

Aus der Abteilung für Strahlenzytogenetik
des Helmholtz Zentrums München
Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Horst Zitzelsberger

**Bildgebende Massenspektrometrie zur pharmakokinetischen *in situ* Analyse von
Kinaseinhibitoren in Tumorgeweben**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Katharina Huber
aus Trostberg

2018

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Horst Zitzelsberger

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Imhof

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 13.08.2018

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Bildgebende Massenspektrometrie zur pharmakokinetischen *in situ* Analyse von
Kinaseinhibitoren in Tumorgeweben

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ruppling, 24.08.2018

Katharina Huber

Inhalt

1	Einleitung	5
1.1	MALDI imaging Massenspektrometrie	5
1.1.1	MALDI imaging.....	5
1.1.2	Vergleich von Methoden zum Wirkstoffnachweis im Körper	8
1.2	MALDI imaging in der Wirkstoffentwicklung	10
1.2.1	Präklinische Untersuchung von aktiven Substanzen.....	10
1.2.2	Untersuchung von Wirkstoffverteilung und Pharmakokinetik mit MALDI imaging	10
1.2.3	Wirkstoffnachweise mit MALDI imaging	12
1.3	Ziele dieser Arbeit	14
2	Zusammenfassung.....	15
3	Summary	17
4	Publizierte Ergebnisse.....	19
4.1	Beschreibung und Einordnung der Journale	20
4.1.1	Histochemistry and Cell Biology	20
4.1.2	Analytical Chemistry	20
4.2	Eigener Beitrag zu den Publikationen	21
4.2.1	Histochemistry and Cell Biology	21
4.2.2	Analytical Chemistry	21
4.3	A rapid <i>ex vivo</i> tissue model for optimising drug detection and ionisation in MALDI imaging studies	22
4.4	A novel approach of MALDI drug imaging, immunohistochemistry, and digital image analysis for drug distribution studies	23
5	Schlussfolgerung und Ausblick	24
6	Literaturverzeichnis zu Einleitung und Schlussfolgerung	27
7	Abkürzungsverzeichnis.....	35
8	Publikationsverzeichnis	37
8.1	Veröffentlichungen in peer-reviewed journals.....	37
8.2	Präsentationen	38
9	Danksagung.....	39

1 Einleitung

Im Rahmen dieser kumulativen Dissertation wurden zwei Artikel veröffentlicht. Das zentrale Thema beider Arbeiten ist die bildgebende Massenspektrometrie. In der ersten Publikation wurde eine Methode zum Wirkstoffnachweis und zur Abschätzung der Messbarkeit von *in vivo* verabreichten Wirkstoffen aus Gewebeschnitten entwickelt. In der zweiten Publikation wurde die Wirkstoffverteilung von antineoplastischen Wirkstoffen in Xenograft Tumoren untersucht.

Alle in dieser Dissertation dargestellten massenspektrometrischen, histologischen und immunhistochemischen Experimente wurden von mir selbständig geplant, durchgeführt und ausgewertet.

Alle Arbeiten am lebenden Tier wurden im Rahmen von Kooperationsprojekten durchgeführt.

1.1 MALDI imaging Massenspektrometrie

1.1.1 MALDI imaging

Die bildgebende Massenspektrometrie ist eine relativ junge Technik, die es ermöglicht, eine große Anzahl an Biomolekülen und exogenen Stoffen in Geweben nachzuweisen und abzubilden (Neubert und Walch 2013).

Unter der Bezeichnung „Bildgebende Massenspektrometrie“ werden verschiedene Methoden zusammengefasst; die gebräuchlichsten sind MALDI (matrix assisted laser desorption/ionisation), DESI (desorption electrospray ionisation) und SIMS (secondary ion mass spectrometry) imaging. Diese Methoden unterscheiden sich hinsichtlich des Ionisierungsvorgangs, woraus unterschiedliche Ortsauflösung und Sensitivität im Hinblick auf bestimmte Molekülgruppen resultiert. Daraus ergeben sich verschiedene Einsatzgebiete in der Anwendung (Prideaux und Stöckli 2012, Nilsson et al. 2014). Beispielsweise wird für DESI und SIMS, im Gegensatz zum MALDI, keine Matrixüberschichtung benötigt, weil mittels Elektrospray und Ionenstrahl ionisiert wird. Die Ortsauflösung variiert stark, wobei SIMS die beste Auflösung liefert, MALDI im mittleren Bereich liegt, und DESI weniger genau ist. Entsprechend variiert auch die Analysenzeit und die Art der Moleküle, die sich mit der jeweiligen Methode ionisieren lassen (Vaysse et al. 2017).

Mit der Entwicklung der ersten ortsaufgelösten massenspektrometrischen Methoden 1975

durch Hillenkamp begann die Entwicklung verschiedener Ionisierungs- und Detektionstechniken, die schließlich den Nachweis von Biomolekülen durch „matrix-assisted laser desorption/ionisation“ (MALDI) ermöglichte (Hillenkamp et al. 1975, Karas et al. 1985). 1994 wurde die erste MALDI imaging Anwendung beschrieben und 1997 wurden dann erstmals Gewebe mittels bildgebender Massenspektrometrie untersucht (Spengler et al. 1994, Caprioli et al. 1997).

Inzwischen ist MALDI imaging eine zunehmend genutzte Methode zur ortsaufgelösten Messung von Proteinen, Peptiden, Metaboliten, Lipiden, Wirkstoffen und vielen anderen Analyten (Norris und Caprioli 2013). Nach den ersten Beschreibungen der Methode durch Spengler et al. (1994) und Caprioli et al. (1997) wurden fast ausschließlich Proteine aus Gewebeschnitten untersucht (Balluff et al. 2011). Vor allem als Screening-Methode in Biomarkerstudien, zum Beispiel zur Vorhersage des Therapieansprechens, findet MALDI imaging Anwendung (Balluff et al. 2011, Elsner et al. 2012, Schwamborn et al. 2012). Ein neuerer Ansatz ist das Abbilden von Stoffwechselvorgängen, zur Untersuchung von physiologischen Vorgängen, beispielsweise des Steroid-Metabolismus (Ly et al. 2015, Andrew et al. 2016). Das Potential der bildgebenden Massenspektrometrie für den spezifischen und ortsaufgelösten Wirkstoffnachweis in Geweben wird zunehmend in der präklinischen Entwicklung von Arzneistoffen angewandt (Castellino et al. 2012). Vergleichsweise neu ist die Nutzung der bildgebenden Massenspektrometrie in der Mikrobiologie, Botanik und Forensik (Moore et al. 2014, Wang et al. 2016, Bai et al. 2016, Shen et al. 2014, Lauzon et al. 2015).

Beim MALDI imaging, einer Methode in der bildgebenden Massenspektrometrie, werden Schnitte von Geweben, zumeist Gefrierschnitte, auf leitfähigen ITO (Indium-Zinn-Oxid) - Objektträgern aufgezogen (Buck et al. 2015, Ly et al. 2016, Norris und Caprioli 2013). Diese Schnitte werden dann mit einer sogenannten Matrix überschichtet. Als Matrixsalze werden UV-lichtabsorbierende organische Säuren mit niedrigem Molekulargewicht verwendet und werden, in einem organischen Lösungsmittel gelöst, in möglichst gleichmäßigen, mikroskopisch kleinen Tröpfchen auf die Gewebeschnitte aufgebracht. Dadurch werden die im Lösungsmittel löslichen Analytmoleküle aus dem Gewebeschnitt herausgelöst und kokristallisieren mit dem Matrixsalz zu möglichst kleinen Kristallen (Neubert und Walch 2013). Die Zusammensetzung der Matrix spielt eine große Rolle, da zum einen die Lösungsmittelkomponente die Extraktion von Molekülen aus dem Gewebe beeinflusst und zum anderen das Matrixsalz das UV-Licht des Lasers absorbiert und auf die Analytmoleküle überträgt und damit die Desorption und Ionisierung ermöglicht (Norris und Caprioli 2013). So

werden für verschiedene Fragestellungen auch verschiedene Matrixsalze eingesetzt. Für kleine Moleküle werden bevorzugt α -Hydoxyzimtsäure (CHCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) und Dihydroxybenzoësäure (DHB, 2,3-dihydroxybenzoic acid) verwendet, zur Ionisierung von großen Molekülen (Peptiden und Proteinen) wird meist Sinapinsäure verwendet (Neubert und Walch 2013). Das organische Lösungsmittel ermöglicht die Extraktion der Analytmoleküle, daher muss die Zusammensetzung der Matrix auf die Löslichkeit der entsprechenden Analyten abgestimmt sein. Auch das Auftragen der Matrix erfordert eine Optimierung, da die Gewebeschnitte soweit befeuchtet sein müssen, dass eine gute Extraktion ermöglicht wird. Jedoch führt eine zu starke Durchtränkung zu Diffusion und damit zu einer schlechteren Ortsauflösung (Groseclose und Castellino 2013). Besonders beim Nachweis von Arzneistoffen muss die Löslichkeit der Wirkstoffe im Matrixlösungsmittel bedacht werden, sodass für die meisten Versuchsansätze eine ausführliche Optimierung der Matrixzusammensetzung und –applikation unerlässlich ist (Groseclose und Castellino 2013, Huber et al. 2014a).

