

Aus der Klinik und Poliklinik für Radiologie

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Jens Ricke

**$^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT zum in vivo-Monitoring der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Biomarker früher anti-angiogenetischer Therapieeffekte im experimentellen Mammakarzinom-Modell**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Magdalena Hellmann

aus Peine

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Clemens Cyran

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Sibylle Ziegler  
PD Dr. Christopher Übleis

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Philipp Kazmierczak

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2023

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
1 Einleitung .....	1
1.1 Das humane Mammakarzinom.....	1
1.1.1 Monitoring des Therapieansprechens .....	2
1.2 Das Transmembranprotein Integrin .....	4
1.3 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Bildgebung .....	6
1.4 Fragestellung .....	7
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Überblick .....	9
2.2 Tumormodell .....	11
2.3 Narkose.....	13
2.4 Der Angiogenesehemmer Bevacizumab .....	14
2.5 PET/CT .....	17
2.6 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin spezifische Tracer.....	21
2.7 Punktion der Schwanzvene .....	23
2.8 Durchführung der PET/CT .....	24
2.9 Analyse der PET/CT-Datensätze.....	25
2.10 Euthanasie und Tumorexplantation .....	27
2.11 Immunhistochemie .....	28
2.11.1 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression.....	29
2.11.2 Zellproliferation (Ki-67) .....	29
2.11.3 Gefäßdichte (CD31) .....	30
2.11.4 Apoptose (TUNEL) .....	31
2.11.5 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31-Doppelfärbung .....	31

2.11.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen .....	32
2.12 Validierung der Bindungsspezifität von $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD) <sub>3</sub> in MDA-MB-231-Xenografts mit Autoradiographie und Immunfluoreszenz .....	32
2.13 Statistik .....	34
3 Ergebnisse .....	36
3.1 $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD) <sub>3</sub> -PET/CT.....	36
3.2 Tumorvolumen .....	39
3.3 Immunhistochemie .....	41
3.3.1 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin .....	42
3.3.2 Mikrogefäßdichte.....	44
3.3.3 Zellproliferation.....	47
3.3.4 Apoptose.....	49
3.3.5 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31-Doppelfärbung .....	51
3.3.6 Autoradiographie.....	52
4 Diskussion.....	55
4.1 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Radiotracer zum Monitoring früher anti-angiogenetischer Therapieeffekte.....	55
4.2 Bevacizumab als Angiogenesehemmer.....	59
4.3 PET/CT im Vergleich zur MRT .....	61
4.4 Immunhistochemische Validierungsversuche .....	62
4.5 Ausblick.....	63
5 Limitationen.....	65
5.1 Zelllinie.....	65
5.2 Messzeitpunkte .....	65
5.3 Immunhistochemische Validierungsversuche .....	66
5.4 Spillover-Effekt der Blase .....	67
6 Schlussfolgerung.....	68

7	Zusammenfassung.....	69
8	Literaturverzeichnis .....	71
9	Publikationen.....	81
10	Anhang.....	82
10.1	Danksagung.....	82
10.2	Eidestattliche Versicherung .....	83

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Randomisierte Einteilung. ....	9
Abb. 2: Zeitstrahl zum Studienverlauf in der PET/CT-Kohorte .....	10
Abb. 3: Zeitstrahl zum Versuchsablauf .....	11
Abb. 4: Installationen zur Isofluran-Narkose .....	14
Abb. 5: Bevacizumab als Angiogeneseinhibitor .....	16
Abb. 6: Vergleich des Metabolierungsweges von $^{18}\text{F}$ -FDG und Glucose .....	18
Abb. 7: Schematische Darstellung des $\beta^+$ -Zerfalls bei der PET .....	19
Abb. 8: Struktur von TRAP .....	21
Abb. 9: Struktur von TRAP-(RGD) <sub>3</sub> .....	23
Abb. 10: Katheter zur Tracerinjektion .....	24
Abb. 11: VOI-Selektion. ....	27
Abb. 12: $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD) <sub>3</sub> -PET/CT-Bilder .....	36
Abb. 13: Boxplot-Diagramm zur TBR in der Baseline- und Follow-Up-Messung .....	38
Abb. 14: Tumorvolumen in Therapie- und Kontrollgruppe an Tag 0 und Tag 7 .....	41
Abb. 15: Boxplot-Diagramm zum Vergleich der durchschnittlichen $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression zwischen Therapie- und Kontrollkohorte.....	43
Abb. 16: $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der Therapie- und Kontrollgruppe .....	44
Abb. 17: Boxplot-Diagramm zum Vergleich von CD31 in Therapie- und Kontrollgruppe .....	46
Abb. 18: CD31-Färbungen in Therapie- und Kontrollgruppe .....	46
Abb. 19: Boxplot-Diagramm zur Analyse Ki-67 positiv gefärbter Zellen .....	48
Abb. 20: Färbung Ki-67 positiver Zellen.....	48
Abb. 21: Boxplot-Diagramm zum Vergleich apoptotischer Zellen in Therapie- und Kontrollgruppe.....	50
Abb. 22: Fluoreszierende TUNEL-Färbung.....	50
Abb. 23: Fluoreszierende $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31 Doppelfärbung .....	51
Abb. 24: Validierung der Bindungsspezifität von $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD) <sub>3</sub> an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin durch Autoradiographie und Immunfluoreszenz. ....	53

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 TBR und $\Delta$ TBR.....	37
Tabelle 2 Tumorvolumen in der Baseline- und Follow-Up-Untersuchung und $\Delta$ Volumen .....	40
Tabelle 3 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der Therapie und Kontrollkohorte .....	42
Tabelle 4 CD31-positiv gefärbte Endothelzellen in Therapie- und Kontrollgruppe.....	45
Tabelle 5 Ki-67 positiv gefärbte Zellen pro Tier.....	47
Tabelle 6 Apoptose in Therapie und Kontrollgruppe .....	49
Tabelle 7 Quantitative Analyse der Autoradiographie Blockierungsversuche.....	54

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Mammakarzinom

Die häufigste maligne Erkrankung der Frau ist das Mammakarzinom. In Deutschland ist diese Erkrankung für rund ein Viertel der tumorbedingten Todesfälle der Frau verantwortlich (1). Damit hat die Untersuchung des Mammakarzinoms sowie die Optimierung der Therapie und des Therapiemonitorings heutzutage eine unumstrittene Relevanz.

Zur Diagnostik des Mammakarzinoms bei klinischem Verdacht sowie zur Früherkennung im Rahmen eines Screenings bei Frauen ab 50 Jahren wird neben einer klinischen Untersuchung und Sonographie der Brust eine Mammographie durchgeführt. Erhärtet sich der Verdacht auf ein Mammakarzinom in dieser Untersuchung wird eine Stanzbiopsie, Vakuumbiopsie oder Exzisionsbiopsie zur Sicherung der Verdachtsdiagnose durchgeführt. Das entnommene Gewebe wird histologisch auf maligne Zellen sowie bei Vorliegen eines Karzinoms auf Tumortyp, Hormonrezeptorstatus und HER2-Rezeptoren untersucht. Eine nicht-invasive Bildgebung zur Bestätigung der Verdachtsdiagnose ersetzt nicht die histologische Verifizierung durch die invasive Biopsie. Nach Sicherung der Diagnose erfolgt bei Verdacht auf Metastasierung zum Staging eine Computertomographie des Thorax und des Abdomens sowie eine Skelettszintigraphie. Die Therapie erfolgt stadiengerecht und entsprechend der histologischen Klassifikation durch systemische Therapie, operative Therapie und Strahlentherapie (2).

### **1.1.1 Monitoring des Therapieansprechens**

Zum Monitoring des lokalen Therapieansprechens werden vor allem bildgebende Verfahren wie die Mammographie und die Sonographie der Brust durchgeführt. Eine Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgt ergänzend bei schwer zu beurteilenden Befunden oder Hochrisikopatienten (2).

Nach Therapiebeginn erhalten die Patienten vierteljährlich eine Re-Evaluation der Therapie, später nur noch halbjährlich und jährlich (3). Zu Beginn der Therapie hängen die Abstände der Bildgebung von der gewählten Therapie und der Größe der Tumoren sowie der individuellen Prognose ab. Durch die Bildgebungsverfahren können die Morphologie des Tumors, eine Volumenänderung im Verlauf der Therapie und die Entstehung möglicher Rezidive überwacht werden.

Von einer quantifizierbaren Größenabnahme der Tumoren unter neoadjuvanter Therapie kann erst nach mehreren Wochen ausgegangen werden (4). Klinisch werden sowohl Mammographie als auch Ultraschall oder Magnetresonanztomographie zur Beurteilung des Therapieansprechens genutzt. Die Magnetresonanztomographie ist die sensitivste Methode der morphologischen Bildgebungsmodalitäten zur Überprüfung des Therapieansprechens (4). Eine weitere Kontrolle des Therapieansprechens kann über invasive Biopsien des Tumorgewebes stattfinden. Im entnommenen Tumorgewebe werden dabei immunhistochemische Parameter, beispielsweise zur Zellproliferation, untersucht (5).

Es gibt keine einheitlichen Vorgaben, wann die erste Bildgebung zur Beurteilung des Therapieansprechens nach Beginn einer systemischen Therapie bei metastasiertem Mammakarzinom stattfinden soll (6). Entsprechend der S3-Leitlinie soll eine Therapieevaluation alle 6-12 Wochen erfolgen (2). Bei anhaltender Remission können die bildgebenden Intervalle verlängert werden.

In vielen klinischen Studien werden die response evaluation criteria in solid tumors (RECIST)- Kriterien aktuell als Referenz zum Monitoring des Therapieansprechens solider Tumoren verwendet. Die RECIST-Kriterien sollen durch eine rein morphologische Beurteilung von Zielläsionen während und nach einer Therapie eine Unterteilung des Therapieansprechens in progressive disease, partial remission, complete remission und stable disease ermöglichen. Hierzu wird die Größenänderung der Zielläsion im Verlauf untersucht. Eine Beurteilung der Tumoren auf funktioneller oder molekularer Ebene erfolgt durch RECIST nicht (7). Die Hybridbildgebung als diagnostische Methode hat in der onkologischen Therapiesteuerung auf Grund der im Vergleich zum konventionellen Staging sehr hohen diagnostischen Genauigkeit einen zunehmenden Stellenwert. Bei dieser Untersuchungsmethode werden mehrere Bildgebungsverfahren komplementär kombiniert. Beispiele für Hybridbildgebung sind die Kombinationen aus Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Computertomographie (CT), Sonographie und MRT sowie PET und MRT (8). Vorteil dieser Verfahren ist, dass sie in vivo und nicht-invasiv die Charakterisierung der Tumormanifestationen auf morphologischer, funktioneller und molekularer Ebene ermöglichen (9). In einer Metaanalyse zum Vergleich der <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT mit der ausschließlichen CT- oder PET-Untersuchung wurde festgestellt, dass durch die Hybridbildgebung eine genauere Diagnostik verschiedener maligner Erkrankungen möglich war (10). Vogens et al. untersuchten zwischen 2017 und 2019 in einer prospektiven Studie die klinischen Auswirkungen von FDG-PET/CT auf das Staging und die Behandlung von Hochrisiko-Brustkrebspatienten. Durch die FDG-PET/CT konnten mit hoher Sensitivität und Spezifität Fernmetastasen detektiert werden. Zudem wurde durch die FDG-PET/CT die Therapie unter anderem durch Verzicht auf Brustoperationen und umfassendere Strahlentherapie beeinflusst (11). Eine retrospektive Studie von Tatsumi et al. mit 75 an Brustkrebs erkrankten Patienten

zeigte, dass mit  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT in mehr als der Hälfte der Fälle eine genauere Lokalisation und Charakterisierung von Läsionen möglich war (12).  $^{18}\text{F}$ -Fluorodesoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) ist der zuerst etablierte und in der onkologischen Bildgebung mit PET/CT am häufigsten genutzte Tracer (13). Das mit  $^{18}\text{F}$  radioaktiv markierte Glucoseanalogon FDG wird über Glucosetransporter in die Zellen aufgenommen. Intrazellulär dient  $^{18}\text{F}$ -FDG analog zu Glucose als Substrat des Enzyms Hexokinase. Der weitere Metabolismus unterscheidet sich. Der Radiotracer kann nicht weiter verstoffwechselt werden und reichert sich in Geweben mit hohem Glucosestoffwechsel an. Gewebe mit hohem Glucosestoffwechsel, z.B. Tumorzellen, können so detektiert werden (14). Durch die steigende Relevanz der PET/CT in der Krebsdiagnostik wurde intensiv an der Entwicklung neuer Radiotracer geforscht. Verschiedene nicht auf FDG basierende Radiotracer wurden entwickelt, die in Studien eine noch höhere Sensitivität, Spezifität und diagnostische Genauigkeit aufwiesen (15, 16).

## 1.2 Das Transmembranprotein Integrin

Integrine sind eine Gruppe von heterodimeren Transmembranproteinen, die auf allen Zellen bis auf Erythrozyten vorkommen (17). Sie bestehen aus zwei Untereinheiten,  $\alpha$  und  $\beta$ . Diese sind als Glykoproteingruppen nicht-kovalent verbunden (18). Integrine besitzen eine extrazelluläre und eine zytoplasmatische Domäne. Als Transmembranproteine verbinden sie intra- und extrazelluläre Matrix und bewirken zusätzlich eine Zell-Zell-Adhäsion (19). Je nach Kombination aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit können sie unterschiedliche extrazelluläre Moleküle binden und damit eine Signalkaskade auslösen (20). Es sind bislang 24 verschiedene Integrinformen bekannt (18). Die Adhäsionsmoleküle können in einen aktivierte und in einen inaktiven

Zustand übergehen (21). Die Bindungsaaffinität zu den extrazellulären Liganden hängt von dem Zustand ab, in dem sich das Integrin befindet. Die Proteine Talin und Kindlin spielen bei der Aktivierung der Integrine eine Schlüsselrolle (22). Physiologisch sind die Transmembranproteine an verschiedenen Vorgängen im Körper beteiligt. So spielen sie beispielsweise bei der Blutgerinnung, bei Entzündungen und der gerichteten Leukozytenwanderung eine entscheidende Rolle (21). Integrine sind unter anderem an der Gefäßneubildung und der Metastasierung von Tumoren beteiligt (23). Besonders  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, ein Mediator von Zellproliferation und Zelldifferenzierung, wird auf Tumorzellen und Gefäßendothelzellen überexprimiert (24).  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindet Moleküle mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD). Dazu zählen unter anderem Fibronectin, Fibrinogen und der von-Willebrand-Faktor. Durch die Bindung der extrazellulären Moleküle wird eine Signalkaskade ausgelöst und das aktivierte Adhäsionsmolekül stimuliert die Zellen zur Proliferation und Differenzierung (25). Der Fibroblast Growth Factor bewirkt eine vermehrte  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Freisetzung bei der Angiogenese (26).

Verschiedene Studien konnten belegen, dass  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ein notwendiger Faktor der Angiogenese von Tumoren ist. Durch die Blockierung des Adhäsionsmoleküls mit Antagonisten konnten die Gefäßproliferation und das Tumorwachstum *in vivo* gehemmt werden (24, 25, 27). In einer Studie von Reinmuth et al. wurde die Wirkung des  $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ -Antagonisten S247 auf orthotop in Mäuse implantierte Kolonkarzinom-Metastasen in der Leber untersucht (28). Es wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine geringere Metastasen- und Gefäßausbildung sowie ein längeres Überleben nach Behandlung mit S247 im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Außerdem wurde gezeigt, dass die Integrin-Expression durch den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) beeinflusst wird, da dieser Integrine indirekt aktiviert (29).

Auch beim humanen Mammakarzinom zeigt sich eine Korrelation zwischen der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression und der Größenzunahme sowie Metastasierung der Tumoren (30). Es konnte gezeigt werden, dass  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin zur Metastasierung von Mammakarzinomen in Knochen beiträgt (31). Je nach Zelllinie des humanen Mammakarzinoms variiert die zelluläre  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression. Während auf Tumorzellen der Linie MDA-MB-435 die Adhäsionsmoleküle beispielsweise vermehrt nachweisbar sind, zeigt die Zelllinie MDA-MB-231 keine erhöhte zelluläre  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression (32).

### **1.3 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Bildgebung**

Auf Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) basierende Radiotracer ermöglichen eine nicht-invasive Beurteilung der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression von Tumoren in der PET. Durch die Bindung an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin können Tumoren und deren Angiogenese durch den Radiotracer in PET-Untersuchungen dargestellt werden (33). Die Radiotraceraufnahme korreliert mit der immunhistologisch quantifizierten  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression (34). Wenn die Tumoren eine hohe zelluläre Expression von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin aufweisen, ist eine Unterscheidung hinsichtlich der Traceraufnahme zwischen Tumorzellen und Gefäßendothelzellen erschwert (33). Die verschiedenen RGD-Radiotracer variieren in ihrer Affinität zu  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Zur optimalen Bildgebung wird eine möglichst hohe Affinität zu dem Transmembranprotein benötigt. Zyklische RGD-Peptide weisen im Vergleich zu linearen RGD-Peptiden eine höhere Bindungsaffinität und Spezifität auf (30). Zusätzlich spielt die Anzahl der RGD-Peptide im Radiotracer eine Rolle. So zeigte sich, dass monomere RGD-Tracer eine niedrigere Bindungsaffinität zu  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin aufwiesen als multimere RGD-Radiotracer (30).

In einer Studie von Notni et al. wurden <sup>18</sup>F-Galacto-RGD, Ga-NODAGA-c(RGDyK) und <sup>68</sup>Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub> verglichen (35). CD-1 Nacktmäuse erhielten humane M21/M21L Melanom-Xenografts und wurden mit PET untersucht. <sup>68</sup>Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub> zeigte im Vergleich zu den anderen auf RGD basierenden Radiotraceren eine bis zu siebenfach höhere Affinität zu  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, eine hohe Spezifität für  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, eine hohe in-vivo Stabilität sowie eine schnelle renale Clearance.

#### 1.4 Fragestellung

Die zur Beurteilung des Therapieansprechens von Tumoren klinisch verwendeten morphologischen Bildgebungsverfahren können die Tumormorphologie im Verlauf darstellen, ermöglichen jedoch keine Charakterisierung der Pathophysiologie auf funktioneller und molekularer Ebene. Hier treten Veränderungen, wie eine Abnahme von Rezeptoren, schon ein bevor es zu einer Größenabnahme des Tumors kommt (36). Zur individualisierten Therapiesteuerung ist es von Vorteil schon in der frühen therapeutischen Phase eine Aussage über die molekularen Veränderungen des Tumors treffen zu können, um mit hoher diagnostischer Genauigkeit Responder von non-Respondern zu differenzieren.

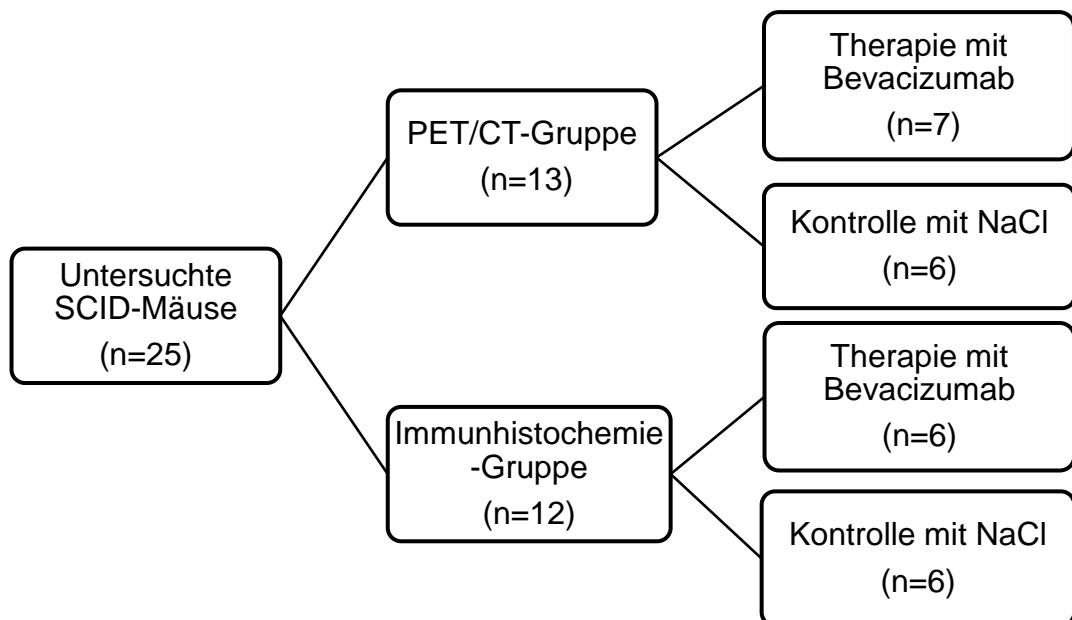
Die vorliegende Arbeit untersucht, ob das Therapieansprechen beim Mammakarzinom im Mausmodell mit der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Biomarker der Angiogenese in vivo in der PET/CT validiert werden kann. Dazu wird die Bindung des Radiotracer <sup>68</sup>Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub> an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in der PET/CT in einem Mammakarzinommodell mit geringer zellulärer  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression untersucht. Die in der Bildgebung dargestellte endotheliale  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression wird als Surrogatparameter der Angiogenese angesehen. Die Hypothese ist, dass <sup>68</sup>Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT das in vivo Monitoring der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Biomarker anti-angiogenetischer

Therapieeffekte in MDA-MB-231 Mammakarzinom-Xenografts im Mausmodell nach einwöchiger Therapie mit dem VEGF-Inhibitor Bevacizumab ermöglicht.

## 2 Material und Methoden

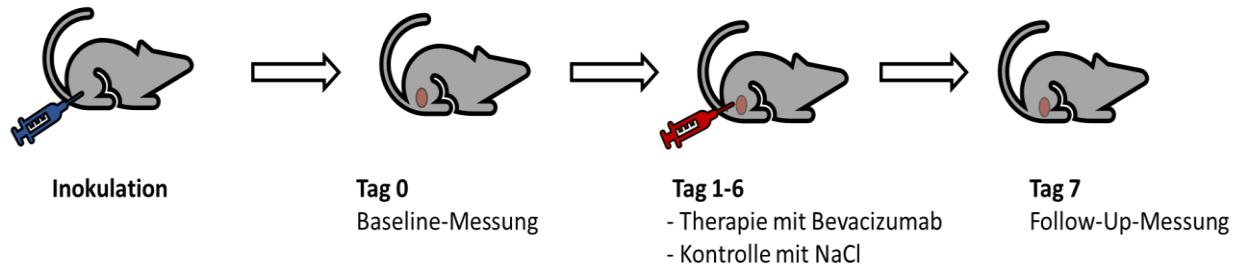
### 2.1 Überblick

In der vorliegenden Studie, genehmigt von der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantragsnummer: 55.2-1-54-2532-82-2014), wurden 25 immunsupprimierten Severe Combined Immunodeficiency- (SCID-) Mäusen humane Mammakarzinomzellen orthotop in die Milchleiste inokuliert. Die Tumoren wuchsen unter täglicher Überprüfung des Gesundheitszustandes der Tiere und Vermessung der Tumoren durch eine Schieblehre. Sie erreichten eine Größe von mindestens 0,5 cm. n=13 Tiere wurden mit PET/CT ( $n_{PET}=13$ ) untersucht. Die anderen n=12 Tiere wurden zur immunhistochemischen Validierung der Untersuchungsergebnisse verwendet ( $n_{IHC}=12$ ). Es erfolgte eine randomisierte Einteilung in Therapie- und Kontrollgruppen (Abbildung 1).



