

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der
Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

**Anwendung von radioaktiv markierten RGD-Peptiden zur Kontrolle
der Behandlung von malignen Tumoren mit
 $\alpha_v\beta_3$ Integrin Liganden**

Tanja Renate Maria Dettenhofer

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 08.11.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.02.2006 angenommen.

Meinen Eltern und meiner Schwester Carmen

Inhalt

1	EINLEITUNG	6
1.1	Fragestellung	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Chemikalien	13
2.2	Lösungen	14
2.2.1	Zellkultur.....	14
2.2.1.1	Zelllinie M21 und M21-L	14
	RPMI-Medium	14
	EDTA-Lösung.....	14
2.2.1.2	Zelllinie A431	14
	RPMI-Medium	14
	EDTA-/Trypsinlösung	14
2.2.2	In-vitro Versuche	15
	Inkubationsmedium	15
	Bindepuffer	15
2.2.3	Proteinmengenbestimmung.....	15
	Wasser-/PBS-Gemisch.....	15
	Proteinstandard	15
2.2.4	Anästhesie.....	16
2.3	Geräte	16
2.4	Radioaktiv markierte Tracer	16
2.5	Blockaden	17
2.6	Zellkultur	18
2.6.1	Zelllinie M21 und M21-L	18
2.6.2	Zelllinie A431	18

2.7	In-vitro Untersuchung der Radioliganden-Bindung und Internalisierung durch den Rezeptor $\alpha_v\beta_3$	19
2.7.1	Versuchsprotokoll.....	19
2.7.2	Bestimmung der Internalisierung unter 4 °C.....	20
2.7.3	Blockierung des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors durch die Substanzen S247 und P-004... 20	
2.7.3.1	Dosisabhängigkeit der Blockade	20
2.7.3.2	Bestimmung der Dauer der Rezeptorblockade.....	21
2.7.4	Proteinmengenbestimmung.....	21
2.7.5	Datenauswertung	22
2.8	Tierexperimente	23
2.8.1	Versuchstiere und Haltung	23
2.8.2	Anästhesie und Abtötung	23
2.8.3	Tumormodell.....	23
2.8.4	In-vivo Darstellung des $\alpha_v\beta_3$ Integrins.....	24
2.8.4.1	Versuchsablauf.....	24
2.8.4.2	Injektion des radioaktiv markierten Tracers.....	24
2.8.4.3	Injektion der $\alpha_v\beta_3$ Integrin Antagonisten	25
2.8.4.4	In-vivo Aufnahmen der Tracerverteilung im Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographen: LSO-APD PET (MADPET)	25
2.8.4.5	Durchführung und Auswertung der Biodistributionsuntersuchung.....	26
2.9	Statistische Auswertung	26
3	ERGEBNISSE	27
3.1	In-vitro Untersuchungen zur Bindung und Internalisierung von radioaktiven Tracern durch den Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ und dessen Blockade durch antagonistische Substanzen bei Zellen der Linie M21 und M21-L 27	
3.1.1	Proteinmengenbestimmung.....	27
3.1.2	Bindung und Internalisierung des radioaktiven Tracers unter 37 °C und 4 °C im Vergleich.....	28
3.1.3	Internalisierung des radioaktiv markierten Tracers unter Vorbehandlung mit den Substanzen S247 und P-004.....	30
3.1.3.1	Dosisabhängigkeit der $\alpha_v\beta_3$ Rezeptorblockade mit S247 und P-004 ... 30	
3.1.3.2	Dauer der Bindung der Substanz S247 an den Rezeptor	33

3.2 Tierexperimente	34
3.2.1 Tumormodell.....	34
3.2.2 Biodistribution von [¹⁸ F]Galacto-RGD nach intravenöser Injektion	34
3.2.3 In-vivo Darstellung der Anreicherung von [¹⁸ F]Galacto-RGD mittels Kleintier-PET	37
4 DISKUSSION	41
4.1 In-vitro Versuche	41
4.2 In-vivo Versuche	45
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	51
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	53
7 ABKÜRZUNGEN	64
8 DANKSAGUNG	65

1 Einleitung

Integrine gehören neben Cadherinen, Immunglobulinen und Selektinen zur großen Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle (Aplin et al. 1998; S.197). Sie stellen eine Familie membranständiger Glykoproteine dar, welche sowohl für Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Kontakte von großer Bedeutung sind. Integrine besitzen eine heterodimere Struktur, bestehend aus einer nicht kovalent verbundenen α - und β -Untereinheit, die neben einer großen extrazellulären Domäne einen kurzen transmembranen sowie einen zytoplasmatischen Anteil aufweist (siehe Abb. 1). Es sind mindestens 18 α -, sowie 8 β -Untereinheiten bekannt, die durch Kombination über 24 verschiedene Integrine bilden (Hynes 1987; S.549, Albelda et al. 1990a; S.2868, Ruoslahti 1991; S.1, Hynes 1992; S.11, Gille et al. 1996; S.93, Kim et al. 1997; S.123, Ivaska et al. 2000; S.17).

Die $\alpha\beta$ -Paarung legt die Spezifität für die Liganden fest, welche unter anderem Moleküle der extrazellulären Matrix (EZM) wie Fibronektin, Fibrinogen, Vitronektin, Laminin, Kollagen, Tenascin, Thrombospondin, von Willebrand Faktor (vWF) und Osteopontin sind. Die Erkennung erfolgt häufig durch das Tripeptid Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) (Pierschbacher et al. 1984; S.5985, Ruoslahti et al. 1987; S.491, Ruoslahti 1996; S.697). Darüber hinaus stellen manche Integrine auch Zell-Zell-Kontakte her, indem sie an Zellmembran-Proteine binden, zum Beispiel an zur Immunglobulinklasse gehörendes ICAM-1 und ICAM-2 (Springer 1990; S.425).

Der zytoplasmatische Anteil stellt über intrazelluläre Proteine wie Talin (Rees et al. 1990; S.685), Vinculin (Gilmore et al. 1995, S.197, Johnson et al. 1995, S.261) und α -Aktin (Otey et al. 1990, S.721) eine Verbindung zwischen Rezeptor und Aktinfilamenten des Zytoskeletts her. Dies ermöglicht sowohl eine feste Bindung an die Matrix als auch eine transzelluläre Signalübertragung (Damsky et al. 1992, S.772, Lester et al. 1992, S.31, Schwartz et al. 1995, S.549, Akiyama 1996, S.181, Aplin et al. 1998, S.197, Hynes 2002, S.673). Die Bindung an EZM-Moleküle löst verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege mittels „second messenger“ Molekülen aus. Hierzu zählt unter anderem die Aktivierung von zytoplasmatischen Tyrosinkinasen (zum Beispiel „focal adhesion kinase“ [FAK]) sowie von Serin-/Threoninkinasen. Darüber hinaus sind die Aktivierung von Ionenströme wie zum Beispiel von Ca^{2+} und Na^+/H^+ und die Synthese von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Howe et al. 1998; S.220) zu nennen. Die Signalübertragung kann Veränderungen im Zellzyklus sowie

Migration, Adhäsion und Invasion der Zellen bewirken. Neben diesem „outside-in signaling“ besteht ebenso die Möglichkeit der entgegengesetzten Richtung, des „inside-out signaling“, was zur Veränderung der Rezeptoraffinität führt (Hynes 1992, S.11, Chen et al. 1994, S.18307, Schwartz et al. 1995, S.549, Kim et al. 1997; S.123).

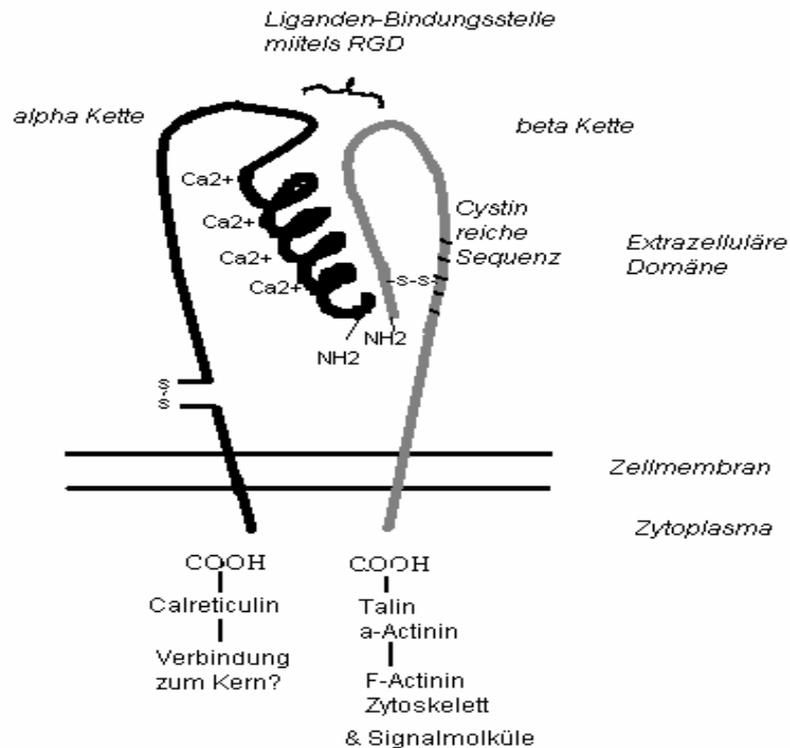


Abb. 1

Schematische Darstellung des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors (modifiziert nach Haubner)

Die Bedeutung der Integrine spiegelt sich in der großer Vielfalt ihrer Expressierung auf verschiedensten Zelltypen wider, wobei manche für den Zelltyp spezifisch sind, wie zum Beispiel das Glykoprotein gp IIb/IIIa, das ausschließlich auf Megakaryozyten und Thrombozyten zu finden ist (Ginsberg et al. 1988, S.1). Andere dagegen sind weniger zellspezifisch und erfüllen auch einander ähnliche Aufgaben.

Grob zusammengefasst ist die Familie der Integrine von großer Bedeutung für Thrombozytenaggregation, immunologische Prozesse, embryonale Entwicklung und Wundheilung (Kumar 1998, S.1365). Aber auch im Rahmen der Angiogenese, die von der Adhäsions- und Invasionsfähigkeit der vaskulären Zellen abhängig ist, spielen sie eine wichtige Rolle (Brooks 1996, S.683). Von Bedeutung sind sie darüber hinaus in der Pathogenese von Krankheiten wie Thrombozytenaggregationsstörungen, wie zum Beispiel die Glanzmann Thrombasthenie (Ginsberg et al. 1988, S.1), chronischen Entzündungen, degenerativen Augenerkrankungen sowie vor allem von Tumoren und deren Metastasierung.

In diesem Zusammenhang ist insbesondere das Integrin $\alpha_v\beta_3$, auch als Vitronektinrezeptor bezeichnet, zu nennen. Es ist in vielen pathologischen Prozessen wie unkontrollierter Angiogenese (zum Beispiel Retinopathien (Friedlander et al. 1996, S.9764) Rheumatoide Arthritis (Storgard et al. 1999, S.47) und maligne Tumoren), Osteoporose (Engleman et al. 1997, S.2284), Tumorwachstum (Brooks et al. 1994b, S.1157, Brooks et al. 1995, S.1815) und Tumormetastasierung (Albelda et al. 1990b, S.6757, Felding-Habermann et al. 1992, S.5070, Felding-Habermann et al. 2002, S.427) vermehrt beteiligt.

Das Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit einer Größe von 160 (α -Kette)/ 85 (β -Kette) kDa zeigt viele der typischen strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Integrinfamilie. Beim Erwachsenen konnte dieser Rezeptor nur auf Osteoklasten, aktivierten Leukozyten, Makrophagen sowie in geringem Maß auf Thrombozyten, ruhenden Endothelzellen, auf glatten Muskelzellen des Uterus und der Gefäße sowie in Niere und Plazenta nachgewiesen werden (Horton 1997, S.722, Eliceiri et al. 1999, S.1227). Aktivierte Endothelzellen, wie sie in der Angiogenese zum Beispiel bei Entzündungen, Wundheilungen und Tumoren vorkommen, weisen dagegen eine hohe Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins auf (Brooks et al. 1994a, S.569), was unter anderem auf stimulierende Cytokine wie „tumor necrosis factor α “ (TNF α) und „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) zurückzuführen ist (Friedlander et al. 1995, S.1500). Auch auf Tumorzellen, insbesondere bei invasiven Formen, lässt sich der $\alpha_v\beta_3$ Rezeptor vermehrt nachweisen. Beispiele dafür sind Tumoren der Mamma, der Lunge, der Blase, der Prostata sowie Osteosarkome, Neuroblastome, Glioblastome (Gladson et al. 1991, S.1924) und Melanome (Albelda et al. 1990b, S.6757, Gehlsen et al. 1992, S.111). So konnte zum Beispiel an einem Melanommodell eine Korrelation zwischen Invasivität

und $\alpha_v\beta_3$ Expression gezeigt werden (Albelda et al. 1990b, S.6761, Felding-Habermann et al. 1992, S.2018).

Als Ligand für Zell-Matrix-Kontakte wurde als erstes das Protein Vitronektin entdeckt, worauf auch der Name Vitronektinrezeptor für $\alpha_v\beta_3$ zurückzuführen ist. Darüber hinaus zählen Fibronektin, Osteopontin, Sialoprotein, vWF, Fibrinogen, Thrombospondin und Laminin zu den Liganden. Die Bindung des $\alpha_v\beta_3$ Integrins erfolgt an die Peptidsequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) in diesen Proteinen (Cheresh et al. 1987a, S.1434). Eine Bindung von zum Beispiel Vitronektin führt zur Ausbildung von „focal contacts“ über eine Umlagerung der Aktinfilamente. Der Rezeptor vermittelt so die Adhäsion an die Matrix und befähigt die Zellen, im Gewebe zu migrieren. Auch auf im Blut zirkulierenden Zellen begünstigt das Integrin $\alpha_v\beta_3$ die Adhäsion an das Endothel sowie die transendotheliale Migration der Zellen, was für den Metastasierungsprozess bei Tumoren wichtig ist (Felding-Habermann et al. 1996, S.5895, Voura et al. 2001, S.2699). Ebenso begünstigt das $\alpha_v\beta_3$ Integrin auf der Oberfläche von Tumorzellen die Ansiedlung im Knochen sowie die Osteolyse. Darüber hinaus ist dieses Integrin auf der Oberfläche von Osteoklasten zu finden. Es bewirkt über die Bindung von Osteopontin deren Aktivierung, was zu einer vermehrten Knochenresorption und Osteolyse führt (Miyachi et al. 1991, S.20369, McHugh et al. 2000, S.433, Chellaiah et al. 2003, S.197).

Die Migration von Tumorzellen in das umliegende Gewebe wird außerdem durch Matrixmetalloproteasen (MMP) erleichtert. Man hat gezeigt, dass der $\alpha_v\beta_3$ Rezeptor aktiviertes MMP-2 sowie MMP-9 unter anderem auf der Zelloberfläche von Endothel-, Tumor- oder auch Plasmazellen direkt bindet und in dieser Kombination die Zellinvasion in die umgebende Matrix begünstigt wird (Brooks et al. 1996, S.683, Seftor et al. 1999, S.359, Hofmann et al. 2000, S.625, Ria et al. 2002, S.836). Darüber hinaus binden $\alpha_v\beta_3$ -positive Zellen diese Protease nicht nur, sie steigern auch deren Sekretion. MMP-2 proteolysiert zum Beispiel natives Kollagen, dessen RGD-Motiv erst nach diesem Schritt von $\alpha_v\beta_3$ erkannt wird. Diese Assoziation von Integrinexpression und Proteolysefähigkeit ist besonders für die Tumordinvasion sowie für die Ausbildung neuer Gefäße von großer Bedeutung (Stetler-Stevenson 2001, S.383).

Eine weitere wichtige Eigenschaft ist, dass agonistische Bindung an den $\alpha_v\beta_3$ Rezeptor die Zelle vor Apoptose bewahrt, was sowohl bei Melanom- als auch Endothelzellen gezeigt wurde (Montgomery et al. 1994, S.8858, Varner et al. 1995, S.367, Petitclerc et al. 1999, S.2724). Die Rezeptorbindung führt zur Suppression der p53 Aktivität und blockiert die durch p53 induzierbare p21WAF1/CIP1 Expression. Dies bewirkt eine Zunahme der bcl-2/bax ratio. Als Folge davon nimmt die Zellüberlebensrate zu, was wiederum zu einem unkontrollierten Wachstum der Tumorzellen beiträgt (Stromblad et al. 1996, S.429).

Zusammenfassend zeigt sich, dass das Integrin $\alpha_v\beta_3$ besonders im Bereich Tumorwachstum, Invasivität und Metastasierungspotential sowie im Angiogeneseprozess eine kritische Rolle spielt. Da der Rezeptor auf normalem Gewebe und ruhenden Endothelzellen nur schwach exprimiert wird, stellt er ein geeignetes Ziel für neue Therapien in diesem Bereich dar. Sowohl Anti-Integrin Antikörper, wie zum Beispiel der monoklonale Antikörper (mAb) LM609, als auch synthetische RGD-Peptide werden als Antagonisten eingesetzt. Diese binden je nach Konfiguration mit hoher Affinität an den Rezeptor. Sie blockieren Zelladhäsion, Migration, Wachstum, Differenzierung und führen zur Apoptose (Aumailley et al. 1991, S.50, Pfaff et al. 1994, S.20233, Ruoslahti 1996, S.697). Das Wachstum neuer Blutgefäße wird inhibiert und so die Gefäßversorgung des Tumors eingeschränkt. In verschiedenen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass dies zu einer Wachstumsinhibierung oder Tumorregression führt (Brooks et al. 1994b, S.1157, Brooks et al. 1995, S.1815, Hammes et al. 1996, S.529). Zusätzlich zu ihrer Wirkung auf die tumorinduzierte Angiogenese können $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten auch direkt das Wachstum und die Metastasierungsfähigkeit von $\alpha_v\beta_3$ -positiven Tumorzellen antagonisieren.

