

Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie

Evaluierung eines neuartigen Fucosidase Tumor
Seneszenz-spezifischen Tracers für die Positronen-
Emissions-Tomographie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Trautwein, Nils Florian

2022

Dekan: Professor Dr. B Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. J. Pichler

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Huber

Tag der Disputation: 24.11.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Krebs	11
1.2	Tumorentstehung	11
1.3	Zellzyklus	12
1.3.1	Zellzyklus-Regulation	14
1.3.2	Zellzyklusstopp	15
1.4	Seneszenz	17
1.4.1	Induktionsarten von zellulärer Seneszenz	17
1.4.2	Replikative Seneszenz (RIS)	18
1.4.3	DNA Schädigung Antwort (DDR)	18
1.4.4	Therapie-induzierte Seneszenz (TIS)	19
1.4.5	Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS)	19
1.4.6	Immunoseneszenz	20
1.5	Seneszenz-assoziierte Veränderungen	20
1.5.1	Veränderungen des Metabolismus durch Seneszenz	21
1.5.2	Seneszenz-assoziiierter Sekretorischer Phänotyp (SASP)	22
1.6	Klinische Anwendung	22
1.7	Detektionsmöglichkeiten	24
1.8	α -Fucosidase und Fucosylierung	24
1.9	Medizinische Bildgebung	25
1.9.1	Tracer	26
1.9.2	Positronen-Emissions-Tomographie (PET)	26
1.9.3	Magnetresonanztomographie	27

1.10	Fragestellung	28
2	Material und Methoden	30
2.1	Material und Geräte.....	30
2.2	Radiotracer	41
2.2.1	Tracerproduktion.....	41
2.2.2	[18F]FDG.....	41
2.2.3	[18F]FEFuc und [18F]FpyGal.....	41
2.2.4	Tracerstabilität	42
2.3	Kultivierung von Zellen.....	42
2.3.1	Kultivierung von humanen HCT116-Zellen	43
2.3.2	Kultivierung von murinen HRas-Zellen	43
2.3.3	Kultivierung von murinen NRas-Zellen und AMp19-Zellen	43
2.3.4	Kultivierung von humanen U-87 MG-Zellen.....	43
2.3.5	Kultivierung von murinen CT26-Zellen	44
2.4	Seneszenzinduktion	44
2.4.1	Seneszenzinduktion in humanen HCT116-Zellen	44
2.4.2	Seneszenzinduktion in murinen HRas-Zellen	44
2.4.3	Seneszenzinduktion bei murinen NRas- und AMp19-Zellen	44
2.5	Expression von Komponenten des Fucosemetabolismus	44
2.5.1	Real-time-quantitative-Polymerasekettenreaktion	44
2.5.2	Bicinchoninic acid Assay (BCA-Assay)	46
2.5.3	Western Blot Analyse	46
2.6	<i>In vitro</i> Tracer-Validierung.....	48
2.6.1	<i>In vitro</i> Up-Take Mechanismus.....	48
2.7	<i>In vivo</i> Tracer-Validierung	48

2.7.1	PET.....	48
2.7.2	MRT	49
2.8	Tiermodelle.....	49
2.8.1	Rahmenbedingungen	49
2.8.2	Vorbereitung der Mäuse für PET und MRT	49
2.8.3	Tiermodelle	50
2.8.4	<i>Ex vivo</i> Tumorschnittbildgebung	54
2.9	Datenanalyse	54
2.9.1	Gamma-Counter-Analyse	54
2.9.2	PET- und MRT-Datenanalyse	55
2.9.3	Autoradiographie-Analyse.....	55
2.9.4	Analyse der H&E-Schnitte	55
2.10	Statistische Auswertung.....	56
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Mikroskopie seneszenten Zellen	57
3.2	Expression des Fucose-Metabolismus.....	57
3.2.1	Fucose-Metabolismus auf mRNA Ebene	57
3.2.2	Fucosidase-Metabolismus auf Proteinebene	58
3.2.3	GLUT1-Expression auf Proteinebene.....	60
3.3	<i>In vitro</i> Tracer Up-Take.....	61
3.3.1	[¹⁸ F]FEFuc-Tracer	61
3.3.2	[¹⁸ F]FEFuc-Tracer Mechanismus.....	65
3.3.3	[¹⁸ F]FDG	66
3.3.4	[¹⁸ F]FpyGal.....	67
3.4	<i>In vivo</i> [¹⁸F]FEFuc-Evaluation	68

3.4.1	Tracerstabilität	69
3.4.2	PET/MRT <i>in vivo</i> Messung bei HCT116-Tumoren	71
3.4.3	PET/MRT <i>in vivo</i> Messung bei HCT116-Fuca-Tumoren	73
3.4.4	PET/MRT <i>in vivo</i> Messung bei HRas-Tumoren	75
3.4.5	PET/MRT <i>in vivo</i> Messung bei NRas-Tumoren	78
3.4.6	PET/MRT <i>in vivo</i> Messung bei AMp19-Tumoren.....	80
4	<i>Diskussion</i>	82
4.1	Klinische Relevanz der Seneszenzdetektion <i>in vivo</i>	85
4.2	Weitere Anwendungsmöglichkeiten des [¹⁸ F]FEFuc-Tracers.....	86
4.3	Vergleich des [¹⁸ F]FpyGal-Tracers mit dem [¹⁸ F]FEFuc-Tracer	88
4.4	Seneszenzdetektion <i>in vivo</i>	88
4.5	Ausblick	89
5	<i>Zusammenfassung</i>	90
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	92
7	<i>Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift</i>	103
8	<i>Danksagung</i>	104

Abkürzungsverzeichnis:

Abkürzung:	Vollständige Bezeichnung:
μCi	Mikrocurie
μl	Mikroliter
α	Alpha
AB263	Bcl-2 Inhibitor
AMp19	Akt, Myc, p19Arf ^{-/-}
AP20187	Ligand zur Induktion von Homodimerisierung, Senolytika
AR	Autoradiographie
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
β	Beta
BCA	Bicinchoninic acid Assay
Bcl-2	„B-Cell Lymphoma“ 2
Bq	Becquerel
BRAF	B rapidly accelerated fibrosarcoma
BSA	Rinderserumalbumin
C	Kohlenstoff
CDK	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	Komplementär DNA
CD8	CD8-Rezeptor
Ci	Curie
Cip	CDK-interagierenden Protein
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CX-5461	RNA-Polymerase I
DDR	DNA-Schädigung
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
Doxo	Doxorubicin
Doxy	Doxycyclin
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
E2F-1	Familie von Transkriptionsfaktoren
eV	Elektronenvolt
F	Fluor
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GLUT	Glucosetransporter
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-Kolonien-stimulierender Faktor

H	Wasserstoff
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HRas	RT3GEPiRshp53; pWZLHrasV12
IL	Interleukin
i. p.	Intra peritoneal
INK4	Inhibitoren von CDK4
IS	Immunoseneszenz
i. v.	Intra venös
IVC	Individuell ventilierte Käfige
k	Kilo
kg	Kilogramm
l	Liter
LOR	Line of response
m	Meter
M	Mol
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mdm2	mouse double minute 2 homolog
mHz	Milli Hertz
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRN	MRE11-RAD50-NBS1 Komplex
mRNA	Boten Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
mT	milli Tesla
mTOR	„Mammalian target of Rapamycin“
Na	Natrium
NEA	Nicht essentielle Aminosäuren
NF-kB	nuklear factor, „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nano Mol
NRas	Nras ^{G12V}
O ₂	Sauerstoff
OIS	Onkogen-induzierte-Seneszenz
P	Phosphat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIS	Penicilin/Streptomycin
PI3K	Phosphoinositidkinase 3
p15	CDK-Inhibitor 2B
p16	CDK-Inhibitor 2

p18	CDK-Inhibitor 2C
p19	CDK-Inhibitor 2D
p21	CDK-Inhibitor 1
p27	CDK-Inhibitor 1B
p53	Tumorsuppressor p53
p57	CDK-Inhibitor 1C
qPCR	Real time Quantitative Polymerasekettenreaktion
RAF	Rasch beschleunigtes Fibrosarkom Protein
RAS	Ratten Sarkom, Protoonkogen
RB	Retinoblastomprotein
RCIS	Ribosomale Checkpoint induzierte Seneszenz
RIS	Replikative Seneszenz
RNA	Ribonukleinsäure
SASP	Seneszenz-assoziiertes-sekretorisches-Phänotyp
s. c.	subcutan
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
T	Tesla
TBST	Tris-buffered Saline mit Tween
TC	Technetium
TIS	Therapie-induzierte-Seneszenz
TMR	Tumor-Muskel-Ratio
V	Volt
VOI	„Volume of interest“

1 Einleitung

1.1 Krebs

In der Allgemeinbevölkerung ist das Wort „Krebs“ oder „Tumor“ mit schlechten Nachrichten assoziiert. Zumeist ist nur bekannt, dass sich bösartige Zellen vervielfältigen. Im klinischen Alltag prägen diese Krankheitsbilder ganze Abteilungen und Stationen. Die interdisziplinären Tumorkonferenzen sind kaum noch aus den Krankenhäusern wegzudenken. Sie ermöglichen eine umfassende Diagnostik und bestmögliche Therapien.

Trotz der großen Fortschritte in der Forschung steigt die Zahl der Krebserkrankungen weiterhin an. Dies ist nicht zuletzt der demographischen Entwicklung geschuldet, bei der der Anteil der Älteren stark zunimmt. (Brussig 2015) Über viele Jahre der Forschung hat sich die klinische Behandlung von Tumoren stark personalisiert. Dabei sind neue Formen der Diagnostik und der Therapie entstanden. Diese Arbeit beschäftigt sich mit neuen Methoden zur Diagnostik und bildgebend gestützter Therapie.

1.2 Tumorentstehung

Physiologische Zellen entarten zu Krebszellen, zumeist durch Mutationen von Desoxyribonukleinsäuren (DNA). Diese Mutationen betreffen häufig mindestens eine der folgenden Gengruppen: Tumorsuppressor, Onkogene oder DNA-Reparatursysteme.

Die Tumorsuppressorproteine haben normalerweise ihre Funktion in der Zellzykluskontrolle. Bei ihnen kommt es durch eine „Loss-of-function“-Mutation zu einem unkontrollierten Zellzyklusablauf. (Wang, Han et al. 2006) In diesem entarten die Zellen zu malignen Tumorzellen. Zu den bekanntesten Tumorsuppressoren gehören p53, p27, p16 und pRB. (Al-Mohanna, Manogaran

et al. 2004, Zilfou and Lowe 2009, Manning and Dyson 2011, Currier, Kolb et al. 2019)

Onkogene dagegen sind Gene, die häufig durch eine „Gain-of-function“-Mutation aktiviert werden. (Giordano and Lee 2006) Durch eine Überstimulation kommt es zu einem verstärkten Zellwachstum. Die bekanntesten Onkogene sind EGFR und BRAF. (Pines, Kostler et al. 2010, Gopal, Sarihan et al. 2019)

Zu dem DNA-Reparatursystem gehört eine größere Gruppe Proteine. Ihre Hauptfunktion ist die Detektion und Reparatur von Schäden in der DNA. Dabei stehen sie in Wechselwirkung mit den Tumorsuppressoren. Durch eine Mutation in diesem System können sich Zellen mit geschädigter DNA weiterteilen. (Jackson and Bartek 2009, Torgovnick and Schumacher 2015, Ma, Setton et al. 2018)

In allen Bereichen kommt es durch die Mutationen zu einem unkontrollierten Ablauf des Zellzyklus. Daher wird auf den Zellzyklus im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

1.3 Zellzyklus

Der Zellzyklus ist ein fundamentaler Prozess, der die Proliferation, die DNA-Reparatur und das Wachstum von Zellen steuert. Dadurch ist der Zyklus auch eine der wichtigsten Grundlagen zum Verständnis der Tumorentstehung. Er besteht aus vier unterschiedlichen Phasen, der G₁-Phase (gap-1), der S-Phase (Synthese), der G₂-Phase (gap-2) und der M-Phase (Mitose). Wenn Zellen den Zellzyklus verlassen, treten sie in die Ruhephase, die sogenannte G₀-Phase ein (Abbildung 1).

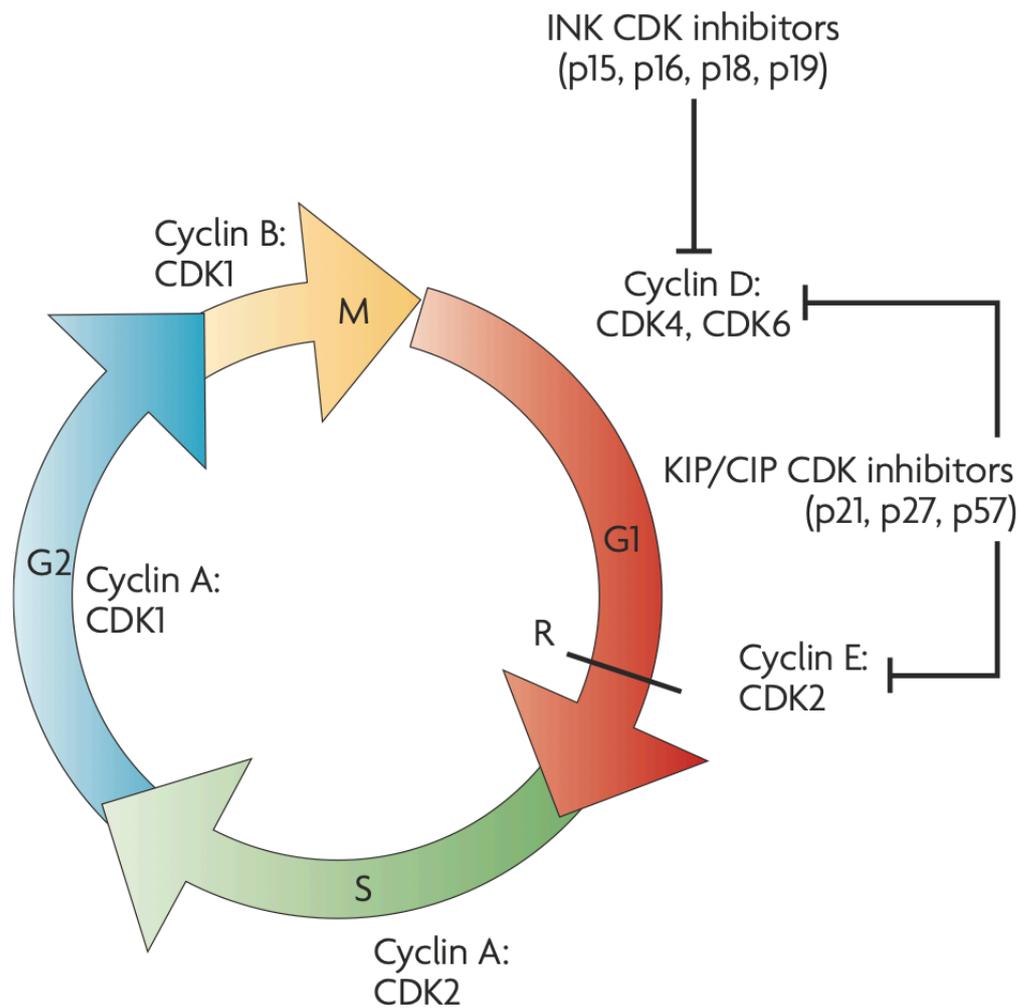


Abbildung 1: Der Zellzyklus. In der Abbildung sind die unterschiedlichen Phasen und einige wichtige Regulatoren des Zyklus dargestellt aus (Dehay and Kennedy 2007)

Die vier Phasen des Zellzyklus und ihre Funktionen sollen im Folgenden kurz beschrieben werden. In der G₁-Phase des Zellzyklus werden Proteine und Nukleotide synthetisiert, die für die DNA-Replikation benötigt werden. Die S-Phase zeichnet sich durch die Replikation der DNA und die Synthese von RNA und Proteinen aus. In der G₂-Phase wird die Zellteilung vorbereitet und es werden weitere Proteine und RNA synthetisiert. Während der M-Phase findet die Mitose statt, in deren Folge zwei Tochterzellen entstehen. (Schafer 1998)

1.3.1 Zellzyklus-Regulation

Der Zellzyklus kann durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst werden. Hierbei spielen Cycline und CDKs eine wesentliche Rolle für seine Regulation. Am Übergang von der ruhenden Zelle (G_0 -Phase) in die G_1 -Phase sind in der Regel Wachstumsfaktoren wie EGF, HGF oder PDGF beteiligt. (Kimura, Honda et al. 2000) Sie aktivieren intrazelluläre Signalwege wie die PI3K- oder die RAS/MAPK-Kaskade, die zur Aktivierung von Cyclin D führen und dadurch den Zellzyklus starten. (Jones and Kazlauskas 2001)

Cyclin D bildet mit den CDK4 und 6 sogenannte Cyclin D/CDK4- und Cyclin D/CDK6-Komplexe, welche das RB hyperphosphorylieren. Für die Regulation der G_1 -Phase spielt das Tumorsuppressorprotein RB und seine Phosphorylierung eine zentrale Rolle. Das unphosphorylierte RB inhibiert den Transkriptionsfaktor E2F-1, welcher die Bildung von Proteinen für den Übergang von der G_1 -Phase in die S-Phase steuert. Durch die RB Hyperphosphorylierung über die Cyclin D/CDK4- und Cyclin D/CDK6-Komplexe kommt es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F-1. (Arroyo and Raychaudhuri 1992, Weinberg 1995) Für den Übergang von der G_1 -Phase in die S-Phase ist zusätzlich der Cyclin E/CDK2-Komplex zuständig. (Koff, Giordano et al. 1992)

Zu Beginn der S-Phase wird Cyclin E wieder abgebaut und stattdessen Cyclin A überexprimiert. Dieses bildet einen Komplex mit CDK2 und reguliert so den Übergang von der S- in die G_2 -Phase. (Dulic, Lees et al. 1992, Koff, Giordano et al. 1992)

Der Übergang von der G_2 - in die M-Phase wird in erster Linie durch CDK1 (cdc28) reguliert. CDK1 interagiert mit den Cyclinen A und B. (Draetta, Piwnica-Worms et al. 1988, Schafer 1998)

1.3.2 Zellzyklusstopp

Durch verschiedene Faktoren kann es zum Zellzyklusstopp kommen, dieser kann reversibel oder irreversibel sein. Ein irreversibler Zellzyklusarrest wird als Seneszenz bezeichnet. (Yosef, Pilpel et al. 2017)

Für die Regulation des Zellzyklusstopps sind CDK-Inhibitoren (CKi) von entscheidender Bedeutung. In der Literatur sind zwei wesentliche CKi Familien beschrieben – die INK4-Proteine und die Cip/Kip-Proteine. Zu den INK4 Proteinen gehören p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}. Während die INK4 Proteine spezifisch über CDK4 agieren, hemmen die Cip/Kip-Proteine breiter, indem sie an Cyclin-CDK-Komplexe binden. Hierzu gehören p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}.

Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt bei der Vermittlung des Zellzyklusstopps eine wichtige Rolle. Es kann über die Aktivierung von p21 unter anderem den Cyclin D/CDK4-Komplex hemmen. (Lane and Crawford 1979, Lane 1992) Für die Aktivierung von p53 ist der MRN-Komplex von Bedeutung. Der MRN-Komplex kann DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüche detektieren. (Lamarche, Orazio et al. 2010) Dieser führt zu einer Aktivierung der beiden Kinasen ATR und ATM, wobei der genaue Prozess dahinter noch nicht vollständig verstanden ist. (Marechal and Zou 2013)

Die beiden Kinasen phosphorylieren die E3 Ligase Mdm2, welche p53 bindet. (Tibbetts, Brumbaugh et al. 1999, Shinozaki, Nota et al. 2003, Cheng, Chen et al. 2009) Durch die Phosphorylierung wird p53 freigesetzt und p53 kann am p21 Promoter seine Transkription induzieren. (Shi and Gu 2012, Benson, Mungamuri et al. 2013) P21 inhibiert den Cyclin D/CDK4-Komplex und führt damit zu einem Zellzyklusarrest. (Xiong, Zhang et al. 1993, Nourse, Firpo et al. 1994)

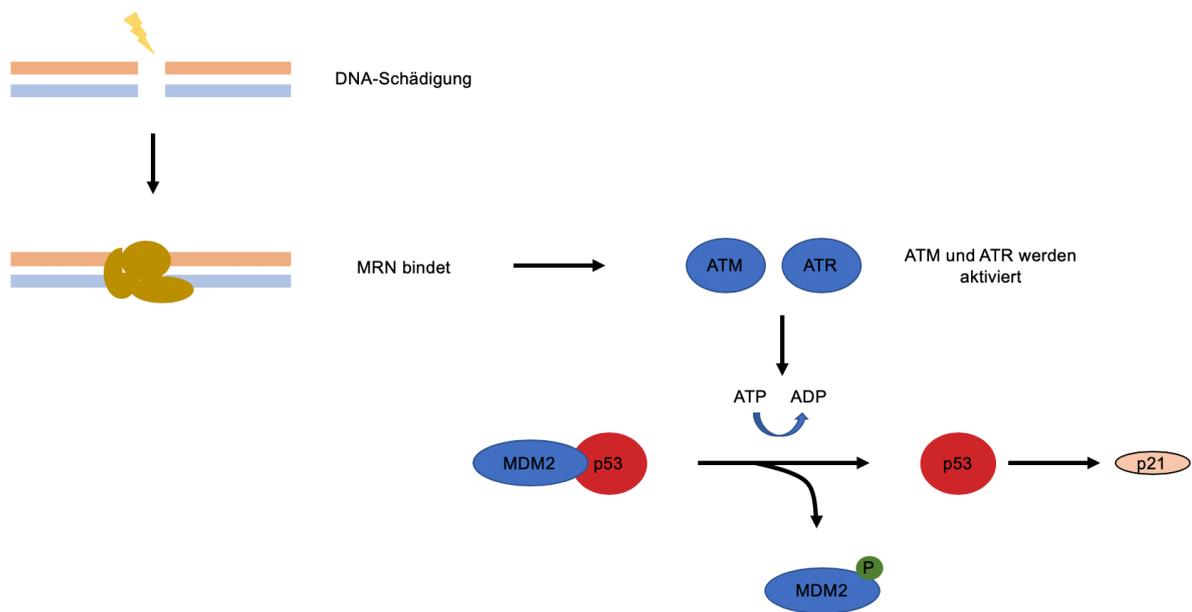


Abbildung 2: Zellzyklusstopp bei DNA-Schädigung. Skizze der DNA-Schädigung, adaptiert aus (Heinrich, Müller et al. 2014)

Eine weitere Möglichkeit des Zellzyklusarrests ist die Akkumulation von CDK inhibitorischen Proteinen p16 und p21, welche die aktive dephosphorylierte Form des Retinoblastomproteins begünstigen. Das Protein kann dadurch nicht an E2F binden und führt dadurch zu einem Zellzyklusstopp und nimmt seine Funktion als Tumorsuppressor wahr. (Stein, Drullinger et al. 1999, Gire and Dulic 2015)

Im Folgenden wird der Schwerpunkt auf die Seneszenz gelegt, dem Hauptthema dieser Arbeit.

1.4 Seneszenz

Anfang der 60er-Jahre beobachteten Leonard Hayflick und Paul Moorhead *in vitro* in menschlichen Fibroblasten, dass deren proliferative Kapazität begrenzt ist und die Proliferation nach einer gewissen Zeit sistiert. Das Phänomen beschrieben sie als „zelluläre Seneszenz“.

Diese Beobachtung war der Startschuss für Arbeiten in einem neuen wissenschaftlichen Forschungsfeld, das seither eine hohe Anerkennung erfährt. Der von Hayflick und Moorhead beschriebene Vorgang wird mittlerweile als Replikative Seneszenz bezeichnet. (Hayflick and Moorhead 1961) Weitere Unterformen der zellulären Seneszenz sind die Onkogen-induzierte-Seneszenz (OIS), die Therapie-induzierte-Seneszenz (TIS) und die Immunoseneszenz (IS). (Roninson 2003, Kang, Yevsa et al. 2011, Ventura, Casciaro et al. 2017)

Senescente Zellen unterscheiden sich von anderen Zellen morphologisch aber auch durch einen veränderten Metabolismus. (Nacarelli, Lau et al. 2019) Einige dieser Zellveränderungen werden als biologische Marker für Seneszenz genutzt, zum Beispiel die erhöhte β -Galactosidase-Aktivität seneszenter Zellen. (Severino, Allen et al. 2000)

Die Hauptfunktion der Seneszenz ist die Elimination unerwünschter Zellen. Sie stellt damit eine Alternative zum Zelltod dar. Seneszenz wurde bisher bei verschiedenen physiologischen und patho-physiologischen Prozessen, wie der Karzinogenese, der Geweberegeneration und im Alterungsprozess, beschrieben. (Munoz-Espin and Serrano 2014)

1.4.1 Induktionsarten von zellulärer Seneszenz

Aktuell werden fünf wesentliche Arten der Seneszenz-Entstehung unterschieden. Dies lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass Seneszenz bei vielen altersassoziierten Erkrankungen von hoher Relevanz ist. Zu diesen gehören beispielweise Lungenerkrankungen, die Osteoporose und die Steatohepatitis.

