

Aus der Klinik und Poliklinik für RadiologieKlinik der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Jens Ricke

**Magnetresonanztomografie mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen
USPION zum Monitoring früher antiangiogenetischer
Therapieeffekte im orthotopen Mammakarzinom-Modell der
Maus**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Thomas Habereeder

aus

Hausham

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Clemens Cyran

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Reinhold Tiling

Prof. Dr. med. Frank Kolligs

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Philipp Kazmierczak

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

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Die Physiologie von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.....	6
1.2	Vascular Endothelial Growth Factor als Promotor der Angiogenese.....	7
1.3	Expression von Integrin als zelluläre Antwort auf VEGF.....	8
1.4	Der Angiogenese-Hemmer Bevacizumab	9
1.5	MRT zur Bildgebung bei Staging-Untersuchungen	9
1.6	MRT zur Untersuchung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression	10
1.7	Fragestellung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Tumormodell	13
2.2	Datenakquisition mit Magnetresonanztomographie.....	14
2.2.1	Magnetresonanztomographie.....	14
2.2.2	RGD-USPIO als $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-bindendes Kontrastmittel.....	18
2.2.3	Messprotokoll.....	19
2.2.4	Narkose.....	21
2.2.5	Wärmeplatte.....	21
2.2.6	Schwanzvenen-Katheter	21
2.2.7	Testreihe zur Überprüfung der Variabilität der Messwerte.....	22
2.3	Unspezifische Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle.....	23
2.4	Einwöchige Therapie	23
2.5	Nachverarbeitung und Auswertung der akquirierten MRT-Daten	24
2.6	Einschläferung der Tiere und Explantation von Leber und Tumor.....	25
2.7	Immunhistochemie	25
2.7.1	Vorbereitung der Präparate.....	25
2.7.2	Immunhistochemische Darstellung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression	26
2.7.3	Immunhistochemische Darstellung der Mikrogefäßdichte.....	26

2.7.4	Immunhistochemische Darstellung der Tumorzell-Proliferation	27
2.7.5	Fluoreszierende Darstellung der Tumorzell-Apoptose.....	28
2.7.6	Fluoreszierende $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-/CD31- Doppelfärbung	28
2.7.7	Berliner-Blau-/CD31- Doppelfärbung.....	29
2.8	Statistik.....	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Magnetresonanztomographie.....	31
3.1.1	Messwerte der RGD-USPIO-MRT	31
3.1.2	Tumervolumina bei einwöchiger Therapie	36
3.1.3	Korrelation von ΔR_2 und Tumervolumina	37
3.1.4	Variabilitätsexperiment der T2-Messwerte	38
3.1.5	Messwerte der unspezifischen USPIO-Untersuchung.....	38
3.2	Immunhistochemische Darstellung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression	39
3.3	Immunhistochemische Darstellung der Mikrogefäßdichte.....	40
3.4	Immunhistochemische Darstellung der Tumorzell-Proliferation	42
3.5	Fluoreszierende Darstellung der Tumorzell-Apoptose.....	43
3.6	Fluoreszierende $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-/CD31- Doppelfärbung	45
3.7	Fluoreszierende Berliner-Blau-/CD31- Doppelfärbung	46
4	Diskussion	47
4.1	$\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Surrogatparameter antiangiogenetischer Therapieeffekte	47
4.2	Tumervolumina und Rezeptorstatus.....	48
4.3	Variabilitätsmessung zum Ausschluss von lagerungsbedingten Messfehlern	49
4.4	Reduziertes T2-Signal nach Gabe von unspezifischen USPIO	50
4.5	Immunhistochemie zur Validierung der USPIO-MRT-Messergebnisse.....	51
4.6	Bevacizumab im Mausmodell	52
4.7	Zeitlicher Vorteil der molekularen Bildgebung gegenüber Morphologie- basierter Bildgebung.....	53

4.8	Ansätze verschiedener Bildgebender Verfahren, Integrine zur Untersuchung angiogenetischer Aktivität zu nutzen	54
5	Limitationen der Arbeit	59
6	Zusammenfassung	61
7	Literaturverzeichnis.....	62
8	Abbildungsverzeichnis	72
9	Tabellenverzeichnis.....	74
10	Publikation.....	75
11	Anhang	76

1 Einleitung

Statistisch gesehen entwickelt jeder dritte Europäer im Laufe seines Lebens ein Tumorleiden. Allein in Deutschland erkranken jährlich rund 480.000 Menschen.¹ Drei Viertel der Erkrankten sind über 60 Jahre alt, daher spricht man auch von der Krankheit des alten Menschen. Therapie und Betreuung dieser Patienten spielen sowohl epidemiologisch als auch ökonomisch eine entscheidende Rolle in der Medizin. Aufgrund der Vielzahl der verschiedenen Gewebe, die maligne entarten können, und der weiteren Differenzierungen innerhalb der Tumorarten² gibt es ein breites Spektrum an Therapieoptionen, die im Rahmen einer personalisierten Medizin für jeden einzelnen Patienten optimiert werden können.

Die Beurteilung des Therapieerfolges bei soliden Malignomen erfolgt durch die bildgebende Darstellung des Primärtumors und der Metastasen in der Regel mit Kontrastmittelverstärkter Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) nach zwei bis drei Zyklen einer Chemotherapie³ in einem Zeitraum von sechs bis zwölf Wochen nach Therapiebeginn. Erst zu diesem Zeitpunkt kann ein morphologischer Nachweis für das Ansprechen auf eine Chemotherapie aufgrund zytotoxischer Effekte und der damit einhergehenden Größenreduktion erbracht werden. Dies bedeutet für Patienten mit zu geringem oder fehlendem Ansprechen auf die Therapie (low- bzw. non-responder) einen möglichen Zeitverlust und eine eventuelle Progression des Malignoms, bevor diese optimiert werden kann.

1.1 Die Physiologie von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Integrine sind Transmembranproteine, die, außer auf Erythrozyten, ubiquitär auf menschlichen und tierischen Zellen vorkommen.⁴ Ihre Hauptaufgabe ist die Fixierung und Stabilisation einzelner Zellen in Zellverbänden sowie im Extrazellulärraum.⁵ Des Weiteren werden über Integrine Signaltransduktionen und Zell-Zell-Interaktionen vermittelt. Diese Adhäsionsproteine werden aus zwei nicht-kovalent verbundenen Glykoprotein-Untereinheiten α und β gebildet. Der Großteil der Untereinheiten liegt extrazellulär und besitzt viele variable Domänen, an denen Integrin an extrazellulären Matrix-Liganden wie Fibronectin, Kollagen, Laminin oder Fibrinogen binden kann. Fixiert werden die Untereinheiten durch eine transmembranäre Einfachhelix und einen weitgehend unstrukturierten zytoplasmatischen Rest.⁵

$\alpha_v\beta_3$ -Integrin hat ein Molekulargewicht von 160 kDa (α -Kette) und 85 kDa (β -Kette) und vermittelt die Bindung an Vitronektin, ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix und des Blutserums.⁶ Das Erkennungsmotiv hierfür ist die Aminosäuresequenz arg-gly-asp (RGD) über die auch Fibronektin, Fibrinogen oder Bone-Sialoprotein (BSP) an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden können. Andere Proteine wie Kollagen und Laminin werden erst nach einer Konformationsänderung erkannt. Diese Änderung kann eine funktionelle Relevanz bei der Reparatur und beim Remodelling bei Entzündungen und Gewebsverletzungen haben. Des Weiteren ist $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an der Zellmigration beteiligt und beeinflusst durch Bereitstellung von Schlüsselsignalen die Balance zwischen Zellproliferation und Differenzierung.⁶ Ebenfalls konnte ein intrazellulärer Kalziumanstieg aufgrund eines Kontaktes mit RGD-Domänen tragenden Proteinen in Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Osteoklasten nachgewiesen werden.⁵⁻⁷

Während der Angiogenese werden auf kapillären Endothelzellen α_v -Integrine, auch $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, vermehrt exprimiert.⁸ Stimulus für die Freisetzung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ist Fibroblast Growth Factor (FGF), für $\alpha_v\beta_5$ -Integrin Vascular Endothelial Growth Factor. Es wird jedoch kontrovers diskutiert, ob nicht beide Wachstumsfaktoren Stimuli für beide Integrine sein könnten.⁹

Auch auf Drüsenzellen der Mamma wird $\alpha_v\beta_3$ -Integrin exprimiert. Bei adulten Mamma-Stammzellen spielt $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in der Mitte der Schwangerschaft eine entscheidende Rolle für das Wachstum, die Klonogenität und die Ausschüttung von Slug, einem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor mit antiapoptotischer Wirkung.¹⁰⁻¹²

Da erhöhtes Wachstum, Klonogenität und antiapoptotische Faktoren, wie zum Beispiel Slug, auch entscheidend bei der Karzinogenese sind sollten Karzinome auch auf ihren $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Status untersucht werden.

1.2 Vascular Endothelial Growth Factor als Promotor der Angiogenese

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist ein im Blutkreislauf frei zirkulierendes Protein und ein Schlüsselprotein der Angiogenese. Gesunde Gewebe wie auch Tumoren können sich ab einer kritischen Größe von 2-3 mm nicht mehr alleine durch Diffusion ernähren.^{13,14} . So lässt sich beispielsweise sowohl in der embryonalen und frühen postpartalen Phase physiologisch, als auch bei malignen Tumoren wie dem Mammakarzinom pathologisch eine erhöhte VEGF-Konzentration als Stimulus der

Angiogenese für eine optimierte Versorgung der Gewebe nachweisen.¹⁵ Sie benötigen eigene Gefäße und schütten, induziert durch niedrigen Sauerstoffpartialdruck, niedrigen pH-Wert oder Hypoglykämie, Wachstumsfaktoren aus.^{16,17} VEGF dient nicht nur der Angiogenese, es induziert zusätzlich antiapoptotische Proteine wie B-Cell Lymphoma 2 (BCL-2) und A1 über den Phosphatidyl-Inositol-3 (PI-3) - Kinase/AKT-Signalweg.¹⁸ Die biologischen Effekte von VEGF werden durch die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 und 2 (VEGFR-1 und VEGFR-2) vermittelt.¹⁹ Dadurch werden verschiedene Proteine wie Phospholipase C - γ (PLC- γ), PI-3-Kinase oder die SRC-Familie in den Endothelzellen phosphoryliert.²⁰ VEGF fördert das Wachstum der Endothelzellen durch Aktivierung des Raf-Mek-Erk-Signalweges.²¹ Die RTK wurden unter anderem sowohl in der Zellmembran vaskulärer Endothelzellen als auch auf Knochenmarkszellen der Erythropoese entdeckt.¹⁵ Studien mit Fetal liver kinase-1 (FLK-1) - defizienten Mäusen, bei denen das VEGFR-2- Gen deaktiviert wurde, haben gezeigt, dass die frühen Mausembryonen ohne VEGFR-2 nicht länger als 8,5 – 9,5 Tage überleben können und intrauterin versterben.²² FLK-1 wird als homologer humaner VEGFR-2 bei Mäusen angesehen.²³

1.3 Expression von Integrin als zelluläre Antwort auf VEGF

Viele Reaktionen der Endothelzellen, die durch VEGF ausgelöst werden, können ebenfalls durch andere Zelladhäsions-Rezeptoren induziert werden. Zelladhäsion und Zellmigration werden unter anderem speziell durch Proteine der Integrin-Familie vermittelt.²⁴ Genexpression und Proliferation stellen zwei Folgen von Integrin-Rezeptor-Signalen dar. Von den 22 Integrin-Subtypen beeinflussen mindestens sechs Subtypen die Angiogenese.²⁵ Dabei stellte sich $\alpha_v\beta_3$ als potentester Signalgeber heraus.²⁶ VEGFR-2 kann durch den PI-3-Kinase-/AKT- oder den PTEN- Signalweg eine verstärkte Expression von Integrinen als elementaren Faktor der endothelialen Zellmigration auslösen. Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVECs = human umbilical vein endothelial cells) migrieren unter Einfluss von VEGF zahlreich zu Orten hoher Konzentrationen an Vitronektin, dem bevorzugten Liganden von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Bei ausbleibendem Einfluss durch VEGF oder Blockade der β_3 -Untereinheit des Integrins findet nur eine sehr geringe Migration und dadurch eine verringerte Angiogenese statt.²⁷

1.4 Der Angiogenesehemmer Bevacizumab

Therapeutika mit antiangiogenetischer Wirkung werden schon seit einigen Jahren gegen Tumorerkrankungen verwendet. So wird der anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab als Angiogenesehemmer in verschiedenen Kombinationstherapien, insbesondere mit Anthrazyklinen und Taxanen eingesetzt. Progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben konnten durch Bevacizumab-basierte Kombinationstherapien unter anderem beim kolorektalen Karzinom,²⁸ dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom,²⁹ Mammakarzinom³⁰ und auch beim Gliom belegt werden.³¹ Daher wurden diese in die Leitlinien zur Therapie der oben beschriebenen Tumorentitäten aufgenommen.^{3,32,33,34}

Bevacizumab ist ein humanisierter monoklonaler anti-VEGF-Antikörper, der an alle Isoformen von VEGF-A binden und somit eine Aktivierung von VEGFR-1 und VEGFR-2 verhindern kann. Dadurch reduziert Bevacizumab alle Folgeprozesse dieser Rezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass es unter Bevacizumab zu einer signifikanten Reduktion sowohl der Mikrogefäßdichte in Tumoren, als auch des sich negativ auf die Prognose von Tumorerkrankungen auswirkende Einwandern von tumorassoziierten Makrophagen kommt.^{35,36} Die Bindung von VEGF durch Bevacizumab führt ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf Endothelzellen in soliden Tumoren.³⁷

1.5 MRT zur Bildgebung bei Staging-Untersuchungen

Die für Staging-Untersuchungen solider Tumoren am häufigsten verwendete Modalität in der klinischen Bildgebung ist die CT. Die MRT erzielt hierbei neben der CT die beste räumliche Auflösung und bietet mit dem höchsten Weichteilkontrast die genaueste anatomische Information ohne Strahlenbelastung.³⁸ Die MRT kann zur Evaluation verschiedener Tumorentitäten genutzt werden, zum Beispiel dem Prostata-³⁹, Blasen-⁴⁰ oder Kolonkarzinom.⁴¹ Insbesondere beim Lokalstaging (T-Stadium) des Prostatakarzinoms bildet die MRT den Goldstandard.⁴² Die erhobenen Datensätze geben zum einen Informationen über Tumolvolumen und -morphologie, zum anderen erlaubt sie durch Methoden der funktionellen Bildgebung, wie der MRT Perfusion oder MRT-Diffusion, nicht invasiv und in vivo Aussagen zur Tumorphysiologie.

1.6 MRT zur Untersuchung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression

In der Literatur werden verschiedene Projekte beschrieben, in denen molekulare MRT-Untersuchungen mit neuen, spezifisch bindenden Kontrastmitteln durchgeführt wurden.⁴³ Das bei der Neoangiogenese häufig überexprimierte $\alpha_v\beta_3$ -Integrin zeigte sich als möglicher Biomarker angiogenetischer Prozesse in vivo. Einige Projekte untersuchten gadoliniumhaltige Kontrastmittel mit RGD-Sequenzen, um $\alpha_v\beta_3$ -Integrin MR-tomographisch nicht invasiv und in vivo quantitativ nachweisen zu können. Die Effekte beim Einsatz dieser Kontrastmittel werden über die longitudinalen T1-Relaxationszeiten gemessen.^{44,45} Die transversalen T2-Relaxationszeiten werden nur gering beeinflusst.

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin sind eisenoxidhaltige Nanopartikel (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle, USPIO) mit RGD-Sequenzen (RGD-USPIO). Als Eisenoxid wird ein Gemisch aus Magnetit ($\text{Fe}^{2+}(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_4$) und seine oxidierte Form Maghämät ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) verwendet. Im Gegensatz zu den gadoliniumhaltigen Kontrastmitteln verkürzen diese Nanopartikel neben den T1-Zeiten auch verstärkt die T2-Zeiten, deren Signal durch Spin-Spin-Wechselwirkungen und Magnetfeldinhomogenitäten beeinflusst wird (siehe Kapitel 2.2.1).^{46,47} Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Einfluss auf die Relaxationszeiten abhängig vom Durchmesser der USPIO ist. So war bei kleineren Durchmessern der Nanopartikel die Relaxivität r_2 geringer als bei größeren.⁴⁸

Des Weiteren zeigt RGD-USPIO als Kontrastmittel im Vergleich zu ungelabelten USPIO eine starke Affinität zu $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. In einer Studie, in der Ratten mit Tetrahydrochlorid behandelt wurden um verschiedene Grade der Leberfibrosierung zu erreichen, konnte der Nachweis erbracht, dass $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit T2-gewichteter MRT als Surrogat-Parameter bei Leberfibrosierung für molekulare Bildgebung geeignet ist. So konnte durch eine T2*-Sequenz gezeigt werden, dass die Akkumulation von Eisenpartikeln mit RGD-USPIO als Kontrastmittel wesentlich höher war als mit ungelabelten USPIO.⁴⁹ Die RGD-USPIO-MRT kann ebenfalls eingesetzt werden um $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf Endothelzellen während der Neoangiogenese in proliferierendem Tumorgewebe nachzuweisen.⁵⁰ Möglicherweise können zu kleine Nanopartikel jedoch durch Endozytose den Zellstoffwechsel beeinflussen.⁵¹ Auch eine unspezifische Extravasation im Rahmen des enhanced permeability and retention Effekts aufgrund sehr kleiner Durchmesser der Nanopartikel (<50 nm) wurde beschrieben.⁵²

1.7 Fragestellung

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass die endotheliale Bindung von RGD-USPIO in experimentellen Mammakarzinom-Xenografts nach einer einwöchigen Monotherapie mit dem VEGF-Rezeptorantagonisten Bevacizumab als Korrelat der reduzierten $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression signifikant abnimmt. Das Ziel dieser Studie ist es zu prüfen, ob die RGD-USPIO-MRT für eine longitudinale Darstellung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Biomarker früher antiangiogenetischer Effekte im experimentellen Mammakarzinom Modell der Maus geeignet ist.

Des Weiteren soll der Zusammenhang der erhobenen MR-Messwerte mit der Tumorummetrie sowie mit immunhistochemischen Untersuchungen ($\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, Mikrogefäßdichte, Tumorzell-Proliferation, Tumorzell-Apoptose) untersucht werden. Es soll die Frage beantwortet werden, ob die RGD-USPIO-MRT molekulare Zusatzinformationen zum Morphologie-basierten Monitoring einer Tumorthherapie generieren kann.

2 Material und Methoden

Das Projekt wurde unter der Tierversuchsantrags-Nummer TVA 55.2-1-54-2532-82-2014 von der Regierung von Oberbayern genehmigt und übereinstimmend mit den Statuten „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“⁵³ durchgeführt.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass mit RGD-USPIO frühe antiangiogenetische Effekte durch eine veränderte Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an Endothelzellen dargestellt werden kann, wurde ein Studiendesign gewählt, bei dem orthotop in die Milchleiste von weiblichen Mäusen implantierte humane Mammakarzinom-Xenografts vor und nach einer antineoplastischen Therapie untersucht werden. Die reduzierte Angiogenese und folglich niedrigere $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression soll sich in einem stärkeren T2-Signal des Tumors in der MRT darstellen. Das in den RGD-USPIO enthaltene Eisenoxid führt zu einer Verkürzung der T2-Zeit und daher zum schnelleren Signalverlust. Eine fehlende Bindung des Kontrastmittels mangels $\alpha_v\beta_3$ -Integrin führt daher zu einem stärkeren T2-Signal.

Zum Nachweis eines Therapieansprechens durch molekulare Imaging Biomarker mit MRT wurden die mit Mammakarzinom-Zellen versehenen Mäuse nach erfolgreicher Tumorgenese einen Tag vor (Baseline-Messung) und am siebten Tag (Follow-up-Messung) einer antiangiogenetischen Therapie mit dem monoklonalen VEGF-Antikörper Bevacizumab untersucht. Im Anschluss an die Follow-up-Messung wurden die Tiere getötet und die Tumoren explantiert. Diese wurden in Formalin (Forene, AbbVie Deutschland GmbH und Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland) fixiert und tiefgefroren, um sie für die immunhistochemischen Validierungsversuche vorzubereiten (Abbildung 1).

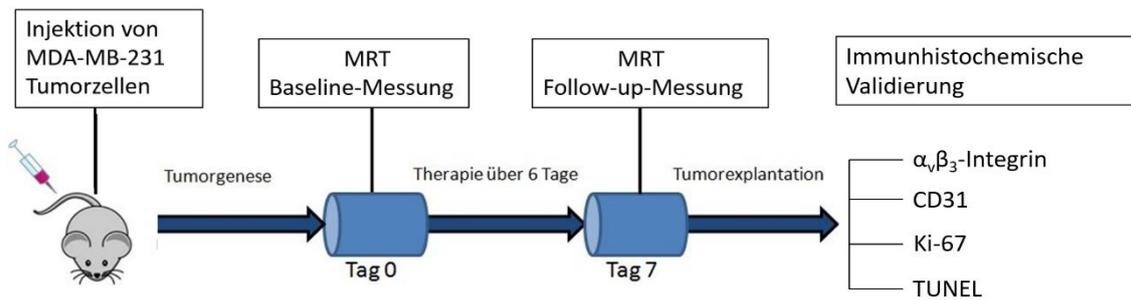


Abbildung 1: Versuchsablauf: Zeitliche Abfolge von Tumorzell-Implantation, MRT-Messungen vor und nach Therapie; Nach der Follow-up-Messung wurden die Tumoren explantiert und im Hinblick auf $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, Gefäßdichte, Proliferation und Apoptose immunhistochemisch untersucht.

2.1 Tumormodell

Die Studie wurde an Severe Combined Immunodeficiency Mäusen (SCID-Mäuse, n = 20) durchgeführt, die zwischen 8 und 20 Wochen alt waren. Aufgrund der fehlenden zellulären und humoralen Immunität der Tiere, die durch eine mangelnde Ausreifung der T- und B-Lymphozyten begründet ist, war ein zuverlässiges und zeitnahes Wachstum der Tumoren gewährleistet. Da es sich bei dem untersuchten humanen Mammakarzinom um eine Tumorentität handelte, die beim Menschen vorwiegend das weibliche Geschlecht betrifft, wurden für dieses Projekt nur weibliche Mäuse verwendet. Zudem eignen sich weibliche Mäuse auf Grund ihres sozialen Verhaltens besser zur Gruppentierhaltung. Die Tiere wurden von einem für medizinische Kleintierforschung etablierten Züchter (Harlan Laboratories, B.V., AN Venray, Niederlande) geliefert.

