

Visualisierung der Tumorzelloberflächenmarker-Expression und der intratumoralen Heterogenität mit Surface-Enhanced-Resonance-Raman- Nanopartikeln

Lara Kim Rotter

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der
Technischen Universität München
zur Erlangung einer Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Susanna Kossatz

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Claus Zimmer
2. Prof. Dr. Gabriele Multhoff
3. Prof. Dr. Ingo Mellinghoff

Die Dissertation wurde am 09.11.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 04.01.2024 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG	7
1.1 HINTERGRUND UND MOTIVATION DER VORLIEGENDEN ARBEIT	7
1.2 BILDGEBUNGSVERFAHREN	8
1.3 IMMUNHISTOCHEMIE	10
1.4 RAMAN-NANOPARTIKEL-BILDGEBUNG	11
1.4.1 GRUNDLAGEN	11
1.4.2 SURFACE-ENHANCED (RESONANCE) RAMAN SPECTROSCOPY	13
1.4.3 BESONDERHEITEN DER SERRS	15
1.4.4 BIODISTRIBUTION UND AUFNAHME VON NANOPARTIKELN IN TUMOREN	15
1.4.5 ANWENDUNG DER SE(R)RS	19
1.5 ZELLOBERFLÄCHENMARKER UND INTRATUMORALE HETEROGENITÄT	19
1.5.1 EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR	20
1.5.2 HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR 2	21
2 ZIELSETZUNG	23
3 MATERIALIEN UND METHODEN	25
3.1 MATERIALIEN	25
3.2 SYNTHESE DER SERRS-NANOPARTIKEL	25
3.3 FUNKTIONALISIERUNG DER SERRS-NANOPARTIKEL MIT CETUXIMAB UND TRASTUZUMAB	25
3.4 CHARAKTERISIERUNG DER SERRS-NANOPARTIKEL	26
3.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	27
3.6 TIERMODELLE	27
3.7 MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE	29
3.8 RAMAN-BILDGEBUNG UND QUANTIFIZIERUNG DES RAMAN-SIGNALS	30
3.9 HISTOLOGIE	31

4	ERGEBNISSE	33
4.1	SYNTHESE VON MIT ANTIKÖRPERN FUNKTIONALISIERTEN SERRS-NANOPARTIKELN ..	33
4.2	ANALYSE DES EXPRESSIONSNIVEAUS DES TUMORMARKERS EGFR MITTELS CETUXIMAB-SERRS-NANOPARTIKELN IN PERIPHEREN TUMOREN	38
4.3	ANALYSE DES EXPRESSIONSNIVEAUS DES TUMORMARKERS HER2 MITTELS TRASTUZUMAB-SERRS-NANOPARTIKELN IN PERIPHEREN TUMOREN	41
4.4	ANALYSE DES EXPRESSIONSNIVEAUS DES TUMORMARKERS EGFR MITTELS CETUXIMAB-SERRS-NANOPARTIKELN IN INTRAZEREBRALEN TUMOREN	45
4.5	ANALYSE DES EXPRESSIONSNIVEAUS DES TUMORMARKERS HER2 MITTELS TRASTUZUMAB-SERRS-NANOPARTIKELN IN PERIPHEREN TUMOREN	47
4.6	NACHWEIS DES TUMORMARKERS HER2 MITTELS TRASTUZUMAB-SERRS- NANOPARTIKELN IN VIVO.....	50
4.7	ANALYSE DES EXPRESSIONSNIVEAUS DES TUMORMARKERS EGFR UND NACHWEIS DER INTRATUMORALEN HETEROGENITÄT MITTELS CETUXIMAB-SERRS- NANOPARTIKELN IN PERIPHEREN TUMOREN.....	52
4.8	ANALYSE DES EXPRESSIONSNIVEAUS DES TUMORMARKERS HER2 UND NACHWEIS DER INTRATUMORALEN HETEROGENITÄT MITTELS TRASTUZUMAB-SERRS- NANOPARTIKELN IN PERIPHEREN TUMOREN.....	54
4.9	ÜBERBLICK ÜBER DIE AUFNAHME VON ANTIKÖRPER-TRAGENDEN NANOPARTIKELN IN ABHÄNGIGKEIT VOM EGFR- UND HER2-EXPRESSIONSSTATUS UND VON DER LOKALISATION DER TUMOREN	56
4.10	ERGEBNISÜBERBLICK	58
5	DISKUSSION.....	59
5.1	VERGLEICH DER SERRS-NANOPARTIKEL-BILDGEBUNG MIT ANDEREN BILDGEBUNGSVERFAHREN	60
5.2	IMMUNHISTOCHEMIE	65
5.3	RAMAN-BILDGEBUNG	72
5.4	KRITISCHE BETRACHTUNG DES POTENZIALS VON GOLDNANOPARTIKELN IN DER PATIENTENVERSORGUNG	75
5.4.1	DER EPR-EFFEKT.....	75

5.4.2	RELEVANZ DER QUANTIFIZIERUNG VON ZELLOBERFLÄCHENMARKERN UND DER INTRATUMORALEN HETEROGENITÄT	77
5.4.3	TOXIZITÄT	79
5.4.4	RAMAN-SCANNER	82
5.5	LIMITATIONEN BISHERIGER STUDIEN UND ERFORDERLICHE SCHWERPUNKTE FÜR ZUKÜNFTIGE ARBEITEN	83
5.6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	86
6	ZUSAMMENFASSUNG	89
7	LITERATURVERZEICHNIS	90
8	ANHANG	106
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	106
8.2	TABELLENVERZEICHNIS	109
8.3	DANKSAGUNG	110
8.4	LEBENS LAUF	111
8.5	VERÖFFENTLICHUNGEN.....	115
8.6	EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG	117

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CT	Computertomographie
cts/s	Signale pro Sekunde (engl. counts per second)
CEUS	Kontrastmittel-verstärkter Ultraschall (engl. contrast-enhanced ultrasound)
DFHCC	Dana-Farber/Harvard Cancer Center
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPR	passive Anreicherung (engl. enhanced permeability and retention)
GBM	Glioblastoma multiforme
GNP	Gold-Nanopartikel
H&E	Hämatoxylin und Eosin
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
ICR	Institut für Krebsforschung (engl. Institute for Cancer Research)
IHC	Immunhistochemie
i. v.	intravenös
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
NP	Nanopartikel
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. Phosphate-Buffered Saline)
PEG	Polyethylen-Glykol
PET	Positronen-Emissionstomographie

scid	schwere kombinierte Immunschwäche (engl. severe combined immunodeficiency)
SERRS	Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy
SERS	Surface-Enhanced Raman Spectroscopy
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (engl. single photon emission computed tomography)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
US	Ultraschall

1 EINLEITUNG

1.1 Hintergrund und Motivation der vorliegenden Arbeit

Die Behandlung von Tumorerkrankungen gehört derzeit zu den größten medizinischen Herausforderungen. Im Jahr 2020 erkrankten weltweit 19,3 Millionen Menschen an Krebs, 10 Millionen starben an dessen Folgen. Bis zum Jahr 2040 prognostiziert die Internationale Agentur für Krebsforschung einen Anstieg der Fallzahlen um 47 % [1]. Diese Statistiken unterstreichen die Bedeutung der Weiterentwicklung der Prävention, der Diagnostik, der Therapie und der Nachsorge von Tumorerkrankungen. Die vorliegende Arbeit widmet sich primär der Optimierung der Diagnostik, besitzt möglicherweise aber auch das Potenzial, die Langzeitnachsorge für Patienten zu verbessern. Traditionell erfolgen die Diagnose und die Stadieneinteilung onkologischer Erkrankungen mit Hilfe verschiedener Bildgebungsverfahren (z. B. Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Positronen-Emissionstomographie (PET)) oder mit Hilfe von Biopsien. Die in Bildgebungsverfahren sichtbaren morphologischen Veränderungen treten erst nach Veränderungen auf zellulärer Ebene auf, die nur über eine invasive Biopsie detektiert werden können.

Zur Verbesserung der diagnostischen Aussagekraft von Bildgebungsverfahren hat in den vergangenen beiden Dekaden die Forschung im Bereich der molekularen Bildgebung an Bedeutung gewonnen [2]. Die molekulare Bildgebung charakterisiert Strukturen auf zellulärer und molekularer Ebene. Sie erfasst somit ursächliche oder treibende Komponenten – statt deren Ergebnis [3]. Ließen sich diese nicht- oder minimal-invasiven Methoden in der Klinik etablieren, wären eine frühere Detektion, ein umfassendes Staging, optimierte Therapieentscheidungen sowie ein verbessertes Monitoring von malignen Tumoren möglich.

Die Erfassung eines Tumors und seiner Heterogenität ist im Rahmen der Diagnose und der Verlaufsbeobachtung essenziell. In diesem Kontext spielen prädiktive und prognostische Aussagen, basierend auf spezifischen Zelloberflächenmarkern, sowie die Erfassung von Änderungen bzw. Resistenzen im longitudinalen Verlauf aufgrund des Selektionsdrucks durch die zunehmend individualisierten Krebstherapien eine Rolle. Ideal wäre eine nicht- oder minimal-invasive Methode mit hoher Sensitivität und Spezifität, die die Erfassung des gesamten Tumors in seiner Heterogenität, inklusive therapierelevanter Zelloberflächenmarker (z. B. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)), ermöglicht. Die in der

Klinik derzeit verwendeten Bildgebungsverfahren, wie CT, MRT, PET und Ultraschall (US) [4, 5], sowie weitere diagnostische Methoden, wie die Immunhistochemie (IHC) [6, 7], besitzen jedoch nicht alle Charakteristika einer idealen Methode, sodass ein molekulares Bildgebungsverfahren eine wertvolle Ergänzung darstellen könnte.

1.2 Bildgebungsverfahren

Die CT fertigt mittels Röntgenstrahlung Schnittbilder an. Die Dichte und die Zusammensetzung der Gewebe werden mittels Hounsfield-Einheiten (engl. hounsfield units (HU)) angegeben. Aufgrund des geringen Weichgewebekontrasts werden häufig auf Iod basierende Kontrastmittel eingesetzt. Vorteile der CT sind der geringe Zeitbedarf, die unbegrenzte Eindringtiefe und ein Auflösungsvermögen von circa 1 mm [8]. Zwei wesentliche Nachteile der CT sind die Strahlenbelastung sowie das Risiko eines Nierenversagens durch die Kontrastmittelgabe bei Patienten mit einer reduzierten glomerulären Filtrationsrate. Die konventionelle CT liefert anatomische Daten, allerdings keine Informationen zur dargestellten Materie. Damit erlaubt die CT keine Aussagen zur Benignität oder Malignität eines Tumors oder zu molekularen Strukturen.

Die MRT stellt eine magnetische Bildgebungsmethode dar und erfasst „Weichteile“, wie das Gehirn, das Rückenmark, Muskeln, Bänder sowie Sehnen, deutlich besser als die CT. Ein zusätzlicher Vorteil gegenüber der CT besteht darin, dass sie keine ionisierende Strahlung emittiert. Weitere Stärken der MRT sind die nicht limitierte Eindringtiefe und die hohe räumliche Auflösung von circa 1 mm. Ein wesentlicher Nachteil ist das erforderliche starke Magnetfeld, wodurch die MRT bei Personen mit Implantaten (z. B. Herzschrittmacher, Insulinpumpen) z. T. kontraindiziert ist [8]. Die klinisch verwendeten, auf Gadolinium basierenden Kontrastmittel können ein Risiko darstellen, wobei vor allem die nephrogene systemische Fibrose gefürchtet wird [9]. Überdies besitzen die MRT und die CT eine geringe Sensitivität, sodass hohe Mengen von Kontrastmittel erforderlich sind (circa 10^{-5} – 10^{-3} M). Weitere Nachteile der MRT sind die im Vergleich zur CT längere Aufnahmedauer sowie die höheren Kosten. Wie die CT liefert die MRT primär anatomische Daten, die keine definitiven Aussagen zur Malignität, zur Benignität, zu molekularen Strukturen oder zur intratumoralen Heterogenität von Zelloberflächenmarkern erlauben [8, 10].

Allerdings gibt es auch neuere funktionelle MRT- und CT-Verfahren, die weitergehende Informationen, z. B. zur Tumolvaskularisation (MR/CT-Perfusion) oder zur Zelldichte (Diffusions-MRT/MR-Spektroskopie), liefern können.

Die PET basiert auf der Messung nuklearer Strahlung. Vorteilhaft ist – wie bei der CT und der MRT – die beim menschlichen Körper unlimitierte Eindringtiefe. Wesentliche Vorteile gegenüber der CT und der MRT sind eine deutlich erhöhte Sensitivität sowie die Möglichkeit einer quantitativen Betrachtung des gemessenen Signals. Generelle Nachteile der PET umfassen die Strahlenbelastung durch Verwendung radioaktiver Substanzen, die aufwändige Herstellung dieser Substanzen mit einem Zyklotron und die hohen Kosten (Herstellung der radioaktiven Substanzen, Kauf der Instrumente, bauliche Anforderungen an die Gebäude). Ein weiterer Nachteil ist die im Vergleich zur CT und zur MRT geringere räumliche Auflösung von 5–10 mm [8].

Die Bildgebung mittels US basiert auf hochfrequenten US-Wellen (meist 1–20 Hertz (Hz)). Die Hauptvorteile des US sind die Geschwindigkeit der Bildgebung (innerhalb von Sekunden), das Fehlen einer Strahlenbelastung sowie die geringen Kosten. Das Auflösungsvermögen der Methode liegt je nach gewählter Frequenz bei 0,15–3 mm [11]. Allerdings weist der US eine im Vergleich zu CT, MRT und PET reduzierte Eindringtiefe auf, die jedoch durch Reduktion der verwendeten Frequenz (auf Kosten der Auflösung) verbessert werden kann. Eine hohe Auflösung gelingt durch eine Erhöhung der Frequenz bei Reduktion der Eindringtiefe. Der US stellt nur Weichteile und keine Knochen oder Strukturen, die von Luft umgeben sind, dar, weil diese Elemente keine oder kaum US-Wellen übertragen. Somit liefert auch der US primär anatomische Daten. Die Methode weist eine hohe Abhängigkeit von der Expertise des Durchführenden und des Befunders auf [8]. Die Sensitivität des US kann durch den Einsatz von US-geeignetem Kontrastmittel gesteigert werden (kontrastmittel-verstärkter Ultraschall, engl. contrast-enhanced ultrasound (CEUS)). Die verwendeten Mikrobläschen (engl. microbubbles) können mit Antikörpern funktionalisiert werden [8].

Abbildung 1 bietet eine Übersicht über das räumliche Auflösungsvermögen (*Abbildung 1a*) und die Sensitivität der Kontrastmittel (*Abbildung 1b*) der verschiedenen diagnostischen Methoden.

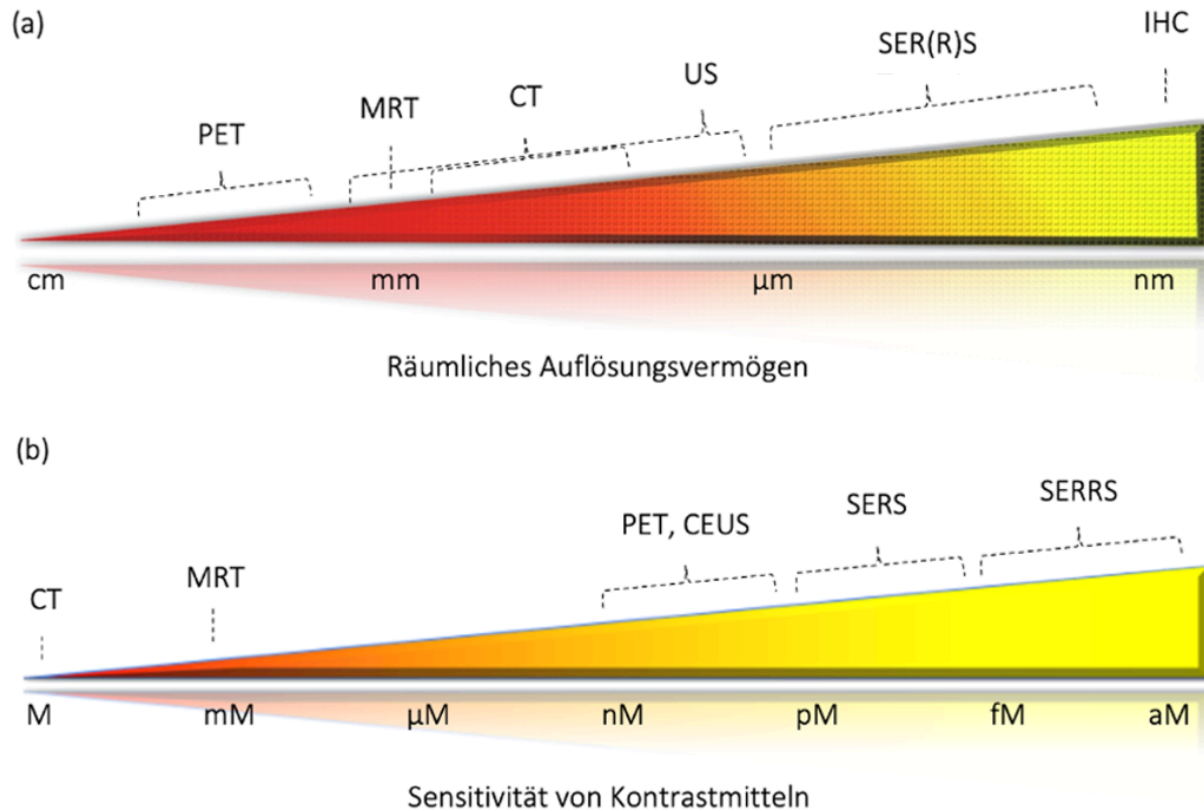


Abbildung 1: Räumliches Auflösungsvermögen verschiedener Bildgebungsverfahren und Sensitivität ihrer Kontrastmittel

(a) Räumliches Auflösungsvermögen: Positronen-Emissionstomographie (PET, 5–7 mm), Magnetresonanztomographie (MRT, 1 mm), Computertomographie (CT, 0,5–1 mm), Ultraschall (US, 0,15–3 mm), Surface-Enhanced (Resonance) Raman Spectroscopy (SER(R)S, $\leq 100 \mu\text{m}$), Immunhistochemie (IHC, im nm-Bereich). Das Auflösungsvermögen hängt beim US von der Frequenz ab. Das Auflösungsvermögen der SER(R)S ist von der gewählten Schrittgröße des Lasers abhängig, die in der vorliegenden Arbeit auf 50–100 μm festgelegt wurde. (b) Sensitivität nach Kontrastmittel-Applikation: CT (M), MRT (mM), PET (pM), Kontrastmittel-verstärkter Ultraschall (CEUS) (pM), SER(R)S (pM-aM). (Eigene Abbildung)

1.3 Immunhistochemie

Seit ihrer Einführung in den frühen 1940er Jahren durch Albert Coons [12] hat sich die IHC in der Forschung und der klinischen histologischen Diagnostik etabliert. Zu den zentralen Anwendungsfeldern der IHC gehört die Detektion von Zell- und Gewebeatantigenen. Die Ergebnisse bilden die Grundlage für prädiktive [13-19] sowie prognostische [18, 20-22] Aussagen bei verschiedenen Tumoren [23-26] und beeinflussen die Wahl des Therapieregimes entscheidend [27-30].

Trotz ihrer fundamentalen Bedeutung in der medizinischen Diagnostik weist die IHC auch Nachteile auf. Für die histologische Evaluation muss das Gewebe mittels Biopsie gewonnen werden.

Dieses invasive Verfahren ist insbesondere bei Gehirntumoren mit relevanten Risiken verbunden [31, 32]. Wiederholungen von Biopsien sollten daher möglichst vermieden werden, obwohl eine longitudinale Beobachtung wegen potenzieller Veränderungen des Tumorgewebes aufgrund des Selektionsdrucks durch Chemo- und Strahlentherapien für eine Optimierung der Therapie wichtig wäre [33-35]. Ein weiterer Nachteil von Biopsien ist, dass lediglich ein Teil des Tumors erfasst wird, der potenziell nicht repräsentativ für den gesamten Tumor ist [6, 7, 36-39], was zu prognostischen und therapeutischen Fehlern führen kann. Bei einer histologischen Evaluation wird ein signifikanter Anteil der Glioblastoma multiforme (GBM) in ihrem Grad unterschätzt [7]; bei Brustkrebspatienten ist die HER2-Expression oft nicht eindeutig bestimmbar [37]. Des Weiteren hängt die Qualität der Befundung von der Expertise des IHC-Durchführenden und des Pathologen ab [39-46]. Darüber hinaus ist die IHC primär eine qualitative Methode, wodurch die Interpretation erschwert wird, ob ein negatives oder ein positives Ergebnis vorliegt [43, 46, 47]. Zahlreiche Innovationen zielen darauf ab, die Unabhängigkeit von den Befundenden zu erhöhen sowie eine Quantifizierung zu ermöglichen (Ermittlung der Anteile von immunpositiven Zellen an der Gesamtzahl der Zellen, Verwendung eines semiquantitativen Punktesystems [45], Immunfluoreszenz [48]). Nachteilig bleiben jedoch die invasive Gewinnung der Gewebeprobe sowie die Erfassung nur eines Ausschnitts des gesamten Tumors. Zu den Nachteilen der weit verbreiteten Immunfluoreszenz gehören die Photobleichung, die Autofluoreszenz von Gewebe [49, 50] sowie spektrale Überlappungen bei der Verwendung mehrerer Fluorophore [48].

1.4 Raman-Nanopartikel-Bildgebung

1.4.1 Grundlagen

Die Raman-Nanopartikel(NP)-Bildgebung basiert auf der unelastischen Streuung, die entsteht, wenn ein Laser auf ein Molekül trifft. Diese Streuung wurde erstmals 1923 von Adolf Smekal beschrieben [51] und 1928 von Chandrasekhara Venkata Raman nachgewiesen [52], wofür er 1930 den Nobelpreis in Physik erhielt. *Abbildung 2* stellt das Prinzip der oberflächenverstärkten Raman-Bildgebung dar.

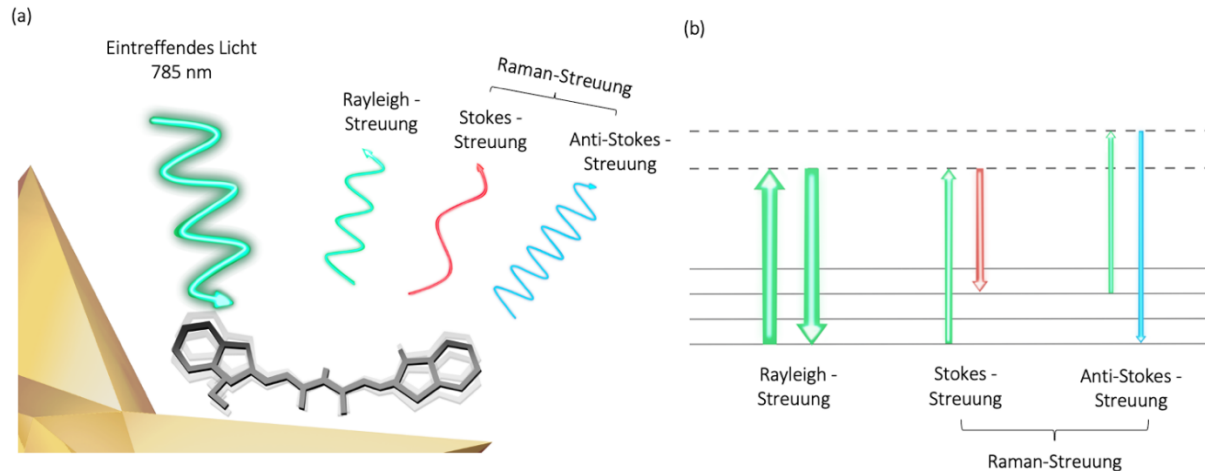


Abbildung 2: Prinzip der oberflächenverstärkten Raman-Bildgebung

(a) Emittiertes Licht setzt sich nach der Streuung durch ein Molekül aus der Rayleigh- und der Raman-Streuung zusammen, wobei die Raman-Streuung aus Stokes- und Anti-Stokes-Streuung besteht. (b) Illustration der Energieniveaus der Photonen der Rayleigh- und der verschiedenen Formen der Raman-Streuung. *Modifiziert nach: C. Andreou, S. A. Kishore, and M. F. Kircher, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A New Modality for Cancer Imaging," J Nucl Med, vol. 56, no. 9, pp. 1295–1299, Sep, 2015.*

Ein von einem Laser angeregtes Molekül beginnt zu schwingen und streut das Licht des Lasers in unterschiedlichen Frequenzen zurück (*Abbildung 2a*). Die meisten Photonen werden in Form des elastischen Rayleigh-Effekts gestreut, wobei sich weder die Energie noch die Frequenz oder die Wellenlänge der emittierten Photonen verändert. Da keine Energie auf das Molekül übertragen wird und sich damit das emittierte Signal nicht ändert, erlaubt die Rayleigh-Streuung keine Aussagen zum Molekül. Circa eines von 10 Millionen Photonen erfährt eine Änderung in seiner Frequenz und folglich seiner Wellenlänge. Diese Effekte resultieren aus der Interaktion mit dem untersuchten Molekül und werden als Raman-Streuung bezeichnet. Damit lassen sich aus letzterer Charakteristika des Moleküls ableiten. Die Raman-Streuung besteht meist aus Licht niedrigerer Energie (Stokes-Streuung), da ein Teil der Energie im Molekül verbleibt und dort das Energieniveau ansteigen lässt. Aufgrund der verlängerten Wellenlänge der Photonen ergibt sich eine Rotverschiebung. Ein Anteil des Lichts erfährt jedoch eine Transition zu einer höheren Frequenz, bedingt durch einen Energieverlust des vom Licht getroffenen Moleküls (Anti-Stokes-Streuung) (*Abbildung 2b*) [53].

Die Veränderung der Frequenz bzw. Wellenlänge kann in Form eines Graphen visualisiert werden. In einem solchen Raman-Spektrum wird die Wellenlängenveränderung auf der x-Achse aufgetragen, die Signalintensität auf der y-Achse. Die Wellenlängenveränderung auf der x-Achse wird als Raman-Verschiebung (cm^{-1}) bezeichnet (engl. Raman shift). Die Signalintensität wird als die vom

Raman-Spektroskop detektierten Signale pro Sekunde (engl. counts per second (cts/s)) aufgetragen. Moleküle mit unterschiedlichen Strukturen verändern die Wellenlänge spezifisch, wodurch sie ein individuelles Raman-Signal erzeugen.

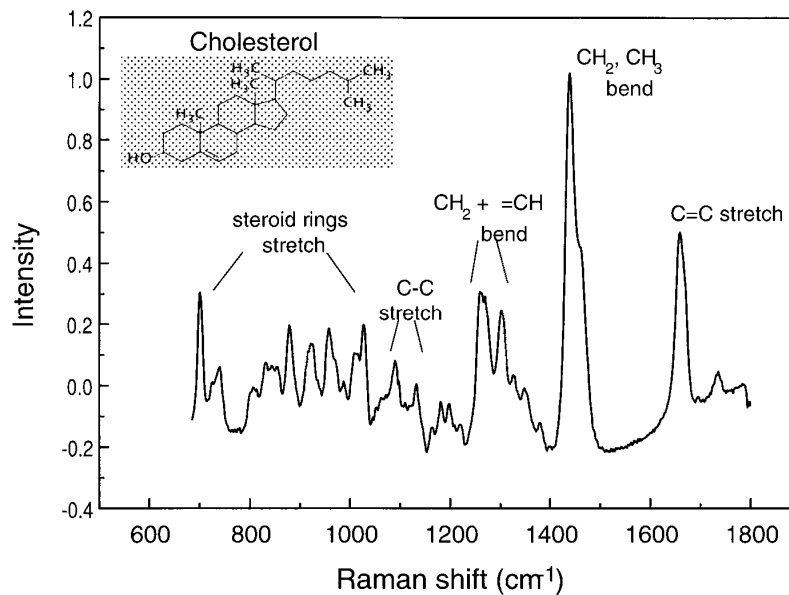


Abbildung 3: Raman-Signal des Moleküls Cholesterol

Die molekulare Struktur von Cholesterol erzeugt ein individuelles Raman-Signal. Übersetzungen: Intensity (Intensität); Raman shift (Raman-Verschiebung). Reproduziert mit der Genehmigung von IOP Publishing 2022. © Institute of Physics and Engineering in Medicine. Alle Rechte sind vorbehalten. Aus: E. B. Hanlon, R. Manoharan, T. W. Koo, K. E. Shafer, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Prospects for in vivo Raman spectroscopy," *Phys Med Biol*, vol. 45, no. 2, pp. R1-R59, Feb, 2000.

Da die Änderungen in der Wellenlänge von dem untersuchten Molekül abhängen, ist das Raman-Spektrum hochspezifisch und wird in der Literatur auch als Raman-„Fingerabdruck“ bezeichnet. Als Beispiel dient hier das Spektrum des Moleküls Cholesterol (Abbildung 3) [54-56].

1.4.2 Surface-Enhanced (Resonance) Raman Spectroscopy

Da eine Frequenzänderung nur bei einem von 10 Millionen Photonen eintritt, wurden zahlreiche Versuche zur Signalverstärkung unternommen. Zunächst wurde die Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) entwickelt, aus der die Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy (SERRS) hervorgegangen ist.

Das 1974 von Fleischmann et al. erstmals beschriebene Prinzip der SERS [57] beinhaltet ein Edelmetall (z. B. Gold, Silber) als Resonanzkörper für das das Edelmetall umgebende Molekül. Trifft der Strahl eines Lasers auf diese Verbindung, wird das auf der Frequenzänderung basierende Signal verstärkt. Von den postulierten möglichen Mechanismen für diese Verstärkung ist die Oberflächenplasmonenresonanz der verbreitetste Mechanismus. Bei der Oberflächenplasmonenresonanz entsteht das Signal durch die Interaktion von Oberflächenplasmonen auf metallenen Nanostrukturen mit Raman-aktiven Molekülen, die durch das eintreffende Licht generiert werden. Das Licht des Laserstrahls erregt die Oberflächenplasmonen und führt zu einer kollektiven Oszillation der Elektronen im Metall mit dem umgebenden Molekül sowie damit zu einer Signalerhöhung um mehrere Größenordnungen (10^5 – 10^{10}) gegenüber der ursprünglichen Raman-Methode ohne Metall [58]. Des Weiteren wird eine Ladungstransfer-Resonanz diskutiert, bei der ein Elektronentransfer zwischen Molekül und Edelmetall stattfindet, der in beide Richtungen möglich ist. Als dritter möglicher Vorgang steigert der Resonanzeffekt zwischen Licht und Molekül die Raman-Intensität. Das vermutete Zusammenspiel der drei Mechanismen hängt von den verwendeten Materialien und Laserfrequenzen ab [59].

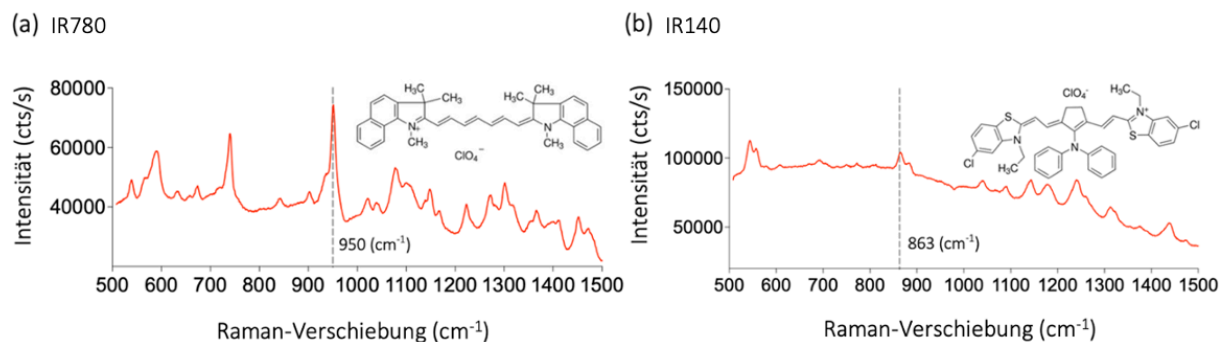


Abbildung 4: Raman-Signal der Moleküle IR780 und IR140

Die Moleküle (a) IR780 und (b) IR140 sind zwei verbreitete „Raman-Reporter“. Ihre charakteristische Molekülstruktur bedingt ihr individuelles Raman-Signal. (a) IR780 zeigt einen charakteristischen Intensitätspeak bei 950–960 cm^{-1} . (b) IR140 zeigt einen seiner charakteristischen Intensitätspeaks bei 863–893 cm^{-1} . (Eigene Abbildung)

Die verwendeten Moleküle verleihen den Edelmetall-NP einen individuellen „Fingerabdruck“ und werden als „Raman-Reporter“ bezeichnet (Abbildung 4) [60, 61]. Eine weitere Signalverstärkung (10^{13} – 10^{15}) wird dadurch erzielt, dass die Wellenlänge des Lasers mit dem Absorptionsmaximum des verwendeten Edelmetalls und des Moleküls übereinstimmt [62]. Bei dem als SERRS bezeichneten Verfahren besteht im Laser-Edelmetall-Molekül-System eine gemeinsame Resonanz [59].

1.4.3 Besonderheiten der SERRS

Neben der hohen Spezifität und der Sensitivität bis in den attomolaren Bereich [63] zeichnet sich die SERRS durch das Fehlen einer Photobleichung und einer Autofluoreszenz aus, die gewichtige Nachteile bei der Fluoreszenzbildgebung darstellen [55]. Des Weiteren besteht eine hohe Signalstabilität selbst bei konstanter Laserexposition [64]. Antikörper und andere Liganden können über Thiol-Maleimid-Verbindungen an Sulfhydryl-Modifikationen der SERRS-NP gekoppelt werden. Damit lassen sich SERRS-NP je nach Fragestellung funktionalisieren [65]. Intravenös (i. v.) injizierte Antikörper-tragende SERRS-NP können mittels Raman-Bildgebung den gesamten Tumor minimal-invasiv visualisieren und eine differenzielle Verteilung der Zelloberflächenmarker innerhalb des Tumors darstellen [66]. Des Weiteren finden auch topische, endoskopische und intraperitoneale Applikationsformen Anwendung [67-69]. SERRS-NP bestehen primär aus Gold und Silika, die als inerte Materialien keine signifikante Toxizität aufweisen [70-72].

1.4.4 Biodistribution und Aufnahme von Nanopartikeln in Tumoren

Toxizitätsstudien ergaben, dass in gesunden Mäusen systemisch applizierte NP primär vom retikuloendothelialen System aufgenommen werden, wobei als Zellen vor allem Makrophagen und als Organe die Milz sowie die Leber eine Rolle spielen (*Abbildung 5*) [70, 73, 74].

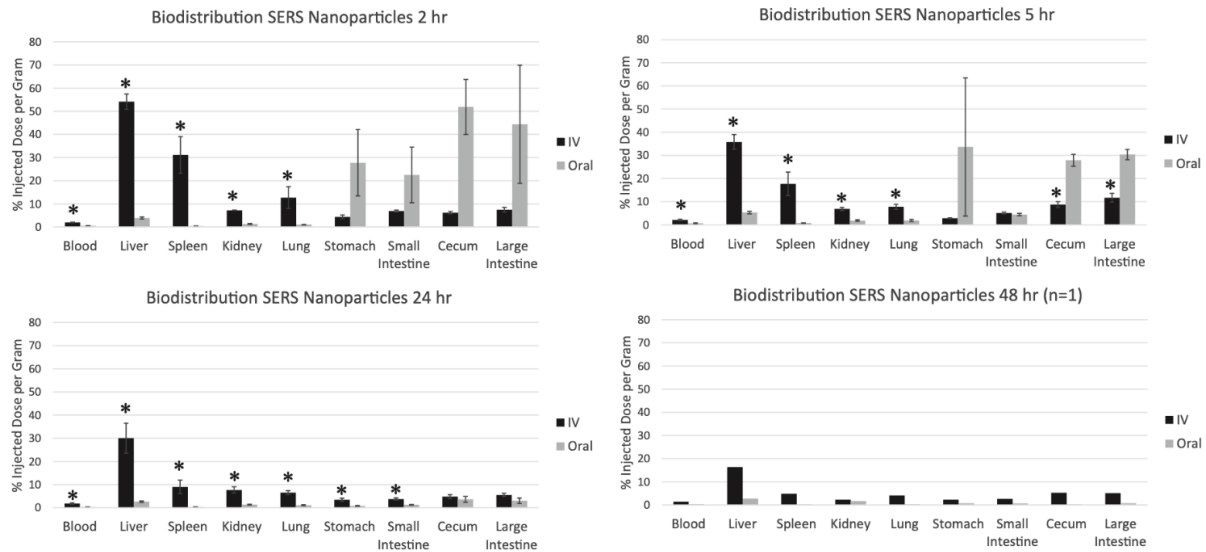


Abbildung 5: Biodistribution von ^{64}Cu -markierten Raman-Nanopartikeln nach IV vs oraler Verabreichung

Die Akkumulation der NP (% injizierte Dosis pro Gramm) in verschiedene Organe war zwischen der IV und der oralen Gruppe signifikant verschieden. Mäuse, die eine IV Injektion von NP erhielten, zeigten eine signifikant höhere Akkumulation ($*p < 0,03$) besonders in Organen, die an der systemischen Entfernung von NP beteiligt sind (z. B. Leber, Milz). Übersetzungen: Blood (Blut); Liver (Leber); Spleen (Milz); Kidney (Niere); Lung (Lunge); Stomach (Magen); Small Intestine (Dünndarm); Cecum (Zäkum); Large Intestine (Dickdarm). *Reproduziert mit der Genehmigung von Elsevier im Jahre 2022. Alle Rechte sind vorbehalten. Aus: J. L. Campbell, E. D. SoRelle, O. Ilovich, O. Liba, M. L. James, Z. Qiu, V. Perez, C. T. Chan, A. de la Zerda, and C. Zavaleta, "Multimodal assessment of SERS nanoparticle biodistribution post ingestion reveals new potential for clinical translation of Raman imaging," Biomaterials, vol. 135, pp. 42-52, Aug, 2017.*

Das Phänomen der passiven Anreicherung von NP (engl. enhanced permeability and retention (EPR)) wurde 1986 erstmals von Maeda et al. beschrieben (Abbildung 6) [75, 76]. Bei diesem Effekt kommt es aufgrund des hyperpermeablen Zustands von Tumorgefäßen über die vergrößerten endothelialen Poren (bis zu 1000 nm) zu einer passiven Anreicherung größerer Partikel. Das Fehlen funktionell intakter Lymphgefäße innerhalb von Tumoren verstärkt den Effekt. Diverse Studien belegen, dass die Anreicherung von NP in Tumoren über eine Funktionalisierung mit Antikörpern oder mit anderen, für einen überexprimierten Zelloberflächenmarker spezifischen Komponenten gesteigert werden kann [67, 69, 77-80]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass NP die Fähigkeit besitzen, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [81].