Das Auftragen der Matrix kann sowohl manuell als auch automatisiert erfolgen (Norris und Caprioli 2013). Das manuelle Auftragen mittels Pipette eignet sich gut für vorbereitende Versuche und Methodenentwicklung, ist jedoch für eine ortsaufgelöste Messung ungeeignet, da hier durch die große Lösungsmittelmenge zwar eine erhebliche Extraktion stattfindet, jedoch diffundieren dabei die Moleküle und werden delokalisiert, sodass bei dieser Methode kaum eine strukturbezogene Information zu erwarten ist (Norris und Caprioli 2013). Bei kommerziell verfügbaren Apparaturen wird die Matrixmischung aufgespottet, aufgesprüht oder per Sublimation aufgebracht. Ziel hierbei ist, bei möglichst guter Extraktion eine möglichst geringe Delokalisation zu erreichen. Darüber hinaus wird eine geringe Tröpfchengröße angestrebt, um eine homogene Kristallbildung zu ermöglichen (Neubert und Walch 2013). Sehr kleine und homogene Matrixkristalle sind eine wichtige Voraussetzung für eine gleichmäßige Ionisierung und Vergleichbarkeit der Massenspektren (Neubert und Walch 2013).

Grundsätzlich werden in der bildgebenden Massenspektrometrie zwei Messverfahren unterschieden: „Profiling“ und „Imaging“-Messungen (Norris und Caprioli 2013). Bei „Profiling“-Messungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit „A rapid *ex vivo* tissue model for optimising drug detection and ionisation in MALDI imaging studies“ angewendet wurden, wird ein großer Laserdurchmesser (ca. 100 bis 500 μm) verwendet, um die im Gewebe vorhandenen Moleküle zu ionisieren und zu erfassen. Jedoch liegt hierbei kein großes Augenmerk auf einer genauen ortsaufgelösten Darstellung, die beim „Profiling“ stark limitiert

ist. Ein großer Vorteil liegt dabei in einer Zeitsparnis, weshalb diese Methode geeignet ist, um zügig einen repräsentativen Eindruck über das Vorhandensein oder die Messbarkeit von bestimmten Analyten zu bekommen (Norris und Caprioli 2013). Aus diesem Grund wurde die „Profiling“-Methode in der vorliegenden Arbeit „A rapid *ex vivo* tissue model for optimising drug detection and ionisation in MALDI imaging studies“ angewendet (Huber et al. 2014a). Anders verhält es sich bei „Imaging“-Messungen, hier werden ganze Gewebeschnitte, oder repräsentative Teile davon, mit einem definierten, hochauflösten Laserraster abgemessen. Bei sehr homogenen Geweben wie zum Beispiel Xenograft-Tumoren kann die Messung mit einer Ortsauflösung von 100 µm (alle 100 µm ein Laserpunkt) bereits aufschlussreich sein, wohingegen kleine und komplexe Proben, zum Beispiel infarzierte Mäuseherzen oder Tumorbiopsien, ein engeres Raster erfordern, um die verschiedenen Gewebe-Subpopulationen zu erfassen (Aichler et al. 2015, Aichler et al. 2013). Die Technik wird diesbezüglich beständig vorangetrieben, so berichten neueste Artikel bereits von MALDI imaging Methoden mit Ortsauflösungen auf Einzelzellebene (Caprioli 2016).

Je höher die Ortsauflösung ist, desto besser können komplex zusammengesetzte Gewebeproben untersucht werden. Gewebeproben bestehen aus vielen verschiedenen Zellarten und extrazellulären Bestandteilen wie Stroma, Blut- und Lymphgefäßen und Bindegewebe sowie weiteren Komponenten (Rauser et al. 2010). All diese Bestandteile weisen eine unterschiedliche molekulare Zusammensetzung auf und liefern daher beim MALDI imaging sehr verschiedene Spektren. Daher erlaubt erst die Koregistrierung des histologisch angefärbten Gewebeschnitts eine morphologie-basierte Auswertung, da die entsprechenden Spektren mit ihren Signalintensitäten den Gewebestrukturen zugeordnet werden können. So können mittels virtueller Mikrodissektion digital Gewebsregionen definiert und die entsprechenden Massenspektren exportiert und ausgewertet werden. Zur visuellen Ergebnisdarstellung besteht die Möglichkeit, die massenspektrometrischen Signalintensitäten ortsaufgelöst auf den Gewebeschnitten darzustellen (Schöne et al. 2013).

1.1.2 Vergleich von Methoden zum Wirkstoffnachweis im Körper

Die bildgebende Massenspektrometrie verbindet die Vorteile der Massenspektrometrie mit denen der histologischen Analyse. Die Massenspektrometrie ermöglicht die direkte Messung mehrerer hundert molekularer Spezies aus komplexen Proben. Es wird keine Markierung benötigt, die die biologischen, chemischen oder physikalischen Eigenschaften des Zielmoleküls beeinflussen kann (Norris und Caprioli 2013).

Der wohl größte Vorteil der bildgebenden Massenspektrometrie gegenüber den flüssigbasierten Methoden ist die Möglichkeit, Gewebeschnitte zu messen, ohne diese dabei zu zerstören. Dadurch bleibt die Morphologie erhalten und kann dann mit den massenspektrometrischen Daten korreliert werden (Schöne et al. 2013).

Gegenüber anderen bildgebenden Verfahren wie der Magnetresonanztomographie (magnetic resonance imaging, MRI) und der Positronenemissionstomographie (PET) bietet MALDI imaging den Vorteil, dass keine molekularen Markierungen benötigt werden (Prideaux und Stoeckli 2012). Dadurch können Biomoleküle oder Wirkstoffe in ihrem physiologischen Kontext untersucht werden (Neubert und Walch 2013). Darüber hinaus ermöglicht MALDI imaging die simultane Detektion von Wirkstoffen und deren Metaboliten, da, anders als zum Beispiel bei der Autoradiographie, die Moleküle aufgrund ihrer Masse erfasst und voneinander unterschieden werden (Prideaux and Stoeckli 2012). Ein weiterer, sehr gewichtiger Vorteil von MALDI imaging ist die sehr kleine benötigte Probenmenge. Bereits kleine endoskopisch gewonnene Biopsien (ca. 1 x 1 mm) reichen aus, um eine molekulare Analyse durchzuführen (Aichler et al. 2013).

MALDI imaging ist somit als Multiplexverfahren zu verstehen, bei dem nicht nur die „gesuchten“ Moleküle gemessen (zielgerichtetes Analyseverfahren, „targeted“), sondern alle messbaren Moleküle erfasst werden, die unter den gegebenen Messumständen ionisierbar und detektierbar sind (nicht-zielgerichtetes Verfahren, „non-targeted“) (Gorzolka und Walch 2014a). Das macht MALDI imaging zu einer vielversprechenden Screening-Methode, es können Analyten erfasst werden, die zuvor gar nicht oder nur aus einem anderen Zusammenhang bekannt waren (Gorzolka et al. 2014b).

1.2 MALDI imaging in der Wirkstoffentwicklung

1.2.1 Präklinische Untersuchung von aktiven Substanzen

Die Entwicklung von Wirkstoffen ist ein sehr aufwendiges Unterfangen, das ca. 12 bis 15 Jahre in Anspruch nimmt und Kosten bis zu einer Milliarde US-Dollar verursachen kann (Hughes et al. 2011). Auf die Identifizierung einer Zielstruktur, wie zum Beispiel ein Rezeptormolekül, folgt das Screening nach Leitstrukturen, das heißt Substanzen, die beispielsweise an eine Zielstruktur binden können, die dann ausführlichen präklinischen Studien unterzogen werden. Nach erfolgreicher *in vitro* und *in vivo* Testung auf Wirksamkeit sowie Toxizität erfolgen umfangreiche Untersuchungen zum pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Profil, bevor eine Substanz dann in klinischen Studien eingesetzt werden kann (Hughes et al. 2011). Das Vorhandensein eines Wirkstoffs an der entsprechenden Zielstruktur ist eine grundlegende Voraussetzung für dessen Wirksamkeit, daher spielt die Untersuchung der Wirkstoffverteilung in Geweben bei der pharmakologischen Charakterisierung eine besondere Rolle (Marusyk et al. 2012).

