführen ist, wird als Fehlervarianz bezeichnet. Um diese zu ermitteln, wird die Varianz aus der Abweichung jedes Messwertes vom Mittelwert der Gruppe berechnet. [33]

Die Signifikanzprüfung wird mit dem F-Test durchgeführt. Zur Überprüfung der Nullhypothese, die besagt, dass die Mittelwerte der Gruppen gleich sind, wird der Quotient aus “ Treatment-Varianz ” und Fehlervarianz gebildet. Der F-Wert des Quotienten mit den Zähler $(k-1)$ - und Nenner $(k \times (n - 1)$ bzw. $N-k)$ -freiheitsgraden und dem gewünschten Signifikanzniveau kann in F-Verteilungstabellen nachgeschlagen werden. Dabei steht k für die Anzahl der Gruppen, N für die Anzahl aller Versuchsteilnehmer, und n für die Anzahl der Versuchsteilnehmer pro Gruppe. Um ein signifikantes Ergebnis zu erreichen, müsste zum Beispiel bei einem Signifikanzniveau von 5 % der F-Wert mindestens 95 % betragen. Auf diesem Niveau könnte folglich die Nullhypothese zu Gunsten der Alternativhypothese verworfen werden. [33]

Um bei Vorliegen der Alternativhypothese, d.h. dem Vorhandensein von Abweichungen zwischen den Mittelwerten der Gruppen, herauszufinden, welche Mittelwerte sich unterscheiden, können post-hoc-Tests (multiple Mittelwertvergleiche) und paarweise multiple Vergleiche angewandt werden. Bei den post-hoc-Verfahren werden dazu aus einer inhomogenen Gruppe von Mittelwerten homogene Untergruppen ermittelt. Dadurch kann festgestellt werden, welche Faktorstufen für den signifikanten Effekt der univariaten Varianzanalyse verantwortlich sind. Bei den paarweisen Mehrfachvergleichen wird die Differenz zwischen den gepaarten Mittelwerten ermittelt. [59]

Der Bonferroni-Test als Beispiel für einen Mehrfachvergleich wird dazu verwendet, mit T-Tests paarweise Vergleiche zwischen Gruppenmittelwerten durchzuführen. Es erfolgt eine Korrektur des Signifikanzniveaus [33].

Im Rahmen einer Varianzanalyse kann der Dunnett-Test als T-Test mit paarweisen Mehrfachvergleichen eingesetzt werden, um signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Kontrollgruppe und der Therapiegruppen ausfindig zu machen. Bei dem Dunnett-T-Test wird eine Gruppe als Kontrollgruppe behandelt und alle Gruppen damit verglichen. [59]

In dieser Arbeit wurde der Dunnett-Test bei der Auswertung der in vivo Tracer-

aufnahme und der Ermittlung des Ki67-Indexes verwendet. Es erfolgte eine multiple paarweise Beurteilung der Unterschiede der prozentualen Tumor-Hintergrund-Quotienten bzw. der Ki67-Indexe zwischen den Therapiegruppen und der Kontrollgruppe.

Allgemeine Trendtests wurden durch die Anwendung linearer Regressionsmodelle, unter Berücksichtigung des Dosis-Niveaus als kontinuierliche Prädiktorvariable, durchgeführt. Im Rahmen dieser Analysen wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient aufgezeichnet, um die Richtung und Stärke des linearen Zusammenhangs zu quantifizieren.

Alle statistischen Tests wurden zweiseitig mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 durchgeführt.

3.4.2 Berechnungen und graphische Darstellung

Der Wert vor Therapie bei den tierexperimentellen Studien (Tumorzellen, TBR, Histologie) bzw. der unbehandelten Kontrollgruppe bei den *in vitro*-Versuchen (Zytotoxizitätstest mit MTT, Vitalitätsprüfung mit Trypanblau, Traceraufnahme, FACS) wurde als 100 % definiert und die Werte nach entsprechender Therapie mit Doxorubicin relativ dazu berechnet. Bei der Biodistribution als Organverwertung der Versuchstiere wurden die Organe bzw. der Tumor in Relation zum M. quadriceps femoris des rechten Hinterlaufs gesetzt und somit der Organ-Muskel-Quotient bzw. der Tumor-Muskel-Quotient berechnet. Die relativen Werte wurden entweder mit R Software, Version 2.11.1 oder mit Microsoft Office 2000 als Diagramme mit dem Standardfehler (Berechnung gemäß 3.4.1) als Fehlerbalken dargestellt. Die Daten bei der Zellzyklusanalyse wurden dabei als gestapelte Säulen in % dargestellt, ansonsten wurden gruppierte Säulen (z.B. Vitalitätstest mit Trypanblau) verwendet. Die Daten der Änderung des Tumorzellvolumens *in vivo* wurden als Liniendiagramm graphisch dargestellt, die Immunhistochemie mit Ki67 und Caspase 3 als Punktdiagramm.

Kapitel 4

Ergebnisse

Ziel war die Untersuchung der Fragestellung, ob mit radioaktiven Tracern ^{18}F FLT und ^{18}F FDG eine frühe Beurteilung des Therapieansprechens auf Chemotherapie in dosisabhängiger Weise möglich ist. Zudem wurde ein Vergleich der Tracer ^{18}F FLT und ^{18}F FDG durchgeführt. Dies wurde sowohl in in vitro Studien als auch in tierexperimentellen Studien untersucht.

4.1 In vitro Studie

Die in vitro Experimente umfassen den Zytotoxizitätstest mit MTT, die Vitalitätsprüfung mit Trypanblau, die Aufnahmeversuche mit den radioaktiven Tracern ^{18}F FLT und ^{18}F FDG, und die Zellzyklusanalyse mit FACS. Proliferation und Zellviabilität in vitro wurden mit Zellzahlmessung und dem Zytotoxizitätstest mit MTT gemessen. Die Zellzyklusdistributionsanalyse wurde anhand einer PI-Färbung mit FACS durchgeführt. Dabei wurden auch die Zellen in Apoptose erfasst. Mit den ^{18}F FLT- und ^{18}F FDG- Aufnahmeversuchen wurde getestet, wie die Aufnahme der radioaktiven Tracer FLT und FDG im Vergleich miteinander sich bei unterschiedlichen Dosen Chemotherapie verändert. Mit den Aufnahmeversuchen wurde der Frage nachgegangen, ob das Radionukleosid ^{18}F FLT ein verlässlicher Biomarker für die Proliferation von Lymphomzellen ist. Als zytostatisches Medikament wurde das Anthracyclin Doxorubicin verwendet.

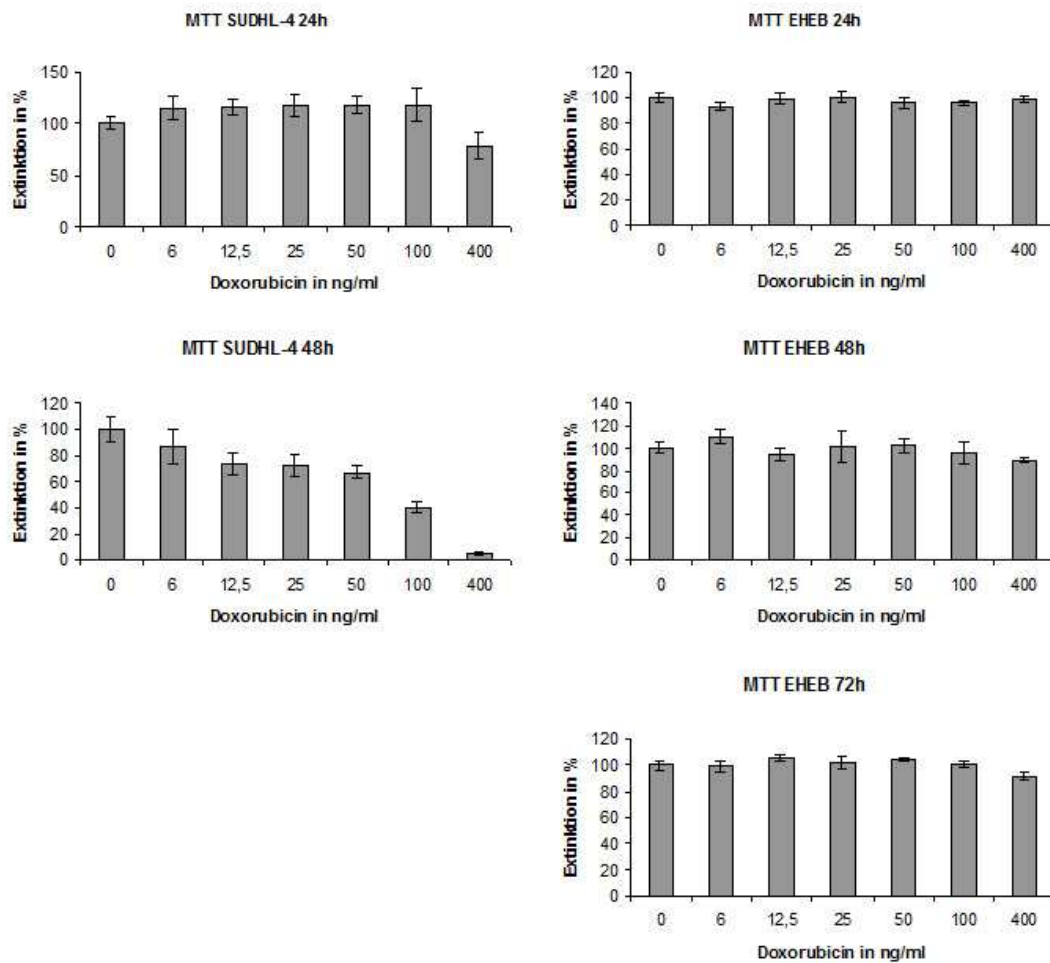


Abbildung 4.1: Zytotoxizitätstests mit MTT mit den Lymphomzelllinien SUDHL-4 (links) und EHEB (rechts) nach Therapie mit Doxorubicin mit den angegebenen Dosen und nach den angegebenen Zeitpunkten, 50 000 Zellen/well, Mittelwerte, $n=3$ pro Gruppe. Die Extinktion der Kontrollzellen (ohne Doxorubicin) wurde jeweils als 100 % definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Während sich bei der Tumorzelllinie EHEB kaum ein Effekt der Chemotherapie im Sinne einer Reduktion der Extinktion zeigt, bewirkt das Zytostatikum bei den SUDHL-4 Zellen zu frühen Zeitpunkten einen dosisabhängigen Rückgang der Extinktion.

4.1.1 Zytotoxizitätstest mit dem MTT-Assay

Der Zytotoxizitätstest mit MTT wurde mit Doxorubicindosen von 0 ng/ml (Kontrolle), 6 ng/ml, 12.5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml und 400 ng/ml sowohl bei der Tumorzelllinie SUDHL-4 als auch bei der Zelllinie EHEB durchgeführt.

Die Inkubationszeit des Farbstoffs MTT betrug 2,5 Stunden.

Bei der humanen chronischen B-Zell-leukämischen Zelllinie EHEB zeigte sich insgesamt wenig Effekt der Chemotherapie bei Messungen nach 24, 48 und 72 Stunden. Eine Ausnahme stellten die mit 400 ng/ml behandelten Zellen dar: dort wurde bei Messungen nach 48 und 72 Stunden ein geringfügiger Rückgang der Extinktion auf 81,7 % nach 48 Stunden (SE 2,2 %) bzw. auf 91,3 % nach 72 Stunden (SE 2,8 %) beobachtet. Alle anderen Werte der Extinktion im Vergleich zur Kontrolle (100 %) pendelten bei Messungen nach 24 Stunden zwischen 93,2 % und 100,5 % (SE 1,3 % bis 4,4 %), nach 48 Stunden zwischen 86,2 % und 121,6 % (SE 5,1 % bis 14,4 %), und nach 72 Stunden zwischen 99,6 % und 105,7 % (SE 1,3 % bis 5,0 %). Zur grafischen Darstellung siehe Abb. 4.1.

Wie in Abb. 4.1 (linke Seite) erkennbar, stellte sich dieser Sachverhalt bei der humanen B-Zell-Lymphom-Zelllinie SUDHL-4 anders dar. Zwar zeigte sich im Zytotoxizitätstest mit MTT bei Messungen nach 24 Stunden ebenfalls erst bei einer Doxorubicinkonzentration von 400 ng/ml ein Effekt im Sinne einer Reduktion der Extinktion um 21,8 % auf 78,2 % (SE 13,1 %). Alle anderen Werte der Extinktion im Vergleich zur Kontrolle (100 %) pendelten bei Messungen nach 24 Stunden zwischen 114,8 % und 118,4 % (SE 5,9 % bis 15,8 %). Jedoch stellte sich im Zytotoxizitätstest bei Messungen nach 48 Stunden eine dosisabhängige Empfindlichkeit bei Konzentrationen bis 6 ng/ml Doxorubicin heraus, was sich in einer dosisabhängigen Abnahme der Extinktion auf folgende Werte niederschlug:

6 ng/ml: 87,1 % (Standardfehler 13,7 %)
12,5 ng/ml: 74,1 % (Standardfehler 8,2 %)
25 ng/ml: 72,6 % (Standardfehler 8,7 %)
50 ng/ml: 67,3 % (Standardfehler 5,1 %)
100 ng/ml: 40,5 % (Standardfehler 4,4 %)
400 ng/ml: 4,8 % (Standardfehler 1,3 %)

Insgesamt wurde in den Zytotoxizitätstests mit MTT bei der Zelllinie EHEB erst nach 48 und 72 Stunden und einer hohen Doxorubicindosis (400 ng/ml) ein Effekt auf die Extinktion beobachtet. Bei der Zelllinie SUDHL-4 war ebenfalls diese hohe Doxorubicinkonzentration nötig, um bei Messungen nach 24 Stunden einen deutlichen Effekt zu erreichen. Bei Messungen zu einem späteren Zeitpunkt zeigten die MTT-Tests mit der Zelllinie SUDHL-4 eine mit aufsteigender Doxoru-

Die Doxorubicinkonzentration zeigt eine zunehmende Reduktion der Extinktion bei Doxorubicinkonzentrationen von 6 ng/ml bis 400 ng/ml.

Es wurde in den Zytotoxizitätstests mit MTT gezeigt, dass die in allen Experimenten verwendete Zelllinie SUDHL-4 geeignet ist, Zellproliferation bzw. -reduktion zu einem frühen Zeitpunkt anzuzeigen und in dosisabhängiger Weise auf Chemotherapie mit Doxorubicin signifikant messbar reagiert. Da sich die Tumorzelllinie EHEB dafür als weniger geeignet erwies, wurde diese in den folgenden Versuchen nicht mehr verwendet.

4.1.2 Vitalitätsprüfung und Proliferationsbestimmung mit Trypanblau

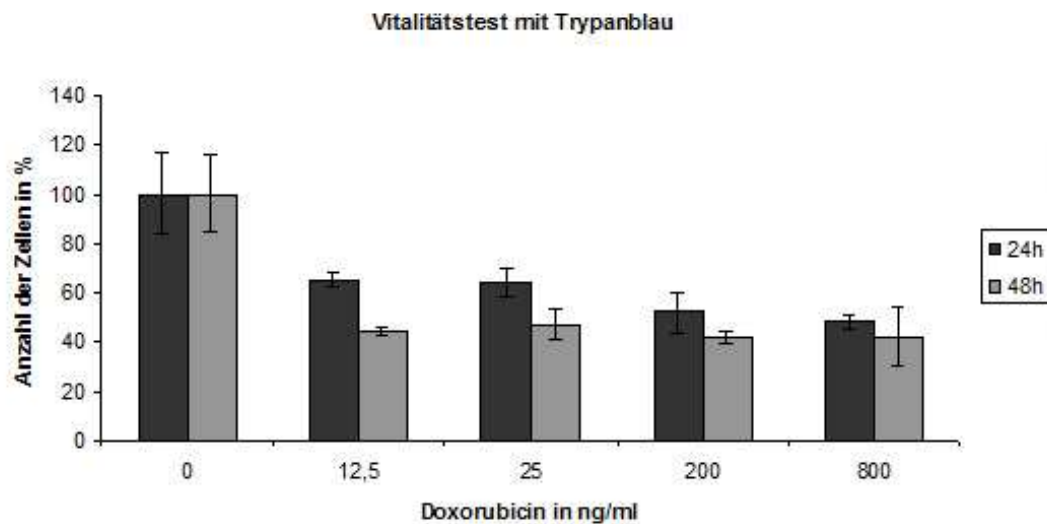


Abbildung 4.2: Trypanblau-Färbung zur Vitalitätsprüfung von Lymphomzellen nach Therapie mit Doxorubicin mit den angegebenen Konzentrationen, Messungen 24 und 48 Stunden nach Chemotherapie, 500 000 Zellen/well, Mittelwerte, n=3 pro Gruppe. Anzahl der Kontrollzellen (ohne Doxorubicin) nach 24 bzw. 48 Stunden wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Chemotherapie konnte deren Effekt durch den Rückgang der vitalen Zellen nachgewiesen werden.

Proliferation und Zellvitalität *in vitro* wurden neben dem Zytotoxizitätstest mit MTT auch durch Zellzahlbestimmung bei der Vitalitätsprüfung mit dem Farb-

stoff Trypanblau gemessen. Dieser Vitalitätstest wurde mit der Tumorzelllinie SUDHL-4 und Doxorubicinkonzentrationen von 0 ng/ml (Kontrolle), 12,5 ng/ml, 25 ng/ml, 200 ng/ml und 800 ng/ml nach 24 Stunden und 48 Stunden durchgeführt. Die Vitalitätsprüfung ergab nach 24 Stunden eine dosisabhängige Reduktion der Anzahl der Tumorzellen auf 64,5 % (SE 2,7 %) bei 12,5 ng/ml Doxorubicin, 63,6 % (SE 5,6 %) bei 25 ng/ml Doxorubicin, 51,5 % (SE 8,3 %) bei 200 ng/ml Doxorubicin und 48,5 % (SE 2,7 %) bei 800 ng/ml Doxorubicin. Der Mittelwert der Tumorzellzahl sank somit mit aufsteigender Doxorubicinkonzentration zunehmend. Dabei war ein deutlicher Unterschied zwischen sehr niedrigen und sehr hohen Doxorubicindosen feststellbar.

Bei der 48 Stunden Messung wurde ebenfalls ein starker Effekt der Chemotherapie im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. So sank das Niveau der Anzahl der Zellen nach Behandlung sehr deutlich auf 44,4 % (SE 1,6 %) bei 12,5 ng/ml Doxorubicin, 47,2 % (SE 6,1 %) bei 25 ng/ml Doxorubicin, 41,7 % (SE 2,5 %) bei 200 ng/ml Doxorubicin und ebenfalls 41,7 % (SE 1,8 %) bei 800 ng/ml Doxorubicin. Der Unterschied zwischen den einzelnen Dosierungen war jedoch nicht sehr ausgeprägt.

Insgesamt wurde in der Vitalitätsprüfung sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden ein Ansprechen der Zellen auf Chemotherapie festgestellt. Insbesondere bei der 24 Stunden Messung ergab sich ein dosisabhängiger Unterschied des Therapieansprechens. In Abb. 4.2 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt.

4.1.3 In vitro ^{18}F FDG- und ^{18}F FLT-Aufnahme der Lymphomzellen

Wie im Zytotoxizitätstest mit MTT (siehe Abb. 4.1) und in der Trypanblaufärbung (siehe Abb. 4.2) schon dargestellt wurde, ist die Tumorzelllinie SUDHL-4 bei niedrigen Doxorubicinkonzentrationen bis 6 ng/ml (MTT-Test) bzw. 12,5 ng/ml (Vitalitätstest mit Trypanblau) empfindlich.

Um die für die Traceraufnahmeversuche richtige Zellkonzentration ausfindig zu machen, wurde ein Konzentrationsabhängigkeitstest durchgeführt. Dazu befanden sich in jeder Probe gleich viele Zellen, jedoch in unterschiedlicher Zellkonzentration (2,5 Mio Zellen/ml versus 1,25 Mio Zellen/ml). Beide Zellkonzentrationen wurden mit 50 und 400 ng/ml Doxorubicin behandelt und nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation die FDG-Aufnahme gemessen. Es stellte sich heraus, dass bei

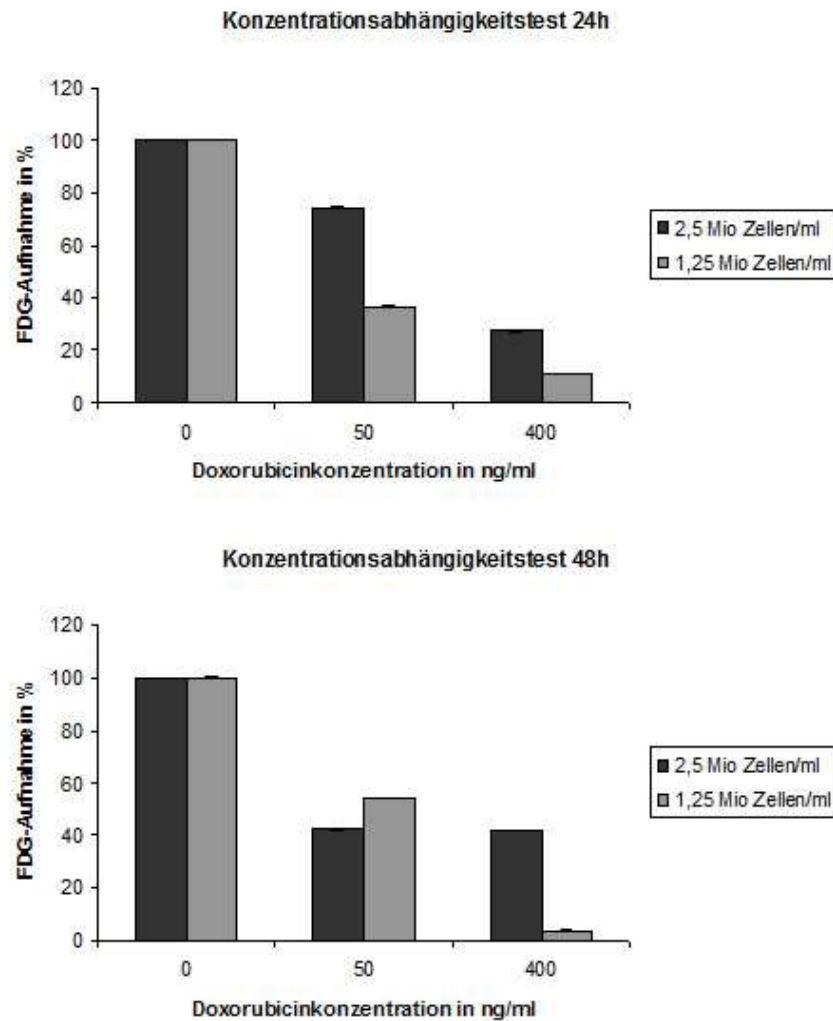


Abbildung 4.3: Konzentrationsabhängigkeitstest mit ^{18}F FDG bei Lymphomzellen 24 (oben) und 48 (unten) Stunden nach Chemotherapie in vitro, $n=3$ pro Gruppe. Je 500 000 Zellen wurden mit den angegebenen Doxorubicinkonzentrationen behandelt. Die Traceraufnahme der unbehandelten Zellen wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Sowohl bei hoher als auch bei niedriger Zellkonzentration kann eine Verminderung der Traceraufnahme nach Therapie beobachtet werden.

jeder Zellkonzentration und jedem Messzeitpunkt die Traceraufnahme nach Doxorubicinbeigabe folgendermaßen sank:

Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei hoher Zellkonzentration: 50ng/ml 74,5 %, 400ng/ml 27,5 %, bei niedriger Zellkonzentration: 50ng/ml 36,3 %, 400ng/ml 11,2 %.