**Abb. 1: Randomisierte Einteilung der Mäuse in PET/CT- und Immunhistochemiekohorte sowie jeweilige Aufteilung in Therapie- und Kontrollgruppe.**

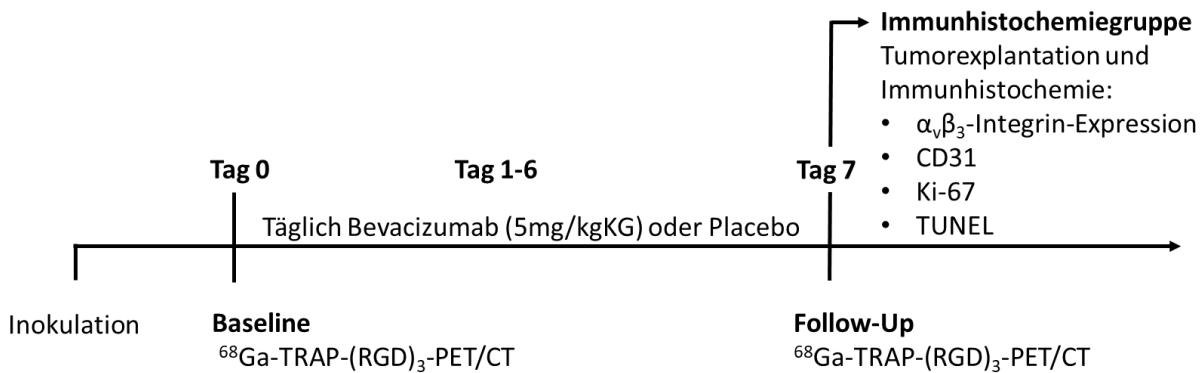
Die Therapiegruppe erhielt über sechs Tage eine intraperitoneale Injektion einer gewichtsadaptierten Dosis des Angiogenesehemmers Bevacizumab (Avastin®, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz, 5 mg/kg Körpergewicht). Analog dazu erhielt die Kontrollgruppe eine intraperitoneale Injektion einer 0,9 %-NaCl-Lösung als Placebo. n=13 Tiere bildeten die PET/CT-Kohorte. An Tag 0 des Versuchs wurde die Baseline-PET/CT-Untersuchung in einem hochauflösenden Kleintier-PET (Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions, Siemens Healthineers Molecular Imaging, Knoxville, TN) mit darauffolgender separater nativer CT-Bildgebung durchgeführt. Die CT diente der Tumorlokalisierung, anatomischen Koregistrierung sowie zur Untersuchung des Tumorvolumens. Die Follow-Up-Untersuchung erfolgte an Tag 7 (Abb. 2). Nach der Bildgebung am siebten Tag wurden die Tiere eingeschläfert.



**Abb. 2: Zeitstrahl zum Studienverlauf in der PET/CT-Kohorte.** Nach der Inokulation folgte an Tag 0 die Baseline-PET/CT und an Tag 7 die Follow-Up-PET/CT. Zwischen den Untersuchungstagen erhielten die Mäuse eine tägliche intraperitoneale Injektion von Bevacizumab oder Placebo.

Den n=12 Mäusen der Immunhistochemiegruppe wurden nach einwöchiger Therapie mit Bevacizumab oder Gabe von NaCl als Placebo die Tumoren post mortem entnommen. Die explantierten Tumoren wurden in flüssigem Stickstoff und Formalin fixiert und für immunhistochemische Validierungsversuche aufgearbeitet. Dazu wurden Gewebsschnitte angefertigt, die mikroskopisch auf  $\alpha\beta_3$ -Integrin-Expression,

Zellproliferation (Ki-67), Gefäßdichte (CD31) und Apoptose (TUNEL) untersucht wurden (Abb. 3).



**Abb. 3: Zeitstrahl zum Versuchsablauf.** Nach der Inokulation erhielten von Tag 1 bis Tag 6 alle Versuchstiere Bevacizumab (5mg/kg Körpergewicht, Therapiegruppe) oder eine äquivalente Menge Placebo (Kontrollgruppe). In der PET-CT-Kohorte fand an Tag 0 die Baseline- und an Tag 7 die Follow-Up  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT-Untersuchung statt. In der Immunhistochemiekohorte wurden an Tag 7 die Tumoren explantiert und immunhistochemisch auf  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, Gefäßdichte (CD31), Zellproliferation (Ki-67) und Apoptose (TUNEL) untersucht.

## 2.2 Tumormodell

n=25 SCID-Mäusen (Harlan Laboratories Inc., Indianapolis, IN) wurden humane Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™, Manassas, VA) orthotop in die Milchleiste implantiert. Bei den Tieren handelte es sich um 7-8 Wochen alte SCID-Mäuse. Durch eine Genmutation der Antigen-Rezeptor-Gene der SCID-Mäuse war die Bildung ihrer B- und T-Lymphozyten gestört (37). Die im Blut zirkulierenden T-Lymphozyten sind überwiegend funktionslos und die Immunglobulinspiegel im Serum deutlich vermindert (38). Dies führt zu einer eingeschränkten Immunität (39). Hierdurch wurde das Wachstum von implantierten humanen Tumorzellen ermöglicht ohne durch die körpereigene Immunreaktion der

Mäuse gehemmt zu werden (40). Da das humane Mammakarzinom bei Menschen hauptsächlich beim weiblichen Geschlecht auftritt, wurde das Mausmodell in weiblichen Tieren etabliert. Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass weibliche Mäuse in einer homogenen weiblichen Versuchsgruppe weniger aggressives Verhalten untereinander aufweisen als männliche Mäuse (41). Es wurden jeweils 4 Mäuse in einem Käfig gehalten. In den Käfigen war die Temperatur konstant bei 26° C bei 65 % Luftfeuchtigkeit. Nachdem sich die Tiere eine Woche im Tierstall akklimatisieren konnten, wurden  $3 \times 10^6$  Tumorzellen subkutan unter Inhalationsanästhesie mit 2,5 Vol.-% Isofluran orthotop in die Milchleisten der Tiere implantiert. Für die Implantation wurde eine 25-Gauge Nadel genutzt. Die Tumorzellen wurden in 50 µl isotoner Lösung resuspendiert. Die Lösung bestand aus 25 µl Phosphatpuffer und 25 µl Matrigel™ (BD Biosciences, San Jose, CA).

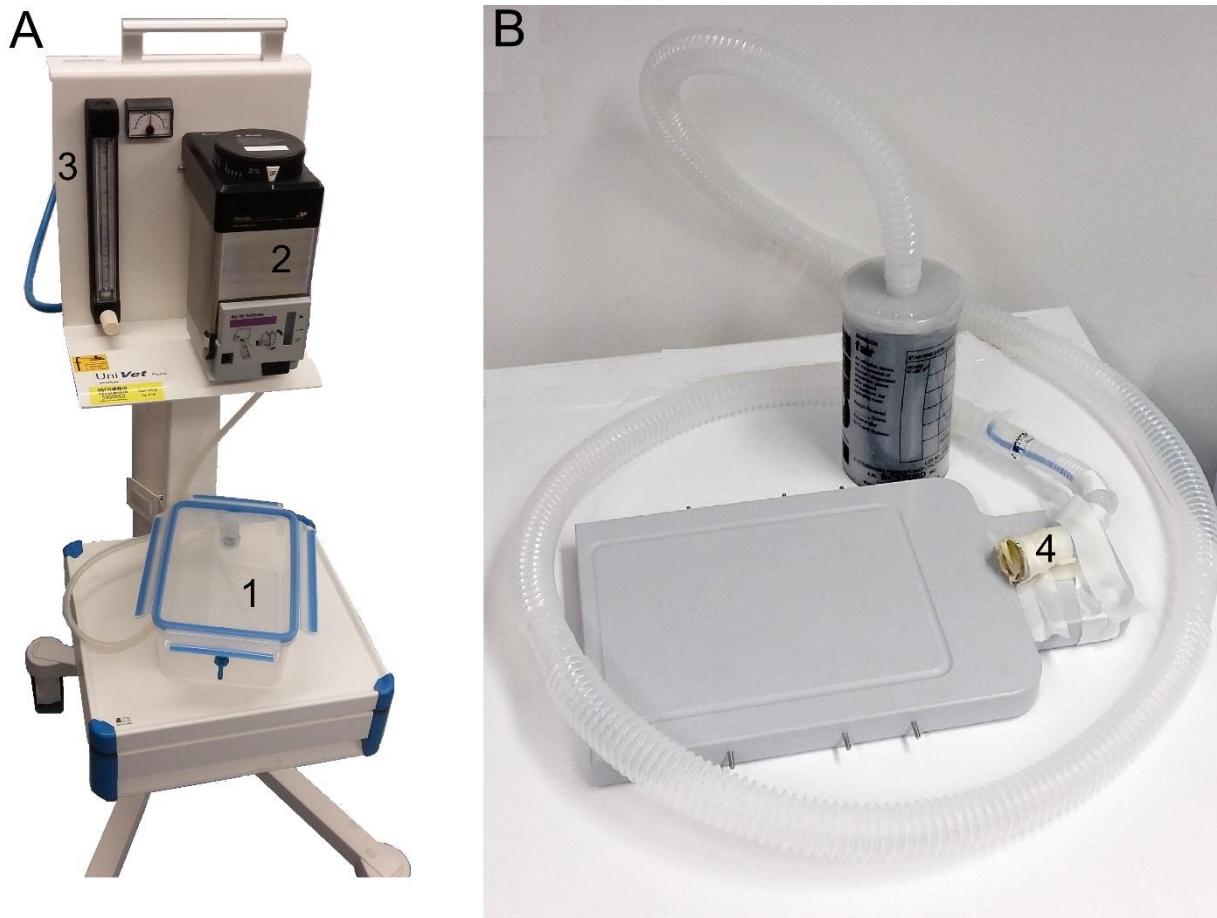
MDA-MB-231 ist eine etablierte, schnell wachsende, invasive humane Brustkrebszelllinie. Die Zelllinie ist triple negativ, das heißt sie exprimiert keine Human-Epidermal-Growth-Factor-Receptor-2 (HER2/neu)-, Östrogen- oder Progesteronrezeptoren (42). Außerdem zeichnet sie sich durch eine niedrige zelluläre  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression aus (43). Hierdurch wurde eine dedizierte Untersuchung der endothelialen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression der Gefäßendothelzellen als Surrogatparameter der Angiogenese ermöglicht ohne relevantes Hintergrundsignal durch  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression von Tumorzellen. Die Tumogröße wurde täglich vermessen und protokolliert. Nach dem Erreichen einer Tumogröße von 0,5 cm wurden die Versuchstiere randomisiert in PET/CT- und Immunhistochemiekohorte unterteilt. Die Unterteilung in zwei unabhängige Gruppen erfolgte, um eine systematische Verzerrung zu vermeiden. Sowohl der verwendete Radiotracer als auch die in den immunhistochemischen Validierungsversuchen verwendeten Antikörper

binden an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin. Eine mögliche kompetitive Blockade der Rezeptoren wurde durch separate Versuchsgruppen verhindert.

Während der gesamten Versuchszeit wurde sorgfältig auf das Befinden der Tiere geachtet. Täglich wurde das Gewicht kontrolliert und die Tumoren auf Ulzerationen untersucht. Gewichtsabnahme > 15 % des Körpergewichts, Ulzera der Tumoren, Tumorgröße > 1,5 cm, apathisches Verhalten, Atembeschwerden, Abwehrverhalten bei Palpation der Tumoren, Lähmungserscheinungen sowie eine nicht-physiologische Körperhaltung waren Abbruchkriterien. Die Erfüllung eines dieser Kriterien hätte aus Tierschutzgründen zu einem vorzeitigen Versuchsabbruch und zur Euthanasie des betroffenen Tieres geführt.

### **2.3 Narkose**

Alle Untersuchungen mit relevantem Schmerzrisiko wurden unter Inhalationsnarkose durchgeführt. Bei der Inhalationsnarkose handelte es sich um ein Gasgemisch aus 2,5 Vol.-% Isofluran (Forene AbbVie, Wiesbaden, Deutschland) und 100 Vol.-% O<sub>2</sub>. Die Verabreichung erfolgte über eine für die Mäuse angefertigte Nasenmaske (Abb. 4). Um das Absinken der Körpertemperatur der Tiere unter der Narkose zu verhindern, wurde eine Wärmematte (Air heat control unit, RAPID Biomedical, Würzburg, Deutschland) oder eine Wärmelampe (Beurer, Infrarot-Wärmestrahl器 IL50, Ulm, Deutschland) verwendet.



**Abb. 4: Installationen zur Isofluran-Narkose.** A) Mobile Station zur Einleitung der Isofluran-Narkose. Die Box (1), in der sich das Versuchstier befand, war über zwei Schläuche mit dem Isofluran-Verdampfer (2) und der O<sub>2</sub>-Gasflasche verbunden. Der Sauerstoff-Flow konnte über eine Skala (3) kontrolliert werden. B) Lagerungsplatte mit einer Nasenmaske (4), über die die Tiere ein Gemisch aus 2,5 Vol.-% Isofluran und 100 Vol.-% O<sub>2</sub> erhielten.

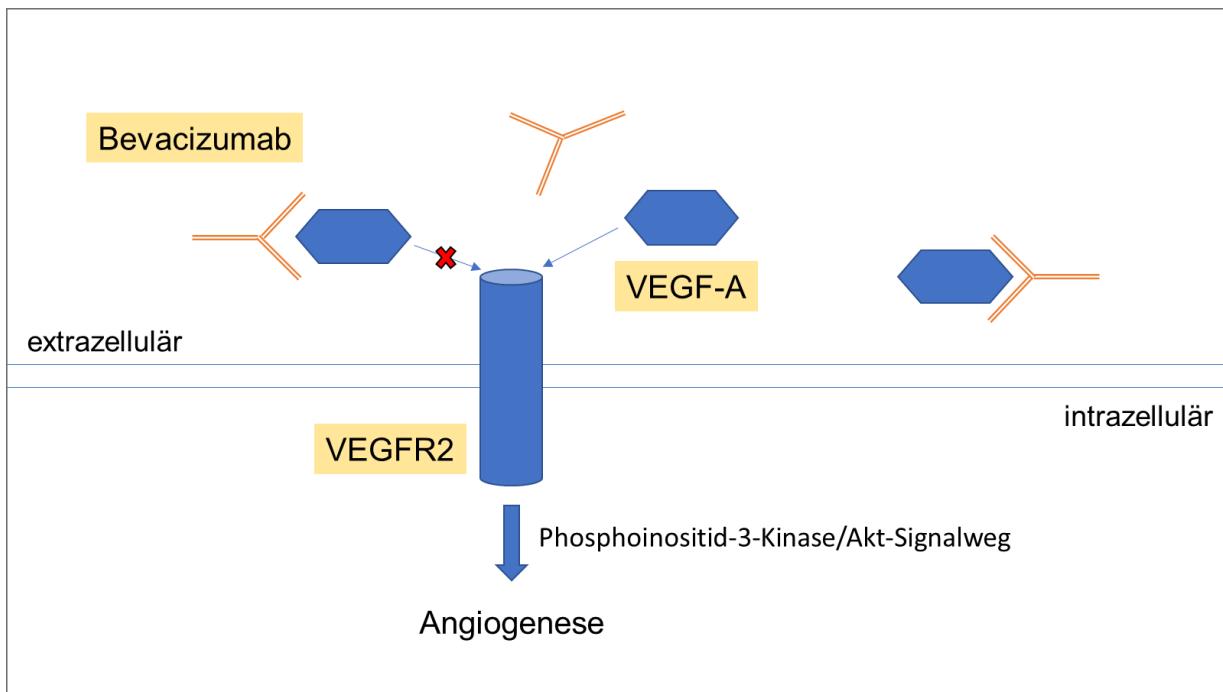
## 2.4 Der Angiogenesehemmer Bevacizumab

Bevacizumab ist ein monoklonaler humanisierter Antikörper, der spezifisch an den Wachstumsfaktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) bindet. VEGF wird unter anderem bei Hypoxie oder Hypoglykämie ausgeschüttet und bindet als Signalmolekül an VEGF-Rezeptoren (VEGFR) (44). Dies führt zur Stimulation von vaskulärem Endothel und spielt sowohl physiologisch in der Entwicklung der embryonalen de-novo Angiogenese als auch pathologisch in der Tumorangiogenese eine wichtige Rolle (45).

Es gibt drei verschiedene VEGFR Subtypen: VEGFR1, VEGFR2 und VEGFR3. Dabei

spielt vor allem VEGFR2 eine große Rolle in der Gefäßausbildung von Tumoren. Der Wachstumsfaktor VEGF untergliedert sich in 5 Subtypen, wobei VEGF-A als wichtigster Promotor der Angiogenese fungiert, während die anderen Formen VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und PIGF (Placental Growth Factor) unter anderem bei der Bildung von Lymphgefäßbündeln bedeutsam sind und Einfluss auf die Angiogenese im Rahmen von Entzündungsprozessen haben. VEGF-A untergliedert sich durch alternatives Splicing in verschiedene Subtypen. Der Subtyp mit der größten biologischen Aktivität ist hierbei VEGF-A<sub>165</sub> (45, 46).

VEGFR2 ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), die über Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase/Akt-Signalwegs die Zelle zur Angiogenese anregt (47, 48). Wird VEGF von Bevacizumab gebunden, kann es nicht mehr an den VEGFR2 binden und das Angiogenesesignal unterbleibt (49) (Abb. 5). Bevacizumab kann so als Angiogenesehemmer in die Gefäßbildung von Tumoren eingreifen. Bis zu einer Größe von 1-2 mm können sich Tumoren über Diffusion mit Blut versorgen (50). Mit progredienter Größenzunahme reicht diese Versorgung nicht mehr aus. Unter Hypoxie kommt es zum angiogenic switch und der Tumor beginnt durch Freisetzung von proangiogenetischen Wachstumsfaktoren, insbesondere VEGF, ein Gefäßnetzwerk auszubilden (44). Ist die Angiogenese durch Bevacizumab gehemmt, führt dies aufgrund der reduzierten Gefäßneubildung zu einer Hemmung der Tumorproliferation.

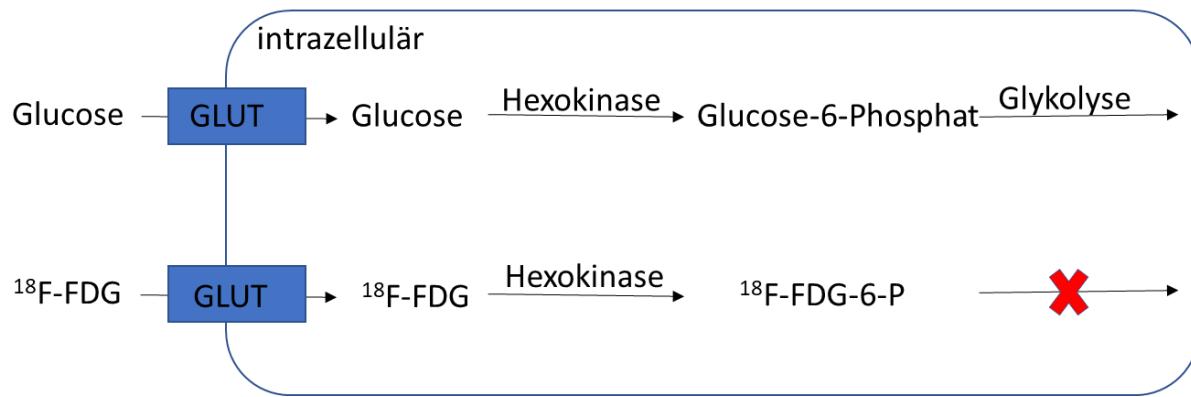


**Abb. 5: Bevacizumab als Angiogeneseinhibitor.** Der Antikörper Bevacizumab bindet VEGF-A und verhindert damit das Binden an VEGFR2. Die Signalkaskade zur Induktion der Angiogenese wird nicht ausgelöst.

Der Angiogenesehemmer Bevacizumab wird zur Therapie von metastasierten Mammakarzinomen, metastasierten Kolonkarzinomen, metastasierten Cervixkarzinomen, nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, Nierenzellkarzinomen und Ovarialkarzinomen in Kombination mit anderen Chemotherapeutika als Infusion verabreicht (51). In verschiedenen Studien am Patienten konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Bevacizumab sowohl die Angiogenese hemmt als auch die Apoptose der Tumorzellen steigert (52). Der Einsatz als Therapeutikum beim Mammakarzinom hat in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika, wie Doxorubicin oder Paclitaxel, das mediane progressionsfreie Überleben der Patienten signifikant verlängert (53, 54).

## 2.5 PET/CT

Bei der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) handelt es sich um ein nuklearmedizinisches Bildgebungsverfahren. Dabei werden den Patienten Radiotracer injiziert. Radiotracer sind schwach radioaktive Substanzen, die durch die Markierung mit einem Radionuklid hergestellt werden. Im Körper binden die Radiotracer entweder spezifisch an Zielstrukturen wie Rezeptoren oder nehmen an Stoffwechselvorgängen teil. Der am häufigsten genutzte Radiotracer ist <sup>18</sup>F-Fluordesoxyglucose (<sup>18</sup>F-FDG). Dieser wird analog zu Glucose über Glucosetransporter (GLUT) in die Zellen aufgenommen und durch das Enzym Hexokinase zu <sup>18</sup>F-Fluordesoxyglucose-6-Phosphat (<sup>18</sup>F-FDG-6P) phosphoryliert (Abb. 6). Tumorzellen gewinnen auch bei ausreichender Sauerstoffversorgung Energie hauptsächlich durch Glykolyse. Dies führt mit Hochregulation der Glucosetransporter in der Zellmembran zu einem erhöhten Glucosemetabolismus. Die in Tumorzellen beobachtete Glykolyse bei aeroben Bedingungen wird als Warburg-Effekt bezeichnet (55). <sup>18</sup>F-FDG wird nach der Phosphorylierung nicht weiter metabolisiert und reichert sich so in Zellen mit einem hohen Zuckerstoffwechsel, wie zum Beispiel Tumorzellen, an (56). Verschiedene Faktoren beeinflussen die Effizienz eines Radiotracers. Es ist wichtig, dass eine hohe Affinität zum Zielmolekül besteht. Außerdem sollte er selektiv binden und zeitnah renal ausgeschieden werden, um Anreicherungen außerhalb der zu untersuchenden Region zu vermeiden (57). Die Bindungsrate des Tracers sollte hoch sein, während die Dissoziationsrate möglichst gering sein sollte. Dies ermöglicht eine hohe Akkumulation des Radiotracers in der Zielregion und damit eine spezifische Bildgebung (58).