1.2.2 Untersuchung von Wirkstoffverteilung und Pharmakokinetik mit MALDI imaging

Ein Großteil des bekannten Wissens über Pharmakologie, Toxizität, Pharmakokinetik und Interaktionen zwischen Wirkstoffen wird aus der Untersuchung von Surrogaten wie Plasma gewonnen. Dieses Vorgehen ist pragmatisch, da nur eine einfache Blutabnahme nötig ist, um entsprechende Proben zu gewinnen. Trotz dieser Vorteile bildet diese Vorgehensweise nicht die tatsächliche Situation im Gewebe ab (Goodwin et al. 2010).

Um Wirkstoffverteilungen in Geweben zu unterscheiden, wird üblicherweise die Autoradiographie eingesetzt. Durch die Aufarbeitung von Versuchstieren in Ganzkörperschnitten ist es möglich, Ganzkörper-ADME-Studien durchzuführen, also die Absorption (A), Distribution (D), Metabolisierung (M) und die Exkretion (E) eines Wirkstoffs im Körper zu untersuchen. Hierbei wird die Wirksubstanz radioaktiv markiert und anschließend die radioaktive Markierung von Wirkstoff und markierungstragenden Metaboliten nachgewiesen, ohne diese jedoch sicher unterscheiden zu können (Solon et al. 2010). Die typische Ortsauflösung der Autoradiographie (ARG) beträgt zwischen 50 und 100

µm, mittels Mikroautoradiographie können 10 µm erreicht werden (Castellino et al. 2011). MALDI imaging ermöglicht eine vergleichbare Ortsauflösung, erlaubt aber darüber hinaus die Unterscheidung von Wirkstoff und Metaboliten anhand deren Massen. Dazu bietet MALDI imaging die Möglichkeit, eine hohe Anzahl an endogenen Molekülen mit zu erfassen und simultan zum Wirkstoff abzubilden, die als mögliche molekulare Marker für Therapieansprechen, toxische Effekte oder Krankheitsverlauf dienen können (Castellino 2012, Prideaux und Stoeckli 2012).

Auch die Positronenemissionstomographie (PET) wird inzwischen für die Verfolgung der Wirkstoffmoleküle im Körper (Mensch oder Versuchstier) angewandt. PET kann *in vivo* durchgeführt werden und ermöglicht so wiederholte Messungen und liefert gute Daten zur Kinetik (Slobbe et al. 2015). Jedoch werden auch hier markierte Wirkstoffmoleküle benötigt, was technischen Aufwand und Verlust an molekularer Spezifität bedeutet, da nicht zwischen Wirkstoff und Metaboliten unterschieden werden kann (Rudin und Weissleder 2003).

Im Gegensatz dazu wird bei der bildgebenden Massenspektrometrie (MSI) keine Markierung benötigt, vielmehr ermöglicht die Massenbestimmung einen simultanen und spezifischen Nachweis von Wirkstoffen und Metaboliten (Norris und Caprioli 2013).

Eine andere hochspezifische Methode für den Nachweis und die Identifikation verschiedener Moleküle ist die Gewebsextraktion mit nachfolgender flüssig-chromatographischer Auftrennung und massenspektrometrischer Detektion (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS). Dieser Ansatz erlaubt die markierungsfreie, spezifische Detektion und Quantifizierung der Analyten, jedoch kann innerhalb des extrahierten Gewebestücks keine Ortsauflösung erreicht werden (Prideaux und Stoeckli 2012).

Demgegenüber kann die bildgebende Massenspektrometrie Moleküle sehr genau, bis auf wenige Mikrometer, ortsaufgelöst abmessen. Wie bei Autoradiographie und LC-MS ist dies keine *in vivo* Methode, sodass nur ein einziger Zeitpunkt pro Probe in der Pharmakokinetik aufgenommen werden kann. MSI besitzt die gleichen Vorteile wie die LC-MS, nämlich die spezifische molekulare und simultane Detektion ohne molekulare Marker, hat aber darüber hinaus den einzigartigen Vorteil, dass die Gewebeschnitte in ihrer histo-anatomischen Struktur erhalten bleiben und nach entsprechender Färbung mit massenspektrometrischen Daten überlagert werden können (Norris und Caprioli 2013). So werden die Vorteile der simultanen hochspezifischen Detektion mittels Massenspektrometrie mit der Ortsauflösung, wie sie etwa die Mikroautoradiographie bietet, kombiniert. Auch die schon erwähnte Koregistrierung mit verschiedenen Färbungen bietet einen großen Vorteil für die genaue Lokalisierung der Wirkstoffe und ihrer Metaboliten, da damit die Verteilung von Wirkstoffen

auf spezifische Gewebsstrukturen bezogen werden kann, wie es in der hier vorgelegten Publikation „A novel approach of MALDI drug imaging, immunohistochemistry, and digital image analysis for drug distribution studies“ durchgeführt wurde (Huber et al. 2014b).

1.2.3 Wirkstoffnachweise mit MALDI imaging

Da die bildgebende Massenspektrometrie die Möglichkeit zur markierungsfreien und ortsaufgelösten Detektion von Wirkstoffen bietet, wird die Methode zunehmend für Wirkstoffanalysen genutzt (Norris und Caprioli 2013). Die bildgebende Massenspektrometrie mit ihrer geringen erforderlichen Probenmenge, sowie der große Informationsgehalt solcher Messungen können, vor allem in Kombination mit histologischen Methoden, maßgeblich zu pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Studien beitragen (Castellino 2012).

In bisher publizierten Studien wurde die Verteilung von bereits zugelassenen oder vor der Zulassung stehenden Wirkstoffen untersucht, wie zum Beispiel Vemurafenib, Levofloxacin, Chlordecon, Tamoxifen und Tiotropiumbromid (Kwon et al. 2015, Prideaux et al. 2015, Lagarrigue et al. 2014, Végvári et al. 2016, Zecchi et al. 2013).

Torok et al. (2014) zeigten mit bildgebender Massenspektrometrie die Wirkstoffverteilung von Sunitinib in Xenograft Tumoren von Colon-Adenokarzinomen. Anhand immunhistochemisch gefärbter Folgeschnitte wurden die Zielrezeptoren von Sunitinib angefärbt, sodass diese mit dem abgebildeten Wirkstoff koregistriert werden konnten, um zu zeigen, ob der Wirkstoff an seinen Rezeptor gelangt.

Auch toxikologische Effekte wurden mit MALDI imaging abgebildet, zum Beispiel wurde von Castellino et al. (2013) eine große Studie zum Virustatikum Fosdevirin durchgeführt. Nicht nur die pharmakologischen Bestandteile der Arzneimitteltherapie sind toxikologisch relevant, auch Hilfsstoffe wie zum Beispiel Konservierungsmittel können unerwünschte Effekte hervorrufen. Desbenoit et al. (2013) nutzten die bildgebende Massenspektrometrie um die Anreicherung des Konservierungsstoffs Benzalkoniumchlorid, in Hornhaut und Bindegewebe des Auges zu untersuchen.

Besonders für die Untersuchung neuartiger Wirkstofffreisetzungssysteme und von Wirkstoff-Antikörper-Konjugaten ist die Anwendung der bildgebenden Massenspektrometrie sinnvoll, da freier als auch gebundener Wirkstoff unterschieden werden können und auch feine Unterschiede bezüglich des Verhaltens im Gewebe erfasst werden (Swales et al. 2014, Fujiwara et al. 2016). Häufig lassen sich der Wirkstoff und seine Metaboliten in einer und derselben Messung abbilden, sodass Rückschlüsse auf die Wirksamkeit und Toxikologie der

Metaboliten sowie Metabolitenanreicherung und Wirkstoffabbau und -ausscheidung gezogen werden können (Buck et al. 2015b, Sun et al. 2016).

Den neuen Möglichkeiten, die die bildgebende Massenspektrometrie für die Wirkstoffanalyse bietet, stehen auch methodische Herausforderungen gegenüber.

