

Aus dem Medizinischen Zentrum für Radiologie, Klinik für Strahlendiagnostik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. J. Klose

Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg



*Korrelation des Fluoreszenzsignals von Xenografttumoren mit
der MRT-Volumetrie*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Stephan Mario Dulce

aus Berlin

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Heiko Alfke

1. Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Helmut Höffken

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen	5
1 Einleitung	6
1.1 Tumordiagnostische Verfahren	7
1.1.1 Verfahren mit Strahlenexposition	7
1.1.1.1 Projektionsradiographie	7
1.1.1.2 Computertomographie (CT).....	8
1.1.1.3 Positronenemissionstomographie (PET).....	10
1.1.1.4 Single-Photonen-Emissionscomputertomographie (SPECT)	11
1.1.2 Verfahren ohne Strahlenexposition	12
1.1.2.1 Sonographie	12
1.1.2.2 Magnetresonanztomographie (MRT)	13
1.1.2.3 Das optische Imaging und seine Grundlagen	18
1.1.2.3.1 Biolumineszenzmethode	19
1.1.2.3.2 Fluoreszenzmethode.....	20
1.1.3 Kombinierte strahlendiagnostische Verfahren	24
2 Fragestellung.....	26
3 Material und Methodik	27
3.1 Durchführung der Versuche	27
3.2 Meßanordnung	29
3.3 Eichung der Messkammer	33
3.4 Gemessene Parameter	34
3.5 Berechnete Parameter	36
3.5.1 Photonendichten	36
3.5.2 Berechnung von Tumorgößen.....	36
3.5.2.1 Tumorflächen	36
3.5.2.2 Tumorumfänge.....	37
3.5.2.3 Berechnung von Messwertstreuung und Korrelation.....	37
4 Ergebnisse	39
5 Diskussion	55
5.1 Zu Messgrößen und Methodik	55
5.2 Zur Wachstumsphase des Tumormaterials.....	56
5.3 Korrelation von quantitativen Fluoreszenzsignalen und MRT-Volumina	57
5.4. Korrelation von qualitativen Fluoreszenzsignalen und MRT-Volumina	58
5.5. Störfaktoren bei Fluoreszenzsignalen in Geweben	59
5.6. Zum räumliche Tumorwachstum.....	62
5.7. Zur Anwendung der Fluoreszenzmarkierung	63
5.8. Tumorumfänge auf Pixelbasis	65
6 Ausblicke	67
7 Zusammenfassung	69
8 Literaturverzeichnis	71
9 Anhang: Tabellen	86
10 Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	93
11 Lebenslauf Stephan Mario Dulce.....	94
12 Danksagung	97
13 Ehrenwörtliche Erklärung	98

Verwendete Abkürzungen

CCD = Cooled Charged Coupled Device

DsRed-Protein = Rot fluoreszierendes Protein

DESS = Double Echo in Steady State Sequence

ΔTc = Tumorcounts minus Hintergrundemissionen

$\Delta Tc/\mu l$ MRT-Volumen = Photonenvolumendichte

EF = Eichfaktor des Sensors in der Messkammer

FA = Flipwinkel

FoV = Field of View

GFP = Green Fluorescent Protein

KF = geometrischer Korrekturfaktor für Volumina der Tumorformen

LD 50 = letale Strahlendosis bei der 50% der Tiere versterben

P = Pixelzahl

pEGFP-C1 = Reporterogen

pDsRed2-N1 = Reporterogen

ROI = Region Of Interest

r = Korrelationskoeffizient

Sv = Sievert (Maßeinheit für effiziente äquivalente Strahlendosis)

TE = Echozeit

TR = Repetitionszeit

1 Einleitung

In der Tumordiagnostik trat im Laufe der Zeit immer wieder die Frage nach einem schnellen, für den Organismus schonenden und natürlich kostengünstigen Verfahren zur Verifizierung von Tumorumfängen auf. Solche Verfahren sind speziell in der Radiologie Gegenstand intensiver Forschungen.

Über Jahrzehnte sind statische und dynamische bildgebende Verfahren mit und ohne Strahlenexposition zur Tumordiagnostik entwickelt worden. Eine weitere Entwicklung auf diesem Gebiet ist das optische Imaging, ein bereits lange bekanntes Verfahren, welches dank großer Fortschritte in der Gentechnik nun wieder die Aufmerksamkeit der Forschung auf sich gezogen hat und zahlreiche Arbeiten an Tiermodellen zur Folge hatte. Es handelt sich dabei um ein Verfahren, dem Gentechnik und Emissionsmessungen mit Photozellen zu Grunde liegen.

Wie bei jedem Messverfahren treten auch beim optischen Imaging Fragen nach der Korrelation mit bereits bewährten und gut erforschten, bildgebenden Verfahren zur Volumenbestimmung von Tumoren auf.

Beim Arbeiten mit Tiermodellen wurde häufig eine einfache Caliper-Volumetrie, das sind Messungen von Länge und Breite oberflächlicher Tumoren mit der Schublehre, als Bezugssystem für das optische Imaging verwendet. Bildgebende Verfahren mit Strahlenexposition schieden meistens, vor allem bei häufigen Verlaufskontrollen während des Tumorwachstums für viele Organismen, wegen des Erreichens von letalen Strahlendosen, aus. Die Sonographie ist bei Tumoren von Kleintieren, obwohl es besonders kleine Schallköpfe gibt, nur begrenzt anwendbar.

So bietet sich die MRT-Volumetrie als ein geeignetes Bezugssystem für die Beurteilung der Korrelation der beim optischen Imaging entstehenden primären oder sekundären Photonenstrahlung an. Hierfür stehen spezielle Kleintierspulen zur Verfügung.

Auf Grund dieser Überlegungen entstand das Thema dieser Arbeit.

1.1 Tumordiagnostische Verfahren

Zunächst soll ein Überblick über die gebräuchlichen, bildgebenden Verfahren der Tumorumetrie und ihre Grundlagen und Anwendungen auf Tiermodelle gegeben werden.

1.1.1 Verfahren mit Strahlenexposition

1.1.1.1 Projektionsradiographie

Die Projektionsradiographie ist eine einfache und häufig durchgeführte diagnostische Methode der Darstellung von inneren Organen. Sie beruht auf der Absorption von Röntgenstrahlen in Geweben. Die Projektionsradiographie ist zwar kostengünstig aber bei der Darstellung von Weichteilstrukturen eine nicht sehr sensitive und spezifische Methode. Weichteilgewebe, wie z.B. Tumorgewebe und insbesondere kleine Tumoren sind auf Röntgenbildern auf Grund der schwachen Strahlenabsorption weniger gut abzubilden. Zur Volumenmessung von Tumoren ist die Projektionsradiographie nur eingeschränkt zu verwenden, auch wenn man den Tumor in zwei Ebenen darstellt und daraus ein Volumen berechnet (Thurn et al. 1979).

Die effektive Belastung des Körpers mit Strahlung beträgt bei dieser Methode je nach Körperbereich zwischen 0,01- 2 mSv mit Ausnahme von höheren Belastungen bei Angiographien, Urographien und Magen-Darm-Darstellungen (Bernhardt et al. 1995).

Leider ist die Projektionsradiographie bei Kleintieren wegen der geringen Größe des zu untersuchenden Gebietes kaum zu nutzen.

1.1.1.2 Computertomographie (CT)

Das computertomographische Verfahren beruht auf der unterschiedlichen Absorption von Röntgenstrahlen in den verschiedenen Geweben (Wegner et al. 1992). Ein Objekt wird zwischen die Strahlenquelle und einem Detektor positioniert, der die Absorptionsprofile aufnimmt. Diese akquirierten Daten werden mit Hilfe eines Rechners zu Bilddaten als Schnittbilder verarbeitet. Durch eine zirkuläre Rotationsbewegung der Strahlenquelle und des gegenüberliegenden Detektors wird über einen spezifischen Algorithmus der Weichteilkontrast deutlich verbessert. Die CT ist somit bei der Beurteilung von Weichteilstrukturen aussagekräftiger als eine Projektionsradiographie. Da die Gewebe unterschiedliche Absorptionen aufweisen, entstehen mittels CT planare Bilder von Körperregionen mit einer Auflösung von 100 µm oder von 50 µm bei hochauflösenden Dünnschichten (Paulus et al. 1999, 2000, Yamashita et al. 2000, Balaban et al. 2001).

Je nach Gerätespezifikation ist der Zeitaufwand der Bildakquisition sehr gering. Bei einer Datenakquisition von 360 Projektionen in 0,5 s kann man eine vollständige Untersuchung in wenigen Sekunden durchführen. Es werden beim CT entweder sequentielle Einzelschichten (2D Technik) oder spiralförmige Schicht-Volumen-Akquisitionen (3 D Technik) verwendet (Balaban et al. 2001, Soucek et al. 1990).

Die Computertomographie ist mit radiographischen Darstellungen vergleichbar, hat keine Gewebespezifität und erkennt auch keine Stoffwechselfunktionen, wie etwa PET u.ä.. Die CT liefert aber eine große Anzahl von Daten und Interpretationen.

Das CT-Verfahren ist zur Beurteilung ossärer Strukturen sehr gut geeignet, hat aber auch einen festen Stellenwert bei der Beurteilung von Weichteilorganen erlangt. Der Weichteilkontrast ist allerdings geringer als bei der MRT (Paulus et al. 2000, Borah et al. 2001).

Die Detektion und Differenzierung von Weichteilgewebe lassen sich mit Hilfe von jodhaltigen Kontrastmitteln verbessern. Die handelsüblichen Kontrastmittel reichern sich über die Gefäße und Kapillaren extrazellulär in Geweben an (Lewis et al. 2002). Wegen der geringen Sensitivität für Kontrastmittel ist

allerdings eine Kontrastmittelmenge von bis zu 200 ml notwendig (Behe et al. 2007).

Die effektive Strahlenexposition beim Menschen liegt pro Untersuchung zehn bis hundertfach höher als bei der Projektionsradiographie. Sie beträgt je nach abzubildendem Organbereich zwischen 2,5-30 mSv, im Mittel 8 mSv (Laubenberger et al. 1994, Nagel et al 2004, Galanski et al 2001, Bernhardt et al 1995).

Der Vorteil der CT-Untersuchung liegt in der hohen räumlichen Auflösung und der guten morphologischen Darstellung, sowie im schnellen zeitlichen Ablauf bei guter Empfindlichkeit und günstigen Kosten. Nachteilig wirkt sich der geringere Weichteilkontrast im Verhältnis zur MRT aus. Ein weiterer Nachteil der CT ist die beschriebene Strahlenexposition und die geringere Sensitivität für Kontrastmittel.

Es gibt spezielle Kleintier-Tomographen als Mikro-CT, die eine hohe Auflösung von 50µm bei spiralförmiger Volumenakquisition haben (Lewis et al. 2002). Setzt man bei Kleintieren weniger Strahlenenergie ein, findet man bessere Absorption mit höherem Bildkontrast auch bei Weichgeweben (Balaban et al. 2001). Paulus et al. haben 2000 bei Mäusen eine Strahlendosis von 40 kVp bei einem Anodenstrom von 800µA eingesetzt. Die einzelnen Organe erhielten je nach Auflösungsgrad ungefähr 0,3-0,6 Sv. Das waren ca.5% der LD 50 bei Mäusen (Patchen et al. 1992).

Die Mikro-CT benötigt eine effiziente Bildverarbeitungssoftware um den Datensatz einer Maus von 10^9 Voxel zu rekonstruieren (Behe et al. 2007). Wegen der schnellen Datenakquisition ist die CT bei Kleintieren gut geeignet.

Auf Grund ihrer Nachteile ist sie aber für die Verlaufskontrolle des Wachstums von Tumoren bei Mäusen nur eingeschränkt nutzbar.

1.1.1.3 Positronenemissionstomographie (PET)

Die Positronenemissionstomographie ist eine nuklearmedizinische Methode. Es werden kurzlebige radioaktive Isotopen an so genannte Tracermoleküle gebunden (Balaban et al. 2001, Magata et al. 1995, Behe et al. 2007).

Tracer können Tumormarker, Enzyme, Antitumorantikörper, Stoffwechselsubstrate u.ä. sein. Bevorzugte Nuklide sind F-18, C-11, O-15, Cu-64, Ga-68, J- 124 aus deren Positronen beim Zerfall Photonen und Gammastrahlen mit einer Energie von 511 keV entstehen.

Die markierten Tracer werden Organismen injiziert. Durch Ionenkanalproteine oder Enzyme erfolgt ihre Anreicherung in Geweben, Tumoren oder Metastasen, die dann mit Detektoren gemessen werden kann.

Bei der PET wird der Ort des Zerfalls von Positronen messtechnisch erkannt und ein räumliches Bild regeneriert. Gewebe mit raschem Zellumsatz lassen sich mit Radiotracer gut anreichern (Behe et al. 2007).

Mit der PET werden in Ergänzung zur Projektionsradiographie, CT und MRT Körperfunktionen und dynamische Funktionen gemessen, die auf der Zellbiochemie beruhen (Lewis et al. 2002). Die Ortsauflösung ist mit 4 mm im klinischen Bereich und mit 1 mm im Kleintierbereich nicht sehr hoch, die Tumorspezifität aber groß, so dass sehr kleine Tumoren erkennbar sind (Balaban et al. 2001, Cherry et al. 1997, 2001, 2006).

Es gibt allerdings moderne PET-Scanner mit einer Ortsauflösung von 6 mm³ bei einer Nachweisgrenze von ca. 10⁻¹¹ M. Mit Mikro-PET-Technologie werden Ortsauflösungen von 2 mm³ erreicht (Alfke et al. 2001). Apparativ erfordert die PET einerseits Geräte, die Proben regenerieren und stofflich Synthesen durchführen können (z.B. Cyclotron), andererseits sind zur Ortsbestimmung zwei Detektoren mit empfindlichen Photomultipliern, sowie Faseroptik und Rechner erforderlich, die Daten akquirieren, verwerten und auf Folien ausdrucken oder auf Bildschirmen sichtbar machen.

Die aktuelle Strahlenbelastung eines Patienten beträgt bei der PET ca. 5,3 mSv, also mehr als bei der Projektionsradiographie. Die verwendeten Isotopen zerfallen allerdings kurzfristig entsprechend der verwendeten Isotope.

Die Vorteile der PET sind die Visualisierung biochemischer Reaktion und Zellrezeptoren. Nachteilig kann die Zerstörung von Markern durch Strahlung sein.

Die Positronenemissionsradiographie ist anfangs hauptsächlich auf dem Gebiet der experimentellen Forschung an Kleintieren und bei der Genforschung und erst später in der Tumor- und Metastasendiagnostik beim Menschen eingesetzt worden. In der Arbeit von Lewis et al. (2002) werden allein elf verschiedene Kleintier-PET-Geräte beschrieben.

1.1.1.4 Single-Photonen-Emissionstomographie (SPECT)

Eine weitere Methode zur Darstellung spezifischer Tumorgewebe ist die Photonemissionstomographie. Der Unterschied zur Positronen-Emissionstomographie besteht darin, dass Photonemissionen aus dem Zerfall von radioaktiven Tracern direkt mit einer rotierenden Gamma-Kamera gemessen und zur Bildrekonstruktion über einen Rechner ausgewertet werden (Lewis et al. 2002). Es werden ebenso wie bei der PET systemisch wirkende, radioaktiv markierte, Gammastrahlen emittierende Substrate, wie einfache Moleküle, Peptide oder Antikörper (so genannte Chelatoren) verwendet, die sich über Ionenkanalproteine oder enzymatisch in Tumorzellen anreichern. Die verwendeten Isotopen Tc-99m, Ga-67, In-111, J-123,131 haben eine Gamma-Energie zwischen 93 und 360 keV (Stein et al. 2003).

Die Geräteanordnung ist der PET ähnlich. Im Unterschied zur PET werden bei der SPECT die Photonen im Winkel von 90° auf dem Detektor abgebildet, vor den verschiedene Kollimatoren geschaltet werden, deren Spektren die Auflösung beeinflussen. Die Rotation der Detektoren ermöglicht eine 3D-Rekonstruktion des Bildes. Je größer die Entfernung zwischen Kollimator und Objekt ist, desto besser ist die Vergrößerung des Objektes.

Bei klinischen Untersuchungen mit Einsatz von Tc99m wird eine Auflösung von deutlich unter 10 mm erreicht (Beckmann et al. 2007). Die SPECT ist im klinischen Gebrauch trotz geringer Ortsauflösung sehr tumorspezifisch (Behe et al. 2007). Je größer die Energie der Nuklide ist, desto geringer ist die

Ortsauflösung (Klinisch <1cm). Je besser die Vergrößerung ist, desto besser ist aber die Auflösung (<1mm) bei Schwächung der Sensitivität.

Bei Kleintieren erfordert die Bildgebung eine bessere Auflösung, die mit Hilfe von den Detektoren vorgeschalteten Pin-Hole-Collimatoren auch unter 1 mm erreicht wird. Multi-Pin-Hole-Collimatoren verbessern zusätzlich die Sensitivität der Messung von ca. 10^{-10} - 10^{-11} M (Beckmann et al.2007, Behe et al. 2007, Wirrwar et al. 2001, Weber et al. 1999).

Bei der Single-Photonen-Emissionscomputertomographie finden wir eine geringere Strahlenbelastung für Organismen als bei der Computertomographie und eine gute Visualisierung biochemischer Reaktionen.

1.1.2 Verfahren ohne Strahlenexposition

1.1.2.1 Sonographie

Die Sonographie basiert auf der Messung von akustischen Signalen nach Aussenden von Schallwellen mit Frequenzen zwischen 3 – 12 MHz. Der Untersucher tastet mit einer Sende- und Empfangssonde den Körper ab. Die Empfangsdaten der Sonde werden auf einen Rechner übertragen, der dann über einen Bildschirm die Organstrukturen in 2 D oder 3 D sichtbar macht. Tumorflächen lassen sich im 2D-Verfahren gut, Tumorumfänge mit dem 3D-Verfahren allerdings nur bedingt berechnen, da der eigentliche Tumor oft schwer von dem umliegenden, entzündlichen Gewebe und möglichen Nekrosen abgrenzbar ist. Deshalb ist eine gewisse Mindestgröße zur Tumordetektion notwendig.

Die Sonographie ist eine Kosten sparende, leicht zu handhabende diagnostische Methode ohne Strahlenexposition, die wegen der guten Ortsauflösung und besseren Weichteilkontraste im Vergleich zur Projektionsradiographie bei der Beurteilung von Weichteilstrukturen sehr häufig angewendet wird (Frommhold et al. 1982).

Störfaktoren der Sonographie sind vor allem Gasansammlungen im Intestinaltrakt, sowie Luft in den Lungen und die Knochen, was zur Reflexion bzw. Absorption des Ultraschallsignals führt. Die Sonographie ist vom jeweiligen Untersucher abhängig und deshalb nicht immer reproduzierbar.

Bei Kleintieren, insbesondere Mäusen, ist die Sonographie im experimentellen Bereich kaum einsetzbar, da die Größe des zu untersuchenden Gebietes sehr klein ist und dadurch eine sichere Volumenbestimmung schwer möglich werden kann.

1.1.2.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Grundlagen der heutigen MRT haben 1946 Bloch et. al. und Purcell et. al. erarbeitet, als sie Flüssigkeiten und Feststoffe mit Hilfe der Kernresonanz untersuchten. Später wurde das Verfahren zur Analytik in der Chemie und Biochemie verwendet (Suhr 1965, Dwek 1973) und erst 1973 hat Lauterbur erstmalig mit Hilfe der magnetischen Kernspinresonanz ein Verfahren zur Bildgebung entwickelt, das Damadian 1971, 1977 dann zur Darstellung von Schnittbildern beim Menschen einsetzte. In den folgenden Jahren wurde die Methode der Magnetresonanztomographie zu einem multiplanaren Schnittbildverfahren entwickelt (Habermehl et al. 1982, Sander 1989). Durch die seitdem andauernde ständige Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Computertechnik konnte die Bildgebung des MRT bis heute ständig verbessert werden.

Nach bisherigen Erfahrungen besteht bei einer MRT- Untersuchung kein gesundheitliches Risiko, worin der für die Anwendung sehr wichtige Vorteil gegenüber anderen strahlenexponierenden Verfahren liegt.

Gerätestruktur und Prinzip

Ein MRT-Gerät besteht aus einem Hochfrequenzsender und -empfänger, einer mit Stickstoff oder Helium gekühlten Magnetspule, magnetischen Gradientenfeldern, einem Signalverstärker, einem Analog-Digitalwandler und einem Rechner mit Signalverarbeitungsanlage.

Einem Untersuchungsobjekt werden in einem starken statischen Magnetfeld energiereiche Hochfrequenzimpulse von ca. 1 KW zugeführt. Diese Impulse, die der kernspezifischen Resonanzfrequenz entsprechen, heben den Spin der im Magnetfeld geordneten Atomkerne auf ein höheres Energieniveau an, das sie nach Unterbrechung der Energiezufuhr unter Abgabe eines Hochfrequenzsignals als Echo wieder verlieren. Der Hochfrequenzempfänger registriert die Resonanzsignale, nachdem sie durch die Signalverarbeitung verstärkt werden.

Der Rechner koordiniert schließlich alle Arbeitsgänge des MR-Tomographen zu Schnittbildern und speichert die Ergebnisse bis zum Ausdruck über ein Kamerasystem auf Folien oder in Zahlen bis zur dritten Dimension (Penka et al. 1977, Petersen et al. 1986).

Meßtechnisch arbeitet man bei der MRT-Bildgebung überwiegend mit dem Spin-Echoverfahren oder dem Gradienten-Echoverfahren zur Erzeugung von Magnetresonanzen (Sander 1989). Bei dem Spin-Echoverfahren entsteht das Spinecho durch einen Invertierungsimpuls nach Anregung durch einen Hochfrequenzimpuls. Beim Gradienten-Echoverfahren fehlt der Invertierungsimpuls. Dieses Verfahren arbeitet deshalb schneller als das Spin-Echoverfahren. Sander hat 1989 zusätzlich ein Mehrschichtgradienten-Echoverfahren entwickelt, das eine Sequenz von Einzelschichten darstellt. Es beschleunigt die Bildgebung bei der MRT. Eine Schicht erfordert ca. 20 ms. Durch längere Messzeiten werden mehr Daten aufgenommen, so dass sich Bildqualität und Kontrastauflösung verbessern.

Magnetismus und Kernspin

Der Magnetismus der Atomkerne wird durch die Rotationsbewegungen seiner Kernteilchen im Winkel von 90° zur Polarisationsrichtung als Spin nach aussen ausgelöst, wenn im Kern eine ungerade Teilchenzahl vorliegt. Deshalb kommen nur Teilchen wie Wasserstoffprotonen (H-1, H-2), Kohlenstoff (C-13), Stickstoff (N-15), Natrium (Na-23), Phosphor (P -31) Sauerstoff (O-17), die in Geweben und Organismen vorkommen, als Messobjekt in Frage (Penka et al. 1977). Die Magnetfeldstärke wird in Tesla, gemessen und hat positiven Einfluß auf die Polarisierung der Kernspinteilchen. Hingegen führen steigende Temperaturen zur Depolarisierung der Spinteilchen. Bei 1 –Tesla-Geräten und Temperaturen von 37° werden ca. sieben pro 1 Mill. Wasserstoff-Kernspinn polarisiert und der Messung zugänglich gemacht (Laubenberger et al. 1994).

Relaxation

Nach Ausrichtung des Kernspins parallel zum angelegten Magnetfeld nennt man den Rückfall der Energie in den Gleichgewichtszustand, nachdem die Energiezufuhr unterbrochen wird, T-1 Relaxation und die Zeit in der das geschieht die T-1 –Spin-Gitter-Relaxationszeit, die vom Gewebe, der Flussdichte und der Temperatur abhängig ist. Bei Feldstärken von 0,5 Tesla liegt sie für Weichgewebe bei Zehntelsekunden. Die T-1 Relaxationszeit beeinflusst bei der MRT die Signalintensitäten und Bildkontraste (Sander 1989).

Dephasierungen der Kernspinvektoren treten nach den einzelnen Hochfrequenzimpulsen auf. Sie werden als T-2 Spin-Spin-Relaxation auch als transversale Relaxation bezeichnet. Die so genannte T-2 Spin-Spin-Relaxationszeit, die nach Abfall der Quermagnetisierung gemessen wird, ist von Temperatur und Geweben aber auch von Geräten abhängig und wird in der Regel geringer als die T-1 Relaxationszeit gefunden. Sie beeinflusst ebenfalls Signalintensitäten und Bildkontraste (Sander 1989). Die T2-Gewichtung erbringt hellere flüssigkeitsbetonte Bilder im Gegensatz zur T1-Gewichtung (Laubenberger et al. 1994).

Erstellung von Bildtomogrammen

Die magnetischen Gradientenfelder dienen der Gewebe bezogenen Kodierung der Magnetresonanzsignale und sind in allen drei Raumebenen angeordnet. Um ein Bildtomogramm zu erhalten, müssen die kodierten Resonanzsignale einer Frequenzanalyse unterzogen werden. Das basiert auf dem proportionalen Zusammenhang zwischen der Resonanzfrequenz der Kernspins und der magnetischen Flußdichte (Lauterbur 1973). Man arbeitet heute mit Fourier-Verfahren (Griebel et al. 1985, Löffler et al. 1981, Petersen et al. 1986), wobei Raumdimensionen durch selektive Schichtanregung, Phasenkodierung und Frequenzkodierung rekonstruiert werden.

Anwendung der MRT

Schwerpunkte der Diagnostik mit der Magnetresonanz sind Weichteilstrukturen im Körper, aber auch ossäre Strukturen sind gut darstellbar.

Da bei der MRT der Gewebekontrast der erstellten Bilder mit höheren Magnetfeldstärken und Signalausbeuten zunimmt, finden wir die Tendenz zu Geräten mit deutlich mehr Tesla. Meist sind MR-Tomographen mit Feldstärken zwischen 0,5 und 2 Tesla üblich. Es befinden sich aber auch Geräte mit 3,0, 7,0 und sogar 9,4 Tesla in der klinischen Anwendung oder experimentellen Erprobung.

Allgemein gilt: Je höher die magnetische Feldstärke, desto größer die Signalaktivitäten und desto besser die Bildqualität auf Grund besserer Auflösung. Die MRT bildet Gewebe in 3 D mit einer Ortsauflösung von ca. 50 μm , in vitro von ca. 10 μm , ab (Louie et al. 2000, Behe et al. 2007). Eine zusätzliche Verbesserung des Signals und der Ortsauflösung bieten spezielle Oberflächenspulen, wie bei Kleintieren, die das Signal-Rauschverhältnis optimieren.