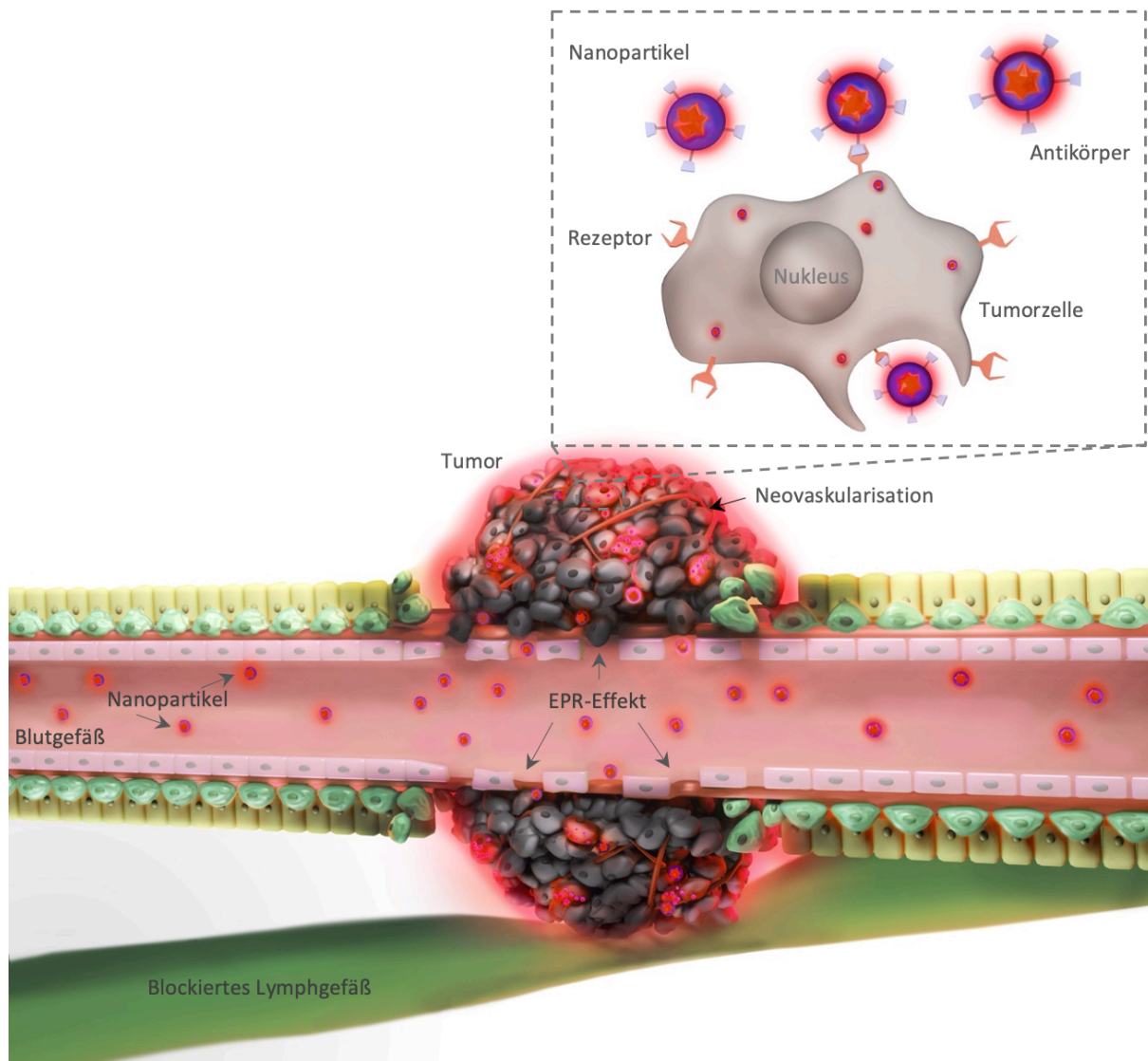
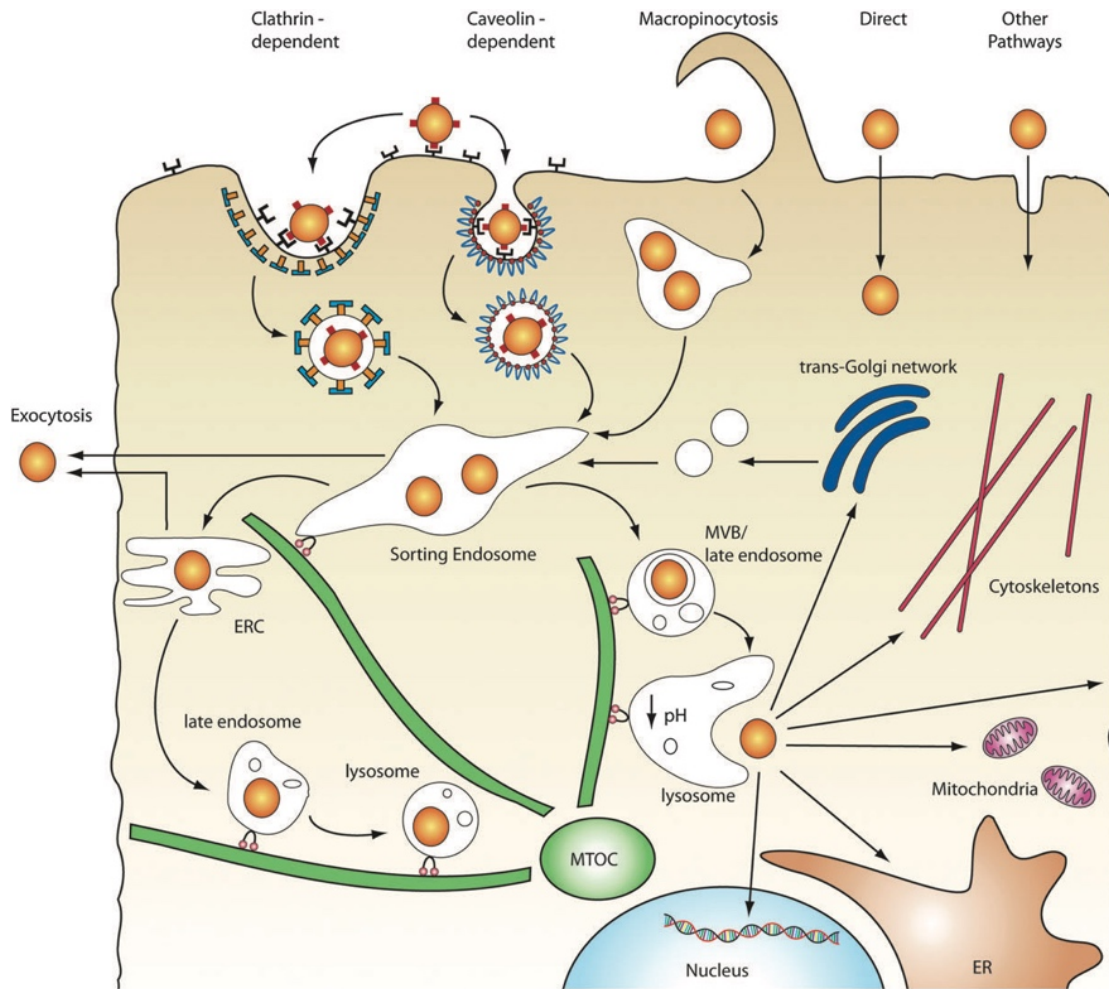


Abbildung 6: Aufnahme von Nanopartikeln (NP) in einen Tumor mittels Enhanced-Permeability-and-Retention(EPR)-Effekt und durch spezifische Funktionalisierung von NP

Über den EPR-Effekt sammeln sich NP unabhängig von einer spezifischen Funktionalisierung in Tumoren an. Eine Funktionalisierung der NP mit einem für einen Zelloberflächenmarker spezifischen Antikörper erhöht die Aufnahme. Die in Tumoren häufig vorkommende Unterentwicklung oder Blockade der Lymphwege unterstützt die Ansammlung von NP. (Eigene Abbildung)

Aufnahmen mit dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zeigen, dass sich NP in der Zelle vorrangig in Organellen wie Endo- und Lysosomen befinden [82]. Makrophagen nehmen NP über Phagozytose auf. Bei einer Antikörper-Rezeptor-Interaktion kommt es in der Regel zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose (Abbildung 7) [83].



Abbreviations: ERC, endocytic recycling compartment; ER, endoplasmic reticulum; MTOC, microtubule-organizing centre; MVB, multivesicular bodies;

Abbildung 7: Intrazellulärer Transport von Nanopartikeln (NP)

Nach der Aufnahme über verschiedene endozytotische Mechanismen werden NP über Vesikel, Motorproteine und das Zytoskelett im endolysosomalen Netzwerk transportiert. Endosomen können über Fusion mit der Plasmamembran ihren Inhalt wieder an den Extrazellulärraum abgeben (Exozytose). Alternativ können Endosomen zu Lysosomen reifen, in denen der Vesikelinhalt abgebaut wird. Um zytoplasmatische oder nukleäre Zielstrukturen zu erreichen, müssen NP dem endolysosomalen Netzwerk entkommen und das Zytoplasma durchqueren. Abkürzungen: ERC (Endozytotisches Recycling Kompartiment); ER (Endoplasmatisches Retikulum); MTOC (Mikrotubuli-organisierendes Zentrum); MVB (Multivesikel Körper). *Reproduziert mit der Genehmigung von ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, ETC. durch Copyright Clearance Center, Inc. im Jahre 2022. Alle Rechte sind vorbehalten. Aus: L. Y. Chou, K. Ming, and W. C. Chan, "Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles," Chem Soc Rev, vol. 40, no. 1, pp. 233-245, Jan, 2011.*

1.4.5 Anwendung der SE(R)RS

Im Jahr 2006 veröffentlichten Kim et al. eine Arbeit zur Darstellung von Tumorzellen mit SERS-NP und Antikörper-tragenden SERS-NP [84]. Im Jahr 2010 nutzten Mohs et al. erstmals ein handgehaltenes Raman-Gerät für eine prä- und intraoperative Detektion von Tumoren und verbleibenden Tumorzellen nach der Entfernung des sichtbaren Tumors [85]. Liu et al. entwickelten die SERS-Bildgebung 2013 weiter, indem sie multimodale SERS-NP generierten, die neben der Raman-Bildgebung auch zur Bildgebung mittels CT, MRT und Multiphotonenmikroskopie sowie zur photothermalen Therapie verwendet werden konnten [86].

Die Signalintensität der SER(R)S-NP schwächt sich bei subkutaner und intramuskulärer Applikation um ein bis zwei Größenordnungen ab [82]. Die Eindringtiefe liegt bei der SER(R)S-basierten Bildgebung nach i. v. Applikation in einem Bereich von mehreren Millimetern [8, 65]. Die hohe Auflösung der SERRS-Bildgebung erlaubt die Darstellung von isolierten Zellgruppen mit weniger als fünf Zellen [79].

In präklinischen Studien zeigen SERS und SERRS vielversprechende Fortschritte in der Detektion chemischer Komponenten. Der Hauptanwendungsbereich ist die Onkologie. SER(R)S-NP werden aber auch zur Untersuchung infektiöser Erkrankungen, beispielsweise für Analysen des C-reaktiven Proteins (CRP), eingesetzt [58, 59, 87-93]. In den vergangenen fünf Jahren lag der Fokus auf Studien zur Exploration der sensitiveren SERRS-NP in diversen Bereichen der Onkologie (z. B. Gehirn-, Brust-, Leber-, Kolorektal- und Ovarialkrebs, Lungen- bzw. Lymphknotenmetastasen). Zunehmend werden auch SERRS-NP entwickelt, die eine multimodale Anwendung (etwa zusätzliche PET-Bildgebung) erlauben [55, 68, 69, 79, 80, 94-97].

1.5 Zelloberflächenmarker und intratumorale Heterogenität

Zelloberflächenmarker sind bei verschiedenen Tumoren von prädiktiver [13-19] und prognostischer [18, 20-22] Bedeutung [23-26]. Sie haben häufig einen entscheidenden Einfluss auf die Auswahl des Therapieregimes, da sie als Angriffspunkt für Therapeutika dienen [27-30]. Bei den meisten Tumoren variiert die Zelloberflächenmarker-Verteilung [98-103] von Patient zu Patient (intertumorale Heterogenität), aber auch innerhalb eines Patienten (intratumorale Heterogenität). Diese Heterogenität ist für das Therapieansprechen und das progressionsfreie Überleben sowie das

Gesamtüberleben zentral [23, 26, 98-100, 104-106]. Die intratumorale Heterogenität und die sich verändernde Zelloberflächenmarker-Expression gelten als Ursache für die hohe Therapieresistenz- und Rückfallrate bei GBM sowie Brustkrebs [33, 101, 103]. Die Tumorerheterogenität ist ein zentrales Charakteristikum von GBM [33, 98, 104, 106, 107], lässt sich jedoch mit der CT, der MRT oder der PET nicht erfassen. Bei einer Brustkrebserkrankung stellt die Überexpression des Zelloberflächenrezeptors HER2 die häufigste Ursache für Gehirnmastasen dar und gilt als Hauptrisikofaktor für ein reduziertes gehirnmastasenfreies Überleben [108, 109] und Gesamtüberleben [109, 110]. Auch die in den 1990er Jahren entdeckte Heterointeraktion von zwei verschiedenen Rezeptoren – vor allem von EGFR und HER2 – wird als weiterer relevanter Faktor für das Scheitern von Therapien diskutiert [111-114]. Neu entdeckte molekulare Angriffspunkte in Tumoren erlauben eine zunehmend personalisierte Therapie. Allerdings kann der durch eine Chemo- und Strahlentherapie verursachte selektive Druck die initiale Komposition eines Tumors in Bezug auf seine Zelloberflächenmarker so verändern, dass zunächst erfolgreiche Therapien letztlich ineffektiv werden [34, 35, 100, 115-117].

1.5.1 Epidermal Growth Factor Receptor

Die ErbB-Familie (Namensgeber ist ein avianes, virales Protoonkogen (erythroblastic leukemia viral oncogene) [118, 119]) umfasst im Menschen vier verwandte Rezeptor-Tyrosinkinase (EGFR/erbB1/HER1, erbB2/HER2/Neu, erbB3/HER3 und erbB4/HER4 der EGFR) [120]. Die Bindung des Liganden Epidermal Growth Factor (EGF) an den EGFR führt zu seiner Homo- oder Heterodimerisierung mit einem weiteren Rezeptor der ErbB-Familie, hauptsächlich jedoch mit HER2. Über die folgende Autophosphorylierung der intrazellulären Domänen der Rezeptoren werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert, die letztlich die Zellproliferation steigern, die Apoptose limitieren und die Metastasierung sowie die Neovaskularisation fördern [121].

Der EGF wurde 1962 von Stanley Cohen identifiziert [122]. Die Aufklärung des EGF-Wirkmechanismus beinhaltete 1978 die Entdeckung der Bindung an den EGFR sowie 1981 die Entdeckung der Autophosphorylierung [123] und der Tyrosinkinase-Aktivität [124]. Der EGFR war der erste Rezeptor, bei dem ein Zusammenhang zwischen Mutationen bzw. einer Überexpression und der Tumorentstehung erkannt wurde [125]. Eine erste Beschreibung von monoklonalen Antikörpern gegen EGFR, die das Tumorstadium hemmen, folgte 1983 [126, 127]. Im Jahr 1987

wurden Daten zur vermehrten Expression vom EGFR in GBM sowie Daten zu einer schlechteren Prognose bei einer solchen Expressionssteigerung bei Kopf- und Halstumoren sowie Ösophagus-, Ovarial-, Zervix- und Blasenkrebs veröffentlicht [128, 129]. In bis zu 60 % der GBM wird eine erhöhte EGFR-Expression aufgrund von Genamplifikationen beobachtet, die zu einem ungehemmten Zellwachstum führt [130]. Aufgrund seiner Korrelation zum Therapieansprechen und zur Überlebensrate hat sich der EGFR als klinischer Marker bei GBM sowie anderen Tumoren etabliert [105, 111, 130-135]. Auch die Entwicklung von EGFR-spezifischen Therapiemöglichkeiten wurde vorangetrieben [130, 136]. Daher ist die Erfassung des Zelloberflächenmarkers EGFR im klinischen Alltag elementar und sollte weiter optimiert werden.

1.5.2 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

Der Zelloberflächenmarker HER2, der wie der EGFR zur ErbB-Familie gehört [119, 120], wurde 1984 entdeckt [137]. Der transmembrane Glykoprotein-Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität stimuliert das Zellwachstum. Der HER2 ist der einzige Rezeptor der ErbB-Familie, der keinen bekannten Liganden besitzt. Er fungiert jedoch als Partner für die Heterodimerisierung mit anderen ErbB-Mitgliedern [138]. Der HER2 wurde in Tumoren verschiedener Organe (z. B. Lunge, Magen, Kolon, Rektum, Blase, Endometrium, Ovarien, Kopf-Hals-Bereich) gefunden [16, 18, 139, 140]. In 20–30 % der Mammakarzinome liegt eine HER2-Überexpression vor [141, 142]. Ein positiver HER2-Status ist mit einem erhöhten Risiko für Gehirnmetastasen und einem schlechteren Gesamtüberleben verbunden [108, 143]. Die Einführung von gegen HER2 gerichteten Therapien hat die Prognose von Patienten mit HER2-positivem Brust-, Gastroösophageal- und Magenkrebs deutlich verbessert. Die erste effektive, auf Antikörpern basierende Therapie erfolgte 1998 in den USA mit Trastuzumab [144]. Letzteres wurde von der Food and Drug Administration (FDA) durch ein beschleunigtes Verfahren (FDA Expedited Program) genehmigt [145]. Daraufhin wurde die Bestimmung des Zelloberflächenmarkers HER2 in die Richtlinien der American Society of Clinical Oncology aufgenommen [146]. Die European Medicine Agency (EMA) ließ Trastuzumab im Jahr 2000 zu. In den folgenden Jahren wurden weitere spezifische Therapien, wie Trastuzumab-Pertuzumab und Ado-Trastuzumab-Emtansin (T-DM1), entwickelt, die die Prognose auch bei Gehirnmetastasen verbessern [142, 147-151]. Folglich ist die Evaluation des HER2-Status für Patienten mit Brustkrebs von fundamentaler Bedeutung. Die exakte Bestimmung des HER2-Status

stellt jedoch im klinischen Alltag nach wie vor eine Herausforderung dar. Auf Biopsien basierende Befunde hängen von der Prozessierung des Gewebes [39, 41, 152], der Expertise des Pathologen [42, 43] und der Repräsentativität des entnommenen Gewebes für den Gesamttumor ab. Letzteres ist oft nicht gegeben, was zu nicht eindeutigen Ergebnissen führt [37, 38].

2 ZIELSETZUNG

Die Erfassung der intratumoralen Heterogenität von Zelloberflächenmarkern ist essenziell für die initiale Diagnose und – aufgrund potenzieller Veränderungen des Rezeptorstatus – auch für den Therapieverlauf. Daher sollte die Expression eines Zelloberflächenmarkers im gesamten Tumor möglichst minimal-invasiv, ohne Strahlenbelastung und mit maximalem Informationsgewinn erhoben werden.

Etablierte klinische Bildgebungsmodalitäten und die IHC erfüllen auch bei kombinierter Anwendung diese Kriterien nur teilweise, jedoch nicht in ihrer Gesamtheit. Der US sowie die CT, die MRT und die PET haben einen Auflösungsbereich von 500 μm – 7 mm. Die CT und die PET gehen mit einer erheblichen Strahlenbelastung einher. Die CT und die MRT benötigen aufgrund ihrer sonst niedrigen Sensitivität hohe Mengen an Kontrastmittel. Die IHC bietet zwar Informationen auf subzellulärem Niveau, ist aber mit einer invasiven Prozedur verbunden und liefert primär qualitative Daten aus einem begrenzten Tumorareal. Zahlreiche Ansätze treiben die Funktionalisierung der Kontrastmittel für die verschiedenen Bildgebungsverfahren voran. Allerdings zerfallen die Kontrastmittel für den US bei der US-Wellen-Exposition sehr schnell; für die CT bzw. die MRT werden aufgrund ihrer geringen Sensitivität große Mengen benötigt. Die für die PET verwendeten Tracer weisen zwar eine hohe Sensitivität auf, gehen jedoch mit einer radioaktiven Strahlenexposition einher. Aktuell lässt sich der Rezeptorstatus am besten mit der IHC evaluieren. Aufgrund ihrer Invasivität ist diese Methode zur Verlaufsbeobachtung des Rezeptorstatus aber nicht geeignet.

Eine optimale diagnostische Methode lässt sich durch eine hohe Auflösung und Sensitivität bei geringer Strahlenbelastung und Invasivität charakterisieren.

In der vorliegenden Arbeit soll überprüft werden, ob i. v. injizierte, mit Antikörpern funktionalisierte SERRS-NP eine Unterscheidung von Zelloberflächenmarkern mit einer hohen und einer niedrigen Expression ermöglichen (relative Quantifizierung), d. h. inwieweit sich differierende Expressionsmuster eines Zelloberflächenmarkers in den Intensitäten der Raman-Signale abbilden. Sollte dies gelingen, könnten mit einer einmaligen, minimal-invasiven i. v. Injektion von mit Antikörpern funktionalisierten SERRS-NP die inter- und die intratumorale Heterogenität von Zelloberflächenmarkern in Tumoren dargestellt werden. Damit könnte die SERRS-NP-basierte Bildgebung zu einer wertvollen Methode in der Diagnose und im Therapieverlauf werden sowie die

Lücke zwischen den makroskopischen Daten der klinischen Bildgebungsmethoden und den hochspezifischen, aber limitierten Informationen der IHC vermindern. Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. Gelingt die Konjugation der Antikörper Cetuximab und Trastuzumab an SERRS-NP und in welchem Bereich liegt ihre Detektionsgrenze *in vitro*?
2. Ist mit *i. v.* applizierten Cetuximab-SERRS-NP eine relative Quantifizierung der Expression des Zelloberflächenmarkers EGFR im intertumoralen Vergleich möglich und lassen sich damit Tumoren mit hoher bzw. niedriger Expression unterscheiden?
3. Ist mit *i. v.* applizierten Trastuzumab-SERRS-NP eine relative Quantifizierung der Expression des Zelloberflächenmarkers HER2 im intertumoralen Vergleich möglich und lassen sich damit Tumoren mit hoher bzw. niedriger Expression unterscheiden?
4. Gelingt die Detektion eines Tumors mit hoher HER2-Expression mittels Trastuzumab-SERRS-NP durch den intakten Mäuseschädel *in vivo*?
5. Ist mit *i. v.* applizierten Cetuximab-SERRS-NP eine differenzielle Expression des Zelloberflächenmarkers EGFR innerhalb eines Tumors mit hoher EGFR-Expression nachweisbar und damit eine Darstellung der intratumoralen Heterogenität von EGFR möglich?
6. Ist mit *i. v.* applizierten Trastuzumab-SERRS-NP eine differenzielle Expression des Zelloberflächenmarkers HER2 innerhalb eines Tumors mit hoher HER2-Expression nachweisbar und damit eine Darstellung der intratumoralen Heterogenität von HER2 möglich?

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) erworben. Die Antikörper Cetuximab (Erbix, Eli Lilly) und Trastuzumab (Herceptin, Genentech) wurden von der Apotheke des Memorial Sloan Kettering Cancer Centers (MSKCC) zur Verfügung gestellt.

3.2 Synthese der SERRS-Nanopartikel

Die Herstellung der SERRS-NP erfolgte nach Harmsen et al. [65]. 60 nm Gold-Nanosterne (*Abbildung 11, S. 33*) wurden mit 10 ml einer 20 mM Goldchlorid-Vorratslösung zu einem Liter 60 mM Ascorbinsäure bei 4 °C hinzugefügt. Die Gold-Nanopartikel (GNP) wurden per Zentrifugation gesammelt und in einer Membrankassette (MWCO 3,5 kDa) für drei Tage dialysiert. Zur Generierung der SERRS-NP wurden der dialysierten GNP-Dispersion (5,4 ml) absoluter Alkohol mit 900 µl Ammoniumhydroxid (ad 45 ml) und – direkt danach – Raman-Reporter-Tetraethylorthosilicat (TEOS)-Lösung (90 µl 25 mM Raman-Reporter-IR780 Perchlorat (IR780) in N,N-Dimethylformamid + 13,5 ml 100%iger Alkohol + 2,25 ml TEOS) zugefügt. Nach 24 Minuten wurde die Reaktion mit Ethanol gestoppt. Anschließend wurden die SERRS-NP viermal mit Ethanol gewaschen.

3.3 Funktionalisierung der SERRS-Nanopartikel mit Cetuximab und Trastuzumab

Für die Funktionalisierung wurden die NP-Oberflächen zunächst mit Sulfhydryl-Gruppen bestückt. Zu den SERRS-NP wurde eine Lösung aus 850 µl 100%igem Alkohol, 100 µl (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan (3-MPTMS) und 50 µl deionisiertes Wasser gegeben, die zuvor in einem 70 °C warmen Wasserbad für zwei Stunden erwärmt wurde. Die mit Sulfhydryl-Gruppen versehenen SERRS-NP wurden per Zentrifugation gesammelt, mit Ethanol und Wasser gewaschen sowie auf eine Konzentration von 3,5 nM eingestellt. Das für die Verknüpfung der Antikörper und der SERRS-NP verwendete heterobifunktionale Poly(ethylene Glykol) (N-Hydroxysuccinimid 5-Pentanoat)

Ether N'-(3-Maleimidopropionyl)aminoethan (PEG) wurde mit einem fünffachen Überschuss von Cetuximab (0,5 mg/ml) bzw. Trastuzumab (1 mg/ml) für 40 Minuten in 10 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure(MES)-Puffer pH 7,1 inkubiert. Anschließend wurde die PEG-Antikörper-Lösung einmal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. Phosphate-Buffered Saline (PBS)) und zweimal mit MES-Puffer gewaschen. Um die Antikörper mit der Oberfläche der SERRS-NP zu verbinden, wurden 350 µl einer 3,5 nM Lösung der Sulfhydryl-Gruppen-tragenden SERRS-NP zu der PEG-Antikörper-Lösung hinzugefügt und für 30 Minuten inkubiert. Mit Cetuximab funktionalisierte SERRS-NP (Cetuximab-SERRS-NP) und mit Trastuzumab funktionalisierte SERRS-NP (Trastuzumab-SERRS-NP) wurden mit deionisiertem Wasser gewaschen sowie in MES-Puffer (mit 0,22 µm Filter sterilisiert, pH 7,3) in einer finalen Konzentration von 3,5 nM dispergiert.

3.4 Charakterisierung der SERRS-Nanopartikel

Zur Charakterisierung der NP per TEM wurden Proben der mit den Antikörpern funktionalisierten NP auf ein Kupfernetz mit Karbon (Maschenweite 300, Electron Microscopy Sciences) aufgetragen und luftgetrocknet. Die Bilder wurden bei einer 50.000- bis 250.000-fachen Vergrößerung mit einem JOEL 1200EX (JEOL USA, Inc.) TEM bei 80 kV aufgenommen. Die Konzentration und die Größenverteilung der SERRS-NP wurden während der Synthese mittels NP-Verfolgungsanalyse (NTA; NanoSight NS500; Malvern Instruments, Inc.) beobachtet. Das mit Hilfe dynamischer Lichtstreuung (engl. Dynamic Light Scattering (DLS)) (Malvern Instruments Ltd., Modell Zetasizer Nano) ermittelte Zeta-Potenzial gibt Aufschluss über den Erfolg der einzelnen Syntheseschritte. Das Zeta-Potenzial beschreibt das elektrokinetische Potenzial in kolloidalen Dispersionen. Es ist ein Indikator für die Stabilität der Dispersionen. Die negativen und die positiven Werte beschreiben den Grad der elektrostatischen Abstoßungskraft. Je näher der Wert an 0 liegt, desto neutraler verhalten sich die in der Dispersion enthaltenen Moleküle zueinander und desto größer ist das Risiko der Aggregation. Die Intensität der Raman-Signale der SERRS-NP wurde mit dem Renishaw-inVia-Raman-Mikroskopie-System (Renishaw, Hoffman Estates) bestimmt (*Abbildung 10, S. 31*), das mit einer Piezoelement-kontrollierten Bühne für Mikron-aufgelöste dreidimensionale Kartierungen, einem 300 mW 785 nm Diodenlaser und einem 2,54 cm ladungsgekoppelten Bauteil-Sensor (engl. Charge-Coupled Device (CCD)) mit einer Spektralauflösung von $1,07 \text{ cm}^{-1}$ ausgestattet war. Die SERRS-NP-Spektren wurden mit einem 5 x

Objektiv (Leica Microsystems) und einer Erfassungszeit von 1 Sekunde bei einer 0,05%igen Laserenergie erfasst.

3.5 Durchflusszytometrie

Zur Gewährleistung der Objektivität wurde die Durchflusszytometrie von Hsiao-Ting Hsu, der technischen Assistentin des Kircher-Labors, durchgeführt. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zelllinien A431, U87 und MDA-MB-468 von der American Type Culture Collection (ATCC) erworben (*siehe Tabelle 1, S. 29*). Die Zelllinien U87EGFR und TS895 wurden von dem Labor von Dr. Ingo Mellinghoff am MSKCC zur Verfügung gestellt (*siehe Tabelle 1, S. 29*). Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen die Zelloberflächenmarker EGFR und CD340 (BioLegend) für 15 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend mit kalter Dulbecco's Phosphate-Buffered Solution (DPBS, Thermo Fisher Scientific) gewaschen, in Durchflusszytometrie-Puffer (PBS + 0,5 % fetales Kälberserum) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Thermo Fisher Scientific) (1 mg/ml) resuspendiert und direkt der Durchflusszytometrie zugeführt. Für jede Zelllinie wurden mindestens 50.000 Ereignisse gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit einem LSR II Durchflusszytometer (BS BioScience) mit der Software FlowJo10 für Mac OS X (Treestar).

3.6 Tiermodelle

Alle Tierexperimente wurden durch das institutionelle Tierpflege- und -nutzungs-Komitee des MSKCC (Protokollnummer 16-09-013) bewilligt. Die Induktion intrazerebraler und peripherer (subkutan an der Flanke lokalisierter) Tumoren erfolgte durch die Implantation verschiedener Zelllinien in vier bis fünf Wochen alte ICR-Prkdc-*scid*-Mäuse (ICR – Institute for Cancer Research; Prkdc – Protein Kinase DNA-Activated Catalytic Subunit; scid – severe combined immunodeficiency). Dadurch wurden Tumoren mit variierenden Expressionsniveaus von EGFR und HER2 generiert.

Für die Evaluation der EGFR-Expression wurden zwei Mausmodelle etabliert (*Abbildung 8*):

- Modell 1: Tumoren der Zelllinien A431/TS895 in den Flanken (n = 8) und im Gehirn (n = 8);
- Modell 2: Tumoren der Zelllinien U87EGFR/U87 in den Flanken (n = 7) und im Gehirn (n = 3).

Für die Evaluation der HER2-Expression wurde ein Mausmodell erstellt (*Abbildung 8*):

- Modell 3: Tumoren der Zelllinien MDA-MB-468/HCC1954 in den Flanken ($n = 2$) und im Gehirn ($n = 3$).

Die individuellen Zelllinien wurden in verschiedene Loci desselben Tieres appliziert (entweder in beide Flanken oder in beide Hemisphären), um Tumoren mit hoher und niedriger Expression desselben Oberflächenmarkers im selben Tier zu erhalten (*Abbildung 8*):

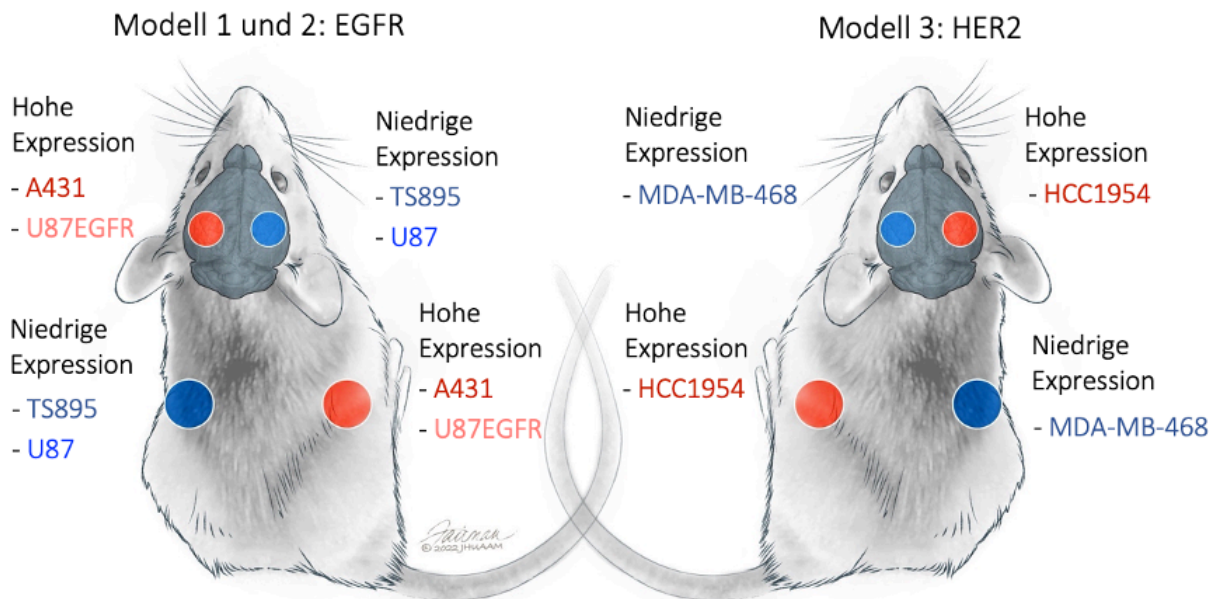


Abbildung 8: Illustration der Tumormodelle für den Nachweis von Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) bzw. Human Epidermal Growth Factor 2 (HER2) exprimierenden Tumorzelllinien

Zur Analyse der EGFR-Expression wurden Modelle mit den Tumorzelllinien A431 und TS895 (Modell 1; $n = 9$) bzw. U87EGFR und U87 (Modell 2; $n = 8$) genutzt. Zur Analyse der HER2-Expression wurden Modelle mit den Tumorzelllinien HCC1954 und MDA-MB-468 (Modell 3; $n = 5$) kreiert. A431 und U87EGFR zeigten eine hohe, TS895 und U87 eine niedrige EGFR-Expression (Modelle 1 + 2). HCC1954 zeigte eine hohe, MDA-MB-468 eine niedrige HER2-Expression (Modell 3). A431 wurde dabei stets mit TS895 (Modell 1), U87EGFR mit U87 (Modell 2) und HCC1954 mit MDA-MB-468 (Modell 3) kombiniert. Pro Hemisphäre bzw. pro Flanke wurde eine Tumorzelllinie implantiert. (*Eigene Abbildung*)

Zur Generierung von Tumoren in den Flanken wurden 10^6 Zellen jeder Zelllinie in jede Flanken-seite implantiert. Für die intrakraniellen Tumoren wurden die Zellen (*Zellzahl siehe Tabelle 1*) stereotaktisch in jede Hemisphäre implantiert (*Abbildung 9*). Auf diese Weise wurden verschiedene Mausmodelle für die beiden Marker hergestellt, wobei eine Maus stets ein bis zwei Tumoren trug. Ein Tumor wies dabei jeweils eine hohe bzw. niedrige Expression desselben Zelloberflächenmarkers auf.

Tabelle 1: Art und Anzahl der zur Generierung von intrazerebralen und peripheren Tumoren verwendeten Zelllinien

Biomarker Expressionsniveau	Zelllinie	Entität der Zelllinie	implantierten Zellen/ Hemisphäre	implantierten Zellen/ Flanke
Hohe EGFR- Expression	TS895	GBM	500.000	1.000.000
	U87	GBM	500.000	1.000.000
Niedrige EGFR- Expression	A431	Epidermoid Karzinom	500.000	1.000.000
	U87EGFR	GBM	20.000	1.000.000
Hohe HER2- Expression	MDA-MB-468	Brustkrebs	20.000	1.000.000
Niedrige HER2- Expression	HCC1954	Brustkrebs	500.000	1.000.000

EGFR = Epidermal Growth Factor Receptor, GBM = Glioblastoma multiforme, HER2 = Human Epidermal Growth Factor Receptor 2. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Zur Induktion der Gehirntumoren wurde die Nadelspitze 1,0 mm lateral des Bregmas, 3,5 mm unterhalb der Dura eingeführt und dann 0,5 mm hochgezogen, um ein Reservoir für die Zellen zu bilden. Die finale Tiefe der Nadelspitze lag bei 3,0 mm. Die Inzidenz und die Größe der Tumoren wurden wöchentlich über MRT-Bildgebungen (Bruker 7T MRI, Billerica) ab circa zwei Wochen nach der Zellimplantation beurteilt. Die Gehirntumoren wuchsen innerhalb von vier bis acht Wochen zu einer Größe von 1–8 mm und die peripheren Tumoren in den Flanken innerhalb von zwei bis vier Wochen zu einer Größe von 5–10 mm heran.

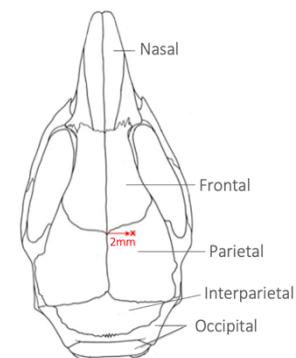


Abbildung 9: Schädelknochen einer Maus
Nadelpositionierung für die Tumorzellimplantation.
(Eigene Abbildung)

3.7 Magnetresonanztomographie

Die MRT wurde mit einem für Kleintiere geeigneten Gerät durchgeführt, das mit einem 7 Tesla supraleitenden Magneten (Bruker Biospin Corp.), einem Gradienten (Resonance Research, Inc.), einer 115 mm großen Öffnung sowie einer maximalen Gradienten-Amplitude von 640 Millitesla

pro Meter (mT/m) ausgestattet war. Eine spezialanfertigte 36 mm Hochfrequenz-Phasenschieberspule im Vogelkäfigformat (Starks Contrast MRI Coils Research, Inc.) wurde für die Hochfrequenzerzeugung und -erfassung genutzt. Die Mäuse wurden mit einem 2%igem Isoflurangas-Sauerstoff-Gemisch (Life Science, LLC) immobilisiert. Die Atmung der Tiere wurde mit einem physiologischen Beobachtungssystem für Kleintiere (SA Instruments, Inc.) kontrolliert. Zur Positionierung der Tiere wurden Bilder entlang drei orthogonaler Orientierungen akquiriert. Die Gehirne der Mäuse wurde mittels einer koronar T2-gewichteten, schnell spinnenden rapid-acquisition-with-relaxation-enhancement(RARE)-Echosequenz mit den folgenden Parametern aufgezeichnet: Matrix 256×160 , Sichtfenster (engl. Field of View (FOV)) 3×2 cm, Repetitionszeit (engl. Repetition Time (TR))/Echozeit (engl. Echo Time (TE)) 1500/50 Millisekunden und 1-mm-Schichten und zwölf Akquisitionen im Durchschnitt. Die Dauer der Bildgebung betrug insgesamt im Schnitt sechs Minuten. Die MRT wurde von der Core Facility Animal Imaging am MSKCC durchgeführt.

3.8 Raman-Bildgebung und Quantifizierung des Raman-Signals

Hatten die Tumoren eine Größe von 0,5–1,0 cm erreicht, erhielten die Mäuse eine Injektion von 350 μ l einer 3,5 nM Cetuximab-SERRS-NP- oder Trastuzumab-SERRS-NP-Lösung in die Schwanzvene. 18–24 Stunden nach der Injektion wurden die Mäuse eingeschläfert. Periphere Tumoren wurden direkt nach der Entfernung und vor der Fixierung mit Formaldehyd mittels Raman-Bildgebung analysiert. Da von mehreren Gehirnen Schnitte untersucht werden sollten, wurden diese für 30–45 Minuten in 4 % Formaldehyd gelegt, um das Gewebe zu stabilisieren und eine Zersetzung während der Bildgebung zu verhindern. Anschließend wurden zwei bis drei Schnitte mit einer Schnittdicke von 0,5–1,5 mm angefertigt. Alle Raman-Untersuchungen wurden mit dem im *Kapitel 3.4* beschriebenen Raman-System durchgeführt (*Abbildung 10*). Die Raman-Bilder wurden in derselben Fokalebene (Objektivlinse, 5 x) bei 10–100 % Laserenergie und 0,6–1 Sekunde Erfassungszeit im „Map-Image“-Erfassungsmodus mit einer Schrittgröße des Lasers von 50–100 μ m aufgenommen. Bei der gewählten Schrittgröße wurde die Bildgebungsdauer von drei Stunden nicht überschritten, sodass die Laserexposition des Gewebes von Tumor zu Tumor vergleichbar blieb, aber dennoch größere Tumoren in ihrer Gesamtheit untersucht werden konnten. Die Raman-Bilder wurden mit einem intern entwickelten Programm in Matlab (2017b) analysiert.

Die tumorrelevanten Regionen im Gehirn wurden durch eine MRT des gesamten Gehirns in vivo und durch Histologie der Gehirnschnitte ex vivo bestimmt. Zur Entfernung des Fluoreszenzhintergrunds der Raman-Spektren wurde das Fluoreszenzgrundsignal mittels des Whittaker-Filters ($\lambda = 200 \text{ cm}^{-1}$) und der Partial-Least-Squares(PLS)-Toolbox v.8.0 (Eigenvector Research, Inc.) subtrahiert. Eine typische Raman-Analyse dauerte 90–180 Minuten.

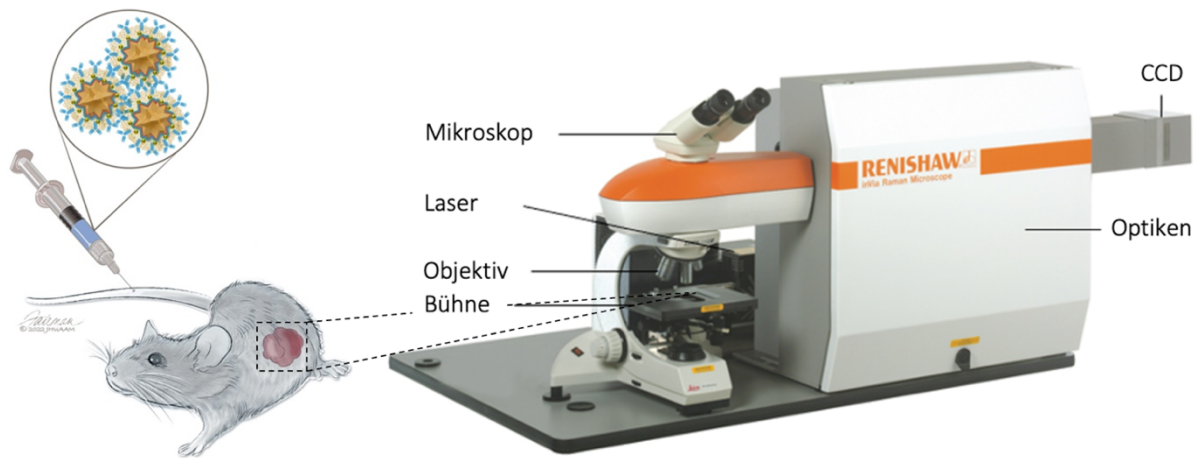


Abbildung 10: Aufbau des Raman-Spektroskops für die Raman-Bildgebung

Der kommerziell erhältliche InVia Raman-Scanner* besteht aus einer Bühne, Objektiven, einem Mikroskop, einem Laser, einer Box mit den Optiken sowie einer Charge-Coupled-Device(CCD)-Kamera. Für die In-vivo-Bildgebung wurden die Mäuse, für die Ex-vivo-Bildgebung die Tumoren auf der Bühne unter dem Mikroskop platziert. (*Eigene Abbildung*). * Renishaw's inVia confocal Raman microscope. © Copyright Renishaw plc. Image. Reproduziert mit der Genehmigung von Renishaw.

3.9 Histologie

Zur Gewährleistung der Objektivität wurden die histologischen Untersuchungen am MSKCC in der Core-Facility-Molekulare-Zytologie und am DFHCC in der Core-Facility-Nagetier-Histopathologie nach den dort üblichen Standardverfahren durchgeführt.

Alle Tumoren der vorliegenden Arbeit wurden am MSKCC fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Gehirne und die Gehirnschnitte sowie die peripheren Tumoren wurden in 4 % Paraformaldehyd über Nacht bei Raumtemperatur fixiert und mittels eines Leica ASP6025 Gewebeprozessors (Leica Biosystems) in Paraffin eingebettet.

Am MSKCC wurde die Hämatoxylin-und-Eosin(H&E)-Färbung wie folgt durchgeführt: Nach einer Deparaffinisierung mit zwei Wechseln von HistoClear (National Diagnostics) nach je einer

Minute und anschließenden Waschschritten mit absolutem, 95%igem und 70%igem Ethanol sowie Wasser wurden die Proben in Harris-Hämatoxylin-Lösung (Fisher Scientific) für 2,5 Minuten gefärbt. Nach weiteren Waschschritten wurden die Proben mit Eosin Y (Sigma-Aldrich) für zehn Sekunden gefärbt und wiederholt gewaschen, dehydriert sowie mit Permount (Fisher Scientific) fixiert. Die H&E-Färbung am Dana-Farber/Harvard Cancer Center (DFHCC) wurde mittels des HistoCore-Spectra-ST-Färbeautomaten von Leica Biosystems durchgeführt.

Die EGFR-IHC erfolgte am MSKCC mittels des Leica-Bond-RX-Färbeautomaten (Leica Biosystems). Verwendet wurde folgender Primärantikörper: Anti-EGFR (Cell Signaling Technologies, 4,4 µg/ml). Des Weiteren wurde am MSKCC eine Immunfluoreszenz-Färbung in dem Leica Bond RX (Leica Biosystems) durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Am DFHCC wurde die IHC mit Hilfe einer Leica-Bond-III-automatisierten Färbepattform sowie mit einem Refine Detection Kit (Leica Biosystems) durchgeführt. Verwendet wurden folgende Primärantikörper: Anti-EGFR (Cell Signaling Technology, Klon D38B1; 1:50 Verdünnung) und Anti-HER2 (Neomarkers, Klon SP3; 1:40 Verdünnung).

4 ERGEBNISSE

Teile der im Folgenden aufgeführten Ergebnisse wurden in der Zeitschrift *Nanotheranostics* unter dem Titel „Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging“ veröffentlicht [66].