Die wohl größte Hürde beim Aufsetzen von „Drug Imaging“ Experimenten stellt die Detektion des einzelnen Wirkstoffsignals aus Gewebeschnitten dar. Mittels Laser werden nicht nur die gewünschten Wirkstoff- oder Metabolitensignale ionisiert, sondern auch viele verschiedene endogene Moleküle, die den Wirkstoffnachweis stören können. Dies geschieht zum Beispiel durch Signalüberlagerung mit endogenen Molekülen oder auch Matrixsignalen. Daher spielt die Wahl der geeigneten Matrixsubstanz eine bedeutende Rolle, da sie einerseits die Ionisierung überhaupt ermöglichen muss, andererseits jedoch keine Signalüberlagerung stattfinden darf (Stöckli et al. 2007).

Zudem kann die komplexe chemische Zusammensetzung von Gewebeschnitten zu Wechselwirkungen führen, in deren Folge Signalintensitäten beeinflusst werden können, wie z. B. beim sogenannten „Ionensuppressionseffekt“ (Heeren et al. 2009). Darunter versteht man die Signalverminderung von Analyten auf Gewebe im Vergleich zum Analytsignal direkt auf einem herkömmlichen MALDI-Probenträger ohne Gewebehintergrund. Mögliche Ursachen hierfür sind endogen vorhandene Salze und Lipide, die den Ionisierungsprozess beeinflussen, oder molekulare Interaktionen zwischen Analyten und endogenen Biomolekülen (Castellino et al. 2011, Heeren et al. 2009). So stellt der Nachweis von Wirkstoffen in Geweben oft eine Herausforderung dar, da die Messbarkeit des Reinstoffs auf einem herkömmlichen MALDI-Probenträger oder auch einem speziellen leitfähigen Indium-Zinn-Oxid-Objektträger (ITO-Träger) nicht auf die Messbarkeit des gleichen Signals im Gewebeschnitt übertragbar ist (Castellino et al. 2011). Dieses Problem wurde in der ersten hier aufgeführten Publikation behandelt. Es wurde ein *ex vivo* Experiment entwickelt, das zum einen eine Vorhersage über die Messbarkeit von Wirkstoffen aus Geweben und zum anderen die Optimierung von Messparametern und experimentellen Variablen (die Matrixsubstanz) erlaubt (Huber et al. 2014a).

In der zweiten Publikation wurde die Verteilung dreier, *in vivo* verabreichter antineoplastischer Wirkstoffe in Tumorgewebe untersucht und die Ursache der sehr homogenen Wirkstoffverteilung mittels immunhistologischer CD31 Färbung der Blutgefäße untersucht (Huber et al. 2014b).

1.3 Ziele dieser Arbeit

Das Ziel dieser Dissertation war die Entwicklung und Validierung einer MALDI imaging Methode für Wirkstoffverteilungsstudien sowie die Untersuchung von drei antineoplastischen Wirkstoffen in Xenograft Tumorgeweben. Im Rahmen dieser kumulativen Dissertation wurden zwei Artikel zu den genannten Fragestellungen veröffentlicht.

Zur Optimierung von Probenvorbereitung und Messbedingungen der MALDI „drug imaging“ Studien wurde zunächst ein *ex vivo* Experiment entwickelt. Die Etablierung von MALDI drug imaging Experimenten erfordert einen hohen Aufwand an behandeltem Gewebe. Aus diesem Grund war das Ziel der ersten Studie, anhand von unbehandelten Leberschnitten ein zuverlässiges Optimierungsmodell für die Messung der Wirkstoffe Afatinib, Erlotinib und Sorafenib zu etablieren, das ohne *in vivo* behandeltes Tiergewebe auskommt. Auch sollte an diesem *ex vivo* Modell eine Vorhersage über die Messbarkeit der Wirkstoffe mittels MALDI imaging getroffen werden können, um eventuelle Störeffekte wie Ionensuppression schnell zu erkennen und Aussagen über die Ionisierbarkeit der Wirkstoffmoleküle aus Gewebeschnitten treffen zu können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Verteilung von drei *in vivo* verabreichten antineoplastischen Wirkstoffen (Afatinib, Erlotinib und Sorafenib) in Abhängigkeit von der Blutversorgung in Tumorgeweben.

Zur Charakterisierung der Wirkstoffverteilung im Gewebe gehört nicht nur der Nachweis und das Abbilden der Verteilung des Wirkstoffsignals in Xenograft Tumoren, vielmehr muss auch die Kinetik der Wirkstoffverteilung über die Zeit betrachtet werden. Die zumeist heterogene Verteilung von Wirkstoffen in Geweben wirft die Frage nach Faktoren auf, die die Verteilung der Wirkstoffe beeinflussen. Daher war es Ziel der zweiten veröffentlichten Studie, die Wirkstoffverteilung im zeitlichen Verlauf und darüber hinaus den Einfluss der Blutgefäße auf die Wirkstoffverteilung zu untersuchen. Um die Struktur der Blutgefäße in Gewebeschnitten zu detektieren und zu charakterisieren, wurden immunhistologische CD31 Färbungen durchgeführt. Um eine semiquantitative Korrelation zwischen den Wirkstoffsignalen aus dem MALDI „drug imaging“ Experiment und dem immunhistologischen Gefäßnachweis zu erreichen, sollten beide Datensätze mittels digitaler Bildauswertung integriert werden.

2 Zusammenfassung

Das zentrale Thema dieser Doktorarbeit ist die Etablierung und Anwendung von Methoden der bildgebenden Massenspektrometrie zur pharmakokinetischen *in situ* Analyse von Kinaseinhibitoren in Tumorgeweben.

Der erste Artikel, der im Rahmen dieser Doktorarbeit veröffentlicht wurde, “A rapid *ex vivo* tissue model for optimising drug detection and ionisation in MALDI imaging studies”, publiziert in Histochemistry and Cell Biology, behandelt die Etablierung eines *ex vivo* Modells, um die Ionisierbarkeit und die Detektierbarkeit von *in vivo* verabreichten Wirkstoffen mittels bildgebender Massenspektrometrie vorherzusagen.

Hierbei wurden Verdünnungsreihen der Wirkstoffe Afatinib, Erlotinib, Sorafenib und Pirfenidon auf Leberschnitte aufgebracht. Mithilfe dieser *ex vivo* behandelten Leberschnitte wurden Probenvorbereitung und Messparameter für den Wirkstoffnachweis optimiert. Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend in einem MALDI imaging Ansatz an *in vivo* behandelten Lebergeweben validiert.

Anhand des *ex vivo* Experiments konnten Matrixzusammensetzung sowie Messparameter für den jeweiligen Wirkstoffnachweis optimiert werden. Diese Etablierungsmethode kann nun vor dem Einsatz von Labortieren durchgeführt werden und eine Vorhersage für die Messbarkeit von Wirkstoffen in Gewebe liefern.

In der zweiten Studie “A novel approach of MALDI drug imaging, immunohistochemistry, and digital image analysis for drug distribution studies in tissues”, erschienen in Analytical Chemistry, wurde die bildgebende Massenspektrometrie zur Untersuchung der Verteilung und Kinetik von Wirkstoffen in Xenograft Tumoren herangezogen.

Es wurden zwei Tumormodelle untersucht, ein Xenograft Modell für Kopf-Hals-Tumoren, in dem die Tyrosinkinaseinhibitoren Afatinib und Erlotinib eingesetzt wurden, sowie ein Xenograft Modell für Sarkome mit dem Multikinaseinhibitor Sorafenib. Die Wirkstoffverteilung in den Gewebeschnitten wurde mittels MALDI imaging bestimmt. Diese beiden Befunde, Wirkstoffverteilung und Gefäß-Färbung, wurden koregistriert und mittels digitaler Bildanalyse ausgewertet.

Diese multimodale Vorgehensweise ermöglichte die Erfassung des Zusammenhangs von Vaskularisierung und Wirkstoffverteilung in den Xenograft Tumoren. Neben der heterogenen Wirkstoffverteilung, die in allen Behandlungsregimen zu detektieren waren, war in den

Tumorregionen, in denen starke Wirkstoffsignale gemessen wurden, ein hoher Grad an Vaskularisierung auffällig. Im Gegensatz dazu konnten in den Tumorregionen ohne Wirkstoffsignale nur wenige Blutgefäße gefunden werden. Im Sarkommodell wurde ein Zusammenhang zwischen der Größe der Blutgefäße und der Wirkstoffverteilung festgestellt. Der Flächenanteil von kleinen Gefäßen am Gesamtflächenanteil der Blutgefäße war in den stark wirkstoffhaltigen Tumorregionen größer als in den Regionen ohne Wirkstoff, was auf eine überwiegende Diffusion durch die Endothelien der kleinen Blutgefäße hinweist. Um die Diffusion in das Tumorgewebe zu untersuchen, wurde die Signalintensität der Wirkstoffmessung in Abhängigkeit von der Entfernung zum nächsten Blutgefäß verglichen. In diesem Zusammenhang wurden signifikante Unterschiede der Diffusion zwischen den einzelnen Wirkstoffen und zwischen verschiedenen Dosierungen erkannt.