Man kann durch paramagnetische Kontrastmittel, die nach i.v. Injektion nur im extrazellulären Raum bleiben, versuchen einzelne Gewebestrukturen besser darzustellen. Ein derartiges Kontrastmittel ist ein Gadoliniumderivat. Es führt zu

einer Verkürzung der Protonenrelaxationszeit und einer höheren Signalintensität und damit schärferen Kontrasten. Hierzu haben Sander (1989), Li et al. (1998), Zhu et al. (2000), und Maurer (2007) eingehende Studien vorgelegt. Auf diese Weise können die Gewebe- und Tumordurchblutung und die Sauerstoffsättigung, sowie die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke dargestellt werden. Durch Eingriffe in die zelluläre Eisenaufnahme ist es möglich gewesen, weil Eisen paramagnetisch ist, Tumorzellen an ihrer ausgeprägten Eisenaufnahme mit Hilfe einer MR-Tomographie an der verkürzten T_1 Relaxationszeit und höheren T_1 Signalintensität zu erkennen (Alfke et al. 2001).

MRT bei Kleintieren

Für eine MRT bei Kleintieren wurden spezielle Versuchsbedingungen entwickelt. Das bezieht sich insbesondere auf die magnetischen Feldstärken. Um eine größere Signalausbeute zu erreichen, haben Sarkar et al. (1988, 1989) sowie Moats et al. (2001) magnetische Feldstärken von 9,4 bzw. 11,7 Tesla angewendet. Alfke et al. 2001 berichten über den tierexperimentellen Einsatz von 14,1 Tesla Geräten. Die Kleintierspulen haben einen geringen Totraum, wodurch das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht wird. Normalspulen würden bei Kleintieren schlechte Bildqualität und geringe Sensitivität erbringen (Behe et al. 2007). Moats et al. (2001) haben mit den hohen magnetischen Feldstärken bei Mäusen Tumoren mit einem Volumen von 60 μ l erkannt. He et al. (2000) und Maurer (2007) haben ihre Untersuchungen bei Mäusen mit einem 1,0 Tesla-Gerät durchgeführt.

Da normale Klinik-MRT-Geräte von ihrer Auflösung her für Kleintiere nicht ausreichen, werden für die Forschung besondere MRT-Geräte vorgehalten, die aber teuer sind. Deshalb werden in Ergänzung zu normalen Klinikgeräten spezielle Kleintierspulen hergestellt (Alfke et al. 2004, Maurer 2007), in die man Mäuse narkotisiert einbringen kann und die eine gute Auflösung von 312,5 μ m x 312,5 μ m bieten. Die Akquisitionszeiten liegen bei 8 bis 20 Minuten (Heverhagen et al. 2004).

Zur Analyse der MRT-Datensätze haben Heverhagen et al. (2004) und Alfke et al. (2004) eine Software in Verbindung mit dem MeVis-Zentrum an der Universität Bremen entwickelt. Damit können funktionelle Datensätze ausgewertet, sowie pixelbasierte Parameter und schließlich Tumoren im 3D-Format als Volumen dargestellt werden.

An mit verschiedenen Tumorzellen geimpften Mäusen konnten seit ca. 1996 zahlreiche Modelle zum Tumorwachstum entwickelt werden, deren Ausdehnung und Einfluß der Chemotherapie mit der MRT verfolgt werden konnte, weil die MRT eine besonders gute Auflösung für Weichgewebe hat (Lewis et al. 2002).

Vor- und Nachteile der MRT

Vorteile der MRT sind die fehlende Strahlenbelastung des Organismus, sowie der gute Weichteilkontrast und die präzisen Informationen über morphologische Strukturen.

Nachteile des Verfahrens sind die größtenteils langen Akquisitionszeiten, die zur Bilderstellung notwendig sind, sowie die geringere Sensitivität von 10^{-3} - 10^{-5} M gegenüber den dynamischen Verfahren, die zu Nachweisgrenzen von ca. 10^{-5} M führen.

Des Weiteren sind die hohen Kosten der MRT zu berücksichtigen.

1.1.2.3 Das optische Imaging und seine Grundlagen

Definition und historischer Rückblick:

Im Gegensatz zu den Schnittbildverfahren, wie z. B. MRT oder CT beruht das optische Imaging auf der Messung von Tumor bezogener Photonenstrahlung, die als Primär oder Sekundärlicht entsteht, wenn im Stoffwechsel der Tumorzellen chemische Reaktionen als Lumineszenz ausgelöst oder Fluoreszenzfarbstoffe in die Tumorzellen eingebracht werden. Bei den Schnittbildverfahren werden Tumorumfänge mathematisch aus Integralen der Schnittbilder mit Hilfe von spezieller Software errechnet (Heverhagen et al.

2004). Beim optischen Imaging muß erst die Photonenemission über eine Eichung in Beziehung zu Volumina gebracht werden. Die Messung der Photonenstrahlung erfolgt mit Hilfe von Multipliern und Photozellen.

Schon 1929 hat Cutler Licht zur diagnostischen Durchleuchtung von Mammæ verwendet. Allerdings waren Sensibilität und Spezifität der Methode gering. Erst in den 80er und 90er Jahren entstand mit der Entwicklung von empfindlichen CCD-Kameras (cooled-charged-coupled device) neues Interesse an der so genannten optischen Bildgebung (Bremer et al.2001, Marshall et al.1984, Drexler et al.1985, Franceschini et al. 1997). Man hoffte, dass dieses Verfahren Bedeutung für die Mammographie und Endoskopie bekommt. Das Problem blieb aber die Streuung und Absorption der zu messenden Photonen in Geweben. Die Photonenstreuung erwies sich als der hauptsächliche Faktor für die tiefenabhängige geringe Ortsauflösung der Methode von 100 µm (Alfke et al. 2001). Es wurde bereits damals deutlich, dass rotes Licht weniger in Geweben absorbiert wird und besser Gewebe durchdringen kann. Als optische Marker oder Kontrastmittel wurden Fluorochrome, wie Indocyaningrün entwickelt, die bei Bestrahlung gute Rotemission zeigten. Es wurden vorwiegend Absorptionsmessungen als Intensitätsabschwächungen des eingestrahlten Lichtes durchgeführt, um Tumoren in den Mammæ zu lokalisieren.

In der weiteren Entwicklung kam es dann zu der Einbindung von Genfähen und zellständigen Proteasen in die Freisetzung von Fluoreszenz- und Lumineszenzemissionen (Wack et al. 2003, Contag et al. 1997, 2000, Hasegawa et al. 2000, Alfke et al. 2000). Heute beginnt das optische Imaging sich die Tumordiagnostik zu erschließen.

1.1.2.3.1 Biolumineszenzmethode

Die Biolumineszenzmethode beruht auf der Erzeugung von Primärlicht durch eine Luziferase katalysierte, Energie freisetzende Reaktion in Tumorzellen, nach in vivo Gabe von D-Luziferin (Haeckel et al. 1995 Wood 1995). Die Photonenakquisition geschieht mit einer CCD-Kamera optimal über ca. 120 s

und wird quantitativ digital registriert (Hundt et al. 2008).

Hintergrundemissionen sind zu beachten.

Die Lumineszenzmessung hat etwa die gleiche Empfindlichkeit wie die Radioaktivitätsmessungen.

1.1.2.3.2 Fluoreszenzmethode

Prinzip und Herstellung von Genföhren

Die Fluoreszenzmethode, mit der sich die vorliegende Arbeit befasst, beruht auf der Messung von energieärmerem Sekundärlicht, das entsteht, wenn ein Fluoreszenzfarbstoff mit einem energiereichen Primärlicht bestrahlt wird (Haeckel et al. 1995). Üblicherweise wird mit Green Fluorescent Protein (GFP) oder DsRed Protein als Fluoreszenzfarbstoff gearbeitet. Derartige Fluoreszenzfarbstoffe müssen selektiv in Tumorzellen eingebracht werden, um ein Wachstum dieser Tumoren an Hand von Photonenemissionen experimentell verfolgen zu können. Die Messungen finden ebenfalls mit einer CCD-Kamera statt. Die Belichtungszeiten liegen zwischen 20 ms und 500 ms, (Gehrke 2003) und sind damit deutlich geringer als bei der Lumineszenzmethode.

Die Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in der Löslichkeit und im Polymerisationsgrad unterscheiden, sind an einen Vektor als so genannte Genföhre gebunden, so dass ein Reporter gen entsteht, das mit Hilfe der Endocytose in Tumorzellen aufgenommen wird, die damit geklont sind und vermehrungsfähig bleiben. (Gehrke 2003)

Als Vektoren werden Präparationen von Adenoviren (Chandhuri et al. 2001), von SV40 Viren (Contag et al. 1997), Retroviren (Choy et al. 2003, Hasegava et al. 2000, Bouvet et al. 2002), Lipid-DNA-Komplexen (Subramanian et al. 1996), Salmonella Typhimurium (Zhao et al. 2005) und Bakuloviren (Gehrke 2003) verwendet.

Gehrkes Vektoren sind mehrfach gereinigt, um Immunreaktionen gegen Virusmaterial zu verhindern.

Autofluoreszenz von Geweben

Fluoreszenzsignale unterliegen in Geweben einer Autofluoreszenz auf Grund von Nukleinsäuren, Nikotinsäureamid und Flavonukleotiden sowie aromatischen Proteinbausteinen (Fellner et al. 1979). Deshalb muß jede Messung einer Tumoremission mit einem tumorfreien Gewebehintergrund abgeglichen werden. Fellner und später Wack et al. (2003) schlugen vor, eine bei 470 nm gemessene Autofluoreszenz von einer bei 520 nm gemessenen GFP-Fluoreszenz abzuziehen, um die Tumor bedingte Photonenemission zu erhalten. Die Autofluoreszenz tritt bei Messungen von GFP-markierten Tumoren stärker als bei DsRed –Protein markierten Tumoren in Erscheinung und kann durch kurze Belichtungszeiten von 20 ms klein gehalten werden (Gehrke 2003).

Struktur und Verhalten von GFP

Das aus einer Tiefseequalle isolierte Green-Fluoreszent-Protein (GFP) ist die Polypeptidkomponente eines Polynucleoproteids (Wilmann et al. 2004) und hat mit 238 Aminosäuren eine Molekülmasse von ca. 27 kDa (Prasher et al. 1992). Es produziert unter Strahlung in einer Energietransferreaktion grünes Licht, wobei eine Oxidation und Cyclisierung des Moleküls eintritt (Chalfie et al. 1995, Subramanian et al. 1996). Nach Anregung durch das energiereiche Primärlicht von 395 nm emittiert GFP ein energieärmeres, grünes Sekundärlicht von 509 nm bzw. 520 nm (Kain et al. 1995, Wack et al. 2003, Fellner et al. 1979, Heim et al. 1994, 1995). Wack et al. (2003) haben für ihre Fluoreszenzmessungen bei GFP-geklonten Pankreastumorzellen Laserstrahlen als primäres Anregungslicht verwendet und damit die Ausbeute der Fluoreszenzemission deutlich gesteigert. So konnten sie Tumoren erkennen die nur 10% GFP-Gene hatten. Tasetti et al. (1997) und Ahmed et al. (2002) arbeiteten bei der Messung der Fluoreszenzemission ebenfalls mit Laser als Excitationslicht.

Struktur und Verhalten von DsRed 2 Protein

Das aus einer Koralle gewonnene DsRed-Protein ist ein tetrameres Homologes des GFP, kann aber auch durch Klonung aus einem Quallenprotein (GFP) hergestellt werden (Matz et al. 1999) oder durch Photokonversion aus nicht strahlendem GFP entstehen (Chudakov et al. 2003). Seine Struktur wurde von Wall et al. (2000), Shaner et al. (2004) und Baird et al. (2000) untersucht. Es hat ebenfalls eine Molekülmasse zwischen 25-30 kDa (Hoffman 2005). Die Rot-Emission ist offensichtlich auf mehrere Phenol- und entstehende Imidazolgruppen sowie deren n-Elektronenschwingungen im Polypeptidmolekül zurückzuführen. 22% der Aminosäuresequenzen sind nach Wall mit denen im GFP identisch. DsRed hat nach Anregung mit Licht von 558 nm eine Sekundär-Lichtemission von 583 nm. Durch Umwandlung von DsRed-Protein in eine monomere Struktur hat man inzwischen mehrere langwelliger emittierende Fluoreszenzproteine entwickelt (Shaner et al. 2004, Vinterstein et al. 2004, Heim et al. 1994). Auch Hoffman (2005) berichtet über die Entwicklung zahlreicher Modelle für Fluoreszenzmarkierung von Zelllinien, auch als Doppelkloning mit GFP und DsRed-Protein oder Cyan-F-Protein, wobei es zur Steigerung der Fluoreszenzemission kommt (Vinterstein et al. 2004, Chudakov et al. 2003).

Zelluläre Aufnahme von GFP- und DsRed Genen

Nach Subramanian et al. (1996) ist GFP auf Grund von Flow-zytometrischen Untersuchungen intrazellulär lokalisiert.

Bei gesunden Mäusen haben Yang et al. (2000a) nachweisen können, dass nach einer Injektion von GFP-Gen bereits nach 5-8 Stunden in Gehirn und Leber Fluoreszenz auftritt, die bis zu vier Monaten in der Leber nachweisbar ist. Sato et al. (2003) entwickelten ein DsRed-Gen, das bei Ratten nach Injektion ins Knochenmark eine Fluoreszenzemission in der Leber auslöst. Moats et al. (2001) haben an einem Neuroblastommodell bei Mäusen die Aufnahme von Retrovirus-GFP-Gen in wachsende Tumoren nachgewiesen.

Absorption von Fluoreszenzemissionen im Gewebe

Licht von 400-650 nm dringt nur einige Millimeter, Licht von 650-1000 nm dringt einige Zentimeter, in die Haut ein. Deshalb ist nahes Infrarotlicht wegen besserer Gewebepenetration für in vivo-Applikationen sinnvoll (Bremer et al. 2001). Eine Absorption der Lichtemission von GFP in Geweben ist ca. 1,4 bis 1,7 fach größer als bei DsRed-Protein (Jacques et al. 1991), was auch später durch Gehrke (2003, Bremer et al. 2001) bestätigt wurde. Sie kann sowohl beim Anregungslicht als auch beim Emissionslicht wellenlängenabhängig auftreten (Troy et al. 2004, Rice et al. 2001, Yang et al. 2000, Vinterstein et al. 2004). Deshalb wird die Anwendung von DsRed 2 als Reportergen, das langwelliger emittiert, empfohlen. Signalfächen wurden von Gehrke (2003) bei Rotfluoreszenz größer als der Tumorfläche entspricht, bei Grünfluoreszenz eher kleiner gefunden.

Immunologie von biologischen Fluoreszenzfarbstoffen

Yang et al. (2000) haben bei ihren Untersuchungen an Mäusen mit Melanometastasen keine Immunreaktionen gegen GFP exprimierende Zellen gefunden. Ebenso haben Bobek et al. (2004) bei einem Lungencarcinommodell mit zahlreichen Lymphknotenmetastasen keine Immunreaktion auf GFP gefunden. Dem stehen aber Befunde von Liu et al. (1999) gegenüber, wonach die GFP-Expression toxisch ist und zu Apoptose führt. Vinterstein et al. (2004) fand eine Toxizität von DsRed 2 gegenüber Colibakterien, was bei einem homologen und besser löslichen DsRed 3 in diesem Umfang nicht zu beobachten war.

Anwendung des Optischen Imagings

Die praktische Anwendung des optischen Imagings ist bisher meist an Nacktmäusen erfolgt. Man führte Wachstumskinetiken von Tumoren, Metastasendiagnostik und Therapiestudien durch. Die Mäuse wurden subkutan, intraperitoneal oder intravenös mit dem mit GFP oder DsRed geklonten Tumormaterial transfiziert und das Tumorwachstum oder die

Metastasierung an Hand von Emissionsmessungen verfolgt (Choy et al. 2003, Diehn et al 2003, Gehrke 2003, Hasegawa et al. 2000, Contag et al. 2000, Bouvet et al. 2002, Balaban et al. 2001, Hoffman et al. 2006, Wack et al. 2003, Chandhuri et al. 2001, Yang et al. 2000, Peyruchaud et al. 2003, Alfke et al. 2004).

Bei Hoffman (2001, 2005), Alfke et al. (2000, 2001) und Choy et al (2003a) findet man gute Übersichten über die Methode und Anwendung des Klonierens von Tumorzellen verschiedener Herkunft mit Fluoreszenzreportergenen sowie Wachstumskinetiken der Tumoren an Hand von Messungen der Fluoreszenzemission und ihre Beeinflussung durch zytostatische Medikamente. Die Beobachtungszeit der Untersuchungen beträgt meist nur 14-25 Tage, selten 40 Tage. 2006 haben Hoffman und Yang et al. sowie Hasegawa et al. (2000) und Peyruchaud et al. (2003) über Untersuchungen an transfizierten Tumormäusen bis zu 30 bzw. 60 Tagen berichtet. Nur Bouvet et al. (2002) haben das Metastasenwachstum 100 Tage lang fluoreszenzmikroskopisch verfolgt.

Die optische Bildgebung mittels Fluoreszenzmarkierung könnte eine gute Möglichkeit bieten, kostengünstig, schnell, spezifisch, nicht invasiv und vor allem ohne Strahlenbelastung des Patienten Tumoren in einem frühen Stadium darzustellen.

Der Vorteil des optischen Imagings ist sicher der geringe Zeitaufwand im Sekundenbereich. Nachteilig sind aber die zahlreichen möglichen Störfaktoren bei der Ermittlung quantitativer Photonenemissionen im Verhältnis zu Tumorumfängen und die noch geringe Ortsauflösung von ca. 100µm.

1.1.3 Kombinierte strahlendiagnostische Verfahren

Um die Vorteile der dynamischen und der statischen Bildgebung zu kombinieren, wurden inzwischen Geräte entwickelt, die die Bilder beider Verfahren fusionieren. Die statischen Schnittbildverfahren, wie CT oder MRT, haben eine hohe räumliche Auflösung, die dynamischen Verfahren, wie PET

oder SPECT, dafür eine hohe Sensitivität und Gewebsspezifität und liefern Informationen über metabolische Prozesse. Auf diese Weise können Tumoren besser und früher erkannt werden (Behe et al 2007).

Zurzeit werden die Kombinationen PET/MRT, PET/CT, SPECT/ MRT und SPECT/ CT in den Markt eingeführt, wovon z.B. PET/CT auch von Krankenkassen als sinnvolle Innovationen betrachtet werden, weil sie zeitsparend arbeiten (Reibe 2009).

Besondere Bedeutung haben die kombinierten Verfahren in der Kleintierforschung, aus der sie auch entwickelt wurden (Behe et al. 2007, Beyer et al. 2000).

Vorteile der Fusion sind eine Platzersparnis bei den Messgeräten, weil der PET-Ring in eine Bohrung des MRT eingeführt werden kann und die simultane Datenakquisition sich zeitsparend auswirkt.

Der Nachteil von PET/MRT ist, dass MRT-Daten nicht separat erhoben werden können und gegenseitige Beeinflussung von Magnetfeld und Multiplier auftreten, die nur behoben werden können, wenn der Multiplier außerhalb des Gerätes steht oder Photodioden an seine Stelle treten.

Der Nachteil von SPECT/MRT ist die Zeitverzögerung bei Messungen, weil die Geräte getrennt aufgestellt werden müssen und die Objekte zu den Messorten transportiert werden müssen.

Das PET/CT bringt eine gute Tumorlokalisierung und wird am häufigsten in der Tumorforschung bei Kleintieren eingesetzt.

Das SPECT/CT ist allerdings nur mit Pinhole-Kollimatoren für Kleintierstudien geeignet (Behe et al. 2007).

2 Fragestellung

Choy et al. (2003) und andere Autoren haben bei Kurzzeitbeobachtungen des Wachstums von experimentellen, fluoreszenzmarkierten Tumoren eine lineare Korrelation von Fluoreszenzsignalen und Tumorumfängen gefunden. Als Volumenbestimmung verwendeten sie die Caliper-Volumetrie ($\text{Länge} \times (\text{Breite})^2 \times 0,52$).

Wir gingen der Frage nach, ob Fluoreszenzsignale grundsätzlich linear proportional sind, insbesondere auch bei Langzeitbeobachtungen mit Tumorumfängen korrelieren und ob die Caliper-Volumetrie ein verlässlicher Maßstab für das Wachstum von Xenografttumoren ist.

Hierzu sollten bei wachsenden Xenografttumoren Fluoreszenzsignale, als quantitative Photonenemissionen, und die Pixelzahlen, die strahlenden Tumorumfängen entsprechen, im Verhältnis zur MRT-Volumetrie bestimmt und die MRT-Volumetrie mit der Caliper-Volumetrie verglichen werden.

In Anwendung unserer Ergebnisse war zusätzlich zu prüfen, ob und wie gut aus Pixelflächen berechnete Tumorumfänge mit der MRT- oder Caliper-Volumetrie korrelieren.

Wenn es gelänge, durch reine Fluoreszenzsignale eine zuverlässige Volumenbestimmung von Tumoren durchführen zu können, wäre das ein wichtiger Schritt, um das optische Imaging zunächst tierexperimentell anwenden zu können.

3 Material und Methodik

3.1 Durchführung der Versuche

Melanomzellen der Zelllinie MeWo (Fa. J. Hart, London) wurden in einer Vorarbeit (Gehrke 2003) mit Hilfe eines hergestellten, synthetischen, baculoviralen Vektors, der aus hochgereinigter baculoviraler Kapsid-DNA und synthetischen Liposomenhüllen bestand, mit den Reporter genen pEGFP-C1 bzw. pDsRed2-N1 (Fa. Clontech, Heidelberg) transfiziert und in einem Kulturmedium (Luria-Bertani Medium: 5g Bakto-Hefe-Extrakt, 10g Baktotrypton, 10g NaCl, 1l Wasser mit pH 7,5) kryokonserviert. Bakuloviren sind nach Gehrke 2003 nicht humanpathogen und lösen keine Mutationen aus, weil ihre Erbsubstanz in Säugetierzellen kaum transkribiert wird, dafür aber Reportergene aktiviert werden. Ca. 70% der nach Gehrkes Methode transfizierten Melanomzellen haben Reporter genexpression.

Wir haben die kryokonservierten transfizierten Melanomzellen bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen nach Trypsinierung in Kulturschalen in einem Nährmedium (Dulbeccos modified essential Medium mit 10% foetalem Kälberserum) nach Durchlaufen von 4 Waschpassagen mit Phosphatpufferlösung gezüchtet und mikroskopisch auf Vitalität geprüft. Diese stabil exprimierenden, fluoreszenzmarkierten Melanomzellen (EGFP, DsRed2TM) wurden dann in 0,5 ml Phosphatpuffer lsg. pH 7,5 suspendiert, je 5×10^6 Zellen den immundefizienten Mäusen subkutan injiziert und die entstehenden soliden Tumoren ca. 3-4 Wochen später mit Hilfe des in vivo Imagings, der Caliper methode und der MRT-Volumetrie über mehrere Wochen untersucht.

Die Untersuchungen wurden bei 8 Tieren in zwei Serien durchgeführt. Die Mäuse wurden vor jeder Messung, die ca. zweimal wöchentlich erfolgte, i.p. mit ca. 0,4 ml einer Lösung aus 0,8ml Ketamin (Hostaket®, Intervet, Firma Bayer, Leverkusen), 1,2ml Xylazinhydrochlorid (Rompun®2%, Firma Bayer, Leverkusen) und 8ml NaCl durch eine 30G Kanüle anästhesiert und zunächst in eine speziell entwickelte Kleintier-Imaging-Spule (Keil B., med. Zentrum für Radiologie Marburg) die an einen 1,0-T Magnetresonanztomographen (Magnetom Expert, Siemens, Erlangen, Germany) angeschlossen war, gelegt.

Wir führten eine doppelte 3D DESS-Sequenz („Double echo in steady-state – Sequence“) mit den dafür nötigen Lokalizern durch, die ca. 11 min dauerte.

Die Einstellungen waren:

TR: 26,8 ms, TE: 9,0 ms,
 FA: 40°, FoV: 80mm x 40mm,
 Matrix: 256x128, 40 slices,
 slab thickness 36mm,
 voxel size 0,31mm x 0,31mm
 x 0,9 mm ,
 acquisition time 5 min 30 sec

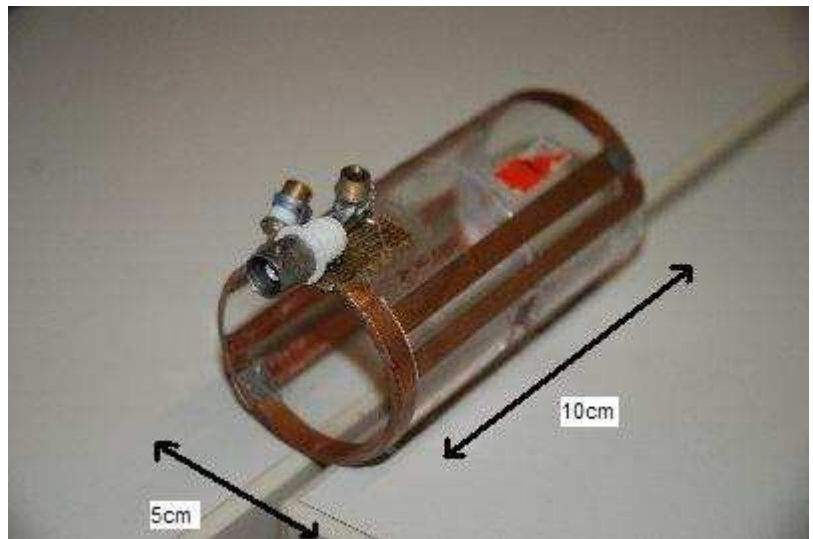


Abb.1 Modell einer Kleintierimaging-Spule

Die hierfür benötigte Zeit, inklusive Einbringen und Entfernen der Maus, belief sich auf etwa 20 min pro Versuchstier.

Die so erstellten Dicom-Dateien wurden zur weiteren Verarbeitung von der Workstation an einen speziellen Rechner zur Volumenberechnung gesendet. Hierfür wurde das MeVis-Programm ILab 4, im Speziellen die Funktion des „Gradient Watershed“, verwendet (Heverhagen et al. 2004).

Die Tumore konnten dabei in allen drei Schichtebenen markiert werden. Das Programm errechnet so aufgrund von Algorithmen aus den Schichtdicken und den markierten Flächen die Anzahl der Voxel. Aus der Anzahl der Voxel kann auf das Volumen geschlossen werden, da ein Voxel einem Volumen von 0,0865 mm³ entspricht.

Die noch immer narkotisierte Maus wurde dann in eine lichtundurchlässige Kammer platziert. Mit Primärlicht über spezifische Exzitationsfilter wurden Reporterproteine angeregt und ausgesendete Fluoreszenzsignale von einer CCD-Kamera (Fa. Hamamatsu Herrsching) aufgenommen. Für beide verwendeten



Abb. 2 Messkammer

Reportertypen wurde die minimal mögliche Belichtungszeit von 20 ms verwendet, um die Verfälschung der Messwerte durch eine im Verlauf des Versuchs verstärkt auftretende Punktintensitätsmaximierung und das Hintergrundrauschen zu minimieren.

3.2 Meßanordnung

Die Hamamatsu Digital CCD-Kamera C 488021-W besteht aus einem wassergekühltem Kamerakopf mit auf -60° durch Peltierelemente gekühltem Sensor, einer Kontrolleinheit und einer image-acquisition unit sowie einer PC-Software mit Bildschirm (Abb.2,3).