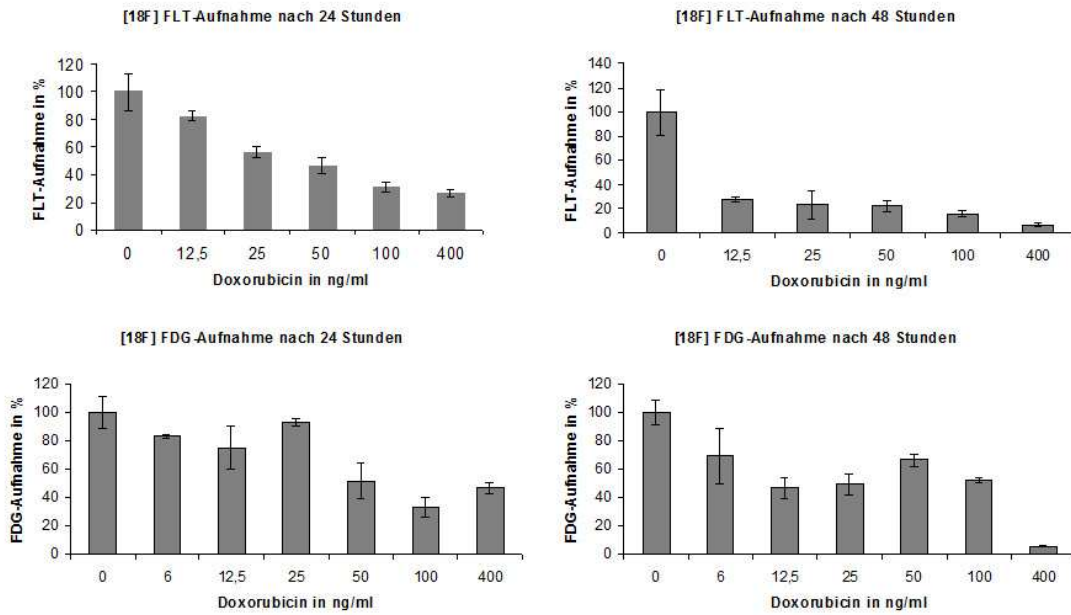


Abbildung 4.4: In vitro ^{18}F FLT- (obere Abbildungen) und ^{18}F FDG- (untere Abbildungen) Aufnahme in Lymphomzellen 24 (links) und 48 (rechts) Stunden nach Chemotherapie, Mittelwerte, $n=3$ pro Gruppe. 500 000 Zellen/well wurden mit den angegebenen Doxorubicinkonzentrationen inkubiert. Nach Inkubation mit ^{18}F FLT bzw. ^{18}F FDG nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die Aktivität in counts per minute (cpm) gemessen. Die Aktivität der unbehandelten Zellen wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Nur die ^{18}F FLT-Aufnahme geht nach Inkubation mit Doxorubicin dosisabhängig zurück. Die Reduktion der ^{18}F FDG-Aufnahme findet, v.a. bei niedrigeren Chemotherapie-dosen, variabel und in einem geringeren Ausmaß statt.

Nach 48 Stunden Inkubationszeit bei hoher Zellkonzentration: 50ng/ml 42,0 %, 400ng/ml 41,6 %, bei niedriger Zellkonzentration: 50ng/ml 54,2 %, 400ng/ml 3,8 %. Da sich insbesondere bei der niedrigeren Zellkonzentration dabei eine dosisabhängige Abnahme ergab, wurde bei den folgenden Traceraufnahmeversuchen eine Zellkonzentration von lediglich 500 000 Zellen/ml verwendet.

Die Aufnahmeversuche mit den radioaktiven Substanzen ^{18}F FLT und ^{18}F FDG wurden mit der Tumorzelllinie SUDHL-4 und Doxorubicinkonzentrationen von 0 ng/ml (Kontrolle), 12,5 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml und 400 ng/ml durchgeführt. Bei dem ^{18}F FDG-Aufnahmeversuch wurde zusätzlich auf die Doxorubicinkonzentration 6 ng/ml getestet. Gemessen wurden die Radioaktivität in counts per minute im γ -Counter nach 24 und 48 Stunden Behandlung mit den

ansteigenden Dosen Doxorubicin und anschließender Inkubation mit den radioaktiven Tracern. Die Daten wurden zerfallskorrigiert.

In vitro bewirkte die Chemotherapie in Lymphomzellen eine Reduktion sowohl der ^{18}F FLT- als auch der ^{18}F FDG-Aufnahme, sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden (siehe Abb.4.4).

Nach 24 Stunden verursachte das Doxorubicin eine mit aufsteigender Konzentration zunehmende Verminderung der ^{18}F FLT-Aufnahme. Im Einzelnen sank die FLT-Aufnahme in vitro folgendermaßen:

12,5 ng/ml: 82,5 % (Standardfehler 4,0 %)

25 ng/ml: 56,0 % (Standardfehler 4,0 %)

50 ng/ml: 46,6 % (Standardfehler 5,6 %)

100 ng/ml: 30,5 % (Standardfehler 3,4 %)

400 ng/ml: 26,6 % (Standardfehler 0,6 %)

Bei der FDG-Aufnahme zeigte sich nach 24 Stunden keine durchgehende Dosisabhängigkeit im Bereich von 6 bis 400 ng/ml, jedoch war das Niveau der Traceraufnahme bei hohen Dosen Doxorubicin (100 ng/ml und 400 ng/ml) auf unter 50 % (SE 7,1 % und 4,1 %) vermindert. Eine deutliche Reduktion der FDG-Aufnahme fand erst bei Doxorubicinkonzentrationen von 50 bis 400 ng/ml statt und zeigte sich variabel und in geringerem Ausmaß.

Bei der Messung nach 48 Stunden wurde bei den Zellen eine deutlich höhere FLT- als FDG-Aufnahme beobachtet. In unbehandelten Zellen betrug die mittlere FLT-Aufnahme 45 185 cpm (SE 7 395), nach Inkubation mit FDG 17 901 cpm (SE 1 240). Folgende relative Werte der FLT-Aufnahme verdeutlichen den dosisabhängigen Rückgang der FLT-Aufnahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100 %):

12,5 ng/ml: 28,2 % (Standardfehler 11,8 %, $p=0,032$)

25 ng/ml: 23,2 % (Standardfehler 4,6 %, $p=0,017$)

50 ng/ml: 22,3 % (Standardfehler 2,6 %, $p=0,015$)

100 ng/ml: 16,0 % (Standardfehler 1,5 %, $p=0,011$)

400 ng/ml: 7,1 % (Standardfehler 1,0 %, $p=0,008$)

Eine signifikante Reduktion der FLT-Aufnahme konnte zwischen jeder Konzentration von 12,5 bis 100 ng/ml verglichen mit 400 ng/ml (je $p < 0,027$) dargestellt werden.

Im Gegensatz dazu fand sich bei der FDG-Aufnahme nach 48 Stunden keine Dosisabhängigkeit in dem Bereich von 6 bis 100 ng/ml, jedoch wurde die Traceraufnahme bei 400 ng/ml Doxorubicin auf 5,1 % (SE 0,4 %) stark reduziert. Bei Doxorubicinkonzentrationen im Bereich von 6 bis 100 ng/ml pendelten die Werte zwischen 68,8 % (6 ng/ml Doxorubicin) und 46,8 % (12,5 ng/ml Doxorubicin), d.h. die FDG-Aufnahme wurde in allen Therapiegruppen im Vergleich zur Kontrolle reduziert (6 ng/ml: $p=0,21$, 12,5 ng/ml: $p=0,008$, 25 ng/ml: $p=0,01$, 50 ng/ml: $p=0,024$, 100 ng/ml: $p=0,005$, 400 ng/ml: $p<0,001$). Ein signifikanter Unterschied in der Traceraufnahme fand zwischen jeder Konzentration von 6 bis 100 ng/ml verglichen mit 400 ng/ml statt, nicht jedoch zwischen zwei Therapiegruppen von 6 bis 100 ng/ml.

Im ^{18}F FLT-Aufnahmeversuch in vitro wurde sowohl bei Messung nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden eine eindeutige Tendenz hinsichtlich eines dosisabhängigen Rückgangs der FLT-Aufnahme festgestellt. Die Lymphomzellen zeigten je nach Dosis eine Reduktion der ^{18}F FLT-Aufnahme um 17,5 % (12,5 ng/ml) bis 73,4 % (400 ng/ml) bei Messung nach 24 Stunden und um 71,8 % (12,5 ng/ml) bis 92,1 % (400 ng/ml) bei Messung nach 48 Stunden.

Im Gegensatz dazu erfolgte im ^{18}F FDG-Aufnahmeversuch sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden eine variable und geringere Verminderung der ^{18}F FDG-Aufnahme bei den gemessenen Doxorubicinkonzentrationen. Eine deutliche Reduktion der FDG-Aufnahme fand erst bei hohen Doxorubicinkonzentrationen statt.

4.1.4 Zellzyklusanalyse

Nach Veränderungen im Zellzyklus wurde 24 und 48 Stunden nach Chemotherapie geforscht. Dies erfolgte durch fluorescence activated cell sorting (FACS) mit Propidiumjodid (PI), einen Marker für DNS.

Bei der Zellzyklusanalyse nach 24 Stunden zeigten sich Veränderungen des Zell-

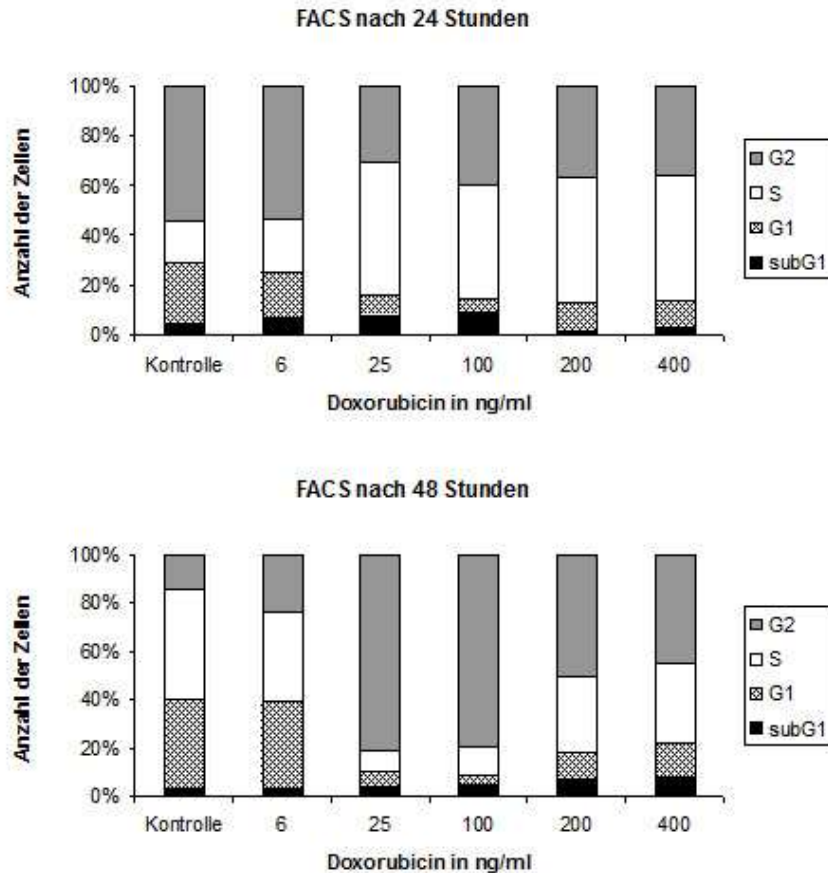


Abbildung 4.5: Zellzyklusanalyse mit PI-FACS 24 (obere Abbildung) und 48 (untere Abbildung) Stunden nach Therapie mit den angegebenen Dosen Doxorubicin, 1,5 Mio. Zellen/well, Mittelwerte, n=3 pro Gruppe außer Kontrolle 48 Stunden: n=6. Dargestellt sind die Veränderungen der Zellzyklusphasen subG1, G1, Synthese (S) und G2. Auffallend ist eine Zunahme der S-Phase nach 24 Stunden und ein G2-Arrest nach 48 Stunden.

zyklus bei den behandelten Zellen. Die Anzahl der apoptotischen Zellen (subG1) stieg von 4,7% bei den unbehandelten Kontrollen mit steigender Doxorubicinkonzentration bis 100 ng/ml stetig auf 9,8% und fiel bei noch höher dosierter Chemotherapie wieder ab. Die Zellen in der G1-Phase verhielten sich gegensätzlich dazu: die G1-Phase verschmälerte sich stetig von 24,4% bei den Kontrollen bis auf 4,9% bei einer Doxorubicinkonzentration von 100 ng/ml. Bei 200 und 400 ng/ml Doxorubicin verbreiterte sich die G1-Phase wieder auf je 11,2%. Die Synthese (S)-Phase erhöhte sich von 15,9% bei den unbehandelten Zellen (Kontrolle) auf

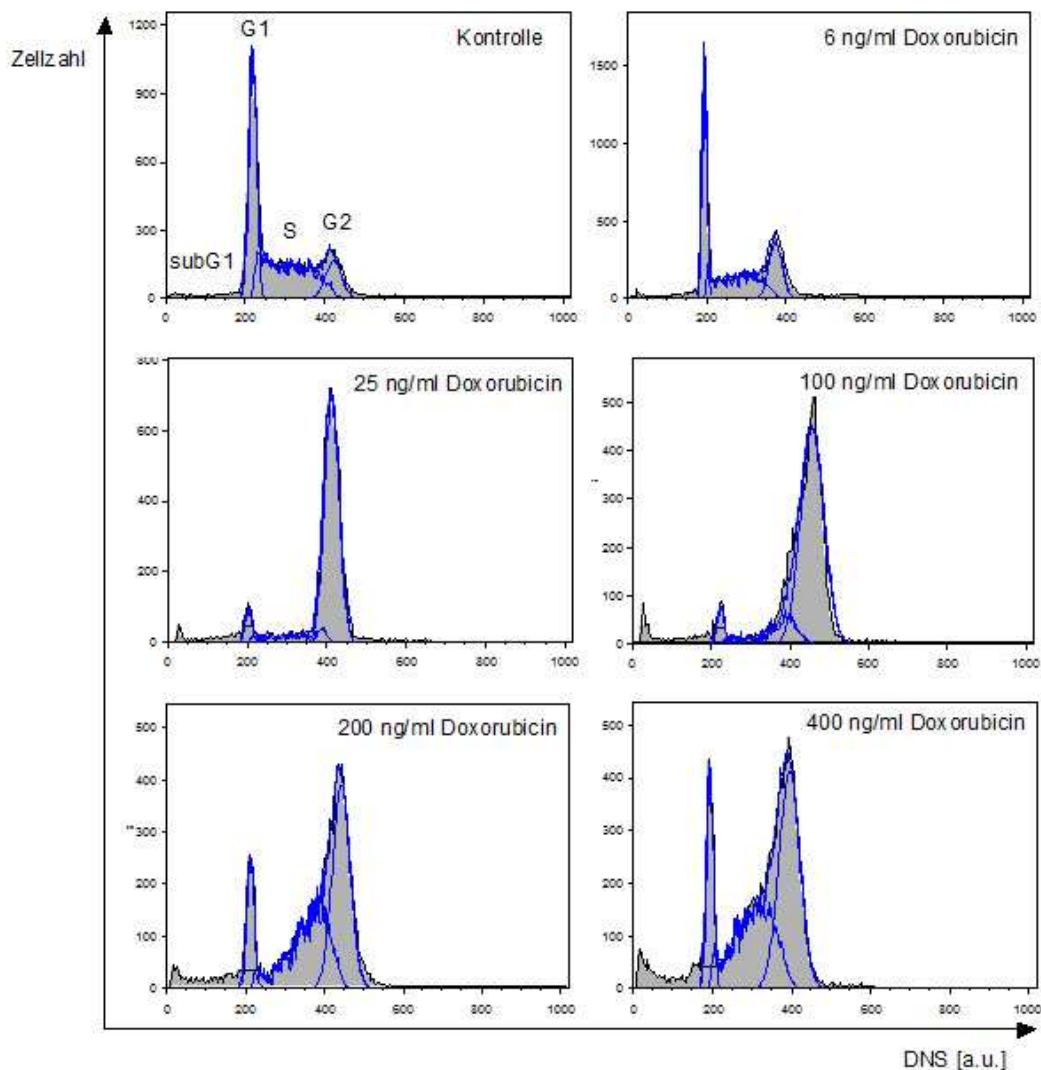


Abbildung 4.6: Zellzyklusanalyse mit PI-FACS nach Therapie mit den angegebenen Doxorubicinkonzentrationen nach 48 Stunden. Im Diagramm der Kontrolle (links oben) sind die Peaks mit den Zellzyklusphasen subG1, G1, Synthese (S) und G2 beschriftet. Auffallend ist eine Zunahme der G2-Fraktion.

20,1% bei einer Doxorubicinkonzentration von 6 ng/ml und auf 45 bis 50% ab einer Konzentration von 25 ng/ml Doxorubicin (25 ng/ml: 50,1%, 100 ng/ml: 45,7%, 200 ng/ml: 50,4%, 400 ng/ml: 49,0%). Die G2-Phase hingegen betrug bei den Kontrollen und bei niedrig dosierter Chemotherapie (6 ng/ml) ca. 50% und pendelte sich ab einer Doxorubicinkonzentration von 25 ng/ml bei ca. 30 bis 40% ein (25 ng/ml: 28,5%, 100 ng/ml: 40,9%, 200 ng/ml: 36,6%, 400 ng/ml:

34,7 %).

Insgesamt fiel bei der FACS-Analyse nach 24 Stunden auf, dass ab einer Doxorubicinkonzentration von 25 ng/ml deutliche Veränderungen des Zellzyklus auftreten (siehe Abb. 4.5). Die S-Phase stieg ab einer Doxorubicinkonzentration von 25 ng/ml auf ein hohes Niveau; die G2-Phase pendelte sich ab 25 ng/ml auf einem etwas niedrigerem Niveau ein. Es zeigte sich eine zunehmende Reduktion der G1-Phase sowie eine Zunahme der apoptotischen Zellen (subG1) bis 100 ng/ml. Bei höherer Doxorubicinkonzentration (200 und 400 ng/ml) verhielt es sich vice versa.

Die FACS-Analyse (Abb. 4.5 und Abb. 4.6) nach 48 Stunden erbrachte einen zunehmenden G2-Arrest bei Konzentrationen bis 100 ng/ml. In dieser Phase trat ab einer Doxorubicinkonzentration von 25 ng/ml ein deutlicher Sprung von 22,8 % bei 6 ng/ml Doxorubicin auf 78,5 % bei 25 ng/ml Doxorubicin auf. Dieser Sprung machte sich ebenfalls in der S-Phase bemerkbar: sie verringerte sich von 35,6 % bei 6 ng/ml Doxorubicin auf 9,5 % bei 25 ng/ml Doxorubicin. Bei Konzentrationen von 200 und 400 ng/ml wurde neben einem Wiederansteigen der S-Phase und einer Reduktion der G2-Phase auch ein wieder zunehmender G1-Arrest auf Werte über 10 % beobachtet. Am stärksten ausgeprägt fand sich dieser G1-Arrest allerdings bei den nicht (Kontrolle, G1=36,6 %) bzw. mit niedriger Chemotherapie (6 ng/ml, G1=35,0 %) behandelten Zellen. Die Fraktion der apoptotischen Zellen (sub-G1-Phase) stieg mit zunehmender Doxorubicinkonzentration stetig an. Sie war mit einem Maximum von 7,3 % bei 400 ng/ml jedoch bei jeder Konzentration eher niedrig.

Wie bei der FACS Analyse nach 24 Stunden fielen auch bei der Analyse nach 48 Stunden starke Veränderungen ab einer Doxorubicinkonzentration von 25 ng/ml auf. Während nach 24 Stunden ein Anstieg der Zellen in der S-Phase zu verzeichnen war, war nach 48 Stunden ein Zuwachs der Zellen in der G2-Phase bei Verminderung der S-Phase zu bemerken. Die G1-Phase verhielt sich nach 24 und 48 Stunden identisch: sie sank mit zunehmender Chemotherapie bis 100 ng/ml stetig und stieg bei hohen Doxorubicinkonzentrationen (200 und 400 ng/ml) wieder an. Auch die Anzahl der apoptotischen Zellen in der subG1-Phase verhielt sich mit einem stetigen Anstieg bis zu einer Doxorubicinkonzentration von 100 ng/ml nach 24 und nach 48 Stunden gleich und war bei beiden Messungen insgesamt niedrig.

4.2 In vivo Studie

Der zweite Schritt, um herauszufinden, ob der Proliferationsmarker ^{18}F FLT im Vergleich zum ^{18}F FDG dazu verwendet werden kann, nicht-invasiv und sehr früh das Therapieansprechen bei unterschiedlichen Dosen von Chemotherapie zu beurteilen, war die Evaluation im Xenotransplantat Model mit einer angemessenen und davor in vitro getesteten Lymphomzelllinie. Es wurde für die in vivo Studien die humane diffus-großzellige B-Zell-Lymphom-Zelllinie SUDHL-4 verwendet, um in der Maus Lymphom-Xenotransplantate zu erzeugen. Die ^{18}F Traceraufnahme wurde in vivo durch nicht-invasive PET-Aufnahmen und ex vivo durch Messungen im γ -Counter erfasst. Ex vivo wurden die Tumoren zudem histologisch und immunhistochemisch untersucht. Die Änderung des Tumolvolumens wurde mit Schublehrenmessung erfasst.

4.2.1 Änderung des Tumolvolumens nach Doxorubicintherapie

Die Änderung des Tumolvolumens nach Doxorubicintherapie wurde gemessen, um den Effekt der Chemotherapie auf das Tumorwachstum beurteilen zu können. Die Mäuse erreichten bis 4 Wochen nach Tumorzellinjektion eine Tumgröße von ca. $10\text{mm} \times 10\text{mm}$. Zu dem Zeitpunkt wurde ihnen dann entweder einmalig eine Dosis Doxorubicin ($25\ \mu\text{g}$, $50\ \mu\text{g}$, $100\ \mu\text{g}$ oder $200\ \mu\text{g}$) intraperitoneal verabreicht oder die Tiere wurden der Kontrollgruppe zugeteilt. Diese erhielt eine 0,9%ige NaCl-Lösung (pro Maus $100\ \mu\text{l}$ intraperitoneal). Die Größe des Xenotransplantats wurde an dem Tag der Chemotherapie (Tag 0) und an Tag 2 (n=6 pro Gruppe) bis Tag 9 (n=3 pro Gruppe) nach Therapie mit einer Schublehre gemessen. Ebenso wurde mit der Kontrollgruppe verfahren. Das Tumolvolumen wurde gemäß 3.3.2 berechnet und die Entwicklung des Wachstums dargestellt.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der eine Erhöhung von 80% (Standardfehler 30%) gemessen wurde, blieb das Tumolvolumen 48 Stunden nach Therapie in jeder Therapiegruppe weitgehend unverändert (siehe Abb. 4.7). An Tag 9 war das Tumolvolumen in den therapierten Tieren folgendermaßen gestiegen:

$25\ \mu\text{g}$: 62% (Standardfehler 14%, $p=0,032$)

$50\ \mu\text{g}$: 80% (Standardfehler 10%, $p=0,033$)

$100\ \mu\text{g}$: 42% (Standardfehler 1%, $p=0,029$)

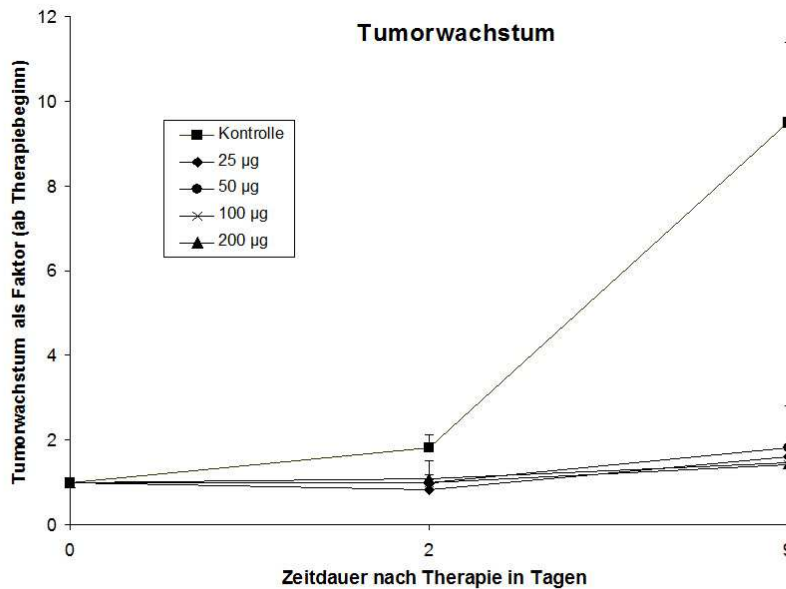


Abbildung 4.7: Dosisabhängiges Tumorstadium, gemessen am Tumorstadium, in vivo. Mediane Veränderung des Tumorstadiums in Kontrolltieren und therapierten Mäusen an Tag 2 ($n=6$ pro Gruppe) und Tag 9 ($n=3$ pro Gruppe). Tumorstadium vor Therapie (Tag 0) wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. An Tag 2 blieb das Tumorstadium der therapierten Mäuse weitgehend unverändert, während das der Kontrolltiere um 80 % anstieg. Am Tag 9 stellt sich der Unterschied noch deutlicher heraus: während bei den therapierten Mäusen nur ein geringer Zuwachs zu verzeichnen war, stieg das Tumorstadium der untherapierten Tiere auf über das 8fache.