4.1 Synthese von mit Antikörpern funktionalisierten SERRS-Nanopartikeln

Bei den Cetuximab- und Trastuzumab-SERRS-NP (siehe Kapitel 3.2 und 3.3) bestand das Zentrum der NP aus Gold in Form eines Sterns. Letzterer war von dem Infrarot-Raman-Reporter IR780 Perchlorat umgeben, der wiederum von einer Silikat-Hülle stabilisiert wurde. Diese Grundform wurde mit einer Schicht einer heterobifunktionalen PEG-Matrix umhüllt, an die Cetuximab bzw. Trastuzumab konjugiert wurde (Abbildung 11).

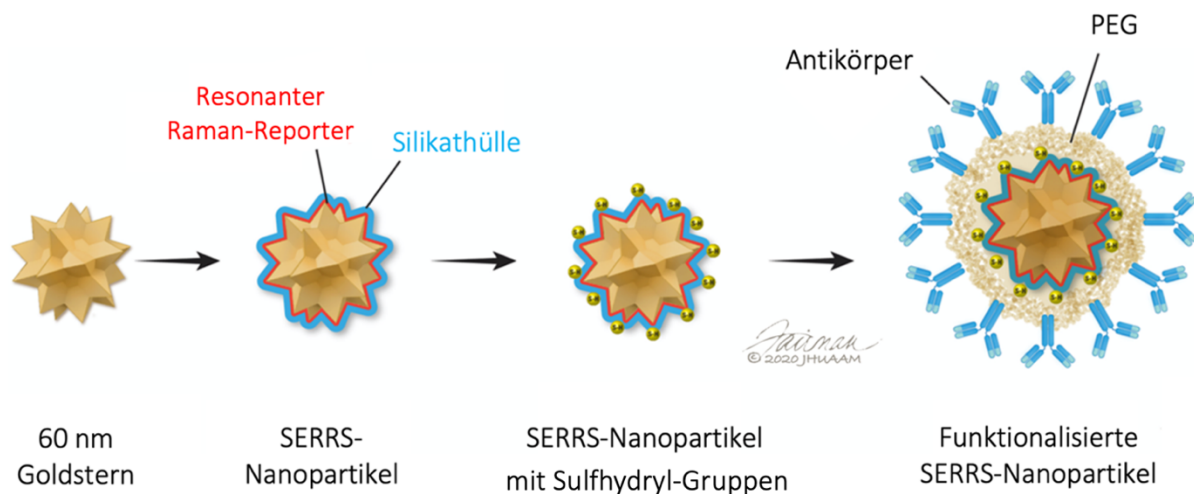


Abbildung 11: Synthese der Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikel (SERRS-NP)
 Schematische Illustration der mit Antikörpern funktionalisierten SERRS-NP. Zunächst wurden 60 nm große Nanosterne synthetisiert. Dann wurde während des Hinzufügens der Silikat-Hülle ein resonanter Raman-Reporter an der Oberfläche der Nanosterne angebracht. Die mit einer Silikat-Hülle versehenen Nanosterne wurden mit dem Hinzufügen von Sulfhydryl-Gruppen und dem heterobifunktionalen Polyethylenglykol(PEG)-Molekül modifiziert sowie mit Cetuximab oder Trastuzumab funktionalisiert. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, “Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging,” Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Die Sternform bestand aus einer Verbindung von Tetrachlorogoldsäure ($H[AuCl_4]$) und Ascorbinsäure ($C_6H_8O_6$). Um die Bildung großer sphärischer Formen zu verhindern und kleine sphärische

Elemente zu generieren, wurde die Synthese bei einer Temperatur von 4 °C mit Materialien, die dieselbe Temperatur aufwiesen, durchgeführt. Bei dem Nukleierung genannten Vorgang band die Tetrachlorogoldsäure innerhalb weniger Sekunden an die sich drehende Ascorbinsäure. Innerhalb weiterer Sekunden lagerten sich verbliebene Goldelemente, die nicht an der Nukleierung teilgenommen hatten, an die sphärischen Formen an, wodurch die Sternformation entstand. Bei erfolgreicher Sternbildung färbte sich die Lösung innerhalb weniger Sekunden blau. Primär sphärische Formationen ergaben einen violetten Farbton. Bei erfolgreicher Reaktion wurden die Sterne für drei Tage bei Raumtemperatur dialysiert, um überschüssige Ascorbinsäure zu entfernen, die zu einer Aggregation der Sterne führen könnte. Der positiv geladene Raman-Reporter band an die negativ geladenen Gruppen der Goldoberfläche und neutralisierte die Sterne.

Durch die Silikat-Hülle sollte die Aggregation der neutralen Sterne verhindert werden. Zur Herstellung der Hülle wurde der Raman-Reporter IR780 Perchlorat ($C_{37}H_{37}ClN_2O_4$) in Silicium-haltigem Tetraethylorthosilicat (TEOS, $C_8H_{20}O_4Si$) gelöst. Die Nähe der Goldoberfläche zu dem Raman-Reporter bedingte die in *Kapitel 1.4.2* beschriebene Resonanzerhöhung der eintreffenden Laserstrahlen und damit eine Verstärkung des Raman-Signals. Um die das Silicium umgebenden Sauerstoff-Moleküle der Sulfhydryl-Gruppe zugänglich zu machen, wurde die vorhandene organische Methylgruppe durch die Zugabe von Ammoniumhydroxid entfernt. Die vollständige Silikat-Hülle stellte sicher, dass nur der Raman-Reporter mit der Goldoberfläche in Kontakt trat, was wichtig war, um die ungewollte Amplifikation von Raman-Signalen durch umgebende Biomoleküle zu verhindern. Des Weiteren diente das Silikat der Stabilisierung und verhinderte eine Aggregation der NP.

Der Herstellungsprozess wurde über das Zeta-Potenzial überwacht, das zu diesem Zeitpunkt aufgrund der zahlreichen negativ geladenen Sauerstoff-Moleküle der Silikat-Hülle bei circa -50 liegen sollte. Die Sulfhydryl-Gruppen der Silikat-Hülle dienten als Basis für die folgende PEGylierung, die wiederum die Funktionalisierung der NP mit Antikörpern ermöglichte. Durch das Hinzufügen von Sulfhydryl-Gruppen wurden die SERRS-NP leicht positiv geladen, was sich im Zeta-Potenzial widerspiegelte. Die Einführung der Sulfhydryl-Gruppen erfolgte über (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilan (MPTMS, $C_6H_{16}O_3SSi$), das eine Silicium-Gruppe zur Bindung an die Hydroxid-Gruppen der Silikat-Hülle und eine Sulfhydryl-Gruppe für die folgende PEGylierung enthielt. PEG ist ein bifunktionales Molekül mit einer Maleimid-Gruppe, die an die Sulfhydryl-Gruppe der Silikat-Hülle bindet. Die Succinimid-Gruppe beinhaltet eine reaktionsfreudige NH-Gruppe, die mit den

Aminogruppen von Lysin in der Fc-Region der Antikörper reagierte. Die PEG-Hülle verhinderte unspezifische Interaktionen der SERRS-NP mit dem Gewebe. Des Weiteren reduzierte die PEG-Hülle die Opsonierung der NP mit Komplementfaktoren und damit die Phagozytose durch Makrophagen, womit ihre Bioverfügbarkeit anstieg.

In einem letzten Schritt erfolgte die Funktionalisierung der SERRS-NP mit Antikörpern. Aufgrund der positiven Ladung der Antikörper sollte ein deutlicher Anstieg im Zeta-Potenzial auf circa -20 bis -15 zu beobachten sein. Ein Anstieg auf über -10 oder unter +10 war nicht wünschenswert, da annähernd neutrale SERRS-NP zur Aggregation neigen.

Im Rahmen einer Qualitätskontrolle wurde die Goldstern-Morphologie und die Silikat-Hülle mittels TEM (JEOL USA, Inc., Model JOEL 1200EX) (*Abbildung 12a*) beurteilt. Begleitend zu den Experimenten wurde die Konzentration der SERRS-NP per Nanopartikel-Tracking-Analyse ermittelt und das Zeta-Potenzial (*Abbildung 12b*) mittels Dynamic Light Scattering (DLS, Malvern Instruments Ltd., Modell Zetasizer Nano) erhoben.

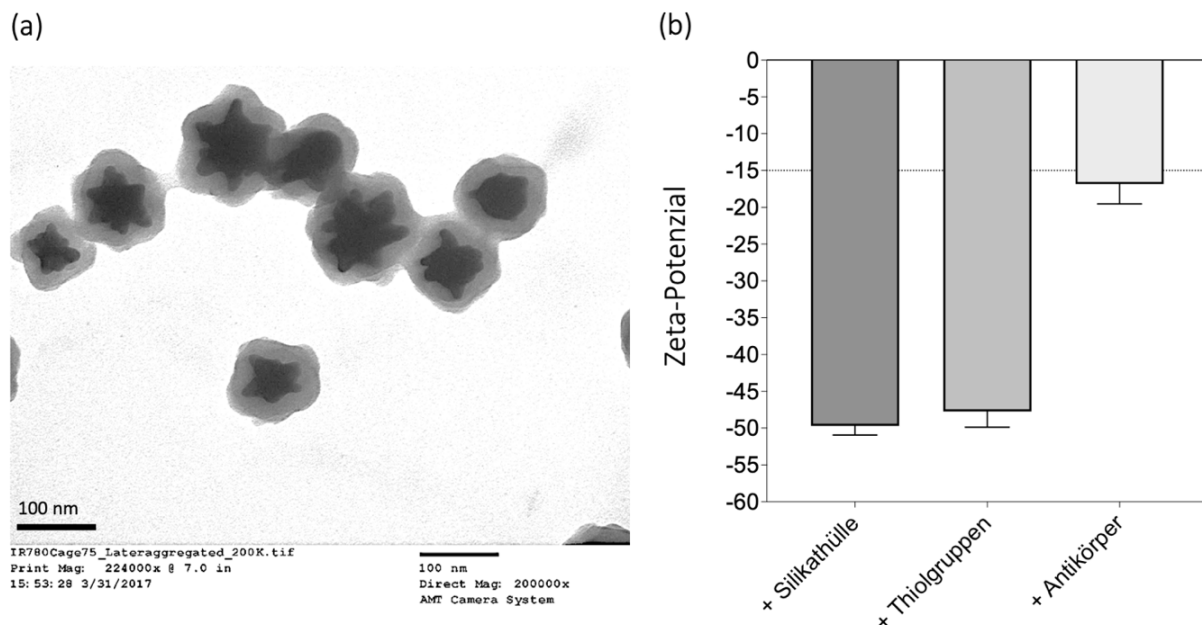


Abbildung 12: Qualitätskontrolle der Synthese der Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikel (SERRS-NP) mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) und Dynamischer Lichtstreuung (engl. Dynamic Light Scattering (DLS))

(a) Die Qualitätskontrolle der SERRS-NP erfolgte mittels TEM, um die Formierung der Silikat-Hülle und die Größe der SERRS-NP zu beurteilen. (b) Die Messung der DLS verifiziert die Ladungsverschiebung in einen weniger negativen Ladungsbereich, bedingt durch das Hinzufügen von Sulfhydryl-Gruppen und Antikörpern. (*Eigene Abbildung*)

Des Weiteren wurde der Erfolg der Synthese über die Messung der Intensität der Raman-Signale von 10 μl einer 1 nM SERRS-NP-Lösung *in vitro* überprüft (*Abbildung 13*). Der individuelle „Fingerabdruck“ der synthetisierten SERRS-NP zeigte mehrere eindeutige und voneinander abgrenzbare spektrale Peaks. Trotz des Fluoreszenzhintergrunds waren verschiedene Intensitätspeaks erkennbar, inklusive der für IR780 charakteristischen Peaks bei 950–960 cm^{-1} .

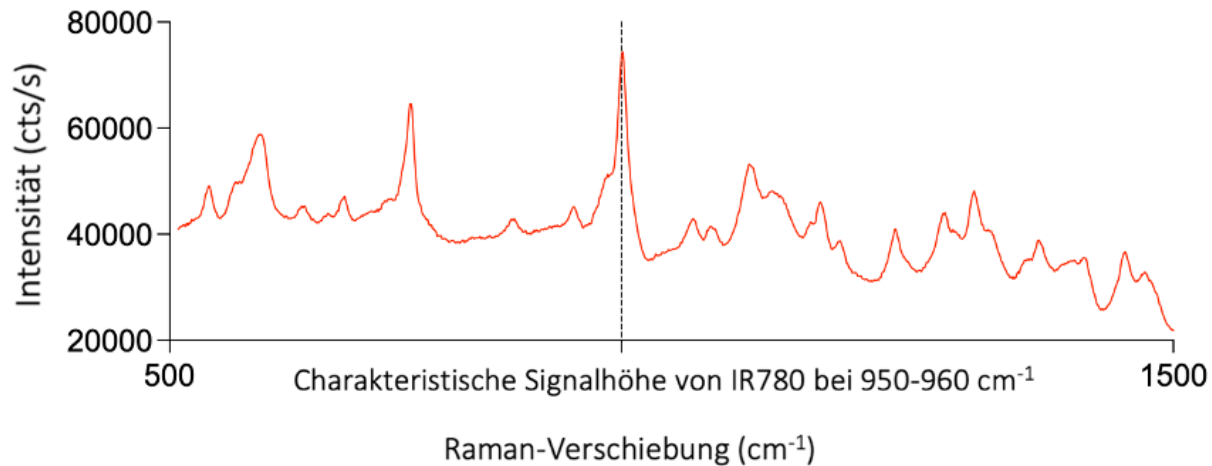


Abbildung 13: Qualitätskontrolle der Synthese der Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikel (SERRS-NP) mittels Intensitätsmessung der Raman-Signale

Dargestellt ist ein repräsentatives Raman-Signal der Cetuximab-SERRS-NP. Es zeigte sich eine hohe Signalintensität *in vitro*. Das Raman-Signal wies mehrere deutliche Peaks auf, wobei der prominenteste dem für den Raman-Reporter IR780 charakteristischen Peak bei 950–960 cm^{-1} entsprach. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Die Durchführung einer Verdünnungsreihe ergab eine Detektionsgrenze von 1 pM nach Subtraktion des Hintergrunds (*Abbildung 14*). Die Intensität des charakteristischen Peaks bei 950–960 cm^{-1} wurde dazu genutzt, die SERRS-NP zu quantifizieren, da das Signal ein nichtlineares, monoton ansteigendes Verhältnis mit der NP-Konzentration aufwies. Der Signalpeak bei 1020 cm^{-1} und mehrere andere weniger intensive Peaks entstammten dem Plastikmaterial der 384 Kavitätenplatte. Diese Peaks wurden sichtbar, wenn das Signal der SERRS-NP abnahm.

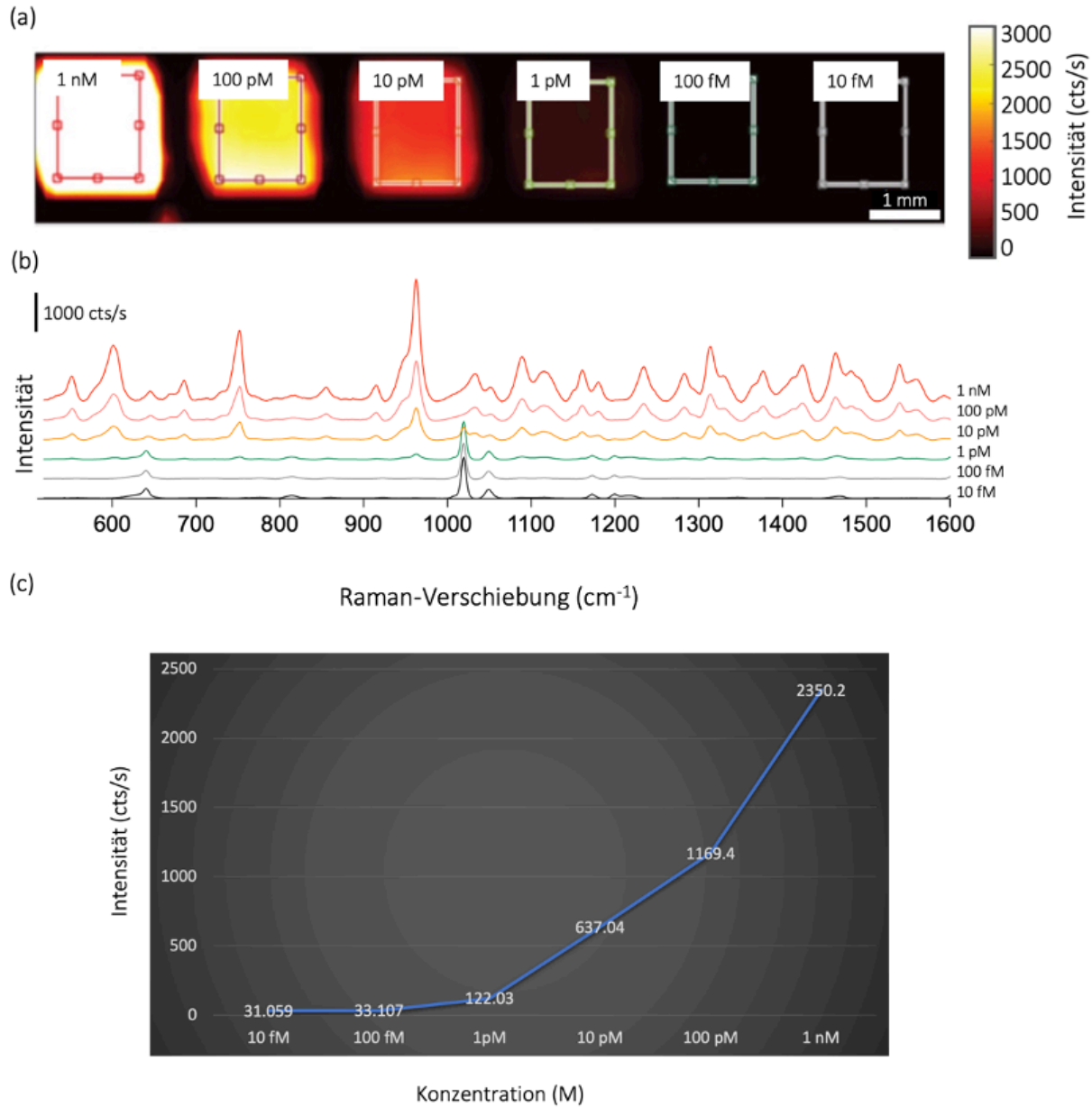


Abbildung 14: Intensität der Raman-Signale der Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikel (SERRS-NP) bei unterschiedlichen Verdünnungen

Dargestellt ist eine repräsentative Verdünnungsreihe von SERRS-NP im Raman-Bild (a) sowie in Form von Raman-Signalen (b). Die Detektionsgrenze lag bei 1 pM nach der Subtraktion des Hintergrundsignals. Zur besseren Übersicht wurden die Graphen der Konzentrationen farbig markiert. (c) Der Graph zeigt die Intensitäten in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Verdünnungsreihe. Es bestand ein nichtlineares Verhältnis zwischen der NP-Konzentration und der Signalintensität. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

4.2 Analyse des Expressionsniveaus des Tumormarkers EGFR mittels Cetuximab-SERRS-Nanopartikeln in peripheren Tumoren

Zur Induktion eines peripheren Tumorwachstums wurde den Mäusen in den gegenüberliegenden Flanken jeweils eine Tumorzelllinie mit hoher (A431, U87EGFR) und eine mit niedriger (TS895, U87) EGFR-Expression implantiert (Abbildung 15b und siehe Tabelle 1, S. 29). Die Durchflusszytometrie bestätigte die zunehmende EGFR-Expression von TS895 über U87 und U87EGFR bis hin zur Zelllinie A431 (Abbildung 15a).

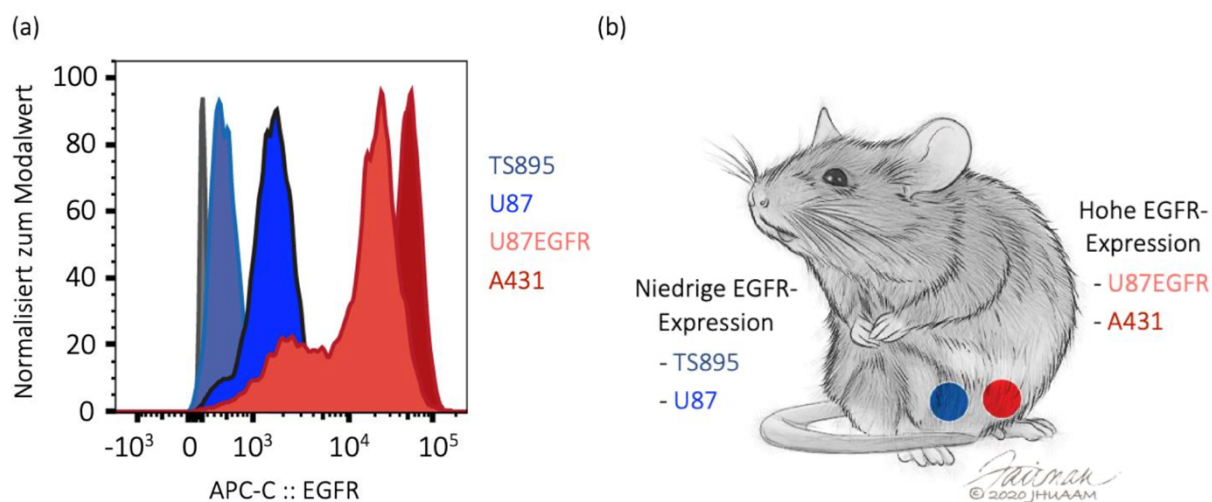


Abbildung 15: Nachweis Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) exprimierender Tumorzelllinien im Mausmodell für periphere Tumoren

ICR-Prkdc-*scid*-Mäusen* wurden Tumorzellen der Linien TS895, U87, U87EGFR und A431 implantiert. (a) Das Niveau der EGFR-Expression in den Tumorzelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Die Zelllinien zeigten eine unterschiedliche EGFR-Expression: TS895 < U87 < U87EGFR < A431. (b) Die Tumorzelllinien mit niedriger EGFR-Expression (TS895 bzw. U87) wurden in eine Flankenseite implantiert. In die gegenüberliegende Flankenseite derselben Maus wurden Tumorzelllinien mit hoher EGFR-Expression (A431 bzw. U87EGFR) implantiert. Tumoren mit niedriger EGFR-Expression n = 10, Tumoren mit hoher EGFR-Expression n = 13. * ICR – Institute for Cancer Research; Prkdc – Protein Kinase DNA-Activated Catalytic Subunit; scid – severe combined immunodeficiency. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Das erste Modell bestand aus dem Vergleichspaar A431 (höchste EGFR-Expression) und TS895 (geringste EGFR-Expression). Nachdem in diesem Modell die Unterscheidung der Höhe der EGFR-Expression mittels Cetuximab-SERRS-NP möglich war, wurde ein ähnliches Tumormodell mit den Zelllinien U87EGFR und U87, deren EGFR-Expression weniger stark differierte, generiert.

Nachdem die Tumoren zwei bis vier Wochen herangewachsen waren, erhielten die Tiere Cetuximab-SERRS-NP mit einer minimal-invasiven i. v. Injektion in die Schwanzvene appliziert. 18–24 Stunden später wurden die Mäuse eingeschläfert, die Tumoren entnommen, in ihrer Mitte geteilt und unverzüglich der Raman-Bildgebung zugeführt.

In der SERRS-basierten Bildgebung zeigten Tumoren mit einer hohen EGFR-Expression intensivere Raman-Signale als Tumoren mit einer niedrigen EGFR-Expression (*Abbildung 16*). Korrespondierend mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie waren die Unterschiede in der Intensität des Raman-Signals zwischen den aus den Zelllinien TS895 und A431 hervorgegangenen Tumoren deutlicher als zwischen den aus den Zelllinien U87 und U87EGFR stammenden Tumoren (*Abbildung 16*).

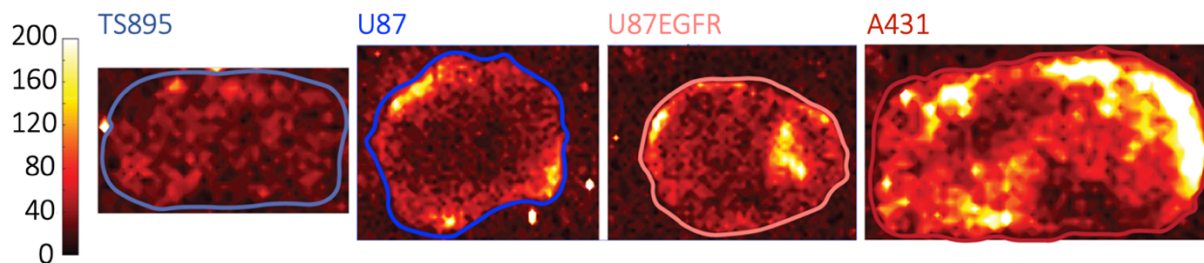


Abbildung 16: Raman-Bildgebung der Tumoren mit differenzieller Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) nach Applikation von Cetuximab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (Cetuximab-SERRS-NP)

Dargestellt sind Tumoren mit von links nach rechts ansteigender EGFR-Expression. Vor der Bildgebung wurden die Tumoren in der Mitte geteilt (2–4 mm Gewebedicke). Das Signal bei $950\text{--}960\text{ cm}^{-1}$ bildet die Verteilung des Zelloberflächenmarkers EGFR ab. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Nach der Bildgebung wurden aus den in Paraffin eingebetteten Tumoren sequenzielle Schnitte erstellt, die einer H&E- oder EGFR-IHC-Färbung zugeführt wurden. Die H&E-Färbung verdeutlichte das Wachstum der Tumorzellen (*Abbildung 17a*). In der IHC-Färbung wurde eine niedrige EGFR-Expression in den von den Zelllinien TS895 und U87 stammenden Tumoren nachgewiesen, während die aus den Zelllinien U87EGFR und A431 hervorgegangenen Tumoren eine hohe EGFR-Expression zeigten (*Abbildung 17b*).

Beachtet werden sollte, dass in Abhängigkeit von der optischen Konfiguration die Raman-Bildgebung Daten aus einer Brennebene mit einer Dicke von bis zu mehreren mm generiert, während die Signale in histologischen Schnitten auf eine durchschnittliche Schichtdicke von 5–7 μm begrenzt

sind. Die Unterschiede zwischen den Raman-Signalen von Tumoren mit hoher und niedriger EGFR-Expression stimmten mit den Messdaten der Durchflusszytometrie sowie der IHC überein.

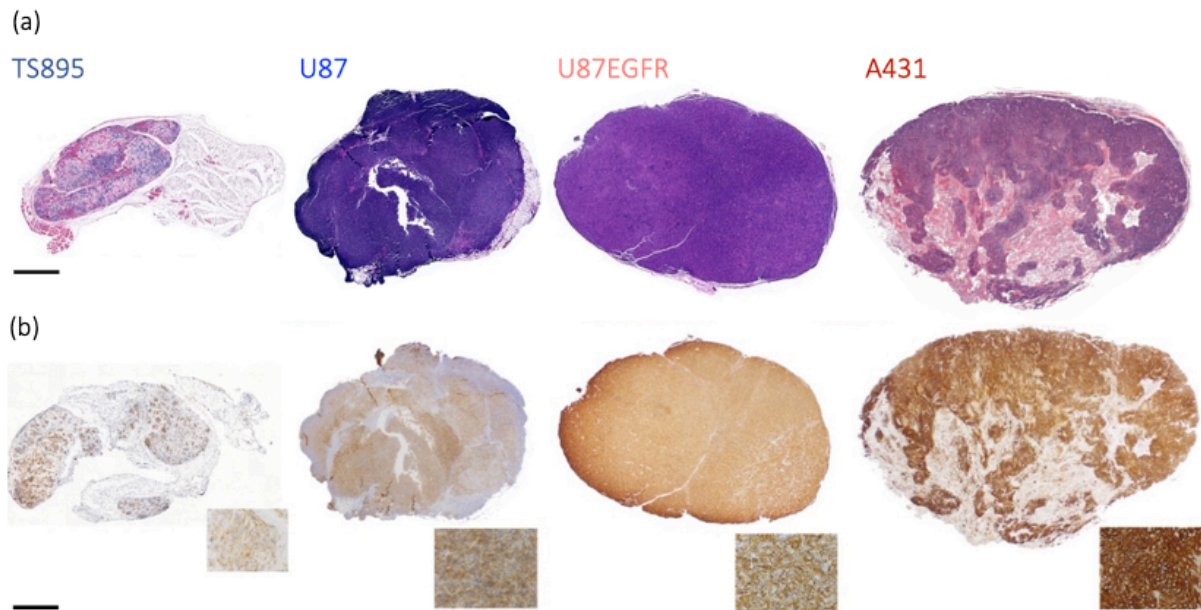


Abbildung 17: Histologische Evaluation der mittels Raman-Bildgebung untersuchten peripheren Tumoren mit differenzieller Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

(a) Die Hämatoxylin-und-Eosin(H&E)-Färbung bestätigte das Vorliegen von Tumorzellen. (b) Die Immunhistochemie(IHC)-Färbung zeigte eine mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie und der Raman-Bildgebung übereinstimmende EGFR-Expression. Die Maßstabskalen entsprechen 1 mm. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Der Durchschnittswert eines Raman-Signals jedes Tumors wurde ermittelt (*siehe Graphen in Abbildung 18a und Umrandungen in Abbildung 16, S. 39*), um ein repräsentatives Spektrum für jeden Tumor zu erhalten. Die Höhe der EGFR-Expression entsprach der Intensität der gemittelten Spektren. Die Raman-Spektren der Tumoren des ersten Modells (hohe EGFR-Expression: Zelllinie A431, dunkelrot vs. niedrige EGFR-Expression: Zelllinie TS895, hellblau) differierten stärker als die Raman-Spektren der Tumoren des zweiten Modells (hohe EGFR-Expression: Zelllinie U87EGFR, hellrot vs. niedrige EGFR-Expression: Zelllinie U87, dunkelblau) (*Abbildung 18a*). *Abbildung 18b* zeigt die unterschiedliche Signalintensität des für den Raman-Reporter IR780 charakteristischen Peaks bei $950-960\text{ cm}^{-1}$ in den verschiedenen Tumoren. Damit wurde verifiziert, dass Cetuximab-SERRS-NP Abstufungen in der EGFR-Expression unterscheiden können und damit eine relative Quantifizierung möglich ist.

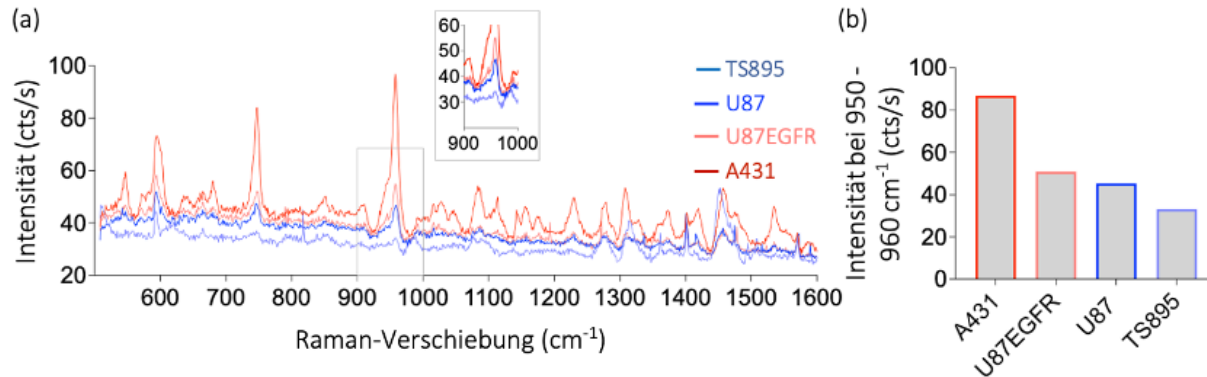


Abbildung 18: Raman-Signale der peripheren Tumoren mit differenzieller Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

(a) Dargestellt sind die gemittelten Raman-Signale der Tumoren der in Abbildung 17 mit Linien umschlossenen Areale. Die Intensität der Raman-Signale entspricht den EGFR-Expressionsniveaus der Durchflusszytometrie sowie der Immunhistochemie (IHC). Das vergrößerte Areal entspricht dem für den Raman-Reporter IR780 charakteristischen Peak bei 950–960 cm^{-1} . (b) Das Balkendiagramm zeigt die unterschiedliche Signalintensität des Peaks bei 950–960 cm^{-1} in Abhängigkeit von der EGFR-Expression. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, “Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging,” Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

4.3 Analyse des Expressionsniveaus des Tumormarkers HER2 mittels Trastuzumab-SERRS-Nanopartikeln in peripheren Tumoren

Zur Induktion eines peripheren Tumorwachstums wurde den Mäusen in den gegenüberliegenden Flanken eine Brustkrebszelllinie mit hoher (HCC1954) und eine mit niedriger (MDA-MB-468) HER2-Expression implantiert (*Abbildung 19b und siehe Tabelle 1, S. 29*). Die Durchflusszytometrie bestätigte die unterschiedlichen Niveaus der HER2-Expression (*Abbildung 19a*).

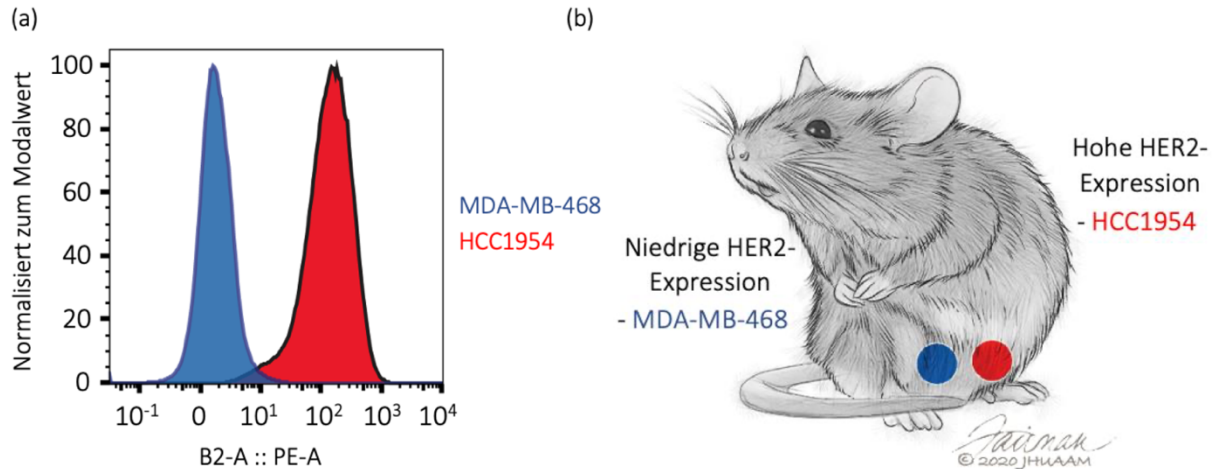


Abbildung 19: Nachweis Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) exprimierender Tumorzelllinien im Mausmodell für periphere Tumoren

ICR-Prkdc-*scid*-Mäuse* wurden Tumorzellen der Linien MDA-MB-468 und HCC1954 implantiert. (a) Das Niveau der HER2-Expression in den Tumorzellen wurde mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Die Zelllinien zeigten eine unterschiedliche HER2-Expression: MDA-MB-468 < HCC1954. (b) Die Tumorzelllinie mit niedriger HER2-Expression (MDA-MB-468) wurde in eine Flankenseite implantiert. In die gegenüberliegende Flankenseite derselben Maus wurde eine Tumorzelllinie mit hoher HER2-Expression (HCC1954) implantiert. Tumoren mit niedriger HER2-Expression n = 2, Tumoren mit hoher HER2-Expression n = 2. * ICR – Institute for Cancer Research; Prkdc – Protein Kinase DNA-Activated Catalytic Subunit; scid – severe combined immunodeficiency. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Nachdem die Tumoren zwei bis vier Wochen herangewachsen waren, erhielten die Tiere Trastuzumab-SERRS-NP über eine minimal-invasive i. v. Injektion in die Schwanzvene appliziert. 18–24 Stunden später wurden die Mäuse eingeschläfert, die Tumoren entnommen, in ihrer Mitte geteilt und unverzüglich der Raman-Bildgebung zugeführt.

Wie bei der EGFR-Raman-Bildgebung zeigten auch in diesem Fall Tumoren mit hoher HER2-Expression ein höheres Raman-Signal als solche mit niedriger HER2-Expression (*Abbildung 20a*). Nach der Bildgebung wurden aus den in Paraffin eingebetteten Tumoren sequenzielle Schnitte erstellt, die einer H&E- oder HER2-IHC-Färbung zugeführt wurden. Die H&E-Färbung (*Abbildung 20b*) belegte das Vorliegen von Tumorzellen. Die HER2-Expression war negativ in dem von der Zelllinie MDA-MB-468 abstammenden Tumor und deutlich positiv für den aus der Zelllinie HCC1954 hervorgegangenen Tumor (*Abbildung 20c*).

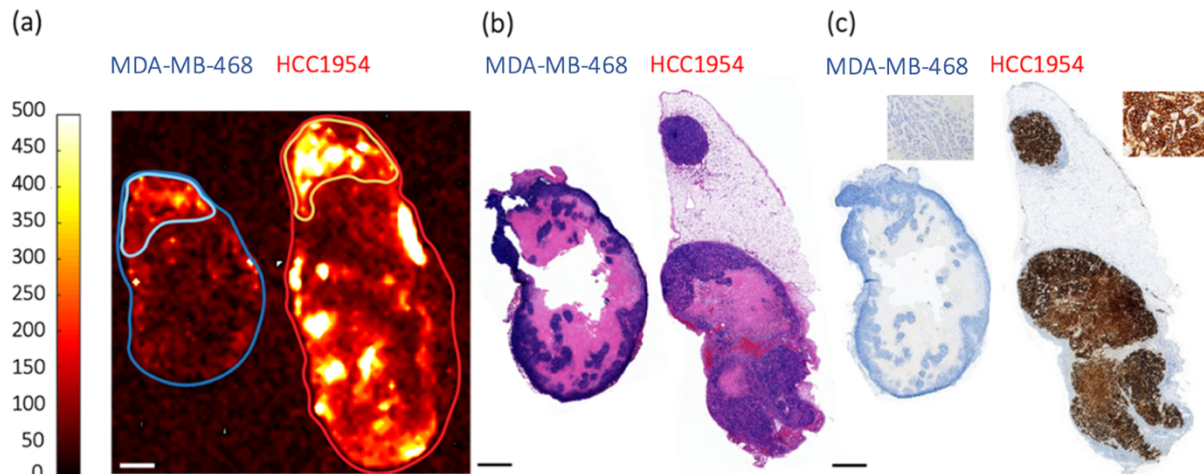


Abbildung 20: Raman-Bildgebung der Tumoren mit differenzieller Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) nach Applikation von Trastuzumab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (Trastuzumab-SERRS-NP) und histologische Evaluation der mittels Raman-Bildgebung untersuchten Tumoren

(a) Dargestellt sind Tumoren mit niedriger (blaue Umrandung) und hoher (rote Umrandung) HER2-Expression. Vor der Bildgebung wurden die Tumoren in ihrer Mitte geteilt (2–4 mm Gewebedicke). Die Untersuchung des Raman-Signalpeaks bei 950–960 cm^{-1} entsprach der Verteilung des Zelloberflächenmarkers HER2. (b) Die Hämatoxylin- und Eosin(H&E)-Färbung bestätigte das Vorliegen von Tumorzellen. (c) In der Immunhistochemie(IHC)-Färbung war HER2 in dem von der Zelllinie mit niedriger HER2-Expression stammenden Tumor nicht nachweisbar. Tumoren, die von der Zelllinie mit hoher HER2-Expression stammten, zeigten eine intensive Färbung. Die Ergebnisse stimmten mit den Daten der Durchflusszytometrie und der Raman-Bildgebung überein. Die Maßstabskalen entsprechen 1 mm. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Die Analyse der jeweiligen Raman-Spektren (Mittelwerte der angegebenen Areale in *Abbildung 20a*) zeigte, dass sich die differenzielle HER2-Expression auch in den unterschiedlichen Intensitäten der Raman-Spektren widerspiegelte (*Abbildung 21a*). Areale des Tumors mit niedriger HER2-Expression, die in der IHC-Färbung negativ erschienen, zeigten ein moderates Raman-Signal. Die Raman-Bildgebung enthält Signale aus einer Schichtdicke von mehreren mm, während die IHC-Nachweise auf eine durchschnittliche Schichtdicke von 5–7 μm limitiert sind. Daher ist es möglich, dass Raman-Signale aus einer tieferen Schicht stammten, die bei der IHC nicht erfasst wurden.