(Ginaldi, Di Benedetto et al. 2005, Tsuji, Aoshiba et al. 2006, Ogrodnik, Miwa et al. 2017)

1.4.2 Replikative Seneszenz (RIS)

Bei der DNA-Replikation wird der Folgestrang aus unterschiedlichen Okazaki-Fragmenten zusammengesetzt und anschließend verknüpft. Da dieses jedoch am 5' Ende beider Töchterstränge nicht möglich ist, verkürzen sich die Enden. Damit dieses nicht mit einem Genverlust einhergeht befinden sich an den DNA-Strangenden Strukturelemente, die Telomere. (O'Sullivan and Karlseder 2010) Diese sind sich wiederholende DNA-Doppelstrang-Sequenzen aus TTAAGGG Motiven. Falls die Telomere durch eine hohe Anzahl von Zellteilungen eine kritische Länge unterschreitet, führt dies zur replikativen Seneszenz. (Oeseburg, de Boer et al. 2010)

1.4.3 DNA Schädigung Antwort (DDR)

Zellen sind in der Lage, aufgrund einer externen DNA-Schädigung in Seneszenz überzugehen. Kommt es zu einer Schädigung der DNA, geht die Zelle, zum Beispiel über die Induktion von p53, in einen Zellzyklusarrest über, um den geschädigten Bereich zu reparieren. Falls dieses nicht möglich ist, initiiert die Zelle zelluläre Seneszenz oder Apoptose durch programmierten Zelltod. (Fumagalli, Rossiello et al. 2014)

Sowohl Telomer-abhängige Seneszenz als auch DDR stehen in Verbindung mit pRB, p53, p21 und p16. In jungen seneszenten Zellen phosphoryliert RB Cyclin D1, dieses reicht jedoch noch nicht gänzlich für einen Zellzyklusarrest aus. (Narita, Nunez et al. 2003) In alternden Zellen akkumuliert daher p21. Dieses Protein bindet und inaktiviert Cyclin D1-CDK4-, Cyclin D1-CDK6- und Cyclin E-CDK2-Komplexe, um einen Stopp des Zellzyklus zu erzeugen. Als weiterer Mechanismus reichert sich auch der CDK4-CDK6-Inhibitor, p16^{Ink4a}, an. Im späteren Stadium der Seneszenz geht die Expression von p21 zurück, hingegen bleibt die Überexpression von p16 erhalten. (Stein, Drullinger et al. 1999)

1.4.4 Therapie-induzierte Seneszenz (TIS)

Die Therapie-induzierte Seneszenz über Chemotherapeutika ist dosisabhängig. Am häufigsten führen Zytostatika zur Seneszenz, die die DNA schädigen; Beispiele hierfür sind Hydroxyurea, Adriamycin und Cisplatin. (Wang, Wong et al. 1998, Park, Jeong et al. 2000, Elmore, Rehder et al. 2002) In höheren Dosen führen diese Medikamente zur Apoptose. (Tanida, Mizoshita et al. 2012)

Bisher wurden unterschiedliche Signalwege mit der Therapie induzierten Seneszenz durch Chemotherapeutika bei Tumoren in Verbindung gebracht. In vielen Fällen werden Einzel- und Doppelstrangbrüche durch Seneszenz-induzierende Medikamente ausgelöst. (Wang, Wong et al. 1998, Park, Jeong et al. 2000, Elmore, Rehder et al. 2002)

1.4.5 Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS)

Proto-Onkogene können durch bestimmte Faktoren zu Onkogenen mutieren. Durch die Überexpression von Onkogenen wird das Wachstum normaler Zellen stimuliert und kann durch unkontrolliertes Wachstum in eine maligne Entartung übergehen. Viele Zellen schützen sich jedoch vor diesem Vorgang, indem sie einen Prozess der Seneszenz einleiten, falls diese Gene überexprimiert werden. (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007)

Dieser Vorgang wurde 1998 von M. McMahon und J. Bishop am Beispiel von RAS- und RAF-Proteinen zuerst beschrieben. (Zhu, Woods et al. 1998) Diese beiden Proteine wurden in erster Linie mit neoplastischer Entartung in Zusammenhang gebracht. McMahon und Bishop entdeckten jedoch, dass RAS und RAF bei normalen Zellen zu einem Zellzyklusstopp und Apoptose führen können. (Zhu, Woods et al. 1998) Seneszenz wird durch RAF bei Zellen induziert, die eine vermehrt aktivierte MAP-Kinase-Kaskade aufweisen und dadurch die Gefahr einer neoplastischen Entartung besteht. (Zhu, Woods et al. 1998) Später wurde ein analoger Mechanismus beschrieben, der zum Beispiel über eine

BRAF-, MOS- und E2F-1-Überexpression aktiviert wird. (Lin, Barradas et al. 1998, Dimri, Itahana et al. 2000, Michaloglou, Vredeveld et al. 2005)

1.4.6 Immunoseneszenz

Das angeborene Immunsystem bildet den ersten Abwehrmechanismus gegen Pathogene. Im Alter kommt es zu einer kontinuierlichen Verschlechterung des Immunsystems. Hier spielt die Seneszenz von Immunzellen eine wichtige Rolle, was auch als Immunoseneszenz bezeichnet wird. (Derhovanessian, Larbi et al. 2009, Solana, Tarazona et al. 2012, Ventura, Casciaro et al. 2017) Dies bildet gleichzeitig eine der Grundlagen für die Erhöhung immun-vermittelter Erkrankungen im Alter. Die Immunoseneszenz betrifft sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem. Im Gegensatz zu den vorherig genannten Arten der Seneszenz hat die Immunoseneszenz nichts mit der proliferativen Kapazität von Zellen zu tun. (Derhovanessian, Larbi et al. 2009) Die Anzahl der Neutrophilen und Makrophagen im Alter ist unter gesunden Bedingungen gleich. Dafür sinkt in beiden Zellen im Rahmen der Alterung die Kapazität zur Chemotaxis, zur Phagozytose, der Superoxid-Produktion und der Signal-Transduktion. (Solana, Tarazona et al. 2012)

Eine geringe Anzahl von nativen T-Zellen ist ein Marker für die Immunoseneszenz, besonders die der CD8+ Zellen. Gleichzeitig erkennt man zu diesem Zeitpunkt häufig eine Erhöhung der T-Gedächtniszellen, die jedoch eine herabgesetzte Funktionalität aufweisen. Diese Veränderungen führen zu einer erniedrigten Immunabwehr gegenüber Neuinfektionen und persistierenden Infektionen. (Derhovanessian, Larbi et al. 2009)

1.5 Seneszenz-assoziierte Veränderungen

Bisher wurden unterschiedliche Induktoren von Seneszenz beschrieben. Dadurch wird deutlich, dass seneszente Zellen in verschiedene Mechanismen involviert sind und sich von normalen Zellen unterscheiden. Durch den jeweiligen Induktionsmechanismus verändert sich das Aussehen der seneszenten Zellen

im Vergleich zu normalen Zellen. Sie nehmen an Fläche zu und flachen ab. (Sherwood, Rush et al. 1988, Cho, Ryu et al. 2004) Weiterhin kommt es bei einem irreversiblen Zellzyklusstopp zu Veränderungen des Metabolismus und der Genexpression.

1.5.1 Veränderungen des Metabolismus durch Seneszenz

Durch Seneszenz-Induktion kommt es zu hochgradigen Veränderungen in der Zelle, wie zum Beispiel dem irreversiblen Zellzyklusarrest. Eine weitere Abweichung ist ein veränderter Metabolismus der seneszenten Zellen. Zunächst wurde bei replikativer Seneszenz, anhand alternder Fibroblasten, eine erhöhte Glykolyse und eine verstärkte Lactatproduktion entdeckt. (Bittles and Harper 1984) Bestimmte Signalkaskaden konnten diesen Veränderungen zugeordnet werden, so führen beispielweise der AMPK- und NF- κ B-Signalweg zu einer erhöhten Glykolyse und zur Seneszenz-Induktion. (Takebayashi, Tanaka et al. 2015) Außerdem führen die beiden Signalwege zu einer erhöhten Lactat Dehydrogenase A und Monocarboxylat Transporter 1 Expression. (Liao, Hsu et al. 2014) Glykolyse und erhöhte Lactatproduktion wirken beide durch positive Rückkopplung auf den NF- κ B-Signalweg. Dadurch kommt es zur Bildung von proinflammatorischen Faktoren und einer Hochregulation von Genen, die für den SASP (seneszenz-assoziierten-sekretorischen-Phenotyp) von Bedeutung sind.

Durch eine Acridine-Orange-Färbung wurde im Jahr 2000 ein verstärkt exprimiertes lysosomales Kompartiment in seneszenten Zellen nachgewiesen. Bereits vorher war die β -Galactosidase-Aktivität als Goldstandard für die Seneszenz-Detektion bekannt. Die Aktivität der sich im Lysosom befindenden Hydrolase ist bei einem sauren pH zwischen 4,0 und 4,5 am höchsten. (Kurz, Decary et al. 2000) An der Universität Tübingen wurde 2013 als potenziell neuer Biomarker für die Seneszenz-Detektion die lysosomale α -Fucosidase beschrieben. (Hildebrand, Lehle et al. 2013) Dieses Enzym ist die Zielstruktur des [18 F]FEFuc -Tracers.

1.5.2 Seneszenz-assoziiertes Sekretorisches Phänotyp (SASP)

Das Tumormicroenvironment stellt einen wichtigen Bestandteil des Tumorwachstums dar. Es dient den neoplastischen Zellen als Grundlage für die Nährstoffgewinnung, zum Beispiel von Glucose und Aminosäuren. Außerdem produzieren Zellen des Tumormicroenvironments Wachstumsfaktoren, die das Tumorwachstum beeinflussen. (Zhang, Nie et al. 2010, Binnewies, Roberts et al. 2018, Wegiel, Vuerich et al. 2018)

Seneszenz wurde bisher in erster Linie als ein anti-proliferativer Prozess beschrieben. Neuere Untersuchungen belegen allerdings, dass seneszente Zellen das Tumormicroenvironment durch den Seneszenz assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) proliferationsfördernd wirken. (Krtolica, Parrinello et al. 2001, Kuilman, Michaloglou et al. 2008) Seneszente Zellen können zum Beispiel Interleukin 6 und 1, sowie Chemokine, Proteine des IGF-Signalwegs und hämatopoetische Stimulationsfaktoren (GM-CSF) sezernieren. (Coppe, Desprez et al. 2010) Durch diese parakrine Sekretion können seneszente Zellen eine inflammatorische Umgebung erzeugen und dadurch einen neoplastischen Effekt auf die Tumorzellen ausüben. (Krtolica, Parrinello et al. 2001, Ohanna, Giuliano et al. 2011, Lasry and Ben-Neriah 2015, Lee and Schmitt 2019)

1.6 Klinische Anwendung

Seneszente Zellen haben eine hohe Bedeutung bei mehreren altersassoziierten Erkrankungen wie dem Lungenemphysem (Tsuji, Aoshiba et al. 2006), der Lungenfibrose (Minagawa, Araya et al. 2011, Disayabutr, Kim et al. 2016), der Osteoporose (Ginaldi, Di Benedetto et al. 2005), der Steatohepatitis (Ogrodnik, Miwa et al. 2017), der Atherosklerose (Head, Daunert et al. 2017) und bei Nierenerkrankungen. (Ding, Franki et al. 2001, Falke, Gholizadeh et al. 2015, Valentijn, Falke et al. 2018)

Ein neues Forschungsfeld mit hohem Potential zur klinischen Anwendung eröffnet sich durch die gezielte Behandlung seneszenten Zellen. Dadurch lassen sich altersassoziierte Erkrankungen oder maligne Prozesse therapieren. Diese seneszenzspezifische Therapieform wird als senolytische Therapie bezeichnet und kann insbesondere bei altersassoziierten Erkrankungen zur Anwendung kommen. (Xu, Pirtskhalava et al. 2018)

ABT263, ein Bcl-2-Inhibitor, wurde als ein Medikament entdeckt, welches *in vitro* und *in vivo* selektiv senescente Zellen töten kann. (Chang, Wang et al. 2015) ABT263 wurde bei Mäusen mit Lungenemphysem getestet. Dabei wurde das Lungenemphysem durch die Gabe von porkiner Pankreaselastase induziert. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die ABT263 Applikation senescente Zellen eliminiert und dadurch in den Mäusen die Progression des Lungenemphysems hemmt. (Mikawa, Suzuki et al. 2018)

Ein weiteres Beispiel ist die Therapie der Fettleberhepatitis. So wurde im Jahr 2017 publiziert, dass durch die Behandlung mit Dasatinib und Quercetin die Zahl der seneszenten Zellen in der Leber signifikant reduziert wurde. Dies war mit einer signifikanten Reduktion der Fettleber assoziiert. (Ogrodnik, Miwa et al. 2017)

Die Ergebnisse in den beiden Modellen in zwei unterschiedlichen Organen zeigen, welches mögliche Potential eine senolytische Therapie auf den Verlauf von altersassoziierten Erkrankungen haben könnte. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Therapie-induzierte Seneszenz (TIS), insbesondere im Bereich der Tumorbehandlung. Zytostatika in geringeren Dosen induzieren hierbei Seneszenz anstatt Apoptose. (Wang, Wong et al. 1998, Park, Jeong et al. 2000, Elmore, Rehder et al. 2002) Diese Form der Zytostatika-Anwendung in Kombination mit einer senolytischen Therapie könnte die Chemotherapeutika-bedingten Nebenwirkungen deutlich reduzieren und eine sinnvolle Option zur Behandlung bestimmter Tumorformen bieten.

1.7 Detektionsmöglichkeiten

Die Seneszenzdetektion ist beim Patienten aktuell limitiert auf *ex vivo* Methoden. Der Goldstandard ist der seneszenz-assoziierte β -Galactosidase Assay. (Severino, Allen et al. 2000, Gary and Kindell 2005) Eine weitere Möglichkeit der Seneszenz-Detektion ist die quantitative Bestimmung von Seneszenz-Markern, wie p16 und p21 per Western Blot. (Alcorta, Xiong et al. 1996, Noren Hooten and Evans 2017, Yosef, Pilpel et al. 2017) Außerdem kann eine Quantifizierung von SASP-Proteinen, wie IL-6, im Zellmedium erfolgen. (Noren Hooten and Evans 2017) Als neuen Marker zum Nachweis der Seneszenz entdeckte Hildebrand et al an der Eberhard Karls Universität Tübingen die lysosomale α -Fucosidase. (Hildebrand, Lehle et al. 2013)

1.8 α -Fucosidase und Fucosylierung

Die α -Fucosidase ist ein lysosomales Enzym, welches in die Gruppe der Hydrolasen gehört. (Ali, Jenkins et al. 2008) Die α -Fucosidase trennt mit Hilfe von Hydrolyse Fucose von Glykoproteinen und Glykolipiden ab. (O'Brien, Willems et al. 1987)

Zwei unterschiedliche Hauptwege führen zur Fucosylierung. Beim sogenannten „Salvage Pathway“ wird die Fucose zunächst durch die Fucokinase phosphoryliert und dann mit Hilfe der GDP-Fucose-Pyrophosphorylase in GDP-Fucose umgewandelt. Diese wird durch einen GDP-Fucose Transporter in den Golgi-Apparat transportiert. Dort wird Fucose durch unterschiedliche Fucosyltransferasen an Proteine gebunden (Abbildung 3). Beim „de novo Pathway“ wird GDP-Fucose aus D-Mannose und D-Glucose gewonnen. (Moriwaki, Noda et al. 2007)

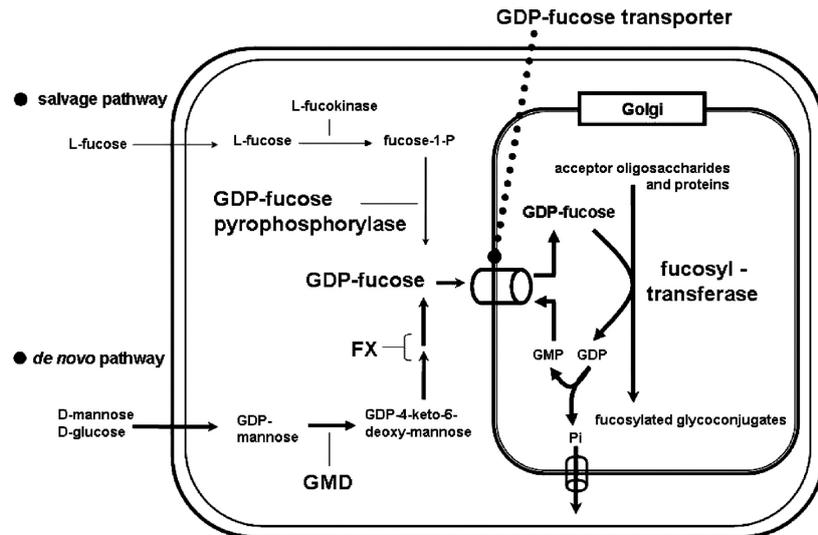


Abbildung 3: Der Fucosemetabolismus, Skizze des Fucosemetabolismus der Zelle aus (Moriwaki, Noda et al. 2007)

Die Fucosylierung spielt bei einigen Tumorarten eine wichtige Rolle, zum Beispiel im Rahmen des Mamma-Karzinoms oder beim HCC (Hepatozelluläres Karzinom). (Noda, Miyoshi et al. 2003, Lai, Chen et al. 2019)

1.9 Medizinische Bildgebung

Um die Anatomie und ihre pathologischen Veränderungen besser zu verstehen, hat sich seit der Entwicklung des Röntgenverfahrens, Ende des 19. Jahrhunderts, die medizinische Bildgebung als ein wichtiger Bestandteil in der Diagnostik und Forschung etabliert. Während in den Anfangsjahren die Darstellung der Anatomie im Vordergrund stand, erlaubt die moderne nicht invasive Bildgebung, die quantitative und qualitative Erfassung von funktionellen und molekularen Parametern, sowie von detaillierten Strukturen im Submillimeter-Bereich, um die Morphologie abzubilden.

1.9.1 Tracer

Tracer sind mit einem radioaktiven Isotop markierte kleine Moleküle oder Antikörper, welche spezifisch in bestimmten Zellen aufgenommen werden oder an sie binden. Häufig verwendete Isotope sind zum Beispiel ^{11}C , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ und ^{18}F . Der Warburg-Effekt beschreibt einen erhöhten Glucose-Bedarf bei Krebszellen. (Warburg, Wind et al. 1927) Dieser Effekt wurde sich in der Tumordiagnostik zu Nutze gemacht. Daher ist ^{18}F -Fluoro-deoxy-glucose, [^{18}F]FDG, einer der häufigsten verwendeten radioaktiven Tracer. Aufgrund eines erhöhten Glucose-Metabolismus wird dieser in den meisten Tumorzellen verstärkt aufgenommen.

1.9.2 Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Die Positronen-Emissions-Tomographie ist ein relativ neues Verfahren der medizinischen Bildgebung. Der erste PET-Scanner wurde 1974 von Micheal E. Phelps und Kollegen entwickelt. (Phelps, Hoffman et al. 1975, Hoffmann, Phelps et al. 1976) Der Tracer wird intravenös in den Patienten oder das Tier injiziert. Die verwendeten Isotope für die PET-Tracer zerfallen mit einem β^+ -Zerfall und geben dabei Positronen ab, welche mit freien Elektronen interagieren und wodurch es zu einer Annihilation, einer Vernichtungsreaktion, kommt. Bei der Annihilation werden zwei 511keV γ -Photonen in fast 180° zueinander freigesetzt. Durch diese beiden freigesetzten Photonen wird eine Lokalisierung durch externe, ringförmig angeordnete Detektoren möglich. Die Detektoren kalkulieren hierfür eine sogenannte „lines of response“. Wenn Annihilationen zur gleichen Zeit stattfinden und von Detektoren erkannt werden, kann es zu einem falschen Signal und somit einer falschen LOR kommen. (Basu, Kwee et al. 2011, Omami, Tamimi et al. 2014)

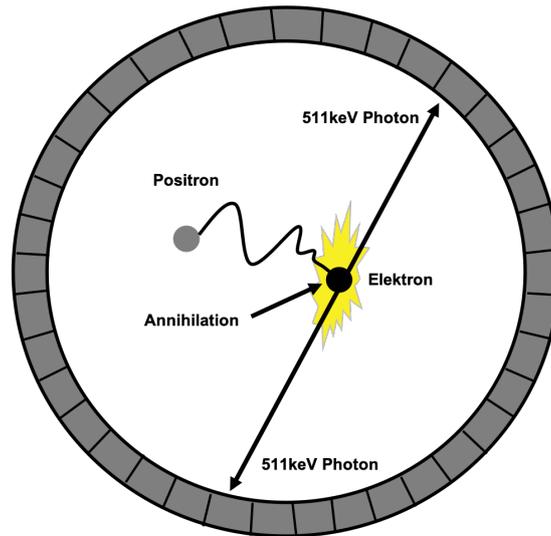


Abbildung 4: Positronen-Emissions-Tomographie. PET-Skizze, adaptiert aus (Cherry and Dahlbom 2006)

Die roh PET-Daten bestehen aus den LORs, welche am Computer in Histogramme umgeschrieben werden. Diese Histogramme können dann zu dreidimensionalen Schnittbildern rekonstruiert werden. Eine der häufigsten und auch hier verwendete Rekonstruktionsmöglichkeit ist der OSEM-Algorithmus. (Lantos, Mitra et al. 2018) Während PET-Scans in erster Linie den Metabolismus von Zellen bzw. Zellexpression darstellen können, wird dieses meistens kombiniert mit einer anatomischen Bildgebung wie der MRT oder der CT.

1.9.3 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie ist eines der am meisten verwendeten bildgebenden Verfahren der Medizin. Das grundlegende Prinzip des MRTs ist die Kernspintomographie. Im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren wird für die MRT keine radioaktive Strahlung benötigt. 1952 wurde den beiden Physikern Felix Bloch und Edward Purcell für die Entdeckung der zugrundeliegenden Physik der Nobelpreis verliehen. Durch diese Erkenntnisse können heutzutage unterschiedliche Gewebestrukturen mit Hilfe eines MRTs sichtbar gemacht und unterschieden werden. Protone besitzen einen Kernspin, welcher aufgrund der Boltzmann-Verteilung zufällig in alle Richtungen zeigt.

Kernspin-aktive Atome sind zum Beispiel ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{23}Na , ^{31}P . Durch den Einfluss des externen magnetischen Feldes im MRT werden die Kernspins alle longitudinal ausgerichtet, dabei können sie parallel oder antiparallel zum magnetischen Feld orientiert sein. Die parallele Orientierung ist die energetisch günstigere Form. Daher zeigt die Summe aller Kernspins, die Netto-Magnetisierung, parallel zu dem externen magnetischen Feld. Dieses nennt man die longitudinale Magnetisierung. Durch einen hohen resonanten Radiofrequenzimpuls kommt es zur Energieübertragung und spins einiger Protonen ändern ihre parallele in eine antiparallele Orientierung. Dieses führt zum Verlust der longitudinalen Magnetisierung. Gleichzeitig sind die Kernspins in-phase synchronisiert und bilden eine transversale Magnetisierung. Dieser neue Zustand kann durch Spulen gemessen werden, da er nicht mehr die gleiche Ausrichtung wie das externe magnetische Feld hat. Nach Beendigung des Radiofrequenzimpulses nimmt die in-Phase Orientierung ab und es kommt damit zur transversalen Relaxation. Die antiparallelen Kernspins gehen von ihrem energetisch ungünstigen wieder in ihren energetisch günstigen Zustand zurück, den parallelen. Dieses bezeichnet man als longitudinale Relaxation. Der Zeitpunkt an dem wieder 67% der longitudinalen Magnetisierung hergestellt sind, bezeichnet man als T_1 . Der Zeitpunkt an dem nur noch 37% der transversalen Magnetisierung vorhanden sind, bezeichnet man als T_2 . (Schenck 2000, Maniam and Szklaruk 2010, Vijayalaxmi, Fatahi et al. 2015)

Gewebe unterscheiden sich aufgrund ihren spezifischen T_1 - und T_2 -Zeiten. Dadurch können zuletzt MRT-Bilder rekonstruiert werden.

1.10 Fragestellung

Zelluläre Seneszenz spielt bei verschiedenen Alterungsprozessen und Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle. Um eine breite klinische Anwendung bezüglich der quantitativen Diagnostik und einer eventuellen Therapiesteuerung zu ermöglichen, ist eine klinische *in vivo* Detektion der zellulären Seneszenz von zentraler Bedeutung.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, ein molekulares Verfahren zu entwickeln und zu evaluieren, welches eine Seneszenzdetektion *in vivo* ermöglicht. Die Bildgebung bietet seit der Entwicklung der Positronen-Emissions-Tomographie eine gute Möglichkeit der zellulären Markierung durch Tracer. Als Zielstrukturen wurden die β -Galactosidase und die α -Fucosidase für zwei unterschiedliche Tracer gewählt. Der [^{18}F]FpyGal-Tracer, welcher ein Substrat der β -Galactosidase ist, befindet sich bereits in der klinischen Translation.

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Validierung des [^{18}F]FEFuc-Tracers, der in Verbindung mit der α -Fucosidase bzw. der Fucosylierung steht. Im Rahmen der Arbeit wurde daher in unterschiedlichen Seneszenzmodellen der [^{18}F]FEFuc-Tracer untersucht und mit Ergebnissen des bereits vorhandenen [^{18}F]FpyGal-Tracers verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

Tabelle 1 Geräte und Zubehör

Geräte	Hersteller
Bio RAD PowerPac Basic	Bio-Rad, Hercules (USA)
Digitales Westernblotauslesegerät, Odyssey	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
ELISA-Gerät, MULTISKAN EX	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tischzentrifuge (Mini spin)	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gamma-Counter	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Bulle (Schweiz)
Gefrierschrank -80 °C	Sanyo, Osaka (Japan)
Inkubator, HERACELL 150i	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Ionentauscherkartusche SEP-PAK QMA light	Waters, Milford (USA)
Kryotom, CM1850	Leica Microsystems, Wetlar

Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Bulle (Schweiz)
LightCycler 1.5	Roche, Basel (Schweiz)
LUNA-C18(2)-Säule	Phenomenex, Aschaffenburg
Mikroskop Axio Imager Z1	Zeiss, Jena
MRT, 7 T BioSpec 70/30 MR Kleintier-Scanner	Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen
MRT, 7 T, 300 MHz ClinScan Kleintier-Scanner	Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen
Nanodrop	PEQLab, Erlangen
NanoZoomer	Hamamatsu, Hamamatsu (Japan)
Narkosesystem RTA-0011	Vetland Medical Sales & Services LLC, Louisville, USA
Nuklear Magnetic Resonanz spectra Bruker Advance III 600	Bruker, Massachusetts (USA)
PET-Scanner	Inveon, Siemens Preclinical Solution, Knoxville (USA)
pH/ORP Meter	Hanna Instruments, Woonsocket (USA)
Phosphorimager Storm 840	Molecular Dynamics, Sunnyvale (USA)
Phosphorschirm	Molecular Dynamics, Sunnyvale (USA)

Pipetboy	Integra Biosciences, Zizers (Schweiz)
Shaker Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank, Heraeus HERAsafe KS	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
TRACERlab FX N Pro Synthesemodul	GE Healthcare, Uppsala (Schweden)
Vortex	Greiner bio-one, Kremsmünster (Österreich)
Wärmebetten	Thermolux Wärmeunterlagen, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Zentrifuge, Megafuge 40R	Thermo Scientific, Braunschweig
Zyklotron, PETtrace	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)

Tabelle 2 Materialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
30 G Nadel	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)

96 Well Microplates	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
BCA-Assay, Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Cornea Gel	Gerhard Mann GmbH, Berlin
Einweg-Zählkammer	NanoEnTek, Seoul (Südkorea)
Einwegspritzen (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Costar, Corning (USA)
Eppendorf Tubes 1.5, 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)
FDG-Tracer Kit	ABX, Dresden
Filterspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Gammacounter Tubes	Sarstedt, Nürnbrecht
PVDF Transfermembran	Merck Millipore, Burlington (USA)
peqGold Total RNA Kit	VWR International
Objektträger Superfrost	R. Langenbrinck, Emmendingen
Schlauch	Smiths Medical Intl. Ltd., Hythe (UK)
TissueTec	Sakura Finetek, Torrance (USA)

U-20-Insulinspritzen	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Zellkulturflaschen 550 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster (Österreich)

Tabelle 3 Reagenzien

Material	Hersteller	Zusatzinformationen
Ammonium persulfat	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)	
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe	Na-Salz
CX-5461	Adoq Bioscience, Irvine (USA)	RNA-Polymerase I-Inhibitor, 100 mg
SYBR Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden	
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	100 ml
Doxorubicinhydrochlorid	Cell Pharm, Bad Vilbel	DOXO-cell® 50 mg
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	Doxycyclin Hydrochlorid

Dulbecco's MEM, 500 ml	Biochrom GmbH, Berlin	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	Gibco™, 500 ml
Ethanol	Honeywell, Charlotte (USA)	
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	500 ml, 30-minütige Thermo-Inaktivierung im 56° Wasserbad
Fluorethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	
GLUT1/4-Inhibitor	Tocris Bioscience, Bristol (UK)	WZB117
Glycine	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)	
Isofluran	Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden	
K ₂ CO ₃ , Kaliumcarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	

Matrigel™ Matrix	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	Corning™
McCoy´s 5A, 500 ml	ATCC, Manassas (USA)	
Methanol	Honeywell, Charlotte (USA)	
Nukleosidtriphosphat	Amerstham, (UK)	20mM dNTPs,
Nicht essenzielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom GmbH, Berlin	(100x)
Odyssey Blocking Buffer	Licor Bioscience, Lincoln (USA)	
Page Ruler	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	Produkt 26616
PIS, Penicilin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	
Protease-Inhibitor	Roche, Basel (Schweiz)	Tablette
Reverser Transkriptase	invitrogen, Carlsbad, (USA)	
Rotiphorese Gel	Roth, Karlsruhe	

SDS	Roth, Karlsruhe	Pellets
Sodium Pyruvate	Biochrom GmbH, Berlin	100mM
SuperScript II Reverse Transkriptase	invitrogen, Carlsbad, (USA)	
Trypanblau-Lösung, 0.4%	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)	Gibco™
Trizma Base	Sigma Aldrich, St. Louis (USA)	crystalline
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	100 ml
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe	

Tabelle 4 primäre Westernblot Antikörper

Primäre Antikörper	Produktnummer	Hersteller
GLUT1	ab115730	Abcam, Cambridge (UK)

α -Fucosidase	Sc-365496	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
β -Actin Hasenantikörper	13E5	Cell Signaling Technology, Cambridge (UK)
β -Actin Mausantikörper	MAB1501	Merck Millipore, Burlington (USA)

Tabelle 5 sekundäre Westernblot Antikörper

Sekundäre Antikörper	Produktnummer	Hersteller
Goat anti-Mouse IRDye 680RD	926-68070	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
Goat anti-Mouse IRDye 800CW	926-32210	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
Goat anti-Rabbit IRDye 680RD	926-68071	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)
Goat anti-Rabbit IRDye 800CW	926-32211	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)

Tabelle 6 RT-PCR-Primer (murine)

Alle verwendeten Primer stammen von der Firma Eurofins, Huntswill (USA).