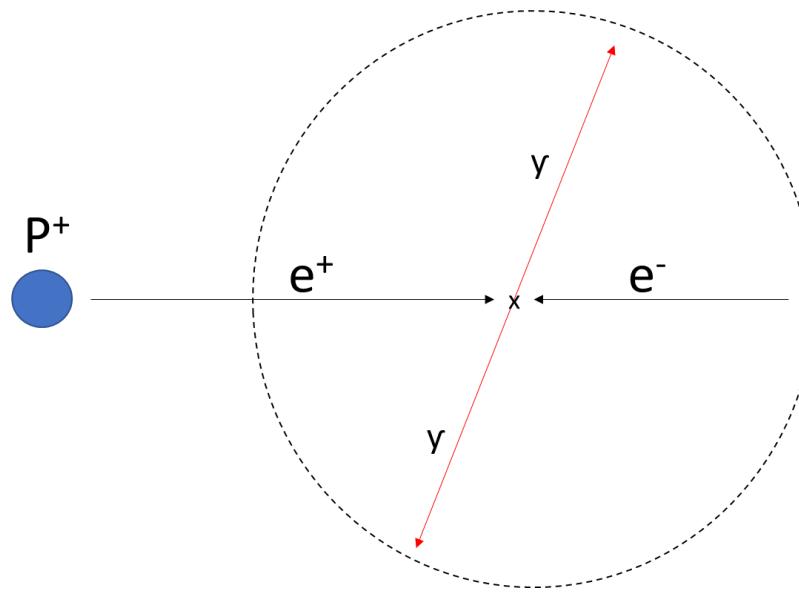


**Abb. 6 Vergleich des Metabolisierungsweges von <sup>18</sup>F-FDG und Glucose.** Die zelluläre Aufnahme erfolgt über Glucosetransporter. Intrazellulär werden beide Moleküle durch das Enzym Hexokinase phosphoryliert. Während Glucose-6-Phosphat weiter verstoffwechselt wird, reichert sich <sup>18</sup>F-FDG-6-P an.

Die PET macht sich den  $\beta^+$ -Zerfall der Nuklide zu Nutze. Beim  $\beta^+$ -Zerfall entsteht aus einem Proton ( $P^+$ ) unter Abgabe eines Positrons ( $e^+$ ) und eines Neutrinos ( $\nu$ ) ein Neutron (N).



Die entstehenden Positronen verlangsamen sich während sie das Gewebe durchqueren und kollidieren in kurzer Distanz mit Elektronen. Bei der Kollision von sogenannten Antiteilchen und Teilchen vernichten sich diese gegenseitig. Dies wird als Annihilation bezeichnet. Die dabei entstehende Vernichtungsstrahlung zeigt sich als zwei Photonen, die sich mit 511 keV und Lichtgeschwindigkeit in diametral entgegengesetzte Richtungen bewegen (56).



**Abb. 7: Schematische Darstellung des  $\beta^+$ -Zerfalls bei der PET.** Das beim Zerfall des Protons  $P^+$  entstandene Positron  $e^+$  kollidiert mit einem Elektron  $e^-$  an Punkt  $x$ . Dabei entstehen Photonen  $\gamma$ , die sich in entgegengesetzte Richtungen voneinander entfernen. Die Photonen treffen auf einen Detektorring.

Ein Detektorring registriert die auftreffenden Photonen auf einer  $180^\circ$ -Ebene (Abb. 6). Die Photonen treffen koinzident an zwei gegenüberliegenden Stellen auf den Detektorring. Die Linie zwischen diesen Punkten wird als Koinzidenzlinie bezeichnet. Durch die Registrierung der Photonen an den Detektoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten kann der Entstehungsort der Vernichtungsstrahlung entlang der Koinzidenzlinie lokalisiert werden. Werden die einzelnen Punkte zu einem 3D-Bild rekonstruiert, erhält man Informationen, wo sich der Tracer angereichert hat und kann daraus auf die Größe und Lokalisation von Geweben mit hohem Stoffwechsel schließen (56). Die PET wird vor allem genutzt, um maligne Tumoren zu lokalisieren. Da Tumorzellen einen besonders hohen Glucosestoffwechsel haben, reichert sich das Glucoseanalogon  $^{18}\text{F}$ -FDG dort an und kann in der PET mit hoher Sensitivität und Spezifität zur Bildgebung genutzt werden (59). Auch in der Epilepsie- und

Demenzdiagnostik und bei entzündlichen Erkrankungen wird die <sup>18</sup>F-FDG PET eingesetzt (56).

Die Computertomographie (CT) ist ein Bildgebungsverfahren, bei dem mit Röntgenstrahlung eine 3D-Abbildung des zu untersuchenden Objektes erstellt wird. Dazu werden Schnittbilder des Objekts in verschiedenen Ebenen angefertigt, aus denen ein Gesamtbild rekonstruiert werden kann. Die CT-Daten werden in Graustufen dargestellt. Diese Graustufen können anhand der Hounsfield-Skala durch Hounsfield Units (HU) bestimmten Geweben zugeordnet werden. Da Luft fast keine Röntgenstrahlung absorbiert, wird diese in der CT-Datenanalyse mit -1000 HU definiert. Wasser hingegen wird auf der Skala mit 0 HU, Fett mit etwa -100 HU und Knochen zwischen 500 und 1500 HU definiert (60).

Die PET/CT ist eine Hybridbildgebung aus PET und CT, die seit 2001 klinisch eingesetzt wird und ermöglicht, nicht nur die Morphologie des Tumors in der CT, sondern auch Stoffwechselvorgänge oder die Expression eines Zielrezeptors mit PET zu beurteilen (61). In der PET werden die Zielstrukturen der Radiotracer durch die Radiotraceranreicherung dargestellt. Die CT ermöglicht eine detaillierte anatomische Darstellung der verschiedenen Körperstrukturen. Die Kombination beider Verfahren erlaubt eine präzise Beurteilung und Lokalisation der untersuchten Strukturen im Hinblick auf Morphologie, Funktion und den molekularen Eigenschaften des Gewebes.

Um die MDA-MB-231-Mammakarzinome der SCID-Mäuse in der PET/CT darzustellen, wurde eine hochauflösende Positronen-Emissions-Tomographie (Inveon Dedicated PET, Preclinical Solutions, Siemens Healthineers Molecular Imaging, Knoxville, TN) genutzt und mit den CT-Datensätzen (Somatom Force, Siemens Healthineers, Erlangen, Deutschland; 35 mAs, 100 kV, Schichtdicke 0,6 mm) fusioniert. Während

der beiden Untersuchungen wurden die Tiere identisch positioniert, um eine Bildfusion zu ermöglichen.

## 2.6 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin spezifische Tracer

$\alpha_v\beta_3$ -Integrin bindet extrazelluläre Proteine mit der RGD-Tripeptid-Sequenz (62). Zyklische RGD-Tripeptid-Antagonisten wurden hergestellt und radioaktiv markiert, um  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Radiotracer zu entwickeln. Für diese Studie wurde  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP (1,4,7-Triazacyclononane-Phosphonic Acid)-(RGD)<sub>3</sub> als Radiotracer in der PET genutzt. Studien zeigten, dass dieser eine besonders hohe Bindungsaffinität zu  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin aufweist. Notni et al. zeigten, dass die Bindungsaffinität des Tracers rund 7-fach höher ist als die anderer Integrin-spezifischer Tracer wie beispielsweise  $^{18}\text{F}$ -Galakto-RGD (35). Außerdem weist der Radiotracer eine hohe Selektivität, Stabilität, Anreicherung im Tumorgewebe und eine schnelle renale Clearance auf (63). In dieser Untersuchung erhielten die Versuchstiere  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> mit einer Gesamtaktivität von 30 MBq über einen in der lateralen Schwanzvene liegenden peripher-venösen Zugang. Die Synthese des verwendeten Tracers durchlief zwei Prozesse. Zuerst wurde das TRAP-Peptid (Abb. 8) synthetisiert (35, 64).

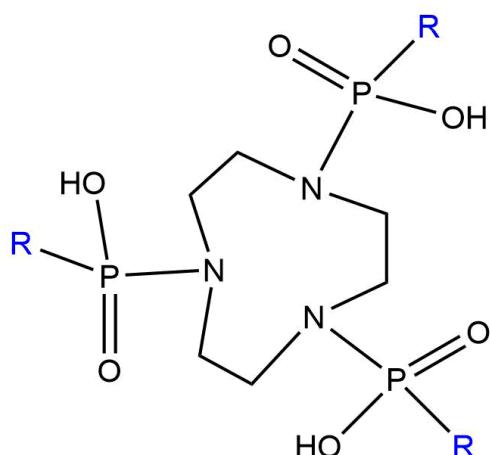
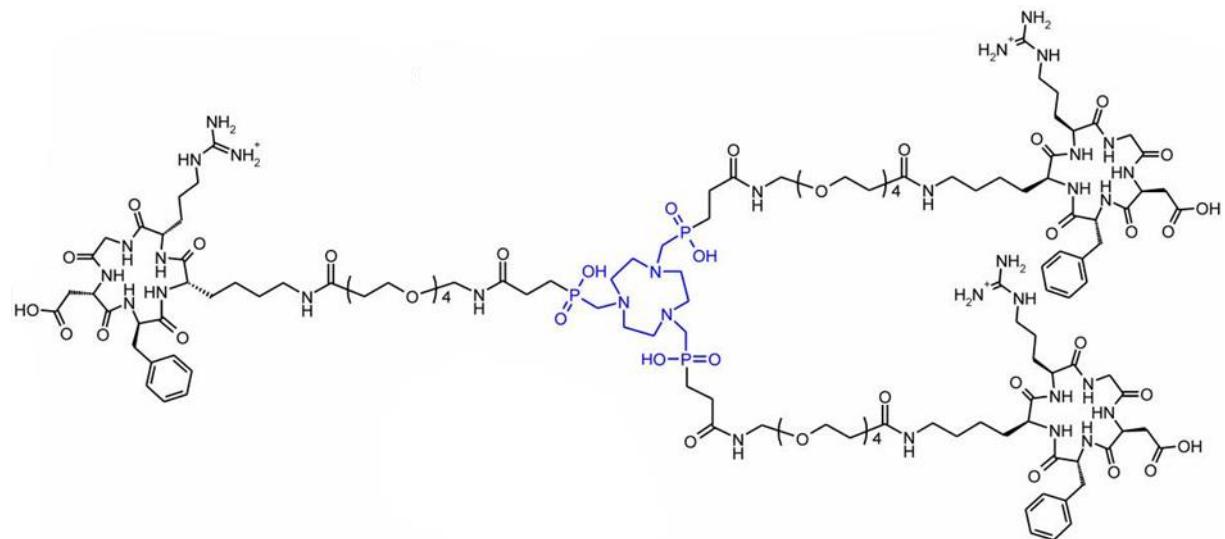


Abb. 8: Struktur von TRAP (gezeichnet mit ChemDraw)

Das TRAP-Peptid wurde mit drei Aminosäuresequenzen aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure (RGD) verknüpft, sodass TRAP-(RGD)<sub>3</sub> entstand (Abb. 9).

Im zweiten Schritt wurde das TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-Peptid durch die Radiopharmazie der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin am LMU Klinikum (Direktor: Prof. Dr. med. Peter Bartenstein) mit <sup>68</sup>Ga radioaktiv markiert. Dazu wurde ein auf SnO<sub>2</sub> basierender <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generator (IGG100-50M, Eckert & Ziegler Radiopharma GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. In diesem entsteht aus <sup>68</sup>Ge durch Elektroneneinfang das Isotop <sup>68</sup>Ga und es bildet sich ein Gleichgewicht aus beiden Isotopen. <sup>68</sup>Ga wird durch eine Lösung, in der es selbst, nicht aber <sup>68</sup>Ge löslich ist, aus dem Generator gewonnen. Durch die Entnahme von <sup>68</sup>Ga kommt es wiederum zu einem Ungleichgewicht, weshalb <sup>68</sup>Ge erneut zerfällt damit das Gleichgewicht zwischen beiden Isotopen aufrechterhalten wird. 25 µl TRAP-(RGD)<sub>3</sub> (AVEBETRIN, SCINTOMICS GmbH, Fürstenfeldbruck, Deutschland), wurden in 288 µl 1 M Natriumacetat gelöst. Danach wurde die Lösung mit 300-400 MBq <sup>68</sup>GaCl<sub>3</sub> markiert, das zuvor mit <sup>68</sup>Ge/<sup>68</sup>Ga-Generator eluiert wurde. Als Lösungsmittel wurden 2 ml 0,1 N HCl verwendet. Nach anschließendem Erhitzen auf 90 °C für 10 min, Anreicherung mit C18-Kartusche und Korrektur des pH durch einen Phosphatpuffer auf 7,2 konnte die Injektionslösung fertig gestellt werden. Zur Qualitätskontrolle wurde die radiochemische Reinheit nach jeder Synthese des Tracers mit Hilfe einer High-Performance-Flüssigchromatographie mit >98 % gesichert. Das gewonnene <sup>68</sup>Ga bindet mit einer hohen Affinität an das TRAP-Peptid. Auch unter Bedingungen wie einem sehr niedrigen pH-Wert oder bei deutlich geringerer Ligandenkonzentration, unter denen andere Liganden, zum Beispiel DOTA oder NOTA nicht binden konnten, konnte TRAP in Studien der Autoren Notni et al mit <sup>68</sup>Ga radioaktiv markiert werden (64, 35). Die Verbindung des TRAP-Peptids mit <sup>68</sup>Ga fand unmittelbar vor der Applikation des Radiotracers statt, da <sup>68</sup>Ga mit 68 Minuten nur

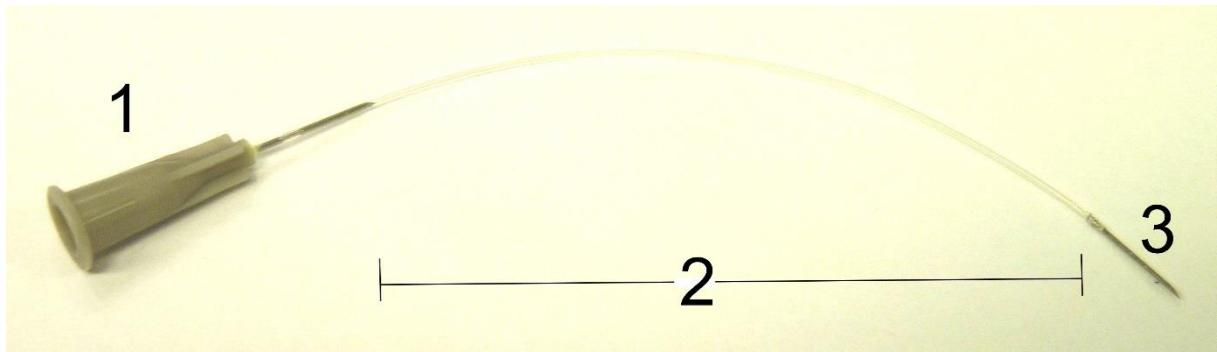
über eine relativ kurze Halbwertszeit verfügt (65, 66). Damit nur ein geringer Zerfall bis zur Bildgebung stattfand, erfolgte diese möglichst zeitnah nach der Synthese des Radiotracers. Abbildung 9 zeigt die Molekülstruktur von TRAP-(RGD)<sub>3</sub>.



**Abb. 9.: Struktur von TRAP-(RGD)<sub>3</sub>.** TRAP befindet sich mittig und bindet drei RGD-Peptide am Phosphatrest (gezeichnet mit ChemDraw).

## 2.7 Punktion der Schwanzvene

Um den Tracer zu injizieren, wurde ein Zugang in die laterale Schwanzvene gelegt. Der Venenverweilkatheter wurde im Labor für Experimentelle Radiologie des LMU Klinikums aus der Metallspitze sowie dem Endstück einer 27 Gauge Kanüle (Microlance, 0,4 x 19 mm, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) und einem Plastikschorl mit einem Durchmesser von 0,7 mm (Abb. 10) zusammengesetzt.



**Abb. 10: Katheter zur Tracerinjektion** bestehend aus dem konustragenden Endstück (1) und der Spitze einer 27 Gauge Kanüle (3) sowie der Verbindung durch einen dünnen Plastikschlauch (2).

Um die Vene zu punktieren, wurden das Versuchstier mit Isofluran narkotisiert, der Schwanz mit einem Tourniquet gestaut und die Schwanzvene durch die Bestrahlung mit einer Infrarotlampe erwärmt. Die Erwärmung führte zur Vasodilatation. Dies vereinfachte die Punktions der lateralen Schwanzvene mit dem in einem Nadelhalter fixierten Katheter.

## 2.8 Durchführung der PET/CT

An Tag 0 fand die Baseline-Untersuchung der Tiere mit PET und CT statt. Analog dazu erfolgte an Tag 7 die Follow-Up-Untersuchung. Jeweils zwei Tiere wurden zeitgleich mit 2,5 Vol.-% Isofluran bei 2 l 100 Vol.-% O<sub>2</sub> narkotisiert und erhielten einen peripher-venösen Zugang zur Applikation des Radiotracers in die laterale Schwanzvene. Sobald die motorischen Reaktionen der Tiere erloschen waren und ein venöser Zugang gelegt war, wurde <sup>68</sup>Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub> mit einer Gesamtaktivität von ca. 30 MBq injiziert. Die Mäuse wurden im dedizierten Kleintier-PET positioniert und es wurden im Zeitraum von 53 min und 90 min nach der Injektion des Radionuklids Emissions/Transmissions-Aufnahmen der Tiere angefertigt. Zunächst fand 53 min

nach Tracerapplikation eine 7-minütige Transmissionsaufnahme mit  $^{57}\text{Co}$  als externe Strahlungsquelle statt. Die Emissionsaufnahme folgte 60 – 90 min nach Injektion des Tracers. Die beim  $\beta$ -Zerfall des Radionuklids entstehenden Photonen werden beim Durchqueren des Körpers in entgegengesetzte Richtungen durch Interaktionen mit Atomen abgeschwächt. Dies geschieht unabhängig vom Ort der Strahlungsquelle. Um die Verteilung der Schwächung entlang von Koinzidenzlinien im zu untersuchenden Körper zu bestimmen, wurden Transmissionsaufnahmen angefertigt. Mit einer externen Strahlungsquelle außerhalb des Körpers wurde dabei der Schwächungsfaktor entlang dieser Linien ermittelt. Um die Verteilung des Radiotracers im Körper zu untersuchen, wurden anschließend Emissionsaufnahmen erstellt. Hierbei wurde die vom Körper ausgehende Strahlung detektiert. Zur Schwächungskorrektur wurden die Emissionsaufnahmen mit den in den Transmissionsaufnahmen ermittelten Schwächungsfaktoren korrigiert (56, 67).

Anschließend erfolgte eine native CT-Untersuchung zur Koregistrierung und Tumorlokalisierung. Die Positionierung der Maus während der CT-Untersuchung war analog zur Positionierung in der PET, um eine Bildfusion zu ermöglichen. Auch die CT-Untersuchung erfolgte unter Isofluran-Narkose. Nach Abschluss der Baseline-Untersuchung erwachten die Tiere aus der Narkose und konnten wieder in die gewohnte Umgebung des Tierstalls zurückkehren. Die Follow-Up-Untersuchung erfolgte an Tag 7 analog zur Baseline-Untersuchung. Anschließend fand die schmerzfreie Euthanasie der Versuchstiere unter Narkose statt.

## 2.9 Analyse der PET/CT-Datensätze

Zur Analyse der PET/CT-Datensätze wurde das Programm Inveon Acquisition Workplace (Siemens Healthineers, Knoxville, TN) verwendet. Die Tumorvolumina [ $\mu\text{l}$ ]

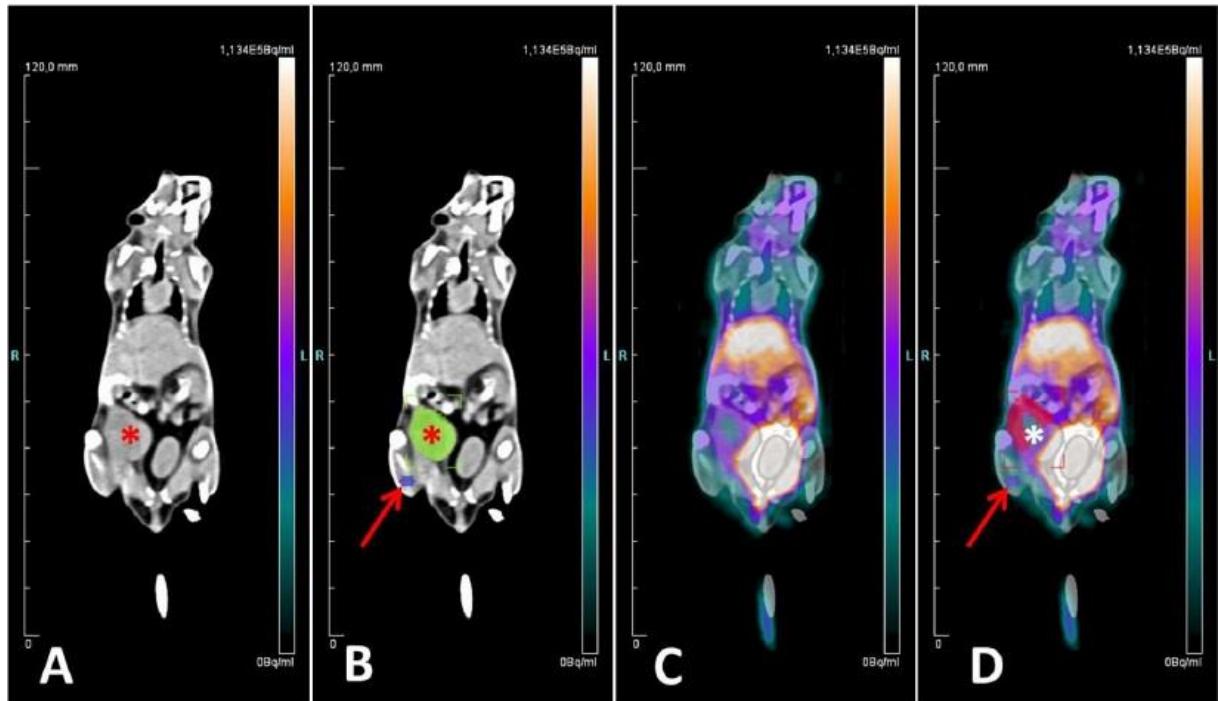
wurden mit CT-Volumetrie der nativen CT-Datensätze berechnet. Dabei lieferten die einzelnen Schnittbilder des Tumors in Summation das Gesamtvolumen. Zur Analyse der PET-Daten wurden OSEM 3D und MAP 3D Algorithmen mit 4 und 32 Wiederholungen genutzt. Es wurden die Bildparameter 256 x 256 Matrix, 159 Schnitte, Schichtdicke 0,796 mm, Vergrößerung 100% und Auflösung 1,5 mm verwendet. Um die Radiotracer-Anreicherung im Tumor zu ermitteln, wurden die PET- und CT-Aufnahmen zunächst fusioniert. Dazu wurde ein Software-gestützter Volumen-Fusions-Algorithmus verwendet. Die Ergebnisse der Bildfusion wurden visuell verifiziert. In Fällen, in denen die Bilder nicht optimal zusammengeführt wurden, fand eine manuelle Nachbearbeitung statt, um eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen den PET- und CT-Bildern zu erzielen. Im nächsten Schritt wurden Volumes of interest (VOI) über den Tumor und einen Muskel der hinteren Extremität gelegt. Daraufhin wurde die Target-to-Background-Ratio (TBR) aus dem Quotienten des  $VOI_{Tumor}$  und des  $VOI_{Muskel}$  berechnet.

$$TBR = VOI_{Tumor} / VOI_{Muskel}$$

Indem das  $VOI_{Tumor}$  ins Verhältnis zu einem Referenzgewebe ( $VOI_{Muskel}$ ) gesetzt wurde, war die Messmethode weniger anfällig für inter- und intraindividuelle Unterschiede als der Vergleichsparameter Standardized Uptake Value (SUV), der in der  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET klinisch etabliert und validiert ist, um die Akkumulation des Radiotracers semiquantitativ zu erfassen;  $SUV = \text{Aktivitätskonzentration (Bq/g)} \times \text{Patientengewicht (g)} / \text{applizierte Aktivität (Bq)}$ .