200 µg: 46 % (Standardfehler 18 %, $p=0,031$)

In der Kontrollgruppe stieg das Tumorstadium auf +847 % (Standardfehler von 194 %). Es wurden signifikante Unterschiede des Tumorstadiums zwischen therapierten und untherapierten Tieren an Tag 9 dargestellt (s. p -Werte). Bei der geringen Anzahl der Versuchstiere wurde jedoch kein statistisch relevanter Unterschied im Tumorstadium zwischen den einzelnen Therapiegruppen festgestellt. Jedoch wurde die Tendenz beobachtet, dass bei höheren Doxorubicindosen (100 und 200 µg) im Vergleich zu niedrigeren Doxorubicindosen (25 und 50 µg) eine verstärkte Hemmung eintrat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 als Liniendiagramm mit Fehlerbalken grafisch dargestellt.

4.2.2 Beurteilung des frühen Therapieansprechens mit ^{18}F FLT- und ^{18}F FDG-PET

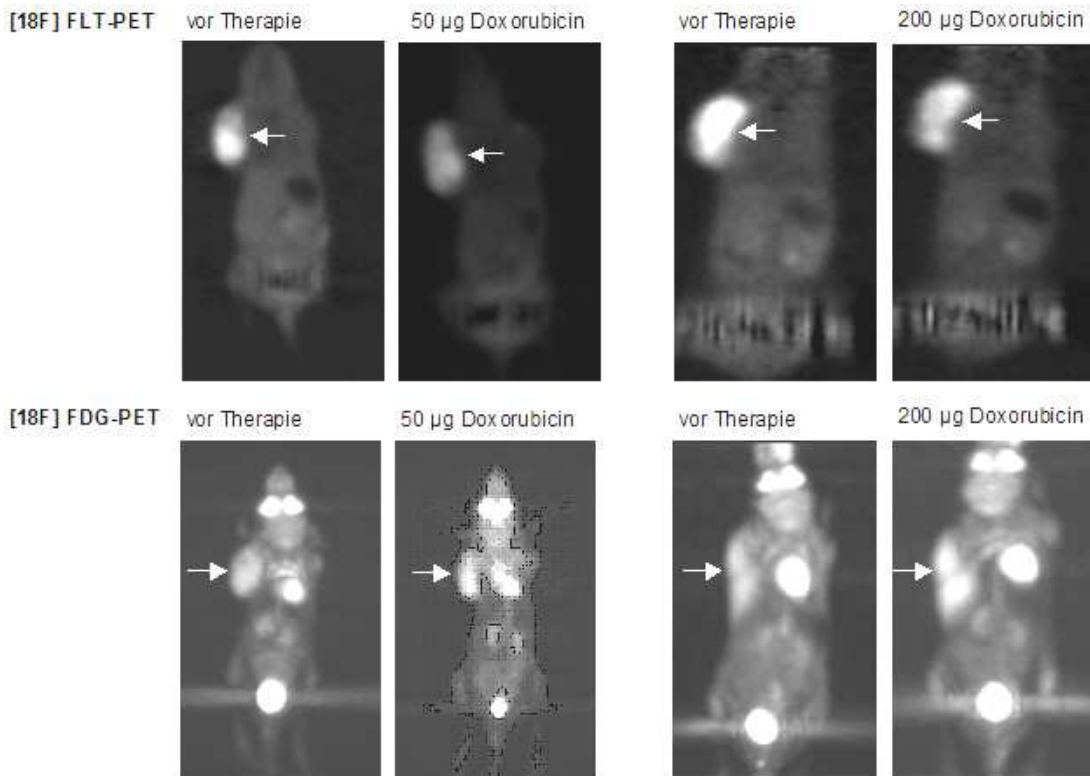


Abbildung 4.8: [18F] FLT- (oben) und [18F] FDG- (unten) PET-Aufnahmen (transaxiale Schnitte) typischer Mäuse 48 Stunden vor und nach Therapie mit $50\mu\text{g}$ (links) bzw. $200\mu\text{g}$ (rechts) Doxorubicin. In der FLT-PET ist eine verringerte Traceraufnahme in den Tumoren (Pfeile) nach Chemotherapie erkennbar, wohingegen sich in der FDG-PET eine erhöhte Traceraufnahme in den Tumoren (Pfeile) nach Therapie bemerkbar macht.

Als nächstes erfolgte die Untersuchung, ob die beobachteten Unterschiede zwischen FLT- und FDG-Aufnahme in vitro nach Chemotherapie in vivo reproduziert werden können. Um das frühe Therapieansprechen der Tiere auf zytotoxische Therapie zu evaluieren, wurden die Mäuse vor und 24 oder 48 Stunden nach der Chemotherapie mit Doxorubicin einem statischen ^{18}F FLT- bzw. ^{18}F FDG-PET unterzogen. Dies geschah, sobald mit der Schublehre eine Größe von mindestens $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$ gemessen wurde. Die PET-Aufnahmen vor der Chemotherapie (Tag 0, pre-Tx) stellten den Ausgangswert dar, zu dem die folgenden

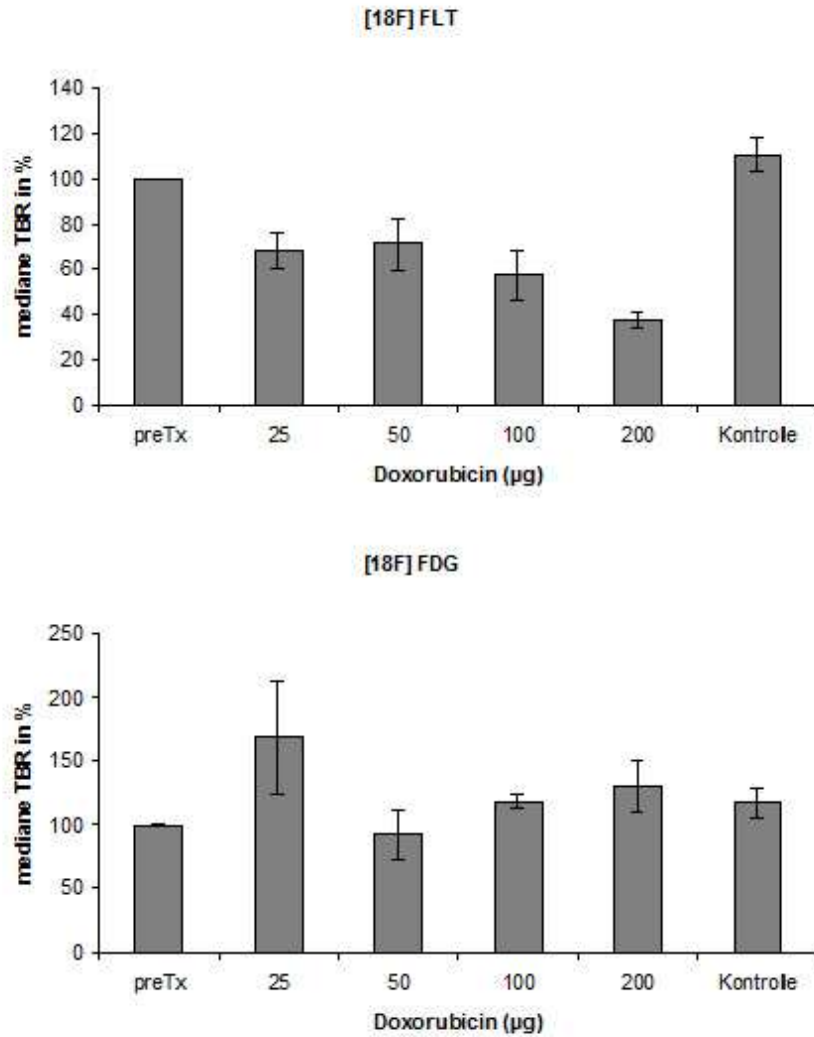


Abbildung 4.9: Medianer Tumor-Hintergrund-Quotient (TBR) der ^{18}F FLT-PET (obere Abbildung) und der ^{18}F FDG-PET (untere Abbildung) zu einem frühen Zeitpunkt nach Chemotherapie in den angegebenen Dosen. ^{18}F FLT-PET: $25\mu\text{g}$ und $50\mu\text{g}$: $n=6$, 100μ , $200\mu\text{g}$ und Kontrolle: $n=3$. ^{18}F FDG-PET: $25\mu\text{g}$: $n=3$, $50\mu\text{g}$: $n=4$, 100μ , $200\mu\text{g}$ und Kontrolle: $n=3$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Die TBR vor Therapie wurde als 100 % definiert. Die TBR der ^{18}F FLT-PET sinkt mit steigender Doxorubicinkonzentration, während die TBR der ^{18}F FDG-PET zwischen den Therapiegruppen stark schwankt.

PET-Messungen in Relation gesetzt wurden. Abb. 4.8 zeigt repräsentative PET Bilder zweier Mäuse, die Doxorubicin ($50\mu\text{g}$, $200\mu\text{g}$) erhielten. Zeigt der Tumor einen hohen Kontrast zum umliegenden Gewebe, wie dies am Tag 0 der PET Mes-

sungen der Fall war, spricht dies für eine hohe Traceraufnahme und entsprechend ein niedriger Kontrast für eine niedrige Traceraufnahme. Nach Therapie war die tumoröse ^{18}F FLT-Aufnahme in jeder Gruppe deutlich reduziert (siehe Abb. 4.8, obere Felder), wohingegen bei der ^{18}F FDG-PET bei beiden Dosen ein Anstieg der Traceraufnahme beobachtet wurde (siehe Abb. 4.8, untere Felder). Im Kontrolltier, d.h. ohne Chemotherapie, stieg das Signal sowohl im ^{18}F FLT- als auch im ^{18}F FDG-PET an. Zur objektiven Quantifizierung wurden Regions of Interest (ROI) in repräsentativen axialen Schnittebenen definiert, um damit den Tumor-Hintergrund-Quotienten (TBR) gemäß 3.3.5 zu berechnen und somit die Effekte der Chemotherapiedosen auf die Tracer vergleichen zu können. Die mediane TBR vor Therapie wurde als 100 % definiert und die Reduktion der TBR nach Therapie berechnet und in Abb. 4.9 graphisch dargestellt. Die Analyse der Varianz zeigte bei der ^{18}F FLT-PET eine signifikante Heterogenität bei der prozentualen TBR-Verteilung zwischen den Therapiegruppen ($p=0.008$), d.h. dass jede Gruppe für sich nicht zufällige Werte erzielt hat. Die multiple paarweise Beurteilung der Unterschiede der TBR (in %) zwischen Therapiegruppe und Kontrollgruppe mit dem Dunnett-Test zeigte in allen Vergleichen einen signifikant niedrigeren Wert der TBR (in %) der ^{18}F FLT-PET-Daten bei den therapierten Tieren. Die mediane ^{18}F FLT-TBR bei früher Messung verzeichnet einen signifikanten Rückgang auf folgende Werte:

25 μg : 68 % (Standardfehler 6,0 %, $p=0,02$)

50 μg : 71 % (Standardfehler 9,1 %, $p=0,037$)

100 μg : 57 % (Standardfehler 12,1 %, $p=0,008$)

200 μg : 37 % (Standardfehler 5,3 %, $p=0,001$)

Bei der Kontrollgruppe erhöhte sich der TBR leicht auf 110 % (Standardfehler 8.4 %).

Obwohl sich der Tumor-Hintergrund-Quotient jeder Therapiegruppe signifikant vom Tumor-Hintergrund-Quotienten der Kontrollmäuse und vom Ausgangswert unterschied, wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Therapiegruppen ausgemacht (p -Wert der univariaten Varianzanalyse =0,131). Es zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen Reduktion des Tumor-Hintergrund-Quotienten und Chemotherapiedosis ($r=-0,54$, $p=0,021$).

Die mediane TBR der FDG-PET dagegen verzeichnete nach Therapie einen Anstieg mit großen Unterschieden zwischen den Therapiegruppen. Es stellte sich le-

diglich eine schwache, statistisch nicht signifikante Korrelation zwischen Veränderung des Tumor-Hintergrund-Quotienten und Doxorubicindosis dar ($r=-0,13$, $p=0,668$). Im Einzelnen ergaben sich folgende Werte:

25 μg : 168 % (Standardfehler 52,2 %)

50 μg : 92 % (Standardfehler 19,6 %)

100 μg : 118 % (Standardfehler 6,1 %)

200 μg : 130 % (Standardfehler 23,2 %)

Bei der Kontrollgruppe wurde ein geringgradiger Anstieg des medianen TBR auf 117 % (Standardfehler 9,6 %) verzeichnet.

4.2.3 Organentnahme und Organverwertung der Versuchstiere

Um die im PET gemessenen Werte ex vivo im γ -Counter zu validieren, wurde den Mäusen das Xenotransplantat und folgende weitere Organe entnommen: Blut, Herz, Lunge, Leber, Magen, Pankreas, Milz, Dünndarm, Dickdarm, Niere, Tumor, Muskel, Knochen und Hirn.

Die Aktivität wurde im γ -Counter als counts per minute (cpm) gemessen und in Relation zum Gewicht (in g) des gemessenen Gewebes gesetzt. Wie bei der TBR der FLT- und FDG-PET-Aufnahmen wurde der Musculus quadrizeps femoris als Referenz verwendet und der Quotient aus der Aktivität des jeweiligen Gewebes und der Aktivität des Muskels gebildet. Anschließend wurde der Mittelwert der Quotienten berechnet.

Der Tumor-Muskel-Quotient belief sich bei dem Tracer ^{18}F FDG auf 7,18 (Kontrolle, $n=3$, $\text{SE}=3,0\%$), 7,36 (25 μg Doxorubicin, $n=3$, $\text{SE}=2,8\%$) und 5,11 (50 μg Doxorubicin, $n=3$, $\text{SE}=1,0\%$). Im Gegensatz dazu wurde bei dem Tracer ^{18}F FLT eine stetige Minderung von 9,16 (25 μg , $n=3$, $\text{SE}=0,7\%$) auf 8,27 (100 μg , $n=3$, $\text{SE}=2,6\%$) auf 6,61 (200 μg , $n=3$, $\text{SE}=2,5\%$) verzeichnet.

Bezüglich des Organ-Muskel-Quotienten zeigte das Xenotransplantat bei dem Tracer ^{18}F FLT mit deutlichem Abstand den größte Unterschied zur Hintergrundaktivität. Eine starke ^{18}F FLT-Aufnahme fand sich zudem im Nierengewebe, während im Hirngewebe im Gegensatz zur ^{18}F FDG kaum eine Anreicherung stattfand. (siehe Abb. 4.10) Das Maximum der ^{18}F FDG-Aufnahme zeigte sich im Herzmuskel, gefolgt von Xenotransplantat, Gehirn und Nierengewebe.

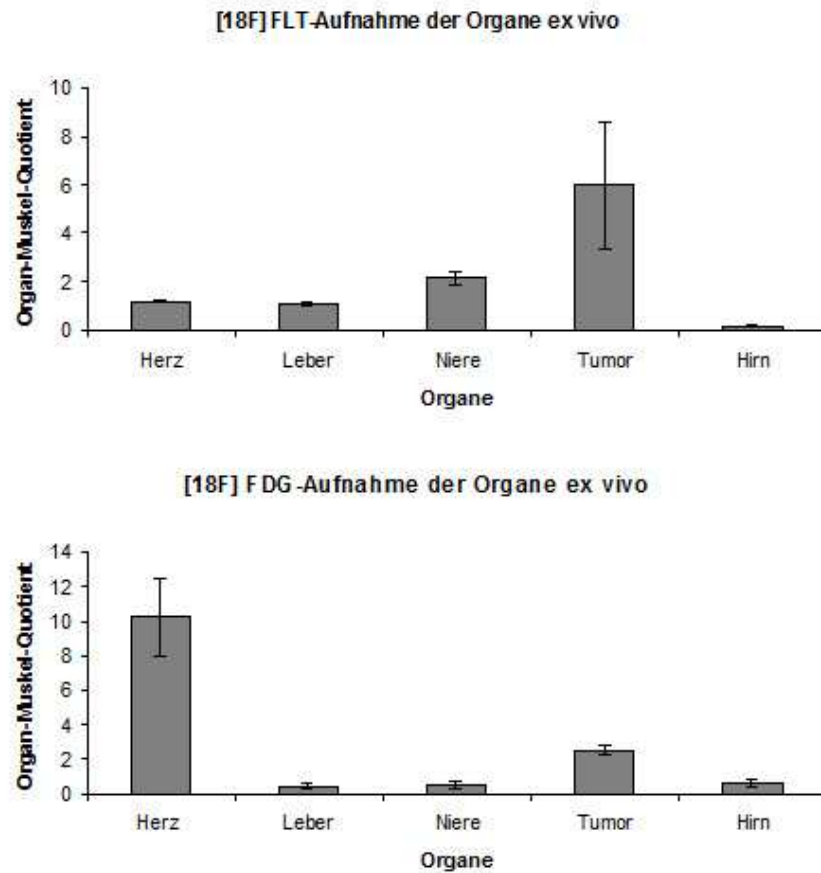


Abbildung 4.10: Mediane ^{18}F FLT (obere Abb.) und ^{18}F FDG (untere Abb.) - Aufnahme der Organe relativ zum Musculus quadrizeps femoris, gemessen ex vivo als Organ-Muskel-Quotient 48 bzw. 72 Stunden nach Chemotherapie, $n=3$ pro Gruppe. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Die FLT-Aufnahme erfolgt an erster Stelle in das Xenotransplantat, wohingegen die FDG-Aufnahme ein Maximum im Herzmuskel aufweist. Während die Niere bei beiden Tracern gut anreichert, dringt das FLT kaum in das Hirngewebe vor.

Im Folgenden eine Auflistung der in Abb. 4.10 dargestellten Mediane und SE der Organ-Muskel-Quotienten mit FLT: Herz 1,23 (SE 0,04), Leber 1,10 (SE 0,08), Niere 2,16 (SE 0,29), Tumor 5,95 (SE 2,62), Hirn 0,18 (SE 0,03) sowie mit FDG: Herz 10,27 (SE 2,22), Leber 0,45 (SE 0,17), Niere 0,56 (SE 0,22), Tumor 2,54 (SE 0,27), Hirn 0,64 (SE 0,18).

4.2.4 Histologie und Immunhistochemie der entnommenen Xenotransplantate

Die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen verfolgten das Ziel, herauszufinden, wie die bei den unterschiedlichen Chemotherapiedosen sich unterscheidende Traceraufnahme bei der Positronenemissionstomographie zustande kommt.

Nachdem die PET-Untersuchungen erfolgt waren, wurde das Lymphom Xenotransplantat sowohl für Histologie (HE-Färbung) als auch für Immunfärbungen mit dem proliferationspezifischen Antigen Ki67 bzw. mit dem Markerprotein Aktivierte Caspase 3 als Apoptosemarker entnommen.

Mit dem Proliferationsmarker Ki67 steht eine validierte Methode zur Untersuchung von Gewebedünnschnitten von Non-Hodgkin-Lymphomen zur Verfügung [120]. Es wurde eine quantitative Auswertung der Immunhistochemie vorgenommen. Der dazu benötigte Proliferationsindex errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Ki67 Index} = \frac{\text{anti-Ki67 immungefärbte Zellen}}{\text{alle Zellen}}$$

Bei unbehandelten Lymphomen bewegte er sich im Bereich zwischen 0,23 und 0,32 (siehe Abb. 4.11). Die multiple paarweise Beurteilung der Unterschiede des Ki67-Indexes zwischen Therapiegruppe und Kontrollgruppe mit dem Dunnett-Test erbrachte in allen Vergleichen signifikant niedrigere Ki67-Index Werte für therapierte Lymphome:

25 μg : $p = 0,007$

50 μg : $p < 0,001$

100 μg : $p < 0,001$

200 μg : $p < 0,001$

Es zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede in den Ki67-Indizes zwischen den einzelnen Therapiedosen (p -Wert der univariaten Varianzanalyse = 0,013). Durch mehrfache Vergleiche wurde gezeigt, dass die Heterogenität der Ki67-Index Verteilung hauptsächlich durch den Unterschied zwischen 25 μg und 50 μg (angepasster p -Wert nach Bonferroni: $p = 0,018$) und zwischen 25 μg und 200 μg (angepasster p -Wert nach Bonferroni: $p = 0,037$) erklärbar ist.

Die explantierten Tumore zeigten einen dosisabhängigen Abfall des Proliferati-

onsmarkers Ki67, jedoch keine Veränderung des Apoptosemarkers Caspase 3.

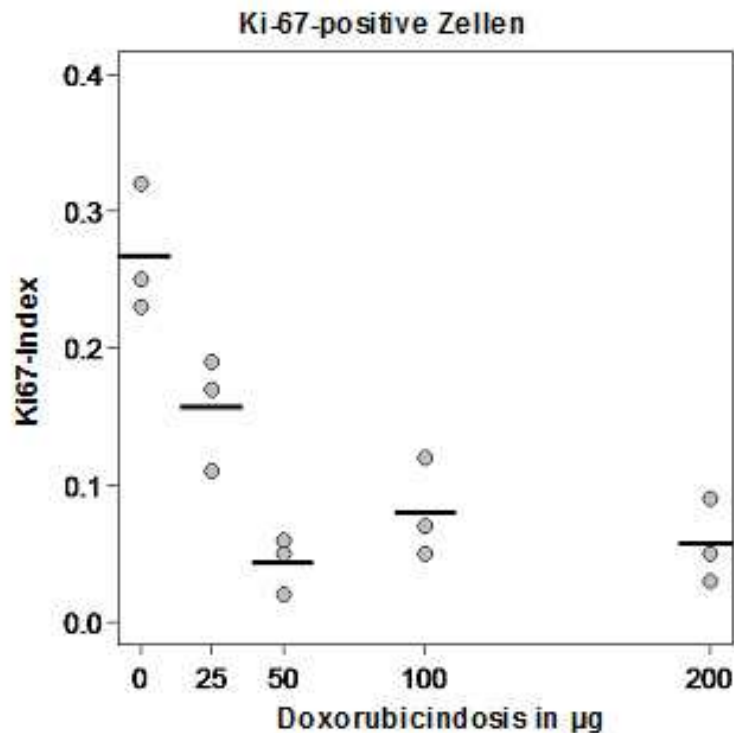


Abbildung 4.11: Ki67 Proliferationsindex als Punktdiagramm 48 Stunden nach Behandlung mit Doxorubicin in den angegebenen Dosen bzw. ohne Therapie (Kontrolle), n=3. Bei den Therapiegruppen zeigt sich ein Rückgang der Ki67-Index-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch zwischen den einzelnen Therapiegruppen gibt es signifikante Unterschiede in den Ki67 Indizes.

Der aktivierte Zustand des Proteins Caspase 3 findet sich während der Phase der Apoptose. Die Teilnahme des Proteins Caspase 3 am Apoptosemechanismus von Lymphomzellen wurde schon von Zhang et al. [137] untersucht. Bei den immunhistochemischen Färbungen mit der aktivierten Caspase 3 wurden keine relevanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Therapiegruppen festgestellt. Obwohl eine Anhäufung apoptotischer Zellen in manchen Tumorebenen beobachtet werden kann, belief sich der Anteil der Caspase 3-positiven Zellen in diesen Schnitten auf unter 5%. Zur grafischen Darstellung siehe Abb. 4.12.

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) zeigten sich im Tumorgewebe der Therapiegruppen v.a. Lymphomzellen, teilweise mit kleinen nekrotischen Arealen und

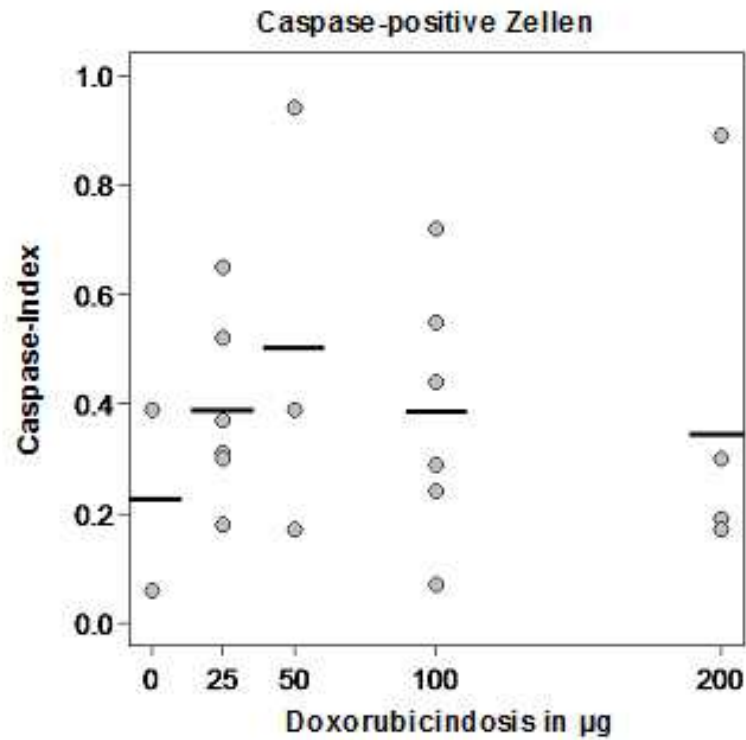


Abbildung 4.12: Caspase-Index als Punktdiagramm 48 Stunden nach Behandlung mit Doxorubicin in den angegebenen Dosen bzw. ohne Therapie (0). 0μ : $n=2$, 25μ : $n=6$, 50μ : $n=3$, 100μ : $n=6$, 200μ : $n=5$. Es wurden keine relevanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Therapiegruppen festgestellt.

wenigen Stromazellen. Insbesondere in der Nähe von Gefäßen wurden nach Therapie zudem Entzündungszellen, z.B. Makrophagen (siehe Abb. 4.13), beobachtet.