Name des Gens	Primer Sequenz in 5'-3'
Fucosidase for	TACCAGCGCTTCATGACAGA
Fucosidase rev	AGTTCCAAGACACAGGGCTT
GDP-Fucose Transporter for	TCCTACCTGCTGCTCAAACA
GDP-Fucose Transporter rev	ACGCAGGCATTGACATTGTT
β -Actin for	CGGATGTCAACGTCACACTT
β -Actin rev	GGCCAGGTCATCACTATTGG

Tabelle 7 RT-PCR-Primer (human)

Alle verwendeten Primer stammen von der Firma Eurofins, Huntswill (USA).

Name des Gens	Primer Sequenz in 5'-3'
GDP-Fucose Transporter for	TCACCTTCTACCAGTGCCTG
GDP-Fucose Transporter rev	TAGGAGAGCAGCACGTTGAA
Fucosidase for	GCCTCATCGGGATTTGGTTG
Fucosidase rev	ACATTCCCCTCCCATCAG

β -Actin for	CGGATGTCAACGTCACACTT
β -Actin rev	GGCCAGGTCATCACTATTGG

Tabelle 8 Softwareprogramme:

Name	Firma
Ascent Software for Multiskan	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
AxioVision Rel. 4.8	Zeiss, Jena
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc.
Image J	NIH
Inveon Acquisition Workplace	Inveon, Siemens Preclinical Solution, Knoxville (USA)
Inveon Research Workplace Software	Inveon, Siemens Preclinical Solution, Knoxville (USA)
Light Cycler Software 5.0	Roche, Basel (Schweiz)
MestReNova	Mestrelab Research, Santiago (Spanien)
NDP.view 1.2.41	Hamamatsu, Hamamatsu (Japan)
ND-1000	PEQLab, Erlangen
Odyssey SA	LI-COR Biosciences, Lincoln (USA)

2.2 Radiotracer

Die drei in dieser Arbeit verwendeten radioaktiven Tracer wurden alle durch die Radiopharmazie des Werner Siemens Imaging Centers (WSIC) in Tübingen hergestellt. Diese Abteilung führte auch Qualitätskontrollen der Tracer durch.

2.2.1 Tracerproduktion

Der radioaktive Grundbaustein der drei Tracer ist ^{18}F -Fluor. Dieses wurde mit Hilfe eines Zyklotron hergestellt.

2.2.2 [^{18}F]FDG

Der FDG-Tracer wurde mit Hilfe eines speziellen Kits, in einem TRACERlab FX N Pro Synthesemodul hergestellt. Durch eine nukleophile Substitution wurde Peracetyl-Mannosetriflat durch [^{18}F]Fluorid markiert. Daraufhin wurde die Acetyl-Gruppe mit Natronlauge entfernt und es entstand [^{18}F]FDG.

2.2.3 [^{18}F]FEFuc und [^{18}F]FpyGal

Diese beiden Tracer wurden von Jonathan Cotton am WSIC in Tübingen entwickelt. Für beide Tracer galten zwei lysosomale Enzyme als Zielstrukturen. Ihre Synthese fand ebenfalls in dem TRACERlab FX N Pro Synthesemodul statt. Das radioaktive [^{18}F]Fluorid wurde auf einer Ionenaustauscherkartusche fixiert. Das Fluorid wurde mit Hilfe einer 90%igen Acetonitrillösung, Kaliumcarbonat und Kryptofix eluiert. Mit einem Inertgasstrom (Argon) wurde nachfolgend das abgelöste [^{18}F]Fluorid getrocknet.

Für den [^{18}F]FEFuc-Tracer wurde als Präkursor-Molekül α -Iodoethyfuose verwendet. Durch eine nukleophile Substitution bei 100 °C für 10 Minuten in Acetonitril wurde das radioaktive Isotop angefügt. Durch eine semi-präparative HPLC auf einer LUNA-C18(2)-Säule wurde die Lösung aufgereinigt. Die

Schutzgruppe wurde mit Hilfe von Natronlauge hydrolysiert. Der gewonnene Tracer wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.

Für [^{18}F]FpyGal wurde als Präkursor-Molekül β -Nitropyridinolgalactose verwendet. Im Gegensatz zum [^{18}F]FEFuc-Tracer fand beim [^{18}F]FpyGal die Makierungsreaktion bei 150 °C für 5 Minuten in Dimethylsulfoxid (DMSO) statt.

Die restlichen Schritte glichen denen des [^{18}F]FEFuc-Tracers.

2.2.4 Tracerstabilität

Eine wichtige Grundlage für die *in vivo* Nutzung eines PET-Tracers ist dessen Stabilität im Blut. Bei einer kurzen Blut-Halbwertszeit besteht die Gefahr, dass er im Blut verstoffwechselt wird. Die *in vitro* Experimente zur Überprüfung der Stabilität des Tracers im Serum wurden gemeinsam mit Dr. Jonathan Cotton durchgeführt. Dazu wurde Balb/c nu nu Mäusen retrobulbär Blut entnommen. Das Serum wurde durch anschließende Zentrifugation gewonnen.

Zusätzlich wurde FEFuc und Fluorethanol in VE Wasser jeweils auf eine Konzentration von 200 mmol/l eingestellt. Von beiden Gemischen wurden 100 μl mit 100 μl Serum vermischt und es erfolgte eine Inkubation von einer Stunde bei 37,5 °C. Nach dieser Inkubationszeit wurden weitere 100 μl FEFuc mit 100 μl Serum gemischt. Außerdem wurden jeweils 100 μl FEFuc und Mäuseserum mit 100 μl VE-Wasser gemischt.

Zu allen 5 Proben wurden 200 μl VE-Wasser und 400 μl Acetonitril hinzugegeben. Danach erfolgte eine Messung im NMR, um die Strukturen zu bestimmen und einen potenziellen Abbau zu erkennen.

2.3 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden in Cryo-Röhrchen in einem Volumen von 1 ml bei einem Mischverhältnis von 90% FCS und 10% DMSO bei -80 °C eingefroren und

gelagert. Das Ernten der Zellen wurde mit Hilfe von Trypsin durchgeführt und die Zellen wurde mit Hilfe einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau in einer Einweg-Zählkammer gezählt.

2.3.1 Kultivierung von humanen HCT116-Zellen

Die humanen HCT116-Zellen wurden in einer Zellkulturflasche, CELLSTAR® bei 37,5 °C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Zum Wachsen brauchen die Zellen 20 ml McCoy's 5A Kulturmedium, welches mit 10% FCS und 1% PIS ergänzt wurde.

2.3.2 Kultivierung von murinen HRas-Zellen

Die murinen HRas-Zellen sind eine genetisch veränderte Zelllinie, in denen über die Zugabe von Doxycyclin ein p53 knock-out induziert werden kann. Diese Zelllinie wurden in einer Zellkulturflasche, CELLSTAR® bei 37,5 °C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Wachsen benötigen die Zellen DMEM, welches mit 10% FCS, 1% PIS, 1% NEA und 1% Pyruvat ergänzt wurde. Um den p53 knock-out aufrechtzuerhalten, benötigen die Zellen 5 µg/ml Doxycyclin.

2.3.3 Kultivierung von murinen NRas-Zellen und AMp19-Zellen

Die murinen NRas und AMp19-Zellen wurden jeweils in einer Zellkulturflasche, bei 37,5 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellkulturflasche wurde zum mit 20 ml DMEM, welches mit 10% FCS, 1% PIS und 1% NEA ergänzt wurde, befüllt.

2.3.4 Kultivierung von humanen U-87 MG-Zellen

Die humanen U-87 MG-Zellen wurden in einer Zellkulturflasche bei 37,5 °C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellkulturflasche wurde zum mit 20 ml DMEM, welches mit 10% FCS und 1% PIS ergänzt wurde, befüllt.

2.3.5 Kultivierung von murinen CT26-Zellen

Die Kultivierung der murinen CT26-Zellen erfolgte in einer Zellkulturflasche mit 20 ml RPMI-1640 Zellkulturmedium mit 10% FCS und 1% PIS in einem Brutschrank bei 37,5 °C und 5% CO₂.

2.4 Seneszenzinduktion

2.4.1 Seneszenzinduktion in humanen HCT116-Zellen

Bei den HCT116-Zellen wurde Seneszenz durch Doxorubicin-Zugabe induziert. Dafür wurde eine Wirkstoffkonzentration von 250 nM mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden verwendet. Bis zum Einsetzen der Therapie induzierten Seneszenz wurde 72 Stunden gewartet.

2.4.2 Seneszenzinduktion in murinen HRas-Zellen

Durch Doxycyclin-Entzug findet in den HRas-Zellen eine p53 Reaktivierung statt. Durch den nun wieder exprimierten Tumorsuppressor wird die Zellteilung gestoppt und in den folgenden drei Tagen Seneszenz induziert.

2.4.3 Seneszenzinduktion bei murinen NRas- und AMP19-Zellen

Die Seneszenz-Induktion erfolgte durch eine 24-stündige Behandlung mit dem Medikament CX-5461, ein RNA-Polymerase I Inhibitor, in einer Wirkungskonzentration von 500 nM, welches in DMSO verdünnt wurde. Danach benötigten die Zellen 11 Tage, um in Seneszenz überzugehen.

2.5 Expression von Komponenten des Fucosemetabolismus

2.5.1 Real-time-quantitative-Polymerasekettenreaktion

Um die mRNA-Expression der für den Fucosemetabolismus wichtigen Enzyme zu bestimmen, wurde zunächst eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt.

Es wurden von jeder Zelllinie (HCT116, NRas, HRas, AMp19) jeweils 10 Millionen senescente und normale Zellen durch die Zugabe 400 µl RNA-Lysepuffer lysiert. Im Anschluss wurde durch Nutzung des peqGold Total RNA Kit die RNA isoliert. Es wurden 1 µg der RNA in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurde die RNA und 6,25 µl oligo(DT) primer bei 65 °C für 5 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurden Nukleosidtriphosphate, 5x Buffer mit Reverser Transkriptase, SuperScript II Reverse Transkriptase, β-Mercaptoethanol und Rekombinanter Ribonuklease Inhibitor hinzugefügt und die Lösung inkubierte 55 Minuten bei 37 °C. Danach folgte eine 5-minütige Inkubation bei 95 °C. Am Ende wurde durch die Verdünnung mit destilliertem Wasser eine Konzentration von 10 ng/µl der cDNA erreicht. Mit Hilfe des LightCycler Real-Time PCR-Systems wurde eine quantitative Analyse durchgeführt. Dafür wurden pro Durchgang 1 µl der gelösten cDNA, 5 µl SYBR Green PCR Master Mix, 3 µl PCR grade Wasser und 5pmol vorwärts und rückwärts Primer verwendet. Es wurde das PCR-Programm aus Tabelle 8 verwendet. Die Expression der Fucosidase und des GDP-Fucose-Transporter wurden getestet und mit Hilfe von β-Actin wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt. Die Primer wurden mit Hilfe von primer3 und primer-blast erstellt.

Tabelle 9 PCR-Programm:

Programm	Temperatur	Zeit (h:min:sec)
Aktivierung	95 °C	00:15:00
Denaturierung	95 °C	00:00:15
Annealing	60 °C	00:00:45
Elongation	72 °C	00:00:30

} 40x

Schmelzen	65 °C	00:00:15
Abkühlen	40 °C	00:00:30

Die Genexpression wurde mit Hilfe der delta-delta-CT-Methode analysiert und zum Referenz-Gen (β -Actin) normalisiert.

2.5.2 Bicinchoninic acid Assay (BCA-Assay)

Für den BCA-Assay mussten die Zellen zunächst lysiert werden. Dafür wurden 5 ml Lysepuffer mit einer Protease-Inhibitor Tablette gemischt. Für eine Zellreihe wurden 400 μ l dieses Gemischs verwendet, der Protease-Inhibitor verhindert den Abbau der Proteine durch die Protease. Um die Proteinkonzentration in diesen 400 μ l zu bestimmen, wurde ein BCA-Assay durchgeführt.

Der Assay wurde mit Hilfe des Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Auslesen des BCA-Assays erfolgte mit Hilfe des Elisa-Geräts.

2.5.3 Western Blot Analyse

Lyse-Puffer:

2 ml 0,5 M EDTA
0,25 ml 100% Triton X-100
10 ml 1 M Tris pH 8,0
28,75 ml 87% Glycerin
459 ml VE Wasser

10fach Laufbuffer

30 g Tris
144 g Glycin
10 g SDS
1 l VE Wasser

Transferbuffer:

3,3 g Tris
15,01 g Glycin
200 ml Methanol
800 ml VE Wasser pH 8,5

Sammelgel:

3,4 ml VE Wasser
0,625 ml 0,5 M Tris pH 6,8
0,85 ml Rotiphorese 30
50 μ l 10% SDS

5 µl TEMED

50 µl APS

6x Laemmli-Buffer:

7 ml 0,5M Tris pH 6,8

3 ml Glycerol

1 g SDS

1,2 mg Bromphenolblau

600 µl β-Mercaptoethanol

10% APS

0,5 g Ammonium Persulfate

5 ml VE Wasser

Die Proteine der lysierten Zellproben wurden zunächst bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert und mit 6-fachem Lemmy Buffer vermischt. Nun wurden die Proteine mit Hilfe einer Gelelektrophorese (Sammelgel und 12% Trenngel) separiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter Anlegen einer Spannung von zunächst 80 V über 30 Minuten, anschließend 100 V bei 30 Minuten und zuletzt 60 Minuten bei 120 V. Die aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine Transfermembran übertragen. Diese wurde vor Auflegen auf das Gel durch Methanol aktiviert.

Die Übertragung erfolgte in einer Transferkammer. Diese wurde dazu mit Transferpuffer gefüllt. Die Übertragung erfolgte unter Anlegung einer Spannung von 80 V über 45 Minuten. Nach gelungenem Transfer wurde die Membran über eine Stunde mit BSA geblockt. Die Membran wurde in 3 Schritten mit 10 ml TBST gewaschen, um sie dann bei 4 °C über Nacht mit der optimalen Antikörperkonzentration zu inkubieren. Am nächsten Tag folgten drei weitere Waschgänge mit 10 ml TBST. Im nächsten Schritt inkubierte die Membran mit einem sekundären Antikörper in optimaler Konzentration bei Raumtemperatur ohne Tageslicht. Nach der Inkubation folgten erneut 3 Waschgänge mit 10 ml TBST. Die Auswertung der Membran erfolgte durch das Odessey Detektionsprogramm.

2.6 *In vitro* Tracer-Validierung

Für die *in vitro* Tracer Testung wurden Triplikate mit 1 Millionen abgezählten Zellen in 1 ml PBS angefertigt und mit 5-40 μCi Tracer für 40 Minuten bei 37,5 °C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden 3 Waschgänge mit PBS durchgeführt. Auf diese folgte eine Messung im Gamma Counter. Dafür wurden drei Standardlösungen des Tracers zu Beginn jeder Messung hinzugefügt und ebenfalls gemessen. Die Standardlösungen dienten zur Berechnung der prozentualen Dosis, welche in den Zellen aufgenommen wurde.

2.6.1 *In vitro* Up-Take Mechanismus

Um zu untersuchen, wie der Tracer in die Zellen aufgenommen wird, wurde zunächst eine 20-minütige Inkubation mit einem GLUT-Inhibitor, WZB117, bei 37 °C und 5% CO_2 durchgeführt. Daraufhin folgte eine 40-minütige Inkubation mit dem Tracer bei 37,5 °C und 5% CO_2 . Danach wurden 3 Waschgänge mit PBS durchgeführt. Auf diese folgte eine Messung im Gamma Counter. Dafür wurden drei Standardlösungen des Tracers zu Beginn jeder Messung hinzugefügt und ebenfalls gemessen. Die Standardlösungen dienten zur Berechnung der prozentualen Dosis, welche in den Zellen aufgenommen wurde.

2.7 *In vivo* Tracer-Validierung

2.7.1 PET

Zu der Testung des Tracers *in vivo* wurden drei gleiche Kleintier PET-Scanner verwendet. Die Messungen wurden über die Inveon Acquisition Workplace Software an drei Computern gesteuert. Die Scanner sind sowohl für die Messung von Mäusen als auch für die Messung von Ratten vorgesehen. Das transaxiale Gesichtsfeld beträgt 10 cm, das axiale Gesichtsfeld 12,7 cm im Zentrum verfügt der Scanner über eine räumliche Auflösung von ca. 1,4 mm. Das Material der Kristalle ist Lutetium-Oxyorthosilicat. Es wurden 55-minütige dynamische Scans und eine Transmission à 15 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurde eine

anatomische MRT-Aufnahme durchgeführt. Die Datensätze wurden im 3D-Modus histogrammiert.

2.7.2 MRT

Um dem PET-Bild eine anatomische Übersicht zu geben, wurde eine MRT-Aufnahme gemacht. Dafür wurde entweder ein 7 T BioSpec 70/30 MR Kleintier-Scanner oder ein 7 T, 300 MHz ClinScan Kleintier-Scanner mit Hilfe der zugehörigen Syngo MRT-Software verwendet. Für die Messungen wurde eine ^1H -Resonanzfrequenz von 300,4 MHz und ein B-GA 20S Gradientensystem mit einer Amplitude von 290 mT/m verwendet.

2.8 Tiermodelle

2.8.1 Rahmenbedingungen

Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Tierversuchsantrag R 9/12 und R 4/18). Es wurden zwei unterschiedliche Mausstämme verwendet. Es handelt sich dabei um BALB/c nu/nu und SCID Mäuse. Beide wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 6 Wochen geliefert. Die SCID Mäuse wurden ausschließlich für das subkutane NRas-Modell verwendet, für den Rest wurden die BALB/c nu/nu Mäuse eingesetzt. Die Tiere wurden für die Studien in der Tierhaltung des WSIC in Tübingen untergebracht. Die Unterbringung erfolgte unter konstanten Haltungsbedingungen (Raumtemperatur 20 °C, Luftfeuchtigkeit 50%). Die Mäuse wurden maximal zu fünf in einem „Typ2 Long“ „individually ventilated cages“ (IVC) unter pathogenfreien Bedingungen gehalten.

2.8.2 Vorbereitung der Mäuse für PET und MRT

Die Mäuse wurden mit 2%igem Isofluran narkotisiert. Das Gas wurde mit medizinischer Luft (21% O₂) in einem Narkosesystem RTA-0011 vermischt. Der Arbeitsplatz und die Anästhesie-Tierbox wurden durch Wärmebetten beheizt. Zur

intravenösen (i.v.) Injektion von Tracern in Mäuse wurde ein spezieller Katheter verwendet. Diese Katheter bestehen aus einer 30 G Kanüle, einem Schlauch und einer U-20-Insulinspritze. Nach einer ausreichenden Tiefe der Anästhesie wurde, der mit sterilem Heparin aufgefüllte Katheter in der Schwanzvene der Mäuse fixiert. Die Mäuse wurden danach auf PET-Betten umgelagert und mit Hilfe von Tupfern und Klebeband fixiert. Die Augen wurden während des Scans mit Cornea Gel geschützt. Die Narkose wurde mit angeschlossenen Atemmasken aufrechterhalten. Um für die Dauer der dynamischen Messungen eine genügende Wärme für die Tiere zu ermöglichen, wurde ein Warmwassersystem, zur Erwärmung der Betten, an die Tierbetten angeschlossen. Mit Hilfe eines Laserkreuzes des Scanners und der Inveon Acquisition Workplace Software wurde das „Field of view“ auf die Tumore eingestellt. Fünf Sekunden nach dem Start des PET-Scans wurden 300-350 μ Ci Tracer intravenös verabreicht.

2.8.3 Tiermodelle

2.8.3.1 Subkutanes HCT116-Modell

Für dieses Modell wurden HCT116-Zellen und Fucosidase überexprimierende HCT116-Zellen verwendet. Es wurden eine Million Fucosidase überexprimierende Zellen in 100 μ l Matrigel pro Flanke, von n=4 Mäusen injiziert. Eine Woche später wurden in weitere elf Mäuse jeweils 750.000 normale HCT116-Zellen in 100 μ l Matrigel pro Flanke der narkotisierten Mäuse injiziert. Nach einer weiteren Woche des Tumorwachstums, wurden die Mäuse mit genetisch unveränderten HCT116-Zellen randomisiert und in zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Gruppe mit n=5 Mäusen wurde mit Doxorubicin i.v. (10 mg/kg) behandelt, um Seneszenz zu induzieren. Die andere Gruppe mit n=6 Mäusen erhielt 75 μ l PBS i.v.. Beides erfolgte erneut unter Isofluran Narkose. Nach weiteren sieben Tagen wurden die PET- und MRT-Messungen durchgeführt. Die Mäuse wurden im Anschluss in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Daraufhin wurden die Tumore für Autoradiographie und H&E-Färbung entnommen und im Kryotom bei -20 °C geschnitten.

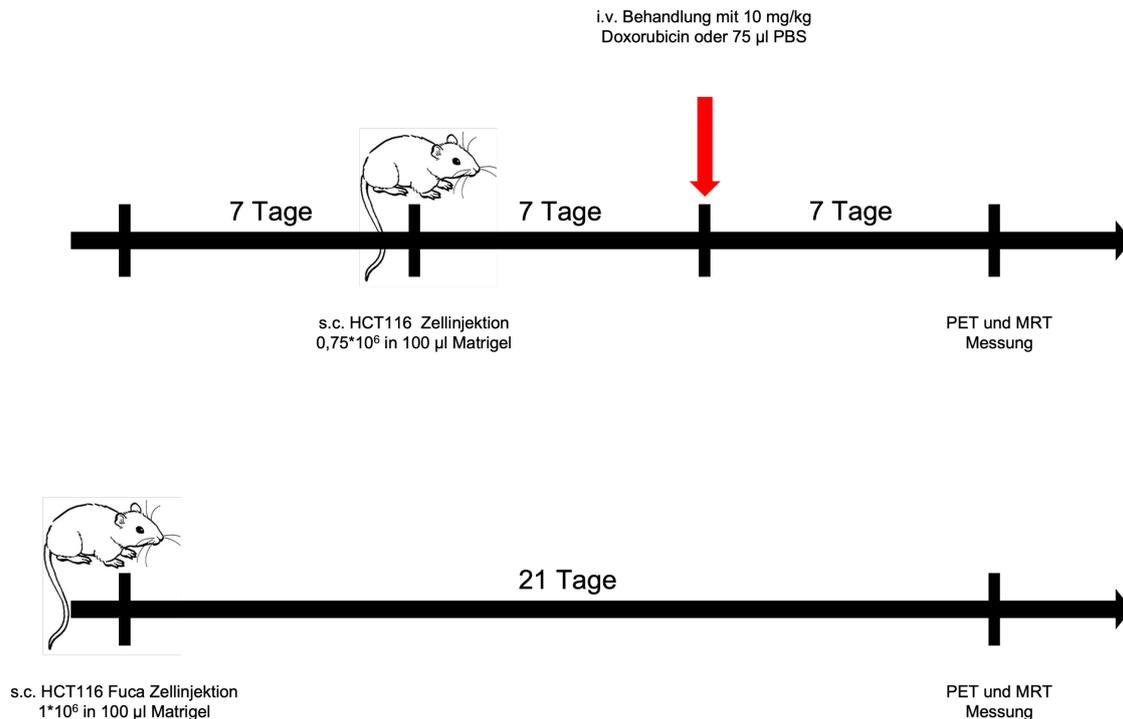


Abbildung 5: Versuchsaufbau des HCT116-Modells. Die i.v. Behandlung erfolgte mit 10 mg/kg Doxorubicin oder mit $75 \mu\text{l}$ PBS

2.8.3.2 Subkutanes HRas Modell

Bereits 5 Tage vor der Injektion von Tumorzellen wurde dem Trinkwasser der Mäuse 0.2 mg/ml Doxycyclin in einer lichtunempfindlichen Flasche zugegeben. Dann wurden $1.5 \cdot 10^6$ HRas-Zellen, in $100 \mu\text{l}$ PBS pro Flanke, in die Mäuse injiziert. Alle drei Tage wurde das Wasser ausgetauscht und neu mit Doxycyclin aufbereitet. Nach einer Woche Tumorstadium wurden die Mäuse randomisiert und in zwei Gruppen eingeteilt (mit jeweils $n=4$, $N=8$). Bei der einen Gruppe wurde das Doxycyclin entfernt und normales Wasser benutzt. Bei der anderen Gruppe wurde weiterhin alle drei Tage das Wasser durch Doxycyclin aufbereitetes Wasser ersetzt. Nach einer Woche erfolgten die PET- und MRT-Messungen. Im Anschluss wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation in

Narkose getötet. Danach wurden die Tumore entnommen und für Autoradiographie und H&E im Kryotom bei -20 °C geschnitten.