Trotz seiner wichtigen Rolle im Rahmen der Angiogenese und Tumorzellmetastasierung ist das $\alpha_v\beta_3$ Integrin nur eines einer Vielzahl von zellulären Rezeptor- und Adhäsionsmolekülen, die bei unterschiedlichen Tumoren in verschiedenem Ausmaß exprimiert werden. Es ist somit nicht zu erwarten, dass eine Therapie mit $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten bei allen Tumorerkrankungen gleichermaßen effizient ist. Um $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten gezielt einsetzen zu können, ist es deshalb wesentlich, den Rezeptorstatus der Tumorzellen beziehungsweise der Endothelzellen vor Therapie zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden in den letzten Jahren radioaktiv markierte,

zyklische Peptide mit einer RGD-Sequenz entwickelt (Sipkins et al. 1998, S.623, Haubner et al. 1999, S.1061, Boerman et al. 2000, S.195). Durch die radioaktive Markierung mit Positronenstrahlern kann die Aufnahme dieser Peptide mittels Positronen Emissions Tomographie (PET) nicht-invasiv nachgewiesen werden. Die PET ist für diese Anwendung besonders geeignet, da sie im Vergleich zu anderen klinischen Bildgebungstechniken die höchste Sensivität aufweist und Konzentrationen von radioaktiven Tracern im picomolaren Bereich bestimmen kann (Weber et al. 2001, S.179). Zusätzlich zum Nachweis der Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins kann die PET mit radioaktiv markierten RGD-Peptiden auch dazu eingesetzt werden, die Blockade des $\alpha_v\beta_3$ Integrins durch therapeutisch eingesetzte $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten zu bestimmen und so die Therapie mit $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten zu überwachen. Diese potentielle Anwendung von radioaktiv markierten RGD-Peptiden wurde in der vorliegenden experimentellen Arbeit an Zellkulturen und murinen Tumormodellen untersucht.

1.1 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es zu zeigen, inwieweit Untersuchungen mit radioaktiv markierten RGD-Peptiden dazu eingesetzt werden können, um die Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins auf Tumor- und Endothelzellen nicht-invasiv nachzuweisen und die Blockade des Integrins mit $\alpha_v\beta_3$ spezifischen Antagonisten quantitativ zu erfassen.

Hierzu wurden die $\alpha_v\beta_3$ -spezifischen Liganden [^{125}I]Gluco-RGD und [^{18}F]Galacto-RGD verwendet. Diese zeichnen sich durch eine hoch-affine Bindung an diesen Rezeptor aus und zeigen nur sehr geringe Affinität zu anderen RGD-bindenden Integrinen (Haubner et al. 1999, S.1065, Haubner et al. 2001b, S.1784). Mit Hilfe dieser Tracer wurde die Blockade des $\alpha_v\beta_3$ Integrins durch die peptidomimetischen Antagonisten S247 und P-004 in Zellkulturen und tumortragenden Mäusen untersucht. Für in-vitro wie auch in-vivo Versuche wurden die $\alpha_v\beta_3$ -exprimierenden Melanomzellen M21, als Kontrolle die rezeptornegativen Zellen M21-L, genutzt. Zum Nachweis der Rezeptorblockade in tumorinduzierten Gefäßen dienten für in-vivo Experimente $\alpha_v\beta_3$ -negative Tumorzellen der Linie A431, Zellen eines menschlichen Plattenepithelkarzinoms.

Es wurde zum einen die Bindung des Tracers an $\alpha_v\beta_3$ auf der Zelloberfläche sowie dessen Aufnahme in das Zellinnere gemessen. Darüber hinaus sollten Daten zur Blockade der Aufnahme der beiden radioaktiven Liganden durch S247 und P-004 gewonnen werden.

In einem nächsten Schritt wurde an tumortragenden Mäusen untersucht, ob sich mit Hilfe von PET-Untersuchungen mit [^{18}F]Galacto-RGD die Blockade des $\alpha_v\beta_3$ Integrins mit S247 und P-004 nicht-invasiv nachweisen lässt. Zur Validierung der mittels PET nicht-invasiv bestimmten Traceraufnahme im Tumorgewebe wurden Biodistributionsuntersuchungen durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Calciumchlorid-2-hydrat krist. $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, 9018499, Darmstadt
Diethylether	Merck, 100926.100, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Sigma, C.C.Pro Z 17-M, Deisenhofen
Farbstoff Konzentrat Protein Assay	Bio-Rad, 500-0006, München
Fötale Kälberserum FKS	Seromed, S 0115, Berlin
Gentamycin 10 mg/ml	Seromed, A 2712, Berlin
Glutamin	Seromed, K 0282, Berlin
Ketavet 100 mg/ml (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia & Upiohn, Erlangen
Magnesiumchlorid-hexahydrat $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck, 58833.0250, Erlangen
Manganese Chloride Tetrahydrate $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	Sigma, M-3634, Deisenhofen
NaCl-Lösung 0,9%	Merck, 106404, Erlangen
Natriumacetat	Merck, 106265, Erlangen
Natriumlauge NaOH	Hausapotheke Rechts der Isar
Penicillin/Streptomycin, 10000 U/10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Seromed, A2212, Berlin
Phoshatpuffer PBS	Sigma, 1000-3, Deisenhofen
Proteinstandard BSA 2 mg/ml	Uptima Interchim, UP 36859A, Frankreich
Rinderserumalbumin BSA	Sigma, P-8010, Deisenhofen
Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital, Leverkusen
RPMI 1640 Medium	Seromed, FG 1215, Berlin
Salzsäure HCl 1M	Merck, 109057, Darmstadt
Tris base	Sigma, T-1503, Deisenhofen

2.2 Lösungen

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinie M21 und M21-L

RPMI-Medium

RPMI 1640

FKS 10%

Glutamin 1%

Gentamycin 10 mg/ml 1%

EDTA-Lösung

EDTA 0,1 M

In PBS

2.2.1.2 Zelllinie A431

RPMI-Medium

RPMI 1640

FKS 10%

Streptomycin 1%

Penicillin 1%

EDTA-/Trypsinlösung

EDTA 0,02%

Trypsin 0,05%

In PBS

2.2.2 In-vitro Versuche

Inkubationsmedium

RPMI 1640

1% BSA

Bindepuffer

0,1% BSA

1 mM CaCl_2

1 mM MgCl_2

0,01 mM MnCl_2

150 mM NaCl

50 mM Tris

Aqua dest., pH 7,4

2.2.3 Proteinmengenbestimmung

Wasser-/PBS-Gemisch

9 Teile PBS + 1 Teil H_2O

Proteinstandard

9 Teile PBS + 1 Teil BSA 2 mg/ml

2.2.4 Anästhesie

Ketavet/Rompun Narkotikum	50 ml
physiolog. NaCl -Lösung, 0,9%	41 ml
Ketavet (100 mg/ml Ketaminhydrochlorid)	5 ml
Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)	4 ml

2.3 Geräte

Analysenwaage Sartorius, Typ LA 230S-OCE

Sartorius, Göttingen

Gamma-Counter, TYP 1480 Wizard TM 3

Wallac, Finnland

Spectrophotometer, Typ Uvikon 931

Kontron Instruments, Italien

Zellzählgerät, Typ Casy®1

Schärfe System, Reutlingen

2.4 Radioaktiv markierte Tracer

Als Liganden des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors wurde sowohl mit ^{125}I markiertes Gluco-RGD sowie mit ^{18}F markiertes Galacto-RGD verwendet (siehe Abb. 2). Für beide Substanzen wurde bereits eine receptorspezifische Bindung an den $\alpha_v\beta_3$ Rezeptor sowohl in-vitro wie auch in-vivo mittels PET nachgewiesen. Sie sind sowohl in ihrer Rezeptoraffinität sowie in ihrer Selektivität vergleichbar. Für in-vitro Studien erwies sich ^{125}I markiertes Gluco-RGD aufgrund seiner langen Halbwertszeit von 60,2 d als

günstiger, da dadurch die Werte stabiler und besser reproduzierbar wurden. Mit ^{18}F markiertes Galacto-RGD ($t_{1/2}=109,7$ Minuten) wurde zur in-vivo Diagnostik der $\alpha_v\beta_3$ Expression und zum Monitoring der Rezeptorblockade mittels PET eingesetzt (Haubner et al. 2001a, S.326, Haubner et al. 2001b, S.1781).

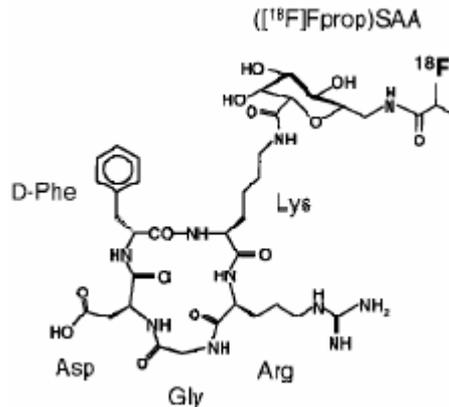


Abb. 2

Schematische Darstellung von $[^{18}\text{F}]\text{Galacto-RGD}$ (nach Haubner et al. 2001b, S.1784)

2.5 Blockaden

Als $\alpha_v\beta_3$ Liganden wurden Substanzen der Firma Pharmacia Corporation, St. Louis, mit der Bezeichnung P-004 und S247 eingesetzt. Es handelt sich dabei um RGD-peptidomimetische Antagonisten des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors (siehe Abb. 3).

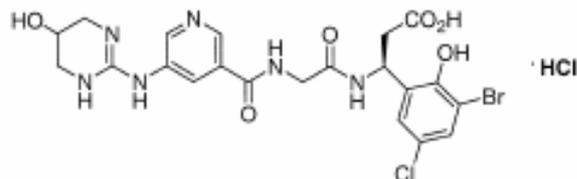


Abb. 3

Struktur der Substanz S247 (nach Shannon et al. 2004, S.132)

Die Substanz S247 mit einem Molargewicht von 638 g/mol wurde für in-vitro Versuche in PBS aufgelöst, wobei eine Ausgangskonzentration von 1 mM hergestellt und diese je nach Bedarf mit PBS weiter verdünnt wurde.

Bei der Substanz P-004 mit dem Gewicht von 388,99 g/mol diente eine Lösung in H₂O in der Konzentration von 10 mM als Ausgangssubstrat. Die Verdünnung auf die jeweils benötigte Konzentration erfolgte mit PBS.

Für die Tierexperimente wurden die beiden $\alpha_v\beta_3$ Liganden in physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst.

2.6 Zellkultur

2.6.1 Zelllinie M21 und M21-L

Die humane Melanomzelllinie M21 wurde im Labor von Dr. D. Morton aus einer Lymphknotenmetastase isoliert. Aus dieser Linie wurde unter Dr. D.A. Cheresch eine Subpopulation selektioniert, genannt M21-L (low), welche keine Expression des α_v Proteins aufweist (Cheresch et al. 1987b, S.17703).

Die Zelllinien M21 und M21-L wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit gezüchtet. Das Kulturmedium setzte sich aus dem Fertigmedium RPMI 1640 unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 1% Glutamin sowie 1% Gentamycin 10 mg/ml zusammen. Die Passage der Zellen erfolgte dreimal pro Woche. Zum Ablösen der Zellen erwies sich eine 0,1 M EDTA-Lösung als günstig. Die so erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert, das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis von 1:10 auf neue Flaschen verteilt.

2.6.2 Zelllinie A431

Es handelt sich hierbei um eine Linie, die von D.J. Giard et al. (1973, S.1417) isoliert wurde. Sie stammt aus einem Karzinom der Vulva einer 85-jährigen Frau. Die Zellen zeigen keine nachweisbare Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins.

Vergleichbar zu den Linien M21 und M21-L wurden diese Zellen in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Kulturmedium diente RPMI 1640 unter Zusatz von 10% FKS, 1% Streptomycin und 1% Penicillin. Abgelöst wurden die Zellen mit einer Trypsin-/EDTA-Lösung. Die Verteilung auf neue Kulturflaschen erfolgte in einem Verhältnis von 1:8.

2.7 In-vitro Untersuchung der Radioliganden-Bindung und Internalisierung durch den Rezeptor $\alpha_v\beta_3$

2.7.1 Versuchsprotokoll

Es wurden die $\alpha_v\beta_3$ -positiven Zellen der Linie M21 sowie als Kontrolle die $\alpha_v\beta_3$ -negativen Zellen M21-L verwendet. Nach Bildung eines Monolayers wurden die Zellen mittels EDTA-Lösung von den Kulturflaschen abgelöst. Nach Zentrifugieren und Resuspension der Zellpellets mit circa 1-2 ml Nährmedium erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe eines automatischen Zellzählgerätes. Es bewährte sich, die Zellzahl auf 1×10^7 - 3×10^7 Zellen pro ml einzustellen.

Es wurden je 1000 μ l Inkubationsmedium in Eppendorfgefäße pipettiert, je Probe circa 3×10^5 Zellen eingesetzt und circa 1 Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran folgte die Zugabe des radioaktiv markierten Tracers. Bei den in-vitro Versuchen erfolgte fast ausschließlich die Verwendung von iodiertem Gluco-RGD. Das mit ¹⁸Fluor markierte Galacto-RGD wurde aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit nur bei einzelnen Versuchen als Vergleich eingesetzt. Die zugegebene Aktivität wurde mittels Messung im Gamma-Counter so eingestellt, dass jede Probe circa 500 000 cpm (counts per minute) in einem Volumen von 10 μ l enthielt. Bei ¹⁸Fluor wurde entsprechend der Halbwertszeit eine Aktivität von circa 4 000 000 cpm bevorzugt. Es folgte eine Inkubation der Zellen bei 37°C für 120 Minuten.

Nach dieser Inkubationszeit folgte das Abzentrifugieren der Proben. Der Überstand wurde für jede Probe separat in Gamma-Probenröhrchen überführt. Im Anschluss folgte ein zweimaliger Waschschrift mit je 1 ml Bindepuffer pro Probe. Es wurde jeweils zentrifugiert und der Überstand in die vorherigen Probenröhrchen pipettiert.

Im nächsten Schritt wurde versucht, die Bindungen auf der Zelloberfläche zu lösen. Dazu war eine Inkubation der Zellen mit je 1 ml Natriumacetat (0,02 M/pH 4-5) für 10 Minuten bei 37°C erforderlich. Die Proben wurden wiederum bei 3500 U 4 Minuten zentrifugiert und der Überstand in neue Gamma-Probenröhrchen überführt. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit Natriumacetat.

Um die Internalisierung des Tracers zu bestimmen, wurden die Zellpellets in je 1 ml NaOH (1M) unter starkem Aufrütteln aufgelöst. Für die später folgende Proteinmengenbestimmung war es notwendig, je 50 µl der Suspension zu verwenden. Die restliche Zellsuspension wurde für die Messung wiederum in frische Probenröhrchen überführt. Durch zweimaliges Spülen mit PBS wurde versucht, Rückstände in den Eppendorfgefäßen möglichst gering zu halten.

Die Messung der Proben erfolgte in einem Gamma-Counter der Firma Wallac. Die Aktivität wurde in registrierten Zerfallereignissen pro Minute (cpm) angegeben.

2.7.2 Bestimmung der Internalisierung unter 4°C

Der Versuch verlief wie unter 2.7.1 beschrieben. Nach Zugabe des radioaktiven Tracers wurden die Zellen 120 Minuten auf Eis gekühlt. Die weiteren Schritte wurden ebenfalls unter dieser Bedingung durchgeführt.

2.7.2.1 Blockierung des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors durch die Substanzen S247 und P-004

2.7.2.2 Dosisabhängigkeit der Blockade

Die Proben wurden wie unter 2.7.1 beschrieben vorbereitet. Der Zellansatz erfolgte jedoch in nur 950 µl Inkubationsmedium. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurden zunächst S247 und P-004 in den jeweiligen vorbereiteten Konzentrationen in einem Volumen von 50 µl hinzugefügt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann erst erfolgte die Zugabe des radioaktiv markierten Tracers. Der weitere Vorgang verlief laut Beschreibung unter 2.7.1.

2.7.2.3 Bestimmung der Dauer der Rezeptorblockade

Nach Zugabe der Substanz S247 in einer Konzentration von 1 μM pro vorbereitete Probe (siehe 2.7.1) wurden die entsprechenden Ansätze nach den Zeitpunkten 10 Minuten beziehungsweise 24 Stunden zentrifugiert, der Überstand entfernt und mit PBS gespült. Zur Kontrolle dienten eine Probenreihe, die nicht nach 10 Minuten gewaschen wurde, sowie eine Reihe, welche zwar nach 10 Minuten gespült, dann jedoch weitere 24 Stunden inkubiert wurde. Bei Proben, die für 24 Stunden vorgesehen waren, bewährte sich als Ansatz Kulturmedium, wodurch der Zellverlust sich geringer hielt. Die weiteren Schritte folgten wie unter 2.7.1 beschrieben.

2.7.3 Proteinmengenbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmengen der einzelnen Proben mit Hilfe der Photometrie war notwendig, um die aufgenommene Aktivität nicht nur auf die Zellzahl sondern auch auf den jeweiligen Proteingehalt zu beziehen, da dieser zwischen den Zelllinien variierte. Dazu wurde eine Standardkurve aufgestellt (siehe Tab. 1), aus welcher eine lineare Gleichung gewonnen werden konnte.

Tab. 1

Protokoll für die Proteinstandardkurve

	Referenz	0,002 mg	0,004 mg	0,007 mg	0,01 mg
PBS	0,7 ml	0,7 ml	0,7 ml	0,7 ml	0,7 ml
Standard 1:10 BSA	0 ml	0,01 ml	0,02 ml	0,035 ml	0,05 ml
1 T. H₂O + 9 T. PBS	0,1 ml	0,09 ml	0,08 ml	0,065 ml	0,05 ml
Farbstoffkonzentrat Protein Assay	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

Die einzelnen Proben wurden nach gleichem Protokoll aufbereitet, wobei anstatt des Proteinstandards die Zellsuspension eingesetzt und mit dem PBS/H₂O-Gemisch auf 0,1 ml ergänzt wurde. In einem Photometer wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=595$ nm über einen Zeitraum von 10 Sekunden jede Probe zweimal gemessen und der Mittelwert daraus gebildet. Aus der ermittelten Extinktion wurde mit Hilfe der Standardkurve die Proteinmenge in 1 ml Zellsuspension berechnet.

2.7.4 Datenauswertung

Die im Gamma-Counter gemessene Aktivität (cpm) des Natriumacetatüberstands wurde ebenso wie die Aktivität der in NaOH aufgelösten Zellen auf die insgesamt dem Probenröhrchen zugegebene Aktivität bezogen und in Prozent angegeben. Dies wiederum wurde in ein Verhältnis zur Proteinmenge gesetzt und mit %/mg bezeichnet. Auf diese Weise wurde die Bindung auf der Zelloberfläche (Aktivität des Natriumacetatüberstands) sowie die Internalisierung in die Zelle (Aktivität des in NaOH aufgelösten Zellpellets) ermittelt. Aus den Probengruppen wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung errechnet.