Die Sensorfläche beträgt $12,29 \text{ mm} \times 12,29 \text{ mm} = 151 \text{ mm}^2$. Sie besteht aus $512 \times 512 = 262144$ Pixeln mit einer einzelnen Pixelfläche von $24 \mu\text{m} \times 24 \mu\text{m} = 576 \mu\text{m}^2 = 576 \times 10^{-6} \text{ mm}^2$

Die Pixelfläche ist so groß bemessen, damit möglichst viele Lichtquanten pro Pixel empfangen werden können. Die Temperatur im CCD muss konstant gehalten werden, damit sich die Sensorsensibilität nicht verändert.

Die Digital –photographische Meßmethode wird mit einer Fluoreszenz - Emissionsphotometrie kombiniert. Das heißt:

Das Fluoreszenzmedium in Form der Reporterproteine bewirkt die Umwandlung eines energiereicheren Primärlichtes in ein energieärmeres Sekundärlicht, dessen Photonen photographisch von uns gemessen werden (Förster 1946).

Das anregende Licht wird von einer Lichtquelle erzeugt und durch einen Interferenzfilter mit einer Breite von 450-490 nm für die GFP-Markierung und mit einer Breite von 535-580 nm für die DsRed-Markierung gefiltert. Das entstehende, emittierte Fluoreszenzlicht wird bei der GFP-Markierung nach Durchtritt durch ein Interferenzfilter von 510-560 nm Breite und bei der DsRed-Markierung durch ein Filter von 570-800 nm Breite am Sensor gemessen.

Die Primärstrahlung bei der GFP-Markierung ist mit ca. 488 nm energiereicher als bei der DsRed-Markierung mit ca. 558 nm.

Die bei der GFP-Markierung gemessene Sekundärstrahlung von im Mittel 535 nm ist ebenfalls energiereicher als die bei der DsRed-Markierung gemessene Sekundärstrahlung von ca. 583 nm.

Die spektrale Response des Sensors für Photonenemissionen zwischen 500 und 800 nm Wellenlänge beträgt 80-92 % (Abb.4).

Den Rauscheffekt unserer Methode haben wir durch Hintergrundmessungen erfasst.

Die Höhe der Quantenausbeute (Photonencounts) ist vom Abstand des Primärlichtes zum Medium und dem später zu diskutierenden Gewebefaktoren und biophysikalischen Faktoren abhängig (Dörr 1977). Der Abstand der Lichtquelle zum Medium darf deshalb während der Meßserien nicht verändert werden.

Wir haben zur Auswertung der Bilddaten das Wasabi-Programm der Fa. Hamamatsu (Herrsching) verwendet.

Spektrale Qualität des Sensors S 7170, Messanordnung und Spezifikation des CCD-Kamerasystems C 4880 21-24-W nach Fa. Hamamatsu Manual (Herrsching)

SPECTRAL RESPONSE CHARACTERISTICS

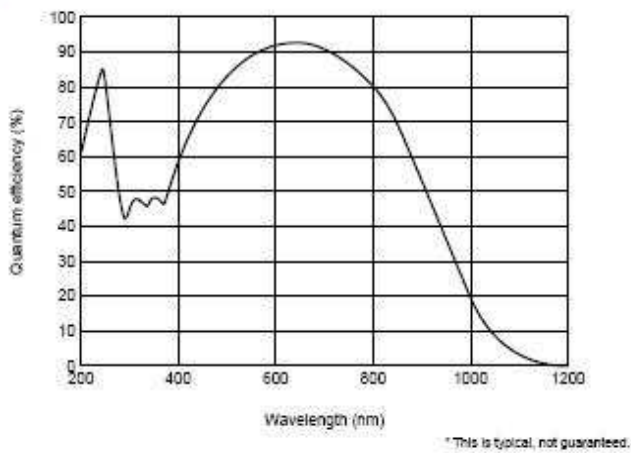


Abb. 4

SYSTEM CONFIGURATION

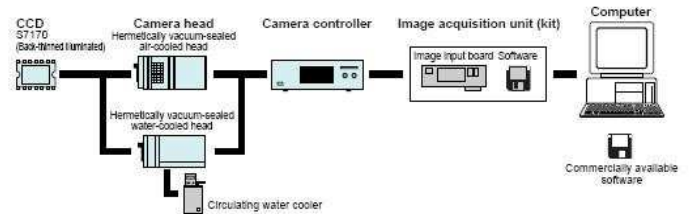


Abb. 3

SPECIFICATIONS

Model name	C4880-21-□□-A	C4880-21-□□-W
Camera head type	Hermetically vacuum-sealed air-cooled head	Hermetically vacuum-sealed water-cooled head
Circulating water cooler (sold separately)	-	Required (see Peripheral Equipment on p. 37)
Vacuum pump (sold separately)	-	-
Imaging device	S7170 Model 1 full-frame transfer CCD	
Effective no. of pixels	512 (H) × 512 (V)	
Cell size	24 (H) × 24 (V) μm	
Effective area	12.29 (H) × 12.29 (V) mm	
Readout noise (High-precision scan mode)	Min.	8 electrons r.m.s.
	Typ.	8 electrons r.m.s.
Full well capacity	300,000 electrons	
Dynamic range (High-precision scan mode)	Typ.	37,500 : 1
	Max.	50,000 : 1
Frame rate	High-precision scan mode	0.5 frames/sec (156 kHz/pixel)
	Fast scan mode	7 frames/sec (2.6 MHz/pixel)
Cooling method	Peltier cooling / forced-air cooling + hermetic sealing	Peltier cooling / water cooling + hermetic sealing
Cooling temperature	-45 to -55 °C	-60 to -70 °C
CCD cooling control	Cooling ON/OFF control, cooling temperature setting function Front panel dial / software-controlled switching; Temperature displayed on front panel LCD	
Dark current	0.8 electrons/pixel/sec	0.3 electrons/pixel/sec
Exposure time	20 ms or more	
A/D converter	12 / 14 / 16 bits	
Lens mount	C-mount	
Mechanical shutter	Built-in (Control: OPEN / CLOSE / AUTO)	
Variable analog gain	Front panel dial / software-controlled switching, 1 - 8 times (high-speed scan)	
Variable offset	Front panel dial / software-controlled switching (fast scan)	
Amp gain	2 steps (fast scan), 3 steps (precision scan)	
Binning scan	Yes	
Sub-array scan	1/1, 1/2, 1/4, 1/8 (H) × any desired number (V)	
Super-pixel scan	2 × 2, 4 × 4, 8 × 8	
External trigger input	Yes	
Output signal (digital output)	Parallel digital output (conforms to RS-422)	
External control	RS-232C	
Ambient storage temperature	-10 to +50 °C	
Ambient operating temperature	0 °C to +40 °C	
Ambient operating/storage humidity	70% max. (with no condensation)	
Line voltage	100 / 117 / 220 / 240 VAC, 50/60 Hz	
Power consumption	Approx. 220 VA	

Abb.7

Die Abb. 5 zeigt anhand des Beispiels einer Maus wie ein Fluoreszenzbild mit dem entsprechenden Tumor fusioniert werden kann. Abb. 6 ist ein Beispiel für die MRT-Darstellung des Tumors einer Maus.

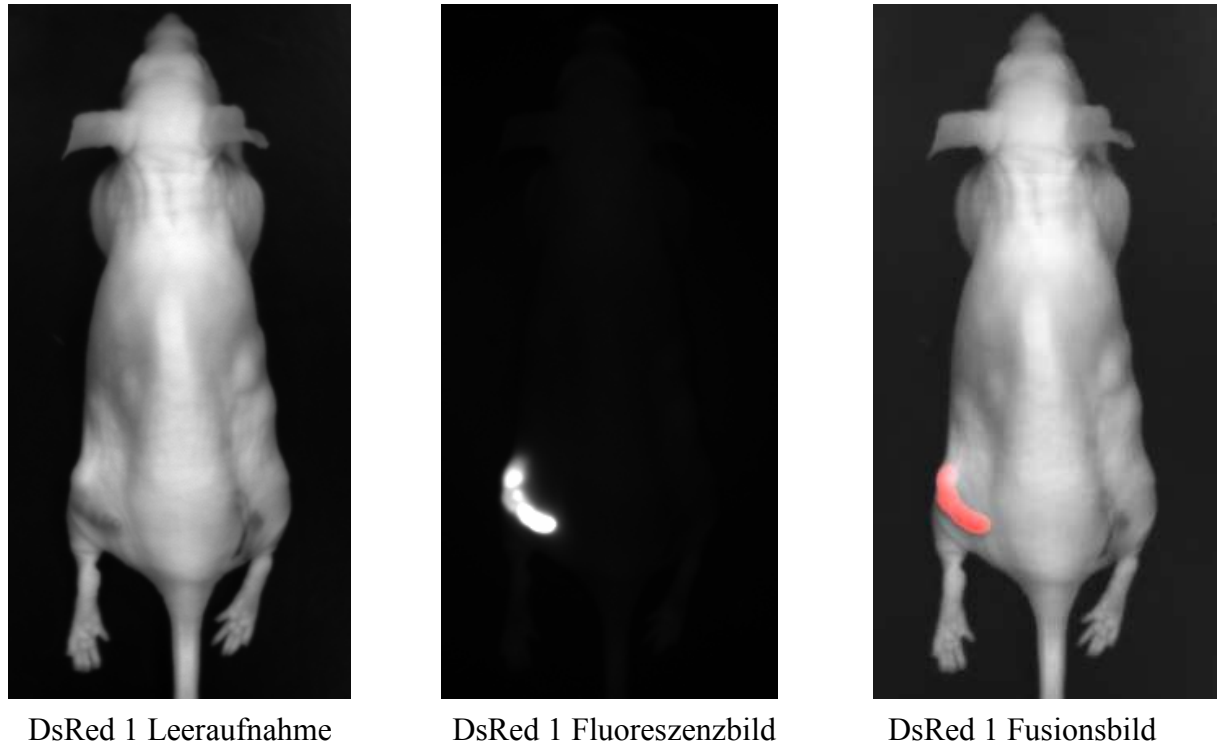
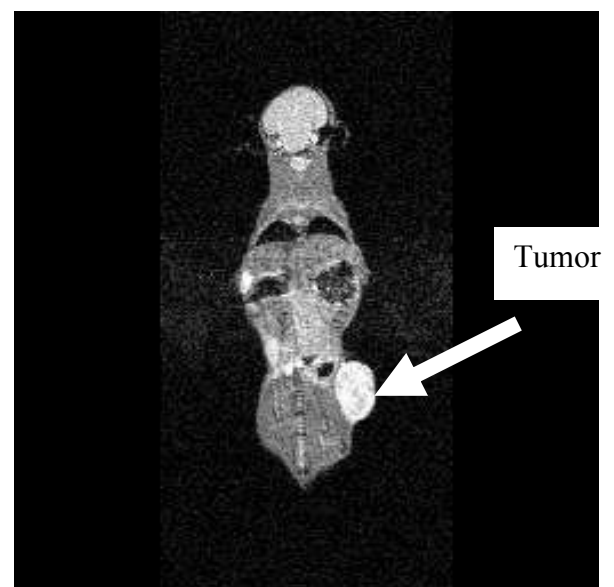


Abb. 5 Darstellung von Tumor und Fluoreszenzmissionen bei Maus DsRed 1, Flanke links hinten

Abb. 6 Darstellung eines MRT-Schnittes einer DESS-Sequenz einer untersuchten Maus



3.3 Eichung der Messkammer

Eine Eichung der Messkammer ist in folgender Weise erforderlich: Die Messung der Fluoreszenz und der Pixelfläche der Tumoren vollzieht sich in einem Abstand von 27 cm zwischen Objekt und Kamerasensor. Auf dem Sensorchip sind 512×512 Pixel = 262144 Pixel lokalisiert, wobei jeder Pixel eine Fläche von $24 \mu\text{m} \times 24 \mu\text{m} = 576 \mu\text{m}^2$ hat (Abb. 7). Insgesamt ergibt das eine Pixelfläche von 151 mm^2 , auf welche die Objekte verkleinert abgebildet werden. Um die wirkliche Tumorfläche zu erfassen, wird ein Faktor ermittelt, mit dem die an Hand der Pixelzahl gemessenen Tumorflächen zu multiplizieren sind.

Hierzu haben wir einen Standard aus Millimeterpapier von 100 mm^2 Fläche verwendet, der als Messobjekt diente. Die Pixelzahl dieses Standards wurde zu 1684 Pixeln ermittelt. Hieraus errechnet sich eine durch einen Pixel abgebildete Objektfläche von $59382 \mu\text{m}^2$, entsprechend $0,059382 \text{ mm}^2$. Das ist verglichen mit der Fläche eines Pixels im Sensor von $576 \mu\text{m}^2$ das 103-fache.

Um die wirkliche Tumorfläche in mm^2 bei den Mäusen in der Kammer zu ermitteln, muss deshalb jede gemessene Pixelzahl mit dem Eichfaktor (EF) $0,059382$ multipliziert werden, der die Vergrößerung des Objektes berücksichtigt.

Die Messanordnung, insbesondere der Messabstand zwischen Objekt und Sensor, darf nach dem Bestimmen des Korrekturfaktors nicht mehr verändert werden.

3.4 Gemessene Parameter

Gemessen wird mit der CCD-Kamera an den Versuchstagen die Sekundäremission eines Fluoreszenzlichtes. Mit dem Mauszeiger wird nach Erstellung einer Aufnahme der nun sichtbare Tumorrand nachgezogen und die so erstellte ROI (Region of Interest) in den Hintergrundemissionsbereich kopiert. Das Programm errechnet nun die Differenz zwischen Hintergrund- und Tumoremmission als:

$$\Delta Tc\text{-Photonencounts pro } 20 \text{ ms}$$

Zusätzlich wird die zweidimensionale Größe der ROI mit der Anzahl der Pixel angegeben (Pixelzahl [P]).

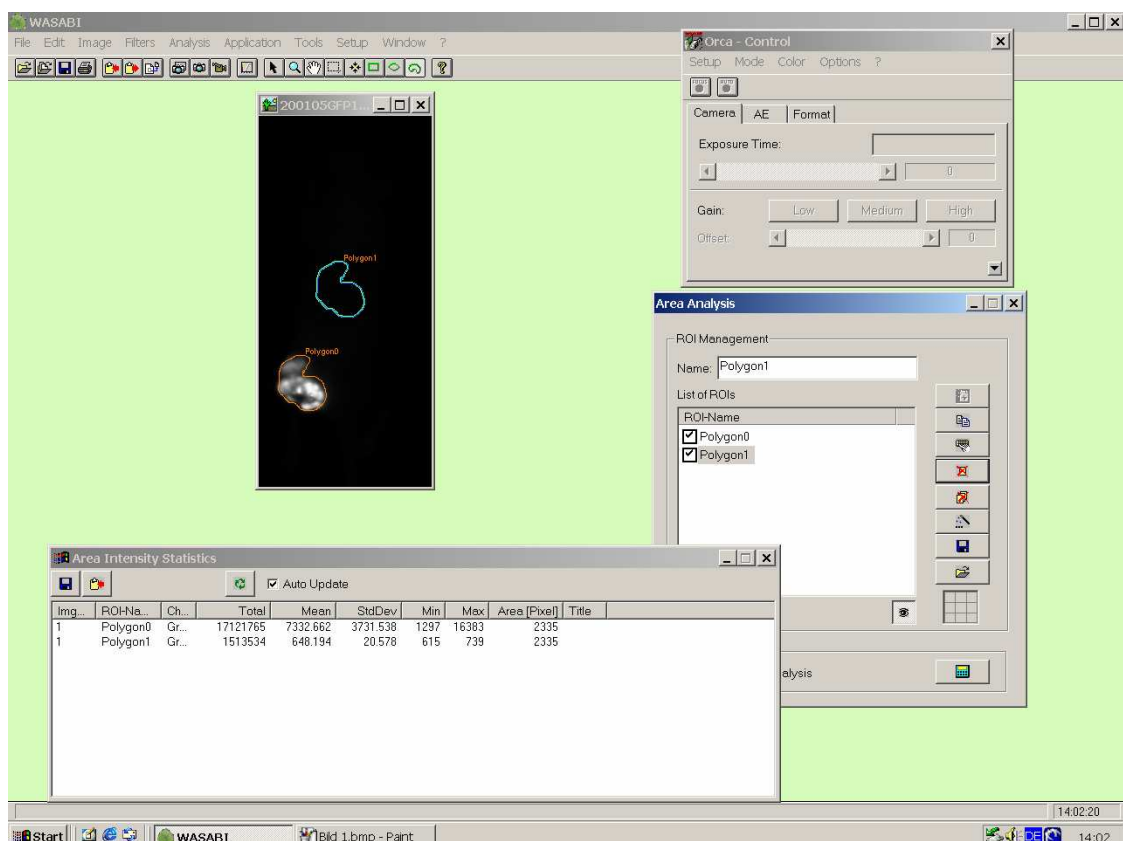


Abb. 8 Darstellung der Messung von Objekt und Hintergrundemission

Den individuellen Fehler des Verfahrens haben wir im Vorfeld an einer Stichprobe durch Zehnfachmessung der Pixel und der Tumorcounts ermittelt. Der Variationskoeffizient beträgt statistisch 1,3% für die Pixelzahl und 0,6% für die Tumorcounts.

Um eine Verteilung der Photonenemission im Tumor sichtbar zu machen, haben wir Emissionsmessungen teilweise graphisch, dreidimensional dargestellt. Dazu haben wir das Programm Scion Image® der Firma Scion Corporation verwendet. Hierbei werden die Intensitäten der Emissionen der einzelnen Tumore als Höhenlinien einer dreidimensionalen Platte dargestellt.

Das Tumolvolumen wurde durch die Magnetresonanztomographie auf Grund der erstellten Dicom-Dateien mit einem Rechner und dem ILAB 4 Programm als

μl MRT-Volumen

an den jeweiligen Untersuchungstagen bis zum Tod der Tiere bestimmt.

Parallel zur Bestimmung der Tumorumfänge mit der MRT- Methode wurde auch die Caliper-Methode mit Hilfe von Messdaten einer Schublehre angewendet und nach der Formel

Länge x Breite² x KF (KF= geometrischer Korrekturfaktor = 0,52)

auf μl Volumen umgerechnet. Die meisten Autoren rechnen ebenfalls mit dem Quadrat der Breite und multiplizieren dann mit dem Faktor 0,52 oder 0,5 (Choy, et al. 2003; Diehn, et al. 2002; Peyruchaud, et al. 2003).

Der Korrekturfaktor (KF) bei der Calipermethode soll die Abweichungen von ellipsoiden und kugeligen Tumorformen von den Idealformen errechenbarer Quader oder Würfel erfassen, so dass näherungsweise Tumorumfänge resultieren (Choy et al. 2003).

Der Umrechnungsfaktor KF vom Würfelvolumen L^3 auf ein darin enthaltenes Kugelvolumen mit dem Durchmesser $L=2r$ beträgt korrekt 0,5233.

$KF = 4 \pi r^3/3$ dividiert durch L^3 bei $L= 2r$

Für ein Ellipsoid errechnet sich ein gleicher Faktor nach

$1,334\pi \times r_1 \times r_2 \times r_3$

3.5 Berechnete Parameter

3.5.1 Photonendichten

Die Photonendichte wurde als Volumenverhältnis

$$\Delta Tc / \mu\text{l MRT-Volumen}$$

dargestellt.

Um die Korrelation von Photonendichten und Tumorwachstum über den Beobachtungszeitraum hin beurteilen zu können, haben wir zusätzlich die Photonendichten auf die MRT-Volumina während des Wachstums der Tumoren bezogen (Tab. 1-8).

$$\text{Photonendichte / MRT-Volumen}$$

Alle diese Daten wurden getrennt für mit DsRed und Green-Fluorescent – Protein (GFP) markierte Impftumoren der Mäuse ermittelt.

3.5.2 Berechnung von Tumorgrößen

Tumorgrößen können als Flächen oder Volumen erfasst werden.

3.5.2.1 Tumorflächen

Zur Bestimmung von Tumorflächen haben wir eine eigene Methode entwickelt. Die Fläche der Tumoren wurde auf Grund der Pixelzahl berechnet. Um aus der Pixelzahl mit unserer Messanordnung Tumorflächen wirklichkeitsnah zu erfassen, verwendeten wir den Eichfaktor der Messkammer. Dann errechnete sich die Tumorfläche durch Multiplikation mit diesem Eichfaktor wie folgt:

$$\text{Pixelzahl} \times 0,059382 \text{ mm}^2 = \text{Tumorfläche in mm}^2$$

3.5.2.2 Tumorumina

Tumorumina in μl haben wir, wie beschrieben, nach der MRT-Methode und der Calipermethode, die beide ohne Fluoreszenzsignale auskommen, bestimmt.

Will man mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen Tumorumina ermitteln, müssen Korrelationen zwischen Tumorumina und quantitativen Photonenemissionen dargestellt werden.

Ein anderer Weg, um auf Grund von Fluoreszenzsignalen ohne quantitative Photonenmessungen Tumorumina zu verifizieren, besteht darin, dass man Pixelflächen der Tumore in Volumina umrechnet. Dies wurde mit Hilfe der Gleichung

$$\mu\text{l Tumorumin} = \text{mm}^2 \text{ Pixelfläche} \times \sqrt{\text{Pixelfläche} \times 0,52 \text{ (KF)}}$$

getan.

Die Quadratwurzel der Pixelfläche entspricht näherungsweise der mittleren Tumorumhöhe. Diese Pixel-Wurzel-Volumetrie haben wir mit Ergebnissen der MRT- und Calipervolumetrie verglichen.

3.5.2.3 Berechnung von Messwertstreuung und Korrelation

Der Variationskoeffizient VK, die Streuung eines Messwertes wurde zu Beginn der Versuchsserie einmal als prozentuale Standardabweichung (s) des Mittelwertes (\bar{X}) ermittelt.

$$\text{VK}\% = \frac{s \cdot 100}{\bar{X}} \qquad s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Der Korrelationskoeffizient (r) für die Beziehung von MRT-Volumina (X) zu Tumoremmission ΔT_c (Y) wurde für Teilbereiche der Kurven bei den Mäusen 1 DsRed und 1 GFP nach Struck 1973 wie folgt berechnet:

$$r = \frac{\sum (X - \bar{X}) \cdot (Y - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2 \cdot \sum (Y - \bar{Y})^2}}$$

Ein Korrelationskoeffizient nahe 1,0 beschreibt eine linear-proportionale Abhängigkeit der Parameter X, Y zueinander und entspricht einer Eichgeraden, die zu Aussagen über X durch Y verwendet werden kann. Ein Korrelationskoeffizient nahe 0 spricht gegen eine Verwendung einer Kurve als Eichgerade, weil die Parameter in keiner Abhängigkeit zueinander stehen.

4 Ergebnisse

Die Überlebenszeiten unserer mit fluoreszenzmarkierten Melanomzellen geimpften 8 Mäuse lagen zwischen 35 und 99 Tagen (Tab. 9)

Übersicht über die Messparameter am Anfang und am Ende der Versuchsserien

Maus	Beginn des Tumorwachstums		Überlebenstage nach Impfung		µl MRT Tu-Vol		Pixelzahl		Photonenemissionen ΔTc (Mill. Counts)	
	Anfang	Ende	Anfang	Ende	Anfang	Ende	Anfang	Ende	Anfang	Ende
1 GFP		23	99	74	6009	522	7800		$0,6 \times 10^{-3}$	1,1
2 GFP		22	65	38	597	322	1215		$2,3 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-3}$
3 GFP		22	42	51	220	389	721		$5,7 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^{-3}$
4 GFP		22	38	44	112	406	661		$3,1 \times 10^{-3}$	$5,4 \times 10^{-3}$
5 GFP		22	35	41	87	506	665		$1,6 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-3}$
1 DsRed		30	84	51	976	660	2691		2,3	18,7
2 DsRed		29	49	145	451	633	1354		22×10^{-3}	36×10^{-3}
3 DsRed		29	58	317	1986	1579	3584		25×10^{-3}	77×10^{-3}

Tab. 9

Der Beginn des Wachstums der soliden Tumoren fand bei DsRed-Markierung ab ca. vier und bei GFP-Markierung ab ca. 3 Wochen statt. Anschließend erfolgten regelmäßige Messungen der Photonemissionen, der Pixelzahl und der Caliper- und MRT-Volumina.

Als Maßstab des Wachstums sind die gemessenen MRT-Volumina genommen worden. Die Calipervolumina weichen am stärksten von den MRT-Volumina ab, die Volumina nach der Pixelwurzelmethode am geringsten (Abb. 11-14).

Die Photonemissionen steigen bei allen Tieren mit unterschiedlicher Intensität während der Beobachtungsdauer des Tumorwachstums bis auf 18,7 Mill. bzw. 1 Mill. an (Tab. 10-17, Abb. 9-14).