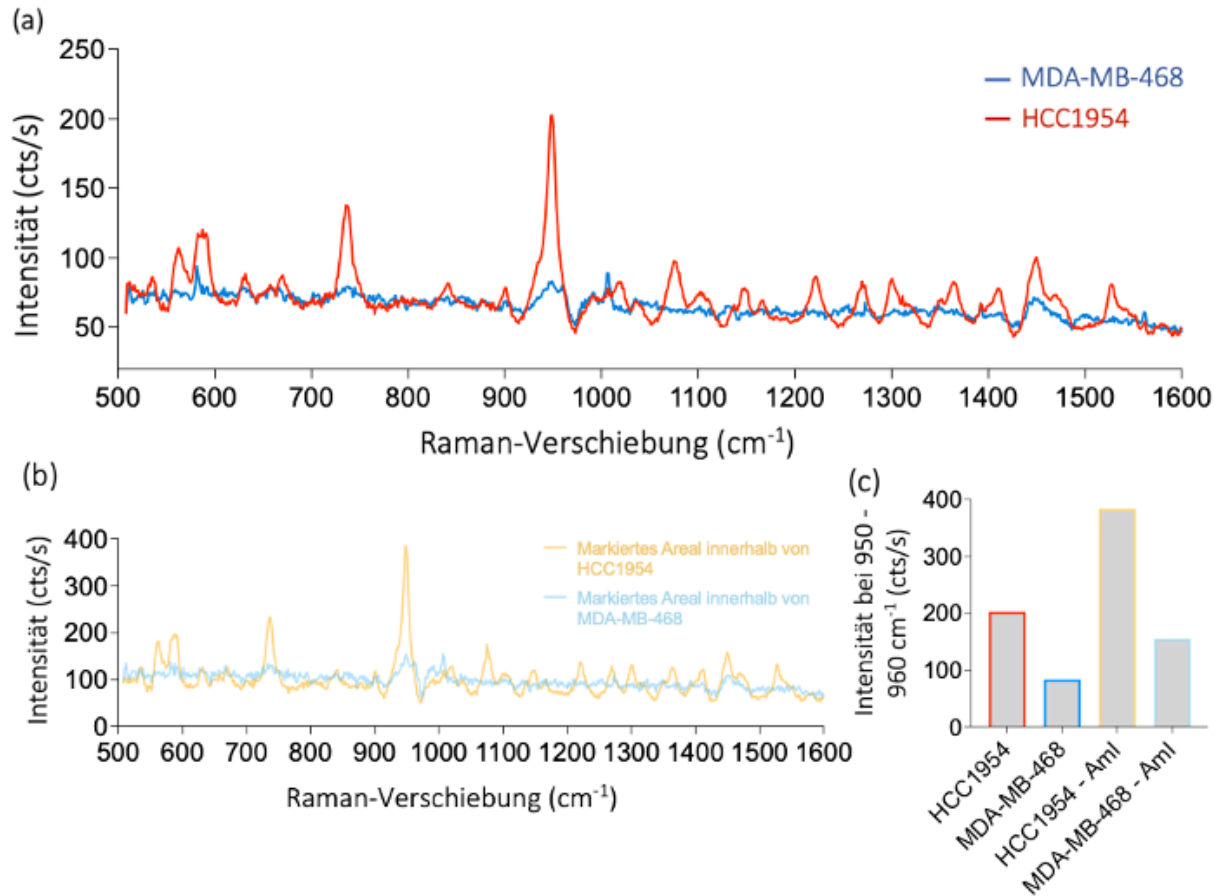


Abbildung 21: Raman-Signale der peripheren Tumoren mit differenzieller Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)

(a) Dargestellt sind die gemittelten Raman-Signale der Tumoren der in Abbildung 20a mit Linien umschlossenen Areale (rot/blau). Die Intensität der Raman-Signale entspricht den HER2-Expressionsniveaus der Durchflusszytometrie sowie der Immunhistochemie (IHC). (b) Die Raman-Signale (hellblau und gelb) entsprechen den in Abbildung 20a umrandeten Arealen höherer Signalintensität innerhalb der Tumoren mit niedriger bzw. hoher HER2-Expression (c) Das Balkendiagramm zeigt die unterschiedliche Signalintensität des Peaks bei 950–960 cm⁻¹ in Abhängigkeit von der HER2-Expression. Es bestehen deutliche Unterschiede zwischen Tumoren mit hoher (rote Umrandung) und niedriger (blaue Umrandung) HER2-Expression sowie Arealen mit maximaler Intensität (Aml) in Tumoren mit hoher (gelbe Umrandung) und niedriger (hellblaue Umrandung) HER2-Expression. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Die Areale mit moderater Intensität innerhalb des Tumors mit einer niedrigen HER2-Expression (hellblaue Umrandung, *siehe Abbildung 20a*) zeigten eine signifikant niedrigere Raman-Signalintensität als Areale hoher Intensität innerhalb des Tumors mit einer hohen HER2-Expression (gelbe Umrandung, *siehe Abbildung 20a*, korrespondierendes Raman-Spektrum, *siehe Abbildung 21b*). Die Daten belegen, dass Antikörper-tragende SERRS-NP das Potenzial besitzen, eine differenzielle Expression von Oberflächenmarkern zuverlässig in verschiedenen Tumorentitäten zu erfassen.

4.4 Analyse des Expressionsniveaus des Tumormarkers EGFR mittels Cetuximab-SERRS-Nanopartikeln in intrazerebralen Tumoren

Zum Nachweis, ob Cetuximab-SERRS-NP auch im intrazerebralen Kontext zwischen einer hohen und einer niedrigen EGFR-Expression unterscheiden können, wurden in beide Hemisphären von ICR-Prkdc-<scid>-Mäusen Tumorzelllinien mit hoher (A431, U87EGFR) bzw. niedriger (TS895, U87) EGFR-Expression implantiert (*Abbildung 22a und siehe Tabelle 1, S. 29*). Die EGFR-exprimierenden Tumoren wurden mittels MRT in Intervallen von ein bis zwei Wochen, beginnend vier Wochen nach der Implantation, nachverfolgt (*Abbildung 22b*).

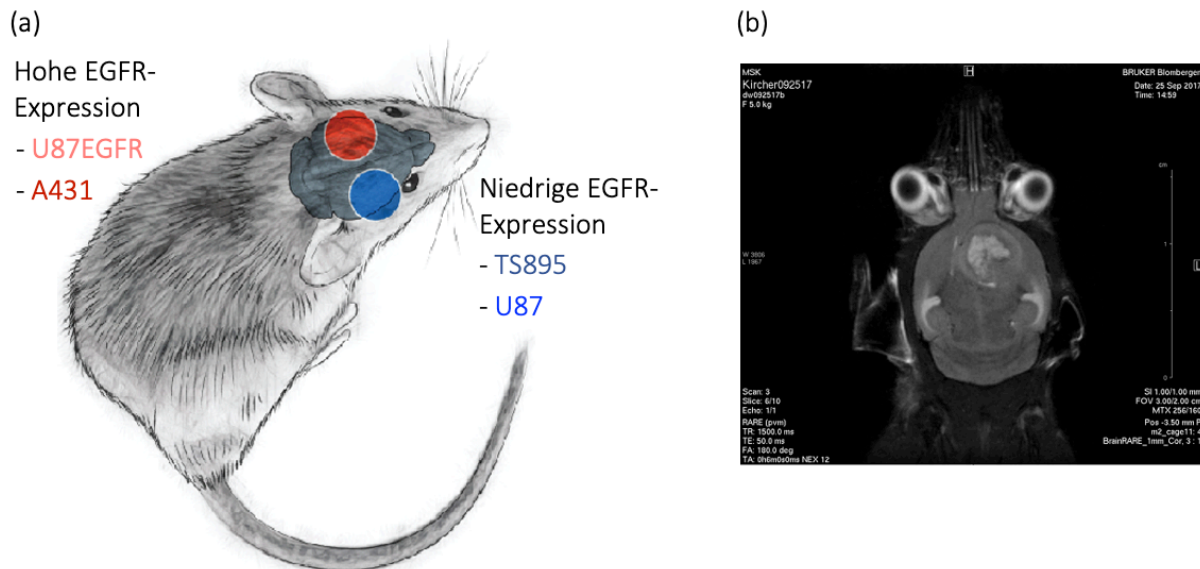


Abbildung 22: Nachweis Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) exprimierender Tumorzelllinien im Mausmodell für intrazerebrale Tumoren

(a) Orthotope primäre und sekundäre Gehirntumormodelle wurden mittels stereotaktischer Implantation von Tumorzelllinien mit hoher (A431 bzw. U87EGFR) bzw. niedriger (TS895 bzw. U87) EGFR-Expression in je eine Hemisphäre von ICR-Prkdc-<scid>-Mäusen* etabliert. (b) Magnetresonanztomographie(MRT)-Bild fünf Wochen nach der Implantation von A431 (n = 8) und TS895 (n = 3) Tumorzellen. * ICR – Institute for Cancer Research; Prkdc – Protein Kinase DNA-Activated Catalytic Subunit; scid – severe combined immunodeficiency. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, “Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging,” Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Die Ergebnisse der EGFR-SERRS-basierten Raman-Bildgebung für die Zelllinien A431 und TS895 sind in *Abbildung 23a* dargestellt.

Die Mäuse wurden 14–18 Stunden nach der Injektion der Cetuximab-SERRS-NP eingeschläfert. Die entnommenen Gehirne wurden entweder im Ganzen oder in koronaren Schnitten der SERRS-

basierten Raman-Bildgebung zugeführt. Bei der Verwendung koronarer Schnitte (*Abbildung 23*) wurde das Gehirn vor der Schnittgenerierung (0,5–1,5 mm) für circa 45 Minuten in Formaldehyd fixiert.

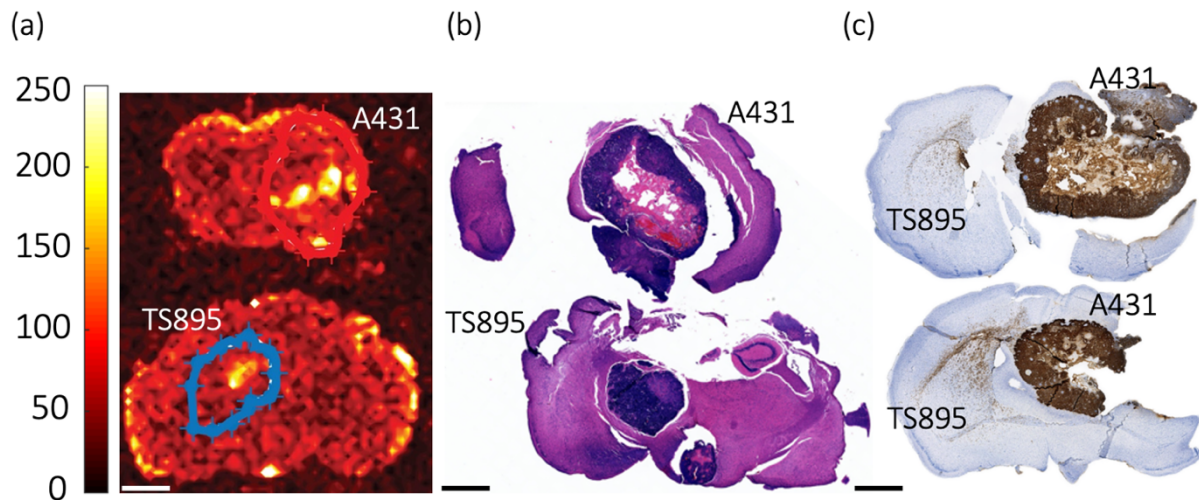


Abbildung 23: Raman-Bildgebung und histologische Evaluation der Tumoren mit differenzieller Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) nach Applikation von Cetuximab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (Cetuximab-SERRS-NP)

(a) Raman-Bildgebung der koronaren Gehirnschnitte einer mit Cetuximab-SERRS-NP injizierten Maus mit Tumoren mit hoher und niedriger EGFR-Expression. (b) Die Hämatoxylin-und-Eosin(H&E)-Färbung bestätigt das Tumorstadium in beiden Hemisphären. (c) Die Immunhistochemie(IHC)-Färbung für EGFR zeigt die differenzielle EGFR-Expression der beiden Tumoren. Die Maßstabskalen entsprechen 1 mm. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Tumoren mit hoher EGFR-Expression zeigten eine höhere Raman-Signalintensität als ihre Pendanten mit niedriger EGFR-Expression in der kontralateralen Hemisphäre (*Abbildung 23a*). Die per SERRS-basierter Bildgebung untersuchten Gehirne wurden anschließend fixiert, in Paraffin eingebettet, sequenziell geschnitten, mit H&E gefärbt sowie für die EGFR-spezifische IHC-Färbung prozessiert. Die H&E-Färbung (*Abbildung 23b*) belegte das Vorliegen von Tumorzellen. Die IHC-Färbung bestätigte die hohe Expression in den aus der Zelllinie mit einer hohen EGFR-Expression (A431) hervorgegangenen Tumoren und die niedrige Expression in den aus der Zelllinie mit einer niedrigen EGFR-Expression (TS895) stammenden Tumoren (*Abbildung 23c*).

Die Analyse der Raman-Spektren ergab, dass sich die differierenden EGFR-Expressionsniveaus in den Intensitäten der Raman-Spektren widerspiegeln. Tumoren mit höherer EGFR-Expression (rotes Raman-Spektrum) zeigten höhere Intensitäten als solche mit niedrigerer EGFR-Expression (blaues Raman-Spektrum) (*Abbildung 24a*). Allerdings war die Differenz geringer ausgeprägt als

in peripher gelegenen Tumoren. Das Balkendiagramm visualisiert die Signaldifferenz (*Abbildung 24b*) des für den Raman-Reporter IR780 charakteristischen Signalpeaks bei 950–960 cm^{-1} . Zusammengefasst belegen die Ergebnisse, dass sich mit Cetuximab-SERRS-NP verschiedene EGFR-Expressionsniveaus sowohl in der Peripherie als auch intrazerebral erfassen lassen.

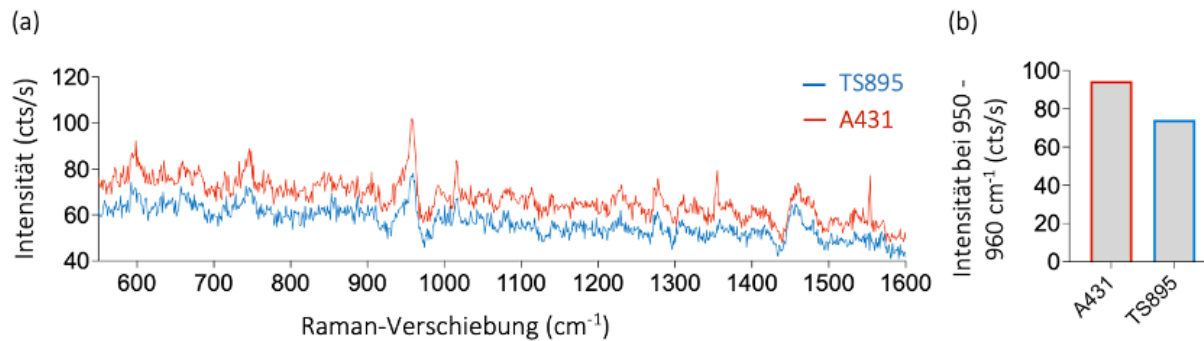


Abbildung 24: Raman-Signale der intrazerebralen Tumoren mit differenzieller Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

(a) Dargestellt sind die gemittelten Raman-Signale der Tumoren der in *Abbildung 23a* mit Linien umschlossenen Areale (rot/blau). Die Intensität der Raman-Signale entspricht den EGFR-Expressionsniveaus der Durchflusszytometrie (*Abbildung 15*) sowie der Immunhistochemie (IHC). (b) Das Balkendiagramm zeigt die Signaldifferenz der charakteristischen Signalintensität des Peaks bei 950–960 cm^{-1} und visualisiert die differenzielle Signalintensität mit abnehmender EGFR-Expression. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

4.5 Analyse des Expressionsniveaus des Tumormarkers HER2 mittels Trastuzumab-SERRS-Nanopartikeln in intrazerebralen Tumoren

Im Folgenden wurden HER2-exprimierende Tumoren in einem intrazerebralen Brustkrebsmetastasenmodell untersucht. ICR-Prkdc- $\langle\text{scid}\rangle$ -Mäusen wurden Tumorzelllinien mit hoher (HCC1954) und Tumorzelllinien mit niedriger HER2-Expression (MDA-MB-468) in die gegenüberliegenden Hemisphären implantiert (*Abbildung 25a* und siehe *Tabelle 1, S. 29*). Das Tumorstadium wurde mittels MRT-Bildgebungen ab der vierten Woche nach der Implantation in ein- bis zweiwöchigen Intervallen beobachtet (*Abbildung 25b*).

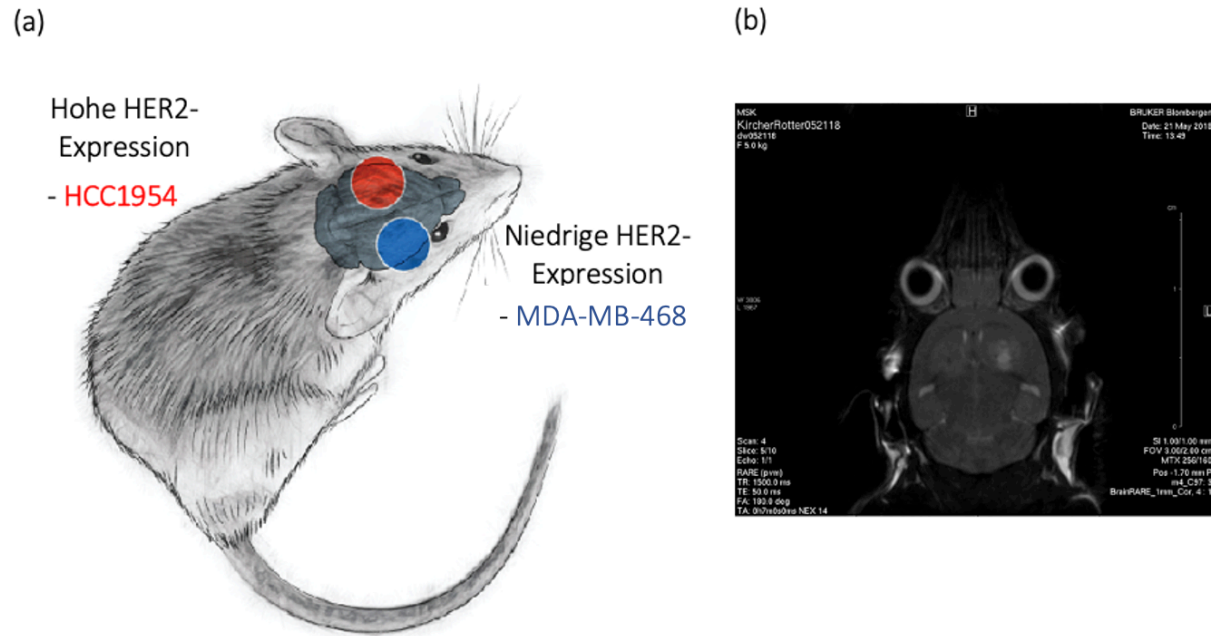


Abbildung 25: Nachweis Human Epidermal Growth Factor 2 (HER2) exprimierender Tumorzelllinien im Mausmodell für intrazerebrale Tumoren

(a) Orthotope sekundäre Gehirntumormodelle wurden mittels stereotaktischer Implantation von Tumorzelllinien mit hoher (HCC1954) bzw. niedriger (MDA-MB-468) HER2-Expression in je eine Hemisphäre von ICR-Prkdc-<scid>-Mäusen* etabliert. (b) Magnetresonanztomographie(MRT)-Bild vier Wochen nach der Implantation von HCC1954 (n = 3) und MDA-MB-468 (n = 3) Tumorzellen. * ICR – Institute for Cancer Research; Prkdc – Protein Kinase DNA-Activated Catalytic Subunit; scid – severe combined immunodeficiency. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, “Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging,” Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Die von der HCC1954-Zelllinie abstammenden Tumoren zeigten eine deutlich höhere Wachstumsrate als Tumoren, die aus den Zelllinien MDA-MB-468 sowie A431 und TS895 hervorgegangen waren (*Abbildung 25 und Abbildung 22, S. 45*).

18–24 Stunden nach der minimal-invasiven i. v. Injektion von Trastuzumab-SERRS-NP in die Schwanzvene wurden die Tiere eingeschläfert. Nach Entnahme der Gehirne wurden diese im Ganzen oder in koronaren Schnitten der SERRS-basierten Raman-Bildgebung zugeführt. *Abbildung 26a* zeigt die SERRS-basierte Raman-Bildgebung eines intakten Gehirns. Für die koronaren Schnitte (0,5–1,5 mm Schnittstärke) wurden die Gehirne zuvor für circa 45 Minuten in Formaldehyd fixiert. Die Raman-Signale zeigten eine deutlich höhere Intensität bei Tumoren mit hoher HER2-Expression im Vergleich zu denen mit niedriger HER2-Expression in der kontralateralen Hemisphäre (*Abbildung 26a*).

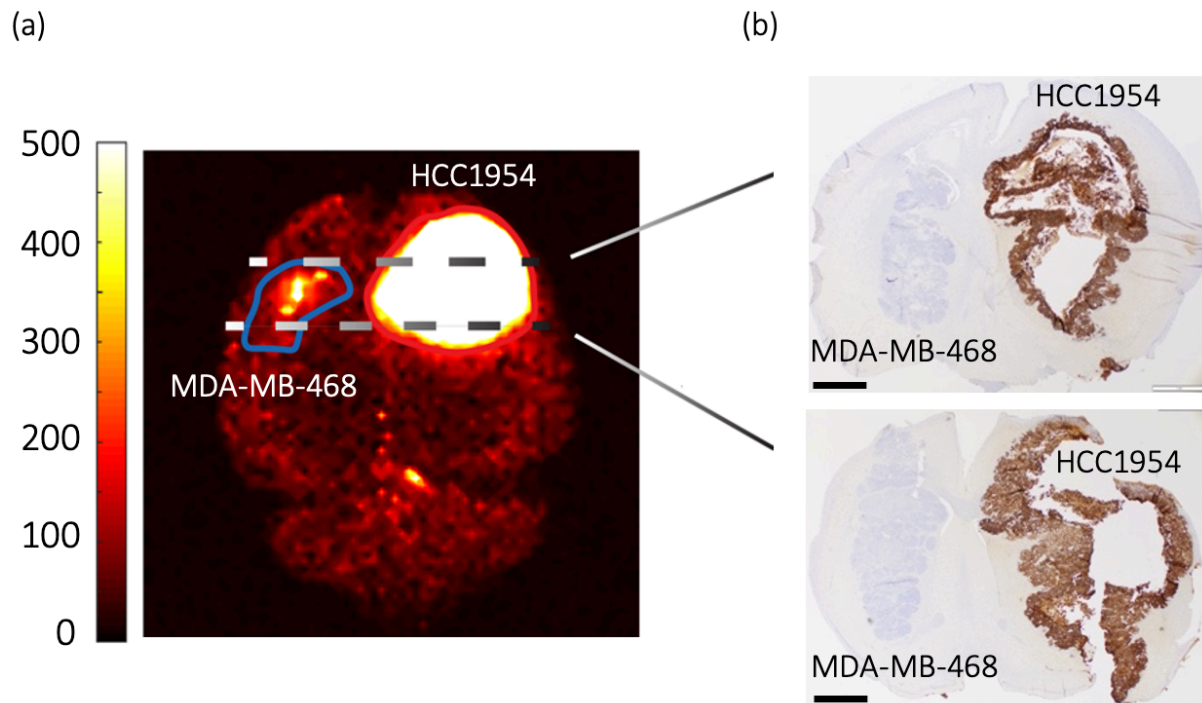


Abbildung 26: Raman-Bildgebung und histologische Evaluation der Tumoren mit differenzieller Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) nach Applikation von Trastuzumab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (Trastuzumab-SERRS-NP)

(a) Raman-Bildgebung des ganzen Gehirns einer mit Trastuzumab-SERRS-NP injizierten Maus mit Gehirntumoren mit hoher und niedriger HER2-Expression. (b) Die Immunhistochemie(IHC)-Färbung für HER2 zeigt die differenzielle HER2-Expression der beiden Tumoren. Die gestrichelten Linien entsprechen der Schnittebene des jeweiligen histologischen Schnitts. Die Maßstabskalen entsprechen 1 mm. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Nach der Raman-Bildgebung wurden die Gehirne fixiert, in Paraffin eingebettet, sequenziell geschnitten sowie aufgrund der bei der EGFR-Evaluation beobachteten Gewebefragilität direkt der HER2-IHC-Analyse zugeführt. Die IHC-Färbung bestätigte die hohe Expression in den Brustkrebsmetastasen, die aus der Zelllinie HCC1954 hervorgegangen waren, und die niedrige Expression in den Brustkrebsmetastasen, die der Zelllinie MDA-MB-468 entstammten (*Abbildung 26b*). Die Analyse der Raman-Spektren (Durchschnittswert der farblich markierten Areale aus *Abbildung 26a*) zeigte, dass sich die differierenden HER2-Expressionsniveaus in den Intensitäten der Raman-Spektren widerspiegeln. Das Raman-Spektrum der Brustkrebsmetastasen mit höherer HER2-Expression (rot) wies deutlich höhere Intensitäten auf als das der Brustkrebsmetastasen mit niedrigerer HER2-Expression (blau) (*Abbildung 27*). In dem Balkendiagramm ist der charakteristische Signalpeak für den Raman-Reporter IR780 bei $950\text{--}960\text{ cm}^{-1}$ dargestellt (*Abbildung 27b*). Die erheblichen Divergenzen in der Intensität der Raman-Signale entsprachen den Ergebnissen der IHC.

Die Unterschiede im Intensitätsniveau der Raman-Spektren waren im verwendeten HER2-Modell wesentlich deutlicher als in dem EGFR-Modell (*Abbildung 27 und Abbildung 24, S. 47*). Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen der IHC-Analysen. Die Tumoren mit einer hohen EGFR-Expression zeigten gegenüber solchen mit einer hohen HER2-Expression eine geringere Färbeintensität.

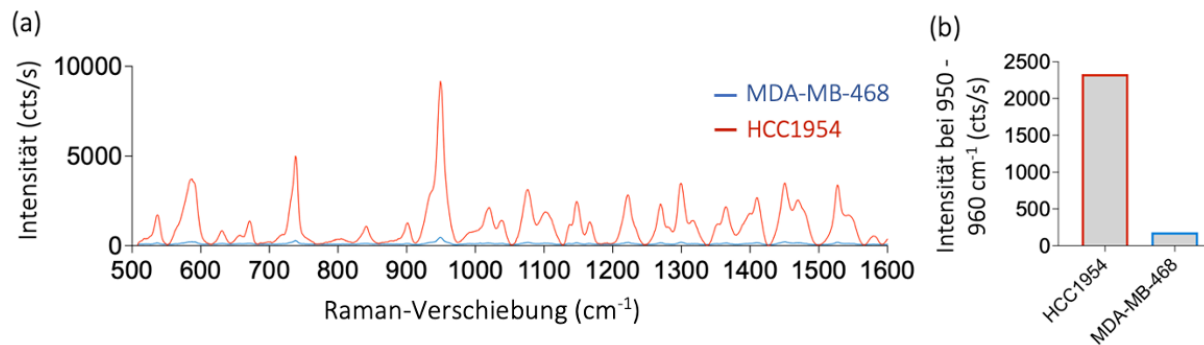


Abbildung 27: Raman-Signale der intrazerebralen Tumoren mit differenzieller Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)

(a) Dargestellt sind die gemittelten Raman-Signale der Tumoren der in Abbildung 26 mit Linien umschlossenen Areale (rot/blau). Die Intensität der Raman-Signale entspricht den HER2-Expressionsniveaus der Durchflusszytometrie (Abbildung 19) sowie der Immunhistochemie (IHC). (b) Das Balkendiagramm zeigt die Signaldifferenz der charakteristischen Signalhöhe bei 950–960 cm⁻¹ und visualisiert die differenzielle Signalintensität mit abnehmender HER2-Expression. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

4.6 Nachweis des Tumormarkers HER2 mittels Trastuzumab-SERRS-Nanopartikeln in vivo

Zur Evaluation eines möglichen minimal-invasiven Einsatzes der Methode wurde überprüft, ob intrazerebral gelegene Tumoren durch die Haut und den Schädelknochen in einer lebenden Maus nachweisbar sind. Wie zuvor beschrieben, wurde das Tumorwachstum durch die Implantation von Brustkrebszellen (HCC1954) induziert. Bei erfolgreichem Tumorwachstum wurden die Trastuzumab-SERRS-NP mittels einer minimal-invasiven i. v. Injektion appliziert.

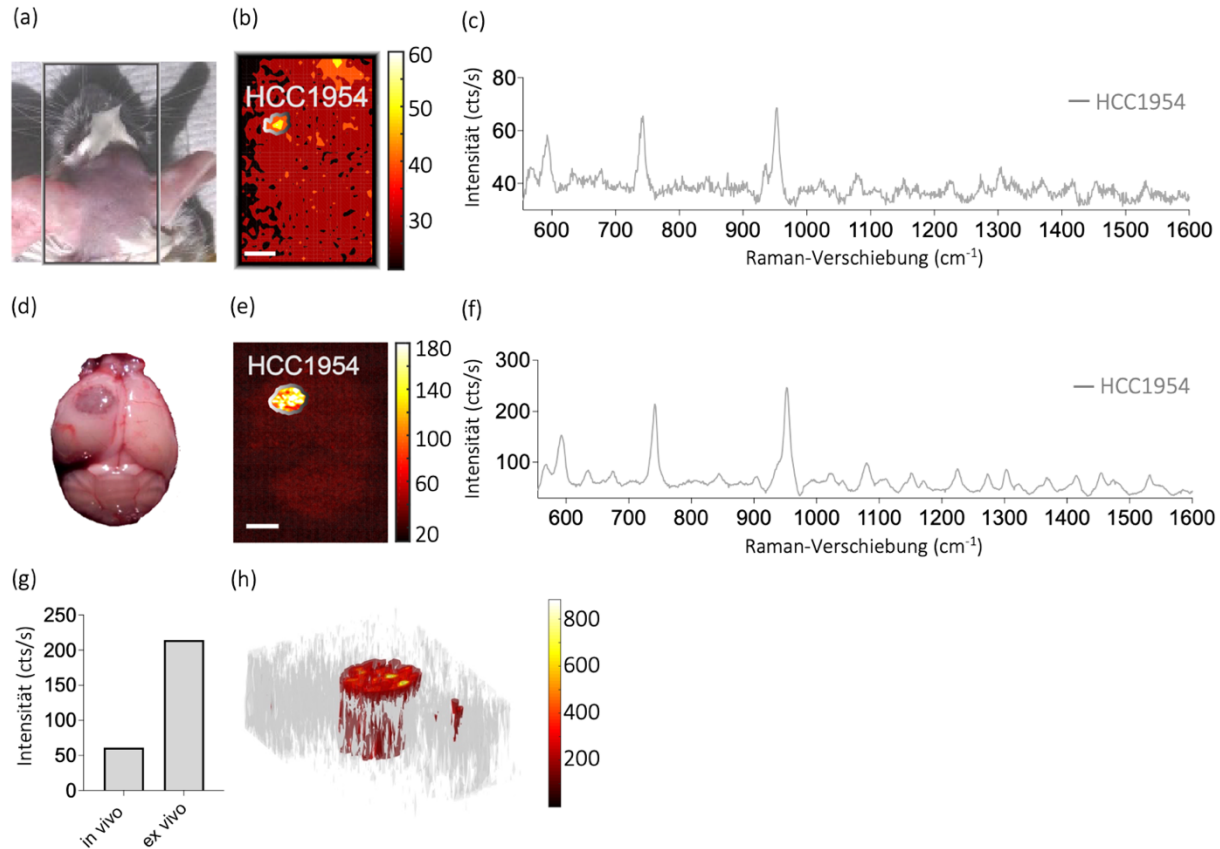


Abbildung 28: Nichtinvasive In-vivo-Raman-Bildgebung eines Tumors mit einer hohen Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) nach Applikation von Trastuzumab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (Trastuzumab-SERRS-NP)

(a) 18–24 Stunden nach der Injektion von Trastuzumab-SERRS-NP wurde das Kopfhair der Maus für die Raman-Bildgebung entfernt. (b) Die Raman-Bildgebung konnte die Trastuzumab-SERRS-NP durch die intakte Haut und den Schädel der Maus nachweisen. (c) Das Raman-Signal des in (b) umrandeten Areals entsprach der Raman-Signatur der Trastuzumab-SERRS-NP. (d-f) Die Ergebnisse von (b-c) wurden mit einer Ex-vivo-Raman-Bildgebung des Gehirns bestätigt. (g) Das Balkendiagramm visualisiert die höhere Signalintensität der Ex-vivo-Bildgebung gegenüber der In-vivo-Bildgebung. (h) 3D-Rekonstruktion der Raman-Daten des untersuchten Tumors. Die Maßstabskalen entsprechen 1 mm. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, “Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging,” Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Vor der Bildgebung erhielt die Maus eine auf Ketamin (15 mg/ml) und Xylazin (1,5 mg/ml) basierende, intraperitoneal applizierte Anästhesie.

Wie *Abbildung 28* zeigt, ließ sich der Tumor im lebenden Organismus durch die intakte Haut und den intakten Schädel darstellen. Wie erwartet, zeigte die In-vivo-Bildgebung einen deutlichen Signalverlust im Vergleich zur Bildgebung des intrazerebralen Tumors ex vivo. Zur Illustration der Signalspezifität wurde die SERRS-basierte Raman-Bildgebung mit Modifikation der Fokalebene durch Bewegung der Bühne des Raman-Spektroskops (*Abbildung 10, S. 31*) in 1-mm-Schritten

wiederholt. Dabei wurde die erste Bildgebung bei -1500 μm unterhalb der Gehirnoberfläche durchgeführt, die letzte bei -4500 μm . Die Tumorsäule grenzte sich deutlich gegenüber dem umliegenden gesunden Gehirnparenchym (grau schattiert) ab (*Abbildung 28h*).

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass mit Antikörpern funktionalisierte SERRS-NP eine In-vivo-Bildgebung durch den intakten Schädel erlauben.

4.7 Analyse des Expressionsniveaus des Tumormarkers EGFR und Nachweis der intratumoralen Heterogenität mittels Cetuximab-SERRS-Nanopartikeln in peripheren Tumoren

Die vorangegangenen Versuche belegen, dass die durch Antikörper-tragende SERRS-NP ausgelösten Raman-Signale Tumoren mit einer hohen und einer niedrigen Expression von Zelloberflächenmarkern unterscheiden können (relative Quantifizierung). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob diese SERRS-NP dazu genutzt werden können, die intratumorale Heterogenität der Zelloberflächenmarker-Expression zu erfassen. Zu diesem Zweck wurden die Raman-Bildgebungsdaten (*Abbildung 29a*) und die IHC-Daten (*Abbildung 29b*) von Tumoren mit hoher EGFR-Expression analysiert.

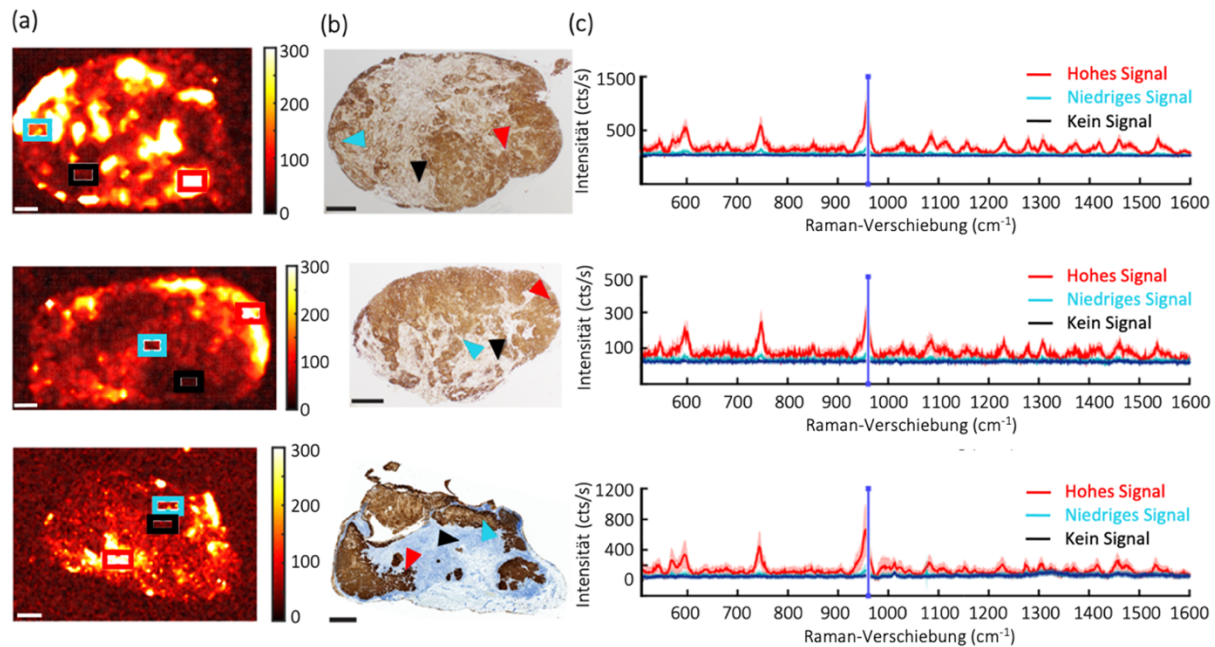


Abbildung 29: Intratumorale Heterogenität in Tumoren mit einer hohen Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

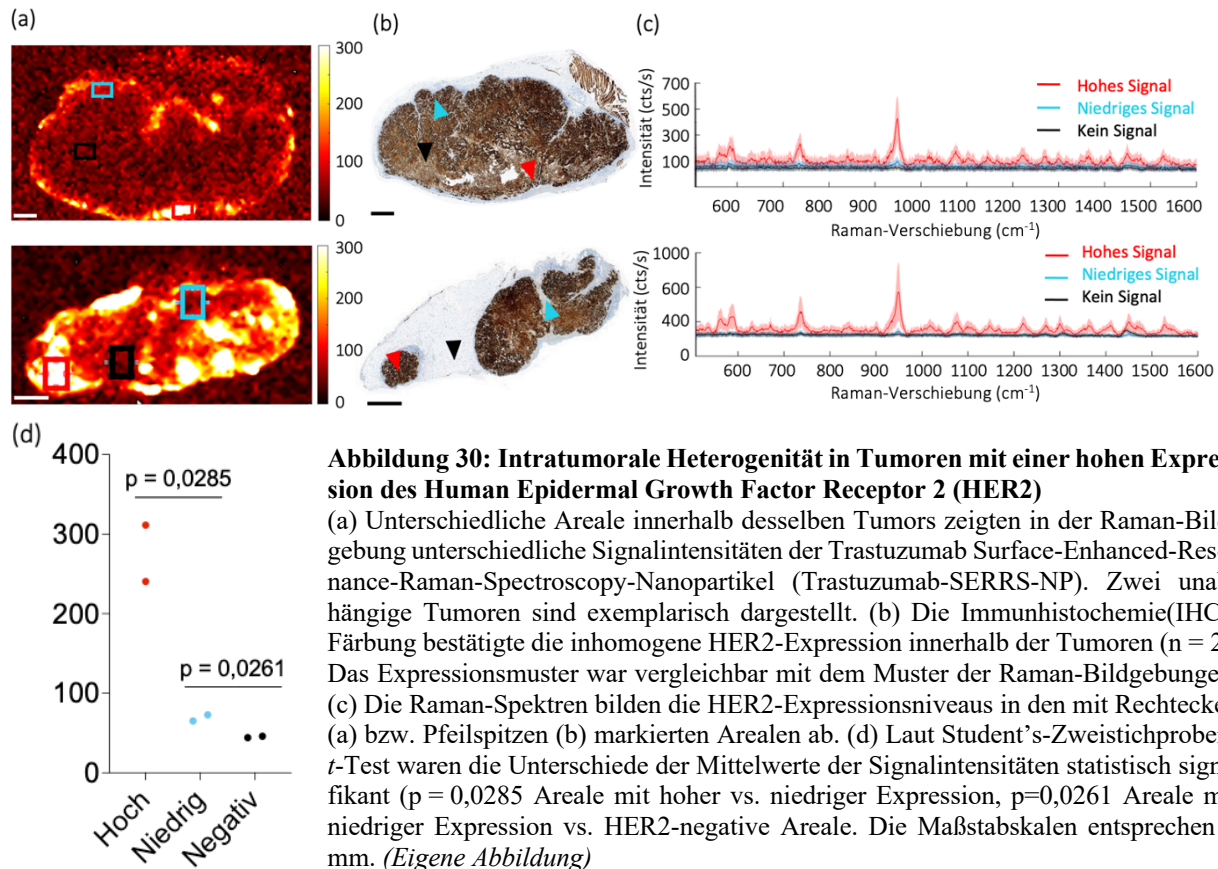
(a) Unterschiedliche Areale innerhalb desselben Tumors zeigten in der Raman-Bildgebung verschiedene Signalintensitäten der Cetuximab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikel (Cetuximab-SERRS-NP). Drei unabhängige Tumoren sind exemplarisch dargestellt. (b) Die Immunhistochemie(IHC)-Färbung bestätigte die inhomogene EGFR-Expression innerhalb der Tumoren (n = 8). Das Expressionsmuster war vergleichbar mit dem Muster der Raman-Bildgebungen. (c) Die Raman-Spektren bildeten die EGFR-Expressionsniveaus in den mit Rechtecken (a) bzw. Pfeilspitzen (b) markierten Arealen ab. (d) Laut Student's-Zweistichproben-t-Test waren die Unterschiede der Mittelwerte der Signalintensitäten statistisch signifikant ($p = 0,0428$ Areale mit hoher vs. niedriger Expression, $p = 0,0118$ Areale mit niedriger Expression vs. EGFR-negative Areale). Die Maßstabskalen entsprechen 1 mm. *Veröffentlicht in und modifiziert nach: L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," Nanotheranostics, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.*

Die Raman-Signale von verschiedenen Tumorarealen wurden gemittelt (Abbildung 29c). Erhoben wurden Raman-Spektren aus Arealen mit hohen und niedrigen SERRS-NP-Signalen sowie aus Raman-Signal-negativen Arealen (rote, cyan-farbene und schwarze Umrandungen in Abbildung 29a, Pfeilkopfspitzen in Abbildung 29b). Die Spektren der durchschnittlichen Raman-Signale der Areale wurden für jedes Beispiel nach der Subtraktion des Grundsignals aus 70 individuellen Punkt-Spektren innerhalb der dargestellten Rechtecke ($1500 \times 900 \mu\text{m}^2$) gebildet. Für jedes Spektrum wurde die durchschnittliche Intensität zwischen 950 und 960 cm^{-1} (einschließlich des Maximums des Raman-Spektrums) analysiert.

Areale mit hoher EGFR-Expression zeigten Intensitäten von über 200 cts/s, wohingegen Areale mit niedriger Expression lediglich Intensitäten im Bereich von 100 cts/s erreichten (*Abbildung 29d*). Die Intensitäten im Bereich von 50 cts/s der Areale mit als negativ eingestufte EGFR-Expression entsprachen dem Hintergrundsignal und der Störsignalrektifikation im Zuge der Grundsignalabstraktion. Die ermittelten Signale pro Sekunde (cts/s) hängen von der verwendeten Bildgebungssystemkonfiguration ab (z. B. verwendete Optik, Akquisitionszeit) und sind daher arbiträr. Bei konstanten Einstellungen liefert die Methode bei vergleichenden Analysen quantitative Informationen zu den mittels IHC erhobenen qualitativen Informationen. Laut Student's-Zwei-stichproben-*t*-Test unterschieden sich die Differenzen der Durchschnittswerte der Intensitäten signifikant ($p = 0,0428$ Areale mit hoher vs. Areale mit niedriger EGFR-Expression; $p = 0,0118$ Areale mit niedriger EGFR-Expression vs. Areale mit als negativ eingestufte EGFR-Expression). Die Daten belegen, dass Raman-Signale von Antikörper-tragenden SERRS-NP genutzt werden können, um Areale mit hoher, niedriger und fehlender EGFR-Expression zu unterscheiden.

4.8 Analyse des Expressionsniveaus des Tumormarkers HER2 und Nachweis der intratumoralen Heterogenität mittels Trastuzumab-SERRS-Nanopartikeln in peripheren Tumoren

Nach dem Nachweis der Eignung von Cetuximab-SERRS-NP für die Darstellung der intratumoralen Heterogenität des Zelloberflächenmarkers EGFR wurde analog die Eignung von Trastuzumab-SERRS-NP zum Nachweis der intratumoralen Heterogenität des Zelloberflächenmarkers HER2 untersucht. Die Raman-Bildgebungsdaten von Tumoren mit hoher HER2-Expression (*Abbildung 30a*) wurden durch die anschließende IHC-Analyse der HER2-Expression bestätigt (*Abbildung 30b*).