Die korrekte Lage der VOIs wurde in den drei Schnittebenen koronar, axial und sagittal visuell überprüft (Abb. 11). Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass es nicht zu einem Spillover, also einer Überlagerung der Traceranreicherung im Tumor, durch die Blase kam. Da der Radiotracer schnell renal ausgeschieden wurde, enthielt die Blase der

Tiere bereits während der Messungen einen Teil des applizierten Radionuklids. Die Tumorregionen, die durch eine Traceranreicherung in der Blase überlagert wurden, wurden für die Analyse nicht berücksichtigt.



**Abb. 11: VOI-Selektion.** Koronare Schnittebene. Bild A: Native CT-Aufnahme. Der Tumor ist mit einem roten Stern markiert. Bild B: Natives CT-Bild. Der Tumor ist grün eingefärbt und mit einem roten Stern markiert. Der rote Pfeil deutet auf einen Muskel (lila) hin. Bild C und D: Fusionierte PET/CT-Bilder. Bild D: Übertragung der festgelegten VOIs aus den CT-Daten auf die PET-Daten. Der Tumor ist pink eingefärbt und mit einem weißen Stern markiert. Der Pfeil deutet auf den lila angefärbten Muskel hin. Durch die Signalaufnahme in der Blase eingeschränkt beurteilbare Tumorbereiche wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

## 2.10 Euthanasie und Tumorexplantation

Nach Beendigung der Follow-Up-Untersuchungen an Tag 7 wurden die Tiere durch eine gesättigte intrakardiale Kaliumchlorid-Injektion eingeschläfert. Davor wurde sichergestellt, dass die Tiere mit Isofluran narkotisiert waren. Die Tiefe der Narkose wurde über einen gezielten Schmerzreiz überprüft. Bei ausbleibender Reaktion und verlangsamter Atemfrequenz konnte von einer schmerzfreien Euthanasie

ausgegangen werden. Bei der Immunhistochemie-Kohorte wurden die Tumoren nach Feststellung des sicheren Todes explantiert und zur weiteren Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren und in Formalin fixiert und in einer Atmosphäre von -80 °C aufbewahrt.

## 2.11 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Validierungsversuche wurden in einer separaten Tierkohorte ( $n_{IHC}=12$ ) durchgeführt, um eine kompetitive Blockierung durch Bindung des Radiotracers und der für die immunhistochemischen Färbungen verwendeten Antikörper an dieselben Rezeptoren zu verhindern. Nach einer einwöchigen Therapie mit Bevacizumab ( $n_{Therapie}=6$ ) oder der Placebogabe mit 0,9 % NaCl ( $n_{Kontrolle}=6$ ) wurden die Tiere an Tag 7 eingeschläfert. Die Tumoren wurden explantiert und in Hinblick auf  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, Zellproliferation (Ki-67), Gefäßdichte (CD31) und Apoptose (TUNEL) immunhistochemisch aufgearbeitet. Dazu wurde ein Teil des Gewebes nach der Präparation in flüssigem Stickstoff konserviert. Mit einem Kryotom (Leica CM1950, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden Kryoschnitte angefertigt, die auf einen Objektträger (Superfrost Ultra Plus®, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) gezogen wurden. Dieser Teil wurde für die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Färbungen sowie die Doppelfärbung aus  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und CD31 genutzt.

Der Rest des Tumors wurde nach der Explantation für 36-72 Stunden in Formalin eingelegt. Nach dieser Zeit erfolgte eine Entwässerung des Gewebes im Gewebsentwässerungsautomaten (Leica PELORIS II, Wetzlar, Deutschland) mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x30 min 70 % Ethanol, 2x30 min 80 % Ethanol, 2x30 min 96 % Ethanol, 2x30 min 100 % Ethanol, 2x1 h Paraffin bei 60 °C). Anschließend wurde

das Gewebe in Paraffin gegossen und mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2245, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) in 3 µm dicke Paraffinschnitte geteilt, die dann auf Objektträger (Superfrost) gezogen wurden. Weiterführend wurden diese Schnitte für die Ki-67-, CD31- und TUNEL-Färbungen verarbeitet.

### **2.11.1 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression**

Die Gefrierschnitte wurden zuerst 10 min in Aceton bei -20 °C fixiert, um anschließend für mindestens 20 min bei Raumtemperatur zu trocknen. Anschließend wurden die Schnitte in einer Lösung aus 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (PBS) gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die endogene Peroxidase blockiert (peroxidase blocking reagent, DAKO, Hamburg, Deutschland). Durch die gewebseigene endogene Peroxidase kann es zu unerwünschten Interferenzen und daraus resultierenden ungewollten Hintergrundfärbungen kommen. Durch eine Hemmung der endogenen Peroxidase-Aktivität mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) können diese verhindert werden (68). Schließlich wurden die Gefrierschnitte über Nacht mit dem spezifischen monoklonalen Maus-anti-human- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antikörper LM609 (1:50, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Es folgte die Inkubation mit einem sekundären anti-Maus-Antikörper Envision<sup>TM+</sup> Kit (DAKO, Hamburg, Deutschland). Nach weiteren Waschungen wurden die Gefrierschnitte mit dem AEC-Substrat (Envision<sup>TM+</sup> Kit, DAKO, Hamburg, Deutschland) erneut inkubiert. Nach einer Gegenfärbung mit Hämalaun wurde die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression visualisiert.

### **2.11.2 Zellproliferation (Ki-67)**

Das Ki-67-Protein ist ein spezifischer immunhistochemischer Marker der Zellproliferation (69). Die in Formaldehyd fixierten und in Paraffin gebetteten

Gewebsschnitte wurden zunächst entwachst und rehydriert. Durch die Fixierung in Formaldehyd kommt es zu einer Vernetzung von Proteinen durch die Bildung von Schiff'schen Basen und Methylenbrücken (70). Dadurch werden Epitope maskiert und können von ihrem Antikörper nicht mehr erkannt werden. Deshalb wurden die Vernetzungen (Maskierungen) bei 600 W durch Mikrowellen und einen Citrat-Puffer aufgelöst. Zusätzlich wurde die endogene Peroxidase blockiert (Envision<sup>TM</sup>+ Kit, DAKO, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die Gewebsschnitte über Nacht bei 4 °C mit Anti-Ki-67-Antikörpern inkubiert (1:100; ab16667, Abcam, Cambridge, Großbritannien). Ein zweiter Anti-Kaninchen-Antikörper (Envision<sup>TM</sup>+ Kit, DAKO, Hamburg, Deutschland) wurde danach hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Schnittes mit DAB-Chromogen. Durch eine abschließende Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun konnte das Ki-67-Protein visualisiert werden.

### **2.11.3 Gefäßdichte (CD31)**

Cluster of Differentiation 31 (CD31) ist ein Zelladhäsionsmolekül, das vor allem auf Endothelzellen exprimiert wird. Es ist auch unter dem Namen platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) bekannt. Eine besonders hohe Konzentration der Moleküle befindet sich an Zell-Zell-Verbindungen, weshalb CD31 als Marker der Gefäßdichte geeignet ist (71). Die immunhistochemische Aufarbeitung von CD31 erfolgte größtenteils analog zu dem oben beschriebenen Ablauf bei Ki-67. So erfolgten auch hier eine Antigendemaskierung und ein Peroxidaseblock. Die Gewebsschnitte wurden über Nacht mit anti-CD31-Antikörper (1:50; ab28364, Abcam, Cambridge, Großbritannien) inkubiert. Sowohl die Analyse von Ki-67 als auch von CD31 erfolgte mit Envision<sup>TM</sup>+System-HRP AEC/DAB System (DAKO, Hamburg, Deutschland). Als Substrat-Chromogen wurde für die CD31-Färbung das AEC-Chromogen genutzt.

## 2.11.4 Apoptose (TUNEL)

Mit der TUNEL-Methode lassen sich Brüche in den DNA-Strängen apoptotischer Zellen nachweisen (72). Dazu wurden die freien 3'OH-Gruppen der gebrochenen Stränge mit fluoreszierenden Nukleotiden durch Nutzung eines TUNEL-Assays (In situ Cell Death Detection Kit, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) gekoppelt. Zunächst wurde für die Färbung eine Rehydrierung und Entparaffinierung der Paraffinschnitte vorgenommen. Anschließend folgte eine 30-minütige Inkubation mit einer Pepsin-Lösung (DAKO; Hamburg, Deutschland). Danach wurden die Antigene mit Citrat-Puffer in einem Wasserbad mit einer Wassertemperatur von 100 °C demaskiert. Darauf folgte die eigentliche TUNEL-Färbung durch Anwendung des TUNEL-Assays entsprechend der Angaben des Herstellers. Zuletzt wurden die Schnitte mit Vecta Shield® antifade mounting medium with DAPI (VectorLabs, Burlingame, CA) als Trägermedium eingedeckt und bei 4 °C erneut für mindestens 1 h inkubiert. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff, der an DNA bindet. Die fluoreszierenden gebrochenen Stränge konnten nun unter einem Fluoreszenz-Mikroskop quantifiziert werden.

## 2.11.5 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31-Doppelfärbung

Um zu belegen, dass sich die angefärbten  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine auf Endothelzellen und nicht auf Tumorzellen befanden, erfolgte eine  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31-Doppelfärbung. CD31 ist ein Adhäsionsmolekül und wird vor allem auf der Oberfläche von Endothelzellen, Thrombozyten, Monozyten, Leukozyten und T-Zellen exprimiert (71). Da das Molekül auf Tumorzellen nicht exprimiert wird, konnte eine Kolokalisation mit  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin zeigen, dass sich die angefärbten Integrine nicht auf Tumorzellen befanden. Der Ablauf der Doppelfärbung entsprach zunächst dem der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Färbung. Auch

diese Kryoschnitte wurden in Aceton bei -20 °C fixiert und die endogene Peroxidase geblockt. Darauf folgte die Inkubation mit einem anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antikörper (LM609: 1:50, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) und einem anti-CD31-Antikörper (1:50; Abcam, Cambridge, Großbritannien) bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurden die Schnitte zusätzlich mit einem sekundären Ziegen anti-Maus-Antikörper (Alexa Fluor 488: 1:500; Abcam, Cambridge, Großbritannien) sowie mit einem sekundärem Esel anti-Kaninchen-Cy3™-Antikörper (1:300; Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA) inkubiert. Nach einer Kernfärbung mit DAPI (1 µg/ml; Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Eindeckung mit Fluoromount™ (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) konnten auch diese Schnitte ausgewertet werden.

## **2.11.6 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen**

Zur Analyse der Färbungen von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, CD31, Ki-67 und der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-/CD31-Doppelfärbung wurde ein hochauflösendes Mikroskop (DM 2500, Leica, Camera AG, Wetzlar, Deutschland) verwendet. In zehn zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern (High Power Fields, HPF) wurden die gefärbten Parameter in 200-facher Vergrößerung quantifiziert. Zur Auszählung der apoptotischen Zellen in der TUNEL-Färbung wurde ein Fluoreszenzfilter (520±20 nm) eingesetzt.

## **2.12 Validierung der Bindungsspezifität von $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> in MDA-MB-231-Xenografts mit Autoradiographie und Immunfluoreszenz**

Die Validierung der Bindungsspezifität von  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> in MDA-MBA-231-Xenografts an die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren erfolgte durch zwei aufeinanderfolgende Arbeitsschritte. Zunächst wurden die Tumorschnitte mit dem Radiotracer  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> inkubiert. Bei der Hälfte der Tumorschnitte wurden die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-

Rezeptoren mit einem spezifischen Antikörper blockiert. Darauf folgte eine Bildgebung mit Autoradiographie. Im zweiten Schritt wurde zur Bestätigung der spezifischen Blockade der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren eine  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Fluoreszenz-Färbung durchgeführt. 6  $\mu\text{m}$  dicke Kryoschnitte der Tumoren wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die Hälfte der Tumorschnitte für 1 Stunde mit einem primären Anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antikörper (LM609: 1:20, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Tumorschnitte mit Bindepuffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) gewaschen und für 1,5 Stunden luftgetrocknet. Die andere Hälfte der Tumorschnitte wurde, ohne vorangegangene Blockade der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren, mit Bindepuffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) gewaschen und für 1,5 Stunden luftgetrocknet. Alle Tumorschnitte wurden anschließend mit  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> (5 MBq in 50 ml Tris-HCl 50 mM) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, mit Bindepuffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) gewaschen und bei Raumtemperatur für 1 Stunde luftgetrocknet. Die Schnitte wurden für 2,5 Stunden auf Autoradiographie-Bildplatten (BAS cassette2 2025 imaging plates, Fujifilm, Tokio, Japan) gelegt und mit Autoradiographie (25  $\mu\text{m}$  Auflösung, CR-35-BIO, Elysia-Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) ein Autoradiogramm erstellt. Die Bildanalyse erfolgte mit einer Nachbearbeitungssoftware (AIDA image analyzing software V4.50, Elysia-Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland). Es wurde sowohl bei der Hälfte der Tumorschnitte mit blockierten  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen als auch bei der Hälfte der Tumorschnitte ohne Blockade die Signalintensität in einem festgelegten Areal ermittelt. Dazu wurde die Signalintensität des Hintergrunds von der des Zielareals subtrahiert. Das Verhältnis der Signalintensitäten zwischen den Tumorschnitten mit und ohne Rezeptorblockade wurde berechnet.

Im zweiten Schritt erfolgte zur Validierung der spezifischen Blockade der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren aus dem ersten Arbeitsschritt eine  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Fluoreszenz-Bildgebung. Alle Tumorschnitte wurden mit primären anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antikörper (LM609, 1:50, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde ein sekundärer Antikörper hinzugefügt (Ziegen anti-Maus-IgG Alexa Fluor 488, 1:500; Abcam, Cambridge, Großbritannien; Esel anti-Kaninchen Cy3<sup>TM</sup>, 1:300; Jackson ImmunoResearch Inc., West Grove, PA). Zur Analyse der Tumorschnitte wurde ein präklinisches optisches Bildgebungssystem (In-Vivo FX PRO, Bruker Corp., Billerica, MA) mit einer CCD-Kamera (Anregungsfilter 480 nm, Emissionsfilter 535 nm, Gesichtsfeld 200 mm, Brennebene 11 mm, 2x x-binning, 2x y-binning, 130 x 130 ppi) genutzt. Die Fluoreszenzbildgebung wurde visuell analysiert und qualitativ interpretiert.

## 2.13 Statistik

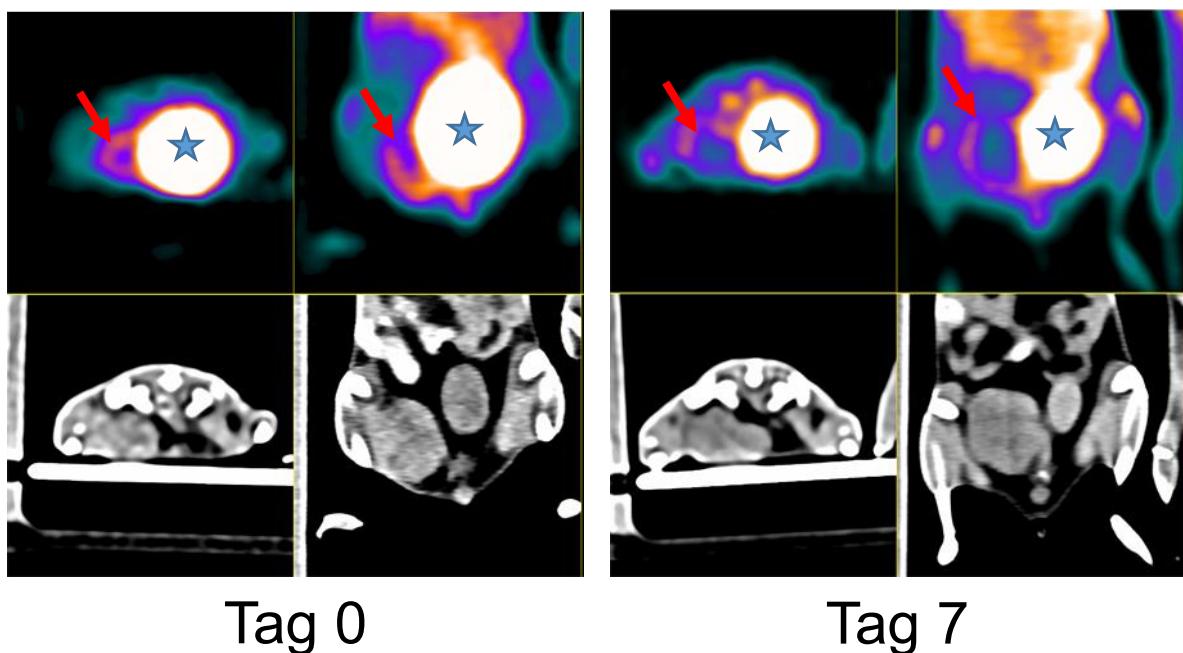
Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS 23 für Windows (IBM Corp., Armonk, NY) genutzt. Mit nichtparametrischen Wilcoxon/Mann-Whitney-U-Tests wurde überprüft, ob die Differenzen innerhalb der Therapie- oder Kontrollgruppe ( $\Delta TBR_{\text{Follow-Up/Baseline Therapie}}$ ,  $\Delta TBR_{\text{Follow-Up/Baseline Kontrolle}}$ ) und zwischen Therapie- und Kontrollgruppe ( $TBR_{\text{Baseline Therapie}}$  vs  $TBR_{\text{Baseline Kontrolle}}$ ;  $TBR_{\text{Follow-Up Therapie}}$  vs  $TBR_{\text{Follow-Up Kontrolle}}$ ,  $\Delta TBR_{\text{Follow-Up/Baseline Therapie}}$  vs  $\Delta TBR_{\text{Follow-Up/Baseline Kontrolle}}$ ) statistisch signifikant sind. Eine statistische Untersuchung erfolgte mit oben genannten Tests für die PET/CT-Daten ( $TBR$ , Tumorvolumen) sowie die immunhistochemischen Untersuchungen ( $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, Mikrogefäßdichte, Zellproliferation, Apoptose). Die linearen Korrelationen zwischen nicht-normalverteilten Variablen wurden mit dem Spearman-Test untersucht. Die Signalintensitäten der geblockten und nicht geblockten Tumorschnitte in der Autoradiographie wurden mit abhängigen t-

Tests verglichen. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p<0.05$  als statistisch signifikant festgelegt. Die quantitative Beschreibung der Daten erfolgte durch die Mittelwerte und die Standardabweichungen (SD) bei einem Konfidenzintervall von 95 %.

### 3 Ergebnisse

### 3.1 $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT

Zur Analyse der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der PET wurde die Anreicherung des Radiotracers  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> im Tumor und zum Vergleich in einem Muskel der hinteren Extremität gemessen. Abbildung 12 zeigt die PET/CT-Datensätze eines Tieres aus der Therapiekohorte an Tag 0 und an Tag 7. In Tabelle 1 werden die TBR-Werte der Baseline- und der Follow-Up-Untersuchung und die Änderung der TBR zwischen den beiden Messzeitpunkten für jedes Tier aus der Therapie- und Kontrollkohorte gezeigt.



**Abb. 12:  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT-Bilder Baseline- und Follow-Up in der Therapiegruppe.** PET- (obere Reihe) und native CT-Bildgebung (untere Reihe) zur Baseline- (links) und Follow-Up-Untersuchung (rechts). Die Anreicherung des Tracers im Tumor (Pfeil) ist nach einwöchiger Therapie deutlich reduziert. Der Radiotracer wird renal eliminiert und ist in der Blase deutlich sichtbar (Stern).

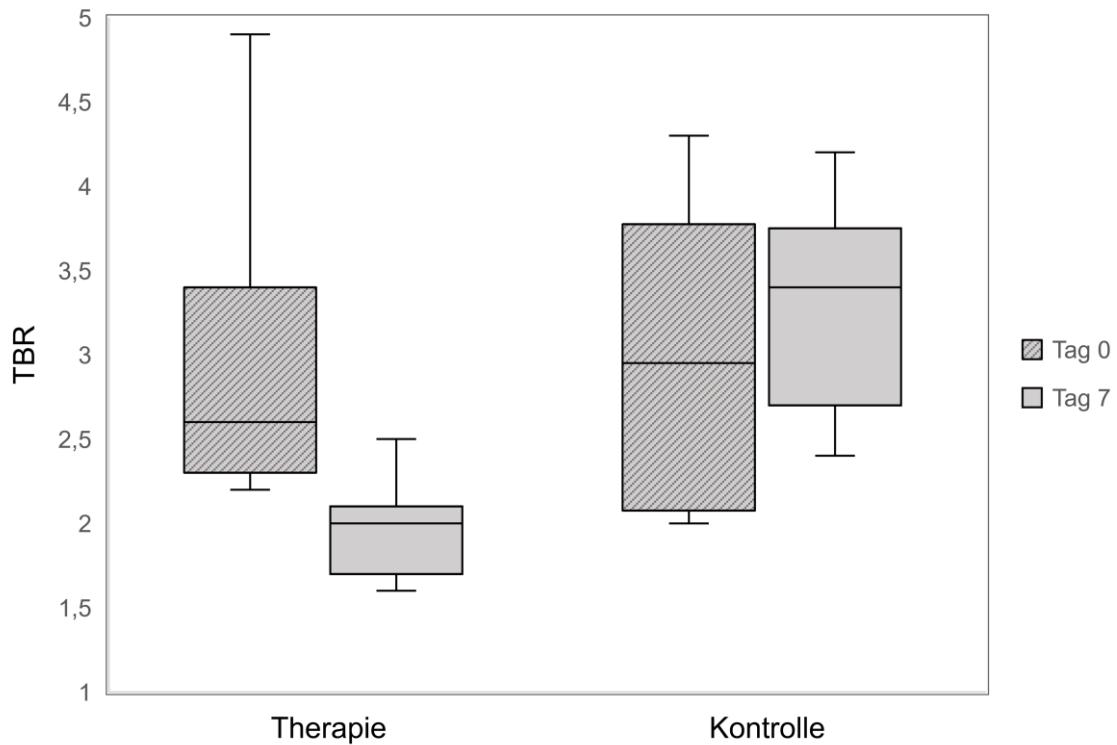
Tiernummer	TBR <sub>Baseline</sub>	TBR <sub>Follow-Up</sub>	ΔTBR <sub>Follow-Up/Baseline</sub>
<b>Therapie</b>			
1	2,5	2,0	-0,5
2	3,4	1,6	-1,8
3	4,9	2,5	-2,4
4	2,2	1,9	-0,3
5	2,3	2,1	-0,2
6	2,6	1,7	-0,9
7	3,4	2,0	-1,4
<b>Mittelwert±SD<sup>1</sup></b>	<b>3,04±0,95</b>	<b>1,97±0,29</b>	<b>-1,07±0,83</b>
<b>Kontrolle</b>			
11	2,5	3,6	+1,1
12	2,0	2,4	+0,4
13	2,1	3,4	+1,3
14	4,3	2,8	-1,5
15	3,4	3,4	0
16	3,6	4,2	+0,6
<b>Mittelwert±SD<sup>1</sup></b>	<b>2,98±0,92</b>	<b>3,30±0,63</b>	<b>+0,32±1,01</b>

<sup>1</sup>SD=Standardabweichung

**Tabelle 1** TBR an Tag 0 sowie an Tag 7 und ΔTBR zwischen beiden Messzeitpunkten.

In der Therapiegruppe kam es bei allen sieben Versuchstieren zu einer signifikanten Abnahme der ΔTBR<sub>Follow-Up/Baseline</sub> ( $3,04\pm0,95$  zu  $1,97\pm0,29$ ,  $p=0,022$ ). In der Kontrollgruppe kam es zu einer Zunahme der ΔTBR bei n=4 Tieren. Bei einem Tier

(Nummer 15) veränderte sich die  $\Delta TBR$  über den Zeitraum nicht und bei einem anderen Versuchstier (Nummer 14) nahm  $\Delta TBR_{\text{Follow-Up/Baseline}}$  mit  $-1,50$  ab. Insgesamt nahm die TBR in der Gruppe nicht signifikant zu ( $2,98 \pm 0,92$  auf  $3,30 \pm 0,63$ ,  $p=0,500$ , Abb. 13).