2.8 Tierexperimente

2.8.1 Versuchstiere und Haltung

Für das in-vivo Tumormodell haben sich 6 Wochen alte, weibliche Swiss nu/nu Mäuse aus spezifisch pathogen freier Zucht (Charles River, Sulzfeld) bewährt. Es lag die Genehmigung für Tierversuche von der Regierung von Oberbayern 211-2531-14/1997 und 2000 vor. Gehalten wurden die Tiere in Käfigen zu je vier bis sechs Mäusen in einem Tierstall mit speziellem Lichtprogramm bei 26°C und 50-60% Luftfeuchtigkeit. Die Nahrung bestand aus Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser ad libitum.

2.8.2 Anästhesie und Abtötung

Zur subkutanen Injektion von Tumorzellen wurden die Mäuse unter eine kurze Äthernarkose gesetzt. Dazu eignete sich ein geschlossenes Glasgefäß mit Äther getränkten Tüchern. Die Kurznarkose wurde ebenso für die intravenöse Injektion der Blockaden als auch der radioaktiven Substanzen eingesetzt. Um die Tiere für die PET zu narkotisieren, erfolgte eine intraperitoneale Injektion von je 250 µl der Ketavet/Rompun-Lösung. Für die Biodistribution wurden die Mäuse mit CO₂ und anschließender Eröffnung des Thorax mit Durchtrennung des Aortenbogens getötet.

2.8.3 Tumormodell

Die zu injizierenden Tumorzellen wurden mit serumfreien RPMI-Medium in Suspension gebracht. Die Nacktmäuse erhielten unter Äthernarkose in die rechte Flanke eine subkutane Injektion von 4×10^6 (M21) beziehungsweise 2×10^6 (A431) Zellen in einem Volumen von 0,1 ml. Innerhalb von circa drei bis vier Wochen bildeten sich gut palpable Tumoren, die für die weiteren Untersuchungen eingesetzt wurden.

2.8.4 In-vivo Darstellung des $\alpha_v\beta_3$ Integrins

2.8.4.1 Versuchsablauf

Es wurde sowohl eine Gruppe von Tieren, die einen Tumor der Zelllinie M21 ausgebildet hatten, als auch eine Gruppe mit dem Tumormodell der Linie A431 verwendet. Die Untersuchungen fanden jeweils an zwei aufeinander folgenden Tagen statt. Am ersten Tag erhielten alle Tiere ausschließlich eine Injektion des radioaktiv markierten Tracers. Dessen Anreicherung in den Tumoren wurde 90 Minuten p. i. in einem Kleintier-PET dargestellt. Jeweils ein Teil der beiden Gruppen wurde noch am gleichen Tag als Kontrollgruppe getötet. Die Tumoren sowie verschiedene andere Gewebeproben wurden entnommen und die darin angereicherte Aktivität mit Hilfe eines Gamma-Counters bestimmt (siehe 2.8.4.5). Nach 24 Stunden folgte bei den verbleibenden Tieren die Injektion von S247 beziehungsweise P-004 sowie nach einer Latenz von 10 Minuten die Injektion der Aktivität, vergleichbar zum Vortag. Nach Abschluss der PET-Untersuchung wurden die Tiere ebenfalls getötet und die verbleibende Aktivitätskonzentration im Tumor und anderen Geweben gemessen. Sowohl das Melanommodell als auch das Tumormodell A431 wurde mit der Substanz S247 in einer Konzentration von 50 mg/kg behandelt. Zusätzlich erfolgte bei Tieren mit Tumoren der Linie M21 die Injektion der Blockade S247 in den Konzentrationen 5 mg/kg, 0,5 mg/kg und 0,05 mg/kg sowie die Injektion der Substanz P-004 in der Konzentration von 50 mg/kg.

2.8.4.2 Injektion des radioaktiv markierten Tracers

Den Mäusen wurden 4,5-11,1 MBq (circa 120-300 μ Ci) des mit 18 Fluor markierten Galacto-RGD in einem Volumen von circa 100 μ l in die laterale Schwanzvene injiziert. Dazu wurde das Tier unter eine kurze Äthernarkose gesetzt und die Vene mittels Wärme und Reibung erweitert.

2.8.4.3 Injektion der $\alpha_v\beta_3$ Integrin Antagonisten

Die Injektion der Substanzen S247 und P-004, aufgelöst in physiologischer Kochsalzlösung, erfolgte ebenfalls in die laterale Schwanzvene. Die jeweils benötigte Konzentration wurde auf ein Volumen von 100 μ l NaCl eingestellt, wobei das Gewicht einer Maus mit 20 g berechnet wurde.

2.8.4.4 In-vivo Aufnahmen der Tracerverteilung im Kleintier-Positronen-Emissions-Tomographen: LSO-APD PET (MADPET)

Um die ^{18}F -Tracerverteilung in-vivo darzustellen, wurden PET-Aufnahmen angefertigt. Da die herkömmlich verwendeten PET-Geräte mit einer begrenzten Ortsauflösung von 4-6 mm für Kleintiere wie Mäuse nicht geeignet sind, wurde ein speziell gefertigter Kleintier-PET-Scanner mit verbessertem Auflösungsvermögen und guter Nachweisempfindlichkeit verwendet. Dieser Prototyp namens Munich Avalanche Photo Diode PET (MADPET) mit einer Auflösung von 2,4 mm wurde von der Arbeitsgruppe Ziegler et al. (2001, S.136) konstruiert. Er basiert auf LSO-ADP Modulen (LSO="lutetium oxyorthosilicate scintillation", APD="avalanche photodiodes").

90 Minuten nach Injektion von [^{18}F]Galacto-RGD wurden die Tiere mit Rompun/Ketavet-Lösung narkotisiert und im PET-Scanner so positioniert, dass die transaxiale Schnittebene durch den Tumor in der Flanke verlief. Diese Messposition wurde am Tier markiert, um am folgenden Tag vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Die Radioaktivitätsverteilung wurde sowohl bildlich als auch als Zählraten pro Pixel dargestellt.

Um den Tumoruptake für [^{18}F]Galacto-RGD zu bestimmen, wurde die Tumorregion mit der maximalen Aufnahme mit einer etwa 5 mm großen „region of interest“ (ROI) sowie als Vergleich ein Referenzbereich auf der gegenüberliegenden Thoraxregion markiert. Die Aktivitätsaufnahme im Tumor wurde relativ zur Aktivitätskonzentration in der Referenzregion ausgedrückt (Tumor/Hintergrund Verhältnis).

2.8.4.5 Durchführung und Auswertung der Biodistributionsuntersuchung

Die Biodistribution erfolgte bei den dafür vorgesehenen Tieren circa 30 Minuten nach der Tumordarstellung im PET, somit circa 120 Minuten nach Injektion der radioaktiven Substanzen. Die Tiere wurden mittels CO₂ getötet, der Thorax eröffnet und der Aortenbogen durchtrennt. Das Blut wurde möglichst zügig mit Hilfe einer Spritze für die Messung gewonnen. Als nächstes folgte die Präparation des subkutan liegenden Tumors und eines Teils der ventralen Oberschenkelmuskulatur. Für Blut, Muskel und Tumor wurde in speziell vorgewogenen Probengefäßen auf einer Analysenwaage (Einteilung=0,0001 g; Messfehler=0,0002) das Gewicht bestimmt.

Die Zählrate des in die Gewebe aufgenommenen ¹⁸Fluor wurde in einem Gamma-Counter gemessen und in counts per minute (cpm) angegeben. Zur Auswertung war ein Standard notwendig. Hierfür wurde die gleiche Menge der radioaktiven Substanz, die man den Mäusen injiziert hatte, in einen Erlmeyerkolben überführt und mit H₂O exakt auf 100 ml aufgefüllt. Je 1 ml wurde in fünf Probengefäße überführt und ebenfalls gemessen. Die in den Organen gemessene Aktivität wurde auf den Mittelwert des Standards bezogen. Die Daten aus Gewichts- (in Gramm) und Impulsratenbestimmung (cpm) wurden für jedes Organ ermittelt, auf cpm/g umgerechnet und auf den 1% igen Standard der injizierten Aktivität bezogen. Die in den Organen enthaltene Aktivität wurde in Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe (%ID/g) ausgedrückt. Die Werte der mit der Blockade vorbehandelten Mäuse wurden außerdem auf die Kontrollgruppe ohne Blockade bezogen und in Prozent angegeben.

2.9 Statistische Auswertung

Alle quantitativen Werte wurden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die Veränderung der Aktivitätsaufnahme von Gluco- und Galacto-RGD unter Vorbehandlung mit S247 und P-004 wurde bei gepaartem Vergleich mittels Wilcoxon Test sowie bei ungepaartem Vergleich mit Hilfe des Mann-Whitney Tests auf statistische Signifikanz getestet.

3 Ergebnisse

3.1 In-vitro Untersuchungen zur Bindung und Internalisierung von radioaktiven Tracern durch den Rezeptor $\alpha_v\beta_3$ und dessen Blockade durch antagonistische Substanzen bei Zellen der Linie M21 und M21-L

3.1.1 Proteinmengenbestimmung

Je Versuch wurde eine Standardkurve (n=11) mittels eines definierten Proteinstandards erstellt, auf welche die einzelnen Proben bezogen wurden. Als Trend zeigte sich eine Gerade mit einer Gleichung von $y=(0,0654 \pm 0,0086)x$ (siehe Abb. 4). Mittels der jeweiligen Gleichung wurde aus den gemessenen Extinktionen die Proteinmenge der je 3×10^5 eingesetzten Zellen errechnet. Es ergab sich ein Mittelwert von $170 \pm 6 \mu\text{g}$ (n=219).

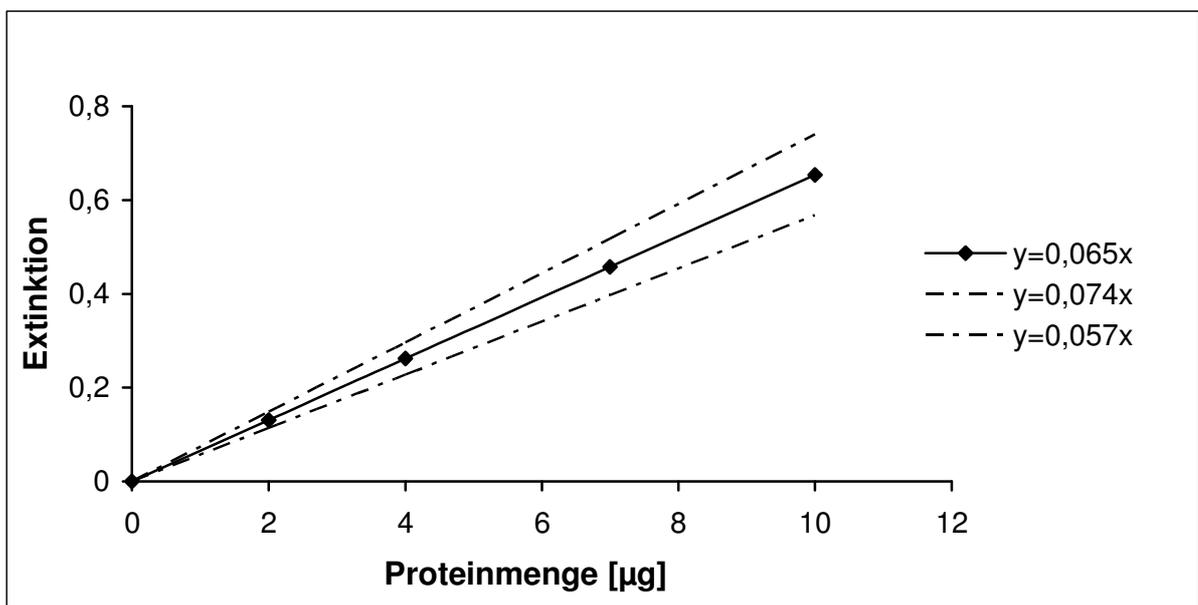


Abb. 4

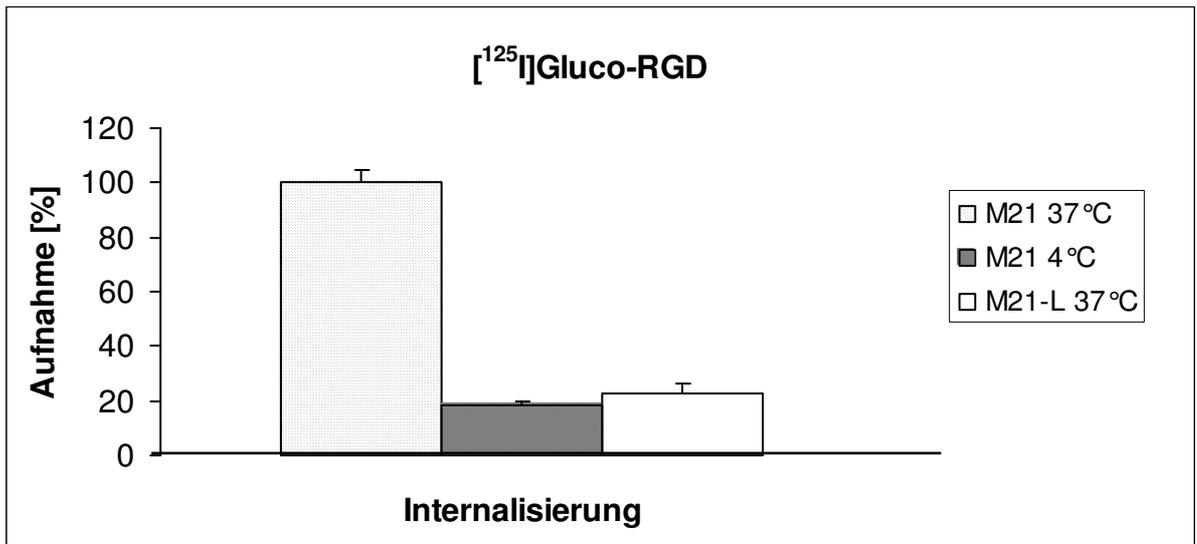
Für standardisierte Proteinmengen (2, 4, 7, 10 μg) wurde die Extinktion gemessen und als Standardkurve dargestellt. Je Versuch (n=11) wurde eine ausgleichende Trendlinie berechnet und aus diesen linearen Gleichungen der Mittelwert \pm Standardabweichung der Steigung ermittelt. Gleichung: $y=(0,0654 \pm 0,0086)x$.

3.1.2 Bindung und Internalisierung des radioaktiven Tracers unter 37°C und 4°C im Vergleich

Zellen der Linie M21 wurden 120 Minuten bei 37°C und 4°C mit dem Tracer [¹²⁵I]Gluc-RGD inkubiert. Zur Negativkontrolle erfolgte dies auch bei Zellen der Linie M21-L (nur bei 37°C). Unter 37°C lag die Internalisierung der eingesetzten Aktivität zwischen 1,05 und 5,89 %Aktivität/mg. Der Mittelwert (n=40) betrug $2,17 \pm 1,63$ %Aktivität/mg. Es zeigte sich, dass die Aufnahme unter den verschiedenen Versuchsansätzen schwankte, während sich innerhalb eines Experiments eine deutlich geringere Variabilität nachweisen ließ. So betrug innerhalb der einzelnen Versuche die Standardabweichung durchschnittlich 29,97%. Die $\alpha_v\beta_3$ -negativen Zellen M21-L (n=9) zeigten im Vergleich zu M21 eine um circa 77% geringere Internalisierung der Aktivität von $22,75 \pm 10,47$ (3,70) %. Der Unterschied war signifikant.

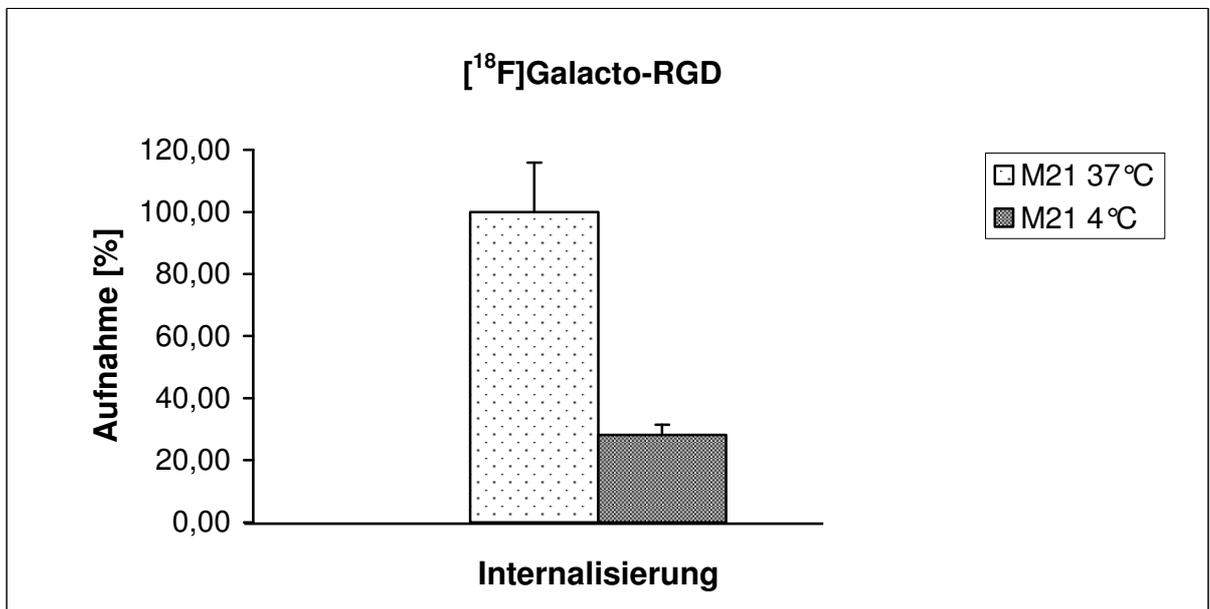
Die Oberflächenbindung unter 37°C lag bei Zellen der Linie M21 bei $2,41 \pm 2,20$ %Aktivität/mg, innerhalb eines Experiments betrug die Standardabweichung durchschnittlich 42,94%. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Oberflächenbindung zwischen M21 und M21-L Zellen gezeigt werden. Somit erwiesen sich Messungen der Bindung von Gluc-RGD an die Zellmembran unter den verwendeten Versuchsbedingungen als schlecht reproduzierbar und scheinen zum großen Teil Rezeptor unspezifisch zu sein. Aus diesen beiden Gründen wurde für die folgenden Auswertungen nur die internalisierte Radioaktivitätsmenge berücksichtigt, die sich mit wesentlich besserer Reproduzierbarkeit bestimmen ließ.

