

**Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik Klinikum rechts der Isar
der Technischen Universität München**

**Nichtinvasive Darstellung tumorassoziierter Angiogenese mittels
Positronen-Emissions-Tomographie und radioaktiv markierter Liganden des
 $\alpha\beta 3$ -Integrins**

Daniel Reim

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. W.A. Weber
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke

Die Dissertation wurde am 20.04.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14.09.2005 angenommen.

**Meinen Eltern,
meiner Großmutter
und Susi**

Zusammenfassung (Abstract)

Beim Tumorwachstum kommt es im Rahmen der Angiogenese zur Expression des $\alpha\beta_3$ -Integrins auf Endothelzellen. Diese Arbeit zeigt, dass tumorassoziierte Angiogenese mittels radioaktiv markierter $\alpha\beta_3$ Liganden nichtinvasiv darstellbar ist. Als Modell dienten auf Nacktmäuse transplantierte humane A431 Zellen. In-vitro reicherten A431 Zellen $\alpha\beta_3$ -spezifische Liganden ($[^{18}\text{F}]\text{Gal-RGD}/[^{125}\text{I}]\text{Glc-RGD}$) nicht an. In-vivo zeigten die Tumoren jedoch eine intensive Aufnahme von $[^{18}\text{F}]\text{Gal-RGD}$ (Tumor/Blut nach 90 min 9.8), die durch den $\alpha\beta_3$ Liganden $\epsilon(\text{RGD})\gamma\text{V}$ blockierbar war (-73%). Dies konnte mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nichtinvasiv erfasst werden. Immunhistochemisch zeigten die Tumorblutgefäße, im Gegensatz zu den Tumorzellen, $\alpha\beta_3$ Expression. In-vitro bestätigte sich, dass proliferierende humane Endothelzellen $[^{18}\text{F}]\text{Gal-RGD}$ und $[^{125}\text{I}]\text{Glc-RGD}$ $\alpha\beta_3$ -spezifisch internalisieren. PET mit $[^{18}\text{F}]\text{Gal-RGD}$ ist somit vielversprechend zur Darstellung der Angiogenese bei Patienten.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	
1. Einleitung	8
2. Fragestellung	13
3. Material und Methoden	14
3.1. Zelllinien und Kulturbedingungen	14
3.1.1. Die M21 und M21-L Zelllinie	14
3.1.2. A431	14
3.1.3. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	15
3.1.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen	16
3.2. Zelluläre Bindung und Aufnahme der $\alpha v \beta 3$ -Liganden in vitro	17
3.2.1. Nuklide und $\alpha v \beta 3$ -Liganden	17
3.2.2. Prinzip der in-vitro Untersuchungen	17
3.2.3. Durchführung	18
3.2.4. Veränderungen der Inkubationsbedingungen	19
3.3. Proteinbestimmung	20
3.3.1. Prinzip der Proteinbestimmung	20
3.3.2. Durchführung	20
3.4. Aufnahme der $\alpha v \beta 3$ -Liganden in vivo	21
3.4.1. Versuchstiere und Haltung	21
3.4.2. Etablierung des Tumormodells	21
3.4.3. PET-Untersuchung und Biodistributionsuntersuchungen	22
3.5. Immunhistochemische Untersuchung des Tumorgewebes	23
3.5.1. Prinzip der Immunhistochemie	23
3.5.2. Vorbereitung der Schnitte für die Färbung	23
3.5.3. CD 31 Färbung	23

3.5.4.	CD 51/61 ($\alpha v \beta 3$) Färbung	24
3.5.5.	CD 61 ($\beta 3$) Färbung	25
3.6.	Statistische Auswertung	26
4.	Ergebnisse	27
4.1.	Ergebnisse der in vitro Untersuchungen	27
4.1.1.	Optimierung der Untersuchungsbedingungen	27
4.1.2.	Aufnahme von Gluko-RGD und Galakto-RGD bei M21, M21-L, A431 Zellen und HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells)	27
4.1.3.	Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Aufnahme der $\alpha v \beta 3$ Liganden	29
4.1.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse der in-vitro Untersuchungen	35
4.2.	Ergebnisse der PET-Untersuchung und Biodistributionsstudien	36
4.2.1.	PET-Untersuchungen	36
4.2.2.	Biodistributionsstudien	37
4.3.	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	39
4.3.1.	CD 31 Färbung	39
4.3.2.	CD 51/CD 61 Färbung	40
4.3.3.	CD 61 Färbung	41
5.	Diskussion	42
5.1	Ergebnisse der in-vitro Experimente	42
5.2	Ergebnisse der in-vivo Experimente	46
6.	Zusammenfassung	49

Literaturverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen

A431	Zellen der Linie A431 (Epidermoidzell Karzinom)
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-biotinylierte Peroxidase Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Arg-Gly-Asp	Arginin-Glycin-Aspartat
bFGF	basic fibroblast growth factor
Bq	Bequerel
BSA	Bovines Serum Albumin
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
cpm	Counts per minute
cRGDyV	Zyklisches Peptid, das die RGD Sequenz enthält
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECGS	Endothelial cell growth supplement
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F-18	Fluor 18
FGF	Fibroblast growth factor
FKS	Fetales Kälber Serum
g	Gramm
GP	Glykoprotein
HUVEC	Human umbilical vein epithelial cells
I-125	Iod 125
ID	Injektionsdosis
IgG	Immunglobulin G
KBq	Kilobequerel
kDa	Kilo-Dalton
keV	Kiloelektronenvolt
LM 609	Maus Anti-Mensch-Integrin-avb3 Biotin-konjugierter monoklonaler Antikörper
M21	Zellen der Linie M21 (Malignes Melanom)
M21-L	Zellen der Linie M21-L (Malignes Melanom, modifiziert)
MADPET	Munich avalanche diode positron emission tomograph
MBq	Megabequerel
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

PDECGF	Platelet derived endothelial cell growth factor
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PET	Positron Emissions Tomographie
PGE1	Prostaglandin E1
PGE2	Prostaglandin E2
RGD	Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat
ROI	Region of interest
TBS	Tris-NaCl Puffer
TNF alpha	Tumor Nekrose Faktor alpha
U/min	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

In dieser Arbeit wird untersucht, ob es möglich ist, tumorassoziierte Neoangiogenese durch die Positronen-Emissions-Tomographie mit radioaktiv markierten Liganden des $\alpha v \beta 3$ -Integrins darzustellen.

Sobald Tumore eine bestimmte Größe erreichen, benötigen sie eine eigene Gefäßversorgung. Nur vaskularisierte Tumore sind in der Lage lokal weiter zu wachsen und zu metastasieren. Ein wesentlicher Mechanismus der tumorinduzierten Gefäßneubildung ist die Angiogenese, das heisst die Bildung neuer Blutgefäße durch Migration und Proliferation von Endothelzellen in bestehenden Gefäßnetzwerken.

In den letzten Jahren sind zunehmend so genannte angiogenetische Faktoren identifiziert worden, die den Prozess der Neovaskularisation initiieren können. Diese Moleküle haben die unterschiedlichsten Eigenschaften. So fungieren VEGF (Vascular endothelial growth factor) (Ferrara N, 1989, S. 851) und PDECGF (platelet derived endothelial cell growth factor) (Ishikawa F, 1989, S. 557) vornehmlich als Mitogene für vaskuläre Endothelzellen. Dahingegen sind so genannte FGFs (fibroblast growth factors) pleiotrop. Sie stimulieren das Wachstum von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Außerdem wertet man Prostaglandine wie PGE1 und PGE2 (Graeber JE, 1990, S. 665) sowie Adenosin (Dusseau JW, 1986, S. 163) als angiogenetisch. Andere Moleküle, wie Abbauprodukte der Hyaluronsäure, Coeruloplasmin und Heparin werden als Promotoren der Angiogenese angesehen (West DC, 1985, S. 1324).

Die Fähigkeit von Tumorzellen angiogenetisch wirksam zu werden ist ein komplexer Prozess. Wie dieser Prozess vollzogen wird, ist nicht vollständig geklärt. Man vermutet, dass die angiogenetische Aktivität unter dem Einfluss von Tumor Suppressor Genen, wie z.B. p53 (Su JD et al., 2003, S. 3585) steht, was dazu führt, dass die Sezernierung von Angiogenese stimulierenden Faktoren und von Angiogenese inhibierenden Faktoren, z.B. Thrombospondin, in einem Gleichgewicht gehalten wird. Während des Wachstums des Tumors kommt es dann zur Herunterregulierung der suppressorischen Gene (Rastinejad F, 1989, S. 345) und zur Sezernierung der oben bereits beschriebenen angiogenetischen Faktoren. Diese müssen durch das Gewebe diffundieren, um die bereits bestehenden Gefäße zu erreichen. Diese Moleküle sind in der Lage, die

Produktion von Kollagenasen und Plasminogen Aktivator durch Endothelzellen zu stimulieren. Diese degradieren im Anschluss die Basalmembran des dortigen Gefäßgewebes. Für diesen Prozess sind die als Adhäsionsmoleküle fungierenden Integrine von wesentlicher Bedeutung, da Angiogenese zur Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen führt, die in ruhenden Zellen nicht oder nur minimal gebildet werden. Des Weiteren sind Tumore in der Lage Makrophagen und Mastzellen zu stimulieren, die wiederum analog zu entzündlichen Prozessen selbst proangiogenetisch wirken und diesen Effekt durch Sezernierung von $\text{TNF}\alpha$ noch verstärken. So scheint $\text{TNF}\alpha$ eine wesentliche Rolle dabei zu spielen, dass die Zellmigration erleichtert wird, indem $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ zunehmend an der so genannten Migrationsfront der Endothelzellen exprimiert wird (Gao B, 2002, S. 1196).

Die Tumorzellen selbst sezernieren außerdem Proteasen, die zur Proteolyse extrazellulärer Matrixproteine führen, wodurch wiederum angiogenetische Prozesse erleichtert werden (Pepper MS, 1992, S. 145). Die vom Tumor freigesetzten Proteasen tragen auch zur Degradierung der Basalmembran der Gefäße bei. Aus der extrazellulären Matrix wird bFGF freigesetzt, welches später Endothelzellen stimuliert zu wandern und Tubuli zu formen. VEGF führt zur Gefäßdilatation, wodurch eine erhöhte Gefäßpermeabilität bedingt wird. Dadurch können Fibrinprodukte in den extrazellulären Raum gelangen. Entlang dieser Leitstruktur und der Chemotaxine wandern Endothelzellen in Richtung des Tumors und teilen sich. Dabei ändern diese Zellen ihre morphologischen Eigenschaften während der Wanderung von einer tubulären zu einer flachen Form im Muttergefäß. Im Tochtergefäß nehmen sie dann wieder die tubuläre Form an (Folkman J, 1980, S. 551).

Verschiedene Integrine spielen eine wesentliche Rolle für die Ausbildung neuer Blutgefäße. Die Familie der Integrine wurde Mitte der 80er Jahre entdeckt, als man erkannte, dass eine Gruppe von Adhäsions-Proteinen, das Plättchenprotein GP IIb/IIIa, verschiedene Lymphozyten-Adhäsionsproteine sowie Rezeptoren für Fibronectin und Vitronectin alle eine ähnliche Funktion und Struktur aufwiesen (Ruoshlati E, 1991, S. 1).

Integrine sind Heterodimere von nicht kovalent miteinander verknüpften α - und β -Untereinheiten. Mindestens 16 verschiedene α - ($\alpha\text{1} - \text{9}$, αv , αIIb , αM , αL , αX , αIEL , αLRI) und 8 β -Untereinheiten ($\beta\text{1} - \beta\text{8}$) sind bis jetzt identifiziert worden (Hynes RO, 1992, S. 11).

Die α -Untereinheit besteht aus ca. 1100 Aminosäuren, die β -Untereinheit aus ca. 800 Aminosäuren. Die verschiedenen α -Ketten können sich mit den unterschiedlichen β -Untereinheiten zu Integrinsubtypen assoziieren.

Jede Untereinheit besteht aus einer extrazellulären Domäne, einem membranständigen Teil und einer kurzen zytoplasmatischen Region am C-Terminus (Hynes RO, 1987, S. 549).

Die β -Untereinheit enthält 56 Cystein Reste, was auf eine stark gefaltete Konformation hinweist. Die aminoterminal Domäne weist eine ausgeprägte Schleife auf, die durch eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cystein Rest 435 und Rest 5 stabilisiert wird (Albelda SM, 1990, S. 2868). Des Weiteren existiert eine weitere Disulfidbrücke zwischen Cystein 655 und Cystein 406.

In den α -Untereinheiten findet man sieben genetische Wiederholungen im Aminoterminal. In allen Integrinen sind drei oder vier dieser Wiederholungen homolog zu dem EF-Hand-Motiv Kalzium bindender Proteine, wie z.B. Calmodulin (Pytela R., 1985, S. 5766). Die Struktur ist ein Helix-Schleife-Helix Motiv, in welchem das Kalzium festgehalten wird (Strynadka NC, 1989, S. 951).

Außerdem bestehen die meisten α -Untereinheiten aus einer leichten und einer schweren Kette, die wiederum über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die leichte Kette hat einen kleinen zytoplasmatischen C-Terminus und eine transmembranöse Region. Die schwere Kette liegt komplett extrazellulär.

Für die Ligandenbindung und Ligandenspezifität ist die Assoziation beider Untereinheiten essentiell, durch welche die Ligandenbindungstasche gebildet wird. Des Weiteren ist die Anwesenheit divalenter Kationen wie Magnesium, Mangan und Kalzium von entscheidender Bedeutung für die Ligandenbindung (Springer TA, 1990, S. 359).

Aufgrund ihrer großen Bedeutung vieler physiologischer und pathologischer Prozesse werden Integrine zunehmend als Zielstrukturen für therapeutische Interventionen eingesetzt. Prominentester Vertreter dieser Klasse ist der Fibronectin-Rezeptor Antikörper Abciximab (Anti α I**b** β 3), ein Inhibitor der Plättchenaggregation, welches klinisch zur Antikoagulation eingesetzt wird (Cohen SA, 2000, S. 173). Zahlreiche klinische und präklinische Studien haben außerdem die Inhibierung von Integrinen im Rahmen der Tumorthherapie untersucht. So schreibt man insbesondere den α v**\beta**3-

Integrinen eine zentrale Bedeutung für die Tumorbiologie zu (Tripathi M, 2002, S. 2824; Sheppard D, 2002, S. 913).

Das $\alpha v \beta 3$ -Integrin (Vitronektinrezeptor) wird auf angiogenetisch aktiven Endothelien, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und auch auf einigen Tumorzellen, z.B. der Melanomzelllinie M21, exprimiert (Suzuki S, 1987, S. 14080).

Liganden für dieses Integrin sind Vitronektin, Fibrinogen, Fibronektin, von Willebrandt Faktor, Thrombospondin und Osteopontin. Das Erkennungsmotiv ist die Aminosäuresequenz Arginin, Glycin, Aspartat, die abgekürzt als RGD-Sequenz bezeichnet wird (Ruoshlati E, 1986, S. 517). Die Bindung des $\alpha v \beta 3$ -Integrins an diese Proteine kann durch kurze Peptide, die eine RGD-Sequenz beinhalten, inhibiert werden (Gehlsen KR, 1988, S. 925).

Das $\alpha v \beta 3$ -Integrin wird von Endothelzellen im Rahmen einer Vielzahl von Erkrankungen exprimiert (Brooks PC, 1994, S. 569).

Diese beinhalten die diabetischen Retinopathie, die rheumatoide Arthritis aber auch die Neubildung von Blutgefäßen nach Myokardinfarkt und ischämischen Ereignissen am Herzen. Auch nach Verletzungen fand man heraus, dass $\alpha v \beta 3$ -Integrin in Blutgefäßen von menschlichem Wundgranulationsgewebe exprimiert wurde, nicht jedoch in normaler Haut. Weiterhin zeigte sich, dass $\alpha v \beta 3$ -Integrin eine große Rolle in der Migration glatter Muskelzellen nach arterieller Verletzung durch Upregulation der Matrix Metalloproteinasen spielt (Bendeck MP, 2000, S. 1467). Man sah, dass die beta-3 mRNA in glatten Muskelzellen nach einer künstlich mit einem Katheter induzierten Verletzung in der Arteria carotis einer Ratte hochreguliert wurde. Man fand außerdem, dass der Vitronektinrezeptor, zumindest im Tiermodell, notwendig ist für die embryonale Implantation (Illera MJ, 2000, S. 1285). Illera zeigte, dass nach Blockade des Vitronektinrezeptors die Implantation von Mäuseembryonen in nur geringerer Zahl erfolgen konnte.

Das $\alpha v \beta 3$ -Integrin wird auch von verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert und beeinflusst damit wesentlich das Verhalten mancher Tumore bezüglich Invasivität und Metastasenausbildung (Cheresh DA, 1987, S. 17703).