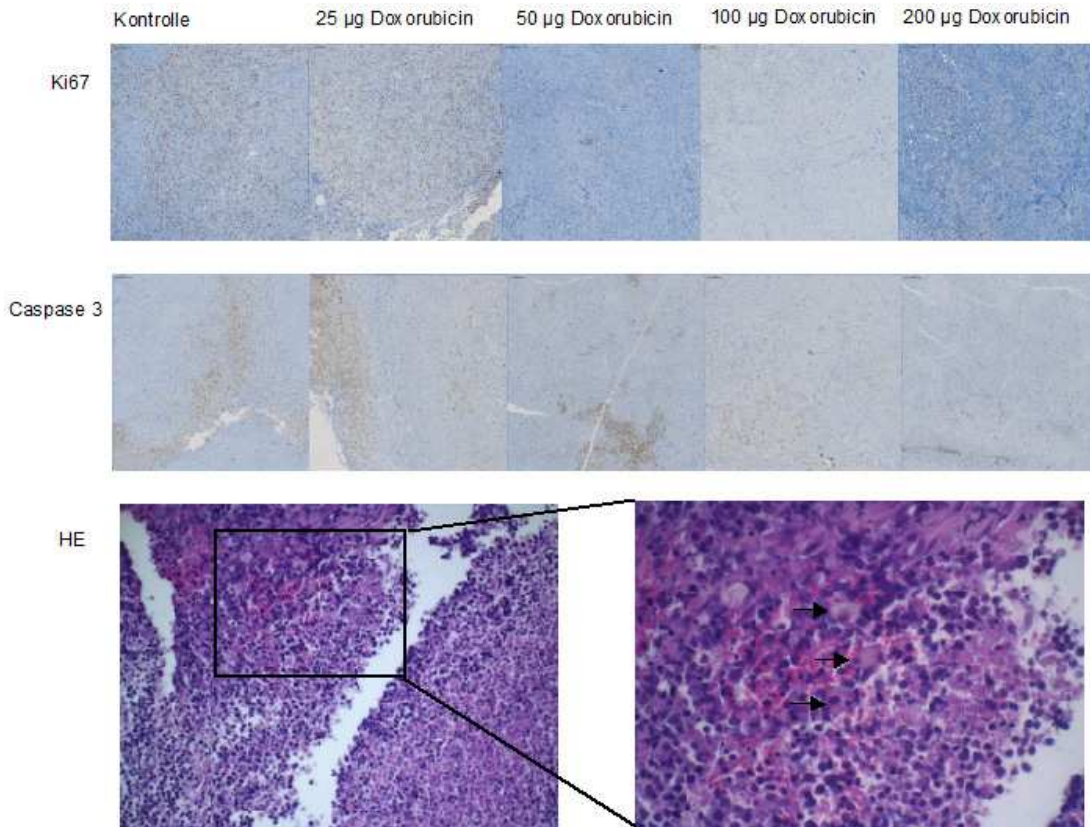


Abbildung 4.13: Tumor Xenotransplante ex vivo 48 Stunden nach Therapie mit den angegebenen Dosen Doxorubicin oder ohne Therapie (Kontrolle), gefärbt mit Hämatoxylin und Eosin (HE) oder Immunfärbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 oder aktivierte Caspase 3. Mäuse ohne Therapie zeigen eine hohe proliferative Aktivität in der Ki67 Färbung. Chemotherapierte Mäuse zeigen eine signifikant reduzierte Proliferationsrate in der Ki67 Färbung, jedoch keine relevanten Unterschiede in der Anzahl der apoptotischen Zellen, die aktivierte Caspase 3 exprimieren. Die Standard HE Morphologie nach Therapie mit 50µg zeigt eine Infiltration von Entzündungszellen (Pfeile), insbesondere in der Nähe von Gefäßen.

Kapitel 5

Diskussion

In der Klinik erfolgt die Evaluation des Therapieansprechens üblicherweise Wochen oder Monate nach Beginn der Therapie, insbesondere mit auf Morphologie basierenden Bildgebungstechniken wie der CT oder der MRT [16][71]. Bei Patienten mit therapieresistenter Krankheit würde eine frühe Beurteilung des Therapieansprechens jedoch eine Therapieanpassung erlauben, bevor Änderungen in der Tumorgröße sichtbar sind. Damit kann neben dem Krankheitsfortschritt auch Therapie Nebenwirkungen und Kosten vorgebeugt werden. Momentan wird die ^{18}F FDG-PET bereits zur Therapiekontrolle eingesetzt, jedoch weist sie einige Limitationen, wie falsch positive Ergebnisse, auf (siehe 1.4) [80][44], sodass es sinnvoll ist, einen besseren *in vivo* Marker für die frühe Vorhersage des Therapieansprechens zu entwickeln. Es wurde bereits belegt, dass Proliferation ein spezifischeres Merkmal von Carcinomen ist als erhöhter Glucosestoffwechsel [128]. In dieser Dissertation wurde der Frage nachgegangen, ob ^{18}F FLT ein geeigneterer Tracer für die Vorhersage des frühen Therapieansprechens ist. Da bei diesem Radiopharmakon ein enger Zusammenhang zwischen Traceraufnahme in die Tumorzellen und proliferierenden Zellen besteht [132][11][13], und bereits eine hohe Sensitivität bei der Lymphomdetektion beschrieben wurde [132], scheint er zur Evaluation proliferativer Aktivität geeignet zu sein. *In vitro* Studien dazu wurden unter anderem von van Waarde et al. mit Gliomzellen [127], von Direcks et al. und Dittmann et al. mit Mammacarcinomzellen [24][26] und von Wagner et al. mit Lymphomzellen [132] durchgeführt. *In vivo* wurde die Fragestellung in den letzten Jahren im Lymphom-Xenotransplantat-Mausmodell unter anderem von Wagner et al. [132], Buck et al. [12] und Graf et al. [39] untersucht. Auch anhand

der Krankheit im Menschen wurde über die Eignung des ^{18}F FLT als Therapieprädiktor geforscht [47][46][11][48].

Da die Chemotherapiedosis unter gewissen Umständen, z.B. bei älteren Patienten, angepasst werden muss [88], scheint es insbesondere angesichts der demografischen Entwicklung unserer Gesellschaft sinnvoll, einen Tracer zu etablieren, der Therapieansprechen in Tumoren auch in einer dosisabhängigen Weise wiedergibt. In dieser Dissertation wurde neben der frühen Therapiereponse auch die Dosis-Wirkungs-Beziehung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht.

Um auf dem Gebiet der Therapiereponse forschen zu können, gilt es, zunächst die Grundlagen zu verstehen. Chemotherapeutika bewirken ein Therapieansprechen meist durch einen Zellzyklusarrest oder eine Induktion des programmierten Zelltodes, die so genannte Apoptose. Wenn in einem Areal viele Zellen apoptotisch werden, wirkt sich das mikro- oder gar makroskopisch in einer Nekrose aus. Die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin, das in dieser Laborarbeit eingesetzt wurde, resultiert in einen Zellzyklusarrest oder einer Apoptose [22][138]. Die Apoptose ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Anthracycline an die Zellmembran binden und somit zu einer Erhöhung der Permeabilität führen. Doxorubicin ist ein Anthracyclin, das durch Interkalation in die DNS, Hemmung der Polymerase sowie der Topoisomerase II die DNS-Replikation, die Transkription und die Mitose blockiert [78][34][36]. Doxorubicin wirkt durch Alkylierung und Vernetzung der DNS [38][113] und hemmt die Topoisomerase 2 alpha durch Bindung an das Enzym [89]. Topoisomerase formt dann einen Komplex mit der DNS, der mit Hilfe freier Radikale einen DNS-Doppelstrangbruch verursacht [72][112]. In unbehandelten Zellen entspiralisiert Topoisomerase II die Helixwindungen des DNS-Doppelstrangs, so dass Replikation und Transkription stattfinden kann. Das Chemotherapeutikum Doxorubicin hemmt jedoch nicht direkt den Thymidinmetabolismus oder den salvage pathway. Es handelt sich um ein Medikament, das auch im klinischen Alltag häufig eingesetzt wird.

Für sämtliche Versuche wurde die humane hochmaligne Lymphom-Zelllinie SUDHL-4 verwendet, die eine Verdopplungszeit von ca. 40 Stunden hat und eine hohe Proliferationsrate aufweist [29].

5.1 In vitro Studie

Im ersten Schritt wurde *in vitro* untersucht, ob die frühe Therapieresponse in Dosis-Wirkungs-Beziehung mit den beiden radioaktiven Markern ^{18}F FLT und ^{18}F FDG nachgewiesen werden kann und ob dabei das ^{18}F FLT dem ^{18}F FDG überlegen ist.

Dafür wurde zuerst mit dem Zytotoxizitätstest mit MTT als Methode zur Messung der Zellwachstumshemmung getestet, ob die Lymphomzelllinien SUDHL-4 und EHEB für die Fragestellung des frühen Therapieansprechens geeignet sind. Diese Tests ergaben, dass die in allen Experimenten verwendete Zelllinie SUDHL-4 geeignet ist, Zellproliferation bzw. -reduktion zu einem frühen Zeitpunkt anzuzeigen. Da sich die Tumorzelllinie EHEB, möglicherweise aufgrund der niedrigeren Zellteilungsrate, dafür als weniger geeignet erwies (siehe 4.1.1), wurde sie in den folgenden Versuchen nicht mehr verwendet. Die Unterschiede sind möglicherweise auf die niedrigere Verdopplungszeit der SUDHL-4-Zellen (ca. 40 Stunden [29]) gegenüber der EHEB-Zellen (50-70 Stunden [28]) zurückzuführen.

Proliferation und Zellviabilität *in vitro* wurden neben dem Zytotoxizitätstest mit MTT auch durch Zellzahlbestimmung bei der Vitalitätsprüfung mit dem Farbstoff Trypanblau gemessen. Es wurde in der Vitalitätsprüfung sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden ein Ansprechen der Tumorzellen auf Chemotherapie festgestellt.

Die beiden Untersuchungen zeigten, dass die Tumorzelllinie SUDHL-4 auf niedrige Doxorubicinkonzentrationen bis 6 ng/ml (MTT-Test) bzw. 12,5 ng/ml (Vitalitätstest mit Trypanblau) empfindlich reagiert und geeignet ist, Zellproliferation bzw. -reduktion zu einem frühen Zeitpunkt anzuzeigen.

Als nächstes wurden die SUDHL-4-Zellen chemotherapiert und mit Radioaktivität inkubiert. Mit den ^{18}F FLT- und ^{18}F FDG- Aufnahmeversuchen wurde getestet, wie sich die Aufnahme der radioaktiven Tracer ^{18}F FLT und ^{18}F FDG im Vergleich bei Chemotherapie mit unterschiedlichen Dosierungen verändert. Es wurde evaluiert, ob das Radionukleosid ^{18}F FLT ein verlässlicher Biomarker für die Proliferation von Lymphomzellen ist.

In vitro zeigte sich erst bei sehr hohen Konzentrationen Doxorubicin und erst nach 48 Stunden eine Abnahme der ^{18}F FDG-Aufnahme, was möglicherweise an einem unspezifischen Glucosemetabolismus durch infiltrierende Entzündungszellen liegt.

Denn durch den vermehrten Glucosemetabolismus wird möglicherweise die therapiebedingte Abschwächung des Signals bei niedrigeren Doxorubicindosen bzw. bei geringerer Einwirkzeit des Doxorubicins ausgeglichen, sodass der Effekt der Chemotherapie erst bei höheren Dosen bzw. längerem Einwirken sichtbar wird. Diese Hypothese steht in Einklang mit den *in vivo* und *ex vivo* Versuchen: Bei den *in vivo* Versuchen war selbst bei Chemotherapie mit hohen Dosierungen keine gerichtete Reduktion der ^{18}F FDG-Aufnahme nach Therapie erkennbar. In der histologischen Untersuchung des *ex vivo* gewonnenen Gewebes fielen in der HE-Färbung Entzündungszellen auf.

Bei den ^{18}F FLT-Aufnahmeversuchen wurde im Gegensatz dazu sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die deutliche Tendenz eines dosisabhängigen Rückgangs der ^{18}F FLT-Aufnahme beobachtet. *In vitro* stellte sich dieser Sachverhalt in einer ausgeprägten Dosis-Wirkungs-Beziehung dar.

Insgesamt spiegelten sich die in der Traceraufnahme *in vitro* beobachteten Effekte der Chemotherapie in den Aufnahmeversuchen *in vivo* wider: Im Gegensatz zum Tracer ^{18}F FLT zeigte sich unter Verwendung des Tracers ^{18}F FDG *in vitro* lediglich eine dosisunabhängige, nicht lineare Abnahme der Traceraufnahme und *in vivo* kein eindeutiger Effekt der Chemotherapie nachgewiesen wurde.

Die Versuche deuten auf eine Überlegenheit des Tracers ^{18}F FLT gegenüber dem ^{18}F FDG in einem experimentellen Umfeld hin.

Um zu untersuchen, mit welchen Veränderungen im Zellzyklus die Reduktion der ^{18}F FLT-Aufnahme einhergeht, wurde eine Zellzyklusdistributionsanalyse mit PI-Farbstoff durchgeführt. Die Zellzyklusanalyse ist eine Methode zur Abbildung von DNS. Unter Zellzyklus versteht man den wiederholten Ablauf von Mitose und Interphase. Er setzt sich aus den Phasen G1 (gap 1), S (Synthese), G2 (gap 2) und M (Mitose) zusammen. Die Bezeichnung ist auf Howard und Pelc zurückzuführen [51]. Die G1-, S- und G2-Phase bilden die Interphase, die auch als Wachstumsphase bezeichnet wird. In der postmitotischen G1-Phase finden Wachstumsvorgänge sowie die Kontrolle der DNS statt. Hier erfolgt die Proteinbiosynthese, bestehend aus Transkription und Translation, zur Produktion von Zellbestandteilen. Es wird mRNA für Histone und Replikationsenzyme synthetisiert, um in der nachfolgenden Synthese-Phase die DNS-Replikation und Produktion von Histonen zu ermöglichen. Nach der Synthesephase besteht bis zur Kernteilung ein doppelter

Chromosomensatz. In der prämitotischen G₂-Phase erfolgt die Kontrolle der DNS nach Replikation sowie die Produktion von zellteilungsspezifischen Proteinen und RNS zur Vorbereitung auf die Mitose. Auf die Interphase folgt die Mitose, in der die Teilung der Chromosomen stattfindet.

Für das Fortschreiten der Zellen innerhalb des Zellzyklus müssen Kontrollpunkte passiert werden. In der G₁-Phase beispielsweise befindet sich der sogenannte Restriktionspunkt, an dem entschieden wird, ob die Zelle den Zellzyklus ein weiteres Mal durchläuft, oder ob sie durch Differenzierung in eine Gewebezelle in die G₀-Phase übertritt. Auch am Übergang von der G₂-Phase zur M-Phase befindet sich ein Kontrollpunkt, den die Zellen passieren müssen, um in die Mitose eintreten zu können. Der Zellzyklus arretiert, wenn die Replikation unvollständig ist oder Schäden in der DNS vorhanden sind. Ein weiterer Kontrollpunkt befindet sich in der M-Phase; er ist für die Einleitung der eigentlichen Zellteilung entscheidend. [111]

Mit der Zellzyklusanalyse wurde in dieser Dissertation bei Messung zu einem sehr frühen Zeitpunkt (24 Stunden) ein Anstieg der Synthese-Phase nach jeglicher Dosis Chemotherapie dargestellt. Auch Direcks et al. beobachteten einen Zuwachs der S-Phase 24 Stunden nach Doxorubicinbehandlung, jedoch in einer nicht signifikanten Weise [24]. Möglicherweise kommt nach 24 Stunden der replikationshemmende Effekt von Doxorubicin in Form eines S-Phasen-Arrestes zum Ausdruck. Wie oben beschrieben, resultiert diese Wirkung aus der Hemmung der DNS-abhängigen DNS-Polymerase [78] sowie der Bindung an Topoisomerase II alpha [89][91]. Passend dazu, dass das Vorrücken in die nächste Phase G₂ nach 24 Stunden noch nicht erfolgt ist, verringerte sich in den Versuchen, die dieser Dissertation zu Grunde liegen, die G₂/M-Phase nach 24 Stunden Inkubationszeit im Vergleich zur Kontrolle nach jeglicher Dosis Chemotherapie. Als Hauptaussage der Zellzyklusanalyse gehen die Zellen nach 48 Stunden Inkubationszeit dagegen in einen G₂/M-Arrest. Neben einer dosisabhängigen Verbreiterung der G₂/M-Phasen-Fraktion zeigte sich zudem eine Verschmälerung der S-Phasen-Fraktion, wobei bei Chemotherapie mit sehr hohen Dosierungen (200 und 400 µg) die S-Phase zu Lasten der G₂/M-Phase wieder anstieg. Auffallend ist zudem sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden Inkubationszeit eine Reduktion der G₁-Phase. In Übereinstimmung dazu beschreibt auch Direcks et al. eine signifikante Verschmälerung der G₁-Fraktion bereits nach 24 Stunden sowie eine signifikante Ak-

kumulation in der G2/M-Phase 48 Stunden nach Chemotherapie mit Doxorubicin [24]. Entsprechend den Resultaten dieser Dissertation zeigt sich nach 24 Stunden eine Verbreiterung der S-Phase und eine Verschmälerung der G2/M-Phase [24]. Dagegen verzeichnet die S-Phase nach 48 Stunden einen geringfügigen Rückgang, wohingegen als Kernaussage der Zellzyklusanalyse die G2/M-Phase nach 48 Stunden mit erheblicher Signifikanz ansteigt [24]. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der Versuche, die dieser Dissertation zugrunde liegen.

Von einem Doxorubicin-induzierten G2/M-Phasen-Block berichten auch Di Bartolomeo et al. [22]. Vergleichbare Beobachtungen machen Smith et al. bei humanen B-Zell-Lymphomzellen 24 Stunden nach Doxorubicinbehandlung ab der minimalen zytostatischen Konzentration [113]: die G1-Fraktion sinkt mit zunehmender Dosierung, wohingegen die S-Phase einen steten Zuwachs verzeichnet, d.h. das Verhältnis von G1- zur S-Phase verhält sich mit zunehmender Doxorubicinkonzentration gegenläufig. Das bedeutet, dass die Lymphomzellen den G1-S-Phasen-Kontrollpunkt nach Chemotherapie durchlaufen können [113]. Während Doxorubicin in hohen Dosierungen einen S-Phasen-Arrest verursacht, beobachtet Smith et al. bei niedriger Konzentration einen G2/M-Phasen-Block [113]. Diese Tendenz zeigte sich auch bei der Zellzyklusanalyse dieser Dissertation nach 48 Stunden: während der G2-Arrest bei niedrigeren Doxorubicinkonzentrationen (25 und 100 μg) sehr ausgeprägt war, kam es bei höheren Dosen Doxorubicin (200 und 400 μg) zu einem Wiederanstieg der S-Phase zu Lasten der G2-Phase.

Bei Potter et al. wird eine signifikant verminderte G1-Fraktion bei Erhöhung der S- und G2/M-Fraktion 24 Stunden nach Doxorubicinbehandlung dargestellt [91]. Dabei ist der DNS-Schaden 1 bis 24 Stunden nach Doxorubicinbehandlung in jeder Zellzyklusphase (G1, S, G2/M) signifikant höher als in unbehandelten Zellen [91].

Möglicherweise ist der DNS-Schaden in der G1-Phase dem die Transkription behindernden doxorubicininduzierten Topoisomerase-DNS-Komplex zuzuschreiben [91]. Die RNS-Synthese wird durch Hemmung der RNS-Polymerase sowie der Topoisomerase II alpha durch Doxorubicin vermindert [78][34][112]. Dies führt zu einer Beeinträchtigung von Wachstumsvorgängen wie der Ergänzung von Zellbestandteilen. Durch die eingeschränkte Synthese der mRNS von Replikationsenzymen und Histonen ist zudem die Vorbereitung der nachfolgenden DNS-Replikation beeinträchtigt. Dass in der S- und v.a. der G2/M-Phase mehr Strang-

brüche verursacht werden als in der G1-Phase [91], ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass in diesen Zellzyklusphasen zusätzlich eine Beeinträchtigung der Replikation bzw. der Chromosomentrennung bei der Zellteilung stattfindet [91][90][36][112]. Entsprechend den Strangbrüchen verhält sich die Expression und Aktivität des Enzyms Topoisomerase II alpha: Austin et al. berichten über Studien, in denen die Enzymexpression ein Maximum in der späten S- und G2/M-Phase erreicht, in der G1-Phase jedoch kaum vorhanden ist [4]. Auch die Phosphorylierung des Enzyms nimmt mit fortschreitendem Zellzyklus zu [52][2]. Dies deutet darauf hin, dass der Großteil des durch Topoisomerase II-hemmende Substanzen verursachten DNS-Schadens auf die Beeinträchtigung der Topoisomerase II alpha zurückzuführen ist [36]. In der G1-Phase herrscht überwiegend die beta-Isoform der Topoisomerase II vor, deren Expression unabhängig von den Zellzyklusphasen erfolgt und die in geringerem Ausmaß medikamenteninduzierte Strangbrüche verursacht [4]. Da nach Doxorubicinbehandlung von Zellen ohne Topoisomerase II alpha kein signifikanter Unterschied in den Zellzyklusphasen dargestellt wurde, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Spezifität der Zellzyklusphasen bei DNS-Schaden von der Expression des Enzyms Topoisomerase II alpha abhängig ist [91]. Bei vorhandener Expression verursachen Topoisomerase II alpha-hemmende Substanzen somit DNS-Schäden mit hoher Spezifität bezüglich der Zellzyklusphasen [91]. Durch Hemmung des in der G2/M-Phase hochregulierten Enzyms Topoisomerase II resultiert folglich ein G2/M-Phasen-Arrest [24][91].

Daneben gibt es Hinweise dafür, dass nur die Kombination von Topoisomerasehemmung und anderen zellulären Faktoren wie der Regulation von Zellzykluskontrollpunkten und Apoptosemechanismen zum Zellzyklusarrest bzw. Zelltod führt [113][69][73][60][27]. Denkbar ist, dass die Zellen nicht in die Präsynthesephase (G1-Phase) vorrücken können und dadurch in der G2-M-Phase akkumulieren. Da Doxorubicin die M-Phase beeinträchtigt, kann möglicherweise der Kontrollpunkt in der M-Phase, an dem über die Einleitung der eigentlichen Zellteilung entschieden wird [111], nicht passiert werden; das Resultat ist ein Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase.

Wenn ein Kontrollpunkt beispielsweise aufgrund eines DNS-Schadens nicht passiert werden kann und die Reparaturmechanismen nicht ausreichen, den Schaden zu beheben, kann der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet werden. Die Induktion der Apoptose durch Tumorsuppressorproteine wie p53 dient

der Verhinderung einer Tumorentstehung. Die Fraktion der apoptotischen Zellen befinden sich in der SubG1-Phase. In der Zellzyklusanalyse dieser Dissertation stellte sich nach 48 Stunden mit zunehmender Doxorubicinkonzentration eine ansteigende subG1-Fraktion dar, d.h. Zellen gingen vermehrt in Apoptose. Bei einem Maximum von 7,3% war die Induktion des programmierten Zelltodes jedoch insgesamt niedrig. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Kontrollpunkt zwar nicht passiert werden kann, die Reparaturmechanismen jedoch noch aktiv sind; die Folge ist ein Zellzyklusarrest. Erst bei zunehmender Dosis an Chemotherapie wird die Apoptose eingeleitet.

Die Apoptosemechanismen bei Anthracyclinen differieren durch unterschiedliche Wirkungsweisen. Zwelling et al. beispielsweise zeigen, dass der Apoptosemarker endonucleolytic cleavage in humanen Leukämiezellen durch Doxorubicin im Gegensatz zu Idarubicin nicht exprimiert wird [140].