Die Kombination aus Wirkstoffnachweis mit MALDI imaging und Immunhistochemie ist ein spezifischer und örtlich hochauflöster Ansatz, der die Korrelation von histologischen Merkmalen mit pharmakokinetischen Eigenschaften erlaubt und so wertvolle Informationen für die Weiterentwicklung von Wirkstoffen, Formulierungen und Behandlungsschemata liefert.

3 Summary

The main focus of this thesis is the development and application of mass spectrometry imaging for the pharmacokinetic *in situ* analysis of kinase inhibitors in tumour tissues.

The first publication reported in this thesis, “A rapid *ex vivo* tissue model for optimising drug detection and ionisation in MALDI imaging studies”, published in Histochemistry and Cell Biology, addresses the development of a reliable *ex vivo* model which enables the prediction of ionisation and the detection of *in vivo* administered drug molecules.

Decreasing dilution series of afatinib, erlotinib, sorafenib and pirfenidone were spotted onto liver sections in order to specifically optimise sample preparation and measurement conditions for the subsequent drug detection. The results from the *ex vivo* liver spotting model were validated by a MALDI drug imaging approach of *in vivo* treated liver tissue.

Using the developed *ex vivo* experiment, it was possible to establish a protocol for sample preparation, by finding an optimal matrix substance for each drug, and to improve measurement conditions, by finding a suitable mass spectrometer for a specific drug detection. These method optimisation experiments should be carried out prior to the treatment of animals and therefore help to reduce animal experiments by predicting the measurability of drugs in a tissue background.

In the second publication, “A novel approach of MALDI drug imaging, immunohistochemistry, and digital image analysis for drug distribution studies in tissues”, published in Analytical Chemistry, imaging mass spectrometry was employed for the examination of drug distribution and kinetics in xenograft tumour tissues.

Two tumor models were investigated, a head and neck squamous cell carcinoma xenograft model, treated with the tyrosine kinase inhibitors erlotinib and afatinib, and a sarcoma xenograft model, treated with the multi-kinase inhibitor sorafenib. After the analysis of drug distribution by imaging mass spectrometry, the tumor tissue was immunostained for CD31, a marker for blood vessels. Subsequently, both images, the drug distribution revealed by MALDI imaging and the CD31 immunostain, were co-registered and examined by digital image analysis.

This combined approach allowed a correlation of the drug distribution with the occurrence, size and distance of blood vessels. Despite a heterogeneous distribution of all three anti-cancer agents, we found a higher degree of vascularization in the tumor regions with high

drug levels, compared to regions without drug signals that contained only few blood vessels. In the sarcoma model, we found a correlation between blood vessel size and drug distribution. The ratio between small vessels to total vessel areas in drug containing tumor regions was significantly higher than in tumor regions without drug signal, suggesting a prevailing diffusion through the endothelia of small blood vessels.

The drug signal intensity as a function of distance to blood vessels was measured in order to investigate the diffusion of the drug into the tumor tissue. As a result, significant differences in the diffusion states were detected between the anti-cancer agents and between varying doses.

The combination of drug detection by MALDI imaging and immunohistochemistry appeared to be a specific approach with high local resolution which enables the correlation of histological features with pharmacokinetic properties. It is therefore a valuable tool for the improvement of drug design, administration formula or treatment regimen.

4 Publizierte Ergebnisse

4.1 Beschreibung und Einordnung der Journale

4.1.1 Histochemistry and Cell Biology

Histochemistry and Cell Biology (Histochem Cell Biol.) ist ein Journal, das Forschungsarbeiten im Bereich molekulare Histologie und Zellbiologie veröffentlicht. Dazu zählen auch Arbeiten auf den Gebieten molekulare Zusammensetzung, metabolische Prozesse sowie Methodenentwicklung in Histochemie und Zellbiologie. Die Artikel unterliegen einer Peer review-Begutachtung.

Histochemistry and Cell Biology ist das offizielle Journal der Gesellschaft für Histochemie und erscheint monatlich im Springer Verlag.

Thomson Reuters verzeichnet Histochemistry and Cell Biology in der Kategorie Mikroskopie, wo es dem Journal Citations Report 2014 zufolge mit einem Impaktfaktor von 3,054 und einem Fünfjahres-Impaktfaktor von 2,487 auf Rang eins von elf Journalen liegt.

4.1.2 Analytical Chemistry

Analytical Chemistry (Anal Chem.) ist ein Journal, das jüngste und originäre Forschung auf allen Gebieten der analytischen Chemie, wie zum Beispiel Bioanalytik, Massenspektrometrie, Elektrochemie, Bildgebung, Instrumentierung, Datenverarbeitung und Messtechnologie publiziert.

Arbeiten, die in Analytical Chemistry erscheinen, unterliegen einem peer-review-Begutachtungsprozess. Das Journal erscheint in zweiwöchigem Rhythmus bei ACS Publications.

Laut ISI Web of Knowledge rangiert Analytical Chemistry auf Position vier im Bereich Analytische Chemie (insgesamt 76 Journale). Im Journal Citation Report 2014 weist Analytical Chemistry einen Impaktfaktor von 5.636 und einen Fünfjahres-Impaktfaktor von 5.794 auf.

4.2 Eigener Beitrag zu den Publikationen

4.2.1 Histochemistry and Cell Biology

An der Arbeit “A rapid *ex vivo* tissue model for optimising drug detection and ionisation in MALDI imaging studies”, publiziert in Histochemistry and Cell Biology, beträgt der von mir durchgeführte Anteil das Aufsetzen des experimentellen Designs für das MALDI „drug imaging“ Experiment, sowie die Experimentelle Durchführung von massenspektrometrischen und histologischen Methoden inklusive Probenvorbereitung, Datenerfassung, Gewebeannotation, statistische Auswertung, Erstellen von Abbildungen und Verfassen des Manuskriptes.

4.2.2 Analytical Chemistry

Der eigene Anteil an der in Analytical Chemistry erschienenen Publikation „A novel approach of MALDI drug imaging, immunohistochemistry, and digital image analysis for drug distribution studies in tissues“, umfasst das Aufsetzen des experimentellen Designs für die Tierversuche und das MALDI „drug imaging“ Experiment, sowie das Mitwirken bei den Tierversuchen. Die massenspektrometrischen und histologischen Arbeiten, mit Probenvorbereitung, Durchführung der Experimente, Datenerfassung und Gewebeannotation sowie die Immunhistochemie, Bildanalyse, statistische Auswertung, Erstellen der Abbildung und Anfertigen des Manuskripts wurden von mir selber durchgeführt.

4.3 A rapid *ex vivo* tissue model for optimising drug detection and ionisation in MALDI imaging studies

Huber K, Aichler M, Sun N, Buck A, Li Z, Fernandez IE, Hauck SM, Zitzelsberger H, Eickelberg O, Janssen KP, Keller U, Walch A

Histochem Cell Biol. 2014 Oct; 142(4):361-71

doi: 10.1007/s00418-014-1223-0.

4.4 A novel approach of MALDI drug imaging, immunohistochemistry, and digital image analysis for drug distribution studies

Huber K, Feuchtinger A, Borgmann D M, Li Z, Aichler M, Hauck S, Zitzelsberger H, Schwaiger M, Keller U, Walch A

Anal Chem. 2014 Nov 4; 86(21):10568-75

doi: 10.1021/ac502177y.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Gegensatz zur MALDI Messung von Proteinen, Metaboliten und anderen Biomolekülen, die meist in einer Art Screening-Messung erfasst werden, erfordert der Nachweis von *in vivo* applizierten Wirkstoffen einen zielgerichteten Messansatz („targeted approach“) (Buck und Walch 2014, Gorzolka und Walch 2014). Dies erfordert die Optimierung einer Reihe von Parametern, wie z. B. die Bestimmung der zu verabreichen Wirkstoffmenge, um den *in vivo* applizierten Wirkstoff im Gewebeabschnitt nachweisen zu können. Die Ionisierbarkeit des Analyten selbst und der Wirkstoffnachweis vor Gewebehintergrund sind zu untersuchen. Des Weiteren muss eine geeignete Matrixsubstanz gefunden werden (Huber et al. 2014a). Da für die Entwicklung von Methoden für die bildgebende Massenspektrometrie eine große Menge an Gewebematerial benötigt wird, wurde als erster Teil dieser Doktorarbeit ein *ex vivo* Experiment entwickelt, das die Einsparung von Zeit, Kosten und vor allem Labortieren ermöglicht. Gerade vor dem Hintergrund der immer strenger werdenden Tierschutzrichtlinien ist dieser Aspekt essentiell.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode trägt sowohl zur Vermeidung unnötiger Tierversuche bei, etwa im Fall einer unzureichenden Nachweisbarkeit des Analyten, als auch zur Verringerung, weil der Ansatz im Vorfeld ohne *in vivo* behandelte Gewebe auskommt.