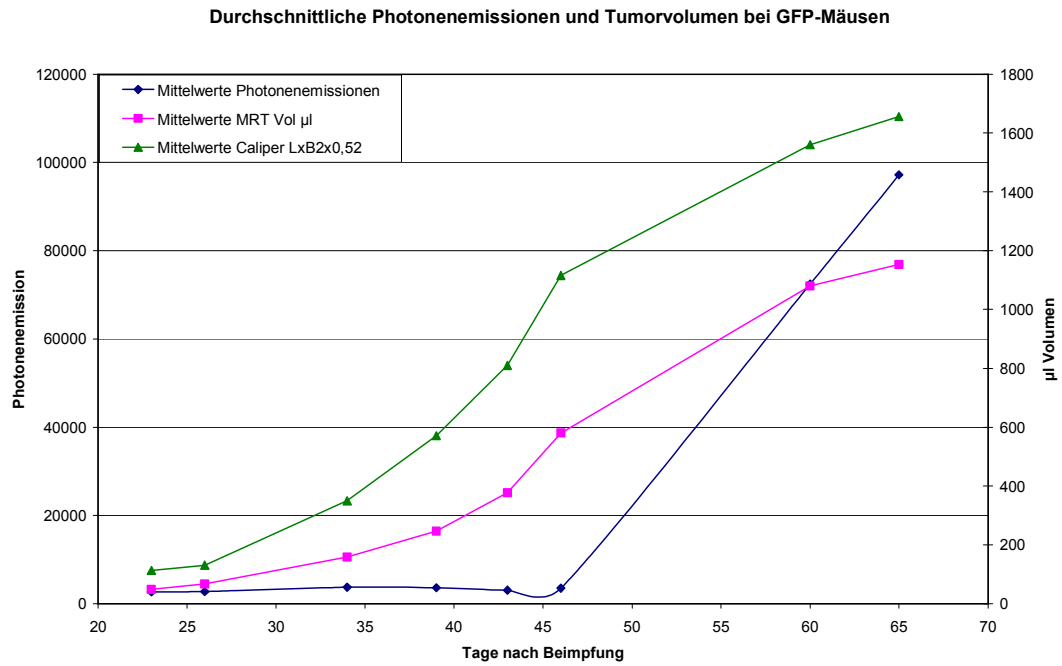


Abb. 11

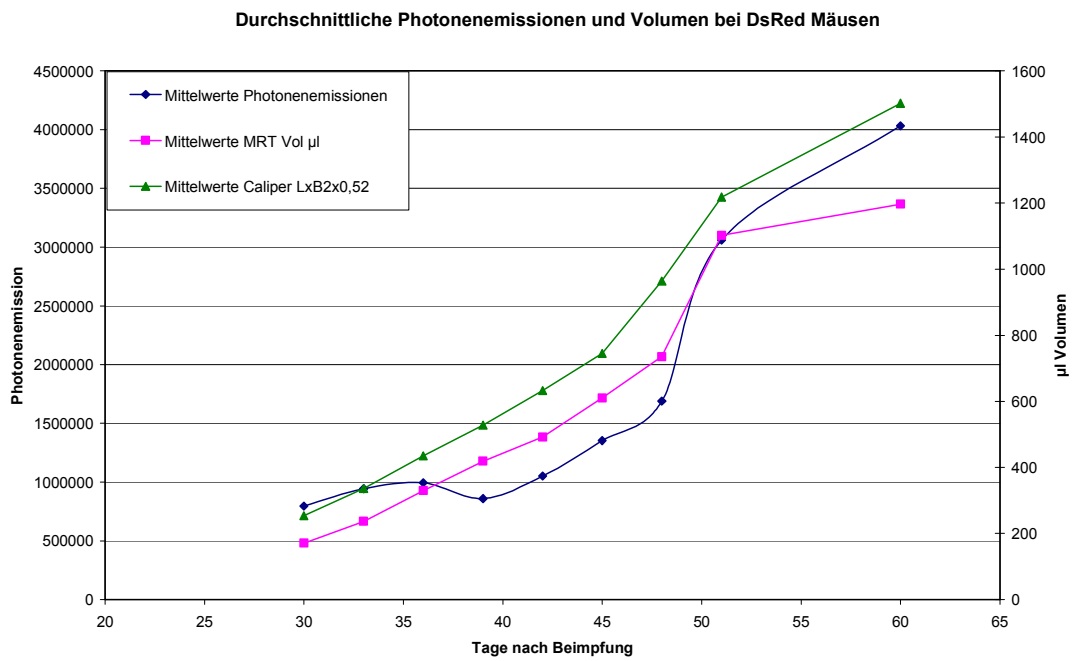


Abb. 12

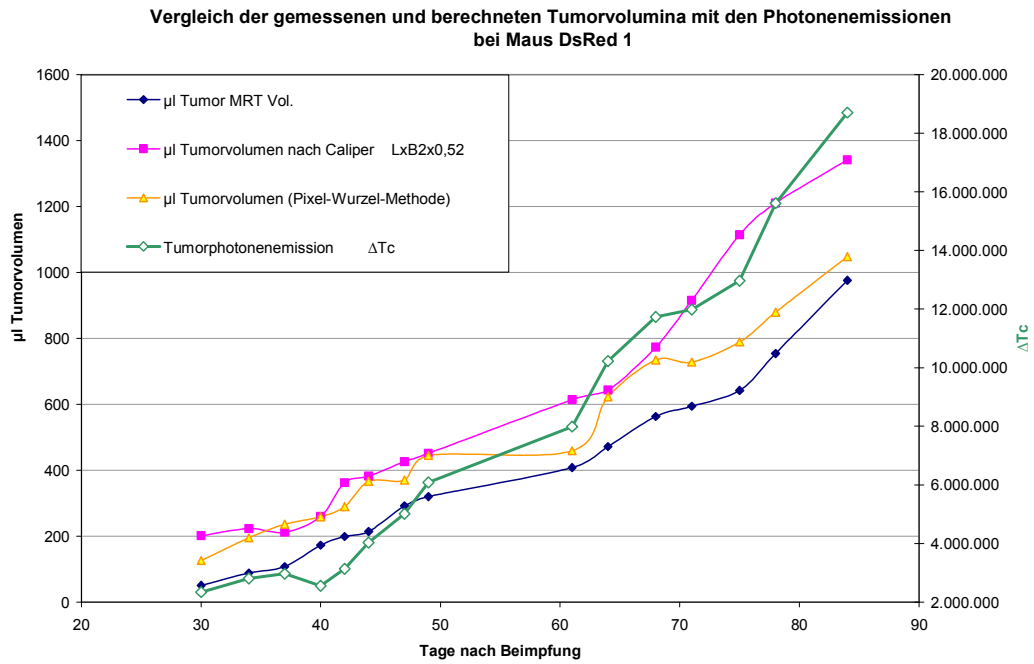


Abb. 13

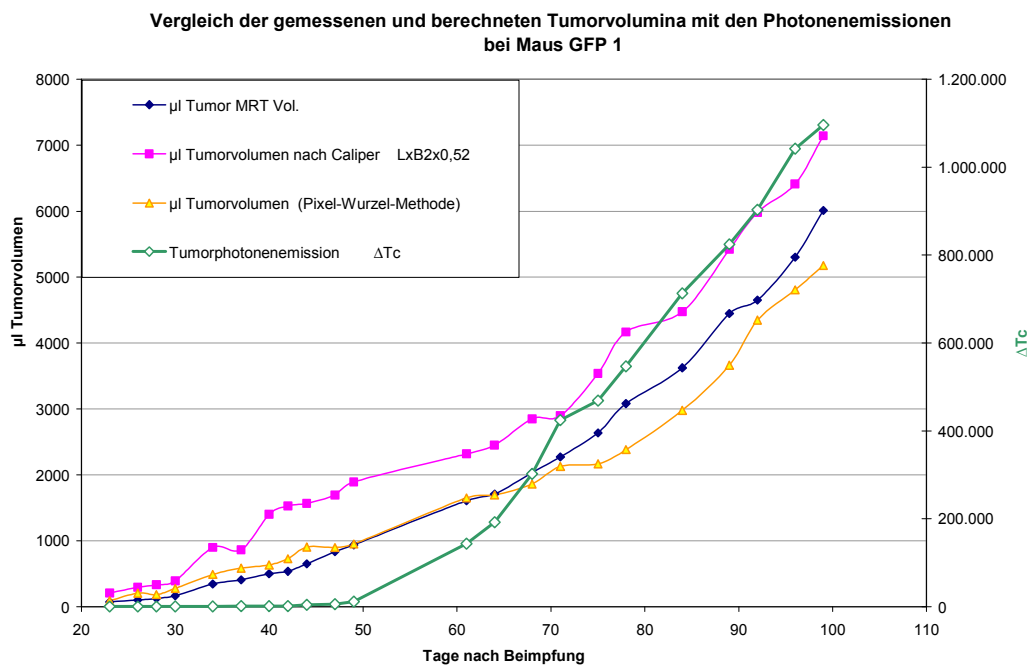


Abb. 14

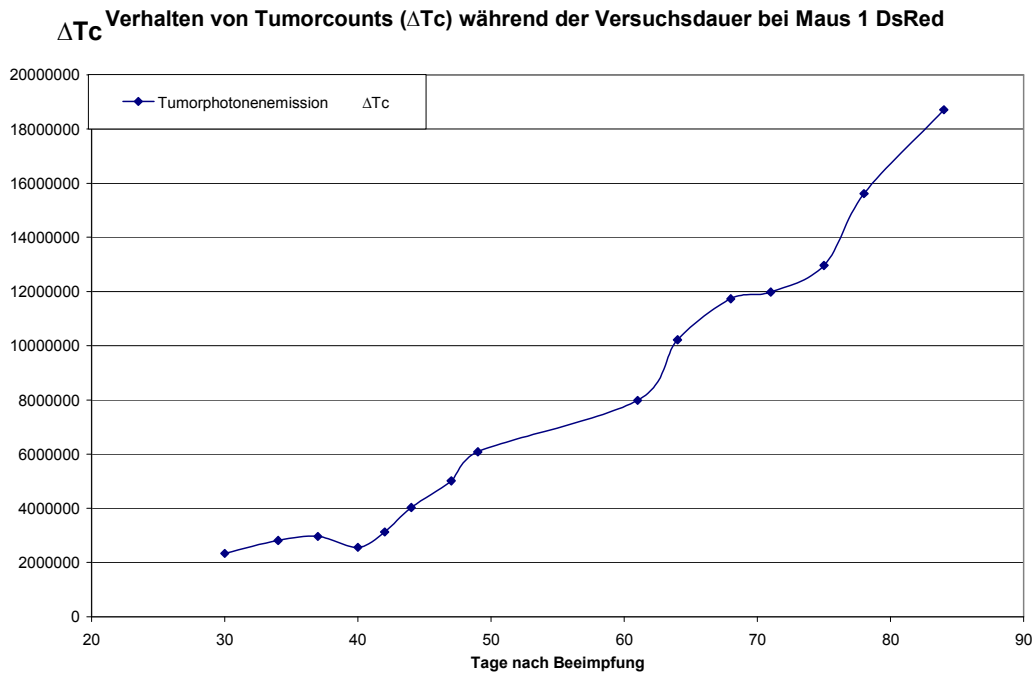


Abb. 9

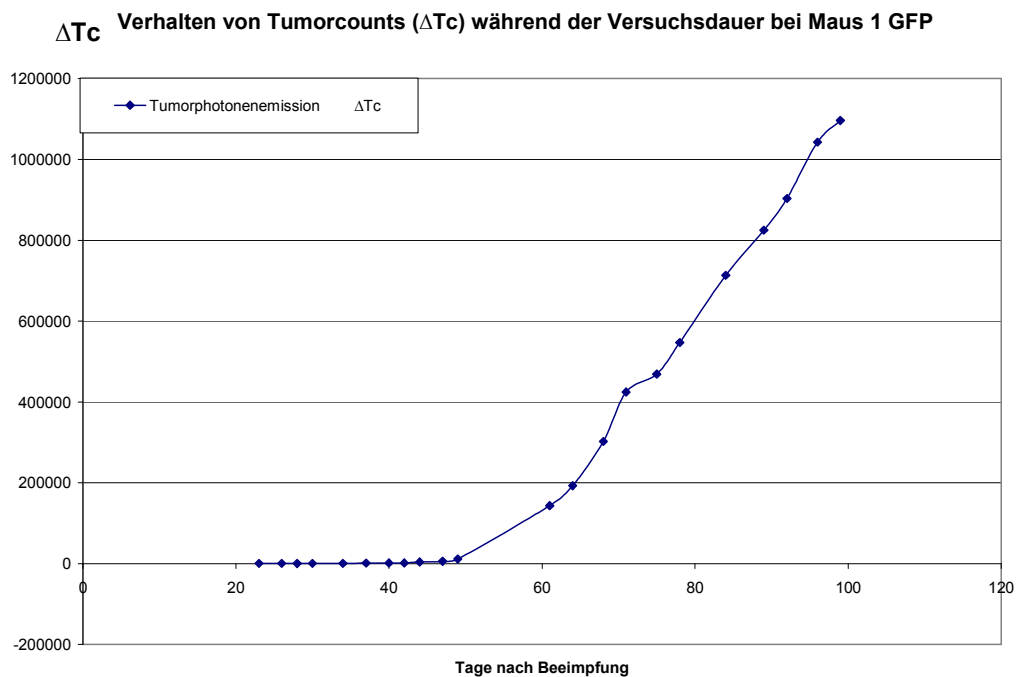


Abb. 10

Allerdings findet der Anstieg der Fluoreszenzsignale zum Teil erst mit Verzögerung von Tagen auf den Beginn des Tumorwachstums bezogen statt. Bei Maus GFP 3 fällt der anfängliche Emissionsanstieg bereits nach 13 Tagen wieder ab. Nur bei den Mäusen DsRed 1 und GFP 1 sind die Photonenemissionen langfristig bis 84 bzw. 99 Tage zu verfolgen. Grundsätzlich sind die Photonenemissionen bei DsRed-Tumormäusen 10-20

fach höher als bei GFP-Tumormäusen, wie nach der Literatur zu erwarten war (Gehrke et al. 2003).

Wenn die Photonenemissionen der Tumoren auf μl MRT-Volumina bezogen dargestellt werden, zeigen sich bei den am längsten gewachsenen Tumoren am Ende der Zeit Abweichungen von der Linearität der Kurven (Abb. 15,16).

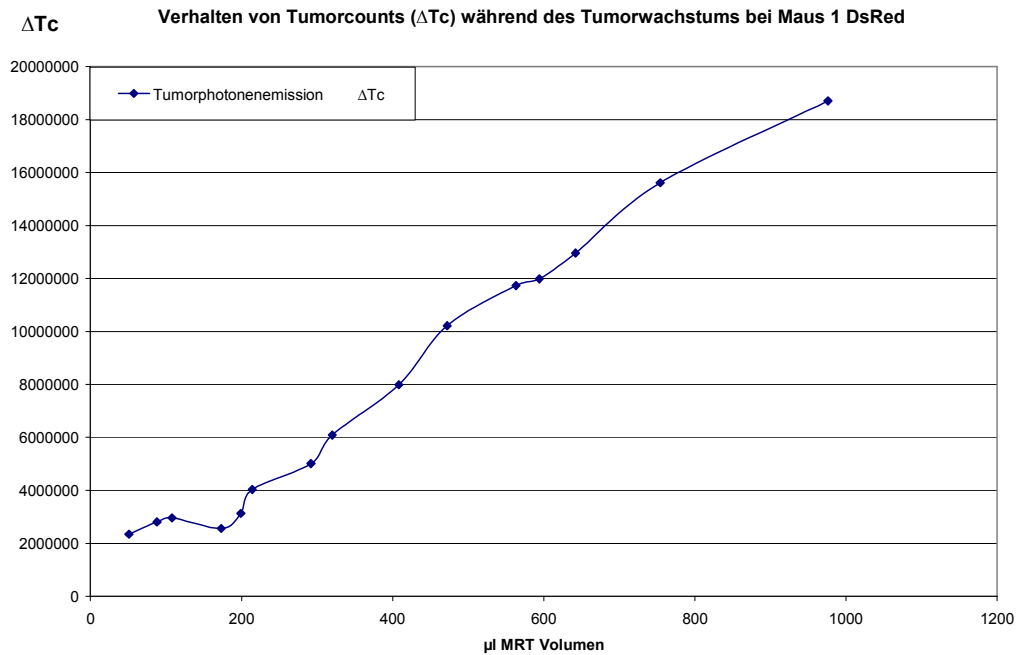


Abb. 15

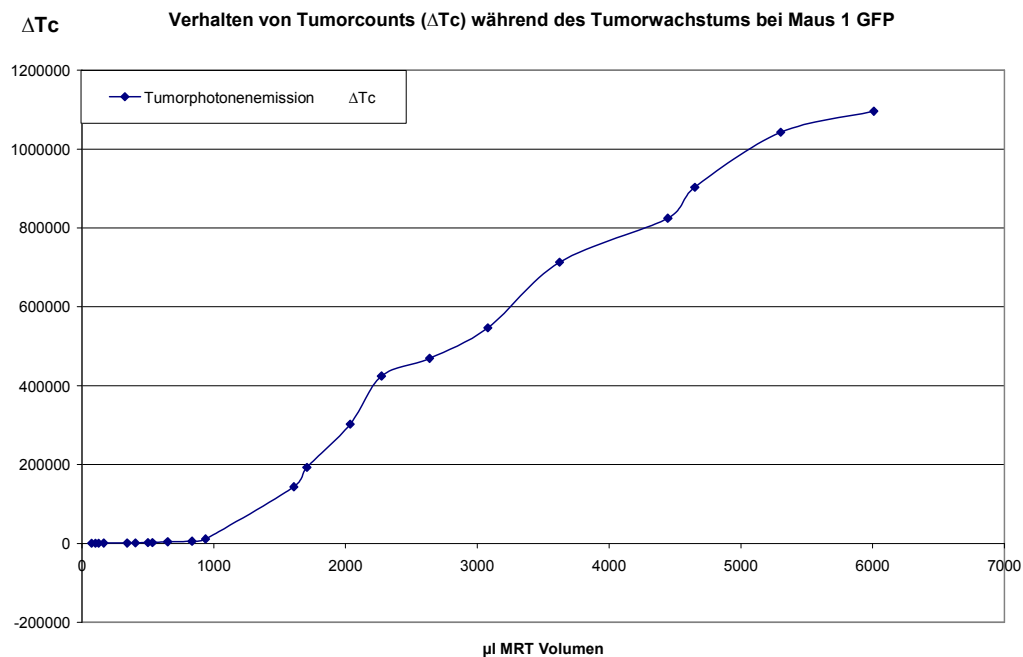


Abb. 16

Fast man die Daten der Photonenemissionen und ihre entsprechenden MRT-Volumina von den Tumoren aller Tiere zu Durchschnittswerten zusammen, dann ist erkennbar, dass die Fluoreszenzsignale im Durchschnitt erst ab einem Tumorumfang von 400 μl bis 500 μl deutlich werden (Abb. 17,18, Tab. 18,19).

Durchschnittswerte der Tumordaten von DsRed-Tumoren					
Mittelwerte Überlebte Tage	Mittelwerte Photonenemissionen	Mittelwerte Pixelzahl	Mittelwerte MRT Vol μl	Mittelwerte Caliper $\text{LxB}^2 \times 0,52$	Anzahl der gemessenen Tiere
30	796360	957	171	254	3
33	943309	1218	237	336	3
36	994840	1439	330	435	3
39	860264	1589	419	528	3
42	1052082	1651	492	633	3
45	1353729	1775	610	745	3
48	1689710	1957	735	964	3
51	3059377	2467	1102	1218	2
60	4032141	2584	1197	1502	2

Tab. 18

Durchschnittswerte der Tumordaten von GFP-Tumoren					
Mittelwerte Überlebte Tage	Mittelwerte Photonenemissionen	Mittelwerte Pixelzahl	Mittelwerte MRT Vol μl	Mittelwerte Caliper $\text{LxB}^2 \times 0,52$	Anzahl der gemessenen Tiere
23	2664	429	48	113	5
26	2755	501	67	131	5
34	3708	773	158	350	5
39	3583	946	246	571	4
43	3059	1319	377	810	3
46	3521	1642	580	1116	2
60	72402	2406	1080	1560	2
65	97203	2469	1153	1656	2

Tab. 19

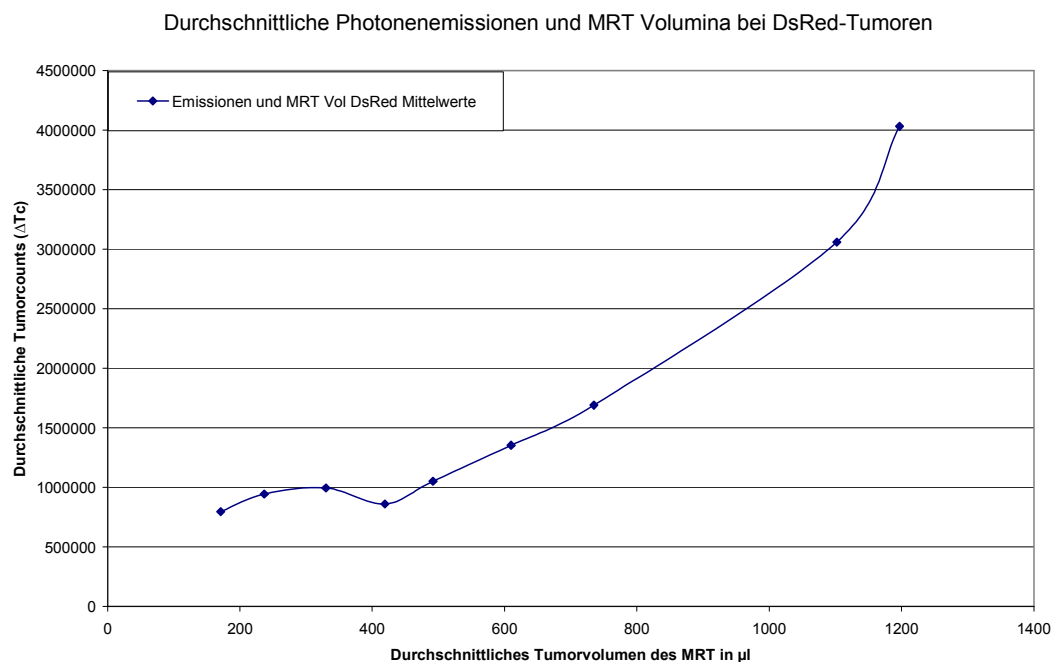


Abb. 17

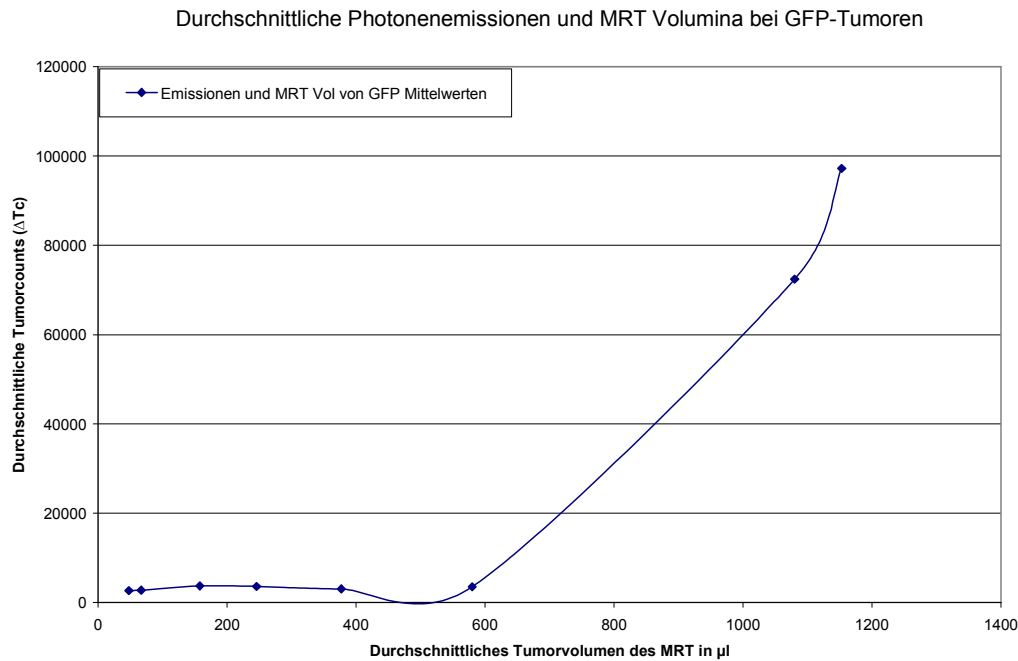


Abb. 18

Die Detektionsschwellen für Tumorwachstum mit Hilfe von quantitativen DsRed oder GFP Signalen ergeben sich danach unter Berücksichtigung der Einzelbeobachtungen bei den Mäusen DsRed 1 und GFP 1 zu 200 μl bis 400 μl für DsRed- und zu 500 μl bis 1000 μl für GFP-Markierung.

Tabelle 20 zeigt an einem Beispiel, dass in gewissen Volumenbereichen der Tumoren bei den Mäusen DsRed 1 und GFP 1 eine gute Korrelation von $r_{\text{DsRed } 1} = 0,99$ oder $r_{\text{GFP } 1} = 0,98$ zwischen Photonemission und Tumorumfang besteht.

Meßdaten im linear-proportionalen Bereich von
Photonencounts und MRT-volumina
der markierten Tumoren von Mäusen 1 DsRed und 1 GFP.

Maus 1 DsRed		Maus 1 GFP	
$\Delta Tc(\text{Mill})$	$\mu\text{IMRT-vol.}$	$\Delta Tc(\text{Mill})$	$\mu\text{l MRTvol.}$
2,56	173	0,011	938
3,13	199	0,143	1609
4,03	214	0,193	1708
5,01	292	0,302	2036
6,09	320	0,425	2273
7,99	408	0,469	2638
10,22	472	0,547	3080
12,96	563	0,713	3625
11,73	594		
12,96	642		
15,61	754		
$r = 0,99$		$r = 0,98$	

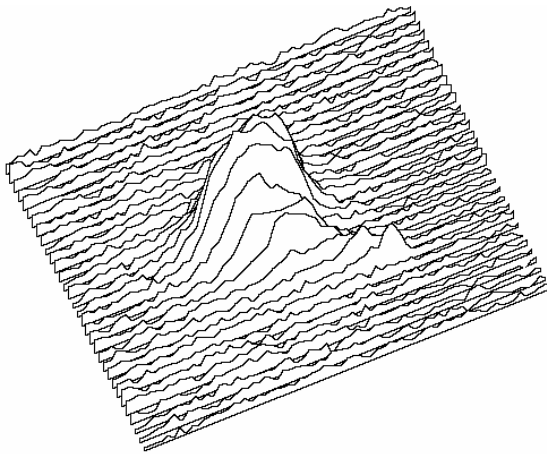
$r =$ Korrelationskoeffizient zum MRT-volumen

Tab. 20

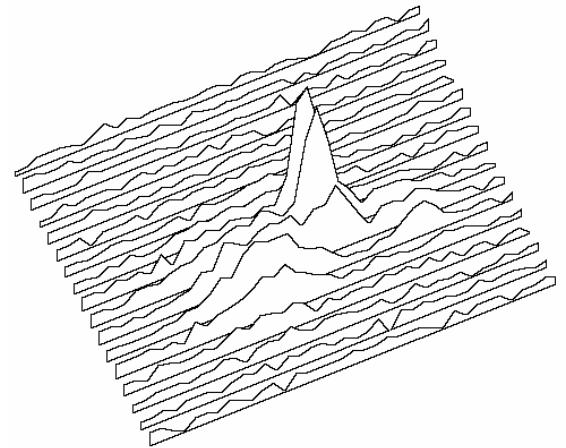
Die anderen 6 Mäuse haben nicht lange genug gelebt, um eine Korrelation der Photonenemissionen mit dem Tumorumfang über längere Zeit verfolgen zu können. Insofern lassen diese Daten nur eine begrenzte Aussage über μl Tumorumfang pro Photonencounts zu, zumal erhebliche Unterschiede im Emissionsverhalten zwischen DsRed- und GFP- Markierung bestehen. Bei DsRed-Markierung von Maus 1 entsprechen 1 Mill. Counts ca. 59 μl Tumorumfang und bei GFP-Markierung von Maus 1 0,1 Mill. Counts ca. 600 μl Tumorumfang.

Die geschichteten Stichproben von Tumoren zeigen, dass es innerhalb einzelner Tumoren emissionsarme Bereiche gibt (Abb. 19, 20).