Klinische Studien belegen, dass die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber medikamenteninduzierter Apoptose mit hoher Topoisomerase II-Expression korreliert, wohingegen ein niedriges Topoisomerase-Niveau mit Resistenzen einhergeht [18][139][23][52]. Zudem ist eine Korrelation zwischen Therapieansprechen und einer hohen Expression dieses Enzyms in klinischen Studien nachgewiesen [18][124]. Während bei normalen Zellen die Expression der Topoisomerase II alpha lediglich in der S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus stattfinden kann [124], sind maligne Zellen wie Leukämiezellen in der Lage dazu, die Topoisomerase II in der G0- und G1-Phase zu exprimieren [124]. Ein hohes Niveau an Topoisomerase II alpha in der G0/G1-Phase des Zellzyklus hat bezüglich des Therapieansprechens möglicherweise eine prädiktive Relevanz [124].

Bei den Versuchen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurde die Prädiktion des Therapieansprechens unter Verwendung radioaktiver Substanzen untersucht. Dabei gehen die Veränderungen der Zellzyklusanalyse 24 und 48 Stunden nach Chemotherapie mit einer Reduktion der Traceraufnahme im in vitro-Aufnahmeversuch einher. Im Gegensatz zur ^{18}F FLT-Aufnahme zeigte die ^{18}F FDG-Aufnahme lediglich eine variable und verzögerte Reduktion der Traceraufnahme nach Therapie. Entsprechend den Ergebnissen, die dieser Dissertation zugrunde liegen, berichten Dittmann et al. von einer Akkumulation der Ösophaguscarcinomzellen in der S-Phase 24 Stunden nach Behandlung mit jeglicher Dosis Cisplatin oder 5-

FU, während bei längerer Inkubationszeit die S-Phasen-Fraktion großteils wieder rückläufig ist [25].

Ebenfalls vereinbar mit o.g. Ergebnissen wird dabei *in vitro* eine nicht signifikante Veränderung der ^{18}F FDG-Aufnahme 24 Stunden nach Chemotherapie mit Cisplatin oder 5-Fluoro-Uracil (5-FU) sowie ein signifikanter Abfall der ^{18}F FLT-Aufnahme nach Cisplatingabe dargestellt [25]. Nach Behandlung mit 5-FU und Methotrexat kommt es dagegen zu einem massiven Anstieg der ^{18}F FLT-Aufnahme [25]. Eine mögliche Ursache ist, dass die Hemmung des *de-novo*-Thymidinsynthese-Pathways durch diese Chemotherapeutika zu einer verstärkten Aktivierung des salvage pathway führt. Durch diesen wird die FLT-Aufnahme erhöht und somit die Anpassung von Thymidinnachfrage und -angebot ermöglicht [25]. Reske et al. stellen die Hypothese auf, dass diese fragile metabolische Situation nur innerhalb eines posttherapeutischen Zeitfensters auftritt, wenn der Thymidinflux durch den salvage pathway auf den Bedarf der DNS-Synthese trifft und die Zellviabilität nicht beeinträchtigt ist [95]. Tatsächlich wird im strahleninduzierten (RIF-1) Fibrosarkom und in HT29-Koloncarcinomzellen eine erhöhte Thymidinaufnahme 2 Stunden nach Therapie mit 5-FU beobachtet, wohingegen nach 24 und 48 Stunden eine verminderte Thymidinaufnahme stattfindet [135]. Dieser biphasische Effekt des 5-FU wurde auch bei Gliomzellen dargestellt: während in den ersten 4 Stunden eine vermehrte FLT-Aufnahme stattfindet, kommt es nach 24 Stunden zu einem starken Abfall dieser Nukleosidaufnahme [127].

Eine veränderte FLT-Aufnahme kann also an unterschiedlichen Mechanismen der Proliferationshemmung der verwendeten Medikamente liegen und ist daher von der jeweiligen Therapie abhängig [25].

Taxane beispielsweise beeinflussen die Zellen in der mitotischen Phase [20]. Folglich ist eine Erhöhung des Pyrimidin-Salvage-Pathways hier kein Mechanismus, bei dem die Zellen der Toxizität dieses Medikaments entgegenwirken können.

Unter Behandlung mit dem Taxan Docetaxel kommen Oyama et al. bei Aufnahmeversuchen mit Prostatacarcinomzellen *in vitro* zu Ergebnissen, die in Übereinstimmung mit denen dieser Dissertation sind: Bei der ^{18}F FDG-Aufnahme nach 24 Stunden zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen therapierten und untherapierten Zellen, wohingegen bei dem Radionukleosid ^{18}F FLT ein signifikanter Rückgang der Traceraufnahme zu beobachten ist [85]. Dieser Rückgang korreliert mit einer verminderten S-Phase-Zellfraktion in der Zellzyklusanalyse

nach 24 Stunden [85], was in dieser Arbeit erst nach 48 Stunden der Fall war. Im Gegensatz zu Zellzyklusveränderungen und FLT-Aufnahmeveränderungen stellen Oyama et al. keine Hemmung des Zellwachstums *in vitro* zu diesem frühen Zeitpunkt fest [85]. Somit werden mit dem Tracer ^{18}F FLT Veränderungen der DNS-Synthese schon vor Veränderungen des Zellwachstums gezeigt. Die kaum veränderte ^{18}F FDG-Aufnahme lässt auf einen unveränderten Glucosemetabolismus der Zellen in der frühen Phase des Zellzyklusarrestes schließen [85].

Ebenso wird bei Doxorubicinbehandlung von Mammacarcinomzellen *in vitro* nach 24 Stunden aber auch bereits nach 4 Stunden ein dosisabhängiger Rückgang der ^{18}F FLT-Aufnahme *in vitro* beobachtet, begleitet von einer signifikanten dosisabhängigen Reduktion der Synthese-Phase [26].

Da unterschiedliche Chemotherapeutika unterschiedliche Angriffspunkte und dadurch unterschiedliche Auswirkungen auf Traceraufnahme und Zellzyklusphasen haben können, stellen van Waarde et al. *in vitro* anhand von Gliomzellen einen Vergleich zwischen den Substanzen Doxorubicin, Cisplatin und 5-FU an [127]. Bei der ^{18}F FDG-Aufnahme wird durch Doxorubicin- und Cisplatinbehandlung innerhalb von 24 Stunden kein Effekt nachgewiesen; bei dem Medikament 5-FU zeigt sich ein leichter Abfall der Glucoseaufnahme nach 24 Stunden [127]. Im Gegensatz dazu tritt im ^{18}F FLT-Aufnahmeversuch nach Therapie mit Doxorubicin ein sehr starker Effekt im Sinne einer ausgeprägten Reduktion der FLT-Aufnahme auf, der in geringerem, jedoch signifikanten Ausmaß nach 24 Stunden auch bei Cisplatin und 5-FU dargestellt wird [127]. Bei der Zellzyklusanalyse mit PI-Farbstoff verzeichnet die S-Phase nach Behandlung mit Doxorubicin und 5-FU nach 24 Stunden einen signifikanten Rückgang, wohingegen mit Cisplatin die gegenteilige Wirkung erzielt wird [127]. Dabei verursacht Doxorubicin aufgrund des Abbaus zellulärer Adenosintriphosphate (ATP) eine ausgeprägtere Wirkung auf die FLT-Aufnahme als auf die S-Phase [127]. Nach Behandlung der Zellen mit Doxorubicin sinken neben dem ATP-Gehalt auch die Thymidinkinaseaktivität und die FLT-Aufnahme [127]. Zwischen FLT- und Thymidin-Aufnahme in die Zelle besteht eine signifikante Korrelation (Korrelationskoeffizient $r=0.88$) [123]. Dabei ist die Regulation der Thymidin- bzw. der FLT-Aufnahme von dem Enzym Thymidinkinase 1 (TK1) abhängig [82][63][31][94]. Dieses Schlüsselenzym des salvage pathway weist eine hohe Substratspezifität für Pyrimidinsubstratanaloga mit höchstens geringfügigen Veränderungen des Zuckerrestes auf. Die ein-

deutige Korrelation zwischen TK1 Aktivität und zellulärer ^{18}F FLT Aufnahme [94][6][63][102] macht ^{18}F FLT zu einem Surrogatparameter für proliferative Aktivität, ohne dass die physiologische Replikation beeinträchtigt wird [63][94][6]. Vergleiche zwischen FLT-Aufnahme und S-Phasen-Fraktion ergeben ähnliche Ergebnisse wie zwischen FLT-Aufnahme und TK1-Aktivität [102]. In Tumorzellen, bei der die Proliferation stark TK-1-abhängig ist, können durch die FLT-Aufnahme Veränderungen der TK1-Aktivität und der Proliferation ermittelt werden [102]. Die TK-1-Abhängigkeit basiert auf dem salvage pathway als thymidinbereitstellenden Stoffwechselweg, denn das Enzym dient der Bereitstellung von dTTP für die DNS-Replikation. Durch vermehrte Translation der Thymidinkinasen-mRNA ergibt sich eine erhöhte Aktivität der Thymidinkinase 1 in der Synthese-Phase des Zellzyklus, in der die DNS-Replikation stattfindet [106]. Die Aktivität der Thymidinkinase 1 ist nicht nur von der S-Phasen-Fraktion und damit vom Ausmaß der TK1-Expression abhängig, sondern auch von der Verfügbarkeit des Kofaktors ATP [5]. Dieser wird von dem Enzym zur Phosphorylierung von Thymin benötigt. Die unterschiedlich starke katalytische Aktivität desselben Enzyms liegt darin begründet, dass die Thymidinkinase 1 in Anwesenheit von ATP ein Tetramer bildet, das bei der Phosphorylierung von ^{18}F FLT 20 mal effektiver ist als das niedrigaffine Dimer [81]. Folglich haben Veränderungen der Höhe des ATP-Spiegels einen bedeutenden Einfluss auf den zellulären ^{18}F FLT Uptake [5]. Dies dient der posttranslationalen Feinabstimmung des Zellzyklus; während in der G0/G1-Phase des Zellzyklus die TK1 v.a. als Dimer vorliegt und somit eine verminderte Aktivität aufweist [106], erfolgt in der S-Phase vermehrt die Transition zum Tetramer [81]. Da FLT von dem Enzym TK1 umgesetzt wird [82], ist die zelluläre FLT-Aufnahme von der S-Phasen-spezifischen Expression des Enzyms Thymidinkinase 1 abhängig. Da die FLT-Aufnahme in Lymphomzellen die S-Phase des Zellzyklus widerspiegelt [11][94], stellt der Tracer einen hervorragenden Marker für Proliferation - einer der Kennzeichen von Carcinomen [45] - dar. Die nach Doxorubicinbehandlung reduzierte Synthese-Phase als Ausdruck einer gehemmten DNS-Replikation geht mit einer verminderten FLT-Aufnahme einher und unterstreicht somit die Fähigkeit des ^{18}F FLT, die verringerte Proliferation nach Therapie früh sichtbar zu machen.

Eine reduzierte FLT-Aufnahme und gleichzeitig unvermindert hohe Expression des Enzyms TK1 kann in Tumorzellen vorkommen, wenn das zelluläre ATP-

Niveau sinkt [5]. In Tumoren mit niedriger TK1 Aktivität bzw. niedriger Proliferationsfraktion (z.B. niedriggradige Lymphome) ist ^{18}F FLT für die Beurteilung des Therapieansprechens möglicherweise weniger geeignet. Denn das zelluläre “trapping” des Tracers ^{18}F FLT ist von dem Enzym Thymidinkinase 1 [94] und die Wirksamkeit dessen wiederum von dem Kofaktor ATP abhängig [5].

Nach Therapie mit Cisplatin oder 5-FU vermindert sich das ATP-Niveau im Gegensatz zur Doxorubicinbehandlung nicht [127]. Damit ist die o.g. gegenteilige Wirkung des Cisplatins bezüglich der S-Phase erklärbar. Zudem lässt sich daraus schlussfolgern, dass im Gegensatz zum Effekt der Cisplatin- oder 5-FU-Behandlung der Effekt des Doxorubicins auf das ^{18}F FLT mit der Verminderung des ATP-Gehaltes in der Zelle in Zusammenhang steht [127].

Nach Doxorubicintherapie von Mammacarcinomzellen berichtet Direcks et al. dagegen von einem Anstieg des TK1-Niveaus und der TK1-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Zellen [24]. Passend dazu verursacht die Doxorubicinexposition in dieser Studie eine Erhöhung sowohl der ^{18}F FDG-Aufnahme als auch der ^{18}F FLT-Aufnahme nach 24 und 48 Stunden [24]. Zudem wird eine Akkumulation der Zellen in der G2/M-Phase beschrieben. Sherley et al. berichten in einer Studie von 1988, dass die maximale Thymidinkinaseaktivität in der G2/M-Phase stattfindet [106]. Dies steht in Kontrast zu anderen Studien, die eine verminderte TK-Aktivität und eine verminderte FLT-Aufnahme beobachten [127] und die TK1-Aktivität als spezifisch für die S-Phase bezeichnen [32] (s. oben).

Mit dem Rückgang der S-Phase sowie der ^{18}F FLT-Aufnahme 24 Stunden nach Doxorubicinbehandlung sind die Ergebnisse von van Waarde et al. [127] mit denen von Dittmann et al. [26] vereinbar. Zusätzlich beschreibt van Waarde et al. eine weitgehend unveränderte ^{18}F FDG-Aufnahme [127]. Unter Verwendung des Taxans Docetaxel kommt Oyama [85] zu demselben Ergebnis.

Die genannten Studien verdeutlichen, dass die Hemmung der DNS-Replikation durch Doxorubicin sowohl durch den ^{18}F FLT-Aufnahmeversuch als auch durch die Zellzyklusanalyse erfasst wird [127][26][127]. Damit werden in dieser Dissertation die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bestätigt.

Da ^{18}F FLT sowohl in vitro als auch in vivo frühe Veränderungen der DNS-Synthese besser als ^{18}F FDG erfassen kann, und diese Ergebnisse mit denen der

Zellzyklusanalyse vereinbar sind, scheint dieser Tracer ein viel versprechendes Instrument bei der frühen Response-Prädiktion zu sein.

5.2 Tierexperimentelle Studie

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob sich die *in vitro* Ergebnisse *in vivo* reproduzieren lassen. Dazu wurden die Versuchstiere mit dem Lymphom Xenotransplantat einmalig mit Chemotherapie unterschiedlicher Dosierungen (25 bis 200 μg) behandelt und die im Folgenden aufgeführten Versuche durchgeführt:

Bei der Tumolvolumenmessung wurde anhand der Änderung des Tumolvolumens ein Effekt der Doxorubicintherapie erfasst. Hinsichtlich des Tumorwachstums zwischen den Therapiegruppen wurde kein statistischer Unterschied festgestellt, was möglicherweise auf die niedrige Fallzahl der Versuchstiere, die kurze Beobachtungszeit und die mangelnde Messgenauigkeit der Messmethode zurückzuführen ist [53]. Es war jedoch die Tendenz zu einer stärkeren Hemmung bei höheren Doxorubicindosen zu beobachten.

Bei der ^{18}F FLT-PET wurden Änderungen des Tumorwachstums durch einen signifikanten Rückgang des Tumor-Hintergrund-Quotienten im Vergleich zu Kontrolltieren sichtbar gemacht. Es zeigte sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen Reduktion des Tumor-Hintergrund-Quotienten und Chemotherapiedosis. Im Gegensatz dazu wurde bei den Versuchen mit ^{18}F FDG kein eindeutiger Rückgang des Tumor-Hintergrund-Quotienten im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachtet. Der Quotient erhöhte sich bei dieser Untersuchung nach Therapie teilweise sogar und wies starke Unterschiede zwischen den Therapiegruppen auf. Diese Ergebnisse spiegelten sich in der *ex vivo* Messung der ^{18}F FDG-Aufnahme im γ -Counter wider, bei der eine variable, nicht lineare Veränderung des Tumor-Muskel-Quotienten stattfand.

Es wurde zudem eine Biodistribution mit Bestimmung des Organ-Muskel-Quotienten durchgeführt, die die Pharmakokinetik der Tracer wiedergibt und der Qualitätskontrolle dient. Die Anreicherung des Tracers ^{18}F FLT in den verschiedenen Organen zeigte ein Maximum im Xenotransplantat, gefolgt vom Nierengewebe. In den anderen Organen, wie z.B. Leber und Herzmuskel, zeigte sich lediglich ein geringer Unterschied zur Hintergrundaktivität. Im Hirngewebe fand im Gegensatz zum ^{18}F FDG kaum eine Anreicherung des Tracers ^{18}F FLT statt, was

an der für ^{18}F FLT schlechten Passierbarkeit der Blut-Hirn-Schranke liegt. Eine erhöhte ^{18}F FDG-Aufnahme stellte sich v.a. am Herzmuskel dar, gefolgt von Xenotransplantat und Hirngewebe. Dies sind die Organe, in denen Glukose vermehrt verstoffwechselt wird. In Einklang mit der Niere als Ausscheidungsorgan wurde eine deutliche Anreicherung beider Tracer im Nierengewebe beobachtet. Die Ergebnisse sind mit früheren Studien zur Anreicherung des ^{18}F FLTs und der ^{18}F FDG in den verschiedenen Geweben vereinbar [132][131][77].

In der Histologie bzw. Immunhistochemie wurde bei den entnommenen therapierten Tumoren ein dosisabhängiger Rückgang des Proliferationsmarkers Ki67 festgestellt. Bei einem geringen Anteil apoptotischer Zellen wurde mit dem Apoptosemarker Aktivierte Caspase 3 kein relevanter Hinweis auf vermehrten Zelltod nach Chemotherapie dargestellt. In Zusammenschau mit den Befunden der Zellzyklusanalyse (s. oben) deutet dies auf Zellzyklusarrest statt Apoptose als Folge der Doxorubicintherapie hin. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigten sich Entzündungszellen, die auf eine den Tumor begleitende Entzündungsreaktion hindeuten.

Die dargestellten Entzündungszellen bekräftigen die Hypothese, dass die Resultate der Traceraufnahmeversuche auf eine unspezifische Glucoseaufnahme durch eine den Tumor begleitende Entzündungsreaktion, v.a. durch Makrophagen, zurückzuführen sind. Die verwendeten SCID-Mäusen besitzen zwar keine B- und T-Lymphozyten, das unspezifische Abwehrsystem, zu dem beispielsweise Granulozyten und Makrophagen zählen, ist jedoch vorhanden [40].

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die im Vergleich zur ^{18}F FDG-PET bessere Eignung der ^{18}F FLT-PET zur Anwendung beim high-grade Lymphom zur Beurteilung der frühen Reduktion der Tumorpheriferation nach zytostatischer Therapie. Die Modifikationen der Traceraufnahme gehen dabei den Veränderungen der Tumorgöße voran, sodass eine frühe Beurteilung der Therapieresponse möglich ist.

Vergleichbare Ergebnisse werden nach Chemotherapie und Strahlentherapie bei anderen murinen Tumorentitäten wie dem Plattenepithelcarcinom [134], dem Ösophaguscarcinom [3] und dem Fibrosarkom [70] im Xenotransplantatmodell berichtet.

Beispielsweise stellen auch Yang et al. im Xenotransplantatmodell eines murinen Plattenepithelcarcinoms bei PET-Untersuchungen 24 und 48 Stunden nach Ra-

diotherapie zwar eine verminderte Aufnahme des Tracers ^{18}F FLT, jedoch nicht der ^{18}F FDG fest [134]. Das Tumorwachstum hält nach Therapie an, jedoch in geringerem Ausmaß als in der untherapierten Kontrollgruppe [134]. Mit der Hoechst-Färbung werden nach 24 Stunden histologische Hinweise für vermehrte Apoptose beobachtet [134]. Das bedeutet, der vermehrte programmierte Zelltod und die Hemmung des Tumorwachstums als Folge der Therapie können durch den Tracer ^{18}F FLT im Gegensatz zur radioaktiv markierten Glukose ^{18}F FDG früh dargestellt werden.

Apisarnthanarax et al. berichten 2 Tage nach Chemoradiotherapie (Docetaxel) bei ösophaguscarcinomtragenden Mäusen von einem im Aufnahmeverhalten bei der ^{18}F Tracer sichtbaren Effekt der Therapie im Vergleich zum Xenotransplantat der Kontrollmäuse [3]. Jedoch fällt die Reduktion der ^{18}F FDG-Aufnahme (-17%) nach 2 Tagen erheblich geringer aus als die Reduktion der Traceraufnahme bei ^{18}F FLT (-58%) [3]. Die Ergebnisse spiegeln sich - in Übereinstimmung mit den Resultaten dieser Dissertation - in der ex vivo Traceraufnahme wider [3]. Das Tumolvolumen zeigt die ersten vier Tage nach Therapie keine bedeutende Veränderung und vermindert sich erst ab dem achten Tag [3]. Wie bereits in mehreren Studien dargestellt wurde [130][13], korreliert auch hier der Ki67-Index mit der ^{18}F FLT-Aufnahme [3]. Die Studie stellt dar, dass ^{18}F FLT besser als ^{18}F FDG den Proliferationsrückgang als Therapieeffekt früh anzeigen kann, noch bevor dieser sich auf das Tumolvolumen niederschlägt.

Mit einem schnellen Rückgang der tumoralen ^{18}F FLT-Aufnahme im RIF-1 Sarkom-Xenotransplantatmodell der Maus sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Behandlung mit Cisplatin beschreiben Leyton et al. vergleichbare Ergebnisse [70].

Eine Reduktion der tumoralen ^{18}F FLT-Aufnahme nach Radiotherapie und Androgen-Ablations-Therapie wird im Tiermodell mit Prostatacarcinom-Xenotransplantat nachgewiesen [86]. Sieben Jahre später bestätigen Oyama et al. die verminderte ^{18}F FLT-Aufnahme in vivo nach zweiwöchiger Docetaxeltherapie bei hormonrefraktärem Prostatacarcinom-Xenotransplantat [85]. Die Veränderungen bei der ^{18}F FDG-PET sind minimal und deshalb nicht signifikant [85]. Anhand der Messung des Tumolvolumens ist während der gesamten Zeit ein kontinuierliches Wachstum erkennbar [85]. Histologisch ergibt sich in der PCNA-Färbung ein Rückgang der proliferativen Aktivität [85]. Wie bei den Ergebnissen, die dieser Dissertation zugrunde liegen, korreliert der Apoptoseindex dagegen nicht mit

den Veränderungen der FLT-Aufnahme [85]; entsprechend einem Zellzyklusarrest. Der Rückgang der Proliferation wird folglich durch eine im Gegensatz zum Tracer ^{18}F FDG signifikant verminderte ^{18}F FLT-Aufnahme sichtbar gemacht. Im nicht kleinzelligen Bronchialcarcinom (NSCLC)-Xenotransplantat-Modell der Maus beobachten Ullrich et al. einen Rückgang der ^{18}F FLT-Aufnahme in der Positronenemissionstomographie nach 2 Tagen Erlotinibtherapie, wohingegen bei der ^{18}F FDG-Aufnahme im Tumor keine konsistente Verminderung feststellbar ist [125]. In sensitiven Tumoren korreliert Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion mit einem verminderten ^{18}F FLT-, jedoch nicht mit einer reduzierten ^{18}F FDG-Aufnahme [125]. Die Spezifität des ^{18}F FLT wird durch die fehlende FLT-Aufnahme bei therapieresistenten Tumormutationen bestätigt [125].

In einer Studie von Brepoels et al. wird ein murines Mantelzelllymphom-Xenotransplantat mit Cyclophosphamid behandelt und der SUV (s. Kap. 1.3) der ^{18}F FDG- und ^{18}F FLT-PET gemessen. Während die FDG-Aufnahme anfänglich sinkt und an Tag 4 unter einströmenden Entzündungszellen wieder ansteigt, findet eine konstante Reduktion der FLT-Aufnahme ab dem zweiten Tag statt [8]. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der ^{18}F FDG-Aufnahme stellt Brepoels et al. in einer weiteren Lymphom-Xenotransplantat-Studie 2010 mit unterschiedlichen Cyclophosphamiddosen dar [7]. Der anfängliche Abfall der FDG-Aufnahme ist möglicherweise durch das im Vergleich zu vorliegender Arbeit ca. doppelt so große Tumolvolumen zu erklären: je größer das Tumolvolumen, desto weniger gewichteten Entzündungszellen hinsichtlich der FDG-Aufnahme.

In einer weiteren Studie über die ^{18}F FDG-Aufnahme im high-grade Lymphom-Xenotransplantat-Modell ex vivo nach Behandlung mit Cyclophosphamid bleibt die FDG-Aufnahme, nach anfänglicher Reduktion an Tag 3, unter einem Abfall viabler Tumorzellen sowie einem Anstieg von Entzündungszellen weitgehend stabil. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist die Rate apoptotischer Zellen gering [115]. Da die ^{18}F FDG-Aufnahme von Entzündungszellen derer von Tumorzellen ähnlich ist oder diese sogar übersteigt [67], kann ein vorübergehender Anstieg zu einer Überschätzung viabler Tumorzellen führen. Im Gegensatz dazu ist eine lediglich geringe ^{18}F FLT-Aufnahme entzündlicher Areale bekannt [11].