Nach Erhalt und Eingewöhnung im laboreigenen Stall wurden den Mäusen in einer kurzen Gasnarkose unter einer Haube in einem Gemisch aus 2,5 Vol% Isofluran und 2 l Sauerstoff mit einer 25-Gauge-Nadel 2×10^6 Zellen der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™, Manassas, VA) subkutan in die Milchleiste implantiert. Bei MDA-MB-231 handelt es sich um Zellen eines triple-negativen Adenokarzinoms, die ursprünglich aus einer kaukasischen Brustkrebspatientin isoliert wurden. Sie weisen keine Expression von Östrogen- oder Progesteronrezeptoren auf und sind negativ für eine Amplifikation der HER2/Neu-Gens. Dreifach negative

Mammakarzinome erwiesen sich als prognostisch ungünstiger als solche mit den genannten Hormon-Rezeptoren.⁵⁴ Da neben nahezu allen physiologischen Zellen auch maligne Zellen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin exprimieren, musste eine Zelllinie verwendet werden, bei der die Expression möglichst gering ist. MDA-MB-231-Zellen zeigen nachweislich eines der niedrigsten Expressionsmuster von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.⁵⁵ Würde $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf Tumorzellen zu sehr exprimiert werden, hätte man einen möglichen therapeutischen Erfolg des Bevacizumab nicht eindeutig nachweisen können, da das verwendete Kontrastmittel sowohl an den Rezeptoren am Endothel, als auch an denen der Tumorzellen binden würde. Um die endotheliale Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als Parameter der Angiogenese nutzen zu können, muss ausgeschlossen werden, dass das Kontrastmittel an anderen Zellen als an Endothelzellen bindet. Daher wurde diese Zelllinie verwendet, da sie mit einer vergleichsweise niedrigen Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin die Detektion der Rezeptordichte auf Endothelzellen nicht beeinflussen soll und so die Erfassung der antiangiogenetischen Effekte unter VEGF-Therapie erlaubt.⁵⁵ Gemäß der Hypothese soll somit das detektierte MRT-Signal ausschließlich von an Endothelzellen gebundenen Kontrastmittelmolekülen stammen, die die endotheliale Integrinexpression als Parameter der Angiogenese reflektieren ohne wesentliche Beeinflussung durch eine Integrinexpression der Tumorzellen. Diese wurden, gelöst in einem Gesamtvolumen von 0,05 ml als 1:1-Mischung aus phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit pH 7,4 und Matrigel® (BD Biosciences, San Jose, CA), injiziert, sobald sämtliche motorische Reaktionen der Versuchstiere erloschen waren. Nach Implantation der Tumorzellen wurden die Mäuse täglich auf ihren Allgemeinzustand hin untersucht, gewogen und die Tumoren mit einer Schieblehre vermessen. Ab einem Tumordurchmesser von mindestens 0,5 cm wurden die Tiere randomisiert der Therapie- oder Kontrollgruppe (n = 10 pro Gruppe) zugeteilt.

2.2 Datenakquisition mit Magnetresonanztomographie

2.2.1 Magnetresonanztomographie

Die Versuchsreihe wurde an einem klinischen 3-Tesla Magnetresonanztomographen (MAGNETOM Skyra, Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Die Datenakquisition erfolgte durch eine 6-Kanal-Handgelenksspule (Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland).

Die MRT ist ein bildgebendes Verfahren, das durch ein starkes Magnetfeld und Radiofrequenzimpulse Gewebe anregt und die ausgestrahlten elektromagnetischen Wellen als Bildsignal nutzt. Wasserstoff-Atome in Verbindungen bestehen aus einem positiv geladenen Proton als Kern, der von einem negativ geladenen Elektron als Hülle umkreist wird.⁵⁶ Das Proton besitzt die Eigenschaft eines Spins, das heißt, es dreht sich um seine eigene Achse. In der Summe besitzt das Wasserstoff-Atom die Ladung Null. Auf Grund der Teilladungen von Kern und Hülle wirken sie trotzdem wie kleine Magneten und richten ihre Rotationsachse selbstständig parallel oder antiparallel zur Längsmagnetisierung M_z eines Magnetfeldes B_0 im Kernspintomographen aus (Abbildung 2)

Verhalten von Spins im Magnetfeld

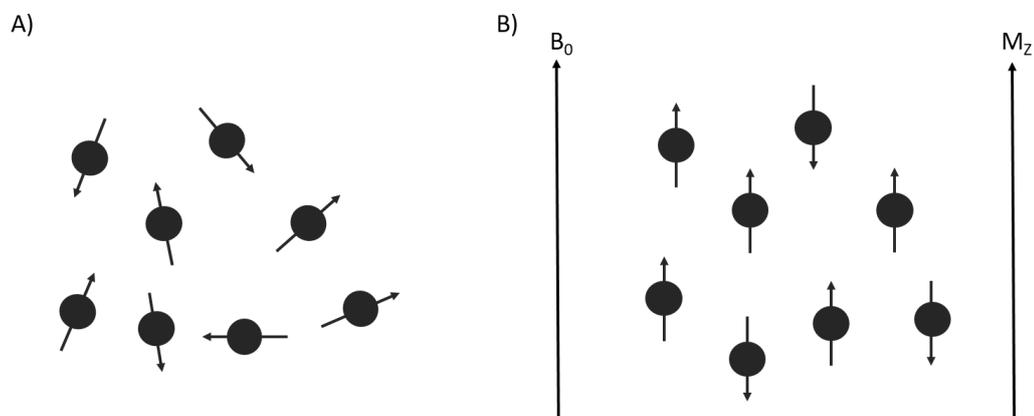


Abbildung 2: Aufbau einer Längsmagnetisierung (modifiziert nach Weishaupt 2014)⁵⁷. A) ungerichtete Spins außerhalb eines Magnetfeldes; B) unter Einfluss eines Magnetfeldes B_0 richten sich die Spins parallel oder antiparallel zur Längsmagnetisierung M_z aus.

Werden die Spins anschließend durch einen Radiofrequenz (RF)-Impuls in eine andere Richtung ausgelenkt und die Rotationsachse dadurch beeinflusst, wird eine Spannung induziert, die als elektromagnetisches Signal detektiert werden kann. Die Protonen absorbieren dabei Energie des RF-Impulses und gelangen auf ein höheres Energieniveau. Das Signal nimmt nach Ende des RF-Impulses unter dem Einfluss des konstanten Magnetfeldes stetig ab, da die Protonen die aufgenommene Energie wieder abgeben und auf das vorherige Niveau fallen, bis sich die Spins wieder an das ursprüngliche Magnetfeld angepasst haben. Der Verlust der Quermagnetisierung ist unter anderem abhängig von der Umgebung bzw. dem Gewebe, in dem sich die Protonen befinden. Die Stärke des Signals ist abhängig vom Magnetfeld und von der Energie des RF-Impulses.⁵⁸

In vorliegender Versuchsreihe wurde eine T2-Relaxometrie verwendet, ein Verfahren, das die transversale Ebene des Protonensignals (T2-Resonanz) betrachtet. Hierbei wird nach einem RF-Impuls ein stetig abnehmendes Signal detektiert, begründet durch Spin-Spin-Wechselwirkungen einzeln außer Phase geratener, relaxierender Wasserstoffkerne (T2-Relaxation, Abbildung 3). Dieser Prozess wird durch Magnetfeldinhomogenitäten im umliegenden Gewebe beschleunigt (T2*-Relaxation), wie sie unter anderem auch in Anwesenheit von paramagnetischen Substanzen wie Eisen oder Eisenverbindungen auftreten.^{59,60} Das in dieser Studie untersuchte Kontrastmittel basiert auf einer Eisenverbindung und soll genau diesen Effekt bewirken. Somit soll an Orten hoher Kontrastmittelkonzentrationen das T2-Signal geringer sein als an Orten niedriger Konzentration.

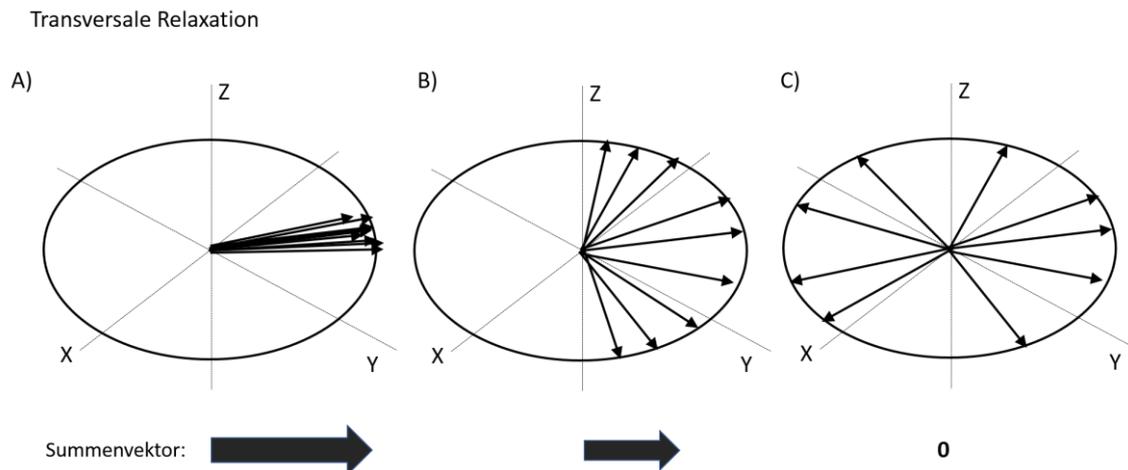


Abbildung 3: T2-Relaxation (modifiziert nach Weishaupt 2014)⁵⁷. A) nach einem RF-Impuls ausgelenkte Wasserstoffkerne sind alle in Phase; durch die gleichgerichtete Auslenkung wird hier die maximale Quermagnetisierung erreicht. B/C) beginnende und vollständige Querrelaxation und dabei stetige Abnahme des Summenvektors der Quermagnetisierung; durch gegenseitige Beeinflussung und Magnetfeldinhomogenitäten kommt es zur Dephasierung.

Das Signal der T2-Resonanz wird anschließend digital zu einem dreidimensionalen Datensatz verarbeitet und als Schnittbilder der detektierten Schichten dargestellt. Die gezeigten Schnittbilder können noch zu keiner quantitativen Aussage herangezogen werden. Hierfür müssen die T2-Zeiten der einzelnen Gewebe bestimmt werden. Die T2-Zeit beschreibt die Zeit, nach der das Signal der Quermagnetisierung auf 37 % des Signals der maximalen Quermagnetisierung abgenommen hat. Dafür benötigt man eine sogenannte T2-Map, bei der die Signalintensitäten den T2-Zeiten der dargestellten Gewebe entsprechen. T2-Maps kann man durch die Differenz der MR-Signale zu

verschiedenen Echozeiten (time-to-echo, TE) erhalten. Über das so berechnete Bild kann für jedes Pixel die T2-Zeit ermittelt werden. Die gewebsspezifischen T2-Zeiten erlauben nun quantitative Aussagen über Veränderungen der Resonanzsignale der Gewebe, wie sie zum Beispiel nach Kontrastmittelgabe auftreten. Durch die Berechnung des Kehrwertes der T2-Zeit erhält man die Relaxationsrate R2 ($R2 = 1/T2 [s^{-1}]$). R2 verändert sich bei konstanter Temperatur und Magnetfeldstärke linear zur Konzentration des Kontrastmittels, wie in einer vorab durchgeführten ex vivo Verdünnungsreihe gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 5). Eine lineare Korrelation zwischen der Relaxationsrate und der Kontrastmittelkonzentration konnte bisher nicht nur in Verdünnungsreihen, sondern auch in vitro mit SPIO markierten Gliomzellen, sowie Lymphozyten gezeigt werden.⁶¹ Mit R2 können ebenfalls R2-Maps rekonstruiert werden. Analog zu T2-Maps können die Rekonstruktionen zu quantitativen Aussagen der Kontrastmittelanreicherung herangezogen werden. Da bei diesem Projekt ein Kontrastmittel verwendet wurde, das sich bei stärkerer Anreicherung in schwächeren T2-Signalintensitäten resultiert, zeigt sich in einer farbkodierten R2-Map folglich ein erhöhter R2-Wert.

Die Relaxivität eines Kontrastmittels gibt an, in welchem Maß es das Resonanzsignal eines Gewebes beeinflusst. Sowohl das T1-Signal, wie auch das in diesem Projekt detektierte T2-Signal unterliegen diesem Effekt. Da sich die T2-Zeit in einer reziproken Proportionalität verhält, zeigt sich R2 linear in einer direkten Proportionalität zur Konzentration des Kontrastmittels.⁶² Das ist didaktisch sehr anschaulich, da nun bei einer verringerten Kontrastmittelaufnahme im Gewebe ein ebenfalls niedrigerer R2 beobachtet werden kann. Die Relaxivität wird in $[mM^{-1}s^{-1}]$ angegeben. Ist die Relaxivität eines Kontrastmittels bekannt, kann über die Veränderung von R2 eine quantitative Aussage über die Kontrastmittelanreicherung im untersuchten Gewebe getroffen werden.

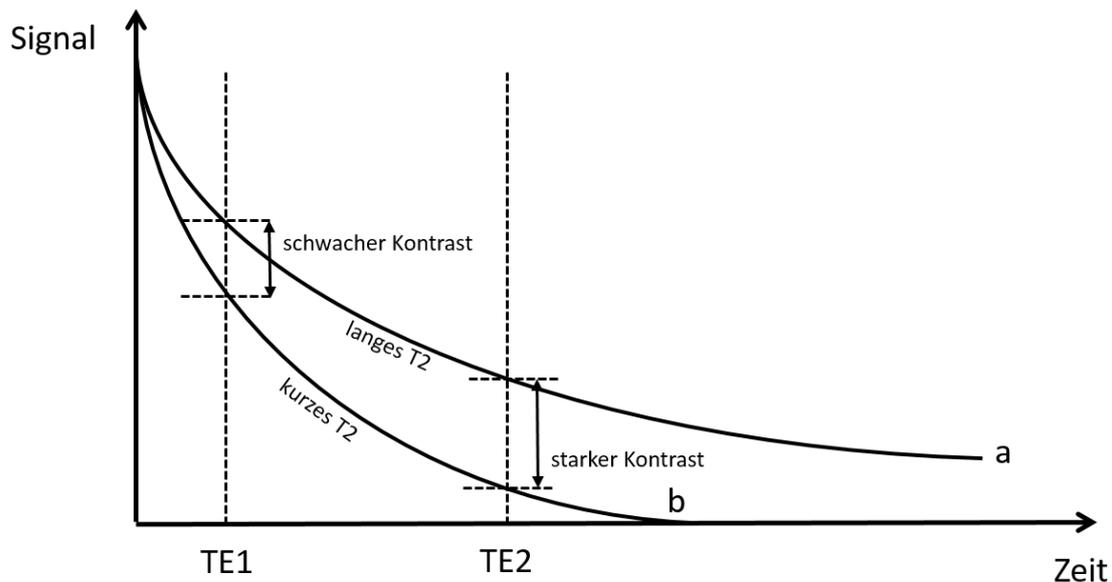


Abbildung 4: Zusammenhang von TE und T2-Kontrast (modifiziert nach Weishaupt 2014)⁵⁷. T2-Signalverlust zweier Gewebe mit unterschiedlich langen Relaxationszeiten in Abhängigkeit der Zeit. Gewebe mit langen T2-Relaxationszeiten (Kurve a) verlieren das Signal langsamer als Gewebe mit kurzen T2-Relaxationszeiten (Kurve b).

TE definiert den Zeitpunkt, der zum Empfangen der T2-Resonanz gewählt wurde. Idealerweise wird eine TE gewählt, die einen starken Kontrast zwischen Zielgewebe und Umgebung darstellen kann. Time to Repeat (TR) gibt den Zeitpunkt vor, bei dem ein weiterer HF-Impuls die Protonen erneut auslenkt.

2.2.2 RGD-USPIO als $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-bindendes Kontrastmittel

Zur Darstellung der endothelialen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression wurden spezifisch bindende RGD-USPIO (P04000, hydrodynamischer Durchmesser 180 nm, 10^6 Fe-Atome und 3500 RGD-Peptide pro Nanopartikel, Guerbet, Villepinte, Frankreich) als eisenoxidhaltige Nanopartikel-Emulsion verwendet. Diese wurden nach der Nativ-Untersuchung, einer Untersuchung ohne bzw. vor Kontrastmittelgabe, über einen eigens angefertigten Mikro-Katheter als Bolus-Injektion verabreicht. Die in Gasnarkose gehaltenen Tiere wurden sofort nach der Nativ-Messung auf eine Wärmeplatte gelegt und die RGD-USPIO über eine laterale Schwanzvene mit dem Mikro-Katheter injiziert. Mit einer gewichtsadaptierten Verdünnung von 2,5 $\mu\text{l/g}$ Körpergewicht (200 $\mu\text{mol Fe/kg}$) in Kochsalz-Lösung (0,9% NaCl) wurde ein Gesamtvolumen von 0,15 ml verabreicht. Um

eine Dilatation der Venen zu erreichen, wurden die Tiere wenige Sekunden mit einer 300 W Wärmelampe (Ceramic Infrared, Beurer GmbH, Ulm, Deutschland) aus einer Entfernung von 30 cm erwärmt und die Vene proximal der Injektionsstelle manuell gestaut. 60 min nach der Injektion wurde das Messprotokoll kontrastmittelverstärkt wiederholt (siehe Abbildung 6).

Ungelabelte USPIO (P03999, Guerbet, Villepinte, Frankreich) wurden als das korrespondierende, nicht spezifisch bindende Kontrastmittel verwendet, um den Effekt einer unspezifischen Extravasation und Akkumulation durch Enhanced Permeability and Retention (EPR-Effekt) auszuschließen. (siehe auch 2.3)

2.2.3 Messprotokoll

Durch eine Verdünnungsreihe verschiedener Kontrastmittelkonzentrationen mit $c(\text{Fe}) = 0,05 \text{ mM}$, $0,1 \text{ mM}$, $0,2 \text{ mM}$ und $0,4 \text{ mM}$ in $21 \text{ }^\circ\text{C}$ warmem Wasser und bei einer Magnetfeldstärke von 2,89 Tesla konnte für das verwendete Kontrastmittel eine R_2 -Relaxivität von $306 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt werden (Abbildung 5). Da sich die Relaxationsrate R_2 bei gleichbleibender Temperatur und Magnetfeldstärke linear zur Konzentration des Kontrastmittels verhielt, konnte die Kontrastmittelbindung im untersuchten Gewebe auf Grund der Differenz von R_2 ($\Delta R_{2\text{Baseline}} = R_{2\text{Baseline+KM}} - R_{2\text{Baseline nativ}}$; $\Delta R_{2\text{Follow-Up}} = R_{2\text{Follow-Up+KM}} - R_{2\text{Follow-Up nativ}}$) semiquantitativ bestimmt werden.

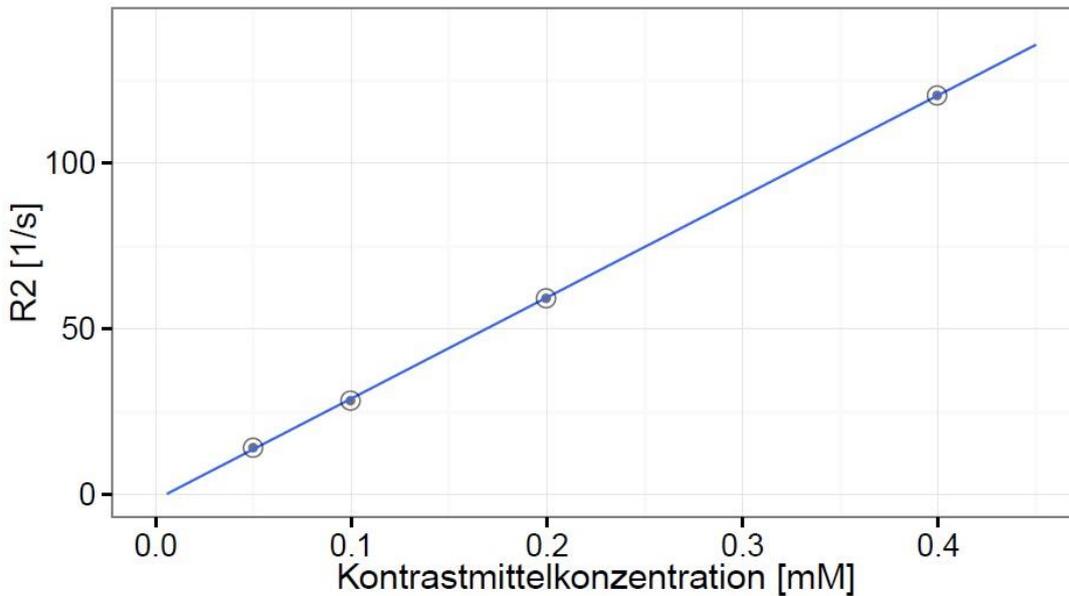


Abbildung 5: *In vitro* R2-Relaxivität des verwendeten Kontrastmittels in einer Verdünnungsreihe. Mit R2-Relaxivität= $R2/c(Fe)$ wurde eine R2-Relaxivität von $306 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ in 21°C warmen Wasser und einer Magnetfeldstärke von 2,89 Tesla definiert. In der Grafik erkennt man die lineare Korrelation zwischen den R2-Werten und der Eisenkonzentration der Kontrastmittellösung.

Nach Bestimmung der oben aufgeführten Parameter wurde das Messprotokoll für die Untersuchung der Versuchstiere definiert. Baseline-Messungen an Tag 0 (Tag 1 = erster Tag der Therapie) sowie Follow-up-Messungen an Tag 7 wurden sowohl vor als auch nach Kontrastmittelgabe mit dem gleichen Protokoll durchgeführt (Abbildung 6). Verwendet wurde eine T2 spin-echo Sequenz mit vier Echozeiten ($TE= 20/40/60/80 \text{ ms}$) und einer TR von 3800 ms. Das Fettsignal wurde dabei unterdrückt (fat-sat). Unter Verwendung einer Signalmittelung einer zweifachen Aufnahme (two averages), einer 64×64 Akquisitionsmatrix (acquisition matrix), einer 128×128 Rekonstruktionsmatrix (reconstructed matrix), einem Gesichtsfeld (field of view) von $50 \times 50 \text{ mm}$ und einer Schichtdicke von 1,2 mm lag die Akquisitionszeit bei 24:56 min.

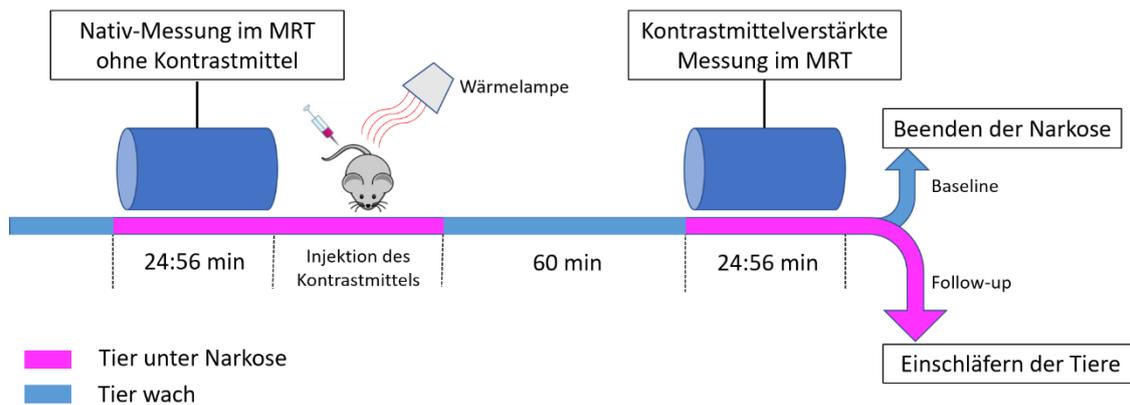


Abbildung 6: Übersicht der Messabfolge des MRT-Protokolls. Zu Beginn der MRT-Untersuchung wurden die Tiere in Narkose gelegt. Direkt im Anschluss an die Nativ-Messung wurde das Kontrastmittel appliziert. Um durch eine Kreislaufaktivierung ein Auskühlen der Tiere zu verhindern, wurden sie danach für 60 min aufgeweckt. Die kontrastmittelverstärkte MRT-Messung wurde wieder unter Narkose durchgeführt. Nach Abschluss des Messprotokolls wurden die Tiere der Baseline-Messungen in den Stall zurückgebracht, die der Follow-up-Messungen noch unter Narkose eingeschlafert.