Brooks et al. zeigten als erste (Brooks PC, 1994, S. 1157), dass eine Blockade des $\alpha v \beta 3$ -Integrins durch Antikörper die Bildung von Blutgefäßen inhibiert und so das Wachstum von Tumoren inhibiert werden kann. Ausgehend von diesen Ergebnissen

wurden verschiedene Antikörper, peptidische und nicht-peptidische Antagonisten des $\alpha\beta3$ -Integrins, entwickelt, die sich derzeit in der klinischen und präklinischen Prüfung befinden (Hwang R, 2004, S. 995).

Diese Studien würden wesentlich erleichtert durch ein Verfahren, das es ermöglicht die Expression des $\alpha\beta3$ -Integrins im Tumorgewebe nicht-invasiv darzustellen und die Blockade des Integrins mit Hilfe von Antikörpern oder niedrig-molekularen Antagonisten zu messen.

Zu diesem Zweck wurden kürzlich mehrere radiokativ markierte zyklische RGD-Peptide entwickelt, die es ermöglichen mit Hilfe von nuklearmedizinischen Verfahren die Expression des $\alpha\beta3$ -Integrins darzustellen. Besonders interessant sind dabei mit dem Positronenstrahler Fluor-18 markierte Peptide, da diese mit Hilfe der Positronen-Emissions-Tomographie mit sehr hoher Empfindlichkeit und guter räumlicher Auflösung nachgewiesen werden können.

In dieser Arbeit wurden zwei glycosilierte RGD-Peptide, Iod-125-Gluko-RGD und Fluor-18-Galakto-RGD, auf ihre Eignung zur nicht-invasiven Darstellung der Tumoriangiogenese untersucht. Von diesen Peptiden war bereits bekannt, dass sie sich spezifisch in Tumorzellen anreichern, die $\alpha\beta3$ exprimieren (Haubner R, 2001, S. 326). Es war aber nicht bekannt, ob es möglich ist, mit diesen Peptiden die $\alpha\beta3$ -Expression im Rahmen der Angiogenese nicht-invasiv darzustellen.

2. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob PET-Untersuchungen mit Fluor-18 Galakto-RGD dazu eingesetzt werden können, die Expression des $\alpha\beta3$ -Integrins im Rahmen der tumorinduzierten Angiogenese nicht-invasiv darzustellen. Hierzu musste zunächst ein geeignetes Tiermodell entwickelt werden, in dem die Tumorzellen selbst $\alpha\beta3$ -negativ waren, $\alpha\beta3$ aber von aktivierten Endothelzellen exprimiert wurde. Es wurden deshalb zunächst verschiedene Zelllinien in-vitro auf ihrer Expression des $\alpha\beta3$ -Integrins und die Aufnahme von RGD-Peptiden untersucht. In-vitro wurden außerdem Versuche zum Aufnahmemechanismus der RGD-Peptide durchgeführt und die Kinetik der zellulären Aufnahme untersucht. Es wurde dann mittels PET-Untersuchungen und Biodistributionsuntersuchungen an tumortragenden Mäusen untersucht, ob angiogenetisch aktive Tumore dargestellt werden können.

3. Material und Methoden

3.1. Zelllinien und Kulturbedingungen

3.1.1. Die M21 und M21-L Zelllinie

Die Zellen der Linien M21 stammen aus einer humanen Melanomzelllinie, die aus einer Lymphknotenmetastase gewonnen wurden. M21 Zellen exprimieren das $\alpha\beta 3$ -Integrin in hoher Dichte an der Zellmembran. M21-L ist eine M21-Subpopulation ohne α -Integrin Expression, die im Labor von Dr. D. A. Cheresh etabliert wurde (Cheresh DA, 1987, S. 17703).

M21 und M21-L wurden in RPMI 1640 Medium der Firma Biochrom KG (Berlin) mit Zusatz von 5 ml 20 mM Glutamin, 5 ml Gentamycin (10 mg/ml) und 50 ml FKS (Fetales Kälberserum) pro 500 ml in Monolayer-Kulturflaschen (Greiner, Nürtingen) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Alle zwei bis vier Tage wurden die Zellen nach ausreichendem Wachstum (Konfluenz von 70 %-80 %) in neue Kulturflaschen umgesetzt. Dazu wurden die Zellen mittels Zugabe von 5 ml einer 1 mM PBS-EDTA-Lösung und Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ für fünf Minuten vom Boden der Flaschen gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und für drei Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 5 ml frischem Medium versetzt und gelöst. Zum Schluss wurde die Zellsuspension auf zwei neue Kulturflaschen mit frischem Medium verteilt.

3.1.2. A431

Die Zellen der Linie A431 stammen von einem epidermoidzelligen Karzinom der Vulva einer 85-jährigen Frau ab (Giard DJ, 1973, S. 1417).

Tumore dieser Zellen sind bekannt dafür, schnell wachsende subkutane Tumore in Nacktmäusen zu bilden, die stark vaskularisiert sind.

A431 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium der Firma Biochrom KG (Berlin) mit Zusatz von 5 ml Penicillin/Streptomycin und 50 ml FKS (Fetales Kälberserum) pro 500 ml in Monolayer-Kulturflaschen (Greiner, Nürtingen) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Alle zwei bis vier Tage wurden die Zellen nach ausreichendem Wachstum (Konfluenz von 70 %-80 %) in neue Kulturflaschen umgesetzt. Dazu wurden die Zellen mittels Zugabe von 5 ml einer Trypsin–EDTA–Lösung und Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ für fünf Minuten vom Boden der Flaschen gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 ml Medium versetzt, um die Zellen zu schützen, da Trypsin–EDTA einen zytotoxischen Effekt aufweist. Danach wurde die Suspension für drei Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 5 ml frischem Medium versetzt und gelöst. Zum Schluss wurde die Zellsuspension auf zwei neue Kulturflaschen mit frischem Medium verteilt.

3.1.3. HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen wurden von der Firma Cell Lining GmbH (Berlin) bezogen. Diese werden gemäß bekannten Prozeduren isoliert (Jaffe EA, 1973, S. 2745).

Nach Lieferung wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen mit frischem Medium überführt. Dieses setzt sich aus 500 ml Medium 199 mit modifizierten Earle's Salzen der Firma Gibco (Eggenstein), 100 ml FKS, 10 ml 20 mM Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin (alle von der Firma Biochrom KG, Berlin) und 300 µl ECGS–Lösung (Endothelial Cell Growth Supplement, Firma ICN, Frankfurt) zusammen.

Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert. Die Lösung wurde dann in Monolayer–Kulturflaschen (Greiner, Nürtingen) mit 25 ml frischem Medium überführt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Nach fünf bis sieben Tagen erfolgte die Subkultivierung. Dazu wurden die Zellen mittels Zugabe von 5 ml einer 0,05 %igen Trypsin–EDTA–Lösung und Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ für fünf Minuten vom Boden der Flaschen gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 ml Medium versetzt, um die Zellen zu schützen, da Trypsin–EDTA einen zytotoxischen Effekt aufweist. Danach wurde die Suspension für drei Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 5

ml frischem Medium versetzt und gelöst. Abschließend wurde die Zellsuspension auf zwei neue Kulturflaschen mit frischem Medium verteilt.

3.1.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen der oben genannten Zelllinien wurden über einen längeren Zeitraum verwendet. Es war daher nötig die Zellen einzufrieren, da Zellen bekanntlich mit zunehmender Zeit in Kulturbedingungen ihre Eigenschaften verändern können. Somit wurde gewährleistet, dass auf einen Pool gleichartiger Zellen für die Experimente zurückgegriffen werden konnte.

Zunächst wurden Zellen aller Zelllinien in ausreichender Menge kultiviert. Dann wurden die Zellen, wie bereits oben beschrieben, vom Boden der Kulturflaschen gelöst, die Suspensionen zentrifugiert und die Überstände abpipettiert und verworfen.

Anschließend wurde das Pellet in DMSO (Dimethylsulfoxid) Freeze Medium der Firma Sigma (Taufkirchen) gelöst. DMSO verhindert die für die Zellen schädliche Kristallbildung beim Einfrieren.

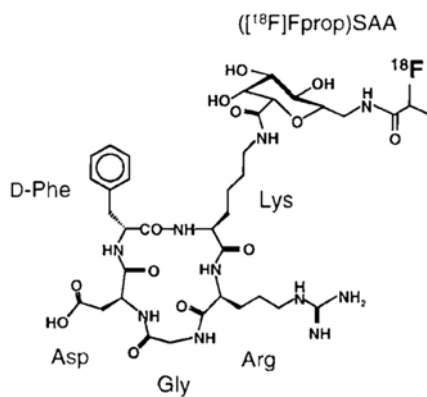
Die Zellsuspension wurde auf eine Konzentration von ca. $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml mittels eines Zellzählgerätes (CASY-1 der Firma Schärfe, Reutlingen) eingestellt. Daraufhin wurde jeweils 1 ml der Lösung in Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden zunächst für 24 Stunden bei -20 °C , dann für 24 Stunden bei -70 °C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff mit -196 °C überführt wurden.

Das erneute Auftauen der Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei 37 °C . Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml entsprechendem, frischem Zellkulturmedium überführt, zentrifugiert bei 1000 U/min, der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde nun in Monolayer-Kulturflaschen überführt. Dann erfolgte die Kultivierung der Zellen wie oben beschrieben.

3.2. Zelluläre Bindung und Aufnahme der $\alpha v\beta 3$ -Liganden in vitro

3.2.1. Nuklide und $\alpha v\beta 3$ -Liganden

Die Aufnahme von RGD-Peptiden durch die M21, M21-L und A431 Zellen wurde in vitro für zwei glykosilierte, zyklische Pentapeptide untersucht, die mit Iod-125 (I-125) oder Fluor-18 (F-18) radioaktiv markiert waren. Die Synthese beider Peptide und ihre radioaktive Markierung wurde an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Haubner R, 2001, S. 326 und Haubner R, 2001, S. 1781).



Formel von Galakto-RGD: Man erkennt die für die $\alpha v\beta 3$ -Selektivität spezifische RGD-Sequenz.

3.2.2. Prinzip der in-vitro Untersuchungen

In vitro wurden folgende beiden Untersuchungen zur Gluko- und Galakto-RGD Aufnahme der Zellen durchgeführt:

- Messung der an der Zellmembran der Zelle gebundenen Aktivität, die durch die Natriumacetat-Spülung von der Zelle entfernt wird.
- Messung der in der Zelle befindlichen Aktivität, die nach dem Spülen mit Natriumacetat durch die Lyse der Zellen mit NaOH-Lösung bestimmt wurde.

Die Proben wurden mittels eines Gamma-Counters (Wallac 1480 Wizard 3[™]) der Firma Wallac (Freiburg) nach bekanntem Prinzip vermessen (Büll, 1999, S. 48).

Das Energiefenster lag für Messungen mit I-125 bei 15 keV–85 keV und bei Messungen mit F-18 bei 400 keV–1200 keV. Alle Proben wurden für 60 Sekunden gemessen. Die

Aktivitätsmenge in der Zelle wurde dann auf die Aktivitätsmenge der Inkubationslösung bezogen und nach Bestimmung der in der Probe befindlichen Proteinmenge (s.u.) als Uptake in %/mg Protein ausgedrückt.

3.2.3. Durchführung

Zunächst wurden die Zellen mit 5 ml einer 1 mM PBS–EDTA–Lösung (bei M21/M21–L) oder mit 5 ml einer 0,05 %igen Trypsin-EDTA-Lösung (A431/HUVEC) vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und in Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen. Dann wurden die Zellen in 1 ml ihres entsprechenden Zellkulturmediums resuspendiert und die Zellzahl in einem Zellcounter (CASY-1 der Firma Schärfe, Reutlingen) gemessen. Jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in vorbereitete Eppendorf–Cups mit 1 ml Inkubationsmedium, welches aus dem entsprechendem Zellkulturmedium ohne FKS und mit 1 % BSA (Bovines Serum Albumin) versetzt bestand, überführt.

Für jede Zelllinie wurden auf diese Weise mindestens drei Proben bereitgestellt und im Zelltest verwendet.

Dann wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert, bevor in jeden Cup $1 \cdot 10^6$ cpm der aktiven Substanz zugegeben wurden. Die Zellversuche wurden jeweils entweder mit Gluko– oder mit Galakto–RGD durchgeführt. Die Zellen wurden dann nochmals entweder für eine Stunde oder für zwei Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Eppendorf Cups bei 3500 U/min für vier Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in ein Zählröhrchen überführt. Das Pellet wurde danach in den Vorversuchen mit 1 ml PBS, in den Experimenten dann aber mit 1 ml Bindepuffer (0,1 % BSA; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 0,01 mM MnCl₂ in TBS pH 7,4) gespült. Die Suspension wurde wiederum bei gleicher Umdrehungszahl und Dauer zentrifugiert, der Überstand in das Messröhrchen überführt und der Waschschrift nochmals wiederholt.

Danach wurde das Pellet in 1 ml Natriumacetat–Lösung für zehn Minuten im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert, das Cup wiederum bei gleicher Umdrehungszahl und Dauer zentrifugiert und der Überstand in ein neues Messröhrchen

überführt. Ein erneuter Waschschrift mit Natriumacetat-Lösung, wie oben beschrieben, folgte.

Schließlich wurde das Zellpellet in 1 ml einer 1 mM NaOH-Lösung lysiert und in ein neues Messröhrchen überführt. Das Cup wurde dann nochmals mit 1 ml PBS zweimal gespült, um unter Umständen verbliebene Aktivität aus dem Cup vollständig zu entfernen.

Die Radioaktivität in den Proben wurden dann mittels des Gamma-Counters gemessen.

3.2.4. Veränderungen der Inkubationsbedingungen

Veränderungen der Temperatur

Der oben beschriebene Zelltest wurde bei erniedrigter Temperatur durchgeführt, um weitere Erkenntnisse über Rezeptoreigenschaften und die Bindung des Peptides an den Integrinrezeptor zu gewinnen.

Dabei wurden die Zellen bei 4 °C für eine Stunde und für zwei Stunden inkubiert.

Veränderung der Ca²⁺-Konzentration im Inkubationsmedium

Des Weiteren wurden die Zellen in Ca²⁺-freiem PBS inkubiert. Hierbei sollte untersucht werden, inwiefern Kalziumionen einen Einfluss auf die Aufnahme von $\alpha\beta3$ -Liganden haben. Das Vorgehen war hierbei ansonsten gleich dem oben beschriebenen. Für die Untersuchungen mit Kalzium wurden M21-Zellen in normalem Inkubationsmedium und im Vergleich in Kalzium-freiem PBS für 60 Minuten inkubiert.

Einfluss der $\alpha\beta3$ -Liganden cRGDyV

Der Zelltest wurde außerdem unter Überschuss von nicht radioaktiv markiertem RGD-Peptid cRGDyV durchgeführt, das spezifisch an das $\alpha\beta3$ -Integrin bindet. Auf diese Weise wurde die unspezifische Bindung von Galakto-RGD bestimmt. Dabei wurde dem Inkubationsmedium, in dem sich die Zellen befanden, zehn Minuten vor Zugabe der Aktivität 50 μ l einer 20 μ M cyclo-RGDyV-Lösung zugegeben (Endkonzentration 1 μ M). Das Vorgehen des Zelltests war ansonsten wie oben beschrieben.

Einfluss der Mn²⁺-Konzentration im Inkubationsmedium

In der Literatur wurde vielfach der Effekt der erhöhten Bindung von $\alpha v\beta 3$ -positiven Zellen an Vitronektin durch Mangan-Ionen berichtet (Yeh CH, 1999, S. 57).

Mit diesem Test sollte untersucht werden, ob auch die Aufnahme von Gluko-RGD unter Manganeinfluss erhöht werden kann.

Bei den Versuchen mit Mangan wurden M21 Zellen und M21-L Zellen jeweils für 120 Minuten in Inkubationsmedium, zu dem Mn²⁺ in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt wurde, inkubiert.

3.3. Proteinbestimmung

3.3.1. Prinzip der Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Photometrie. Dabei ist die gemessene Extinktion direkt proportional zur Proteinmenge.

Ein Farbstoff bildet in Lösung mit dem gelösten Protein einen Komplex und bewirkt dadurch eine Extinktionsänderung.

Zunächst wurde mittels eines BSA-Standards eine Eichgerade erstellt. Anschließend wurden die einzelnen Werte der Proteinlösungen aus dem Zelltest ermittelt und die entsprechenden Proteinmengen von der Eichgeraden abgelesen.