Unter 4°C verringerte sich die Traceraufnahme der Zellen M21 signifikant auf $18,04 \pm 4,52$ % (im Vergleich zu 37°C) (siehe Abb. 5a). Die Internalisierung wurde bei Zellen der Linie M21 in einem Versuch beispielhaft auch für [¹⁸F]Galacto-RGD ermittelt. Dies geschah sowohl unter 37°C als auch unter 4°C. Die Anreicherung betrug unter 37°C $0,38 \pm 0,10$ %Aktivität/mg. Bei 4°C verringerte sich die Aufnahme um 72% auf $0,11 \pm 0,02$ %Aktivität/mg. Die Signifikanz lag bei $p=0,05$ (siehe Abb. 5b).

**Abb. 5a**

Vergleich der Internalisierung von [¹²⁵I]Gluco-RGD in Zellen der Linie M21 und M21-L nach 120 Minuten Inkubation in Suspension unter 37°C und 4°C.

Die Werte wurden jeweils auf M21 37°C als 100% bezogen und als Mittelwert ± SEM angegeben.

**Abb. 5b**

Vergleich der Internalisierung von [¹⁸F]Galacto-RGD in Zellen der Linie M21 nach 120 Minuten Inkubation in Suspension unter 37°C und 4°C.

Angabe als Mittelwert ± SEM.

3.1.3 Internalisierung des radioaktiv markierten Tracers unter Vorbehandlung mit den Substanzen S247 und P-004

3.1.3.1 Dosisabhängigkeit der $\alpha_v\beta_3$ Rezeptorblockade mit S247 und P-004

Vor Zugabe des radioaktiv markierten Tracers, in den meisten Experimenten [125 I]Gluco-RGD, erfolgte eine 10 minütige Inkubation der Zellen M21 bei 37°C mit der Substanz S247 beziehungsweise P-004 in unterschiedlichen Konzentrationen. Zum Vergleich dienten Zellen M21 unter 37°C, die nur den jeweiligen Tracer erhielten. Die Aufnahme der mit den Substanzen vorbehandelten Zellproben wurde zu den unblockierten Zellansätzen ins Verhältnis gesetzt und in Prozent angegeben. Es zeigte sich sowohl unter der Substanz S247 als auch unter P-004 eine dosisabhängig verminderte Aufnahme von [125 I]Gluco-RGD (siehe Abb. 6a/b). Bei einer Konzentration von 50 μ M lag die verbliebene Anreicherung der Aktivität unter S247 bei $13,14 \pm 6,45$ (2,15)% beziehungsweise bei $15,39 \pm 7,69$ (3,25)% unter P-004. Im Vergleich dazu betrug die Aufnahme bei Zellen der Linie M21-L $22,75 \pm 10,47$ (3,70)%. Unter einer Dosisreduktion der Blockadesubstanzen konnte ein Anstieg der Traceraufnahme nachgewiesen werden. Unter 0,05 μ M S247 lag die Anreicherung bei $48,69 \pm 17,67$ (3,53)%, unter 0,05 μ M P-004 bei $59,87 \pm 28,98$ (8,37)%. Auch bei einer Konzentration von nur 0,005 μ M ließ sich noch eine signifikante Blockade von knapp 30% unter S247 sowie unter P-004 zeigen. Der Uptake betrug $71,04 \pm 29,57$ (6,78)% (S247) beziehungsweise $72,04 \pm 16,24$ (5,14)% (P-004). Da sich auch unter hohen Blockadekonzentrationen der Substanzen eine Restaufnahme von circa 15% nachweisen ließ und die als Negativkontrolle eingesetzte Linie M21-L ebenso eine Aktivität von circa 20% aufzeigte, wurde daraus vermutet, dass dieser Anteil der Radioaktivität rezeptorspezifisch internalisiert wird. Aus diesem Grund wurde in der Auswertung der 15% Wert als Nullpunkt definiert und aus der daraus folgenden Darstellung der IC_{50} Wert graphisch ermittelt. Im Bezug auf die Substanz S247 betrug dieser circa 10 nM, für P-004 lag er mit circa 30 nM etwas höher.

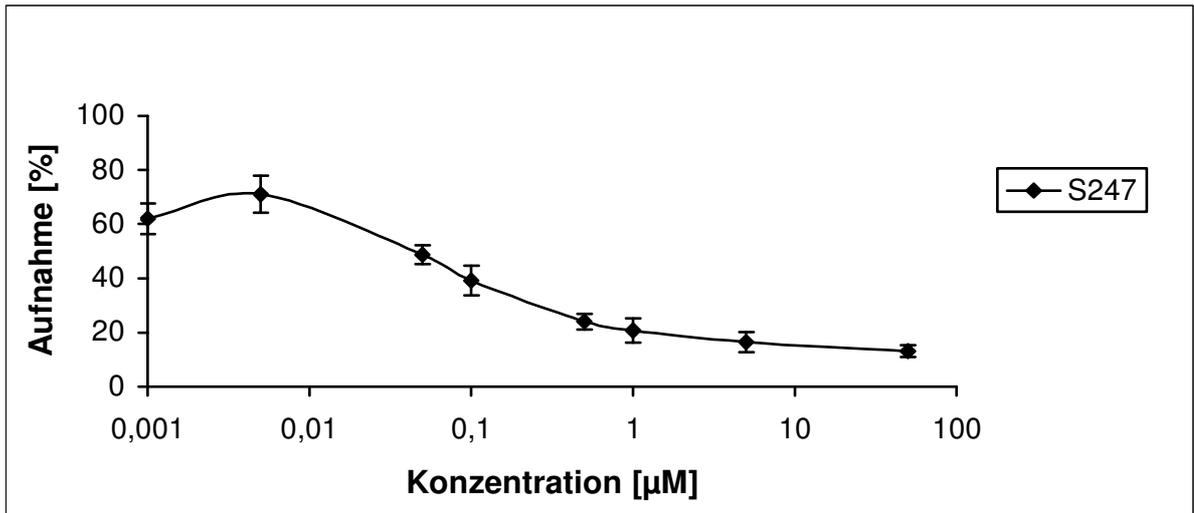


Abb. 6a

Aufnahme der Aktivität nach Inkubation (120 Minuten) von Melanomzellen M21 mit [¹²⁵I]Gluc-RGD nach Vorbehandlung mit der Substanz **S247** (50/5/1/0,5/0,1/0,05/0,005/0,001 μM). Jeder Datenpunkt wurde durchschnittlich in vier Experimenten á drei bis fünf Proben bestimmt. Die Aufnahme unter Blockade wurde auf die unblockierte Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

Angabe als Mittelwert ± SEM.

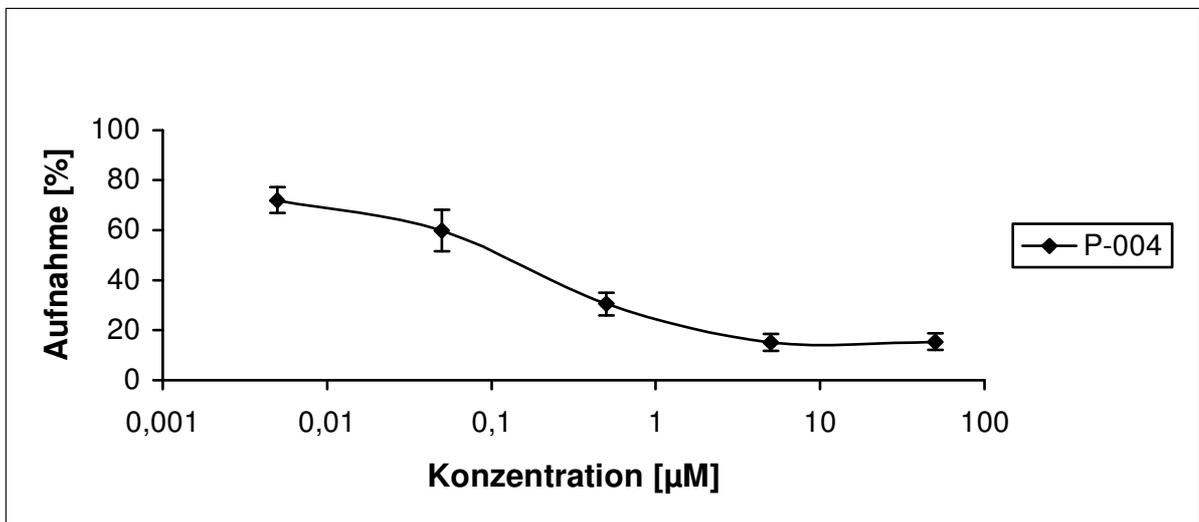


Abb. 6b

Aufnahme der Aktivität nach Inkubation (120 Minuten) von Melanomzellen M21 mit [¹²⁵I]Gluc-RGD nach Vorbehandlung mit der Substanz **P-004** (50/5//0,5/0,05/0,005 μM). Jeder Datenpunkt wurde durchschnittlich in drei Experimenten á drei bis fünf Proben bestimmt. Die Aufnahme unter Blockade wurde auf die unblockierte Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

Angabe als Mittelwert ± SEM.

Neben dem Tracer [125 I]Gluco-RGD wurde exemplarisch ebenso [18 F]Galacto-RGD in einzelnen Versuchen eingesetzt. Es bestätigte sich die dosisabhängige Blockade der Traceraufnahme durch die Substanzen S247 und P-004 (siehe Abb. 7).

Unter der Dosis von 5 μ M zeigte sich eine eindeutige Rezeptorblockade mit einer verbliebenen Internalisierung von $6,78 \pm 3,91$ (2,26)% unter S247 beziehungsweise von $10,12 \pm 5,42$ (3,13)% unter P-004. Bei niedrigeren Konzentrationen der Antagonisten stieg die Traceraufnahme an. Sie lag jedoch auch bei einer Dosierung von 0,05 μ M bei nur $47,62 \pm 12,07$ (6,97)% (S247) beziehungsweise bei $66,64 \pm 6,84$ (3,95)% (P-004). Dieser Unterschied war statistisch signifikant.

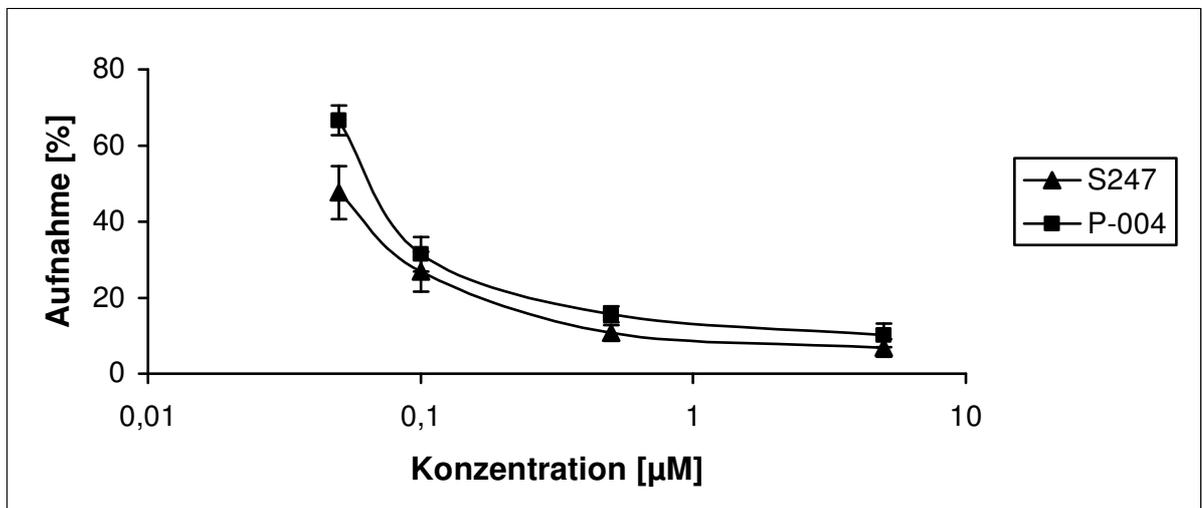


Abb. 7

Aufnahme der Aktivität nach Inkubation (120 Minuten) von Melanomzellen M21 mit [18 F]Galacto-RGD nach Vorbehandlung mit den Substanzen **S247** und **P-004** (0,05/0,1/0,5/5 μ M). Ein Datenpunkt wurde in einem Experiment á drei Proben bestimmt. Die Aufnahme unter Blockade wurde auf die unblockierte Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

Angabe als Mittelwert \pm SEM.

3.1.3.2 Dauer der Bindung der Substanz S247 an den Rezeptor

Um die Dauer der Rezeptorblockade durch S247 zu bestimmen, wurden die Zellen M21 vor Zugabe des Tracers [¹²⁵I]Glucó-RGD einem Spülvorgang unterzogen. Es wurden Zellen sowohl über einen Zeitraum von 10 Minuten als auch über 24 Stunden mit 1 µM S247 inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen, um nicht stabile Bindungen zu lösen. Zum Vergleich dienten unblockierte Proben sowie Zellen, die 10 Minuten mit 1 µM S247 inkubiert, aber nicht gewaschen wurden.

Es zeigte sich, dass all jene Zellproben, die gewaschen wurden, keine Blockade des Rezeptors mehr aufwiesen (siehe Abb. 8). Im Gegensatz zu Proben, die nicht gespült wurden und mit einer Aktivitätsaufnahme von $30,02 \pm 16,27$ (7,28)% signifikant blockiert waren, lag die Internalisierung bei $127,01 \pm 13,78$ (6,16)% (24 Stunden Inkubationszeit) im Vergleich zu nicht blockierten Zellen. Es ließ sich keine signifikante Abhängigkeit von der vorausgegangenen Inkubationszeit mit der Substanz S247 nachweisen.

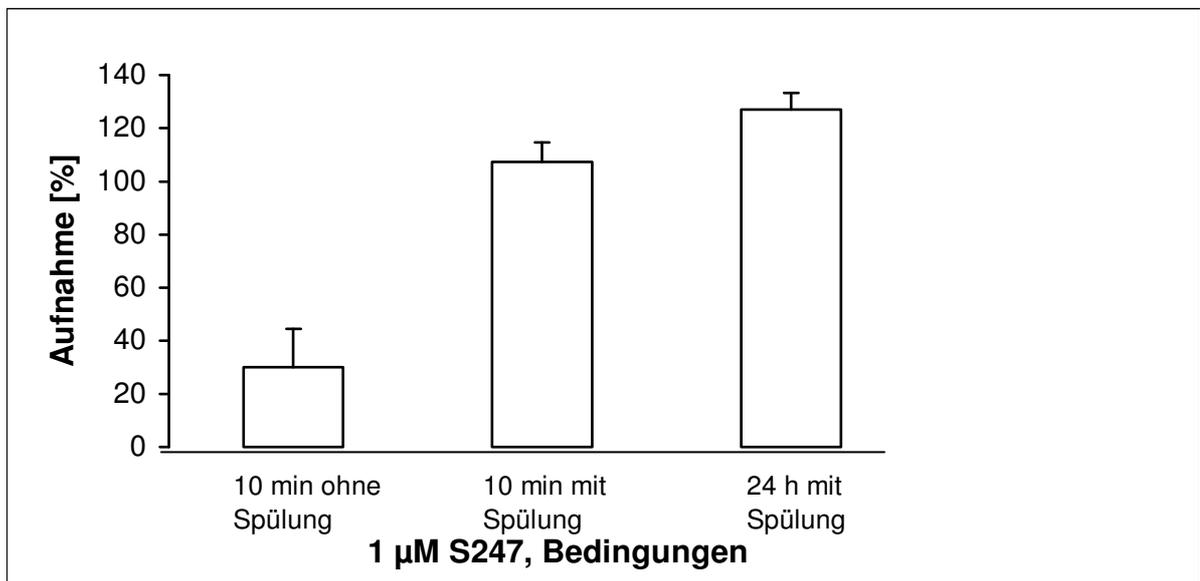


Abb. 8

Aufnahme der Aktivität nach Inkubation (120 Minuten) von Melanomzellen M21 mit [¹²⁵I]Glucó-RGD nach Vorbehandlung mit der Substanz **S247 (1 µM)**. Darstellung der Bindungsfestigkeit der Substanz nach 10 Minuten beziehungsweise 24 Stunden Inkubation mit anschließender PBS-Spülung. Jeder Datenpunkt wurde in einem Experiment á fünf Proben bestimmt. Die Aufnahme unter Blockade wurde auf die unblockierte Kontrolle bezogen und in Prozent dargestellt.

Angabe als Mittelwert ± SEM.

3.2 Tierexperimente

3.2.1 Tumormodell

Für die in-vivo Untersuchungen wurden die Tumormodelle M21 sowie zur Untersuchung des Rezeptorstatus auf tumorinduzierten Gefäßen die Zellen der Linie A431 verwendet. Nach zwei bis drei Wochen zeigten sich an der Injektionsstelle deutlich subkutan liegende Tumoren. Zum Versuchszeitpunkt schwankte die Tumormasse bei den Tieren zwischen 0,2 g und 1,3 g. Ein Teil der größeren Tumoren wies Nekrosen auf.

3.2.2 Biodistribution von [¹⁸F]Galacto-RGD nach intravenöser Injektion

Bei beiden Modellen wurde die Tracerverteilung mittels Biodistribution nach 120 Minuten ohne Rezeptorblockade sowie nach Vorbehandlung mit 50 mg/kg der Substanz S247 ermittelt. Ein Teil der Mäuse mit Melanom 21 erhielt statt S247 die Substanz P-004 in gleicher Dosierung. Die Injektion von S247 und P-004 erfolgte 10 Minuten vor der des Tracers. Die Biodistributionsdaten wurden in Tabelle 2 dargestellt.

Nach 120 Minuten zeigte sich in beiden Tumormodellen eine geringe Konzentration der Aktivität in Blut und Muskel, was auf eine rasche renale Ausscheidung des Tracers sowie auf eine nur geringe Expression des Rezeptors zurückzuführen ist. Die Konzentration betrug beim Melanom M21 im Blut 0,09 %ID/g, im Muskel 0,21 %ID/g. Unter Vorbehandlung mit S247 nahm die Aktivität im Muskel um 76% auf 0,05 %ID/g ab, im Blut veränderte sie sich mit 0,10 %ID/g unwesentlich. Unter der Substanz P-004 verringerte sich ebenso die gemessene Aktivität im Muskel um 86% auf 0,03 %ID/g, im Blut um 45% auf 0,05 %ID/g.

Bei Tieren mit A431 verhielt es sich ähnlich. Unter Blockade nahm die Konzentration im Blut von 0,10 %ID/g auf 0,02 %ID/g ab, im Muskel um 83% von 0,34 %ID/g auf 0,02 %ID/g. In beiden Modellen ließ sich mit 2,38 %ID/g (Melanom M21) und 1,94 %ID/g (A431) eine hohe Aktivitätsanreicherung im Tumor nachweisen, was zu einem hohen Tumor/Blut Quotient von 26,44 (M21) beziehungsweise 19,4 (A431) führte.

Sowohl unter 50 mg/kg S247 als auch unter P-004 verringerte sich die Traceraufnahme im Tumor M21 signifikant jeweils um 95% auf 0,12 %ID/g mit einem Tumor/Blut Quotient von 1,2 (S247) beziehungsweise 2,4 (P-004). Die Anreicherung der Aktivität im Tumor A431 nahm unter der Blockade mit S247 ebenso signifikant um 90% auf 0,20 %ID/g ab. Die Rezeptorblockade durch die Substanzen ließ sich somit in beiden Tumormodellen nachweisen.

Tab. 2

Anreicherung der Aktivität von [¹⁸F]Galacto-RGD nach 120 Minuten in Nacktmäusen mit Melanom M21 und A431; Vorbehandlung mit 50 mg/kg der Substanz **S247** (M21, A431) sowie der Substanz **P-004** (M21).

Angabe als Mittelwert ± Standardabweichung in %ID/g.

S247/P-004	M21			A431	
	0 mg/kg (n=3)	50 mg/kg S247(n=4)	50 mg/kg P-004 (n=4)	0 mg/kg (n=4)	50 mg/kg S247 (n=4)
Blut	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,10	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,06	0,02 ± 0,01
Muskel	0,21 ± 0,06	0,05 ± 0,03	0,03 ± 0,02	0,34 ± 0,17	0,02 ± 0,01
Tumor	2,38 ± 0,26	0,12 ± 0,07	0,12 ± 0,02	1,94 ± 0,35	0,20 ± 0,05
Tumor/Blut	26,4	1,2	2,4	19,4	10

Nachdem in diesen ersten Experimenten gezeigt werden konnte, dass S247 und P-004 in hoher Dosierung die Tumoraufnahme von Galacto-RGD nahezu vollständig blockieren können, wurde in einem nächsten Experiment die Dosisabhängigkeit der Rezeptorblockade untersucht. Für diese Untersuchungen wurde Mäusen mit M21 Tumoren vor der Injektion von [¹⁸F]Galacto-RGD die Substanz S247 in der Dosierung von 0,05 mg/kg, 0,5 mg/kg und 5 mg/kg intravenös injiziert. Die Biodistributionsdaten 120 Minuten nach Tracerverabreichung wurden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3

Anreicherung der Aktivität von [¹⁸F]Galacto-RGD nach 120 Minuten in Nacktmäusen mit Melanom M21 ohne Blockade sowie nach Vorbehandlung mit der Substanz **S247** (0,05 mg/kg, 0,5 mg/kg, 5 mg/kg).

Angabe in Mittelwert ± Standardabweichung in %ID/g.

S247	0 mg/kg (n=2)	0,05 mg/kg (n=3)	0,5 mg/kg (n=3)	5 mg/kg (n=3)
Blut	0,08 ± 0,01	0,055 ± 0,003	0,026 ± 0,002	0,04 ± 0,01
Muskel	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,03	0,05 ± 0,05	0,03 ± 0,02
Tumor M21	1,25 ± 0,04	0,75 ± 0,29	0,25 ± 0,06	0,16 ± 0,09
Tumor/Blut	15,6	12,5	8,3	4,0

Es zeigte sich wiederum eine geringe Konzentration der Aktivität in Blut und Muskel, welche unter Blockade von 0,08 %ID/g auf Werte von 0,055 %ID/g bis 0,026 %ID/g abnahm. Dies war jedoch nicht klar dosisabhängig.

Im Tumor reduzierte sich die Aufnahme der Aktivität von 1,25 %ID/g (0 mg/kg) auf 0,75 %ID/g (0,05 mg/kg), 0,25 %ID/g (0,5 mg/kg) sowie auf 0,16 %ID/g (5 mg/kg). In diese Reihe fügte sich auch das Ergebnis unter der Dosierung von 50 mg/kg mit 0,12 %ID/g sehr gut ein. Die Abnahme der Aktivitätsanreicherung war unter 0,5 mg/kg und 5 mg/kg signifikant. Insgesamt konnte eine Dosisabhängigkeit deutlich gezeigt werden (siehe Abb. 9). Der Tumor/Blut Quotient verringerte sich dosisabhängig von 15,6 auf Werte von 4,00-8,33.

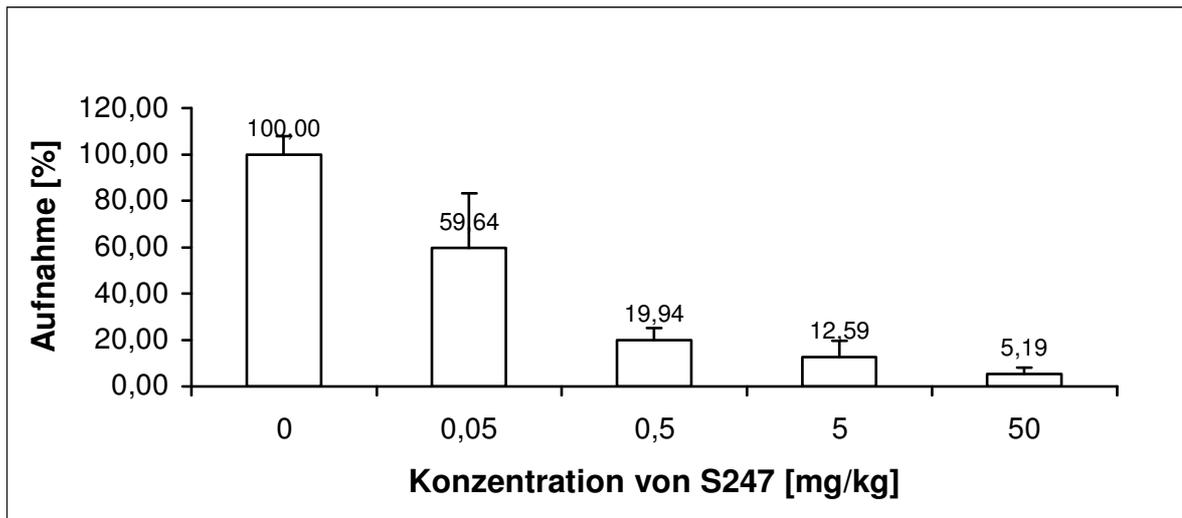


Abb. 9

Anreicherung der Aktivität von [^{18}F]Galacto-RGD in Tumoren der Linie M21 nach 120 Minuten in Abhängigkeit der Dosierung der Substanz **S247** in den Konzentrationen 0,05 mg/kg, 0,5 mg/kg, 5 mg/kg und 50 mg/kg. Die Werte wurden auf unblockierte Tumoren M21 bezogen (=100%).

3.2.3 In-vivo Darstellung der Anreicherung von [^{18}F]Galacto-RGD mittels Kleintier-PET

Es wurden von den Mäusen mit Melanom M21 und dem Karzinom A431 in einem Kleintier-PET transaxiale Bilder durch den Tumor angefertigt. Dies erfolgte 90 Minuten nach Injektion des Tracers. Sowohl M21 als auch A431 zeigten eine deutliche Anreicherung der Aktivität in der rechten Flanke (siehe Abb. 10 und 11). Es bestätigte sich ein hoher Tumor/Hintergrund Quotient, wie er auch aus den Daten der Biodistribution hervorging. Er betrug beim Melanom M21 ($n=23$) $3,20 \pm 0,44$, bei der Linie A431 ($n=7$) $3,56 \pm 0,62$.

Darüber hinaus wurden von einem großen Teil der Tiere am darauf folgenden Tag nochmals Bilder angefertigt. Sie erhielten zum Vergleich 10 Minuten vor Injektion des Tracers die Blockadesubstanz S247 beziehungsweise P-004 in unterschiedlichen Konzentrationen. Tieren mit dem Karzinom A431 wurden 50 mg/kg S247 injiziert, Mäuse mit Melanom M21 wurden mit S247 in den Konzentrationen 50 mg/kg, 5 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,05 mg/kg sowie mit 50 mg/kg P-004 vorbehandelt. In Tabelle 4 wurde der

Tumor/Hintergrund Quotient unter Blockade dargestellt und mit der unblockierten Aufnahme verglichen.

Tab. 4

Anreicherung von [¹⁸F]Galacto-RGD in Tieren mit Melanom M21 und A431, dargestellt im Kleintier-PET 90 Minuten p. i. sowohl ohne Blockade als auch nach Vorbehandlung mit der Substanz **S247** beziehungsweise **P-004**.

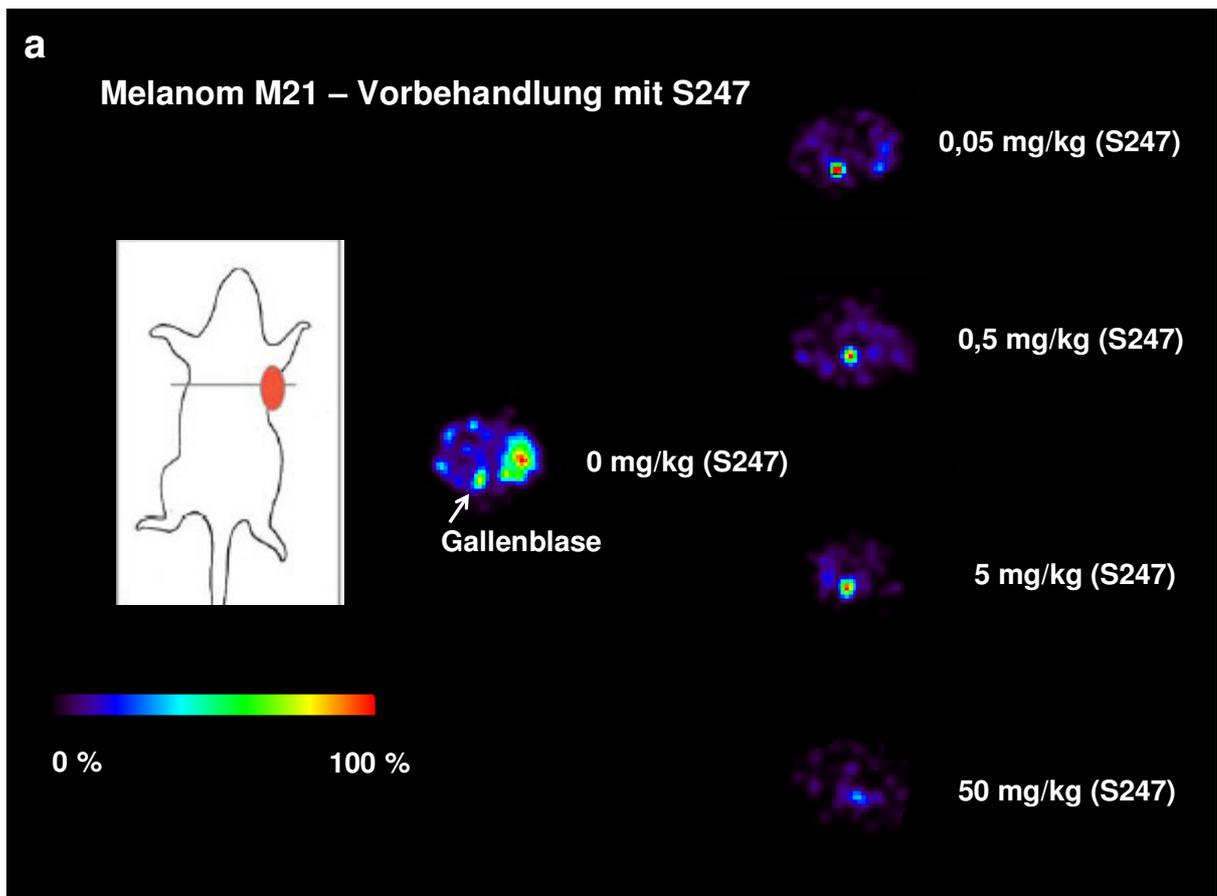
Angabe als Tumor/Hintergrund Quotient, Mittelwert ± Standardabweichung.

M21			
S247	Ohne Blockade	Nach Blockade	Signifikanz
50 mg/kg (n=4)	3,22 ± 0,43	0,93 ± 0,23	p<0,05
5 mg/kg (n=3)	3,19 ± 0,21	1,13 ± 0,51	p=0,05
0,5 mg/kg (n=3)	3,49 ± 0,56	0,86 ± 0,14	p=0,05
0,05 mg/kg (n=3)	2,64 ± 0,19	1,83 ± 0,28	p=0,05
P-004			
50 mg/kg (n=4)	3,52 ± 0,65	1,28 ± 0,27	p=0,05
A431			
S247	Ohne Blockade	Nach Blockade	Signifikanz
50 mg/kg (n=3)	4,12 ± 0,50	1,85 ± 0,26	p<0,05

Die Substanz S247 führte bei Melanom M21 beziehungsweise bei A431 in der Konzentration 50 mg/kg zu einer signifikanten Abnahme des Tumor/Hintergrund Quotienten um 71% von 3,22 auf 0,93 beziehungsweise um 55% von 4,12 auf 1,85. Ebenso verringerte sich dieser in Tieren mit Melanom M21 um 65% von 3,19 auf 1,13 (5 mg/kg) beziehungsweise um 74% von 3,49 auf 0,89 (0,5 mg/kg). Auch in der niedrigen Dosierung von 0,05 mg/kg konnte noch eine Blockade von circa 30% im PET festgestellt werden.

Unter der Substanz P-004 (50 mg/kg) zeigte sich ebenfalls eine Abnahme des Tumor/Hintergrund Quotienten um 64% von 3,52 auf 1,28, die statistisch grenzwertig signifikant war.

In den Abbildungen 10a/b wurde eine Auswahl von Bildern der Mäuse unter Vorbehandlung der Substanzen P-004 und S247 in unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt. Die Traceranreicherung in der Tumorregion ist klar abhängig von der Dosierung der Blockadesubstanz.



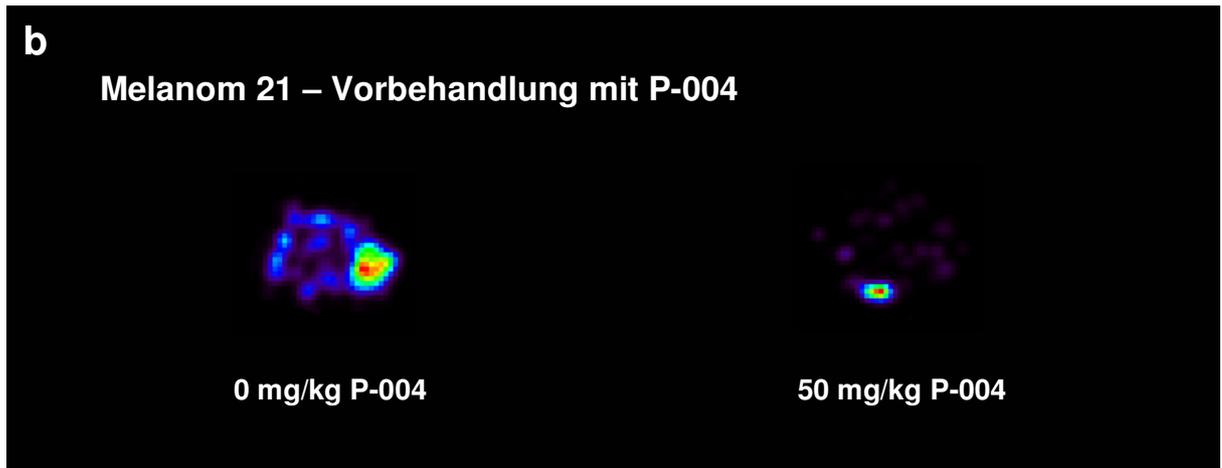


Abb. 10 a/b

Transaxiale Bilder einer Maus, welche den Tumor Melanom **M21** an der rechten Flanke ausbildete, mittels eines Kleintier-PETs. Darstellung der Anreicherung in $\alpha_v\beta_3$ -positivem Tumorgewebe 90 Minuten nach Tracerinjektion. Vorbehandlung mit den Blockadesubstanzen **S247** (0, 0,05, 0,5, 5, 50 mg/kg) (a) und **P-004** (50 mg/kg) (b).