2.2.4 Narkose

Um Bewegungsartefakte in der Bildgebung und psychischen sowie physischen Stress für die Tiere zu minimieren, wurden die SCID-Mäuse vor der Untersuchung im MRT mit einem Gasgemisch aus 2,5 % Isofluran und zwei Litern Sauerstoff bis zur Reflexlosigkeit narkotisiert. Die Narkose wurde während der gesamten Datenakquisition aufrechterhalten.

2.2.5 Wärmeplatte

Um eine Unterkühlung der narkotisierten Versuchstiere während der gesamten Akquisitionszeit zu vermeiden, wurden die Tiere sofort nach Einleitung der Narkose auf einer eigens für die MRT konstruierten Wärmeeinheit (Air Heat Control Unit, RAPID Biomedical GmbH, Rimpar, Deutschland) gelagert, die den Erhalt einer adäquaten Körperkerntemperatur über mehrere Stunden gewährleistete.

2.2.6 Schwanzvenen-Katheter

Für die Injektion des Kontrastmittels wurde ein Mikrokatheter angefertigt, um die benötigte Menge Kontrastmittel zu applizieren ohne dem Versuchstier zu viel Volumen

zu verabreichen (Abbildung 7). Der Mikrokatheter bestand aus einer Konus tragenden 27 Gauge Kanüle (Microlance, 3/4 19 x 0,4 mm, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), gefolgt von einem 7 cm langen Plastikschlauch mit einem Diameter von 0,7 mm als flexibles Überleitungsstück. Für die Punktion wurde eine metallene Spitze einer weiteren 27 Gauge Kanüle an der Schlauchspitze fixiert. Nachdem das System auf seine Funktionalität hin geprüft worden war, konnten die Tiere mit Nadelhalter an einer der lateralen Schwanzvenen punktiert werden.

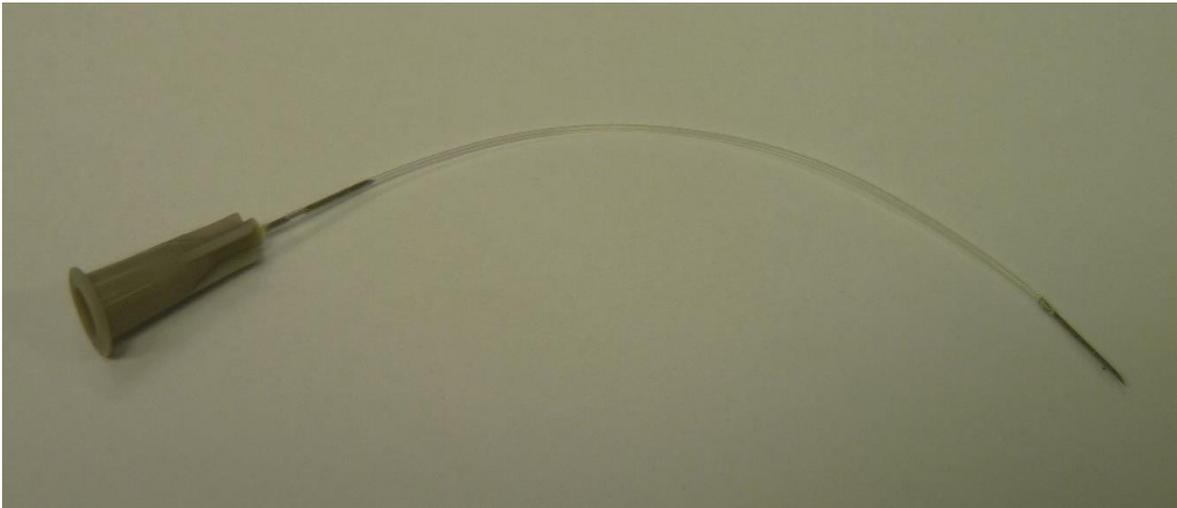


Abbildung 7: Schwanzvenen-Katheter; Konus tragende 27 Gauge Kanüle, Plastikschlauch als flexibles Verbindungsstück und metallene Spitze zur Injektion.

2.2.7 Testreihe zur Überprüfung der Variabilität der Messwerte

Bei Mäusen in einem klinischen MRT handelt es sich um Objekte mit sehr kleinen Resonanzvolumina in einem für Menschen konstruierten Signalempfänger. Die erhobenen Messwerte unterschieden sich jedoch nur in geringem Maße (siehe Kapitel 3.1.1 und Tabelle 1), weshalb sichergestellt werden musste, dass es nicht allein durch das Umlagern der Tiere schon zu Abweichungen der Messwerte kam. Dies konnte unter anderem durch erneutes Shimmen des MRT geschehen. Dabei gleicht der Tomograph vor dem Starten des eigentlichen Messprotokolls Magnetfeldinhomogenitäten, die durch Verlagerung der sich im MRT befindenden Objekte oder des Tisches entstehen mit zusätzlichen Korrekturfeldern aus. Dafür wurde eine Testreihe mit drei Mäusen durchgeführt, bei der die narkotisierten Tiere mit dem unter Kapitel 2.2.3 beschriebenen Messprotokoll untersucht und daraufhin aus dem MRT herausgenommen wurden. Anschließend wurden die Tiere wieder in selber Position (head first, prone; Kopf voran, auf dem Bauch liegend) in die Handgelenksspule gelegt und nochmals mit demselben

Protokoll untersucht. Dadurch wurde ein unvermeidbarer Lagerungsfehler simuliert, der auch in den zu untersuchenden Kohorten entstand, weil die Tiere zur Kontrastmittelgabe ebenfalls aus dem MRT herausgenommen werden mussten.

2.3 Unspezifische Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle

Zum Nachweis der Bindungsspezifität von RGD-USPIO wurden n=4 Tiere mit unspezifischen USPIO als Kontrastmittel untersucht. Diese Tiere wurden einer Baseline-Messung unterzogen und anschließend randomisiert einer Therapie- oder Kontrollgruppe zugeteilt. Unspezifische USPIO wurden in der gleichen Konzentration wie RGD-USPIO verabreicht und die Tiere mit demselben Protokoll sowohl vor, als auch 60 min nach Kontrastmittelgabe gemessen. Gemäß der vom Hersteller angegebenen Halbwertszeit im Blut (RGD-USPIO = $6,6 \pm 0,5$ min; USPIO = $11,5 \pm 1,3$ min) sollte das restliche, noch zirkulierende Kontrastmittel nur noch einen marginalen Effekt auf erhobene Messwerte haben. Es wurde erwartet, dass sich die kontrastmittelverstärkten T2-Zeiten nicht oder nur geringfügig von den T2-Zeiten der Nativ-Untersuchungen unterschieden. Des Weiteren beschrieben Kiessling et al. eine Extravasation und Persistieren der Nanopartikel in umliegendem Gewebe, vor allem bei neugebildeten Tumorgefäßen mit hoher endothelialer Permeabilität (Enhanced Permeability and Retention, EPR-Effekt).⁶³ Aufgrund multipler Faktoren (VEGF, Bradykinin, Stickstoffmonoxid, Prostaglandine u.v.m.)⁶⁴ kommt es speziell im Bereich wachsender Tumoren zur Neubildung fenestrierter Kapillaren sowie Lymphgefäßen, durch die einerseits intravenös applizierte Kontrastmittel sowie Therapeutika leichter in das Tumorgewebe diffundieren, andererseits durch mangelhaften Lymphabfluss erschwert abtransportiert werden können. Dadurch kommt es zu einer verzögerten Biodistribution und einer unnatürlich langen Verweildauer des Fremdmaterials im Gewebe.⁶⁵

2.4 Einwöchige Therapie

Nach der Baseline-Messung wurden die Tiere der Therapiegruppe sechs Tage mit dem anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®, Roche, Basel, Schweiz) therapiert, der einmal täglich mit einer gewichtsadaptierten Menge von 5mg/kg Körpergewicht verabreicht wurde (injiziertes Volumen Bevacizumab verdünnt mit 0,9 % NaCl 0,2 ml). Die Kontrollgruppe erhielt eine äquivalente Menge Placebo (0,9 % NaCl). Für die Injektion wurden die Tiere mit 2,5 % Isofluran und zwei Litern Sauerstoff in eine kurze

Narkose gelegt. Bevacizumab wurde daraufhin mit einer 27 Gauge Kanüle (Microlance, 3/4, 19 x 0,4 mm, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) intraperitoneal appliziert.

Im Anschluss an die einwöchige Therapie wurde an Tag 7 die Follow-up-Messung im MRT durchgeführt.

2.5 Nachverarbeitung und Auswertung der akquirierten MRT-Daten

Die Auswertung und Analyse der MRT-Datensätze erfolgte mit dem Programm PMI 0.4 (Platform for Research in Medical Imaging), das mit IDL (ITT Visual Information Systems, Boulder, CO) durch das Josef-Lissner-Laboratory for Biomedical Imaging am Institut für Klinische Radiologie am Klinikum der LMU München erstellt wurde.⁶⁶

Die Bilddaten der vier unterschiedlichen T2-Zeiten einer Messung (20/40/60/80 ms) wurden nach der Signalintensität ihrer Echozeiten zu einem Datensatz fusioniert. Durch die unterschiedlichen Signalintensitäten während der vier Echozeiten konnte auf den so entstandenen T2-Maps jedem Pixel eine T2-Zeit in ms zugeteilt werden. Anschließend wurde auf jedem Schichtbild dieser Fusionsbilder eine region of interest (ROI) über den Tumor eingezeichnet. Durch die Summation der ROI verschiedener aufeinanderfolgender Schichten erhielt man ein volume of interest (VOI) über den gesamten Tumor. Über die VOI konnte die mittlere T2-Zeit des Tumorgewebes ermittelt werden. Aus der mittleren T2-Zeit eines Tumors wurde seine Relaxationsrate R2 bestimmt. Über die Differenz von R2 Baseline ($\Delta R2_{\text{Baseline}} = R2_{\text{Baseline+KM}} - R2_{\text{Baseline nativ}}$) und der Follow-up-Messung ($\Delta R2_{\text{Follow-up}} = R2_{\text{Follow-up+KM}} - R2_{\text{Follow-up nativ}}$) konnte eine semiquantitative Aussage über die 60 min post injectionem gebundene Kontrastmittelmenge getroffen werden. Die unterschiedlichen $\Delta R2$ der beiden Gruppen ($\Delta R2_{\text{Therapie}}$ und $\Delta R2_{\text{Kontrolle}} = \Delta R2_{\text{Follow-up}} - \Delta R2_{\text{Baseline}}$) wurden als quantitative Surrogatparameter der geringeren Bindung des Kontrastmittels nach Therapie genutzt. Negative $\Delta R2_{\text{Therapie}}$ und $\Delta R2_{\text{Kontrolle}}$ waren Surrogat für eine reduzierte Kontrastmittelanreicherung als Korrelat einer verringerten $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression.

Die VOI, die zur Berechnung der mittleren T2-Zeiten erstellt wurden, wurden ebenfalls zur Größenbestimmung der Tumoren benutzt. Dadurch soll eine Korrelation der T2-Zeiten mit den Tumorumfängen ausgeschlossen werden. Die Differenz der Tumorumfänge der Follow-up- und Baseline-Messungen wurde daraufhin auf ihre Korrelation mit $\Delta R2_{\text{Therapie}}$ und $\Delta R2_{\text{Kontrolle}}$ hin untersucht. Eine fehlende Korrelation ist

wichtig, um die Veränderungen der T2-Zeiten auf das Kontrastmittel zurückführen und eine Reduktion des Tumolvolumens als Grund ausschließen zu können

2.6 Einschläferung der Tiere und Explantation von Leber und Tumor

Nach erfolgreichem Abschluss der Follow-up-Datenakquisition wurden die noch in Narkose liegenden Tiere getötet. Nach Erlöschen aller Reflexe und Vitalzeichen wurden Leber und Tumor durch stumpfe Präparation freigelegt und explantiert. Die Präparate wurden halbiert, eine Hälfte wurde in Formalin fixiert, die andere mit flüssigem Stickstoff (-196 °C; Linde AG, Pullach, Deutschland) tiefgefroren und anschließend bei -80 °C kryokonserviert.

2.7 Immunhistochemie

Zur Validierung der Ergebnisse aus den MR-Untersuchungen wurden die explantierten Tumoren mit verschiedenen immunhistochemischen Verfahren aufgearbeitet. Die Präparate wurden auf $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, Mikrogefäßdichte (CD31), Tumorzell-Proliferation (Ki-67) und Tumorzell-Apoptose (TUNEL) untersucht. Zur Auswertung wurden jeweils zehn zufällige High-Power-Fields mit 200-facher Vergrößerung ausgezählt. Des Weiteren wurde eine immunfluoreszierende Doppelfärbung mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31 angefertigt sowie eine immunhistochemische Doppelfärbung mit Berliner Blau/CD31.

2.7.1 Vorbereitung der Präparate

Die nach der Explantation in Formalin konservierten Tumoren wurden nach 36 Stunden in einem Gewebeentwässerungsautomaten (ASP200S, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Deutschland) jeweils zweimal 30 min in wässrigen Lösungen mit 70 %, 80 %, 96 % und 100 % Ethanol, sowie zweimal 60 min in Paraffin bei 60 °C entwässert. Daraufhin wurden die trockenen Präparate in Paraffin gegossen, mit einem Rotationsmikrotom (RM 2245, Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) in 3 µm dicke Schichten geschnitten und auf Superfrost-Objektträger (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) aufgetragen. Diese Schnitte

wurden für die Ki-67-, CD31-, die TUNEL-Färbung sowie für die Berliner Blau-/CD31-Doppelfärbung verwendet.

Für die immunhistochemische Bestimmung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression sowie für die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-/CD31-Doppelfärbung wurden die kryokonservierten Präparate verwendet. Die gefrorenen Tumoren wurden mit einem Kryotom (CM 1950, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Deutschland) in 6 μm dicke Schichten geschnitten und auf Superfrost-Objektträger aufgetragen.

2.7.2 Immunhistochemische Darstellung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression

Zur Ermittlung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression von Endothelzellen wurden die kryokonservierten Schnitte 10 min in Aceton bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ vorgekühlt und anschließend bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Nach erstmaligem Waschen in einer PBS-Lösung (phosphate buffered saline: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 auf 1 l H_2O) wurde die endogene Peroxidase mit einem speziellen Kit (peroxidase blocking reagent; DAKO, Hamburg, Deutschland) geblockt. Dieser Schritt war notwendig, da die Peroxidase sonst später mit dem aufgetragenen Chromogen hätte reagieren und es so in einen stabilen Farbstoff umsetzen können. Nach der Blockade konnte die Inkubation mit monoklonalen anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Antikörpern (LM609 Millipore MAB1976, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) im Verdünnungsverhältnis 1:50 begonnen werden. Am Folgetag wurden die Schnitte mit einem weiteren anti-Maus-IgG-AK (EnVisionTM+ Kit, DAKO, Hamburg, Deutschland) und einem Substrat-Chromogen (3-Amino-9-Ethylcarbazole-Substrat (AEC-Substrat), EnVision Kit) behandelt. Anschließend wurden sie mit Mayers Hämalaun (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gegengefärbt und in Kaisers Glyceringelatine (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. Daraufhin konnten die Präparate ausgewertet werden.

2.7.3 Immunhistochemische Darstellung der Mikrogefäßdichte

CD31, auch Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1) genannt, wird hauptsächlich von Endothelzellen, sowie Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert.⁶⁷ Es steuert die Migration von Leukozyten und registriert Scherstress zwischen den Zellen.⁶⁸ Außerdem ist es an der Angiogenese beteiligt.⁶⁹ Daher wird es häufig als Marker für die Gefäßdichte verwendet.

Zur Visualisierung von CD31 wurden mit Ethanol getrocknete Paraffinschnitte aus ihrer Einbettung befreit und rehydriert. Dies erfolgte durch Inkubation der Objektträger bei 60 °C und anschließendem Bad in einem Xyloersatz (Neo-Clear®, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland), gefolgt von Waschungen mit Ethanol-Wasser-Gemischen verschiedener Konzentrationen (100 %, 96 %, 80 %, 70 %) und Wasser. Durch die Fixierung mit Formalin kam es größtenteils zur Quervernetzung mit anderen Proteinen, der sogenannten Maskierung. Die Tertiärstrukturen der interessierenden Epitope veränderten sich und waren so nicht mehr zugänglich für Antikörper. Mit einem Citratpuffer und unter gleichzeitiger Einwirkung von Mikrowellen mit einer Leistung von 600 W konnten die Quervernetzungen teilweise wieder aufgehoben, die ursprünglichen Tertiärstrukturen wiederhergestellt und so interessierende Antigene demaskiert werden. Das Waschen der Präparate zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte mit einem TBS-Puffer (TRIS buffered saline, 61 g Trizma Base, 90 g NaCl, 1000 ml demineralisiertes H₂O, 0,05 % Tween-20). Die endogene Peroxidase wurde, wie unter 2.7.2 beschrieben, blockiert und die Schnitte mit einem polyklonalen Kaninchen anti-CD31-AK (ab28364, Abcam, Cambridge, UK) im Verdünnungsverhältnis 1:50 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate mit anti-Kaninchen-AK (EnVision™+ Kit, DAKO, Hamburg, Deutschland) und als Substrat mit AEC-Chromogen versetzt, mit Mayers Hämalaun gegengefärbt und in Kaisers Glyceringelatine eingebettet.

2.7.4 Immunhistochemische Darstellung der Tumorzell-Proliferation

Ki-67 ist ein Protein, das sich während der Mitose größtenteils auf der Oberfläche der Chromosomen finden lässt, während der G₀-Phase jedoch nicht nachweisbar ist. Diese Eigenschaft macht es zu einem sehr sensiblen Marker der Zellteilung.⁷⁰

Die ersten Schritte zur Herstellung der Präparate für die Ki-67-Färbung liefen bis zur Inkubation mit dem ersten Antikörper analog zur CD31- Färbung, wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben. Daraufhin wurden die Schnitte mit einem Kaninchen anti-Ki-67-AK (ab16667, Abcam, Cambridge, UK) im Verdünnungsverhältnis 1:100 inkubiert. Nach einer nächtlichen Ruhephase bei 4 °C wurden die Präparate am Folgetag mit dem sekundären anti-Kaninchen-AK und einem 3,3'-Diaminobenzidin- Chromogen (DAB-Chromogen) als Substrat versetzt. Indem die Präparate abschließend mit Mayers

Hämalaun gegengefärbt und in Kaisers Glyceringelatine eingebettet wurden, waren sie zur Visualisierung der Tumorzell-Proliferation fertiggestellt.

2.7.5 Fluoreszierende Darstellung der Tumorzell-Apoptose

Während der Apoptose werden die DNA-Stränge durch Endonukleasen geschnitten. Die freien Hydroxylgruppen an den Nukleinsäurefragmenten können mit einem TUNEL-Assay (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden versehen werden.⁷¹ Somit kann man im Fluoreszenzmikroskop apoptotische von lebend konservierten Zellen unterscheiden.

In diese Arbeit wurden die Präparate zur Darstellung der Tumorzell-Apoptose analog zu den CD31-Präparaten aus Paraffin gelöst und rehydriert (siehe Kapitel 2.7.3). Anschließend wurden sie in einer Pepsin-Lösung mit 2 g Pepsin (DAKO, Hamburg, Deutschland) sowie 500 ml 0,2 m HCl bei 37 °C inkubiert und mittels Citrat-Puffer in einem siedenden Wasserbad demaskiert. Nach Abkühlen der Objektträger und zweimaligem Waschen mit einer PBS-Lösung wurden die Schnitte mit einem TUNEL-Assay (In situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics AG, Risch, Schweiz) versehen. Dies fand gemäß Herstellerangaben bei 37 °C unter Ausschluss von Licht statt. Auch die abschließende Inkubation mit einem Trägermedium (Vecta Shield, DAKO, Hamburg, Deutschland) lief im Dunkeln ab. Die fertigen Gewebeproben konnten nun unter einem Fluoreszenzmikroskop (DM 2500, Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland) mit einem Standardfilter von 520 ± 20 nm analysiert werden.

2.7.6 Fluoreszierende $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-/CD31- Doppelfärbung

Da die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Färbung Integrine aller Zellen, nicht nur der Endothelzellen, sondern auch beispielsweise die von Tumorzellen, darstellt, wurde mit einer Doppelfärbung zusammen mit CD31 eine Nachweismethode angewandt, die zeigen soll, dass das angefärbte Integrin überwiegend von Endothelzellen exprimiert wurde.

Die Färbung der Präparate für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31 verlief bis einschließlich der Inkubation mit monoklonalen anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-AK analog zur $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Färbung (siehe Kapitel 2.7.2). Die sekundären Antikörper waren in diesem Fall anti-Maus-IgG-AK (Alexa Fluor: 1:500, Abcam, Cambridge, UK) aus Ziegen. Anschließend wurden dieselben Präparate mit polyklonalen Kaninchen anti-CD31-AK und anti-Kaninchen-AK

(Cy3TM: 1:300, Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA) von Affen versetzt, abschließend die Kerne mit DAPI (1µg/mL; Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt und die Präparate mit FluoromountTM (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) eingedeckt.

2.7.7 Berliner-Blau-/CD31- Doppelfärbung

Mit der Berliner-Blau-/CD31- Doppelfärbung sollte gezeigt werden, dass das Kontrastmittel spezifisch an das endotheliale $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindet und nicht im Interstitium oder an anderen Zellen. Berliner-Blau bindet an Eisenverbindungen und kann somit als Nachweis für die eingesetzten RGD-USPIO verwendet werden.