3.3.3. Durchführung

Die Proteinkonzentrationen für die Bestimmung der Standardeichgerade sind in der folgenden Tabelle gezeigt (alle Volumina in ml):

	Referenz	0 mg	0,002 mg	0,004 mg	0,007 mg	0,07 mg
PBS	0,7	0	0,70	0,70	0,700	0,70
BSA 1:10	0	0	0,01	0,02	0,035	0,05
1T. H ₂ O + 9T. PBS	0,1	0	0,09	0,08	0,065	0,05
Bio RAD Protein Assay (Farbstoff)	0,2	0	0,20	0,20	0,200	0,20

Für die Proteinbestimmung aus den Zelltestproben wurde wie folgt vorgegangen. In vorbereitete Eppendorf-Cups wurden jeweils 0,7 ml PBS pipettiert. Dann wurden 0,075 ml vom H₂O/Puffer Gemisch und 0,025 ml der jeweiligen Proteinprobe aus dem Zelltest zugegeben.

Schließlich wurden 0,2 ml des Farbstoffs (Bio RAD Protein Assay der Firma Bio Rad Laboratorium GmbH, Wien) zugegeben und die Lösung für fünf Minuten inkubiert.

Die Proben wurden dann im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm mindestens zweimal vermessen und ein Mittelwert errechnet.

3.4. Aufnahme der $\alpha\beta$ 3-Liganden in vivo

3.4.1. Versuchstiere und Haltung

Die Tierversuche wurden mit immundefizienten Nacktmäusen durchgeführt. Diese wurden von Charles River (Iffa Credo, Frankreich) bezogen. Hierbei handelte es sich um Swiss nu/nu weibliche Labormäuse, bei welchen durch eine Serie von Kreuzungen das Nude-Gen auf die CD-1 Maus übertragen wurde. Das mutante Allel des nude-Locus wird autosomal rezessiv vererbt. Homozygote Tiere sind daher haarlos und besitzen keinen Thymus. Die Zucht des Stammes erfolgte im Isolator bei Charles River durch heterozygote nu/+ Weibchen und homozygote nu/nu Männchen. Die Tiere waren bei Ankunft ca. zwischen drei und sieben Wochen alt. Nach Lieferung wurden die Tiere in artgerechte Käfige verbracht und für ca. zehn Tage vor Versuchsbeginn in einer nahezu sterilen Umgebung untergebracht.

3.4.2. Etablierung des Tumormodells

Nach Bereitstellung einer ausreichenden Menge A431-Zellen wurden jeder Maus $1 \cdot 10^6$ Zellen subkutan an der linken Vorderflanke injiziert.

Die Tumore wuchsen für zehn Tage, wobei darauf geachtet wurde, dass sie die Versuchstiere nicht in ihrer Beweglichkeit einschränkten, keine Ulzerationen auftraten und die Tumore eine Größe von 1,5 cm nicht überschritten.

3.4.3. PET – Untersuchung und Biodistributionsuntersuchungen

Nach einer Dauer von zehn Tagen wurden PET–Untersuchungen und Biodistributionsstudien an den Mäusen durchgeführt.

Ziel war es, $\alpha v\beta 3$ –Expression von im Tumor neu gebildeten Gefäßen bildlich darzustellen. Daher wurden Zellen für die Tumore verwendet, die, wie in den Zelltests bewiesen, eine geringe Aufnahme von Galakto–RGD aufweisen und ein hohes angiogenetisches Potential haben.

Für die hier beschriebene PET–Untersuchung wurde ein hochauflösender Kleintier PET–Scanner verwendet (MADPET: Munich Avalanche Diode Positron Emission Tomograph). Der spezielle Tierscanner besteht aus zwei Sektoren mit jeweils drei Modulen, die zur Bildaquisition eines transaxialen Schnittes in 30 Winkelschritten um das Versuchstier rotieren. Weitere technische Daten des Scanners sind an anderer Stelle beschrieben (Ziegler SI, 2001, S. 136).

Für die Biodistributionsstudien und PET–Untersuchungen wurden fünf Nacktmäusen 10 MBq ^{18}F –Galakto–RGD injiziert. Die PET–Aufnahmen erfolgten nach 90 Minuten, die Biodistributionsstudien nach 120 Minuten.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Mäuse getötet und sezirt. Es wurden Blut, Muskel aus der Region um das Femur und der Tumor entnommen. Die Proben wurden dann im Gamma–Counter vermessen. Zum Schluss wurde eine Standardlösung mit der Restaktivität aus den Spritzen hergestellt und ebenfalls gemessen. Diese wurde später zur Ermittlung der Zerfallskorrektur benötigt.

Bei zwei Tieren wurde zehn Minuten vor Aktivitätsgabe 6 mg/kg nicht radioaktiv markiertes cRGDyV in die Schwanzvene injiziert. Die Akquisitionsparameter der PET–Untersuchungen waren: 180° Rotation, 30 Steps á zehn Sekunden Messdauer. Die Auswertung der PET–Aufnahmen erfolgte mittels einer Instituts–eigenen Software. Dabei wurden in den Aufnahmen so genannte ROIs (Regions Of Interest) definiert und ausgewertet. Mit Hilfe der Software wurde ein Mittelwert der im Tumor angereicherten Aktivität und der Hintergrund–Aktivität zum Moment der Bildaquisition ermittelt. Aus den beiden Werten wurde ein Tumor/Untergrund Verhältnis errechnet. Dieses wurde dann zur Bewertung der Ergebnisse herangezogen.

3.5. Immunhistochemische Untersuchung des Tumorgewebes

3.5.1. Prinzip der Immunhistochemie

Ziel der Untersuchung war es, unten beschriebene Oberflächenantigene auf den gezüchteten Tumoren nachzuweisen oder auszuschließen.

3.5.2. Vorbereitung der Schnitte für die Färbung

Die Tumore wurden nach der Sektion entnommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Für die Färbungen wurden die Tumore in eine Fixationsmasse (Tissue Tek der Firma Sakura (Gießen)) eingebettet und anschließend mit einem Mikrotom geschnitten. Die Dicke der Schnitte betrug $7\text{ }\mu\text{m}$. Die vorbereiteten Schnitte wurden bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.5.3. CD 31 Färbung

Hier wurde ein Ratten Anti-Maus-CD 31 monoklonaler Antikörper (anti PECAM-1) der Firma BD PharMingen (Heidelberg) (Katalog Nr.: 558736) eingesetzt.

Der Antikörper reagiert mit PECAM-1/CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule) (Baldwin HS, 1994, S. 2539).

CD 31 ist ein zur Immunglobulin-Familie gehöriges 130 kDa Glykoprotein, das Zell-Zell Adhäsion vermittelt (De Lisser HM, 1994, S. 490) und auf der Oberfläche von adulten und embryonalen Endothelzellen exprimiert wird. CD 38 und der Vitronektin-Rezeptor ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin) sind vermutlich Liganden von CD 31 (Horenstein AL, 1998, S. 1129; Piali L, 1995, S. 451). CD 31 vermittelte Endothelzell-Zell Interaktionen sind an der Angiogenese beteiligt (De Lisser HM, 1997, S. 671).

Mit Hilfe dieser Färbung können Blutgefäße in den Tumoren dargestellt werden.

Als Primärantikörper wurde ein CD 31 Antikörper der Firma BD PharMingen (Heidelberg) verwendet. Als Kontrolle wurde ein unspezifischer Rat IgG_{2 α , κ} Antikörper (BD PharMingen (Heidelberg)) eingesetzt.

Der Sekundärantikörper war ein biotinylierter Anti-Ratten-Antikörper.

Für die eigentliche Färbereaktion wurde ABC-Reagenz aus dem Vectastain-Kit der Firma Vector (Burlingame, USA) verwendet. ABC Reagenz ist ein Komplex aus Avidin und biotinylierter Peroxidase. Als Substrat für den Avidin-biotinylierte-Peroxidase-Enzym-Komplex wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC Reagenz der Firma Vector) verwendet.

Des Weiteren wurde ein H₂O₂ Gemisch (50 µl 30 %iges H₂O₂ + 450 µl destilliertes Wasser + 2000 µl Methanol) verwendet.

Auf jedem Objektträger befanden sich jeweils zwei Schnitte, einer für die Färbung und einer für die Kontrollfärbung. Von den oben genannten Reagenzien wurden jeweils abhängig von der Größe der einzelnen Schnitte immer ca. 100 µl verwendet.

Die Schnitte wurden nach dem Auftauen getrocknet und dann zehn Minuten in Aceton (-20 °C) fixiert. Danach wurden die Schnitte dreimal für zwei Minuten in PBS gespült und dann mit 4 % BSA-Lösung für 20 Minuten inkubiert, um die unspezifische Antikörper-Bindung zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte für 60 Minuten mit dem Primärantikörper (CD 31 bzw. Kontrollantikörper Rat IgG_{2α,κ}) (1:100 verdünnt mit dem 4 % BSA) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte wieder dreimal für zwei Minuten in PBS gespült. Danach wurde der Sekundärantikörper (1:6000 verdünnt) für 30 Minuten zugegeben. Es folgte wiederum eine Spülung wie oben beschrieben. Nun wurde die endogene Peroxidase für fünf bis zehn Minuten mit dem H₂O₂-Gemisch blockiert. Dann wurden die Schnitte wieder in PBS gewaschen. ABC Reagenz wurde für 30 Minuten zugegeben und wieder in PBS abgewaschen. Danach wurde AEC für 30 Minuten zugegeben. Die letzte Spülung erfolgte für dreimal zwei Minuten mit destilliertem Wasser.

Das restliche Gewebe wurde noch mit Hämatoxylin für 30–45 Sekunden gefärbt und für ca. fünf Minuten im Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden schließlich getrocknet, mit Glyceringelatine fixiert, eingedeckt und mit dem Lichtmikroskop untersucht.

3.5.4. CD 51/61 (αvβ3) Färbung

Hier wurde LM609, ein Maus Anti-Mensch-Integrin-αvβ3 Biotin konjugierter monoklonaler Antikörper der Firma Chemicon (Hampshire, U.K.)(Katalog Nr.: MAB1976B) eingesetzt.

Dieser Antikörper (Isotyp IgG₁) reagiert mit dem menschlichen, nicht aber mit dem murinen Vitronektinrezeptor über die Erkennung der Arginin–Glycin–Aspartat (RGD) Sequenz.

Mittels dieser Färbung sollte nachgewiesen werden, dass die Tumorzellen (A431) $\alpha v\beta 3$ –negativ waren.

Der Primärantikörper war der Biotin–konjugierte Antikörper gegen $\alpha v\beta 3$. Als Kontrollantikörper wurde ein Maus IgG₁ Antikörper der Firma Chemicon (Hampshire U.K.) (Katalog Nr.: PP100) eingesetzt. Da der hier beschriebene Antikörper bereits Biotin–konjugiert war, konnte auf den Einsatz eines Sekundärantikörpers verzichtet werden.

Die Reagenzien waren die gleichen, wie oben beschrieben. Zusätzlich wurde hier zur Verdünnung der Antikörper ein Antikörper–Diluent (TechMate der Firma Signet (Dedham, USA)) verwendet.

Der Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 1:50 verdünnt.

Das Procedere entsprach ansonsten dem für die CD 31 Färbung beschriebenen Verfahren.

3.5.5. CD 61 ($\beta 3$) Färbung

Für diese Färbung wurde ein Hamster Anti-Maus-CD 61 Antikörper der Firma BD PharMingen (Heidelberg) (Katalog Nr.: 550541) eingesetzt.

Der Antikörper reagiert mit der $\beta 3$ -Kette des Integrins (CD 61) (Yasuda M, 1995, S. 251).

CD 61 wird auf Thrombozyten (Kieffer N, 1990, S. 328), aktivierten T–Lymphozyten (Moulder K, 1991, S 343), Granulozyten (Frieser M, 1996, S. 3127) und Blastozysten (Schultz JF, 1995, S. 11522) exprimiert.

Mit Hilfe dieser Färbung sollten die $\beta 3$ -Integrinketten auf den Oberflächen der Endothelien der Blutgefäße im Tumor nachgewiesen werden.

Der Primärantikörper war ein Hamster anti-Maus-CD 61 Antikörper, die Kontrolle wurde ohne Primärantikörper durchgeführt. Als Sekundärantikörper kam ein biotinylierter Maus anti-Hamster Cocktail der Firma BD PharMingen (Heidelberg) (Katalog Nr.: 550335) zum Einsatz. Dieser besteht aus zwei Maus anti–Hamster-

Antikörpern mit den Isotypen Mouse BALB/c IgG_{1,κ} und IgG_{2b,κ} in einem Antikörper-Diluent (Serum und 0,09 % Natriumazid).

Auch hier waren die Reagenzien gleich den obigen, die Antikörper wurden hier mit dem oben beschriebenen Antikörper Diluent verdünnt.

Das Vorgehen der Färbung war gleich dem der CD 31 Färbung, der Primärantikörper wurde jedoch 1:10 verdünnt, der Sekundärantikörper 1:100.

3.6. Statistische Auswertung

Alle quantitativen Parameter sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz wurde je nach Fragestellung mit gepaarten und ungepaarten t-Tests untersucht. Ein p-Wert von 0,05 wurde als signifikant angesehen. Diese Auswertungen wurden in Microsoft Excel 2000 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der in-vitro Untersuchungen

4.1.1. Optimierung der Untersuchungsbedingungen

In mehreren Vorversuchen wurden die optimalen Voraussetzungen für die Durchführung der in-vitro Experimente ermittelt.

Es zeigte sich dabei, dass die Werte für die an der Zellmembran gebundenen Aktivität für alle Untersuchungsbedingungen schwankten und nur schlecht reproduzierbar waren. Es zeigten sich keine klaren Unterschiede in den Radioaktivitätsaufnahmen zwischen M21 und M21-L Zellen. Es wurde deshalb die internalisierte Menge von Gluko- bzw. Galakto-RGD für die weiteren Auswertungen verwendet.

4.1.2. Aufnahme von Gluko-RGD und Galakto-RGD bei M21, M21-L, A431 Zellen und HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten betrug die internalisierte Menge von Gluko-RGD bei M21 Zellen um 3 %/mg Protein (3,03 +/- 0,2 %/mg Protein) und stieg leicht nach 120 Minuten auf 3,6 +/- 0,5 %/mg Protein.

Bei M21-L Zellen zeigte sich nach 60 und 120 Minuten eine Aufnahme von 0,9 +/- 0,1 %/mg Protein bzw. 0,6 +/- 0,14 %/mg Protein (60 Minuten: $p = 0,004$; 120 Minuten: $p = 0,01$). Die Zellen der Linie A431 zeigten ein ähnliches Verhalten wie die M21-L Zellen. Hierbei war ein Uptake von durchschnittlich 0,7 +/- 0,07 %/mg Protein nach 60 Minuten und 0,6 +/- 0,15 %/mg Protein nach 120 Minuten festzustellen (60 Minuten: $p = 0,065$; 120 Minuten: $p = 0,5$ im Vergleich zu M21-L). Auch hier zeigte sich nach längerer Inkubationszeit keine Steigerung der Aufnahme des Markers. Der Uptake von Gluko-RGD lag für HUVEC bei 1,28 +/- 0,53 %/mg Protein nach 60 Minuten und nach 120 Minuten bei 1,67 +/- 0,15 %/mg Protein ($p = 0,009$ für HUVEC zu A431).

Die Ergebnisse sind in Diagramm 1 zusammengefasst.

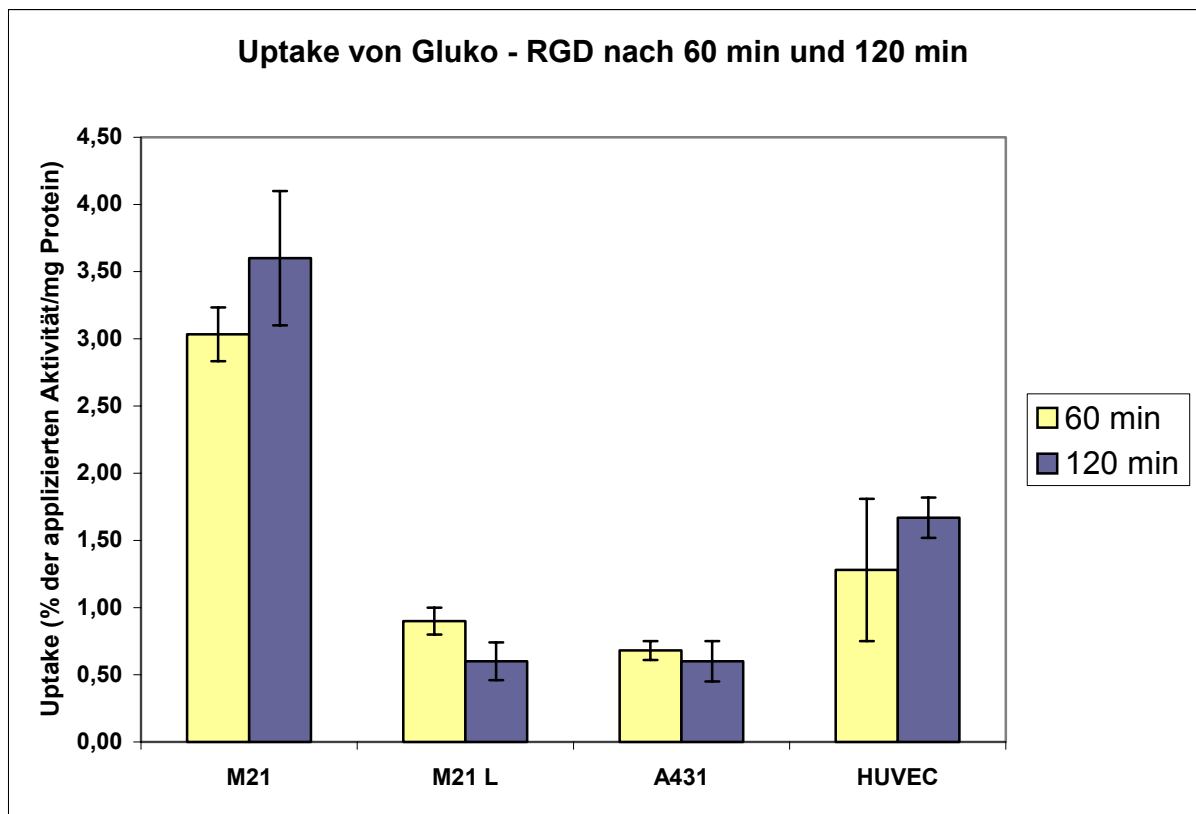


Diagramm 1: Uptake von Gluko-RGD nach 60 und 120 Minuten Inkubationszeit in % der applizierten Aktivität/mg Protein

Für Galakto-RGD ergab sich nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten das folgende Ergebnis:

Die intrazelluläre Aufnahme betrug bei M21 Zellen $0,37 \pm 0,05$ %/mg Protein, bei M21-L $0,07 \pm 0,01$ %/mg Protein und bei A431 $0,09 \pm 0,04$ %/mg Protein ($p = 0,001$ für den Vergleich von M21 und M21-L respektive A431). Der Uptake von HUVEC lag durchschnittlich bei $0,83 \pm 0,04$ %/mg Protein ($p = 0,001$ für den Vergleich HUVEC zu A431). Die Ergebnisse sind in Diagramm 2 dargestellt.

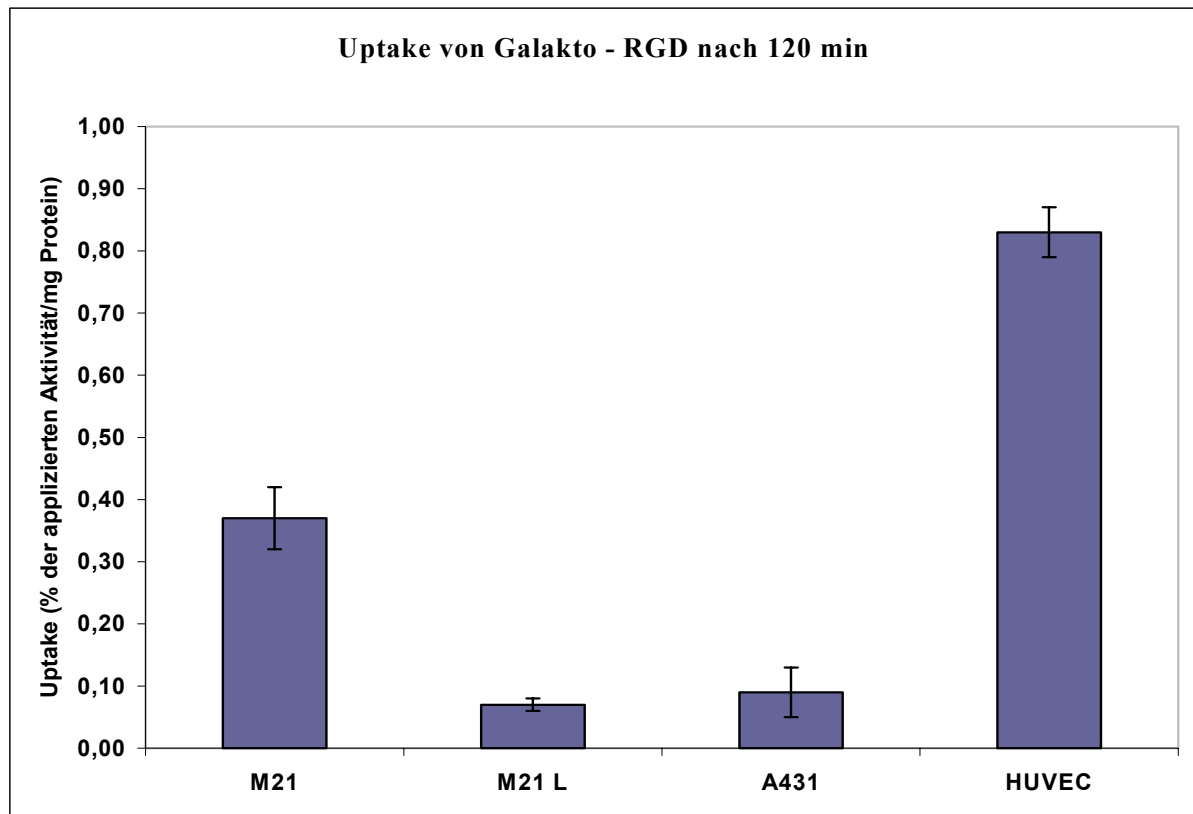


Diagramm 2: Uptake von Galakto-RGD nach 120 Minuten Inkubationszeit in % der applizierten Aktivität/mg Protein

4.1.3. Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Aufnahme der $\alpha\beta 3$ -Liganden

Einfluss der Temperatur

Die Internalisierung von Peptiden, hier Gluko- bzw. Galakto-RGD ist stark von der Temperatur abhängig. Hier wurde nun untersucht, ob Temperaturunterschiede bei $\alpha\beta 3$ -positiven Zelllinien einen Einfluss auf den Uptake haben. Zum Vergleich wurden $\alpha\beta 3$ -negative Zellen mitgetestet. In den Zelltests wurde der Uptake bei 4 °C mit dem Uptake bei 37 °C verglichen. Der Versuch wurde mit I-125 markiertem Gluko-RGD durchgeführt. Die Werte wurden nach 60 und 120 Minuten ermittelt.

Unter diesen Bedingungen wurde die intrazelluläre Aufnahme von Gluko-RGD bei M21 Zellen nach 60 Minuten um 81 % verringert ($p = 0,00025$), während sich die Aufnahme bei A431 nur um 10 % verringerte ($p = 0,09$).

Auch die Aufnahme nach 120 Minuten Inkubationszeit (Diagramm 4) wurde deutlich ($p = 0,0003$) reduziert (-94 %). Für A431 Zellen kam es zu einer Abnahme von 15 % ($p = 0,08$), die hier im Diagramm nicht dargestellt ist.

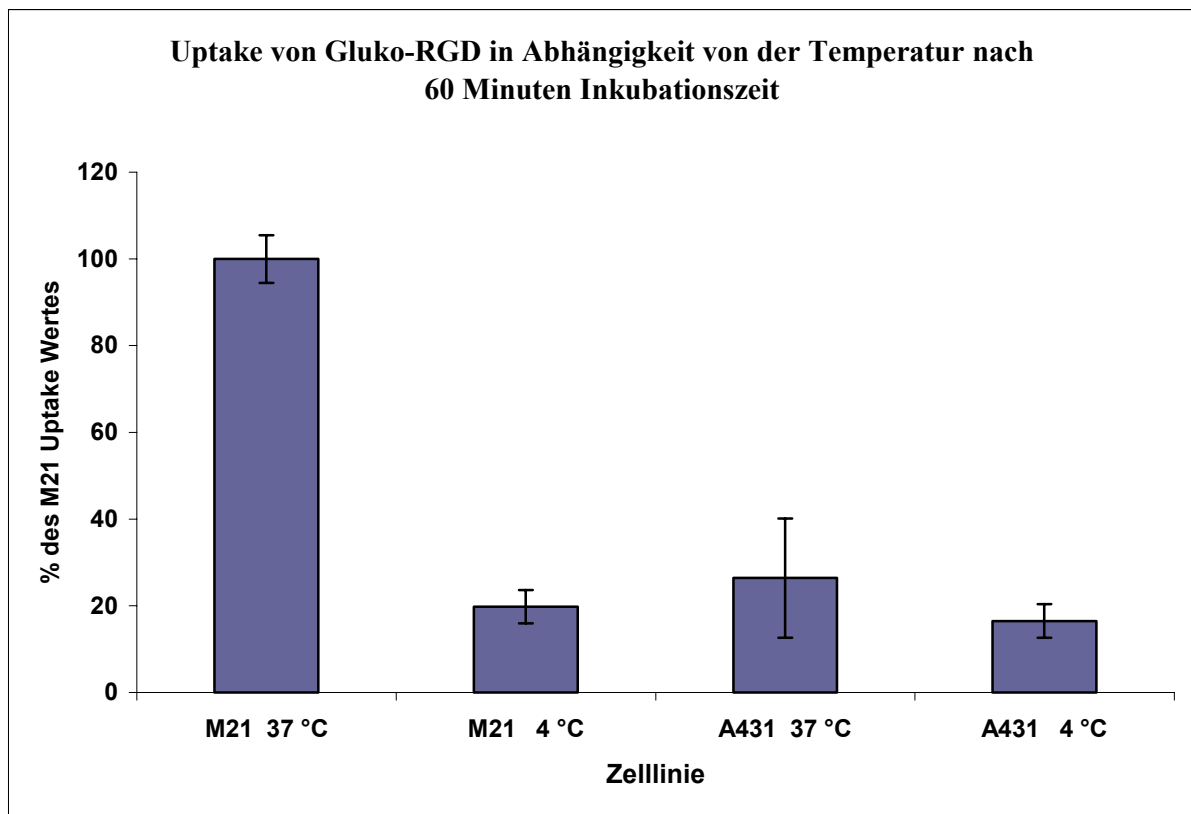


Diagramm 3: Uptake von Gluko-RGD bei 4 °C und 37 °C nach 60 Minuten Inkubationszeit in % des M21 Wertes (M21 = 100%)

Die Aufnahme von Gluko-RGD verringerte sich nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei M21-L Zellen um 19 % ($p = 0,04$) und nach 120 Minuten um 8 % ($p = 0,01$) im Vergleich zu M21 Zellen.

Bei HUVEC verringerte sich der Uptake um 30 % nach 60 Minuten ($p = 0,009$) (im Diagramm nicht dargestellt) respektive um 35 % nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten ($p = 0,02$). Diese Ergebnisse werden in Diagramm 4 zusammengefasst.

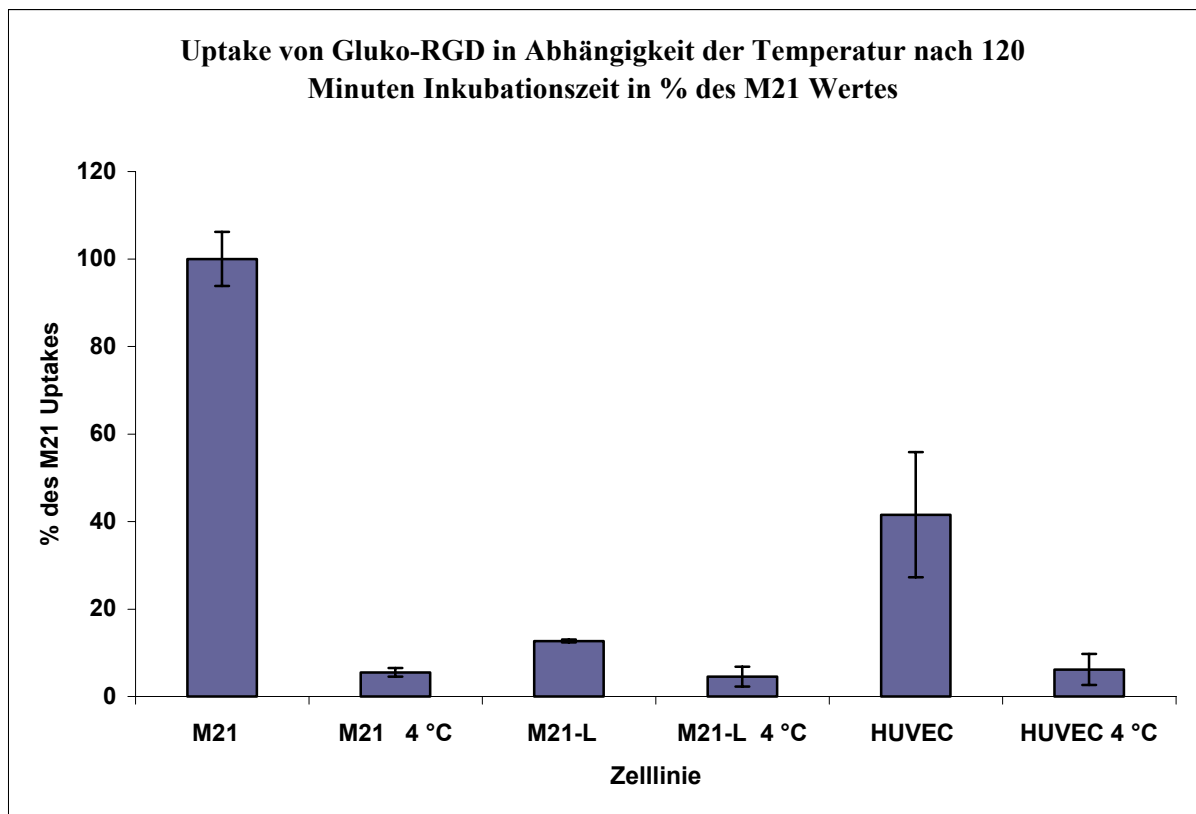


Diagramm 4: Darstellung des Uptakes von Gluko-RGD nach 120 Minuten Inkubationszeit in % des M21 Wertes (M21 = 100%) bei 4 °C und 37 °C bei M21, M21-L und HUVEC

Einfluss divalenter Kationen auf den Uptake von Gluko-RGD

Kalzium hat einen wesentlichen Einfluss auf den Uptake von Gluko- bzw. Galakto-RGD. In einem Vorversuch (Diagramm 5) nahm die Aufnahme von Gluko-RGD in die Zelle bei Inkubation mit Kalzium-freiem PBS um 56 % signifikant ($p = 0,019$) ab.

In einem zweiten Experiment nahm die Aufnahme bei M21 um 71 %, bei M21-L um 17 % und bei HUVEC um 47 % nach 60 Minuten Inkubationszeit ab.

Nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten (Diagramm 6) verringerte sich die Internalisierung bei M21 um 85 %, bei HUVEC um 61 % und bei M21-L stieg die Internalisierung sogar um 6 %. Dabei war der Abfall bei den M21 Zellen ($p = 0,0003$) und bei den HUVEC ($p = 0,014$) signifikant. Ein signifikanter Unterschied bei den M21-L Zellen konnte nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

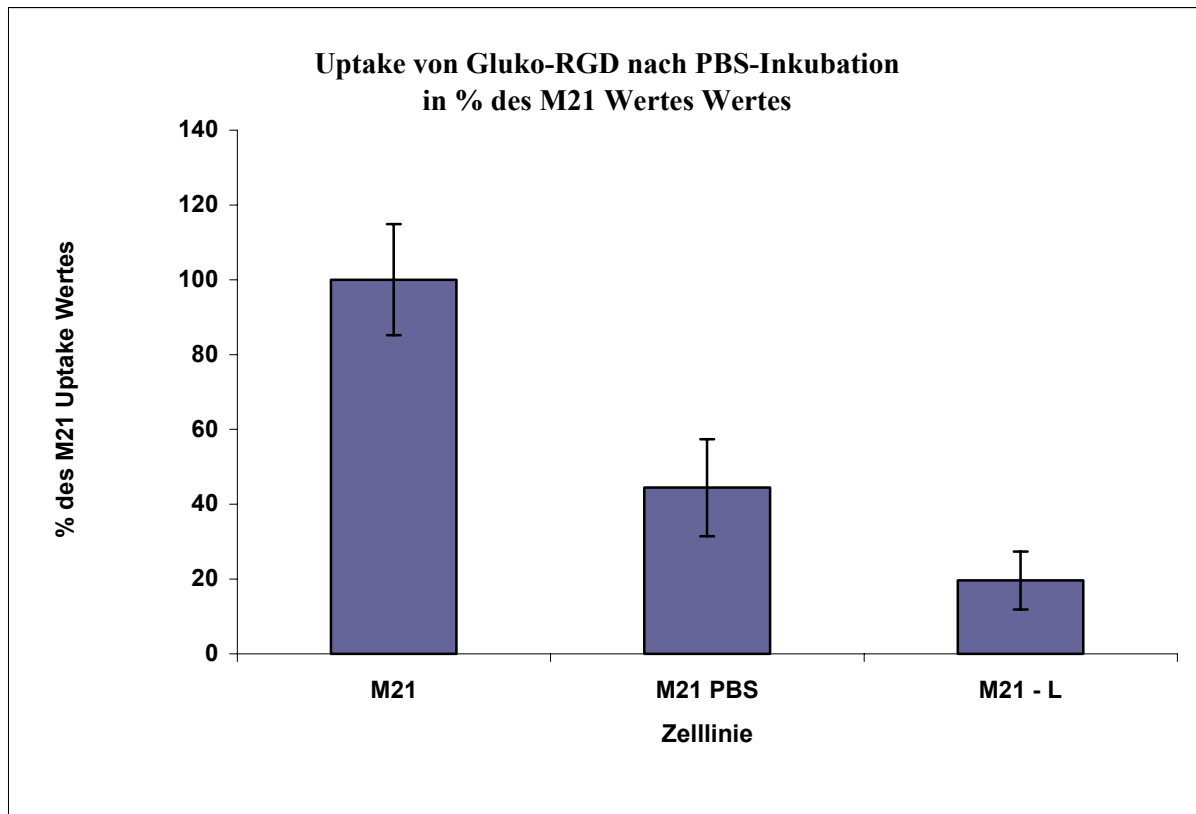


Diagramm 5: Uptake von Gluko-RGD nach PBS-Inkubation (Ca^{2+} frei) in Abhängigkeit des M21 Wertes (M21=100%)

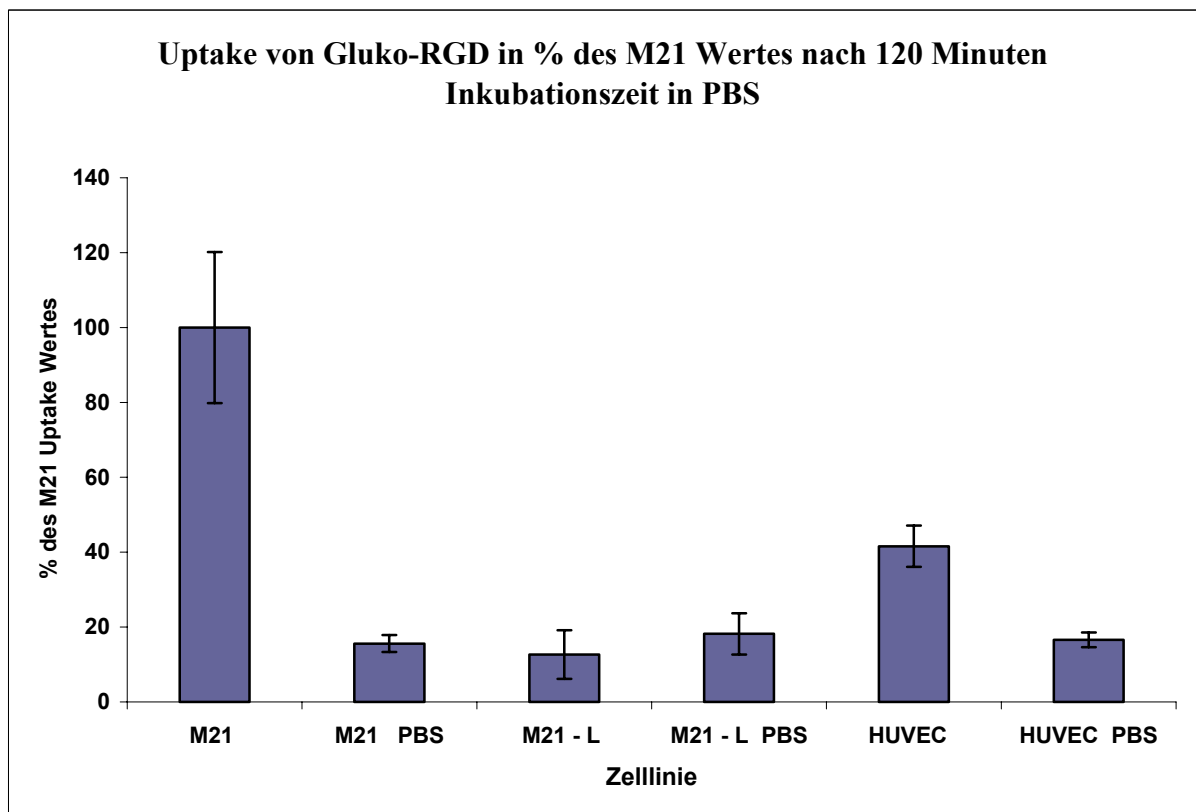


Diagramm 6: Uptake von Gluko-RGD nach 120 Minuten Inkubation in PBS in Abhängigkeit des M21 Wertes (M21=100%)

Einfluss von Mangan auf die Aufnahme von Gluko-RGD

Schließlich wurde der Effekt von Mangan auf die Uptake Werte untersucht. Mangan hat einen stabilisierenden Effekt auf die Konformation der α - und β -Untereinheiten und erhöht die Affinität des Liganden zum Rezeptor bzw. verstärkt die Bindung an Vitronektin.

Im Versuch bestätigte sich dieser Effekt insofern, dass sich der Uptake von Gluko-RGD unter Manganeinfluss bei $\alpha\beta$ 3-positiven M21 Zellen um das zwei bis dreifache des Wertes ohne Manganeinfluss steigern ließ, wohingegen $\alpha\beta$ 3-negative Zellen wie M21-L nahezu keine Veränderungen zeigten. Ohne Einfluss von Mangan lag der Uptakewert für M21 durchschnittlich bei $0,99 \pm 0,14$ %/mg Protein, für M21-L bei $0,23 \pm 0,06$ %/mg Protein. Unter Manganeinfluss stieg der Uptake bei M21 auf $2,73 \pm 0,07$ %/mg Protein ($p = 0,003$), bei M21-L auf $0,43 \pm 0,04$ %/mg Protein ($p = 0,02$). Die Ergebnisse sind nachfolgend graphisch dargestellt.

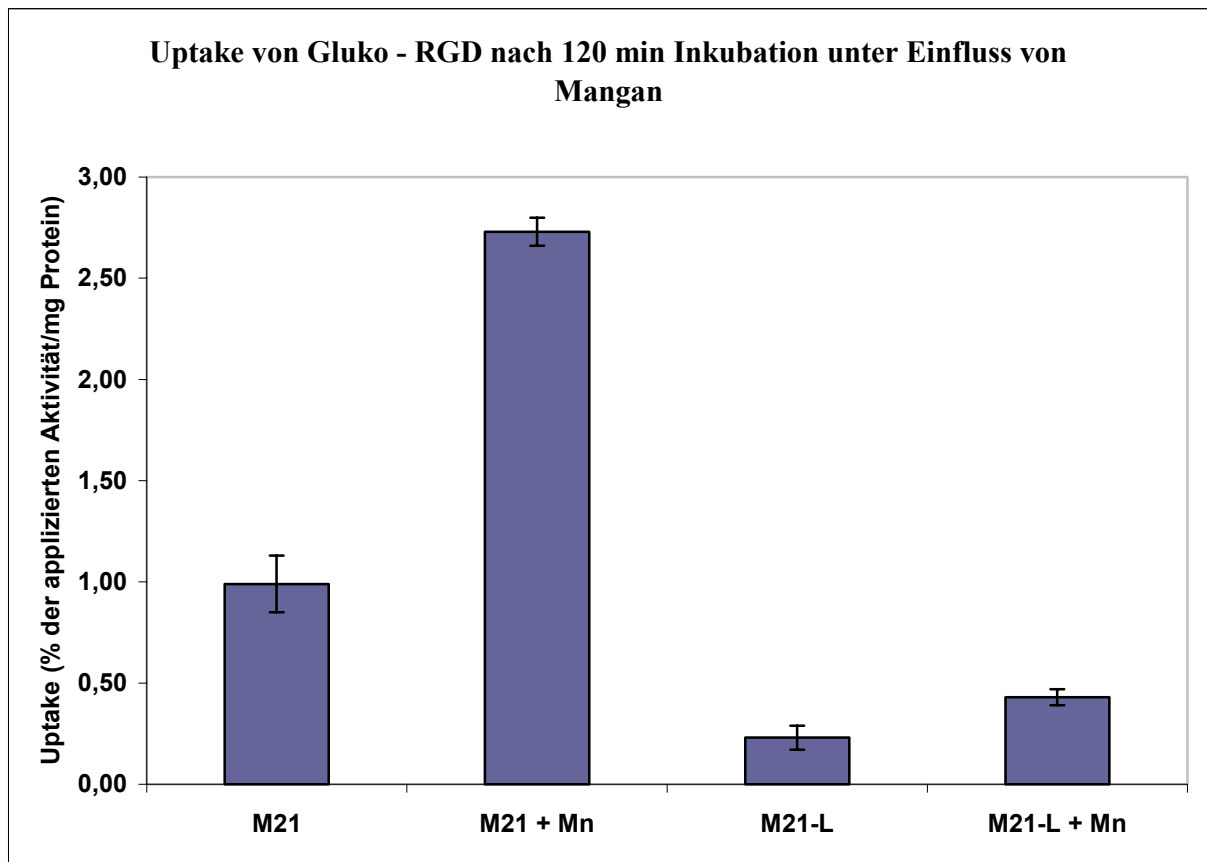


Diagramm 7: Uptakewerte in An- bzw. Abwesenheit von Mangan

Einfluss von $\alpha\beta 3$ -Liganden

Weiterhin war es wichtig zu untersuchen, in welchem Ausmaß sich die Aufnahme der radioaktiv markierten RGD–Peptide durch $\alpha\beta 3$ -Liganden blockieren lässt. Dadurch konnte die Rezeptor-spezifische Bindung von der unspezifischen Aktivitätsaufnahme unterschieden werden. Bei Zugabe der $\alpha\beta 3$ -Liganden cRGDyV zum Testansatz sank der Uptake-Wert für HUVEC um 87 +/- 2 % bezogen auf den M21 Uptake.

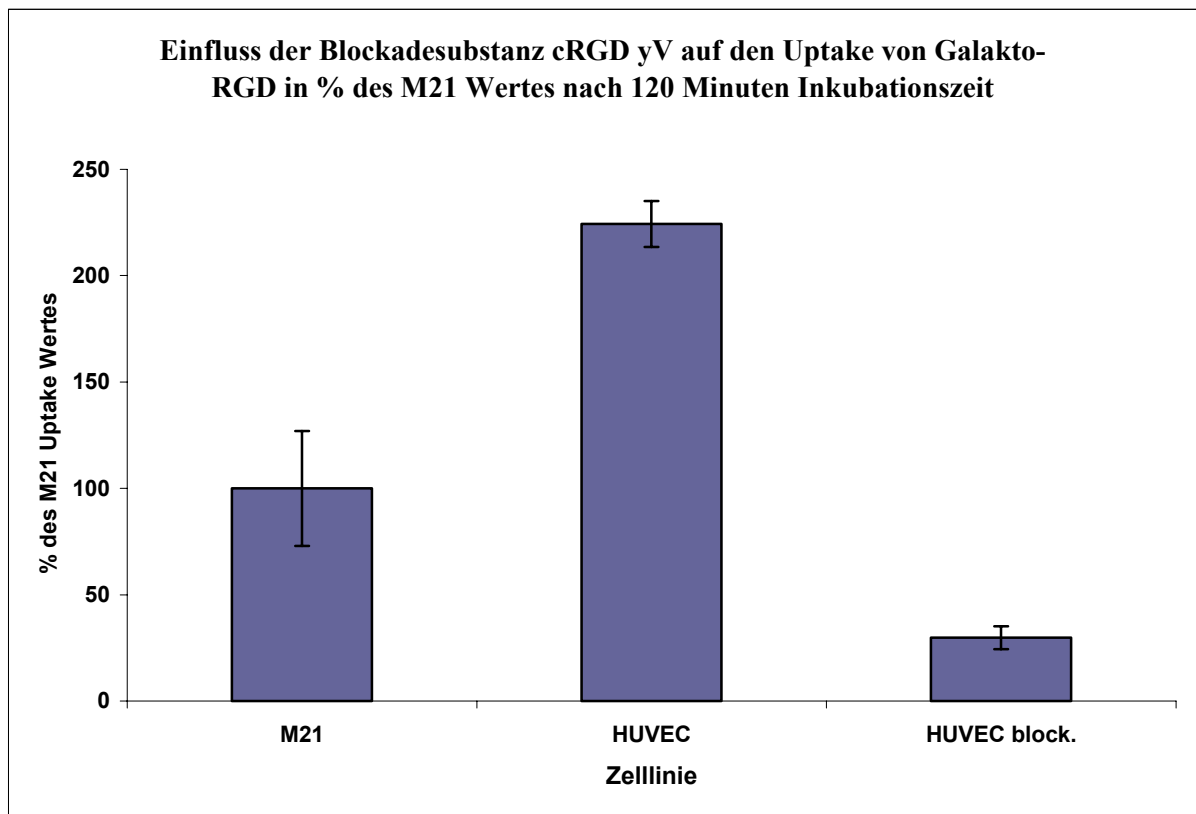


Diagramm 8: Einfluss der Blockadesubstanz cRGDyV auf den Uptake von Galakto-RGD in HUVEC in Abhängigkeit des M21 Wertes (M21=100%)

4.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der in-vitro Untersuchungen

Zusammenfassend zu den Zelltests sind folgende Aussagen zu treffen:

Zellen, die $\alpha v\beta 3$ -positiv sind, weisen einen höheren Uptake sowohl von Gluko- als auch von Galakto-RGD auf als Zellen, die $\alpha v\beta 3$ -negativ sind. Insgesamt ließ sich feststellen, dass der Uptake von Gluko-RGD wesentlich höher lag als bei Galakto-RGD. M21 Zellen und HUVEC zeigten in den in-vitro Versuchen hohe Uptake-Werte. M21-L und A431 Zellen wiesen niedrige Werte auf. Dabei lag die Aufnahme des Markers für M21 drei bis viermal so hoch als die von M21-L bzw. A431.

Der Vorgang der Bindung und der Internalisierung ist bei M21 und HUVEC sowohl temperaturabhängig als auch blockierbar, wohingegen M21-L und A431 kaum Änderungen im Verhalten bei Inkubation mit 4 °C oder Blockade mit cRGDyV aufzeigten. Des Weiteren zeigt sich bei M21 ein verminderter Uptake, wenn Kalzium im Inkubationsmedium fehlt. Die Versuche mit Mangan bestätigten, dass dieses Ion auf $\alpha v\beta 3$ -positive Zellen einen Komplex-stabilisierenden Effekt hat und die Internalisierung steigert. Dieser Effekt konnte bei M21-L nicht gezeigt werden.

4.2. Ergebnisse der PET–Untersuchung und Biodistributionsstudien

Im Folgenden werden nun die Aufnahmen der PET–Studien und die Ergebnisse der Biodistributionsstudien dargestellt. Die Biodistributionsstudien wurden parallel zu den PET–Messungen durchgeführt, um die im PET–Bild dargestellte hohe Aktivitätsanreicherung im Tumor mit quantitativen Daten korrelieren zu können.

4.2.1. PET–Untersuchungen

In Abbildung 1 und 2 werden transversale Schnitte durch den A431 Tumor dargestellt. Abbildung 1 zeigt die PET Untersuchung ohne Vorbehandlung mit c(RGDyV), Abbildung 2 die Untersuchung nach Vorbehandlung mit diesem $\alpha\beta_3$ -Liganden. Die fokale, ventral gelegene Aktivitätsanreicherung ist der Gallenblase zuzuordnen, da Galakto-RGD bei Mäusen teilweise biliär ausgeschieden wird.

In der quantitativen Auswertung zeigte sich, dass die Tumoraufnahme von F^{18} -Galakto-RGD relativ zur kontralateralen Thoraxwand durch Vorbehandlung mit c(RGDyV) verringert wird.

Die Auswertung der korrespondierend durchgeführten Biodistributionsstudie ergab eine wesentlich höhere Aufnahme von Galakto-RGD in den Tumor im Vergleich zu der Internalisierung in den blockierten Tumor. Die Ergebnisse werden in Diagramm 9 und 10 dargestellt.

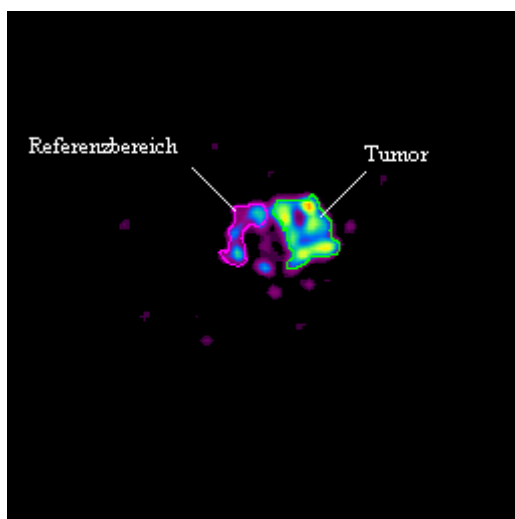


Abbildung 1: Transversaler Schnitt durch den Tumor im PET (ohne Blockade)

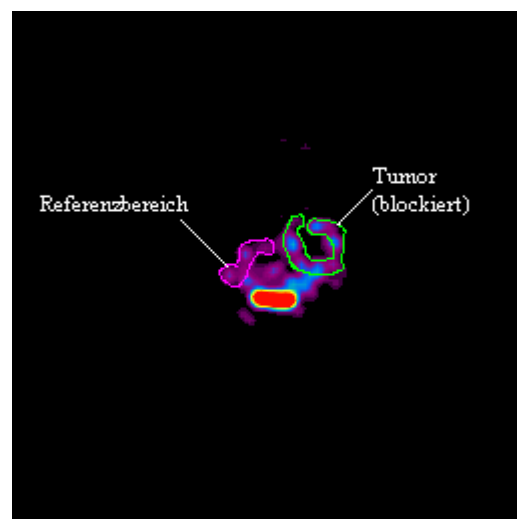


Abbildung 2: Transversaler Schnitt durch den Tumor im PET mit Blockade (geringe Signalintensität)

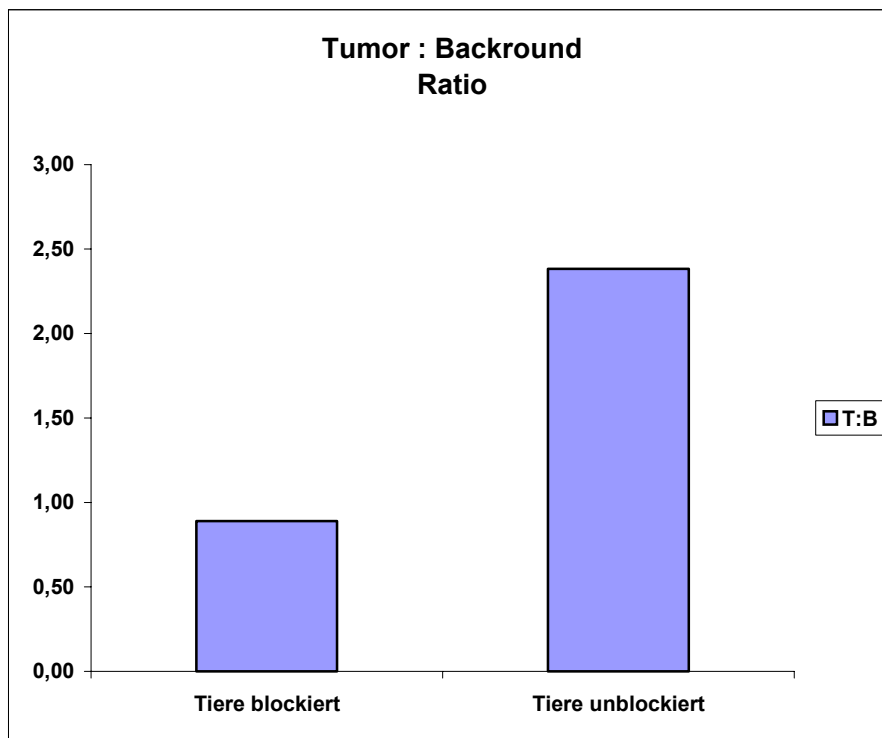


Diagramm 9:
Tumor:Background Ratios:
Mit cRGDyV blockierte Tiere weisen eine niedrige T:B Ratio auf, unblockierte Tiere eine hohe. Die T:B Ratio korreliert mit den gezeigten Aufnahmen.

Zusammenfassung der PET-Untersuchungen

Zusammenfassend zu den PET-Studien ist festzustellen, dass blockierte Versuchstiere eine geringe Anreicherung im Tumor, unblockierte Tiere eine hohe Anreicherung im Tumor aufweisen. Der Vorgang der Aktivitätsanreicherung im Tumor ist somit blockierbar.

4.2.2. Biodistributionsstudien

Nach Messung der entnommenen Gewebe wurden die ermittelten Counts auf das Gewicht der Gewebe bezogen und in % ID/g ausgedrückt (ID = injizierte Aktivität).

Bei den mit cRGDyV vorbehandelten Tieren betragen die Aktivitätskonzentrationen für Blut durchschnittlich 0,04 +/- 0,01 % ID/g, für Muskelgewebe 0,11 +/- 0,052 % ID/g und für Tumorgewebe 0,29 +/- 0,062 % ID/g.

Ohne Vorbehandlung betrug die Aktivitätskonzentration im Blut durchschnittlich 0,11 +/- 0,05 % ID/g, im Muskelgewebe 0,29 +/- 0,046 % ID/g und für Tumorgewebe 1,07 +/- 0,33 % ID/g.

Die Ergebnisse sind im Einzelnen in Diagramm 10 aufgetragen.

Die Werte zeigen hier wiederum eine gute Korrelation zu den oben dargestellten Bildern aus dem PET. Tiere, deren Traceruptake in den Tumor mittels cRGDyV weitgehend blockiert wurde, zeigen geringe Aktivitätsanreicherungen im Tumor. Tiere, welchen nur Galakto-RGD injiziert wurde, hatten hingegen eine ca. dreifach höhere Aktivitätsanreicherung im Tumor als die vorbehandelten Tiere. Blut und Muskel bei unblockierten Tieren hatten außerdem geringfügig höhere Aktivitätsaufnahmen als die blockierten Tiere.

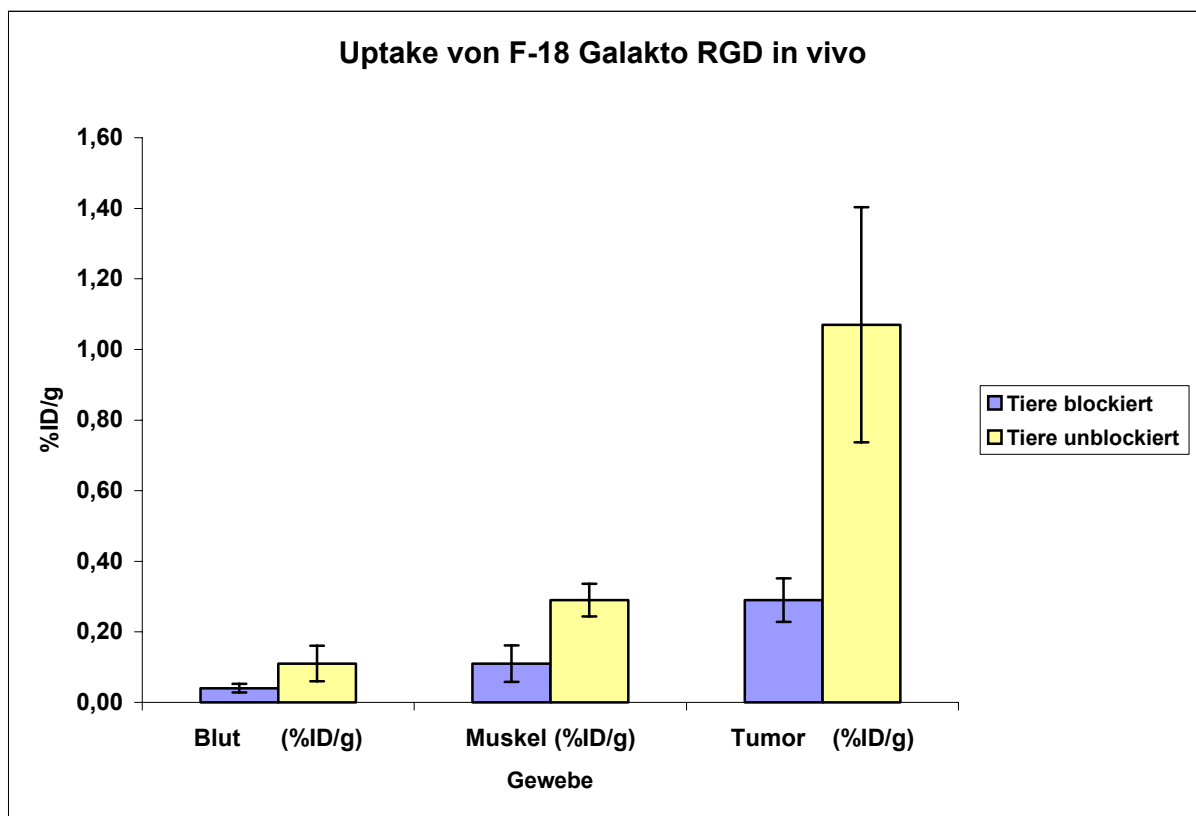


Diagramm 10: Uptake von F-18 Galakto-RGD in vivo in %ID/g

Tiere	Blut	SD	Muskel	SD	Tumor	SD
Tiere blockiert	0,04	0,012	0,11	0,052	0,29	0,062
Tiere unblockiert	0,11	0,050	0,29	0,046	1,07	0,333
P	0,07 n.s.		0,022		0,019	

Die Werte sind in Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm des bezeichneten Gewebes ausgedrückt (% ID/g).

4.3. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Die Immunhistochemie ist ein wesentliches Element in der Bestimmung von Oberflächenantigenen. Daher wurde sie zum Nachweis der Integrine eingesetzt. Nachfolgend werden nun die Bilder gezeigt mit einigen Erklärungen.

4.3.1. CD 31 Färbung

In Abbildung 3 sieht man einen Schnitt eines A431 Tumors, welcher direkt nach den Biodistributionsstudien entnommen worden und für die weitere Verarbeitung tiefgefroren worden war. Die Zellkerne sind mit Hämatoxylin blau gefärbt. Die rot gefärbten Zellen sind CD 31 positiv und somit den Endothelzellen der Blutgefäße im Tumor zuzuordnen. In Abbildung 4 wird ein Kontrollschnitt gezeigt, der nicht mit dem Primärantikörper behandelt wurde und keine rote Färbung aufweist.

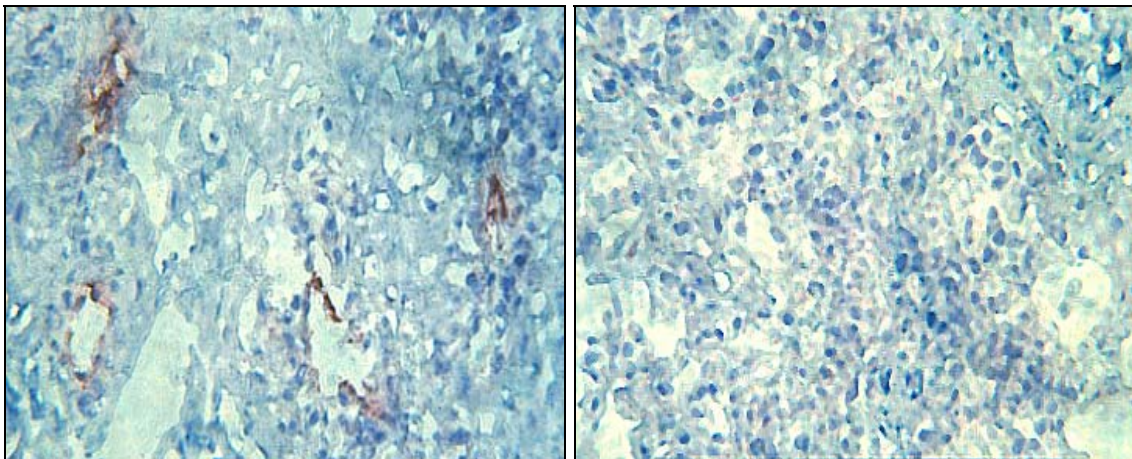


Abb. 3: Färbung mit CD 31 Antikörper: Die CD 31 positiven Zellen stellen sich rot dar.

Abb.4: Kontrollfärbung des Tumors ohne Behandlung mit dem Primärantikörper

4.3.2. CD 51/CD 61 Färbung

CD 51/CD 61 positive Zellen sind in diesen Färbungen rot dargestellt, die Zellkerne blau (Abbildung 5). In Abbildung 6 findet man einen Kontrollschnitt, der ohne den Primärantikörper behandelt worden ist. Erwartungsgemäß ist die Zellmembran der M21-Zellen deutlich CD 51/CD 61 positiv.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei A431 Tumoren keine spezifische Färbung der Tumorzellen. Erwartungsgemäß ist auch keine Färbung von Endothelien zu sehen, da der LM609 Antikörper nicht mit murinem CD 51/CD 61 reagiert.

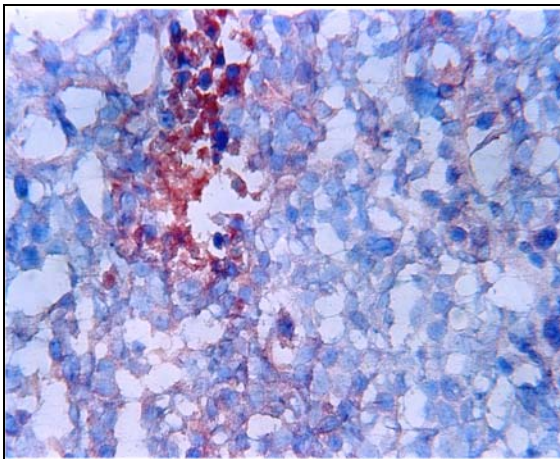


Abb. 5: M21 Tumorzellen gefärbt mit LM609

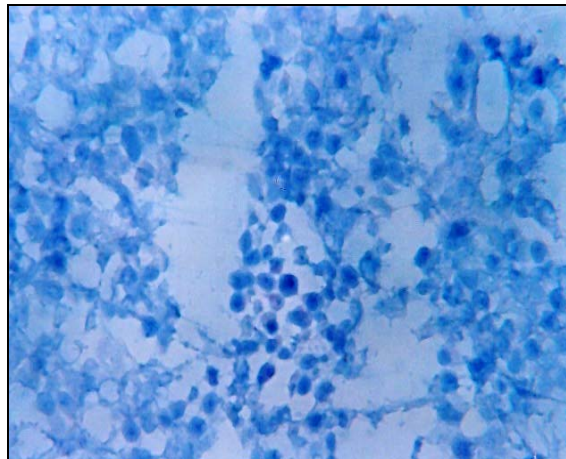


Abb. 6: M21 Tumorzellen gefärbt mit Kontrollantikörper

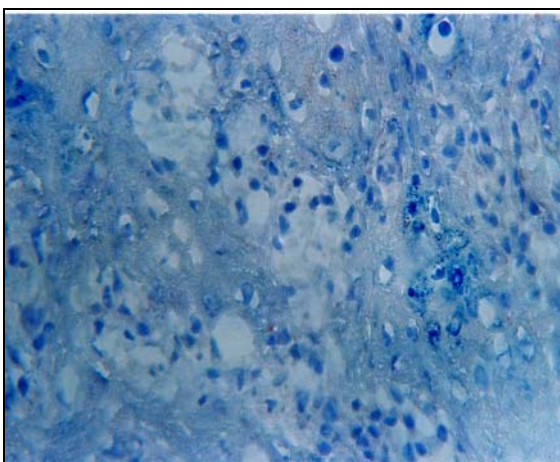


Abb. 7: A431 gefärbt mit LM609. Wie bei der Negativkontrolle in Abb. 8 ist keine $\alpha v\beta 3$ -Expression nachweisbar.

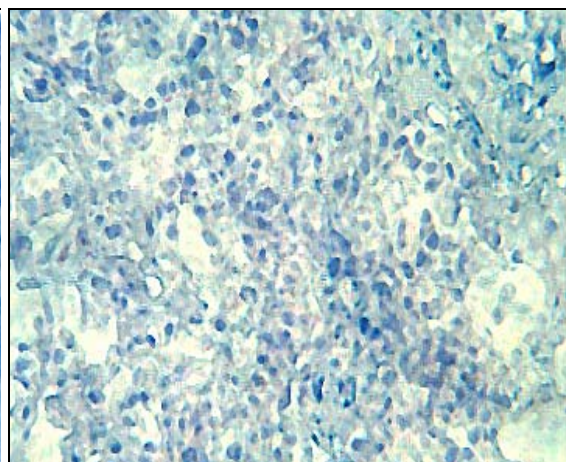


Abb. 8: A431 Kontrollfärbung ohne Primärantikörper

4.3.3. CD 61 Färbung

Schließlich wurde eine Färbung gegen das murine Oberflächenantigen CD 61 ($\beta 3$ -Untereinheit des $\alpha v \beta 3$ -Komplexes) durchgeführt. Leider stehen derzeit keine Antikörper gegen den CD 51/CD 61 Komplex zur Verfügung. Zum Vergleich wurde ein Präparat einer CD 61 positiven Milz einer Maus angefertigt. Das Präparat ist in Abbildung 9 gezeigt. Man sieht regelrechtes Milzgewebe mit blauen Kernen. Auf der Oberfläche der Sinusoide erkennt man in rot-brauner Farbe die CD 61 positiven Zellen. In Abbildung 10 kommt der A431 Tumor zur Darstellung. Man sieht zwischen den blauen Kernen der Tumorzellen rot-braune CD 61 positive Zellen, die ähnlich gefärbt sind wie die Sinusoidepithelien aus dem Milzpräparat. In Abbildung 11 ist eine Negativkontrolle gezeigt, die ohne den Primärantikörper behandelt wurde. Man kann hier keine CD 61 positiven Endothelzellen erkennen.

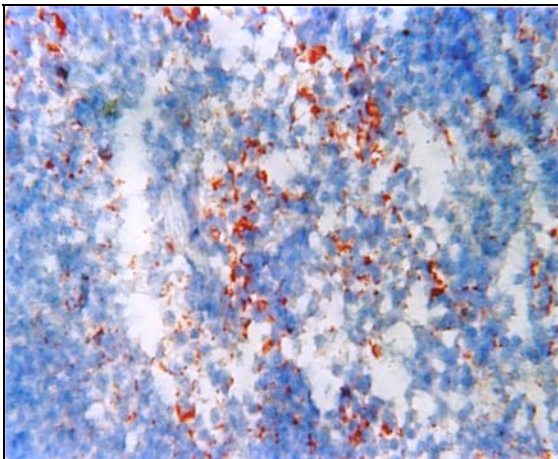


Abb. 9: CD 61 positives Milzpräparat

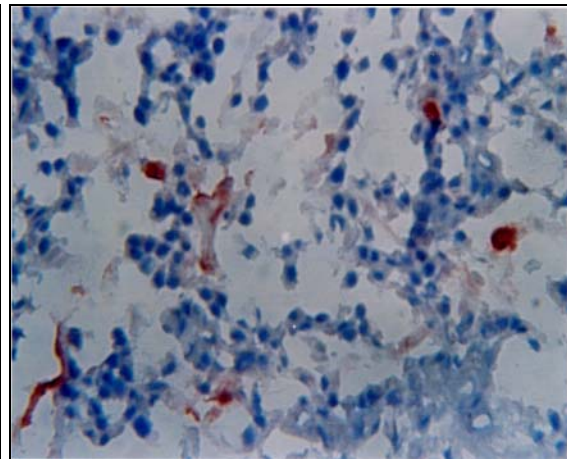


Abb. 10: CD 61 positive Endothelien im A431 Tumor

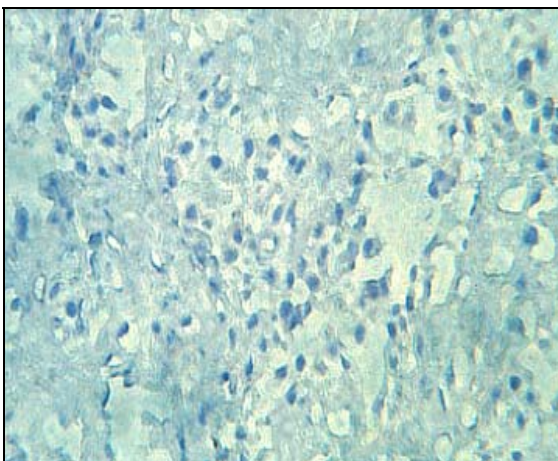


Abb. 11: Kontrollfärbung ohne CD 61 Antikörper

5. Diskussion

5.1 Ergebnisse der in – vitro Experimente

Die in-vitro Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von Gluko- und Galakto-RGD haben drei wesentliche Ergebnisse: Erstens konnte gezeigt werden, dass beide Peptide von Tumorzellen in einem energieabhängigen Prozess internalisiert werden. Zweitens war die Menge an internalisierten Peptiden mehr als fünfmal höher für $\alpha\beta3$ -positive Zellen als für $\alpha\beta3$ -negative Zellen. Drittens konnte die Internalisierung von RGD-Peptiden durch pharmakologische Interventionen, die die Affinität des $\alpha\beta3$ -Integrins zu seinen natürlichen Liganden erhöhen oder erniedrigen, bis zu vierfach verändert werden.

In Vorversuchen zeigte sich eine hohe Variabilität der an der Zelloberfläche von $\alpha\beta3$ -positiven und negativen Zellen gebundenen Menge an RGD-Peptiden. Ein Grund dafür kann die Tatsache sein, dass die Bindung des Liganden an sein Integrin nur von sehr kurzer Dauer und rasch reversibel ist, wenn die Zellen mit Puffer gespült werden.

Da bekannt ist, dass Integrinrezeptoren aber auch nach Bindung ihres Liganden internalisiert werden (Schraa AJ, 2002, S. 241; Roberts MS, 2004, S. 1505), wurde für die weiteren Versuche die internalisierte Menge von Gluko- bzw. Galakto-RGD bestimmt. Dieser Parameter erwies sich in den Vorversuchen als stabiler und besser reproduzierbar. Wahrscheinlich ist außerdem die intrazelluläre Retention in-vivo wichtiger als die extrazellulär gebundene Menge (von Hagen, 2000, S. 186).

Da es zu prüfen galt, welche Eigenschaften die A431 Zellen bezüglich des Uptakes von Gluko-RGD in das Zellinnere haben, wurden die Uptakewerte von M21-L und A431 verglichen. Hier zeigte sich, dass A431 eine ähnlich niedrige Aufnahme von glykosiliertem RGD haben wie M21-L. Diese Ergebnisse ließen sich auch mehrmals reproduzieren. Somit hatte man humane Tumorzellen gefunden, die geeignet waren, um sie in den in-vivo Experimenten einsetzen zu können.

Außerdem wurden die Experimente mit den HUVEC durchgeführt, um Vergleichswerte zu den bekanntlich $\alpha\beta3$ -positiven M21 Zellen akquirieren zu können. Die Literaturangaben zur $\alpha\beta3$ -Expression dieser Zellen sind widersprüchlich und abhängig von den Versuchsbedingungen, wie z.B. dem Sauerstoffpartialdruck (Walton HL, 2000, S. 674).

Es wurde deshalb überprüft, ob HUVEC ebenfalls Gluko-RGD bzw. Galakto-RGD in das Zellinnere aufnehmen und ob dieser Uptake mit M21 vergleichbar ist. Es konnte gezeigt werden, dass HUVEC bei allen Experimenten etwas weniger Gluko-RGD internalisierte als M21. Jedoch nahmen HUVEC Galakto-RGD in höherem Maße auf als M21.

Allgemein kann man feststellen, dass Galakto-RGD weniger gut internalisiert wurde als Gluko-RGD. Der Anteil aufgenommener Substanz pro mg Protein war bei allen Zelllinien ausnahmslos wesentlich geringer als bei Gluko-RGD. So ließ sich feststellen, dass die Werte für den Uptake im Durchschnitt aller in-vitro Experimente für Gluko-RGD bei M21 Zellen im Bereich von 1,0 %–3,5 % pro mg Protein, bei M21-L 0,5 %–0,7 % pro mg Protein, bei A431 ebenfalls um 0,5 % pro mg Protein und bei HUVEC 1,2 %–1,7 % pro mg Protein betragen. Für Galakto-RGD lag dieser Wert bei M21 um 0,4 % pro mg Protein, bei M21-L um 0,1 % pro mg Protein, bei A431 um 0,1 % pro mg Protein und bei HUVEC um 0,8 % pro mg Protein. Jedoch war das Verhältnis der Aufnahme von Gluko- und Galakto-RGD für $\alpha v\beta 3$ -positive und -negative Zellen ähnlich. Sowohl die Aufnahme von Gluko- als auch von Galakto-RGD war etwa dreibis achtfach höher für $\alpha v\beta 3$ -positive als für $\alpha v\beta 3$ -negative Zellen. Es erscheint deshalb möglich, dass Gluko-RGD zu einem größeren Ausmaß $\alpha v\beta 3$ -unabhängig in die Zellen aufgenommen wird. Dies könnte durch die etwas höhere Lipophilie von Gluko-RGD (log P Wert -2.45) im Vergleich zu Galakto-RGD (log P Wert -3.17) bedingt sein (Haubner R, 2004, S. 64).

Eine andere Überlegung wäre, dass das Galakto- bzw. das Gluko-RGD Molekül während der Versuchsdurchführung durch Verschiebungen des pH Wertes oder anderer physikalisch chemischer Einflussfaktoren zerfällt und dann das radioaktive F-18 bzw. I-125 über unspezifische Ionenkanäle in das Zellinnere gelangt. Diese Erklärung kann aber ausgeschlossen werden, da Untersuchungen in Tiermodellen gezeigt haben, dass Gluko- und Galakto-RGD in vivo stabil sind. Es ist somit nicht anzunehmen, dass es in vitro zu einem wesentlichen Metabolismus kommt (Haubner R, 2004, S. 65).

Es ist aus der Literatur bekannt, dass sich Integrin-abhängige Prozesse durch kurze zyklische RGD-Peptide unterbinden lassen (Matsuno H, 1994, S. 2203). Hierzu wurde in den in-vitro Experimenten ein kurzes zyklisches RGD Peptid, welches nicht radioaktiv markiert war, eingesetzt. Dieses blockierte die Bindung von radioaktivem Galakto-RGD an das $\alpha v\beta 3$ -Integrin von HUVEC. Man konnte zeigen, dass die

Aufnahme der radioaktiven Substanz durch den Einfluss von cyclo-RGDyV in den Bereich der Uptakewerte $\alpha\beta3$ -negativer Zellen bei Inkubation mit Galakto-RGD fiel. Damit konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Internalisierung glykosilierter RGD-Peptide in HUVEC spezifisch für $\alpha\beta3$ -Integrin positive Zellen ist.

Die Aufnahme von Gluko- und Galakto-RGD in M21 Zellen und HUVEC war stark temperaturabhängig. Durch Reduktion der Temperatur auf 4 °C konnte die Aufnahme beider Peptide um 80 % reduziert werden. Gleichzeitig stellte man aber fest, dass der Wert für die unspezifische Aufnahme von M21-L und A431 bei Veränderung der Inkubationstemperatur auf 4 °C sich ebenfalls verringerte. Der Effekt war aber deutlich weniger stark als bei M21 Zellen und HUVEC ausgeprägt. Diese Tatsache lässt schlussfolgern, dass auch in $\alpha\beta3$ -negativen Zellen ein energieabhängiger Transport von RGD-Peptiden erfolgt. Dieser Transport ist aber quantitativ wesentlich geringer als bei $\alpha\beta3$ -positiven Zellen und die passive Diffusion in die Zelle spielt eine größere Rolle für die Aufnahme in diesen Zellen.

Der Einfluss zweiwertiger Kationen auf Integrin-Protein-Wechselwirkungen ist weitgehend bekannt (Gailit J, 1988, S. 12927; Yeh CH, 1999, S. 57). Gailit untersuchte, inwiefern divalente Kationen wie Magnesium, Kalzium oder Mangan einen Einfluss auf die Bindung von Rezeptor Liposomen an RGD auf Oberflächen haben. Yeh untersuchte die Bindung von Endothelzellen an Oberflächen unter dem Einfluss divalenter Kationen. Beide fanden heraus, dass Mangan den größten Einfluss auf die Bindungsaffinität von RGD an den Integrinrezeptor aufweist. Weiterhin sind Kalzium- und Magnesium-Ionen essentiell für die Aufrechterhaltung der Bindung von Integrinen an ihre Liganden. Daraus entstand der Gedanke, dass die Internalisierung der RGD-Peptide in das Zellinnere von HUVEC und M21 ebenfalls abhängig sein muss von der Anwesenheit divalenter Kationen. Außerdem sollte ein Anstieg des Uptakes von Gluko- bzw. Galakto-RGD zu verzeichnen sein, wenn Mangan in erhöhter Konzentration vorliegt.

Die in-vitro Experimente konnten dies bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass bei M21 der Uptake von Gluko-RGD von der Anwesenheit von Kalzium-Ionen abhängig ist. Wurden M21 Zellen in PBS, welches Kalzium-frei ist, inkubiert, sank der Uptake von Gluko-RGD auf das Niveau von $\alpha\beta3$ -negativen Zellen wie A431 oder M21-L herab. Genauso konnte dies für HUVEC gezeigt werden. M21-L Zellen hingegen wurden durch die Abwesenheit von Kalzium nicht beeinflusst. Bei ihnen lag der

Uptakewert von Gluko-RGD im selben Bereich wie bei Inkubation in 37 °C und regulärem Medium.

Experimente, die den Einfluss von Mangan untersuchen sollten, konnten ebenfalls bestätigen, dass dieses genannte Kation den größten Effekt auf die Bindungsaffinität von Integrinen und ihren Liganden hat. Die Aufnahme von Gluko-RGD in das Zellinnere von M21 ließ sich durch Zugabe von Mangan in das Inkubationsmedium mehr als verdoppeln.

Somit konnte bestätigt werden, dass nicht nur die Bindung von $\alpha\beta3$ -positiven Zellen, wie z.B. HUVEC an immobilisierte Liganden auf Oberflächen durch divalente Kationen beeinflusst wird, sondern auch die Aufnahme eines RGD-Peptides in $\alpha\beta3$ -positive Zellen. Dies ist ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit, da es zeigt, dass die Aufnahme von radioaktiv markierten RGD-Peptiden nicht nur von der Expression des $\alpha\beta3$ -Integrins, sondern auch von seinem so genannten „Aktivierungszustand“ abhängig ist. Es ist aus der Literatur bekannt, dass verschiedene intrazelluläre Prozesse in gleicher Weise wie die extrazelluläre Konzentration divalenter Kationen die Affinität von $\alpha\beta3$ zu seinen Liganden verändern können. Dies wird als so genanntes „inside-out signalling“ oder Aktivierung des Integrins bezeichnet. Anhand der hier dargestellten Ergebnisse ist zu erwarten, dass die Aktivierung des $\alpha\beta3$ -Integrins zu einer höheren Aufnahme von radioaktiv markierten RGD-Peptiden führt. Es scheint somit denkbar, dass PET-Untersuchungen mit Galakto-RGD nicht nur Aufschluss über die Expression des $\alpha\beta3$ -Integrins, sondern auch über seinen Aktivierungszustand geben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Zellen der Linie M21 und HUVEC Gluko- und Galakto-RGD spezifisch internalisieren, wohingegen Zellen der Linien A431 und M21-L das radioaktiv markierte Molekül nur in sehr geringem Maß aufnehmen. Der Prozess der Internalisierung ist spezifisch blockierbar und wird von der Temperatur sowie von der Anwesenheit divalenter Kationen beeinflusst. Mangan vermag die Aufnahme des Peptides sogar noch signifikant zu steigern. Damit erschienen auf Mäuse transplantierte A431 Tumore in vivo als Modell für die Darstellung der $\alpha\beta3$ -Expression auf aktivierten Endothelzellen geeignet.

5.2 Ergebnisse der in-vivo Experimente

Die in-vivo Experimente zeigten, dass Galakto-RGD in A431 Tumoren signifikant angereichert wird. Das Ausmaß der Anreicherung ist hoch genug, um diese Tumore nicht-invasiv mittels PET darzustellen. Durch Vorbehandlung mit dem $\alpha\beta3$ -Liganden c(RGDyV) konnte die Tumoranreicherung von Galakto-RGD nahezu vollständig blockiert werden. Da A431 Zellen kein $\alpha\beta3$ -Integrin exprimieren und in vitro nur minimale Mengen von Galakto-RGD aufnehmen, bedeutet dies, dass Galakto-RGD in intratumoralen Blutgefäßen angereichert wurde. Somit zeigen diese Ergebnisse zum ersten Mal, dass PET mit Galakto-RGD dazu eingesetzt werden kann, die Expression des $\alpha\beta3$ -Integrins auf aktivierten Endothelzellen nicht invasiv darzustellen. Bisher war nur bekannt, dass die Expression des $\alpha\beta3$ -Integrins auf Tumorzellen mittels glykosilierter RGD Peptide bildlich darstellbar ist (Haubner R, 2001, S. 1781).

Die Tumoraufnahme von Galakto-RGD ist auch im in-vivo Modell blockierbar. Den Versuchstieren wurde vor Gabe der radioaktiven Substanz nicht radioaktives cyclo-RGD injiziert, welches die Bindungsstelle am $\alpha\beta3$ -Integrin der Endothelzellen im Blutgefäß blockierte. Das nachfolgend injizierte Galakto-RGD konnte folglich nicht in die Endothelzellen aufgenommen werden. Somit kamen die Gefäße in den Tumoren nicht zur Darstellung in der PET-Untersuchung.

Parallel zu den PET-Untersuchungen wurden Biodistributionsstudien durchgeführt, um im PET gemessene Signale verifizieren zu können. Hierbei zeigten die Tumore eine hohe Aktivitätsanreicherung, wohingegen in Blut und Muskel wenig radioaktives Galakto-RGD retiniert wurde. Tiere, die vor Aktivitätsinjektion mit der Blockadesubstanz cyclo-RGD behandelt wurden, zeigten, wie in den PET-Studien bereits dargestellt, geringe Aktivitätsanreicherungen.

Man konnte zeigen, dass in allen Experimenten im Blut am wenigsten Aktivität nachzuweisen war. Muskelgewebe, welches aus der hinteren Extremität des Versuchstieres entnommen worden war, nahm geringfügig mehr an Galakto-RGD auf. Trotz Gabe einer Blockadesubstanz war die Aktivitätskonzentration im Tumorgewebe höher als in Blut oder Muskelgewebe. Dies kann auf die hohe Expression von $\alpha\beta3$ -Integrin zurückzuführen sein oder auf unspezifische Mechanismen, wie erhöhtes extrazelluläres Volumen, gesteigerte Perfusion oder Gefäßpermeabilität.

Cohen beschrieb, dass glatte Muskelzellen in Gefäßen $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin nur dann in großer Anzahl auf den Oberflächen exprimieren, wenn diese Zellen aktiviert sind, d.h. wenn Angiogeneseprozesse stattfinden (Cohen SA, 2000, S. 163). Dieser Effekt konnte sehr gut an den PET-Bildern und Biodistributionsstudien gezeigt werden. Man konnte ein Signal nur in dem Areal feststellen, in welchem Angiogenese stattfand, nämlich in den Arealen, denen der Tumor zuzuordnen war. Die Gewebe hingegen, in welchen keine Neoangiogenese mit erforderlicher Aktivierung glatter Muskelzellen stattfand, wiesen kaum Aktivitätsanreicherung auf. Die Aktivitätskonzentration von Galakto-RGD im Muskelgewebe war jedoch höher als die im Plasma und konnte durch Vorbehandlung mit c(RGDyV) verringert werden. Dies lässt vermuten, dass auch in diesen Geweben $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ in geringem Ausmaß exprimiert wird.

Die immunhistochemischen Untersuchungen bestätigten, dass von A431 Zellen auch in vivo kein $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ exprimiert wird, da diese Zellen, im Gegensatz zu den als positiven Kontrollen verwendeten M21 Zellen, keine Bindung des $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -spezifischen Antikörpers LM609 zeigten. Durch die Färbungen mit dem Endothelzellmarker CD 31 konnte die gute Vaskularisation der A431 Tumore dargestellt werden (De Lisser HM, 1997, S. 671). Im Gegensatz zu $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ wird CD 31 jedoch auch auf ruhenden Endothelzellen exprimiert. Dieser Antikörper ermöglicht somit keine spezifische Darstellung der Neoangiogenese.

Hierfür sollten weitere entsprechende Färbungen gegen das $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin mittels eines speziellen Antikörpers durchgeführt werden. Ziel war es zu zeigen, dass im Tumor selbst kein $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (CD 51/CD 61) exprimiert wurde, jedoch in den Gefäßen.

Da auf dem Markt momentan kein geeigneter Antikörper für die Färbung von murinem $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin existiert, wurden Färbungen gegen die β3 -Untereinheit, CD61, eingesetzt, um die Expression des $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrins auf den murinen Gefäßzellen nachzuweisen.

In den Abbildungen 10 und 12 im Ergebnisteil ist zu erkennen, dass die A431 Tumore im Inneren CD 61 positive murine Zellen aufweisen. Diese entsprechen auch morphologisch Endothelzellen. Es konnte also gezeigt werden, dass Zellen humanen Ursprungs kein $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin auf ihrer Oberfläche exprimieren, murine Endothelzellen, die während der tumorassoziierten Neoangiogenese entstanden sind, dahingegen sind eindeutig nachweisbar.

Daraus ergibt sich, dass das im PET gemessene Signal und die in der Biodistribution festgestellte spezifische Aktivitätsanreicherung im Tumorgewebe den während der Neoangiogenese aktivierten Endothelzellen zuzuordnen ist.

Die Ergebnisse sind somit vielversprechend zur nicht-invasiven Darstellung tumorassoziierter Angiogeneseprozesse.

Sollten die in den Tierexperimenten gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen übertragbar sein, kann hierdurch ein wichtiger Beitrag zur Diagnostik maligner Erkrankungen geleistet werden.

Besonders Tumore, die angiogenetische Prozesse in hohem Maße induzieren aber auch Tumore, deren Zellen $\alpha v \beta 3$ -Integrin selbst exprimieren, scheinen für die PET-Darstellung mit Galakto-RGD geeignet. In einer Pilotstudie konnte bereits nachgewiesen werden, dass verschiedene Tumore mit PET und Galakto-RGD dargestellt werden können (Haubner R, Weber WA, 2005, S. e70).

Seit kurzem werden antiangiogenetische Therapien mit Erfolg bei Patienten mit metastasierten Tumoren eingesetzt. Dies konnte insbesondere bei kolorektalen Karzinomen für eine Kombinationstherapie eines VEGF-Antikörpers mit einer Chemotherapie gezeigt werden (Hurwitz H, 2004, S. 2335). Für die weitere Entwicklung derartiger Behandlungen ist es essentiell, die Inhibierung der Angiogenese frühzeitig nachzuweisen und dem Patienten im Falle eines Nicht-Ansprechens Alternativtherapien anbieten zu können.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der Angiogenese kommt es zur verstärkten Expression und funktionellen Aktivierung des $\alpha\beta3$ -Integrins auf Endothelzellen. Die vorliegende experimentelle Arbeit zeigt, dass tumorassoziierte Angiogenese mittels radioaktiv markierter $\alpha\beta3$ -Liganden nicht-invasiv darstellbar ist. In in-vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass $\alpha\beta3$ -positive Zellen, wie Endothel- und Tumorzellen (HUVEC, M21), radioaktiv markierte glykosilierte RGD-Peptide über das $\alpha\beta3$ -Integrin internalisieren. Diese Prozesse waren dabei abhängig von der Anwesenheit divalenter Kationen, v.a. von Kalzium. Der Uptake radioaktiv markierter Peptide ließ sich durch die Anwesenheit von Mangan wesentlich steigern. Der Prozess der Internalisierung in das Zellinnere war temperaturabhängig und durch $\alpha\beta3$ -Liganden inhibierbar. Im Gegensatz dazu zeigten Tumorzellen ohne Expression des $\alpha\beta3$ -Integrins (M21-L und A431) eine etwa fünffach geringere zelluläre Aufnahme, die sich nicht wesentlich durch $\alpha\beta3$ -Liganden, Temperaturerniedrigung oder Veränderung der Konzentration von divalenten Kationen beeinflussen ließ.

Für die in-vivo Untersuchungen zur Darstellung der Angiogenese mittels radioaktiv markierter RGD-Peptide wurden auf Nacktmäuse xenotransplantierte A431 Zellen eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass das mit Fluor-18 radioaktiv markierte glykosilierte RGD-Peptid Galakto-RGD in diesen Tumoren im Tiermodell stark angereichert wurde. (Tumor/Blut Verhältnis nach 90 Minuten: 9,8). Die Anreicherung ließ sich durch Vorbehandlung mit einer pharmakologischen Dosis von $\alpha\beta3$ -Liganden blockieren (-73 %). Die Aufnahme von Galakto-RGD in A431 Tumore konnte durch Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nicht-invasiv quantitativ erfasst werden. Immunhistochemische Färbungen zeigten, dass die intratumoralen Blutgefäße - im Gegensatz zu den Tumorzellen - $\alpha\beta3$ stark exprimierten.

Somit wurde gezeigt, dass es möglich ist tumorassoziierte Neoangiogenese bildlich im PET darzustellen. Die Anwendung der beschriebenen Darstellung von Angiogeneseprozessen könnte sich auf viele medizinische Fachbereiche ausdehnen.

Im Vordergrund steht die Darstellung von Angiogenese bei Tumoren und die Therapiekontrolle von anti-angiogenetischen Behandlungen. Es ist aber auch vorstellbar, PET-Untersuchungen mit Galakto-RGD bei anderen Erkrankungen mit verstärkter Angiogenese, wie bei chronisch entzündlichen Prozessen, einzusetzen.

Literaturverzeichnis

1. Albelda SM, Buck CA .
Integrins and other cell adhesion molecules.
FASEB J 4: 2868-2880, 1990
2. Baldwin HS, Shen HM, Yan HC.
Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development.
Development 120: 2539-2553, 1994
3. Bendeck MP, Irvin C, Reidy M, Smith L, Mulholland D, Horton M, Giachelli CM .
Smooth muscle cell matrix metalloproteinase production is stimulated via alpha(v)beta(3) integrin.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 20: 1467-1472 , 2000
4. Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA.
Requirement of vascular integrin avb3 for angiogenesis.
Science 264: 569-571, 1994
5. Brooks PC Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA.
Integrin alpha(v)beta(3) antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.
Cell 79: 1157-1164, 1994
6. Büll, Schicha, Biersack, Knapp, Reiners, Schober (Hrsg.)
Nuklearmedizin
Thieme Verlag, Stuttgart/New York, 1999
3. Auflage: 8-9; 48-55
7. Cheresh DA, Spiro RC.
Biosynthetic and functional properties of an Arg-Gly-Asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor.
J Biol Chem 262: 17703-17711, 1987
8. Cohen, SA, Trikha, M, Mascelli, MA .
Potential future clinical applications for the GP IIb/IIIa antagonist, abciximab in thrombosis, vascular and oncological indicators.
Pathol Oncol Res 6: 163-174, 2000
9. De Lisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM.
Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis.
Am J Pathol 151: 671-677, 1997

10. De Lisser HM, Newman PJ, Albelda SM.
Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31.
Immunol Today 15: 490-495, 1994
11. Dusseau JW, Hutchins PM, Malbasa DS.
Stimulation of angiogenesis by adenosine on the chick chorioallantoic membrane.
Circ Res 59: 163-170, 1986
12. Ferrara N, Henzel WJ.
Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.
Biochem Biophys Res Commun 161: 851-858, 1989
13. Folkman J, Haudenschild C.
Angiogenesis in vitro.
Nature 288: 551-556, 1980
14. Frieser M, Hallmann R, Johansson S.
Mouse polymorphonuclear granulocyte binding to extracellular matrix molecules involves beta 1 integrins.
Eur J Immunol 26: 3127-3136, 1996
15. Gailit J, Ruoslahti E.
Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations.
J Biol Chem 263: 12927-12932, 1988
16. Gao B, Saba TM, Tsan MF.
Role of avb3 integrin in TNF-alpha-induced endothelial cell migration.
Am J Physiol Cell Physiol 283: 1196-1205, 2002
17. Gehlsen KR, Argraves WS, Pierschbacher MD.
Inhibition of in vitro tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides.
J Cell Biol 106: 925-930, 1988
18. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ.
In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.
J Nat Cancer Inst 51: 1417-1423, 1973
19. Graeber JE, Glaser BM, Setty BN.
15-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates migration of human retinal microvessel endothelium in vitro and neovascularization in vivo.
Prostaglandins 39: 665-673, 1990

20. Guhlmann C, Reske S.
PET in der Onkologie-klinische Indikationen: Ergebnisse der zweiten deutschen Konsensuskonferenz.
Forum DKG 1999, 14: 32-45
21. van Hagen PM, Breeman WA, Bernard HF, Schaar M, Mooij CM, Srinivasan A, Schmidt MA, Krenning EP, de Jong M.
Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD analogue for tumour imaging and radionuclide therapy.
Int J Cancer 90: 186-198, 2000
22. Haubner R, Weber WA, Beer Aj, Vabuliene E, Reim D, Sarbia M, Becker KF, Goebel M, Hein R, Wester HJ, Kessler H, Schwaiger M.
Noninvasive visualization of the activated alphavbeta3 integrin in cancer patients by positron emission tomography and [(18F)]Galacto-RGD
PLoS Med 3: e70, 2005
23. Haubner R, Kuhnast B, Mang C, Weber WA, Kessler H, Wester HJ, Schwaiger M.
[18F]Galacto-RGD: synthesis, radiolabeling, metabolic stability, and radiation dose estimates.
Bioconjug Chem 15: 61-69, 2004
24. Haubner R, Wester HJ, Burkhart F, Senekowitsch-Schmidtke R, Weber W, Goodman S, Kessler H, Schwaiger M.
Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics.
J Nucl Med 42: 326-336, 2001
25. Haubner R, Wester HJ, Weber W, Mang C, Ziegler SI, Goodman S, Senekowitsch-Schmidtke R, Kessler H, Schwaiger M.
Noninvasive imaging of avb3 Integrin expression using F18 labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography.
Cancer Res 61: 1781-1785, 2001
26. Horenstein AL, Stockinger H, Imhof BA.
CD38 binding to human myeloid cells is mediated by mouse and human CD31.
Biochem J 330: 1129-1135, 1998
27. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny B.
Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.
N Engl J Med 350: 2335-2342, 2004

28. Hwang R, Varner J.
The role of integrins in tumor angiogenesis.
Hematol Oncol Clin North Am 18: 991-1006, 2004
29. Hynes RO.
Integrins: a family of cell surface receptors.
Cell 48: 549-554, 1987
30. Hynes RO.
Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.
Cell 69: 11-25, 1992
31. Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U.
Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor.
Nature 338: 557-562, 1989
32. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG.
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins identification by morphologic and immunologic criteria.
J Clin Invest 52: 2745-2756, 1973
33. Kieffer N, Phillips DR.
Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions.
Annu Rev Cell Biol 6: 329-357, 1990
34. Moulder K, Roberts K, Shevach EM.
The mouse vitronectin receptor is a T cell activation antigen.
J Exp Med 173: 343-347, 1991
35. Matsuno H, Stassen JM, Vermylen J.
Inhibition of integrin function by a cyclic RGD-containing peptide prevents neointima formation.
Circulation 90: 2203-2206, 1994
36. Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R.
Angiogenesis (Steiner, Weisz, Langer, eds.), 145-147
Birkhaeuser Verlag, Basel, 1992
37. Piali L, Hammel P, Uherek C.
CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium.
J Cell Biol 130: 451-460, 1995

38. Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E.
A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin.
Proc Natl Acad Sci USA 82: 5766-5770, 1985
39. Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP.
Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene.
Cell 56: 345-355, 1989
40. Roberts MS, Woods AJ, Dale TC, Van Der Sluijs P, Norman JC.
Protein kinase B/Akt acts via glycogen synthase kinase 3 to regulate recycling of alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins.
Mol Cell Biol 24: 1505-1515, 2004
41. Ruoslahti E.
Integrins.
J Clin Invest 87: 1-5, 1991
42. Ruoslahti E, Pierschbacher MD.
Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal.
Cell 44: 517-518, 1986
43. Schraa AJ, Kok RJ, Berendsen AD.
Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting.
J Control Release 83: 241-251, 2002
44. Schultz JF, Armant DR.
Beta 1- and beta 3-class integrins mediate fibronectin binding activity at the surface of developing mouse peri-implantation blastocysts regulation by ligand-induced mobilization of stored receptor.
J Biol Chem 270: 11522-11531, 1995
45. Sheppard D.
Endothelial integrins and angiogenesis: not so simple anymore.
J Clin Invest 110: 913-914, 2002
46. Springer TA.
The sensation and regulation of interactions with the extracellular environment: the cell biology of lymphocyte adhesion receptors.
Annu Rev Cell Biol 6: 359-402, 1990
47. Strynadka NC, James MN.
Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins.
Annu Rev Biochem 58: 951-998, 1989

48. Su JD, Mayo LD, Donner DB, Durden DL.
PTEN and phosphatidylinositol 3'-kinase inhibitors up-regulate p53 and block tumor-induced angiogenesis: evidence for an effect on the tumor and endothelial compartment.
Cancer Res 63: 3585-3592, 2003
49. Suzuki S, Argraves WS, Arai H.
Amino acid sequence of the vitronectin receptor alpha subunit and comparative expression of adhesion receptor mRNAs.
J Biol Chem 262: 14080-14085, 1987
50. Trikha M, Zhou Z, Timar J, Raso E, Kennel M, Emmell E, Nakada MT.
Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and avb3 integrins in tumor growth, angiogenesis and metastasis.
Cancer Res, 62: 2824-2833, 2002
51. Walton HL, Corjay MH, Mohamed SN.
Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) in cultured human endothelial cells.
J Cell Biochem 78: 674-680, 2000
52. West DC, Hampson IN, Arnold F.
Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid.
Science 228: 1324-1326, 1985
53. Yasuda M, Hasunuma Y, Adachi H.
Expression and function of fibronectin binding integrins on rat mast cells.
Int Immunol 7: 251-258, 1995
54. Yeh CH, Peng HC, Huang TF.
Cytokines modulate integrin avb3-mediated human endothelial cell adhesion and calcium signaling.
Exp Cell Res 251: 57-66, 1999
55. Ziegler SI, Pichler BJ, Boening G.
A prototype high-resolution animal positron tomograph with avalanche photodiode arrays and LSO crystals.
Eur J Nucl Med 28: 136-143, 2001