Im Jahr 2007 beschreiben Buck et al. im Lymphom Xenotransplantat 48 Stunden nach Chemotherapie mit Cyclophosphamid einen ex vivo gemessenen signifi-

kanten Rückgang der ^{18}F FLT-Aufnahme, jedoch ohne bedeutende Veränderung der Tumorgroße [12]. Die proliferative Aktivität, gemessen am Ki67-Index, verzeichnet nach Therapie ebenfalls einen signifikanten Rückgang [12]. Frühe antiproliferative Effekte der Chemotherapie werden folglich schon vor einer Tumorgößenänderung sichtbar gemacht [12].

Graf et al. stellen in demselben Lymphommodell wie bei vorliegender Arbeit und ebenfalls mit Doxorubicin bereits nach einem Tag einen signifikanten Rückgang des Tumor-Hintergrund-Quotienten bei der ^{18}F FLT-PET fest [39]. Das Tumorstadium bei den therapierten Mäusen zeigt eine signifikant niedrigere Wachstumsrate. Die ^{18}F FLT-Aufnahme des Lymphoms *ex vivo* sinkt nach 1, 5 und 9 Tagen, entsprechend der *in vivo* ^{18}F FLT-Aufnahme. Der Proliferationsmarker Ki67 verzeichnet nach Therapie einen Rückgang, während der Apoptosemarker Aktivierte Caspase 3 ansteigt. Dies deutet auf die Rolle von Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion als zugrunde liegenden Mechanismen der PET-Signaländerungen hin [39].

Nach bereits erfolgter Diskussion des Zusammenhangs zwischen Traceraufnahme *in vitro* und Veränderungen im Zellzyklus erfolgt als nächstes ein Vergleich der Traceraufnahme im Mausmodell mit den Ergebnissen der Zellzyklusdistributionsanalyse. Entsprechend den *in vitro* Aufnahmeversuchen gehen in dieser Dissertation die beschriebenen Zellzyklusveränderungen *in vivo* mit einer sinkenden FLT-Aufnahme einher, wohingegen mit dem Tracer FDG bei starken Schwankungen zwischen den Therapiegruppen kein eindeutiger Therapieeffekt nachgewiesen werden konnte.

Dieser Fragestellung wurde in mehreren Studien bereits nachgegangen:

Bei Erlotinib-therapierten NSCLC-Zellen stellen Ullrich et al. bei nach 48 Stunden verminderter *in vivo* ^{18}F FLT-Aufnahme *in vitro* neben einer Apoptoseinduktion einen Zellzyklusarrest in G1 und eine reduzierte S-Phasen-Fraktion dar [125]. Die ^{18}F FDG-Aufnahme im PET war dagegen nicht signifikant reduziert [125]. Das bedeutet möglicherweise, dass eine verminderte Proteinbiosynthese und damit DNS-Synthesevorbereitung in der G1-Phase stattfindet. Dieser Sachverhalt spiegelt sich in einer verminderten FLT-Aufnahme besser wieder als in der FDG-Aufnahme. Die Unterschiede im Zellzyklusarrest im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Dissertation und o.g. Studien erklären sich möglicherweise durch unter-

schiedliche Wirkungsweise des Chemotherapeutikums. Denn Erlotinib hemmt die Tyrosinkinaseaktivität und dadurch Zellwachstumsvorgänge. Diese finden wiederum v.a. in der G1-Phase statt, in der der Zellzyklus in dieser Studie arretiert [125].

Auch bei Yang et al. steht die verminderte ^{18}F FLT-Aufnahme 24 Stunden nach Radiotherapie des murinen Plattenepithelcarcinoms in Zusammenhang mit einer verminderten Synthese-Phase. In der ^{18}F FDG-Aufnahme hingegen ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle erkennbar [134]. Zudem ist die G2/M-Phasenfraktion verbreitert [134]. Dies deutet auf einen G2/M-Arrest infolge einer beeinträchtigten Replikationskontrolle oder Chromosomentrennung hin, kann aber auch daraus resultieren, dass die Zellen aufgrund der Zellzykluskontrollpunkte nicht in die Präsynthese- (G1-Phase) und folglich auch nicht in die Synthesephase fortschreiten können und in den vorgeschalteten Phasen akkumulieren (s. oben). Vergleichbare Resultate sind in den Versuchen, die dieser Dissertation zugrunde liegen, nach 48 Stunden erkennbar (s. oben).

Apisarnthanarax et al. vergleichen ebenfalls die ^{18}F FDG- und ^{18}F FLT-Aufnahme in vivo bei Ösophaguscarcinomzellen nach Chemoradiotherapie mit Veränderungen im Zellzyklus [3]. Nach 2 Tagen Therapie ist ein deutlicher Rückgang der ^{18}F FLT-Aufnahme erkennbar [3]. Die verminderte ^{18}F FDG-Aufnahme nach Therapie ist wesentlich geringer ausgeprägt als die Reduktion der ^{18}F FLT-Aufnahme [3]. Dabei zeigt sich 48 Stunden nach Docetaxeltherapie ein erheblicher Anstieg der Zellen in G2/M-Phase mit begleitendem Abfall der G1-Phase [3]. Die S-Phase verzeichnet initial (nach 12 Stunden) einen Anstieg und fällt nach 48 Stunden Inkubationszeit wieder ab [3]. Dieselben Ergebnisse stellten sich bei den Messungen dieser Dissertation nach 24 und 48 Stunden dar und wurden bereits diskutiert (s. oben).

Die Literaturrecherche ergibt insgesamt - in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Dissertation - einen Zusammenhang zwischen Traceraufnahme in vivo, in vitro und der Zellzyklusanalyse. Dabei geht die reduzierte ^{18}F FLT-Aufnahme nach Chemotherapie meist mit einer verminderten Synthese-Phase [85][26][127][125][134] und teilweise zusätzlich mit einem G2/M-Arrest [134][3] einher. Die ^{18}F FDG-Aufnahme verzeichnet im Gegensatz dazu nach Therapie keinen signifikanten Rückgang [85][24][127][134]. Immunhistochemisch ist die ver-

ringerte ^{18}F FLT-Aufnahme von einem verminderten Proliferationsindex [3][12][39] und teilweise von einer erhöhten Apoptoserate [134][125][39] begleitet. Sowohl im Rahmen von in vitro Studien [85][127] als auch in tierexperimentellen Studien [3][85][134][125] werden therapieassoziierte Veränderungen in der ^{18}F FLT- und ^{18}F FDG-Aufnahme verglichen, wodurch entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ein früherer und ausgeprägterer posttherapeutischer Rückgang der ^{18}F FLT-Aufnahme im Vergleich zur ^{18}F FDG-Aufnahme in den Tumoren dargestellt wird.

Es liegt die Schlussfolgerung nahe, dass das ^{18}F FLT hinsichtlich der Evaluation der frühen Therapieresponse der überlegene Marker ist [3][85][134][125].

In dieser Arbeit wurde die Traceraufnahme in vivo und dessen frühe Reduktion bei Therapieansprechen mit volumetrischen Daten, die als Parameter für den Krankheitsfortschritt dienten, verglichen. Es erfolgte die Gegenüberstellung von ^{18}F FLT- und ^{18}F FDG-Aufnahme sowohl in vitro als auch in vivo. Die Ergebnisse der in vivo und ex vivo Radionukleosidaufnahmemessungen wurden zudem zur Expression von zellzykluskorrelierten Proteinen in Bezug gesetzt. Ein weiterer Vergleich erfolgte zwischen den Ergebnissen der Aufnahmeversuche und denen der Zellzyklusdistributionsanalyse.

Es stellte sich heraus, dass im Gegensatz zur ^{18}F FDG-Aufnahme bereits zu einem frühen Zeitpunkt nach Chemotherapie eine Reduktion der ^{18}F FLT-Aufnahme im Lymphom sowohl in vitro als auch im Tierexperiment stattfindet. Immunhistochemische Untersuchungen sowie die Zellzyklusdistributionsanalyse liefern dabei Hinweise für einen Zellzyklusarrest anstatt der Apoptoseinduktion als zu Grunde liegenden Mechanismus. In dieser präklinischen Arbeit wurde gezeigt, dass die Kleintier- ^{18}F FLT-PET geeignet ist, frühe Veränderungen nach Chemotherapie in der Tumorpheriferation im Lymphom-Xenotransplantat-Modell aufzuzeigen. Dabei ist die ^{18}F FLT-PET hinsichtlich des prädiktiven Potentials und der diagnostischen Genauigkeit der konventionellen ^{18}F FDG-PET überlegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein verlässliches experimentelles Lymphommodell aufgestellt, mit dem frühes Therapieansprechen auf zytostatische Behandlung erfasst werden kann. Dieses Modell ermöglicht neue Erkenntnisse hinsichtlich der Effizienz von therapeutischen Agentien, die die Tumorzellproliferation hemmen.

5.3 Kritische Betrachtung

Bei kritischer Betrachtung finden sich - wie in jeder wissenschaftlichen Arbeit - Störfaktoren, die die Aussagekraft der Ergebnisse einschränken.

Mögliche Fehlerquellen liegen in der Versuchsdurchführung. So ist es möglich, dass bei den Aufnahmeversuchen *in vitro* die Überführung der Zellsuspension von der Wellplatte in die Eppendorfgläser zu einem ungleichmäßigen Verlust von Zellen geführt hat, der sich in einer Verminderung des Signals und einem Messfehler auswirken kann. Aus diesem Grund haben Direcks et al. die Traceraufnahme nicht nur im γ -Counter, sondern auch im PET-Aufnahmegarät gemessen, sodass die Zellen nicht überführt werden mussten [24]. Ein Unterschied im Ergebnis zwischen beiden Methoden wurde jedoch nicht festgestellt [24].

Zudem wurde bei der Versuchsdurchführung zur Tumolvolumenmessung ein Messschieber verwendet, wodurch möglicherweise eine unzureichende Messgenauigkeit erreicht wurde [53].

In Hinblick auf die Beurteilung der Aussagekraft der Versuche ist die Art der Datengenerierung einzubeziehen. Bei der Zellzyklusanalyse nach 48 Stunden wurde ein mit der Literatur vereinbares Ergebnis beschrieben. Unklar bleibt jedoch, wie realitätsgetreu dieses ist, denn die erneute Verbreiterung der S-Phase und die Abnahme der G2-Phase bei sehr hohen Konzentrationen an Doxorubicin (200 μ g und 400 μ g) liegt möglicherweise in der Generierung der Werte begründet: Wie in den Zellzyklusdiagrammen sichtbar (siehe Abb. 4.6), verläuft die Grenze zwischen S-Phase und G2-Phase insbesondere bei solch hohen Doxorubicindosen fließend, was eine eindeutige Zuordnung erschwerte. Dabei wurde möglicherweise die Grenze falsch zugunsten der S-Phase gezogen und dadurch Zellen, die tatsächlich der G2-Phase zugehörig sind, der S-Phase zugeordnet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterliegen aufgrund des geringen Stichprobenumfangs einigen statistischen Limitationen. So wurde bei der Tumolvolumenmessung und bei der *in vivo* ^{18}F FLT-Aufnahme-Messung des Tumor-Hintergrund-Quotienten zwischen den Therapiegruppen möglicherweise deshalb kein signifikanter Unterschied festgestellt, weil die Anzahl der Gruppenmitglieder zu gering war.

Eine mögliche Limitation im Einsatz des Tracers ^{18}F FLT ist, dass das Thymidinanalogon kaum in die DNS eingebaut wird [63][94][6] und dadurch Zellproliferation nicht direkt nachweist [74][94]. Da das zelluläre “trapping” des Tracers ^{18}F FLT über die ATP-abhängige Thymidinkinase 1 gesteuert wird [94], ist es möglich, dass durch Beeinflussung dieses Enzyms oder des ATP die Proliferationsbeurteilung durch FLT beeinträchtigt ist.

Zudem ist zu berücksichtigen, dass, wie in dieser Arbeit, Chemotherapie nicht immer zu einer Apoptoseeinleitung führt, sondern in erster Linie zu einem Zellzyklusarrest. Zellen im Arrest führen vermutlich aufgrund fehlender Proliferation zu einer negativen ^{18}F FLT-PET. Nach Chemotherapie ist es möglich, dass diese Tumorzellen sich wieder teilen und somit ein Rezidiv verursachen. Weiterführende größer angelegte Untersuchungen, inwiefern mit der frühen ^{18}F FLT-PET Aussagen über ein Langzeittherapieansprechen gemacht werden können, ob mit diesem Tracer erneute Proliferation nach Zellzyklusarrest sichtbar gemacht werden kann und in welchen Zeitabständen erneute PET-Untersuchungen durchgeführt werden sollen, wären sinnvoll.

Zuletzt sei darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse in Labor und des Tierexperiments kein uneingeschränkter Prädiktor für Ergebnisse im Modell Mensch sind. Da die Resultate nicht direkt übertragbar sind, ist es sinnvoll, die Fragestellung dieser Arbeit im Menschen zu evaluieren und weitere klinische Studien mit ^{18}F FLT in verschiedenen Tumorentitäten durchzuführen, um den Tracer auch klinisch zu etablieren. Dies hat ansatzweise bereits stattgefunden [62][48][13] und kann durchaus weitergeführt werden, da das ^{18}F FLT nach bisherigem Kenntnisstand gesundheitlich unbedenklich [76][35] und gegenüber dem Glukoseanalogon ^{18}F FDG überlegen ist.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Da durch konventionelle Diagnostik eine Therapieresponse bei malignen Tumoren erst nach mehreren Wochen feststellbar ist, in denen bei Therapieresistenz unnötiger Aufwand entstanden ist, ist es sinnvoll, einen Marker für die Positronenemissionstomographie zu etablieren, mit dem der Effekt einer begonnenen Therapie schneller evaluiert werden kann. Die bisher klinisch eingesetzte ^{18}F 2'-Fluoro-2'-Desoxyglukose weist einige Limitationen auf, insbesondere die unspezifische Anreicherung in Entzündungsherden. Hinsichtlich der Unterscheidung zwischen Entzündungsreaktion und Malignität ist die Etablierung eines Tracers, der proliferative Aktivität spezifischer anzeigt, erstrebenswert. Folglich sollte in der Dissertation der Frage nachgegangen werden, inwieweit mit den radioaktiven Tracern ^{18}F FLT und ^{18}F FDG eine frühe nicht-invasive Beurteilung des Chemotherapieansprechens eines hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphoms in dosisabhängiger Weise möglich ist und ob das ^{18}F FLT der ^{18}F FDG dabei überlegen ist.

Dies wurde sowohl mit Hilfe von in vitro als auch tierexperimentellen Studien untersucht.

In allen Versuchen wurde das Chemotherapeutikum Doxorubicin sowie die humane diffus-großzellige B-Zell-Lymphom-Zelllinie SUDHL-4 verwendet und die Daten nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit erhoben.

Zellproliferation und -viabilität wurden mit Hilfe einer Vitalitätsprüfung mit Trypanblau und eines Zytotoxizitätstests mit MTT gemessen. Dabei wurde darge-

stellt, dass die Tumorzelllinie SUDHL-4 auf niedrige Doxorubicinkonzentrationen in dosisabhängiger Weise empfindlich reagiert und geeignet ist, Zellwachstumshemmung zu einem frühen Zeitpunkt anzuzeigen.

Des Weiteren wurde mit der Zellzyklusdistributionsanalyse durch fluorescence activated cell sorting nach Zellzyklusveränderungen infolge der Chemotherapie mit Doxorubicinkonzentrationen von 6 bis 400 ng/ml geforscht.

Es zeigte sich unter der Chemotherapie nach 48 Stunden Inkubationszeit eine Reduktion der DNS-Synthesephase und der G1-Phase sowie ein G2-Arrest. Die Anzahl der apoptotischen Zellen in der subG1-Phase war bei beiden Messungen sehr niedrig.

Der Versuch verdeutlicht, dass der Effekt der Chemotherapie auf die Zellen nicht im Sinne einer Apoptose zum Tragen kommt, sondern den Zellzyklusarrest in der Phase G2 betrifft.

Außerdem wurde die ^{18}F FLT- und ^{18}F FDG-Aufnahme in die Lymphomzellen bei Doxorubicinkonzentrationen von 6 bis 400 ng/ml verglichen. In vitro bewirkte die Chemotherapie nach 24 und nach 48 Stunden eine Reduktion sowohl der ^{18}F FLT- als auch der ^{18}F FDG-Aufnahme - also eine deutliche Therapieresponse. Im Gegensatz zum ^{18}F FDG- wurde bei dem ^{18}F FLT-Aufnahmeversuch eine Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachtet.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in vivo wurde eine Tumolvolumenmessung der Xenotransplantate mittels Messschieber durchgeführt, bei der eine Hemmung des Tumorwachstums bei Doxorubicindosen von 25 bis 200 μg nachgewiesen wurde. Im Rahmen der Tumolvolumenmessung ergab sich zwar keine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung, jedoch tendenziell eine stärkere Hemmung bei höheren Chemotherapiedosen.

Unter Anwendung der ^{18}F FLT-PET wurden Änderungen des Tumorwachstums durch einen signifikanten Rückgang des Tumor-Hintergrund-Quotienten im Vergleich zu Kontrolltieren sichtbar gemacht. Im Gegensatz dazu erhöhte sich der Quotient bei der ^{18}F FDG-PET posttherapeutisch mit großen Unterschieden zwischen den Therapiegruppen. Diese Ergebnisse spiegelten sich in der ex vivo Messung der ^{18}F FDG-Aufnahme wider, bei der eine variable, nicht lineare Veränderung des Tumor-Muskel-Quotienten stattfand.

Es wurde zudem eine Biodistribution mit Bestimmung der Organ-Muskel-Quoti-

enten durchgeführt, die der Qualitätskontrolle dient. Die Anreicherung der Tracer in den verschiedenen Organen entspricht der Pharmakokinetik der zugeführten Substanzen.

In der Histologie bzw. Immunhistochemie wurde bei den entnommenen Tumoren ein dosisabhängiger signifikanter Rückgang des Proliferationsmarkers Ki67 ohne signifikanter Erhöhung des Apoptosemarkers Caspase3 festgestellt. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigten sich als Begleitreaktion des Tumors Entzündungszellen.

Das Fazit dieser Arbeit ist, dass frühes Therapieansprechen auf antiproliferative Therapie im high-grade Non-Hodgkin-Lymphom mit der ^{18}F FLT-PET in dosisabhängiger Weise beurteilt werden kann. Das Radionukleosid ^{18}F FLT stellt sich als verlässlicher Biomarker für die Proliferation von Lymphomzellen dar. Es reflektiert den frühen antiproliferativen Effekt der Chemotherapie besser als die ^{18}F FDG und scheint damit als Prädiktor des Ansprechens auf zytostatische Therapie beim high-grade Lymphom besser geeignet zu sein. Es liegt die Schlussfolgerung nahe, dass das ^{18}F FLT hinsichtlich der Evaluation der frühen Therapieresponse der überlegene Marker ist. Aufgrund seiner Überlegenheit gegenüber dem Glukoseanalogon ^{18}F FDG ist es angebracht, weitere Untersuchungen mit ^{18}F FLT auch im Menschen durchzuführen.

Kapitel 7

Tabellen

Tabelle 7.1: Chemikalien

Substanz	Hersteller
AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Anti-Cleaved Caspase 3-Antikörper	Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Bio-Rad Protein-Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
BSA-Proteinstandard	Bio-Rad, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO Freeze Medium)	Bio Veris Corporation, Gaithersburg, USA
EnVision (Zweitantikörper)	DAKO, Hamburg, Deutschland
Ethanol 70%	Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München, Deutschland
Fetales Bovines Serum (FKS = fetales Kälberserum)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Isofluran	Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland
MIB-1(anti-Ki67-Antikörper)	Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland
MTT Farbstoff	Promega, Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge (NaOH) 1M	Riedel de Häen, Seelze, Deutschland
PBS (Dulbecco [1] w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml, 10 000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Propidiumjodid 95% (C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ribonuclease A from bovine pancreas	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Tris	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypanblaulösung 0,5%	Sigma, Steinheim, Deutschland

Tabelle 7.2: Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Eppendorf 4151	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Analysenwaage Sartorius, Typ LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Anästhesiesystem für Versuchstiere	Vetland Medical Sales and Services, Louisville, KY, USA
Brutschrank Typ 6000	Heraeus, Berlin, Deutschland
FACS-Gerät	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Gamma-Counter Typ 1480 Wizard TM3	Wallac, Turku, Finnland
Gefrierschrank (- 20 °C)	Perbio Hy Clone, Bonn, Deutschland
Gefrierschrank (-70°C) HU9-50y-T-A	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Immunostainer	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA
Kamera Canon A590IS	Canon, Malakka, Malaysien
Laminair Flow HB 2472	Heraeus, Berlin, Deutschland
Micro PET Focus 120	Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA
Mikroskop, Aktiovert 10	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	MD-Kova, Madaus Diagnostika Köln, Deutschland
PET/CT System Inveon	Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, Tennessee, USA
Pipetus®-akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Stickstoffbehälter ARPEGE 70	Deutsche Air Liquid Anlagebau GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Vortex-Genie	Scientific Industries INC, Springfield MA, USA (Vertrieb durch Bender&Hobei AG, Zürich, Schweiz)
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Wellplattenleser Bio-Tek Elx800TM Series Universal Microplate Reader	Progen Scientific, London, UK
Zentrifuge, Megafuge 1,0 R	Heraeus, Berlin, Deutschland

Tabelle 7.3: Gebrauchsmaterial

Materialien	Hersteller
Casy®1 Probenröhrchen	Schärfe System, Reutlingen, Deutschland
Cryo Tubes 1,8 ml Glasträger	Nunc Inter Med, Dänemark Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Kulturflaschen mit Filter (25, 75, 175 cm ² , g-sterilisiert, RNA/DNA frei, pyrogenfrei)	Greiner, Solingen, Deutschland
Multipipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten (1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spezialfutter für immundefiziente Versuchstiere - Zuchtdiät	Altromin Spezialfutter GmbH&CoKG, Lage, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Corning, Bodenheim, Deutschland
Zellkultur Testplatten 6U	Greiner, Solingen, Deutschland
Zellkultur Testplatten 24U	Greiner, Solingen, Deutschland
Zellkultur Testplatten 48U	Greiner, Solingen, Deutschland
Zellkultur Testplatten 96U	TPP, Schweiz

Tabelle 7.4: Software

Software	Hersteller
Definiens Enterprise Image Intelligence™ Suite	Fa. Definiens AG, München, Deutschland
Flow Jo, Version 7.2.1	Treestar Inc., Ashland, OR, USA
Inveon Research Workplace, Version 2.2	Siemens Preclinical Solutions, Knoxville, TN, USA
KC Junior	Bio-Tek Instruments 1998-2003, London, UK
Microsoft Office 2000	Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland
R Software, Version 2.11.1	R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich
SPSS, Version 15.0	SPSS, Inc., Chicago, IL, USA

Abbildungsverzeichnis

- 1.1 Molekulare Struktur der Metaboliten D-Glukose und Thymidin, deren zugehörige Radiotracer ^{18}F FDG, ^{11}C Thymidin und ^{18}F FLT und des Pharmakons Azidothymidin. 13
- 1.2 Synthesewege der Thymidinmetaboliten. Das durch den salvage pathway aus Thymin gewonnene Nukleotid Thymidin wird wie das ^{18}F 3'-Fluoro-3'-Desoxythymidin (^{18}F FLT) von der Thymidinkinase 1 unter ATP-Verbrauch zu Thymidinmonophosphat (TMP) phosphoryliert. Im de-novo-pathway katalysiert die Thymidylatsynthase aus Uridin-5'-monophosphat (UMP) unter Beteiligung der Tetrahydrofolsäure Thymidinmonophosphat (TMP). Gehemmt werden kann dieser Syntheseweg durch das Pyrimidinanalogon 5-Fluoro-Uracil (5'-FU) oder dem Dihydrofolatreduktasehemmer Methotrexat (MTX), wohingegen der salvage-pathway durch den Nukleotidreduktasehemmer 1-Beta-D-Arabinofuranosylcytosin (Ara-C) inhibiert werden kann. Thymidinmonophosphat (TMP) wird zu Thymidindiphosphat (TDP) und dieses zu Thymidintriphosphat (TTP) phosphoryliert, das als einziges in die DNS eingebaut werden kann. 15

- 4.1 Zytotoxizitätstests mit MTT mit den Lymphomzelllinien SUDHL-4 (links) und EHEB (rechts) nach Therapie mit Doxorubicin mit den angegebenen Dosen und nach den angegebenen Zeitpunkten, 50 000 Zellen/well, Mittelwerte, n=3 pro Gruppe. Die Extinktion der Kontrollzellen (ohne Doxorubicin) wurde jeweils als 100 % definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Während sich bei der Tumorzelllinie EHEB kaum ein Effekt der Chemotherapie im Sinne einer Reduktion der Extinktion zeigt, bewirkt das Zytostatikum bei den SUDHL-4 Zellen zu frühen Zeitpunkten einen dosisabhängigen Rückgang der Extinktion. 42
- 4.2 Trypanblau-Färbung zur Vitalitätsprüfung von Lymphomzellen nach Therapie mit Doxorubicin mit den angegebenen Konzentrationen, Messungen 24 und 48 Stunden nach Chemotherapie, 500 000 Zellen/well, Mittelwerte, n=3 pro Gruppe. Anzahl der Kontrollzellen (ohne Doxorubicin) nach 24 bzw. 48 Stunden wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Chemotherapie konnte deren Effekt durch den Rückgang der vitalen Zellen nachgewiesen werden. . . . 44
- 4.3 Konzentrationsabhängigkeitstest mit ^{18}F FDG bei Lymphomzellen 24 (oben) und 48 (unten) Stunden nach Chemotherapie in vitro, n=3 pro Gruppe. Je 500 000 Zellen wurden mit den angegebenen Doxorubicinkonzentrationen behandelt. Die Traceraufnahme der unbehandelten Zellen wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Sowohl bei hoher als auch bei niedriger Zellkonzentration kann eine Verminderung der Traceraufnahme nach Therapie beobachtet werden. 46

- 4.4 In vitro ^{18}F FLT- (obere Abbildungen) und ^{18}F FDG- (untere Abbildungen) Aufnahme in Lymphomzellen 24 (links) und 48 (rechts) Stunden nach Chemotherapie, Mittelwerte, n=3 pro Gruppe. 500 000 Zellen/well wurden mit den angegebenen Doxorubicinkonzentrationen inkubiert. Nach Inkubation mit ^{18}F FLT bzw. ^{18}F FDG nach 24 bzw. 48 Stunden wurde die Aktivität in counts per minute (cpm) gemessen. Die Aktivität der unbehandelten Zellen wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Nur die ^{18}F FLT-Aufnahme geht nach Inkubation mit Doxorubicin dosisabhängig zurück. Die Reduktion der ^{18}F FDG-Aufnahme findet, v.a. bei niedrigeren Chemotherapiedosen, variabel und in einem geringeren Ausmaß statt. 47
- 4.5 Zellzyklusanalyse mit PI-FACS 24 (obere Abbildung) und 48 (untere Abbildung) Stunden nach Therapie mit den angegebenen Dosen Doxorubicin, 1,5 Mio. Zellen/well, Mittelwerte, n=3 pro Gruppe außer Kontrolle 48 Stunden: n=6. Dargestellt sind die Veränderungen der Zellzyklusphasen subG1, G1, Synthese (S) und G2. Auffallend ist eine Zunahme der S-Phase nach 24 Stunden und ein G2-Arrest nach 48 Stunden. 50
- 4.6 Zellzyklusanalyse mit PI-FACS nach Therapie mit den angegebenen Doxorubicinkonzentrationen nach 48 Stunden. Im Diagramm der Kontrolle (links oben) sind die Peaks mit den Zellzyklusphasen subG1, G1, Synthese (S) und G2 beschriftet. Auffallend ist eine Zunahme der G2-Fraktion. 51

- 4.7 Dosisabhängiges Tumorwachstum, gemessen am Tumolvolumen, in vivo. Mediane Veränderung des Tumolvolumens in Kontrolltieren und therapierten Mäusen an Tag 2 (n=6 pro Gruppe) und Tag 9 (n=3 pro Gruppe). Tumolvolumen vor Therapie (Tag 0) wurde als 100 % definiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. An Tag 2 blieb das Tumolvolumen der therapierten Mäuse weitgehend unverändert, während das der Kontrolltiere um 80 % anstieg. Am Tag 9 stellt sich der Unterschied noch deutlicher heraus: während bei den therapierten Mäusen nur ein geringer Zuwachs zu verzeichnen war, stieg das Tumolvolumen der untherapierten Tiere auf über das 8fache. 54
- 4.8 [18F] FLT- (oben) und [18F] FDG- (unten) PET-Aufnahmen (transaxiale Schnitte) typischer Mäuse 48 Stunden vor und nach Therapie mit 50 μ g (links) bzw. 200 μ g (rechts) Doxorubicin. In der FLT-PET ist eine verringerte Traceraufnahme in den Tumoren (Pfeile) nach Chemotherapie erkennbar, wohingegen sich in der FDG-PET eine erhöhte Traceraufnahme in den Tumoren (Pfeile) nach Therapie bemerkbar macht. 55
- 4.9 Medianer Tumor-Hintergrund-Quotient (TBR) der ¹⁸F FLT-PET (obere Abbildung) und der ¹⁸F FDG-PET (untere Abbildung) zu einem frühen Zeitpunkt nach Chemotherapie in den angegebenen Dosen. ¹⁸F FLT-PET: 25 μ g und 50 μ g: n=6, 100 μ , 200 μ g und Kontrolle: n=3. ¹⁸F FDG-PET: 25 μ g: n=3, 50 μ g: n=4, 100 μ , 200 μ g und Kontrolle: n=3. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Die TBR vor Therapie wurde als 100 % definiert. Die TBR der ¹⁸F FLT-PET sinkt mit steigender Doxorubicinkonzentration, während die TBR der ¹⁸F FDG-PET zwischen den Therapiegruppen stark schwankt. 56

4.10 Mediane ^{18}F FLT (obere Abb.) und ^{18}F FDG (untere Abb.) - Aufnahme der Organe relativ zum Musculus quadrizeps femoris, gemessen ex vivo als Organ-Muskel-Quotient 48 bzw. 72 Stunden nach Chemotherapie, n=3 pro Gruppe. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SE) an. Die FLT-Aufnahme erfolgt an erster Stelle in das Xenotransplantat, wohingegen die FDG-Aufnahme ein Maximum im Herzmuskel aufweist. Während die Niere bei beiden Tracern gut anreichert, dringt das FLT kaum in das Hirngewebe vor. 59

4.11 Ki67 Proliferationsindex als Punktdiagramm 48 Stunden nach Behandlung mit Doxorubicin in den angegebenen Dosen bzw. ohne Therapie (Kontrolle), n=3. Bei den Therapiegruppen zeigt sich ein Rückgang der Ki67-Index-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch zwischen den einzelnen Therapiegruppen gibt es signifikante Unterschiede in den Ki67 Indizes. 61

4.12 Caspase-Index als Punktdiagramm 48 Stunden nach Behandlung mit Doxorubicin in den angegebenen Dosen bzw. ohne Therapie (0). 0μ : n=2, 25μ : n=6, 50μ : n=3, 100μ : n=6, 200μ : n=5. Es wurden keine relevanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Therapiegruppen festgestellt. 62

4.13 Tumor Xenotransplante ex vivo 48 Stunden nach Therapie mit den angegebenen Dosen Doxorubicin oder ohne Therapie (Kontrolle), gefärbt mit Hämatoxylin und Eosin (HE) oder Immunfärbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 oder aktivierte Caspase 3. Mäuse ohne Therapie zeigen eine hohe proliferative Aktivität in der Ki67 Färbung. Chemotherapierte Mäuse zeigen eine signifikant reduzierte Proliferationsrate in der Ki67 Färbung, jedoch keine relevanten Unterschiede in der Anzahl der apoptotischen Zellen, die aktivierte Caspase 3 exprimieren. Die Standard HE Morphologie nach Therapie mit $50\mu\text{g}$ zeigt eine Infiltration von Entzündungszellen (Pfeile), insbesondere in der Nähe von Gefäßen. 63

Literaturverzeichnis

- [1] Allen-Auerbach M., Quon A., Weber W.A., Obrzut S., Crawford T., Silverman D.H., Ratib O., Phelps M.E., Czernin J. Comparison between 2-deoxy-2-[18f]fluoro-d-glucose positron emission tomography and positron emission tomography/computed tomography hardware fusion for staging of patients with lymphoma. *Mol Imaging Biol*, 6:411–416, 2004.
- [2] Aoyama M., Grabowski D.R., Holmes K.A., Rybicki L.A., Bukowski R.M., Ganapathi M.K., Ganapathi R. Cell cycle phase specificity in the potentiation of etoposide-induced dna damage and apoptosis by kn-62, an inhibitor of calcium-calmodulin-dependent enzymes. *Biochem Pharmacol.*, 61:49–54, 2001.
- [3] Apisarnthanarax S., Alauddin M.M., Mourtada F., Ariga H., Raju U., Mawlawi O., Han D., Bornmann W.G., Ajani J.A., Milas L., Gelovani J.G., Chao K.S. Early detection of chemoradioresponse in esophageal carcinoma by 3'-deoxy-3'-3h-fluorothymidine using preclinical tumor models. *Clin Cancer Res*, 12:4590–4597, 2006.
- [4] Austin C.A., Marsh K.L. Eukaryotic dna topoisomerase ii beta. *Bioessays.*, 20:215–226, 1998.
- [5] Barthel H., Cleij M.C., Collingridge D.R., Hutchinson O.C., Osman S., He Q., Luthra S.K., Brady F., Price P.M., Aboagye E.O. 3'-deoxy-3'-[18f]fluorothymidine as a new marker for monitoring tumor response to antiproliferative therapy in vivo with positron emission tomography. *Cancer Res.*, 63:3791–3798, 2003.
- [6] Barthel H., Perumal M., Latigo J., He Q., Brady F., Luthra S.K., Price P.M., Aboagye E.O. The uptake of 3'-deoxy-3'-[18f]fluorothymidine into

- l5178y tumours in vivo is dependent on thymidine kinase 1 protein levels. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 32:257–263, 2005.
- [7] Brepoels L., De Saint-Hubert M., Stroobants S., Verhoef G., Balzarini J., Mortelmans L., Mottaghy F.M. Dose-response relationship in cyclophosphamide-treated b-cell lymphoma xenografts monitored with [18f]fdg pet. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*., pages 1688–1695, 2010.
- [8] Brepoels L., Stroobants S., Verhoef G., De Groot T., Mortelmans L., De Wolf-Peeters C. (18)f-fdg and (18)f-ft uptake early after cyclophosphamide and mtor inhibition in an experimental lymphoma model. *J Nucl Med.*, 50:1102–1109, 2009.
- [9] Brink I., Reinhardt M.J., Hoegerle S., Althoefer C., Moser E., Nitzsche E.U. Increased metabolic activity in the thymus gland studied with 18f-fdg pet: age dependency and frequency after chemotherapy. *J Nucl Med*, 42:591–595, 2001.
- [10] Buchmann I., Reinhardt M., Elsner K., Bunjes D., Althoefer C., Finke J., Moser E., Glatting G., Kotzerke J., Guhlmann C.A., Schirrmeister H., Reske S.N. 2-(fluorine-18)fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography in the detection and staging of malignant lymphoma. a bicenter trial. *Cancer*, 91:889–899, 2001.
- [11] Buck A.K., Bommer M., Stilgenbauer S., Juweid M., Glatting G., Schirrmeister H., Mattfeldt T., Tepsic D., Bunjes D., Mottaghy F.M., Krause B.J., Neumaier B., Döhner H., Möller P., Reske S.N. Molecular imaging of proliferation in malignant lymphoma. *Cancer Res*, 66:11055–11061, 2006.
- [12] Buck A.K., Kratochwil C., Glatting G., Juweid M., Bommer M., Tepsic D., Vogg A.T., Mattfeldt T., Neumaier B., Möller P., Reske S.N. Early assessment of therapy response in malignant lymphoma with the thymidine analogue [18f]ft. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 34:1775–1782, 2007.
- [13] Buck A.K., Schirrmeister H., Hetzel M., Von Der Heide M., Halter G., Glatting G., Mattfeldt T., Liewald F., Reske S.N., Neumaier B. 3'-deoxy-3'-[18f]fluorothymidine-positron emission tomography for noninvasive as-

- essment of proliferation in pulmonary nodules. *Cancer Res*, 62:3331–3334, 2002.
- [14] Carr R., Barrington S.F., Madan B., O’Doherty M.J., Saunders C.A., van der Walt J., Timothy A.R. Detection of lymphoma in bone marrow by whole-body positron emission tomography. *Blood*, 91:3340–3346, 1998.
- [15] Castellucci P., Nanni C., Farsad M., Alinari L., Zinzani P., Stefoni V., Battista G., Valentini D., Pettinato C., Marengo M., Boschi S., Canini R., Baccarani M., Monetti N., Franchi R., Rampin L., Fanti S., Rubello D. Potential pitfalls of 18f-fdg pet in a large series of patients treated for malignant lymphoma: prevalence and scan interpretation. *Nucl Med Commun*, 26:689–694, 2005.
- [16] Cheson B.D., Horning S.J., Coiffier B., Shipp M.A., Fisher R.I., Connors J.M., Lister T.A., Vose J., Grillo-López A., Hagenbeek A., Cabanillas F., Klippensten D., Hiddemann W., Castellino R., Harris N.L., Armitage J.O., Carter W., Hoppe R., Canellos G.P. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-hodkin’s lymphomas. nci sponsored international working group. *J Clin Oncol*, 17:1244, 1991.
- [17] Cheson B.D., Pfistner B., Juweid M.E., Gascoyne R.D., Specht L., Horning S.J., Coiffier B., Fisher R.I., Hagenbeek A., Zucca E., Rosen S.T., Stroobants S., Lister T.A., Hoppe R.T., Dreyling M., Tobinai K., Vose J.M., Connors J.M., Federico M., Diehl V. The international harmonization project on lymphoma. revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*, 25:579–586, 2007.
- [18] Coon J.S., Marcus E., Gupta-Burt S., Seelig S., Jacobson K., Chen S., Renta V., Fronda G., Preisler H.D. Amplification and overexpression of topoisomerase α predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.*, 8:1061–1067, 2002.
- [19] de Hemricourt E., De Boeck K., Hilde F., Abib A., Kockx M., Vandevivere J., De Bock R. Sarcoidosis and sarcoid-like reaction following hodgkin’s disease. report of two cases. *Mol Imaging Biol*, 5:15–19, 2003.

- [20] Demidenko Z.N., Halicka D., Kunicki J., McCubrey J.A., Darzynkiewicz Z., Blagosklonny M.V. Selective killing of adriamycin-resistant (g2 checkpoint-deficient and mrp1-expressing) cancer cells by docetaxel. *Cancer Res.*, 65:4401–4407, 2005.
- [21] Devizzi L., Maffioli L., Bonfante V., Viviani S., Balzarini L., Gasparini M., Valagussa P., Bombardieri E., Santoro A, Bonadonna G. Comparison of gallium scan, computed tomography, and magnetic resonance in patients with mediastinal hodgkin's disease. *Ann Oncol*, 8:53–56, 1997.
- [22] Di Bartolomeo S., Di Sano F., Piacentini M., Spinedi A. Apoptosis induced by doxorubicin in neurotumor cells is divorced from drug effects on ceramide accumulation and may involve cell cycle-dependent caspase activation. *J Neurochem*, 75:532–539, 2000.
- [23] Dingemans A.M., Pinedo H.M., Giaccone G. Clinical resistance to topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta.*, 1400:275–288, 1998.
- [24] Direcks W.G., Berndsen S.C., Proost N., Peters G.J., Balzarini J., Spreewenbergh M.D., Lammertsma A.A., Molthoff C.F. [18f]fdg and [18f]flt uptake in human breast cancer cells in relation to the effects of chemotherapy: an in vitro study. *Br J Cancer.*, 99:481–487, 2008.
- [25] Dittmann H., Dohmen B.M., Kehlbach R., Bartusek G., Pritzkow M., Sarbia M., Bares R. Early changes in ¹⁸f flt uptake after chemotherapy: an experimental study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 29:1462–1469, 2002.
- [26] Dittmann H., Jusufoskab A., Dohmena B.M., Smyczek-Gargya B., Fersis N., Pritzkow M., Kehlbach R., Vonthein R., Machulla H.J., Bares R. 3'-deoxy-3'-[18f]fluorothymidine (flt) uptake in breast cancer cells as a measure of proliferation after doxorubicin and docetaxel treatment. *Nucl Med Biol*, 36:163–169, 2009.
- [27] Dive C., Evans C.A., Whetton A.D. Induction of apoptosis—new targets for cancer chemotherapy. *Semin Cancer Biol*, 3:417–427, 1992.
- [28] DSMZ. EHEB. [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-67.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-67.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192). Stand: 04.02.2012.

- [29] DSMZ. SUDHL-4. [http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-495.html?tx_dsmzresources_pi5\[returnPid\]=192](http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-495.html?tx_dsmzresources_pi5[returnPid]=192). Stand: 04.02.2012.
- [30] Elstrom R., Guan L., Baker G., Nakhoda K., Vergilio J.A., Zhuang H., Pitsilos S., Bagg A., Downs L., Mehrotra A., Kim S., Alavi A., Schuster S.J. Utility of fdg-pet scanning in lymphoma by who classification. *Blood*, 101:3875–3876, 2003.
- [31] Eriksson S., Arnér E., Spasokoukotskaja T., Wang L., Karlsson A., Brosjö O., Gunvén P., Julusson G., Liliemark J. Properties and levels of deoxy-nucleoside kinases in normal and tumor cells; implications for chemotherapy. *Adv Enzyme Regul*, 34:13–25, 1994.
- [32] Euler H., Eriksson S. Comparative aspects of the proliferation marker thymidine kinase 1 in human and canine tumour diseases. *Vet Comp Oncol.*, 9:1–15, 2011.
- [33] Fahrmeir L., Künstler R., Pigeot I., Tutz G. *Statistik. Der Weg zur Datenanalyse*. Fahrmeir, L. (Hrsg.), Springer-Verlag GmbH, Berlin-Heidelberg-New York. 517–543, 305–307, 428, 4., verbesserte Auflage, 2002.
- [34] Ferrazzi E., Woynarowski J.M., Arakali A., Brenner D.E., Beerman T.A. Dna damage and cytotoxicity induced by metabolites of antracycline antibiotics, doxorubicin and idarubicin. *Cancer Commun*, 3:173–180, 1991.
- [35] Flexner C., van der Horst C., Jacobson M.A., Powderly W., Duncanson F., Ganes D., Barditch-Crovo P.A., Petty B.G., Baron P.A., Armstrong D. Relationship between plasma concentrations of 3'-fluorothymidine (alovudine) and antiretroviral activity in two concentration-controlled trials. *J Infect Dis*, 170:1394–1403, 1994.
- [36] Fortune J.M., Osheroff N. Topoisomerase ii as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, 64:221–253, 2000.
- [37] Gallamini A., Biggi A., Fruttero A., Pugno F., Cavallero G., Pregno P., Grasso M., Farinelli C., Leone A., Gallo E. Revisiting the prognostic role of gallium scintigraphy in low-grade non-hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med*, 24:1499–1506, 1997.

- [38] Gewirtz D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.*, 57:727–741, 1999.
- [39] Graf N., Herrmann K., den Hollander J., Fend F., Schuster T., Wester H.J., Senekowitsch-Schmidtke R., zum Büschenfelde C.M., Peschel C., Schwaiger M., Dechow T., Buck A.K. Imaging proliferation to monitor early response of lymphoma to cytotoxic treatment. *Mol Imaging Biol*, 10:349–355, 2008.
- [40] Greiner D.L., Hesselton R.A., Shultz L.D. Scid mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells*, 16:166–177, 1998.
- [41] Grierson J.R., Shields A.F. Radiosynthesis of 3'-deoxy-3'-[(18)f]fluorothymidine: [(18)f]ft for imaging of cellular proliferation in vivo. *Nucl Med Biol.*, 27:143–156, 2000.
- [42] Guo N., Xie J., Manning H.C., Deane N.G., Ansari M.S., Coffey R.J., Gore J., Price R.R., Baldwin R.M., McIntyre J.O. A novel in vitro assay to assess phosphorylation of 3'-[18f]fluoro-3'-deoxythymidine. *Mol Imaging Biol*, 13:257–264, 2011.
- [43] Hamacher K., Coenen H.H., Stöcklin G. Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[18f]-fluoro-2-deoxy-d-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med.*, 27:235–238, 1986.
- [44] Han H.S., Escalón M.P., Hsiao B., Serafini A., Lossos I.S. High incidence of false-positive pet scans in patients with aggressive non-hodgkin's lymphoma treated with rituximab-containing regimens. *Ann Oncol.*, 20:309–318, 2009.
- [45] Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*, 144:646–674, 2011.
- [46] Herrmann K., Buck A.K., Schuster T., Junger A., Wieder H.A., Graf N., Ringshausen I., Rudelius M., Wester H.J., Schwaiger M., Keller U., Dechow T. Predictive value of initial 18f-ft uptake in patients with aggressive non-hodgkin lymphoma receiving r-chop treatment. *J Nucl Med.*, 52:690–696, 2011.

- [47] Herrmann K., Buck A.K., Schuster T., Rudelius M., Wester H.J., Graf N., Scheuerer C., Peschel C., Schwaiger M., Dechow T., Keller U. A pilot study to evaluate 3'-deoxy-3'-18f-fluorothymidine pet for initial and early response imaging in mantle cell lymphoma. *J Nucl Med.*, 52:1898–1902, 2011.
- [48] Herrmann K., Wieder H.A., Buck A.K., Schöffel M., Krause B.J., Fend F., Schuster T., Meyer zum Büschenfelde C., Wester H.J., Duyster J., Peschel C., Schwaiger M., Dechow T. Early response assessment using 3'-deoxy-3'-[18f]fluorothymidine-positron emission tomography in high-grade non-hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*, 13:3552–3558, 2007.
- [49] Hoffmann M., Kletter K., Diemling M., Becherer A., Pfeffel F., Petkov V., Chott A., Raderer M. Positron emission tomography with fluorine-18-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose (f18-fdg) does not visualize extranodal b-cell lymphoma of the mucosa-associated lymphoid tissue (malt)-type. *Ann Oncol*, 10:1185–1189, 1999.
- [50] Hollister D. Jr., Lee M.S., Eisen R.N., Fey C., Portlock C.S. Variable problems in lymphomas: Case 2. sarcoidosis mimicking progressive lymphoma. *J Clin Oncol*, 23:8113–8116, 2005.
- [51] Howard A., Pelc S.R. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Int J Radiat Biol*, 49:207–218, 1986.
- [52] Isaacs R.J., Davies S.L., Sandri M.I., Redwood C., Wells N.J., Hickson I.D. Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase ii. *Biochim Biophys Acta.*, 1400:121–137, 1998.
- [53] Jensen M.M., Jørgensen J.T., Binderup T., Kjaer A. Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microct is more accurate and reproducible than determined by 18f-fdg-micropet or external caliper. *BMC Med Imaging.*, 16:8–16, 2008.
- [54] Jerusalem G., Beguin Y., Fassotte M.F., Najjar F., Paulus P., Rigo P., Fillet G. Whole-body positron emission tomography using 18f-fluorodeoxyglucose

- for posttreatment evaluation in hodgkin's disease and non-hodgkin's lymphoma has higher diagnostic and prognostic value than classical computed tomography scan imaging. *Blood*, 94:429–433, 1999.
- [55] Jerusalem G., Beguin Y., Najjar F., Hustinx R., Fassotte M.F., Rigo P., Fillet G. Positron emission tomography (pet) with 18f-fluorodeoxyglucose (18f-fdg) for the staging of low-grade non-hodgkin's lymphoma (nhl). *Ann Oncol*, 12:825–830, 2001.
- [56] Juweid M.E., Cheson B.D. Positron-emission tomography and assessment of cancer therapy. *N Engl J Med.*, 354:496–507, 2006.
- [57] Juweid M.E., Stroobants S., Hoekstra O.S., Mottaghy F.M., Dietlein M., Guermazi A., Wiseman G.A., Kostakoglu L., Scheidhauer K., Buck A., Namann R., Spaepen K., Hicks R.J., Weber W.A., Reske S.N., Schwaiger M., Schwartz L.H., Zijlstra J.M., Siegel B.A., Cheson B.D., Imaging Subcommittee of International Harmonization Project in Lymphoma. Use of positron emission tomography for response assessment of lymphoma: Consensus of the imaging subcommittee of international harmonization project in lymphoma. *J Clin Oncol*, 25:571–578, 2007.
- [58] Juweid M.E., Wiseman G.A., Vose J.M., Ritchie J.M., Menda Y., Wooldridge J.E., Mottaghy F.M., Rohren E.M., Blumstein N.M., Stolpen A., Link B.K., Reske S.N., Graham M.M., Cheson B.D. Response assessment of aggressive non-hodgkin's lymphoma by integrated international workshop criteria and fluorine-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J Clin Oncol*, 23:4652–4661, 2005.
- [59] Kanji G.K. *100 Statistical Tests*. Kanji G.K. (Hrsg.), SAGE Publication Inc., Los Angeles-London-New Delhi-Singapore-Washington DC. 65, 67, 69, 106, 3. Auflage, 2006.
- [60] Kastan M.B., Zhan Q., el-Deiry W.S., Carrier F., Jacks T., Walsh W.V., Plunkett B.S., Vogelstein B., Fornace A.J. Jr. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and gadd45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, 71:587–597, 1992.

- [61] Kazama T., Faria S.C., Varavithya V., Phongkitkarun S., Ito H., Macapinlac H.A. Fdg pet in the evaluation of treatment for lymphoma: Clinical usefulness and pitfalls. *Radiographics*, 25:191–207, 2005.
- [62] Kenny L., Coombes R.C., Vigushin D.M., Al-Nahhas A., Shousha S., Aboagye E.O. Imaging early changes in proliferation at 1 week post chemotherapy: a pilot study in breast cancer patients with 3'-deoxy-3'-[(18)f]fluorothymidine positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 34:1339–1347, 2007.
- [63] Kong X.B., Zhu Q.Y., Vidal P.M., Watanabe K.A., Polsky B., Armstrong D., Ostrander M., Lang S.A. Jr., Muchmore E., Chou T.C. Comparisons of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 36:808–818, 1992.
- [64] Kostakoglu L., Leonard J.P., Kuji I., Coleman M., Vallabhajosula S., Goldsmith S.J. Comparison of fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography and ga-67 scintigraphy in evaluation of lymphoma. *Cancer*, 94:879–888, 2002.
- [65] Kubota K., Itoh M., Ozaki K., Ono S., Tashiro M., Yamaguchi K., Akaizawa T., Yamada K., Fukuda H. Advantage of delayed whole-body fdg-pet imaging for tumour detection. *Eur J Nucl Med*, 28:696–703, 2001.
- [66] Kubota R., Kubota K., Yamada S., Tada M., Ido T., Tamahashi N. Microautoradiographic study for the differentiation of intratumoral macrophages, granulation tissues and cancer cells by the dynamics of fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake. *J Nucl Med*, 35:104–112, 1994.
- [67] Kubota R., Yamada S., Kubota K., Ishiwata K., Tamahashi N., Ido T. Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. *J Nucl Med.*, 33:1972–1980, 1992.
- [68] la Fougère C., Hundt W., Bröckel N., Pfluger T., Haug A., Scher B., Hacker M., Hahn K., Reiser M., Tiling R. Value of pet/ct versus pet and ct per-

- formed as separate investigations in patients with hodgkin's disease and non-hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 33:1417–1425, 2006.
- [69] Lane D.P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358:15–16, 1992.
- [70] Leyton J., Latigo J.R., Perumal M., Dhaliwal H., He Q., Aboagye E.O. Early detection of tumor response to chemotherapy by 3'deoxy-3'-[18f]fluorothymidine positron emission tomography: the effect of cisplatin on a fibrosarcoma tumor model in vivo. *Cancer Res*, 65:4202–4210, 2005.
- [71] Lister T.A., Crowther D., Sutcliffe S.B., Glatstein E., Canellos G.P., Young R.C., Rosenberg S.A., Coltman C.A., Tubiana M. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol*, 7:1630–1636, 1989.
- [72] Liu L.F. Dna topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem*, 58:351–375, 1989.
- [73] Lock R.B., Ross W.E. Inhibition of p34cdc2 kinase activity by etoposide or irradiation as a mechanism of g2 arrest in chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*, 50:3761–3766, 1990.
- [74] Lu L., Samuelsson L., Bergström M., Sato K., Fasth K.J., Långström B. Rat studies comparing 11c-fmau, 18f-flt, and 76br-bfu as proliferation markers. *J Nucl Med*, 43:1688–1698, 2002.
- [75] Martiat P., Ferrant A., Labar D., Cogneau M., Bol A., Michel C., Michaux J.L., Sokal G. In vivo measurement of carbon-11 thymidine uptake in non-hodgkin's lymphoma using positron emission tomography. *J Nucl Med*, 29:1633–1637, 1988.
- [76] Matthes E., Lehmann C., Scholz D., Rosenthal H.A., Langen P. Phosphorylation, anti-hiv activity and cytotoxicity of 3'-fluorothymidine. *Biochem Biophys Res Commun*, 153:825–831, 1988.
- [77] McLarty K., Moran M.D., Scollard D.A., Chan C., Sabha N., Mukherjee J., Guha A., McLaurin J., Nitz M., Houle S., Wilson A.A., Reilly R.M.,

- Vasdev N. Comparisons of [18f]-1-deoxy-1-fluoro-scylo-inositol with [18f]-fdg for pet imaging of inflammation, breast and brain cancer xenografts in athymic mice. *Nucl Med Biol.*, 38:953–959, 2011.
- [78] Momparler R.L., Karon M., Siegel S.E., Avila F. Effect of adriamycin on dna, rna, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Res*, 36:2891–2895, 1976.
- [79] Moog F., Bangerter M., Kotzerke J., Guhlmann A., Frickhofen N., Reske S.N. 18-f-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography as a new approach to detect lymphomatous bone marrow. *J Clin Oncol*, 16:603–609, 1998.
- [80] Moskowitz C.H., Schöder H., Teruya-Feldstein J., Sima C., Iasonos A., Portlock C.S., Straus D., Noy A., Palomba M.L., O'Connor O.A., Horwitz S., Weaver S.A., Meikle J.L., Filippa D.A., Caravelli J.F., Hamlin P.A., Zeleznetz A.D. Risk-adapted dose-dense immunochemotherapy determined by interim fdg-pet in advanced-stage diffuse large b-cell lymphoma. *J Clin Oncol.*, 28:1896–1903, 2010.
- [81] Munch-Petersen B., Cloos L., Jensen H.K., Tyrsted G. Human thymidine kinase 1. regulation in normal and malignant cells. *Adv Enzyme Regul.*, 35:69–89, 1995.
- [82] Munch-Petersen B., Cloos L., Tyrsted G., Eriksson S. Diverging substrate specificity of pure human thymidine kinases 1 and 2 against antiviral dideoxynucleosides. *J Biol Chem*, 266:9032–9038, 1991.
- [83] Muzi M., Mankoff D.A., Grierson J.R., Wells J.M., Vesselle H., Krohn K.A. Kinetic modeling of 3'-deoxy-3'-fluorothymidine in somatic tumors: mathematical studies. *J Nucl Med.*, 46:371–380, 2005.
- [84] Newman J.S., Francis I.R., Kaminski M.S., Wahl R.L. Imaging of lymphoma with pet with 2-[f-18]-fluoro-2-deoxy-d-glucose: correlation with ct. *Radiology*, 190:111–116, 1994.
- [85] Oyama N., Hasegawa Y., Kiyono Y., Kobayashi M., Fujibayashi Y., Ponde D.E., Dence C., Welch M.J., Yokoyama O. Early response assessment

- in prostate carcinoma by 18f - fluorothymidine following anticancer therapy with docetaxel using preclinical tumour models. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 38:81–89, 2011.
- [86] Oyama N., Ponde D.E., Dence C., Kim J., Tai Y.C., Welch M.J. Monitoring of therapy in androgen-dependent prostate tumor model by measuring tumor proliferation. *J Nucl Med*, 45:519–525, 2004.
- [87] Pakos E.E., Fotopoulos A.D., Ioannidis J.P. 18f-fdg pet for evaluation of bone marrow infiltration in staging of lymphoma: a meta-analysis. *J Nucl Med*, 46:958–963, 2005.
- [88] Peyrade F., Jardin F., Thieblemont C., Thyss A., Emile J.F., Castaigne S., Coiffier B., Haioun C., Bologna S., Fitoussi O., Lepeu G., Fruchart C., Bordessoule D., Blanc M., Delarue R., Janvier M., Salles B., André M., Fournier M., Gaulard P., Tilly H.; Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) investigators. Attenuated immunochemotherapy regimen (r-minichop) in elderly patients older than 80 years with diffuse large b-cell lymphoma: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 12:460–468, 2011.
- [89] Piccart-Gebhart M.J. Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer. *N Engl J Med*, 354:2177–2179, 2006.
- [90] Potter A.J., Gollahon K.A., Palanca B.J., Harbert M.J., Choi Y.M., Moskovitz A.H., Potter J.D., Rabinovitch P.S. Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of dna damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin. *Carcinogenesis*, 23:389–401, 2002.
- [91] Potter A.J., Rabinovitch P.S. The cell cycle phases of dna damage and repair initiated by topoisomerase 2-targeting chemotherapeutic drugs. *Mutat Res.*, 572:27–44, 2005.
- [92] Querellou S., Valette F., Bodet-Milin C., Oudoux A., Carlier T., Harousseau J.L., Chatal J.F., Couturier O. Fdg-pet/ct predicts outcome in patients with aggressive non-hodgkin's lymphoma and hodgkin's disease. *Ann Hematol*, 85:759–767, 2006.

- [93] Raanani P., Shasha Y., Perry C., Metser U., Naparstek E., Apter S., Nagler A., Polliack A., Ben-Bassat I., Even-Sapir E. Is ct scan still necessary for staging in hodgkin and non-hodgkin lymphoma patients in the pet/ct era? *Ann Oncol*, 17:117–122, 2006.
- [94] Rasey J.S., Grierson J.R., Wiens L.W., Kolb P.D., Schwartz J.L. Validation of flt uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in a549 carcinoma cells. *J Nucl Med*, 43:1210–1217, 2002.
- [95] Reske S.R., Deisenhofer S. Is 3'-deoxy-3'-18f-fluorothymidine a better marker for tumour response than 18f-fluorodeoxyglucose? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 33:38–43, 2006.
- [96] Römer W., Hanauske A.R., Ziegler S., Thödtmann R., Weber W., Fuchs C., Enne W., Herz M., Nerl C., Garbrecht M., Schwaiger M. Positron emission tomography in non-hodgkin's lymphoma: assessment of chemotherapy with fluorodeoxyglucose. *Blood*, 91:4464–4471, 1998.
- [97] Robert Koch-Institut(2010). Non-Hodgkin-Lymphome (C82-85). http://www.rki.de/cln_160/nn_1869836/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Praevalenz/Lokalisationen/C82_85,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/C82_85.pdf. Stand: 08.02.2012.
- [98] Rodriguez M., Rehn S., Ahlstrom H., Sundström C., Glimelius B. Predicting malignancy grade with pet in non-hodgkin's lymphoma. *J Nucl Med*, 36:1790–1796, 1995.
- [99] Sandherr M., von Schilling C., Link T., Stock K., von Bubnoff N., Pechel C., Avril N. Pitfalls in imaging hodgkin's disease with computed tomography and positron emission tomography using fluorine-18-fluorodeoxyglucose. *Ann Oncol*, 12:719–722, 2001.
- [100] Schaefer N.G., Hany T.F., Taverna C., Seifert B., Stumpe K.D., von Schulthess G.K., Goerres G.W. Non-hodgkin lymphoma and hodgkin disease: coregistered fdg pet and ct at staging and restaging - do we need contrast-enhanced ct? *Radiology*, 232:823–829, 2004.
- [101] Schöder H., Noy A., Gönen M., Weng L., Green D., Erdi Y.E., Larson S.M., Yeung H.W. Intensity of 18fluorodeoxyglucose uptake in positron emission

- tomography distinguishes between indolent and aggressive non-hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 23:4643–4651, 2005.
- [102] Schwartz J.L., Tamura Y., Jordan R., Grierson J.R., Krohn K.A. Monitoring tumor cell proliferation by targeting dna synthetic processes with thymidine and thymidine analogs. *J Nucl Med.*, 44:2027–2032, 2003.
- [103] Seam P., Juweid M.E., Cheson B.D. The role of fdg-pet scans in patients with lymphoma. *Blood*, 110:3507–3516, 2007.
- [104] Sehn L.H., Donaldson J., Chhanabhai M., Fitzgerald C., Gill K., Klasa R., MacPherson N., O'Reilly S., Spinelli J.J., Sutherland J., Wilson K.S., Gascoyne R.D., Connors J.M. Intoduction of combined chop plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large b-cell lymphoma in british columbia. *J Clin Oncol*, 26:447–454, 2008.
- [105] Shankar L.K., Hoffman J.M., Bacharach S., Graham M.M., Karp J., Lammertsma A.A., Larson S., Mankoff D.A., Siegel B.A., Van den Abbeele A., Yap J., Sullivan D., National Cancer Institute. Consensus recommendations for the use of 18f-fdg pet as an indicator of therapeutic response in patients in national cancer institute trials. *J Nucl Med*, 47:1059–1066, 2006.
- [106] Sherley J.L., Kelly T.J. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem*, 263:8350–8358, 1988.
- [107] Shields A.F., Grierson J.R., Dohmen B.M., Machulla H.J., Stayanoff J.C., Lawhorn-Crews J.M., Obradovich J.E., Muzik O., Mangner T.J. Imaging proliferation in vivo with [f-18]flt and positron emission tomography. *Nat Med*, 4:1334–1336, 1998.
- [108] Shields A.F., Mankoff D., Graham M.M., Zheng M., Kozawa S.M., Link J.M., Krohn K.A. Analysis of 2-carbon-11-thymidine blood metabolites in pet imaging. *J Nucl Med*, 37:290–296, 1996.
- [109] Shields A.F., Mankoff D.A., Link J.M., Graham M.M., Eary J.F., Kozawa S.M., Zheng M., Lewellen B., Lewellen T.K., Grierson J.R., Krohn K.A. Carbon-11-thymidine and fdg to measure therapy response. *J Nucl Med*, 39:1757–1762, 1998.

- [110] Shreve P.D., Anzai Y., Wahl R.L. Pitfalls in oncologic diagnosis with fdg pet imaging: physiologic and benign variants. *Radiographics*, 19:61–77, 1999.
- [111] Sitte P., Weiler E.W., Kadereit J.W., Bresinsky A., Körner C. *Strasburger. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. Sitte P., Weiler E.W., Kadereit J.W., Bresinsky A., Körner C. (Hrsg.), Spektrum-Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin. 35. Auflage, 2002.
- [112] Smith P.J. Dna topoisomerase dysfunction: a new goal for antitumor chemotherapy. *Bioessays*, 12:167–172, 1990.
- [113] Smith P.J., Rackstraw C., Cotter F. Dna fragmentation as a consequence of cell cycle traverse in doxorubicin- and idarubicin-treated human lymphoma cells. *Ann Hematol*, 69:7–11, 1994.
- [114] Smyczek-Gargya B., Fersis N., Dittmann H., Vogel U., Reischl G., Machulla H.J., Wallwiener D., Bares R., Dohmen B.M. Pet with [18f]fluorothymidine for imaging of primary breast cancer: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 31:720–724, 2004.
- [115] Spaepen K., Stroobants S., Dupont P., Bormans G., Balzarini J., Verhoef G., Mortelmans L., Vandenberghe P., De Wolf-Peeters C. [(18)f]fdg pet monitoring of tumour response to chemotherapy: does [(18)f]fdg uptake correlate with the viable tumour cell fraction? *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30:682–688, 2003.
- [116] Sugawara Y., Fisher S.J., Zasadny K.R., Kison P.V., Baker L.H., Wahl R.L. Preclinical and clinical studies of bone marrow uptake of fluorine-1-fluorodeoxyglucose with or without granulocyte colony-stimulating factor during chemotherapy. *J Clin Oncol*, 16:173–180, 1998.
- [117] Sugawara Y., Zasadny K.R., Kison P.V., Baker L.H., Wahl R.L. Splenic fluorodeoxyglucose uptake increased by granulocyte colony-stimulating factor therapy: Pet imaging results. *J Nucl Med*, 40:1456–1462, 1999.
- [118] Sundoro-Wu B.M., Schmall B., Conti P.S., Dahl J.R., Drumm P., Jacobsen J.K. Selective alkylation of pyrimidyl- dianions: Synthesis and purification of 11c labeled thymidine for tumor visualization using positron emission tomography. *Int J Appl Radiat Isot.*, 35:705–708, 1984.

- [119] Surbone A., Longo D.L., DeVita V.T. Jr., Ihde D.C., Duffey P.L., Jaffe E.S., Solomon D., Hubbard S.M., Young R.C. Residual abdominal masses in aggressive non-hodgkin's lymphoma after combination chemotherapy: significance and management. *J Clin Oncol.*, 6:1832–1837, 1988.
- [120] Szczuraszek K., Mazur G., Jelen M., Dziegiel P., Surowiak P., Zabel M. Prognostic significance of ki-67 antigen expression in non-hodgkin's lymphomas. *Anticancer Res*, 28:1113–1118, 2008.
- [121] Tatsumi M., Cohade C., Nakamoto Y., Fishman E.K., Wahl R.L. Direct comparison of fdg pet and ct findings in patients with lymphoma: Initial experience1. *Radiology*, 237:1038–1045, 2005.
- [122] Thill R., Neuerburg J., Fabry U., Cremerius U., Wagenknecht G., Hellwig D., Osieka R., Günther R., Büll U. Comparison of findings with 18-fdg pet and ct in pretherapeutic staging of malignant lymphoma. *Nuklearmedizin*, 36:234–239, 1997.
- [123] Toyohara J., Waki A., Takamatsu S., Yonekura Y., Magata Y., Fujibayashi Y. Basis of flt as a cell proliferation marker: comparative uptake studies with [3h]thymidine and [3h]arabinothymidine, and cell-analysis in 22 asynchronously growing tumor cell lines. *Nucl Med Biol.*, 29:281–287, 2002.
- [124] Ugglå B., Möllgård L., Ståhl E., Mossberg L.L., Karlsson M.G., Paul C., Tidefelt U. Expression of topoisomerase iialpha in the g0/g1 cell cycle phase of fresh leukemic cells. *Leuk Res.*, 25:961–966, 2001.
- [125] Ullrich R.T., Zander T., Neumaier B., Koker M., Shimamura T., Waerzeggers Y., Borgman C.L., Tawadros S., Li H., Sos M.L., Backes H., Shapiro G.I., Wolf J., Jacobs A.H., Thomas R.K., Winkeler A. Early detection of erlotinib treatment response in nslc by 39-deoxy-39-[18f]-fluoro-l-thymidine ([18f]flt) positron emission tomography (pet). *PLoS ONE*, 3:3908, 2008.
- [126] Van Den Bossche B., Lambert B., De Winter F., Kolindou A., Dierckx R.A., Noens L., Van De Wiele C. 18fdg pet versus high-dose 67ga scintigraphy for restaging and treatment follow-up of lymphoma patients. *Nucl Med Commun*, 23:1079–1083, 2002.

- [127] van Waarde A., Been L.B., Ishiwata K., Dierckx R.A., Elsinga P.H. Early response of sigma-receptor ligands and metabolic pet tracers to 3 forms of chemotherapy: An in vitro study in glioma cells. *J Nucl Med*, 47:1538–1545, 2006.
- [128] van Waarde A., Cobben D.C., Suurmeijer A.J., Maas B., Vaalburg W., de Vries E.F., Jager P.L., Hoekstra H.J., Elsinga P.H. Selectivity of 18f-flt and 18f-fdg for differentiating tumor from inflammation in a rodent model. *J Nucl Med*, 45:695–700, 2004.
- [129] Vander Borgh T., Labar D., Pauwels S., Lambotte L. Production of [2-11c]thymidine for quantification of cellular proliferation with pet. *Int J Rad Appl Instrum A.*, 42:103–104, 1991.
- [130] Vesselle H., Grierson J., Muzi M., Pugsley J.M., Schmidt R.A., Rabinowitz P., Peterson L.M., Vallières E., Wood D.E. In vivo validation of 3'-deoxy-3'-[(18)f]fluorothymidine ([18f]flt) as a proliferation imaging tracer in humans: correlation of [18f]flt uptake by positron emission tomography with ki-67 immunohistochemistry and flow cytometry in human lung tumors. *Clin Cancer Res*, 8:3315–3323, 2002.
- [131] Vogg A.T., Buck A.K., Schmid M., Neumaier B., Wczasek K., Zlatopolskiy B.D., Reske S.N. Synthesis and biodistribution of 3'-fluoro-5-[(131)i]iodo-2'-deoxyuridine: a comparative study of [(131)i]fidu and [(18)f]flt. *Nucl Med Biol.*, 34:273–281, 2007.
- [132] Wagner M., Seitz U., Buck A., Neumaier B., Schultheiss S., Bangerter M., Bommer M., Leithäuser F., Wawra E., Munzert G., Reske S.N. 3'-[18f]fluoro-3'-deoxythymidine ([18f]-flt) as positron emission tomography tracer for imaging proliferation in a murine b-cell lymphoma model and in the human disease. *Cancer Res*, 63:2681–2687, 2003.
- [133] Wells P., Gunn R.N., Alison M., Steel C., Golding M., Ranicar A.S., Brady F., Osman S., Jones T., Price P. Assessment of proliferation in vivo using 2-[11c]thymidine positron emission tomography in advanced intra-abdominal malignancies. *Cancer Res*, 62:5698–5702, 2002.

- [134] Yang Y.J., Ryu J.S., Kim S.Y., Oh S.J., Im K.C., Lee H., Lee S.W., Cho K.J., Cheon G.J., Moon D.H. Use of 3'-deoxy-3'-[18f]fluorothymidine pet to monitor early responses to radiation therapy in murine scvii tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 33:412–419, 2006.
- [135] Yau K., Price P., Pillai R.G., Aboagye E. Elevation of radiolabelled thymidine uptake in rif-1 fibrosarcoma and ht29 colon adenocarcinoma cells after treatment with thymidylate synthase inhibitors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.*, 33:981–987, 2006.
- [136] Yeung H.W., Grewal R.K., Gonen M., Schöder H., Larson S.M. Patterns of (18)f-fdg uptake in adipose tissue and muscle: a potential source of false-positives for pet. *J Nucl Med*, 44:1789–1796, 2003.
- [137] Zhang W., Zhou R., Chen P., He P. Study on expression of caspase-3 and bcl-2 proteins and their relations with cell apoptosis and proliferation in non-hodgkin's lymphoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.*, 30:434–438, 2001.
- [138] Zhou M., Gu L., Li F., Zhu Y., Woods W.G., Findley H.W. Dna damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. *J Pharmacol Exp Ther.*, 303:124–131, 2002.
- [139] Zhou R., Frostvik Stolt M., Kronenwett U., Gruber A., Liliemark J., Liliemark E. Real-time rt-pcr for the determination of topoisomerase ii mrna level in leukaemic cells. *Leuk Res.*, 26:487–494, 2002.
- [140] Zwelling L.A., Bales E., Altschuler E., Mayes J. Circumvention of resistance by doxorubicin, but not by idarubicin, in a human leukemia cell line containing an intercalator-resistant form of topoisomerase ii: evidence for a nontopoisomerase ii-mediated mechanism of doxorubicin cytotoxicity. *Biochem Pharmacol*, 45:516–520, 1993.

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ganz herzlich danken!

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Schwaiger, dass ich in seiner Abteilung meine Doktorarbeit durchführen durfte.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Buck für die Bereitstellung des Forschungsthemas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Nicolas Graf für die Hilfestellung bei der Durchführung der experimentellen Versuche.

Dr. Jürgen den Hollander gilt mein Dank für das Einführen in den Umgang mit Zellkulturen und in die restlichen "Basics" der Laborarbeit.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Prof. Buck, Dr. Nicolas Graf, PD Dr. Tobias Dechow und Dr. Ken Herrmann, danke ich recht herzlich für das regelmäßige konstruktive Feedback und die anregenden Diskussionen über unsere Arbeit.

Den Mitarbeitern im nuklearmedizinischen Labor danke ich für das kollegiale Umfeld, die stets gute Atmosphäre und die Hilfestellung bei den anfänglichen Problemen des Laboralltags. Hier gilt mein besonderer Dank Frau Annette Frank.

Frau Sybille Reder und Frau Elisabeth Aywanger danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und die sorgfältigen Kleintier-PET-Aufnahmen.

Ebenso möchte ich mich bei Anja Baumgart für die geduldige Einarbeitung und Hilfestellung bei allen Fragen bezüglich der Zellzyklusanalyse bedanken.

Außerdem danke ich Dr. Marcus Krämer für die histologische Auswertung der Xenotransplantate sowie Tibor Schuster für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Von ganzen Herzen danke ich vor allem meiner Freundin Daniela Zwisler für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, und meinem Freund Rainer Schröter für die liebe und geduldige Unterstützung, insbesondere beim Schreiben der Dissertation mit dem Textbearbeitungsprogramm LaTeX.

Zu guter Letzt möchte ich einen ganz besonderen Dank denjenigen aussprechen, ohne die ich nie soweit gekommen wäre - meinen Eltern.