Die Raman-Signale von verschiedenen Tumoren wurden gemittelt (*Abbildung 30c*). Erhoben wurden Raman-Spektren aus Arealen mit hohen und niedrigen SERRS-NP-Signalen sowie aus Raman-Signal-negativen Arealen (rote, cyan-farbene und schwarze Umrandungen in *Abbildung 30a*, Pfeilkopfspitzen in *Abbildung 30b*). Die Spektren der Durchschnittswerte der Raman-Signale der jeweiligen Areale wurden für jedes Beispiel nach der Abstraktion des Grundsignals aus 50 individuellen Punkt-Spektren innerhalb der dargestellten Rechtecke ($1000 \times 600 \mu\text{m}^2$) gebildet. Für jedes Spektrum wurde die durchschnittliche Intensität zwischen 950 und 960 cm^{-1} (einschließlich des Maximums des Raman-Spektrums) analysiert. Areale mit hoher HER2-Expression zeigten Intensitäten im Bereich von 200 cts/s , solche mit niedriger Expression Intensitäten im Bereich von 50 cts/s (*Abbildung 30d*). Die Intensitäten im Bereich von 50 cts/s der Areale mit als negativ eingestufte HER2-Expression entsprachen dem Hintergrundsignal und der Störsignalrektifikation im Zuge der Grundsignalabstraktion. Die ermittelten Signale pro Sekunde (cts/s) hängen von der verwendeten Bildgebungssystemkonfiguration ab (z. B. verwendete Optik, Akquisitionszeit) und sind daher arbiträr. Bei konstanten Einstellungen liefert die Methode bei vergleichenden Analysen

quantitative Informationen zu den mittels IHC erhobenen qualitativen Informationen. Laut Student's-Zweistichproben-*t*-Test unterschieden sich die Differenzen der Durchschnittswerte der Intensitäten signifikant ($p = 0,0285$ Areale mit hoher vs. Areale mit niedriger HER2-Expression; $p = 0,0261$ Areale mit niedriger HER2-Expression vs. Areale mit als negativ eingestufte HER2-Expression).

4.9 Überblick über die Aufnahme von Antikörper-tragenden Nanopartikeln in Abhängigkeit vom EGFR- und HER2-Expressionsstatus und von der Lokalisation der Tumoren

In einem letzten Schritt wurden die Durchschnittswerte der Raman-Verschiebung bei $950\text{--}960\text{ cm}^{-1}$ aller untersuchten Tumoren miteinander verglichen, um zu überprüfen, ob die Differenzierungsfähigkeit der SERRS-NP auch bei einem globalen Vergleich sämtlicher analysierter Tumore erhalten blieb. Der Mittelwert der Intensität für peripher gelegene Tumoren betrug bei hoher bzw. niedriger EGFR-Expression $102,789\text{ cts/s}$ bzw. $48,585\text{ cts/s}$ und bei hoher bzw. niedriger HER2-Expression $98,596\text{ cts/s}$ bzw. $55,458\text{ cts/s}$ (*Abbildung 31a*). Für die zerebralen Tumoren lagen die Mittelwerte bei hoher bzw. niedriger EGFR-Expression bei $263,874\text{ cts/s}$ bzw. $71,817\text{ cts/s}$ (*Abbildung 31b*) und bei hoher bzw. niedriger HER2-Expression bei $2161,4\text{ cts/s}$ bzw. $224,157\text{ cts/s}$ (*Abbildung 31c*).

Damit wurde die Hypothese bestätigt, dass Cetuximab- bzw. Trastuzumab-SERRS-NP zwischen Tumoren mit hoher bzw. niedriger EGFR- und HER2-Expression unterscheiden können. Bei genauer Betrachtung der Datenpunkte der peripher (*Abbildung 31a*) und intrazerebral (*Abbildung 31b + c*) gelegenen Tumoren fiel jedoch auf, dass sich die Werte der Tumoren mit hoher und niedriger Expression zum Teil überschneiden. Hierzu ist zu bedenken, dass jeder Punkt den Mittelwert einer mehrere mm umfassenden Schichtdicke und somit den Durchschnittswert vieler „Zellschichten“ wiedergibt (*siehe Kapitel 5.4.2*). Für eine bessere Beurteilung des Einflusses des Herstellungsprozesses sowie des EPR-Effekts auf die Signalintensität erhielten die Datenpunkte, die von Tumoren derselben Maus stammten (Paarungen von Tumoren mit hoher bzw. niedriger EGFR- bzw. HER2-Expression), die gleiche Farbe. Schwarze Punkte entsprechen Tumoren, die aufgrund eines fehlenden Tumorwachstums kein direktes Pendant in derselben Maus aufwiesen. Die Betrachtung der Datenpunkte der Tumorpaaire bestätigte den Befund der Gesamt-Mittelwerte,

dass SERRS-NP auch auf der Ebene individueller Tumore solche mit hoher bzw. niedriger EGFR- bzw. HER2-Expression unterscheiden können.

Bei der Betrachtung der Graphen der intrazerebralen Tumoren fiel eine große Bandbreite der Signalintensitäten bei den Tumoren mit einer hohen EGFR- (*Abbildung 31b*) und HER2-Expression (*Abbildung 31c*) auf. Davon waren insbesondere HER2-Tumoren betroffen.

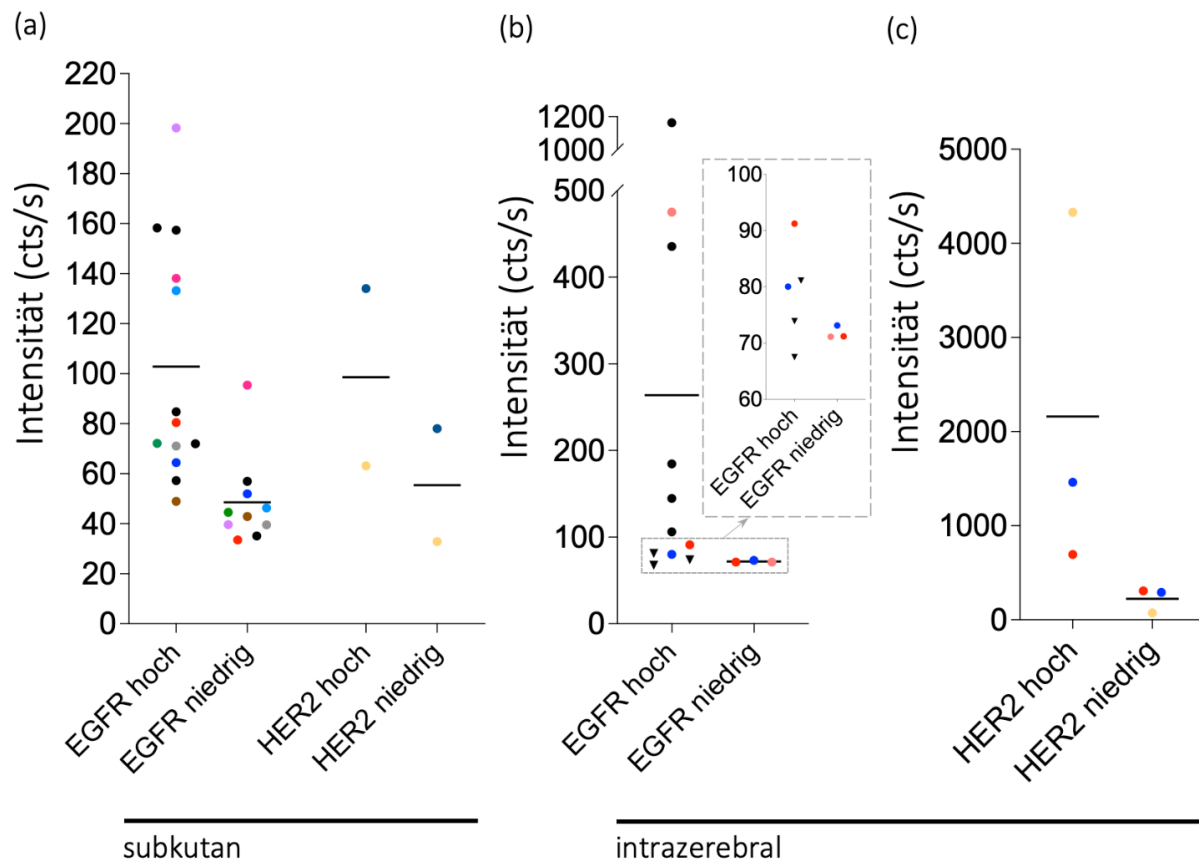


Abbildung 31: Überblick über die mit Antikörper-tragenden Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (SERRS-NP) generierten Daten in Abhängigkeit vom Expressionsstatus des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) der verwendeten Zelllinien und der Lokalisation der Tumoren

(a) Intensitätswerte der Raman-Signale mit Angabe des Mittelwerts von allen untersuchten EGFR (n = 23) bzw. HER2 (n = 4) exprimierenden Tumoren, die subkutan heranwachsen. Die Farben kennzeichnen Tumorpaaire einer Maus. Schwarze Punkte stellen Tumoren ohne Gegenstück im selben Tier dar. (b) Intensitätswerte der Raman-Signale mit Angabe des Mittelwerts von allen untersuchten EGFR-exprimierenden Tumoren, die intrazerebral heranwachsen (n = 14). Die Farben kennzeichnen Tumorpaaire einer Maus. Schwarze Punkte stellen Tumoren ohne Gegenstück im selben Tier dar. Die Dreiecke entsprechen aus der Zelllinie U87EGFR hervorgegangenen Tumoren. Die Vergrößerung des markierten Bereichs dient der optimierten Darstellung der Werte für Tumoren mit hoher bzw. niedriger EGFR-Expression. (c) Intensitätswerte der Raman-Signale mit Angabe des Mittelwerts von allen untersuchten HER2-exprimierenden Tumoren, die intrazerebral heranwachsen (n = 6). Die Farben kennzeichnen Tumorpaaire einer Maus. Schwarze Punkte stellen Tumoren ohne Gegenstück im selben Tier dar. (*Eigene Abbildung*)

Die Tumoren mit einer hohen HER2-Expression entstammten der Zelllinie HCC1954, die in den Versuchstieren eine enorm hohe Proliferationsrate aufwies, gefolgt von den Zelllinien mit hoher EGFR-Expression A431 und U87EGFR (dreieckige Symbole in *Abbildung 31b*).

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass eine Unterscheidung von Tumoren mit hoher und niedriger EGFR- bzw. HER2-Expression mittels einer minimal-invasiven i. v. Injektion von Cetuximab- bzw. Trastuzumab-SERRS-NP möglich ist. Diese Aussage gilt nicht nur für einzelne Tumorpaare, sondern in der Tendenz auch für den Vergleich der Mittelwerte aller hier untersuchten Tumoren.

4.10 Ergebnisüberblick

Die durchgeführten Experimente ergaben folgende Ergebnisse:

1. Cetuximab- und Trastuzumab-SERRS-NP konnten erfolgreich mit einer Detektionsgrenze von 1 pM synthetisiert werden.
2. I. v. applizierte Cetuximab-SERRS-NP ermöglichen die Visualisierung einer differenziellen EGFR-Expression sowie eine relative Quantifizierung des Zelloberflächenmarkers EGFR in peripheren und intrazerebralen Tumoren.
3. I. v. applizierte Trastuzumab-SERRS-NP ermöglichen die Visualisierung einer differenziellen HER2-Expression und eine relative Quantifizierung des Zelloberflächenmarkers HER2 in peripheren und intrazerebralen Tumoren.
4. Die Detektion eines Tumors mit hoher HER2-Expression nach i. v. Injektion von Trastuzumab-SERRS-NP ist in vivo möglich.
5. I. v. applizierte Cetuximab-SERRS-NP ermöglichen die intratumorale Differenzierung von Arealen mit unterschiedlicher EGFR-Expression.
6. I. v. applizierte Trastuzumab-SERRS-NP ermöglichen die intratumorale Differenzierung von Arealen mit unterschiedlicher HER2-Expression.

5 DISKUSSION

Das Wissen über die prädiktive und prognostische Bedeutung von Zelloberflächenmarkern bei onkologischen Erkrankungen sowie die Nutzung dieser Marker als Zielstruktur für spezifische Therapien nehmen stetig zu. Die Erfassung der Verteilung der Expression der Zelloberflächenmarker im gesamten Tumor sowie therapiebedingter Expressionsänderungen ist entscheidend für die Verbesserung des Gesamtüberlebens sowie für die Entwicklung personalisierter Therapien mit geringerer Toxizität.

Die klinische Relevanz eines Zelloberflächenmarkers definiert sich durch seine Bedeutung für das Verhalten des Tumors und anhand der Möglichkeit, seinen tumorfördernden Einfluss zu inhibieren. Unter einer Chemo- oder Strahlentherapie kann der Selektionsdruck die Zellkomposition des Tumors sowie die Expression von Zelloberflächenmarkern verändern. Würden sich mit einer minimal-invasiven Methode Veränderungen der relevanten Zelloberflächenmarker unter der Therapie beobachten lassen, wäre eine sofortige Adaptation des Therapieregimes möglich. Beim Verlust des durch eine Therapie adressierten Zelloberflächenmarkers könnte der Einsatz des Therapeutikums zeitnah beendet und unnötige Nebenwirkungen vermieden werden. Bei einer De-novo-Expression eines Zelloberflächenmarkers könnten deutlich früher passende Therapeutika gewählt werden, als es derzeit auf der Basis von Befunden von Bildgebungsdaten und Symptomen möglich ist. Für die Etablierung individualisierterer Therapien sind Methoden mit geringer Invasivität bei gleichzeitig umfassendem Informationsgewinn erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine molekulare Bildgebungsmethode, basierend auf der Raman-Spektroskopie, vorgestellt, die diese Kriterien potenziell erfüllt. Als Grundlage für die weiteren Experimente wurde zunächst die Konjugation der Antikörper Cetuximab und Trastuzumab an die SERRS-NP nachgewiesen. Des Weiteren wurde die Fähigkeit der Antikörper-tragenden SERRS-NP untersucht, zwischen Tumoren mit hoher und niedriger Zelloberflächenmarker-Expression (EGFR, HER2) in präklinischen Mausmodellen mit peripher gelegenen und intrazerebralen Tumoren zu unterscheiden. Abschließend wurde evaluiert, ob die Spezifität der Methode ausreicht, um auch die intratumorale Heterogenität (quantitativ) zu erfassen. Die Experimente dienten der Klärung der Frage, ob die Raman-Spektroskopie mit Antikörper-tragenden SERRS-NP zur Erfassung der inter- und intratumoralen Heterogenität von Zelloberflächenmarkern geeignet und damit

den aktuellen klinischen Diagnosemethoden überlegen ist bzw. eine wertvolle Ergänzung dieser darstellen kann.

Zur Evaluation verschiedener EGFR-Expressionsniveaus wurden Mäusen die Tumorzelllinien-Paare A431/TS895 bzw. U87EGFR/U87 implantiert. Zur Evaluation der hohen sowie der niedrigen HER2-Expression erhielten sie das Zelllinien-Paar HCC1954/MDA-MB-468. Nach einer Injektion von mit Cetuximab bzw. Trastuzumab funktionalisierten SERRS-NP wurden die Tumoren ex vivo der SERRS-basierten Raman-Bildgebung zugeführt. Einige Tumoren wurden auch in situ evaluiert und einige Mäuse lebend einer SERRS-basierten Raman-Bildgebung unterzogen. Die Bildgebungsdaten wurden mit einer intern entwickelten Software in dem Programm Matlab ausgewertet. Für den Vergleich mit dem klinischen Goldstandard der IHC wurden die Tumoren nach der SERRS-basierten Raman-Bildgebung mittels einer histologischen Standardprozedur fixiert sowie gefärbt.

Die Ergebnisse belegen, dass Antikörper-tragende SERRS-NP zwischen Tumoren mit hoher und solchen mit niedriger Zelloberflächenmarker-Expression differenzieren können. EGFR und HER2 wurden dabei mit den Antikörpern Cetuximab und Trastuzumab nachgewiesen. Des Weiteren war auch eine Erfassung der intratumoralen Heterogenität möglich, wie Experimente mit Tumoren mit einer hohen EGFR- und HER2-Expression zeigten. Zwischen den Arealen mit einer hohen und niedrigen EGFR-Expression ($p = 0,0428$) sowie zwischen den Arealen mit einer niedrigen und fehlenden EGFR-Expression ($p = 0,0118$) bestanden signifikante Unterschiede. Das Gleiche galt für Areale mit einer hohen und niedrigen HER2-Expression ($p = 0,0285$) sowie für Areale mit einer niedrigen und fehlenden HER2-Expression ($p = 0,0261$). Außerdem konnte die Anwendungsmöglichkeit dieser Methode um eine quantitative Komponente durch die Ermittlung der Signalintensität erweitert werden. Letztlich gelang in dem präklinischen Mausmodell die Tumorerfassung durch den intakten Schädel, wobei es noch nicht möglich war, die intratumorale Heterogenität abzubilden.

5.1 Vergleich der SERRS-Nanopartikel-Bildgebung mit anderen Bildgebungsverfahren

Die aktuell zur Verfügung stehenden Verfahren zur Analyse von Tumoren und relevanten Zelloberflächenmarkern weisen trotz aller Weiterentwicklungen erhebliche Nachteile auf. Der US ist eine patientenfreundliche Bildgebungsmethode, die bei der Beurteilung von Weichteilgeweben

inklusive der Befundung von Tumoren sowie von US-gestützten Biopsien verwendet wird. Die Einführung des Kontrastmittel-verstärkten US erhöht die Sensitivität deutlich [8, 10]. Weitere Innovationen zielen darauf ab, durch Verwendung verschiedener Kontrastmittel (z. B. Antikörpertragende Nanostrukturen) die Spezifität zu erhöhen. Beispielsweise erhöht sich *in vitro* durch die Verwendung von Herceptin-NP die Echogenität signifikant [153]. Jiang et al. zeigten *in vitro* sowie *in vivo* eine Kontrasterhöhung und eine Erhöhung der Verweildauer von Herceptin-tragenden Nanostrukturen in Brustkrebszellen und Mäusen mit Brustkrebs [154]. Diese Arbeiten kombinieren die vielversprechenden Ansätze der molekularen Bildgebung mit dem patientenverträglichen US.

Allerdings weisen die vorgestellten Verfahren gegenüber dem Vorgehen in der vorliegenden Studie deutliche Nachteile auf. Bei Jiang et al. wurden die Herceptin-NP intratumoral injiziert, wodurch möglicherweise die Verteilung der NP beeinflusst wurde [154]. Des Weiteren zerfallen die für den CEUS verwendeten Mikrobäschen bei der Bildgebung, wodurch für eine wiederholte Bildgebung eine erneute Injektion des Kontrastmittels erforderlich wird [4, 155]. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten basieren auf einer *i. v.* Injektion, wodurch sich die NP gleichmäßiger verteilen. Zudem zeichnen sich SER(R)S-NP durch eine hohe Photostabilität aus, womit ein konstantes Signal über mehrere Stunden erzielt werden kann. Überdies ist das Auflösungsvermögen für US in der Regel mit 1–2 mm deutlich schlechter als das der SERRS-Bildgebung (im μM -Bereich). Auch ermittelten Jiang et al. im Rahmen der *In-vivo*-Studien keine inter- und intratumoralen Intensitätsunterschiede, was jedoch für eine relative Quantifizierung von Bedeutung ist. Die CT wird zur Primärdiagnostik und zur Verlaufsbeobachtung bei verschiedenen Tumorentitäten verwendet, ermöglicht aber im Wesentlichen nur eine anatomische Beschreibung. Kontrastmittel erhöhen zwar den Weichteilkontrast und damit den Informationsgehalt, liefern allerdings keine Informationen zu den Zelloberflächenmarkern des Tumors. Yoon et al. zeigten 2016 in einer retrospektiven Studie eine Assoziation zwischen der Überlebensrate nach einer Trastuzumab-Therapie und der Tumorheterogenität bei HER2-positiven Magentumoren. Die Tumorheterogenität wurde basierend auf einer Texturanalyse der CT-Bilddaten untersucht. Texturanalysen, die auf eine erhöhte Tumorheterogenität hinwiesen, korrelierten mit einer besseren Prognose. Zu den Limitationen der Studie gehört, dass die CT-Daten von verschiedenen CTs stammten, wodurch die ohnehin herausfordernde HER2-Heterogenitätsmessung mittels CT weiter an Aussagekraft verlor.

Auch wenn eine Texturanalyse eine interessante Erweiterung des CT-Anwendungsspektrums darstellt, fehlt die Möglichkeit einer molekularen Analyse [156]. Die Nutzung der CT im Bereich der molekularen Bildgebung ist durch die Menge an Kontrastmittel limitiert, die für die Veränderung der Röntgenstrahlungsabschwächung erforderlich ist. Damit besteht das Risiko, dass pharmakologische Effekte zu einer veränderten Darstellung von physiologischen und pathophysiologischen Begebenheiten führen [8].

Einige Gruppen arbeiten mit GNP, da diese die Röntgenstrahlung deutlich abschwächen. Popovtzer et al. 2008 generierten in einer In-vitro-Studie mit gegen das A9-Antigen (alpha6beta4-Integrin) gerichteten Antikörper-tragenden GNP CT-Daten von Kopf- und Halstumorzellen [157]. Im Jahr 2011 folgte eine der ersten In-vivo-Studien von Reuveni et al. mit Anti-EGFR-tragenden GNP zur spezifischen Adressierung von Kopf- und Halstumoren mit hoher EGFR-Expression in Mäusen. Der Einsatz dieser GNP erhöhte die Sensitivität der CT signifikant. 200 µl (25 mg/ml) Gold der mit Antikörpern funktionalisierten GNP reichten für die Bildgebung aus [158].

Für eine Anwendung der CT im Bereich der molekularen Bildgebung sprechen die gute räumliche Auflösung, die hohe Eindringtiefe, die schnelle Akquisitionszeit und die Kosteneffizienz. Zu den Nachteilen der Methode zählt die geringe Sensitivität, die eine höhere Menge an Kontrastmittel erfordert, auch wenn Antikörper-tragende GNP verwendet werden. Der bedeutendste Nachteil ist jedoch die Strahlenbelastung, die die Anzahl der CT-Wiederholungen limitiert, wodurch die CT nur bedingt für eine longitudinale molekulare Verlaufsbeobachtung eines Tumors geeignet ist.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Methode der Antikörper-tragenden SERRS-NP weist gegenüber der molekularen Bildgebung mittels CT zwei Nachteile auf: die limitierte Eindringtiefe von circa 5 mm und die lange Dauer der Bildgebung (circa drei Stunden für das Gehirn einer Maus). Hinsichtlich der Kosteneffizienz kann zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung der SERRS-basierten Bildgebung noch keine vergleichende Aussage getroffen werden.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass die SERRS-basierte Bildgebung eine höhere Auflösung und Sensitivität (1 mg Gold in 200 µl einer 3,5 mM GNP-Lösung) als die CT-Bildgebung aufweist. Aufgrund der hohen Sensitivität kann eine weitaus geringere Menge an GNP als bei der CT verwendet werden [8]. Obwohl Gold ein inertes Material darstellt, ist eine Kurz- und Langzeittoxizität nicht ausgeschlossen. Somit stehen der Strahlenbelastung und der größeren Menge an GNP bei der CT die Bedenken hinsichtlich einer möglichen Toxizität bei der SERRS-Bildgebung gegenüber.

Auch die MRT wird zur Primärdiagnostik sowie zu Verlaufsbeobachtungen bei verschiedenen Tumorentitäten verwendet, liefert aber primär anatomische Daten. Die Verwendung verschiedener Sequenzen mit oder ohne Kontrastmittel erhöht den Informationsgehalt, gibt jedoch keine Informationen zum Ausmaß der Zelloberflächenmarker-Expression in Tumoren. Chauhan et al. fanden bei der Verwendung von Oligonukleotid-AS1411-tragenden, auf Gadolinium basierenden GNP eine höhere Aufnahme in Brustkrebszellen *in vitro*. Durch die bevorzugte Anreicherung des Kontrastmittels Gadolinium in malignen Tumoren verbesserte sich der Kontrast im MRT signifikant [159]. In einer weiteren vielversprechenden Studie detektierten Chen et al. eine höhere Aufnahme von Cetuximab-tragenden superparamagnetischen Eisenoxid-NP (engl. superparamagnetic iron oxide (SPIO)) in EGFR-überexprimierenden GBM-Zelllinien *in vitro* [160]. In der *In-vitro*-Studie von Sinha et al. gelang eine spezifische Gadolinium-Anreicherung in EGFR-überexprimierenden Tumoren mittels Anti-EGFR-tragender, mesoporer Silikon-NP [161].

Bislang fehlen aber relevante *In-vivo*-Studien zur MRT-basierten EGFR-Darstellung auf intratumoraler Ebene. Des Weiteren sollte berücksichtigt werden, dass die Auflösung bei der MRT (Millimeterbereich) im Vergleich zur SERRS-basierten Bildgebung (Mikrometerbereich) auch bei Verwendung von Antikörper-tragenden NP deutlich geringer ist. Das Gleiche gilt für die Sensitivität (10^{-5} – 10^{-3} M für die MRT versus 10^{-15} – 10^{-12} M für SERS bzw. 10^{-17} – 10^{-15} M für SERRS), sodass voraussichtlich – wie auch bei der CT – bei der MRT im Vergleich zur SERRS-basierten Bildgebung höhere Mengen an Kontrastmittel appliziert werden müssen. Gut verträgliche Substanzen können ebenfalls in größeren Mengen physiologische und pathophysiologische Prozesse auslösen, die die *In-vivo*-Verhältnisse verändern. Daher sind Bildgebungsverfahren wünschenswert, die ohne Kontrastmittel oder mit geringen Mengen an solchen einen maximalen Informationsgewinn ermöglichen. Trotz der beschriebenen Nachteile sollten weitere Studien zur Anreicherung von MRT-Kontrastmitteln mittels Antikörper durchgeführt werden, da dieses Verfahren im Gegensatz zur SERRS-Bildgebung eine unbegrenzte Penetrationstiefe besitzt.

Die PET wird primär genutzt, um onkologische Erkrankungen mittels ^{18}F -markierter [^{18}F]-2-Fluoro-2-Deoxy-Glukose ([^{18}F]-FDG), eines Analogons der Glukose, darzustellen. Maligne Zellen weisen eine hohe Zellteilungsrate und damit eine erhöhte metabolische Aktivität sowie – bedingt durch den Warburg-Effekt – auch eine erhöhte Glukose-Verwertung auf.

Zahlreiche Gruppen veröffentlichten Arbeiten zur spezifischen Darstellung von Zelloberflächenmarkern mittels PET. Henry et al. fassten in einer Übersichtsarbeit acht Studien zum Nachweis

von HER2 in Brustkrebspatienten mit PET und/oder Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (engl. single photon emission computed tomography (SPECT)) zusammen [162]. Xiao et al. erfassten den EGFR bei Mäusen mit Lungenkrebs anhand von SPECT [163]. Auch wenn sich der mittels SPECT ermittelte Rezeptorstatus durch histologische Untersuchungen bestätigen lässt und die Eindringtiefe bei der PET und der SPECT im Gegensatz zur SERRS-Bildgebung nicht limitiert ist, bieten PET/SPECT-basierte Bilddaten primär eine Ja-/Nein-Antwort, die durch numerische Werte zwar ergänzt werden kann, jedoch aufgrund ihrer reduzierten räumlichen Auflösung keine visuelle Darstellung der intratumoralen Zelloberflächenmarker-Heterogenität erlaubt. Des Weiteren besteht – anders als bei der SERRS-basierten Bildgebung – auch bei der PET/SPECT eine relevante Strahlenbelastung.

Für alle etablierten Bildgebungsverfahren gibt es Bestrebungen, den Informationsgewinn durch die Verbesserung und die Funktionalisierung der Kontrastmittel zu erhöhen. Dennoch bietet die SERRS-basierte Bildgebung substantielle Vorteile, die ihre weitere Etablierung rechtfertigt. Die Methode zeichnet sich im Vergleich zu den anderen klinischen Verfahren durch eine erhöhte Sensitivität aus. Die anderen Verfahren (Ausnahme US) benötigen große Kontrastmittelmengen zur Erhöhung der Auflösung. Die bildgebenden Verfahren berücksichtigen – mit Ausnahme der PET – keine metabolischen Komponenten. Die CT und die PET gehen mit einer erheblichen Strahlenbelastung einher. Der US hängt im hohen Maße von der Expertise des Durchführenden ab, wodurch die Reproduzierbarkeit eingeschränkt wird, und erreicht im Vergleich zu den anderen Bildgebungsverfahren eine geringere Penetrationstiefe.

In der vorliegenden Arbeit ließen sich Tumoren mit hoher Sensitivität (im pikomolaren Bereich) in ihrer anatomischen Lokalisation in vivo durch den intakten Schädel einer Maus lokalisieren. Anhand der Funktionalisierung der SERRS-NP mit Cetuximab bzw. Trastuzumab wurden die Tumoren nicht nur makroskopisch erfasst, sondern gleichzeitig durch die Zelloberflächenmarker EGFR und HER2 charakterisiert. Dabei konnte die Methode nicht nur zwischen „Expression“ und „keine Expression“ unterscheiden, sondern erfasste ebenso die intratumorale Heterogenität. Letztlich war eine relative Quantifizierung der differenziellen EGFR- und HER2-Expression im intertumoralen sowie im intratumoralen Vergleich möglich. Die Abdeckung dieser Ebenen (makroskopisch/mikroskopisch-quantitativ) verspricht einen hohen Informationsgewinn mit einer einzigen Methode.

Die wichtigsten Vorteile der vorgestellten Methode im Vergleich zu den sich bereits in der klinischen Anwendung befindlichen Bildgebungsverfahren sind die hohe räumliche Auflösung und Sensitivität, die fehlende Notwendigkeit hoher Kontrastmittelmengen, die enorm hohe Spezifität (spezifische Raman-Signale werden auch als „Fingerabdruck“ bezeichnet) sowie die im Vergleich zur (CE)US weitgehende Unabhängigkeit vom Untersucher.

Weder der (CE)US noch die CT, die MRT oder die PET liefern suffiziente molekulare Informationen zu Diagnostik und Therapieplanung. Daher wird in der Regel eine Biopsie durchgeführt. Die Einführung der Biopsienadel erfolgt meist blind, unter US oder in einigen Fällen mit einer anderen Bildgebung zur besseren Zielführung. In Anbetracht des reduzierten Auflösungsvermögens dieser Modalitäten ist die Verwendung des Begriffs „Zielführung“ bei der Analyse der Verteilung relevanter Zelloberflächenmarker kritisch zu werten. Die für die Zielführung genutzten Bildgebungsverfahren liefern lediglich anatomische Daten – und keine Information zum Vorhandensein oder zur intratumoralen Verteilung der Zelloberflächenmarker. Eine Ausnahme bildet die PET, die bei einigen Zelloberflächenmarkern zwischen dem Vorhandensein und Fehlen unterscheiden kann [8]. Die Auflösung der PET ist jedoch zu gering, um eine Verteilung der Zelloberflächenmarker innerhalb des Tumors darzustellen, sodass die Methode nicht zur Führung der Biopsienadel geeignet ist. Bei allen etablierten Bildgebungsverfahren besteht das Risiko, relevante Areale eines Tumors zu übersehen.

5.2 Immunhistochemie

Den Goldstandard zur Erfassung der Expression von Zelloberflächenmarkern stellt aktuell die IHC bioptischer Gewebeproben dar. Dieses Verfahren weist aber ebenfalls grundlegende Nachteile auf. Zur Durchführung einer histologischen Evaluation muss mittels einer Biopsie oder einer chirurgischen Intervention Gewebe entnommen werden. Jeder invasive Vorgang birgt Risiken. Des Weiteren bildet eine histologische Untersuchung lediglich einen Ausschnitt des gesamten Tumors ab und ist damit möglicherweise nicht repräsentativ [6, 36-38]. Die Schnittdicke beträgt 3–7 μm [27], wobei in der Regel mehrere Schnitte eines Präparates angefertigt werden. Mikkelsen et al. zeigten in ihrer Arbeit zur Repräsentativität von GBM-Gewebeproben, dass bei 46 % der untersuchten Gewebeproben die histologischen und die immunhistochemischen Eigenschaften von der Gewebemenge abhingen. Die Autoren schlussfolgerten, dass ein signifikanter Anteil der Tumoren dem

Risiko einer Unterbewertung in Bezug auf ihren Grad ausgesetzt ist [36]. Bei Youk et al., die die Ergebnisse mehrerer Studien mit insgesamt 3299 Läsionen untersuchten, waren bei durchschnittlich 10 % der Biopsien Wiederholungsbiopsien notwendig, die in 17 % der Fälle eine maligne Läsion identifizierten, die ohne die Wiederholung nicht erfasst worden wäre, wodurch die Therapieeinleitung verzögert worden wäre [164].

Die vorliegende Arbeit belegt, dass Antikörper-tragende SERRS-NP das Potenzial besitzen, nach einer einmaligen und minimal-invasiven i. v. Injektion die intratumorale Heterogenität eines Querschnitts eines mehrere Millimeter dicken Tumors zu erfassen. Damit bietet die Methode trotz niedriger Invasivität einen relevanten Zugewinn an Information. Möglicherweise ließe sich daher durch das Verfahren das Risiko für die Notwendigkeit von Wiederholungsuntersuchungen und für falsche Therapieentscheidungen aufgrund nichtrepräsentativer Gewebefragmente reduzieren. Notwendige Wiederholungsuntersuchungen, beispielsweise zur Verlaufsbeurteilung der Tumorkomposition, erfordern bei der SERRS-basierten Bildgebung lediglich eine erneute minimal-invasive i. v. Injektion. Damit eignet sich diese Methode potenziell sowohl als Entscheidungsgrundlage für personalisierte Therapien als auch für eine frühzeitige Adaptation dieser Therapien bei Veränderungen der Zelloberflächenmarker-Expression.

Die Problematik der Repräsentativität besteht ebenso bei der Betrachtung einzelner Zelloberflächenmarker. Im Bereich der Brustkrebstherapie ist HER2 als mögliche therapeutische Zielstruktur essenziell. Laut zahlreicher Studien ist die Erhebung des HER2-Status nicht optimal. Nach Schätzungen ergeben 15 % der Biopsien keinen eindeutigen HER2-Status [37], und 20 % der als HER2-positiv eingestuften Tumoren sind HER2-negativ [165]. Die These einer homogenen Verteilung von HER2 innerhalb eines Tumors ist aktuell nicht mehr haltbar. Moeder et al. berichteten 2007 erstmals über die klinischen Implikationen des HER2-Status und des Erfolgs HER2-spezifischer Therapien in Abhängigkeit von der heterogenen HER2-Verteilung innerhalb der Tumoren [166]. Eine Studie von Seol et al. zeigte, dass eine intratumorale Heterogenität von HER2 mit nicht eindeutigen HER2-Ergebnissen in der Biopsie und einem klinisch schlechten Verlauf assoziiert ist [167]. Diese Ergebnisse belegen die Notwendigkeit für repräsentativere Gewebeevaluationen. Die zuverlässige Erfassung des HER2-Status ist methodisch herausfordernd und Gegenstand zahlreicher Forschungsbemühungen [168].

Die in der vorliegenden Studie entwickelte Methode einer minimal-invasiven i. v. Injektion von Trastuzumab-SERRS-NP in Verbindung mit einer anschließenden SERRS-basierten Raman-Bildgebung konnte die differenzielle Verteilung von HER2 im gesamten Tumor visualisieren. Die Trastuzumab-SERRS-NP waren in der Lage, periphere sowie intrazerebrale Tumoren mit hoher und niedriger HER2-Expression in einem Individuum zu unterscheiden. Die HER2-Erfassung umfasste bei einer mehrere Millimeter betragenden Schichtdicke den gesamten Tumorquerschnitt. Diese Befunde sprechen dafür, dass bei einer Weiterentwicklung der Methode auf klinische Standards die Zahl nicht eindeutiger HER2-Ergebnisse reduziert werden kann. Positive Folgen wären eine Abnahme der Notwendigkeit von Wiederholungsbiopsien, die Möglichkeit der Entscheidung für oder gegen eine HER2-spezifische Therapie auf der Basis valider Daten und damit eine Verbesserung des klinischen Verlaufs und des Gesamtüberlebens von Patienten mit HER2-positiven Tumoren.

Das Neuauftreten oder der Verlust eines Zelloberflächenmarkers im Verlauf einer Therapie ist ein bekanntes Phänomen. Furugaki et al. fanden eine Korrelation zwischen dem Verlust der EGFR-Expression bei Lungenkrebs und dem Wirkungsverlust von spezifischen, gegen EGFR gerichteten Therapien [169]. Dieser Zusammenhang wurde von Xu et al. sowie von anderen Forschern bestätigt [170]. Dasselbe trifft auf den Verlust von HER2 zu. Ahn et al. stellten in ihrem Review-Artikel die Bedeutung eines therapiebedingten HER2-Verlusts für den Metastasierungsprozess sowie die Relevanz der rechtzeitigen Detektion solcher Veränderungen für therapeutische Implikationen dar [171]. Ein HER2-Verlust tritt nicht nur bei Patienten mit Brustkrebs auf. Pietrantonio et al. berichteten in einer Multicenter-Studie vom Scheitern spezifischer, gegen HER2 gerichteter Therapien bei gastroösophagealen Krebserkrankungen sowie Magenkrebskrankungen und postulierten die Notwendigkeit erneuter Biopsien zur Erfassung des HER2-Expressionsverlusts und zur Anpassung der Therapien [172].

Die vorgestellten Arbeiten sind repräsentativ für zahlreiche Studien zu Veränderungen von Zelloberflächenmarkern und einem damit einhergehenden Verlust der Therapiewirksamkeit. Die Befunde belegen die Notwendigkeit der Entwicklung weniger invasiver diagnostischer Maßnahmen mit einem größeren Informationsgewinn. In der vorliegenden Arbeit reichte eine einmalige minimal-invasive i. v. Injektion von Antikörper-tragenden SERRS-NP aus, um die Zelloberflächenmarker EGFR und HER2 sowie ihre Verteilung innerhalb eines Tumors zu erfassen. Die korrekte

Erfassung wurde durch eine subsequente IHC-Untersuchung verifiziert. Eine wiederholte Injektion von SERRS-NP war nicht möglich, da die Tiere vor Entnahme der Tumoren euthanasiert wurden. Dieser Schritt war erforderlich, weil der derzeitige Entwicklungsstand der Raman-Spektroskopie noch keine Beschränkung auf reine In-vivo-Versuche ermöglicht. Pilotexperimente am MSKCC (Daten nicht dargestellt) zeigten, dass die Qualität der Ergebnisse von der Oberfläche des Tumors abhing. Das zur Verfügung stehende Raman-Spektroskop war nicht in der Lage, seinen Fokus den natürlichen Wölbungen des untersuchten Gewebes anzupassen. Folglich mussten die Tumoren entnommen und in ihrer Mitte durch einen ebenen Schnitt geteilt werden. Inzwischen sind Raman-Spektroskope mit automatisierter Fokuseinstellung erhältlich.

Trotz dieser Limitationen ließ sich mit einer einmaligen, minimal-invasiven i. v. Injektion von Cetuximab- bzw. Trastuzumab-SERRS-NP der HER2- und EGFR-Expressionsstatus quantitativ erfassen. Ferner weist die Raman-Bildgebung keine Strahlenbelastung auf. Mit optimierten Raman-Spektroskopen sowie der vorliegend beschriebenen Methode ist über wiederholte Injektionen von Antikörper-tragenden SERRS-NP eine longitudinale Verlaufsbeobachtung des Zelloberflächenmarker-Status eines Tumors und wahrscheinlich auch seiner Metastasen möglich.

Aktuell wird eine Therapie erst angepasst, wenn klinische Verschlechterungen eintreten oder in der Bildgebung (CT, MRT, PET) ein Progress zu beobachten ist. In der Regel liegt einer klinischen Verschlechterung ein erheblicher Fortschritt der Krebserkrankung zugrunde. Bildgebungsverfahren können einen Progress bereits früher erkennen. Weder die klinischen Symptome eines Patienten noch die genannten Bildgebungsverfahren erlauben jedoch eine Aussage zur Kausalität des Therapieversagens. Der vorliegende Ansatz mit Antikörper-tragenden SERRS-NP könnte mögliche Ursachen identifizieren. In regelmäßigen Abständen wiederholte i. v. Injektionen von Cetuximab- bzw. Trastuzumab-SERRS-NP könnten bei Patienten mit Anti-EGFR- oder Anti-HER2-Therapie bei einem Verlust der Zelloberflächenmarker-Expression zur Beendigung der spezifischen Therapie führen und damit unnötige Nebenwirkungen reduzieren oder verhindern. Bei Veränderung des Expressionsstatus des Tumors könnten SERRS-NP mit Antikörpern für andere in Frage kommende Zelloberflächenmarker funktionalisiert sowie injiziert werden. In Abhängigkeit vom Befund könnte eine entsprechend neu angepasste Antikörper-Therapie das Risiko eines Tumorprogresses reduzieren.

Bei der Beurteilung von IHC-Daten muss berücksichtigt werden, dass das Ursprungsgewebe durch aufwändige Arbeitsschritte (Fixierung, Fassung in Paraffin, Deparaffinisierung, Rehydrierung,

Antigen-Freilegung, Auswahl der Antikörper und ihre Aufbereitung, diverse Waschschriffe und Gegenfärbungen) strukturelle Veränderungen erfährt, die die Anfärbbarkeit und die Detektion von Zelloberflächenmarkern negativ beeinflussen können. Engel et al. evaluierten die Ergebnisse von 39 Originalartikeln, wonach die Dauer der Gewebefixierung, die zur Fixierung verwendeten Substanzen und das Verhältnis von Gewebevolumen zur Fixierlösung das Ausmaß sowie die Intensität der IHC-Färbung beeinflussten [173]. Laut Du et al. kann der Prozess der Dekalzifizierung in der IHC zu falsch-negativen Befunden führen [174].

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Daten entstammten überwiegend Geweben, die nicht fixiert werden mussten. Lediglich die Gehirne wurden für 30–45 Minuten in Formaldehyd fixiert, was jedoch unter der Voraussetzung der Optimierung der Raman-Spektroskope zukünftig obsolet wäre.

Ebenso kann das Austrocknen des Gewebes oder die unvollständige Dehydrierung zu falsch-negativen Ergebnissen führen [175]. Van Hecke und D’Amico et al. verwiesen auf das Risiko der Zerstörung von Epitopen bei der Antigen-Demaskierung sowie auf ein damit verbundenes Risiko einer falsch-negativen IHC [176, 177]. Xie et al. belegten den Verlust von Epitopen bei nicht optimierten Verwahrungsbedingungen von in Paraffin eingebetteten Geweben [178]. Die in der vorliegenden Studie vorgestellte Methode zur Erfassung der Zelloberflächenmarker-Expression in Tumoren erforderte keine aufwändige Prozessierung. Tumoren wurden unmittelbar nach der Einschläferung der Mäuse entnommen und innerhalb von fünf bis sieben Minuten nach Eintreten des Todes der Raman-Bildgebung zugeführt. Mit diesem zeitsparenderen Verfahren ließen sich die EGFR- sowie die HER2-Expression erfassen, ohne therapieentscheidende Informationen einzubüßen.

Systeme zur IHC-Detektion zeigen mit zunehmender Sensitivität einen Anstieg des Hintergrundsignals [179]. Ein signifikanter Vorteil der Raman-Spektroskopie ist das günstigere Signal-Rausch-Verhältnis, wodurch Hintergrundsignale vernachlässigt werden können [180].

Letztlich ist die IHC eine primär qualitative Methode, was in Verbindung mit dem Risiko einer fehlenden Repräsentativität der Biopsie für den gesamten Tumor und der notwendigen Expertise des IHC-Durchführenden sowie des Pathologen zu potenziell falschen Therapieentscheidungen und zur Prognoseverschlechterung führen kann. Durch die Verwendung eines Punkte-Scores lassen sich mit der IHC auch semiquantitative Daten erzeugen. Färbungen mit einem Wert von 3+ werden als „positiv“ bewertet. Nicht eindeutige Ergebnisse werden in der Regel einer Fluoreszenz-

in-situ-Hybridisierung (FISH) zugeführt. Insgesamt ist die Quantifizierung von IHC-Daten ein weites Forschungsfeld. Die Quantifizierbarkeit wird durch intra- und interpersonelle Unterschiede bei den Arbeitsschritten (Fixierung, Prozessierung) sowie zwischen den IHC-Methoden erschwert [47]. Taylor et al. halten die Vorbereitung zur Färbung aufgrund der multiplen Variablen für einen der am wenigsten kontrollierbaren Bereiche der IHC [181].

Auch bei der hier vorgestellten Methode sind intra- und interpersonelle Unterschiede beim Herstellungsprozess der GNP möglich. Zwar bieten Firmen wie Sigma Aldrich bereits maschinell hergestellte GNP an, diese weisen jedoch eine geringere Intensität auf als die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten SERRS-NP. Diese Problematik sollte sich durch die weitere Verbesserung des Herstellungsprozesses von GNP im kommerziellen Sektor lösen lassen.

Für Seidal et al. ist die Variationsbreite bei der Interpretation die Hauptursache für die reduzierte Quantifizierbarkeit von IHC-Daten [47]. Eine etablierte Methode zur quantitativen Abschätzung von IHC-Ergebnissen ist die Bestimmung der prozentualen Anteile von immunpositiven Zellen an der Gesamtanzahl der zu untersuchenden Zellen. Laut Kim et al. weist dieses Verfahren jedoch den Nachteil auf, dass der Grad der IHC-Farbreaktion nicht berücksichtigt wird. Die Autoren nennen als eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Quantifizierung ein semiquantitatives Punktesystem, verweisen aber zugleich auf eine zunehmende Subjektivität aufgrund der zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten [179].

Mit den verwendeten Cetuximab- und Trastuzumab-SERRS-NP ließen sich feine Unterschiede in der EGFR- sowie der HER2-Expression sowohl visuell im Raman-Bild zusammen mit einer numerisch annotierten Farbskala als auch numerisch durch die Intensitätswerte der Raman-Spektren objektiv erfassen.

Weitere Arbeiten konzentrieren sich auf eine Optimierung der Quantifizierung von IHC-Daten durch spektrale Bildanalysen sowie durch die Verwendung der Immunfluoreszenz mit verschiedenen Bildanalysemethoden [49]. Die breiten Signalbänder bei der Immunfluoreszenz führen jedoch aufgrund von Überlappungen mit der Autofluoreszenz des Gewebes zu einer reduzierten Sensitivität und Spezifität [50]. Bei der HER2-Evaluation hat sich beim Auftreten von nicht eindeutigen Ergebnissen eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung(FISH)-Analyse etabliert, die jedoch ein umfangreiches Training und eine profunde Expertise voraussetzt sowie sehr zeit- und kostenintensiv ist [152].

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode der SERRS-basierten Raman-Bildgebung mit Antikörper-tragenden SERRS-NP zur quantitativen Differenzierung der EGFR- und der HER2-Expression ist im Vergleich zur IHC noch eine recht junge Methode. Daher weisen viele Prozesse (z. B. Herstellung der SERRS-NP) noch intra- sowie interpersonelle Unterschiede auf, da sie noch manuell erfolgen und daher eine profunde Expertise erfordern. Angesichts des Potenzials dieser Methode in der Onkologie ist anzunehmen, dass die Automatisierung der Herstellungsprozesse und der Bildgebung weiterentwickelt wird. Sind diese Hürden überwunden, sollte sich die Bildgebung mit SERRS-NP im Vergleich zur IHC/Immunfluoreszenz durch eine höhere Sensitivität und Spezifität auszeichnen, da ihre Raman-Peaks 10- bis 100-mal schmaler sind und weder Photobleichung noch Interferenz mit der Autofluoreszenz von Geweben aufweisen [180].

Wie oben diskutiert, gehören zu den Hauptursachen der reduzierten Quantifizierbarkeit von IHC-Ergebnissen die Gewebeprozessierung sowie die individuelle Beurteilung durch einen Pathologen. Für eine valide Quantifizierung müsste nicht nur die Beurteilung der IHC-Färbung, sondern der gesamte Prozess von der Gewebeakquirierung bis zur Interpretation und zum Report standardisiert werden [181].

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten basieren auf nicht oder nur minimal prozessierten Geweben. Die Prozessierung beschränkte sich auf ein 30- bis 45-minütige Fixierung der Gehirne für eine bessere Erstellung koronarer Schnitte. Der Umfang dieser Prozessierung war im Vergleich zur IHC weitaus geringer. Diese diente in der vorliegenden Studie lediglich als Kontrolle und ist zukünftig im klinischen Umfeld nicht mehr erforderlich.

Die Analyse der SERRS-basierten Bildgebung beinhaltet eine automatische relative Quantifizierung. Die Daten der Bildgebung wurden durch ein intern entwickeltes Programm analysiert. Mittels verschiedener Instrumente (z. B. Pixel, Rechteck, Polygon) wurden die Tumoren im Ganzen, aber auch einzelne Bereiche untersucht. Diese Form der Datenerhebung schließt jegliche Subjektivität aus, da bei Festlegung der Pixel (Rechtecke, Polygone) das diesem Tumorareal entsprechende Raman-Spektrum sowie dessen Intensitätswerte automatisch angezeigt werden. Die vorliegende Methode beinhaltet somit eine objektive Quantifizierung des Raman-Signals, die eine interpersonelle Varianz ausschließt.

Die Vorteile des neuen Verfahrens gegenüber der IHC umfassen eine geringere Invasivität, ein größeres Volumen des untersuchten Gewebes (höhere Repräsentativität), das Fehlen potenziell

manipulativer Schritte bei der Gewebeprozessierung sowie eine objektive Quantifizierbarkeit. Gegenüber der Immunfluoreszenz, die die quantitative Komponente der konventionellen IHC erhöhen kann, sind die fehlende Interferenz mit der Autofluoreszenz und eine deutlich höhere Lichtbeständigkeit vorteilhaft.

5.3 Raman-Bildgebung

Die SER(R)S-basierte Raman-Bildgebung hat in der Forschung in den vergangenen 10–15 Jahren aufgrund ihrer Vorteile (hohe Sensitivität, „fingerabdruckartiges“ Signalmuster, Auflösung im Mikrometerbereich, Unabhängigkeit der Analyse vom Befunder, fehlende Notwendigkeit der Gewebeprozessierung) und der steigenden Relevanz der Kenntnis der Zelloberflächenmarker-Komposition für spezifische Therapien einen deutlichen Aufschwung erfahren.

Im Jahr 2008 verglichen Qian et al. in einer In-vivo-Studie die Signale EGFR-positiver Tumoren nach einer Injektion von SERS-NP bzw. Anti-EGFR-SERS-NP in die Schwanzvene von Mäusen. Bei Verwendung der Anti-EGFR-SERS-NP war das Signal in dem Tumor zehnfach höher als bei der Verwendung unspezifischer SERS-NP. Die beschriebene fehlende Signalerhöhung bei der Verwendung von unspezifischen SERS-NP ist zu hinterfragen, da allein aufgrund des EPR-Effekts eine Lokalisation der NP im Tumor möglich sein sollte. Möglicherweise war aber das Signal der von den Autoren synthetisierten NP zu schwach [82]. Die Autoren verglichen keine Tumoren mit unterschiedlicher EGFR-Expression und validierten den EGFR-Status auch nicht mittels IHC.

Jokerst et al. veröffentlichten 2012 eine Studie zur Darstellung von EGFR mittels GNP in kolorektalen Karzinomen. Sie detektierten eine mehr als 34-fache Anreicherung der GNP in EGFR-positiven im Vergleich zu EGFR-negativen Tumoren und ein mehr als siebenfach höheres Signal gegenüber der Epidermis mit einer normalen EGFR-Expression. Bei der Verwendung von Anti-EGFR-GNP im Vergleich zu unspezifischen GNP lag das Signal achtfach höher [77]. Zusammenfassend belegt die Studie, dass Anti-EGFR-GNP hochspezifisch Tumoren mit erhöhter EGFR-Expression markieren können. Die Daten beruhten jedoch auf einer topischen Anwendung; In-vivo-Experimente wurden nicht durchgeführt. Auch wurden keine Tumoren mit graduellen Abstufungen der EGFR-Expression untersucht oder die Daten mit dem Goldstandard der IHC validiert. Die Autoren verwiesen auf die Möglichkeit einer Signalvarianz aufgrund der bekannten intratumoralen Heterogenität in kolorektalen Karzinomen, ohne diese zu analysieren.

Chung et al. ergänzten die bisherigen Studien zu Cetuximab-GNP durch EGFR-Blockungsstudien mit verschiedenen Cetuximab-Konzentrationen, wobei die Cetuximab-GNP die Menge nichtblockierter EGFR-Moleküle widerspiegeln und damit die EGFR-Expressionsniveaus vor sowie nach einer Therapie mit Cetuximab dokumentierten. Da eine Cetuximab-Therapie zu einer EGFR-Internalisierung führt, kann mit dieser Methode eine Aussage über die potenzielle Effektivität einer Cetuximab-Therapie getroffen werden [78]. Auch diese Arbeit beruhte lediglich auf In-vitro-Analysen und beinhaltete keine Untersuchungen mit i. v. applizierten Cetuximab-GNP.

Mallia et al. wiesen 2015 in vivo die intratumorale EGFR-Heterogenität mittels Applikation von Anti-EGFR-GNP nach [67]. Allerdings basierten die Daten auf einer topischen Applikation der NP, die für 30 Minuten auf der Tumoroberfläche inkubiert wurden. Fraglich ist, ob die NP unter diesen Bedingungen vergleichbar gut in den Tumor eindringen wie nach einer systemischen Applikation. Vermutlich waren bei diesem Studienaufbau nur Aussagen zum EGFR-Status der exponierten Tumoroberfläche – und nicht zu den tiefer gelegenen Ebenen des Tumors – möglich. Somit konnte, wie bei einer Biopsie, kein umfassendes Bild der EGFR-Verteilung im gesamten Tumor generiert werden.

Die diskutierten Studien stellen die derzeit relevanten Arbeiten zur Erfassung von EGFR mittels der Raman-Bildgebung und der funktionalisierten GNP dar. Obwohl sie das Wissen zum Potenzial von Anti-EGFR-GNP zur Evaluation des EGFR-Status in Tumoren wesentlich erweitert haben, fehlen Arbeiten zur minimal-invasiven i. v. Administration von Anti-EGFR-SERRS-NP. In weiterführenden Studien sollten aufgrund der Varianz individueller Organismen und der NP-Chargen Tumoren mit unterschiedlicher EGFR-Expression innerhalb eines Modells mit gemeinsam hergestellten NP verglichen werden. Des Weiteren sollte das Potenzial von Anti-EGFR-NP zur Erfassung verschiedener EGFR-Expressionsniveaus sowohl in peripher als auch in intrazerebral gelegenen Tumoren analysiert werden. Huang et al. 2016 formulierten die Notwendigkeit einer Untersuchung des Potenzials von SERRS-NP zur exakten Erfassung der EGFR-Amplifikation in GBM [79]. Diese noch nicht adressierten Forschungsfragen führten zur Entwicklung der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente.

Park et al. publizierten 2009 eine der ersten In-vitro-Studien mit Anti-HER2-SERS-Nanorods (die Bezeichnung bezieht sich auf die längliche Form der Partikel) zur Erfassung von HER2 auf Tumorzellen. Die verschiedenen Komponenten (Tumorzellen, Antikörper, Nanorods) wurden in einem Schichtverfahren auf Glas präpariert, womit Tumorzellen aus ihrem ursprünglichen Milieu

entfernt wurden. Ferner fehlte eine Analyse von Tumorzellen mit verschiedenen HER2-Expressionsniveaus [182].

Télléz-Plancarte et al. konnten dagegen 2019 in vier Zelllinien mit differierenden HER2-Niveaus mittels Trastuzumab-Silber-NP klare Differenzen in den Intensitäten der Raman-Signale aufzeigen. Auch diese Studie war eine reine In-vitro-Studie mit einem Schichtverfahren (Applikation von Silber-NP auf einer Goldplatte, Antikörper, Tumorzellen). Die Autoren verwiesen auf die notwendige Evaluation unter physiologischen Bedingungen [97].

Verdin et al. untersuchten 2021 das Potenzial von Anti-HER2-SERS-NP für eine quantitative Analyse der HER2-Expression. Die SERS-NP bestanden aus einer Gold-Silber-Komposition mit Rhodamin-B-Isothiocyanat als Reporter, der eine gute Resonanz zum verwendeten 532 nm Laser aufwies. Die durchgeführten Kontrollexperimente belegten, dass die NP primär über die Antikörper mit dem Tumorgewebe interagierten. Ein Vorteil dieser Studie gegenüber anderen Arbeiten war, dass HER2-positive sowie HER2-negative Proben auf der gleichen Glasfläche präpariert und damit identisch prozessiert wurden. Wie auch in der vorliegenden Studie nutzten die Autoren zur Evaluation der unterschiedlichen HER2-Expressionsniveaus keinen Vergleich mit gesundem Gewebe, sondern mit Tumorgewebe mit einer geringeren HER2-Expression. Dieses Vorgehen ist wichtig, da gesundes Gewebe aufgrund seiner Zellmorphologie, seiner Dichte und seines pH-Wertes möglicherweise anders mit NP interagiert als Tumorgewebe. Einen weiteren Fortschritt stellt der Einsatz einer neuen Datenverarbeitungstechnik dar, die eine Auflösung von bis zu 2 μm auf subzellulärem Niveau ($> 10\text{--}20 \mu\text{m}$) erlaubte [183]. Auch diese Arbeit war jedoch eine reine Ex-vivo-Studie mit einer topischen Applikation der SER(R)S-NP auf mit Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Brustkrebsgewebe. Mit diesem Ansatz war die Eignung von SER(R)S-NP für eine minimal-invasive Diagnostik nicht evaluierbar. Eine Auflösung auf ein subzelluläres Niveau ist für die Einschätzung des Zelloberflächenmarker-Status im gesamten Volumen eines Tumors kaum erforderlich. Des Weiteren zeigen Silber- im Vergleich zu Gold-NP eine erhöhte Toxizität [184], wodurch diese NP für Ex-vivo-Studien und In-vivo-Applikationen nicht geeignet sind.

Die vorgestellten Studien dokumentierten die Möglichkeit einer quantitativen Erfassung von HER2 mittels Anti-HER2-NP. Allerdings basierten diese Studien auf In-vitro- und Ex-vivo-Anwendungsbeispielen sowie topischen Anwendungsbeispielen. Zur Etablierung von Anti-HER2-NP in der minimal-invasiven Diagnostik sind Studien erforderlich, die das Potenzial dieser NP,

die HER2-Expression im gesamten Tumor darzustellen, nach einer systemischen Injektion untersuchen. In Anbetracht der häufigen Metastasierung von Brustkrebs, einem der verbreitetsten Tumoren mit einer HER2-Expression, in das Gehirn, fehlen Arbeiten zur differenziellen HER2-Expression in peripher und intrazerebral gelegenen Tumoren. Diese Themen wurden in der vorliegenden Arbeit adressiert.

Die vorliegende Arbeit ist somit die erste und einzige Studie mit einer systemischen Administration von Cetuximab- und Trastuzumab-SERRS-NP zur quantitativen Analyse der Tumormarker EGFR und HER2 in extrazerebral sowie intrazerebral gelegenen Tumoren. Die Daten belegen, dass die Raman-Bildgebung mit Antikörper-tragenden SERRS-NP die Tumoren besser als die MRT erfasst und zudem die generierten Daten mit denen der Durchflusszytometrie und IHC übereinstimmen. Durchflusszytometrisch lassen sich nur isolierte Zellen analysieren, womit Informationen zum räumlichen Kontext eines Tumors verloren gehen. Die IHC beruht auf einer Biopsie und liefert zwar räumliche Informationen, jedoch nur aus einem begrenzten Areal des Tumors. Die in der vorliegenden Studie verwendete Raman-Spektrum-Bestimmung mittels SERRS-NP besitzt gegenüber etablierten Verfahren den Vorteil, dass sie in vivo mit einer minimalen Menge von SERRS-NP bzw. Kontrastmittel ohne Zellisolierung und ohne gewebemodifizierende Prozessierung durchgeführt werden kann. Gleichzeitig liefert sie detailliertere Daten über die inter- und intratumorale Heterogenität von Zelloberflächenmarkern im gesamten Tumorquerschnitt.

5.4 Kritische Betrachtung des Potenzials von Goldnanopartikeln in der Patientenversorgung

5.4.1 Der EPR-Effekt

Trotz der genannten Vorteile und des Potenzials zur Verbesserung der Patientenversorgung ist die Nutzung von GNP als Diagnostikum kritisch zu betrachten. Ein Aspekt ist die Frage nach der spezifischen Interaktion der funktionalisierten NP mit dem Zelloberflächenmarker, d. h. nach der Spezifität bzw. nach dem Umfang des EPR-Effekts [75, 76]. Studien belegen, dass der EPR-Effekt zu einer basalen Aufnahme von NP in solide Tumoren (z. B. Brust-, Prostata- und Pankreaskrebs), Sarkome sowie präkanzeröse Läsionen führt [55]. Obwohl der Grad dieser passiven Anreicherung

krebsentitäts- und speziesspezifisch ist, belegen Studien, dass Raman-Signale von für einen Zelloberflächenmarker funktionalisierten NP die Signale von nicht modifizierten NP, deren Anreicherung im Tumorgewebe allein vom EPR-Effekt abhängt, übertreffen [69, 79, 80].

Auch Blockungsstudien weisen nach, dass funktionalisierte NP mit ihrem Zielmolekül interagieren und zu einer signifikanten Signalerhöhung beitragen [67, 77-79]. Die stärkere Anreicherung von funktionalisierten NP beruht vermutlich auf einer Erhöhung ihrer Assoziationskonstante um vier bis fünf Größenordnungen [185] und einem Anstieg der Avidität. Diese Parameter führen zu einer verlängerten Verweilzeit im Tumorgewebe und einer erhöhten Aufnahme in die Tumorzellen. Auch wenn der prozentuale Anteil des Raman-Signals, der auf den EPR-Effekt zurückzuführen ist, nicht bestimmbar ist, zeigt sich, dass dieser nicht entscheidend für die ermittelten relativen Unterschiede des Signals ist. Bei den untersuchten Tumoren entsprach die Intensität der Raman-Signale den Ergebnissen der Durchflusszytometrie und der IHC. In einem Individuum war das Raman-Signal des Tumors mit einer hohen Zelloberflächenmarker-Expression stets höher als das Signal des Tumors mit einer niedrigen Zelloberflächenmarker-Expression.

Auch in der vorliegenden Studie hat vermutlich bei verschiedenen Experimenten der EPR-Effekt die Raman-Signale beeinflusst. So zeigte sich bei peripher und intrazerebral gelegenen Tumoren ein unterschiedliches Ausmaß der Differenz zwischen den Intensitäten der Tumoren mit hoher bzw. niedriger EGFR-Expression (jeweils abstammend von der Tumorzelllinie A431 bzw. TS895). Eine mögliche Ursache dafür ist ein schwächerer EPR-Effekt bei den intrazerebral gelegenen Tumoren. Diese wiesen ein langsames Wachstum auf als peripher gelegene Tumoren (4–8 Wochen vs. 2–4 Wochen). Möglicherweise entwickelten in den vorliegenden Modellen die intrazerebral gelegenen Tumoren ein stabileres Gefäßsystem als die peripher gelegenen, wodurch der Beitrag des EPR-Effekts zur Aufnahme von NP reduziert wurde.

Einen noch deutlicheren Unterschied zwischen den Signalintensitäten zeigten intrazerebral gelegene Tumoren mit hoher bzw. niedriger HER2-Expression. Während der Experimente fiel auf, dass die aus der Zelllinie HCC1954 stammenden Tumoren im Vergleich zu denen aus den anderen Zelllinien eine besonders hohe Wachstumsrate aufwiesen. Möglicherweise war der EPR-Effekt in dem HER2-Modell höher als in den EGFR-Tumormodellen, wodurch sich die deutlichere Signaldifferenz zwischen Tumoren mit hoher und solchen mit niedriger HER2-Expression erklären ließe. Eine höhere Proliferationsrate steigert die Wahrscheinlichkeit für eine Unterbrechung der Blut-Hirn-Schranke, was wiederum den Austritt der NP aus dem Blutgefäß in den Tumor erleichtert.

Bei einer anzunehmenden Abnahme der Kompetenz der Blut-Hirn-Schranke mit steigender Proliferationsrate ist der Beitrag der spezifischen, auf Antikörpern basierenden Aufnahme der NP in Tumoren mit einer durchschnittlichen Wachstumsrate größer, während der EPR-Effekt bei erhöhten Wachstumsraten zu einer erhöhten Basisaufnahme von NP führt.

Die Basisaufnahme von NP durch den EPR-Effekt hängt zudem von der Tumorentität, der Tumorgroße sowie der Wachstumsrate ab und kann sich auch von Individuum zu Individuum unterscheiden.

Trotz der unterschiedlich starken von Antikörpern unabhängigen Aufnahme von SERRS-NP in die Tumoren über den EPR-Effekt zeigen die Mittelwerte der Raman-Signale und der Signale der individuellen Tumorpaaare in der vorliegenden Studie, dass der EPR-Effekt das Verhältnis der gemessenen Signalintensitäten, die durch die spezifische Interaktion der funktionalisierten NP hervorgerufen wurde, nicht umkehrt, sondern die Tumorbiologie hervorhebt: Höhere Intensitäten stammten von Tumoren mit einer höheren Zelloberflächenmarker-Expression, niedrigere Intensitäten von solchen mit einer niedrigeren Zelloberflächenmarker-Expression.

Dennoch belegen die Ergebnisse die Notwendigkeit systematischer Studien von mit Antikörpern funktionalisierten SERRS-NP in verschiedenen Tumorentitäten, Stadien und Lokalisationen, um den Beitrag des EPR-Effekts beurteilen und spezifische Grenzwerte definieren zu können.

5.4.2 Relevanz der Quantifizierung von Zelloberflächenmarkern und der intratumoralen Heterogenität

Die Relevanz des Wissens über den Expressionsstatus von Zelloberflächenmarkern ist in der Onkologie unumstritten. Inwieweit die Darstellung der intratumoralen Heterogenität sowie die exakte Quantifizierung eines Zelloberflächenmarkers von Bedeutung sind, lässt sich derzeit noch nicht abschätzen. In der Metaanalyse von Lee et al. führte eine gegen EGFR gerichtete Antikörper-Therapie bei Patienten mit GBM mit aberranter EGFR-Expression (Gen-Amplifikation und/oder Rezeptormutationen) zu keinem Überlebensvorteil [130]. Dagegen zeigten Slamon et al. in einer klinischen Phase-3-Studie, in der der HER2-Status basierend auf dem aktuell verwendeten semiquantitativen Punktesystem erfasst wurde, dass die Kombination aus Chemotherapie mit Trastuzumab bei Patienten mit HER2-überexprimierenden Brustkrebstumoren einer alleinigen Chemotherapie hinsichtlich des Überlebens überlegen war [142].

Diese beiden Studien sind exemplarisch für zahlreiche Studien, in denen die spezifische Therapie bei Überexpression eines Zelloberflächenmarkers zu keinem Überlebensvorteil führte oder in denen semiquantitative Informationen zum Expressionsstatus eines Zelloberflächenmarkers ausreichten, um einen Überlebensvorteil durch eine spezifische Therapie zu erzielen. Solche Befunde könnten zu der vorschnellen Annahme verleiten, dass die Erfassung der intratumoralen Heterogenität bzw. eine Quantifizierung eines Zelloberflächenmarkers keine klinischen Konsequenzen für den Patienten haben. Das derzeitige Fehlen eines Effekts spezifischer Therapien auf das Überleben bei bestimmten Tumorentitäten ist kein Argument gegen die Weiterentwicklung der minimal-invasiven Darstellung der Tumorkomposition. Stattdessen ist davon auszugehen, dass diese Methoden eine wertvolle Entscheidungshilfe bei der Auswahl der sich stetig vergrößernden Therapiemöglichkeiten bieten. Auch wenn eine semiquantitative Erfassung eines Zelloberflächenmarkers in vielen Fällen für die Entscheidung für oder gegen eine spezifische Therapie ausreicht, böte eine exakte Quantifizierung möglicherweise die Chance, Grenzfälle besser beurteilen und damit besser therapieren zu können. Ob eine exakte Quantifizierung gegenüber einer semiquantitativen Erfassung für die Patienten einen signifikanten Vorteil darstellt, kann aber zu diesem Zeitpunkt nicht valide beurteilt werden. Diese Forschungslücke sollte jedoch Motivation genug sein, die Entwicklung von Methoden zur Quantifizierung von Zelloberflächenmarkern voranzutreiben.

Die hier vorgestellte Methode bietet die Möglichkeit, die Zelloberflächenmarker-Expression in großen Tumorealen abzuschätzen (relative Quantifizierung) und gleichzeitig die Heterogenität der Expression in diesen Arealen zu analysieren. Beide Parameter sind für eine erfolgreiche Therapie entscheidend. Bei der Gesamtbetrachtung aller Daten der vorliegenden Studie aus verschiedenen Individuen wurde ersichtlich, dass die Tumoren mit hoher und niedriger Expression nicht vollkommen unterschiedliche Signalintensitätsbereiche zeigten. Vielmehr überschneiden sich zum Teil die Intensitätsbereiche der Tumoren der Individuen in beiden Gruppen. Vermutlich resultiert diese Beobachtung aus dem unterschiedlichen Ausmaß der Basisaufnahme, bedingt durch einen individuell verschieden stark ausgeprägten EPR-Effekt und unterschiedliche Tumorumfänge. Jeder Messpunkt (Pixel) in der Analyse der Raman-Bilder stellt einen Mittelwert der aus diesem Bereich stammenden Raman-Signale dar. Folglich ist es möglich, dass ein Tumor eine insgesamt niedrige Raman-Signalintensität aufweist, auch wenn er eine klonale Zellgruppe mit einer deutlich erhöhten Expression eines Zelloberflächenmarkers enthält und damit eine spezifische Therapie in Betracht gezogen werden sollte. Niedrige Mittelwerte können auftreten, wenn in dem untersuchten

Tumor Bereiche mit niedriger Expression dominieren. Diese Problematik könnte in der klinischen Praxis jedoch umgangen werden, wenn nicht nur individuelle Signalintensitäten erhoben, sondern diese stets im Zusammenhang mit Raman-Bildern beurteilt würden, die die intratumorale Verteilung eines Zelloberflächenmarkers visualisieren.

5.4.3 Toxizität

Das Forschungsfeld der molekularen Bildgebung mittels NP hat sich in den vergangenen 10–15 Jahren trotz der Bedenken bezüglich der Toxizität kontinuierlich weiterentwickelt. Die Toxizität von GNP hängt von der Größe, der Morphologie und der Methode der Synthese ab [186, 187]. Im Rahmen der vorliegenden Studie lebten die Mäuse nach einer i. v. Injektion von SERRS-GNP für weitere 18–24 Stunden ohne Symptomveränderungen im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Injektion. Die Evaluation der Toxizität war jedoch nicht Thema der vorliegenden Studie. Zu dieser Thematik standen bereits vor Beginn der Arbeit im Jahre 2016 umfangreiche Daten zur Verfügung. Im Folgenden wird ausschließlich die Literatur zur Toxizität von Gold- oder Silber-Gold-NP diskutiert, da andere Metall-NP ein deutlich schlechteres Toxizitätsprofil besitzen als GNP [184, 188–191].

Die GNP weisen einen protektiven antiinflammatorischen Effekt in Gehirnen von Ratten nach einem ischämischen Schlaganfall auf und befinden sich für verschiedene Indikationen bereits in klinischen Studien [192, 193]. Im Jahr 2011 veröffentlichten Thakor et al. eine umfangreiche Toxizitätsstudie zur i. v. und rektalen Applikation von GNP [70]. Sie beobachteten keine Veränderungen in der physischen Erscheinung, dem Verhalten oder der sozialen Interaktion der Mäuse im Verlauf von zwei Wochen. Auch fehlten Unterschiede bei der kardiovaskulären Funktion sowie bei hämatologischen oder biochemischen Parametern. Primär wurden die GNP aus der systemischen Zirkulation durch das Retikuloendotheliale System (RES) mit Makrophagen als Hauptakteuren eliminiert. Dieser Vorgang gehört zu den Hauptargumenten gegen die Anwendung von GNP, da eine unkontrollierte Aktivierung des Immunsystems bis hin zu einem Zytokin-Sturm befürchtet wird. Derartige Beobachtungen fehlen aber in bisherigen Studien. Qian et al. fanden keine toxischen oder anderen physiologischen Veränderungen innerhalb von zwei bis drei Monaten nach der Injektion von SERS-NP [82]. Allerdings zeigten Thakor et al. eine erhöhte Expression von Phase-2-Antioxidationsenzymen in der Leber, was auf einen erhöhten oxidativen Stress hinweist.

Diese Ergebnisse stehen in Konkordanz mit einer vorangegangenen Arbeit dieser Arbeitsgruppe, in der von der Formation freier Radikale im Zusammenhang mit der Anwendung von GNP berichtet wurde [194]. Auch wurde eine Erhöhung des Bcl-2-associated-X-protein (Bax)/B-cell-lymphoma-2(Bcl-2)-Verhältnisses trotz einer gesteigerten Expression von Antioxidationsenzymen mit subsequenter Apoptose von Hepatozyten dokumentiert [70]. Die initiale inflammatorische Antwort war jedoch bereits nach einer Woche nicht mehr nachweisbar. Trotz der von den Autoren hervorgehobenen hohen Regenerationsfähigkeit der Leber sind diese Befunde nicht zu unterschätzen. Zwar besitzen Menschen ein größeres Lebert Volumen, allerdings werden auch mehr GNP für ein messbares Signal benötigt. Ob die Relationen in Menschen und Mäusen vergleichbar sind, ist nicht bekannt. Des Weiteren war die Analyse auf zwei Wochen nach einer einmaligen Anwendung von NP begrenzt [70].

Die klinisch sinnvolle longitudinale Erfassung der Tumorkomposition erfordert eine wiederholte Injektion von NP über einen unbestimmten Zeitraum mit aktuell noch nicht definierbaren Intervallen. Laut Qian et al. kommt es zu keinen toxischen oder anderen physiologischen Veränderungen innerhalb von zwei bis drei Monaten nach der Injektion der SERS-NP [82], jedoch fehlen Langzeitstudien mit wiederholten Injektionen. Dey et al. veröffentlichten umfangreiche Ergebnisse zum Einfluss von GNP auf die Funktion von Makrophagen und dendritischen Zellen. Während sich die generelle Funktion der beiden Zelltypen nicht signifikant veränderte, traten Veränderungen bei der Zytokin- und Chemokin-Sekretion sowie bei der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf. In Makrophagen wurde eine veränderte Mitochondrien-Aktivität beobachtet. Des Weiteren berichteten die Autoren von einer Zunahme der Antigenpräsentation mit einer verstärkten T-Helferzell-Antwort (Th1-, Th2- und Th17) in dendritischen Zellen [195]. Bei Lira-Diaz et al. beschränkten sich die transiente Astro- und Mikrogliose nach einer intrazerebralen Injektion von GNP in Mäusen auf das Areal um die Injektionsstelle sowie auf die ersten sieben Tage. Danach kam es zu einer Abnahme dieser Effekte und zu einer Normalisierung bis Tag 90 [72]. Da nur eine einzige Injektion erfolgte, waren ebenso wie in der vorliegenden Studie keine Aussagen zu möglichen Langzeiteffekten bei wiederholten Injektionen möglich. Dennoch sind diese Ergebnisse für eine potenzielle klinische Translation vielversprechend. Die wenig invasive i. v. Applikation führt vermutlich auch bei wiederholten Injektionen zu einer geringeren GNP-Konzentration pro Gehirnvolumen. Damit ist von einer geringeren Gewebereaktion auszugehen.

Zusammenfassend lässt sich zur Toxizität festhalten, dass es trotz der bisher vielversprechenden Toxizitätsbefunde unabdingbar ist, die Synthese und den Einsatz von NP zu standardisieren. Diese Forderung betrifft insbesondere die verwendeten Größen, Geometrien und Konzentrationen, die chemische Komposition, die Funktionalisierungen sowie die Darreichungsformen (*Abbildung 32*).

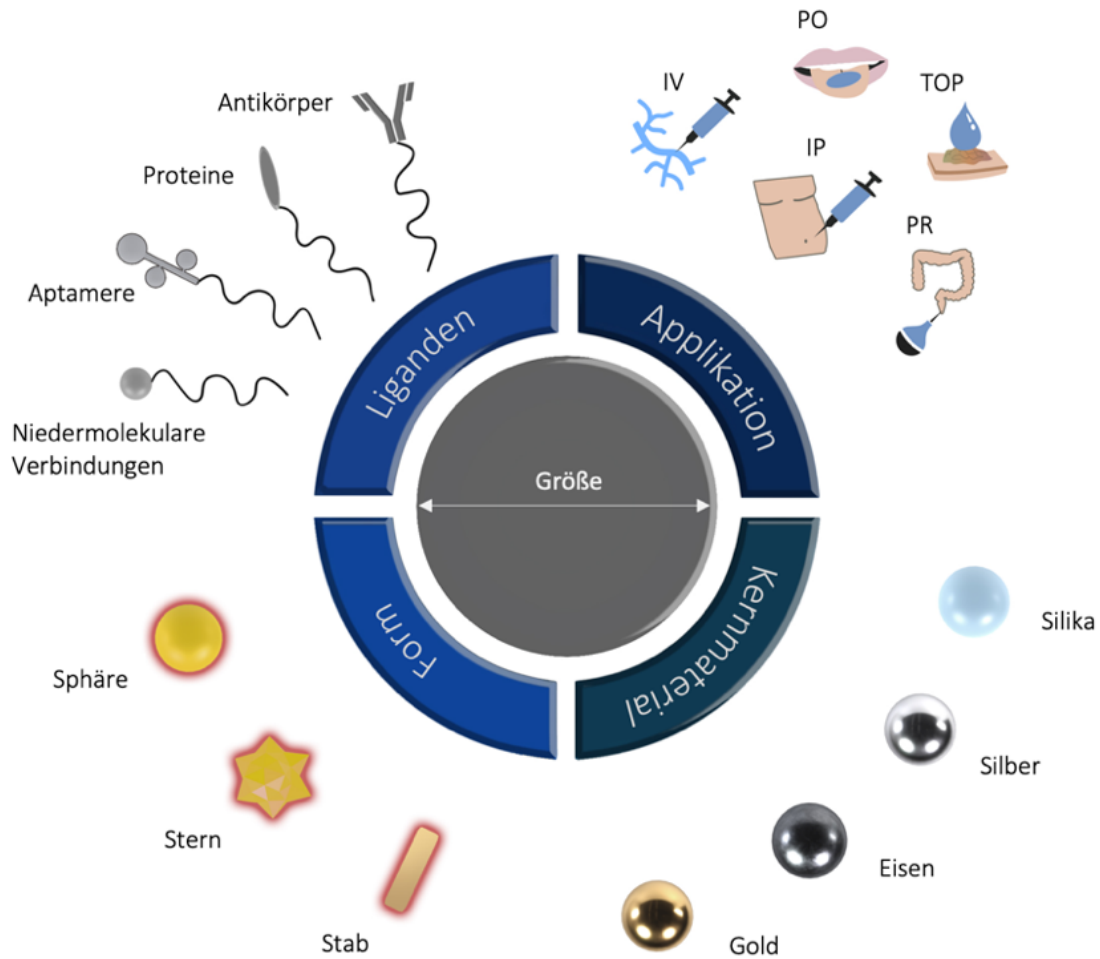


Abbildung 32: Parameter der Gold-Nanopartikel (GNP) für systematische Toxizitätsstudien

In zukünftigen Studien müssen verschiedene Größen, Kernmaterialien, Formen, Liganden und Applikationswege untersucht werden. Diese Abbildung stellt die zurzeit verbreitetsten Materialien in der präklinischen Forschung im Zusammenhang mit der molekularen Bildgebung dar. Abkürzungen: IV (intravenös); IP (intraperitoneal); PR (per rectum); PO (per os); TOP (topisch). (*Eigene Abbildung*)

Die Standardisierung ist die Voraussetzung dafür, dass Ergebnisse nicht durch Unterschiede in der Herstellung der NP verfälscht werden. Alternativ müssten für die aufgeführten Aspekte individuelle Toxizitätsstudien erfolgen. Sinnvoll wäre eine Integration dieser Strategien, da zunächst für jede Tumorentität und jedes Stadium die geeignete NP-Komposition identifiziert werden muss.

Diese könnten dann einem automatischen Herstellungsprozess zugeführt werden, um intra- sowie interindividuelle Unterschiede zu limitieren und umfangreiche Toxizitätsstudien zu ermöglichen.

5.4.4 Raman-Scanner

Notwendig für eine erfolgreiche klinische Translation sind eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit der Raman-Scanner und eine Verkürzung der Dauer der Bildgebung. In der vorliegenden Studie konnten die applizierten SERRS-NP in vivo durch den intakten Schädel einer Maus (1–3 mm) erfolgreich detektiert werden. Dies ist beim Menschen (Schädeldicke > 6 mm) kaum möglich, da die zur Durchdringung der dickeren Knochengewebsschicht benötigte Laserpower wahrscheinlich zu Gewebeverbrennungen führen würde. Auch die Methode der oberflächenverstärkten, räumlich versetzten Raman-Spektroskopie (engl. Surface-Enhanced Spatially Offset Raman Spectroscopy (SESORS)), die durch eine Winkelveränderung des Lasers und des Detektors eine höhere Eindringtiefe erzielt, zeigt bisher nur wenig zufriedenstellende Ergebnisse bei der Datenakquirierung durch den menschlichen Schädel [196, 197].

Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene Möglichkeit der In-vivo-Bildgebung durch den intakten Schädel einer Maus kann aber genutzt werden, um die longitudinale Entwicklung von primären und sekundären Gehirntumoren mit sowie ohne Therapie zu beobachten. Die Versuchstiere müssen nicht mehr der Euthanasie zugeführt oder nicht beliebig oft wiederholbaren chirurgischen oder bioptischen Eingriffen ausgesetzt werden, sondern können mit dieser Methode wiederholt und regelmäßig untersucht werden. Auf diese Weise ließe sich das Expressionsprofil desselben Tumors über mehrere Monate minimal-invasiv analysieren. Bisher ist dies nur möglich mit wiederholten Biopsien oder durch die Verwendung von Mäusen mit der gleichen Tumorentität, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Euthanasie zugeführt werden, wobei eine identische Dynamik in den Tieren vorausgesetzt wird.

Bei einer weiteren Optimierung der Raman-Spektroskope wäre möglicherweise auch die intratumorale Heterogenität in vivo erfassbar, was im Rahmen der vorliegenden Studie aufgrund der erhöhten Schrittgröße der Laserpunkte nicht realisierbar war. Kleinere Schrittgrößen hätten aufgrund der Dauer für eine In-vivo-Bildgebung und -Anästhesie eine nicht akzeptable Belastung für die Versuchstiere dargestellt.

Das größte Potenzial der SER(R)S-NP-basierten Bildgebung besteht im Bereich extrakranialer Analysen, bei denen keine knöchernen Strukturen überwunden werden müssen. Derzeit werden bei der Entwicklung von Scannern mit einem erweiterten Bildgebungswinkel [198] sowie von handgehaltenen [87, 199] und endoskopisch anwendbaren Scannern [200, 201] große Fortschritte erzielt.

Die SERRS-basierte Raman-Bildgebung ist derzeit als alleiniges Instrument zur klinischen Bildgebung nicht geeignet. Denkbar wäre jedoch eine Kombination aus CT bzw. MRT (Lokalisationsbestimmung), PET (Ersteinschätzung der Zelloberflächenmarker-Expression) und SERRS-basierter Bildgebung (Erfassung der Mikrostruktur und intratumoralen Heterogenität). Eine bessere Charakterisierung der Tumorkomposition ließe möglicherweise auch eine gezieltere Biopsie verschiedener Areale eines Tumors zu. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die SERRS-basierte Raman-Bildgebung eine potente Technik darstellt, die geeignet ist, die klinisch etablierte Bildgebung und Diagnostik zu komplementieren.

5.5 Limitationen bisheriger Studien und erforderliche Schwerpunkte für zukünftige Arbeiten

Herstellung der Nanopartikel

Die größte Limitation aller bisherigen Studien, inklusive der hier vorliegenden, ist die individuelle Herstellung der verwendeten NP, die die Vergleichbarkeit der Ergebnisse einschränkt. Aufgrund der individuellen Herstellung wiesen auch die NP-Chargen in der vorliegenden Studie häufig Unterschiede in Größe, Zeta-Potenzial und Signalintensität auf. Damit haben Divergenzen zwischen NP-Chargen möglicherweise zu den unterschiedlichen Raman-Signalniveaus von aus den gleichen Zelllinien hervorgegangenen Tumoren in den verschiedenen Individuen beigetragen.

Somit verweisen die Ergebnisse auf die Notwendigkeit, die SERRS-NP-Herstellung für eine systematische Evaluation und eine bessere Vergleichbarkeit von Studienergebnissen zu automatisieren.

Kommerziell hergestellte NP (z. B. BD, Sigma Aldrich, Oxonica Materials, Inc.) zeigen häufig schlechtere Signalintensitäten als laboreigene NP. Da sich GNP oder vergleichbare NP bisher in

der klinischen Praxis nicht etabliert haben, scheint für Firmen kein ausreichender Anreiz zu bestehen, NP in den verschiedenen chemischen Kompositionen, geometrischen Formen, Größen und möglichen Funktionalisierungen industriell herzustellen.

Geschwindigkeit und Eindringtiefe der Raman-Bildgebung

Noch ist die benötigte Dauer der Raman-Bildgebung für großflächige Areale unrealistisch lang und für Patienten nicht zumutbar. Je nach Größe des Areals kann eine Bildgebung mehrere Tage dauern. Zudem weist die Methode lediglich eine Eindringtiefe im Bereich von mm bis zu wenigen cm auf. Aufgrund der reduzierten Geschwindigkeit des Raman-Scanners in der vorliegenden Studie betrug die Schrittgröße des Lasers in Abhängigkeit von der Tumorgöße zwischen 50 und 100 μm . Damit übertraf die räumliche Auflösung die Größe einer Zelle (10–20 μm) und ein Pixel enthielt das Signal von mehreren Zellen. Solange sich SERRS-NP nicht im Klinikalltag etabliert haben, fehlt ein wirtschaftlicher Anreiz, in die Weiterentwicklung der Kleintier-Scanner zu investieren. Dabei ist eine schnellere Bildgebung von großflächigeren Arealen mit einer erhöhten Eindringtiefe für die klinische Anwendung unverzichtbar.

Zelloberflächenmarker und ihre Quantifizierung

Bisherige Arbeiten zur NP-basierten Raman-Bildgebung konzentrierten sich entweder auf die relative Quantifizierung von Zelloberflächenmarkern in Gewebeschnitten, auf die von isolierten Tumorzellen nach topischer Applikation, auf In-vitro-Applikation der NP oder auf die rein qualitative Detektion der Marker [77, 78, 80, 97, 182, 183]. Die vorliegende Studie geht einen Schritt weiter und präsentiert eine Methode zur relativen Quantifizierung von Zelloberflächenmarkern am Beispiel von EGFR und HER2 nach einer systemischen Administration funktionalisierter NP.

In der Literatur fehlen Daten zur Quantifizierung des EPR-Effekts. Diese Daten sind jedoch notwendig, um den Raman-Signalanteil, der auf der spezifischen Interaktion der Zelloberflächenmarker mit den funktionalisierten NP beruht, quantifizieren zu können. In der vorliegenden Studie

belegten die durchflusszytometrischen Daten und die IHC-Daten die Assoziation der Raman-Signale mit dem Zelloberflächenmarker-Status. Eine Bestimmung des Anteils des EPR-Effekts war allerdings nicht möglich.

Für die Definition exakter Raman-Signal-Grenzwerte, die zu einer Entscheidung für oder gegen eine spezifische Therapie führen, ist eine standardisierte Herstellung der SERRS-NP erforderlich. Derzeit variieren die Signalintensitäten und die Sensitivitäten der SERRS-NP von Labor zu Labor sowie von Charge zu Charge, da einheitliche Synthesebedingungen fehlen. Ferner hängt das durch den EPR-Effekt bedingte Grundsignal von der Tumorentität und dem -stadium ab, was eine Festlegung der Grenzwerte weiter erschwert.

Auch ist der EPR-Effekt in Menschen möglicherweise nicht mit dem in Kleintieren vergleichbar. Tumoren in präklinischen Studien zeigen in der Regel ein schnelles Tumorstadium innerhalb weniger Wochen. Da sich bei Menschen Tumoren meist über einen Zeitraum von Monaten entwickeln, sind die Endothelzellen und die Perizyten der Tumorgefäße vermutlich stärker ausgeprägt, sodass die Penetration durch die Tumoren insgesamt geringer ist.

Zur Definition von Grenzwerten für diverse Tumorentitäten und Zelloberflächenmarker sollte in zukünftigen Studien erarbeitet werden, welche NP-Komposition für den jeweiligen Tumor am geeignetsten ist, aber auch, ob diese NP-Komposition für alle Tumorstadien anwendbar ist. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte in Zusammenarbeit mit der Industrie die Entwicklung eines einheitlichen Herstellungsprozesses angestrebt werden, der für die Definition von Grenzwerten unverzichtbar ist.

Nicht alle therapeutisch einsetzbaren Zelloberflächenmarker lassen sich aufgrund ihrer Struktur oder ihrer Lokalisation gut mittels Bildgebungsverfahren detektieren. Daher sollten zukünftige Arbeiten auch die Erforschung geeigneter Surrogat-Marker umfassen.

Detektion von Zelloberflächenmarker-Mutationen mit Nanopartikeln

Bisherige Studien inklusive der vorliegenden Studie zielten auf die generelle Erfassung der Zelloberflächenmarker ab. Es wäre jedoch wünschenswert, zwischen verschiedenen Mutationsformen eines Markers unterscheiden zu können. Beim EGFR können Mutationen für den Erfolg oder das Scheitern einer Therapie verantwortlich sein [202, 203].

Longitudinale Verlaufsstudien zur Analyse des Zelloberflächenmarker-Status mit Nanopartikeln

Tumoren können sich im Therapieverlauf verändern und Zelloberflächenmarker verlieren oder hinzugewinnen. Bisherige Studien zur langfristigen Anwendung von NP widmeten sich der Toxizitätsevaluation. Im Rahmen der vorliegenden Studie war es zur Beantwortung der Forschungsfragen unabdingbar, die Mäuse einzuschläfern. Nur auf diese Weise konnten die Raman-Daten mit dem Goldstandard der IHC zur Beurteilung des Zelloberflächenmarker-Status verglichen werden. Für eine Optimierung der Vergleichbarkeit wurde auch die Raman-Bildgebung *ex vivo* durchgeführt, wodurch eine Verlaufsbeobachtung unmöglich wurde.

Wie zuvor ausgeführt, ist ebenso die Geschwindigkeit der Scanner ein limitierender Faktor. Sobald diese technischen Probleme behoben sind, sollten Expressionsprofile im Verlauf mit und ohne Therapie in verschiedenen Tumorentitäten erstellt werden.

Langzeittoxizitätsstudien

Die zahlreichen Studien zur Toxizität unterschiedlicher NP-Formulierungen umfassen nur Zeiträume von bis zu drei Monaten. Zukünftige Langzeitstudien von mindestens ein bis zwei Jahren sollten systematisch die Toxizität verschiedener NP bei wiederholter Anwendung evaluieren.

5.6 Schlussfolgerungen

Das Wissen um die Komposition eines Tumors und dessen Adaptation unter der Therapie ist von essenzieller Bedeutung. Bei vielen Patienten sind oder werden die Tumoren refraktär gegenüber Standardtherapien und personalisierten Therapien. Die Charakterisierung der Architektur eines Tumors erfordert eine komplexe Phänotypisierung vor Therapiebeginn, die in regelmäßigen Intervallen wiederholt werden sollte.

Zahlreiche Tumorentitäten zeigen eine Überexpression der Zelloberflächenmarker EGFR und HER2. Die gegen diese Zelloberflächenmarker gerichteten Antikörper Cetuximab bzw. Trastuzumab haben sich in der Krebstherapie etabliert. Beide Therapien sind jedoch mit Nebenwirkungen sowie hohen Kosten verbunden. Folglich könnten die Erfassung der intratumoralen Heterogenität

und die relative Quantifizierung der Marker enorme Vorteile sowohl für den Patienten als für das Gesundheitssystem bieten.

Das Auflösungsvermögen der in der klinischen Praxis verwendeten Bildgebungsmethoden reicht nicht aus, den heterogenen Expressionsstatus einzelner Zelloberflächenmarker zu erfassen. Daneben sind die Verfahren mit klinisch relevanten Nachteilen und Limitationen verbunden. Bei der etablierten IHC wird das Expressionsniveau eines Zelloberflächenmarkers aufgrund von Fehlern bei der Gewebegewinnung und Befundung häufig falsch interpretiert. Zudem lässt sich mit der Methode nur ein begrenztes Areal des Tumors darstellen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine Methode zur Charakterisierung des Expressionsstatus von Zelloberflächenmarkern zu entwickeln, die die bekannten Nachteile (Strahlenbelastung, hohen Kontrastmittelmengen, Invasivität, potenziell gewebeverändernde Prozessierung) umgeht, gleichzeitig aber einen höchstmöglichen Informationsgehalt bietet. In der vorliegenden Studie ließen sich mit einer minimal-invasiven i. v. Injektion von Cetuximab- bzw. Trastuzumab-SERRS-NP die inter- sowie die intratumorale Heterogenität der Zelloberflächenmarker EGFR und HER2 im intrazerebralen und peripheren Kontext darstellen. Das Verfahren erlaubte dabei nicht nur eine Unterscheidung zwischen dem Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein der Marker, sondern auch eine Einordnung unterschiedlicher Expressionsniveaus, die mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie und der IHC übereinstimmten. Die verwendete Methode beruhte auf robusten spektroskopischen Kriterien der Detektion oder Nichtdetektion des SERRS-Signals, womit eine objektive Befundung der Daten möglich war.

Zu den Limitationen der Studie gehörte die manuelle Herstellung der SERRS-NP, wobei zwischen den Partikeln und Chargen Variationen auftraten. Die daraus resultierende unterschiedliche Signalintensität der SERRS-NP könnte die Interpretation des Rezeptorstatus verfälschen. Auch konnte der verwendete Raman-Scanner seine Fokalebene nicht an die unebene Oberfläche der Tumorschnitte anpassen, wodurch möglicherweise die Signale moduliert wurden. Die akquirierten Signalintensitäten stimmten jedoch stets mit den Daten der Durchflusszytometrie und der IHC überein. Die Eindringtiefe der Scanner war auf wenige mm begrenzt. Diese Limitation stellte bei den in der vorliegenden Studie betrachteten Tumoren im Kleintiermodell kein Hindernis dar; für eine klinische Translation müsste aber die Eindringtiefe erhöht werden. Aufgrund der reduzierten Geschwindigkeit des Raman-Scanners wurde eine Schrittgröße zwischen 50 und 100 μm gewählt.

Damit war die räumliche Auflösung größer als eine einzelne Zelle (10–20 μm) und die Pixel enthielten Signale von mehreren Zellen. Aufgrund der eindeutigen Konkordanz mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie und der IHC ist anzunehmen, dass die aus den Zellen generierten Mittelwerte in einem Pixel geeignet waren, die Fragestellungen zu untersuchen.

Vor dem klinischen Einsatz von mit Antikörpern funktionalisierten SERRS-NP zur Bestimmung der Zelloberflächenmarker-Expression sind verschiedene Optimierungen erforderlich. Dazu zählen die kontrollierte Herstellung von SERRS-NP sowie die Optimierung der Raman-Scanner. Überdies sollten größer angelegte präklinische Studien zur Evaluation der Expression weiterer Zelloberflächenmarker, mit longitudinalen Verlaufsbeobachtung und mit Langzeittoxizitätsmessungen durchgeführt werden.

Beim klinischen Einsatz der SERRS-basierten Bildgebung (Erfassung der Mikrostruktur und der intratumoralen Heterogenität des Zelloberflächenmarkers) wäre vorerst eine Kombination mit etablierten Bildgebungsverfahren (CT/MRT zur Tumorlokalisierung, PET zur Ersteinschätzung der Zelloberflächenmarker-Expression) sinnvoll. Bei offenen Fragen oder der Notwendigkeit weiterer Gewebeuntersuchungen könnten die SERRS-basierten Bildgebungsdaten zur Zielführung der Biopsienadel dienen. Bei einer erfolgreichen Etablierung von SERRS-NP in diesem Bereich wäre anschließend eine unabhängige Anwendung als Diagnostikum denkbar. Nach der Feststellung eines Tumors könnte im Anschluss eine i. v. Injektion von mit Antikörpern gegen Zelloberflächenmarker funktionalisierten SERRS-NP verabreicht werden. Die anschließend notwendige Biopsie zur Diagnosesicherung könnte jetzt gezielt bestimmte Regionen analysieren. Im Fall einer auf Antikörpern basierenden Therapie könnte in regelmäßigen Abständen eine Verlaufsuntersuchung mit erneuten Injektionen erfolgen, um Veränderungen im Tumor bzw. bei der Zelloberflächenmarker-Expression zu detektieren und eine eventuell notwendige Therapieanpassung frühzeitig durchzuführen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Expressionsniveau der Zelloberflächenmarker Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) spielt für die Prognose sowie die Therapie diverser Tumoren eine entscheidende Rolle. Aktuell etablierte klinische Diagnosemethoden sind nicht in der Lage, die Expressionsniveaus von EGFR und HER2 in einem größeren Bereich zu quantifizieren und die intratumorale Heterogenität abzubilden. In der vorliegenden Studie sollte analysiert werden, ob mit Cetuximab oder Trastuzumab funktionalisierte Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikel (SERRS-NP) nach einer minimal-invasiven, intravenösen Injektion in der Lage sind, die inter- sowie die intratumorale Heterogenität des EGFR- bzw. des HER2-Status basierend auf Raman-Signalen zu erfassen (relative Quantifizierung). Dazu wurden Mausmodelle mit intrazerebralen und peripheren Tumoren mit einem differenziellen EGFR- und HER2-Expressionsniveau etabliert.

Der Vergleich mit den Magnetresonanztomographie(MRT)- sowie den Immunhistochemie(IHC)-Befunden bestätigte, dass die durch die Cetuximab- und Trastuzumab-SERRS-NP generierten Raman-Spektren die differenzielle Expression von EGFR bzw. HER2 sowohl inter- als auch intratumoral wiedergaben. Tumoren mit hohen Raman-Signalen zeigten auch in der IHC eine hohe Zelloberflächenmarker-Expression. Des Weiteren korrespondierten die intratumoralen Variationen der Raman-Signalintensitäten mit den IHC-Farbunterschieden für den jeweiligen Marker.

Darüber hinaus ermöglichte die Intensität der Raman-Spektren aufgrund ihrer numerischen Komponente eine relative Quantifizierung von EGFR und HER2. Durch den Vergleich der Raman-Signale von Tumoren mit hoher und niedriger EGFR- bzw. HER2-Expression innerhalb einer Maus mit SERRS-NP der gleichen Charge konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Unterschieden der Raman-Signalintensitäten um Varianzen zwischen SERRS-NP-Chargen handelte.

Die Ergebnisse belegen, dass Antikörper-tragende SERRS-NP inter- und intratumorale Variationen der Expression ihrer Zielstrukturen erfassen können. In Zukunft könnten sie daher die klinisch etablierte Bildgebung und Diagnostik komplementieren sowie dazu beitragen, die Limitierungen dieser Methoden in den Bereichen Tumordiagnostik, Erfassung der inter- und intratumoralen Heterogenität sowie Therapieverlaufsbeobachtung zu überwinden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209-249, May, 2021.
- [2] C. Andreou, S. Pal, L. Rotter, J. Yang, and M. F. Kircher, "Molecular Imaging in Nanotechnology and Theranostics," *Mol Imaging Biol*, vol. 19, no. 3, pp. 363-372, Jun, 2017.
- [3] R. Weissleder, and U. Mahmood, "Molecular imaging," *Radiology*, vol. 219, no. 2, pp. 316-333, May, 2001.
- [4] M. F. Kircher, and J. K. Willmann, "Molecular body imaging: MR imaging, CT, and US. part I. principles," *Radiology*, vol. 263, no. 3, pp. 633-643, Jun, 2012.
- [5] J. C. Junn, K. A. Soderlund, and C. M. Glastonbury, "Imaging of Head and Neck Cancer With CT, MRI, and US," *Semin Nucl Med*, vol. 51, no. 1, pp. 3-12, Jan, 2021.
- [6] K. Schmelz, J. Toedling, M. Huska, M. C. Cwikla, L. M. Kruetzfeldt, J. Proba, P. F. Ambros, I. M. Ambros, S. Boral, M. Lodrini, C. Y. Chen, M. Burkert, D. Guergen, A. Szymansky, K. Astrahantseff, A. Kuenkele, K. Haase, M. Fischer, H. E. Deubzer, F. Hertwig, P. Hundsdorfer, A. G. Henssen, R. F. Schwarz, J. H. Schulte, and A. Eggert, "Spatial and temporal intratumour heterogeneity has potential consequences for single biopsy-based neuroblastoma treatment decisions," *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, pp. 6804, Nov, 2021.
- [7] V. E. Mikkelsen, O. Solheim, O. Salvesen, and S. H. Torp, "The histological representativeness of glioblastoma tissue samples," *Acta Neurochir (Wien)*, Oct, 2020.
- [8] M. L. James, and S. S. Gambhir, "A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications," *Physiol Rev*, vol. 92, no. 2, pp. 897-965, Apr, 2012.
- [9] Nibib.nih.gov. 2022. Magnetic Resonance Imaging (MRI). [online] Available at: <<https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/magnetic-resonance-imaging-mri>> [Accessed 29 January 2022].
- [10] J. S. de Maar, A. M. Sofias, T. Porta Siegel, R. J. Vreeken, C. Moonen, C. Bos, and R. Deckers, "Spatial heterogeneity of nanomedicine investigated by multiscale imaging of the drug, the nanoparticle and the tumour environment," *Theranostics*, vol. 10, no. 4, pp. 1884-1909, Jan, 2020.
- [11] H. Morneburg, and S. Aktiengesellschaft, *Bildgebende Systeme für die medizinische Diagnostik: Röntgendiagnostik und Angiographie, Computertomographie, Nuklearmedizin, Magnetresonanztomographie, Sonographie, integrierte Informationssysteme*: Publicis-MCD-Verlag, 1995.
- [12] G. Arthur, "Albert Coons: harnessing the power of the antibody," *Lancet Respir Med*, vol. 4, no. 3, pp. 181-182, Mar, 2016.
- [13] G. Mazzaschi, D. Madeddu, A. Falco, G. Bocchialini, M. Goldoni, F. Sogni, G. Armani, C. A. Lagrasta, B. Lorusso, C. Mangiaracina, R. Vilella, C. Frati, R. Alfieri, L. Ampollini, M. Veneziani, E. M. Silini, A. Ardizzoni, K. Urbanek, F. Aversa, F. Quaini, and M. Tiseo, "Low PD-1 Expression in Cytotoxic CD8(+) Tumor-Infiltrating Lymphocytes Confers an Immune-Privileged Tissue Microenvironment in NSCLC with a Prognostic and Predictive Value," *Clin Cancer Res*, vol. 24, no. 2, pp. 407-419, Jan, 2018.

- [14] R. S. Herbst, J. C. Soria, M. Kowanetz, G. D. Fine, O. Hamid, M. S. Gordon, J. A. Sosman, D. F. McDermott, J. D. Powderly, S. N. Gettinger, H. E. Kohrt, L. Horn, D. P. Lawrence, S. Rost, M. Leabman, Y. Xiao, A. Mokatrín, H. Koeppen, P. S. Hegde, I. Mellman, D. S. Chen, and F. S. Hodi, "Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients," *Nature*, vol. 515, no. 7528, pp. 563-567, Nov, 2014.
- [15] D. S. Thommen, V. H. Koelzer, P. Herzig, A. Roller, M. Trefny, S. Dimeloe, A. Kiialainen, J. Hanhart, C. Schill, C. Hess, S. Savic Prince, M. Wiese, D. Lardinois, P. C. Ho, C. Klein, V. Karanikas, K. D. Mertz, T. N. Schumacher, and A. Zippelius, "A transcriptionally and functionally distinct PD-1(+) CD8(+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade," *Nat Med*, vol. 24, no. 7, pp. 994-1004, Jul, 2018.
- [16] A. De Cuyper, M. Van Den Eynde, and J. P. Machiels, "HER2 as a Predictive Biomarker and Treatment Target in Colorectal Cancer," *Clin Colorectal Cancer*, vol. 19, no. 2, pp. 65-72, Jun, 2020.
- [17] K. Goutsouliak, J. Veeraraghavan, V. Sethunath, C. De Angelis, C. K. Osborne, M. F. Rimawi, and R. Schiff, "Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer," *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 17, no. 4, pp. 233-250, Apr, 2020.
- [18] G. Wang, Y. He, Y. Sun, W. Wang, X. Qian, X. Yu, and Y. Pan, "Prevalence, prognosis and predictive status of HER2 amplification in anti-EGFR-resistant metastatic colorectal cancer," *Clin Transl Oncol*, vol. 22, no. 6, pp. 813-822, Jun, 2020.
- [19] M. A. Xavier, F. Rezende, R. Titze-de-Almeida, and B. Cornelissen, "BRCAness as a Biomarker of Susceptibility to PARP Inhibitors in Glioblastoma Multiforme," *Biomolecules*, vol. 11, no. 8, pp. 1188, Aug, 2021.
- [20] J. Yeong, J. C. T. Lim, B. Lee, H. Li, C. C. H. Ong, A. A. Thike, W. H. Yeap, Y. Yang, A. Y. H. Lim, T. K. Y. Tay, J. Liu, S. C. Wong, J. Chen, E. H. Lim, J. Iqbal, R. Dent, E. W. Newell, and P. H. Tan, "Prognostic value of CD8 + PD-1+ immune infiltrates and PDCD1 gene expression in triple negative breast cancer," *J Immunother Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 34, Feb, 2019.
- [21] C. Badoual, S. Hans, N. Merillon, C. Van Ryswick, P. Ravel, N. Benhamouda, E. Levionnois, M. Nizard, A. Si-Mohamed, N. Besnier, A. Gey, R. Rotem-Yehudar, H. Pere, T. Tran, C. L. Guerin, A. Chauvat, E. Dransart, C. Alanio, S. Albert, B. Barry, F. Sandoval, F. Quintin-Colonna, P. Bruneval, W. H. Fridman, F. M. Lemoine, S. Oudard, L. Johannes, D. Olive, D. Brasnu, and E. Tartour, "PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer," *Cancer Res*, vol. 73, no. 1, pp. 128-138, Jan, 2013.
- [22] J. Yeong, J. C. T. Lim, B. Lee, H. Li, N. Chia, C. C. H. Ong, W. K. Lye, T. C. Putti, R. Dent, E. Lim, A. A. Thike, P. H. Tan, and J. Iqbal, "High Densities of Tumor-Associated Plasma Cells Predict Improved Prognosis in Triple Negative Breast Cancer," *Front Immunol*, vol. 9, pp. 1209, May, 2018.
- [23] S. Umesh, A. Tandon, V. Santosh, B. Anandh, S. Sampath, B. A. Chandramouli, and V. R. Sastry Kolluri, "Clinical and immunohistochemical prognostic factors in adult glioblastoma patients," *Clin Neuropathol*, vol. 28, no. 5, pp. 362-372, Sep-Oct, 2009.
- [24] A. Walczyk, J. Koczyński, D. Gąsior-Perczak, I. Pałyga, A. Kowalik, M. Chrapek, M. Hejnold, S. Góźdź, and A. Kowalska, "Histopathology and immunohistochemistry as prognostic factors for poorly differentiated thyroid cancer in a series of Polish patients," *PLoS One*, vol. 15, no. 2, pp. e0229264, Feb, 2020.

- [25] J. M. Fang, and J. Shi, "A Clinicopathologic and Molecular Update of Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms With a Focus on the New World Health Organization Classification," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 143, no. 11, pp. 1317-1326, Nov, 2019.
- [26] A. O. Stemmer-Rachamimov, and D. N. Louis, "Histopathologic and immunohistochemical prognostic factors in malignant gliomas," *Curr Opin Oncol*, vol. 9, no. 3, pp. 230-234, May, 1997.
- [27] L. L. Matos, D. C. Trufelli, M. G. de Matos, and M. A. da Silva Pinhal, "Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice," *Biomark Insights*, vol. 5, pp. 9-20, Feb, 2010.
- [28] P. Brandtzaeg, "The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry," *J Immunol Methods*, vol. 216, no. 1-2, pp. 49-67, Jul, 1998.
- [29] Z. Gatalica, R. Feldman, S. Vranić, and D. Spetzler, "Immunohistochemistry-Enabled Precision Medicine," *Cancer Treat Res*, vol. 178, pp. 111-135, Jun, 2019.
- [30] J. Baselga, E. A. Perez, T. Pienkowski, and R. Bell, "Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer," *Oncologist*, vol. 11 Suppl 1, pp. 4-12, Sep, 2006.
- [31] C.-C. Chen, P.-W. Hsu, T.-W. Erich Wu, S.-T. Lee, C.-N. Chang, K.-c. Wei, C.-C. Chuang, C.-T. Wu, T.-N. Lui, Y.-H. Hsu, T.-K. Lin, S.-C. Lee, and Y.-C. Huang, "Stereotactic brain biopsy: Single center retrospective analysis of complications," *Clin Neurol Neurosurg*, vol. 111, no. 10, pp. 835-839, Dec, 2009.
- [32] E. A. O'Flynn, A. R. Wilson, and M. J. Michell, "Image-guided breast biopsy: state-of-the-art," *Clin Radiol*, vol. 65, no. 4, pp. 259-270, Apr, 2010.
- [33] J. K. Lee, J. Wang, J. K. Sa, E. Ladewig, H. O. Lee, I. H. Lee, H. J. Kang, D. S. Rosenbloom, P. G. Camara, Z. Liu, P. van Nieuwenhuizen, S. W. Jung, S. W. Choi, J. Kim, A. Chen, K. T. Kim, S. Shin, Y. J. Seo, J. M. Oh, Y. J. Shin, C. K. Park, D. S. Kong, H. J. Seol, A. Blumberg, J. I. Lee, A. Iavarone, W. Y. Park, R. Rabadan, and D. H. Nam, "Spatiotemporal genomic architecture informs precision oncology in glioblastoma," *Nat Genet*, vol. 49, no. 4, pp. 594-599, Apr, 2017.
- [34] P. Fan, and V. Craig Jordan, "Acquired resistance to selective estrogen receptor modulators (SERMs) in clinical practice (tamoxifen & raloxifene) by selection pressure in breast cancer cell populations," *Steroids*, vol. 90, pp. 44-52, Nov, 2014.
- [35] H. Sareen, C. Garrett, D. Lynch, B. Powter, D. Brungs, A. Cooper, J. Po, E. S. Koh, J. Y. Vessey, S. McKechnie, R. Bazina, M. Sheridan, J. V. Gelder, B. Darwish, M. Jaeger, T. L. Roberts, P. De Souza, and T. M. Becker, "The Role of Liquid Biopsies in Detecting Molecular Tumor Biomarkers in Brain Cancer Patients," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 7, pp. 1831, Jul, 2020.
- [36] V. E. Mikkelsen, O. Solheim, Ø. Salvesen, and S. H. Torp, "The histological representativeness of glioblastoma tissue samples," *Acta Neurochir (Wien)*, vol. 163, no. 7, pp. 1911-1920, Jul, 2021.
- [37] S. L. Meijer, J. Wesseling, V. T. Smit, P. M. Nederlof, G. K. Hooijer, H. Ruijter, J. W. Arends, M. Kliffen, J. M. van Gorp, L. Sterk, and M. J. van de Vijver, "HER2 gene amplification in patients with breast cancer with equivocal IHC results," *J Clin Pathol*, vol. 64, no. 12, pp. 1069-1072, Dec, 2011.

- [38] R. S. Hoda, A. S. Bowman, A. Zehir, P. Razavi, E. Brogi, M. Ladanyi, M. E. Arcila, H. Y. Wen, and D. S. Ross, "Next-generation assessment of human epidermal growth factor receptor 2 gene (ERBB2) amplification status in invasive breast carcinoma: a focus on Group 4 by use of the 2018 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 testing guideline," *Histopathology*, vol. 78, no. 4, pp. 498-507, Mar, 2021.
- [39] M. Werner, A. Chott, A. Fabiano, and H. Battifora, "Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry," *Am J Surg Pathol*, vol. 24, no. 7, pp. 1016-1019, Jul, 2000.
- [40] A. S. Leong, and J. Wright, "The contribution of immunohistochemical staining in tumour diagnosis," *Histopathology*, vol. 11, no. 12, pp. 1295-1305, Dec, 1987.
- [41] H. Yaziji, and T. Barry, "Diagnostic Immunohistochemistry: what can go wrong?," *Adv Anat Pathol*, vol. 13, no. 5, pp. 238-246, Sep, 2006.
- [42] L. Qiu, D. D. Mais, M. Nicolas, J. Nanyes, K. Kist, and A. Nazarullah, "Diagnosis of Papillary Breast Lesions on Core Needle Biopsy: Upgrade Rates and Interobserver Variability," *Int J Surg Pathol*, vol. 27, no. 7, pp. 736-743, Oct, 2019.
- [43] S. Biesterfeld, U. Veuskens, F. J. Schmitz, B. Amo-Takyi, and A. Böcking, "Interobserver reproducibility of immunocytochemical estrogen- and progesterone receptor status assessment in breast cancer," *Anticancer Res*, vol. 16, no. 5a, pp. 2497-2500, Sep-Oct, 1996.
- [44] S. Al Diffalha, M. Shaar, G. A. Barkan, E. M. Wojcik, M. M. Picken, and S. E. Pambuccian, "Immunohistochemistry in the workup of prostate biopsies: Frequency, variation and appropriateness of use among pathologists practicing at an academic center," *Ann Diagn Pathol*, vol. 27, pp. 34-42, Apr, 2017.
- [45] S. W. Kim, J. Roh, and C. S. Park, "Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips," *J Pathol Transl Med*, vol. 50, no. 6, pp. 411-418, Nov, 2016.
- [46] Z. Varga, J. Diebold, C. Dommann-Scherrer, H. Frick, D. Kaup, A. Noske, E. Obermann, C. Ohlschlegel, B. Padberg, C. Rakozy, S. Sancho Oliver, S. Schobinger-Clement, H. Schreiber-Facklam, G. Singer, C. Tapia, U. Wagner, M. G. Mastropasqua, G. Viale, and H. A. Lehr, "How reliable is Ki-67 immunohistochemistry in grade 2 breast carcinomas? A QA study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists," *PLoS One*, vol. 7, no. 5, pp. e37379, May, 2012.
- [47] T. Seidal, A. J. Balaton, and H. Battifora, "Interpretation and quantification of immunostains," *Am J Surg Pathol*, vol. 25, no. 9, pp. 1204-1207, Sep, 2001.
- [48] K. Im, S. Mareninov, M. F. P. Diaz, and W. H. Yong, "An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining," *Methods Mol Biol*, vol. 1897, pp. 299-311, Dec, 2019.
- [49] W. C. C. Tan, S. N. Nerurkar, H. Y. Cai, H. H. M. Ng, D. Wu, Y. T. F. Wee, J. C. T. Lim, J. Yeong, and T. K. H. Lim, "Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy," *Cancer Commun (Lond)*, vol. 40, no. 4, pp. 135-153, Apr, 2020.
- [50] R. Neher, and E. Neher, "Optimizing imaging parameters for the separation of multiple labels in a fluorescence image," *J Microsc*, vol. 213, no. 1, pp. 46-62, Jan, 2004.
- [51] A. Smekal, "Zur Quantentheorie der Dispersion," *Naturwissenschaften*, vol. 11, no. 43, pp. 873-875, Oct, 1923.
- [52] C. V. Raman, and K. S. Krishnan, "A New Type of Secondary Radiation," *Nature*, vol. 121, no. 3048, pp. 501-502, Mar, 1928.

- [53] C. Andreou, S. A. Kishore, and M. F. Kircher, "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: A New Modality for Cancer Imaging," *J Nucl Med*, vol. 56, no. 9, pp. 1295-1299, Sep, 2015.
- [54] C. L. Zavaleta, M. F. Kircher, and S. S. Gambhir, "Raman's "effect" on molecular imaging," *J Nucl Med*, vol. 52, no. 12, pp. 1839-1844, Dec, 2011.
- [55] S. Harmsen, R. Huang, M. A. Wall, H. Karabeber, J. M. Samii, M. Spaliviero, J. R. White, S. Monette, R. O'Connor, K. L. Pitter, S. A. Sastra, M. Saborowski, E. C. Holland, S. Singer, K. P. Olive, S. W. Lowe, R. G. Blasberg, and M. F. Kircher, "Surface-enhanced resonance Raman scattering nanostars for high-precision cancer imaging," *Sci Transl Med*, vol. 7, no. 271, pp. 271ra7, Jan, 2015.
- [56] E. B. Hanlon, R. Manoharan, T. W. Koo, K. E. Shafer, J. T. Motz, M. Fitzmaurice, J. R. Kramer, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld, "Prospects for in vivo Raman spectroscopy," *Phys Med Biol*, vol. 45, no. 2, pp. R1-R59, Feb, 2000.
- [57] M. Fleischmann, P. J. Hendra, and A. J. McQuillan, "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode," *Chem Phys Lett*, vol. 26, no. 2, pp. 163-166, May, 1974.
- [58] G. W. Auner, S. K. Koya, C. Huang, B. Broadbent, M. Trexler, Z. Auner, A. Elias, K. C. Mehne, and M. A. Brusatori, "Applications of Raman spectroscopy in cancer diagnosis," *Cancer Metastasis Rev*, vol. 37, no. 4, pp. 691-717, Dec, 2018.
- [59] J. R. Lombardi, and R. L. Birke, "A unified view of surface-enhanced Raman scattering," *Acc Chem Res*, vol. 42, no. 6, pp. 734-742, Jun, 2009.
- [60] X. M. Qian, and S. M. Nie, "Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications," *Chem Soc Rev*, vol. 37, no. 5, pp. 912-920, May, 2008.
- [61] J. Kneipp, H. Kneipp, B. Wittig, and K. Kneipp, "Novel optical nanosensors for probing and imaging live cells," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 2, pp. 214-226, Apr, 2010.
- [62] G. McNay, D. Eustace, W. E. Smith, K. Faulds, and D. Graham, "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS): a review of applications," *Appl Spectrosc*, vol. 65, no. 8, pp. 825-837, Aug, 2011.
- [63] S. Harmsen, M. A. Bedics, M. A. Wall, R. Huang, M. R. Detty, and M. F. Kircher, "Rational design of a chalcogenopyrylium-based surface-enhanced resonance Raman scattering nanoprobe with attomolar sensitivity," *Nat Commun*, vol. 6, pp. 6570, Mar, 2015.
- [64] C. Andreou, V. Neuschmelting, D. F. Tschaharganeh, C. H. Huang, A. Oseledchyk, P. Iacono, H. Karabeber, R. R. Colen, L. Mannelli, S. W. Lowe, and M. F. Kircher, "Imaging of Liver Tumors Using Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 10, no. 5, pp. 5015-5026, May, 2016.
- [65] S. Harmsen, M. A. Wall, R. Huang, and M. F. Kircher, "Cancer imaging using surface-enhanced resonance Raman scattering nanoparticles," *Nat Protoc*, vol. 12, no. 7, pp. 1400-1414, Jul, 2017.
- [66] L. K. Rotter, N. Berisha, H. T. Hsu, K. H. Burns, C. Andreou, and M. F. Kircher, "Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging," *Nanotheranostics*, vol. 6, no. 3, pp. 256-269, Jan, 2022.
- [67] R. J. Mallia, P. Z. McVeigh, C. J. Fisher, I. Veilleux, and B. C. Wilson, "Wide-field multiplexed imaging of EGFR-targeted cancers using topical application of NIR SERS nanoprobes," *Nanomedicine (Lond)*, vol. 10, no. 1, pp. 89-101, Jan, 2015.

- [68] S. Harmsen, S. Rogalla, R. Huang, M. Spaliviero, V. Neuschmelting, Y. Hayakawa, Y. Lee, Y. Taylor, R. Toledo-Crow, J. W. Kang, J. M. Samii, H. Karabeber, R. M. Davis, J. R. White, M. van de Rijn, S. S. Gambhir, C. H. Contag, T. C. Wang, and M. F. Kircher, "Detection of Premalignant Gastrointestinal Lesions Using Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering-Nanoparticle Endoscopy," *ACS Nano*, vol. 13, no. 2, pp. 1354-1364, Feb, 2019.
- [69] A. Oseledchyk, C. Andreou, M. A. Wall, and M. F. Kircher, "Folate-Targeted Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Nanoprobe Ratiometry for Detection of Microscopic Ovarian Cancer," *ACS Nano*, vol. 11, no. 2, pp. 1488-1497, Feb, 2017.
- [70] A. S. Thakor, R. Luong, R. Paulmurugan, F. I. Lin, P. Kempen, C. Zavaleta, P. Chu, T. F. Massoud, R. Sinclair, and S. S. Gambhir, "The fate and toxicity of Raman-active silica-gold nanoparticles in mice," *Sci Transl Med*, vol. 3, no. 79, pp. 79ra33, Apr, 2011.
- [71] M. Cho, W. S. Cho, M. Choi, S. J. Kim, B. S. Han, S. H. Kim, H. O. Kim, Y. Y. Sheen, and J. Jeong, "The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles," *Toxicol Lett*, vol. 189, no. 3, pp. 177-183, Sep, 2009.
- [72] E. Lira-Diaz, M. G. Gonzalez-Pedroza, C. Vasquez, R. A. Morales-Luckie, and O. Gonzalez-Perez, "Gold nanoparticles produce transient reactive gliosis in the adult brain," *Neurosci Res*, vol. 170, pp. 76-86, Sep, 2021.
- [73] C. L. Zavaleta, K. B. Hartman, Z. Miao, M. L. James, P. Kempen, A. S. Thakor, C. H. Nielsen, R. Sinclair, Z. Cheng, and S. S. Gambhir, "Preclinical evaluation of Raman nanoparticle biodistribution for their potential use in clinical endoscopy imaging," *Small*, vol. 7, no. 15, pp. 2232-2240, Aug, 2011.
- [74] J. L. Campbell, E. D. SoRelle, O. Ilovich, O. Liba, M. L. James, Z. Qiu, V. Perez, C. T. Chan, A. de la Zerda, and C. Zavaleta, "Multimodal assessment of SERS nanoparticle biodistribution post ingestion reveals new potential for clinical translation of Raman imaging," *Biomaterials*, vol. 135, pp. 42-52, Aug, 2017.
- [75] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review," *J Control Release*, vol. 65, no. 1-2, pp. 271-284, Mar, 2000.
- [76] Y. Matsumura, and H. Maeda, "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs," *Cancer Res*, vol. 46, no. 12 Pt 1, pp. 6387-6392, Dec, 1986.
- [77] J. V. Jokerst, Z. Miao, C. Zavaleta, Z. Cheng, and S. S. Gambhir, "Affibody-functionalized gold-silica nanoparticles for Raman molecular imaging of the epidermal growth factor receptor," *Small*, vol. 7, no. 5, pp. 625-633, Mar, 2011.
- [78] E. Chung, J. Lee, J. Yu, S. Lee, J. H. Kang, I. Y. Chung, and J. Choo, "Use of surface-enhanced Raman scattering to quantify EGFR markers uninhibited by cetuximab antibodies," *Biosens Bioelectron*, vol. 60, pp. 358-365, Oct, 2014.
- [79] R. Huang, S. Harmsen, J. M. Samii, H. Karabeber, K. L. Pitter, E. C. Holland, and M. F. Kircher, "High Precision Imaging of Microscopic Spread of Glioblastoma with a Targeted Ultrasensitive SERRS Molecular Imaging Probe," *Theranostics*, vol. 6, no. 8, pp. 1075-1084, May, 2016.
- [80] T. R. Nayak, C. Andreou, A. Oseledchyk, W. D. Marcus, H. C. Wong, J. Massague, and M. F. Kircher, "Tissue factor-specific ultra-bright SERRS nanostars for Raman detection of pulmonary micrometastases," *Nanoscale*, vol. 9, no. 3, pp. 1110-1119, Jan, 2017.

- [81] Y. L. Hu, and J. Q. Gao, "Potential neurotoxicity of nanoparticles," *Int J Pharm*, vol. 394, no. 1-2, pp. 115-121, Jul, 2010.
- [82] X. Qian, X. H. Peng, D. O. Ansari, Q. Yin-Goen, G. Z. Chen, D. M. Shin, L. Yang, A. N. Young, M. D. Wang, and S. Nie, "In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags," *Nat Biotechnol*, vol. 26, no. 1, pp. 83-90, Jan, 2008.
- [83] L. Y. Chou, K. Ming, and W. C. Chan, "Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles," *Chem Soc Rev*, vol. 40, no. 1, pp. 233-245, Jan, 2011.
- [84] J. H. Kim, J. S. Kim, H. Choi, S. M. Lee, B. H. Jun, K. N. Yu, E. Kuk, Y. K. Kim, D. H. Jeong, M. H. Cho, and Y. S. Lee, "Nanoparticle probes with surface enhanced Raman spectroscopic tags for cellular cancer targeting," *Anal Chem*, vol. 78, no. 19, pp. 6967-6973, Oct, 2006.
- [85] A. M. Mohs, M. C. Mancini, S. Singhal, J. M. Provenzale, B. Leyland-Jones, M. D. Wang, and S. Nie, "Hand-held spectroscopic device for in vivo and intraoperative tumor detection: contrast enhancement, detection sensitivity, and tissue penetration," *Anal Chem*, vol. 82, no. 21, pp. 9058-9065, Nov, 2010.
- [86] Y. Liu, Z. Chang, H. Yuan, A. M. Fales, and T. Vo-Dinh, "Quintuple-modality (SERS-MRI-CT-TPL-PTT) plasmonic nanoprobe for theranostics," *Nanoscale*, vol. 5, no. 24, pp. 12126-12131, Dec, 2013.
- [87] H. Karabeber, R. Huang, P. Iacono, J. M. Samii, K. Pitter, E. C. Holland, and M. F. Kircher, "Guiding brain tumor resection using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles and a hand-held Raman scanner," *ACS Nano*, vol. 8, no. 10, pp. 9755-9766, Oct, 2014.
- [88] J. Langer, D. Jimenez de Aberasturi, J. Aizpurua, R. A. Alvarez-Puebla, B. Augu  , J. J. Baumberg, G. C. Bazan, S. E. J. Bell, A. Boisen, A. G. Brolo, J. Choo, D. Cialla-May, V. Deckert, L. Fabris, K. Faulds, F. J. Garc  a de Abajo, R. Goodacre, D. Graham, A. J. Haes, C. L. Haynes, C. Huck, T. Itoh, M. K  ll, J. Kneipp, N. A. Kotov, H. Kuang, E. C. Le Ru, H. K. Lee, J. F. Li, X. Y. Ling, S. A. Maier, T. Mayerh  fer, M. Moskovits, K. Murakoshi, J. M. Nam, S. Nie, Y. Ozaki, I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, J. Popp, A. Pucci, S. Reich, B. Ren, G. C. Schatz, T. Shegai, S. Schl  cker, L. L. Tay, K. G. Thomas, Z. Q. Tian, R. P. Van Duyne, T. Vo-Dinh, Y. Wang, K. A. Willets, C. Xu, H. Xu, Y. Xu, Y. S. Yamamoto, B. Zhao, and L. M. Liz-Marz  n, "Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering," *ACS Nano*, vol. 14, no. 1, pp. 28-117, Jan, 2020.
- [89] B. Brozek-Pluska, J. Musial, R. Kordek, E. Bailo, T. Dieing, and H. Abramczyk, "Raman spectroscopy and imaging: applications in human breast cancer diagnosis," *Analyst*, vol. 137, no. 16, pp. 3773-3780, Aug, 2012.
- [90] A. Szaniawska, and A. Kudelski, "Applications of Surface-Enhanced Raman Scattering in Biochemical and Medical Analysis," *Front Chem*, vol. 9, pp. 664134, May, 2021.
- [91] M. A. Tahir, N. E. Dina, H. Cheng, V. K. Valev, and L. Zhang, "Surface-enhanced Raman spectroscopy for bioanalysis and diagnosis," *Nanoscale*, vol. 13, no. 27, pp. 11593-11634, Jul, 2021.
- [92] L. Blanco-Covian, V. Montes-Garcia, A. Girard, M. T. Fernandez-Abedul, J. Perez-Juste, I. Pastoriza-Santos, K. Faulds, D. Graham, and M. C. Blanco-Lopez, "Au@Ag SERS tags coupled to a lateral flow immunoassay for the sensitive detection of pneumolysin," *Nanoscale*, vol. 9, no. 5, pp. 2051-2058, Feb, 2017.

- [93] F. M. Campbell, A. Ingram, P. Monaghan, J. Cooper, N. Sattar, P. D. Eckersall, and D. Graham, "SERRS immunoassay for quantitative human CRP analysis," *Analyst*, vol. 133, no. 10, pp. 1355-1357, Oct, 2008.
- [94] F. Biscaglia, S. Quarta, G. Villano, C. Turato, A. Biasiolo, L. Litti, M. Ruzzene, M. Meneghetti, P. Pontisso, and M. Gobbo, "PreS1 peptide-functionalized gold nanostructures with SERRS tags for efficient liver cancer cell targeting," *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 103, pp. 109762, Oct, 2019.
- [95] M. Spaliviero, S. Harmsen, R. Huang, M. A. Wall, C. Andreou, J. A. Eastham, K. A. Touijer, P. T. Scardino, and M. F. Kircher, "Detection of Lymph Node Metastases with SERRS Nanoparticles," *Mol Imaging Biol*, vol. 18, no. 5, pp. 677-685, Oct, 2016.
- [96] M. A. Wall, T. M. Shaffer, S. Harmsen, D. F. Tschaharganeh, C. H. Huang, S. W. Lowe, C. M. Drain, and M. F. Kircher, "Chelator-Free Radiolabeling of SERRS Nanoparticles for Whole-Body PET and Intraoperative Raman Imaging," *Theranostics*, vol. 7, no. 12, pp. 3068-3077, Jul, 2017.
- [97] A. Téllez-Plancarte, E. Haro-Poniatowski, M. Picquart, J. G. Morales-Méndez, C. Lara-Cruz, J. E. Jiménez-Salazar, P. Damián-Matsumura, L. Escobar-Alarcón, and N. Batina, "Development of a Nanostructured Platform for Identifying HER2-Heterogeneity of Breast Cancer Cells by Surface-Enhanced Raman Scattering," *Nanomaterials (Basel)*, vol. 8, no. 7, pp. 549, Jul, 2018.
- [98] N. Bergmann, C. Delbridge, J. Gempt, A. Feuchtinger, A. Walch, L. Schirmer, W. Bunk, T. Aschenbrenner, F. Liesche-Starnecker, and J. Schlegel, "The Intratumoral Heterogeneity Reflects the Intertumoral Subtypes of Glioblastoma Multiforme: A Regional Immunohistochemistry Analysis," *Front Oncol*, vol. 10, pp. 494, Apr, 2020.
- [99] N. R. Parker, A. L. Hudson, P. Khong, J. F. Parkinson, T. Dwight, R. J. Ikin, Y. Zhu, Z. J. Cheng, F. Vafaee, J. Chen, H. R. Wheeler, and V. M. Howell, "Intratumoral heterogeneity identified at the epigenetic, genetic and transcriptional level in glioblastoma," *Sci Rep*, vol. 6, pp. 22477, Mar, 2016.
- [100] T. M. Parker, K. Gupta, A. M. Palma, M. Yekelchyk, P. B. Fisher, S. R. Grossman, K. J. Won, E. Madan, E. Moreno, and R. Gogna, "Cell competition in intratumoral and tumor microenvironment interactions," *EMBO J*, vol. 40, no. 17, pp. e107271, Sep, 2021.
- [101] G. Radziuviene, A. Rasmusson, R. Augulis, R. B. Grineviciute, D. Zilenaite, A. Laurinaviciene, V. Ostapenko, and A. Laurinavicius, "Intratumoral Heterogeneity and Immune Response Indicators to Predict Overall Survival in a Retrospective Study of HER2-Borderline (IHC 2+) Breast Cancer Patients," *Front Oncol*, vol. 11, pp. 774088, Nov, 2021.
- [102] L. G. Martelotto, C. K. Y. Ng, S. Piscuoglio, B. Weigelt, and J. S. Reis-Filho, "Breast cancer intra-tumor heterogeneity," *Breast Cancer Res: BCR*, vol. 16, no. 3, p. 210, May, 2014.
- [103] G. Turashvili, and E. Brogi, "Tumor Heterogeneity in Breast Cancer," *Front Med*, vol. 4, pp. 227, Dec, 2017.
- [104] G. S. Stoyanov, D. Dzhenkov, P. Ghenev, B. Iliev, Y. Enchev, and A. B. Tonchev, "Cell biology of glioblastoma multiforme: from basic science to diagnosis and treatment," *Med Oncol*, vol. 35, no. 3, pp. 27, Jan, 2018.
- [105] Q. Klopfenstein, C. Truntzer, J. Vincent, and F. Ghiringhelli, "Cell lines and immune classification of glioblastoma define patient's prognosis," *Br J Cancer*, vol. 120, no. 8, pp. 806-814, Apr, 2019.

- [106] F. Liesche-Starnecker, K. Mayer, F. Kofler, S. Baur, F. Schmidt-Graf, J. Kempfer, G. Prokop, N. Pfarr, W. Wei, J. Gempt, S. E. Combs, C. Zimmer, B. Meyer, B. Wiestler, and J. Schlegel, "Immunohistochemically Characterized Intratumoral Heterogeneity Is a Prognostic Marker in Human Glioblastoma," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 10, pp. 2964, Oct, 2020.
- [107] N. Schafer, G. H. Gielen, L. Rauschenbach, S. Kebir, A. Till, R. Reinartz, M. Simon, P. Niehusmann, C. Kleinschnitz, U. Herrlinger, T. Pietsch, B. Scheffler, and M. Glas, "Longitudinal heterogeneity in glioblastoma: moving targets in recurrent versus primary tumors," *J Transl Med*, vol. 17, no. 1, pp. 96, Mar, 2019.
- [108] A. Berghoff, Z. Bago-Horvath, C. De Vries, P. Dubsy, U. Pluschnig, M. Rudas, A. Rottenfusser, M. Knauer, H. Eiter, F. Fitzal, K. Dieckmann, R. M. Mader, M. Gnant, C. C. Zielinski, G. G. Steger, M. Preusser, and R. Bartsch, "Brain metastases free survival differs between breast cancer subtypes," *Br J Cancer*, vol. 106, no. 3, pp. 440-446, Jan, 2012.
- [109] K. J. Stelzer, "Epidemiology and prognosis of brain metastases," *Surg Neurol Int*, vol. 4, no. Suppl 4, pp. S192-S202, May, 2013.
- [110] B. H. Nam, S. Y. Kim, H. S. Han, Y. Kwon, K. S. Lee, T. H. Kim, and J. Ro, "Breast cancer subtypes and survival in patients with brain metastases," *Breast Cancer Res*, vol. 10, no. 1, pp. R20, Feb, 2008.
- [111] S. Berezowska, S. Diermeier-Daucher, G. Brockhoff, R. Busch, J. Duyster, A. L. Grosu, and J. Schlegel, "Effect of additional inhibition of human epidermal growth factor receptor 2 with the bispecific tyrosine kinase inhibitor AEE788 on the resistance to specific EGFR inhibition in glioma cells," *Int J Mol Med*, vol. 26, no. 5, pp. 713-721, Nov, 2010.
- [112] H. S. Earp, T. L. Dawson, X. Li, and H. Yu, "Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 35, no. 1, pp. 115-132, Jul, 1995.
- [113] T. Spivak-Kroizman, D. Rotin, D. Pinchasi, A. Ullrich, J. Schlessinger, and I. Lax, "Heterodimerization of c-erbB2 with different epidermal growth factor receptor mutants elicits stimulatory or inhibitory responses," *J Biol Chem*, vol. 267, no. 12, pp. 8056-8063, Apr, 1992.
- [114] S. P. Kennedy, J. F. Hastings, J. Z. R. Han, and D. R. Croucher, "The Under-Appreciated Promiscuity of the Epidermal Growth Factor Receptor Family," *Front Cell Dev Biol*, vol. 4, pp. 88, Aug, 2016.
- [115] T. S. P. Grandhi, J. To, A. Romero, F. Luna, W. Barnes, J. Walker, R. Moran, R. Newlin, L. Miraglia, A. P. Orth, and S. R. Horman, "High-throughput CRISPR-mediated 3D enrichment platform for functional interrogation of chemotherapeutic resistance," *Biotechnol Bioeng*, vol. 118, no. 8, pp. 3187-3199, Aug, 2021.
- [116] A. Wursthorn, C. Schwager, I. Kurth, C. Peitzsch, C. Herold-Mende, J. Debus, A. Abdollahi, and A. Nowrouzi, "High-Complexity cellular barcoding and clonal tracing reveals stochastic and deterministic parameters of radiation resistance," *Int J Cancer*, vol. 150, no. 4, pp. 663-677, Oct, 2021.
- [117] A. Pala, G. Karpel-Massler, R. E. Kast, C. R. Wirtz, and M. E. Halatsch, "Epidermal to Mesenchymal Transition and Failure of EGFR-Targeted Therapy in Glioblastoma," *Cancers (Basel)*, vol. 4, no. 2, pp. 523-530, May, 2012.
- [118] T. Yamamoto, T. Nishida, N. Miyajima, S. Kawai, T. Ooi, and K. Toyoshima, "The erbB gene of avian erythroblastosis virus is a member of the src gene family," *Cell*, vol. 35, no. 1, pp. 71-78, Nov, 1983.

- [119] D. M. Thompson, and G. N. Gill, "The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy," *Cancer Surv*, vol. 4, no. 4, pp. 767-788, Jan, 1985.
- [120] Y. Yarden, and M. X. Sliwkowski, "Untangling the ErbB signalling network," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 2, no. 2, pp. 127-137, Feb, 2001.
- [121] F. Ciardiello, and G. Tortora, "EGFR antagonists in cancer treatment," *N Engl J Med*, vol. 358, no. 11, pp. 1160-1174, Mar, 2008.
- [122] S. Cohen, "Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal," *J Biol Chem*, vol. 237, pp. 1555-1562, May, 1962.
- [123] G. Carpenter, L. King, Jr., and S. Cohen, "Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro," *Nature*, vol. 276, no. 5686, pp. 409-410, Nov, 1978.
- [124] T. Hunter, and J. A. Cooper, "Epidermal growth factor induces rapid tyrosine phosphorylation of proteins in A431 human tumor cells," *Cell*, vol. 24, no. 3, pp. 741-752, Jun, 1981.
- [125] D. S. Salomon, R. Brandt, F. Ciardiello, and N. Normanno, "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies," *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 19, no. 3, pp. 183-232, Jul, 1995.
- [126] T. Kawamoto, J. D. Sato, A. Le, J. Polikoff, G. H. Sato, and J. Mendelsohn, "Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 80, no. 5, pp. 1337-1341, Mar, 1983.
- [127] J. D. Sato, T. Kawamoto, A. D. Le, J. Mendelsohn, J. Polikoff, and G. H. Sato, "Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors," *Mol Biol Med*, vol. 1, no. 5, pp. 511-529, Dec, 1983.
- [128] A. J. Wong, S. H. Bigner, D. D. Bigner, K. W. Kinzler, S. R. Hamilton, and B. Vogelstein, "Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 84, no. 19, pp. 6899-6903, Oct, 1987.
- [129] R. I. Nicholson, J. M. Gee, and M. E. Harper, "EGFR and cancer prognosis," *Eur J Cancer*, vol. 37 Suppl 4, pp. S9-S15, Sep, 2001.
- [130] A. Lee, M. Arasaratnam, D. L. H. Chan, M. Khasraw, V. M. Howell, and H. Wheeler, "Anti-epidermal growth factor receptor therapy for glioblastoma in adults," *Cochrane Database Syst Rev*, vol. 5, pp. CD013238, May, 2020.
- [131] V. Subramaniyan, S. Fuloria, G. Gupta, D. H. Kumar, M. Sekar, K. V. Sathasivam, K. Sudhakar, K. S. Alharbi, W. H. Al-Malki, O. Afzal, I. Kazmi, F. A. Al-Abbasi, A. S. A. Altamimi, and N. K. Fuloria, "A review on epidermal growth factor receptor's role in breast and non-small cell lung cancer," *Chem Biol Interact*, vol. 351, pp. 109735, Nov, 2021.
- [132] F. S. Saadeh, R. Mahfouz, and H. I. Assi, "EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas," *Int J Biol Markers*, vol. 33, no. 1, pp. 22-32, Jan, 2018.
- [133] D. A. Reardon, P. Y. Wen, and I. K. Mellinghoff, "Targeted molecular therapies against epidermal growth factor receptor: past experiences and challenges," *Neuro Oncol*, vol. 16 Suppl 8, no. Suppl 8, pp. viii7-viii13, Oct, 2014.

- [134] I. Vivanco, H. I. Robins, D. Rohle, C. Campos, C. Grommes, P. L. Nghiemphu, S. Kubek, B. Oldrini, M. G. Chheda, N. Yannuzzi, H. Tao, S. Zhu, A. Iwanami, D. Kuga, J. Dang, A. Pedraza, C. W. Brennan, A. Heguy, L. M. Liau, F. Lieberman, W. K. Yung, M. R. Gilbert, D. A. Reardon, J. Drappatz, P. Y. Wen, K. R. Lamborn, S. M. Chang, M. D. Prados, H. A. Fine, S. Horvath, N. Wu, A. B. Lassman, L. M. DeAngelis, W. H. Yong, J. G. Kuhn, P. S. Mischel, M. P. Mehta, T. F. Cloughesy, and I. K. Mellingshoff, "Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors," *Cancer Discov*, vol. 2, no. 5, pp. 458-471, May, 2012.
- [135] A. Rappl, G. Piontek, and J. Schlegel, "EGFR-dependent migration of glial cells is mediated by reorganisation of N-cadherin," *J Cell Sci*, vol. 121, no. Pt 24, pp. 4089-4097, Dec, 2008.
- [136] R. Roskoski, Jr., "Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors," *Pharmacol Res*, vol. 144, pp. 19-50, Jun, 2019.
- [137] A. L. Schechter, D. F. Stern, L. Vaidyanathan, S. J. Decker, J. A. Drebin, M. I. Greene, and R. A. Weinberg, "The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen," *Nature*, vol. 312, no. 5994, pp. 513-516, Dec, 1984.
- [138] D. Graus-Porta, R. R. Beerli, J. M. Daly, and N. E. Hynes, "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling," *EMBO J*, vol. 16, no. 7, pp. 1647-1655, Apr, 1997.
- [139] E. I. Graziani, M. Sung, D. Ma, B. Narayanan, K. Marquette, S. Puthenveetil, L. N. Tumey, J. Bikker, J. Casavant, E. M. Bennett, M. B. Charati, J. Golas, C. Hosselet, C. M. Rohde, G. Hu, M. Guffroy, H. Falahatpisheh, M. Finkelstein, T. Clark, F. Barletta, L. Tchistiakova, J. Lucas, E. Rosfjord, F. Loganzo, C. J. O'Donnell, H. P. Gerber, and P. Sapa, "PF-06804103, A Site-specific Anti-HER2 Antibody-Drug Conjugate for the Treatment of HER2-expressing Breast, Gastric, and Lung Cancers," *Mol Cancer Ther*, vol. 19, no. 10, pp. 2068-2078, Oct, 2020.
- [140] N. Iqbal, and N. Iqbal, "Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications," *Mol Biol Int*, vol. 2014, pp. 852748-852748, Sep, 2014.
- [141] R. M. Hudziak, J. Schlessinger, and A. Ullrich, "Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 84, no. 20, pp. 7159-7163, Oct, 1987.
- [142] D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, and L. Norton, "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2," *N Engl J Med*, vol. 344, no. 11, pp. 783-792, Mar, 2001.
- [143] A. Garcia-Alvarez, A. Papakonstantinou, and M. Oliveira, "Brain Metastases in HER2-Positive Breast Cancer: Current and Novel Treatment Strategies," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 12, Jun, 2021.
- [144] J. Baselga, L. Norton, J. Albanell, Y. M. Kim, and J. Mendelsohn, "Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts," *Cancer Res*, vol. 58, no. 13, pp. 2825-2831, Jul, 1998.
- [145] "Monoclonal antibody approved for metastatic breast cancer," *Oncology (Williston Park)*, vol. 12, no. 12, pp. 1727, Dec, 1998.

- [146] T. J. Smith, N. E. Davidson, D. V. Schapira, E. Grunfeld, H. B. Muss, V. G. Vogel, 3rd, and M. R. Somerfield, "American Society of Clinical Oncology 1998 update of recommended breast cancer surveillance guidelines," *J Clin Oncol*, vol. 17, no. 3, pp. 1080-1082, Mar, 1999.
- [147] Y. H. Park, M. J. Park, S. H. Ji, S. Y. Yi, D. H. Lim, D. H. Nam, J. I. Lee, W. Park, D. H. Choi, S. J. Huh, J. S. Ahn, W. K. Kang, K. Park, and Y. H. Im, "Trastuzumab treatment improves brain metastasis outcomes through control and durable prolongation of systemic extracranial disease in HER2-overexpressing breast cancer patients," *Br J Cancer*, vol. 100, no. 6, pp. 894-900, Mar, 2009.
- [148] G. D. Lewis Phillips, M. C. Nishimura, J. A. Lacap, S. Kharbanda, E. Mai, J. Tien, K. Malesky, S. P. Williams, J. Marik, and H. S. Phillips, "Trastuzumab uptake and its relation to efficacy in an animal model of HER2-positive breast cancer brain metastasis," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 164, no. 3, pp. 581-591, Aug, 2017.
- [149] F. Montemurro, S. Delalogue, C. H. Barrios, R. Wuerstlein, A. Anton, E. Brain, T. Hatschek, C. M. Kelly, C. Peña-Murillo, M. Yilmaz, M. Donica, and P. Ellis, "Trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and brain metastases: exploratory final analysis of cohort 1 from KAMILLA, a single-arm phase IIIb clinical trial(☆)," *Ann Oncol*, vol. 31, no. 10, pp. 1350-1358, Oct, 2020.
- [150] A. Fabi, D. Alesini, E. Valle, L. Moscetti, R. Caputo, M. Caruso, L. Carbognin, M. Ciccarese, N. La Verde, G. Arpino, K. Cannita, I. Paris, D. Santini, F. Montemurro, M. Russillo, G. Ferretti, G. Filippelli, R. Rossello, A. Fabbri, A. Zambelli, V. Leonardi, A. M. D'Ottavio, C. Nisticò, S. Stani, M. Giampaglia, G. Scandurra, G. Catania, P. Malaguti, D. Giannarelli, and F. Cognetti, "T-DM1 and brain metastases: Clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer," *Breast*, vol. 41, pp. 137-143, Oct, 2018.
- [151] H. Wildiers, K. Tryfonidis, L. Dal Lago, P. Vuylsteke, G. Curigliano, S. Waters, B. Brouwers, S. Altintas, N. Touati, F. Cardoso, and E. Brain, "Pertuzumab and trastuzumab with or without metronomic chemotherapy for older patients with HER2-positive metastatic breast cancer (EORTC 75111-10114): an open-label, randomised, phase 2 trial from the Elderly Task Force/Breast Cancer Group," *Lancet Oncol*, vol. 19, no. 3, pp. 323-336, Mar, 2018.
- [152] M. Bilous, M. Dowsett, W. Hanna, J. Isola, A. Lebeau, A. Moreno, F. Penault-Llorca, J. Rüschoff, G. Tomasic, and M. van de Vijver, "Current perspectives on HER2 testing: a review of national testing guidelines," *Mod Pathol*, vol. 16, no. 2, pp. 173-182, Feb, 2003.
- [153] J. Liu, J. Li, T. J. Rosol, X. Pan, and J. L. Voorhees, "Biodegradable nanoparticles for targeted ultrasound imaging of breast cancer cells in vitro," *Phys Med Biol*, vol. 52, no. 16, pp. 4739-4747, Aug, 2007.
- [154] Q. Jiang, S. Hao, X. Xiao, J. Yao, B. Ou, Z. Zhao, F. Liu, X. Pan, B. Luo, and H. Zhi, "Production and characterization of a novel long-acting Herceptin-targeted nanobubble contrast agent specific for Her-2-positive breast cancers," *Breast cancer*, vol. 23, no. 3, pp. 445-455, May, 2016.
- [155] M. F. Kircher, and J. K. Willmann, "Molecular body imaging: MR imaging, CT, and US. Part II. Applications," *Radiology*, vol. 264, no. 2, pp. 349-368, Aug, 2012.
- [156] S. H. Yoon, Y. H. Kim, Y. J. Lee, J. Park, J. W. Kim, H. S. Lee, and B. Kim, "Tumor Heterogeneity in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Positive Advanced Gastric Cancer Assessed by CT Texture Analysis: Association with Survival after Trastuzumab Treatment," *PloS one*, vol. 11, no. 8, pp. e0161278, Aug, 2016.

- [157] R. Popovtzer, A. Agrawal, N. A. Kotov, A. Popovtzer, J. Balter, T. E. Carey, and R. Kopelman, "Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer," *Nano letters*, vol. 8, no. 12, pp. 4593-4596, Dec, 2008.
- [158] T. Reuveni, M. Motiei, Z. Romman, A. Popovtzer, and R. Popovtzer, "Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an in vivo study," *Int J Nanomedicine*, vol. 6, pp. 2859-2864, Nov, 2011.
- [159] R. Chauhan, N. El-Baz, R. S. Keynton, K. T. James, D. A. Malik, M. Zhu, A. El-Baz, C. K. Ng, P. J. Bates, M. T. Malik, and M. G. O'Toole, "Targeted Gold Nanoparticle-Oligonucleotide Contrast Agents in Combination with a New Local Voxel-Wise MRI Analysis Algorithm for In Vitro Imaging of Triple-Negative Breast Cancer," *Nanomaterials (Basel)*, vol. 9, no. 5, pp. 709, May, 2019.
- [160] H. L. Chen, F. T. Hsu, Y. J. Kao, H. S. Liu, W. Z. Huang, C. F. Lu, P. H. Tsai, A. A. Ali, G. A. Lee, R. J. Chen, and C. Y. Chen, "Identification of epidermal growth factor receptor-positive glioblastoma using lipid-encapsulated targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles in vitro," *J Nanobiotechnology*, vol. 15, no. 1, pp. 86, Nov, 2017.
- [161] S. Sinha, W. Y. Tong, N. H. Williamson, S. J. P. McInnes, S. Puttick, A. Cifuentes-Rius, R. Bhardwaj, S. E. Plush, and N. H. Voelcker, "Novel Gd-Loaded Silicon Nanohybrid: A Potential Epidermal Growth Factor Receptor Expressing Cancer Cell Targeting Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 9, no. 49, pp. 42601-42611, Dec, 2017.
- [162] K. E. Henry, G. A. Ulaner, and J. S. Lewis, "Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Targeted PET/Single- Photon Emission Computed Tomography Imaging of Breast Cancer: Noninvasive Measurement of a Biomarker Integral to Tumor Treatment and Prognosis," *PET clinics*, vol. 12, no. 3, pp. 269-288, Jul, 2017.
- [163] Z. Xiao, Y. Song, W. Kai, X. Sun, and B. Shen, "Evaluation of ^{99m}Tc-HYNIC-MPG as a novel SPECT radiotracer to detect EGFR-activating mutations in NSCLC," *Oncotarget*, vol. 8, no. 25, pp. 40732-40740, Jun, 2017.
- [164] J. H. Youk, E. K. Kim, M. J. Kim, J. Y. Lee, and K. K. Oh, "Missed breast cancers at US-guided core needle biopsy: how to reduce them," *Radiographics*, vol. 27, no. 1, pp. 79-94, Jan-Feb, 2007.
- [165] P. C. Roche, V. J. Suman, R. B. Jenkins, N. E. Davidson, S. Martino, P. A. Kaufman, F. K. Addo, B. Murphy, J. N. Ingle, and E. A. Perez, "Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831," *J Natl Cancer Inst*, vol. 94, no. 11, pp. 855-857, Jun, 2002.
- [166] C. B. Moeder, J. M. Giltane, M. Harigopal, A. Molinaro, A. Robinson, K. Gelmon, D. Huntsman, R. L. Camp, and D. L. Rimm, "Quantitative justification of the change from 10% to 30% for human epidermal growth factor receptor 2 scoring in the American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guidelines: tumor heterogeneity in breast cancer and its implications for tissue microarray based assessment of outcome," *J Clin Oncol*, vol. 25, no. 34, pp. 5418-5425, Dec, 2007.
- [167] H. Seol, H. J. Lee, Y. Choi, H. E. Lee, Y. J. Kim, J. H. Kim, E. Kang, S. W. Kim, and S. Y. Park, "Intratatumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance," *Mod Pathol*, vol. 25, no. 7, pp. 938-948, Jul, 2012.

- [168] A. C. Wolff, M. E. H. Hammond, K. H. Allison, B. E. Harvey, P. B. Mangu, J. M. S. Bartlett, M. Bilous, I. O. Ellis, P. Fitzgibbons, W. Hanna, R. B. Jenkins, M. F. Press, P. A. Spears, G. H. Vance, G. Viale, L. M. McShane, and M. Dowsett, "Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update," *J Clin Oncol*, vol. 36, no. 20, pp. 2105-2122, Jul, 2018.
- [169] K. Furugaki, T. Iwai, Y. Moriya, N. Harada, and K. Fujimoto-Ouchi, "Loss of an EGFR-amplified chromosome 7 as a novel mechanism of acquired resistance to EGFR-TKIs in EGFR-mutated NSCLC cells," *Lung Cancer*, vol. 83, no. 1, pp. 44-50, Jan, 2014.
- [170] J. Xu, X. Zhao, D. He, J. Wang, W. Li, Y. Liu, L. Ma, M. Jiang, Y. Teng, Z. Wang, M. Gu, J. Wu, Y. Wang, W. Yue, and S. Zhang, "Loss of EGFR confers acquired resistance to AZD9291 in an EGFR-mutant non-small cell lung cancer cell line with an epithelial-mesenchymal transition phenotype," *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 144, no. 8, pp. 1413-1422, Aug, 2018.
- [171] S. Ahn, J. W. Woo, K. Lee, and S. Y. Park, "HER2 status in breast cancer: changes in guidelines and complicating factors for interpretation," *J Pathol Transl Med*, vol. 54, no. 1, pp. 34-44, Jan, 2020.
- [172] F. Pietrantonio, M. Caporale, F. Morano, M. Scartozzi, A. Gloghini, F. De Vita, E. Giommoni, L. Fornaro, G. Aprile, D. Melisi, R. Berenato, A. Mennitto, C. C. Volpi, M. M. Laterza, V. Pusceddu, L. Antonuzzo, E. Vasile, E. Ongaro, F. Simionato, F. de Braud, V. Torri, and M. Di Bartolomeo, "HER2 loss in HER2-positive gastric or gastroesophageal cancer after trastuzumab therapy: Implication for further clinical research," *Int J Cancer*, vol. 139, no. 12, pp. 2859-2864, Dec, 2016.
- [173] K. B. Engel, and H. M. Moore, "Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue," *Arch Pathol Lab Med*, vol. 135, no. 5, pp. 537-543, May, 2011.
- [174] J. Du, J. Y. Liu, and J. Su, "[Comparison of two different tissue decalcification methods for immunohistochemistry]," *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, vol. 43, no. 2, pp. 290-294, Apr, 2011.
- [175] C. E. Day, "Histopathology: Methods and protocols," Towota (NJ): Humana Press, 2014.
- [176] D. V. Hecke, "Routine Immunohistochemical Staining Today: Choices to Make, Challenges to Take," *J Histotechnol*, vol. 25, no. 1, pp. 45-54, Mar, 2002.
- [177] F. D'Amico, E. Skarmoutsou, and F. Stivala, "State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry," *J Immunol Methods*, vol. 341, no. 1-2, pp. 1-18, Feb, 2009.
- [178] R. Xie, J. Y. Chung, K. Ylaya, R. L. Williams, N. Guerrero, N. Nakatsuka, C. Badie, and S. M. Hewitt, "Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections," *J Histochem Cytochem*, vol. 59, no. 4, pp. 356-365, Apr, 2011.
- [179] S.-W. Kim, J. Roh, and C.-S. Park, "Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips," *J Pathol Transl Med*, vol. 50, no. 6, pp. 411-418, Nov, 2016.
- [180] M. Vendrell, K. K. Maiti, K. Dhaliwal, and Y. T. Chang, "Surface-enhanced Raman scattering in cancer detection and imaging," *Trends Biotechnol*, vol. 31, no. 4, pp. 249-257, Apr, 2013.
- [181] C. R. Taylor, and R. M. Levenson, "Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II," *Histopathology*, vol. 49, no. 4, pp. 411-424, Oct, 2006.

- [182] H. Park, S. Lee, L. Chen, E. K. Lee, S. Y. Shin, Y. H. Lee, S. W. Son, C. H. Oh, J. M. Song, S. H. Kang, and J. Choo, "SERS imaging of HER2-overexpressed MCF7 cells using antibody-conjugated gold nanorods," *Phys Chem Chem Phys*, vol. 11, no. 34, pp. 7444-7449, Sep, 2009.
- [183] A. Verdin, C. Malherbe, and G. Eppe, "Spatially resolved determination of the abundance of the HER2 marker in microscopic breast tumors using targeted SERS imaging," *Mikrochim Acta*, vol. 188, no. 9, pp. 288, Aug, 2021.
- [184] P. Talarska, M. Boruckowski, and J. Żurawski, "Current Knowledge of Silver and Gold Nanoparticles in Laboratory Research-Application, Toxicity, Cellular Uptake," *Nanomaterials (Basel)*, vol. 11, no. 9, pp. 2454, Sep, 2021.
- [185] S. Hong, P. R. Leroueil, I. J. Majoros, B. G. Orr, J. R. Baker, Jr., and M. M. Banaszak Holl, "The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform," *Chem Biol*, vol. 14, no. 1, pp. 107-115, Jan, 2007.
- [186] S. Tomić, J. Đokić, S. Vasilijić, N. Ogrinc, R. Rudolf, P. Pelicon, D. Vučević, P. Milosavljević, S. Janković, I. Anžel, J. Rajković, M. S. Rupnik, B. Friedrich, and M. Colić, "Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, pp. e96584, May, 2014.
- [187] J. Deng, M. Yao, and C. Gao, "Cytotoxicity of gold nanoparticles with different structures and surface-anchored chiral polymers," *Acta Biomater*, vol. 53, pp. 610-618, Apr, 2017.
- [188] E. M. Luther, C. Petters, F. Bulcke, A. Kaltz, K. Thiel, U. Bickmeyer, and R. Dringen, "Endocytotic uptake of iron oxide nanoparticles by cultured brain microglial cells," *Acta Biomater*, vol. 9, no. 9, pp. 8454-8465, Sep, 2013.
- [189] C. Petters, K. Thiel, and R. Dringen, "Lysosomal iron liberation is responsible for the vulnerability of brain microglial cells to iron oxide nanoparticles: comparison with neurons and astrocytes," *Nanotoxicology*, vol. 10, no. 3, pp. 332-342, Aug, 2016.
- [190] C. L. Wilson, V. Natarajan, S. L. Hayward, O. Khalimonchuk, and S. Kidambi, "Mitochondrial dysfunction and loss of glutamate uptake in primary astrocytes exposed to titanium dioxide nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 7, no. 44, pp. 18477-18488, Nov, 2015.
- [191] A. K. Sharma, V. Singh, R. Gera, M. P. Purohit, and D. Ghosh, "Zinc Oxide Nanoparticle Induces Microglial Death by NADPH-Oxidase-Independent Reactive Oxygen Species as well as Energy Depletion," *Mol Neurobiol*, vol. 54, no. 8, pp. 6273-6286, Oct, 2017.
- [192] Z. Liu, Y. Shen, Y. Wu, Y. Yang, J. Wu, P. Zhou, X. Lu, and Z. Guo, "An intrinsic therapy of gold nanoparticles in focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats," *J Biomed Nanotechnol*, vol. 9, no. 6, pp. 1017-10128, Jun, 2013.
- [193] P. Singh, S. Pandit, V. R. S. S. Mokkalpati, A. Garg, V. Ravikumar, and I. Mijakovic, "Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer," *Int J Mol Sci*, vol. 19, no. 7, pp. 1979, Jul, 2018.
- [194] A. S. Thakor, R. Paulmurugan, P. Kempen, C. Zavaleta, R. Sinclair, T. F. Massoud, and S. S. Gambhir, "Oxidative stress mediates the effects of Raman-active gold nanoparticles in human cells," *Small*, vol. 7, no. 1, pp. 126-136, Jan, 2011.
- [195] A. K. Dey, A. Gonon, E. I. Pécheur, M. Pezet, C. Villiers, and P. N. Marche, "Impact of Gold Nanoparticles on the Functions of Macrophages and Dendritic Cells," *Cells*, vol. 10, no. 1, Jan, 2021.

- [196] B. Sharma, K. Ma, M. R. Glucksberg, and R. P. Van Duyne, "Seeing through bone with surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy," *J Am Chem Soc*, vol. 135, no. 46, pp. 17290-17293, Nov, 2013.
- [197] F. Nicolson, B. Andreiuk, C. Andreou, H. T. Hsu, S. Rudder, and M. F. Kircher, "Non-invasive In Vivo Imaging of Cancer Using Surface-Enhanced Spatially Offset Raman Spectroscopy (SESORS)," *Theranostics*, vol. 9, no. 20, pp. 5899-5913, Aug, 2019.
- [198] S. E. Bohndiek, A. Wagadarikar, C. L. Zavaleta, D. Van de Sompel, E. Garai, J. V. Jokerst, S. Yazdanfar, and S. S. Gambhir, "A small animal Raman instrument for rapid, wide-area, spectroscopic imaging," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, no. 30, pp. 12408-12413, Jul, 2013.
- [199] J. Yang, T. Wang, L. Zhao, V. K. Rajasekhar, S. Joshi, C. Andreou, S. Pal, H. T. Hsu, H. Zhang, I. J. Cohen, R. Huang, R. C. Hendrickson, M. M. Miele, W. Pei, M. B. Brendel, J. H. Healey, G. Chiosis, and M. F. Kircher, "Gold/alpha-lactalbumin nanoprobe for the imaging and treatment of breast cancer," *Nat Biomed Eng*, vol. 4, no. 7, pp. 686-703, Jul, 2020.
- [200] Y.-I. Kim, S. Jeong, K. O. Jung, M. G. Song, C.-H. Lee, S.-J. Chung, J. Y. Park, M. G. Cha, S. G. Lee, B.-H. Jun, Y.-S. Lee, D. W. Hwang, H. Youn, K. W. Kang, Y.-S. Lee, D. H. Jeong, and D. S. Lee, "Simultaneous Detection of EGFR and VEGF in Colorectal Cancer using Fluorescence-Raman Endoscopy," *Sci Rep*, vol. 7, no. 1, p. 1035, Apr, 2017.
- [201] E. Garai, S. Sensarn, C. L. Zavaleta, N. O. Loewke, S. Rogalla, M. J. Mandella, S. A. Felt, S. Friedland, J. T. Liu, S. S. Gambhir, and C. H. Contag, "A real-time clinical endoscopic system for intraluminal, multiplexed imaging of surface-enhanced Raman scattering nanoparticles," *PLoS One*, vol. 10, no. 4, pp. e0123185, Apr, 2015.
- [202] C. R. Chong, and P. A. Jänne, "The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer," *Nat Med*, vol. 19, no. 11, pp. 1389-1400, Nov, 2013.
- [203] M. Juchum, M. Günther, and S. A. Laufer, "Fighting cancer drug resistance: Opportunities and challenges for mutation-specific EGFR inhibitors," *Drug Resist Updat*, vol. 20, pp. 12-28, May, 2015.

8 ANHANG

8.1 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Räumliches Auflösungsvermögen verschiedener Bildgebungsverfahren und Sensitivität ihrer Kontrastmittel.....	10
Abbildung 2: Prinzip der oberflächenverstärkten Raman-Bildgebung.....	12
Abbildung 3: Raman-Signal des Moleküls Cholesterol.....	13
Abbildung 4: Raman-Signal der Moleküle IR780 und IR140	14
Abbildung 5: Biodistribution von ⁶⁴ Cu-markierten Raman-Nanopartikeln nach IV vs oraler Verabreichung	16
Abbildung 6: Aufnahme von Nanopartikeln (NP) in einen Tumor mittels Enhanced-Permeability-and-Retention(EPR)-Effekt und durch spezifische Funktionalisierung von NP	17
Abbildung 7: Intrazellulärer Transport von Nanopartikeln (NP).....	18
Abbildung 8: Illustration der Tumormodelle für den Nachweis von Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) bzw. Human Epidermal Growth Factor 2 (HER2) exprimierenden Tumorzelllinien.....	28
Abbildung 9: Schädelknochen einer Maus	29
Abbildung 10: Aufbau des Raman-Spektroskops für die Raman-Bildgebung.....	31
Abbildung 11: Synthese der Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikel (SERRS-NP)	33
Abbildung 12: Qualitätskontrolle der Synthese der Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikel (SERRS-NP) mittels Transmissionselektronenmikroskop (TEM) und Dynamischer Lichtstreuung (engl. Dynamic Light Scattering (DLS))	35
Abbildung 13: Qualitätskontrolle der Synthese der Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikel (SERRS-NP) mittels Intensitätsmessung der Raman-Signale.....	36

Abbildung 14: Intensität der Raman-Signale der Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikel (SERRS-NP) bei unterschiedlichen Verdünnungen.....	37
Abbildung 15: Nachweis Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) exprimierender Tumorzelllinien im Mausmodell für periphere Tumoren	38
Abbildung 16: Raman-Bildgebung der Tumoren mit differenzieller Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) nach Applikation von Cetuximab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (Cetuximab-SERRS-NP)	39
Abbildung 17: Histologische Evaluation der mittels Raman-Bildgebung untersuchten peripheren Tumoren mit differenzieller Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	40
Abbildung 18: Raman-Signale der peripheren Tumoren mit differenzieller Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	41
Abbildung 19: Nachweis Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) exprimierender Tumorzelllinien im Mausmodell für periphere Tumoren.....	42
Abbildung 20: Raman-Bildgebung der Tumoren mit differenzieller Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) nach Applikation von Trastuzumab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (Trastuzumab-SERRS-NP) und histologische Evaluation der mittels Raman-Bildgebung untersuchten Tumoren	43
Abbildung 21: Raman-Signale der peripheren Tumoren mit differenzieller Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2).....	44
Abbildung 22: Nachweis Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) exprimierender Tumorzelllinien im Mausmodell für intrazerebrale Tumoren	45
Abbildung 23: Raman-Bildgebung und histologische Evaluation der Tumoren mit differenzieller Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) nach Applikation von Cetuximab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (Cetuximab-SERRS-NP).....	46
Abbildung 24: Raman-Signale der intrazerebralen Tumoren mit differenzieller Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR).....	47

Abbildung 25: Nachweis Human Epidermal Growth Factor 2 (HER2) exprimierender Tumorzelllinien im Mausmodell für intrazerebrale Tumoren	48
Abbildung 26: Raman-Bildgebung und histologische Evaluation der Tumoren mit differenzieller Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) nach Applikation von Trastuzumab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (Trastuzumab-SERRS-NP).....	49
Abbildung 27: Raman-Signale der intrazerebralen Tumoren mit differenzieller Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)	50
Abbildung 28: Nichtinvasive In-vivo-Raman-Bildgebung eines Tumors mit einer hohen Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) nach Applikation von Trastuzumab Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (Trastuzumab-SERRS-NP)	51
Abbildung 29: Intratumorale Heterogenität in Tumoren mit einer hohen Expression des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	53
Abbildung 30: Intratumorale Heterogenität in Tumoren mit einer hohen Expression des Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2).....	55
Abbildung 31: Überblick über die mit Antikörper-tragenden Surface-Enhanced-Resonance-Raman-Spectroscopy-Nanopartikeln (SERRS-NP) generierten Daten in Abhängigkeit vom Expressionsstatus des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) der verwendeten Zelllinien und der Lokalisation der Tumoren.....	57
Abbildung 32: Parameter der Gold-Nanopartikel (GNP) für systematische Toxizitätsstudien..	81

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Art und Anzahl der zur Generierung von intrazerebralen und peripheren Tumoren verwendeten Zelllinien.....	29
--	----

8.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Claus Zimmer für seine großzügige Unterstützung bei der vorliegenden Dissertation, trotz der Distanz und unvorhersehbarer Entwicklungen und Ereignisse. Außerdem danke ich meinem initialen Betreuer Herrn Prof. Dr. Moritz Kircher für die Aufnahme in sein Labor und für die Unterstützung in der Findungsphase für die Thematik der vorliegenden Arbeit. Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Ingo Mellinghoff für seine Beratung, für die Zur-Verfügung-Stellung der Tumorzelllinien sowie für die Übernahme meiner Betreuung. Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Kathleen Burns für ihre hilfreichen Rückmeldungen zu den histologischen Evaluationen im Rahmen der vorliegenden Studie. Des Weiteren danke ich Dr. Chrysafis Andreou für die Zusammenarbeit bei der Fertigstellung der Veröffentlichung „Visualizing surface marker expression and intratumoral heterogeneity with SERRS-NPs imaging“ und bei der Vorstellung meiner Daten bei der World Molecular Imaging Conference 2021 sowie für die umfang- und detailreichen wissenschaftlichen Diskussionen, an die ich mit großer Freude zurückdenke. Ich danke Dr. Chrysafis Andreou und Dr. Anton Oseledchik für ihre initialen Erklärungen zur Synthese der SERRS-NP und für unsere Diskussionen bei auftretenden Schwierigkeiten bei den Funktionalisierungen der SERRS-NP. Auch danke ich Hsiao-Ting Hsu und Carl Campos für ihre technischen Anleitungen und Unterstützung bei der Handhabung der Tumorzellen und Mäuse. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jennifer Fairman und Roscoe Lamotagne für ihre graphischen Illustrationen. Der kreative und belebende Austausch war für mich eine hervorragende Schulung bezüglich der Erklärung wissenschaftlicher Zusammenhänge. Ich danke meiner Arbeitgeberin Prof. Dr. Laurie Glimcher, die mir großzügig die Zeit für die Fertigstellung der Dissertation, die Veröffentlichung sowie die Präsentation von Teilen meiner Arbeit bei der World Molecular Imaging Conference 2021 sowie des 3rd MGC Science Day der TUM Graduate School zur Verfügung stellte.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken. Aus tiefstem Herzen danke ich meinen Eltern, die mich zeitlebens in meiner persönlichen und intellektuellen Entwicklung gefördert haben, obwohl sie damit eine große räumliche Distanz zwischen uns akzeptieren mussten.