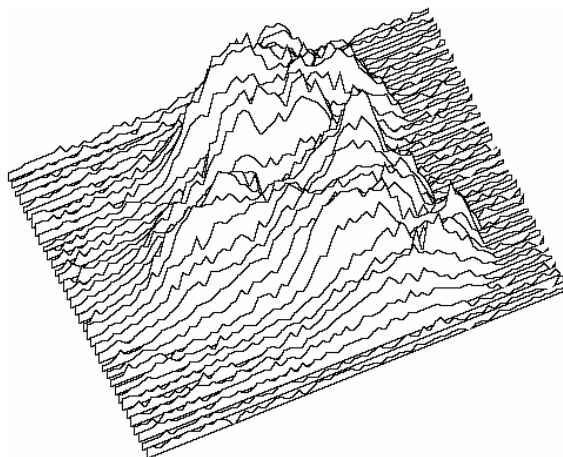
Geschichtete, räumliche Verteilung der Photonenemission der DsRed-Tumoren



DsRed 1 75. Tag



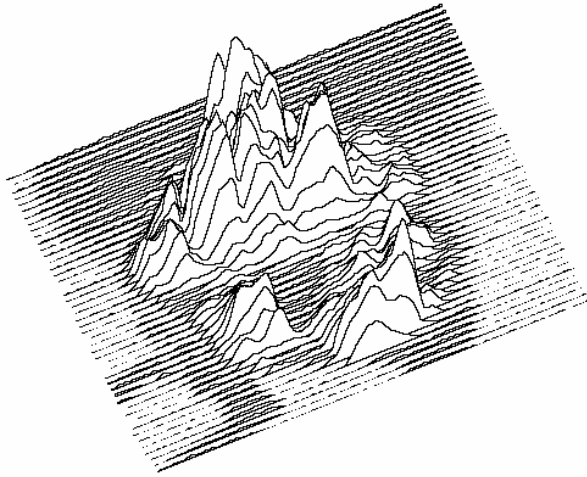
DsRed 2 45.Tag



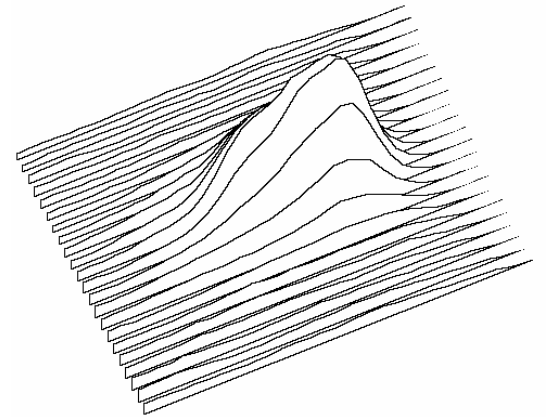
DsRed 3 49.Tag

Abb. 19

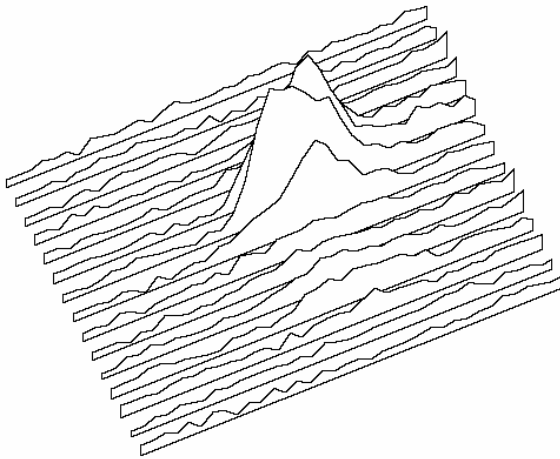
Geschichtete, räumliche Verteilung der
Photonenemissionen der GFP-Tumoren



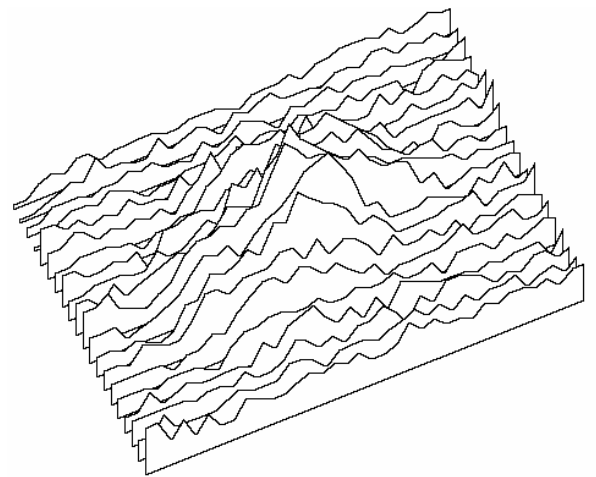
GFP 1 92. Tag



GFP 2 59. Tag



GFP 3 38.Tag



GFP 4 38. Tag

Abb. 20

Die Photonendichten bleiben während des Tumorwachstums bei allen DsRed oder GFP markierten Tumoren ziemlich gleich, aber auf unterschiedlicher Höhe, wie die Beispiele der Mäuse DsRed 1 und GFP 1 zeigen. Nur bei Maus GFP 1 kommt es zwischen 1000 und 2300 μl Tumorumfang zu einem vorübergehenden Anstieg der Photonendichte (Tab. 1-8, 18-19, Abb. 21, 22).

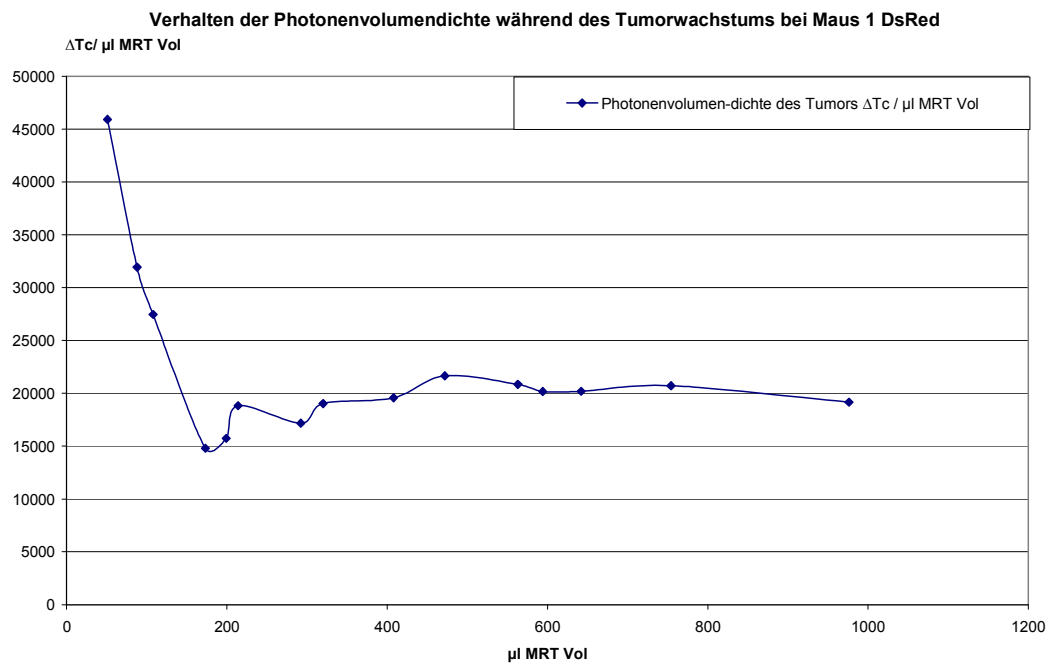


Abb. 21

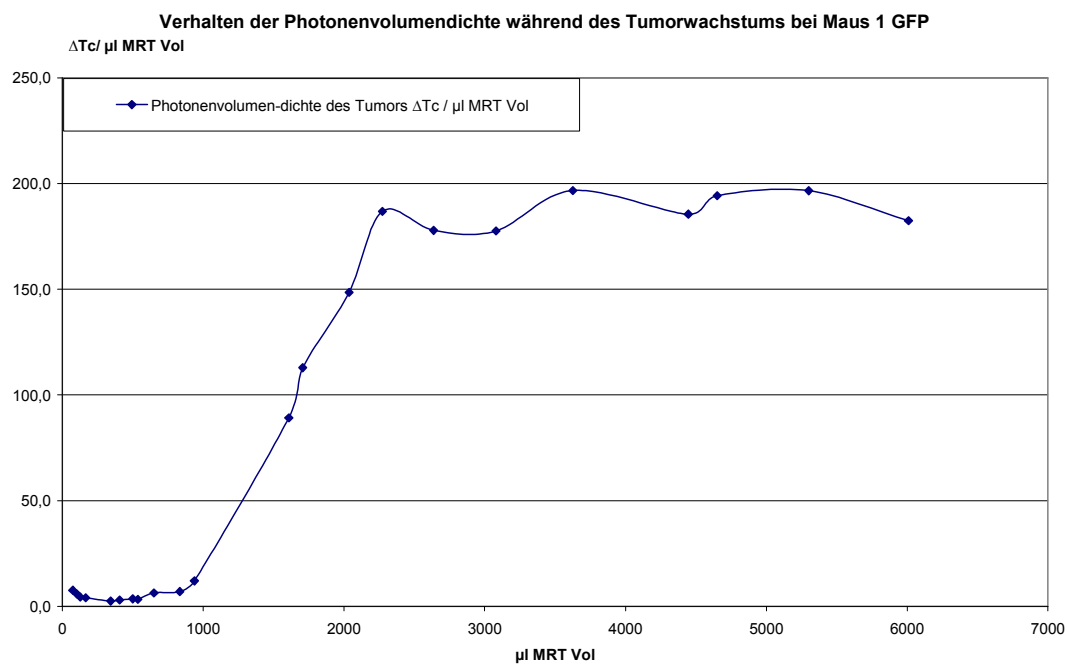


Abb. 22

Bezieht man allerdings die Photonendichten auf die Tumorumfänge (Dichte/MRT-Volumen) und verfolgt ihre Entwicklung während der Wachstumszeit, dann wird deutlich, dass die Photonendichten im Tumorgewebe, mit Ausnahme bei GFP-Maus 1, stetig abnehmen (Tab. 1-8)

Im Gegensatz zur quantitativen Photonemission, verhalten sich die Pixelzahlen, die auf Grund qualitativer Fluoreszenzsignale optisch ermittelt wurden, von Beginn des Tumorstadiums an in guter Korrelation zur MRT-Volumetrie (Tab.10-17, Abb. 23-26).

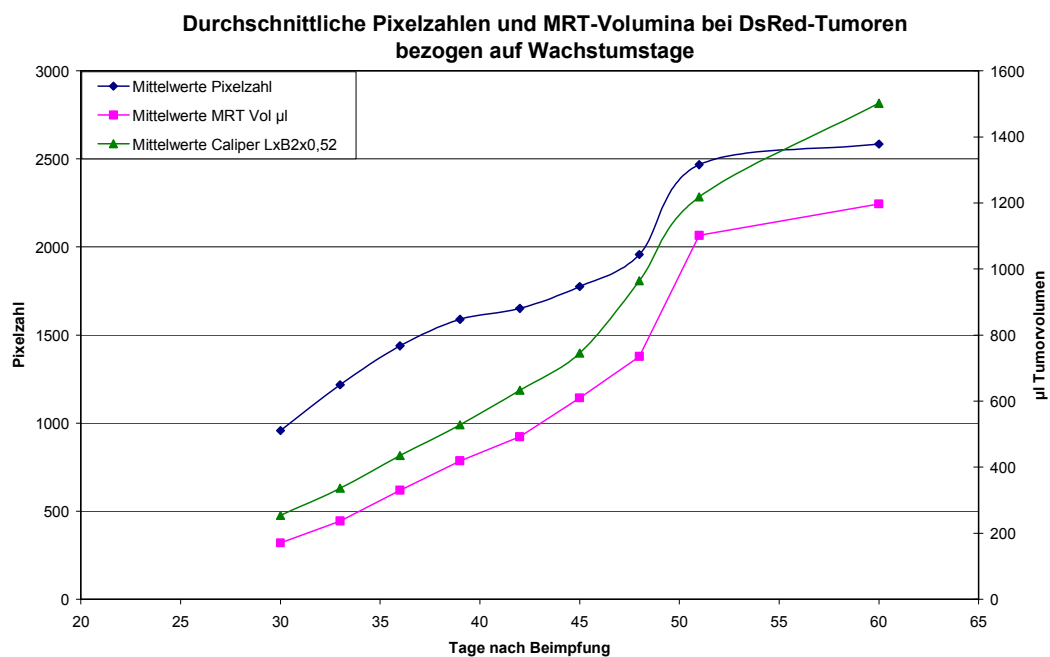


Abb. 26

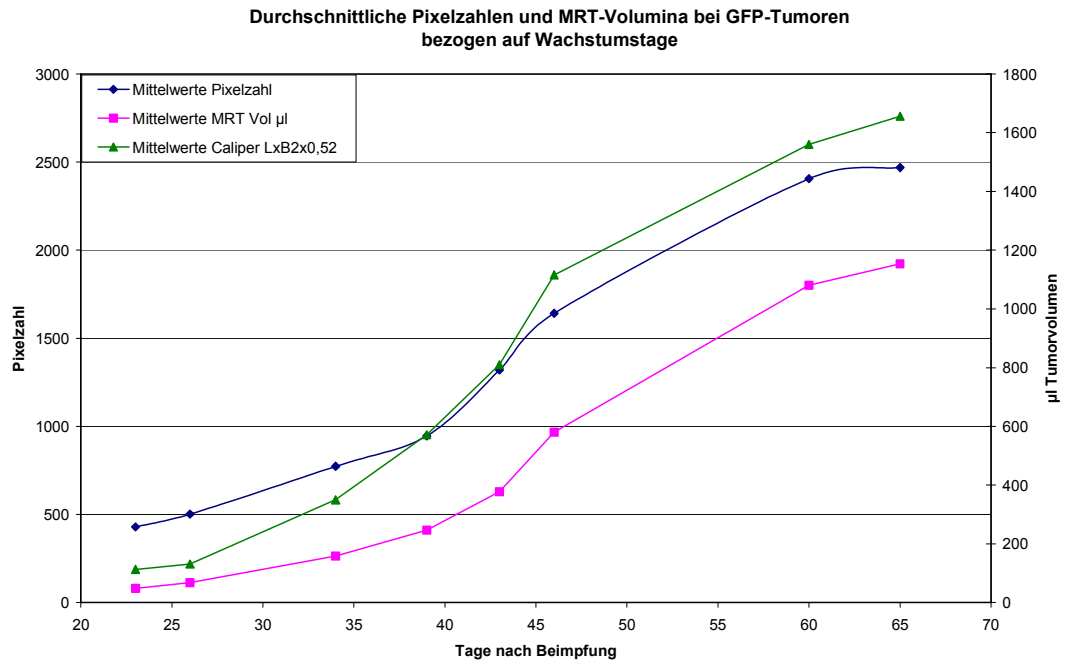


Abb. 25

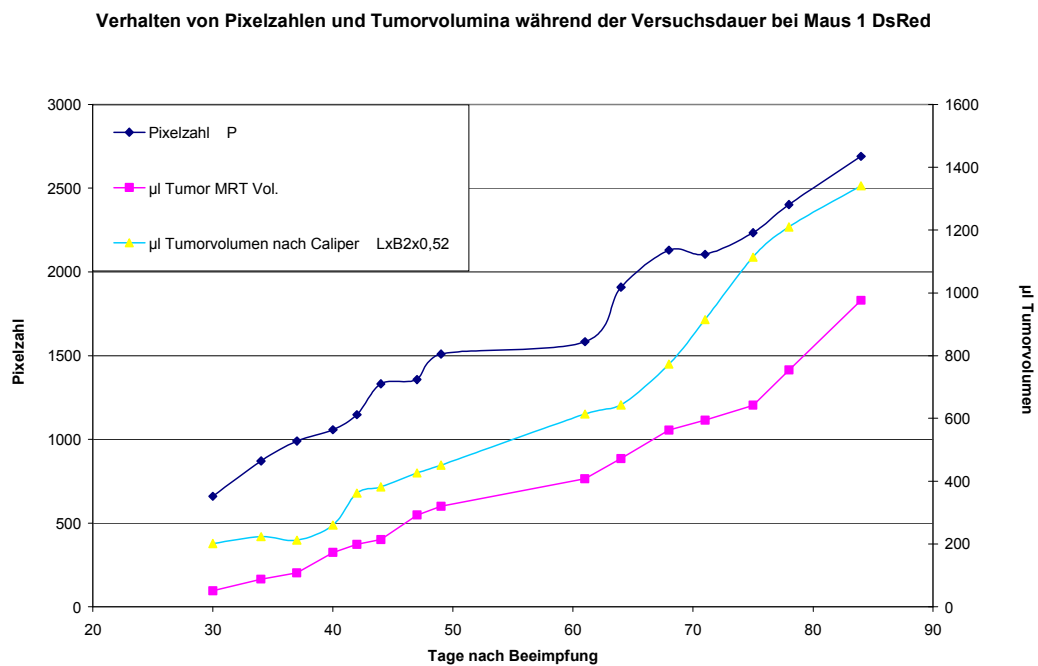


Abb. 23

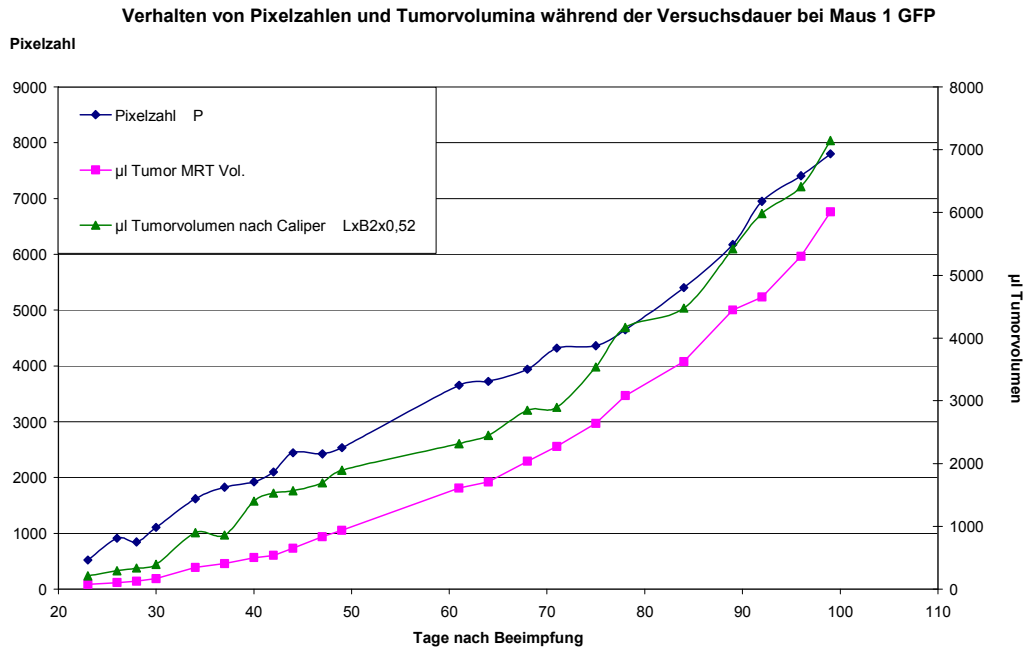


Abb. 24

Man findet graphisch zwischen den Koordinaten Pixelzahl und MRT-Volumen nahezu eine Gerade (Abb. 27, 28).

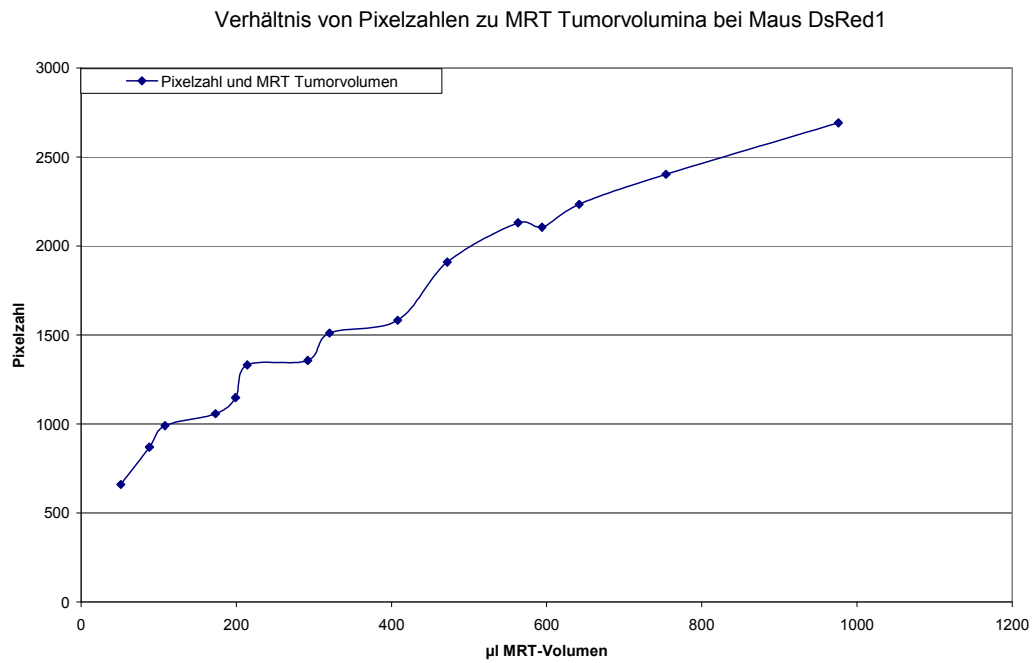


Abb. 27

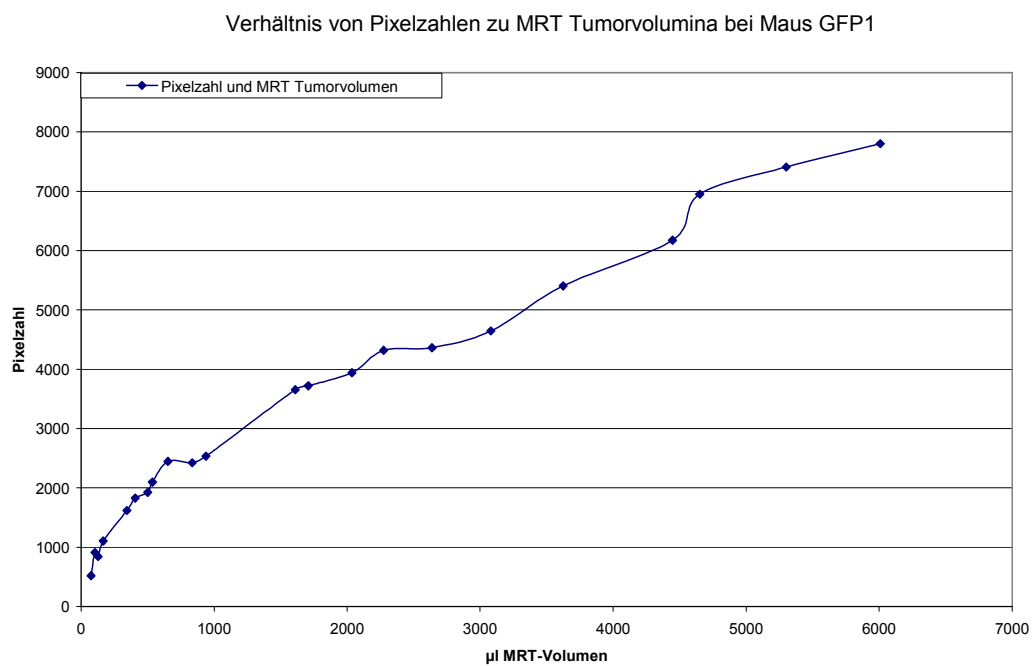


Abb. 28

Die Durchschnittswerte der jeweiligen Tumoren mit DsRed- oder GFP-Markierung zeigen einen ähnlichen Verlauf (Abb. 29, 30).

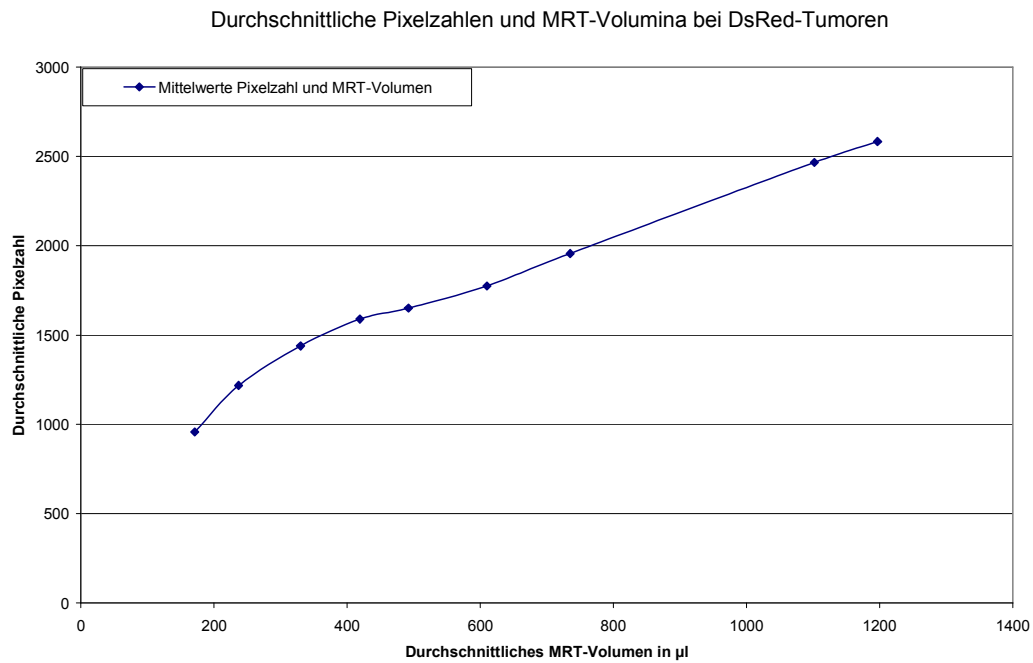


Abb. 29

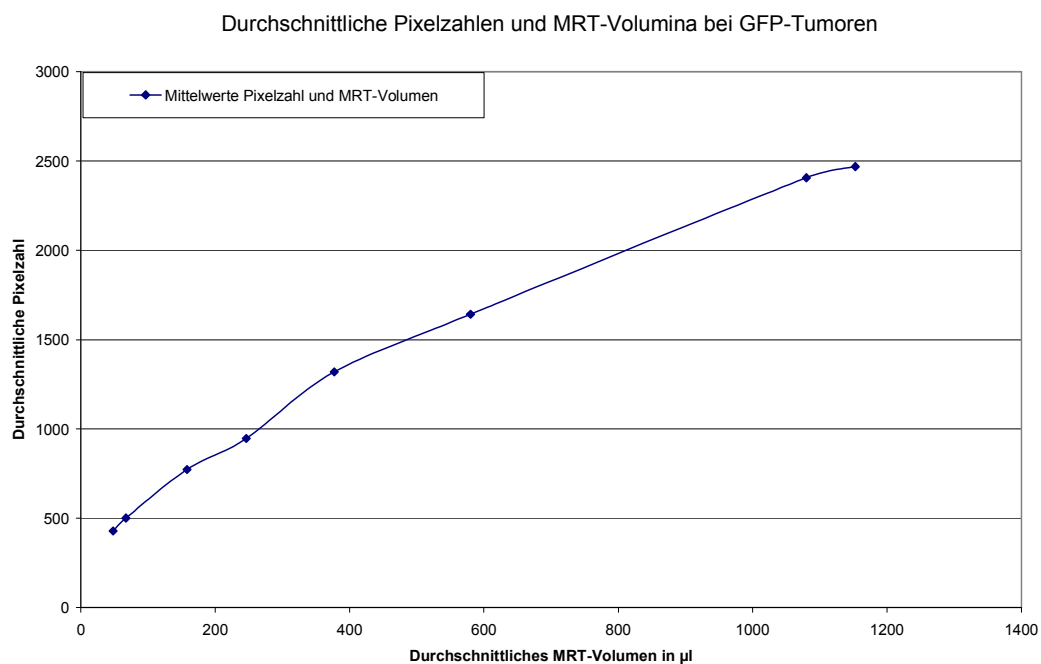


Abb. 30

5 Diskussion

5.1 Zu Messgrößen und Methodik

Wir haben die Fluoreszenzsignale quantitativ als Photonencounts und nicht als Intensitäten und die Signalflächen primär als Pixel dokumentiert, sowie die Tumorumfänge mit der MRT- und Calipermethode gemessen. In der Literatur (Choy et al. 2003, Yang et al. 2000a) wird die Fluoreszenzintensität regelmäßig als Produkt von integraler Fluoreszenzemission (Counts) und Pixelzahl dargestellt. Dabei handelt es sich aber eigentlich um kein aussagekräftiges, physikalisches Maß für die Entwicklung von Photonenemissionen in fluoreszenzmarkierten Tumoren. Es wird nur die Emissionsgröße quantitativ hochgerechnet. Eine tatsächliche Erfassung von quantitativen Emissionsaktivitäten der Tumorzellen kann nur durch die Errechnung der Photonendichten (Counts/Volumen) als physikalische Größe erfolgen, wie wir sie als Volumendichten dargestellt haben (Abb. 21, 22).