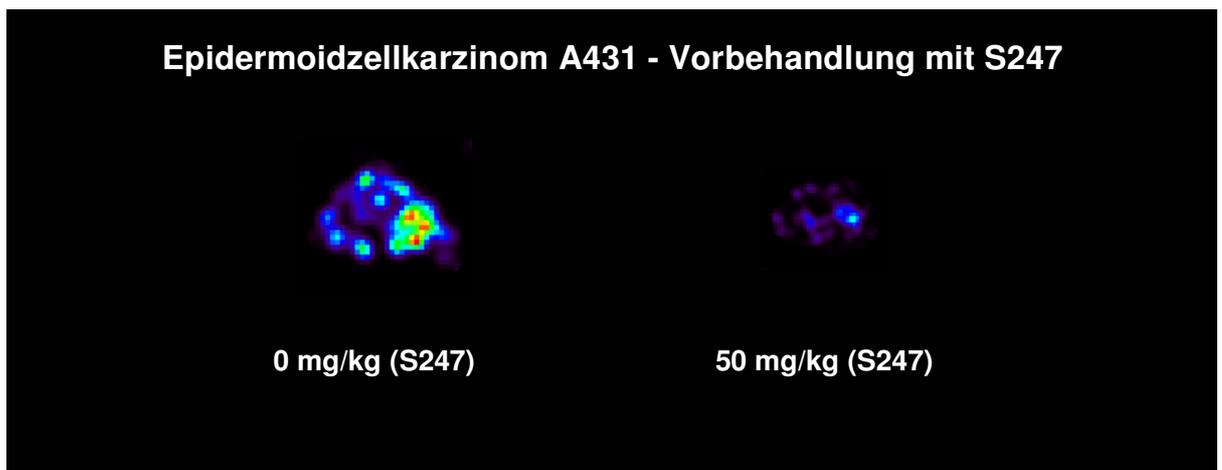


Abb. 11

Transaxiale Bilder einer Maus, welche den Tumor **A431** an der rechten Flanke ausbildete, mittels eines Kleintier-PETs. Darstellung der Anreicherung in Tumorgefäßen 90 Minuten nach Tracerinjektion. Vorbehandlung mit der Substanz **S247** (50 mg/kg)

4 Diskussion

Diese Arbeit zeigt, dass es mit Hilfe radioaktiv markierter RGD-Peptide möglich ist, den $\alpha_v\beta_3$ Rezeptorstatus von Geweben nicht-invasiv darzustellen. Durch in-vitro Untersuchungen zum Uptake von $\alpha_v\beta_3$ -positiven Zellen M21 konnte eine rezeptorvermittelte Internalisierung der Tracer [125 I]Gluc- beziehungsweise [18 F]Galacto-RGD nachgewiesen werden. Die zelluläre Aufnahme beider RGD-Peptide ließ sich durch die peptidomimetischen $\alpha_v\beta_3$ Liganden S247 und P-004 dosisabhängig blockieren. In den darauf aufbauenden in-vivo Studien zur Bildgebung mittels [18 F]Galacto-RGD und PET zeigte sich diese Methodik als geeignet, die Blockade des $\alpha_v\beta_3$ Integrins durch therapeutische Dosen von S247 und P-004 quantitativ zu erfassen. Aufgrund der Bedeutung, welche dem $\alpha_v\beta_3$ Rezeptor in der Neoangiogenese und Tumorausbreitung zukommt, ergeben sich neue, viel versprechende Möglichkeiten im klinischen Einsatz dieser Methode zur Therapieplanung und Therapiekontrolle: Vor einer Therapie mit $\alpha_v\beta_3$ Liganden kann die Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins durch PET-Untersuchungen mit [18 F]Galacto-RGD nicht-invasiv dargestellt werden und so Patienten für dieses Therapieverfahren ausgewählt werden. Nach Einleitung der Therapie kann dann die Blockade des $\alpha_v\beta_3$ Integrins überprüft und gegebenenfalls die Dosis der $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten erhöht werden.

4.1 In-vitro Versuche

Die Grundlage dieser Arbeit beruht auf der Nachweismöglichkeit des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors in-vitro mittels Markierung durch radioaktive, RGD-haltige Tracer. Für die Versuche wurden $\alpha_v\beta_3$ -positive Zellen der Linie Melanom M21 sowie α_v -negative Zellen M21-L als Kontrolle verwendet. Die positive Rezeptorexpression der Linie M21 spiegelte sich vergleichbar zu bekannten Untersuchungsergebnissen in einer hohen intrazellulären Aufnahme von 125 Iod markiertem Gluco-RGD von durchschnittlich 2,17 %Aktivität/mg wider. Die Linie M21-L, welcher durch die ungenügende Ausbildung der α_v Kette die essentielle Bindungsstelle für RGD fehlt (Cheresh, D. et al. 1987a, S.1434), wies dagegen eine um circa 77% geringere Internalisierung des Tracers auf. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich in den Untersuchungen zu den peptidomimetischen $\alpha_v\beta_3$ Rezeptorantagonisten S247 und P-004. Schon eine Dosierung von 5 μ Mol führte zu einer signifikanten Blockade des Uptakes bis zu 80% (Gluco-RGD) beziehungsweise

90% (Galacto-RGD). Jedoch konnte auch unter einer Dosissteigerung keine wesentliche Zunahme der Blockade beobachtet werden. Eine gewisse Restaufnahme war nicht zu unterbinden.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass etwa 20% beziehungsweise 10% der intrazellulären Aufnahme von Gluco- beziehungsweise Galacto-RGD durch einen unspezifischen Transportmechanismus erfolgen. Der hoch-affine, mit S247 und P-004 bereits in nanomolarer Konzentration inhibierbare Transport, ist dagegen mit hoher Wahrscheinlichkeit $\alpha_v\beta_3$ -vermittelt. Die Internalisierung des $\alpha_v\beta_3$ Integrins nach Bindung von Liganden wurde in mehreren aktuellen Studien beschrieben (Balasubramanian 2004, S.42214, Roberts et al. 2004, S.1505).

Da die Aufnahme von Galacto- und Gluco-RGD durch M21-L Zellen in etwa der durch S247 und P-004 nicht blockierbaren Radioaktivitätsaufnahme von M21 Zellen entspricht, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich dabei um einen rezeptorunabhängigen Transportprozess handelt. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre eine Restexpression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins durch M21-L Zellen. So wurde von Allman et al. (2000, S.410) beschrieben, dass in seiner verwendeten Zelllinie M21-L eine Restausprägung des Rezeptors von circa 25% im Vergleich zu M21 bestand. Jedoch ließ sich diese Möglichkeit bei den hier verwendeten Zellen M21-L immunhistologisch sowie durch Western Blots ausschließen (Haubner et al. 2005, S.247). Es wäre ebenso möglich, dass sich die radioaktiv markierten Tracer bei Temperatur- oder pH-Schwankungen destabilisieren und freies ^{125}I sowie ^{18}F durch Ionenkanäle in das Zellinnere diffundiert. Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass bei in-vivo Studien keine vermehrte Aktivität in der Schilddrüse oder im Knochen gemessen werden konnte, wozu freies ^{18}F oder ^{125}I führen würde (Haubner et al. 2001a, S.331, Haubner et al. 2001b, S.1784). Darüber hinaus ist die Überlegung mit einzubeziehen, dass Tumorzellen einen erhöhten Glukosestoffwechsel aufweisen, was zu einer vermehrten intrazellulären Aufnahme von glykolytierten RGD-Peptiden wie Gluco- beziehungsweise Galacto-RGD über Glukosetransporter führen kann. Wie von Vabulienne (2004) jedoch demonstriert wurde, zeigten sich bei M21 Zellen keine Unterschiede in der Internalisierung von Gluco-RGD und einem cRGDyV-Peptid, welches kein Zuckermolekül enthält.

Dass es sich bei der Aufnahme von Gluco- und Galacto-RGD um einen aktiven energieabhängigen Prozess handelt, konnte durch die starke Temperaturabhängigkeit der Traceraufnahme nachgewiesen werden. Hierzu wurde die Internalisierung des Tracers unter 37°C sowie unter 4°C gemessen. Sowohl unter Verwendung von [¹²⁵I]Gluco-RGD als auch von [¹⁸F]Galacto-RGD ließ sich ein um 82% beziehungsweise 72% signifikant verminderter intrazellulärer Uptake bei einer Temperatur von 4°C nachweisen. Ähnliche Beobachtungen im Bezug auf die Temperaturabhängigkeit der Aufnahmefähigkeit durch die Linie M21 wurden auch von Castel et al. (2001, S.1615) gemacht. In dieser Arbeit, in welcher die Endozytose von cRGD-Peptiden und eines α_v Antikörpers 17E6 durch M21 beziehungsweise M21-L Zellen untersucht wurde, kam man jedoch zu der Schlussfolgerung, dass der Antikörper $\alpha_v\beta_3$ -rezeptorspezifisch, die cRGD-Peptide dagegen rezeptorunabhängig aufgenommen werden. So wiesen die Zellen der Linie M21-L verglichen zu M21 unter 37°C eine ebenfalls hohe Internalisierung des verwendeten [³H]cRGD auf. Im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit wurden jedoch um mehr als 1 Million höhere Konzentrationen des cRGD-Peptids von circa 10 μ M/ml eingesetzt, was dazu führte, dass der Rezeptor bereits gesättigt war und damit der unspezifische Uptake deutlich überwog. In den hier verwendeten niedrigen Konzentrationen dagegen ist die Internalisierung $\alpha_v\beta_3$ -abhängig, wie sich an der differierenden Aufnahme von M21 und M21-L zeigt. Der rezeptorunspezifische Uptake spielt in diesem Fall nur eine geringe Rolle.

Interessanterweise fand sich kein signifikanter Unterschied in der Bindung von [¹²⁵I]Gluco-RGD und [¹⁸F]Galacto-RGD auf der Oberfläche von M21 verglichen zu M21-L. Die Ursache hierfür liegt vor allem in der stark eingeschränkten Reproduzierbarkeit der Untersuchungen. Aus der Überlegung heraus, dass die $\alpha_v\beta_3$ Rezeptorbindung von bivalenten Kationen wie Ca_{2+} , Mg_{2+} oder auch Mn_{2+} abhängig ist (Smith et al. 1988, S.18726, Smith et al. 1994, S.960, Plow 2000, S.21785, Legler et al. 2001, S.1545), wurde ein speziell angereicherter Bindepuffer zur Spülung der Zellen verwendet, worunter stabilere Werte als unter PBS erzielt wurden. Auch Lanza et al. (1997, S.230) sowie Schraa et al. (2002, S.469) konnten unter dem Einsatz von bivalenten Kationen eine höhere Zelloberflächenbindung von RGD-Peptiden nachweisen. Der spezielle Puffer könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass in den hier vorliegenden Ergebnissen die Oberflächenbindung im Durchschnitt circa 10% höher als die Internalisierung lag, während van Hagen et al. (2000, S.186) in ihrer

Arbeit eine dreifach höhere intrazelluläre Aufnahme verglichen zur Oberflächenbindung angeben. In dieser Arbeitsgruppe wurde jedoch PBS zum Spülen verwendet.

Das Problem der Streuung der Ergebnisse konnte jedoch auch durch den speziellen Puffer nicht ausreichend beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde in folgenden Experimenten zur Blockierbarkeit von $\alpha_v\beta_3$ die Oberflächenbindung zwar gemessen, jedoch nur der intrazelluläre Uptake für die Auswertungen herangezogen.

Der IC_{50} Wert für die Blockade der Aufnahme von Gluco-RGD lag für S247 bei 10 nM, für P-004 mit circa 30 nM etwas höher. Im Vergleich dazu geben Reinmuth et al. (2003, S.2079) einen IC_{50} von 0,4 nM für S247 an. Dieses Ergebnis wurde an $\alpha_v\beta_3$ -positiven HEK293 Zellen in-vitro ermittelt. Auch Shannon et al. (2004, S.135) bestätigen in ihren Studien einen durchschnittlichen IC_{50} von 0,4 nM, ebenfalls an der Linie 293.

Diese gewisse Diskrepanz hat mehrere mögliche Ursachen. Zum einen muss berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Zelllinien verwendet wurden. Zum anderen wurde in den erwähnten Studien ein Solid-phase Assay eingesetzt. Außerdem schließen die Untersuchungen zur Rezeptorantagonisierung durch S247 sowohl die Bindung auf der Zelloberfläche als auch die Aufnahme in die Zellen mit ein. In der hier vorliegenden Arbeit jedoch wurde ausschließlich die Blockade der Internalisierung für den IC_{50} -Wert herangezogen. Erwähnenswert ist auch, dass Shannon et al. (2004, S.129) Mn_{2+} schon dem Inkubationsmedium zusetzten, was die primäre Bindungskraft des Rezeptors steigert. In den hier vorliegenden Experimenten dagegen wurde Mn_{2+} nur beim Spülen verwendet, um die Bindung sekundär zu erhöhen. Es liegen somit deutliche Unterschiede im Versuchsaufbau vor, die einen Vergleich erschweren.

Wie sich in den Experimenten zur Stabilität der Bindung von S247 an den $\alpha_v\beta_3$ Rezeptor zeigte, ließ sich die Substanz schnell mittels PBS auswaschen, was sich in einer fehlenden Blockade widerspiegelte. Dies wurde auch nicht durch eine Verlängerung der Inkubationszeit mit S247 auf 24 Stunden verbessert. Somit ergeben sich keine Hinweise dafür, dass S247 kovalent an das $\alpha_v\beta_3$ Integrin bindet oder die Expression oder Stabilität des Integrins beeinflusst. Übertragen auf in-vivo Versuche

ist aufgrund dieser Tatsache ein möglichst stabiler Serumspiegel der Substanzen notwendig, um die Ligandenbindung des $\alpha_v\beta_3$ Integrins zu inhibieren.

4.2 In-vivo Versuche

Ziel der Experimente war es zu untersuchen, inwieweit die in-vitro gemachten Beobachtungen durch in-vivo Untersuchungen bestätigt werden können und sich damit auch eine Möglichkeit für den klinischen Einsatz ergibt. In den PET-Studien konnte bei Tieren, die Tumoren der Linie M21 ausbildeten, eine deutlich sichtbare Anreicherung des i. v. injizierten [^{18}F]Galacto-RGD in der Tumorregion nachgewiesen werden. Der Tumor/Hintergrund Quotient betrug durchschnittlich zwischen 2,64 und 3,52. Bei Tieren, in welchen Tumore der Linie A431 implantiert wurden, zeigte sich ebenfalls ein hoher mittlerer Quotient von 4,12. Vergleichbare Werte wurden auch von Haubner et al. ermittelt (2001b, S.1782). In dessen Studien zur Linie M21 lag der Tumor/Hintergrund Quotient bei 5,7. Als Kontrolle wurden in dieser Arbeit Tiere mit M21-L verwendet, wobei hier der Quotient 1,2 betrug.

Im Vergleich zu den ebenfalls rezeptornegativen Zellen der Linie A431 stellt sich also die Frage, weshalb diese Tumore trotz allem ein Vielfaches an Aktivität anreichern. Schon von Felding-Haberman et al. (1992, S.2019) wurde ein deutlich langsames Wachstum von M21-L Zellen im Vergleich zu M21 in-vivo beschrieben. Während die subkutane Injektion von 10^5 Zellen der Linie M21 in drei von fünf Mäusen zu einem raschen Tumorwachstum führte, konnte dies für M21-L auch nach einer Zeit von sechs Wochen nicht beobachtet werden. Erst nach einer Injektion der fünffachen Zellmenge kam es in zwei von fünf Tieren zu einem langsamen Tumorwachstum. Im Zusammenhang mit dem reduzierten Wachstum ist auch eine verminderte Angiogenese zu erwarten, woraus folgt, dass sich Endothelzellen nur in geringem Ausmaß in aktiviertem Zustand befinden. So konnte in immunhistologischen Studien sowie mittels Western Blot keine β_3 Kette in Tumorgefäßen der Linie M21-L nachgewiesen werden, was diese Vermutung bestätigt (Haubner et al. 2005, S.248). Zellen der Linie A431 dagegen haben ein hohes Angiogenesepotential und zeigen ein rasches Wachstum. So konnte in der vorliegenden Arbeit nach einer subkutanen Injektion von 2×10^6 Zellen A431 nach vier Wochen ein Tumor von durchschnittlich 0,4 g gemessen werden. Im Zusammenhang mit der Angiogenese zeigten Haubner et al.

(2005, S.248) in ihrer Arbeit eine deutliche Ausprägung von $\alpha_v\beta_3$ Integrin auf aktivierten Endothelzellen im Tumorbereich von A431, worauf die Traceranreicherung zurückzuführen ist.

Mittels radioaktiv markiertem RGD lassen sich somit nicht nur $\alpha_v\beta_3$ -rezeptorpositive Tumoren darstellen, vielmehr kann auch die Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins auf aktivierten Endothelzellen nachgewiesen werden. Nach Vorbehandlung mit den $\alpha_v\beta_3$ -spezifischen Antagonisten S247 und P-004 konnte in der Bildgebung eine signifikant verminderte Aufnahme des Tracers im Tumorbereich mittels PET nachgewiesen werden. Die Blockade der Traceraufnahme war dosisabhängig und der Tumor/Hintergrund Quotient konnte unter entsprechend hoher Dosierung bis auf Werte um eins reduziert werden, was bedeutet, dass keine spezifische Anreicherung mehr stattfand. Hierzu vergleichbare Ergebnisse wurden auch unter der Substanz cyclo(-Arg-Gly-Asp-DPhe-Val-) gemacht, obwohl sie auf einer zu S247 und P-004 unterschiedlichen Struktur basiert (Haubner et al. 2005, S.248).

Diese Tatsachen sind in vielerlei Hinsicht viel versprechend. Sie zeigen, dass die peptidomimetischen Rezeptorantagonisten S247 und P-004 sich in der Tumorregion beziehungsweise in Bereichen der Neoangiogenese anreichern und die Bindung der RGD-Sequenz an $\alpha_v\beta_3$ unterbinden. Die Substanz [^{18}F]Galacto-RGD ist darüber hinaus nicht nur geeignet, den Rezeptorstatus nicht-invasiv mittels PET darzustellen, sondern auch den Grad der Blockade zu bestimmen. Außerdem scheint dies nicht von der Struktur der $\alpha_v\beta_3$ -antagonistischen Substanz beeinflusst zu werden. Daraus erschließen sich neue Möglichkeiten für den klinischen Einsatz, besonders was eine mögliche Therapie, deren Planung und die Überwachung betreffen.

Die Werte, die sich aus der Biodistribution ergaben, korrelierten sehr gut mit den Ergebnissen der PET-Studien. So betrug die durchschnittliche Aufnahme bis zu 2,66 %ID/g (M21) sowie 1,19 %ID/g (A431), woraus sich ein Tumor/Blut Quotient bis zu 26,44 (M21) und 19,4 (A431) ergab. In der Biodistribution fiel auf, dass die Traceranreicherung im Muskelgewebe in der Aktivitätsanreicherung durch die Substanzen S247 und P-004 reduziert wurde, wenngleich die absolute Tracerkonzentration bereits bei unbehandelten Tumoren sehr niedrig war. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Haubner et al. (2001b, S.1782) unter antagonistisch wirksamem cyclo(-Arg-Gly-Asp-DPhe-Val) gemacht. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass der verwendete Tracer mit geringer Affinität neben $\alpha_v\beta_3$ auch an

andere Rezeptoren wie die Integrine $\alpha_v\beta_5$ oder $\alpha_{IIb}\beta_3$ bindet. Im Vergleich beträgt der IC_{50} für [^{18}F]Galacto-RGD 5 nM ($\alpha_v\beta_3$), 1000 nM ($\alpha_v\beta_5$) beziehungsweise 6000 nM ($\alpha_{IIb}\beta_3$) (Haubner et al. 2001b, S.1782). Diese Integrine werden in unterschiedlicher Ausprägung unter anderem auf Thrombozyten, glatten Muskelzellen und ruhenden Endothelzellen gefunden. Da von der Substanz S247 bekannt ist, dass sie ebenfalls $\alpha_v\beta_5$ (IC_{50} 1,50 nM) und $\alpha_{IIb}\beta_3$ (IC_{50} 380 nM) blockiert, würde dies besonders unter hoher Dosierung eine verminderte Traceraufnahme erklären (Shannon et al. 2004, S.135). Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, dass die Ausscheidung von Galacto-RGD durch die Vorbehandlung mit S247 oder P-004 beschleunigt wurde. Grund dafür könnte eine Beeinflussung der renalen Exkretion durch die S247 und P-004 sein. Es muss berücksichtigt werden, dass allein durch das injizierte Volumen von Kochsalzlösung möglicherweise die renale Ausscheidung beeinflusst wurde. Da das gesamte Blutvolumen der Maus nur etwa 2 ml beträgt, stellt die Injektion von etwa 100 μ l NaCl-Lösung durchaus eine signifikante Volumenbelastung dar, die zu einer erhöhten glomerulären Filtration und zu veränderten Resorptionsprozessen im Tubulussystem der Niere führen kann.

Aufgrund der Möglichkeiten, die sich durch radioaktiv markierte $\alpha_v\beta_3$ Rezeptorantagonisten erschließen, wird derzeit an weiteren Substanzen gearbeitet (Boerman et al. 2000, S.195). Das zum Beispiel von Sivolapenko et al. (1998, S.1383) vorgestellte ^{99m}Tc -markierte lineare Dekapeptid mit zwei RGD-Bindungsstellen scheint in seiner Rezeptoraffinität fraglich. Darüber hinaus ist es auch für die Bildgebung eher schlecht geeignet, da eine hohe Hintergrundaktivität gemessen wurde. Dagegen wurde für ein ^{111}In - beziehungsweise ^{125}I -markiertes diethyleletriamepentaacetic acid (DTPA)-RGD-Analogon eine sowohl in-vitro wie auch in-vivo $\alpha_v\beta_3$ -spezifische Bindung beschrieben. Weiter scheinen diese Substanzen auch für eine Markierung mit Beta-Strahlern wie ^{90}Y and ^{177}Lu geeignet, was die therapeutischen Möglichkeiten erweitert (van Hagen et al. 2000, S.186). Auch für ^{99m}Tc -, ^{186}Re - sowie ^{90}Y -markierte Peptide, die auf einer cyclo-RGD-Struktur basieren, wurde eine hohe $\alpha_v\beta_3$ Affinität nachgewiesen (Haubner et al. 2003, S.189, Haubner et al. 2004, S.26). Ebenfalls auf einer cyclo-RGD-Struktur basierend ist die Substanz [^{18}F]FB-PEG-RGD, für welche eine spezifische Tumoranreicherung mit einem hohen Tumor/Hintergrund Quotient im MicroPET gezeigt wurde. Durch die Koppelung mit Polyethylenglycol konnte eine deutliche Verbesserung der in-vivo Kinetik erzielt werden (Chen et. al 2004, S.1081).

Darüber hinaus wurde von Chen et al. (2005, S.271) neben des ^{18}F Fluor markierten Tracers ein mit ^{64}Cu markiertes, PEGyliertes, dimerisches RGD-Peptid, die Substanz ^{64}Cu -DOTA-PEG-E[c(RGDyK)]₂, vorgestellt. In Untersuchungen am Bronchialkarzinom wurde eine sehr gute Eignung als PET-Tracer zur Darstellung integrinpositiver Tumoren nachgewiesen.

Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist es möglich, $\alpha_v\beta_3$ -positives Gewebe mittels der PET nicht-invasiv darzustellen. Weiter wurde verdeutlicht, inwieweit man die Bindungsfähigkeit spezieller $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten mit Hilfe dieser nuklearmedizinischen Methoden messen kann. Diese Beobachtungen sind insbesondere interessant, wenn man sie im Zusammenhang mit Studien zur biologischen Wirksamkeit betrachtet.

So wurde für S247 gezeigt, dass sie die Inzidenz von Metastasen signifikant senken kann. Tiere, welchen Kolonkarzinomzellen in die Milz injiziert wurden, wiesen unter einer kontinuierlichen Therapie mit S247 eine geringere Anzahl von Lebermetastasen auf als die nicht therapierte Kontrollgruppe. Darüber hinaus wurde eine deutliche Rarefizierung von Gefäßen in den Metastasen beobachtet. Der Primärtumor dagegen wurde im Wachstum nicht signifikant beeinflusst (Reinmuth et al. 2003, S.2079).

Ähnliches wird auch von Harms et al. (2004, S.119) beschrieben. Unter einer Therapie mit S247 bildeten $\alpha_v\beta_3$ -positive Mammakarzinomzellen der Linie MDA-MB 435 weniger Knochenmetastasen aus als in der Kontrollgruppe. Interessanterweise war dieser Unterschied nur signifikant, wenn mit der Therapie vor Inokulation der Tumorzellen begonnen wurde. Die Wirksamkeit der Substanz liegt folglich vor allem in den ersten Phasen des Metastasierungsprozesses, sprich in der frühen Ansiedlung von Zellen sowie deren Überlebensmöglichkeit. Spätere Schritte wie Kolonisation und Proliferation werden laut dieser Studie nur wenig beeinflusst.

Auch Shannon et al. (2004, S.129) stimmten in ihren Beobachtungen damit überein. Die alleinige Gabe der Substanz S247 am Tag der Tumorzellinjektion (435/HAL) führte noch nach einem Zeitraum von drei Wochen zu einer signifikanten Reduktion von Metastasen. Dies wird ebenfalls dadurch begründet, dass die Ansiedlung von im Blut zirkulierenden Tumorzellen in Zielorganen inhibiert wird. In dieser Arbeit wird jedoch auch eine Wirkung auf späte Wachstumsphasen der Metastasen beschrieben, was insbesondere auf die Beeinträchtigung der Endothelzellfunktion zurückzuführen ist.

In keiner dieser Studien zur Substanz S247 konnte jedoch eine Wirkung auf den Primärtumor gezeigt werden, wie man es nach den in-vitro Versuchen erwartet hätte. Eine Ursache dafür liegt in der Heterogenität des Tumorgewebes in-vivo. So wird unter anderem eine größere Vielfalt an Wachstumsfaktoren auf den Zellen exprimiert, die von $\alpha_v\beta_3$ -spezifischen Substanzen nur wenig beeinflusst werden.

Schon von mehreren Arbeitsgruppen wurde beschrieben, dass Linien von Tumorzellen, welche das Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf der Zelloberfläche ausbilden, deutlich aggressiver sind als $\alpha_v\beta_3$ -negative Kontrollgruppen. Die Ausprägung des $\alpha_v\beta_3$ Rezeptors kann als ein Indikator für den Malignitätsgrad gesehen werden. Diese Tumore zeigen nicht nur häufig ein beschleunigtes Wachstum, sondern fallen vor allem durch frühzeitige Ausbildung von Metastasen auf (Albelda et al. 1990b, S.6757, Gladson et al. 1991, S.1924, Felding-Habermann et al. 1992, S.2018, Gehlsen et al. 1992, S.111, Gasparini et al. 1998, S.2625, Felding-Habermann et al. 2001, S.1853). Besonders das Skelettsystem steht häufig an erster Stelle, wodurch sich die Überlebensrate deutlich verschlechtert. Eine Ursache dafür liegt in der zusätzlichen $\alpha_v\beta_3$ -abhängigen Stimulation der Osteoklastenfunktion.

Dies legt die Vermutung nahe, dass $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten besonders effektiv auch auf die osteolytische Metastasierung wirken. So zeigten Carron et al. (1998, S.1930) sowie Engelman et al. (1997, S.2284) für die peptidomimetischen Substanzen SC68448 und SC56631 unter deren Anwendung eine Verminderung der Knochenresorption sowie eine Reduktion der tumorassoziierten Hypercalcämie. Darüber hinaus wurde auch eine verminderte Neovaskularisation beschrieben. Für S247 konnte in-vivo keine signifikante Abnahme der Osteolyse gesichert werden, wobei in-vitro eine Störung der Osteoklastenfunktion beobachtet wurde (Harms et al. 2004, S.123).

Erste klinische Studien zum Einsatz von $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten wurden für die Substanz Cilengitide (EMD 121974) initiiert. Für diese Substanz, die auf der zyklischen Struktur von RGD basiert, wurde in Tierversuchen unter einer Kombination mit Radioimmuntherapie eine vermehrte Apoptose des Tumors gezeigt (Burke et al. 2002, S.4263). In Patientenstudien konnte nun ein positiver Effekt auf die Tumorthherapie im Rahmen der Behandlung von Glioblastomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Monotherapie) sowie von Pankreaskarzinomen (Kombination mit Gemcitabin) beobachtet werden (Colevas et al. 2004, S.1781, Raguse et al. 2004, S.228).

Zusammenfassend zeigt sich, dass das $\alpha_v\beta_3$ Integrin aufgrund seiner Rolle in Metastasierungs- sowie Angiogeneseprozessen ein sehr viel versprechender Angriffspunkt für neue Therapien darstellt. Die Bildgebung mittels radioaktiver Tracer wie [^{18}F]Galacto-RGD und der Positronen-Emissions-Tomographie kann dazu einen großen Beitrag leisten. Dass sich mit dieser Methode nicht nur Tumore beziehungsweise tumorinduzierte Neoangiogenese sondern auch chronische Entzündungen nachweisen lassen, wurde eindrücklich von Pichler et al. (2005, S.184) gezeigt. Abhängig von der Dauer der Entzündung konnte aufgrund der zunehmenden Gefäßneubildung eine vermehrte Anreicherung der Tracer nachgewiesen werden. Hierdurch ergeben sich neue Möglichkeiten in der Unterscheidung von chronischen und akuten Entzündungsprozessen.

Bedeutend jedoch sind vor allem die Möglichkeiten, die sich mit der Substanz [^{18}F]Galacto-RGD in der Therapieplanung und Überwachung der unterschiedlichen pathologischen Prozesse erschließen. Der Rezeptorstatus sowie dessen Blockade kann auf diese Weise auf molekularer Ebene dargestellt werden, wie auch in dieser Arbeit gezeigt wurde. Hierdurch kann die Beurteilung der Wirksamkeit von $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten verbessert werden. In einer ersten klinischen Studie am Patienten von Haubner et al. (2005, S.244) zeigten sich hierzu viel versprechende Ergebnisse. Untersucht wurden Patienten, welche zu einem Teil an metastasiertem Melanom oder Osteosarkom beziehungsweise auch an Knochenmetastasen (Nierenzellkarzinom) oder chronischer Synovitis erkrankt waren. Mittels [^{18}F]Galacto-RGD und der PET konnte eine Aktivitätsanreicherung im Tumorgewebe dargestellt werden, wie sich durch die etablierte Methode mittels [^{18}F]FDG bestätigen ließ. Gleichzeitig zeigte sich, dass im Gegensatz zu [^{18}F]FDG mit Hilfe von [^{18}F]Galacto-RGD eine Aussage über das Angiogenesepotential des Gewebes gemacht werden kann. Dies kann für die Planung einer Therapie von großer Bedeutung sein. Dass mit dieser Methode auch ein quantitativer Nachweis einer Blockade möglich wird, ist ein zusätzlicher Vorteil für die Überwachung und Beurteilung des Therapieerfolgs, insbesondere im Hinblick auf das breite Einsatzgebiet von $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten, welches chronische Entzündungen, pathologische Neoangiogenese wie Retinopathien sowie maligne Tumoren und deren Metastasen einschließt.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und inwieweit es möglich ist, den $\alpha_v\beta_3$ Rezeptorstatus von Zellen beziehungsweise Geweben auf molekularer Ebene in-vitro wie auch in-vivo mittels $\alpha_v\beta_3$ -spezifischer, radioaktiver Tracer darzustellen. Dazu wurden die glykosylierten Peptide [^{125}I]Gluco-RGD und [^{18}F]Galacto-RGD als Marker eingesetzt. Unter Anwendung dieser Untersuchungsmethode wurde darüber hinaus die Blockade des $\alpha_v\beta_3$ Integrins durch zwei peptidomimetische Antagonisten, S247 und P-004, quantitativ erfasst.

Für die Experimente wurden $\alpha_v\beta_3$ -positive Melanomzellen M21, zur Negativkontrolle die Zelllinie M21-L gewählt. Die rezeptornegative Linie A431, ein Plattenepithelkarzinom, diente zur Induktion von Neoangiogenese in-vivo, wodurch aktivierte Endothelzellen auf ihre Rezeptorexprimierung geprüft werden konnten.

In den in-vitro Versuchen, die in Zellsuspension durchgeführt wurden, zeigte sich eine signifikante, $\alpha_v\beta_3$ -spezifische Internalisierung der Tracer, was sich in einer durchschnittlichen intrazellulären Aktivitätsanreicherung von 2,17 %Aktivität/mg für [^{125}I]Gluco-RGD und 0,38 %Aktivität/mg für Galacto-RGD widerspiegelte. Unter einer Absenkung der Temperatur von 37°C auf 4°C wurde die Aufnahme um circa 80% reduziert. Dies belegt, dass es sich bei der Internalisierung um einen aktiven Prozess und keinen Diffusionsvorgang handelt. Sowohl S247 als auch P-004 reduzierte signifikant die intrazelluläre Aufnahme von Gluco- und Galacto-RGD. Die Blockade der Traceraufnahme war dosisabhängig und rasch reversibel. In den in-vivo Studien wurden tumortragende Mäuse mittels Kleintier-PET und [^{18}F]Galacto-RGD untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Signalanreicherung in den Tumorgebieten mit einem hohen Tumor/Hintergrund Quotient von durchschnittlich $3,22 \pm 0,43$ (M21) beziehungsweise $4,12 \pm 0,50$ (A431). Durch die Antagonisten S247 sowie P-004 konnte diese Anreicherung nahezu vollständig unterbunden werden. Diese mittels PET nicht-invasiv gemachten Beobachtungen konnten durch invasive Messungen der Aktivitätskonzentration im Tumorgewebe mittels eines Gamma-Counters bestätigt werden.

Durch die nicht-invasive Darstellung des $\alpha_v\beta_3$ Integrins unter Anwendung von radioaktiv markierten Tracern und der PET erschließen sich neue Möglichkeiten in der Behandlung von Tumoren und der pathologisch gesteigerten Angiogenese bei anderen Erkrankungen. Vor einer Therapie mit $\alpha_v\beta_3$ Liganden kann die Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins durch PET-Untersuchungen mit [^{18}F]Galacto-RGD nicht-invasiv dargestellt werden. Auf diese Weise ist es möglich, geeignete Patienten für dieses Therapieverfahren auszuwählen. Nach Einleitung der Therapie kann dann die Blockade des $\alpha_v\beta_3$ Integrins überprüft und gegebenenfalls die Dosis der $\alpha_v\beta_3$ Antagonisten angepasst werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Akiyama, S.K.: Integrins in cell adhesion and signaling. *Human Cell: Official Journal of Human Cell Research Society*, 9: 181-186, 1996.
2. Albelda, S. and Buck, C.: Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.*, 4: 2868-2880, 1990a.
3. Albelda, S., Mette, S., Elder, D., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., and Buck, C.: Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Research*, 50: 6757-6764, 1990b.
4. Allman, R., Cowburn, P. and Mason, M.: In-vitro and in-vivo effects of a cyclic peptide with affinity for the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cells. *European Journal of Cancer*, 36: 410-422, 2000.
5. Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K. and Juliano, R.L.: Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins. *Pharmacological Reviews*, 50: 197-263, 1998.
6. Aumailley, M., Gurrath, M., Muller, G., Calvete, J., Timpl, R. and Kessler, H.: Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Letters*, 291: 50-54, 1991.
7. Balasubramanian, S. and Kuppuswamy, D.: RGD-containing peptides activate S6K1 through beta 3 integrin in adult cardiac muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 42214-42224, 2003.
8. Boerman, O.C., Oyen, W.J. and Corstens, F.H.: Radio-labeled receptor-binding peptides: a new class of radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*, 30: 195-208, 2000.
9. Brooks, P.C., Clark, R.A. and Cheresh, D.A.: Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 264: 569-571, 1994a.

10. Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G. and Cheresh, D.A.: Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 79: 1157-1164, 1994b.
11. Brooks, P.C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F.H. and Cheresh, D.A.: Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *The Journal of Clinical Investigation*, 96: 1815-1822, 1995.
12. Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schalscha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P. and Cheresh, D.A.: Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*, 85: 683-693, 1996.
13. Burke, P.A., DeNardo, S.J., Miers, L.A., Lamborn, K.R., Matzku, S. and DeNardo, G.L.: Cilengitide targeting of alpha v beta 3 integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Research*, 62: 4263-4272, 2002.
14. Carron, C., Meyer, D., Pegg, J., Engleman, V., Nickols, M., Settle, S., Westlin, W., Ruminski, P. and Nickols, G.: A peptidomimetic antagonist of the integrin alpha v beta 3 inhibits Leydig cell tumor growth and the development of hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res*, 58: 1930-1935, 1998.
15. Castel, S., Pagan, R., Mitjans, F., Piulats, J., Goodman, S., Jonczyk, A., Huber, F., Vilaro, S. and Reina, M.: RGD peptides and monoclonal antibodies, antagonists of alpha v integrin, enter the cells by independent endocytic pathways. *Lab Invest*, 81: 1615-1626, 2001.
16. Chellaiah, M.A. and Hruska, K.A.: The integrin alpha v beta 3 and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int*, 72: 197-205, 2003.
17. Chen, Y.P., O'Toole, T.E., Shipley, T., Forsyth, J., La Flamme, S.E., Yamada, K. M., Shattil, S.J. and Ginsberg, M.H.: "Inside-out" signal transduction inhibited by isolated integrin cytoplasmic domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 18307-18310, 1994.

18. Chen, X., Park, R., Hou, Y., Khankaldyyan, V., Gonzales-Gomez, I., Tohme, M., Bading, J.R., Laug, W.E. and Conti, P.S.: MicroPET imaging of brain tumor angiogenesis with ¹⁸F-labeled PEGylated RGD peptide. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 31: 1081-1089, 2004.
19. Chen, X., Sievers, E., Hou, Y., Park, R., Tohme, M., Bart, R., Bremner, R., Bading, J.R. and Conti, P.S.: Integrin alpha v beta 3-targeted imaging of lung cancer. *Neoplasia*, 7: 271-279, 2005.
20. Cheresh, D.A. and Harper, J.: Arg-Gly-Asp recognition by a cell adhesion receptor requires its 130- kDa alpha subunit. *J Biol Chem*, 262: 1434-1437, 1987a.
21. Cheresh, D.A. and Spiro, R.: 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, 1987b.
22. Colevas, A.D., Scharf, O. and Schoenfeldt, M.: Clinical trials referral resource. Current clinical trials of cilengitide, an alpha v antagonist in clinical development as an anticancer agent. *Oncology (Williston Park)*, 18: 1778, 1781-1782, 1784, 2004.
23. Damsky, C.H. and Werb, Z.: Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Current Opinion in Cell Biology*, 4: 772-781, 1992.
24. Eliceiri, B.P. and Cheresh, D.A.: The role of alpha v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest*, 103: 1227-1230, 1999.
25. Engleman, V.W., Nickols, G.A., Ross, F.P., Horton, M.A., Griggs, D.W., Settle, S.L., Ruminski, P.G. and Teitelbaum, S.L.: A Peptidomimetic antagonist of the alpha v beta 3 integrin inhibits bone resorption in-vitro and prevents osteoporosis in-vivo. *J Clin Invest*, 99: 2284-2292, 1997.
26. Felding-Habermann, B., Mueller, B.M., Romerdahl, C.A., and Cheresh, D.A.: Involvement of integrin alpha v gene expression in human melanoma tumorigenicity. *The Journal of Clinical Investigation*, 89: 2018-2022, 1992a.

27. Felding-Habermann, B., Ruggeri, Z. and Cheresh, D.: Distinct biological consequences of integrin alpha v beta 3-mediated melanoma cell adhesion to fibrinogen and its plasmic fragments. *J Biol Chem*, *267*: 5070-5077, 1992b.
28. Felding-Habermann, B., Habermann, R., Saldívar, E. and Ruggeri, Z. M.: Role of beta 3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. *J Biol Chem*, *271*: 5892-5900, 1996.
29. Felding-Habermann, B., O'Toole, T.E., Smith, J.W., Fransvea, E., Ruggeri, Z.M., Ginsberg, M.H., Hughes, P.E., Pampori, N., Shattil, S.J., Saven, A. and Mueller, B.M.: Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *PNAS*, *98*: 1853-1858, 2001.
30. Felding-Habermann, B., Fransvea, E., O'Toole, T.E., Manzuk, L., Faha, B., and Hensler, M.: Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, *19*: 427-436, 2002.
31. Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A. and Cheresh, D.A.: Definition of Two Angiogenic Pathways by Distinct alpha v Integrins. *Science*, *270*: 1500-1502, 1995.
32. Friedlander, M., Theesfeld, C.L., Sugita, M., Fruttiger, M., Thomas, M.A., Chang, S. and Cheresh, D.A.: Involvement of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in ocular neovascular diseases. *PNAS*, *93*: 9764-9769, 1996.
33. Gasparini, G., Brooks, P., Biganzoli, E., Vermeulen, P., Bonoldi, E., Dirix, L., Ranieri, G., Miceli, R. and Cheresh, D.: Vascular integrin alpha v beta 3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res*, *4*: 2625-2634, 1998.
34. Gehlsen, K.R., Davis, G.E., and Sriramarao, P.: Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties. *Clinical & Experimental Metastasis*, *10*: 111-120, 1992.
35. Giard, D.J., Aaronson, S.A., and Todaro, G.J.: In-vitro cultivation of human tumors: establishment of cell derived from a series of solid tumors. *J Nat Cancer Inst*, *51*: 1417-1473, 1973.

36. Gille, J. and Swerlick, R.A.: Integrins: role in cell adhesion and communication. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 797: 93-106, 1996.
37. Gilmore, A.P. and Burridge, K.: Cell adhesion. Cryptic sites in vinculin. *Nature*, 373: 197, 1995.
38. Ginsberg, M.H., Loftus, J.C., and Plow, E.F.: Cytoadhesins, integrins, and platelets. *Thrombosis and Haemostasis*, 59: 1-6, 1988.
39. Gladson, C.L. and Cheresh, D.A.: Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 88: 1924-1932, 1991.
40. Hammes, H.P., Brownlee, M., Jonczyk, A., Sutter, A. and Preissner, K.T.: Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nature Medicine*, 2: 529-533, 1996.
41. Harms, J.F., Welch, D.R., Samant, R.S., Shevde, L.A., Miele, M.E., Babu, G.R., Goldberg, S.F., Gilman, V.R., Sosnowski, D.M., Campo, D.A., Carol V. Gay, Budgeon, L.R., Mercer, R., Jewell, J., Mastro, A.M., Donahue, H.J., Erin, N., Debies, M.T., Meehan, W.J., Jones, A.L., Mbalaviele, G., Nickols, A., Christensen, N., Melly, R., Beck, L., Kent, J., Rader, R.K., Kotyk, J.J., Pagel, M.D., Westlin, W.F. and Griggs, D.W.: A small molecule antagonist of the alpha v beta 3 integrin suppresses MDA-MB-435 skeletal metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 21: 119-128, 2004.
42. Haubner, R., Wester, H.-J., Reuning, U., Senekowitsch-Schmidtke, R., Diefenbach, B., Kessler, H., Stocklin, G. and Schwaiger, M.: Radiolabeled alpha v beta 3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 40: 1061-1071, 1999.
43. Haubner, R., Wester, H.-J., Burkhart, F., Senekowitsch-Schmidtke, R., Weber, W., Goodman, S.L., Kessler, H. and Schwaiger, M.: Glycosylated RGD-Containing Peptides: Tracer for Tumor Targeting and Angiogenesis Imaging with Improved Biokinetics. *J Nucl Med*, 42: 326-336, 2001a.

44. Haubner, R., Wester, H.J., Weber, W.A. and Schwaiger, M.: Radiotracer-based strategies to image angiogenesis. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine: Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (Aimn) and the International Association of Radiopharmacology (Iar)*, *47*: 189-199, 2003.
45. Haubner, R., Bruchertseifer, F., Bock, M., Kessler, H., Schwaiger, M. and Wester, H.J.: Synthesis and biological evaluation of a (99m)Tc-labelled cyclic RGD peptide for imaging the alpha v beta 3 expression. *Nuklearmedizin*, *43*: 26-32, 2004.
46. Haubner, R., Weber, W.A., Beer, A.J., Vabuliene, E., Reim, D., Sarbia, M., Becker, K.F., Goebel, M., Hein, R., Wester, H.J., Kessler, H. and Schwaiger, M.: Noninvasive Visualization of the Activated alpha v beta 3 Integrin in Cancer Patients by Positron Emission Tomography and [(18)F]Galacto-RGD. *PLoS Med*, *2*: e70, 2005.
47. Hofmann, U. B., Westphal, J.R., Waas, E.T., Becker, J.C., Ruiter, D.J. and van Muijen, G.N.: Coexpression of integrin alpha v beta 3 and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: correlation with melanoma progression. *The Journal of Investigative Dermatology*, *115*: 625-632, 2000.
48. Horton, M.A.: The alpha v beta 3 Integrin "Vitronectin Receptor". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *29*: 721-725, 1997.
49. Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K. and Juliano, R.: Integrin signaling and cell growth control. *Current Opinion in Cell Biology*, *10*: 220-231, 1998.
50. Hynes, R.O.: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, *48*: 549-554, 1987.
51. Hynes, R.O.: Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, *69*: 11-25, 1992.
52. Hynes, R.O.: Integrins Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, *110*: 673-687, 2002.
53. Ivaska, J. and Heino, J.: Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cellular and Molecular Life Sciences: Cmls*, *57*: 16-24, 2000.

54. Johnson, R.P. and Craig, S.W.: F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature*, *373*: 261-264, 1995.
55. Kim, L.T. and Yamada, K.M.: The regulation of expression of integrin receptors. *Proceedings of the Society For Experimental Biology and Medicine*, *214*: 123-131, 1997.
56. Kumar, C.C.: Signaling by integrin receptors. *Oncogene*, *17*: 1365-1373, 1998.
57. Lanza, P., Felding-Habermann, B., Ruggeri, Z.M., Zanetti, M. and Billella, R.: Selective Interaction of a Conformationally-constrained Arg-Gly-Asp (RGD) Motif with the Integrin Receptor alpha v beta 3 Expressed on Human Tumor Cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *23*: 230-241, 1997.
58. Leavesley, D.I., Ferguson, G.D., Wayner, E.A. and Cheresch, D.A.: Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *The Journal of Cell Biology*, *117*: 1101-1107, 1992.
59. Legler, D., Wiedle, G., Ross, F. and Imhof, B.: Superactivation of integrin alpha v beta 3 by low antagonist concentrations. *J Cell Sci*, *114*: 1545-1553, 2001.
60. Lester, B.R. and McCarthy, J.B.: Tumor cell adhesion to the extracellular matrix and signal transduction mechanisms implicated in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, *11*: 31-44, 1992.
61. McHugh, K.P., Hodivala-Dilke, K., Zheng, M.H., Namba, N., Lam, J., Novack, D., Feng, X., Ross, F.P., Hynes, R.O. and Teitelbaum, S.L.: Mice lacking beta 3 integrins are osteosclerotic because of dysfunctional osteoclasts. *The Journal of Clinical Investigation*, *105*: 433-440, 2000.
62. Miyauchi, A., Alvarez, J., Greenfield, E.M., Teti, A., Grano, M., Colucci, S., Zamboni-Zallone, A., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. and Cheresch, D.A.: Recognition of osteopontin and related peptides by an alpha v beta 3 integrin stimulates immediate cell signals in osteoclasts. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*: 20369-20374, 1991.

63. Montgomery, A.M., Reisfeld, R.A. and Cheresh, D.A.: Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*: 8856-8860, 1994.
64. Otey, C.A., Pavalko, F.M. and Burridge, K.: An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in-vitro. *The Journal of Cell Biology*, *111*: 721-729, 1990.
65. Petitclerc, E., Stromblad, S., von Schalscha, T.L., Mitjans, F., Piulats, J., Montgomery, A.M.P., Cheresh, D.A. and Brooks, P.C.: Integrin alpha v beta 3 Promotes M21 Melanoma Growth in Human Skin by Regulating Tumor Cell Survival. *Cancer Res*, *59*: 2724-2730, 1999.
66. Pfaff, M., Tangemann, K., Muller, B., Gurrath, M., Muller, G., Kessler, H., Timpl, R. and Engel, J.: Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha v beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *J Biol Chem*, *269*: 20233-20238, 1994.
67. Pichler, B.J., Kneilling, M., Haubner, R., Braumuller, H., Schwaiger, M., Rocken, M. and Weber, W.A.: Imaging of delayed-type hypersensitivity reaction by PET and ¹⁸F-galacto-RGD. *J Nucl Med*, *46*: 184-189, 2005.
68. Pierschbacher, M.D. and Ruoslahti, E.: Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*: 5985-5988, 1984.
69. Plow, E.F., Haas, T.A., Zhang, L., Loftus, J. and Smith, J.W.: Ligand Binding to Integrins. *J Biol Chem*, *275*: 21785-21788, 2000.
70. Raguse, J.D., Gath, H.J., Bier, J., Riess, H., and Oettle, H.: Cilengitide (EMD 121974) arrests the growth of a heavily pretreated highly vascularised head and neck tumour. *Oral Oncol*, *40*: 228-230, 2004.
71. Rees, D.J., Ades, S.E., Singer, S.J. and Hynes, R.O.: Sequence and domain structure of talin. *Nature*, *347*: 685-689, 1990.

72. Reinmuth, N., Liu, W., Ahmad, S.A., Fan, F., Stoeltzing, O., Parikh, A.A., Bucana, C.D., Gallick, G.E., Nickols, M.A., Westlin, W.F. and Ellis, L.M.: alpha v beta 3 Integrin Antagonist S247 Decreases Colon Cancer Metastasis and Angiogenesis and Improves Survival in Mice. *Cancer Res*, *63*: 2079-2087, 2003.
73. Ria, R., Vacca, A., Ribatti, D., Di Raimondo, F., Merchionne, F. and Dammacco, F.: Alpha v beta 3 integrin engagement enhances cell invasiveness in human multiple myeloma. *Haematologica*, *87*: 836-845, 2002.
74. Roberts, M.S., Woods, A.J., Dale, T.C., van der Sluijs, P. and Norman, J.C.: Protein Kinase B/Akt acts via Glycogen Synthase Kinase 3 to Regulate Recycling of alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 Integrins. *Molecular and Cellular Biology*, *24*: 1505-1515, 2004
75. Ruoslahti, E.: Integrins. *The Journal of Clinical Investigation*, *87*: 1-5, 1991.
76. Ruoslahti, E.: RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *12*: 697-715, 1996.
77. Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D.: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, *238*: 491-497, 1987.
78. Schraa, A.J., Kok, R.J., Moorlag, H.E., Bos, E.J., Proost, J.H., Meijer, D.K., de Leij, L.F. and Molema, G.: Targeting of RGD-modified proteins to tumor vasculature: a pharmacokinetic and cellular distribution study. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *102*: 469-475, 2002.
79. Schwartz, M.A., Schaller, M.D. and Ginsberg, M.H.: Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *11*: 549-599, 1995.
80. Seftor, R.E., Seftor, E.A. and Hendrix, M.J.: Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. *Cancer Metastasis Reviews*, *18*: 359-375, 1999.
81. Shannon, K.E., Keene, J.L., Settle, S.L., Duffin, T.D., Nickols, M.A., Westlin, M., Schroeter, S., Ruminski, P.G. and Griggs, D.W.: Anti-metastatic properties of RGD-peptidomimetic agents S137 and S247. *Clinical & Experimental Metastasis*, *21*: 129-138, 2004.

82. Sipkins, D.A., Cheresh, D.A., Kazemi, M.R., Nevin, L.M., Bednarski, M.D. and Li, K.C.: Detection of tumor angiogenesis in-vivo by alpha v beta 3-targeted magnetic resonance imaging. *Nature Medicine*, 4: 623-626, 1998.
83. Sivolapenko, G.B., Skarlos, D., Pectasides, D., Stathopoulou, E., Milonakis, A., Sirmalis, G., Stuttle, A., Courtenay-Luck, N. S., Konstantinides, K. and Epenetos, A.A.: Imaging of metastatic melanoma utilising a technetium-99m labelled RGD-containing synthetic peptide. *European Journal of Nuclear Medicine*, 25: 1383-1389, 1998.
84. Smith, J. and Cheresh, D.A.: The Arg-Gly-Asp binding domain of the vitronectin receptor. Photoaffinity cross-linking implicates amino acid residues 61-203 of the beta subunit. *J Biol Chem*, 263: 18726-18731, 1988.
85. Smith, J., Piotrowicz, R. and Mathis, D.: A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins. *J Biol Chem*, 269: 960-967, 1994.
86. Springer, T.A.: Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346: 425-434, 1990.
87. Stetler-Stevenson, W.G.: The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 10: 383-392, 2001.
88. Storgard, C.M., Stupack, D.G., Jonczyk, A., Goodman, S.L., Fox, R.I. and Cheresh, D.A.: Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an alpha v beta 3 antagonist. *J Clin Invest*, 103: 47-54, 1999.
89. Stromblad, S., Becker, J.C., Yebra, M., Brooks, P.C. and Cheresh, D.A.: Suppression of p53 Activity and p21WAF1/CIP1 Expression by Vascular Cell Integrin alpha v beta 3 during Angiogenesis. *J Clin Invest*, 98: 426-433, 1996.
90. Tei, K., Kawakami-Kimura, N., Taguchi, O., Kumamoto, K., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Toda, K., Kawata, R., Hisa Y. and Kannagi, R.: Roles of Cell Adhesion Molecules in Tumor Angiogenesis Induced by Cotransplantation of Cancer and Endothelial Cells to Nude Rats. *Cancer Res* 62, 6289–6296, 2002.

91. Vabuliené, E.: Korrelation zwischen dem Grad der Expression des α v β 3 Integrins auf menschlichen Melanomzellen und der Aufnahme von radioaktiv markierten zyklischen RGD-Peptiden. Dissertation an der TUM, 2004
92. van Hagen, P.M., Breeman, W.A., Bernard, H.F., Schaar, M., Mooij, C.M., Srinivasan, A., Schmidt, M.A., Krenning, E.P. and de Jong, M.: Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD analogue for tumour imaging and radionuclide therapy. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *90*: 186-198, 2000.
93. Varner, J.A., Brooks, P.C. and Cheresh, D.A.: REVIEW: the integrin α v β 3: angiogenesis and apoptosis. *Cell Adhesion and Communication*, *3*: 367-374, 1995.
94. Voura, E.B., Ramjeesingh, R.A., Montgomery, A.M.P. and Siu, C.-H.: Involvement of Integrin α v β 3 and Cell Adhesion Molecule L1 in Transendothelial Migration of Melanoma Cells. *Mol Biol Cell*, *12*: 2699-2710, 2001.
95. Weber, W.A., Haubner, R., Vabuliené, E., Kuhnast, B., Wester, H.J. and Schwaiger, M.: Tumor angiogenesis targeting using imaging agents. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine: Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (Aimn) [and] the International Association of Radiopharmacology (Iar)*, *45*: 179-182, 2001.
96. Ziegler, S.I., Pichler, B.J., Boening, G., Rafecas, M., Pimpl, W., Lorenz, E., Schmitz, N. and Schwaiger, M.: A prototype high-resolution animal positron tomograph with avalanche photodiode arrays and LSO crystals. *European Journal of Nuclear Medicine*, *28*: 136-143, 2001.

7 Abkürzungen

APD	avalanche photodiodes
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
cpm	counts per minute
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	fokale Adhäsionskinase
FKS	fetales Kälberserum
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
LSO	lutetium oxyorthosilicate scintillation
MADPET	Munich Avalanche Photo Diode PET
n	Anzahl der Proben bzw. Versuchstiere
PBS	phosphate buffered saline
PET	Positronen Emmisions Tomographie
p. i.	post injektionem
ROI	region of interest
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
TNF α	tumor necrosis factor α
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
vWF	von Willebrand Faktor
%ID/mg	Prozent der injizierten Dosis pro mg

8 Danksagung

Herrn PD Dr. W.A. Weber danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München.

Im Besonderen möchte ich Frau C. Bodenstein für ihre guten Ratschläge und ihre tatkräftige Unterstützung bei den Experimenten danken.

Mein Dank gilt auch Herrn R. Haubner und der Arbeitsgruppe "Radiochemie" für die Synthese der eingesetzten Tracer.

Ein großes Dankeschön möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester sowie meinen Freunden sagen, die in all der Zeit für mich da waren und mir so oft zur Seite standen.