Der Fokus dieser Arbeit lag damit sowohl auf einem zielgerichteten Messansatz als auch auf der Möglichkeit einer Vorhersage der Messbarkeit von Analyten mit *ex vivo* behandeltem Gewebe.

Auf Basis dieser entwickelten Methode konnten in Folge weitere Anwendungen zum Nachweis zahlreicher kleiner Moleküle wie antineoplastischer Wirkstoffe, Antifibrotika und Kontrastmittel etabliert werden (Aichler et al. 2015, Buck et al. 2015b, Huber et al. 2014b, Sun et al. 2016). Da besonders bei antineoplastischen Wirkstoffen die Toxizität hoch ist, und damit einhergehend auch das Risiko für schwere Nebenwirkungen am Patienten, ist die Kenntnis der Verteilung im Körpergewebe von großer Relevanz (Karlsson und Hanrieder 2017).

Wie ortsaufgelöste Messungen zeigen, ist die Wirkstoffverteilung im Gewebe sehr heterogen (Huber et al. 2014b). Dies kann bei der Verwendung von flüssigbasierten Methoden, die mit Gewebshomogenaten arbeiten, nicht untersucht werden (Kwon et al. 2015). In der Realität weisen solide Tumoren eine sehr heterogene Blutgefäßversorgung auf, was als eine naheliegende Ursache für die heterogene Wirkstoffverteilung in Tumoren verstanden werden kann (Marcucci und Corti 2012).

Ausgehend von den im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Tiermodellen ist der nächste Schritt nun die Übertragung der Methodik auf humane Proben. Hier bieten sich vor allem solche Tumoren an, die *in vivo* und auch am Patienten leicht zugänglich sind, wie zum Beispiel Kopf-Hals-Tumoren. So ist es nun möglich, diese Art der Wirkstoffmessungen an Biopsien von humanen Kopf-Hals-Tumoren durchzuführen.

Es kann die Verteilung von verabreichten Wirkstoffen und Metaboliten untersucht und mit der Gefäßverteilung oder anderen anatomischen Strukturen korreliert werden. Dazu ist auch die Untersuchung von Rezeptoren, die Zielstrukturen von Wirkstoffen darstellen (z. B. EGFR oder HER2), nötig. Dadurch kann die Präsenz von Zielstruktur und Wirkstoff im Gewebe untersucht und im Weiteren mit dem Therapieansprechen korreliert werden.

Im Rahmen einer retrospektiven Studie können diese Erkenntnisse über die Wirkstoffverteilung im Gewebe auch mit Parametern wie Überleben oder Rezidivbildung korreliert und zur Entwicklung eines Vorhersagemodells herangezogen werden. Darüber hinaus ist auch die Messung von weiteren, endogenen Molekülklassen wie z. B. Proteinen und Stoffwechselmetaboliten mittels bildgebender Massenspektrometrie ein vielversprechender Ansatz. Auf diese Weise können Moleküle gefunden und identifiziert werden, die beispielweise mit der Präsenz oder der Abwesenheit von Wirkstoffen oder Wirkstoffmetaboliten korrelieren. Dadurch können Rückschlüsse auf Wirkmechanismen, Therapieansprechen oder Toxizität gezogen werden. Es können die Protein- oder Stoffwechselmetaboliten vor und nach der Behandlung untersucht werden, um Veränderungen, die durch die Therapie hervorgerufen werden, zu untersuchen und zu identifizieren. Dies sollte in Patienten, die auf die Therapie ansprechen als auch in solchen, bei denen die Therapie erfolglos bleibt, durchgeführt und dann verglichen werden. Auf diese Weise können pharmakoproteomische als auch pharmakometabolomische Daten generiert werden, die dann auch Rückschlüsse auf Wirkmechanismen sowie toxische Effekte geben können. Dieser Ansatz kann ebenfalls zu einem molekularen Klassifikator führen, mit dem sich prätherapeutisch die Ansprecher von den Nichtansprechern auf eine bestimmt Therapie unterscheiden lassen.

Sehr interessant wäre es auch, Gewebe, die stark mit Wirkstoff angereichert wurden, mit solchen zu vergleichen, in die wenig oder kaum Wirkstoff gelangt. Zum einen kann auch hier zum Beispiel mittels immunhistologischer Färbung eine Ursache für die unterschiedliche Wirkstoffverteilung gefunden werden. Somit können Gewebe identifiziert werden, in die der Wirkstoff nicht vordringt. Ein Abgleich mit klinischen Daten wäre dabei wichtig, um zu sehen, ob hier dann trotzdem ein Ansprechen auf den Wirkstoff vorliegt oder ob die

Abwesenheit von Wirkstoffen tatsächlich für einen Therapiemisserfolg steht. Eine solche Erkenntnis kann dann ebenfalls als Vorhersage des Therapieansprechens herangezogen werden.

6 Literaturverzeichnis zu Einleitung und Schlussfolgerung

Aichler M, Elsner M, Ludyga N, Feuchtinger A, Zangen V, Maier SK, Balluff B, Schöne C, Hierber L, Braselmann H, Meding S, Rauser S, Zischka H, Aubele M, Schmitt M, Feith M, Hauck SM, Ueffing M, Langer R, Kuster B, Zitzelsberger H, Höfler H, Walch A (2013) Clinical response to chemotherapy in oesophageal adenocarcinoma patients is linked to defects in mitochondria. *J Pathol* 230(4):410-419

Aichler M, Huber K, Schilling F, Lohöfer F, Kosanke K, Meier R, Rummeny EJ, Walch A, Wildgruber M (2015) Spatially resolved quantification of gadolinium(III)-based magnetic resonance agents in tissue by MALDI imaging mass spectrometry after in vivo MRI. *Angew Chem Int Ed Engl* 54(14):4279-4283

Andrew R, Homer NZ (2016) Mass spectrometry and its evolving role in assessing tissue specific steroid metabolism. *Biochem Soc Trans* 44(2):645-651

Bai H, Wang S, Liu J, Gao D, Jiang Y, Liu H, Cai Z (2016) Localization of ginsenosides in Panax ginseng with different age by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry imaging. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1026:263-271

Balluff B, Schöne C, Höfler H, Walch A (2011) MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: Technological advancements and recent applications. *Histochem Cell Biol* 136(3):227-244

Buck A, Walch A (2014) In situ drug and metabolite analysis [corrected] in biological and clinical research by MALDI MS imaging. *Bioanalysis* 6(9):1241-1253

Buck A, Ly A, Balluff B, Sun N, Gorzolka K, Feuchtinger A, Janssen KP, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Weirich G, Erlmeier F, Langer R, Aubele M, Zitzelsberger H, Aichler M, Walch A (2015a) High-resolution MALDI-FT-ICR MS imaging for the analysis of metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded clinical tissue samples. *J Pathol* 237(1):123-132

Buck A, Halbritter S, Späth C, Feuchtinger A, Aichler M, Zitzelsberger H, Janssen KP, Walch A (2015b) Distribution and quantification of irinotecan and its active metabolite SN-38 in colon cancer murine model systems using MALDI MSI. *Anal Bioanal Chem* 407(8):2107-2116

Caprioli RM, Farmer TB, Gile J (1997) Molecular imaging of biological samples: Localization of Peptides and Proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 69(23):4751-4760

Caprioli RM (2016) Imaging mass spectrometry: Molecular microscopy for the new age of biology and medicine. *Proteomics* 16(11-12):1607-1612

Castellino S, Groseclose MR, Wagner D (2011) MALDI imaging mass spectrometry: bridging biology and chemistry in drug development. *Bioanalysis* 3(21):2427-2441

Castellino S (2012) MALDI imaging MS analysis of drug distribution in tissue: the right time!(?) *Bioanalysis* 4(21):2549-2551

Castellino S, Groseclose MR, Sigafoos J, Wagner D, de Serres M, Polli JW, Romach E, Myer J, Hamilton B (2013) Central nervous system disposition and metabolism of Fosdevirine (GSK2248761), a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor: An LC-MS and Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging MS investigation into central nervous system toxicity. *Chem Res Toxicol* 26(2):241-251

Desbenoit N, Schmitz-Afonso I, Baudouin C, Laprévote O, Touboul D, Brignole-Baudouin F, Brunelle A (2013) Localisation and quantification of benzalkonium chloride in eye tissue by TOF-SIMS imaging and liquid chromatography mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 405(12):4039-4049

Elsner M, Rauser S, Maier S, Schöne C, Balluff B, Meding S, Jung G, Nipp M, Sarioglu H, Maccarrone G, Aichler M, Feuchtinger A, Langer R, Jütting U, Feith M, Küster B, Ueffing M, Zitzelsberger H, Höfler H, Walch A (2012) MALDI imaging mass spectrometry imaging reveals COX7A2, TAGLN2, and S100-A10 as novel prognostic markers in Barrett´s adenocarcinoma. *J Proteomics* 75(15):4693-4704

Fujiwara Y, Furuta M, Manabe S, Koga Y, Yasunaga M, Matsumura Y (2016) Imaging mass spectrometry for the precise design of antibody-drug conjugates. *Sci Rep* 6:24954

Goodwin RJ, Pennington SR, Pitt AR (2008) Protein and peptides in pictures: imaging with MALDI mass spectrometry. *Proteomics* 8(18):3785-3800

Goodwin RJ, Pitt AR (2010) Mass spectrometry imaging of pharmacological compounds in tissue sections. *Bioanalysis* 2(2):279-293

Gorzolka K, Walch A (2014a) MALDI mass spectrometry imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues in clinical research. *Histol Histopathol* 29(11):1365-1376

Gorzolka K, Bednarz H, Niehaus K (2014b) Detection and localization of novel hordatine-like compounds and glycosylated derivates of hordatines by imaging mass spectrometry of barley seeds. *Planta* 239(6):1321-1335

Groseclose MR, Castellino S (2013) A mimetic tissue model for the quantification of drug distributions by MALDI imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 85(21):10099-10106

Groseclose MR, Laffan SB, Frazier KS, Hughes-Earle A, Castellino S (2015) Imaging MS in Toxicology: An Investigation of Juvenile Rat Nephrotoxicity Associated with Dabrafenib Administration. *J Am Soc Mass Spectrom* 26(6):887-898

Heeren RM, Smith DF, Stauber J, Kükrer-Kaletas B, MacAleese L (2009) Imaging mass spectrometry: Hype or hope? *J Am Soc Mass Spectrom* 20(6):1006-1014

Hillenkamp F, Unsöld E, Kaufmann R, Nitsche R (1975) Laser microprobe mass analysis of organic materials. *Nature* 256(5513):119–120.

Huber K, Aichler M, Sun N, Buck A, Li Z, Fernandez IE, Hauck SM, Zitzelsberger H, Eickelberg O, Janssen KP, Keller U, Walch A (2014a) A rapid ex vivo tissue model for optimising drug detection and ionisation in MALDI imaging studies. *Histochem Cell Biol* 142(4):361-371

Huber K, Feuchtinger A, Borgmann DM, Li Z, Aichler M, Hauck SM, Zitzelsberger H, Schwaiger M, Keller U, Walch A (2014b) Novel approach of MALDI drug imaging, immunohistochemistry, and digital image analysis for drug distribution studies in tissues. *Anal Chem* 86(21):10568-10575

Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL (2011) Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* 162(6):1239-1249

Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F (1985) Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal Chem* 57(14):2935–2939

Karlsson O, Hanrieder J (2017) Imaging mass spectrometry in drug development and toxicology. *Arch Toxicol* 91(6):2283-2294

Kwon HJ, Kim Y, Sugihara Y, Baldestorp B, Welinder C, Watanabe K, Nishimura T, Malm J, Török S, Döme B, Végvári Á, Gustavsson L, Fehniger TE, Marko-Varga G (2015) Drug compound characterization by mass spectrometry imaging in cancer tissue. *Arch Pharm Res* 38(9):1718-1727

Lagarrigue M, Lavigne R, Tabet E, Genet V, Thomé JP, Rondel K, Guével B, Multigner L, Samson M, Pineau C (2014) Localization and in situ absolute quantification of chlordcone in the mouse liver by MALDI imaging. *Anal Chem* 86(12):5775-5783

Lagarrigue M, Caprioli RM, Pineau C (2016) Potential of MALDI imaging for the toxicological evaluation of environmental pollutants. *J Proteomics* 144:133-139

Lauzon N, Dufresne M, Chauhan V, Chaurand P (2015) Development of laser desorption imaging mass spectrometry methods to investigate the molecular composition of latent fingermarks. *J Am Soc Mass Spectrom* 26(6):878-886

Liu X, Ide JL, Norton I, Marchionni MA, Ebling MC, Wang LY, Davis E, Sauvageot CM, Kesari S, Kellersberger KA, Easterling ML, Santagata S, Stuart DD, Alberta J, Agar JN, Stiles CD, Agar NY (2013) Molecular imaging of drug transit through the blood-

brain barrier with MALDI mass spectrometry imaging. *Sci Rep* 3:2859

Ly A, Schöne C, Becker M, Rattke J, Meding S, Aichler M, Suckau D, Walch A, Hauck SM, Ueffing M (2015) High-resolution MALDI mass spectrometry imaging of lipids in the mammalian retina. *Histochem Cell Biol* 143(5):453-462

Ly A, Buck A, Balluff B, Sun N, Gorzolka K, Feuchtinger A, Janssen KP, Kuppen PJ, van de Velde CJ, Weirich G, Erlmeier F, Langer R, Aubele M, Zitzelsberger H, McDonnell L, Aichler M, Walch A (2016) High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging of metabolites from formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Nat Protoc* 11(8):1428-1443

Marcucci F, Corti A (2012) How to improve exposure of tumor cells to drugs: promoter drugs increase tumor uptake and penetration of effector drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 64(1):53-68

Marusyk A, Almendro V, Polyak K (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 12(5):323-334

Moore JL, Becker KW, Nicklay JJ, Boyd KL, Skaar EP, Caprioli RM (2014) Imaging mass spectrometry for assessing temporal proteomics: Analysis of calprotectin in *Acinetobacter baumannii* pulmonary infection. *Proteomics* 14(0):820–828

Neubert P, Walch AK (2013) Current frontiers in clinical research application of MALDI imaging mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics* 10(3):259-273

Nilsson A, Fehniger TE, Gustavsson L, Andersson M, Kenne K, Marko-Varga G, Andrén PE (2010) Fine mapping the spatial distribution and concentration of unlabeled drugs within tissue micro-compartments using imaging mass spectrometry. *Plos One* 5(7):e11411

Nilsson A, Goodwin RJ, Shariatgorji M, Vallianatou T, Webborn PJ, Andrén PE (2014) Mass spectrometry imaging in drug development. *Anal Chem* 87(3):1437-1455

Norris JL, Caprioli RM (2013) Analysis of Tissue Specimens by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry in Biological and Clinical Research. *Chem Rev* 113(4):2309–2342

Patel KJ, Trédan O, Tannock IF (2013) Distribution of the anticancer drugs doxorubicin, mitoxantrone and topotecan in tumors and normal tissues. *Cancer Chemother Pharmacol* 72(1):127-138

Phelan VV, Fang J, Dorrestein PC (2015) Mass Spectrometry Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Treated with Azithromycin. *J Am Soc Mass Spectrom* 26(6):873-877

Prideaux B, Stoeckli M (2012) Mass spectrometry imaging for drug distribution studies. *J Proteomics* 75(16):4999-5013

Prideaux B, ElNaggar MS, Zimmerman M, Wiseman JM, Li X, Dartois V (2015) Mass spectrometry imaging of levofloxacin distribution in TB-infected pulmonary lesions by MALDI-MSI and continuous liquid microjunction surface sampling. *Int J Mass Spectrom* 377:699-708

Rauser S, Deininger SO, Suckau D, Höfler H, Walch A (2010) Approaching MALDI molecular imaging for clinical proteomic research: current state and fields of application. *Expert Rev Proteomics* 7(6):927-941

Rudin M, Weissleder R (2003) Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2(2):123-131

Schöne C, Höfler H, Walch A (2013) MALDI imaging mass spectrometry in cancer research: combining proteomic profiling and histological evaluation. *Clin Biochem* 46(6):539-545

Schwamborn K (2012) Imaging mass spectrometry in biomarker discovery and validation. *J Proteomics* 75(16):4990-4998

Shen M, Xiang P, Shi Y, Pu H, Yan H, Shen B (2014) Mass imaging of ketamine in a single scalp hair by MALDI-FTMS. *Anal Bioanal Chem* 406(19):4611-4616

Slobbe P, Windhorst AD, Stigter-van Walsum M, Smit EF, Niessen HG, Solca F, Stehle G, van Dongen GA, Poot AJ (2015) A comparative PET imaging study with the reversible and irreversible EGFR tyrosine kinase inhibitors [(11)C]erlotinib and [(18)F]afatinib in lung cancer-bearing mice. *EJNMMI Res* 5:14

Solon EG, Schweitzer A, Stoeckli M, Prideaux B (2010) Autoradiography, MALDI-MS, and SIMS-MS imaging in pharmaceutical discovery and development. *AAPS J* 12(1):11-26

Spengler B, Hubert M, Kaufmann R (1994) Proceedings of the 42nd annual conference on mass spectrometry and allied topics. Chicago, Illinois, May 29–June 3 1994

Stoeckli M, Staab D, Schweitzer A (2007) Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometry imaging in whole-body tissue sections. *Int J Mass Spectrom* 160(2-3):195-202

Sun N, Walch A (2013) Qualitative and quantitative mass spectrometry imaging of drugs and metabolites in tissue at therapeutic levels. *Histochem Cell Biol* 140(2):93-104

Sun N, Fernandez IE, Wei M, Wu Y, Aichler M, Eickelberg O, Walch A (2016) Pharmacokinetic and pharmacometabolomic study of pirfenidone in normal mouse tissues using high mass resolution MALDI-FTICR-mass spectrometry imaging. *Histochem Cell Biol* 145(2):201-211

Swales JG, Tucker JW, Strittmatter N, Nilsson A, Cobice D, Clench MR, Mackay CL, Andren PE, Takáts Z, Webborn PJ, Goodwin RJ (2014) Mass spectrometry imaging of cassette-dosed drugs for higher throughput pharmacokinetic and biodistribution analysis. *Anal Chem* 86(16):8473-8480

Torok S, Vegvari A, Rezeli M, Fehniger TE, Tovari J, Paku S, Laszlo V, Hegedus B, Rozsas A, Dome B, Marko-Varga G (2015) Localization of sunitinib, its metabolites and its target receptors in tumour-bearing mice: a MALDI-MS imaging study. *Br J Pharmacol* 172(4):1148-1163

Vaysse PM, Heeren RMA, Porta T, Balluff B (2017) Mass spectrometry imaging for clinical research - latest developments, applications, and current limitations. *Analyst* 142(15):2690-2712

Végvári Á, Shavkunov AS, Fehniger TE, Grabau D, Niméus E, Marko-Varga G (2016) Localization of tamoxifen in human breast cancer tumors by MALDI mass spectrometry imaging. *Clin Transl Med* 5(1):10

Zecchi R, Trevisani M, Pittelli M, Pedretti P, Manni ME, Pieraccini G, Pioselli B, Amadei F, Moneti G, Catinella S (2013) Impact of drug administration route on drug delivery and distribution into the lung: an imaging mass spectrometry approach. *Eur J Mass Spectrom (Chichester)* 19(6):475-482

7 Abkürzungsverzeichnis

9-AA	9-Aminoacridin
ACN	Acetonitril
ARG	Autoradiographie
ATP	Adenosintriphosphat
CD31	cluster of differentiation 31
CHCA	α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure
CT	Computertomographie
DHA	2,6-Dihydroxyacetophenon
DHB	2,3-Dihydroxybenzoësäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	epidermal growth factor receptor
FT	Fourier transform
Gd	Gadolinium
H&E	Hämatoxylin and Eosin
HER	human epidermal growth factor receptor
ICP	inductively coupled plasma
ICR	ion cyclotron resonance
IHC	Immunhistochemie
IMS	“imaging mass spectrometry” (bildgebende Massenspektrometrie)
ITO	Indium-Zinn-Oxid
LADME	Liberation – Absorption – Distribution – Metabolisierung - Excretion
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionisation
MRI	magnetic resonance imaging
MS	Massenspektrometrie
MSI	„mass spectrometry imaging“ (bildgebende Massenspektrometrie)
m/z	Masse zu Ladung-Verhältnis
PBS	phosphate buffered saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
POD	post-operative day
SEM	standard error of the mean
SD	standard deviation

TFA	Trifluoressigsäure
TIC	total ion current
TOF	time of flight

8 Publikationsverzeichnis

8.1 Veröffentlichungen in peer-reviewed journals

Huber K, Aichler M, Sun N, Buck A, Li Z, Fernandez IE, Hauck SM, Zitzelsberger H, Eickelberg O, Janssen KP, Keller U, Walch A. A rapid *ex vivo* tissue model for optimising drug detection and ionisation in MALDI imaging studies. *Histochem Cell Biol.* **2014** Oct; 142(4):361-371

Huber K, Feuchtinger A, Borgmann D M, Li Z, Aichler M, Hauck S, Zitzelsberger H, Schwaiger M, Keller U, Walch A. A novel approach of MALDI drug imaging, immunohistochemistry, and digital image analysis for drug distribution studies. *Anal Chem.* **2014** Nov 4; 86(21):10568-10575

Aichler M, Huber K, Schilling F, Lohöfer F, Kosanke K, Meier R, Rummeny EJ, Walch A, Wildgruber M. Spatially resolved quantification of gadolinium(III)-based magnetic resonance agents in tissue by MALDI imaging mass spectrometry after *in vivo* MRI. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2015** Mar 27; 54(14):4279-4283

Buck A, Aichler M, Huber K, Walch A. In Situ Metabolomics in Cancer by Mass Spectrometry Imaging. *Adv Cancer Res.* **2017**; 134:117-132

Jacobs L, Habringer S, Slawska J, Huber K, Hauf E, Li Z, Refaeli Y, Schwaiger M, Rudelius M, Walch A, Keller U. Functional imaging in combination with mutation status aids prediction of response to inhibiting B-cell receptor signaling in lymphoma. *Oncotarget* **2017**; 8 (45): 78917-78929

8.2 Präsentationen

Huber K et al. Detection and spatial distribution of erlotinib and its metabolites by MALDI FT-ICR imaging mass spectrometry in FaDu xenograft tumors. Treffen der Fachgruppe FT-MS und hochauflösende Massenspektrometrie der DGMS, Heidelberg 2013, Poster

Huber K. *In vivo* imaging of myocardial infarction - Tissue kinetic of MRI contrast agents. Bruker Anwendertreffen, Kassel 2015, Vortrag

Huber K. Application of histology and immunohistochemistry for MALDI Imaging studies – Basics of tissue preparation, staining and analysis. COST workshop on imaging mass spectrometry, Amsterdam 2014, Vortrag

Huber K. Histologie und Immunhistochemie - Basics der Gewebeaufbereitung für MALDI Imaging. Jahrestagung der DGMS, Frankfurt 2014, Vortrag

9 Danksagung

Zuallererst bedanke ich mich bei Horst Zitzelsberger und Axel Walch für die Möglichkeit, auf dem neuen und hochinteressanten Gebiet der bildgebenden Massenspektrometrie ein Promotionsprojekt durchzuführen, ganz besonders jedoch für die geduldige und stets motivierende Betreuung mit der ihr mich durch die ganze Doktorandenzeit und noch weit darüber hinaus unterstützt habt.

Unsere Wissenschaftler Annette, Na, Michaela, Karin, Shibo, Sandra und Alice sind mir immer kompetent und konstruktiv mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Danke ihr lieben Doktoranden- und Laborkollegen Achim, Uli, Claudia-Mareike, Gabi, Daniela, Andi, Susanne, Cédrik, Lisa, Marco, Stephan Maier, Benjamin, Isabell, Thomas, Marina, Christian, Mareike, Patrick, Katja, Louise, Mian, Maja, Manuel, Stefan Kammer, Theresa und Stefan Meding, für eure tatkräftige Unterstützung und die tolle Zeit!

Die Kooperationspartner Sabine Pirsig, Steffi Hauck, Annette Frank, Jolanta Slawska, Zhoulei Li, Uli Keller und Markus Schwaiger haben die Projekte durch ihre professionelle Organisation entscheidend mitgestaltet.