Qualitativ werden die Fluoreszenzsignale von uns als Pixel erfasst und mit Hilfe des Eichfaktors (EF) der CCD-Kamera auf Tumorflächen umgerechnet (Tab. 1-8). Ohne den Eichfaktor würde die Pixelfläche nur verkleinert im Sensor wahrgenommen werden. In den Arbeiten von Choy (2003) und Yang (2000), die auch eine Hamamatsu Kamera verwendeten, kann man keine Eichung der Messkammer erkennen. Man verlässt sich offensichtlich auf die vorhandenen Rechenprogramme, ohne zu wissen, ob sie diese Eichfaktoren berücksichtigen oder man arbeitet nur mit Pixelzahlen.

Wack et al. (2003) berechnen Fluoreszenzemissionen pro Pixel. Wieder andere Autoren (Yang et al. 2000, 2002) arbeiten mit dem Durchmesser von Tumoren oder Metastasen bzw. mit der Tumorfläche in mm^2 , die sie auf Grund der Fluoreszenz berechnen. Contag et al. (2000) verwenden die an einem Standard abgelesenen Farbtiefen der markierten Tumoren pro Pixel in einer morphologischen Studie.

Die Calipervolumetrie, die von den meisten Autoren zur Volumenbestimmung von Tumoren herangezogen wird, diente bei unseren Untersuchungen zum Vergleich mit der MRT-Volumetrie (Abb. 13-14, Tab. 18-19). Dabei ergab sich, dass die Calipervolumetrie wesentlich größere Tumorumfänge anzeigte als die

MRT-Volumetrie und damit die Emissionswerte pro Tumolvolumen von Choy et al. (2003) und Yang et al. (2000) anders zu bewerten sind.

Vielfach sind mit der CCD-Kamera längere Belichtungszeiten von 120 ms Hundt et al. (2008) oder 200 ms Choy et al. (2003) zur Steigerung der Photonenakquisition verwendet worden. Dabei wird aber auch der Rauscheffekt des Gewebehintergrundes stärker als bei 20 ms Belichtungszeit, die wir bevorzugten. Es gilt die Regel, dass die Hintergrundsignale proportional zur Belichtungszeit und Photonenmenge steigen (Bremer et al. 2001).

5.2 Zur Wachstumsphase des Tumormaterials

Bei unserem Versuchsansatz, der mit Gehrkes (2003) synthetischem Reporter-gen und Melanomzellen (MeWo) arbeitet, beginnt die Wachstumsphase der soliden Tumoren ca. 3-4 Wochen nach der Beimpfung der Versuchstiere mit den markierten Tumorzellen. Quantitative Photonenmessungen liefern meist erst nach 5 Wochen verwertbare Daten. Die meisten anderen Autoren (Choy et al. 2003, 2003a, Diehn et al. 2002, Yang et al. 2000a, 2001, 2002, 2003, Subramanian et al. 1996, Bouvet et al. 2002, Peyruchaud et al. 2003) berichten über wesentlich kürzere Nidationszeiten von 5-14 Tagen, haben aber in der Regel mit anderen viralen Reporter-genen und anderen Tumorzelllinien, wie z.B. Coloncarzinomzellen gearbeitet. Anscheinend verhalten sich diese humanen Tumorzelllinien in Wachstum und Nidationsfähigkeit anders als Melanomzellen. Die von Gehrke (2003) hergestellten Plasmid-Reporter-gene könnten langsamere Zellteilungsreaktionen auslösen als andere virale Reporter-gene.

5.3 Korrelation von quantitativen Fluoreszenzsignalen und MRT-Volumina

Unsere Befunde an transfizierten Melanomzellen bestätigen in Teilbereichen die Beobachtungen von Choy et al. (2003), Diehn et al. (2002), Peyruchaud et al. (2003) und Yang et al. (2000a, 2001, 2002, 2003), dass eine Korrelation zwischen quantitativen Photonenemissionen und Tumorwachstum besteht. Wir finden zwischen 173 μl und 754 μl bei DsRed-Maus 1 und zwischen 938 μl und 3625 μl bei GFP-Maus 1 Tumolvolumen eine Gerade mit Korrelationskoeffizienten von $r = 0,99$ bzw. $r = 0,98$. Zu Beginn des Tumorwachstums und nach einer mehrwöchigen Wachstumsphase, die diese Autoren nicht erreichten, tritt eine derartige Korrelation nach unseren Beobachtungen nicht generell auf (Abb. 15, 16). Ab einem Tumolvolumen von ca. 750 μl bei DsRed-Markierung und von ca. 3600 μl bei GFP-Markierung werden die Photonenemissionen geringer als dem Tumorwachstum entspricht. Das bedeutet, dass nicht alle Photonen pro Volumen entsprechend einer Sättigungskinetik erfasst werden, eine Photonenabsorption oder Aggregation mit dem Tumorwachstum zunimmt oder auch die einzelnen Zellen weniger emittieren.

Die abnehmenden und zum Teil variablen Photonendichten (Abb. 21, 22, Tab. 1-8) während des Tumorwachstums belegen, dass keine konstante Photonenakquisition besteht und deshalb ein Verlust von linearer Korrelation auftreten muß. Es kann aber auch einen Verlust von Fluoreszenzgenen während des Tumorwachstums bedeuten.

Zwar sprechen Fluoreszenzsignale für einen vitalen Tumor, wenn aber signalinaktive Nekrosen entstanden sind, vergrößert sich das MRT-Volumen ohne proportionale Zunahme der Fluoreszenzsignale. In solchen Fällen bietet sich eine Tumorgrößenbestimmung nach der Pixel-Wurzel-Methode an, die nur auf qualitativen Fluoreszenzsignalen beruht.

Auf Grund unserer Befunde können quantitative Tumorcounts nicht generell als Basis für eine Volumenerfassung verwendet werden. Damit wird der Nutzen auch für Größenbestimmungen kleiner Tumoren, wie Metastasen, geringer.

Alle Untersuchungen über Fluoreszenzsignale und Tumorumfängen während des Tumorzustandes sind in Bereichen zwischen 7 und maximal 60 Tagen, meist nur in ca. 30 Tagen durchgeführt worden (Hasegawa et al. 2000, Peyruchaud et al. 2003, Choy et al. 2003, Diehn et al. 2002, Gehrke 2003). Eine lineare Korrelation von Photonenemission und Tumorzustand konnten sie bis ca. 750 µl Tumorumfang nach Caliper nachweisen. Eine Kinetik der Photonendichten wurde nicht ermittelt. Interessanterweise ergab eine zytostatische Therapie nur eine Fluoreszenzminderung, aber keine Veränderung des Tumorzustands (Diehn et al. 2002). Das deutet darauf hin, dass die Klonierung mit Fluoreszenzgenen sehr sensibel an den Zellstoffwechsel gebunden ist und sich nicht nur proportional zur Zellteilung entwickeln muss.

5.4. Korrelation von qualitativen Fluoreszenzsignalen und MRT-Volumina

Qualitativ werden Fluoreszenzsignale an Hand der Pixelzahlen erkannt, die eine strahlende Fläche wiedergeben, die mit Hilfe eines Eichfaktors (EF) errechenbar ist.

Die Tabellen 18 und 19 und die Abbildungen 23 und 24, sowie 27 und 28, zeigen, dass die Pixelzahlen in einer stetigen guten Korrelation zu den MRT-Volumina im Koordinatensystem stehen. Auch die Durchschnittswerte von Pixelzahlen und MRT-Volumina der GFP- und DsRed- markierten Tumoren zeigen eine gute, nicht ganz lineare Korrelation zueinander (Abb. 29, 30). Die Pixelzahlen sind deshalb, gerade zu Beginn des Tumorzustands, an Stelle quantitativer Fluoreszenzmessungen gut geeignet um als Grundlage für eine mathematische Bestimmungsmethode von Tumorumfängen zu dienen (siehe 5.8, Pixel-Wurzel-Methode Abb.13,14).

5.5. Störfaktoren bei Fluoreszenzsignalen in Geweben

Biophysikalische Einflüsse und Gewebefaktoren können Photonenemissionen bei unseren Studien beeinflussen. Es sind folgende Einflüsse zu diskutieren.

- Spektrale Empfindlichkeit der Sensoren von Messgeräten
- Anregungsenergie der Strahlung
- Absorption in Geweben
- Konzentrationsabhängige Photonenaggregationen
- Selbstbeschattungen und Streulichtverluste
- Löscheffekte (Quench-effekt)
- Wellenlängenverschiebungen im Spektrum durch pH-Varianz

Die spektrale Empfindlichkeit des Sensors unseres Messgerätes kann kaum bei den verwendeten Messwellenlängen zwischen 500 und 800 nm die Ursache für eine wesentliche Veränderung der Photonen-Ausbeute sein, weil in diesem Bereich der Sensor nur einen Sensibilitätsunterschied von maximal 12% hat (Abb. 4) . Hiermit wären die erheblichen Photonenemissionsunterschiede zwischen der DsRed und der GFP Markierung nicht zu erklären. Rein physikalisch wäre aber zu überlegen, ob die unterschiedliche Energie der Primärstrahlung die voneinander stark abweichende Intensität der Sekundärstrahlung bei Rot- und Grünfluoreszenz verursacht. Da kurzwellige Strahlung, wie bei GFP-Markierung, energiereicher als langwellige Strahlung ist, könnte eine stärkere Photonenabsorption im Gewebe auftreten. Gewebe, insbesondere Bindegewebe, Hämoglobin und Myoglobin bewirken grundsätzlich eine Photonenabsorption, wobei es gleichzeitig zur Streuung der Emission durch Zellmembranen und Organellen kommen kann (Bremer et al. 2001). Das hat Gehrke (2003) in einfachen Versuchen an Mäusen nachgewiesen. Er fand bei GFP-markierten, subkutanen Hauttumoren in situ nur 9% der Signale des exzidierten Tumorgewebes wieder, während bei der DsRed-Markierung 89% der Signale wieder gefunden wurden. Das bedeutet, dass 90% der Sekundärstrahlung bei GFP-Markierung in der Haut absorbiert werden, was er in vitro an Tumoren durch Abdeckung mit verschiedenen Hautschichten bestätigen konnte. Eine Streuung von Photonen löst eine

geringere Ortsauflösung aus. Ein Prozent der Photonen, die nicht streuen, führen zu besser Ortsauflösung aber stärkerem Signalhintergrund (Bremer et al. 2001).

Tief liegende Tumoren sind nach der Literatur bisher im Tierversuch mit der Fluoreszenzmarkierung *in situ* nur bei geöffnetem Abdomen erfasst worden. (Hasegawa et al. 2000; Yang et al. 2001, 2002, 2003 sowie Bouvet et al 2002) Yang und Bouvet haben humane Pankreascarcinomzellen mit einer GFP-Genföhre kloniert und anschließend als Gewebsfragmente in Organe von Nacktmäusen implantiert. Die Tumorentwicklung wurde über mehrere Tage *in situ* und nach Öffnung eines Hautlappens über den Organen direkt gemessen. Bei der Direktmessung fand man, wie auf Grund von Absorptionen in der Haut zu erwarten, deutlich höhere Emissionen als *in situ*.

Yang et al. (2000) haben nach Implantation von mit GFP-Gen geklonten humanen Colonicarcinomzellen in den Bauchraum und nach i.v.- Injektion von mit GFP-Gen geklonten Melanomzellen Messungen von Tumorwachstum und Metastasen in Leber und Skelett durchgeführt. In 0,5 mm Tiefe waren Tumoren mit 60 μm im Durchmesser nachweisbar, in 2,2 mm Tiefe erst mit 1800 μm Durchmesser. Diese Beobachtungen beweisen, wie stark Absorptionen die Photonenmessungen stören können.

Weiterhin ist eine Selbstbeschattung der Photonenemission hauptsächlich durch Pigmente, wie Melanin u.ä. nachgewiesen worden, die ebenfalls zu einer Schwächung der Photonenemissionsmessung führt (Hartmann 1977), was bei den von uns verwendeten Melanomzellen Bedeutung haben könnte.

Streulichtverluste können besonders in Geweben eintreten und dadurch die Photonenemission schwächen (Hartmann 1977).

Dieses Phänomen könnte schon im Rahmen der Anregungsstrahlung bei GFP- Markierung Bedeutung haben und wird von Hoffman (2005) für möglich gehalten.

Die Teilchenaggregation, die dazu führt, dass das Lambert-Beersche Gesetz nicht mehr erfüllt ist, ist Ursache von Sättigungskinetiken. Dieses Phänomen tritt in konzentrierten Lösungen bei der Absorptionsphotometrie auf. Übertragen auf die Emissions-Photometrie würde das bedeuten, dass Photonen bei höheren Dichten nicht mehr einzeln erkannt werden können.

Bei der Fluorometrie von Flüssigkeiten ist die Sekundärstrahlung ein Maß für die durch Primärlicht angeregten Teilchen in einem bestimmten Volumen. Es gilt:

$$\text{Photonenemission} = \text{Konzentration} \times \text{Volumen}$$

Bei Geweben, die, wie in unserem Fall aus Fluoreszenzlicht emittierenden Zellen bestehen, gilt Ähnliches. Nur wenn in den Tumorzellen die Konzentration der anregbaren Teilchen konstant bleibt, kann die Photonemission, ein Maß des Zellvolumens, also der TumorgroÙe sein. In unseren Fällen nimmt aber die Photonendichte pro Tumolvolumen ab (Tab.1-8). Bei zunehmender Zelldichte könnte auch einerseits die anregende Primärstrahlung nicht alle Teilchen erreichen, andererseits würde eine Verdichtung der Sekundärstrahlung zu Photonengruppen führen können und Messungen negativ beeinflussen. Das könnte in unseren Fällen im letzten Teil der Wachstumsphase der Tumoren möglich sein.

Aufgrund zu kurzer Lebensdauer der Mäuse DsRed 2 und 3, sowie GFP 2-5 (35-65 Tage) und der zum großen Teil geringen Tumorumfänge (87-597 μl) konnte die Phase einer Sättigungskinetik von Fluoreszenzsignalen nicht erreicht werden.

Schließlich ist der Quench-Effekt als bimolekularer Lösungsprozess zu erwähnen, der in Geweben auftritt, und zu diskutieren ist (Dörr 1977).

Der Quench-Effekt entsteht, wenn ein so genanntes Löschermolekül Q mit einem angeregten oder anregbaren Molekül A zu einem nicht strahlenden Komplex QA reagiert. Als Molekül A wäre in unserem Fall das GFP- oder DsRed- Gen zu betrachten. Löscher können bereits kleine Moleküle sein (Dörr 1977). Bei höheren Konzentrationen anregbarer Moleküle könnte im Reaktionsgleichgewicht mehr QA- Komplex entstehen. Kuhn (1977) leitet ab, dass sich angeregte Moleküle dem Energiegefälle folgend gegenseitig löschen können. Der Quench-Effekt hängt anscheinend von Wellenlängen ab.

Bei Anregungswellenlängen von über 490 nm ist ein Quench-Effekt nicht mehr zu erwarten (Hein et al.1995; Delagrave et al. 1995). Insofern würden unsere Beobachtungen für einen Quench-Effekt bei Grünfluoreszenz sprechen.

Einen solchen Quench-Effekt könnte man im nicht linearen Verhalten der Kurven von ΔT_c pro μl MRT-Volumen (Abb. 16) bei der Maus 1 GFP sehen.

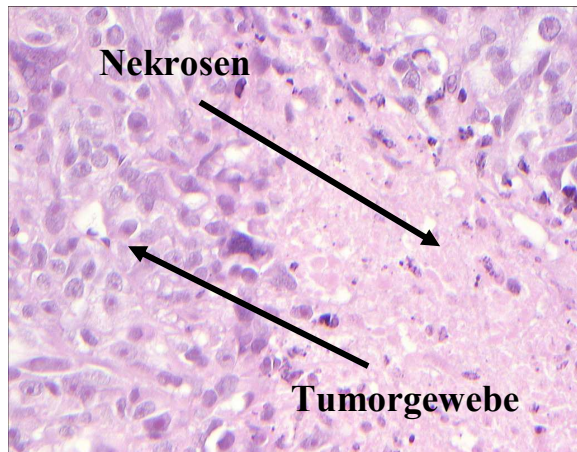
Die Photonen-Volumen-Dichte, die während des Tumorwachstums bei DsRed- und GFP-Markierung abnimmt, könnte auch ein Hinweis auf einen möglichen Quench-Effekt oder eine Photonenaggregation sein (Tab. 1-8).

Sogar der Säuregrad des Tumorgewebes kann Einfluss auf die Anregung der Fluoreszenzstrahlung nehmen (Dörr 1977), indem sich bei einer mehr azidotischen Stoffwechsellage der Tumorzellen die Wellenzahlen der Emission und damit die Messwellenlängen verschieben, was wiederum Beschattungsfaktoren verändern kann.

Biophysikalische Einflüsse können demzufolge die quantitative Verwertung von Fluoreszenzemissionen empfindlich stören, wenn man das Wachstum von markierten Tumoren an Hand von quantitativen Fluoreszenzsignalen vergleichen will.

5.6. Zum räumliche Tumorwachstum

Die schichtweise graphische Darstellung der Intensitäten der Photonenemissionen im Endstadium des Tumorwachstums veranschaulichen das räumliche Tumorwachstum (Abb. 19, 20). Die Ungleichmäßigkeit der Photonenemissionen in einigen Schnittbildern erweckt den Verdacht, dass sich innerhalb der Tumoren nicht mehr strahlende Nekrosen gebildet haben. Die histologische Untersuchung eines Tumors bestätigte diese Vermutung (Abb. 31).



Histologischer Schnitt des Tumors von Maus 3 DsRed 58. Tag, Hämalaun-Eosin-Färbung, Entwässerung durch Alkoholreihe, Parafineinbettung, 4µm Mikrotomschnitt

Abb. 31

Derartige Nekrosen müssen die quantitative Photonenemission beeinflussen. Auch Hundt et al. (2008) beobachteten solche Nekrosen bei ihren Studien an Mäusetumoren mit Hilfe von Lumineszenzsignalen.

5.7. Zur Anwendung der Fluoreszenzmarkierung

Voraussetzung von Anwendungen des optischen Imagings mit Fluoreszenzmarkern zur Diagnostik von Tumoren ist die Klonierung von Tumorzellen mit Fluoreszenz-Reporter-Genen oder die selektive Bindung von fluoreszierenden Proteinen an Tumorzellen. Hierfür kämen nach unseren Untersuchungen in erster Linie rot fluoreszierende Proteine oder Vektoren in Frage, weil sie eine höhere Photonenausbeute bringen.

Auch Alfke et al. (2004a) hat bei seinen Studien mit fluoreszenzmarkierten Melanomzellen ein DsRed-Reporter gen für wesentlich geeigneter gehalten, als ein GFP-Reporter gen, weil im Gewebe die Absorption der Rotemission geringer ist. Er konnte im Tierversuch mit Hilfe der DsRed-Markierung schon am 21.Tag Metastasen erkennen, die mit der GFP-Markierung erst ab dem 38. Tag erkennbar waren. Die Zahl der DsRed-markierten erkennbaren Metastasen nahm zwischen 3. und 7. Woche von 3 auf 48 zu. Mit der GFP-Markierung konnten zunächst keine, dann aber maximal 8 Metastasen erkannt werden. Tierexperimentell ist von einigen Autoren die Fluoreszenzmarkierung von Tumorzellen zu Therapiekontrollstudien angewendet worden. Peyruchaud et al.

(2001, 2003) haben Zellen von Knochenmetastasen, die von einem mit GFP-Genen transfizierten Lungencarcinom stammten, intravenös Mäusen gegeben und 29 Tage lang beobachtet. Die entstehenden Knochenmetastasen waren mit dem optischen Imaging eine Woche früher als mit anderen bildgebenden Verfahren erkennbar. Gleichzeitig konnten sie mit dieser Methodik feststellen, dass Angiostatin und Biphosphonate die Progression der osteolytischen Aktivitäten hemmen. Der Anstieg der Photonencounts verlief exponentiell, verbunden mit einem Flächenwachstum der Metastasen.

Nach unseren Befunden erscheint allerdings eine Volumenbestimmung solcher Metastasen aufgrund quantitativer Fluoreszenzsignale unsicher.

Hasegava et al. (2000) haben GFP-klonierte humane Magencarcinomzellen intraperitoneal implantiert und 2, 3 und 4 Wochen lang die Metastasierung an Hand der Fluoreszenzemissionen dargestellt.

Chaudhuri et al. (2001) haben humane Ovarialcarcinomzellen mit GFP-Genen geklont und Nacktmäusen intraperitoneal implantiert. Schon nach einem Tag fanden sie Tumoren von 0,2 mm Durchmesser, die bis zum 5. Tag wuchsen, deren Fluoreszenzemission aber unter Adriamycintherapie abnahm. Ähnliche Beobachtungen, bei denen es zur Abnahme der Fluoreszenzemission kam, machten Diehn et al. (2002) beim Wachstum von markierten Colonicarcinomzellen unter cytostatischer Therapie.

Contag et al. (1997, 2000) verwendeten als Reporter neben Luziferase auch GFP-Gene zur Markierung von humanen Tumorzellen, die Mäusen intraperitoneal verabreicht wurden und verfolgten deren Wachstum durch Messungen der Photonenemissionen. Moats et al. (2001) haben ein Neuroblastommodell bei Mäusen entwickelt und die Aufnahme von Retrovirus-GFP-Gen in die wachsenden Tumoren nachgewiesen.

Als praktische Anwendungsgebiete der Markierung von Tumoren mit GFP- oder DsRed-Genen sieht Hoffman (2005) Endoskopien und Ganzkörperscreenings.

5.8 Tumorvolumetrie auf Pixelbasis

Unsere Untersuchungen zeigen, dass quantitative Fluoreszenzsignale von markierten, experimentellen Tumoren nur in begrenzten Bereichen mit den MRT-Volumina korrelieren. Die quantitativen Fluoreszenzsignale sind deshalb zur Volumenbestimmung von Tumoren nur bedingt einsetzbar, zumal sie, wie beschrieben, mehreren Störfaktoren unterliegen können. Besser geeignet zur Volumenbestimmung scheint die Verwendung der Pixelzahlen zu sein, die mit den Tumorvolumina konstanter korrelieren (Abb. 27-29).

Es ist möglich auf mathematischem Wege auf Basis qualitativer Fluoreszenzsignale Tumorvolumina zu bestimmen.

Hierzu haben wir die aus der Pixelzahl errechneten Pixelflächen mit der Wurzel der Pixelflächen und dem geometrischen Korrekturfaktor von 0,52 multipliziert. Die Ergebnisse dieser Pixel-Wurzelmethode wurden den Messungen mit der MRT-Volumetrie und Calipervolumetrie bei den wachsenden Tumoren gegenübergestellt (Tab. 21a-h, Abb. 13-14). Es wurden 30 Wertepaare bei DsRed-markierten Tumoren und 42 Wertepaare bei GFP-markierten Tumoren mit den korrespondierenden MRT-Volumina gebildet. Dann wurde die Summe der prozentualen Abweichungen der Einzelwerte der Caliper- und Pixel-Wurzel-Methode von der MRT-Volumetrie und schließlich die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert errechnet.

Bei DsRed-markierten Tumoren ergab sich eine Abweichung von der MRT-Volumetrie

mit der Pixel-Wurzel-Methode von $25 \pm 44\%$

mit der Caliper-Methode von $53 \pm 55\%$

bei GFP-markierten Tumoren eine Abweichung von der MRT-Volumetrie

mit der Pixel-Wurzel-Methode von $8 \pm 39\%$

mit der Caliper-Methode von $86 \pm 54\%$

Damit wird deutlich, dass die Pixel-Wurzel-Methode mit der MRT-Volumetrie besser vergleichbar ist als die Caliper-Volumetrie.

Die bei GFP-Markierung nach der Pixelwurzelmethode gemessenen Tumorvolumina stimmen deutlich besser mit den MRT-Volumina überein als es

bei der DsRed-Markierung der Fall ist. Die Ursache wäre mit dem vermehrten Streulicht bei der DsRed-Fluoreszenz zu erklären, das zu scheinbar größeren Tumorumfängen führt (Gehrke 2003). Je größer die Tumoren sind, desto geringer ist die prozentuale Abweichung der Pixel-Wurzel-Volumetrie gegenüber der MRT-Volumetrie. Das gilt auch für die Caliper-Volumetrie (Tab. 21a-h).

Die Caliper-Volumetrie ergibt gegenüber der MRT-Volumetrie aber stark erhöhte Messwerte, weil sie alle den Tumor umgebenden Haut- und Gewebeschichten zwangsläufig miterfasst.

Die Pixel-Wurzel-Methode ist von quantitativen Photonenemissionsmessungen unabhängig. Es müssen nur lokalisierbare Fluoreszenzsignale vom Sensor der CCD-Kamera empfangen werden können und damit die Messung der Pixelzahl ermöglicht werden. Da die Methode von Pixelzahlen ausgeht könnte sie die Detektionsschwellen für Tumoren gegenüber der quantitativen Fluoreszenzmethode in etwa halbieren, obwohl das Wachstum erst später einsetzt.

Unsere Methode erscheint geeignet, bei tierexperimentellen Untersuchungen, die Caliper- und MRT-Volumetrie zu ersetzen. Sie hat den Vorteil, kein Hintergrundrauschen bzw. eine Autofluoreszenz berücksichtigen zu müssen und nur die CCD-Kamera zu benötigen.

6 Ausblicke

Hinsichtlich der Anwendung des Fluoreszenzimagings bei der Verifizierung von Tumorumfängen sind von Seiten der Radiologie einige Überlegungen anzustellen.