**Abb. 13: Boxplot-Diagramm zur TBR in der Baseline- und Follow-Up-Messung.** Es kam zu einer signifikanten Abnahme der TBR in der Therapiegruppe von Tag 0 zu Tag 7 ( $p=0,018$ ). Die Änderung der TBR zwischen den Messzeitpunkten in der Kontrollgruppe war mit  $p=0,500$  nicht signifikant. Im Vergleich gab es keinen signifikanten Unterschied der TBR zum Zeitpunkt der Baseline-Messung zwischen Therapie- und Kontrollgruppe ( $p=0,836$ ).

$\Delta TBR_{\text{Follow-Up/Baseline}}$  zwischen den Messpunkten unterschied sich zwischen den Versuchsgruppen signifikant ( $\Delta TBR_{\text{Follow-Up/Baseline}}$  Therapie  $-1,07 \pm 0,83$  und  $\Delta TBR_{\text{Follow-Up/Baseline}}$  Kontrolle  $+0,32 \pm 1,01$ ;  $p=0,022$ ).

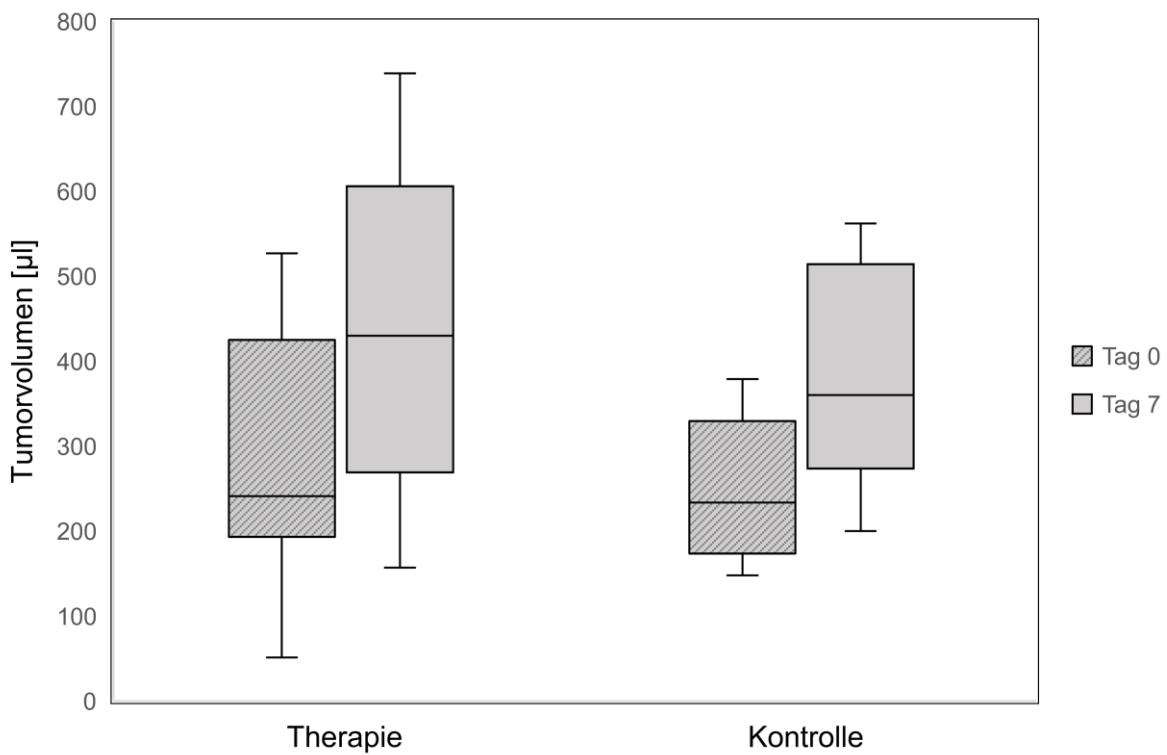
### 3.2 Tumorvolumen

Es gab zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen dem Tumorvolumen in der Therapie- und Kontrollgruppe. Sowohl zum Zeitpunkt der Baseline-Untersuchung (Tumorvolumen<sub>Therapie</sub>  $289 \pm 162 \mu\text{l}$  und Tumorvolumen<sub>Kontrolle</sub>  $248 \pm 89 \mu\text{l}$ ,  $p=0,628$ ) als auch zur Follow-Up-Untersuchung (Tumorvolumen<sub>Therapie</sub>  $423 \pm 203 \mu\text{l}$  und Tumorvolumen<sub>Kontrolle</sub>  $380 \pm 132 \mu\text{l}$ ) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im mittleren Tumorvolumen. Die in beiden Gruppen nachzuweisende Volumenzunahme von der Baseline- bis zur Follow-Up-Untersuchung unterschied sich ebenfalls nicht signifikant ( $\Delta\text{Volumen}_{\text{Therapie}} = 134 \pm 77 \mu\text{l}$  und  $\Delta\text{Volumen}_{\text{Kontrolle}} = 132 \pm 56 \mu\text{l}$ ,  $p=1,000$ ). Während sich die  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin-Expression nach der einwöchigen Therapie mit Bevacizumab signifikant von der nach einer Placebo-Einnahme unterschied, gab es keine Unterschiede in der Volumenänderung der Tumoren. Tabelle 2 zeigt die Tumorvolumina der einzelnen Versuchstiere zu den Zeitpunkten der Baseline- und der Follow-Up-Untersuchung sowie  $\Delta\text{Volumen}$  über den Zeitraum zwischen den Messungen. Das Boxplot-Diagramm Abb. 14 veranschaulicht die geringen Differenzen im Tumorvolumen zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Baseline- und Follow-Up-Untersuchungen. Nur eine sehr geringe Korrelation zeigte sich zwischen Tumorvolumen und TBR bei der Baseline- und Follow-Up-Messung, die nicht signifikant war (Spearmans  $p= -0,023$ ;  $p=0,261$ ).

Tier Nummer	Volumen Baseline [ $\mu$ l]	Volumen Follow- Up [ $\mu$ l]	$\Delta$ Volumen [ $\mu$ l]
<b>Therapie</b>			
<b>1</b>	207	291	+84
<b>2</b>	527	739	+212
<b>3</b>	425	606	+181
<b>4</b>	193	430	+237
<b>5</b>	241	269	+28
<b>6</b>	51	157	+106
<b>7</b>	378	469	+91
<b>Mittelwert<math>\pm</math>SD<sup>1</sup></b>	<b>289<math>\pm</math>162</b>	<b>423<math>\pm</math>203</b>	<b>+134<math>\pm</math>77</b>
<b>Kontrolle</b>			
<b>11</b>	182	298	+116
<b>12</b>	148	200	+52
<b>13</b>	194	364	+170
<b>14</b>	379	562	+183
<b>15</b>	313	498	+185
<b>16</b>	273	356	+83
<b>Mittelwert<math>\pm</math>SD<sup>1</sup></b>	<b>248<math>\pm</math>89</b>	<b>380<math>\pm</math>132</b>	<b>+132<math>\pm</math>56</b>

<sup>1</sup>SD=Standardabweichung

**Tabelle 2** Tumorvolumen in der Baseline- und Follow-Up-Untersuchung und  $\Delta$ Volumen



**Abb. 14: Tumorvolumen in Therapie- und Kontrollgruppe an Tag 0 und Tag 7.** Zwischen Baseline-Messung (schraffiert) und Follow-Up-Messung kam es sowohl bei der Therapie- (links) als auch bei der Kontrollgruppe (rechts) zu einem Tumorvolumenanstieg ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=1,000$ ).

### 3.3 Immunhistochemie

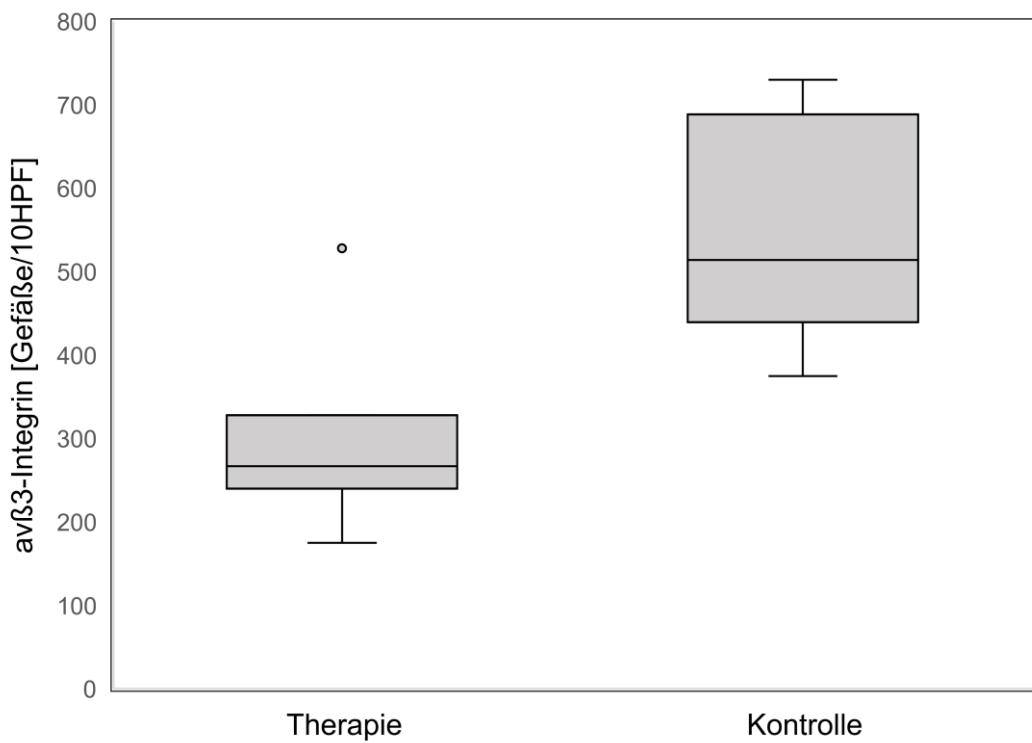
In der Immunhistochemiekohorte bildeten die Tiere mit den Nummern 21, 22, 23, 24, 25 und 26 die Therapiegruppe. Die Tiere mit den Nummern 31, 32, 33, 34, 35 und 36 wurden der Kontrollgruppe zugeordnet. Es wurden zur Quantifizierung der  $\alpha\beta_3$ -Integrin-, CD31-, Ki-67- Expression und Apoptose die Tumorschnitte angefärbt und je 10 verschiedene Gesichtsfelder (High Power Fields, HPF) mikroskopisch betrachtet.

### 3.3.1 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin

Die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression war nach der einwöchigen Therapie mit Bevacizumab insgesamt signifikant niedriger als nach der Gabe einer äquivalenten Menge NaCl. Es wurden die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiv gefärbten Gefäße in jeweils zehn verschiedenen HPF ausgezählt. Sie entsprachen in der Therapiegruppe nach der einwöchigen Behandlung mit Bevacizumab im Durchschnitt etwa der Hälfte der Anzahl in der Kontrollgruppe ( $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in 10 HPF<sub>Kontrolle</sub>  $635,33\pm325$  und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin in 10 HPF<sub>Therapie</sub>  $307,6\pm134,90$ ;  $p=0,03$ ). Diese Werte setzen sich aus der Summe aller  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiv gefärbten Gefäße in 10 HPF pro Tumorschnitt der Therapie- und Kontrollgruppe geteilt durch die Anzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe zusammen (Tabelle 3).

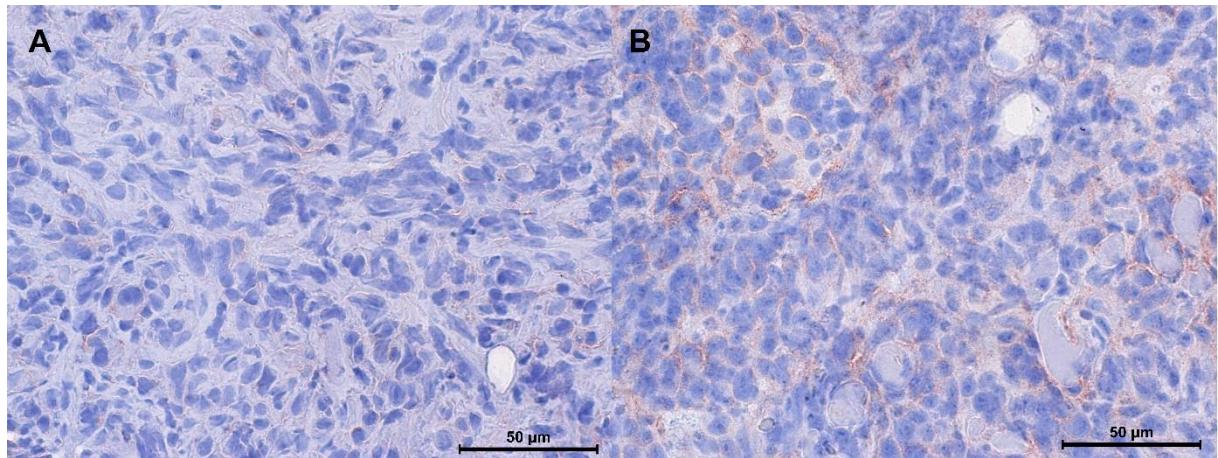
Therapie Tier Nr.	$\alpha_v\beta_3$ -Integrin [Gefäße/10 HPF]	Kontrolle Tier Nr.	$\alpha_v\beta_3$ -Integrin [Gefäße/10 HPF]
21	240	31	730
22	175	32	375
23	-	33	431
24	328	34	564
25	267	35	1248
26	528	36	464
Mittelwert	308	Mittelwert	635
Standardabweichung	$\pm 135$	Standardabweichung	$\pm 325$

**Tabelle 3**  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der Therapie und Kontrollkohorte. Gesamtanzahl der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positiv gefärbten Gefäße in zehn HPF pro Tier.



**Abb. 15: Boxplot-Diagramm zum Vergleich der durchschnittlichen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression zwischen Therapie- und Kontrollkohorte.** Die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression war nach Therapie signifikant geringer als nach Placebogabe.

Auch die in Abbildung 16 als Beispiele eines Tumorschnittes in  $\alpha\beta_3$ -Integrin-Färbung gezeigten histologischen Bilder zeigen signifikant die Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe.



**Abb. 16:  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der Therapie- und Kontrollgruppe.** A) Therapie B) Kontrolle. Die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression war nach einwöchiger Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger.

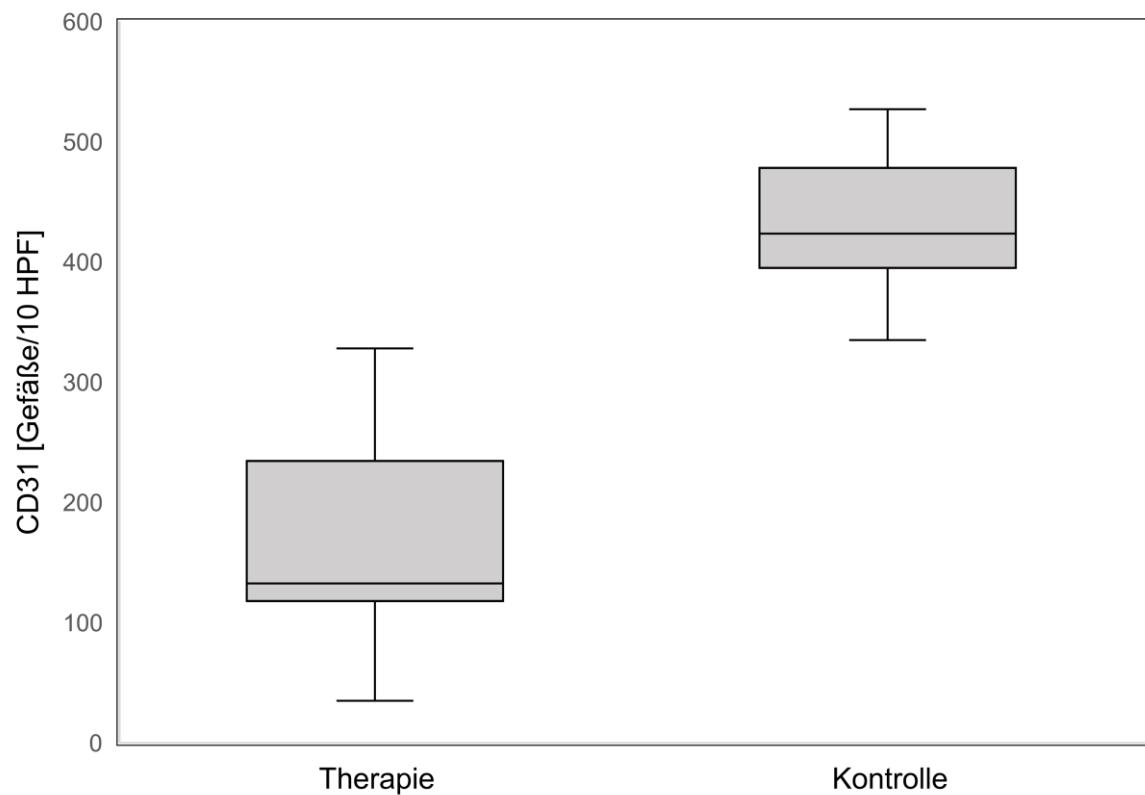
### 3.3.2 Mikrogefäßdichte

Die CD31-Expression als Marker der Gefäßdichte war in der Therapiegruppe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. So wurden in den Paraffinschnitten der den therapierten Tieren entnommenen Tumoren weniger als halb so viele Gefäßendothelzellen mit positiver CD31-Färbung gezählt, wie in der Kontrollgruppe (vgl. Tabelle 4). Für die Anzahl positiver CD31-Zellen wurde der Mittelwert in zehn Gesichtsfeldern pro Tumor für die Kontroll- und Therapiegruppe gebildet (CD31 in 10 HPF<sub>Therapie</sub>  $168 \pm 108$  und CD31 in 10 HPF<sub>Kontrolle</sub>  $432 \pm 70$ ,  $p=0,002$ ).

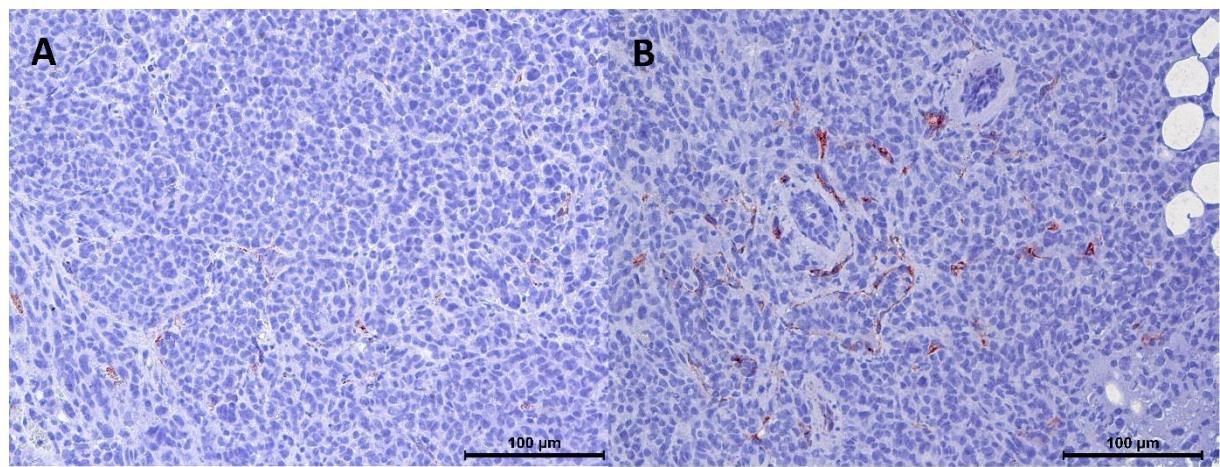
Therapie Tier Nr.	CD31 [Gefäße/10HPF]	Kontrolle Tier Nr.	CD31 [Gefäße/10HPF]
21	35	31	527
22	136	32	491
23	129	33	440
24	328	34	391
25	267	35	407
26	114	36	335
Mittelwert	168	Mittelwert	432
Standardabweichung	±108	Standardabweichung	±70

**Tabelle 4** CD31-positiv gefärbte Endothelzellen in Therapie- und Kontrollgruppe.

Abbildung 17 zeigt den signifikant höheren Anteil der CD31-positiv gefärbten Endothelzellen in der Kontrollgruppe gegenüber der Therapiegruppe. Auch die in Abbildung 18 gezeigten Mikroskop-Aufnahmen wiesen in der Therapiegruppe signifikant weniger CD31-positiv gefärbte Endothelzellen nach als in der Kontrollgruppe.



**Abb. 17: Boxplot-Diagramm zum Vergleich von CD31 in Therapie- und Kontrollgruppe.**  
In der Therapiegruppe war die Mikrogefäßdichte in 10 HPF signifikant geringer als in der Kontrollgruppe.



**Abb. 18: CD31-Färbungen in Therapie- und Kontrollgruppe.** A) Tumorschnitt aus der Therapiegruppe, B) Tumorschnitt aus der Kontrollgruppe. Nach Therapie kam es zu einer signifikant geringeren CD31-Expression.

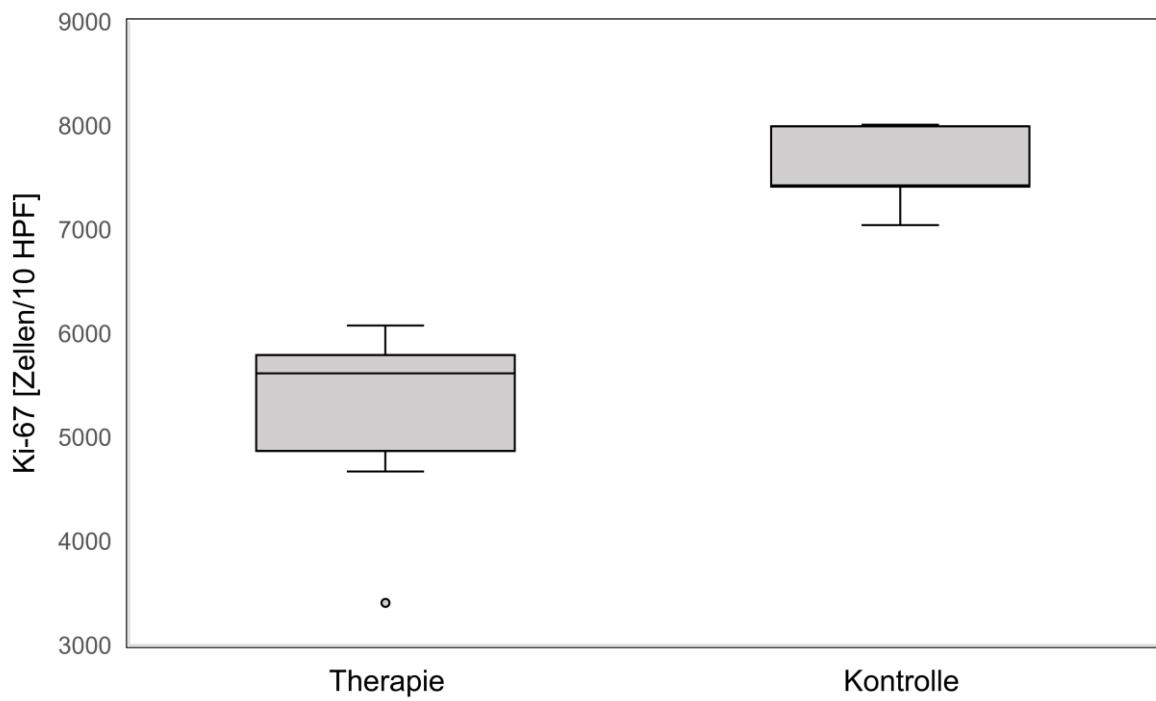
### 3.3.3 Zellproliferation

Die Ki-67-Expression wurde als Parameter zur Quantifizierung der Zellproliferation verwendet. In der Therapiegruppe kam es zu einer signifikanten Abnahme der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ki-67-Expression<sub>Therapie</sub>  $5195 \pm 1002$  und Ki-67-Expression<sub>Kontrolle</sub>  $7574 \pm 418$ ,  $p=0,004$ ). Die in zehn verschiedenen Schnitten gezählten Ki-67-positiv gefärbten Zellen wurden pro Tier summiert und die Mittelwerte innerhalb der jeweiligen Therapie- und Kontrollgruppe berechnet (Tabelle 5).

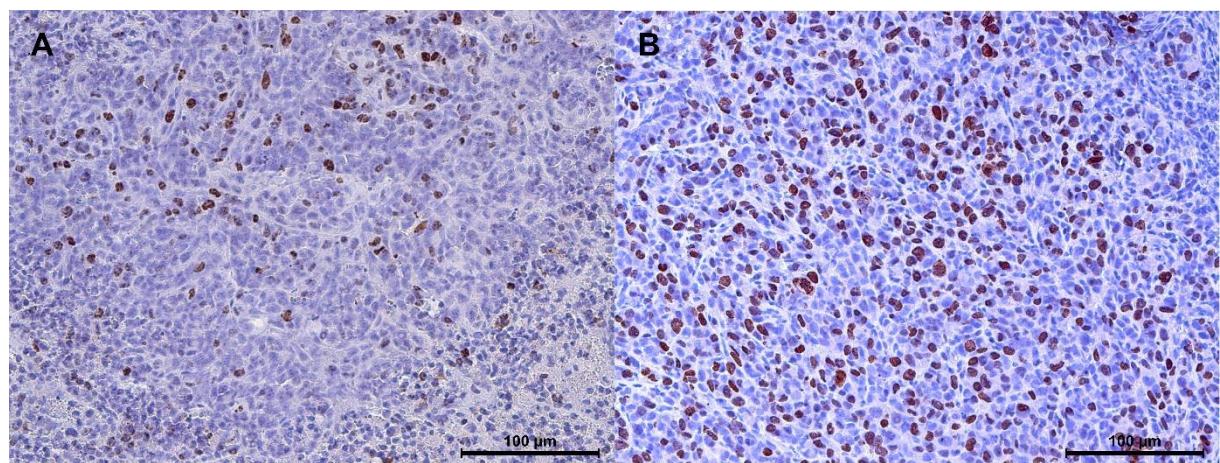
Therapie Tier Nr.	Ki-67 [Zellkerne/10HPF]	Kontrolle Tier Nr.	Ki-67 [Zellkerne/10HPF]
21	5763	31	7422
22	6075	32	7409
23	4669	33	
24	5461	34	8006
25	5800	35	7992
26	3404	36	7039
Mittelwert	5195	Mittelwert	7574
Standardabweichung	$\pm 1002$	Standardabweichung	$\pm 418$

**Tabelle 5** Ki-67 positiv gefärbte Zellen pro Tier.

Abbildung 19 zeigt den signifikant höheren Anteil der Ki-67-positiv gefärbten Zellen in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Therapiegruppe. In den immunhistochemischen Färbungen zeigt sich, dass in der Kontrollgruppe signifikant mehr Zellkerne angefärbt wurden als in der Therapiegruppe (Abb. 20).



**Abb. 19: Boxplot-Diagramm zur Analyse Ki-67 positiv gefärbter Zellen in Therapie (links)- und Kontrollgruppe (rechts). In der Therapiegruppe wurden nach einwöchiger Bevacizumab-Gabe signifikant weniger Ki-67-positiv gefärbte Zellen gezählt als in der Kontrollgruppe nach Placebogabe.**



**Abb. 20: Färbung Ki-67 positiver Zellen.** A) Tumorschnitt der Therapiegruppe B) Tumorschnitt der Kontrollgruppe. Nach einwöchiger Therapie war die Anzahl der angefärbten Ki-67-Proteine (rotbraun) signifikant geringer als nach einwöchiger Placebogabe.

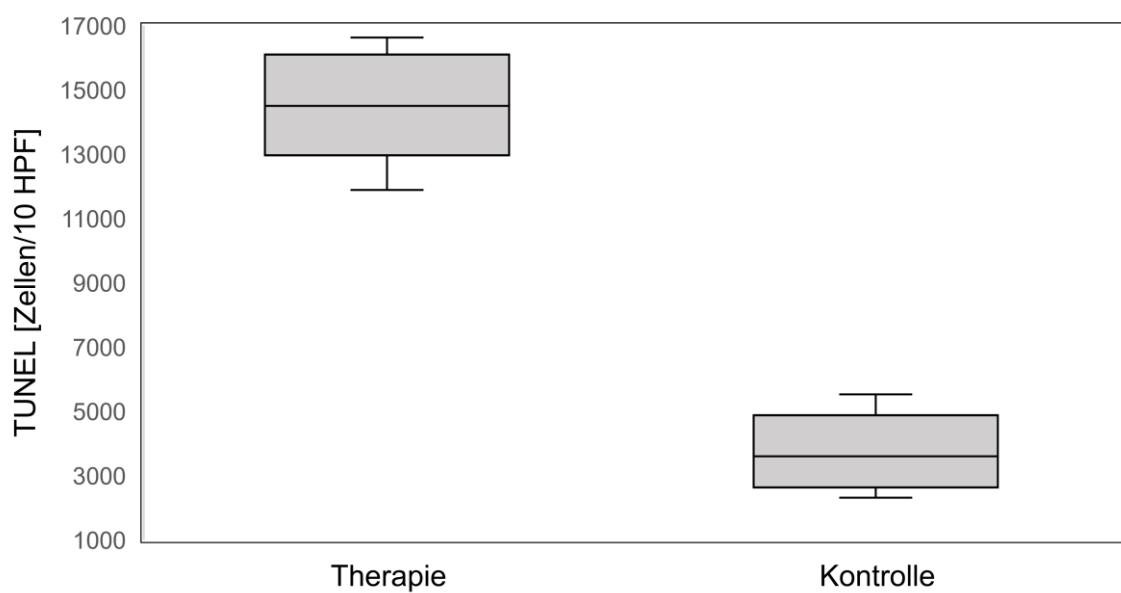
### 3.3.4 Apoptose

In der Therapiegruppe wurden signifikant mehr apoptotische Zellen mit dem TUNEL-Assay nachgewiesen als in der Kontrollgruppe (Apoptose<sub>Therapie</sub> =  $14432 \pm 1974$ , Apoptose<sub>Kontrolle</sub> =  $3776 \pm 1378$ , Tabelle 6).

Therapie Tier Nr.	TUNEL [Zellen/10HPF]	Kontrolle Tier Nr.	TUNEL [Zellen/10HPF]
21	15522	31	2316
22	16623	32	2354
23	16286	33	5255
24	11889	34	3730
25	12795	35	5527
26	13477	36	3476
Mittelwert	14432	Mittelwert	3776
Standardabweichung	$\pm 1974$	Standardabweichung	$\pm 1378$

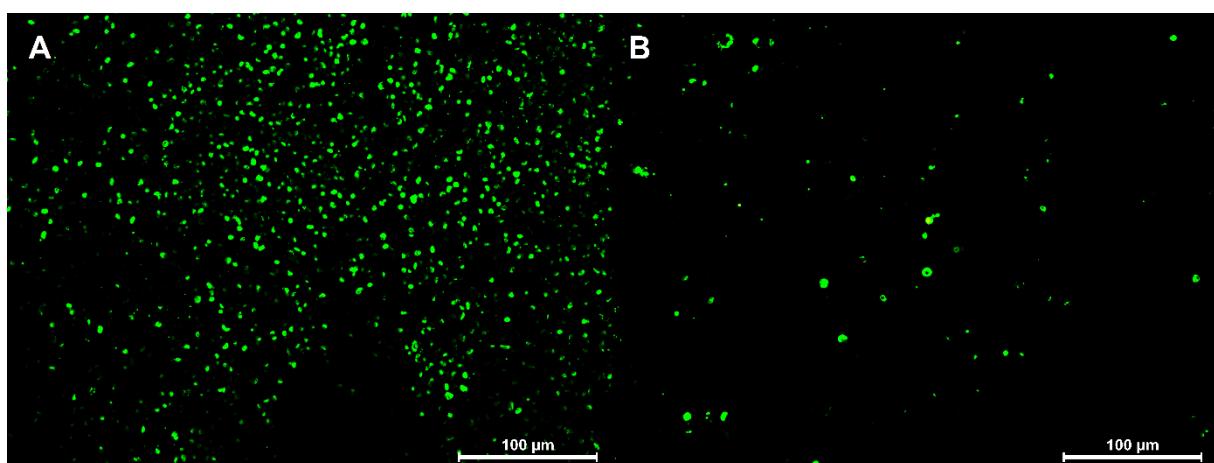
**Tabelle 6** Apoptose in Therapie und Kontrollgruppe. Apoptotische Zellen pro Tier und der jeweilige Gruppendurchschnitt.

Abbildung 21 zeigt den Unterschied der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Die Apoptose stieg nach der Therapie mit Bevacizumab stark an. Im Vergleich dazu weist die Kontrollgruppe nur eine im Verhältnis geringe Anzahl apoptotischer Zellen auf.



**Abb. 21: Boxplot-Diagramm zum Vergleich apoptotischer Zellen in Therapie- und Kontrollgruppe.** Das Diagramm verdeutlicht die signifikante Zunahme apoptotischer Zellen nach Therapie (links) im Vergleich zur Kontrolle (rechts).

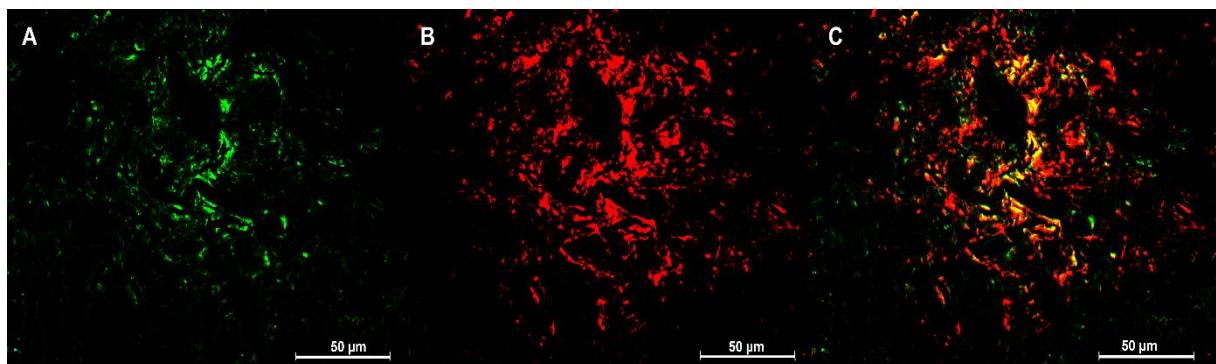
In den immunhistochemischen TUNEL-Färbungen wurde deutlich, dass die Anzahl apoptotischer Zellen nach einwöchiger Therapie höher war als nach einwöchiger Placebogabe (Abb. 22). In den Färbungen zeigten sich die gebrochenen DNA-Stränge in einem fluoreszierenden Grün.



**Abb. 22: Fluoreszierende TUNEL-Färbung.** A) Therapie B) Kontrolle. Nach Therapie ließen sich signifikant mehr apoptotische Zellen (grün) in der Fluoreszenzbildgebung abbilden.

### 3.3.5 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31-Doppelfärbung

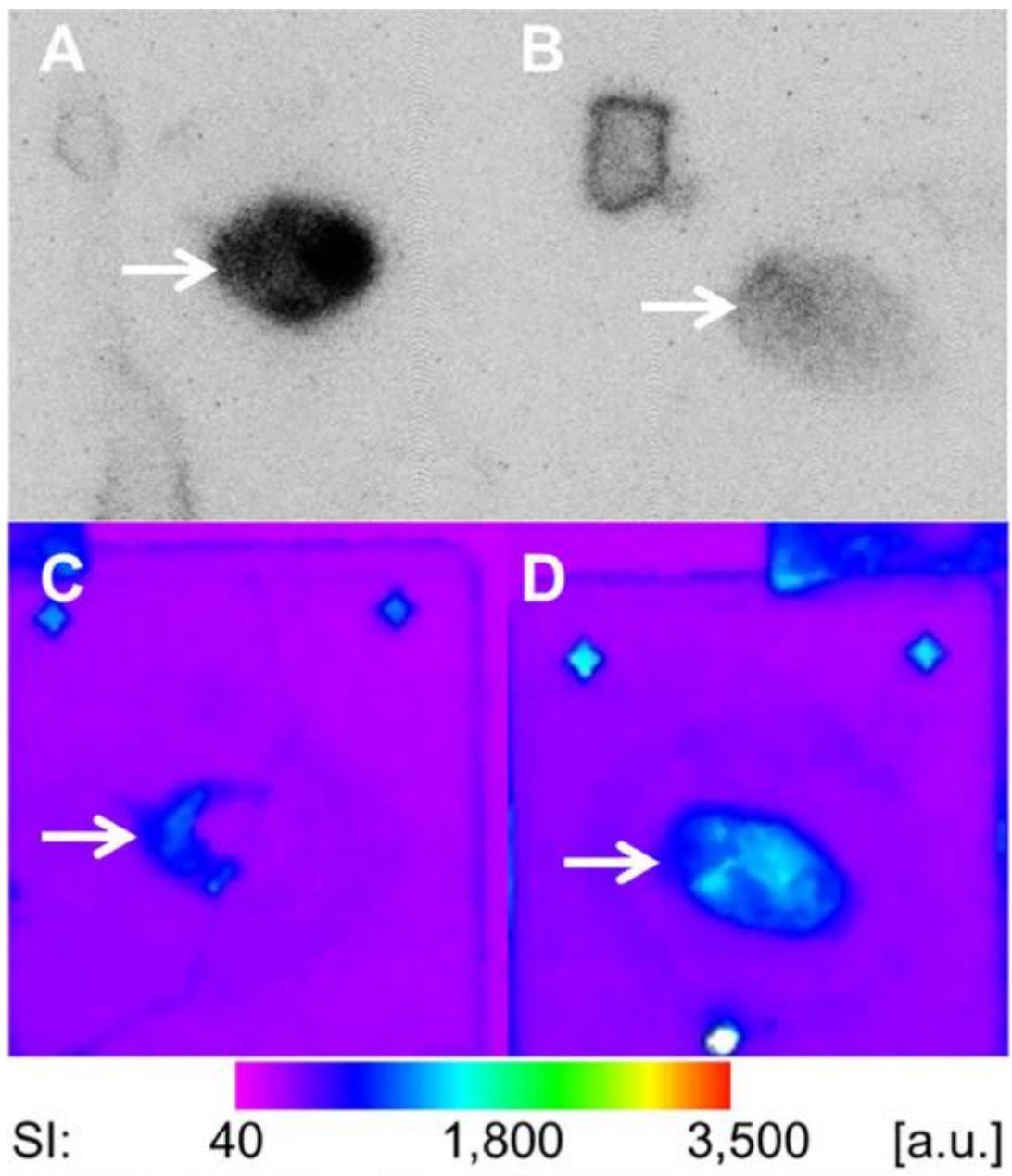
In der fluoreszierenden  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31-Doppelfärbung zeigte sich, dass die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine im verwendeten Tumormodell vorwiegend auf den Gefäßendothelzellen exprimiert wurden (Abb. 23). Dies unterstützte unsere Hypothese, dass die endotheliale  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression für die Zelllinie MDA-MB-231 als Marker der Angiogenese angesehen werden kann.



**Abb. 23: Fluoreszierende  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin/CD31 Doppelfärbung.** A) Fluoreszierende  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Färbung (grün), B) fluoreszierende CD31-Färbung (rot), C) Fusion beider Färbungen zur Koregistrierung. Die Fusion der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin- und CD31-Färbung bestätigt, dass sich angefärbte  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren und angefärbte CD31-Proteine überlagern und somit die gleiche, endotheliale Lokalisation aufweisen.

### 3.3.6 Autoradiographie

Durch die Kombination von Autoradiographie und Immunfluoreszenz konnte die Bindungsspezifität von  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin belegt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Bindung des primären anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antikörpers durch Zugabe des Radiotracers effektiv geblockt wurde. Das Verhältnis der Signalintensität zwischen geblockten und nicht geblockten Tumorschnitten betrug in der quantitativen Auswertung  $2,71 \pm 1,54$  ( $p=0,001$ ). Abbildung 24 zeigt die Autoradiographie eines Tumors mit geblockten und nicht geblockten  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren und die spezifische Fluoreszenzbildgebung derselben Tumorschnitte. Tabelle 7 zeigt die in der Autoradiographie gemessenen Signalintensitäten pro Areal in Tumorschnitten mit geblockten und nicht geblockten Rezeptoren. Diese wurden für den jeweiligen Tumorschnitt zueinander ins Verhältnis gesetzt. Es zeigt sich, dass nach Blockade der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren die gemessene Intensität durchschnittlich um den Faktor 2,71 niedriger war.



**Abb. 24: Validierung der Bindungsspezifität von  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin durch Autoradiographie und Immunfluoreszenz.** Bild A und B zeigen MDA-MB-231-Tumorschnitte (Pfeil) in der Autoradiographie mit nicht geblockten (A) und geblockten (B)  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren nach Inkubation mit  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>. Es zeigt sich ein deutlich niedrigeres Signal nach Blockierung der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren. In Bild C und D werden dieselben Tumorschnitte nach spezifischer  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Immunfluoreszenzfärbung in der Fluoreszenz-Bildgebung dargestellt. Die Tumorschnitte in A/C und B/D sind identisch. SI = Signalintensität, [a.u.] = arbitrary units.

Tumorschnitt Nr.	Nicht geblockt [Intensität/Areal]	Geblockt [Intensität/Areal]	Verhältnis [geblockt/nicht geblockt]
1	17,24	10,57	1,63
2	15,32	11,94	1,28
3	33,51	6,48	5,17
4	20,78	8,09	2,57
5	14,85	11,51	1,29
6	41,75	25,95	1,61
7	41,19	20,22	2,04
8	17,64	3,46	5,10
9	15,32	8,84	1,73
10	20,61	10,29	2,00
11	65,41	16,37	4,00
12	16,55	11,39	1,45
13	98,26	17,08	5,75
14	16,06	7,29	2,20
15	28,20	14,01	2,01
16	35,94	19,55	1,84
17	12,04	5,77	2,01
18	15,71	3,10	5,07
<b>Mittelwert±SD<sup>1</sup></b>	<b>29,24±22,05</b>	<b>11,77±6,14</b>	<b>2,71±1,54</b>

<sup>1</sup>SD=Standardabweichung

**Tabelle 7** Quantitative Analyse der Autoradiographie Blockierungsversuche

## 4 Diskussion

In dieser Studie wurde die  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT zur Untersuchung der anti-angiogenetischen Therapieeffekte von Bevacizumab auf humane orthotope Mammakarzinom-Xenografts in SCID-Mäusen verwendet. Zusätzlich wurde in Korrelation dazu das morphologische Therapieansprechen in der nativen CT untersucht. Zur Validierung der Ergebnisse wurden immunhistochemische Untersuchungen der explantierten Tumoren einer weiteren Versuchstierkohorte durchgeführt. Die signifikant niedrigere Anreicherung von  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> korrelierte mit der signifikant niedrigeren  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der Immunhistochemie-Kohorte nach einwöchiger Therapie. Im Gegensatz dazu nahm sowohl die Anreicherung des Radiotracers als auch die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der Kontrollgruppe nach Gabe eines Placebos innerhalb von einer Woche zu. Das durch CT-Volumetrie ermittelte Tumorvolumen nahm sowohl in der Therapie- als auch in der Kontrollgruppe ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen zu.

### 4.1 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Radiotracer zum Monitoring früher anti-angiogenetischer Therapieeffekte

In den letzten Jahren beschäftigten sich verschiedene Studien mit der Untersuchung von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifischen Radiotracern zum Monitoring anti-angiogenetischer Therapieeffekte in unterschiedlichen Tumormodellen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ein Monitoring früher anti-angiogenetischer Therapieeffekte auf ein Mammakarzinom-Xenograft im Mausmodell mit der  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET möglich ist und über die Morphologie hinaus eine rezeptorbasierte Tumorcharakterisierung unter Therapie erlaubt. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Shi et al., die  $^{68}\text{Ga}$ -3P-

(RGD)<sub>2</sub> als Radiotracer zur Detektion anti-angiogenetischer Therapieeffekte von Endostatin untersuchten (73). Dabei wurde ein in Mäusen implantiertes Lewis-Lungenkarzinom Xenograft als Tumormodell genutzt. Nach 3, 7, 14 und 21 Tagen wurden PET/CT-Untersuchungen mit dem Radiotracer <sup>68</sup>Ga-3P-(RGD)<sub>2</sub> durchgeführt. Zur Kontrolle wurde in identischen Untersuchungen der etablierte Radiotracer <sup>18</sup>F-FDG verwendet. Es wurde festgestellt, dass der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-spezifische Tracer im Gegensatz zu <sup>18</sup>F-FDG deutlich früher ein Ansprechen auf die anti-angiogenetische Therapie registrierte (3 Tage nach Behandlung statt 14 Tage nach Behandlung). So zeigte sich schon nach 3 Tagen ein signifikanter Unterschied in der <sup>68</sup>Ga-3P-(RGD)<sub>2</sub>-Anreicherung zwischen Therapie- und Kontrollgruppe, während mit <sup>18</sup>F-FDG zu diesem Zeitpunkt keine wesentlichen Unterschiede zwischen therapierten und nicht therapierten Tieren ersichtlich wurden. Zur immunhistochemischen Validierung der Ergebnisse wurden Westernblots und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Es zeigte sich eine niedrigere  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression und Gefäßdichte nach Therapie mit dem Angiogeneseinhibitor. Die Ergebnisse decken sich mit den in dieser Arbeit erhobenen PET/CT- sowie Immunhistochemie-Daten.

Maschauer et al. verwendeten einen auf RGD basierenden Radiotracer, 2(<sup>18</sup>F)FGlc-RGD, zur Untersuchung der Therapieeffekte von Panobinostat, einem Pan-Deacetylase-Inhibitor auf die gastrointestinalen Tumormodelle HT29 und HepG2 (74). In vitro wurde in beiden Zelllinien die Zellproliferation durch das Medikament gehemmt. Allerdings konnte nur in der Kohorte des hepatzellulären Karzinoms HepG2 eine signifikante Änderung der Radiotraceraufnahme in der PET festgestellt werden. In der zweiten Tierkohorte mit Kolonkarzinomen (HT29) konnte über elf Tage kein Therapieeffekt mit PET nachgewiesen werden. Immunhistochemisch zeigten sich in HT29-Tumorzellen im Gegensatz zu HepG2-Tumorzellen hinsichtlich der Gefäßdichte

und Zellproliferation nur geringe Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Die Autoren führen dies darauf zurück, dass der gastrointestinale Tumor weniger sensitiv auf den Pan-Deacetylase-Inhibitor reagiert. Im Westernblot war die Caspase-3-Aktivität der HT29-Tumorzellen nach Therapie ebenfalls deutlich geringer als die der HepG2-Tumorzellen. Caspase-3 ist eine Protease, die als Marker der Apoptose qualifiziert ist (75). Insgesamt kommen die Autoren zu dem Schluss, dass der Radiotracer zum frühtherapeutischen Monitoring des Therapieeffektes von Panobinostat auf HepG2-Tumorzellen im Mausmodell genutzt werden kann. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

Rylova et al. untersuchten das Ansprechen von Plattenepithelkarzinomen auf eine Bevacizumab Therapie mit  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDfk)-PET (76). Die Autoren verwendeten zwei verschiedene Plattenepithelkarzinomzelllinien, die, wie die in dieser Studie verwendete Zelllinie, nur gering  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin exprimieren. Es zeigte sich, dass die Tierkohorte mit der Zelllinie A-431 einen signifikanten Anstieg der Tracer-Anreicherung an Tag 7 in der PET-Bildgebung nach der anti-angiogenetischen Therapie aufwies, die auch nach dreiwöchiger Therapie nicht abnahm. Bei Tieren mit der Plattenepithelkarzinomzelllinie FaDu, konnten hingegen nur minimale Unterschiede in der  $^{68}\text{Ga}$ -NODAGA-c(RGDfk) Anreicherung festgestellt werden. Rylova et al. kamen zu dem Schluss, dass der Radiotracer nicht zwangsläufig zum Monitoring eines die Angiogenese inhibierenden Therapieeffekts auf Tumoren genutzt werden kann. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass die Ergebnisse der PET-Bildgebung nicht die reelle  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression widerspiegeln.  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin kann sich in zwei verschiedenen Status, einem Ruhe- und einem aktivierte Status, befinden. Dabei ändert sich die Bindungsaaffinität des Adhäsionsmoleküls zu seinen extrazellulären Liganden. Die intrazellulären Zytoskelettdproteine Talin und Kindlin

wirken bei diesem Prozess als die Hauptmediatoren (22). Ryvola et al. vermuten, dass Bevacizumab  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin aktiviert und dies zu einer gesteigerten Ligandenbindung führt, obwohl die Anzahl der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine nicht ansteigt.

Die Hypothese, dass die Traceranreicherung generell durch den Aktivitätszustand der Integrine beeinflusst wird, teilen auch die Autoren Andriu et al. (77). Sie untersuchten die Anreicherung eines auf RGD-basierenden Radiotracers nach Zugabe von Mangan, das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine aktiviert und nach Zugabe von Calcium mit einer inhibierenden Wirkung. Es zeigte sich eine zunehmende Bindung des Radiotracers an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin nach Aktivierung durch Mangan und eine Abnahme nach Zugabe von Calcium. Ohne Zugabe von Inhibitoren oder Aktivatoren zeigte sich übereinstimmend mit dieser Studie eine Korrelation zwischen Radiotraceranreicherung und  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression. Der von Rylova et al. verwendete Angiogenesehemmer Bevacizumab inhibiert VEGF, der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin aktiviert (78). Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass es trotz der VEGF-Inhibierung durch das Medikament zu einer  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Aktivierung kommt. Zudem wiesen die Tumoren der Zelllinien A-431 und FaDu in den immunhistochemischen Validierungsversuchen weniger  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-positive Gefäßzellen und eine geringere CD31-Expression nach Therapie auf. Auch die Bindungssaffinität der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine zu dem in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper müsste nach der Hypothese der Autoren ansteigen. Eine Möglichkeit, weshalb die Ergebnisse der Autoren verfälscht wurden, könnte sein, dass es zu einer kompetitiven Blockade der Rezeptoren durch die vorangegangene Radiotracerapplikation gekommen ist. Dadurch könnte es zu einer niedrigeren Bindung des zur Färbung der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine verwendeten Antikörpers gekommen sein. Um eine solche Beeinflussung der Ergebnisse zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Studie eine separate Tierkohorte für die immunhistochemischen Validierungsversuche verwendet. Eine weitere

Hypothese, mit der sich die Autoren den Anstieg der Tracer-Anreicherung in der Therapiegruppe erklären, ist, dass es unter Bevacizumab zu einer Normalisierung der Tumorgefäßausbildung kommt. So kann sich der Blutfluss, der vorher durch das schnell wachsende Gefäßsystem turbulent war, normalisieren. Durch die Perfusionsänderung erreiche der Tracer die Gefäße besser als vorher, weshalb es zu einer erhöhten Tracerbindung trotz gesunkenener Gefäßdichte komme. Diese Annahme lässt sich durch eine 2010 veröffentlichte Studie von Bäuerle et al. widerlegen, in der die Autoren zeigten, dass Bevacizumab die Tumorperfusion von Knochenmetastasen der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 signifikant senkt (79). Dementsprechend ist eine gesteigerte Perfusion eine unwahrscheinliche Erklärung für die gestiegene <sup>68</sup>Ga-NODAGA-c(RGDfk)-Anreicherung in der Therapiegruppe der von Rylova et al. veröffentlichten Studie.

## 4.2 Bevacizumab als Angiogenesehemmer

Bevacizumab ist ein monoklonaler humanisierter anti-VEGF-A-Antikörper. Als humanisierte Form des mausspezifischen VEGF-Antikörpers A4.6.1 inhibiert der Angiogenesehemmer humane VEGF-A-Proteine und somit das Tumorwachstum und die Angiogenese humaner Tumorzelllinien (80). Von Mäusen produziertes VEGF-A wird nicht von Bevacizumab gebunden (81). Dementsprechend wird in Mausmodellen mit humanen Tumorzell-Xenografts nur das von den implantierten Zellen gebildete humane VEGF blockiert, nicht aber das von der Maus als Wirtstier exprimierte murine VEGF (82). Gerber et al. stellten die Hypothese auf, dass um eine komplette Inhibition des Tumorwachstums und der Neovaskulisation eines humanen Rhabdomyosarkom-Xenografts im Mausmodell zu erreichen, eine Blockade sowohl des humanen als auch des Wirt-VEGF notwendig sei (83). Sie untersuchten die Wirkung des VEGF-Inhibitors

mFlt(I-3)-IgG, der sowohl humane als auch murine VEGF inhibiert, auf die Tumorzellen und stellten eine komplette Suppression des Tumorwachstums fest. Im Vergleich dazu kam es durch die ausschließliche Inhibierung des humanen VEGF zu einer Reduktion des Tumorwachstums, jedoch nicht zu einer kompletten Suppression. Es zeigt sich somit, dass vom Wirtstier exprimierte VEGF-Proteine Einfluss auf das Wachstum und die Angiogenese des humanen Tumor-Xenografts in Mäusen haben. Liang et al. zeigten in einer Studie zur Untersuchung der Wirkung verschiedener VEGF-Antikörper auf drei humane Tumor-Xenografts in Mäusen, dass der Einfluss des Wirts-VEGF von der Stroma invasion des Tumors abhängig ist (84). So führte Bevacizumab bei einem invasiv wachsenden Pankreaskarzinom zu einer deutlich geringeren Reduktion des Tumorwachstums (< 50 % effektiv), als bei weniger invasiv wachsenden Tumoren, wie einem Rhabdomyosarkom oder einem kolorektalen Karzinom (ca. 90 % effektiv).

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der angiogenetischen Wirkung von Bevacizumab auf humane MDA-MB-231 Mammakarzinom-Xenografts im Mausmodell in der vorliegenden Studie konnte sowohl eine Reduktion der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als auch eine verminderte CD31-Expression festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, in denen die Wirkung des Angiogenesehemmerns auf verschiedene humane Tumorzelllinien in Mausmodellen untersucht wurde (85, 76, 85, 86). Somit kann nach einwöchiger Therapie mit Bevacizumab eine signifikante Reduktion der Angiogenese in diesem Mausmodell belegt werden, obwohl vom Wirtstier gebildetes VEGF nicht blockiert wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einem die Angiogenese fördernden Effekt durch nicht inhibiertes Wirts-VEGF kam. In der vorliegenden Studie konnte in der Therapiegruppe eine signifikant geringere  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression nach einwöchiger Therapie mit Bevacizumab in der  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT gezeigt werden. Dies stützt die Hypothese, dass

Bevacizumab einen anti-angiogenetischen Effekt auf humane MDA-MB-231-Mammakarzinome hat.

#### **4.3 PET/CT im Vergleich zur MRT**

RGD-Peptid-Sequenzen wurden in präklinischen Studien nicht nur in der PET/CT zur Darstellung von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin genutzt, sondern auch in der MRT. Cui et al. untersuchten ein an RGD gekoppeltes Eisenoxid als Kontrastmittel zur spezifischen Darstellung von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (87). Dazu verwendeten die Autoren ein Nasopharynxkarzinom-Xenograft in Mäusen. Sie stellten fest, dass das an RGD gebundene Kontrastmittel die Darstellung des anti-angiogenetischen Therapieeffekts von Endostatin im Mausmodell in der MRT ermöglicht. Dieses Ergebnis korreliert mit einer Studie von Zhang et al., in der ein an RGD gebundenes eisenbasiertes Kontrastmittel den Therapieerfolg eines Angiogenesehemmers auf in Mäuse implantierte humane Glioblastome in der MRT zeigen konnte (88).

Kazmierczak et al untersuchten in einer Parallelstudie die Verwendung eines eisenbasierten Kontrastmittels zur Darstellung der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen im Mausmodell nach Bevacizumab-Therapie in der MRT (89). Das verwendete Maus- und Tumormodell war identisch zur vorliegenden Studie. Auch in dieser Studie war ein frühtherapeutisches Monitoring anti-angiogenetischer Therapieeffekte auf ein Mammakarzinom-Xenograft im Mausmodell möglich und erlaubte über die Morphologie hinaus eine rezeptorbasierte Tumorcharakterisierung unter Therapie. Als Kontrastmittel dienten spezifisch bindende Nanopartikel (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle, USPIO). Nachteile der Verwendung von Nanopartikeln sind eine mögliche Extravasation bei erhöhter Permeabilität von Tumorgefäßen und das Akkumulieren

des Kontrastmittels in umliegendem Gewebe (Enhanced Permeability and Retention (EPR)-Effekt). Eine unspezifische Aufnahme der Eisenpartikel in Zellen des retikulohistiozytären Systems ist möglich und führt zu einer erschweren Unterscheidung der Zielstruktur vom Hintergrund (90). Aus diesen Gründen ist das klinische Translationspotenzial der MRT-Bildgebung mit der Verwendung von USPIO-Kontrastmittel im Vergleich zur  $^{68}\text{Ga}$ -(RGD)<sub>3</sub>-PET geringer. Der Vorteil der MRT-Bildgebung gegenüber der PET/CT ist die nicht vorhandene Strahlenbelastung und ein höherer Weichteilkontrast (91). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die PET eine spezifischere und sensitivere Detektion verschiedener maligner Erkrankungen ermöglicht als die MRT (92, 93).

#### **4.4 Immunhistochemische Validierungsversuche**

Zur Validierung der Ergebnisse der PET/CT erfolgten immunhistochemische in vitro Untersuchungen der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, CD31-Expression, Ki-67-Expression und der Apoptose. Zudem wurde die spezifische Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> an die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptoren durch Autoradiographie bestätigt. Durch die Untersuchung einer separaten Tierkohorte wurde eine kompetitive Blockade der Integrin-Rezeptoren durch die Liganden verhindert. Nach einwöchiger Therapie zeigte sich eine signifikante Abnahme der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, CD31-Expression und Ki-67-Expression. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Autoren Rylova et al., die eine verminderte  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression nach antiangiogenetischer Therapie feststellten und Roland et al., die eine niedrigere CD31-Expression nach einwöchiger Therapie mit Bevacizumab im Mammakarzinommodell zeigen konnten (94, 76).

## 4.5 Ausblick

Um den Weg der RGD-Radiotracer in den klinischen Alltag zu ebnen sind systemische Studien zur humanen klinischen Translation notwendig. In einer Studie von Lopéz-Rodriguez et al. wurde die Biodistribution und Strahlendosis von  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-E[c(RGDfK)]<sub>2</sub> in 5 Probanden untersucht (95). Die Autoren stellten fest, dass die Verwendung des Tracers für den Patienten keine erhöhten Risiken im Vergleich zu anderen Radiotraceren darstellte, solange die Blase regelmäßig entleert wurde. Withofs et al. untersuchten an 27 Patienten mit Nierenkarzinom die Korrelation zwischen der Anreicherung des RGD-Tracers  $^{18}\text{F}$ -FPRGD<sub>2</sub> in der PET und der  $\alpha\beta_3$ -Integrin-, CD31-, CD105- und Ki-67-Expression in der Immunhistochemie (34). Die Patienten wurden präoperativ in der PET/CT untersucht. Anschließend wurden die Tumoren reseziert und immunhistochemisch aufgearbeitet. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Traceranreicherung in der PET und der  $\alpha\beta_3$ -Integrin-Expression in der Immunhistochemie. Ein Rückschluss auf die Angiogenese des Tumors war jedoch nur bei Tumorzelllinien mit geringer zellulärer  $\alpha\beta_3$ -Integrin-Expression möglich. Die Ergebnisse in der vorliegenden Studie im Tiermodell korrelieren mit der klinischen Studie.

Einen anderen Ansatz zum Einsatz von  $\alpha\beta_3$ -Integrin-spezifischen Tracern lieferten Yoon et al. (96). Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie untersuchten die Autoren nicht das Therapiemonitoring, sondern die Korrelation der Bindung von  $^{68}\text{Ga}$ -RGD und  $^{18}\text{F}$ -FDG in der PET/CT zu verschiedenen Brustkrebssubtypen und deren histologischen Prognosefaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass der Standardized Uptake Value (SUV) der  $^{68}\text{Ga}$ -RGD-PET in dem HER2-positiven Patientenkollektiv signifikant höher war. Die genauen Mechanismen für diese Zusammenhänge sind jedoch noch nicht geklärt. Die Korrelation zwischen einer Anreicherung der

Radiotracer in der PET und histologischen Prognosefaktoren könnte eine nicht-invasive Alternative zu Biopsien der Tumoren bieten, um auf den molekularen Phänotyp und Biomarker von Brustkrebspatienten zu schließen. Im Gegensatz zu auf RGD basierenden Radiotracer in der PET/CT gibt es für eisenbasierte RGD-Kontrastmittel in der MRT bisher keine klinischen Patientenstudien. Das geringere klinische Translationspotenzial ergibt sich aus den bereits in Abschnitt 4.3 beschriebenen Risiken der Akkumulation von Nanopartikeln im Gewebe und dem EPR-Effekt.

Auf RGD basierende Radiotracer sind entsprechend der vorliegenden Studie eine vielversprechende Möglichkeit, um die Therapiesteuerung bei Krebspatienten zu verbessern. Daten zur Identifikation der Tumorzelllinien, bei denen RGD-PET zum Therapiemonitoring genutzt werden kann, sollten erhoben werden. Gelingt eine klinische Translation, könnten auf RGD basierende Radiotracer zukünftig das Monitoring früher antiangiogenetischer Therapieeffekte auf Mammakarzinome ermöglichen. Durch individualisierte Therapiesteuerung und die Unterscheidung zwischen Respondern und Non-Respondern könnte hierdurch schon frühtherapeutisch eine Therapieanpassung möglich sein.

## 5 Limitationen

### 5.1 Zelllinie

Die Versuche wurden unter Laborbedingungen an einer Zelllinie durchgeführt, die nur eine geringe zelluläre  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression der Tumorzellen aufweist. Dadurch wurde das Risiko einer möglichen Fehlinterpretation der Ergebnisse durch eine zusätzliche zelluläre Integrin-Expression verringert. In dieser Studie konnten in der  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET die anti-angiogenetischen Therapieeffekte von Bevacizumab auf ein Mammakarzinom-Xenograft der Zelllinie MDA-MB-231 dargestellt werden. Dies ist jedoch nicht uneingeschränkt übertragbar auf Wildtyp-Tumoren mit heterogener  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Ausprägung sowohl auf Gefäßendothelzellen als auch auf Tumorzellen. Eine klare Abgrenzung zwischen Tumor- und Gefäßendothelzellen wäre durch eine zelluläre  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression erschwert. Die Hemmung der Angiogenese könnte durch die Radiotraceranreicherung der Tumorzellen damit nicht mehr eindeutig detektiert und von einer Abnahme der Tumorzellzahl unterschieden werden.

### 5.2 Messzeitpunkte

Des Weiteren fanden nur an zwei verschiedenen Zeitpunkten, an Tag 0 und Tag 7, PET/CT-Untersuchungen statt. So konnte keine dynamische Beurteilung des gesamten Untersuchungszeitraums stattfinden. Für weitere Studien sollte in Erwägung gezogen werden mehr Messzeitpunkte zur Beurteilung des Therapieverlaufs zu etablieren. Dadurch könnten genauere Informationen zur Pathophysiologie des Tumors unter VEGF-inhibierender Therapie gewonnen werden. Zudem könnten Aussagen darüber getroffen werden, ob ein linearer Abfall der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression stattfindet oder ob ein bestimmter Zeitpunkt innerhalb der Woche definiert

werden kann, an dem es zu einer signifikanten Abnahme der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression kommt. Der Messzeitpunkt, zu dem eine Aussage zum frühen Therapieansprechen möglich ist, könnte dadurch optimiert werden.

### **5.3 Immunhistochemische Validierungsversuche**

Die immunhistochemischen Validierungsversuche fanden in einer separaten Tierkohorte statt. Der Radiotracer  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> bindet ebenso wie der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antikörper, der für die immunhistochemische Färbung genutzt wurde, an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine. Um eine kompetitive Blockade der Rezeptoren zu vermeiden, wurden für die Untersuchungen zwei unterschiedliche Kohorten verwendet. Eine direkte Korrelation zwischen den immunhistochemischen Untersuchungsergebnissen und den PET/CT-Daten konnte so nicht untersucht werden. Lediglich eine generelle, aber signifikante Aussage zu der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression, der Gefäßdichte, der Zellproliferation und der Apoptose nach einwöchiger anti-angiogenetischer Therapie konnte getroffen werden. Es lässt sich nicht bestimmen, ob eine besonders niedrige Radiotraceranreicherung in der PET/CT mit einer damit korrelierenden besonders niedrigen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der Immunhistochemie einhergeht. Zudem fand die Explantation der Tumoren nur an Tag 7 statt, sodass eine Baseline-Untersuchung in den immunhistochemischen Validierungsversuchen nicht möglich war. So kann eine Differenz der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression zwischen Therapie- und Kontrollgruppe immunhistochemisch zum Zeitpunkt einer Baseline-Untersuchung nicht ausgeschlossen werden. Würde die Studie mit mehr Tieren in der Versuchsgruppe stattfinden, wäre zu erwägen, ob einigen Tieren die Tumoren zu Zeitpunkten zwischen Tag 0 und 7 entnommen werden, um Aussagen zu der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der Immunhistochemie im Therapieverlauf treffen zu können. Da die Tumorexplantation

mit dem Tod der Tiere einhergeht, hieße dies allerdings, dass die Tiere für spätere Untersuchungen nicht zur Verfügung stehen.

#### **5.4 Spillover-Effekt der Blase**

Ein weiterer limitierender Faktor der vorliegenden Studie ist, dass es durch die renale Ausscheidung von  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> bei einigen Versuchstieren zu einem Spillover-Effekt kam. Wenn der Tumor in der PET-Bildgebung durch die Blase überlagert war, musste dieser überlagerte Anteil des Tumors aus der Analyse ausgeschlossen werden, um eine Verfälschung der Messergebnisse zu vermeiden. Dadurch konnten bei einigen Versuchstieren die Tumoren nicht vollständig in die Auswertung einbezogen werden.

## 6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT zur Untersuchung der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Biomarker der Angiogenese unter VEGF-Inhibition im Mausmodell eingesetzt werden kann. Die Ergebnisse der PET/CT-Untersuchungen konnten durch die immunhistochemischen Versuche validiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese, die Zellproliferation und die Gefäßdichte unter der Therapie mit Bevacizumab signifikant abnahmen, während die Apoptose signifikant zunahm. Durch die Bindung des Radiotracers an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine konnten diese zum Zeitpunkt der Baseline- und Follow-Up-Messung *in vivo* in der PET/CT quantifiziert werden. Daraus lässt sich frühtherapeutisch auf das Therapieansprechen des Tumors auf den Angiogenese-Inhibitor schließen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass eine über die Morphologie hinausgehende Tumorcharakterisierung durch die Verwendung von  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub> zum *in vivo* Monitoring einer Bevacizumab Therapie möglich ist. Es sollten weitere Studien durchgeführt werden, um zu ermitteln bei welchen Tumorzelllinien dieser Radiotracer valide Rückschlüsse auf anti-angiogenetische Therapieeffekte in der PET/CT zulässt. Durch klinische Studien könnte dieses Verfahren nicht nur im Tiermodell eingesetzt werden, sondern zukünftig in der klinischen Routine ein frühes Monitoring der anti-angiogenetischen Therapie beim humanen Mammakarzinom ermöglichen.

## 7 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT zum Monitoring der Therapieeffekte des Angiogenesehemmers Bevacizumab auf experimentelle Mammakarzinom Xenografts in Mäusen untersucht. n=25 SCID-Mäusen wurden humane Mammakarzinomzellen der Zelllinie MDA-MB-231 orthotop in die Milchleiste implantiert. Danach erfolgte eine Randomisierung der Tiere in eine PET/CT- und eine Immunhistochemiegruppe. Die implantierten Tumoren wuchsen auf eine Größe von mindestens 0,5 cm heran. Nach Erreichen der Tumorgröße wurden die Versuchstiere in Therapie- und Kontrollgruppen unterteilt. Die Therapiegruppe erhielt über 6 Tage intraperitoneal eine gewichtsadaptierte Dosis des VEGF-Antikörpers Bevacizumab. Die Kontrollgruppe erhielt intraperitoneal über denselben Zeitraum eine äquivalente Menge 0,9 % NaCl als Placebo. An Tag 0 des Versuchs fand die Baseline-PET/CT statt. Die der PET/CT-Gruppe zugeordneten Mäuse wurden unter Isofluran-Narkose in der PET und anschließend in der CT untersucht. Als Zielparameter wurde in der PET die TBR aus dem Verhältnis der Radiotraceranreicherung im Tumor zu einem Muskel in der hinteren Extremität ermittelt. Zusätzlich wurde das Tumorvolumen in der CT bestimmt. Beide Bildgebungen wurden zur Tumorlokalisierung und Koregistrierung fusioniert. Zwischen der Baseline- und der Follow-Up-Untersuchung erhielten die Versuchstiere über 6 Tage entsprechend der Gruppeneinteilung Bevacizumab oder 0,9 % NaCl. Täglich wurden der Gesundheitsstatus, das Gewicht und die Tumorgröße der Tiere untersucht und protokolliert. An Tag 7 erfolgte die Follow-Up-PET/CT-Untersuchung. Diese verlief analog zur Baseline-Messung. Nach Beenden der Untersuchung erfolgte die Euthanasie der Tiere.

Analog zu der PET/CT-Kohorte erhielt auch die Immunhistochemie-Gruppe, unterteilt in Therapie- und Kontrollgruppe, Bevacizumab oder 0,9 % NaCl. Nach einwöchiger Gabe des Angiogenesehemmers oder des Placebos wurden nach Versuchsbeendigung die Tumoren explantiert und immunhistochemisch auf anti-angiogenetische ( $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression), anti-proliferative (Ki-67) und pro-apoptotische (TUNEL) Effekte sowie die Gefäßdichte (CD31) untersucht.

In der Auswertung der PET/CT-Datensätze zeigte sich, dass die  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-Anreicherung in der Therapiegruppe nach der Therapie signifikant abnahm, während sie in der Kontrollgruppe über diesen Zeitraum anstieg. Das Tumorvolumen unterschied sich zwischen den Gruppen über den gesamten Zeitraum nicht signifikant. Die immunhistochemischen Validierungsversuche ergaben, dass die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression in der Therapiegruppe signifikant niedriger war als in der Kontrollgruppe. Auch die Gefäßdichte und die Zellproliferation waren in der Therapiegruppe signifikant geringer. Die Apoptose war nach der Therapie mit Bevacizumab signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass die  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT frühe anti-angiogenetische Therapieeffekte mit der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Marker der Angiogenese in vivo am Mammakarzinom Xenograft nachweisen kann. Validiert wurde dies durch parallel durchgeführte immunhistochemische Versuche. Es konnte gezeigt werden, dass durch die  $^{68}\text{Ga}$ -TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT eine über die Tumormorphologie hinausgehende rezeptorbasierte Tumorcharakterisierung möglich ist und die endotheliale  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Imaging Biomarker des frühen Therapieansprechens genutzt werden kann.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Staat & Gesellschaft - Todesursachen - Statistisches Bundesamt (Destatis) [cited 2017 Aug 1]. Available from: URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>.
2. Deutsche Krebsgesellschaft (DKG), Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms; 2012. Available from: URL: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/OL/leitlinien.html>.
3. Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, Grunfeld E, Muss HB, Vogel VG et al. American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. *J Clin Oncol* 2006; 24(31):5091–7.
4. Fowler AM, Mankoff DA, Joe BN. Imaging Neoadjuvant Therapy Response in Breast Cancer. *Radiology* 2017; 285(2):358–75.
5. AGO Breast Committee. Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. 2016 [cited 2016 Mar 5].
6. Bonotto M, Basile D, Gerratana L, Pelizzari G, Bartoletti M, Vitale MG et al. Controversies in monitoring metastatic breast cancer during systemic treatment. Results of a GIM (Gruppo Italiano Mammella) survey. *Breast* 2018; 40:45–52.
7. Fournier L, Geus-Oei L-F de, Regge D, Oprea-Lager D-E, D'Anastasi M, Bidaut L et al. Twenty Years On: RECIST as a Biomarker of Response in Solid Tumours an EORTC Imaging Group - ESOI Joint Paper. *Front Oncol* 2021; 11:800547.
8. Hricak H, Choi BI, Scott AM, Sugimura K, Muellner A, Schulthess GK von et al. Global trends in hybrid imaging. *Radiology* 2010; 257(2):498–506.
9. Hicks R, Lau E, Binns D. Hybrid imaging is the future of molecular imaging. *Biomed Imaging Interv J* 2007; 3(3):e49.

10. Czernin J, Allen-Auerbach M, Schelbert HR. Improvements in cancer staging with PET/CT: literature-based evidence as of September 2006. *Journal of Nuclear Medicine* 2007; 48 Suppl 1:78S-88S.
11. Vogsen M, Jensen JD, Christensen IY, Gerke O, Jylling AMB, Larsen LB et al. FDG-PET/CT in high-risk primary breast cancer-a prospective study of stage migration and clinical impact. *Breast Cancer Res Treat* 2021; 185(1):145–53.
12. Tatsumi M, Cohade C, Mourtzikos KA, Fishman EK, Wahl RL. Initial experience with FDG-PET/CT in the evaluation of breast cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; 33(3):254–62.
13. Alavi A, Reivich M. Guest editorial: The conception of FDG-PET imaging. *Semin Nucl Med* 2002; 32(1):2–5.
14. Fowler JS. 18F-FDG Radiosynthesis: A Landmark in the History of PET; 2020.
15. Gulyás B, Halldin C. New PET radiopharmaceuticals beyond FDG for brain tumor imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 56(2):173–90.
16. Kumar R, Dhanpathi H, Basu S, Rubello D, Fanti S, Alavi A. Oncologic PET tracers beyond (18)FFDG and the novel quantitative approaches in PET imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 52(1):50–65.
17. Humphries MJ. Integrin Structure. *Biochem. Soc. Trans* 2000; 28(4):311.
18. Sun C-C, Qu X-J, Gao Z-H. Integrins: players in cancer progression and targets in cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2014; 25(10):1107–21.
19. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69(1):11–25.
20. Bökel C, Brown NH. Integrins in development: moving on, responding to, and sticking to the extracellular matrix. *Dev Cell* 2002; 3(3):311–21.
21. Park EJ, Yuki Y, Kiyono H, Shimaoka M. Structural basis of blocking integrin activation and deactivation for anti-inflammation. *J Biomed Sci* 2015; 22:51.

22. Plow EF, Meller J, Byzova TV. Integrin function in vascular biology. *Current Opinion in Hematology* 2014; 21(3):241–7.
23. 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):234–40.
24. Hood JD, Cheresh DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2(2):91–100.
25. Weibo Cai, Xiaoyuan Chen. PET Imaging of Tumor Integrin Expression. In: 2005 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference - Workshops (CSBW'05); 2005. p. 340–9.
26. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 1995; 270(5241):1500–2.
27. Kumar C. Integrin av $\beta$ 3 as a Therapeutic Target for Blocking Tumor-Induced Angiogenesis. *CDT* 2003; 4(2):123–31.
28. Reinmuth N, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Stoeltzing O, Parikh AA et al. Alphavbeta3 integrin antagonist S247 decreases colon cancer metastasis and angiogenesis and improves survival in mice. *Cancer Res* 2003; 63(9):2079–87.
29. Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ et al. A Mechanism for Modulation of Cellular Responses to VEGF. *Molecular Cell* 2000; 6(4):851–60.
30. Chakravarty R, Chakraborty S, Dash A. Molecular Imaging of Breast Cancer: Role of RGD Peptides. *Mini Rev Med Chem* 2015; 15(13):1073–94.
31. Sloan EK, Pouliot N, Stanley KL, Chia J, Moseley JM, Hards DK et al. Tumor-specific expression of alphavbeta3 integrin promotes spontaneous metastasis of breast cancer to bone. *Breast Cancer Res* 2006; 8(2):R20.
32. Taherian A, Li X, Liu Y, Haas TA. Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. *BMC Cancer* 2011; 11:293.

33. Haubner R, Wester HJ, Weber WA, Mang C, Ziegler SI, Goodman SL et al. Noninvasive imaging of alpha(v)beta3 integrin expression using 18F-labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Res* 2001; 61(5):1781–5.
34. Withofs N, Signolle N, Somja J, Lovinfosse P, Nzaramba EM, Mievis F et al. 18F-FPRGD2 PET/CT imaging of integrin  $\alpha v\beta 3$  in renal carcinomas: correlation with histopathology. *J Nucl Med* 2015; 56(3):361–4.
35. Notni J, Pohle K, Wester H-J. Be spoilt for choice with radiolabelled RGD peptides: Preclinical evaluation of 68 Ga-TRAP(RGD)3. *Nuclear Medicine and Biology* 2013; 40(1):33–41.
36. Quon A, Gambhir SS. FDG-PET and beyond: Molecular breast cancer imaging. *J Clin Oncol* 2005; 23(8):1664–73.
37. Hendrickson EA. The SCID mouse: Relevance as an animal model system for studying human disease. *Am J Pathol* 1993; 143(6):1511–22.
38. Bosma MJ. B and T cell leakiness in the scid mouse mutant. *Immunodefic Rev* 1992; 3(4):261–76.
39. Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:323–50.
40. Shultz LD, Goodwin N, Ishikawa F, Hosur V, Lyons BL, Greiner DL. Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harb Protoc* 2014; 2014(7):694–708.
41. Berry RJ, editor. *Biology of the house mouse: (the proceedings of a symposium held at the Zoological Society of London on 22 and 23 November 1979)*. London: Acad. Pr; 1981. (Symposia of the Zoological Society of London; vol 47).
42. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res* 2011; 13(4):215.

43. Taherian A, Li X, Liu Y, Haas TA. Differences in integrin expression and signaling within human breast cancer cells. *BMC Cancer* 2011; 11(1):293.
44. Nancy Boudreau CM. Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment. *Breast Cancer Research* 2003; 5(3):140.
45. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *Journal of Biochemistry* 2012; 153(1):13–9.
46. Ng Y-S, Krilleke D, Shima DT. VEGF function in vascular pathogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312(5):527–37.
47. S T. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. - PubMed - NCBI [cited 2016 Mar 1]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/pubmed/22130231>.
48. Jiang B-H, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; 97(4):1749–53.
49. Arjaans M, Schröder CP, Oosting SF, Dafni U, Kleibeuker JE, Vries EGD. VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: from bench to bedside. *Oncotarget* 2016; 5(0). Available from: URL: <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=download&path%5B%5D=6918&path%5B%5D=19575>.
50. GN N, al e. Role of angiogenesis in human tumor dormancy: animal models of the angiogenic switch. - PubMed - NCBI [cited 2016 Mar 1]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931911>.
51. Keating GM. Bevacizumab: A review of its use in advanced cancer. *Drugs* 2014; 74(16):1891–925.

52. Wedam SB. Antiangiogenic and Antitumor Effects of Bevacizumab in Patients With Inflammatory and Locally Advanced Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24(5):769–77.
53. Manso L, Moreno F, Márquez R, Castelo B, Arcediano A, Arroyo M et al. Use of bevacizumab as a first-line treatment for metastatic breast cancer. *Curr Oncol* 2015; 22(2):e51–60.
54. Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(10):1252–60.
55. Kawada K, Iwamoto M, Sakai Y. Mechanisms underlying <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose accumulation in colorectal cancer. *World J Radiol* 2016; 8(11):880–6.
56. Jadvar H, Parker JA. *Clinical PET and PET/CT*. London: Springer-Verlag London Limited; 2005. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/b138777>.
57. Schottelius M, Laufer B, Kessler H, Wester H-J. Ligands for mapping alphavbeta3-integrin expression in vivo. *Acc Chem Res* 2009; 42(7):969–80.
58. Liu S. Radiolabeled multimeric cyclic RGD peptides as integrin  $\alpha v \beta 3$  targeted radiotracers for tumor imaging. *Molecular pharmaceutics* 2006; 3(5):472–87.
59. Gallamini A, Zwarthoed C, Borra A. Positron Emission Tomography (PET) in Oncology. *Cancers* 2014; 6(4):1821–89.
60. Avendaño Cervantes G. *Technical fundamentals of radiology and CT*. Bristol: IOP Publishing; 2016. (IOP expanding physics).
61. Schober O, Heindel W, Beyer F. *PET-CT: 37 Tabellen*. Stuttgart: THIEME; 2008. (RRR Referenz-Reihe Radiologie).
62. Danhier F, Le Breton A, Préat V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Molecular pharmaceutics* 2012; 9(11):2961–73.

63. Haubner R, Maschauer S, Prante O. PET radiopharmaceuticals for imaging integrin expression: tracers in clinical studies and recent developments. *Biomed Res Int* 2014; 2014:871609.
64. Notni J, šimeček J, Hermann P, Wester H-J. TRAP, a Powerful and Versatile Framework for Gallium-68 Radiopharmaceuticals. *Chemistry – A European Journal* 2011; 17(52):14718–22. Available from: URL: <http://onlinelibrary.wiley.com.emedien.ub.uni-muenchen.de/doi/10.1002/chem.201103503/full>.
65. 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.
66. Li Z-B, Chen K, Chen X. (68)Ga-labeled multimeric RGD peptides for microPET imaging of integrin alpha(v)beta (3) expression. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35(6):1100–8.
67. Bailey DL, Townsend DW, Valk PE, Maisey MN. *Positron Emission Tomography: Basic Sciences*. Springer London; 2006. Available from: URL: <https://books.google.de/books?id=qxEoHsMgIgoC>.
68. Lang G. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik*. 2., überarb. und aktualisierte Aufl. Wien u.a.: Springer; 2013.
69. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 2000; 182(3):311–22.
70. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol* 2012; 16(3):400–5.
71. Privratsky JR, Newman PJ. PECAM-1: Regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res* 2014; 355(3):607–19.
72. Gavrieli Y. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 1992; 119(3):493–501.

73. Shi J, Jin Z, Liu X, Di Fan, Sun Y, Zhao H et al. PET Imaging of Neovascularization with <sup>68</sup> Ga-3PRGD 2 for Assessing Tumor Early Response to Endostar Antiangiogenic Therapy. *Mol. Pharmaceutics* 2014; 11(11):3915–22.
74. Maschauer S, Gahr S, Gandesiri M, Tripal P, Schneider-Stock R, Kuwert T et al. In vivo monitoring of the anti-angiogenic therapeutic effect of the pan-deacetylase inhibitor panobinostat by small animal PET in a mouse model of gastrointestinal cancers. *Nuclear Medicine and Biology* 2016; 43(1):27–34.
75. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6(2):99–104.
76. Rylova SN, Barnucz E, Fani M, Braun F, Werner M, Lassmann S et al. Does Imaging v 3 Integrin Expression with PET Detect Changes in Angiogenesis During Bevacizumab Therapy? *Journal of Nuclear Medicine* 2014; 55(11):1878–84.
77. Andriu A, Crockett J, Dall'Angelo S, Piras M, Zanda M, Fleming IN. Binding of  $\alpha\beta 3$  Integrin-Specific Radiotracers Is Modulated by Both Integrin Expression Level and Activation Status. *Mol Imaging Biol* 2018; 20(1):27–36.
78. Mahabeleshwar GH, Feng W, Reddy K, Plow EF, Byzova TV. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. *Circ Res* 2007; 101(6):570–80.
79. Bäuerle T, Bartling S, Berger M, Schmitt-Gräff A, Hilbig H, Kauczor H-U et al. Imaging anti-angiogenic treatment response with DCE-VCT, DCE-MRI and DWI in an animal model of breast cancer bone metastasis. *European Journal of Radiology* 2010; 73(2):280–7.
80. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 57(20):4593–9.

81. Gerber H-P, Wu X, Yu L, Wiesmann C, Liang XH, Lee CV et al. Mice expressing a humanized form of VEGF-A may provide insights into the safety and efficacy of anti-VEGF antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104(9):3478–83.
82. Gerber H-P, Ferrara N. Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res* 2005; 65(3):671–80.
83. Gerber HP, Kowalski J, Sherman D, Eberhard DA, Ferrara N. Complete inhibition of rhabdomyosarcoma xenograft growth and neovascularization requires blockade of both tumor and host vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2000; 60(22):6253–8.
84. Liang W-C, Wu X, Peale FV, Lee CV, Meng YG, Gutierrez J 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. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281(2):951–61.
85. Heijmen L, Ter Voert EGW, Punt CJA, Heerschap A, Oyen WJG, Bussink J et al. Monitoring hypoxia and vasculature during bevacizumab treatment in a murine colorectal cancer model. *Contrast Media Mol Imaging* 2014; 9(3):237–45.
86. Bagri A, Berry L, Gunter B, Singh M, Kasman I, Damico LA et al. Effects of anti-VEGF treatment duration on tumor growth, tumor regrowth, and treatment efficacy. *Clin Cancer Res* 2010; 16(15):3887–900.
87. Cui Y, Zhang C, Luo R, Liu H, Zhang Z, Xu T 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. *IJN* 2016; Volume 11:5671–82.
88. Zhang F, Huang X, Zhu L, Guo N, Niu G, Swierczewska M et al. Noninvasive monitoring of orthotopic glioblastoma therapy response using RGD-conjugated iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 2012; 33(21):5414–22.

89. Kazmierczak PM, Schneider M, Habereder T, Hirner-Eppeneder H, Eschbach RS, Moser M et al.  $\alpha\beta 3$ -Integrin-Targeted Magnetic Resonance Imaging for the Assessment of Early Antiangiogenic Therapy Effects in Orthotopic Breast Cancer Xenografts. *Invest Radiol* 2016; 51(11):746–55.
90. Kiessling F, Mertens ME, Grimm J, Lammers T. Nanoparticles for imaging: Top or flop? *Radiology* 2014; 273(1):10–28.
91. Beer AJ, Holzapfel K. PET/MR: Vision, Realität, Routine? *Fortschr Röntgenstr* 2012; 184(S 01).
92. Liu T, Xu W, Yan W-L, Ye M, Bai Y-R, Huang G. FDG-PET, CT, MRI for diagnosis of local residual or recurrent nasopharyngeal carcinoma, which one is the best?: A systematic review. *Radiotherapy and Oncology* 2007; 85(3):327–35.
93. Gu P, Pan L-L, Wu S-Q, Sun L, Huang G. CA 125, PET alone, PET-CT, CT and MRI in diagnosing recurrent ovarian carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Radiology* 2009; 71(1):164–74.
94. Roland CL, Dineen SP, Lynn KD, Sullivan LA, Dellinger MT, Sadegh L et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(7):1761–71.
95. López-Rodríguez V, Galindo-Sarco C, García-Pérez FO, Ferro-Flores G, Arrieta O, Ávila-Rodríguez MA. PET-Based Human Dosimetry of the Dimeric  $\alpha\beta 3$  Integrin Ligand 68Ga-DOTA-E-c(RGDfK)2, a Potential Tracer for Imaging Tumor Angiogenesis. *J Nucl Med* 2016; 57(3):404–9.
96. Yoon H-J, Kang KW, Chun IK, Cho N, Im S-A, Jeong S et al. Correlation of breast cancer subtypes, based on estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2, with functional imaging parameters from 68Ga-RGD PET/CT and 18F-FDG PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 41(8):1534–43.

## 9 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Kazmierczak PM, Todica A, Gildehaus FJ, Hirner-Eppeneder H, Brendel M, Eschbach RS, Hellmann M, Nikolaou K, Reiser MF, Wester HJ, Kropf S, Rominger A, Cyran CC „<sup>68</sup>Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub> Hybrid Imaging for the In Vivo Monitoring of  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Expression as Biomarker of Anti-Angiogenic Therapy Effects in Experimental Breast Cancer.” PLoS One. 2016, Dec 19;11(12):e0168248

## **10 Anhang**

### **10.1 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Clemens Cyran, der mir als mein Doktorvater die Möglichkeit gab, diese Arbeit zu schreiben.

Ein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Philipp Kazmierczak, der mir als direkter Betreuer bei Fragen jederzeit zur Seite stand und mich bei der Durchführung des Projektes unterstützte.

Außerdem möchte ich Frau Dr. Heidrun Hirner-Eppeneder danken, die als Biologin unseres Labors die immunhistochemischen Färbungen erstellt und ausgewertet hat.

Danken möchte ich auch der Tierärztin Frau Dr. Jessica Schuster und Matthias Moser, welche dieses Projekt unterstützt haben.

Mein Dank gilt auch der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des LMU Klinikums München sowie Herrn Prof. Wester für die Bereitstellung der TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-Peptide im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation.

Außerdem ein riesiges Dankeschön an alle, die meine Arbeit Korrektur gelesen haben.

Abschließend gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern. Dafür, dass ihr mir meinen bisherigen Lebensweg geebnet und mich immer mit voller Unterstützung auf all meinen Wegen begleitet habt.

**Eidesstattliche Versicherung**

Hellmann, Magdalena

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema  
„<sup>68</sup>Ga-TRAP-(RGD)<sub>3</sub>-PET/CT zum in vivo-Monitoring der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Expression als Biomarker  
früher anti-angiogenetischer Therapieeffekte im experimentellen Mammakarzinom-Modell“  
selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkennt-  
nisse, 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.

---

Berlin, 08.06.2023

Ort, Datum

---

Magdalena Hellmann

Unterschrift Doktorandin/Doktorand