Die Färbung wurde an Paraffin-fixierten Schnitten durchgeführt. Die CD31-Färbung verlief von der Entparaffinierung und Rehydrierung über das Blocken der Peroxidase und der Inkubation mit erstem und zweitem Antikörper bis hin zum Substrat Chromogen analog zur in Kapitel 2.7.3 beschriebenen CD31-Färbung. Im nächsten Schritt wurden die Präparate für 5 min mit einer Kalium-Ferrocyanid-Lösung versetzt, anschließend mit einer Eisen-Färbearbeitslösung (Kalium-Ferrocyanid-Lösung + Salzsäure-Lösung 1:1; Prussian Blue Test Kit HT20, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert und 30 min später mit Pararosanilin-Arbeitslösung (50 ml ddH₂O + 1 ml Pararosanilin) gegengefärbt. Abschließend wurde die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (90 %, 96 %, und 100 % Ethanol) und Neo-Clear® (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) wieder dehydriert und mit Neo-Mount® (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit einer Statistik-Software (SPSS 21 für Windows, IBM Corp., Armonk, NY) vorgenommen. Therapie- und Kontrollgruppe wurden miteinander bezüglich Unterschieden der R₂ der Baseline- sowie der Follow-up-Messungen vor und nach Kontrastmittelgabe verglichen. Weiterhin wurde auf Unterschiede von $\Delta R_{2\text{Baseline}}$ sowie $\Delta R_{2\text{Follow-up}}$ zwischen der Therapie- und der Kontrollgruppe hin untersucht. Abschließend wurden die Differenzen von $\Delta R_{2\text{Therapie}}$ und $\Delta R_{2\text{Kontrolle}}$ verglichen.

Für alle Tests wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Die quantitativen Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) und einem Konfidenzintervall von 95 % beschrieben. Konfirmatorische Tests (MRT: $\Delta R_{2\text{Kontrolle}}$ vs $\Delta R_{2\text{Therapie}}$; $\Delta R_{2\text{Therapie}}$ Follow-up

vs $\Delta R2_{\text{Therapie Baseline}}$; $\Delta Vol_{\text{Kontrolle}}$ vs $\Delta Vol_{\text{Therapie}}$; Immunhistochemie: $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, CD31, Ki-67, TUNEL der Kontroll- (verglichen mit der Therapiegruppe) wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn die P-Werte kleiner als das nach Bonferroni korrigierte Signifikanzniveau $\alpha' = \alpha/7 = 0.007$ waren. Zusätzliche Tests ($\Delta R2_{\text{Kontrolle Baseline}}$ vs $\Delta R2_{\text{Therapie Baseline}}$; $\Delta Vol_{\text{Kontrolle Baseline}}$ vs $\Delta Vol_{\text{Therapie Baseline}}$) wurden mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ verglichen, da sie als exploratorisch angesehen wurden.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch das Bindungsverhalten von RGD-USPIO als Kontrastmittel in der MRT eine reduzierte Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin unter antiangiogenetischer Therapie nachgewiesen. Dafür wurde eine mit Bevacizumab therapierte Kohorte mit einer Placebo-Kohorte (je n=10 Versuchstiere) verglichen. Die parallel durchgeführten Messungen mit unspezifisch bindenden USPIO bestätigten, dass es zu keinem enhanced permeability and retention Effekt von Nanopartikel dieser Größe kam.

Des Weiteren zeigte der Vergleich der Relaxationszeiten mit den in allen Therapietieren zunehmenden Tumervolumina keine Übereinstimmung. Die immunhistochemischen Färbungen von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, CD31, Ki-67 und TUNEL validierten die Ergebnisse der RGD-USPIO-MRT. Die angefertigten Doppelfärbungen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31 und Berliner-Blau/CD31 wiesen nach, dass das RDG-USPIO nur an endotheliale $\alpha_v\beta_3$ -Integrin gebunden hat.

3.1 Magnetresonanztomographie

3.1.1 Messwerte der RGD-USPIO-MRT

Durch ein reduziertes ΔR_2 in der mit Bevacizumab behandelten Kohorte konnte eine signifikant geringere Kontrastmittelbindung am Endothel gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden ($\Delta R_{2\text{Therapie}} = -0,80 \pm 0,78 \text{ s}^{-1}$ vs. $\Delta R_{2\text{Kontrolle}} = 0,27 \pm 0,59 \text{ s}^{-1}$, $p=0,002$, Tabelle 1). Dieser Effekt konnte in allen zehn Therapietieren nachgewiesen werden. Acht von zehn Kontrolltieren zeigten eine erhöhte Kontrastmittelaufnahme (Abbildung 8).

R_2 zeigte in der Baseline-Messung vor Kontrastmittelgabe zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied ($R_{2\text{Kontrolle Baseline nativ}}: 13,58 \pm 0,79 \text{ s}^{-1}$ vs. $R_{2\text{Therapie Baseline nativ}}: 13,97 \pm 0,79 \text{ s}^{-1}$; $p=0,217$). ΔR_2 als Maß der Kontrastmittelaufnahme und Surrogatparameter der Integrin-Expression vor der einwöchigen Behandlung unterschied sich zwischen beiden Gruppen nicht signifikant ($\Delta R_{2\text{Kontrolle Baseline}}: 1,01 \pm 0,57 \text{ s}^{-1}$ vs. $\Delta R_{2\text{Therapie Baseline}}: 1,50 \pm 0,79 \text{ s}^{-1}$; $p=0,190$).

Bei der Follow-up-Messung unterschied sich R_2 sowohl vor als auch nach Kontrastmittelgabe nicht signifikant in beiden Gruppen ($R_{2\text{Kontrolle Follow-up nativ}}: 14,02 \pm 0,54 \text{ s}^{-1}$ vs. $R_{2\text{Therapie Follow-up nativ}}: 14,79 \pm 1,11 \text{ s}^{-1}$; $p=0,116$; $R_{2\text{Kontrolle Follow-up+KM}}: 15,23 \pm 0,8$

s^{-1} vs. $R2_{\text{Therapie Follow-up+KM}}$: $15,56 \pm 1,29 s^{-1}$; $p=0,652$). Dies zeichnete sich auch in der Differenz der $\Delta R2$ -Werte ab ($\Delta R2_{\text{Kontrolle Follow-up}}$: $1,21 \pm 0,54 s^{-1}$ vs. $\Delta R2_{\text{Therapie Follow-up}}$: $0,70 \pm 0,68 s^{-1}$; $p=0,217$).

Therapietier	$\Delta R2$ Baseline [s^{-1}]	$\Delta R2$ Follow-up [s^{-1}]	$\Delta R2(FU^1) - \Delta R2(BL^2)$ [s^{-1}]
1	0,80	0,62	-0,18
2	1,08	0,15	-0,94
3	1,60	1,18	-0,42
4	2,29	2,19	-0,10
5	2,35	1,05	-1,30
6	3,16	1,38	-1,78
7	0,55	0,11	-0,44
8	1,79	0,19	-1,60
9	1,09	0,26	-0,83
10	0,68	0,60	-0,08
Mittelwert\pmSD³	1,50\pm0,79	0,70\pm0,68*	-0,80\pm0,78
Kontrolltier			
11	0,30	0,92	0,62
12	0,14	0,82	0,68
13	0,18	1,56	1,38
14	1,93	2,07	0,14
15	0,97	1,03	0,06
16	1,11	2,18	1,07
17	1,25	1,33	0,08
18	0,48	0,50	0,02
19	1,49	0,81	-0,68
20	1,28	0,85	-0,43
Mittelwert\pmSD³	1,01\pm0,57	1,21\pm0,54	0,27\pm0,59

¹FU=Follow-up, ²BL=Baseline ³SD=Standardabweichung

Tabelle 1: $\Delta R2$ in Therapie- und Kontrollgruppe vor und nach einwöchiger Behandlung [s^{-1}]; Zu erkennen war ein signifikant erniedrigtes $\Delta R2$ in der Therapiegruppe (mit * markiert). In der Kontrollgruppe zeigte sich ein Anstieg von $\Delta R2$.

$\Delta R2$ der Therapie- und Kontrollgruppe

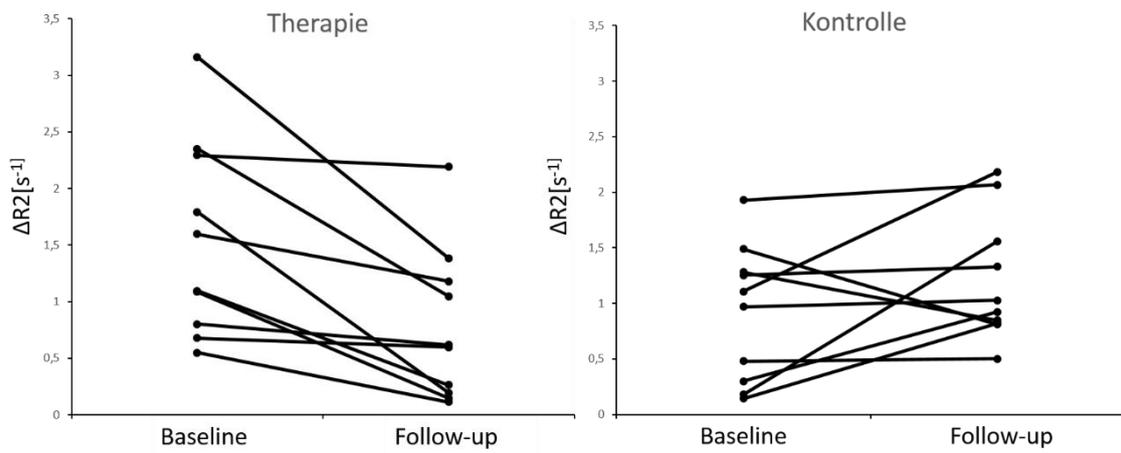


Abbildung 8: $\Delta R2$ der Therapie- und Kontrollgruppe nach einwöchiger Behandlung zeigt den Unterschied der Kontrastmittelbindung am Endothel. In der Therapiegruppe nahm die Kontrastmittelbindung signifikant ab. Die Tumoren aller zehn Tiere nahmen weniger Kontrastmittel auf. In der Kontrollgruppe kam es bei acht von zehn Tieren zu einer Zunahme der Kontrastmittelbindung.

Dieser Effekt konnte auch in farbkodierten R2-Maps dargestellt werden. Durch Kontrastmittelgabe kam es zu einem verringerten T2-Signal und folglich erhöhtem R2 im VOI.

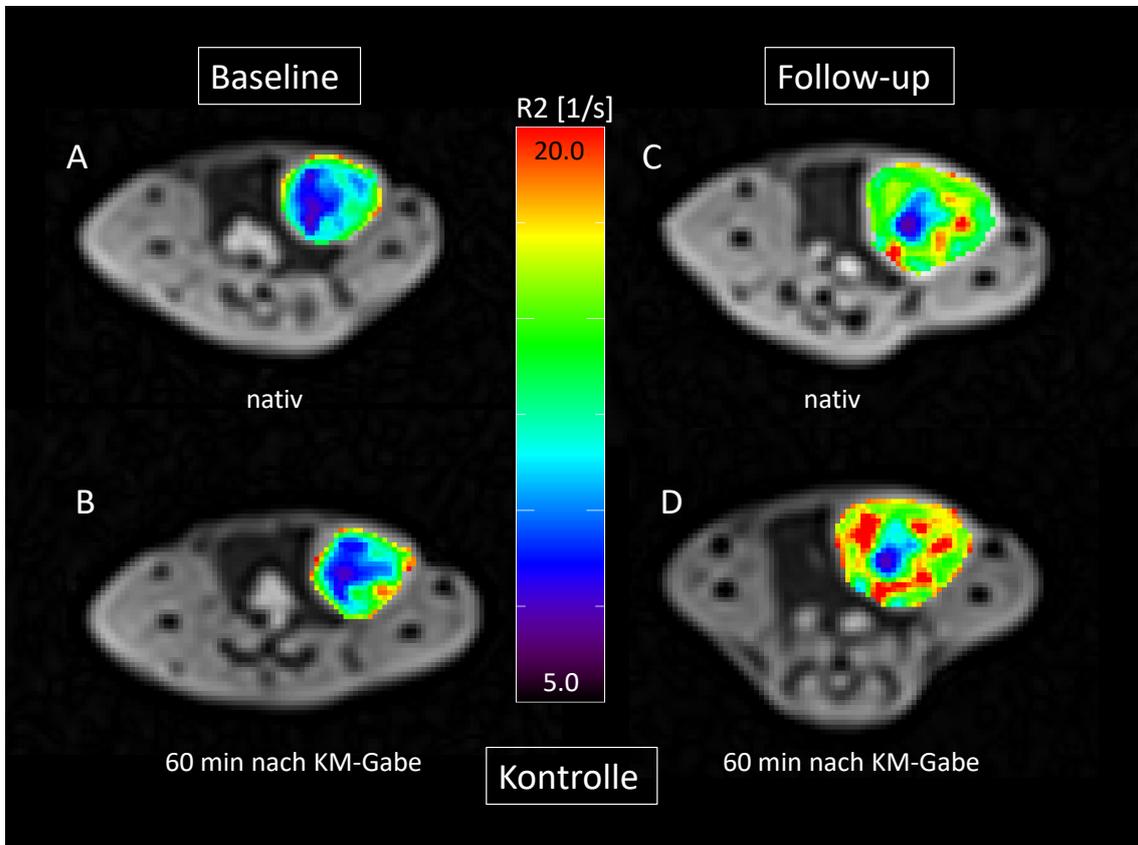


Abbildung 9: Repräsentative farbkodierte R2-Maps eines Kontrolltieres: A: Baseline-Messung ohne Kontrastmittel; B: Baseline-Messung mit Kontrastmittel; C: Follow-up-Messung ohne Kontrastmittel; D: Follow-up-Messung mit Kontrastmittel; Festzustellen war eine Kontrastmittelaufnahme im VOI vor sowie nach einwöchiger Behandlung, dargestellt durch ein erhöhtes R2. Erkennbar ist die sehr viel höhere Kontrastmittelanreicherung in D im Vergleich zu B, abgebildet durch die wärmeren Farben im VOI. Das Tumervolumen nahm in einer Woche deutlich zu.

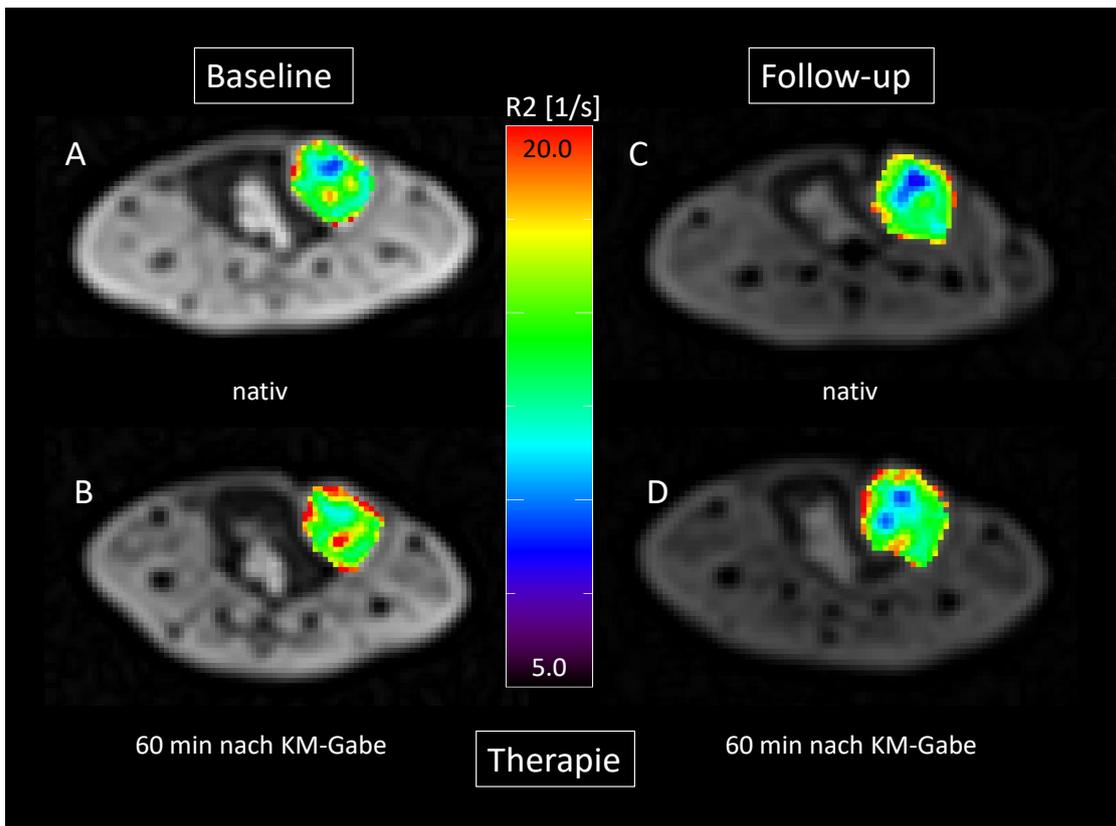


Abbildung 10: Repräsentative farbkodierte R_2 -Maps eines Therapietieres: A: Baseline-Messung ohne Kontrastmittel; B: Baseline-Messung mit Kontrastmittel; C: Follow-up-Messung ohne Kontrastmittel; D: Follow-up-Messung mit Kontrastmittel; Erkennbar war eine Kontrastmittelanreicherung im VOI vor Therapie, dargestellt durch ein deutlich erhöhtes R_2 . Nach Therapie kam es nur noch zu einer geringen Anreicherung, erkennbar durch nicht signifikant erhöhte R_2 -Werte im Vergleich zur Nativ-Messung. Hier wird die Differenz der Kontrastmittelaufnahme zwischen B und D gut durch die vermehrt blau grünen Farben im VOI in D abgebildet.

3.1.2 Tumorvolumina bei einwöchiger Therapie

Das Tumorvolumen nahm bei jedem Tier im Versuchszeitraum zu (Abbildung 11). Im Durchschnitt gab es in der Kontrollgruppe mit 125 μl ein stärkeres Wachstum der Malignome als in der Therapiegruppe mit 71 μl , jedoch kam es zu keinem signifikanten Unterschied ($\Delta\text{Vol}_{\text{Therapie}} +71\pm40 \mu\text{l}$ vs. $\Delta\text{Vol}_{\text{Kontrolle}} +125\pm81 \mu\text{l}$; $p>0,05$). Zum Zeitpunkt der Baseline-Messung gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen ($\text{Vol}_{\text{Therapie Baseline}} 239\pm158 \mu\text{l}$ vs. $\text{Vol}_{\text{Kontrolle Baseline}} 180\pm79 \mu\text{l}$; $p>0,05$).

Therapietier	Tumorvolumen Baseline [μl]	Tumorvolumen Follow- up[μl]	$\Delta\text{Vol.}$ [μl]
1	184	254	70
2	218	323	105
3	133	193	60
4	231	285	54
5	451	563	112
6	67	106	39
7	379	427	48
8	523	678	155
9	99	135	36
10	109	141	32
Mittelwert\pmSD¹	239\pm158	311\pm192	71\pm40
Kontrolltier			
11	188	300	112
12	68	103	35
13	197	309	112
14	230	534	304
15	111	222	111
16	117	141	24
17	158	270	112
18	350	528	178
19	142	224	82
20	205	385	180
Mittelwert\pmSD¹	177\pm79	302\pm146	125\pm81

¹SD= Standardabweichung

Tabelle 2: Tumorvolumina [μl] der Therapie- und Kontrollgruppe vor und nach einwöchiger Behandlung. Bei allen Tieren nahm das Volumen zu. Die Mittelwerte zeigen, dass die Volumina der Kontrollgruppe stärker als die der Therapiegruppe zunahmen. Ein signifikanter Unterschied der Tumorvolumina beider Gruppen wurde nicht festgestellt.

Δ Vol. der Therapie- und Kontrollgruppe

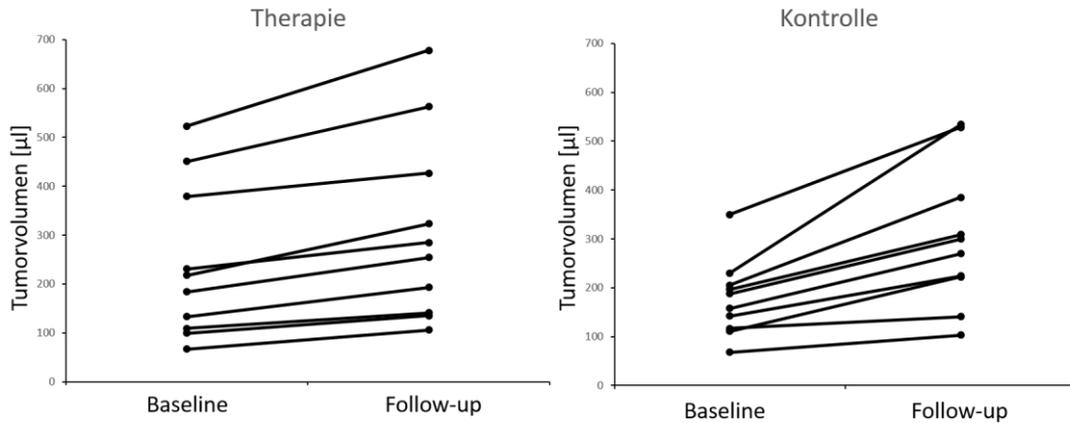


Abbildung 11: Tumorstadium [μl] der Therapie- und Kontrollgruppe vor und nach einwöchiger Behandlung. Zu erkennen war ein Anstieg der Volumina bei allen Tieren. Die Volumina der Kontrollgruppe nahmen stärker zu als die der Therapiegruppe.

3.1.3 Korrelation von $\Delta R2$ und Tumorstadium

Beim Vergleich von $\Delta R2$ mit dem Wachstum der Tumorstadium über eine Woche war keine signifikante Korrelation nachzuweisen (Abbildung 12). Durch den berechneten Korrelationskoeffizienten konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den gemessenen T2-Zeiten und den daraus berechneten $\Delta R2$ -Werten zwischen Baseline und Follow-up um größenbedingte Unterschiede handelte.

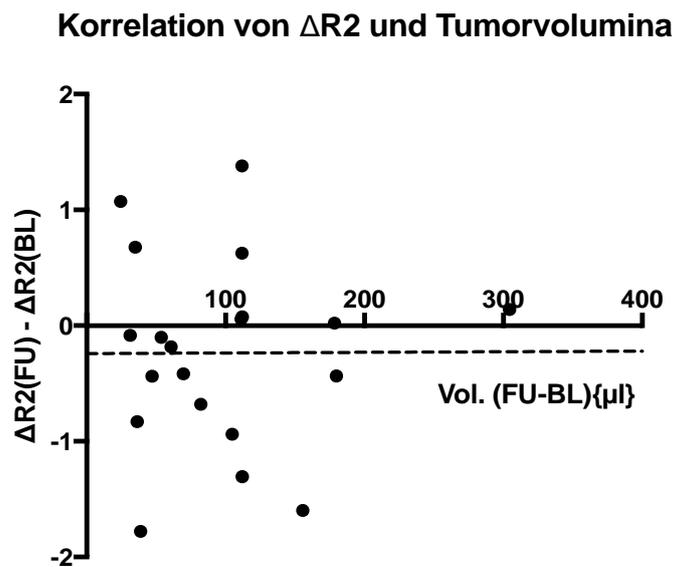


Abbildung 12: $\Delta R2$ -Werte [s^{-1}] in Abhängigkeit der Tumorstadium [μl]; Die Messpunkte streuten stark um die Regressionsgerade (gestrichelte Linie). Der Korrelationskoeffizient nach Spearman mit $\rho = -0,02556391$ bestätigt die fehlende Korrelation.

3.1.4 Variabilitätsexperiment der T2-Messwerte

Um zu untersuchen, ob sich die T2-Zeiten der Tumoren allein lagerungsbedingt veränderten, wurde eine separate Messreihe durchgeführt. Die Tumoren der drei untersuchten Tiere zeigten in den zwei aufeinanderfolgenden Messungen eine durchschnittliche Abweichung der T2-Zeiten von $1,6 \pm 0,28$ ms über die gesamte VOI. Auffällig war die konstant niedrigere T2-Zeit während der zweiten Messung.

Tier	1.Messung [ms]	2.Messung [ms]	$\Delta T2$ [ms]	$\Delta R2 [s^{-1}]$
1	76,93	75,51	1,42	0,70
2	70,89	68,89	2	0,50
3	72,38	71	1,38	0,72
Mittelwert\pmSD¹	73,4\pm2,57	71,8\pm2,76	1,6\pm0,28	0,63\pm0,1

¹SD= Standardabweichung

Tabelle 3: T2-Zeiten [ms] und $\Delta R2 [s^{-1}]$ der Testreihe zur Validierung der Konstanz der Messzeiten.

3.1.5 Messwerte der unspezifischen USPIO-Untersuchung

Die mit den unspezifischen USPIO untersuchten Tiere zeigten im Vergleich zu den RGD-USPIO-Mäusen nur eine geringe Kontrastmittelanreicherung. Bei der Baseline-Messung wurde ein Mittelwert aller Tiere von $\Delta R2 = 0,75 \pm 0,36 s^{-1}$ berechnet, in der Follow-up-Messung von $\Delta R2 = 0,4 \pm 0,32 s^{-1}$.

Therapietier	$\Delta R2$ Baseline	$\Delta R2$ Follow-up	$\Delta R2(FU) - \Delta R2(BL)$
1	0,43	0,29	-0,14
2	1,16	0,26	-0,9
Mittelwert\pmSD¹	0,8\pm0,37	0,27\pm0,02	-0,53\pm0,38
Kontrolltier			
3	0,36	0,11	-0,25
4	1,05	0,95	-0,1
Mittelwert\pmSD¹:	0,71\pm0,35	0,53\pm0,42	-0,18\pm0,08
Mittelwert\pmSD¹ gesamt:	0,75\pm0,36	0,4\pm0,32	-0,35\pm0,32

¹SD= Standardabweichung

Tabelle 4: $\Delta R2 [s^{-1}]$ der Versuchsreihe mit unspezifischen USPIO: Erkennbar war eine stärkere Abnahme von $\Delta R2$ in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Unterschied der Kontrastmittelaufnahme nach einwöchiger Behandlung mit Bevacizumab war nicht signifikant ($p=0,667$).

Mit einem $\Delta R2 = -0,53 \pm 0,38 \text{ s}^{-1}$ nahmen die Tiere nach Therapie mit Bevacizumab weniger Kontrastmittel auf als die Tiere der Kontrollgruppe ($\Delta R2 = -0,18 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$). Dabei kam es zu einem nicht signifikanten Unterschied des T2-Signals nach Kontrastmittelgabe zwischen beiden Gruppen ($p=0,667$).

3.2 Immunhistochemische Darstellung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression

Für die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Färbung wurde die Intensität der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression auf den Präparat-Schnitten betrachtet. Dafür wurden die Integrinrezeptoren rötlich angefärbt (Abbildung 14). Hier zeigte die Therapiegruppe eine signifikant niedrigere Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin im Vergleich zur Kontrollgruppe (Therapiegruppe: 91 ± 30 vs. Kontrollgruppe: 357 ± 72 pro zehn High Power Fields; $p < 0,001$, Abbildung 13, 14).

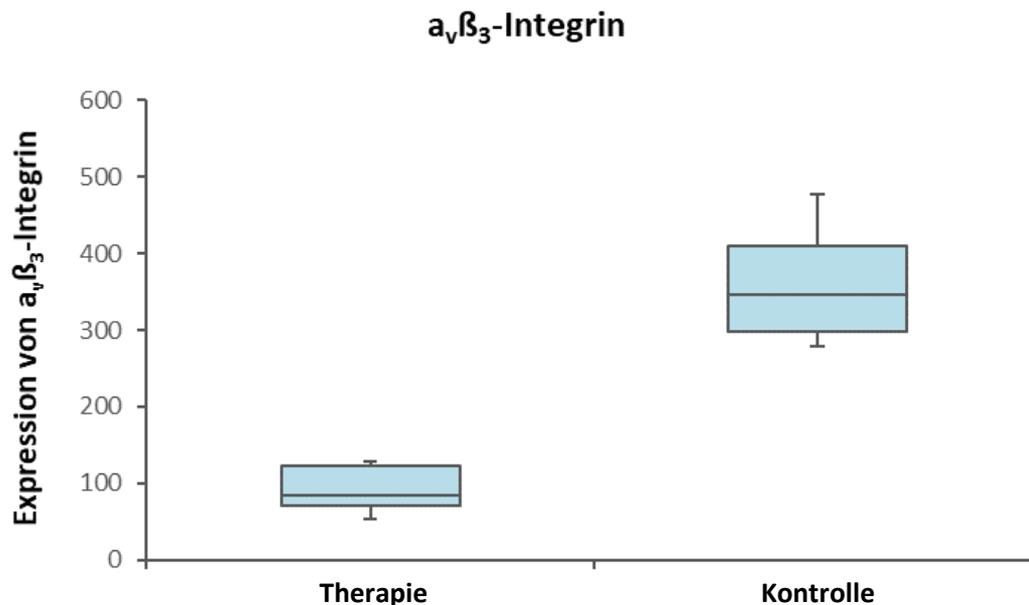
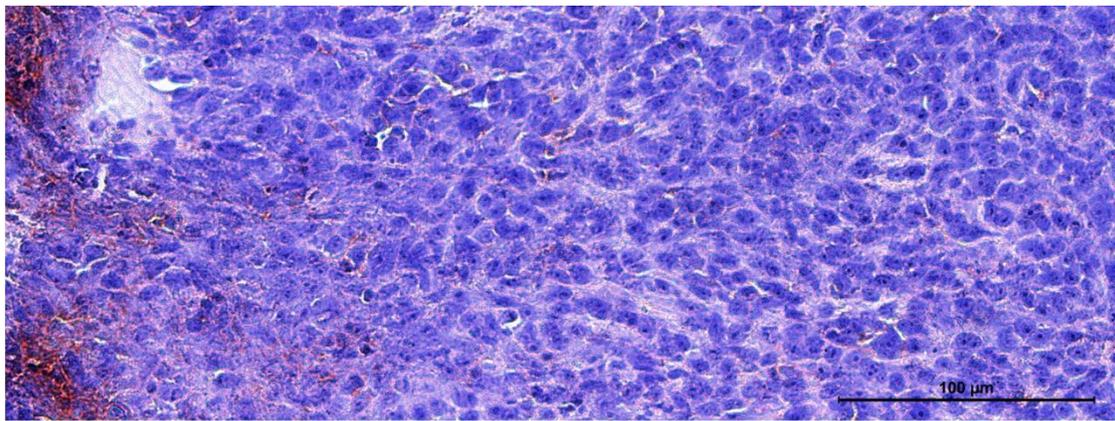
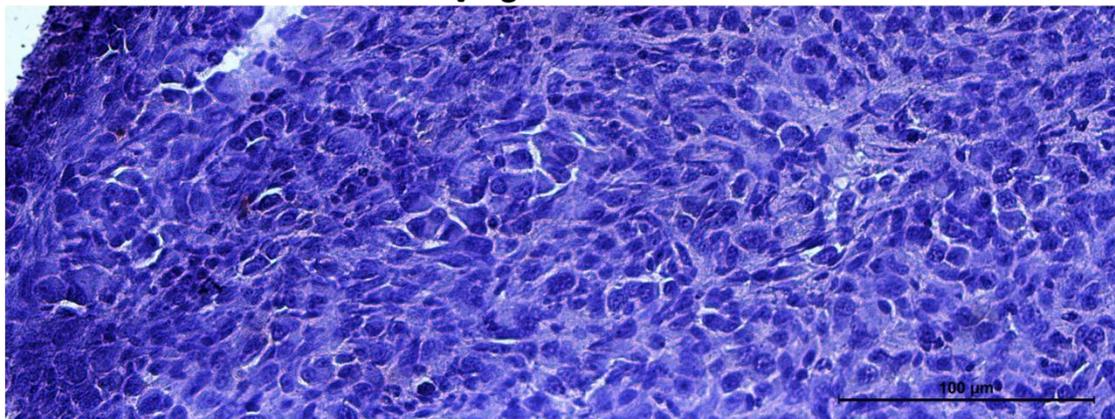


Abbildung 13: Der Boxplot zeigt die unterschiedlich starke Ausprägung der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression. In der Therapiegruppe kam es zu einer signifikant niedrigeren Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$).



A $\alpha_v\beta_3$ -Integrin



B

Abbildung 14: Ausschnitt eines repräsentativen Gesichtsfeldes aus der Kontrollgruppe (A) sowie der Therapiegruppe (B). Die rötliche Färbung zeigt angefärbte $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptoren. Zwischen den Tumorzellen der Kontrollgruppe war eine Expression des Rezeptors gut zu erkennen. Nach Therapie ließ sich immunhistochemisch nahezu kein $\alpha_v\beta_3$ -Integrin nachweisen.

3.3 Immunhistochemische Darstellung der Mikrogefäßdichte

Für die Bestimmung der Mikrogefäßdichte wurden durch CD31-Färbung markierte Gefäße im Tumor gezählt. Hierbei zeigte sich eine signifikant niedrigere Gefäßdichte bei den Therapietieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. (Therapiegruppe: 109 ± 46 vs. Kontrollgruppe: 440 ± 208 pro zehn High Power Fields; $p < 0,001$, Abbildungen 15, 16).

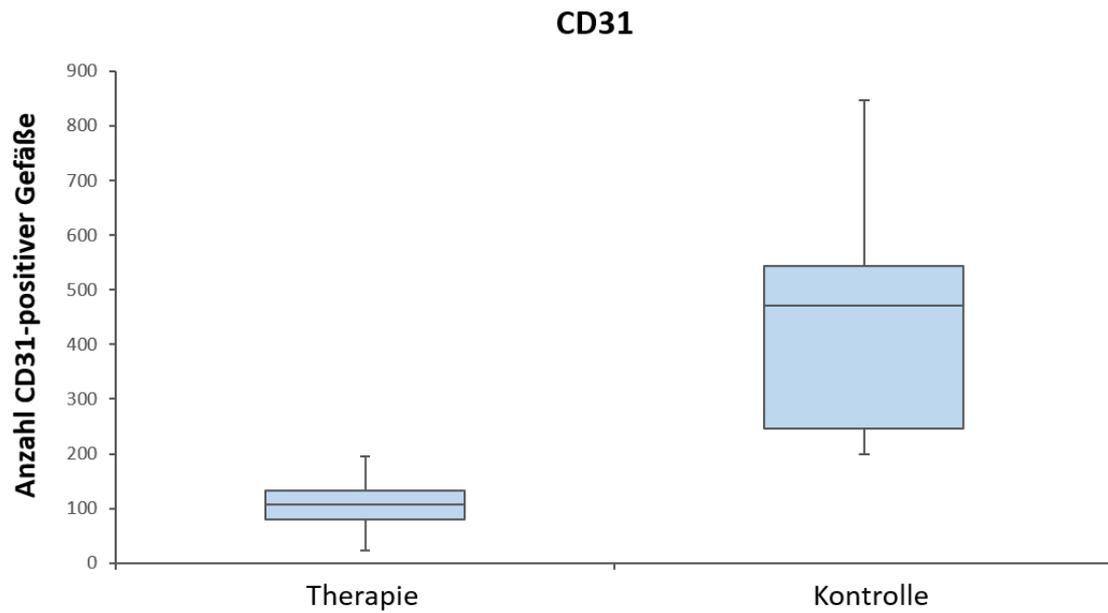
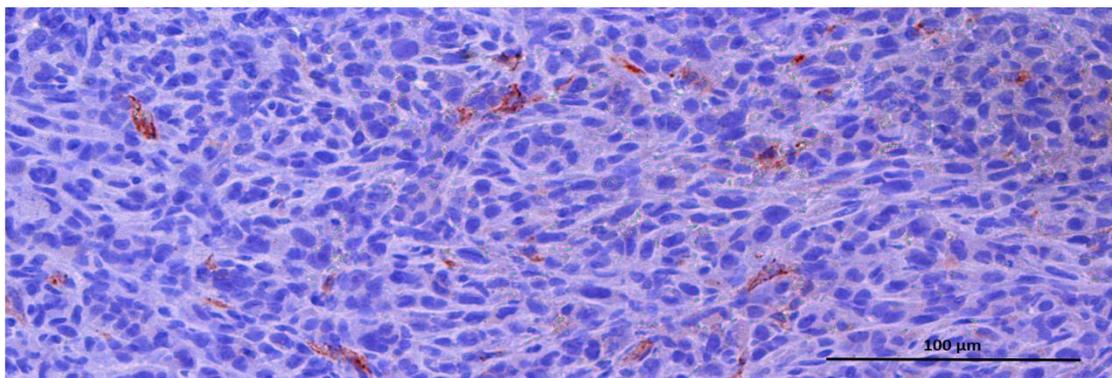
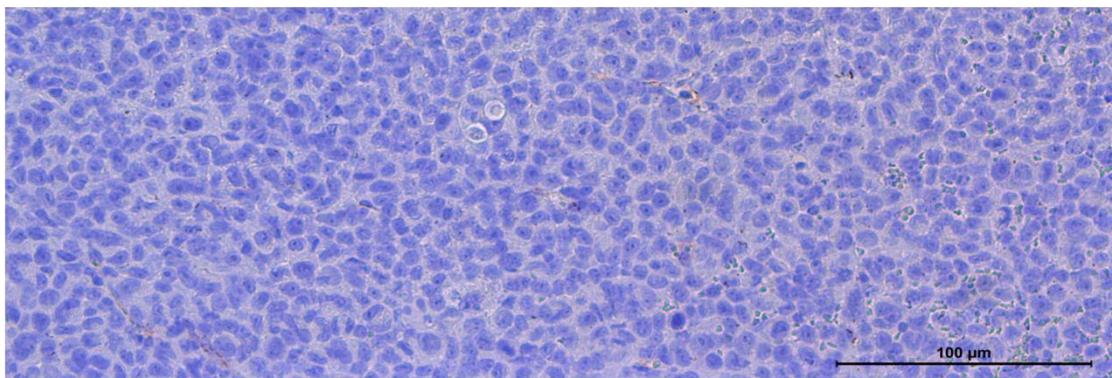


Abbildung 15: In der Therapiegruppe zeigte sich eine signifikant niedrigere Mikrogefäßdichte als in der Kontrollgruppe. Die Therapiegruppe exprimierte durchschnittlich etwa ein Viertel so viele gefärbte Gefäße wie die Kontrollgruppe ($p < 0,001$).



A **CD31**



B

Abbildung 16: Ausschnitt eines repräsentativen Gesichtsfeldes aus der Kontrollgruppe (A) sowie der Therapiegruppe (B) mit CD31-Färbung. Die rötliche Färbung gibt CD31 der Endothelzellen wieder. Die Kontrollgruppe wies eine signifikant höhere Mikrogefäßdichte auf als die Therapiegruppe, wie man anhand der angefärbten Gefäßanschnitte in A erkennen kann.

3.4 Immunhistochemische Darstellung der Tumorzell-Proliferation

Für die Ki-67-Färbung wurden positiv markierte Zellen pro Gesichtsfeld gezählt. Der Marker der Zellproliferation im Tumorgewebe zeigte eine signifikant höhere Zellteilungsrate in der Kontrollgruppe verglichen mit der Therapiegruppe (Kontrollgruppe: 6530 ± 1217 vs. Therapiegruppe: 4040 ± 1373 pro zehn High Power Fields; $p < 0,001$, Abbildungen 17, 18).

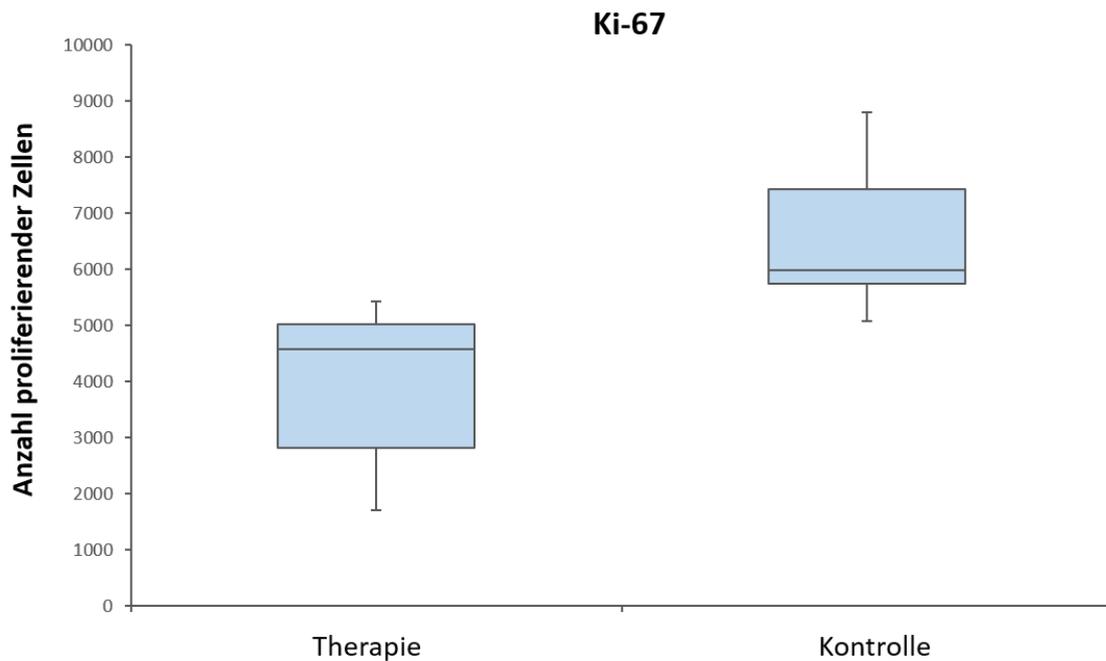
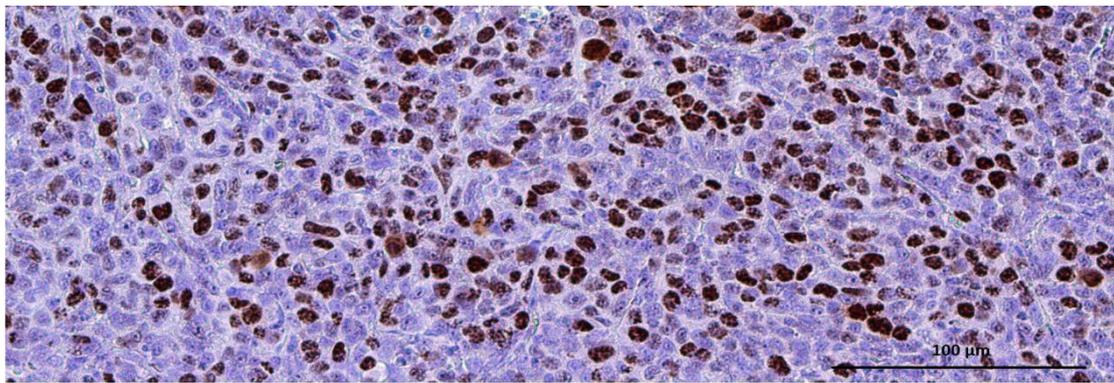
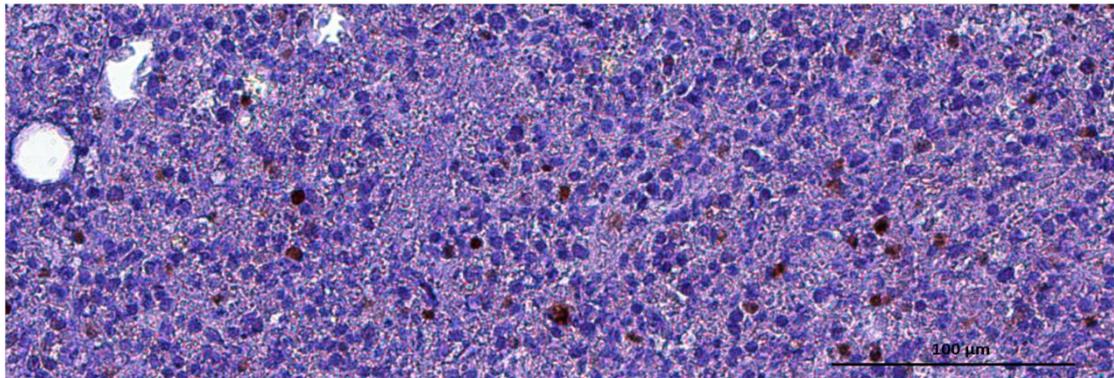


Abbildung 17: Im Gewebe der Therapiegruppe zeigte sich eine signifikant geringere Anzahl proliferierender Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,001$).



A

Ki-67

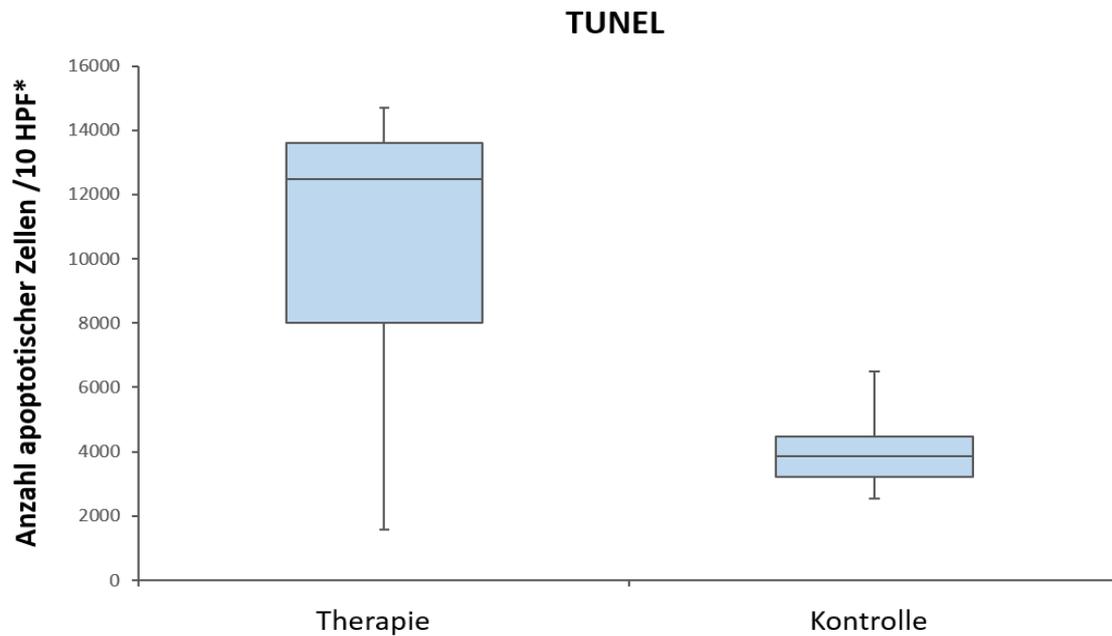


B

Abbildung 18: Ausschnitt eines repräsentativen Gesichtsfeldes aus der Kontrollgruppe (A) sowie der Therapiegruppe (B). Die Kontrollgruppe zeigte eine hohe Zellteilung, erkennbar an der deutlichen rotbraunen Färbung des Präparates. In der Therapiegruppe war die Mitoserate signifikant geringer.

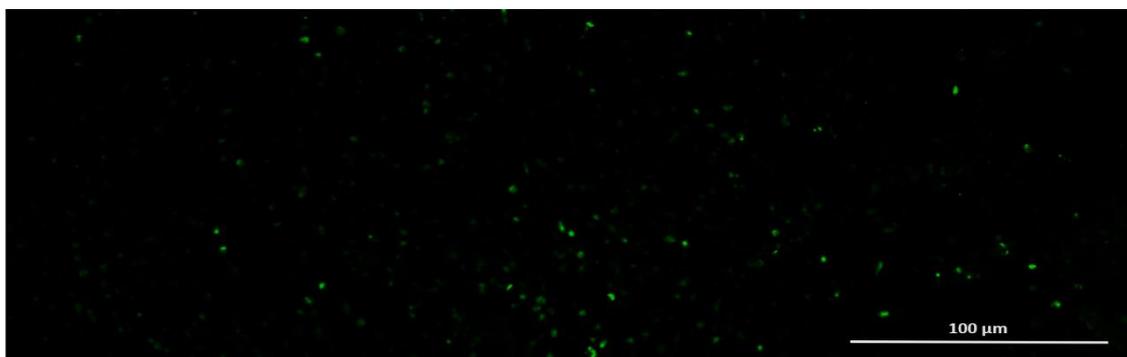
3.5 Fluoreszierende Darstellung der Tumorzell-Apoptose

Die mit Dunkelfeldmikroskopie ausgewertete fluoreszierende TUNEL-Färbung zeigte eine signifikant höhere Zahl apoptotischer Zellen nach Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe. (Therapiegruppe: 11186 ± 4387 vs. Kontrollgruppe: 4017 ± 1191 pro zehn High Power Fields; $p=0,004$, Abbildungen 19, 20).



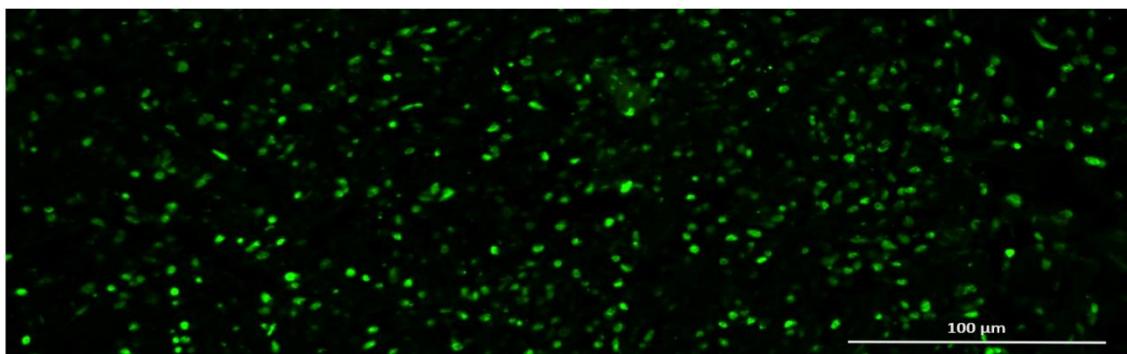
*HPF= High Power Fields

Abbildung 19: In der Therapiegruppe ließ sich der therapeutische Effekt anhand der signifikant höheren Zahl apoptotischer Zellen erkennen. In der Kontrollgruppe wurden weniger als halb so viele Zellen gefärbt (Therapiegruppe: 11186 ± 4387 ; Kontrollgruppe: 4017 ± 1191 ; $p=0,004$).



A

TUNEL

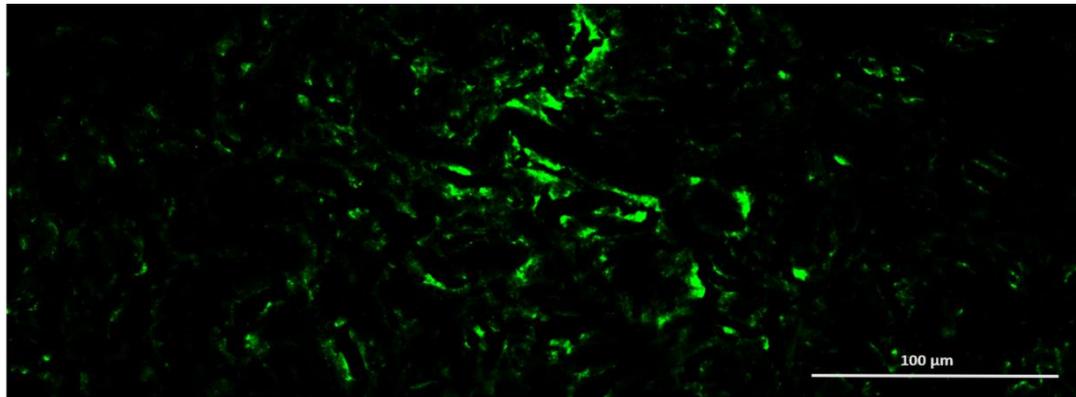


B

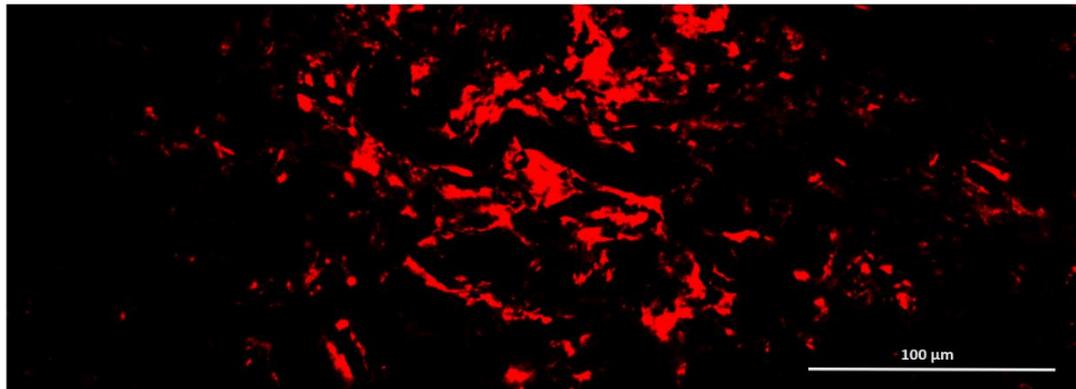
Abbildung 20: Ausschnitt eines repräsentativen High-Power-Fields aus der Kontrollgruppe (A) sowie der Therapiegruppe (B). Grün markiert stellen sich apoptotische Zellen dar. Nach Therapie war die Zahl apoptotischer Zellen signifikant ($p < 0.05$) höher als in der Kontrollgruppe.

3.6 Fluoreszierende $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-/CD31-Doppelfärbung

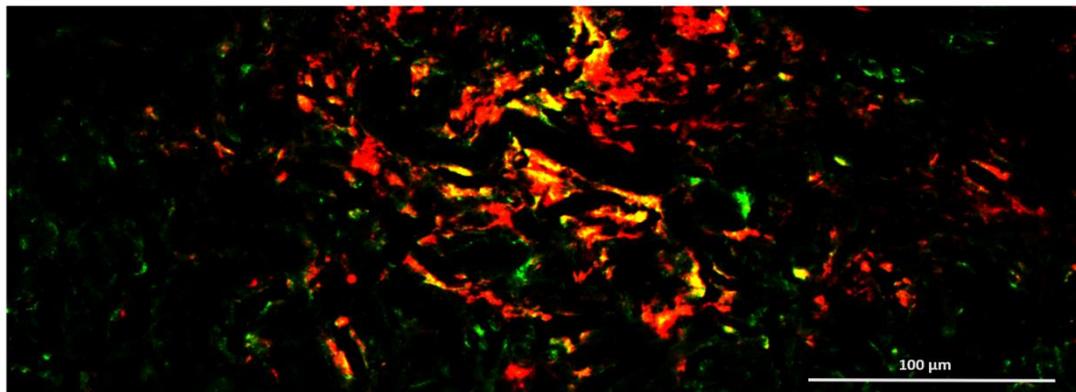
Die fluoreszierende $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-/CD31-Doppelfärbung zeigte unter dem Dunkelfeldmikroskop eine Koexpression beider Oberflächenproteine. Damit konnte gezeigt werden, dass $\alpha_v\beta_3$ -Integrin im untersuchten Tumormodell überwiegend endothelial exprimiert wird (Abbildung 21).



A



B



C

Abbildung 21: Darstellung der fluoreszierenden $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Färbung (A: grün gefärbt), der fluoreszierenden CD31-Färbung (B: rot gefärbt) und der Koexpression beider Rezeptoren durch überlagernde Färbungen (C). Da CD31 ausschließlich von den Endothelzellen exprimiert wurde, konnte man schlussfolgern, dass das sichtbare $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, das sich in der Überlagerung gelb zeigte, ebenfalls endothelial exprimiert wurde.

3.7 Fluoreszierende Berliner-Blau-/CD31- Doppelfärbung

Mit der Berliner-Blau-/CD31- Doppelfärbung konnte der Beweis erbracht werden, dass das eisenhaltige Kontrastmittel tatsächlich am Endothel bindet (Abbildung 22). Es zeigte sich nur auf der Zellmembran und nicht im Zytoplasma. Auch im Interstitium oder auf Oberflächen anderer Zellen wurde kein Eisen nachgewiesen.



*Abbildung 22: Gefäßanschnitt mit Berliner-Blau-/CD31-Doppelfärbung⁷²: Das Endothel zeigte sich rostbraun angefärbt, Eisen stellte sich schwarzblau dar; → gefärbtes Eisen am luminalen Teil des Endothels; * Erythrozyt; Es ließ sich weder im Zytoplasma der Endothelzellen noch im Interstitium oder an anderen Zellen Eisen und damit Kontrastmittel anfärben. Damit wird nachgewiesen, dass es bei RGD-USPIO mit einem hydrodynamischen Diameter von 180 nm zu keinem relevanten EPR-Effekt kam.*

4 Diskussion

In dieser Studie wurde das Monitoring einer antiangiogenetischen Therapie anhand des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptorstatus von Endothelzellen in einem orthotopen Mammakarzinom-Modell mit kontrastmittelverstärkter MRT in vivo untersucht. Das durch eine geringere Anreicherung spezifisch bindender RGD-USPIO signifikant geringere ΔR_2 nach Bevacizumab-Therapie war in Korrelation zur ex-vivo-Immunhistochemie Surrogatparameter einer niedrigeren endothelialen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression. In allen Färbungen ($\alpha_v\beta_3$ -Integrin-, CD31-, Ki-67- Expression und TUNEL) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Dieser Effekt auf molekularer Ebene stand in Kontrast zum morphologischen Verhalten des Tumors. Hier wurde eine Größenprogredienz bei allen untersuchten Tieren festgestellt.

4.1 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Surrogatparameter antiangiogenetischer Therapieeffekte

Die Ergebnisse dieses Projektes zeigen, dass ein Monitoring der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Surrogatparameter des antiangiogenetischen Therapieeffektes mit RGD-USPIO als Kontrastmittel möglich ist. Dies deckt sich mit einer Studie von Zhang et al., bei der das Monitoring einer antiangiogenetischen Therapie an Glioblastomen (U87MG) in Mäusen untersucht wurde.⁵² Auch hier wurden eisenoxidhaltige Nanopartikel mit RGD-Domänen als spezifisch bindendes Kontrastmittel verwendet. In der MRT konnte bereits nach viertägiger Therapie ein signifikanter Unterschied zwischen den Relaxationszeiten von Therapie- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Nach antiangiogenetischer Therapie mit VEGF₁₂₁/rGel, einem Fusionsprotein aus VEGF und dem Pflanzengift Gelonin,⁷³ wurde anhand einer T2*-Perfusionsmessung und einer T2*-Spätaufnahme das unterschiedliche Bindungsverhalten der RGD peptides conjugated to iron oxide nanoparticles (IONP-RGD) nachgewiesen. Somit konnte die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression auch mit einer Perfusionsmessung als Surrogatmarker des Therapieeffektes verwendet werden. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie gab es zwar tägliche MRT-Untersuchungen zur Evaluierung der Tumorgöße, jedoch wurden die Tiere am Tag der T2*-Perfusionsmessung eingeschläfert und die Tumoren explantiert, weshalb der Rezeptorstatus des Endothels nur zu einem einzigen Zeitpunkt untersucht wurde. Da dies nach der Gabe des Angiogenesehemmers geschah, konnte nur eine qualitative Aussage zum Rezeptorstatus nach Therapie getroffen werden.

Die in dieser Studie durch die Baseline-Messung akquirierten Daten erlaubten die Definition von Bezugswerten, die sich durch die Therapie änderten. Diese ermöglichten einen Vergleich und ließen damit eine semiquantitative Aussage über die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Surrogatparameter des antiangiogenetischen Therapieerfolges vor und nach Therapie zu. Damit übereinstimmend kann eine Studie von Cui et al. vergleichend herangezogen werden, bei der frühe antiangiogenetische Therapieeffekte bei Nasopharynx-Karzinomen im MRT am Mausmodell untersucht wurden.⁵⁰ In dem Projekt wurden die frühen Therapieeffekte von Endostatin auf die endotheliale Entwicklung mit RGD-coupled, polyacrylic acid -coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide (RGD-PAA-USPIO) als eisenhaltigem Kontrastmittel dargestellt. Da Endostatin, ein physiologisch aus Kollagen XVIII gebildetes Spaltprodukt, durch Bindung an die Zielzellen durch Modifizierung mehrerer Genexpressionen zu einer reduzierten Angiogenese führt, gilt es als direkter endogener Angiogenese-Inhibitor.⁷⁴ Die Tiere wurden sowohl vor, als auch vier Tage sowie zwei Wochen nach Therapie mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf ihren Gefäßstatus im Tumor hin im MRT untersucht. Auch hier konnte mit der R2-Relaxometrie bereits nach vier Tagen ein signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe beschrieben werden, der sich an Tag 14 sogar noch ausgeprägter zeigte.

4.2 Tumorumfänge und Rezeptorstatus

Nach Morphologie-basierten Kriterien des Therapieansprechens (Zu- bzw. Abnahme des Tumorumfanges) konnte nach sieben Tagen kein signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Bei allen Versuchstieren kam es zu einer Volumenzunahme, lediglich die therapierte Kohorte zeigte ein tendenziell langsames Wachstum. Auch hier deckten sich die vorliegenden Daten mit denen der oben genannten Arbeiten. Sowohl in der Studie von Zhang et al. als auch bei Cui et al. kam es insgesamt zu einer Größenzunahme der Tumoren in den therapierten sowie in den nicht therapierten Gruppen. Während auf molekularer Ebene bereits nach vier Tagen ein signifikanter Unterschied des $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptorstatus bei den verschiedenen Kohorten erkennbar war, konnte morphologisch ein signifikanter Therapieerfolg auf Grund des unterschiedlichen Tumorumfanges zwischen Therapie- und Kontrollgruppe bei Zhang nach sieben und bei Cui nach acht Tagen gezeigt werden.^{50,52} Somit konnte in verschiedenen Tumormodellen der Effekt einer antiangiogenetischen Therapie auf

molekularer Ebene mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin als Surrogatparameter früher dargestellt werden als mit traditionell Morphologie-basierter Bildgebung.

4.3 Variabilitätsmessung zum Ausschluss von lagerungsbedingten Messfehlern

Da in vorliegendem Projekt die Unterschiede der Messwerte sehr gering ausgefallen sind, musste sichergestellt werden, dass diese nicht allein durch Veränderung der Lagerung der Tiere im MRT entstanden. Die Ergebnisse aus den Variabilitätsmessungen zeigten ein regelmäßig niedrigeres T2-Signal in der zweiten Messung im Vergleich zur ersten. Das spricht, trotz der niedrigen Anzahl der in der Variabilitätsmessung untersuchten Tiere ($n=3$), gegen eine neue Ausrichtung des Magnetfelds durch das Shimming sowie gegen eine zufällige Messabweichung. Beides hätte in der zweiten Messung neben niedrigeren auch höhere T2-Werte ergeben müssen. Folglich müsste die durchschnittliche Abweichung der beiden Messungen gegen Null gehen.

Eine weitere mögliche Erklärung der konstant niedrigeren T2-Zeiten ist die Veränderung der Körpertemperatur der Tiere während des Aufenthalts im MRT. Die normale Körperkerntemperatur einer Maus beträgt $38,0\text{ °C}$ bis $39,5\text{ °C}$.⁷⁵ Selbst wenn die Wärmeeinheit eine adäquate Temperatur der Maus gewährleistet, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich diese während der Narkose über eine Stunde verändert. Eine Veränderung der Temperatur des zu untersuchenden Gewebes hat durchaus Auswirkungen auf die Resonanzsignale in der MRT. So zeigten Baron et al., dass eine Temperaturerhöhung in Fettgewebe der menschlichen Brust um 1 °C bereits eine T2-Zeit-Verlängerung von $0,90\pm 0,03\text{ ms}$ bewirken kann.⁷⁶ Das Projekt von Baron et al. wurde an einem 1,5-T-MRT durchgeführt, daher kann es nicht direkt mit vorliegender Studie bei 3 Tesla verglichen werden. Übereinstimmend mit der Aussage von Baron et al. kann ein weiteres Projekt herangezogen werden, in dem nicht-invasive Thermometrie mit T2-gewichteter MRT untersucht wurde. Hier wiesen Parmala et al. eine T2-Zeit-Verlängerung bei steigender Gewebetemperatur sowohl im 1,5-T-MRT als auch im 3-T-MRT nach. So wurde ein Effekt von $\Delta R2 = 0,991/s$ bei einem Temperaturanstieg von $1,6\text{ °C}$ beschrieben.⁷⁷

Im Umkehrschluss würde das bedeuten, dass bei einem $\Delta T2$ ($1,6\pm 0,28\text{ms}$), wie in diesem Projekt gemessen, die Gewebetemperatur des Tumors um ungefähr $2,5\text{ °C}$ abgenommen hätte. Das ist durchaus denkbar, da die Tiere durch die Narkose auskühlen und nur durch die Wärmeeinheit als Unterlage im MRT davor geschützt werden sollten. Der Effekt

würde sich jedoch nur in der Variabilitätsmessung zeigen, da diese Tiere zwischen den beiden Messungen nicht geweckt wurden und daher bei der zweiten Messung bereits über 30 min in Narkose lagen. Die Mäuse der Therapie- und Kontrollgruppe waren zwischen den Messungen vor und nach Kontrastmittel bis zu einer Stunde wach. Dadurch konnte sich ihr Kreislauf erholen und die Körpertemperatur regenerieren.

4.4 Reduziertes T2-Signal nach Gabe von unspezifischen USPIO

In der Versuchsreihe mit den ungelabelten USPIO konnte bei allen Tieren ein verringertes R2 in den Follow-up-Messungen festgestellt werden. In der Kontrollgruppe war der Kontrastmitteleffekt geringfügig niedriger als in der Baseline-Messung, in der Therapiegruppe hingegen war der Effekt deutlicher zu erkennen, wenngleich nicht signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.

Nachdem das hier verwendete Kontrastmittel nicht an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindet, könnte das Phänomen des EPR-Effekts den höher als erwarteten Messunterschied erklären. So wäre es denkbar, dass das Kontrastmittel durch die porösen Tumorgefäße in das Interstitium diffundiert ist und sich dort angereichert hat. Das würde bedeuten, dass die Konzentration des Kontrastmittels in der Kontrollgruppe einen ähnlichen Effekt sowohl während der Baseline- wie auch während der Follow-up-Messung zeigen müsste. Durch den antiangiogenetischen Effekt des Therapeutikums kam es in der Therapiegruppe zu einer geringeren Gefäßdichte im Tumor, wie die Immunhistochemie bestätigte. Folglich gab es weniger fenestrierte Gefäße, durch die das Kontrastmittel hätte entweichen können, was ein erhöhtes $\Delta R2$ zur Folge hatte.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es bei RGD-USPIO als Kontrastmittel zu keinem EPR-Effekt kam. Das konnte durch die Berliner-Blau-/ CD31- Doppelfärbung belegt werden, in der Eisen nur am Endothel und nicht im interstitiellen Raum angefärbt wurde (Abbildung 22). Das bestätigt zum einen die Hypothese, dass Nanopartikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 180 nm groß genug sind, um im untersuchten Tumormodell nicht dem EPR-Effekt zu unterliegen. Andererseits widerspricht es der hier vorgelegten Theorie, die die ermittelten Werte im MRT erklären sollte.

Eine weitere Erklärung wäre das noch im Blutkreislauf der Maus zirkulierende Kontrastmittel. Wie bereits in Kapitel 2.4. beschrieben, beträgt die physiologische Halbwertszeit der unspezifischen USPIO $11,5 \pm 1,3$ min. 60 min post injectionem beträgt

die Blutkonzentration in den Tieren nach sechs Halbwertszeiten $\frac{1}{64}$ der applizierten Konzentration. Mit einer berechneten R2-Relaxivität von $306 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ und einer applizierten Menge von $200 \text{ } \mu\text{mol Fe/kg Körpergewicht}$ (durchschnittliches Körpergewicht einer Maus 20 g , Verteilungsvolumen $18\text{-}20 \text{ ml} \rightarrow 200 \mu\text{M Fe/ Tier}$) wäre ein maximales $\Delta R2$ nach Kontrastmittelgabe von $61,2 \text{ s}^{-1}$ erreichbar gewesen. Nach sechs Halbwertszeiten konnte der Effekt des noch zirkulierenden Kontrastmittels daher bis zu $\Delta R2=0,96 \text{ s}^{-1}$ betragen. Dies wäre mit den gemessenen Werten vereinbar.

Da es sich im Vergleich zu den unspezifischen USPIO bei RGD-USPIO um ein Kontrastmittel mit einer Halbwertszeit von $6,6 \pm 0,5 \text{ min}$ handelt, befand sich zum Zeitpunkt der Messung, bei gleicher Menge applizierten Eisens, nach neun bis zehn Halbwertszeiten nur noch $\frac{1}{512}$ bis $\frac{1}{1024}$ der ursprünglichen Konzentration im Blutkreislauf der Mäuse. Damit konnte mit einem maximalen $\Delta R2$ von $0,0006 \text{ s}^{-1}$ ein messbarer Effekt auf die T2-Zeit und damit eine mögliche Verzerrung der Messwerte ausgeschlossen werden.

4.5 Immunhistochemie zur Validierung der USPIO-MRT-Messergebnisse

Zur Validierung der nicht-invasiven MRT-Messergebnisse wurden mehrere immunhistochemische Färbungen angefertigt. So konnte mit einer CD31-Färbung nachgewiesen werden, dass es als therapeutischer Effekt der Anti-VEGF-Antikörper-Therapie zu einer signifikant reduzierten Mikrogefäßdichte bei der Therapie- im Vergleich zur Kontrollgruppe kam. Dieses Resultat stimmt mit dem Ergebnis einer Studie von Roland et al. überein, in der eine signifikant geringere Mikrogefäßdichte in MDA-MB-231-Xenografts im Mausmodell nach VEGF-Inhibition immunhistochemisch festgestellt werden konnte.³⁶ Diese Arbeitsgruppe therapierte ihre Tiere über 24 Tage zweimal wöchentlich mit dem Angiogenesehemmer Bevacizumab. Im Anschluss beschrieben sie eine zur Kontrollgruppe um 58% reduzierte Mikrogefäßdichte des Tumors in der therapierten Gruppe. Dieses Ergebnis deckt sich mit der CD31-Färbung in einem Parallel-Projekt unserer Arbeitsgruppe, in der MDA-MB-231-Xenograft tragende SCID-Mäuse vor und nach einwöchiger Anti-VEGF-Antikörpertherapie mit radioaktiven RGD-Tracern im PET-CT und immunhistochemisch untersucht wurden. Mit 168 ± 108 vs. 432 ± 70 ausgezählten Gefäßanschnitten zeigte sich bereits nach einer Woche ein deutlicher Therapieeffekt.⁷⁸

Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, wird die Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in Endothelzellen unter anderem durch VEGF stimuliert. Unter VEGF-Inhibition sollte es daher nur zu einer geringen Integrin-Expression kommen.²⁷ Immunhistochemisch konnte der im MRT gemessene Unterschied des Integrin-Rezeptorstatus belegt werden. Es zeigte sich in der Therapiegruppe eine signifikant niedrigere $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression der Rezeptoren nach Anti-VEGF-Antikörpertherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch hier können andere Studien herangezogen werden, die ähnliche Ergebnisse berichten.^{37,66} In der Arbeit von Rylova et al. wurde anhand der Immunhistochemie die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptordichte zur Validierung der im PET-CT erhobenen Daten zum Monitoring einer Bevacizumab-Therapie bestimmt. In zwei verschiedenen Tumormodellen (A-431 human epidermoid carcinoma und FaDu human hypopharyngeal squamous cell carcinoma) wurde sowohl nach einer, als auch nach zwei Wochen Therapie eine signifikant geringere Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin am Endothel anhand eines Antikörpers gegen die β_3 -Untereinheit des Integrins beschrieben.

4.6 Bevacizumab im Mausmodell

Der Angiogenesehemmer Bevacizumab ist ein gegen humanes VEGF gerichteter Antikörper, der keine Kreuzreaktivität zu frei zirkulierendem, murinen VEGF zeigt.⁷⁹ Trotzdem konnte ein antiangiogenetischer Effekt unter Therapie sowohl in der MRT durch geringere Anreicherung des an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin spezifisch bindenden Kontrastmittels, als auch in der Immunhistochemie anhand reduzierter Expression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich auch mit anderen Studien, die in Versuchen mit Bevacizumab in Mausmodellen mit humanen Tumorexografts ebenfalls antiangiogenetische Effekte nachweisen konnten.^{36,37,78}

In vorliegendem Projekt wurden mit MDA-MB-231-Zellen humane Tumorzellen in die Milchleiste der Versuchstiere injiziert. Das Bindegewebe, in das die Tumoren eingewachsen sind und auch die Zellen der neu ausgebildeten Gefäße zur Versorgung des Xenografts waren jedoch murinen Ursprungs.⁸⁰ Daher muss eine humorale Kommunikation zwischen den Zellen möglich sein. So fand man heraus, dass der murine VEGFR2 (= flk-1) eine hohe Affinität zu humanem VEGF, in diesem Projekt von MDA-MB-231-Zellen, zeigt. Seine Aktivierung resultiert, ähnlich der humanen Reaktion, in einer Steigerung der Angiogenese.⁸¹ Selbst wenn Bevacizumab nicht mit freiem murinen VEGF interagiert, so kann es an tumoreigenes VEGF humanen Ursprungs binden.⁷⁹

Damit kann eine Aktivierung des flk-1 durch humanes VEGF aus MDA-MB-231-Zellen durch spezifische anti-humane-VEGF-Antikörper in Mäusen unterbunden werden.

Liang et al. zeigten, dass die Wirksamkeit eines Antikörpers gegen humanes VEGF abhängig von der Tumor-Infiltration in das umliegende Bindegewebe ist. So ist der therapeutische Effekt bei Tumoren mit geringerer Stroma-Invasion höher als bei Tumoren die stärker in das Bindegewebe einwachsen. Eine alleinige Blockade von humanem VEGF bei tief infiltrierenden Tumoren führt zu keiner suffizienten Hemmung der Angiogenese, da das von der Maus stammende stromale VEGF als angiogenetischer Stimulus stärker als das humane VEGF wirkt.⁸²

Das bedeutet, dass das in der vorliegenden Studie verwendete Bevacizumab nur das von den MDA-MB-231-Zellen exprimierte, humane VEGF blockierte, nicht aber das murine. Im Rahmen dieses Projektes konnte die therapeutische Wirksamkeit einer einwöchigen Bevacizumab-Therapie durch die RGD-USPIO-MRT trotzdem mit statistischer Signifikanz dargestellt werden.

4.7 Zeitlicher Vorteil der molekularen Bildgebung gegenüber Morphologie-basierter Bildgebung

Neue zielgerichtete, molekulare Tumorthérapien wirken auf die Physiologie des Tumorgewebes bevor morphologisch reduziertes Wachstum oder Regression zu detektieren ist. Neue bildgebende Verfahren sollen diese Lücke schließen und einen therapeutischen Effekt so früh wie möglich mit hoher Sensitivität und Spezifität quantitativ erfassen können. Somit könnten frühzeitig Responder von Non-Respondern unterschieden und die Therapie personalisiert angepasst werden. Aus diesem Grund wird versucht, die diagnostischen Möglichkeiten aller bildgebenden Modalitäten, zu optimieren. So kann die USPIO-MRT als Verfahren der molekularen Bildgebung einen diagnostischen Mehrwert im Vergleich zur Morphologie-basierten MRT liefern. Mit der Morphologie-basierten MRT können Aussagen über den Erfolg einer antiangiogenetischen Therapie durch einen statistisch signifikanten Unterschied in den Tumolvolumina erst zu einem späteren Zeitpunkt getroffen werden als es mit der USPIO-MRT möglich ist. So wurde das Studiendesign zur Beobachtung der Tumolvolumina unter Bevacizumab-Therapie von Sápi et al. mit 23 Tagen definiert. Es konnte zwar am Ende der Studie eine statistisch signifikante Aussage über das unterschiedliche Tumorstadium zwischen Bevacizumab-Therapie und Kontrolle getroffen werden, nach

einer Woche Therapie jedoch noch nicht.⁸³ Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, in der nach sechs Tagen Therapie kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen anhand der Tumorumfänge festgestellt werden konnte. Trotzdem gelang es bereits zu diesem Zeitpunkt mit der zusätzlichen molekularen Bildgebung einen statistisch signifikanten Therapie-Effekt zeigen zu können.

4.8 Ansätze verschiedener bildgebender Verfahren, Integrine zur Untersuchung angiogenetischer Aktivität zu nutzen

Das Wachstum vieler Tumoren ist abhängig von der lokalen Gefäßproliferation. Die Möglichkeit eines Monitorings der Angiogenese und auch einer antineoplastischen Therapie mit Angiogenesehemmern ist daher essenziell. Durch den Einsatz verschiedener Modalitäten der Bildgebung wird versucht, angiogenetische und antiangiogenetische Vorgänge darzustellen. Der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor eignet sich potentiell durch seine elementare Funktion während der Angiogenese als guter Surrogatparameter. So zeigten bereits Ellegala et al. 2003, dass eine sonographische Darstellung des Integrins mit speziell bindenden Microbubbles als Kontrastmittel möglich ist. In Kombination mit dem sonographisch ermittelten regionalen Blutfluss, dem Blutvolumen und der Flussgeschwindigkeit versprachen sie sich einen wichtigen physiologischen Einblick in die Angiogenese bei neoplastischen und chronisch-ischämischen, kardiovaskulären Erkrankungen.⁸⁴ Auch wenn schon ein signifikanter Unterschied von speziell an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindenden gegenüber unspezifischen Microbubbles gezeigt werden konnte, wurden die Kontrastmittel weiterentwickelt. So wurden beispielsweise Microbubbles mit dualer Target-Erkennung gegen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und VEGFR2 in einer Studie mit den jeweiligen Kontrastmitteln gegen nur eine Target-Struktur verglichen. Es zeigte sich, dass es im Vergleich zu den Mono-Target-Kontrastmitteln durch die doppelte Bindungsmöglichkeit zu einer signifikant höheren Bindung am Endothel kommt.⁸⁵ Das spricht für ein noch sensitiveres Kontrastmittel und könnte daher (anti-)angiogenetische Effekte mit noch höherer Sensitivität nachweisen. Für die Immunmarkierung von Microbubbles mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-bindenden Antikörpern wird in den meisten Fällen die (Strept-)Avidin-Biotin-Methode angewandt.⁸⁶ Da sich (Strept-)Avidin-Biotin als humanimmunogen gezeigt hat, lassen sich diese Studien jedoch nicht in klinische Studien übertragen.⁸⁷ Einen weiteren Ansatz zur nichtinvasiven, molekularen Bildgebung der Angiogenese bei Tumoren zeigten Yan et al, die als spezifisch bindendes Kontrastmittel

Microbubbles mit durch Lipopeptid-gekoppelten $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antikörper verwendet. Damit konnte der human-immunogene Aspekt umgangen werden.⁸⁸

Ein elementarer Vorteil der spezifisch bindenden Microbubbles gegenüber den bisher in der molekularen MRT zum Monitoring (anti-) angiogenetischer Effekte mit Integrin-Darstellung benutzten Kontrastmitteln liegt in deren Größe und physikalischen Eigenschaft. So verbleiben Microbubbles im Gefäßbett und unterliegen nicht dem EPR-Effekt, der bei MRT-Nanopartikeln auftreten kann.⁸⁹ Hier konnte jedoch vorliegende Arbeit zeigen, dass auch die USPIO-MRT ohne nachweisbaren EPR-Effekt möglich ist, wenn die spezifisch bindenden USPIO einen ausreichend großen Durchmesser besitzen.

Neben der Sonografie wird $\alpha_v\beta_3$ -Integrin seit mehreren Jahren präklinisch ebenfalls durch nicht invasive Fluoreszenzbildgebung (Optical Imaging, OI) diagnostisch nutzbar gemacht. Sun et al. konnten in einer Studie zeigen, dass OI mit fluoreszierenden Tracern, die spezifisch an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin oder VEGF binden, zum Monitoring einer antiangiogenetischen Therapie bei humanen Kolon-Karzinom-Xenografts in Mäusen möglich ist.⁹⁰ Dazu verwendeten sie unter anderem ein dimeres RGD-Peptid mit einer hohen Affinität zu $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, gebunden an ein fluoreszierendes Molekül, als Tracer (CF680R-3PRGD2), um HT-29-Kolon-Karzinom-Xenograft tragende Nacktmäuse während einer antiangiogenetischen Therapie mit Sunitinib zu untersuchen. Einer Kontrollkohorte wurde über den gleichen Zeitraum Dimethylsulfoxid (DMSO) intraperitoneal injiziert. HT-29 Tumorzellen exprimieren, analog zu unserer verwendeten Tumorzelllinie MDA-MB-231, nur geringfügig humanes $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.⁹¹ Die Tiere wurden, wie in vorliegendem Projekt, am Tag vor und an Tag sechs der Therapie bildgebend untersucht. Zuzüglich wurden sie auch an Tag zwei und vier der Therapie untersucht. Mit OI konnten Sun et al. bereits an Tag vier anhand des geringeren Tracer-Uptakes an den Tumoren der therapierten Tiere und daraus folgender reduzierter Fluoreszenz einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Ähnlich wie in vorliegender Studie zeigte sich eine morphologische Antwort der therapierten Tumore in Form eines reduzierten Wachstums erst ab Tag sechs, war jedoch auch nicht statistisch signifikant. Im Vergleich zu unserer Arbeit wurden zwar auch histologische Validierungsfärbungen zum Nachweis von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, Zellteilungsrate und Gefäßdichte (hamster-anti- β_3 , KI-67, CD31) der Tumoren durchgeführt, jedoch konnte nicht gezeigt werden, an welchen Zellen der Tracer gebunden war. Durch die im vorliegendem Projekt verwendete Berliner-Blau-/CD31-Doppelfärbung konnten wir die USPIO aufgrund ihres Eisengehaltes direkt nachweisen

und den Endothelzellen zuordnen. Zur Validierung der erhobenen OI-Daten führten Sun et al. eine Radio-Biodistributionsstudie durch, in der sie den $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-bindenden Teil ihres Tracers 3PRGD2 an ^{99m}Tc konjugierten und den Tieren an Tag sechs injizierten. Anschließend wurden die Tiere 1 h post injectionem eingeschlüpfert, Tumoren und Organe explantiert und mit einer Gamma-Kamera untersucht. Hierbei zeigte sich zum einen ein signifikant niedrigerer Tracer-Uptake in den therapierten Tumoren verglichen mit den Tumoren der Kontrolltiere. Zum anderen konnte man 1 h post injectionem einen sehr viel höheren Uptake an markiertem 3PRGD2 in Niere, Magen und vor allem Darm feststellen. Ein Effekt, der auch in der von Sun et al zitierten Studie von Liu et al zu erkennen ist.⁹¹ Wenn auch von Sun et al nicht gezeigt, weil die Tumorzellen in die rechte vordere Flanke injiziert wurden, könnte das zu einem sehr starken Hintergrund-Signal im Abdomen führen. Gerade unter dem Aspekt, dass es sich bei der verwendeten Tumorzelllinie um ein Kolonkarzinom handelte, könnte ein Therapie-Monitoring eines an pathophysiologischer Stelle befindlichen Tumors im Abdomen mit dieser Methode dadurch erschwert sein. Ähnlich der MRT gibt es mittlerweile OI-Tomographen, die eine dreidimensionale Akquisition ermöglichen und damit eine bessere Unterscheidung des fluoreszierenden Gewebes von hoher Hintergrund-Fluoreszenz erlauben.⁹² Es konnte gezeigt werden, dass durch die Biodistribution der USPIO nahezu kein signalbeeinflussendes Kontrastmittel während der MRT-Datenakquisition im Blut der Tiere zirkulierte. In der Studie von Sun et al wurde die Radio-Biodistributionsstudie auch zur Quantifizierung des Tracer-Uptakes durchgeführt, auch wenn mittlerweile eine semiquantitative Beurteilung eines Tracer-Uptakes im Tumor mit Hilfe eines OI-Tomographen möglich ist.⁹³

Aktuelle Studien beschreiben die Möglichkeit eines nuklearmedizinischen Monitorings durch $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Darstellung mit RGD-PET-Tracer. So zeigten Kazmierczak et al in einem Parallel-Projekt, dass es mit ^{68}Ga -TRAP-(RGD)₃ als Radio-Tracer möglich ist, frühe antiangiogenetische Effekte beim Mammakarzinom im Mausmodell mit Integrin als Surrogatparameter nachzuweisen.⁷⁸ In der Studie wurden Mammakarzinom-tragende Nacktmäuse vor und nach einwöchiger Therapie mit dem Angiogenesehemmer Bevacizumab mit PET auf ihren Integrin-Status hin untersucht. Auch hier konnte gezeigt werden, dass ein Therapieansprechen des Tumors durch die molekulare Bildgebung früher nachgewiesen werden konnte als durch die rein Morphologie-basierte. Da ^{68}Ga -TRAP-(RGD)₃ renal ausgeschieden wird, kann es, speziell bei Tumoren in der Nähe des Urogenitaltrakts, zu einem starken Hintergrundsignal während der PET kommen. Dabei handelt es sich um ein bekanntes Problem bei RGD-Radiotracer,⁹⁴ das dafür sorgen kann,

dass Tumoren falsch eingeschätzt oder gar übersehen werden können. Durch die Kombination der PET-Untersuchung mit einer im Anschluss durchgeführten CT (PET-CT) konnte die genaue morphologische Position des Tumors besser definiert und vom Hintergrundsignal abgegrenzt werden. Die USPIO-MRT hingegen bietet durch die molekulare Bildgebung einen zusätzlichen Informationsgewinn zur ohnehin schon sehr kontrastreichen, morphologischen Weichteildarstellung beim Mammakarzinom.⁹⁵ Auf Grund der höheren Ortsauflösung wirken sich die ebenfalls renal ausgeschiedenen USPIO nicht so sehr auf das Hintergrundsignal aus.

Dass die klinische Translation der molekularen Bildgebung mit Integrinen bei der PET-CT bereits am weitesten fortgeschritten ist, zeigen klinische Patientenstudien. Auch in diesen Studien konnte nichtinvasiv zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine Aussage zur therapeutischen Wirksamkeit einer antiangiogenetischen Therapie getroffen werden. So zeigten Yoon et al. in einer PET-CT-Studie mit ⁶⁸Ga-RGD sowie ¹⁸F-FDG, dass sich beide Tracer in Abhängigkeit der Expression von Östrogen-, Progesteron- und HER2-Neu-Rezeptoren ergänzen können. Während der ⁶⁸Ga-RGD-uptake positiv mit pathologischem HER2-Neu-Status korrelierte, zeigte sich die Aufnahme von ¹⁸F-FDG in Hormonrezeptor exprimierenden Tumoren negativ korrelierend.⁹⁶ In einer anderen Studie postulierten Iagaru et al., dass der Radionuklid-gebundene RGD-Tracer Fluorine 18 (18F)-2-fluoropropionyl-labeled PEGylated dimeric arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptide (PEG3- E[c{RGDyk}]2) (FPPRGD2) ein für den menschlichen Körper ungefährliches Radiopharmakon in der PET darstellt. Dafür überwachten sie die Vitalparameter der acht Studienpatienten und führten Laborkontrollen bis sieben Tage nach Untersuchung durch. Hierbei zeigten sich keine relevanten Veränderungen der Parameter nach Applikation des Tracers.⁹⁷ In beiden Projekten handelte es sich nicht wie in vorliegendem Projekt um Klone einer experimentellen Zelllinie in Versuchstieren, sondern um heterogene Wildtypen des Mammakarzinoms bei Menschen. Das ist ein wesentlicher Unterschied, da hier davon ausgegangen werden musste, dass die Tumorzellen in diesen Fällen ebenfalls $\alpha_v\beta_3$ -Integrin exprimierten.

Gründe für die fehlende klinische Translation der USPIO-MRT sind mitunter die Limitationen bezüglich des MRT-Kontrastmittels. Solange der EPR-Effekt und seine Auswirkungen auf die Physiologie des Organismus nicht genau untersucht und eine mögliche unspezifische Akkumulation von Eisen im Interstitium für unproblematisch erachtet wurde, ist es unwahrscheinlich, dass die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische MRT als Teil

einer klinischen MRT-Untersuchung zum Monitoring antiangiogenetischer Effekte einer Tumorthherapie eingesetzt wird.

5 Limitationen der Arbeit

Für die Interpretation dieser Studie müssen einige limitierende Punkte beachtet werden. Die Versuche wurden unter Laborbedingungen an einer menschlichen Mammakarzinom-Zelllinie durchgeführt, die nahezu kein $\alpha_v\beta_3$ -Integrin exprimiert. Damit konnte eine unerwünschte Bindung des Kontrastmittels an die Tumorzellen vermieden werden und somit das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische MR-Signal als Surrogat der Angiogenese interpretiert werden. Der sehr geringe quantitative Unterschied in den Messergebnissen hätte durch Hintergrundrauschen eventuell nicht mehr dargestellt werden können und eine Differenzierung zwischen antiangiogenetischem Effekt und Reduktion vitaler Tumorzellen wäre nicht möglich. In der klinischen Routine kann im Vorfeld nicht ausgeschlossen werden, dass Tumor- oder Stützzellen in neoplastischen Zellverbänden auch $\alpha_v\beta_3$ -Integrin exprimieren. Obwohl $\alpha_v\beta_3$ -Integrin während der Angiogenese auf Endothelzellen überexprimiert wird, wird es doch auch auf vielen anderen Zellen des Körpers, wie zum Beispiel im Darm oder in der Leber exprimiert. Durch eine zusätzliche Anlagerung von RGD-USPIO an diese Zellen oder an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-exprimierende Tumorzellen könnte aktuell der Erfolg einer antiangiogenetischen Therapie nur bedingt nachgewiesen werden, weil das Hintergrund-Signal das Signal aus den Tumorgefäßen in unbekanntem Maß überlagern würde. Damit ein solcher Effekt die Messergebnisse möglichst wenig beeinflusst muss die VOI um den Tumor genauestens eingezeichnet werden, was eine mögliche Fehlerquelle bei der interreader reproducibility birgt.

Des Weiteren wird $\alpha_v\beta_3$ -Integrin nicht nur während der Angiogenese exprimiert, sondern auch physiologisch ohne Stimulus durch VEGF, bzw. durch andere Stimuli, wie den basic fibroblast growth factor (bFGF) oder Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α).⁸ Somit könnte es zu einer falsch negativen Aussage bezüglich der Therapie kommen, wenn zum Zeitpunkt der VEGF-Inhibition ein anderer Stimulus dafür sorgt, dass es zu einer $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression kommt.

In diesem Projekt wurden nur zwei Messungen im Abstand von einer Woche vorgenommen. Wie bereits beschrieben, kann ein therapeutischer Effekt schon einige Tage früher detektiert werden. Mehrere Messungen in kürzeren Abständen könnten Aufschluss über den genaueren zeitlichen Verlauf der Integrin-Expression und des Tumorverhaltens bezüglich einer Anpassung unter Therapie zeigen.⁹⁸ Auch könnte ein Studiendesign mit einer mehr als einwöchigen Beobachtungsdauer im Hinblick auf Langzeitwirkung und Nebenwirkungen aufgrund akkumulierten Kontrastmittels genaueren Aufschluss geben.

Weiterhin fanden die immunhistochemischen Validierungsfärbungen nur zu einem Zeitpunkt am Ende des Versuchs statt. Damit konnten nur die MRT-Ergebnisse zum Zeitpunkt der Follow-up-Messung auf $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, Mikrogefäßdichte, Zellproliferation und Apoptose überprüft werden. So war es in dieser Studie nicht möglich, einen Tumorstatus immunhistochemisch bereits vor der Therapie zu erheben, beziehungsweise die Baseline-Messung zu validieren. Auch konnte keine immunhistochemische Korrelation während der einwöchigen Therapie entnommen werden, um den Verlauf einer Therapie zu dokumentieren, da es bei einer vorzeitigen Explantation des Tumors zu keiner Follow-up-Messung hätte kommen können.

Des Weiteren ist ungewiss, ob während einer Narkose über 30 Minuten die verwendete Wärmeeinheit die Körperkerntemperatur der Tiere im MRT stabil hielt. Da der Effekt einer Temperaturänderung bei diesen geringen Messwertunterschieden durchaus relevant sein dürfte, könnte mit einer Temperaturmessung der Tiere vor und nach Untersuchung im MRT ein Ausgleichsfaktor bestimmt werden, um den entstandenen Fehler zu korrigieren.

6 Zusammenfassung

Um herauszufinden ob die endotheliale Bindung von RGD-USPIO in experimentellen Mammakarzinom-Xenografts nach einer einwöchigen Monotherapie mit dem VEGF-Rezeptorantagonisten Bevacizumab als Korrelat der reduzierten $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression signifikant abnimmt, wurden in dieser Arbeit n=20 Mäuse mit humanen Mammakarzinom-Xenografts vor und nach einer einwöchigen Therapie mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab mit RGD-USPIO-MRT untersucht und die Kontrastmittelbindung mit MR-Relaxometrie quantifiziert. Kern dieser Arbeit waren die ermittelten R2-Werte, mit denen eine Aussage über den Rezeptorstatus von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an Endothelzellen im Tumorgewebe getroffen werden sollte. Die in die Milchleiste implantierten Tumoren wurden mit einer eisenoxidhaltigen Nanopartikel-Emulsion als Kontrastmittel untersucht. Die RGD-Domäne des Kontrastmittels gewährleistete eine spezifische Bindung an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin.

Nach einer ersten MRT-Untersuchung der Tiere erfolgte eine einwöchige Behandlung mit dem anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab. Parallel dazu wurde eine Kontrollgruppe mit äquivalenter Menge eines Placebos behandelt. Im Anschluss daran wurden die Tiere erneut mit dem gleichen MR-Protokoll untersucht. Nach Versuchsende wurden die Tumoren explantiert und immunhistochemisch multiparametrisch aufbereitet ($\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, CD31-Mikrogefäßdichte, Ki-67-Zellproliferation, TUNEL-Apoptoserate), um die MRT-Parameter als Imaging Biomarker der Therapieresponse zu validieren.

Es konnte gezeigt werden, dass ein früher antiangiogenetischer Therapieeffekt anhand der reduzierten Rezeptordichte von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe mit MR-Relaxometrie semiquantitativ nachgewiesen werden kann. Aufgrund der spezifischen Bindung des Kontrastmittels konnte somit der therapeutische Effekt durch die Differenz der Relaxationswerte nicht nur qualitativ, sondern auch semiquantitativ beschrieben werden.

Eine fehlende Korrelation der Relaxationswerte mit den ebenfalls ermittelten Tumolvolumina lässt schlussfolgern, dass die funktionelle Bildgebung von Biomarkern ergänzend zum etablierten Morphologie-basierten MR-Monitoring während einer antineoplastischen Therapie verwendet werden kann. Als nicht invasives Untersuchungsverfahren könnte es somit eine Möglichkeit bieten, zelluläre und pathophysiologische Prozesse in Tumoren in vivo und ohne Biopsie zu eruieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland. *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 10. Ausg. Berlin; 2015. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
2. Beckmann MW, Niederacher D, Schnürch HG, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 1997;75(6):429–439.
3. Kreienberg R. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. 1. Aktualisierung 2008. Germering/München: Zuckschwerdt; 2008.
4. Heine H. *Lehrbuch der biologischen Medizin. Grundregulation und extrazelluläre Matrix 28 Tabellen*: Hippokrates-Verlag; 2007.
5. Evans EA, Calderwood DA. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science (New York, N.Y.)*. 2007;316(5828):1148–1153.
6. Horton MA. The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1997;29(5):721–725.
7. Schwartz MA, Denninghoff K. Alpha v integrins mediate the rise in intracellular calcium in endothelial cells on fibronectin even though they play a minor role in adhesion. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(15):11133–11137.
8. Brooks P, Clark R, Cheresh D. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*. 1994;264(5158):569–571.
9. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science (New York, N.Y.)*. 1995;270(5241):1500–1502.
10. Inukai T, Inoue A, Kurosawa H, et al. SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Molecular cell*. 1999;4(3):343–352.
11. Desgrosellier JS, Lesperance J, Seguin L, et al. Integrin alphavbeta3 drives slug activation and stemness in the pregnant and neoplastic mammary gland. *Developmental cell*. 2014;30(3):295–308.

12. Seguin L, Desgrosellier JS, Weis SM, Cheresh DA. Integrins and cancer: regulators of cancer stemness, metastasis, and drug resistance. *Trends in cell biology*. 2015;25(4):234–240.
13. Rankin EB, Giaccia AJ. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell death and differentiation*. 2008;15(4):678–685.
14. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *BioMed research international*. 2015;2015:549412.
15. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):4–25.
16. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 1971;133(2):275–288.
17. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249–257.
18. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(46):30336–30343.
19. Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669–676.
20. Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(12):6729–6733.
21. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*. 1999;18(13):2221–2230.
22. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 1995;376(6535):62–66.
23. Thomas KA. Vascular Endothelial Growth Factor, a Potent and Selective Angiogenic Agent. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(2):603–606.

24. Calderwood DA. Integrin activation. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 5):657–666.
25. Hynes RO, Bader BL. Targeted mutations in integrins and their ligands: their implications for vascular biology. *Thrombosis and haemostasis*. 1997;78(1):83–87.
26. Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(9):1227–1230.
27. Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, et al. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Molecular cell*. 2000;6(4):851–860.
28. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;350(23):2335–2342.
29. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2006;355(24):2542–2550.
30. Gray R, Bhattacharya S, Bowden C, Miller K, Comis RL. Independent review of E2100: a phase III trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(30):4966–4972.
31. Hsu JY, Wakelee HA. Monoclonal antibodies targeting vascular endothelial growth factor: current status and future challenges in cancer therapy. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 2009;23(5):289–304.
32. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. S3 Leitlinie Kolorektales Karzinom. http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Kolorektales_Karzinom/Version_2.0/LL_KRK_Langversion_2.0.pdf.
33. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-099l_S2k_Gliome__2015-06.pdf.

34. Goeckenjan G, Sitter H, Thomas M, et al. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*. 2010;64 Suppl 2:e1-164.
35. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;357(26):2666–2676.
36. Roland CL, Dineen SP, Lynn KD, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8(7):1761–1771.
37. Rylova SN, Barnucz E, Fani M, et al. Does imaging alphavbeta3 integrin expression with PET detect changes in angiogenesis during bevacizumab therapy? *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2014;55(11):1878–1884.
38. Winter PM, Caruthers SD, Kassner A, et al. Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(nu)beta3-targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. *Cancer research*. 2003;63(18):5838–5843.
39. Moghanaki D, Turkbey B, Vapiwala N, et al. Advances in Prostate Cancer Magnetic Resonance Imaging and Positron Emission Tomography-Computed Tomography for Staging and Radiotherapy Treatment Planning. *Seminars in radiation oncology*. 2017;27(1):21–33.
40. Rabie E, Faeghi F, Izadpanahi M-H, Dayani M-A. Role of Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Staging of Bladder Cancer. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2016;10(4):TC01-5.
41. Hunter C, Blake H, Jeyadevan N, et al. Local staging and assessment of colon cancer with 1.5-T magnetic resonance imaging. *The British journal of radiology*. 2016:20160257.
42. Engelbrecht MR, Jager GJ, Laheij RJ, Verbeek ALM, van Lier HJ, Barentsz JO. Local staging of prostate cancer using magnetic resonance imaging. A meta-analysis. *European radiology*. 2002;12(9):2294–2302.
43. Felton C, Karmakar A, Gartia Y, Ramidi P, Biris AS, Ghosh A. Magnetic nanoparticles as contrast agents in biomedical imaging. Recent advances in iron-

- and manganese-based magnetic nanoparticles. *Drug metabolism reviews*. 2014;46(2):142–154.
44. Sipkins DA, Cheresch DA, Kazemi MR, Nevin LM, Bednarski MD, Li KC. Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphaVbeta3-targeted magnetic resonance imaging. *Nature medicine*. 1998;4(5):623–626.
 45. Kim Y-S, Zhou Y, Bryant H, JR, et al. Synthesis and characterization of gadolinium-Peptidomimetic complex as an alphavbeta3 integrin targeted MR contrast agent. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2015;25(10):2056–2059.
 46. Zhang C, Jugold M, Woenne EC, et al. Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer research*. 2007;67(4):1555–1562.
 47. Jung H, Park B, Lee C, et al. Dual MRI T1 and T2(*) contrast with size-controlled iron oxide nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2014;10(8):1679–1689.
 48. Carvalho A, Martins MBF, Corvo ML, Feio G. Enhanced contrast efficiency in MRI by PEGylated magnetoliposomes loaded with PEGylated SPION. Effect of SPION coating and micro-environment. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2014;43:521–526.
 49. Zhang C, Liu H, Cui Y, et al. Molecular magnetic resonance imaging of activated hepatic stellate cells with ultrasmall superparamagnetic iron oxide targeting integrin alphavbeta(3) for staging liver fibrosis in rat model. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:1097–1108.
 50. Cui Y, Zhang C, Luo R, et al. Noninvasive monitoring of early antiangiogenic therapy response in human nasopharyngeal carcinoma xenograft model using MRI with RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:5671–5682.
 51. Kiessling F, Huppert J, Zhang C, et al. RGD-labeled USPIO inhibits adhesion and endocytotic activity of alpha v beta3-integrin-expressing glioma cells and only accumulates in the vascular tumor compartment. *Radiology*. 2009;253(2):462–469.
 52. Zhang F, Huang X, Zhu L, et al. Noninvasive monitoring of orthotopic glioblastoma therapy response using RGD-conjugated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2012;33(21):5414–5422.

53. Council NR, Research IfLA. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 8th ed; 2011.
54. Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast disease*. 2010;32(1-2):35–48.
55. Taherian A, Li X, Liu Y, Haas TA. Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. *BMC cancer*. 2011;11:293.
56. Riedel E, Janiak C. *Anorganische Chemie*. 5. Aufl. Berlin [u.a.]: De Gruyter; 2002.
57. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B. *Wie funktioniert MRI? Eine Einführung in Physik und Funktionsweise der Magnetresonanzbildgebung mit 8 Tabellen*. 4. Aufl. Berlin: Springer; 2003.
58. Grover VPB, Tognarelli JM, Crossey MME, Cox IJ, Taylor-Robinson SD, McPhail MJW. Magnetic Resonance Imaging. Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *Journal of clinical and experimental hepatology*. 2015;5(3):246–255.
59. Schonngel BP, Fischer R, Nielsen P, Grosse R, Adam G, Yamamura J. Eisenquantifizierung mittels MRT bei Eisenüberladung. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin*. 2013;185(7):621–627.
60. Brittenham GM, Badman DG. Noninvasive measurement of iron: report of an NIDDK workshop. *Blood*. 2003;101(1):15–19.
61. Rad AM, Arbab AS, Iskander ASM, Jiang Q, Soltanian-Zadeh H. Quantification of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled cells using MRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2007;26.
62. Shen Y, Goerner FL, Snyder C, et al. T1 relaxivities of gadolinium-based magnetic resonance contrast agents in human whole blood at 1.5, 3, and 7 T. *Investigative radiology*. 2015;50(5):330–338.
63. Kiessling F, Mertens ME, Grimm J, Lammers T. Nanoparticles for imaging: top or flop? *Radiology*. 2014;273(1):10–28.
64. Wu J, Akaike T, Maeda H. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer research*. 1998;58(1):159–165.

65. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug discovery today*. 2006;11(17-18):812–818.
66. Sourbron S, Ingrisch M, Siefert A, Reiser M, Herrmann K. Quantification of cerebral blood flow, cerebral blood volume, and blood-brain-barrier leakage with DCE-MRI. *Magnetic resonance in medicine*. 2009;62(1):205–217.
67. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *Journal of cell science*. 2013;126(Pt 11):2343–2352.
68. Privratsky JR, Newman PJ. PECAM-1. Regulator of endothelial junctional integrity. *Cell and tissue research*. 2014;355(3):607–619.
69. DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *The American journal of pathology*. 1997;151(3):671–677.
70. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*. 2000;182(3):311–322.
71. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of cell biology*. 1992;119(3):493–501.
72. Kazmierczak PM, Schneider M, Habereeder T, et al. $\alpha v \beta 3$ -Integrin-Targeted Magnetic Resonance Imaging for the Assessment of Early Antiangiogenic Therapy Effects in Orthotopic Breast Cancer Xenografts. *Investigative radiology*. 2016;51(11):746–755.
73. Veenendaal LM, Jin H, Ran S, et al. In vitro and in vivo studies of a VEGF121/rGelolin chimeric fusion toxin targeting the neovasculature of solid tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(12):7866–7871.
74. Abdollahi A, Hahnfeldt P, Maercker C, et al. Endostatin's Antiangiogenic Signaling Network. *Molecular cell*. 2004;13(5):649–663.
75. Ewringmann A, Glöckner B. *Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus. Diagnostischer Leitfaden und Therapie*. 2., überarb. Aufl. Stuttgart: Enke; 2014. Kleintier konkret Praxisbuch.

76. Baron P, Deckers R, Knuttel FM, Bartels LW. T1 and T2 temperature dependence of female human breast adipose tissue at 1.5 T. Groundwork for monitoring thermal therapies in the breast. *NMR in Biomedicine*. 2015;28.
77. Parmala M, Eriksson M, Rytioja M, Tanttu J, Köhler M. Temperature measurement in human fat with T2 imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2016;43.
78. Kazmierczak PM, Todica A, Gildehaus F-J, et al. ⁶⁸Ga-TRAP-(RGD)₃ Hybrid Imaging for the In Vivo Monitoring of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin Expression as Biomarker of Anti-Angiogenic Therapy Effects in Experimental Breast Cancer. *PLOS ONE*. 2016;11(12):e0168248.
<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0168248&type=printable>.
79. Gerber H-P, Wu X, Yu L, et al. Mice expressing a humanized form of VEGF-A may provide insights into the safety and efficacy of anti-VEGF antibodies. *PNAS*. 2007;104(9):3478–3483. <http://www.pnas.org/content/104/9/3478.full>.
80. Morgan RA. Human tumor xenografts. The good, the bad, and the ugly. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2012;20(5):882–884.
81. Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnürch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993;72(6):835–846.
<http://www.cell.com/article/0092867493905739/fulltext>.
82. Liang W-C, Wu X, Peale FV, et al. Cross-species Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-blocking Antibodies Completely Inhibit the Growth of Human Tumor Xenografts and Measure the Contribution of Stromal VEGF. *J. Biol. Chem*. 2006;281(2):951–961. <http://www.jbc.org/content/281/2/951.full>.
83. Sági J, Kovács L, Drexler DA, Kocsis P, Gajári D, Sági Z. Tumor Volume Estimation and Quasi-Continuous Administration for Most Effective Bevacizumab Therapy. *PLOS ONE*. 2015;10(11):e0142190.
<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0142190&type=printable>.
84. Ellegala DB, Leong-Poi H, Carpenter JE, et al. Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to $\alpha\text{(v)}\beta\text{3}$. *Circulation*. 2003;108(3):336–341.

85. Yuan H-X, Wang W-P, Wen J-X, et al. Dual-Targeted Microbubbles Specific to Integrin $\alpha V\beta 3$ and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 for Ultrasonography Evaluation of Tumor Angiogenesis. *Ultrasound in medicine & biology*. 2018;44(7):1460–1467.
86. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1981;29(4):577–580.
87. Petronzelli F, Pelliccia A, Anastasi AM, et al. Therapeutic use of avidin is not hampered by antiavidin antibodies in humans. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2010;25(5):563–570.
88. Yan F, Xu X, Chen Y, et al. A Lipopeptide-Based $\alpha v\beta_3$ Integrin-Targeted Ultrasound Contrast Agent for Molecular Imaging of Tumor Angiogenesis. *Ultrasound in medicine & biology*. 2015;41(10):2765–2773.
89. Kiessling F, Huppert J, Palmowski M. Functional and Molecular Ultrasound Imaging. Concepts and Contrast Agents. *CMC*. 2009;16(5):627–642.
90. Sun X, Ma T, Liu H, et al. Longitudinal monitoring of tumor antiangiogenic therapy with near-infrared fluorophore-labeled agents targeted to integrin $\alpha v\beta_3$ and vascular endothelial growth factor. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2014;41(7):1428–1439.
91. Liu Z, Jia B, Shi J, et al. Tumor uptake of the RGD dimeric probe (99m)Tc-G3-2P4-RGD2 is correlated with integrin $\alpha v\beta_3$ expressed on both tumor cells and neovasculature. *Bioconjugate chemistry*. 2010;21(3):548–555.
92. Lloyd-Lewis B, Davis FM, Harris OB, et al. Imaging the mammary gland and mammary tumours in 3D. Optical tissue clearing and immunofluorescence methods. *Breast cancer research : BCR*. 2016;18(1):127.
93. Wallbrunn A von, Höltke C, Zühlendorf M, Heindel W, Schäfers M, Bremer C. In vivo imaging of integrin alpha v beta 3 expression using fluorescence-mediated tomography. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2007;34(5):745–754.
94. Chen H, Niu G, Wu H, Chen X. Clinical Application of Radiolabeled RGD Peptides for PET Imaging of Integrin $\alpha v\beta_3$. *Theranostics*. 2016;6(1):78–92.

95. Runge VM. Current technological advances in magnetic resonance with critical impact for clinical diagnosis and therapy. *Investigative radiology*. 2013;48(12):869–877.
96. Yoon H-J, Kang KW, Chun IK, et al. Correlation of breast cancer subtypes, based on estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2, with functional imaging parameters from (6)(8)Ga-RGD PET/CT and (1)(8)F-FDG PET/CT. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2014;41(8):1534–1543.
97. Iagaru A, Mosci C, Shen B, et al. (18)F-FPPRGD2 PET/CT: pilot phase evaluation of breast cancer patients. *Radiology*. 2014;273(2):549–559.
98. Chen W-T, Shih TTF, Chen R-C, Tu S-Y, Hsieh W-Y, Yang P-C. Integrin alphavbeta3-targeted dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging using a gadolinium-loaded polyethylene glycol-dendrimer-cyclic RGD conjugate to evaluate tumor angiogenesis and to assess early antiangiogenic treatment response in a mouse xenograft tumor model. *Molecular imaging*. 2012;11(4):286–300.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsablauf	13
Abbildung 2: Verhalten von Spins im Magnetfeld	15
Abbildung 3: Transversale Relaxation	16
Abbildung 4: T2-Signalverlust	18
Abbildung 5: In vitro R2-Relaxivität des verwendeten Kontrastmittels	20
Abbildung 6: Messabfolge der Baseline- und Follow-up-Untersuchung	21
Abbildung 7: Eigens hergestellter Schwanzvenen-Katheter	22
Abbildung 8: $\Delta R2$ der Therapie- und Kontrollgruppe	33
Abbildung 9: Farbkodierte map eines Kontrolltieres	34
Abbildung 10: Farbkodierte map eines Therapietieres	35
Abbildung 11: Tumorumfänge der Therapie- und Kontrollgruppe	37
Abbildung 12: Korrelation der T2-Zeiten und Tumorumfänge	37
Abbildung 13: Boxplot zur Ausprägung $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiver Gefäße	39
Abbildung 14: Ausschnitt eines Gesichtsfeldes mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Färbung	40
Abbildung 15: Boxplot zur Ausprägung CD31 positiver Gefäße	41
Abbildung 16: Ausschnitt eines Gesichtsfeldes mit CD31-Färbung	41
Abbildung 17: Boxplot zur Ausprägung KI-67 positiver Zellen	42
Abbildung 18: Ausschnitt eines Gesichtsfeldes mit KI-67-Färbung	43
Abbildung 19: Boxplot zur Ausprägung TUNEL positiver Zellen	44
Abbildung 20: Ausschnitt eines Gesichtsfeldes mit TUNEL-Färbung	44
Abbildung 21: Darstellung der fluoreszierenden $\alpha_v\beta_3$ -Integrin- Färbung	45
Abbildung 22: Gefäßanschnittes mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31- Doppelfärbung	46

Die Abbildungen 5, 9, 10, 11, 21 und 22 wurden bereits so oder ähnlich in *Kazmierczak PM, Schneider M, Habereder T, Hirner-Eppeneder H, Eschbach RS, Moser M, Reiser MF, Lauber K, Nikolaou K, Cyran CC. $\alpha\beta 3$ -Integrin-Targeted MRI for the Assessment of Early Anti-Angiogenic Therapy Effects in Orthotopic Breast Cancer Xenografts. Invest Radiol 2016* publiziert.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ΔR_2 in Therapie- und Kontrollgruppe vor und nach Behandlung	32
Tabelle 2: Änderung der Tumervolumina der Therapie- und Kontrollgruppe vor und nach Behandlung	36
Tabelle 3: T2-Zeiten und ΔR_2 des Validierungsversuchs der T2-Konstanz	38
Tabelle 4: ΔR_2 der Versuchsreihe mit unspezifischen USPIO	38

10 Publikation

Teile dieser Arbeit wurden bereits von mir und folgender Arbeitsgruppe publiziert:

Kazmierczak PM, Schneider M, Habereeder T, Hirner-Eppeneder H, Eschbach RS, Moser M, Reiser MF, Lauber K, Nikolaou K, Cyran CC. $\alpha\beta 3$ -Integrin-Targeted MRI for the Assessment of Early Anti-Angiogenic Therapy Effects in Orthotopic Breast Cancer Xenografts. Invest Radiol 2016

11 Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian F. Reiser für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit am Institut für Klinische Radiologie am Klinikum der Universität München durchführen zu können.

In gleichem Maße möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Clemens Cyran danken, der mir mit der Bereitstellung des Themas diese Dissertation ermöglicht hat.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. Philipp Kazmierczak für seine intensive Betreuung während der Datenakquisition und auch darüber hinaus. Es war gut zu wissen, ein offenes Ohr und eine schnelle Korrespondenz sowohl für praktische als auch schriftliche Belange zu haben.

Ebenso möchte ich Herrn Moritz Schneider danken, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand, wann immer es um technischen Support und Problemlösungen am MRT ging. Auch für die anschließende Datenauswertung war seine Expertise von höchstem Wert.

Gleichermaßen wichtig für dieses Projekt war die immunhistochemische Bearbeitung, die komplett von Frau Dr. biol. hum. Heidrun Hirner-Eppeneder erledigt wurde, wofür ich ihr hier danken will.

Ein großes Dankeschön auch an Herrn Matthias Moser, der mir mit Pizza und Getränken viele durchgearbeitete Nächte erleichtert hat.

In ganz besonderer Weise möchte ich meiner Freundin Sonja für ihre stetige moralische Unterstützung und auch ihre große Geduld danken. Weiterhin danke ich ihr und auch ihrer Mutter Eva für das kritische, akkurate Korrekturlesen dieser Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Habereeder, Thomas

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

„Magnetresonanztomografie mit $\alpha\beta 3$ -Integrin-spezifischen USPION zum Monitoring früher antiangiogenetischer Therapieeffekte im orthotopen Mammakarzinom-Modell der Maus“

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.

München, den 04.01.2019

Thomas Habereeder