- 1) Will man quantitative Photonenemissionen zur Grundlage der Messung machen, dann müssen auf MRT-Volumen bezogene Eichkurven erstellt werden. Diese sind aber nur in begrenzten Bereichen linear und verwertbar. Außerdem unterliegen die Photonenemissionen in Geweben, besonders in der Tiefe Störfaktoren, die eine sichere, quantitative Auswertung der Messung beeinflussen. Insofern ist dieses Verfahren wahrscheinlich nicht so leicht zu verwirklichen.
- 2) Will man Tumorumfängen nur als mm^2 Fläche darstellen, genügt dagegen eine einfache Eichung der Messkammer, die die Vergrößerung zwischen Sensor und Objekt erfasst, und die Messung der Pixelzahl des Tumors mit dem Mauszeiger. Die Fläche eines Pixels ist der Gerätebeschreibung zu entnehmen und mit dem ermittelten Vergrößerungsfaktor zu multiplizieren, ohne quantitative Emissionsmessungen durchführen zu müssen.
- 3) Will man Tumorumfängen als μl Volumen nicht mit der MRT-Volumetrie ermitteln, dann kann man mit einem mathematischen Verfahren arbeiten. Bei tiefer liegenden und oberflächlichen Tumoren kann man, wie wir zeigen konnten, über die Quadratwurzel der Pixelfläche zuzüglich eines geometrischen Korrekturfaktors und anschließender Multiplikation mit der Pixelfläche die Tumorumfänge errechnen. Dieses Pixel-Wurzel-Verfahren verwendet die Fluoreszenzsignale nur als qualitativen Marker und kann die Bestimmung von Tumorumfängen nach der Calipermethode, sowie eine MRT-Volumetrie im Kleintierbereich ergänzen.

- 4) Einen Ansatz für eine zukünftige Anwendung von Fluoreszenzgenen zur Tumordiagnostik beim Menschen findet man in der Arbeit von Weißleder et al. (1999), Tung et al. (1999) und Bremer et al. (2001). Die Autoren haben im Tierversuch ein in der Fluoreszenzaktivität gelöscht DsRed-Protein in Körperzellen und Tumorzellen eingebracht und fanden, dass nur die Tumorzellen durch ihre eigene lysosomale Protease das DsRed-Protein zur Fluoreszenzemission aktivieren konnten.

Ähnliche Untersuchungen haben Jiang et al. 2004 gemacht. Bremer (2001) hält die optische Bildgebung mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen bei der Mammographie für denkbar. Ebenso bemerkenswert ist die Arbeit von Stanziale et al. (2004), die am Magenkrebsmodell von Mäusen laparoskopisch zeigen, dass nach intraperitonealer Injektion von Herpes-GFP-Gen nur die Tumorzellen GFP aufnehmen und alle anderen Zellen unverändert bleiben. Stritzker et al. (2007) haben gezeigt, dass mit GFP-Gen geklonte Colibakterien als Leuchtakterien Tumorzellen besiedeln können.

Yu et al. (2000, 2004) haben mit transfizierten Bakterien und Viren, die fluoreszenzcodiert waren, Tumoren sichtbar gemacht.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden die Korrelationen von Fluoreszenzsignalen mit der MRT-Volumetrie und die methodischen Möglichkeiten der Erfassung von Tumorgrößen bei Mäusen dargestellt.

Methodisch standen in zwei Versuchsserien 8 immundefiziente Mäuse zur Verfügung, die mit Rot-(DsRed) oder Grün-(GFP) Fluoreszenz markierten Melanomzellen am Oberschenkel beimpft wurden.

Das Wachstum der Tumorzellen wurde teilweise bis zu 3 Monaten mit einer auf Fluorometrie spezialisierten Digitalkamera an Hand von Pixelzahlen, Photonenemissionen, sowie der MRT-Volumetrie und Caliper-Volumetrie verfolgt.

Die Photonenemissionen aus dem Tumorgewebe wurden in einem der Tumorfläche entsprechenden Pixelfenster durch Differenzmessungen zur Hintergrundemission in regelmäßigen Abständen ermittelt. Anschließend wurden mit Hilfe dieser Messwerte Photonendichten sowie Tumorflächen und Tumorumfänge errechnet und tabellarisch und graphisch dargestellt.

Weiterhin wurde ein einfaches, mathematisches Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe man ohne quantitative Photonenmessungen Tumorflächen und Tumorumfänge näherungsweise ermitteln kann. Bei diesem Verfahren müssen Fluoreszenzsignale nur Tumorbegrenzungen anzeigen. Sie sind unabhängig von Absorptions- und Störeffekten und erfordern keine Hintergrundmessungen mehr. Man benötigt nur die integrale Pixelzahl des fluoreszenzmarkierten Tumors und als Eichung den Vergrößerungsfaktor der Messkammer, der einmal an Hand einer Standardfläche für den Sensor bestimmt werden muß.

Außerdem benötigt man die Flächenwurzel als mittleres Maß für die Höhe der Tumoren und einen geometrischen Korrekturfaktor, die beide mathematisch ermittelt werden können. Bei dieser Methode spielen die Strahlungsenergien keine Rolle, solange die Photonenstrahlung den Sensor der Kamera erreicht. Es ergab sich bei unseren Untersuchungen:

Quantitative Fluoreszenzsignale von Xenografttumoren korrelieren nach einer Nidationsphase von ca. 3-4 Wochen mit der Pixelzahl und dem MRT-Volumen erst nach ca. 5 Wochen linearproportional. Nach ca. 11-13 Wochen ergeben die Werte asymptotische Abweichungen von der Linearität. Bei nur tageweiser Betrachtung von Photonenemissionen, wie es andere Autoren beschreiben, ist

dieses Verhalten nicht zu erkennen. Die Detektionsschwelle für subkutane Tumoren mit Hilfe von quantitativen Fluoreszenzsignalen liegt zwischen 200-400 μl bei DsRed- und 500-1000 μl bei GFP-Markierung.

Grundsätzlich werden bei der GFP-Markierung erheblich geringere Photonenströme gemessen als bei der DsRed-Markierung. Als Ursache von schwächer messbaren Photonenemissionen werden insbesondere Störfaktoren, wie Absorption im Gewebe und biophysikalische Einflüsse diskutiert.

Der Einsatz des quantitativen Fluoreszenzimagings zur Volumenbestimmung von Tumoren ist deshalb kritisch zu betrachten, weil eine linear-proportionale Beziehung zwischen quantitativer Photonenemission und Tumorumfang nur begrenzt besteht.

Die DsRed-Markierung ist für die digital-photographische Pixel-Wurzel-Methode als qualitativer Marker einerseits besser geeignet als die GFP-Markierung.

Andererseits findet man mit der GFP-Markierung die geringste mittlere Abweichung (8%) der Tumorumfänge von den MRT-Volumina.

Eine schichtweise Photonenmessung bei den Tumoren vermittelt anschaulich die räumliche Verteilung der Tumoremissionen.

Unsere Methode der mathematischen, digitalphotographischen Volumenbestimmung auf der Basis von Pixelzahlen und einer Eichung der Messkammer ergibt mit den MRT-Volumenbestimmungen besser vergleichbare Resultate als die Caliper-Volumetrie.

Unsere Studie an Mäusetumoren zeigt, dass die Berechnung von Tumorflächen und Tumorumfänge auf Basis qualitativer Fluoreszenzsignale neben der eingeschränkten Verwertung der quantitativen Fluoreszenzsignale möglich ist. Unser Produkt aus Pixelfläche und der Pixelflächenwurzel zur Berechnung der Tumorumfänge ist vergleichbar mit der Summe der Voxel zur Berechnung der Tumorumfänge bei der MRT.

Der Weg über eine Fluoreszenzmarkierung von Tumorzellen und digital-photographische, mathematische Ermittlung von Tumorumfänge kommt ohne Inkorporation von Radioaktivität aus.

8 Literaturverzeichnis

- Ahmed F, Wyckoff J, Lin E, Wang W, Wang Y, Henninghausen L,
Miyazaki J, Jones J, Pollard J, Condeelis J, Segall J
GFP-expression in the mammary gland for imaging of mammary
tumor cells in transgenic mice. *Cancer Res.* (2002) 62,7166-7169
- Alfke H, Kalinowski M, Nocken F, Klose KJ Eine Übersicht über die
molekulare Radiologie. Teil 1: Gentherapie *Fortschr.
Röntgenstrahlen* (2000) 172, 949-956
- Alfke H, Nocken F, Heverhagen JT, Klose KJ Molekulare Radiologie. Teil 2:
Molekulare Bildgebung *Fortschr. Röntgenstrahlen* (2001)
173, 391-398
- Alfke H, Gehrke S, Heverhagen J, Klose KJ Posterpräsentation 2004a
Optische Bildgebung der Transgenexpression
- Alfke H, Kohle S, Maurer E, Celik S, Rascher-Friesenhausen R, Behrend S,
Heverhagen J, Peitgen H, Klose KJ
Analysis of mice tumor models using dynamic MRI data and a
dedicated software platform. *Fortschr.Röntgenstr.* (2004) 176,1226
- Baird G, Zacharias D, Tsien R
Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red
fluorescent protein from coral
Proc.Natl.Acad.Sci. (2000) 97, 11984
- Balaban R, Hampshire V Challenges in small animal non-invasive imaging
ILAR-Journal (2001) 42 , 248-262
- Beckman F, van der Have F The pin-hole-gateway to ultra-high resolution
three dimensional radionuclid imaging
Eur.J.nucl.Med.Mol.Imaging (2007) 34 , 151-161 .

- Behe M, Keil B, Alfke H, Böhm J, Kiessling A, Gotthardt M, Heverhagen J
Kombinierte radiologische und nuklearmedizinische Bildgebung
in Tierexperimenten: Ein Überblick über die aktuellen Möglichkeiten
Fortschr. Röntgenstr. (2007) 179, 796
- Bernhardt J, Veit R, Bauer B Erhebung zur Strahlenexposition der Patienten
bei der Röntgendiagnostik. Z. Med. Physik (1995) 5, 33-39
- Beyer T, Townsend DW, Brun T Acombine PET/CT-scanner for clinical
Oncology. J. Nucl. Med. (2000) 41, 1369-1379
- Bloch F, Hansen W, Packard M Nuclear induction Phys.Rev.69,127-136
(1946) Phys. Rev. (1946) 70, 460- 474
- Bremer C, Ntziachristos V, Mahmood U, Tung CH, Weissleder R
Fortschritte in der optischen Bildgebung. Der Radiologe
(2001) 41, 131
- Bobek V, Kolostov K, Pinterov D, Boubelik M, Jiang P, Yang M, Hoffman R
Syngeneic lymphnode targeting model of green-fluorescent-protein
expressing Lewis lung carcinoma. Clin. Exp. Metastasis (2004)
21, 705
- Borah B, Gross G, Dufresne T Three-dimensional micro-imaging (MR,
micro-CT) finite element modelling and rapid prototyping provide
unique insights into bone architecture in Osteoporosis. Anat. Rec.
(2001) 265, 101-110
- Bouvet M, Wang J, Nardin S, Nassirpour R, Yang M, Baranov E, Jiang P,
Moossa A, Hoffman R
Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple
metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model
Cancer Res. (2002) 62, 1534

- Chalfie M Green fluorescent Protein. *Photochem. Photobiol.* (1995) 62, 4
- Chandhuri T, Mountz J, Rogers B, Partridge E, Zinn K
Light-based imaging of green fluorescent protein-positive ovarian cancer xenografts during therapy. *Gynecol. Oncol.* (2001) 82, 581
- Cherry S, Gambhir S Use of positron-emission-tomography in animal Research. *J. Clin. Pharmacol.* (2001) 41, 482-491, *ILAR. Journal* (2001) 42, 219-232
- Cherry S The 2006 H. Wagner lecture: Of mice and men and positrons advances in PET imaging technology *J. Nucl. Med.* (2006) 47, 1735-1745
- Cherry S, Shao Y, Silverman R, Chatzilloannou A, Meadors K, Siegel S et al.
Micro-PET: a high resolution PET-scanner for imaging small animals *IEEE Trans. Nucl. Sci.* (1997) 44, 1161- 1168
- Chudakov D, Belousov V, Zaraisky A, Novoselov V, Staroverov D, Zorov D, Lukyanov S, Lukyanov K
Kindling fluorescent proteins for precise in vivo photolabeling. *Nat. Biotechnol.* (2003) 21, 191
- Choy G, O'Connor S, Diehn F, Costouros N, Alexander H, Choyke P, Libutti S
Comparision of non-invasive fluorescent and bioluminescent small animal optical imaging. *Biotechniques* (2003) 35, 1022
- Choy G, Choyke P, Libutti S Current advances in molecular imaging: noninvasive in vivo bioluminescent and fluorescent optical imaging in cancer research. *Mol.Imaging* (2003a) 2, 303

- Contag C, Jenkins D, Contag P, Negrin R
Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. *Neoplasia* (2000) 2, 41
- Contag C, Spilman S, Contag P, Oshiro M, Eames B, Dennery P, Stevensen D, Benaron D
Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem. Photobiol.* (1997) 66, 523
- Cutler M
Transillumination as an aid in the diagnosis of breast lesions. *Surg. Gynecol. Obstet.* (1929) 48, 721-728
- Damadian R
Tumour detection by nuclear magnetic resonance
Science (1971) 171, 1151
- Damadian R
Nuclear magnetic resonance: a non-invasive approach to cancer *Hosp. pract.* (1977) 12, 63-70
- Delagrave S, Hawtin R, Silva C, Yang M, Youvan D
Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein
Biotechnology (1995) 13, 151
- Diehn F, Costouros N, Miller M, Feldman A, Alexander H, Li K, Libutti S
Noninvasive fluorescent imaging reliably estimates biomass in vivo. *Biotechniques* (2002) 33, 1250, 1254
- Dörr F
Allgemeine Grundlagen der Photophysik und Photochemie
In *Biophysik* Verlag J. Springer Berlin-Heidelberg (1977) S.174 ff
- Dokumenta Geigy Wissenschaftliche Tabellen 1968 7. Auflage
- Dwek R
Nuclear magnetic resonance in Biochemistry
Clarendon Press Oxford 1973

- Drexler W, Davis JL, Chofield G Diaphonography in the diagnosis of
Breastcancer. Radiology (1985) 157, 41-44
- Fellner M, Chen A, Mont M, McCabe J, Baden M
Patterns and intensity of autofluorescence and its relation to
melanin in human epidermis and hair. Int. J. Dermatol.
(1979) 18, 722
- Förster T Energiewanderung und Fluoreszenz.
Naturwissenschaften (1946) 33, 166
- Franceschini MA, Moesta KT, Fantini S, Gaida G, Gratton E, Jess H,
Mantulin WW, Seeber M, Schlach PM, Kaschke M
Frequency-domain techniques enhance optical mammography:
Initial clinical results. Proc. Natl. Acad. Sci. (1997) 94, 6468-6473
- Frommhold H, Koischwitz D Sonographie des Abdomens
G. Thieme Verlag Stuttgart 1982
- Galanski M, Nagel H, Stamm G CT-Expositionspraxis in der
Bundesrepublik Deutschland Fortschr. Röntgenstr.
(2001) 173, R 1-66
- Gehrke S Bakulovirus-basierte synthetische Vektoren und chimäre
Hepatozyten-spezifische Promotoren für die Leber-gerichtete
Gentherapie. Inaugural-dissertation Marburg 2003
- Griebel J, Schmidt U, Kölbel G Begriffe der medizinischen
Kernspintomographie. Teil II Methoden der Bildrekonstruktion
Röntgenpraxis (1985) 38, 315-320
- Habermehl A, Graul E Kernspinresonanztomographie
Dtsch. Ärzteblatt (1982) 79, 17-29

- Haeckel R, Schumann G Methoden der Messwerterfassung.
In Greiling H, Gressner AM Lehrbuch der klinischen Chemie
und Pathobiochemie. Verlg. Schattauer Stuttgart 1994 3. Aufl. S.
120-141
- Hartmann K Aktionsspektrometrie in Biophysik Verlag J. Springer
Berlin-Heidelberg (1977) S.197 ff
- He Z, Evelhoch J, Mohammad R Magnetresonance imaging to measure
therapeutic response using an orthotopic model of human
pancreatic cancer. Pancreas (2000) 21, 69-76
- Heim R, Cubitt A, Tsien R Improved green fluorescence
Nature (1995) 373, 663
- Heim R, Prasher D, Tsien R Wavelength mutations and posttranslational
autooxidation of green fluorescent protein
Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91, 12501
- Heverhagen J, Hahn H, Wegmann M, Herz U, Whitaker C, Matschl V, Alfke H
Volumetric analysis of mice lungs in a clinical magnetic
resonance imaging scanner. Magma (2004) 10334
- Hasegawa S, Yang M, Chishima T, Miyagi Y, Shimada H, Moossa A,
Hoffman R
In vivo Tumor delivery of the green fluorescent protein gene
to report future occurrence of metastasis
Cancer Gene Ther. (2000) 7, 1336
- Hoffman R Visualization of GFP- expressing tumors and metastasis in vivo
Biotechniques (2001) 30, 1016, 1024

- Hoffman R Advantages of multicolour fluorescent proteins for whole-body and in vivo cellular imaging
J. of Biomedical Optics (2005) 10, 1
- Hoffmann R, Yang M Whole body imaging with fluorescent proteins.
Nat. Protoc. (2006) 1, 1429
- Hundt W, Steinbach S, O'Connell-Rodwell CE, Mayer D, Bednarski M, Guccione S
Tumortissue characterization evaluating the Luciferase activity under the control of a hsp70 promoter and MR-imaging in three tumorcell lines. Eur. J. Radiol. (2009) 70, 369-377
- Jacques S, Mc. Auliffe D The melanosome : threshold temperature for explosive vaporization and internal absorption coefficient during pulsed laser irradiation. Photochem. Photobiol. (1991) 53, 769
- Jiang T, Olson E, Nguyen Q, Roy M, Jennings P, Tsien R
Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. (2004) 101, 17867
- Kain S, Adams M, Kondepudi A, Yang T, Ward W, Kitts P
Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein lokalisation. Biotechniques (1995) 19, 650
- Kuhn H Energieübertragungsmechanismen
In: Biophysik. Verlag J. Springer Berlin-Heidelberg (1977) S.187ff
- Laubenberger T, Laubenberger J, Technik der medizinischen Radiologie
Dtsch. Ärzteverlag Köln 6.Auflage 1994

- Lauterbur P Image formation by inducted local interactions.
Examples employing nuclear magnetic resonance
Nature (1973) 242, 190
- Lewis J, Achilefu S, Garbow J, Laforest R, Welch M Small animal imaging:
current technology and perspectives for oncological imaging
Europ. J. Cancer (2002) 38, 2173-2188
- Li D, Wang Y, Waight D Blood oxygen saturation assessment in vivo using
T₂- estimation. Magn. Resonance Med. (1998) 39, 685-690
- Löffler W, Oppelt A Physical principles of the NMR-tomography
Europ. J. Radiol. (1981) 1, 338-344
- Liu H, Jan M, Chou C, Chen P, Ke N Is green fluorescent protein toxic to
the living cells. Biochem. Biophys. Res. Com. (1999) 260, 712
- Louie A, Huber M, Ahrens E, Rothbacher U, Moats R, Jacobs R, Fraser S,
Meade T In vivo visualization of gene expression using
magnetresonance imaging Nat. Biotechnol. (2000) 18, 321
- Magata Y, Saji H, Choi S, Tajima K, Takagaki T, Sasayama S, Yonokura Y,
Kitano H, Watanabe M, Okada H
Noninvasive measurement of cerebral blood flow and glucose
metabolic rate in the rat with high resolution animal positron
emission tomography (PET). A novel in vivo approach for
assessing drug action in the brains of small animals.
Biol. Pharm. Bull. (1995) 18, 753-756
- Marshall V, Williams DC, Smith KD
Diaphanography as a means of detecting breast cancer
Radiology (1984) 150, 339-343

- Matz M, Fradkov A, Labas Y, Savitsky A, Zaraisky A, Markelov M, Lukyanov S Fluorescent Proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* (1999) 17, 969
- Maurer E Analyse von Tumormausmodellen mittels dynamischer MRT und einer dedizierten Softwareplattform.
Dissertation Humanmedizin Marburg 2007
- Moats R, Ma L, Wayed R, Sugiura Y, Lazaryev A, Tyszka M, Jacobs R, Fraser S, Nelson M, DeClerck Y
Magnetic resonance imaging for the evaluation of a novel Metastatic orthotopic model of human neuroblastoma in immunodeficient mice. *Clin. Exper. Metastasis* (2001) 18, 455
- Nagel H, Blobel J, Brix G, Even K, Galanski M et al.
5 Jahre konzertierte Aktion Dosisreduktion CT.
Fortschr. Röntgenstr. (2004) 176, 1683-1694
- Paulus M, Sari-Sarrat H, Gleason S, Bobrek K, Hicks J, Johnson D, Behel J, Thompson L, Allen W A new X-ray computed tomography system for laboratory mouse imaging.
IEEE Trans. Nucl. Sci. (1999) 46, 558-564
- Paulus M, Gleason S, Kennel S, Hunsicker P, Johnson D
High resolution X-ray computed tomography: An emerging tool for small animal cancer research. *Neoplasia* (2000) 2, 62-70
- Patchen M, Macvittie T, Souza L Postirradiation treatment with granulocyte colony-stimulating factor and preirradiation WR-2721 administration synergize to enhance hematopoietic reconstruction and increase survival. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (1992) 22, 773-779

- Penka V, Lohmann W Kernmagnetische Resonanzspektroskopie in:
Biophysik Hoppe W, Lohmann W, Merkl H, Ziegler H
Verlag J Springer Berlin, Heidelberg, New York (1977) S.134-
140
- Petersen S, Rinck P, Müller R Magnetresonanzphänomene : NMR-Bildgebung
Relaxation, T1 Spin-Gitter-Relaxation in:
Rinck P, Petersen S, Müller R Magnetresonanz-Imaging und
Spektroskopie in der Medizin Verlag G. Thieme Stuttgart- New
York (1986) S. 2-10, 27-34.
- Peyruchaud O, Winding B, Pecheur I, Serre C, Delmas P, Clezardin P
Early detection of bone metastasis in a murine model using
fluorescent human breast cancer cells: application to the use of
the biphosphonate zoledronic acid in the treatment of osteolytic
lesions. J. Bone Miner. Res. (2001) 16, 2027
- Peyruchaud O, Serre C, NicAmhlaibh R, Fournier P, Clezardin P
Angiostatin inhibits bone metastasis formation in nude mice
through a direct anti-osteoclastic activity.
J. Biol. Chem. (2003) 278, 45826
- Prasher D, Eckenrode V, Ward W, Prendergast F, Cormier M
Primary structure of the Aequorea victoria green fluorescent
protein. Gene (1992) 111, 229
- Purcell E, Torrey H, Powel R Resonance absorption by nuclear magnetic
moments in a solid. Phys. Rev. (1946) 69, 37-43
- Raibe F Ambulante Erbringung des PET/CT beim nicht kleinzelligen
Bronchialkarzinom. Berlin Medical (2009) Heft 1
- Rice B, Cable M, Nelson M In vivo imaging of light-emitting probes.
J. Biomed. Optics (2001) 6, 432

- Sander B Über eine schnelle Mehrschicht- Gradienten Echo-sequenz für die cranielle Magnetresonanztomographie
Inaugural Dissertation FU Berlin 1998
- Sarkar S, Mattingly M, Kline T 9,4 T imaging studies of human tumor xenografts in nude mice. Invest. Radiol. (1988) 23, 677-679
- Sarkar S, Clark R, Rycyna R 9,4 T NMR-micro imaging studies of hepatic metastasis of human colorectal tumors in nude mice-
Magn. Resonance Med. (1989) 12, 268-273
- Soncek M, Vock P, Daepf M, Kalender W Spiral CT: Eine neue Technik für Volumenaufnahmen I Grundlagen und Methodik
II Klinische Anwendungsmöglichkeiten.
Röntgenpraxis (1990) 43, 323-330, 365-375
- Stein R, Govidan S, Matthes M Improved iodine radiolabels for monoclonal antibody therapy Cancer res. (2003) 63, 111-118
- Sato Y, Igarashi Y, Hakamata Y, Murakami T, Kaneko T, Takahashi M, Seo N, Kobayashi E Establishment of Alb-DsRed2 transgenic rat for liver regeneration research.
Biochem. Biophys. Res. commun. (2003) 311, 478
- Shaner N, Campbell R, Steinbach P, Giepmans B, Palmer A, Tsien R
Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. Red fluorescent protein.
Nat. Biotechnol. (2004) 22, 1567
- Struck HJ Statistik in: Struck, H.J. Experimentelle Medizin
Verlag G. Thieme Stuttgart (1973) S.28

- Stanziale S, Stiles B, Bhargava A, Kerns S, Kalakonda N, Fong Y
Oncolytic herpes simplex virus-1 mutant expressing green
fluorescent protein can detect and treat peritoneal cancer.
Hum. Gene Ther. (2004) 15, 600
- Stritzker J, Weibel S, Hill P, Oelschläger T, Goebel W, Szalay A,
Tumor-spezifische Kolonisation, Gewebeverteilung und Gen-
induktion durch probiotische E. coli Nissle 1917 in Mäusen.
J. med. Microbiol. (2007) 54, 151
- Subramanian S, Srienc F Quantitative analysis of transient gene expression
in mammalian cells using the green fluorescent protein.
J. Biotechnol. (1996) 49, 137
- Suhr H Anwendungen der kernmagnetischen Resonanzen in der
organischen Chemie Verlag: J. Springer Berlin-Heidelberg-
New York (1965)
- Tasetti V In vivo laser-induced fluorescence imaging of rat pancreatic
cancer with pheophorbide-a Photochem.
Photobiol. (1997) 65, 997
- Thurn P, Bücheler E Einführung in die Röntgendiagnostik 6. Auflage
G. Thieme Verlag 1979
- Troy T, Jekic-McMullen D, Sambucetti L, Rice B
Quantitative comparison of the sensitivity of detection of
fluorescent and bioluminescent reporters in animal models.
Molecular imaging (2004) 3, 9
- Tung CH, Bredow S, Mahmood U, Weissleder R
Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared
fluorescence probe for imaging Bioconjug. Chem. (1999)
10, 892

- Vintersten K, Monetti C, Gertsenstein M, Zhang P, Lazlo L, Biechele S,
Nagy A Mouse in red: Red fluorescent protein expression
in mouse ES cells, embryos and adult animals.
Genesis (2004) 40, 241
- Wegener O Ganzkörpercomputertomographie 2.Auflage Blackwell-Verlag
(1992)
- Wack S, Hajri A, Heisel F, Sowinska M, Berger C, Whelan M, Marescaux J,
Aprahamian M
Feasibility, Sensitivity, and Reliability of Laser-induced
Fluorescence Imaging of Green Fluorescent Protein-
Expressing Tumors in Vivo. *Molecular Ther.* (2003) 7, 765
- Wall M, Socolich M, Ranganathan R The structural basis for red
fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed.
Nat. Struct. Biol. (2000) 7, 1133
- Weber D, Ivanovic M, Franceschi D Pin-hole Spect: A new approach to in
vivo high resolution Spect imaging in small laboratory animals
J. Nucl. Med. (1994) 35, 342-348
- Weissleder R, Tung CH, Mahmood U, Bogdanov A
In vivo imaging of tumors with protease-activated near-
infrared fluorescent probes. *Nat. Biotechnol.* (1999) 17, 375
- Wilmann P, Petersen J, Devenish R, Prescott M, Rossjohn J
Variations on the GFP Chromophore: A polypeptide fragmen-
tation within the chromophore revealed in the 2,1-a crystal
structure of a nonfluorescent chromoprotein from *Anemonia*
sulcata. *J. Biol. Chem.* (2005) 280, 2401