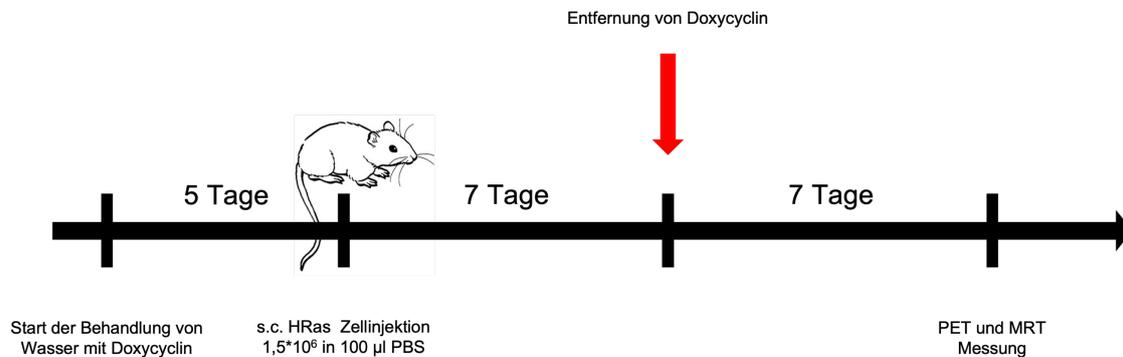


Abbildung 6: Versuchsaufbau des HRas-Modells. Durch die Entfernung von Doxycyclin wird Seneszenz induziert.

2.8.3.3 Subkutanes NRas-Modell

Es wurden pro Flanke der narkotisierten Mäuse, eine Millionen NRas-Zellen s.c. injiziert. Nach 10 Tagen Tumorwachstum wurden die Mäuse randomisiert und in 2 Gruppen eingeteilt (mit jeweils n=5, N=10). Ab dann erfolgte bei der behandelten Gruppe eine tägliche Behandlung mit 25 mg/kg CX-5461 in NaH₂PO₄-Puffer i.p. für 5 Tage, um in den Tumorzellen Seneszenz auszulösen. Bei der Kontrollgruppe erfolgte eine i.p. Behandlung mit PBS. Nach zwei weiteren Tagen wurden dann die PET/MRT-Messungen durchgeführt. Die Mäuse wurden im Anschluss in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Daraufhin wurden die Tumore für Autoradiographie und H&E-Färbung entnommen und im Kryotom bei -20 °C geschnitten.

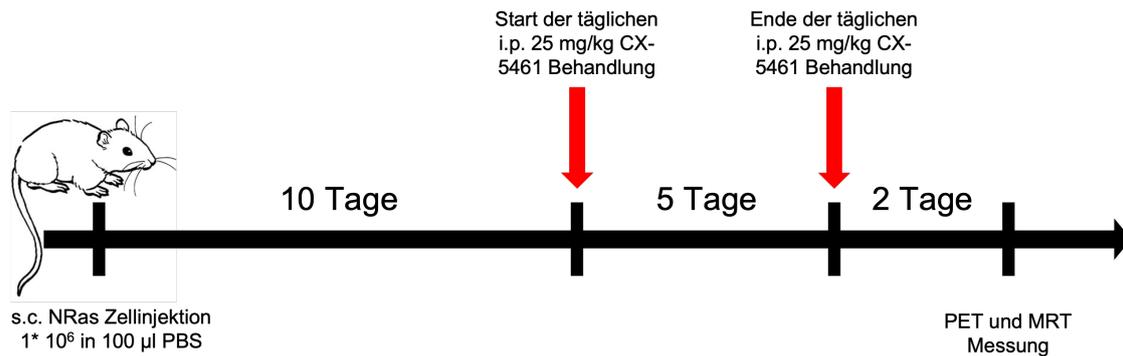


Abbildung 7: Versuchsaufbau des NRas-Modells. Die i.p. Behandlung erfolgte mit 25mg/kg CX-5461 oder mit 75 µl PBS

2.8.3.4 Subkutanes AMp19-Modell

Es wurden pro Flanke der narkotisierten Mäuse, eine Millionen AMp19-Zellen s.c. injiziert. Die Tumoren wuchsen für 14 Tage, danach erfolgte eine randomisierte Aufteilung in 2 Gruppen (mit jeweils n=2, N=4). Ab dann erfolgte bei der behandelten Gruppe eine tägliche Behandlung mit 25 mg/kg CX-5461 in NaH₂PO₄-Puffer i.p. für 5 Tage, um in den Tumoren Seneszenz auszulösen. Bei der Kontrollgruppe erfolgte eine i.p. Behandlung mit PBS. Nach zwei weiteren Tagen wurden die PET/MRT-Messungen durchgeführt. Die Mäuse wurden im Anschluss in Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Daraufhin wurden die Tumore für Autoradiographie und H&E-Färbung entnommen und im Kryotom bei -20 °C geschnitten.

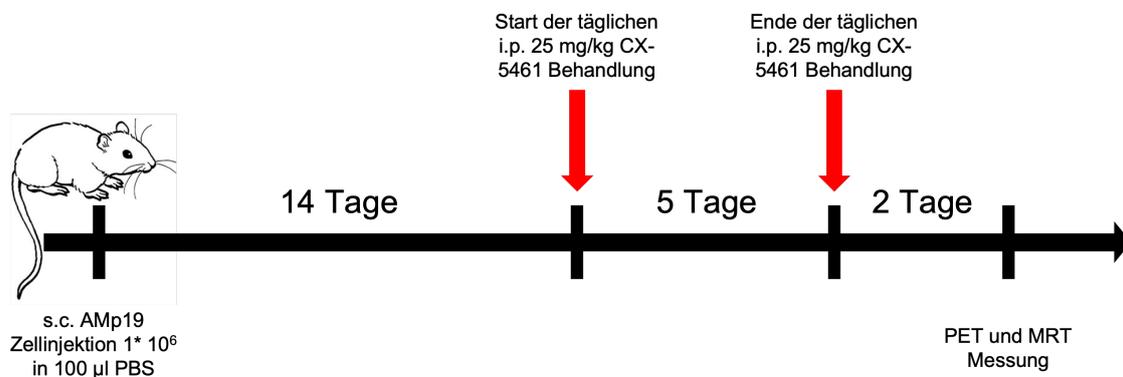


Abbildung 8: Versuchsaufbau des AMp19-Modells. Die i.p. Behandlung erfolgte mit 25 mg/kg CX-5461.

2.8.4 *Ex vivo* Tumorschnittbildgebung

Nach Tötung der Mäuse wurden die Tumore entnommen. Sie wurden sofort in TissuTec bei -20 °C fixiert. Am Kryotom wurden die Tumoren in 20 µm dicke Schnitte geschnitten und auf einem Glasobjektträger befestigt. Zwischen den aufgenommenen Schnittebenen wurden immer wieder circa 15 Schnitte verworfen.

2.8.4.1 Autoradiographie

Die Tumorschnitte auf den Objektträgern wurden auf einer Lagerplatte angeordnet und dann für maximal 8 Halbwertszeiten unter einer Phosphorplatte platziert. Danach erfolgte die Auslesung der Phosphorplatte mit Hilfe eines Phosphor Imager Storm 840.

2.8.4.2 H&E-Färbung

Im Histologie Labor der Hautklinik Tübingen erfolgt unter standardisierten Verfahren die H&E-Färbung der Tumorschnitte nach erfolgter Auslesung der Phosphorplatte. Dies erfolgte für die Kontroll- und Seneszenz-Gruppe.

2.9 Datenanalyse

2.9.1 Gamma-Counter-Analyse

Die Daten der Gamma-Counter-Messung wurden in Form einer .csv-Datei gespeichert. Diese wurde mit Hilfe des Excelprogramms zur Auswertung der Daten benutzt. Für den radioaktiven Standard wurden wie für jede Zelllinie Triplikate angefertigt. In diesem befand sich zu einem notierten Zeitpunkt immer genau 1 µCi des jeweiligen Tracers. Durch diesen fixen Wert konnte man mit Hilfe der durch den Gamma-Counter gezählten „Counts per minute“ die in den Zellen vorhandene Restaktivität bestimmen. Mit Hilfe der vorhandenen Aktivität

und der ursprünglich verwendeten Menge des Tracers ließ sich somit eine prozentuale injizierte Dosis (%ID) berechnen.

2.9.2 PET- und MRT-Datenanalyse

Die Rekonstruktion der PET-Datensätze mit der Inveon Acquisition Workplace Software wurde mit Hilfe von OSEM3D durchgeführt. Danach wurden die PET-Daten mit Hilfe der Inveon Research Workplace Software ausgewertet, die jeweiligen MRT-Datensätze wurden als anatomische Grundlage ebenfalls in diese Software eingelesen. Dadurch konnten die jeweiligen VOI der Tumore eingezeichnet werden. Eine weitere VOI befand sich bei jeder Maus im Muskelgewebe. Die VOIs geben die mittlere und die maximale Aktivität [$\mu\text{Ci/ml}$] an. Durch die mittlere Aktivität und die injizierte Anfangsaktivität kann für die Auswertung die jeweils prozentual injizierte Dosis berechnet werden – analog zu den *in vitro* Auswertungen. Diese Berechnungen konnten sowohl für den Tumor als auch für den Muskel erfolgen. Beide wurden zur besseren Beurteilung der Daten in Relation gesetzt, dadurch entstand die Tumor-Muskel-Ratio.

2.9.3 Autoradiographie-Analyse

Die Auswertung der durch den Phosphor Imager erzeugten .gel-Datensätze erfolgte mit Hilfe des Programmes Image J. Zunächst wurde die Hintergrund-Intensität von der Platte abgezogen, um die Hintergrundsignale zu korrigieren. Es erfolgte eine Normalisierung der Daten mit Hilfe der jeweils in das Tier injizierten Dosis.

2.9.4 Analyse der H&E-Schnitte

Die H&E gefärbten Schnitte wurden durch einen Nanozoomer digitalisiert. Die Darstellung der H&E-Schnitte erfolgte mit der Software NDP.view 1.2.41. In der Auswertung wurde darauf geachtet, dass die Tumore keine zu großen

nekrotischen oder fibrotischen Bereiche aufwiesen, da sie ansonsten nicht in die Analyse eingeschlossen werden konnten.

2.10 Statistische Auswertung

Zunächst wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests getestet, ob eine Stichprobe normalverteilt ist. Bei einer Normalverteilung der Daten wurde anschließend ein Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben verwendet, um nachzuweisen, dass sich die Mittelwerte beider Gruppen signifikant unterscheiden. Bei keiner Normalverteilung wurden die Daten mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verglichen. Alle statistischen Testverfahren wurden mit Hilfe der Graph Pad Prism 7.0 durchgeführt. Als signifikant wurden die Daten betrachtet, wenn: $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$, $p < 0.0001^{****}$.

3 Ergebnisse

3.1 Mikroskopie seneszenten Zellen

Zu Beginn der Arbeiten wurde durch Durchlichtmikroskopie seneszenz-typische Veränderungen an Tumorzellen *in vitro* untersucht. In Abbildung 9 sind Tumorzellen unbehandelt und nach Seneszenzinduktion exemplarisch dargestellt. Die seneszenten Zellen sind abgeflacht und im Vergleich zu den unbehandelten Tumorzellen vergrößert.

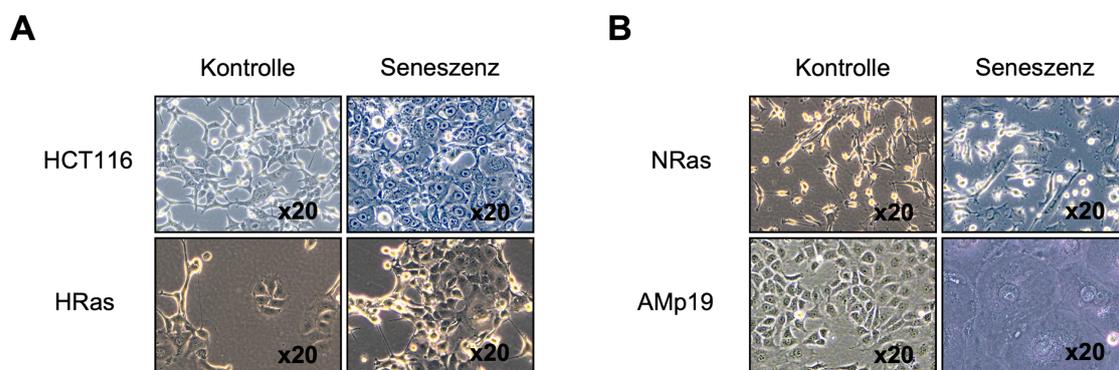


Abbildung 9: Aufnahmen der Kontrollzellen und der seneszenten Zellen. **9A** Die mit Doxorubicin Seneszenz induzierten HCT116-Zellen zeigen sich vergrößert und abgeflacht im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Bei den HRas-Zellen zeigen sich nach der Seneszenzinduktion durch Doxycyclin-Entzug leicht vergrößerte Zellen im Vergleich zu den weiterhin mit Doxycyclin behandelten Zellen. **9B** Sowohl bei den NRas- als auch bei den AMp19-Zellen zeigt sich durch die Seneszenzinduktion mit CX-5641 eine deutlich vergrößerte und abgeflachte Zellform im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

3.2 Expression des Fucose-Metabolismus

3.2.1 Fucose-Metabolismus auf mRNA Ebene

Seneszenz induziert Veränderungen im Metabolismus der Zellen. Im Rahmen der Fragestellung interessierten uns dabei Veränderungen in der Expression der α -Fucosidase und des GDP-Fucose-Transporters. Durch qPCR-Analyse wurde

die mRNA-Expression beider Gene vor und nach Seneszenzinduktion analysiert. Als „House-keeping Gen“ wurde β -Actin zur relativen Quantifizierung verwendet.

Durch die Seneszenzinduktion wurde sowohl die mRNA-Expression der α -Fucosidase als auch die des GDP-Fucose-Transporters gesteigert. Es zeigt sich eine deutlich höhere mRNA-Expression der α -Fucosidase in den Seneszenz-induzierten Zellen als bei den nicht seneszenten Zellen (Abbildung 10A). Außerdem fand sich eine deutlich höhere mRNA-Expression des GDP-Fucose-Transporters bei den Seneszenz-induzierten Zellen als bei den nicht seneszenten Zellen (Abbildung 10B).

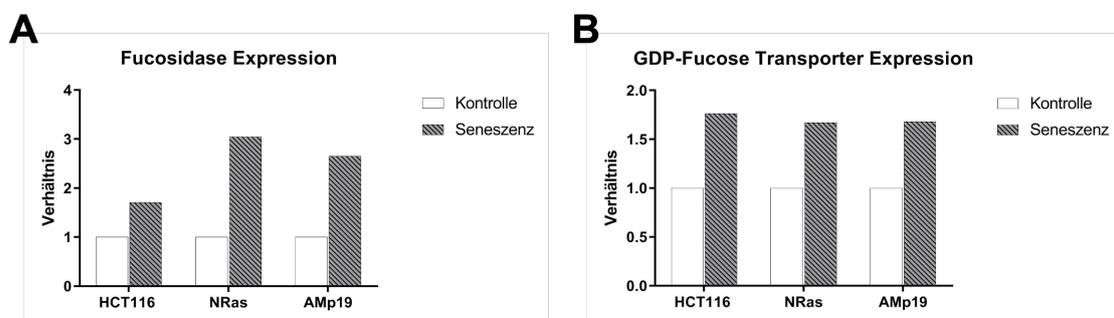


Abbildung 10: Expression des Fucosemetabolismus auf mRNA-Ebene bei seneszenten und normalen Tumorzellen. Die α -Fucosidase (**10A**) und GDP-Fucose-Transporters (**10B**) mRNA-Expression war in allen seneszenten Zelllinien im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erhöht, (n=1).

3.2.2 Fucosidase-Metabolismus auf Proteinebene

Nachdem durch qPCR-Analyse eine erhöhte mRNA-Expression der α -Fucosidase in seneszenten Zellen nachgewiesen wurde, sollte diese Regulation nun auf Proteinebene bestätigt werden. Die Expression von Proteinen wird wesentlich über die Transkription der mRNA reguliert. Allerdings kann über post-transkriptionelle Mechanismen, zum Beispiel durch Phosphorylierung oder über den mTOR-Signalweg, die Translation von Proteinen verändert werden. Die Proteinexpression wurde durch Western Blot-Analyse quantifiziert.

Die α -Fucosidase-Proteinexpression in den HCT116-Zellen wurde an 3 Tagen nach Doxorubicin-Behandlung untersucht. Im Verlauf der Seneszenzinduktion zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der α -Fucosidase-Expression. Als Positivkontrolle kam die α -Fucosidase überexprimierende HCT116 Zelllinie – Fuca – zum Einsatz (Abbildung 11A).

Die Expression der α -Fucosidase war bei den HRas-Zellen ebenfalls nach Seneszenzinduktion erhöht (Abbildung 11B). Bei den NRas-Zellen, welche die deutlichste Hochregulation auf mRNA-Level zeigten, stellte sich die geringste Zunahme der α -Fucosidase-Proteinexpression im Western Blot dar (Abbildung 11D). Dagegen zeigte sich in den Amp19-Zellen nach Seneszenzinduktion ein deutlicher Anstieg der α -Fucosidase-Expression (Abbildung 11C).

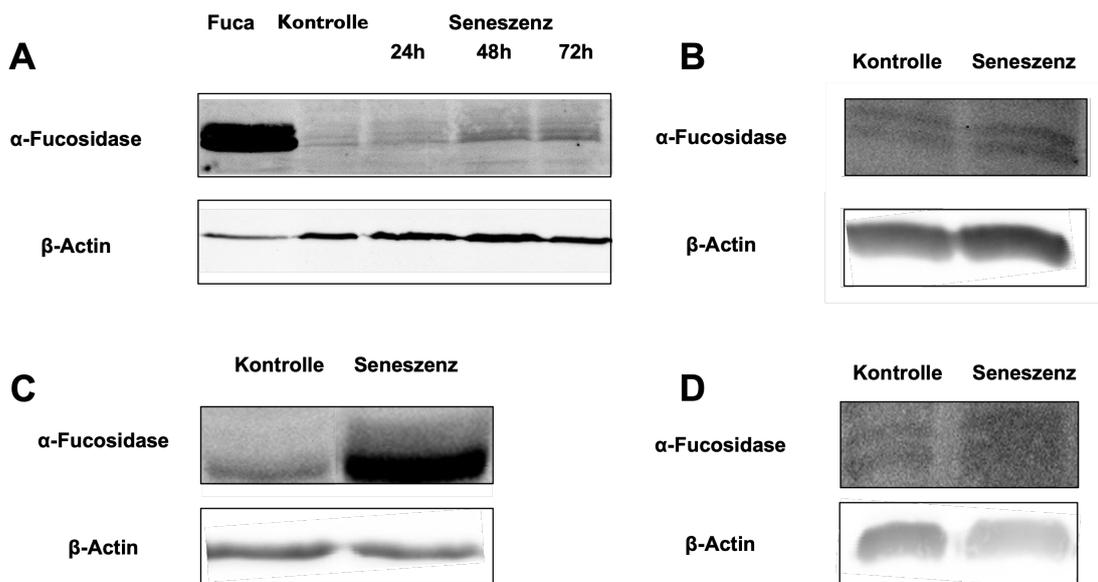


Abbildung 11: Expression der α -Fucosidase auf Protein-Ebene bei seneszenten und normalen Tumorzellen. **11A** Western Blot-Analyse der α -Fucosidase Expression in HCT116-Zellen. **11B** Western Blot Analyse der α -Fucosidase-Expression in HRas-Zellen. **11C** Western Blot Analyse der α -Fucosidase-Expression in Amp19-Zellen. **11D** Western Blot Analyse der α -Fucosidase-Expression in NRas-Zellen.

3.2.3 GLUT1-Expression auf Proteinebene

Über GLUT-Transporter werden Monosaccharide aktiv in die Zelle aufgenommen. Beide Tracer, der [^{18}F]FpyGal- und der [^{18}F]FEFuc-Tracer, basieren auf einem Monosaccharid. Daher stellen die GLUT-Transporter einen potenziellen Aufnahmemechanismus der Tracer in die Zellen dar. Somit galt es zu überprüfen, ob es zu einer verstärkten Expression der GLUT-Transporter in seneszenten Zellen kommt. Es wurde eine Western Blot Analyse des GLUT1-Transporters durchgeführt, da dieser zumeist in Tumorzellen exprimiert wird. In HCT116-Zellen zeigte sich eine geringe Expression des GLUT1-Transporters in seneszenten Zellen. In HRas- und AMP19-Zellen war keine Veränderung der GLUT1-Expression nach Seneszenzinduktion sichtbar. Lediglich bei den NRas-Zellen zeigte sich eine höhere Expression des GLUT1-Transporters in seneszenten Zellen (Abbildung 12).

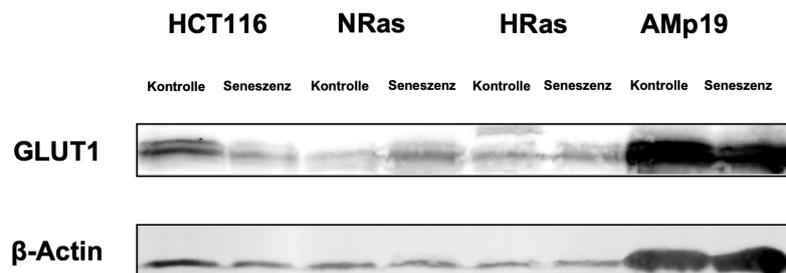


Abbildung 12: Expression des GLUT1-Transporters in seneszenten und normalen Tumorzellen.

3.3 *In vitro* Tracer Up-Take

3.3.1 [¹⁸F]FEFuc-Tracer

Seneszente Zellen zeigen einen erhöhten Fucose-Metabolismus. Diese Beobachtung war Ausgangspunkt der Überlegungen, den [¹⁸F]FEFuc-Tracer spezifisch zur Detektion seneszenten Zellen einzusetzen. Ursprünglich sollte der Tracer in direktem Zusammenhang mit der α -Fucosidase stehen. Im Verlauf der Experimente stellte sich jedoch heraus, dass es keine direkte Interaktion zwischen der α -Fucosidase und dem Tracer gab. Allerdings konnten wir erste vielversprechende Resultate erzielen, die einen Einsatz des Tracers sinnvoll erschienen ließen.

Zunächst sollte der [¹⁸F]FEFuc-Tracer *in vitro* getestet werden. Hier stellte sich jedoch die Frage, mit welcher Dosis des Tracers pro einer Million Tumorzellen gearbeitet werden sollte. Um die richtige Dosis des Tracers zu ermitteln, wurden unterschiedliche Konzentrationen in der humanen HCT116-Kolonkarzinom-Zelllinie getestet. Für diese Analysen wurden drei unterschiedlich Arten von HCT116-Zellen eingesetzt, um den Fucose-Metabolismus zu untersuchen. Es handelte sich dabei um die oben vorgestellten Fucosidase überexprimierende HCT116-Zellen – Fuca, die durch Doxorubicin induzierten seneszenten Zellen und die unbehandelten HCT116-Zellen. Es wurden 4 unterschiedliche Dosen des Tracers von 5-40 μ Ci gewählt und für 40 Minuten inkubiert. Um eine ausreichende Abgrenzung des [¹⁸F]FEFuc-Tracers gegenüber der Hintergrundaktivität des Gamma-Counter zu gewährleisten, betrug die geringste Dosis 5 μ Ci.

Der [¹⁸F]FEFuc-Tracer wurde auf eine Million der jeweiligen Zellen titriert. Für jede Versuchsgruppe wurden Triplikate angefertigt. Bei einer verwendeten Aktivität von 5 μ Ci wurde im Verhältnis zur eingesetzten Dosis die höchste Menge an Tracer in die jeweiligen Zelllinien aufgenommen (Abbildung 13).

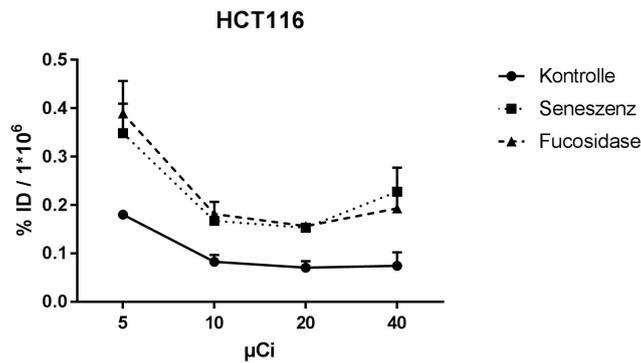


Abbildung 13: *in vitro*, [¹⁸F]FEFuc-Tracer Konzentrationskurve. Verwendet wurden HCT116-Zellen (Fucosidase überexprimierende HCT116-Zellen, seneszente HCT116-Zellen und normale HCT116-Zellen). Es wurden jeweils Triplikate von eine Millionen Zellen mit unterschiedlichen Tracerkonzentrationen (5 µCi, 10 µCi, 20 µCi und 40 µCi) inkubiert (n=1). Die Daten werden als Mittelwert der Triplikate ± Standardabweichung dargestellt.

Nachdem die optimale Dosis für die nachfolgenden Versuche feststand, 5 µCi, wurde im nächsten Schritt der Tracer in unterschiedlichen seneszenten und nicht seneszenten Zelllinien *in vitro* getestet.

Dabei wurden erneut die HCT116-Zelllinien verwendet. Anhand dieser erfolgte die *in vitro* [¹⁸F]FEFuc-Tracer-Testung an einem Therapie-induzierten Seneszenz-Modell. Weiterhin wurde durch die HCT116-Fuca-Zellen eine Untersuchung des Einflusses des Fucose-Stoffwechsels auf die Traceraufnahme getestet. Nach Seneszenz-Induktion durch Doxorubicin zeigten die behandelten HCT116-Zellen eine signifikant höhere Traceraufnahme als unbehandelte HCT116-Zellen (Abbildung 14A). Weiterhin wiesen auch die genetisch veränderten HCT116-Fuca-Zellen eine signifikant höhere Traceraufnahme als die genetisch unveränderten HCT116-Zellen auf (Abbildung 14B).

Um den [¹⁸F]FEFuc-Tracer zusätzlich bei Onkogen-induzierter Seneszenz zu testen, wurde die murine Leberzellkarzinomzelllinie HRas verwendet. Bei diesen Zellen wird über Doxycyclin-Gabe eine Repression des Tumorsuppressors p53 induziert. Durch Doxycyclin-Entzug kommt es nach 3 Tagen zur Reaktivierung des Tumorsuppressors und dadurch zum Zellzyklusstopp mit konsekutiver Seneszenzinduktion. In den so behandelten seneszenten HRas-Zellen war eine

signifikant höhere Traceraufnahme im Vergleich zu den Doxycyclin behandelten Zellen nachweisbar (Abbildung 14C).

Ribosomaler Stress kann ebenfalls Seneszenz auslösen. Dieser Vorgang wird als Ribosomale Checkpoint induzierte Seneszenz bezeichnet. Der Einfluss von RCIS auf die Traceraufnahme wurde in den murinen Leberzellkarzinomzelllinie NRas und AMp19 analysiert.

NRas-Zellen wurden für 24 Stunden mit einem RNA-Polymerase Inhibitor I, CX-5461, behandelt. Nach 11 Tagen kam es in den Zellen zur RCIS. In den seneszenten NRas-Zellen kam es im Vergleich zu den unbehandelten NRas-Zellen zu einer signifikant höheren Traceraufnahme (Abbildung 14D).

Analog zu den NRas-Zellen wurden auch AMp19-Zellen mit CX-5461 behandelt, um RCIS zu induzieren. Auch in den AMp19-Zellen kam es nach RCIS zu einer deutlich gesteigerten Traceraufnahme (Abbildung 14E).

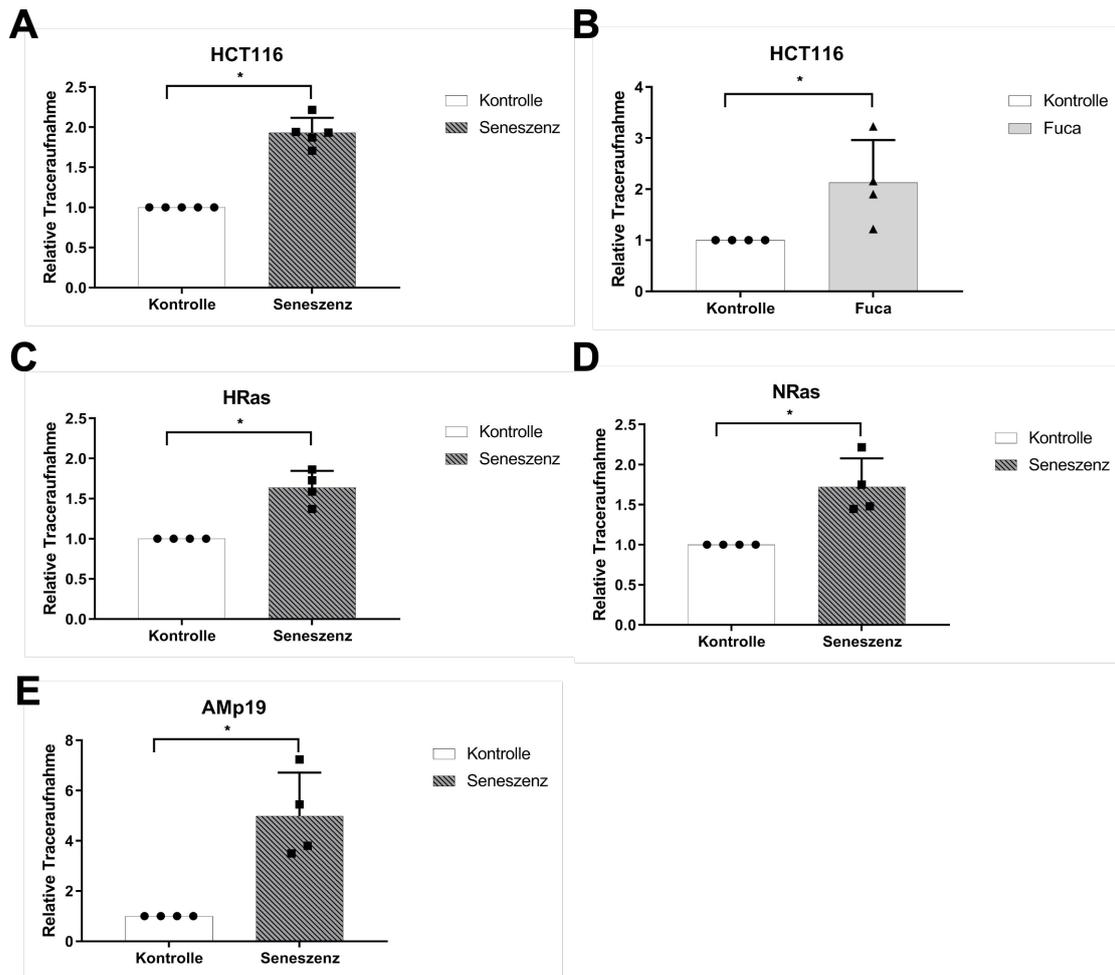


Abbildung 14: Die Aufnahme des $[^{18}\text{F}]\text{FEFuc}$ -Tracers wurden in verschiedenen Zelllinien mit Triplikaten pro Versuch nach Induktion verschiedener Formen des Seneszenz analysiert. **14A** Traceraufnahme der durch die Doxorubicin-Behandlung induzierten seneszenten HCT116-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten HCT116-Zellen (n=5). **14B** Traceraufnahme der Fucosidase überexprimierenden HCT116-Zellen im Vergleich zu den genetisch unveränderten HCT116-Zellen (n=4). **14C** Traceraufnahme der durch p53 reaktivierten seneszenten HRas-Zellen im Vergleich zu den weiterhin durch Doxycyclin p53 reprimierten HRas-Zellen (n=4). **14D** Traceraufnahme der durch CX-5461 induzierten seneszenten NRas-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten NRas-Zellen (n=3). **14E** Traceraufnahme der durch CX-5461 induzierten seneszenten AMp19-Zellen im Vergleich zu den unbehandelten AMp19-Zellen (n=4). Die Daten von A bis E werden als Mittelwert der Triplikate dargestellt. Die Standardabweichung bezieht sich auf die unabhängigen Versuche n und die Daten wurden mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***) und $p < 0.0001$ (****) betrachtet.

3.3.2 [¹⁸F]FEFuc-Tracer Mechanismus

Nachdem eine signifikant höhere Traceraufnahme in allen Zelllinien nach Seneszenzinduktion nachgewiesen werden konnte, erfolgte durch zwei unterschiedliche Versuche die Untersuchung des Tracer-Mechanismus. Als Zielsubstanz des Tracers war die lysosomale α -Fucosidase geplant, für welche Deoxyfuconojirimycin einen kompetitiven Inhibitor darstellt. Um die Wirkungen einer Inhibition der Fucosidase auf den Tracer-Metabolismus zu untersuchen, wurden unterschiedliche Konzentrationen von Deoxyfuconojirimycin zusätzlich zu den 5 μ Ci [¹⁸F]FEFuc auf eine Million HCT116-Zellen gegeben. Es zeigte sich jedoch keine geringere Traceraufnahme, sondern bei 1 mM Deoxyfuconojirimycin sogar eine höhere Traceraktivität als ohne die Zugabe des Inhibitors (Abbildung 15A). In einem weiteren Versuch wurde die Auswirkung von nicht radioaktiven FEFuc auf die Traceraufnahme untersucht. Dafür wurden unterschiedliche Konzentrationen des kalten Tracers zusätzlich zu den 5 μ Ci auf eine Million HCT116-Zellen gegeben. Dabei zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung in der Traceraktivität (Abbildung 15B). Die Inkubation erfolgte jeweils für 40 Minuten bei 37,5 °C und 5% CO₂.

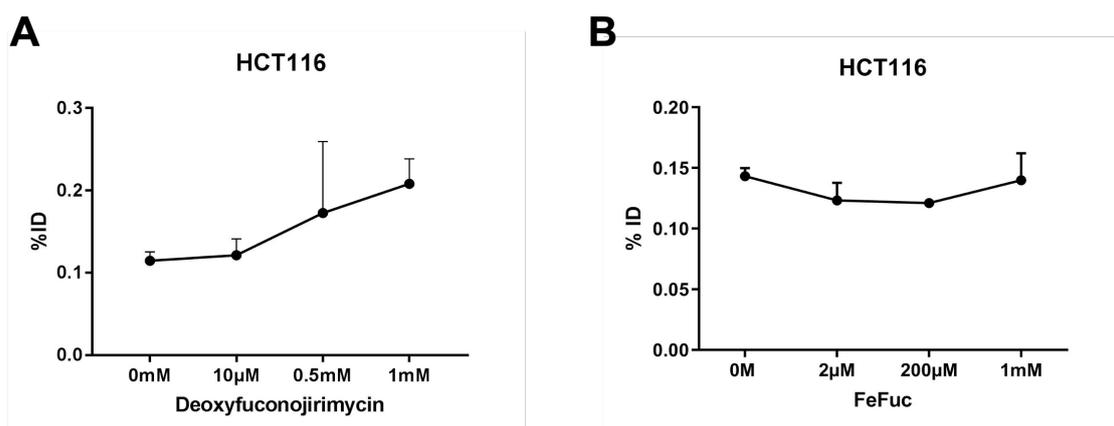


Abbildung 15: *in vitro*, Untersuchung des [¹⁸F]FEFuc-Tracer-Mechanismus bei Triplikaten pro Versuch. **15A** Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des kompetitiven Fucosidase Inhibitors, Deoxyfuconojirimycin zu 5 μ Ci [¹⁸F]FEFuc auf 1 Million HCT116-Zellen. **15B** Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des kalten [¹⁸F]FEFuc zu den 5 μ Ci radioaktiven [¹⁸F]FEFuc auf 1 Million HCT116-Zellen. Die Versuche wurden mit Triplikaten durchgeführt. (n=1)

3.3.3 [¹⁸F]FDG

Der Transport vieler Monosaccharide durch die Zellmembran erfolgt mit Hilfe von transmembranösen Transportproteinen, den sogenannten GLUT-Proteinen. Das bekannteste Substrat der GLUT-Transporter ist Glucose, [¹⁸F]FDG ist der am meisten verbreitete Tracer in der klinischen Bildgebung. Durch die Blockierung des Transporters sollten die Zellen [¹⁸F]FDG nicht mehr aufnehmen können. WZB117 ist ein irreversibler GLUT-Inhibitor. Die jeweiligen Zellen wurden zunächst 20 Minuten mit unterschiedlichen Dosen des GLUT-Inhibitors inkubiert. Danach wurden 20 µCi [¹⁸F]FDG für ebenfalls 20 Minuten hinzugegeben. Es zeigte sich für alle drei verwendeten Zelllinien (HCT116, U-87 MG und CT26) eine starke Reduktion der Traceraufnahme bei steigender WZB117-Dosis (Abbildung 16A, 16B, 16C). Bei 100 nM sank die [¹⁸F]FDG-Traceraufnahme in HCT116-Zellen um 97,09%, in U-87 MG-Zellen um 93,91% und in CT26-Zellen um 85,30% (Abbildung 16D).

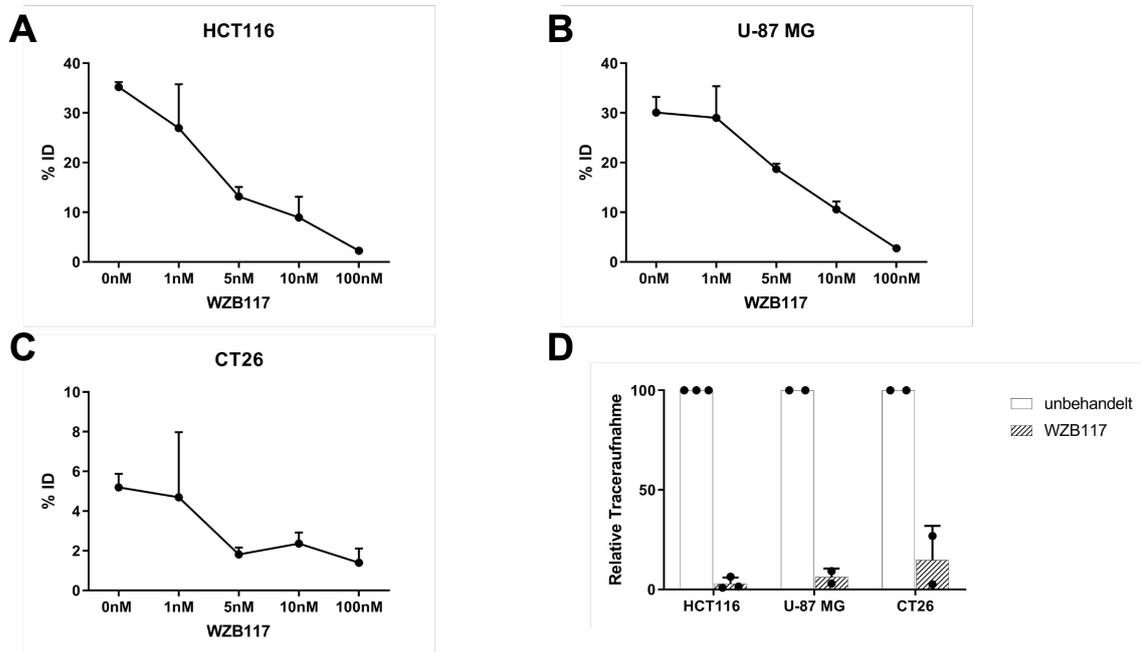


Abbildung 16: *in vitro*, Untersuchung von dem Transportmechanismus des $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Tracers bei Triplikaten pro Versuch. **16A** Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des irreversiblen GLUT-Inhibitors WZB117 zu jeweils eine Million HCT116-Zellen und daraufhin folgend eine Zugabe von 20 μCi des $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Tracers. **16B** Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des irreversiblen GLUT-Inhibitors WZB117 zu jeweils eine Million U-87 MG-Zellen und daraufhin folgend eine Zugabe von 20 μCi des $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Tracers. **16C** Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des irreversiblen GLUT-Inhibitors WZB117 zu jeweils einer Million CT26-Zellen und daraufhin folgend eine Zugabe von 20 μCi des $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Tracers. **16D** Relative $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ -Traceraufnahme nach Behandlung der Zellen mit WZB117 in Beziehung zu einer Behandlung mit der Kontrollsubstanz (HCT116; n=3, U-87 MG und CT26; n=2).

3.3.4 $[^{18}\text{F}]\text{FpyGal}$

Nachdem die Potenz des GLUT-Inhibitors WZB117 zur Blockierung des Transports von $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ in die Zellen erfolgreich nachgewiesen wurde, erfolgte nun die Testung des $[^{18}\text{F}]\text{FpyGal}$ -Tracers. Es wurden sowohl normale HCT116-Zellen als auch durch Doxorubicin Seneszenz-induzierte HCT116-Zellen verwendet. Es wurde zunächst wieder eine 20-minütige Inkubation mit WZB117 in unterschiedlichen Dosen durchgeführt. Daraufhin folgte eine 20-minütige Zugabe von 20 μCi des $[^{18}\text{F}]\text{FpyGal}$ -Tracers. Sowohl bei den normalen als auch bei den seneszenten HCT116-Zellen zeigte sich bei ansteigender WZB117-Dosis

eine Reduktion der Traceraufnahme (Abbildung 17A). Bei einer Konzentration von 100nM zeigte sich eine Reduktion der Traceraufnahme in normalen HCT116-Zellen von 68,65% und in seneszenten HCT116-Zellen von 65,05% (Abbildung 17B).

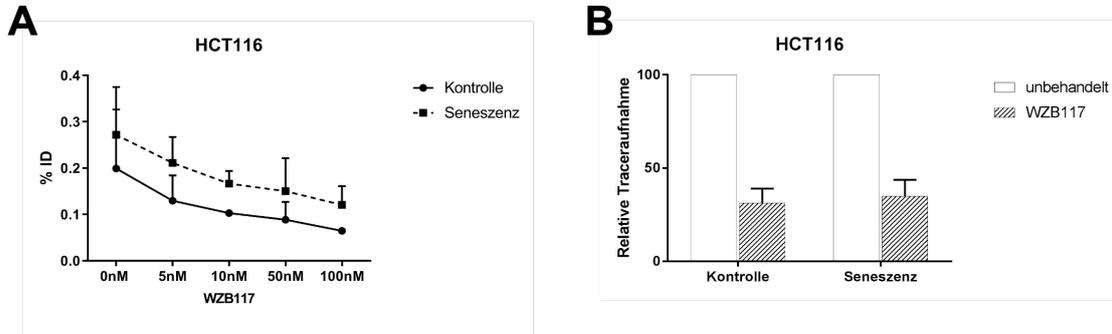


Abbildung 17: *In vitro* Untersuchung des Transportmechanismus des [¹⁸F]FpyGal-Tracers bei Triplikaten pro Versuch. **17A** Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des irreversiblen GLUT-Inhibitors WZB117 zu jeweils eine Million normaler und seneszenten HCT116-Zellen und anschließender Zugabe von 20 µCi des [¹⁸F]FpyGal-Tracers bei Triplikaten (n=1). **17B** Relative [¹⁸F]FpyGal-Traceraufnahme nach Behandlung der Zellen mit 100nmol WZB117 in Beziehung zu einer Behandlung mit der Kontrollsubstanz bei Triplikaten pro Versuch. (n=3).

3.4 *In vivo* [¹⁸F]FEFuc-Evaluation

Die *in vitro* Versuche hatten eine höhere Traceraufnahme in allen Seneszenz induzierten Zellen gezeigt. Diese Ergebnisse waren sowohl für die seneszenten Zelllinien wie auch für die Fucosidase überexprimierende Zelllinie signifikant. Daher sollte im nächsten Schritt die Relevanz der Beobachtung *in vivo* getestet werden.

3.4.1 Tracerstabilität

Das folgende Experiment wurde gemeinsam mit Dr. Jonathan Cotton durchgeführt. Für alle *in vivo* Tracer-Versuche ist von höchster Relevanz, dass der Tracer nicht schnell im Blut der Maus abgebaut bzw. verstoffwechselt wird. Daher erfolgten Experimente, um die Stabilität des FEFuc-Tracers im Serum der Maus zu analysieren. Der FEFuc-Tracer wurde dazu für eine Stunde mit Serum bei 37,5 °C inkubiert. Danach wurde der verbleibende FEFuc-Tracer durch NMR-Messung bestimmt.

Neben der eigentlichen Messung der Stabilität des FEFuc-Tracers im Serum über eine Stunde wurden entsprechende Kontrollexperimente durchgeführt. Es handelt sich hierbei um die NMR-Messung des Serums allein, des FEFuc-Tracers im Serum ohne einstündige Inkubation, der NMR-Messung des Fluorethanol nach einer Stunde Inkubation im Serum, sowie der NMR-Messung des FEFuc-Tracers in VE Wasser (Abbildung 18A).

Außerdem wurde auch Fluorethanol mit Serum inkubiert. Es wäre bei einer Metabolisierung des Tracers ein mögliches Abbauprodukt. Die NMR-Peaks des FEFuc-Tracers (Abbildung 18B) unterscheiden sich stark von denen des Fluorethanol (Abbildung 18C).

Die NMR-Peaks des FEFuc-Tracers in VE-Wasser, sowie des FEFuc-Tracers im Serum unterscheiden sich nicht. Weiterhin zeigen sich auch nach einer Stunde Inkubation des FEFuc-Tracers im Serum keine Hinweise auf Metabolite. Der Tracer ist somit im Serum stabil.

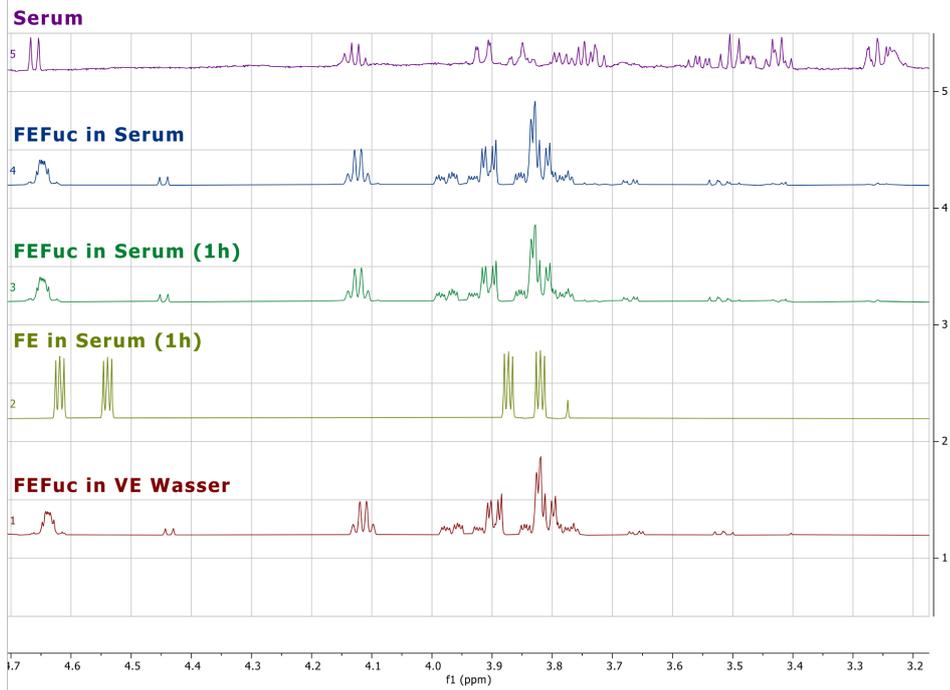
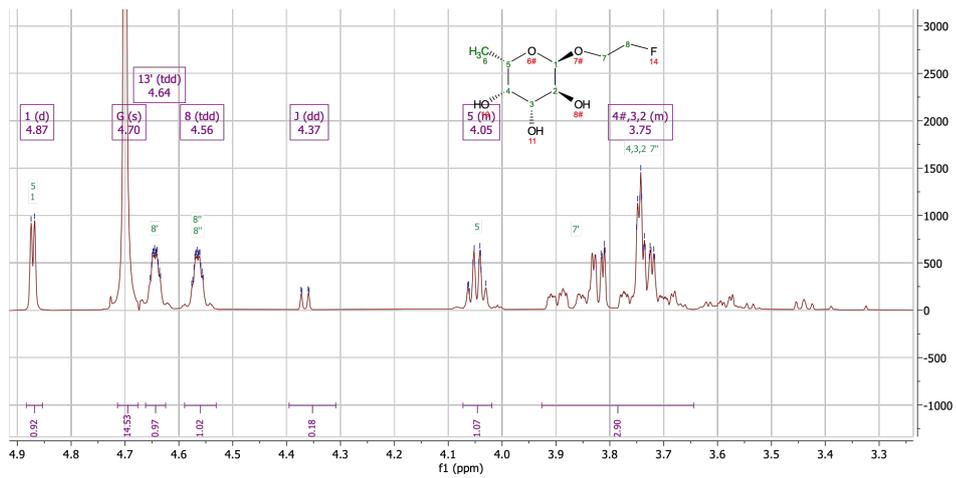
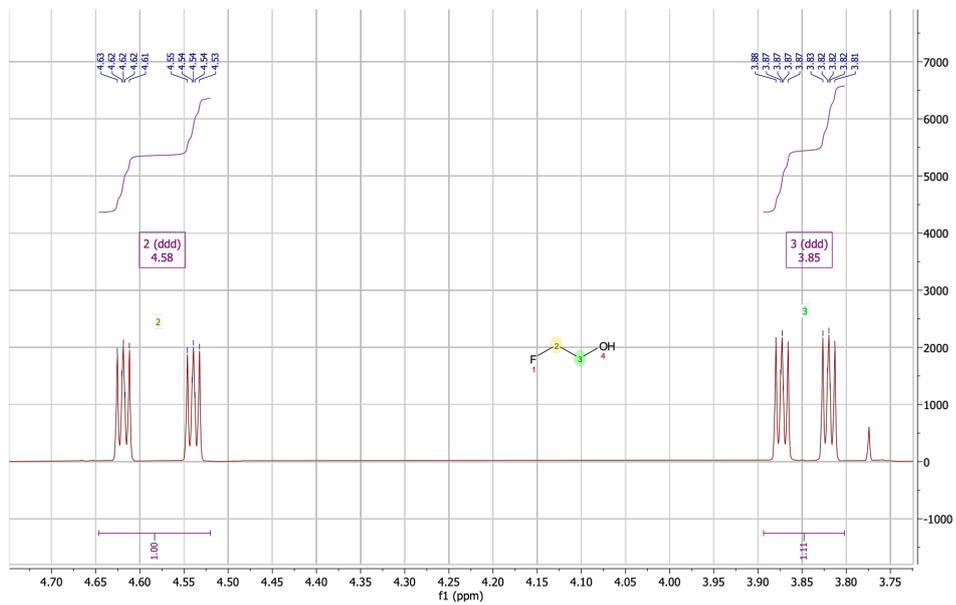
A**B****C**

Abbildung 18: Die Stabilität des [¹⁸F]FEFuc-Tracers wurde über NMR-Messungen geprüft. **18A** nach entsprechender Inkubation erfolgten NMR-Messungen und die im Inkubationsansatz enthaltenen Substanzen wurden quantifiziert. Die erste Zeile zeigen Messungen der NMR-Peaks von normalen Serum, die zweite Zeile zeigt die NMR-Peaks des FEFuc-Tracers im Serum ohne Inkubation, die dritte Zeile zeigt die NMR-Peaks des FEFuc-Tracers nach einer Stunde Inkubation im Serum, die vierte Zeile zeigt die NMR-Peaks des Fluorethanol nach einer Stunde Inkubation im Serum, die fünfte Zeile zeigt die NMR-Peaks des FEFuc-Tracers ohne Seruminkubation. **18B** zeigt die Bestandteile der NMR-Peaks des FEFuc-Tracers. **18C** zeigt die Bestandteile der NMR-Peaks von Fluorethanol.

3.4.2 PET/MRT *in vivo* Messung bei HCT116-Tumoren

Um den [¹⁸F]FEFuc-Tracer bei einer Therapie-induzierten Seneszenz zu testen, wurden als Grundlage dieser Experimente die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT116 verwendet. Diese wurden jeweils subkutan in beide Flanken von BALB/c-nu/nu-Mäusen in Kombination mit Matrigel injiziert. Die Zellen konnten innerhalb einer Woche anwachsen und sich vermehren. Danach wurden die Mäuse nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen aufgeteilt. Bei der einen Gruppe erfolgte eine intravenöse Behandlung mit Doxorubicin von 10 mg/kg Körpergewicht. Bei der anderen Gruppe wurden 75 µl PBS (Lösungssubstanz) intravenös verabreicht. Nach einer weiteren Woche wurde eine dynamische PET-Messung durchgeführt. Dadurch war es möglich, den Effekt der Seneszenz-induzierenden Doxorubicin Therapie zu analysieren. Unmittelbar im Anschluss erfolgte eine MRT-Untersuchung, um ein anatomisches Bild zu generieren. Im weiteren Verlauf wurden die Mäuse getötet, die Tumoren präpariert und mit Hilfe eines Kryotoms Schnitte für weitere Untersuchungen angefertigt.

Zunächst wurde eine autographische Untersuchung der Schnitte durchgeführt, der eine H&E-Färbung folgte. In Abbildung 19A ist exemplarisch das Ergebnis einer PET-Untersuchung dargestellt. Es zeigt sich dabei eine deutlich erhöhte Traceraufnahme in der Region des Tumors bei den Doxorubicin behandelten Tieren im Vergleich zu den mit der Lösungssubstanz behandelten Kontrollmäusen. Die histopathologische Charakterisierung in der H&E-Färbung zeigt in beiden Gruppen keine größeren nekrotischen oder zystischen Bereiche im Tumor oder im peri-tumorösen Gewebe.

In den exemplarisch ausgewählten Autoradiographien der Tumorschnitte zeigte sich eine deutlich verstärkte Tracer-Aktivität in den Tumoren, in denen durch Doxorubicin-Behandlung Seneszenz induziert wurde (Abbildung 19A). In den durch Lösungssubstanz behandelten Kontrolltieren war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt.

Der dynamische PET-Scan ergab ein signifikant höheres Tumor-Muskel-Verhältnis in der Doxorubicin behandelten seneszenten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) (Abbildung 19B). In Abbildung 19C wird exemplarisch die prozentuale Traceraufnahme der Tumoren nach 25 Minuten gezeigt. Dies ergab einen hoch signifikanten Unterschied zwischen der Seneszenz- und der Kontrollgruppe.

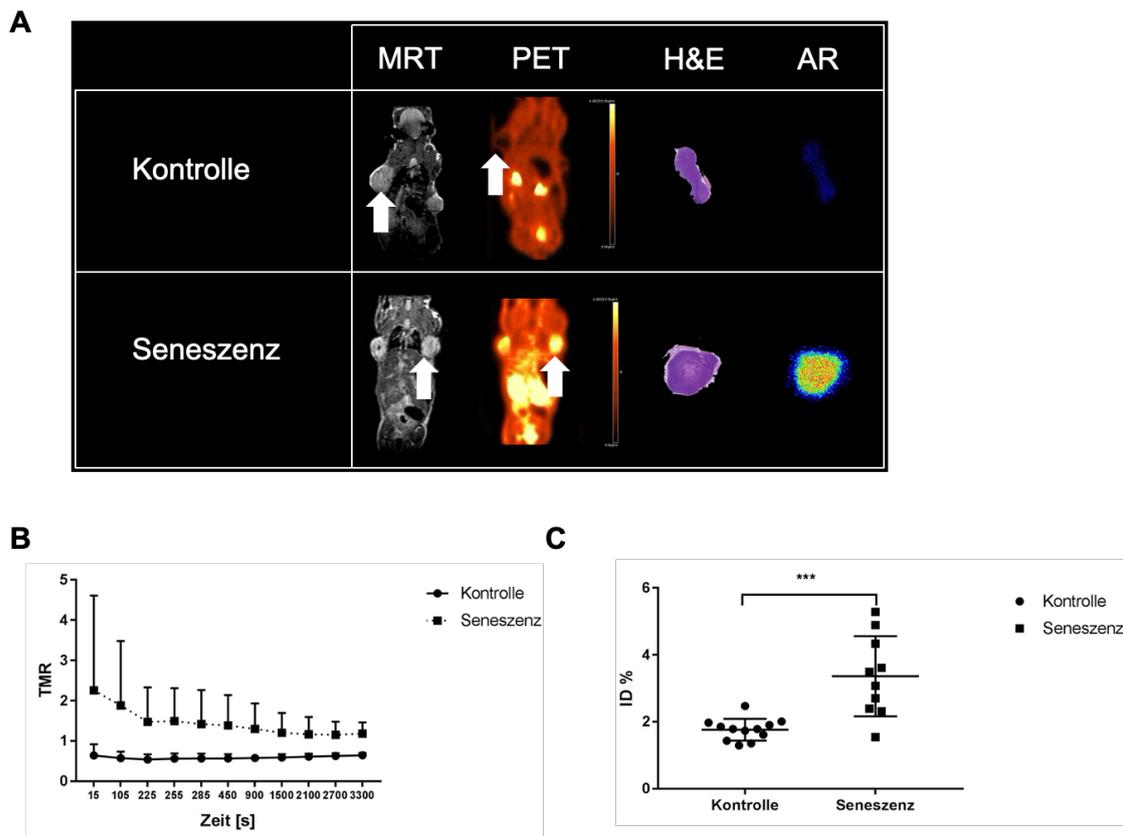


Abbildung 19: Für die *in vivo* Tracer-Untersuchungen wurde die humane HCT116 Kolonkarzinomzelllinie verwendet. **19A** Für die Seneszenz- und Kontrollgruppe wird jeweils exemplarisch ein MRT-Scan, ein PET-Bild, eine histopathologische Untersuchung (H&E-Färbung) sowie eine Autoradiographie gezeigt. **19B** Es wird das Verhältnis des Tumors zur jeweils bestimmten Muskelmasse von der Seneszenz- und der Kontrollgruppe über die Zeit des dynamischen PET-Scans berechnet. Es zeigt sich ein signifikant höheres Tumor-Muskel-Verhältnis in der Seneszenzgruppe (Doxorubicin) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) **19C** In der Grafik wird die prozentuale Dosis des Tracers in der Tumorregion 25 Minuten nach Injektion dargestellt. Es zeigt sich eine signifikant höhere Traceraufnahme in der der Region der seneszenten Tumoren im Vergleich zu den Kontrolltieren (PBS-behandelt). Die Kontrollgruppe besteht aus n=6 Mäusen und N=12 Tumoren, die Seneszenzgruppe aus n=5 Mäusen und N=10 Tumoren. Die Daten in B und C werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***) betrachtet.

3.4.3 PET/MRT *in vivo* Messung bei HCT116-Fuca-Tumoren

Die HCT116-Fuca-Zelllinie überexprimiert Fucosidase konstitutiv. Allerdings induziert die alleinige Überexpression der Fucosidase in der HCT116-Zelllinie keine Seneszenz. Die HCT116-Fuca-Zelllinie wurde daher verwendet, um die Spezifität des [^{18}F]FEFuc-Tracers zu testen und den Zusammenhang mit dem Fucosemetabolismus zu analysieren. Im Gegensatz zur HCT116-Zelllinie weist

die HCT116-Fuca-Zelllinie eine langsamere Wachstumskinetik auf. Daher wurde die nicht genetisch veränderten HCT116-Zellen 7 Tage später in die Flanke der Balb/c-nu/nu-Mäuse injiziert, um zum Zeitpunkt der Messungen vergleichbar große Tumoren in den Tieren nachweisen zu können.

Zwei Wochen nach Injektion der HCT116 und 21 Tage nach Verabreichung der HCT116-Fuca-Zelllinie erfolgten die dynamischen PET-Messungen und der anatomische MRT-Scan. Analog zu dem standardisierten Protokoll wurden mit dem Kryotom Schnitte der Tumore für autoradiographische Untersuchung und H&E-Färbung gewonnen.

In den exemplarisch ausgewählten PET-Bildern zeigte sich eine erhöhte [¹⁸F]FUFuc-Aktivität in den Tumoren der mit der HCT116-Fuca-Zelllinie injizierten Mäuse im Vergleich zu den Tumoren der Kontrollmäuse. Diese Befunde konnten durch die Ergebnisse der Autoradiographie bestätigt werden.

In den histopathologischen Untersuchung der Tumore zeigen die HCT116-Fuca Tumore ein verstärkt zystisches Tumorwachstum (Abbildung 20A). Die dynamischen PET-Messungen zeigten ein signifikant höheres Tumor-Muskel-Verhältnis der HCT116-Fuca abhängigen Tumore im Vergleich zu den genetisch nicht veränderten HCT116 Tumore (Abbildung 20B). Für die beiden Tumore wurde ebenfalls die Aufnahme der prozentual injizierten Dosis nach 25 Minuten analysiert. Hier zeigte sich ein signifikant höheres Ergebnis der HCT116-Fuca abhängigen Tumore im Vergleich zu den genetisch nicht manipulierten HCT116 Tumore (Abbildung 20C).

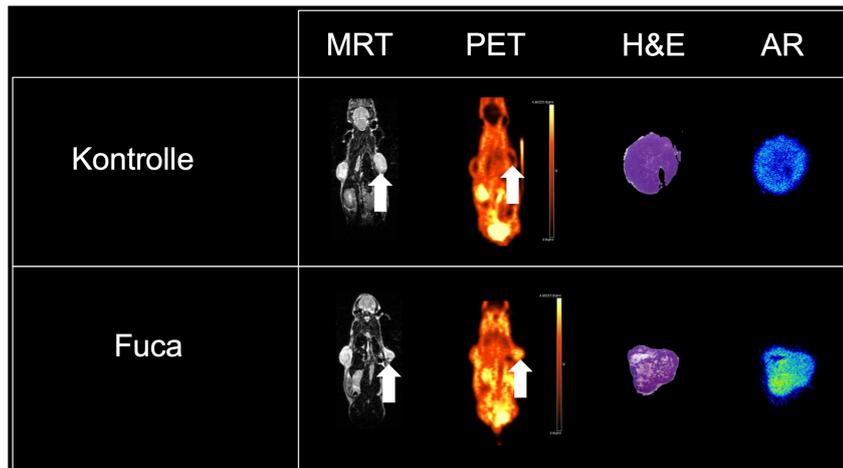
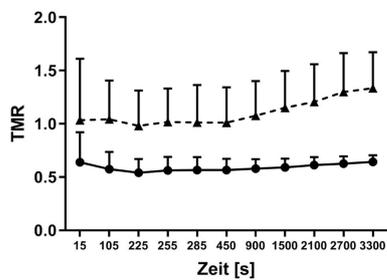
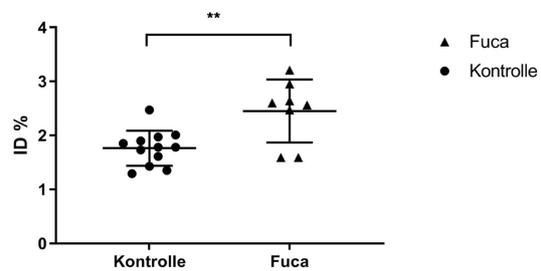
A**B****C**

Abbildung 20: In den *in vivo* Tracer-Untersuchungen wurde die humane HCT116-Kolonkarzinomzelllinie mit der HCT116-Fuca (Überexpression von Fucosidase) verglichen. **20A** Für die HCT116 und HCT116-Fuca Tiere wird jeweils exemplarisch ein MRT-Scan, ein PET-Bild, eine histopathologische Untersuchung (H&E-Färbung) sowie eine Autoradiographie gezeigt. **20B** Es wird das Verhältnis des Tumors zur jeweils bestimmten Muskelmasse von der HCT116-Fuca- und der HCT116-Gruppe über die Zeit des dynamischen PET-Scans berechnet. Es zeigt sich ein signifikant höheres Tumor-Muskel-Verhältnis in der HCT116-Fuca- im Vergleich zur HCT116-Gruppe. **20C** In der Grafik wird die prozentuale Dosis des Tracers in der Tumorregion 25 Minuten nach Injektion dargestellt. Es zeigt sich eine signifikant höhere Traceraufnahme in der Region der Fucosidase überexprimierenden Tumoren (HCT116-Fuca) als in der Region der HCT116 Tumore. Die HCT116-Gruppe besteht aus n=6 Mäusen und N=12 Tumoren, die Fuca-Gruppe aus n=4 Mäusen und N=8 Tumoren. Die Daten in B und C werden als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt und mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***) betrachtet.

3.4.4 PET/MRT *in vivo* Messung bei HRas-Tumoren

Die Onkogen-induzierte Seneszenz ist eine wichtige weitere Untergruppe der Seneszenz. Um an dieser den $[^{18}\text{F}]\text{FEFuc}$ -Tracer *in vivo* zu testen, wurden genetisch veränderte Leberkarzinomzellen verwendet. Den Balb/c-nu/nu-Mäuse

wurde Doxycyclin über das Trinkwasser verabreicht. Nach einer Akkumulation des Doxycyclins von 5 Tagen wurden den Mäusen in beiden Flanken HRas-Zellen injiziert. Bei der HRas-Zelllinie wird durch Doxycyclin die Expression von p53 inhibiert, wodurch es zum Tumorwachstum kommt. Nach einer Woche werden die Mäuse nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen aufgeteilt und bei einer der beiden Gruppen wird das mit Doxycyclin versetzte Wasser durch normales Trinkwasser ersetzt. Die andere Gruppe erhält weiterhin das mit Doxycyclin gemischte Wasser. Durch den Entzug des Doxycyclins kommt es zur Expression von p53 und dadurch zur Onkogen-induzierten Seneszenz.

14 Tage nach der Zellinjektion und damit 19 Tage nach der Verabreichung von Doxycyclin erfolgten die dynamischen PET-Messungen mit dem [¹⁸F]FEFuc-Tracer und im Anschluss der anatomische MRT-Scan. Danach wurden, dem standardisierten Protokoll folgend, mit Hilfe des Kryotoms Tumorschnitte für die autoradiographische Untersuchung und die H&E-Färbung angefertigt.

In den exemplarisch ausgewählten PET-Bildern zeigte sich bei den durch Onkogen induzierten seneszenten Tumoren eine deutlich erhöhte [¹⁸F]FEFuc-Aktivität als in den weiterhin mit Doxycyclin behandelten Tumoren. Ebenfalls verdeutlichen die Resultate der Autoradiographie eine verstärkte Aktivität bei den seneszenten Tumoren (Abbildung 21A). In der histopathologischen Untersuchung mit H&E-Färbung zeigten sich keine größeren zystischen oder nekrotischen Läsionen im Bereich der Tumore oder des anliegenden Gewebes.

Im dynamischen PET-Scan ist ein höheres Tumor-Muskel-Verhältnis bei den seneszenten Tumoren im Vergleich zu den weiterhin durch Doxycyclin p53 repressierten Tumoren erkennbar (Abbildung 21B). Weiterhin wurde die prozentuale Aufnahme der injizierten Dosis in den Tumoren nach 25 Minuten verglichen. Dabei zeigte sich ein deutlich signifikant höheres Ergebnis in den seneszenten Tumoren im Vergleich zu den Tumoren der Kontrollgruppe (Abbildung 21C).

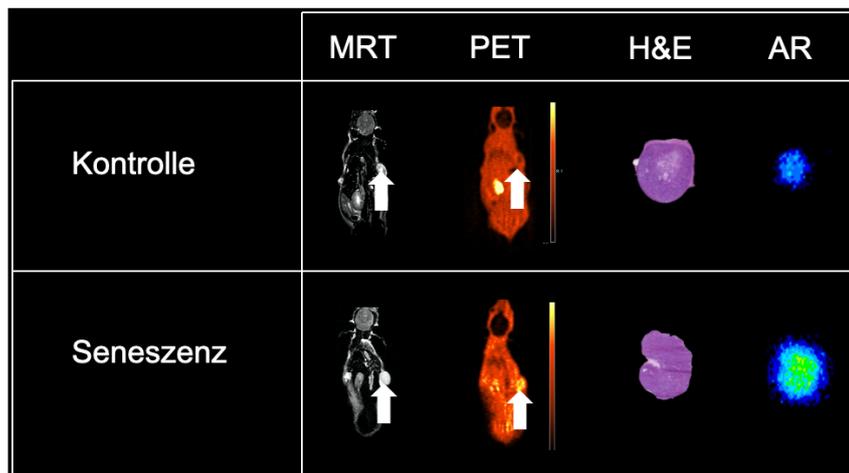
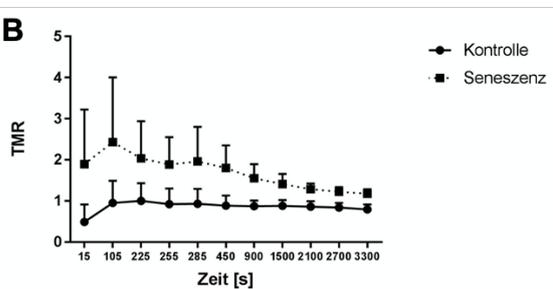
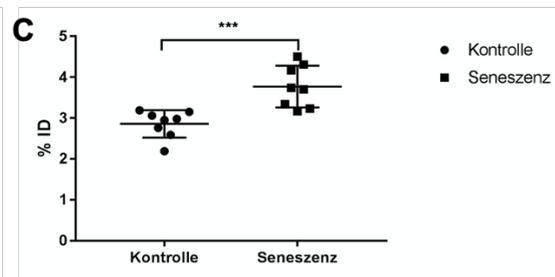
A**B****C**

Abbildung 21: Für die *in vivo* Tracer-Untersuchungen im Hinblick auf die Onkogen induzierte Seneszenz wurde die Leberzellkarzinomzelllinie HRas ausgewählt. **21A** Für die Seneszenz- und die Kontrollgruppe wird jeweils exemplarisch ein MRT-Scan, ein PET-Bild, eine histopathologische Untersuchung (H&E-Färbung) sowie eine Autoradiographie gezeigt. **21B** Es wird das Verhältnis des Tumors zur jeweils bestimmten Muskelmasse, von der Seneszenz- und der Kontrollgruppe über die Zeit des dynamischen PET-Scans berechnet. Es zeigt sich ein signifikant höheres Tumor-Muskel-Verhältnis in der Seneszenzgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. **21C** In der Grafik wird die prozentuale Dosis des Tracers in der Tumorregion 25 Minuten nach Injektion dargestellt. Es zeigt sich eine signifikant höhere Traceraufnahme in der Region der durch Onkogen-Reaktivierung induzierten Tumoren als in der Region, der weiterhin durch Doxycyclin p53 repressierten Tumoren. Die Kontrollgruppe besteht aus n=4 Mäusen und N=8 Tumoren, die Seneszenzgruppe aus n=4 Mäusen und N=8 Tumoren. Die Daten in B und C werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***) betrachtet.

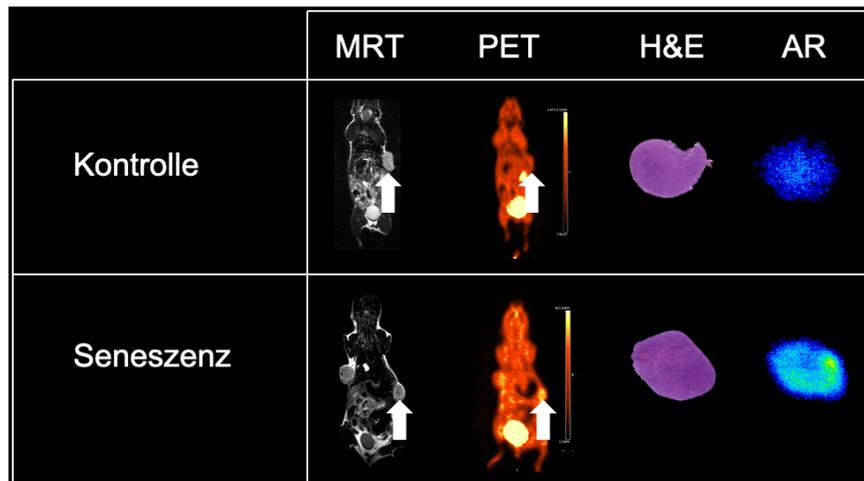
3.4.5 PET/MRT *in vivo* Messung bei NRas-Tumoren

Zur Testung der ribosomalen Checkpoint induzierten Seneszenz (RCIS) wurde aufbauend auf den *in vitro* Ergebnissen die NRas-Zelllinie *in vivo* verwendet.

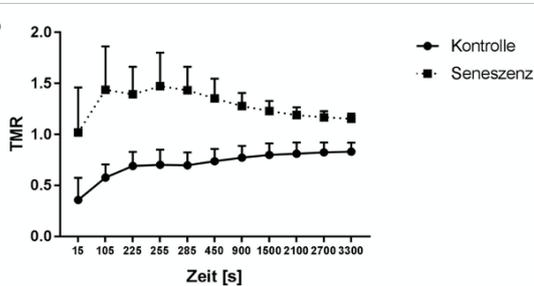
Zunächst wurden die NRas-Zellen subkutan in die Flanken von SCID-Mäusen injiziert. Die Verwendung dieser Mausart war notwendig, da die Tumoren in BALB/c-nu/nu-Mäusen starke nekrotische Areale aufwiesen. Nach einer zehntägigen Wachstumsphase wurden die Mäuse nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen eingeteilt. Bei einer Gruppe begann die fünftägige intra peritoneale Behandlung mit dem RNA-Polymerase I Inhibitor, CX-5461. Die andere Gruppe erhielt eine intra peritoneale Behandlung der Lösungssubstanz (PBS). Nach einem Tag Pause wurden, dem standardisierten Protokoll folgend, ein dynamischer PET-Scan, ein direkt anschließender anatomischer MRT-Scan, eine Autoradiographie und eine H&E-Färbung durchgeführt.

Tumore bei denen RCIS induziert wurden, zeigten in den exemplarisch ausgewählten PET-Bildern eine höhere Tracer-Aktivität im Vergleich zu den Tumoren der mit Lösungssubstanz behandelten Mäuse. Die Resultate der PET-Untersuchung ließ sich durch die ebenfalls angefertigte Autoradiographie bestätigen (Abbildung 22A). Die im Rahmen der PET-Daten erhobenen Werte des Tumor-Muskel-Verhältnisses zeigten erhöhte Ergebnisse für die Seneszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 22B). Außerdem wurde die prozentual aufgenommene Dosis der mit CX-5461 behandelten Tumoren und der mit Lösungssubstanz behandelten Tumoren zum Zeitpunkt von 25 Minuten verglichen. Die seneszenten Tumoren zeigten bei dieser Form der Untersuchung eine signifikant höhere aufgenommene prozentuale Dosis als die unbehandelten Tumoren (Abbildung 22C).

A



B



C

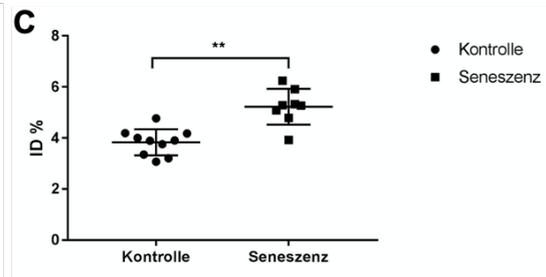


Abbildung 22: *in vivo* Untersuchung des $[^{18}\text{F}]\text{F}^{\text{EFuc}}$ -Tracers nach RCIS induzierter Seneszenz in der murinen Leberzelllinie NRas. **22A** Für die Seneszenz- und die Kontrollgruppe wird jeweils exemplarisch ein MRT-Scan, ein PET-Bild, eine histopathologische Untersuchung (H&E-Färbung) sowie eine Autoradiographie gezeigt. **22B** Es wird das Verhältnis des Tumors zur jeweils bestimmten Muskelmasse, von der Seneszenz- und der Kontrollgruppe über die Zeit des dynamischen PET-Scans berechnet. Es zeigt sich ein signifikant höheres Tumor-Muskel-Verhältnis in der Seneszenzgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. **22C** In der Grafik wird die prozentuale Dosis des Tracers in der Tumorregion 25 Minuten nach Injektion dargestellt. Es zeigt sich eine signifikant höhere Traceraufnahme in der Region der durch die CX-5461 Behandlung induzierten Tumoren als in der Region der Kontrolltumoren. Die Kontrollgruppe besteht aus n=5 Mäusen und N=10 Tumoren, die Seneszenzgruppe aus n=5 Mäusen und N=10 Tumoren. Die Daten in B und C werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***) betrachtet.

3.4.6 PET/MRT *in vivo* Messung bei AMp19-Tumoren

Die Testung der ribosomalen Checkpoint-induzierten Seneszenz (RCIS) erfolgte zusätzlich in der murinen Leberzellkarzinomzelllinien AMp19.

AMp19-Zellen wurden subkutan in die Flanken von BALB/c-nu/nu-Mäusen injiziert. Nach einer 14-tägigen Wachstumsphase wurden die Mäuse nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen aufgeteilt. Bei einer Gruppe begann die fünftägige intraperitoneale Behandlung mit dem RNA-Polymerase I Inhibitor, CX-5461. Die andere Gruppe erhielt eine intraperitoneale Behandlung der Lösungssubstanz (PBS). Nach einem Tag Pause wurden, dem standardisierten Protokoll folgend, ein dynamischer PET-Scan, ein direkt anschließender anatomischer MRT-Scan, eine Autoradiographie und eine H&E-Färbung durchgeführt.

Die Tumoren der Mäuse, bei denen durch ribosomalen Stress Seneszenz induziert wurden, zeigten in den exemplarisch ausgewählten PET-Bildern eine höhere Tracer-Aktivität im Vergleich zu Tumoren der mit Lösungssubstanz behandelten Mäuse. Die Resultate der PET-Bilder ließen sich durch die ebenfalls angefertigte Autoradiographie bestätigen (Abbildung 23A). Die im Rahmen der PET-Daten erhobenen Werte des Tumor-Muskel-Verhältnisses zeigten erhöhte Ergebnisse für die Seneszenz- im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 23B). Außerdem wurden die prozentuale aufgenommene Dosis der mit CX-5461 behandelten Tumoren und der mit Lösungssubstanz behandelten Tumoren zum Zeitpunkt von 25 Minuten verglichen. Die seneszenten Tumoren zeigten bei dieser Form der Untersuchung eine höhere aufgenommene prozentuale Dosis als die unbehandelten Tumoren (Abbildung 23C).

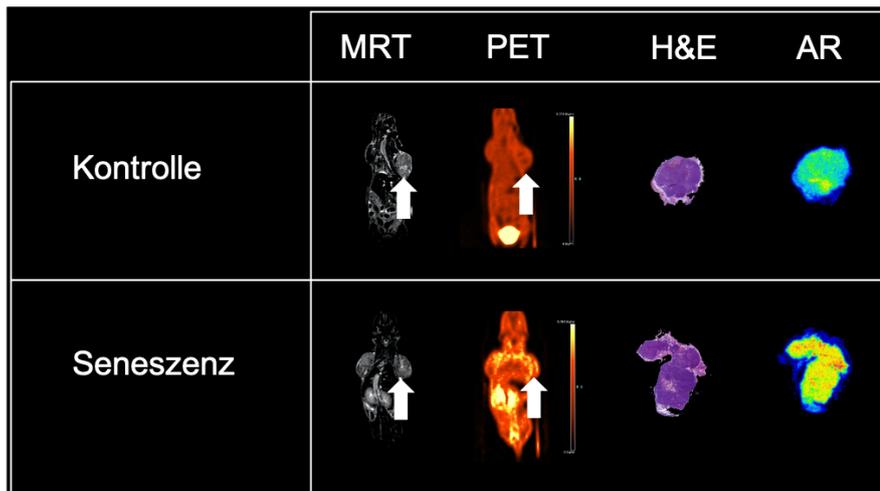
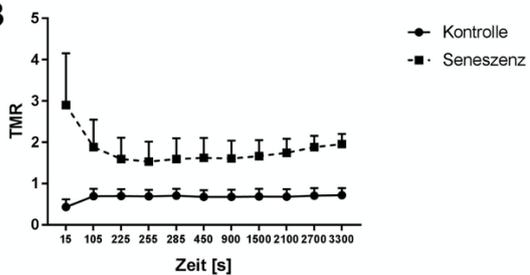
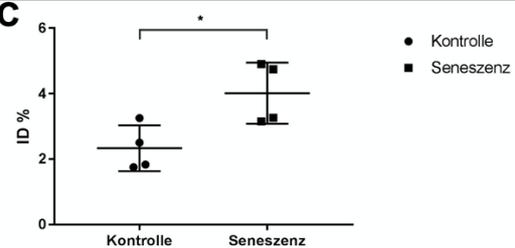
A**B****C**

Abbildung 23: *in vivo* Untersuchung des [^{18}F]FEFuc-Tracers nach RCIS induzierter Seneszenz in der murinen Leberzelllinie AMp19. **23A** Für die Seneszenz- und die Kontrollgruppe wird jeweils exemplarisch ein MRT-Scan, ein PET-Bild, eine histopathologische Untersuchung (H&E-Färbung) sowie eine Autoradiographie gezeigt. **23B** Es wird das Verhältnis des Tumors zur jeweils bestimmten Muskelmasse, von der Seneszenz- und der Kontrollgruppe über die Zeit des dynamischen PET-Scans berechnet. Es zeigt sich ein höheres Tumor-Muskel-Verhältnis in der Seneszenz im Vergleich zur Kontrollgruppe. **23C** In der Grafik wird die prozentuale Dosis des Tracers in der Tumorregion 25 Min nach Injektion dargestellt. Es zeigt sich eine höhere Traceraufnahme in der Region der durch die CX-5461 Behandlung induzierten Tumoren als in der Region Kontrolltumoren. Die Kontrollgruppe besteht aus $n=2$ Mäusen und $N=4$ Tumoren, die Seneszenzgruppe aus $n=2$ Mäusen und $N=4$ Tumoren. Die Daten in B und C werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und mit einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***) betrachtet.

4 Diskussion

Kann dem Altern durch eine senolytische Therapie Grenzen aufgezeigt werden? Durch ähnlich provokante Postulate wurde das Thema Seneszenz zu einem sehr kritisch diskutierten Bereich der medizinischen Forschung. Auch wenn das Szenario der ewigen Jugend noch weit entfernt ist, zeigen Studien, dass gewisse Veränderungen des Alterns durch senolytische Therapien verringert bzw. aufgehoben werden können. (Ellison-Hughes 2020, Poblocka, Bassey et al. 2021) Beispielsweise konnte an Mäusen gezeigt werden, dass eine durch das Altern induzierte osteolytische Aktivität am Femurknochen durch die Behandlung mit einem senolytischen Medikament, AP20187, teilweise revertiert werden konnte und die Dichte der substantia kortikalis wieder zunahm. (Farr, Xu et al. 2017)

Die aktuelle Arbeit hat verdeutlicht, dass der Prozess der Seneszenz auch bei Tumoren eine sehr wichtige Rolle spielt. Die Gabe niedriger Dosen eines Chemotherapeutikums induziert Seneszenz, jedoch keine Apoptose. (Sliwiska, Mosieniak et al. 2009) Daher könnten zukünftig neue senolytische Medikamente eine Option zur spezifischen Behandlung seneszenten Tumorzellen darstellen. (Acosta and Gil 2012) Diese, auf den einzelnen Patienten abgestimmte Therapiestrategie könnte somit im Sinne einer personalisierten Medizin eine Option sein, die Wirkung von Medikamenten durch den Einsatz geringer Dosen zu verbessern und gleichzeitig die Nebenwirkungen zu reduzieren. Aktuell ist es schwierig, den genauen Startpunkt des Nutzens einer senolytischen Therapie in Tumoren festzulegen, da die momentanen Detektionsmöglichkeiten einer Seneszenz in den Tumorzellen auf *ex vivo* Ansätze beschränkt ist. Würde ein Seneszenz-spezifischer PET-Tracer zur Verfügung stehen, bestünde die Möglichkeit, den Anteil der Tumorzellen mit Seneszenz genauer zu differenzieren und darüber eine PET-adaptierte senolytische Therapie zu steuern. Dies würde insbesondere erlauben, den exakten Startpunkt einer entsprechenden Therapie zu definieren und deren Erfolg zu beurteilen. Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, einen entsprechenden PET-Tracer bezüglich seiner möglichen *in vitro* und *in vivo* Relevanz genauer zu untersuchen.

In der Literatur wird die β -Galactosidase-Aktivität als Goldstandard der Seneszenzdetektion beschrieben. (Severino, Allen et al. 2000, Gary and Kindell 2005) Vielversprechende Ergebnisse haben gezeigt, dass es der [^{18}F]FpyGal-Tracer ermöglicht, die β -Galactosidase-Aktivität *in vivo* darzustellen. (Dissertation Cotton, Johnathan Synthesis and evaluation of novel PET probes for *in vivo* imaging of cellular senescence)

Als neuer Seneszenz-Marker wurde die α -Fucosidase von einer Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Tübingen beschrieben. (Hildebrand, Lehle et al. 2013) Dieses Enzym wurde als Zielstruktur des [^{18}F]FEFuc-Tracers verwendet. In der aktuellen Arbeit wurde in verschiedenen Zelllinien und nach Induktion unterschiedlicher Formen der Seneszenz die Expression der Fucosidase auf mRNA- und Proteinebene durch qPCR und Western Blot-Analyse untersucht. Übereinstimmend zeigten alle diese Untersuchungen, dass nach *in vitro* Induktion von Seneszenz eine erhöhte Expression der Fucosidase in den jeweiligen Zellen zu beobachten war. Zusätzlich konnte über qPCR eine verstärkte mRNA-Expression des GDP-Fucose-Transporters nachgewiesen werden. Dieser Transporter ist ein Schlüsselenzym in der Fucosylierung von Proteinen und Lipiden. Er sorgt für den Transport von Fucose in den Golgi-Apparat, in welchem die Fucosyltransferasen die Proteine und Lipide fucosylieren. (Moriwaki, Noda et al. 2007) Die α -Fucosidase ist als lysosomale Hydrolase für die Abspaltung der Fucose von Glykoproteinen und Glykolipiden zuständig. (O'Brien, Willems et al. 1987) Daher korreliert die Expression der beiden Enzyme mit dem Fucosemetabolismus der jeweiligen Zelle.

Seit Erstbeschreibung der Seneszenz im Jahre 1960 wurden unterschiedliche Arten der Seneszenz entdeckt. Es handelt sich dabei unter anderem um die zuerst berichtete Replikative Seneszenz sowie die Therapie-induzierte Seneszenz und die Onkogen-induzierte Seneszenz. (Hayflick and Moorhead 1961, Roninson 2003, Kang, Yevsa et al. 2011) Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konzentrierten wir uns auf Formen der Seneszenz, die im Zusammenhang mit malignen Neoplasien relevant sind. Daher bildeten die Therapie-induzierte Seneszenz und die Onkogen-induzierte Seneszenz einen

Schwerpunkt in der Arbeit. Neben diesen beiden Formen der Seneszenz wurde aufgrund der Aktualität die Ribosomale Checkpoint-induzierte Seneszenz (RCIS) untersucht, da diese erst kürzlich durch die Tübinger Forschungsgruppe Prof. Zender entdeckt wurde. (Wolter, Pesic et al. 2017)

Unabhängig von der Art der Seneszenzinduktion zeigten alle *in vitro* Modelle nach Induktion von Seneszenz ein signifikant höhere Aufnahme des [¹⁸F]FEFuc-Tracers im Vergleich zu Kontrollzellen. Um einen Zusammenhang zwischen dem Fucosemetabolismus und der Traceraufnahme bei Zellen zu untersuchen, wurde der [¹⁸F]FEFuc-Tracer bei einer Fucosidase überexprimierenden HCT116 Kolontumorzelllinie getestet. Bei dieser genetisch veränderten Zelllinie zeigte sich eine signifikant höhere Traceraufnahme im Vergleich zu den genetisch unveränderten HCT116-Zellen. Jedoch führt eine Inhibition der α -Fucosidase mit Deoxyfuconojirimycin gleichzeitig zu einem kleinen Anstieg der Traceraufnahme in HCT116-Zellen. Diese kontroversen Ergebnisse in der Traceraufnahme werfen einige Fragen über den direkten Wirkmechanismus des [¹⁸F]FEFuc-Tracers auf. Es lässt sich keine direkte Interaktion zwischen dem Tracer und der α -Fucosidase-Expression nachweisen. Daher gehen wir davon aus, dass der [¹⁸F]FEFuc-Tracer eher als Surrogat-Marker des Fucose-Metabolismus betrachtet werden kann.

Das Potential des Einsatzes als Surrogat-Marker lässt sich aus dem direkten Zusammenhang zwischen dem Anstieg der α -Fucosidase-Proteinexpression in der jeweiligen Zelllinie nach Seneszenzinduktion und dem Verhältnis der *in vitro* Traceraufnahme sehr gut erkennen. Ein gutes Beispiel dafür sind die AMp19-Zellen. In diesen Zellen konnte nach Seneszenz-Induktion die stärkste Zunahme der α -Fucosidase-Expression beobachtet werden. Damit einhergehend zeigen AMp19-Zellen *in vitro* die stärkste Zunahme der Traceraufnahme nach Seneszenz-Induktion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Aufbauend auf den vielversprechenden *in vitro* Ergebnisse erfolgte zusätzlich eine Testung des Tracers *in vivo*. Hierzu musste der [¹⁸F]FEFuc-Tracer zunächst bezüglich seiner Serumstabilität überprüft werden. Der Tracer war über eine Stunde im Serum von Mäusen stabil und er wurde dabei nicht in seine Metabolite

aufgespalten. Weiterhin zeigte sich bei allen verwendeten *in vivo* Seneszenzmodellen ein signifikant höherer Uptake im Tumor und ein höheres Tumor-Muskelverhältnis in der Seneszenz-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Ebenfalls zeigten die Fucosidase-überexprimierenden-Zellen *in vivo* ähnliche Ergebnisse. Diese Ergebnisse ließen sich alle durch eine zusätzliche *ex vivo* Untersuchung mit Hilfe einer Autoradiographie bestätigen.

4.1 Klinische Relevanz der Seneszenzdetektion *in vivo*

Die *in vivo* Detektion von Seneszenz ist nicht nur auf die Anwendung der Detektion und Therapie seneszenten Zellen bei malignen Tumoren beschränkt, sondern könnte bei vielen Erkrankungen, die mit dem Altern assoziiert sind, wichtig sein. In einem Mausmodell der idiopathischen Fibrose konnte in alveolaren Epithelzellen eine höhere Expression von p16 und p21 sowie eine erhöhte β -Galactosidase-Aktivität als Marker für Seneszenz nachgewiesen werden. Die Forschungsgruppe konnte zusätzlich feststellen, dass durch eine Behandlung mit senolytischen Medikamenten die Progression der Fibrose vermindert werden konnte. (Lehmann, Korfei et al. 2017) Eine Limitation des Ansatzes bestand jedoch in der Tatsache, dass der Arbeitsgruppe keine Methode zur Verfügung stand, die ein Monitoring der Seneszenz *in vivo* ermöglichte. (Lehmann, Korfei et al. 2017) Neben den Mausmodellen erfolgten die ersten klinischen Studien zur Behandlung der idiopathischen pulmonalen Fibrose mit zwei senolytischen Medikamenten (Dasatinib und Quercetin). In der Verum Gruppe zeigte sich eine signifikante, um 6 Minuten verbesserte Gehstrecke im Vergleich zur Kontrollgruppe. (Justice, Nambiar et al. 2019) Auch in dieser Studie blieb die Frage jedoch unbeantwortet, ob es bei allen Patienten mit idiopathischer Fibrose unter Therapie zu einer Reduktion der Seneszenz in den Lungenzellen kam. Diese beiden Beispiele verdeutlichen, wie wichtig es wäre, die Aktivität der Seneszenz *in vivo* monitoren zu können. Dadurch wären funktionelle Daten erhebbbar, die eine Aussage ermöglichen, ob der Therapieerfolg unmittelbar auf die Beeinflussung seneszenten Zellen zurückzuführen ist. Daher hinkt die Bildgebung, in Form molekular definierter PET-Tracer für die Seneszenz, der Entwicklung senolytischer Medikamente hinterher. Daraus folgernd hat die

aktuelle Arbeit zur Testung des [¹⁸F]FEFuc-Tracers eine hohe klinische Relevanz.

Die Therapie mit senolytischen Medikamenten, wie Dasatinib und Imatinib, ist mit dem Auftreten bestimmter Nebenwirkungen assoziiert. (Capdeville, Buchdunger et al. 2002) Eine Abwägung zwischen Nutzen und Nebenwirkungen der Therapie könnte abhängig von der Tracerakkumulation gemacht werden. Darüber hinaus hätte ein zuverlässiger Seneszenz-PET-Tracer auch eine wirtschaftliche Komponente, da der Einsatz innovativer Therapien in der Regel mit erheblichen Kosten verbunden ist. Das bedeutet, bei Vorliegen eines zuverlässigen Seneszenz-PET-Tracers kann sowohl die Indikation zur sonolytischen Therapie als auch deren Steuerung unter Therapie bezüglich des Ansprechens und der Dauer der Therapie genau gemonitort werden. Dadurch können Nebenwirkungen und Kosten im Sinne des Patienten optimal gestaltet werden.

Ein ähnlicher Weg wird ansatzweise bereits bei der Behandlung mit PD-1-Inhibitoren verfolgt. Es zeigt sich teilweise eine Assoziation zwischen der PD-1 Expression und dem Ansprechen einer zielgerichteten Therapie. (Pare, Pascual et al. 2018) Eine Forschungsgruppe konnte für das Merkel-Karzinom bereits zeigen, dass bei den Patienten mit einem guten Therapieansprechen eine deutlich höhere Expression von PD-1 und PDL-1 vorliegt. (Giraldo, Nguyen et al. 2018)

4.2 Weitere Anwendungsmöglichkeiten des [¹⁸F]FEFuc-Tracers

Der Fucosemetabolismus spielt in vielen anderen Forschungsfeldern ebenfalls eine große Rolle. Es ist daher wichtig, dass weitere Untersuchungen folgen, um zu einem besseren Verständnis beizutragen. In anderen Bereichen der Krebsforschung hat die Fucosylierung eine wichtige diagnostische Relevanz. In Patienten mit erhöhten AFP-Serumwerten konnte aufgrund der unterschiedlichen Ausprägungen der Fucosylierung zwischen benignen und malignen Lebererkrankungen unterschieden werden. (Aoyagi, Suzuki et al. 1988) In einer

weiteren Studie wurde die Fucosylierung bei Patienten mit chronischer Hepatitis B Virus (HBV) Infektion im Rahmen der malignen Entartung in Richtung Leberzellkarzinom (HCC) untersucht. Hier zeigte sich, dass bei HBV-Patienten mit nachgewiesenem HCC neunzehnfach erhöhte fucosylierte Proteine im Vergleich zu HBV-Patienten ohne nachgewiesenem HCC nachgewiesen werden konnten. (Aoyagi, Suzuki et al. 1988) Auch bei anderen benignen Lebererkrankungen spielt die Fucosylierung eine wichtige Rolle. Bisher ist die Diagnose der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) häufig eine Ausschlussdiagnose. Bei NASH Patienten konnte eine vermehrte Fucosylierung des Haptoglobins nachgewiesen werden. Daher könnte deren Nachweis zur besseren Diagnose der NASH beitragen. (Kamada, Akita et al. 2013)

Speziell in der Hepatologie könnte demzufolge die erfolgreiche Etablierung eines PET-Tracers, welcher als Surrogat-Marker für den Fucose-Metabolismus fungiert, neue Möglichkeiten für die bildgebende Diagnostik von unterschiedlichen Lebererkrankungen schaffen. Hier könnte es vorteilhaft sein, dass der [^{18}F]FEFuc-Tracers nicht direkt mit einem Enzym interagiert.

Bei der Fucosidose handelt es sich um eine autosomal-rezessive lysosomale seltene Speichererkrankung. Bei dieser Erkrankung ist aufgrund von unterschiedlichen genetischen Mutationen die Expression der Fucosidase in den Geweben des Körpers vermindert. (Willems, Seo et al. 1999) Die fehlende Enzymaktivität führt unter anderem zu geistiger Retardierung, sensomotorischen Defiziten und vergrößerten Organen. (Willems, Gatti et al. 1991) (Jiang, Liu et al. 2017) Bisher kann nicht bestimmt werden, wie stark welches Organ im Rahmen der Erkrankung befallen ist, da es dafür keine Nachweismöglichkeiten gibt. Da die Patienten unterschiedliche Symptome zeigen, könnte durch den [^{18}F]FEFuc-Tracer die Aktivität der Fucosidase spezifisch in bestimmten Organen gemessen werden und davon abhängig zukünftig beispielsweise eine gezielte Gentherapie induziert und deren Erfolg gemonitort werden.

4.3 Vergleich des [¹⁸F]FpyGal-Tracers mit dem [¹⁸F]FEFuc-Tracer

Als Zielstruktur des [¹⁸F]FEFuc-Tracer wurde initial die α -Fucosidase ausgemacht. Im Verlauf dieser Arbeit zeigte es sich jedoch, dass es keine Anzeichen für eine direkte Interaktion des Tracers mit dem Enzym gibt. Es war jedoch möglich zu zeigen, dass der Fucosemetabolismus die Tracerakkumulation stark beeinflusst. Weiterhin gelang es nachzuweisen, dass in den untersuchten Seneszenzmodellen ein verstärkter Fucosemetabolismus vorhanden ist. Der [¹⁸F]FpyGal-Tracer dagegen ist ein Substrat der β -Galactosidase, deren Aktivität als Goldstandard der Seneszenzdetektion gilt.

4.4 Seneszenzdetektion *in vivo*

Aufbauend auf der β -Galactosidase Überexpression in seneszenten Zellen wurde von der Gruppe um Prof. Hu aus Shanghai eine Nanoprobe zur Seneszenzdetektion *in vivo* entwickelt. Diese Nanoprobe, „BOD-L- β Gal“ ermöglicht eine Detektion von Seneszenz über ein Fluoreszenz-gekoppeltes Verfahren *in vitro*. Die Weiterentwicklung der Nanoprobe in Richtung *in vivo* Anwendung war aufgrund der unzureichenden Zellaufnahme zunächst schwierig. Erst durch die Kopplung an Polymere konnte das Verfahren erfolgreich in Form von Nanopartikeln *in vivo* angewendet werden. (Chen, Guo et al. 2020) Dadurch entstand das erste Verfahren zur Seneszenz Detektion *in vivo*. Die Nanoprobe wurde an einem Arteriosklerose-Modell getestet und zeigte dort sehr gute Ergebnisse.

Hierbei handelt sich somit um das erste Beispiel einer erfolgreichen *in vivo* Anwendung. Der Ansatz wurde allerdings an einer relativ kleinen Mauszahl (n=3) getestet. Der Nachteil der Anwendung eines Fluoreszenz-gekoppelten Verfahrens liegt in der geringen Gewebepenetrationstiefe des Detektionssystems. Die maximale Eindringtiefe beschränkt sich auf wenige Zentimeter. (Graves, Ripoll et al. 2003, Ntziachristos, Ripoll et al. 2005) Daher scheint eine Translation vom Kleintiermodellen in die klinische Praxis und Anwendung beim Menschen schwierig. Dennoch stellt der Ansatz mit der Nanoprobe *in vivo* eine

erfolgsversprechende Option dar, da darüber die Relevanz weiterer Seneszenzmodelle experimentell getestet werden kann. Am Ende wäre aber eine Etablierung eines Seneszenz-PET-Tracers aufgrund der möglichen klinischen Translation ein wichtiger Schritt für die Seneszenzdetektion im Menschen.

4.5 Ausblick

Die durchgeführten Experimente verdeutlichen, dass mit dem [^{18}F]FEFuc-Tracer eine Seneszenzdetektion *in vivo* möglich ist. Da in den letzten Jahren neue Formen der senolytischen Therapie von malignen Tumoren erforscht wurden, stellt sich bei deren Anwendung die Frage des effektiven Therapiemonitorings. Dies betrifft sowohl die Frage der initialen Indikationsstellung als auch des Monitorings unter Therapie, um die Effektivität der Senolyse mit dem Therapieerfolg korrelieren zu können. Neben den malignen Erkrankungen spielt Seneszenz auch bei benignen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Daher könnten die im Rahmen der aktuellen Arbeit durchgeführten Experimente die Grundlage einer späteren klinischen Anwendung des [^{18}F]FEFu-Tracer sein und diese dadurch zur Diagnose und Therapie unterschiedlicher maligner und benigner Erkrankungen beitragen. Wie bereits zu Beginn dieser Diskussion erwähnt, ist die therapeutische Nutzung von Seneszenz in vielen unterschiedlichen Bereichen der Medizin ein wichtiger Aspekt der Forschung. Es müssen nicht immer nur positive Ereignisse die Forschung vorantreiben. Im August 2020 zeigte das erste senolytische Medikament in einer klinischen Studie keine signifikant bessere Wirkung als ein Placebo-Präparat. Jedoch eröffnete es damit die Möglichkeit für Diskussionen und neue Ansätze rund um das Thema der Seneszenz. Momentan arbeiten mehr als zwei Dutzend Startups an neuen therapeutischen Möglichkeiten zur Nutzung von Seneszenz. (Dolgin 2020) Für all diese Projekte fehlt bisher *in vivo* ein diagnostisches Nachweisverfahren, sodass die Implementierung eines PET-Tracers für die Diagnose und das Monitoring der Seneszenz ein wesentlicher klinischer Durchbruch sein würde.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit einer Seneszenzdetektion mit Hilfe eines neuen Seneszenz-Biomarkers untersucht. Die α -Fucosidase wurde vor ein paar Jahren als neuer Seneszenzmarker entdeckt und darauf aufbauend der hier untersuchte [^{18}F]FEFuc-Tracer entwickelt.

Im Rahmen der aktuellen Arbeit wurden daher in verschiedenen Zelllinien unterschiedliche Formen der Seneszenz induziert. Hierbei korrelierte das Auftreten von Seneszenz mit einer erhöhten Fucosidase-Expression in den Zellen. Zudem war es mit einer erhöhten Aufnahme des [^{18}F]FEFuc-Tracer assoziiert. Interessanterweise konnte dabei nachgewiesen werden, dass der [^{18}F]FEFuc-Tracer nicht unmittelbar mit der Fucosidase interagiert. Dennoch akkumuliert der [^{18}F]FEFuc-Tracer stärker in genetisch veränderten Zellen, bei denen die Fucosidase spezifisch überexprimiert wird. Daher ist der Zusammenhang der fehlenden Interaktion und trotzdem bestehender Korrelation des [^{18}F]FEFuc-Tracer mit der Fucosidase Expression zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die mögliche Anwendung des [^{18}F]FEFuc-Tracers *in vivo* im Mausmodell untersucht. Dabei zeigte sich zunächst, dass der [^{18}F]FEFuc-Tracer im Blutserum stabil ist. Er wird dort nicht schnell verstoffwechselt und abgebaut. So konnten bei Inkubation des [^{18}F]FEFuc-Tracers im Mäuseserum keine Metabolite nachgewiesen werden. Dies war eine wichtige Voraussetzung für die weitere Anwendung als PET-Tracer *in vivo*.

Bei den *in vivo* Untersuchungen akkumulierte der [^{18}F]FEFuc-Tracer signifikant höher in den Seneszenz induzierten Tumoren im Vergleich zu Kontrolltumoren. Diese Beobachtung konnte *ex vivo* durch die Autoradiographie untermauert werden. Weiterhin wurden unterschiedliche Formen von Seneszenz *in vivo* induziert. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass der [^{18}F]FEFuc-Tracer unabhängig von der jeweiligen Form der Seneszenz angewendet werden kann.

Zusammenfassend konnte daher erfolgreich der [^{18}F]FEFuc-Tracer *in vitro* und *in vivo* untersucht werden und dadurch eine Grundlage für seine mögliche spätere klinische Anwendung gelegt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Acosta, J. C. and J. Gil (2012). "Senescence: a new weapon for cancer therapy." Trends Cell Biol **22**(4): 211-219.
- Al-Mohanna, M. A., P. S. Manogaran, Z. Al-Mukhalafi, K. A Al-Hussein and A. Aboussekhra (2004). "The tumor suppressor p16INK4a gene is a regulator of apoptosis induced by ultraviolet light and cisplatin." Oncogene **23**(1): 201-212.
- Alcorta, D. A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach and J. C. Barrett (1996). "Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13742-13747.
- Ali, S., Y. Jenkins, M. Kirkley, A. Dagkalis, A. Manivannan, I. J. Crane and J. A. Kirby (2008). "Leukocyte extravasation: an immunoregulatory role for alpha-L-fucosidase?" J Immunol **181**(4): 2407-2413.
- Aoyagi, Y., Y. Suzuki, M. Isemura, M. Nomoto, C. Sekine, K. Igarashi and F. Ichida (1988). "The fucosylation index of alpha-fetoprotein and its usefulness in the early diagnosis of hepatocellular carcinoma." Cancer **61**(4): 769-774.
- Arroyo, M. and P. Raychaudhuri (1992). "Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein." Nucleic Acids Res **20**(22): 5947-5954.
- Basu, S., T. C. Kwee, S. Surti, E. A. Akin, D. Yoo and A. Alavi (2011). "Fundamentals of PET and PET/CT imaging." Ann N Y Acad Sci **1228**: 1-18.
- Benson, E. K., S. K. Mungamuri, O. Attie, M. Kracikova, R. Sachidanandam, J. J. Manfredi and S. A. Aaronson (2013). "p53-dependent gene repression through p21 is mediated by recruitment of E2F4 repression complexes." Oncogene **33**: 3959.
- Binnewies, M., E. W. Roberts, K. Kersten, V. Chan, D. F. Fearon, M. Merad, L. M. Coussens, D. I. Gabrilovich, S. Ostrand-Rosenberg, C. C. Hedrick, R. H. Vonderheide, M. J. Pittet, R. K. Jain, W. Zou, T. K. Howcroft, E. C. Woodhouse, R. A. Weinberg and M. F. Krummel (2018). "Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy." Nature Medicine **24**(5): 541-550.
- Bittles, A. H. and N. Harper (1984). "Increased glycolysis in ageing cultured human diploid fibroblasts." Biosci Rep **4**(9): 751-756.
- Brussig, M. (2015). "Demografischer Wandel, Alterung und Arbeitsmarkt in Deutschland." KZfSS Kölner Zeitschrift für Soziologie und Sozialpsychologie **67**(1): 295-324.

Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 729-740.

Capdeville, R., E. Buchdunger, J. Zimmermann and A. Matter (2002). "Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug." Nature Reviews Drug Discovery **1**(7): 493-502.

Chang, J., Y. Wang, L. Shao, R.-M. Laberge, M. Demaria, J. Campisi, K. Janakiraman, N. E. Sharpless, S. Ding, W. Feng, Y. Luo, X. Wang, N. Aykin-Burns, K. Krager, U. Ponnappan, M. Hauer-Jensen, A. Meng and D. Zhou (2015). "Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice." Nature Medicine **22**: 78.

Chen, J.-A., W. Guo, Z. Wang, N. Sun, H. Pan, J. Tan, Z. Ouyang, W. Fu, Y. Wang, W. Hu and X. Gu (2020). "In Vivo Imaging of Senescent Vascular Cells in Atherosclerotic Mice Using a β -Galactosidase-Activatable Nanoprobe." Analytical Chemistry **92**(18): 12613-12621.

Cheng, Q., L. Chen, Z. Li, W. S. Lane and J. Chen (2009). "ATM activates p53 by regulating MDM2 oligomerization and E3 processivity." EMBO J **28**(24): 3857-3867.

Cherry, S. R. and M. Dahlbom (2006). PET: physics, instrumentation, and scanners. PET, Springer.

Cho, K. A., S. J. Ryu, Y. S. Oh, J. H. Park, J. W. Lee, H. P. Kim, K. T. Kim, I. S. Jang and S. C. Park (2004). "Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status." J Biol Chem **279**(40): 42270-42278.

Coppe, J. P., P. Y. Desprez, A. Krtolica and J. Campisi (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." Annu Rev Pathol **5**: 99-118.

Currier, A. W., E. A. Kolb, R. G. Gorlick, M. E. Roth, V. Gopalakrishnan and V. B. Sampson (2019). "p27/Kip1 functions as a tumor suppressor and oncoprotein in osteosarcoma." Sci Rep **9**(1): 6161.

Dehay, C. and H. Kennedy (2007). "Cell-cycle control and cortical development." Nature Reviews Neuroscience **8**(6): 438-450.

Derhovanessian, E., A. Larbi and G. Pawelec (2009). "Biomarkers of human immunosenescence: impact of Cytomegalovirus infection." Curr Opin Immunol **21**(4): 440-445.

Dimri, G. P., K. Itahana, M. Acosta and J. Campisi (2000). "Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor." Mol Cell Biol **20**(1): 273-285.

Ding, G., N. Franki, A. A. Kapasi, K. Reddy, N. Gibbons and P. C. Singhal (2001). "Tubular cell senescence and expression of TGF-beta1 and

p21(WAF1/CIP1) in tubulointerstitial fibrosis of aging rats." Exp Mol Pathol **70**(1): 43-53.

Disayabutr, S., E. K. Kim, S. I. Cha, G. Green, R. P. Naikawadi, K. D. Jones, J. A. Golden, A. Schroeder, M. A. Matthay, J. Kukreja, D. J. Erle, H. R. Collard and P. J. Wolters (2016). "miR-34 miRNAs Regulate Cellular Senescence in Type II Alveolar Epithelial Cells of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis." PLoS One **11**(6): e0158367.

Dolgin, E. (2020). "Send in the senolytics." Nature Biotechnology **38**(12): 1371-1377.

Draetta, G., H. Piwnicka-Worms, D. Morrison, B. Druker, T. Roberts and D. Beach (1988). "Human cdc2 protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate." Nature **336**(6201): 738-744.

Dulic, V., E. Lees and S. I. Reed (1992). "Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase." Science **257**(5078): 1958-1961.

Ellison-Hughes, G. M. (2020). "First evidence that senolytics are effective at decreasing senescent cells in humans." EBioMedicine **56**: 102473.

Elmore, L. W., C. W. Rehder, X. Di, P. A. McChesney, C. K. Jackson-Cook, D. A. Gewirtz and S. E. Holt (2002). "Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction." J Biol Chem **277**(38): 35509-35515.

Falke, L. L., S. Gholizadeh, R. Goldschmeding, R. J. Kok and T. Q. Nguyen (2015). "Diverse origins of the myofibroblast-implications for kidney fibrosis." Nat Rev Nephrol **11**(4): 233-244.

Farr, J. N., M. Xu, M. M. Weivoda, D. G. Monroe, D. G. Fraser, J. L. Onken, B. A. Negley, J. G. Sfeir, M. B. Ogrodnik, C. M. Hachfeld, N. K. LeBrasseur, M. T. Drake, R. J. Pignolo, T. Pirtskhalava, T. Tchkonja, M. J. Oursler, J. L. Kirkland and S. Khosla (2017). "Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice." Nature Medicine **23**(9): 1072-1079.

Fumagalli, M., F. Rossiello, C. Mondello and F. d'Adda di Fagagna (2014). "Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation." PLoS One **9**(10): e110969.

Gary, R. K. and S. M. Kindell (2005). "Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts." Anal Biochem **343**(2): 329-334.

Ginaldi, L., M. C. Di Benedetto and M. De Martinis (2005). "Osteoporosis, inflammation and ageing." Immun Ageing **2**: 14.

Giordano, A. and W. H. Lee (2006). "Preface." Oncogene **25**(38): 5189-5189.

Giraldo, N. A., P. Nguyen, E. L. Engle, G. J. Kaunitz, T. R. Cottrell, S. Berry, B. Green, A. Soni, J. D. Cuda, J. E. Stein, J. C. Sunshine, F. Succaria, H. Xu, A. Ogurtsova, L. Danilova, C. D. Church, N. J. Miller, S. Fling, L. Lundgren, N. Ramchurren, J. H. Yearley, E. J. Lipson, M. Cheever, R. A. Anders, P. T. Nghiem, S. L. Topalian and J. M. Taube (2018). "Multidimensional, quantitative assessment of PD-1/PD-L1 expression in patients with Merkel cell carcinoma and association with response to pembrolizumab." Journal for ImmunoTherapy of Cancer **6**(1): 99.

Gire, V. and V. Dulic (2015). "Senescence from G2 arrest, revisited." Cell Cycle **14**(3): 297-304.

Gopal, P., E. I. Sarihan, E. K. Chie, G. Kuzmishin, S. Doken, N. A. Pennell, D. P. Raymond, S. C. Murthy, U. Ahmad, S. Raja, F. Almeida, S. Sethi, T. R. Gildea, C. D. Peacock, D. J. Adams and M. E. Abazeed (2019). "Clonal selection confers distinct evolutionary trajectories in BRAF-driven cancers." Nat Commun **10**(1): 5143.

Graves, E. E., J. Ripoll, R. Weissleder and V. Ntziachristos (2003). "A submillimeter resolution fluorescence molecular imaging system for small animal imaging." Med Phys **30**(5): 901-911.

Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.

Head, T., S. Daunert and P. J. Goldschmidt-Clermont (2017). "The Aging Risk and Atherosclerosis: A Fresh Look at Arterial Homeostasis." Front Genet **8**: 216.

Heinrich, P. C., M. Müller and L. Graeve (2014). Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, Springer-Verlag.

Hildebrand, D. G., S. Lehle, A. Borst, S. Haferkamp, F. Essmann and K. Schulze-Osthoff (2013). "alpha-Fucosidase as a novel convenient biomarker for cellular senescence." Cell Cycle **12**(12): 1922-1927.

Hoffmann, E. J., M. E. Phelps, N. A. Mullani, C. S. Higgins and M. M. Ter-Pogossian (1976). "Design and performance characteristics of a whole-body positron transaxial tomograph." J Nucl Med **17**(6): 493-502.

Jackson, S. P. and J. Bartek (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature **461**(7267): 1071-1078.

Jiang, M., S. Liu, H. Jiang, Y. Lin, Y. Shao, H. Hu, X. Zhao, H. Liu, Y. Huang and L. Liu (2017). "Brain abnormalities in fucosidosis: transplantation or supportive therapy?" Metab Brain Dis **32**(2): 317-320.

Jones, S. M. and A. Kazlauskas (2001). "Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression." FEBS Lett **490**(3): 110-116.

Justice, J. N., A. M. Nambiar, T. Tchkonja, N. K. LeBrasseur, R. Pascual, S. K. Hashmi, L. Prata, M. M. Masternak, S. B. Kritchevsky, N. Musi and J. L. Kirkland (2019). "Senolytics in idiopathic pulmonary fibrosis: Results from a first-in-human, open-label, pilot study." EBioMedicine **40**: 554-563.

Kamada, Y., M. Akita, Y. Takeda, S. Yamada, H. Fujii, Y. Sawai, Y. Doi, H. Asazawa, K. Nakayama, K. Mizutani, H. Fujii, T. Yakushijin, M. Miyazaki, H. Ezaki, N. Hiramatsu, Y. Yoshida, S. Kiso, Y. Imai, N. Kawada, T. Takehara and E. Miyoshi (2013). "Serum Fucosylated Haptoglobin as a Novel Diagnostic Biomarker for Predicting Hepatocyte Ballooning and Nonalcoholic Steatohepatitis." PLoS One **8**(6): e66328.

Kang, T.-W., T. Yevsa, N. Woller, L. Hoenicke, T. Wuestefeld, D. Dauch, A. Hohmeyer, M. Gereke, R. Rudalska, A. Potapova, M. Iken, M. Vucur, S. Weiss, M. Heikenwalder, S. Khan, J. Gil, D. Bruder, M. Manns, P. Schirmacher, F. Tacke, M. Ott, T. Luedde, T. Longerich, S. Kubicka and L. Zender (2011). "Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development." Nature **479**: 547.

Kimura, I., R. Honda, H. Okai and M. Okabe (2000). "Vascular endothelial growth factor promotes cell-cycle transition from G0 to G1 phase in subcultured endothelial cells of diabetic rat thoracic aorta." Jpn J Pharmacol **83**(1): 47-55.

Koff, A., A. Giordano, D. Desai, K. Yamashita, J. W. Harper, S. Elledge, T. Nishimoto, D. O. Morgan, B. R. Franza and J. M. Roberts (1992). "Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle." Science **257**(5077): 1689-1694.

Krtolica, A., S. Parrinello, S. Lockett, P. Y. Desprez and J. Campisi (2001). "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12072-12077.

Kuilman, T., C. Michaloglou, L. C. Vredeveld, S. Douma, R. van Doorn, C. J. Desmet, L. A. Aarden, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2008). "Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network." Cell **133**(6): 1019-1031.

Kurz, D. J., S. Decary, Y. Hong and J. D. Erusalimsky (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." J Cell Sci **113** (Pt 20): 3613-3622.

Lai, T.-Y., I. J. Chen, R.-J. Lin, G.-S. Liao, H.-L. Yeo, C.-L. Ho, J.-C. Wu, N.-C. Chang, A. C.-L. Lee and A. L. Yu (2019). "Fucosyltransferase 1 and 2 play pivotal roles in breast cancer cells." Cell Death Discovery **5**(1): 74.

Lamarche, B. J., N. I. Orazio and M. D. Weitzman (2010). "The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance." FEBS Lett **584**(17): 3682-3695.

- Lane, D. P. (1992). "p53, guardian of the genome." Nature **358**(6381): 15-16.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells." Nature **278**(5701): 261-263.
- Lantos, J., E. S. Mitra, C. S. Levin and A. Iagaru (2018). "Standard OSEM vs. regularized PET image reconstruction: qualitative and quantitative comparison using phantom data and various clinical radiopharmaceuticals." Am J Nucl Med Mol Imaging **8**(2): 110-118.
- Lasry, A. and Y. Ben-Neriah (2015). "Senescence-associated inflammatory responses: aging and cancer perspectives." Trends Immunol **36**(4): 217-228.
- Lee, S. and C. A. Schmitt (2019). "The dynamic nature of senescence in cancer." Nature Cell Biology **21**(1): 94-101.
- Lehmann, M., M. Korfei, K. Mutze, S. Klee, W. Skronska-Wasek, H. N. Alsafadi, C. Ota, R. Costa, H. B. Schiller, M. Lindner, D. E. Wagner, A. Gunther and M. Konigshoff (2017). "Senolytic drugs target alveolar epithelial cell function and attenuate experimental lung fibrosis ex vivo." Eur Respir J **50**(2).
- Liao, E. C., Y. T. Hsu, Q. Y. Chuah, Y. J. Lee, J. Y. Hu, T. C. Huang, P. M. Yang and S. J. Chiu (2014). "Radiation induces senescence and a bystander effect through metabolic alterations." Cell Death & Disease **5**: e1255.
- Lin, A. W., M. Barradas, J. C. Stone, L. van Aelst, M. Serrano and S. W. Lowe (1998). "Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling." Genes Dev **12**(19): 3008-3019.
- Ma, J., J. Setton, N. Y. Lee, N. Riaz and S. N. Powell (2018). "The therapeutic significance of mutational signatures from DNA repair deficiency in cancer." Nature Communications **9**(1): 3292.
- Maniam, S. and J. Szklaruk (2010). "Magnetic resonance imaging: Review of imaging techniques and overview of liver imaging." World J Radiol **2**(8): 309-322.
- Manning, A. L. and N. J. Dyson (2011). "pRB, a tumor suppressor with a stabilizing presence." Trends Cell Biol **21**(8): 433-441.
- Marechal, A. and L. Zou (2013). "DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(9).
- Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, M. S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C. M. van der Horst, D. M. Majoor, J. W. Shay, W. J. Mooi and D. S. Peeper (2005). "BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi." Nature **436**(7051): 720-724.

Mikawa, R., Y. Suzuki, H. Baskoro, K. Kanayama, K. Sugimoto, T. Sato and M. Sugimoto (2018). "Elimination of p19(ARF) -expressing cells protects against pulmonary emphysema in mice." *Aging Cell* **17**(5): e12827.

Minagawa, S., J. Araya, T. Numata, S. Nojiri, H. Hara, Y. Yumino, M. Kawaishi, M. Odaka, T. Morikawa, S. L. Nishimura, K. Nakayama and K. Kuwano (2011). "Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF-beta-induced senescence of human bronchial epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **300**(3): L391-401.

Moriwaki, K., K. Noda, T. Nakagawa, M. Asahi, H. Yoshihara, N. Taniguchi, N. Hayashi and E. Miyoshi (2007). "A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation." *Glycobiology* **17**(12): 1311-1320.

Munoz-Espin, D. and M. Serrano (2014). "Cellular senescence: from physiology to pathology." *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(7): 482-496.

Nacarelli, T., L. Lau, T. Fukumoto, J. Zundell, N. Fatkhutdinov, S. Wu, K. M. Aird, O. Iwasaki, A. V. Kossenkov, D. Schultz, K.-i. Noma, J. A. Baur, Z. Schug, H.-Y. Tang, D. W. Speicher, G. David and R. Zhang (2019). "NAD⁺ metabolism governs the proinflammatory senescence-associated secretome." *Nature Cell Biology* **21**(3): 397-407.

Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A. W. Lin, S. A. Hearn, D. L. Spector, G. J. Hannon and S. W. Lowe (2003). "Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence." *Cell* **113**(6): 703-716.

Noda, K., E. Miyoshi, J. Gu, C. X. Gao, S. Nakahara, T. Kitada, K. Honke, K. Suzuki, H. Yoshihara, K. Yoshikawa, K. Kawano, M. Tonetti, A. Kasahara, M. Hori, N. Hayashi and N. Taniguchi (2003). "Relationship between elevated FX expression and increased production of GDP-L-fucose, a common donor substrate for fucosylation in human hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines." *Cancer Res* **63**(19): 6282-6289.

Noren Hooten, N. and M. K. Evans (2017). "Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence." *J Vis Exp*(123).

Nourse, J., E. Firpo, W. M. Flanagan, S. Coats, K. Polyak, M. H. Lee, J. Massague, G. R. Crabtree and J. M. Roberts (1994). "Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin." *Nature* **372**(6506): 570-573.

Ntziachristos, V., J. Ripoll, L. V. Wang and R. Weissleder (2005). "Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging." *Nature Biotechnology* **23**(3): 313-320.

O'Brien, J. S., P. J. Willems, H. Fukushima, J. R. de Wet, J. K. Darby, R. Di Cioccio, M. L. Fowler and T. B. Shows (1987). "Molecular biology of the alpha-L-fucosidase gene and fucosidosis." Enzyme **38**(1-4): 45-53.

O'Sullivan, R. J. and J. Karlseder (2010). "Telomeres: protecting chromosomes against genome instability." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 171-181.

Oeseburg, H., R. A. de Boer, W. H. van Gilst and P. van der Harst (2010). "Telomere biology in healthy aging and disease." Pflugers Arch **459**(2): 259-268.

Ogrodnik, M., S. Miwa, T. Tchkonja, D. Tiniakos, C. L. Wilson, A. Lahat, C. P. Day, A. Burt, A. Palmer, Q. M. Anstee, S. N. Grellscheid, J. H. J. Hoeijmakers, S. Barnhoorn, D. A. Mann, T. G. Bird, W. P. Vermeij, J. L. Kirkland, J. F. Passos, T. von Zglinicki and D. Jurk (2017). "Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis." Nat Commun **8**: 15691.

Ohanna, M., S. Giuliano, C. Bonet, V. Imbert, V. Hofman, J. Zangari, K. Bille, C. Robert, B. Bressac-de Paillerets, P. Hofman, S. Rocchi, J. F. Peyron, J. P. Lacour, R. Ballotti and C. Bertolotto (2011). "Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS)." Genes Dev **25**(12): 1245-1261.

Omami, G., D. Tamimi and B. F. Branstetter (2014). "Basic principles and applications of (18)F-FDG-PET/CT in oral and maxillofacial imaging: A pictorial essay." Imaging Sci Dent **44**(4): 325-332.

Pare, L., T. Pascual, E. Segui, C. Teixido, M. Gonzalez-Cao, P. Galvan, A. Rodriguez, B. Gonzalez, M. Cuatrecasas, E. Pineda, A. Torne, G. Crespo, S. Martin-Algarra, E. Perez-Ruiz, O. Reig, M. Viladot, C. Font, B. Adamo, M. Vidal, L. Gaba, M. Munoz, I. Victoria, G. Ruiz, N. Vinolas, B. Mellado, J. Maurel, J. Garcia-Corbacho, M. A. Molina-Vila, M. Juan, J. M. Llovet, N. Reguart, A. Arance and A. Prat (2018). "Association between PD1 mRNA and response to anti-PD1 monotherapy across multiple cancer types." Ann Oncol **29**(10): 2121-2128.

Park, J. I., J. S. Jeong, J. Y. Han, D. I. Kim, Y. H. Gao, S. C. Park, G. P. Rodgers and I. H. Kim (2000). "Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell." J Cancer Res Clin Oncol **126**(8): 455-460.

Phelps, M. E., E. J. Hoffman, N. A. Mullani and M. M. Ter-Pogossian (1975). "Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography." J Nucl Med **16**(3): 210-224.

Pines, G., W. J. Kostler and Y. Yarden (2010). "Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy." FEBS Lett **584**(12): 2699-2706.

- Poblocka, M., A. L. Bassey, V. M. Smith, M. Falcicchio, A. S. Manso, M. Althubiti, X. Sheng, A. Kyle, R. Barber, M. Frigerio and S. Macip (2021). "Targeted clearance of senescent cells using an antibody-drug conjugate against a specific membrane marker." Scientific Reports **11**(1): 20358.
- Roninson, I. B. (2003). "Tumor cell senescence in cancer treatment." Cancer Res **63**(11): 2705-2715.
- Schafer, K. A. (1998). "The cell cycle: a review." Vet Pathol **35**(6): 461-478.
- Schenck, J. F. (2000). "Safety of strong, static magnetic fields." J Magn Reson Imaging **12**(1): 2-19.
- Severino, J., R. G. Allen, S. Balin, A. Balin and V. J. Cristofalo (2000). "Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo?" Exp Cell Res **257**(1): 162-171.
- Sherwood, S. W., D. Rush, J. L. Ellsworth and R. T. Schimke (1988). "Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 9086-9090.
- Shi, D. and W. Gu (2012). "Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity." Genes Cancer **3**(3-4): 240-248.
- Shinozaki, T., A. Nota, Y. Taya and K. Okamoto (2003). "Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export." Oncogene **22**(55): 8870-8880.
- Sliwinska, M. A., G. Mosieniak, K. Wolanin, A. Babik, K. Piwocka, A. Magalska, J. Szczepanowska, J. Fronk and E. Sikora (2009). "Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells." Mech Ageing Dev **130**(1-2): 24-32.
- Solana, R., R. Tarazona, I. Gayoso, O. Lesur, G. Dupuis and T. Fulop (2012). "Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans." Semin Immunol **24**(5): 331-341.
- Stein, G. H., L. F. Drullinger, A. Soulard and V. Dulic (1999). "Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts." Mol Cell Biol **19**(3): 2109-2117.
- Takebayashi, S., H. Tanaka, S. Hino, Y. Nakatsu, T. Igata, A. Sakamoto, M. Narita and M. Nakao (2015). "Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through upregulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells." Aging Cell **14**(4): 689-697.
- Tanida, S., T. Mizoshita, K. Ozeki, H. Tsukamoto, T. Kamiya, H. Kataoka, D. Sakamuro and T. Joh (2012). "Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and

- of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment." Int J Surg Oncol **2012**: 862879.
- Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, J. M. Williams, J. N. Sarkaria, W. A. Cliby, S. Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives and R. T. Abraham (1999). "A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53." Genes Dev **13**(2): 152-157.
- Torgovnick, A. and B. Schumacher (2015). "DNA repair mechanisms in cancer development and therapy." Front Genet **6**: 157.
- Tsuji, T., K. Aoshiba and A. Nagai (2006). "Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema." Am J Respir Crit Care Med **174**(8): 886-893.
- Valentijn, F. A., L. L. Falke, T. Q. Nguyen and R. Goldschmeding (2018). "Cellular senescence in the aging and diseased kidney." Journal of Cell Communication and Signaling **12**(1): 69-82.
- Ventura, M. T., M. Casciaro, S. Gangemi and R. Buquicchio (2017). "Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation." Clinical and Molecular Allergy **15**(1): 21.
- Vijayalaxmi, M. Fatahi and O. Speck (2015). "Magnetic resonance imaging (MRI): A review of genetic damage investigations." Mutat Res Rev Mutat Res **764**: 51-63.
- Wang, H., H. Han, S. Mousses and D. D. Von Hoff (2006). "Targeting loss-of-function mutations in tumor-suppressor genes as a strategy for development of cancer therapeutic agents." Semin Oncol **33**(4): 513-520.
- Wang, X., S. C. Wong, J. Pan, S. W. Tsao, K. H. Fung, D. L. Kwong, J. S. Sham and J. M. Nicholls (1998). "Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells." Cancer Res **58**(22): 5019-5022.
- Warburg, O., F. Wind and E. Negelein (1927). "The Metabolism of Tumors in the Body." J Gen Physiol **8**(6): 519-530.
- Wegiel, B., M. Vuerich, S. Daneshmandi and P. Seth (2018). "Metabolic Switch in the Tumor Microenvironment Determines Immune Responses to Anti-cancer Therapy." Front Oncol **8**: 284.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-330.
- Willems, P. J., R. Gatti, J. K. Darby, G. Romeo, P. Durand, J. E. Dumon and J. S. O'Brien (1991). "Fucosidosis revisited: a review of 77 patients." Am J Med Genet **38**(1): 111-131.

Willems, P. J., H. C. Seo, P. Coucke, R. Tonlorenzi and J. S. O'Brien (1999). "Spectrum of mutations in fucosidosis." Eur J Hum Genet **7**(1): 60-67.

Wolter, K., M. Pesic, S. Klotz, N. Herranz, T. Wuestefeld, T.-W. Kang, M. Seehawer, R. Chawla, S. Zwirner, J. Cotton, B. Zhou, M. Krüger, F. Klawonn, T. Longerich, B. Sipos, B. Pichler, J. Gil, M. Eilers, P. K. Premsrirut, A. Poso and L. Zender (2017). "Abstract LB-335: Induction of Ribosomal Checkpoint Induced Senescence (RCIS) for the treatment of liver cancer." Cancer Research **77**(13_Supplement): LB-335-LB-335.

Xiong, Y., H. Zhang and D. Beach (1993). "Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation." Genes Dev **7**(8): 1572-1583.

Xu, M., T. Pirskhalava, J. N. Farr, B. M. Weigand, A. K. Palmer, M. M. Weivoda, C. L. Inman, M. B. Ogrodnik, C. M. Hachfeld, D. G. Fraser, J. L. Onken, K. O. Johnson, G. C. Verzosa, L. G. P. Langhi, M. Weigl, N. Giorgadze, N. K. LeBrasseur, J. D. Miller, D. Jurk, R. J. Singh, D. B. Allison, K. Ejima, G. B. Hubbard, Y. Ikeno, H. Cubro, V. D. Garovic, X. Hou, S. J. Weroha, P. D. Robbins, L. J. Niedernhofer, S. Khosla, T. Tchkonja and J. L. Kirkland (2018). "Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age." Nature Medicine **24**(8): 1246-1256.

Yosef, R., N. Pilpel, N. Papismadov, H. Gal, Y. Ovadya, E. Vadai, S. Miller, Z. Porat, S. Ben-Dor and V. Krizhanovsky (2017). "p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling." EMBO J **36**(15): 2280-2295.

Zhang, X., D. Nie and S. Chakrabarty (2010). "Growth factors in tumor microenvironment." Front Biosci (Landmark Ed) **15**: 151-165.

Zhu, J., D. Woods, M. McMahon and J. M. Bishop (1998). "Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf." Genes Dev **12**(19): 2997-3007.

Zilfou, J. T. and S. W. Lowe (2009). "Tumor suppressive functions of p53." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(5): a001883.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Präklinischen Bildgebung unter Betreuung von Professor Bernd Pichler durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Marcel Krüger und Dr. Jonathan Cotton. Die Versuche wurden von mir mit Unterstützung durch die technischen Assistenten Dennis Haupt, Linda Schramm, Natalie Mucha und dem Ph.D. Kandidaten Benyuan Zhou durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Danksagung

Ich möchte mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden für die Unterstützung in den letzten Jahren bedanken. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mit ihrer jeweiligen Erfahrung stets zur Seite standen, sowie meiner Freundin, die mir immer wieder den Rücken freigehalten hat.

Ebenso möchte ich mich beim gesamten Team des Werner Siemens Imaging Centers, insbesondere bei Prof. Bernd Pichler, Dr. Marcel Krüger und Benyuan Zhou für ihr Engagement bedanken.