- Wirrwar A, Schramm N, Vosberg H, Mueller-Gartner H
 High resolution Spect in small animal research
 Rev. Neurosciences (2001) 12, 187-193
- Wood WG Proteinbindungsmethoden
 In Greiling H, Gressner AM Lehrbuch der klinischen
 Chemie und Pathobiochemie. Verlg. Schattauer Stuttgart 1994
 3. Aufl. S. 159-171
- Yamashita T, Nabeshima Y, Noda M High resolution micro computer
 tomography analyses of the abnormal trabecula bone
 structures in Klotho gene mutant mice J. Endocrinology
 (2000) 164, 239-245
- Yang M, Baranov E, Jiang P, Sun F, Li X, Li L, Hasegawa S, Bouvet M,
 Al-Tuwaijri M, Chishima T, Shimada H, Moossa A, Penman S,
 Hoffman R Whole-body optical imaging of
 green fluorescent protein-expressing tumors and metastases.
 Proc. Natl. Acad. Sci. (2000) 97, 1206
- Yang M, Baranov E, Moossa A, Penman S, Hoffman R
 Visualizing gene expression by whole-body fluorescence
 imaging. Proc. Natl. Acad. Sci. (2000a) 97, 1278
- Yang M, Baranov E, Wang J, Jiang P, Wang X, Sun F, Bouvet M, Moossa A,
 Penman S, Hoffman R
 Direct external imaging of nascent cancer, tumor progression,
 angiogenesis, and metastasis on internal organs in the
 fluorescent orthotopic model. Proc. Natl. Acad
 Sci. (2000) 99, 3824

- Yang M, Baranov E, Li XM, Wang J, Jiang P, Li L, Moossa A, Penman S, Hoffman R Whole- body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. (2001) 98, 2616
- Yang M, Li L, Jiang P, Moossa A, Penman S, Hoffman R Dual-color fluorescence imaging distinguishes tumor cells from induced host angiogenic vessels and stromal cells Proc. Natl. Acad. Sci. (2003) 100, 14259
- Yu Y, Amala A, Barrio J, Toyokuni T, Satyamurthy N, Namavari M, Cherry S, Phelps M, Herschman H, Gambhir S Quantification of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals. Nat. Med. (2000) 6, 933-937
- Yu Y, Shabahang S, Timiryasova T, Zhang Q, Beltz R, Gentschev I, Goebel W, Scalay A Visualisation of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light emitting proteins. Nat. Biotechnology (2004) 22, 313-320
- Zhao M, Yang M, Li XM, Jiang P, Baranov E, Li S, Penman S, Hoffman R Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP expressing *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. (2005) 102, 755-760
- Zhu X, LI K, Kamaly-asl I, Checkley D, Tessier J, Waterton J Quantification of endothelial permeability, leakage space and blood volume in brain tumors using combined T1 and T2 contrast enhanced dynamic MR-imaging. J. Magn. Resonance Imaging (2000) 11, 575-585

9 Anhang: Tabellen

Berechnete Tumorparameter bei Maus 1 DsRed

Tage Nach Impfung	Photonenvolumen- dichte des Tumors $\Delta Tc / \mu l$ MRT Vol	Tumorphotonendichte/ μl MRT-Volumen	$\sqrt{\text{Tumorpixelfläche =}}$ Tumorhöhe mm	Tumorpixel-fläche mm ²	μl Tumolvolumen Pixel-Wurzelmethode
30	45913	900	6,2	39	126
34	31932	363	7,2	52	195
37	27447	254	7,7	59	236
40	14796	86	7,9	63	259
42	15740	79	8,2	68	290
44	18828	88	8,9	79	366
47	17171	59	8,9	80	370
49	19025	59	9,5	90	445
61	19575	48	9,7	94	459
64	21653	46	10,6	113	623
68	20843	37	11,2	126	734
71	20174	34	11,2	125	728
75	20195	31	11,5	132	789
78	20708	27	11,9	142	879
84	19166	20	12,6	160	1048

$$\text{mm}^2 \text{ Tumorpixelfläche} = \text{Pixelzahl} \times 0,059382 \text{ mm}^2(\text{EF})$$

$$\mu l \text{ Tumolvolumen} = \text{mm}^2 \text{ Pixelfläche} \times \text{mm} \sqrt{\text{Pixelfläche}} \times (0,52)$$

Tab. 1

Berechnete Tumorparameter bei Maus 2 DsRed

Tage Nach Impfung	Photonenvolumen- dichte des Tumors $\Delta Tc / \mu l$ MRT Vol	Tumorphotonendichte/ μl MRT-Volumen ($\times 10^{-2}$)	$\sqrt{\text{Tumorpixelfläche =}}$ Tumorhöhe mm	Tumorpixel-fläche mm ²	μl Tumolvolumen Pixel-Wurzelmethode
29	153	105	6,1	37	117
32	39	20	6,5	42	142
36	32	11	7,9	62	255
39	32	10	8,2	68	290
42	34	9	8,2	67	286
45	38	9	8,6	74	331
49	80	18	8,9	80	370

$$\text{mm}^2 \text{ Tumorpixelfläche} = \text{Pixelzahl} \times 0,059382 \text{ mm}^2(\text{EF})$$

$$\mu l \text{ Tumolvolumen} = \text{mm}^2 \text{ Pixelfläche} \times \text{mm} \sqrt{\text{Pixelfläche}} \times (0,52)$$

Tab. 2

Berechnete Tumorparameter bei Maus 3 DsRed

Tage Nach Impfung	Photonenvolumen- dichte des Tumors $\Delta Tc / \mu l$ MRT Vol	Tumorphotonendichte/ μl MRT-Volumen ($\times 10^{-2}$)	$\sqrt{\text{Tumorpixelfläche =}}$ Tumorhöhe mm	Tumorpixel-fläche mm ²	μl Tumolvolumen Pixel-Wurzelmethode
29	80	25	9,7	94	474
32	29	7	11,1	124	716
36	19	3	11,7	136	827
39	14	2	12,3	151	966
42	12	1	12,6	160	1048
45	13	1	12,8	163	1085
49	14	1	13,7	187	1332
52	16	1	14,2	203	1499
58	39	2	14,6	212	1610

$$\text{mm}^2 \text{ Tumorpixelfläche} = \text{Pixelzahl} \times 0,059382 \text{ mm}^2(\text{EF})$$

$$\mu l \text{ Tumolvolumen} = \text{mm}^2 \text{ Pixelfläche} \times \text{mm} \sqrt{\text{Pixelfläche}} \times (0,52)$$

Tab. 3

Berechnete Tumorparameter bei Maus 1 GFP

Tage Nach Impfung	Photonenvolumen- dichte des Tumors $\Delta Tc / \mu l$ MRT Vol	Tumorphotonendichte/ μl MRT-Volumen (10^{-2})	$\sqrt{\text{Tumorpixelfläche}} =$ Tumorhöhe mm	Tumorpixel-fläche mm^2	μl Tumolvolumen Pixel-Wurzelmethode
23	8	10	5,6	31	90
26	6	6	7,3	54	205
28	4	3	7,1	50	185
30	4	2	8,1	66	278
34	3	1	9,8	96	489
37	3	1	10,4	108	584
40	4	1	10,7	114	634
42	3	1	11,2	125	728
44	6	1	12,0	145	905
47	7	1	12,0	144	899
49	12	1	12,2	150	952
61	89	6	14,7	216	1651
64	113	7	14,8	220	1693
68	148	7	15,3	234	1862
71	187	8	16,0	256	2130
75	178	7	16,1	259	2168
78	178	6	16,6	276	2382
84	197	5	17,9	320	2979
89	186	4	19,2	367	3664
92	194	4	20,3	412	4349
96	197	4	21,0	440	4805
99	182	3	21,5	463	5176

$$\text{mm}^2 \text{ Tumorpixelfläche} = \text{Pixelzahl} \times 0,059382 \text{ mm}^2(\text{EF})$$

$$\mu l \text{ Tumolvolumen} = \text{mm}^2 \text{ Pixelfläche} \times \text{mm} \sqrt{\text{Pixelfläche}} \times (0,52)$$

Tab. 4

Berechnete Tumorparameter bei Maus 2 GFP

Tage Nach Impfung	Photonenvolumen- dichte des Tumors $\Delta Tc / \mu l$ MRT Vol	Tumorphotonendichte/ μl MRT-Volumen (10^{-2})	$\sqrt{\text{Tumorpixelfläche}} =$ Tumorhöhe mm	Tumorpixel-fläche mm^2	μl Tumolvolumen Pixel-Wurzelmethode
22	71	221	4,5	20	47
25	43	78	4,5	20	47
35	19	14	5,6	31	90
38	12	7	6,1	37	117
42	7	3	6,9	47	169
45	4	1	7,1	51	188
59	3	0,5	8,3	69	298
65	3	0,5	8,5	72	318

$$\text{mm}^2 \text{ Tumorpixelfläche} = \text{Pixelzahl} \times 0,059382 \text{ mm}^2(\text{EF})$$

$$\mu l \text{ Tumolvolumen} = \text{mm}^2 \text{ Pixelfläche} \times \text{mm} \sqrt{\text{Pixelfläche}} \times (0,52)$$

Tab. 5

Berechnete Tumorparameter bei Maus 3 GFP

Tage Nach Impfung	Photonenvolumen- dichte des Tumors $\Delta Tc / \mu l$ MRT Vol	Tumorphotonendichte/ μl MRT-Volumen (10^{-2})	$\sqrt{\text{Tumorpixelfläche}} =$ Tumorhöhe mm	Tumorpixel-fläche mm^2	μl Tumolvolumen Pixel-Wurzelmethode
22	113	221	4,8	23	57
25	97	150	5,0	25	65
35	47	32	5,5	30	86
38	27	14	5,8	34	103
42	14	6	6,6	43	148

$$\text{mm}^2 \text{ Tumorpixelfläche} = \text{Pixelzahl} \times 0,059382 \text{ mm}^2(\text{EF})$$

$$\mu l \text{ Tumolvolumen} = \text{mm}^2 \text{ Pixelfläche} \times \text{mm} \sqrt{\text{Pixelfläche}} \times (0,52)$$

Tab. 6

Berechnete Tumorparameter bei Maus 4 GFP

Tage Nach Impfung	Photonenvolumen- dichte des Tumors $\Delta Tc / \mu l$ MRT Vol	Tumorphotonendichte/ μl MRT-Volumen (10^{-2})	$\sqrt{\text{Tumorpixelfläche}} =$ Tumorhöhe mm	Tumorpixel-fläche mm ²	μl Tumorumen Pixel-Wurzelmethode
22	71	160	4,9	24	61
25	54	91	5,0	25	65
35	61	79	5,7	33	98
38	49	43	6,2	39	126

mm² Tumorpixelfläche = Pixelzahl x 0,059382 mm²(EF)
 μl Tumorumen = mm² Pixelfläche x mm $\sqrt{\text{Pixelfläche}}$ x (0,52)

Tab.7

Berechnete Tumorparameter bei Maus 5 GFP

Tage Nach Impfung	Photonenvolumen- dichte des Tumors $\Delta Tc / \mu l$ MRT Vol	Tumorphotonendichte/ μl MRT-Volumen (10^{-2})	$\sqrt{\text{Tumorpixelfläche}} =$ Tumorhöhe mm	Tumorpixel-fläche mm ²	μl Tumorumen Pixel-Wurzelmethode
22	40	97	5,5	30	86
25	25	46	5,7	32	95
35	40	46	6,3	39	128

mm² Tumorpixelfläche = Pixelzahl x 0,059382 mm²(EF)
 μl Tumorumen = mm² Pixelfläche x mm $\sqrt{\text{Pixelfläche}}$ x (0,52)

Tab.8

Gemessene Tumorparameter bei Maus 1 DsRed

Tage nach Impfung	Tumorphotonenemission ΔTc	μl Tumorumen nach Caliper $L \times B^2 \times 0,52$	Pixelzahl P	μl Tumor MRT Vol.
30	2341552	201,0	660	51
34	2810015	223,0	870	88
37	2964246	212,0	990	108
40	2559662	260,0	1057	173
42	3132340	362,0	1148	199
44	4029262	382,0	1331	214
47	5013923	426,0	1357	292
49	6087867	451,0	1510	320
61	7986688	614,0	1583	408
64	10220209	643,0	1909	472
68	11734462	773,0	2130	563
71	11983233	915,0	2105	594
75	12964993	1114,0	2234	642
78	15614096	1210,0	2402	754
84	18705659	1341,0	2691	976

Tab. 10

Gemessene Tumorparameter bei Maus 2 DsRed

Tage nach Impfung	Tumorphotonenemission ΔTc	μl Tumorumen nach Caliper $L \times B^2 \times 0,52$	Pixelzahl P	μl Tumor MRT Vol.
29	22126	216	633	145
32	7565	284	709	196
36	9050	382	1039	282
39	10389	486	1152	325
42	13274	463	1120	389
45	16215	521	1256	422
49	36048	902	1354	451

Tab. 11

Gemessene Tumorparameter bei Maus 3 DsRed

Tage nach Impfung	Tumorphotonenemission ΔTc	μl Tumolvolumen nach Caliper $LxB^2 \times 0,52$	Pixelzahl	P	μl Tumor MRT Vol.
29	25401	344		1579	317
32	12346	501		2075	428
36	11225	710		2287	601
39	10740	838		2559	759
42	10633	1074		2684	888
45	15709	1333		2739	1194
49	20159	1563		3159	1462
52	30888	1984		3423	1884
58	77593	2390		3584	1986

Tab. 12

Gemessene Tumorparameter bei Maus 1 GFP

Tage nach Impfung	Tumorphotonenemission ΔTc	μl Tumolvolumen nach Caliper $LxB^2 \times 0,52$	Pixelzahl	P	μl Tumor MRT Vol.
23	562	210		522	74
26	595	293		911	103
28	547	334		846	127
30	680	394		1106	167
34	855	899		1619	344
37	1213	861		1828	407
40	1781	1401		1924	501
42	1746	1529		2099	536
44	4145	1568		2445	651
47	5839	1693		2425	835
49	11248	1893		2534	938
61	143411	2318		3655	1609
64	192681	2450		3722	1708
68	302234	2849		3940	2036
71	424560	2898		4318	2273
75	469069	3537		4363	2638
78	546841	4168		4646	3080
84	712956	4475		5405	3625
89	824754	5421		6175	4446
92	903355	5983		6948	4651
96	1042463	6412		7408	5302
99	1096212	7144		7800	6009

Tab. 13

Gemessene Tumorparameter bei Maus 2 GFP

Tage nach Impfung	Tumorphotonenemission ΔTc	μl Tumolvolumen nach Caliper $LxB^2 \times 0,52$	Pixelzahl	P	μl Tumor MRT Vol.
22	2258	46		322	32
25	2350	75		323	55
35	2602	262		517	137
38	2253	333		623	186
42	1930	374		792	260
45	1202	538		858	325
59	1392	802		1157	551
65	1725	861		1215	597

Tab. 14

Gemessene Tumorparameter bei Maus 3 GFP

Tage nach Impfung	Tumorphotonenemission ΔTc	μl Tumolvolumen nach Caliper $LxB^2 \times 0,52$	Pixelzahl	P	μl Tumor MRT Vol.
22	5760	114		389	51
25	6323	126		412	65
35	6867	234		512	146
38	4851	400		574	183
42	3103	489		721	220

Tab. 15

Gemessene Tumorparameter bei Maus 4 GFP

Tage nach Impfung	Tumorphotonenemission ΔTc	μl Tumolvolumen nach Caliper $LxB^2 \times 0,52$	Pixelzahl P	μl Tumor MRT Vol.
22	3102	103	406	44
25	3157	99	425	59
35	4711	125	554	77
38	5445	150	661	112

Tab. 16

Gemessene Tumorparameter bei Maus 5 GFP

Tage nach Impfung	Tumorphotonenemission ΔTc	μl Tumolvolumen nach Caliper $LxB^2 \times 0,52$	Pixelzahl P	μl Tumor MRT Vol.
22	1638	91	506	41
25	1350	94	535	54
35	3505	232	665	87

Tab. 17

Prozentuale Abweichungen der nach der Pixelwurzelmethode und Calipermethode gemessenen Tumolvolumina von den MRT-Volumina					
Maus GFP 1					
Tage nach Impfung	μl Tumor MRT Vol.	μl Tumolvolumen Pixel-Wurzelmethode	% Abweichung zum MRT-Volumen	μl Tumolvolumen nach Caliper $LxB^2 \times 0,52$	% Abweichung zum MRT-Volumen
23	74	90	22	210	184
26	103	205	99	293	184
28	127	185	46	334	163
30	167	278	66	394	136
34	344	489	42	899	161
37	407	584	43	861	112
40	501	634	27	1401	180
42	536	728	36	1529	185
44	651	905	39	1568	141
47	835	899	8	1693	103
49	938	952	2	1893	102
61	1609	1651	3	2318	44
64	1708	1693	-1	2450	43
68	2036	1862	-9	2849	40
71	2273	2130	-6	2898	27
75	2638	2168	-18	3537	34
78	3080	2382	-23	4168	35
84	3625	2979	-18	4475	23
89	4446	3664	-18	5421	22
92	4651	4349	-6	5983	29
96	5302	4805	-9	6412	21
99	6009	5176	-14	7144	19

Tab. 21a

Prozentuale Abweichungen der nach der Pixelwurzelmethode und Calipermethode gemessenen Tumorumfänge von den MRT-Volumina					
Maus GFP 2					
Tage nach Impfung	μl Tumor MRT Vol.	μl Tumorumfang Pixel-Wurzelmethode	% Abweichung zum MRT-Volumen	μl Tumorumfang nach Caliper $L \times B^2 \times 0,52$	% Abweichung zum MRT-Volumen
22	32	47	47	46	44
25	55	47	-15	75	36
35	137	90	-34	262	91
38	186	117	-37	333	79
42	260	169	-35	374	44
45	325	188	-42	538	66
59	551	298	-45	802	46
65	597	318	-47	861	44

Tab. 21b

Prozentuale Abweichungen der nach der Pixelwurzelmethode und Calipermethode gemessenen Tumorumfänge von den MRT-Volumina					
Maus GFP 3					
Tage nach Impfung	μl Tumor MRT Vol.	μl Tumorumfang Pixel-Wurzelmethode	% Abweichung zum MRT-Volumen	μl Tumorumfang nach Caliper $L \times B^2 \times 0,52$	% Abweichung zum MRT-Volumen
22	51	57	12	114	124
25	65	65	0	126	94
35	146	86	-41	234	60
38	183	103	-44	400	119
42	220	148	-33	489	122

Tab. 21c

Prozentuale Abweichungen der nach der Pixelwurzelmethode und Calipermethode gemessenen Tumorumfänge von den MRT-Volumina					
Maus GFP 4					
Tage nach Impfung	μl Tumor MRT Vol.	μl Tumorumfang Pixel-Wurzelmethode	% Abweichung zum MRT-Volumen	μl Tumorumfang nach Caliper $L \times B^2 \times 0,52$	% Abweichung zum MRT-Volumen
22	44	61	41	103	134
25	59	65	10	99	68
35	77	98	27	125	62
38	112	126	13	150	34

Tab. 21d

Prozentuale Abweichungen der nach der Pixelwurzelmethode und Calipermethode gemessenen Tumorumfänge von den MRT-Volumina					
Maus GFP 5					
Tage nach Impfung	μl Tumor MRT Vol.	μl Tumorumfang Pixel-Wurzelmethode	% Abweichung zum MRT-Volumen	μl Tumorumfang nach Caliper $L \times B^2 \times 0,52$	% Abweichung zum MRT-Volumen
22	41	86	110	91	122
25	54	95	76	94	74
35	87	128	48	232	167

Tab. 21e

Prozentuale Abweichungen der nach der Pixelwurzelmethode und Calipermethode gemessenen Tumorumfänge von den MRT-Volumina					
Maus DsRed 1					
Tage Nach Impfung	μl Tumor MRT Vol.	μl Tumorumfang Pixel-Wurzelmethode	% Abweichung zum MRT-Volumen	μl Tumorumfang nach Caliper $L \times B^2 \times 0,52$	% Abweichung zum MRT-Volumen
30	51	126	147	201	294
34	88	195	122	223	153
37	108	236	119	212	96
40	173	259	49	260	50
42	199	290	46	362	82
44	214	366	71	382	79
47	292	370	27	426	46
49	320	445	39	451	41
61	408	459	13	614	51
64	472	623	32	643	36
68	563	734	30	773	37
71	594	728	23	915	54
75	642	789	23	1114	74
78	754	879	17	1210	60
84	976	1048	7	1341	37

Tab. 21f

Prozentuale Abweichungen der nach der Pixelwurzelmethode und Calipermethode gemessenen Tumorumfänge von den MRT-Volumina					
Maus DsRed 2					
Tage nach Impfung	μl Tumor MRT Vol.	μl Tumorumfang Pixel-Wurzelmethode	% Abweichung zum MRT-Volumen	μl Tumorumfang nach Caliper $L \times B^2 \times 0,52$	% Abweichung zum MRT-Volumen
29	145	117	-19	216	49
32	196	142	-28	284	47
36	282	255	-10	382	35
39	325	290	-11	486	50
42	389	286	-26	463	19
45	422	331	-22	521	23
49	451	370	-18	902	100

Tab. 21g

Prozentuale Abweichungen der nach der Pixelwurzelmethode und Calipermethode gemessenen Tumorumfänge von den MRT-Volumina					
Maus DsRed 3					
Tage nach Impfung	μl Tumor MRT Vol.	μl Tumorumfang Pixel-Wurzelmethode	% Abweichung zum MRT-Volumen	μl Tumorumfang nach Caliper $L \times B^2 \times 0,52$	% Abweichung zum MRT-Volumen
29	317	474	50	344	9
32	428	716	67	501	17
36	601	827	38	710	18
39	759	966	27	838	10
42	888	1048	18	1074	21
45	1194	1085	-9	1333	12
49	1462	1332	-10	1563	7
52	1884	1499	-20	1984	5
58	1986	1610	-19	2390	20

Tab. 21h

10 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Alfke, Aumüller, Basler, Baum, Behr, Berger, Bien, Boudriot, Cetin, Czubayko, Daubt, Donner-Banzhoff, Eilers, El-Sheik, Feuge, Gerdes, Görg, Gotzen, Gress, Grundmann, Gudermann, Grzeschik, Hasilik, Herrmann-Lingen, Hilt, Höffken, Hoyer, Jungclas, Kalinowski, Kill, Klenk, Klose, Koolman, Krause, Krieg, Kroll, Krones, Kuhlmann, Lang, Lenz, Leonardt, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Löw, Maier, Maisch, Mandrek, Mittag, Moll, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Plant, Rausch, Remschmidt, Renz, del Rey, Richter, Röhm, Rommelfanger, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schneider, Schrader, Seitz, Steiniger, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Weiler, Wennemuth, Werner, Westermann, Wulf

11 Lebenslauf Stephan Mario Dulce

geb. 15.03.1979 in Berlin Wilmersdorf

- | | |
|--------------|--|
| 1984-91 | Katholische Grundschule St. Alfons in Berlin Lankwitz |
| 1991-98 | Otto-Lilienthal Gymnasium in Berlin Lichterfelde, Abschluß Abitur 1998 |
| 7/98 – 4/99 | Wehrdienst beim Panzerartilleriebataillon 425 in Lehnitz |
| 1998-2001 | Fernstudium der Betriebswirtschaftslehre an der Universität Hagen |
| 11/99 | Krankenpflegepraktikum in der Unfall- und Wiederherstellungs-Chirurgie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der FU Berlin |
| 01/00-03/00 | Praktikum in der Neurochirurgie des „Oklahoma Spine Hospital“ in Oklahoma City |
| 05/00- 06/07 | Studium Humanmedizin an der Philippsuniversität Marburg, Physikum ´02, 1.Staatsexamen ´03, 2. Staatsexamen ´05 und 3. Staatsexamen ´07 |

- 02/03-03/03 Famulatur in der Abteilung für Allgemein- und Gefäßchirurgie des St. Franziskus Krankenhauses in Berlin
- 02/04- 03/04 Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin des St. Franziskus Krankenhauses in Berlin
- 07/04- 08/04 Famulatur in der Abteilung für Strahlendiagnostik des Uniklinikums Marburg
- 09/04- 09/04 Famulatur in der Kinder- und Allgemeinarztpraxis von Dr. Eckerhard Lenz in Berlin Lichtenrade
- 10/05- 06/07 Praktisches Jahr in den Abteilungen
Strahlendiagnostik des Uniklinikums Marburg
Innere Medizin des Krankenhauses Brixen in Südtirol
Innere Medizin des Uniklinikums Marburg

Allgemein-, Visceral- und Unfallchirurgie, sowie der Gefäßchirurgie der Asklepios Stadtklinik in Bad Wildungen

07/07-06/09 Assistenzarzt der Allgemein-, Visceral- und Unfallchirurgie der Asklepios Stadtklinik in Bad Wildungen (Basischirurgie - Common Trunk)

seit 01.07.2009 Assistenzarzt der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie im DRK Klinikum Westend in Berlin

12 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Alfke für die Überlassung des Themas, die Einarbeitung und Betreuung der Arbeit, sowie Herrn Prof. Dr. K.-J. Klose für wertvolle Ratschläge zur Abfassung der Arbeit. Herrn Prof. Dr. A. Pagenstecher danke ich für die Anfertigung der Histologischen Präparate, sowie Prof. Dr. H. Stein vom Institut für Pathologie der Charité Berlin im Klinikum Benjamin Franklin für die Digitalisierung und Befundung. Weiterhin danke ich Herrn Dr. M. Behe von der Klinik für Nuklearmedizin der Philippsuniversität Marburg und Herrn Boris Keil von der Klinik für Strahlendiagnostik für ihre Unterstützung und Ratschläge bei der Durchführung der Versuche. Frau Beate Kleb danke ich für die Aufarbeitung des Zellmaterials und für die Hilfe bei den Untersuchungen. Schließlich bin ich Frau Dr. Schüttrichkeit von der Firma Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH in Herrsching zu Dank verbunden für das Entgegenkommen, dass ich einzelne Abbildungen aus dem Manual der CCD-Kamera übernehmen durfte. Die mit Fluoreszenzproteinen geklonten Melanomzellen wurden mir freundlicher Weise von der Klinik für Strahlendiagnostik der Universität Marburg tiefgefroren zur Verfügung gestellt.

13 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Korrelation des Fluoreszenzsignals von Xenografttumoren mit der MRT-Volumetrie“

in der Klinik für Strahlendiagnostik unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Alfke ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift