

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

**Korrelation zwischen dem Grad der Expression des $\alpha\beta_3$
Integrins auf menschlichen Melanomzellen und der Aufnahme
von radioaktiv markierten zyklischen RGD-Peptiden**

Eugenija Vabulienė

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

Vorsitzender: Univ. –Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv. –Doz. Dr. W. A. Weber

2. Univ. –Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch - Schmidtke

Die Dissertation wurde am 12.01.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 05.05.2004 angenommen

Für meine liebe Mutter

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung	1
2 Material und Methoden	7
2.1 Material	7
2.1.1 Chemikalien.....	7
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	9
2.1.3 Antikörper.....	11
2.1.4 Radioaktiv markierte Substanzen.....	12
2.1.5 Geräte.....	12
2.1.6 Zelllinie und Zellkultur.....	12
2.2 Methoden	13
2.2.1 Aufnahme von cRGD-Peptiden in Melanomzellen.....	13
2.2.1.1 Aufnahme von [¹⁸ F]Galacto-RGD in Melanomzellen.....	13
2.2.1.2 Aufnahme von [¹²⁵ I]Glucosyl-RGD und [¹²⁵ I]-RGDyV in Melanomzellen.....	14
2.2.1.3 Auswertung der Aufnahme von cRGD-Peptiden in Melanomzellen.....	14
2.2.1.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	14
2.2.2 Maus-Tumor-Modell.....	15
2.2.2.1 Versuchstiere.....	15
2.2.2.2 Tumormodell.....	15
2.2.3 Darstellung der Verteilung von [¹⁸ F]Galacto-RGD im Tumor mittels Kleintier-PET.....	16
2.2.3.1 Durchführung der PET-Untersuchungen.....	16
2.2.4 Durchführung und Ermittlung der Biodistribution.....	17
2.2.4.1 Ermittlung der Organengewichte.....	17
2.2.4.2 Aktivitätsbestimmung.....	17
2.2.4.3 Auswertung der Biodistributionsdaten.....	18
2.2.5 Histologische Analyse der Mischtumoren.....	18
2.2.5.1 Kryostatschnitte.....	18
2.2.5.2 Hämalaun / Eosin Färbung.....	18
2.2.5.3 Immunhistochemische Darstellung.....	19
2.2.5.3.1 Nachweis der $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Expression in Mischtumoren.....	19
2.2.5.3.2 Nachweis der murinen β3 Expression in Blutgefäßen und Stroma von Mischtumoren.....	20

2.2.6	Western Blot Analyse.....	21
2.2.6.1	Probenvorbereitung.....	21
2.2.6.1.1	Lyse der Melanomzellen.....	21
2.2.6.1.2	Homogenisierung der Mischtumoren.....	22
2.2.6.1.3	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	22
2.2.6.2	Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	23
2.2.6.3	Elektrophorese.....	23
2.2.6.4	Transfer auf eine Nitrocellulosemembran.....	24
2.2.6.5	Immunoblotanalyse des αv Proteins.....	24
2.2.7	Statistische Auswertung.....	25
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Bindung und Internalisierung der cRGD-Peptide durch Melanomzellen.....	26
3.1.1	Bindung und Internalisierung des [^{18}F]Galacto-RGD durch M21 und M21-L Melanomzellen bei +37°C.....	26
3.1.2	Bindung und Internalisierung des [^{125}J]Gluco-RGD durch M21 und M21-L Melanomzellen bei +37°C.....	27
3.1.3	Bindung und Internalisierung des [^{125}J]-RGDyV durch M21 und M21-L Melanomzellen bei +37°C.....	28
3.1.4	Temperaturabhängigkeit der Bindung und Internalisierung der RGD-Peptide durch M21 Zellen.....	28
3.1.5	Internalisierung des [^{18}F]Galacto-RGD bei +37°C durch M21 und M21-L Zellen sowie Blockierung der M21 Zellen mit kaltem Peptid.....	30
3.1.6	Internalisierung des [^{18}F]Galacto-RGD nach Mischung von M21 und M21-L Zellen.....	31
3.1.7	Ermittlung der Expression des αv Integrins in den Zellenmischungen mittels Western Blot.....	32
3.2.	Mischtumoren Modell.....	33
3.2.1	Maustumormodell.....	33
3.2.2	Darstellung der Verteilung von [^{18}F]Galacto-RGD in Mischtumoren mittels Kleintier-PET (MADPET).....	34
3.2.3	Traceraufnahme in Melanommischtumoren.....	35
3.2.4	H&E Färbung von M21 und M21-L Tumoren.....	36
3.2.5	Immunhistochemische Darstellung der Expression des $\alpha v\beta 3$ Integrins in den Mischtumoren.....	36

3.2.6 Immunhistochemische Darstellung der Expression des $\beta 3$ Integrins in den Mischtumoren.....	38
3.2.7 Western Blot Analyse der αv Expression in den Mischtumoren.....	38
3.2.8 Darstellung des Tumor / Muskel Verhältnisses in Abhängigkeit von der αv Expression.....	39
3.2.9 Darstellung der Korrelation zwischen Western Blot und PET.....	40
3.2.10 Darstellung der Korrelation zwischen PET und Biodistributionsdaten.....	41
4 Diskussion.....	43
5 Zusammenfassung.....	49
6 Literaturverzeichnis.....	51
7 Abkürzungsverzeichnis.....	64

1 Einleitung und Fragestellung

Als Integrine wird eine Familie von heterodimeren Membranproteinen bezeichnet, die eine zentrale Rolle in der Adhäsion und Migration von verschiedensten menschlichen Zellen spielen. Der Name "Integrin" leitet sich davon her, dass diese Proteine die extrazelluläre Matrix mit dem intrazellulären Cytoskelett verbinden oder "integrieren".

Die beiden, nicht kovalent miteinander verbundenen Proteinketten, aus denen jedes Integrin besteht, werden als α - und β - Kette bezeichnet. Das Molekulargewicht dieser beiden Ketten beträgt 150 bis 180 kDa für die α - und etwa 90 kDa für die β - Kette. Zur Zeit sind 18 α und 8 β Ketten bekannt, aus denen beim Menschen mehr als 20 verschiedene Rezeptoren gebildet werden (Abb. 1).

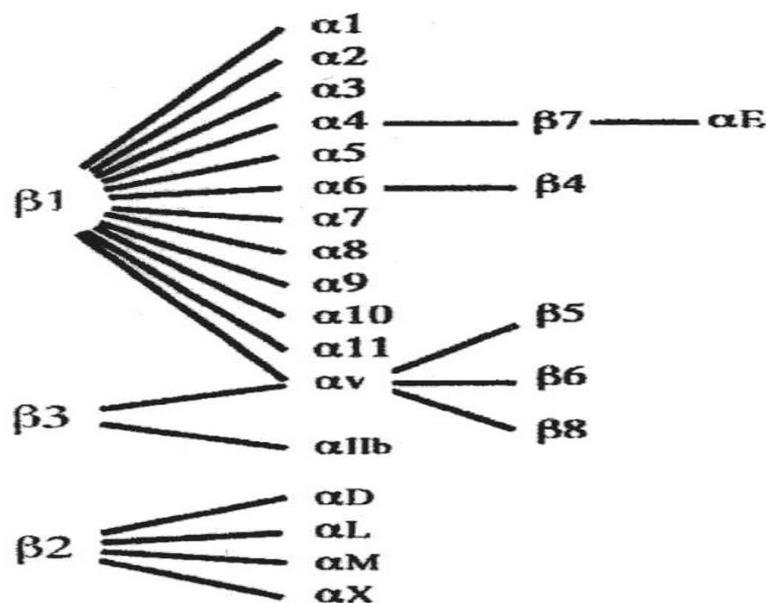


Abb.1 Die Familie der Integrine. Die beim Menschen bekannten Kombinationen von α - und β - Ketten sind durch Linien gekennzeichnet. (Buovard, 2001)

Integrine lassen sich auf nahezu allen Zellen im menschlichen Körper nachweisen und vermitteln vor allem Zell-Matrix, aber auch Zell-Zell-Wechselwirkungen. In Abhängigkeit vom Zelltyp handelt es sich dabei um so unterschiedliche Prozesse wie z.B. die embryonale Organentwicklung, die Angiogenese, die Adhäsion und Migration von Leukozyten und die zelluläre Blutgerinnung. Neben ihrer physiologischen Funktion sind Integrine auch Teil

verschiedener pathologischer Prozesse. Dazu gehören Störungen der Thrombozytenfunktion, die Osteoporose sowie die Metastasierung von malignen Tumoren. In Abhängigkeit von der spezifischen Kombination der α und β Kette binden Integrine eine Vielzahl von Proteinen in der extrazellulären Matrix und Membranproteine an der Oberfläche benachbarter Zellen (Tab.1). Charakteristischerweise bindet dabei nicht ein Integrin spezifisch ein Protein, sondern es kann mit mehreren Proteinen reagieren. Darüber hinaus zeigen die verschiedenen Integrin Subtypen eine überlappende Spezifität (Tab. 1).

Die Bindung von Integrinen an Membran- oder Matrixproteine führt dabei nicht nur zur Zelladhäsion, sondern löst auch intrazellulär über verschiedene Proteinkinasen eine komplexe Signaltransduktion aus. Dieser Prozess wird auch als "outside-in signalling" bezeichnet. Integrine sind somit nicht nur Adhäsionsmoleküle, sondern dienen auch als zelläre Rezeptoren (Giancotti und Ruoshlatti, 1999). Ausführlich untersucht ist dabei die Aktivierung des ERK/MAPK Signaltransduktionsweges über die Proteinkinase FAK und die daraus resultierende Stimulation der Zellproliferation. Ein weiterer Signaltransduktionsweg wird durch die Aktivierung der Proteinkinase ILK eingeleitet und führt u.a. über die Phosphorylierung von PKB/Akt zur Inhibierung der Apoptose (Wu und Dedhar, 2001). Umgekehrt wird die Affinität von Integrinen zu ihren Liganden durch intrazelluläre Prozesse moduliert. Dieser Vorgang wird als Integrin-Aktivierung oder auch als "inside-out signalling" bezeichnet. Ein typisches Beispiel ist dabei die Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf Thrombozyten im Rahmen der Blutgerinnung.

Tab. 1 Extracelluläre Liganden der Integrine, nach Ploew 2000

Ligand	Integrin
Adenovirus Penton Base Protein	$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$
Bone Sialoprotein	$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$
Borrelia burgdorferi	$\alpha_{IIb}\beta_3$
Candida albicans	$\alpha_M\beta_2$
Kollagen	$\alpha_1\beta_1, \alpha_2\beta_1, \alpha_{11}\beta_1, \alpha_{IIb}\beta_3$
Denaturiertes Kollagen	$\alpha_5\beta_1, \alpha_v\beta_3, \alpha_{IIb}\beta_3$
Cytotactin/Tenascin-C	$\alpha_8\beta_1, \alpha_9\beta_1, \alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_6$
Decorsin	$\alpha_{IIb}\beta_3$
Disintegrin	$\alpha_v\beta_3, \alpha_{IIb}\beta_3$
E Cadherin	$\alpha_E\beta_7$
Echovirus 1	$\alpha_2\beta_1$

Epiligrin	$\alpha_3\beta_1$
Factor X	$\alpha_M\beta_2$
Fibronectin	$\alpha_2\beta_1, \alpha_3\beta_1, \alpha_4\beta_1, \alpha_4\beta_7, \alpha_5\beta_1, \alpha_8\beta_1, \alpha_v\beta_1,$ $\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5, \alpha_v\beta_6, \alpha_v\beta_8, \alpha_{IIb}\beta_3$
Fibrinogen	$\alpha_5\beta_1, \alpha_M\beta_2, \alpha_v\beta_3, \alpha_x\beta_2, \alpha_{IIb}\beta_3$
HIV Tat Protein	$\alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5$
iC3b	$\alpha_M\beta_2, \alpha_x\beta_2$
ICAM-1	$\alpha_L\beta_2, \alpha_M\beta_2$
ICAM-2,3,4,5	$\alpha_L\beta_2$
Invasin	$\alpha_3\beta_1, \alpha_4\beta_1, \alpha_5\beta_1, \alpha_6\beta_1$
Laminin	$\alpha_1\beta_1, \alpha_2\beta_1, \alpha_6\beta_1, \alpha_7\beta_1, \alpha_6\beta_4, \alpha_v\beta_3$
MAdCAM-1	$\alpha_4\beta_7$
Matrix Metalloproteinase-2	$\alpha_v\beta_3$
Neutrophil Inhibitor Faktor	$\alpha_M\beta_2$
Osteopontin	$\alpha_v\beta_3$
Plasminogen	$\alpha_{IIb}\beta_3$
Prothrombin	$\alpha_v\beta_3, \alpha_{IIb}\beta_3$
Sperm Fertilin	$\alpha_6\beta_1$
Thrombospondin	$\alpha_3\beta_1, \alpha_v\beta_3, \alpha_{IIb}\beta_3$
VCAM-1	$\alpha_4\beta_1, \alpha_4\beta_7$
Vitronectin	$\alpha_v\beta_1, \alpha_v\beta_3, \alpha_v\beta_5, \alpha_{IIb}\beta_3$
Von Willebrand Faktor	$\alpha_v\beta_3, \alpha_{IIb}\beta_3$

Eines der am intensivsten untersuchten Integrine ist das $\alpha_v\beta_3$ Integrin, das aus einer α Kette vom Typ „v“ (CD51) und einer β Kette vom Typ „3“ (CD61) zusammengesetzt ist. Physiologischerweise wird $\alpha_v\beta_3$ in vivo von Osteoklasten in hoher Dichte exprimiert. Eine geringe Expression findet sich in ruhenden Endothelzellen und der Gefäßmuskulatur, Thrombozyten und Megakaryozyten (Horton 1997). Darüber hinaus findet sich $\alpha_v\beta_3$ im Bereich der Bowman-Kapsel und im Tubulussystem der Niere (Natali 1997).

Zu einer ausgeprägten Zunahme der $\alpha_v\beta_3$ Expression auf Endothelzellen kommt es im Rahmen der tumorinduzierten Angiogenese. Durch blockierende Antikörper gegen $\alpha_v\beta_3$ lässt sich die Migration von Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese inhibieren. Diese Antikörper führen auch zur Apoptose der angiogenetisch aktiven Endothelzellen, während ruhende Endothelzellen in anderen Gefäßen nicht beeinträchtigt werden. Darüber hinaus wird das $\alpha_v\beta_3$ Integrin auch von verschiedenen menschlichen Tumorzellen, wie malignen Melanomen (Albelda 1990), Glioblastomen (Gladson 1991), Meningiomen (Bello 2000), Lungen- (Falcioni 1994), Mamma-, Prostata-, Blasenkarzinomen, Osteosarkomen und Neuroblastomen (Lafrenie 1994, Marshall 1996) exprimiert. Präklinische und klinische

Untersuchungen haben dabei eine Korrelation zwischen der $\alpha v \beta 3$ Expression und der Aktivität und Fähigkeit der Tumorzellen zur Bildung von hämatogenen Metastasen gezeigt. $\alpha v \beta 3$ bindet an zahlreiche Proteine in der extrazellären Matrix (u.a. Vitronectin, Fibronectin und Osteopontin). Die Bindung erfolgt dabei an die Peptid Sequenz Arginin-Glycin-Aspartat in diesen Proteinen. Diese Sequenz wird auch als RGD-Sequenz bezeichnet (Xiong 2002). Peptide, die eine RGD-Sequenz besitzen können deshalb eingesetzt werden, um die Bindung des $\alpha v \beta 3$ an seine Liganden zu verhindern. Da $\alpha v \beta 3$ auf Tumorzellen und im Rahmen der tumorinduzierten Angiogenese in hohem Ausmaß exprimiert wird, während die Expression in normalen Geweben und ruhenden Endothelien gering ist, stellt die Behandlung mit RGD-Peptiden einen Ansatz für eine selektive Tumorthherapie dar. Dabei ist zu berücksichtigen, dass neben $\alpha v \beta 3$ auch zahlreiche andere Integrine an eine RGD-Sequenz von Proteinen binden (Tab.2). Die Affinität der Integrine zu einem spezifischen Protein hängt jedoch in hohem Ausmaß von der sterischen Konfiguration der RGD-Sequenz ab. Es war deshalb möglich, zyklische RGD-Peptide zu entwickeln, die mit hoher Affinität an $\alpha v \beta 3$ und nur mit einer um mehrere Größenordnungen niedrigeren Affinität an andere Integrine binden.

Tab.2 "Erkennungssequenzen" für Integrine (Plow 2000)

Erkennungssequenz	Ligand	Integrin
RGD	Adenovirus Penton Base Protein, Bone Sialoprotein, Kollagen, Decorsin, Disintegrine, Fibrinogen, Fibronectin, Prothrombin, Tenascin, Thrombospondin, Vitronectin, von Willebrand Faktor	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$ $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_{11b}\beta_3$
HHLGGAKQAGDV	γ -Kette des Fibrinogens	$\alpha_{11b}\beta_3$
GPR	α -Kette des Fibrinogens	$\alpha_x\beta_2$
P1 Peptid	γ -Kette des Fibrinogens	$\alpha_M\beta_2$
P2 Peptid	γ -Kette des Fibrinogens	$\alpha_M\beta_2$
AEIDGIEL	Tenascin	$\alpha_9\beta_1$
QIDS	VCAM-1	$\alpha_4\beta_1$
LDT	MAcCAM-1	$\alpha_4\beta_7$
CS-1 Peptid	Fibronectin	$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$
CS-5 Peptid	Fibronectin	$\alpha_4\beta_1$
IDAPS	Fibronectin	$\alpha_4\beta_1$
ICAM Peptide	ICAM-1,-2,-3	$\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$
DLXXL	Tenascin	$\alpha_v\beta_6$
GFOGER	Kollagen	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$

Zwei $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Inhibitoren werden derzeit im Rahmen von Phase II Studien klinisch auf ihre Anwendung in der Tumorthherapie untersucht: Vitaxin™ (ein humanisierter $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Antikörper) und EMD121974 (ein zyklisches RGD Peptid) (Kerbel 2000).

Aufgrund ihrer hohen Affinität und Spezifität können radioaktiv markierte zyklische RGD-Peptide auch eingesetzt werden, um die Expression von $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ in malignen Tumoren nicht-invasiv nachzuweisen (Haubner 1999, 2001a, b; Janssen 2002a). Das empfindlichste Nachweisverfahren dazu stellt die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) dar. In der PET kann die Konzentration von Positronen emittierenden Radioisotopen in Schnittbildern quantitativ bestimmt werden. Vorangegangene Untersuchungen an tumortragenden Mäusen haben bereits gezeigt, dass sich mit Hilfe eines Fluor-18 markierten, glykosilierten Pentapeptids ($[^{18}\text{F}]\text{Galacto-RGD}$) $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ exprimierende Tumoren in der PET mit hohem Kontrast darstellen lassen (Haubner 2001b). Prinzipiell könnten derartige Untersuchungen bei Patienten dazu eingesetzt werden, vor einer Therapie mit $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Antagonisten die Expression dieses Rezeptors nachzuweisen und so gezielt die Patienten für die Therapie auszuwählen, die von einer derartigen Therapie profitieren könnten. PET-Untersuchungen mit $[^{18}\text{F}]\text{Galacto-RGD}$ könnten auch dazu dienen, unter laufender Therapie mit $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Antagonisten die erfolgreiche Blockade des Rezeptors zu dokumentieren und ggf. eine Anpassung der Dosis des Antagonisten vorzunehmen.

Die Expression von $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ist jedoch nur ein Faktor der in vivo die Aufnahme von radioaktiv markierten RGD-Peptiden bestimmt. Andere Faktoren sind die Tumorperfusion, die Größe des intratumoralen Blutvolumens und des Extrazellulärraumes sowie die unspezifische Bindung und Aufnahme von RGD-Peptiden in Tumorzellen. Bevor PET-Untersuchungen mit RGD-Peptiden für die Therapieplanung und Therapiekontrolle bei Patienten eingesetzt werden können, ist es somit erforderlich, die quantitative Beziehung zwischen dem Ausmaß der $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Expression und der Aufnahme von radioaktiv markierten RGD-Peptiden zu untersuchen. Derartige Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit an Tumormodellen mit unterschiedlicher $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Expression durchgeführt.

Fragestellung

1. Wie hoch ist die rezeptorspezifische Aufnahme von RGD-Peptiden in Relation zur unspezifischen Aufnahme in vitro und in vivo?

2. Werden RGD-Peptide nach der Bindung an das $\alpha\beta3$ internalisiert? Wie ist der quantitative Zusammenhang zwischen der internalisierten Peptidmenge und der $\alpha\beta3$ Expression?
3. Wie korreliert quantitativ die Aufnahme von RGD-Peptiden in vivo mit der Expression des $\alpha\beta3$ Integrins?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Bestellnummer
1,4 – Dithiothreitol DTT	Roche, 708984
Aceton	Merck, 1.00014.1000
Acrylamide/Bis-Acrylamide 40% 29:1	National Diagnostics, EC – 852
Ammonium persulfate APS	Sigma, A- 3678
Aprotinin	Roche, 236 624
Bromphenolblau 0,1%	Sigma, B - 5525
Butanol	Sigma, BT – 105
Calciumchlorid-2-hydrat krist $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck, 9018499
Diethylether	Merck, 1.00926.1000
Ethylene glycol tetraacetic acid EGTA	Sigma, E 4378
Eosin	Apotheke
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Sigma, C.C.Pro Z 17-M
Farbstoff – Konzentrat Protein Assay	Bio-Rad, 500-0006
Formalin	Apotheke
Fötale Kälberserum FKS	Biochrom, S 0115
Gel zum Einfrieren, Tissue – Tek	Sakura, 0129910022
Gentamicyn 10 mg/ml	Biochrom, A 2712
Glutamin	Biochrom, K 0282
Glyceringelatine, Kaisers	Merck, 040415505
Glycerol 50%	Sigma, G - 5516
Glycine	Sigma, EC 200-272-2
Hämalaun nach Mayer	Apotheke
HEPES	Fluka, 54447
Isopropanol	Apotheke
Isotone Natriumchlorid-Lösung	Deta-Pharma, 5962.00.00

Kältespray	NeoLab,10006241
Ketavet 100 mg/ml (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia & Upiohn
Leupeptin	Roche, 1017128
Magermilchpulver	ICN, 902887
Magnesiumchlorid-hexahydrat $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Merck, 5833.0250
Manganese Chloride Tetrahydrate $MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Sigma, M-3634
Methanol	Merck, 1.06018.2500
N, N,N',N'- Tetramethylethylenediamine Temed	Sigma, T 8133
Natriumacetat	Merck,1.06265.1000
Natriumchlorid NaCl	Merck,1.06404.1000
Natriumlauge 4 N NaOH	Apotheke
Natriumlauryl – sulfat	Bio- Rad, 161- 0302
Nitrocellulose Membrane 0,2 μ m x 300mm x 3m	Schleicher&Schuell, 439396
Peroxidase substrate KIT AEC	Vector Laboratories, SK - 4200
Phenyl methyl sulfonyl fluorid PMSF	Sigma, P 7626
Phosphatpuffer PBS	Sigma, 1000-3
Pre-Stained Protein Standard SeeBlue Plus2	Invitrogen, LC 5925
Proteinstandard BSA 2mg/ml	Uptima Interchim, UP 36859A
Rinderserumalbumin BSA	Sigma, A- 7906
Rompun 2% - 25ml (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital
RPMI 1640 Medium	Biochrom, FG 1215
Salzsäure 1 N HCl	Merck, 109057
Sodium pyrophosphate tetrabasis anhydrous $Na_4P_2O_7$	Sigma, P 8010
Tris base	Sigma, T -1503
Triton X-100	Bio-Rad,161-0407
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma, P - 1379
Vectastain Elite ABC KIT (Rat IgG)	Vector Laboratories, PK - 6104
Verdünnungslösung für Antikörper	Dako, S 2022
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, 1.08597.1000

2.1.2 Lösungen und Puffer

Bindung von cRGD-Peptiden an die Melanomzellen

Standardkulturmedium: 500ml RPMI 1640
 50ml Fötale Kälberserum
 5 ml Glutamin
 5 ml Gentamycin

Inkubationmedium: RPMI 1640 Medium
 1% Glutamin
 1 % BSA

Waschpuffer: TBS Lösung
 1mM CaCl₂
 1mM MgCl₂
 0,01mM MnCl₂

Natrium- Acetat: 0,02M Natrium-Acetat
 pH 4-5

PBS – Puffer: 120 mmol NaCl
 2,7 mmol KCl
 10 mmol Phosphate Puffer
 1 l H₂O
 pH 7,4

Anästhesie

Ketavet / Rompun Narkotikum: 41 ml NaCl 0,9% Lösung
 5 ml Ketavet 100mg/ml
 4 ml Rompun 2% Lösung

Western Blot

Lysepuffer: 50 mM Hepes pH 7,5
150 mM NaCl
10 % Glycerol
1 % Triton X-100
1 mM EDTA
1 mM EGTA
10 mM Na₄P₂O₇ (= Pyrophosphat)
1 mM PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

Trenngel 15%: 2,5 ml Trenngelpuffer
5 ml Acrylamid 30% 29:1
2,5 ml H₂O
60 µl APS 10%
10 µl Temed

Sammelgel 4%: 3,75 ml Sammelgelpuffer
2,4 ml Acrylamid 30%
13,8 ml H₂O
70 µl APS 10%
30 µl Temed

4 x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris HCl, pH 8,8
0,4% SDS

4 x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris HCl, pH 6,8
0,4% SDS

5 x SDS–Elektrophorese-Puffer: 94,0 g Glycin
5,0 g SDS
15,1 g Tris-base

ad 1,0 l H₂O

Transferpuffer: 6,1 g Tris-base
 28,8 g Glycine
 400 ml Methanol
 ad 2000 ml H₂O
 pH~8,3-8,4

10 x TBS-Lösung: 0,2 M Tris
 1,37 M NaCl
 pH 7,6

TBST – Lösung: 1x TBS Lösung
 0,1% Tween 20

5% Milch-TBST- Lösung: TBST Lösung
 5 % Magermilchpulver

2.1.3 Antikörper

Monoklonale biotinylierte Maus Anti-human Integrin $\alpha\beta$ 3

Antikörper, 1mg/ml

Chemicon, MAB1976B

Monoklonale Hamster Anti-Maus Integrin β 3

Antikörper, 125 μ g/ml

PharMingen, 55054

Sekundäre biotinylierte Maus Anti-Hamster IgG

Antikörper, 125 μ g/ml

PharMingen, 550335

Polyklonale Kaninchen Integrin α v, Antikörper, 1mg/ml

Chemicon, AB1930

Polyklonale mit ¹²⁵I markierte Esel Anti-Kaninchen IgG

Antikörper, 477kBq/ μ g

Amersham Buchler IM134

2.1.4 Radioaktiv markierte Substanzen

Für die PET Untersuchungen wurde [¹⁸F]Galacto-RGD (glykosyliertes zyklisches Pentapeptid) verwendet. Für die Bindungs- und Internalisierungs- Studien an den Melanomzellen wurden [¹²⁵I]Glucoc-RGD, [¹²⁵I]-RGDyV und [¹⁸F]Galacto-RGD eingesetzt. Die cRGD-Peptide wurden von Dr. R. Haubner (Nuklearmedizinische Klinik der Technischen Universität München) synthetisiert und mit den Radionukliden ¹⁸F und ¹²⁵I markiert (Haubner 1999, 2001a, b).

2.1.5 Geräte

Analysenwaage Sartorius Typ LA 230S-OCE	Sartorius, Göttingen
Gamma-counter Typ 1480 Wizard TM 3	Wallac, Turku, Finnland
Kryostat Microm Typ HM 500	Microm, Walldorf
Mikro-Dismembrator 2	B.Braun, Melsungen AG
Power supply Modell 1000/500	Bio-RAD, Germany
Schüttler HS 250 basic	Kika Labortechnik, Staufen
Megafuge 1.0	Heraeus Sepatech, Osterode
Biofuge 13	Heraeus Instruments, Osterode
Mighty small multiple Gel Caster SE 200	Hofer, USA
2051 Midget Multiblot Electrophoretic Transfer Unit	Hofer, USA
Spectrophotometer Uvikow 931	Kontron Instruments, Italy
Mighty small 2 SE 2500/SE 260	Hofer, USA

2.1.6 Zelllinie und Zellkultur

Die Zelllinie M21- entstammt einem humanen Melanom (Cheresh D.A 1987). Diese Zellen exprimieren $\alpha\beta3$ Integrin in hoher Dichte. M21-L ist eine Sublinie von M21- Zellen, die die Fähigkeit zur Synthese der α Kette verloren hat. M21-L- Zellen exprimieren keine $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$ und $\alpha\beta5$ Integrine (Lanza P. 1997). Die Melanomzellen M21 und M21-L wurden uns freundlicherweise von Dr. D.A. Cheresh (TSRI, La Jolla, CA) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinien wurden in RPMI Medien mit 10% FKS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und zweimal pro Woche passagiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Bindung von cRGD-Peptiden an die Melanomzellen

Mit dieser Untersuchung kann die spezifische Bindung der cRGD-Peptide, die die Liganden für $\alpha v \beta 3$ Intergin sind, an die humane Melanomzellen M21 und M21-L, untersucht werden. Die Markierung der Liganden mit den Radionukliden ermöglicht die Bestimmung sowohl der spezifischen Bindung auf der Oberfläche der Zellen als auch der Internalisierung der Liganden.

2.2.1.1 Bindung von [^{18}F]Galacto-RGD an Melanomzellen

- pro Eppendorfgefäß 1ml Inkubationsmedium (RPMI 1640 Medium, 1% Glutamin, 1 % BSA) und 1×10^6 Zellen ansetzen
- Zellen 60 min bei $+37^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubieren
- 1 000 000 cpm [^{18}F]Galacto-RGD pro Eppendorfgefäß zugeben
- 90min bei $+37^\circ\text{C}$ oder $+4^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubieren
- Eppendorfgefäße 3 min bei 3500 rpm zentrifugieren
- Medium abpipettieren und die Eppendorfgefäße mit 1 ml kaltem Waschlösungspuffer (+0,1% BSA) 2 x spülen, erneut zentrifugieren, abpipettieren
- Medium und den Waschlösungspuffer zusammen im Gamma-Counter messen
- 1ml Natrium-Acetat (0,02M / pH 4-5) pro Eppendorfgefäß zugeben
- 10 min bei $+37^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubieren
- zentrifugieren, Na-Acetat Lösung entfernen noch 1x mit Na-Acetat (1ml) spülen
- beide zusammen im Gamma-Counter messen
- Zellen mit 1ml NaOH (1M) pro Eppendorfgefäß lysieren, 1 min bei RT inkubieren
- 50 μl für Proteinkonzentrationsbestimmung entnehmen
- NaOH Lösung abpipettieren, 1x mit PBS (1 ml) Eppendorfgefäße spülen
- beide zusammen im Gamma-Counter messen
- Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Test (siehe 2.3.1.4) bestimmen

Mit dem [^{18}F]Galacto-RGD wurden die blockierenden Eigenschaften des kalten RGDyV-Peptides untersucht. In dem Fall wurde 10 min vor Inkubation mit [^{18}F]Galacto-RGD $15\mu\text{M}$

RGDfV-Peptidlösung zugegeben. Weiter wurde der Versuch nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Die Zellen wurden immer 3 min bei 3500 rpm zentrifugiert.

Für die Versuche mit den M21 und M21-L Zellmischungen wurden pro Ansatz

1×10^6 Zellen mit dem Anteil 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100% von M21- Zellen verwendet.

2.2.1.2 Bindung von [¹²⁵I]Gluc-RGD und [¹²⁵I]-RGDyV an Melanomzellen

Für die Untersuchung der Bindung der [¹²⁵I]Gluc-RGD, [¹²⁵I]-RGDyV Tracer an die M21 und M21-L Zellen wurde das Standardprotokoll (siehe 2.2.1.1) verwendet. Auf Grund der Halbwertszeit des ¹²⁵ I von 59,6 Tagen wurden sowohl die Zahl der Zellen auf 3×10^5 als auch die Menge der angesetzten Tracer auf 500 000 cpm pro Probe reduziert.

2.2.1.3 Auswertung der Bindung von RGD-Peptiden an Melanomzellen

Die im Gamma-Counter gemessenen Impulsraten und die jeweilige Proteinkonzentration wurden für die Auswertung der Versuche zu Grunde gelegt. Im Gamma-Counter wurden 3 Fraktionen gemessen: 1) das Medium mit dem Waschpuffer, in dem sich der größte Teil des ungebundenen Tracers befindetet, 2) die Natrium-Acetat Lösung mit dem radioaktiv markierten Peptid, das auf der Zelloberflächen gebunden wurde, 3) das Zelllysate, mit dem internalisierten Anteil des Ligandes. Zum Errechnen der Anteile des auf der Zelloberfläche gebundenen bzw. des internalisierten Peptides wurden die cpm Werte der 2. und 3. Fraktionen durch die Werte der 1. Fraktion geteilt. Die erhaltenen prozentualen Werte wurden auf die Proteinmenge jeder Probe bezogen. Zum Schluß wurde ermittelt, wieviel % der eingesetzten Aktivität (cpm) pro Milligramm Zellprotein an die Zellmembranen gebunden bzw. in die Zellen aufgenommen wurden (% aufgenommene Aktivität / mg Zellprotein). Von dem pro Ansatz eingesetzten 3-5 Proben wurde der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

2.2.1.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen in den Proben wurden mit der Methode nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Diese colorimetrische Methode ist für die Quantifizierung der Proteine in der Lösung geeignet. Die Standardkurve wurde mittels gelöstem BSA als Standardprotein erstellt.

- in Eppendorfgefäße 700µl PBS, von 0,002 bis 0,015 mg/ml BSA-Lösung, 1:9 H₂O : PBS Lösung ansetzen (auffüllen auf 800 µl)

- Referenz: 700µl PBS + 100µl 1:9 H₂O : PBS Lösung
- Für die Proteinbestimmung 700µl PBS, 25µl Proteinlösung aus der Probe, 75µl 1:9 H₂O : PBS Lösung in den Eppendorfgefäßen zusammenmischen
- Referenz: 700µl PBS, 25µl NaOH (1M) , 75µl 1:9 H₂O : PBS Lösung
- 200µl Bradford Farbstoff-Konzentrat zugeben, mischen und 5 min bei RT inkubieren
- Lösungen in die Mikroküvetten abpipettieren
- bei 595 nm am Spekto-Photometer die Extinktion der Lösungen bestimmen
- aus den Standard-BSA-Proteinlösungsdaten die Standardkurve erstellen und die Proteinkonzentration der zu bestimmenden Proteinlösungen errechnen.

2.2.2 Maus-Tumor-Modell

2.2.2.1 Versuchstiere

Für das Tumormodell wurden weibliche Nacktmäuse (SWISS NU/NU), im Alter von 6 Wochen, aus spezifisch pathogen freier Zucht (Charles River, Frankreich) verwendet. Die Nacktmäuse wurden in Käfigen zu je 4-6 Tiere in einem Tierstall mit speziellem Lichtprogramm bei 26°C, 50-60% Luftfeuchtigkeit gehalten und mit Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser ad libitum versorgt.

2.2.2.2 Tumormodell

Als Tumormodell wurden Nacktmäuse mit xenotransplantiertem menschlichem M21-Melanom verwendet. Durch Injektion einer Mischung von M21 und M21-L Zellen (siehe Tab. 1) wurden somit Tumoren mit unterschiedlicher Dichte von $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ positiven Zellen erzeugt.

Die Zellen wurden vorher in reinem RPMI 1640 Medium gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Die M21 und M21-L Zellen wurden gemischt (Tab.3), in 100 µl des RPMI 1640 Mediums eingebracht und bis zur Inokulation auf Eis aufbewahrt.

Unter Aetherkurznarkose wurde den Nacktmäusen subkutan in die rechte Schulter die M21 und M21-L Zellmischung injiziert. Die Tumoren mit 0% bis 100% $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ positiven Zellen erreichten innerhalb von 4 Wochen ein Gewicht von 0,06 bis etwa 1,21 g (Mittelwert 0,53g).

Tab.3 Anteil der erwarteten M21 Zellen im Mischtumour in Abhängigkeit von der Anzahl der injizierten M21 und M21-L Melanomzellen

Erwarteter Anteil M21- Zellen in den Mischtumoren, %	Zahl der injizierten M21-Zellen	Zahl der injizierten M21-L-Zellen
100 %	$2,5 \times 10^6$	–
75 %	$1,13 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
50 %	$7,5 \times 10^5$	3×10^6
25 %	$3,8 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$
10 %	$1,5 \times 10^5$	$5,4 \times 10^6$
0 %	–	$3,5 \times 10^6$

2.2.3 Darstellung der Verteilung von [¹⁸F]Galacto-RGD im Tumor mittels Kleintier-PET

Um die Verteilung des [¹⁸F]Galacto-RGD-Peptides in vivo in den Mischtumoren zu untersuchen, wurden PET-Aufnahmen von den Mäusen durchgeführt. Dafür wurde der von der Arbeitsgruppe Ziegler (Ziegler 2001) konstruierte hochauflösende Kleintier PET-Scanner (Auflösung 2,4 mm) basierend auf LOS-APD Modulen (LSO – lutetium oxyorthosilicate scintillation, APD – avalanche photodiodes) genannt Munich Avalanche Photo Diode PET (MADPET) verwendet. Der Prototyp des MADPET Tomographens hat 48 Detektoren in 2 Sektoren, die während der Messung um das Tier rotieren. Der innere Abstand beträgt 86 mm. In den Tomographen ragt die manuell verstellbare Plexiglasliege zur Lagerung der Mäuse.

2.2.3.1 Durchführung der PET-Untersuchungen

Vor der i.v. Injektion der Aktivität wurde eine Kurznarkose der Nacktmäuse mit Aether durchgeführt. Unmittelbar vor der Injektion der Tracer in die laterale Schwanzvene wurde der Schwanz in 45°C warmes Wasser getaucht und anschließend abgetrocknet. Durch diese Prozedur dilatierte die Schwanzvene. Mittels einer 27G Kanüle wurden 100-200µl der radioaktiven Substanz i.v. injiziert. Jede Maus erhielt intravenös 0,74 MBq (200µCi)

[¹⁸F]Galacto-RGD. Zur PET-Untersuchung wurde den Mäusen als Narkose 200-250 µl des Rompun/Ketavet Gemisches intraperitoneal injiziert. 90 min. p.i. wurden die anästhesierten Mäuse im Kleintier-PET Gerät mit Klebstreifen in Bauchlage positioniert. Dann erfolgte eine transaxiale Schnittaufnahme durch den Tumorbereich. Für die Aufnahmen wurden 32 Projektionen á 15 Sekunden aufgenommen. Aus diesen Projektionen wurde iterativ mittels des „ordered subsets expectation maximization“ (OSEM) Algorithmus eine Schichtaufnahme rekonstruiert. Zur Bestimmung der Aktivitätsaufnahme im Tumorgewebe wurde in dieser Schichtaufnahme der gesamte Tumor markiert und die mittlere Zählrate in dieser sogenannten "region of interest" (ROI) bestimmt. Außerdem wurde eine ROI in die kontralaterale Thoraxwand gelegt. Die Aktivitätsaufnahme im Tumor wurde dann als das Verhältnis der mittleren Zählrate im Tumor dividiert durch die mittlere Zählrate in dieser Vergleichsregion ausgedrückt.

2.2.4 Durchführung und Ermittlung der Biodistribution

2.2.4.1 Ermittlung der Organgewichte

Nach der PET Aufnahme wurden die Mäuse mit CO₂ Gas getötet. Anschließend folgte die Öffnung des Brustkorbs und die Durchtrennung der Aorta im Bereich des Aortabogens zur Entblutung der Organe und Gewinnung von Blut. Dann wurden der Oberschenkelmuskel und der Tumor präpariert und in speziellen vorgewogenen Probegefäßen auf einer Analysenwaage (Einteilung = 0,0001g; Meßfehler = 0,0002g) gewogen. Die Tumoren wurden sofort nach ihrer Präparation in zwei Teile geteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.4.2 Aktivitätsbestimmung

Die in Tumor, Muskel und Blut enthaltene Aktivität des [¹⁸F]Galacto-RGD wurde im Gamma-Probenwechsler gemessen. Für die Auswertung wurde je Versuch ein 1 %-iger Standard der injizierten Aktivität hergestellt. Dafür wurde das gleiche Volumen der radioaktiven Substanz, die den Mäusen injiziert wurde, in einen 100ml Erlmeyerkolben gefüllt, mit physiologischer Kochsalzlösung bis zum Eichstrich auf 100ml aufgefüllt und gut gemischt. Je 1 ml wurde in 5 Probegefäße pipettiert und dienten als Standard (1% der applizierten Aktivität). Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung der Organproben wurden stets auf den jeweiligen Mittelwert des Standards bezogen.

2.2.4.3 Auswertung der Biodistributionsdaten

Die ermittelten Werte des Gewichtes (g) und der Impulsratenbestimmung (cpm) von Tumoren, Muskeln und Blut wurden auf cpm/g umgerechnet und auf den 1 %-igen Standard der injizierten Aktivität bezogen. Die in den Organen enthaltene Radioaktivität wurde in % der injizierten Aktivität / g Gewebe (% ID/g) ausgedrückt.

2.2.5 Histologische Analyse der Mischtumoren

2.2.5.1 Kryostatschnitte

Eine Hälfte der Tumoren wurden auf Objektträger eines Kryostaten (Microm, TYP HM 500) mit Hilfe eines speziellen Gels zum Einfrieren (Tissue Tek) aufgefroren und die Schnitte mit einer Dicke von 6µm bei -20°C geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Die Gefrierschnitte wurden luftgetrocknet und für H&E und immunhistochemischen Färbungen bis zur Fixierung bei -70°C aufbewahrt.

2.2.5.2 Hämalaun / Eosin Färbung

Zur morphologischen Übersicht wurden die Schnitte von M21 und M21-L Tumoren mit Hämalaun / Eosin nach dem Standardprotokoll gefärbt.

- gefrorene Schnitte trocknen lassen
- 10 min in Formalin fixieren
- kurz in Aqua dest. spülen
- 5 min in Hämalaun (nach Mayer) färben
- 30 s in Leitungswasser spülen
- 10 min im Leitungswasser bläuen lassen
- 30 s in Aqua dest. spülen
- 1 min im Eosin färben
- 2 x 1 min in Aqua dest. spülen
- Schnitte trocknen lassen
- Objektträger mit der Glyceringelatine eindecken.

2.2.5.3 Immunhistochemische Darstellung

Die spezifische Expression der $\alpha\beta 3$ und $\beta 3$ Integrine in den Mischtumoren wurde immunhistochemisch mittels CD51/61 und CD61 Antikörper dargestellt.

2.2.5.3.1 Nachweis der $\alpha\beta 3$ Expression in Mischtumoren

Zur Darstellung der $\alpha\beta 3$ Integrine in Melanommischtumoren wurden die monoklonalen biotinylierten Maus Anti-human Integrin $\alpha\beta$ Antikörper verwendet. Die Versuche wurden nach folgenden Protokoll bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Kryoschnitte trocknen lassen
- 10 min im eiskalten Azeton fixieren
- kurz im PBS-Puffer spülen (Die Schnitte darf man während ganzes Versuchs nicht austrocknen lassen!)
- zur Blockade unspezifischer Bindung Inkubation der Schnitte 20 min mit 4% BSA/PBS Lösung
- monoklonale biotinylierte Maus Anti-human Integrin $\alpha\beta 3$ Antikörper mit der speziellen Verdünnungslösung für die Antikörper (1:100) verdünnen, auf die Schnitte pipettieren und 60 min inkubieren
- 3 x 2min Schnitte in PBS spülen
- zur Blockade der endogenen Peroxidasen Inkubation der Objektträger in der Küvette mit 200 ml reinem Methanol + 50 ml 3%-iges H_2O_2 5 min
- 3 x 2min Schnitte in PBS spülen
- 30 min mit ABC-Peroxidase-Komplex inkubieren
- 3 x 2 min Schnitte in PBS spülen
- 30 min die Schnitte mit AEC Lösung inkubieren
- 3 x 2 min in Aqua dest. spülen
- 45 s die Schnitte in Hämalaun gegenfärben
- 2 x 1 min in Leitungswasser spülen
- 5 min in Leitungswasser die Schnitte bläuen lassen
- Objektträger trocknen lassen und mit Glyceringelatine eindecken

2.2.5.3.2 Nachweis der murinen $\beta 3$ Expression in Blutgefäßen und Stroma von Mischtumoren

Um die Blutgefäße der Maus in den menschlichen Mischtumoren sichtbar zu machen, wurden für die immunhistochemische Darstellung primäre monoklonale Hamster Anti-Maus Integrin $\beta 3$ Antikörper eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten die Mischtumorschnitte ohne primären Antikörper und Mausmuskelschnitte. Als Positivkontrolle dienten murine Schnitte der Milz. Alle Schritte richteten sich nach dem Standard-Protokoll und wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

- Kryoschnitte bei Raumtemperatur trocknen lassen
- 10 min im eiskalten Azeton fixieren
- kurz in PBS spülen (die Schnitte dürfen nicht austrocknen bis Ende des Versuches!)
- 20 min Blockade mit 4% BSA/ PBS Lösung
- 60 min monoklonale Hamster Anti-Maus Integrin $\beta 3$ Antikörper (1:10) auf die Schnitte pipettieren und inkubieren
- 3 x 2 min in PBS-Puffer spülen
- Inkubation mit den sekundären biotinylierten Maus Anti-Hamster IgG Antikörper (1:200) 30 min
- 3 x 2 min in PBS spülen
- zur Blockade der endogenen Peroxidasen Inkubation der Objektträger in der Küvette mit 200 ml reinem Methanol + 50 ml 3%-iges H_2O_2 5 min
- 3 x 2 min in PBS spülen
- Inkubation mit ABC-Peroxidase-Komplex 30 min
- 3 x 2 min in PBS spülen
- Inkubation mit AEC 30 min
- 3 x 2 min in Aqua dest. spülen
- Gegenfärbung mit Hämalaun 2 min
- 2 x 1 min in Leitungswasser spülen
- bläuen mit Leitungswasser 5 min
- Objektträger trocknen lassen
- eindecken in Kaisers Glyceringelatine

2.2.6 Western Blot Analyse

Mittels Western Blot können einzelne Proteine in Gesamtproteinextrakten nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Proteingemische werden mittels einer analytischen diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-DISK-PAGE) aufgetrennt und in einem nachfolgenden Arbeitsschritt auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. So sind immobilisierte Proteine einer Antigen/Antikörper-Bindung zugänglich. Zuerst bindet der unmarkierte Primärantikörper an das gesuchte Antigen. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird von einem Sekundärantikörper erkannt, der mit ^{125}I markiert ist. Die radioaktiv markierte Membran wird auf einen speziell beschichteten Expositions-Screen aufgelegt. Die in der Beschichtung enthaltenen Metallionen werden von der γ -Strahlung auf ein erhöhtes Energieniveau gehoben. Diese Veränderungen des Ionen-Energieniveaus werden nach der Exposition von einem Laser des PhosphorImager Scanners abgetastet und mittels spezieller Software in ein Bild umgewandelt. Die umgewandelten Signale sind sowohl zur Strahlenintensität als auch zur Proteinmenge proportional. Die so sichtbar gemachten Proteine können dann mit entsprechenden Programmen qualitativ und quantitativ beschrieben werden.

2.2.6.1 Probenvorbereitung

Um ein Proteingemisch zu erhalten, wurden die Melanomzellen oder Tumorgewebe durch Homogenisierung und Lysierung bearbeitet.

2.2.6.1.1 Lyse der Melanomzellen

Die Proteinextrakte von M21 und M21-L Melanomzellen wurden durch Lyse der Zellen erhalten.

- Medium von den Flaschen mit M21 und M21-L Zellen absaugen
- 5 ml EDTA pro Flasche zugeben, 5 min inkubieren
- Suspension bei 1500 rpm 5 min zentrifugieren
- Überstand abgießen, 1 ml RPMI Medium pro Pellet zugeben und resuspendieren, die Zahl der Zellen bestimmen
- M21 und M21-L Zellen zusammen in den einzelnen Eppendorfgefäßen mit dem Anteil von M21- Zellen 0, 10, 25, 50, 75, 100 % mischen. Insgesamt 3×10^6 Zellen pro Probe
- Zellen bei 1500 rpm 5 min zentrifugieren

- 10 min auf Eis stehen lassen
- Eppendorfgefäß 10 min bei 15000 rpm bei +4°C zentrifugieren
- Überstand absaugen und 100µl Lysepuffer pro Pellet zugeben, resuspendieren
- Überstand in das neue Eppendorfgefäß abpipettieren
- in -70°C abstellen

2.2.6.1.2 Homogenisierung der Mischtumoren

Die Hälfte der Mischtumoren, die für Western Blot Analyse vorgesehen waren, wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Homogenisierung der Gewebe wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt. Alle Schritte des Protokolls müssen auf Eis gemacht werden!

- ein Gefäß und eine Metallkugel 2 min in flüssigem Stickstoff vorkühlen
- in das Gefäß die Hälfte des Tumors legen und 2 min im flüssigen Stickstoff einfrieren lassen
- Gefäß zuschließen und in den Mikro-Dismembrator 2 legen
- Gerät einschalten und 2 min den Tumor homogenisieren lassen
- Gefäß öffnen und dem Gewebepulver 200µl des Lysepuffer zugeben
- Lysat in das Eppendorfgefäß überführen und 10-15 min auf Eis halten
- Eppendorfgefäß 10 min bei 15000 rpm bei +4°C zentrifugieren
- 150µl des Überstandes in das neue Eppendorfgefäß abpipettieren
- in -70°C aufbewahren

2.2.6.1.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Alle Schritte wurden auf Eis gemacht!

- Proben mit dem Lysat auftauen lassen
- Proteinkonzentration der Lysate wurde nach Bradford bestimmt (siehe 2.3.1.4.). In diesem Fall wurde 1 µl der Proteinlösung für die Proteinkonzentrationsbestimmung verwendet. Alle sonstigen Schritte des Protokolls blieben dabei unverändert. Danach wurden die Proben so mit dem Lysepuffer verdünnt, dass alle Proteinlösungen die gleiche Proteinkonzentration aufwiesen.

2.2.6.2 Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen

Bei der analytischen SDS-PAGE werden Proteingemische einer größenabhängigen Auftrennung im elektrischen Feld unterworfen. Zur Auftrennung der Komplexe nutzt man die Molekularsiebeigenschaften von Polyacrylamidgelen aus.

- Glasplatten (10 x 8 cm), Aluminiumplatten, Spacer (0,75 mm Dicke) und Probenkämme mit Wasser und Azeton säubern
- Gelkammer mittels Mighty- Small SE 200 Multiple-Gel-Caster (Hoefer) (für bis zu zehn Gele) zusammenbauen
- 15% Trenngel-Lösung (siehe 2.1.2) ansetzen (Ammoniumpersulfat-Lösung 10% und TEMED zum Schluß zugeben)
- Mischung bis ca. $\frac{3}{4}$ der Höhe der Gelkammer gießen
- jedes Gel mit 250µl Wasser-gesättigtem-Butanol überschichten (zur Glättung der Oberfläche)
- 60 min auspolymerisieren lassen, dann Butanol abgießen und Gele unter dem fließenden Wasser abspülen
- 4% Sammelgel-Lösung (siehe 2.1.2) vorbereiten (Amoniumpersulfat-Lösung 10% und TEMED zum Schluß zugeben)
- Sammelgele aufgießen und Kämme einsetzen
- 30 min auspolymerisieren lassen

2.2.6.3 Elektrophorese

- Proteinlösungen 1:4 mit reduzierendem Ladepuffer (1:10 DTT) mischen
- Proben direkt vor dem Lauf 5 min bei 95°C inkubieren
- Gelkammer mittels Klammer in einer Mighty small 2 SE 2500/SE 260 Elektrophorese-Einheit (für 1-2 Gele) befestigen
- Gerät mit SDS-Elektrophorese-Puffer in oberen und unteren Pufferhalter befüllen
- Probenkamm ziehen, Proben in der Zentrifuge zentrifugieren und je 5µl Probe (bei Verwendung eines 10-er Kammes) und 5µl Molekulargewichtsmarker in die Taschen pipettieren
- Elektrophorese bei 50 mA/ pro Gel, 180 V (45-60 min), bei der RT durchführen

2.2.6.4 Transfer auf eine Nitrocellulosemembran

- eine flache Schale bis zur Hälfte mit dem Transferpuffer füllen
- Blot-Stapel in dieser Reihenfolge bauen: 1 Schwamm, 1 Whatmanpapier, 1 Nitrocellulosemembran, 1 Gel, 1 Whatmanpapier, 1 Schwamm
- Luftblasen mit Hilfe einer verkürzten 10 ml Plastikpipette herausdrücken
- Blotstapel in den Transferrahmen legen
- Kammer mit dem Transferpuffer auffüllen und den Rahmen in die Blotkammer einsetzen
- Transfer bei 200 mA, 2 h, RT

2.2.6.5 Immunoblotanalyse des αv Proteins

Spezifische Proteine werden auf der Nitrocellulose-Membran durch ein indirektes immunologisches Verfahren nachgewiesen.

- Nitrocellulose-Membran aus dem Transfergerät heraus nehmen
- 2x30 min in 5% Magermilchpulver in TBS-Puffer auf dem Schüttler bei RT inkubieren; Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen auf der Membran
- polyklonale Kaninchen Integrin αv Antikörper (Primärantikörper) mit 5 % Magermilchpulver / TBS-Puffer 1:500 verdünnen
- Membran in Folie einschweißen, Antikörperlösung daraufgeben und bei +4°C Grad über Nacht inkubieren
- Membran 3x5 min in TBST-Puffer unter Schütteln waschen
- Polyklonales ^{125}I markiertes Esel Anti-Kaninchen IgG (sekundärer Antikörper) mit 5 % Magermilchpulver / TBS-Puffer 1:400 verdünnen
- Membran in Folie einschweißen, mit sekundärem Ak. auf dem Schüttler 2 h bei RT inkubieren
- Membran herausnehmen und 6x6 min unter Schütteln in TBST-Puffer bei RT waschen
- Nitrocellulose-Membran trocknen lassen
- Membran auf Whatmanfilter legen in Frischhaltefolie einpacken und in Fotokassette mit Screen exponieren (48 h)
- Screen in Phosphor Imager legen, einscannen
- Banden mit Image Quant-Software quantitativ auswerten

2.2.7 Statistische Auswertung

Für die im folgenden dargestellten Diagramme wurden sämtliche Daten tabellarisch mit Hilfe der Software Microsoft Excel erfaßt. Mittels dieser Software wurden Mittelwerte \pm Standardabweichungen und Regressionswerte ausgerechnet und in den Diagrammen dargestellt. Die Berechnung der statistischen Signifikanten wurde mit Hilfe der Software GraphPad InStat ermittelt. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet. Sie sind im Text und den Graphiklegenden angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Bindung und Internalisierung der cRGD-Peptide durch Melanomzellen

3.1.1 Bindung und Internalisierung des [^{18}F]Galacto-RGD durch M21 und M21-L Melanomzellen bei +37°C

Nach einer Inkubationszeit von M21 und M21-L Melanomzellen von 90 min mit [^{18}F]Galacto-RGD wurde der Anteil von membrangebundenem und internalisiertem Galacto-RGD bei beiden Zelllinien bestimmt. An die Zellen gebundene bzw. internalisierte Radioaktivität (in % der zugesetzten Aktivität) wurde auf das Zellenprotein bezogen (% gebundene bzw. internalisierte Aktivität / mg Zellprotein). Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (Bradford 1976) durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass bei M21 Melanomzellen 1,1 % und bei M21-L Zellen 0,14 % Galacto-RGD an der Membran gebunden waren. Internalisiert wurde von den beiden Zelllinien ein geringer Anteil. Die M21 Zellen internalisierten 0,52% und M21-L Zellen 0,03% des RGD-Peptides (Abb.2).

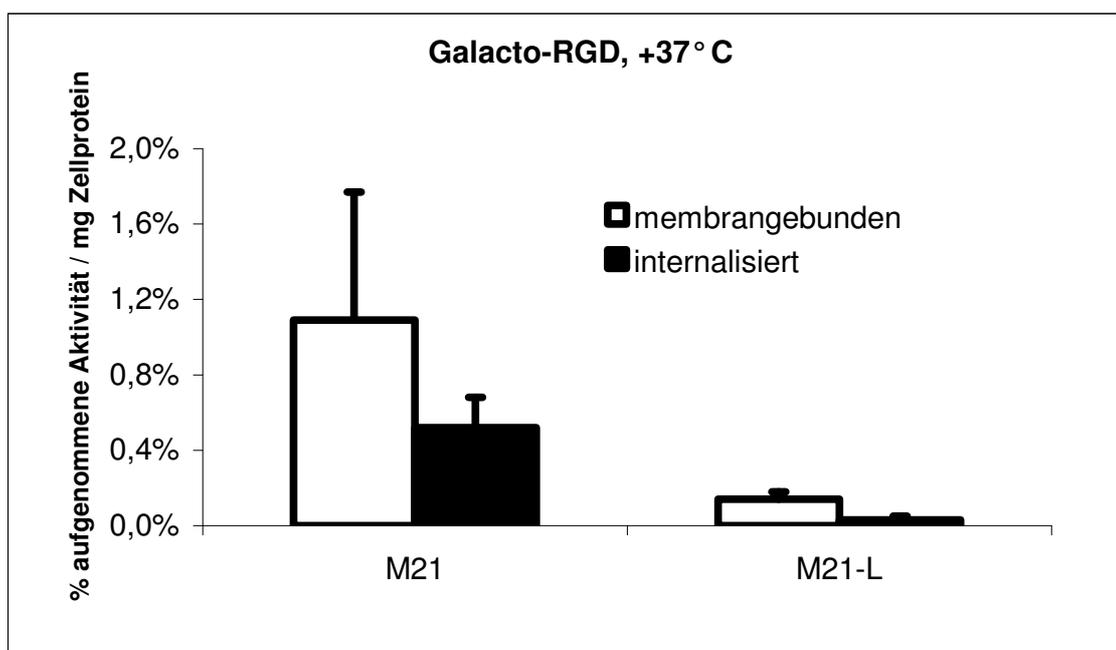


Abb.2 Vergleich der Bindung und Internalisierung von [^{18}F]Galacto-RGD an M21 und M21-L Melanomzellen bei +37°C. MW \pm SD, n=4

3.1.2 Bindung und Internalisierung des [125 I]Gluco-RGD durch M21 und M21-L Melanomzellen bei +37° C

Die Bindung und Internalisierung an M21 und M21-L Zellen wurde mit einem 125 I markierten RGD- Peptid, das an einen anderen Zucker gekoppelt war ([125 I]Gluco-RGD), bei den gleichen Bedingungen (+37°C, Inkubationszeit 90 min) untersucht. Bei $\alpha\beta 3$ positiven M21 Melanomzellen waren 2,40 % und bei $\alpha\beta 3$ negativen M21-L Melanomzellen waren 0,55% des Gluco-RGD an die Zellmembran gebunden. Der internalisierte Anteil dieses Peptides lag bei der M21 Zelllinie bei 0,43% und bei den M21-L Zellen bei 0,10% (Abb.3).

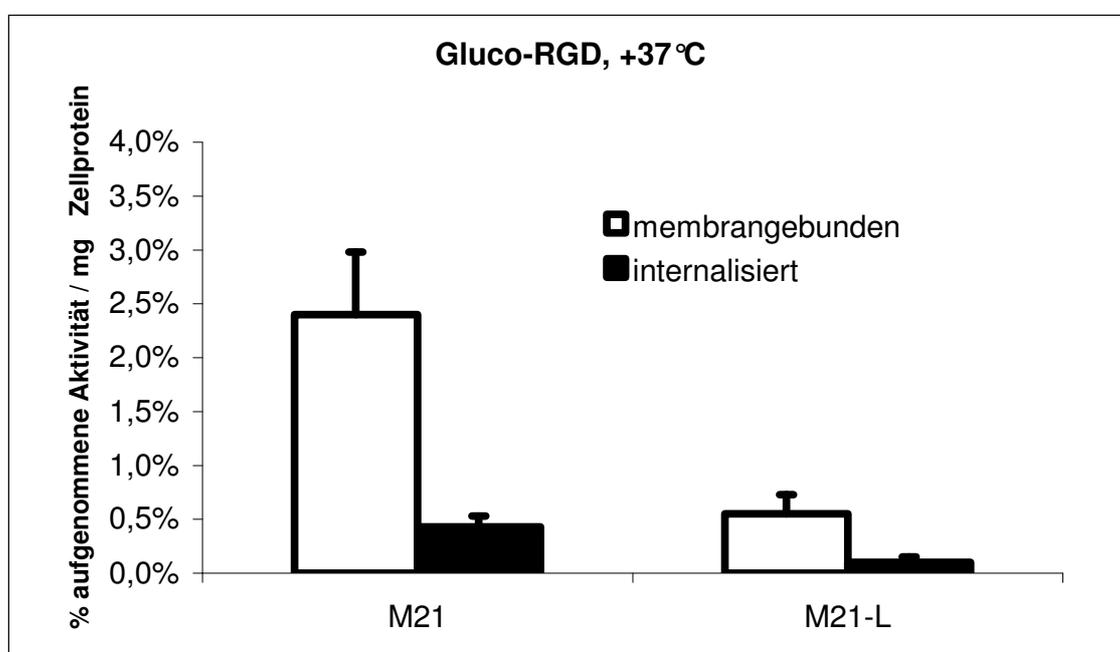


Abb.3 Vergleich der Bindung und Internalisierung von [125 I]Gluco-RGD an M21 und M21-L Melanomzellen bei +37°C. MW \pm SD, n=5

3.1.3 Bindung und Internalisierung des [¹²⁵I]-RGDyV durch M21 und M21-L Melanomzellen bei +37° C

Um den Einfluß der Zuckergruppe auf die spezifische Bindung des RGD-Peptides an den $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ Rezeptor zu untersuchen, wurden die Experimente auch mit dem [¹²⁵I]-RGDyV Peptid, das keine Zuckergruppe besitzt, durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei M21 Zellen 2,77 % des RGDyV-Peptides an die Zellmembran gebunden waren und 0,37 % internalisierten. An M21-L Zellen war ein geringerer Anteil von 0,56% des gleichen Peptides gebunden und 0,12 % internalisiert (Abb.4).

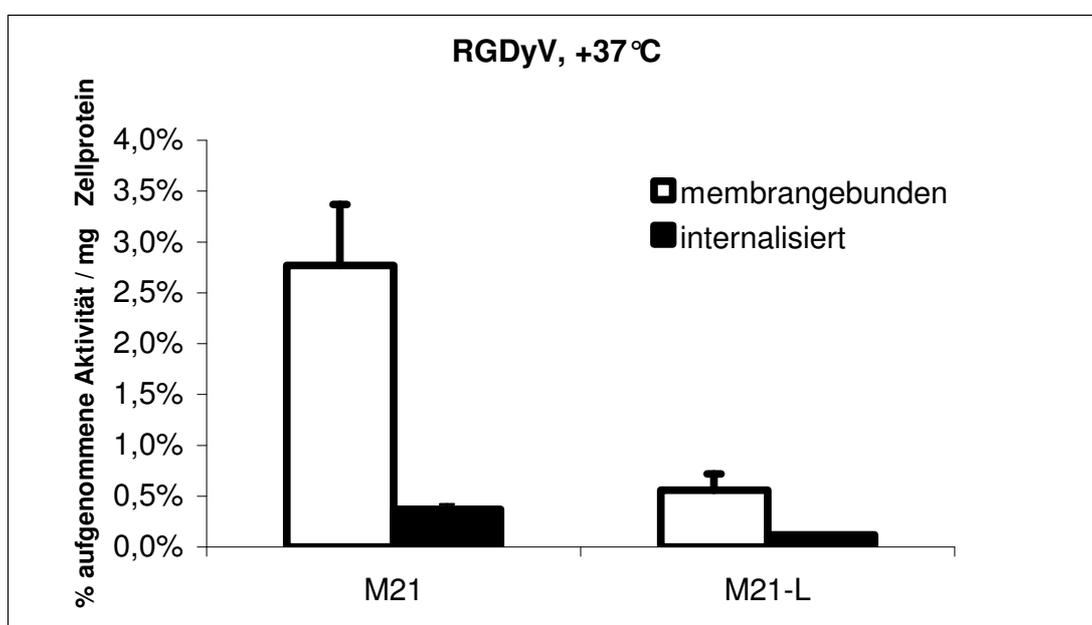


Abb.4 Vergleich der Bindung und Internalisierung von [¹²⁵I]-RGDyV an M21 und M21-L Melanomzellen bei +37°C. MW±SD, n=5

3.1.4 Temperaturabhängigkeit der Bindung und Internalisierung der RGD-Peptide durch M21 Zellen

Die Ergebnisse der drei oben durchgeführten Versuche zeigen wie erwartet eine deutlich niedrigere Bindung und Internalisierung des RGD-Peptides durch M21-L Zellen als durch M21 Zellen mit einer ziemlich großen Standardabweichung der Werte der

membrangebundenen RGD-Peptide. Daher basieren die weiteren Versuche auf dem internalisierten Anteil der M21 Melanomzellen.

Um den Einfluß der Temperatur auf die Bindung der Liganden zu untersuchen, wurden die Versuche bei +4°C und +37°C Grad durchgeführt und die gewonnenen Internalisierungsdaten verglichen.

So ist zu erkennen, dass die M21 Zellen bei +4°C eine deutlich geringere Menge von [¹²⁵I]Gluco-RGD (0,20%) und [¹⁸F]Galacto-RGD (0,21%) als bei +37°C internalisierten (Abb.5). Die Internalisierung des RGD-Peptides durch M21 Zellen war bei +37°C circa doppelt so hoch wie bei +4°C.

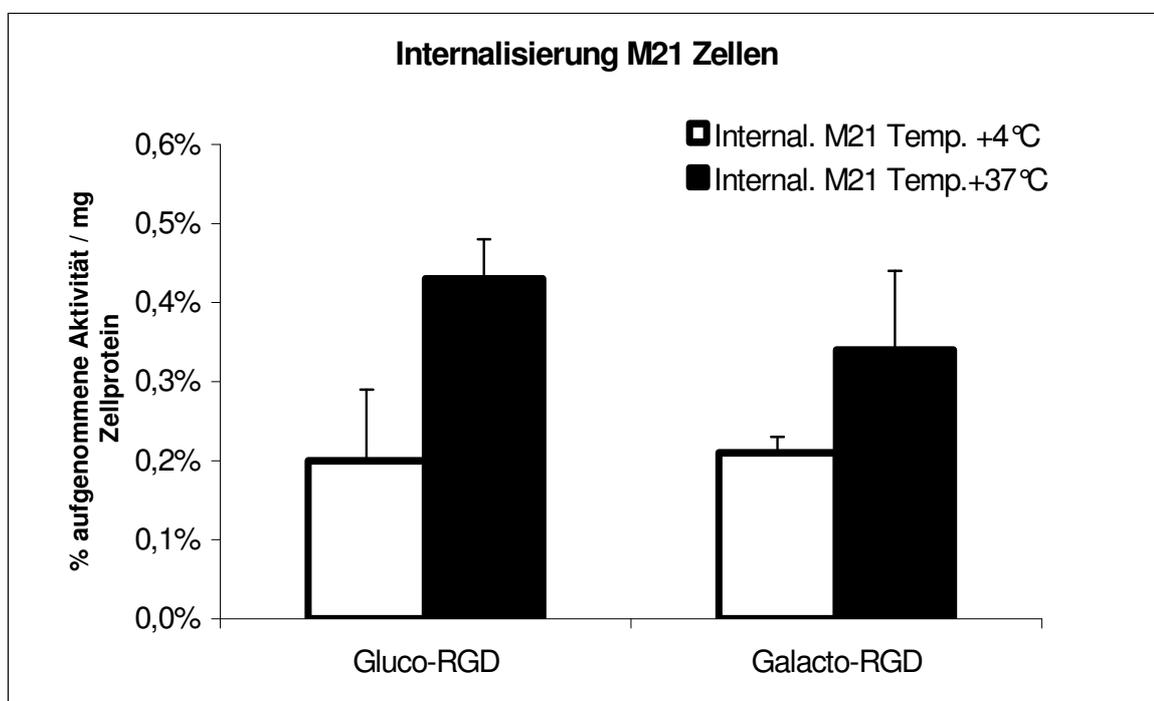


Abb.5 Vergleich der Internalisierung des [¹²⁵I]Gluco-RGD und des [¹⁸F]Galacto-RGD durch M21 Melanomzellen bei +4°C und +37°C, MW±SD, n=5

3.1.5 Internalisierung des [^{18}F]Galacto-RGD bei +37°C durch M21 und M21-L Zellen sowie Blockierung der M21 Zellen mit kaltem Peptid

Da für die PET Untersuchungen als Tracer das [^{18}F]Galacto-RGD verwendet wurde, wurden die beiden Zelllinien bei den gleichen Bedingungen mit diesem RGD-Peptid untersucht. Nach 90 min Inkubationszeit waren bei den M21 Zellen 0,34 % des [^{18}F]Galacto-RGD internalisiert. Die M21-L Zellen hatten nur 0,03 % des Peptides internalisiert. Um die blockierenden Eigenschaften des kalten RGD-Peptides zu untersuchen, wurde 10 min vor der [^{18}F]Galacto-RGD Zugabe zu den M21 Zellen, 15 μM Lösung des RGDyV-Peptides zugegeben. Es zeigte sich, dass die blockierten M21 Zellen nach der Inkubationszeit von 90 min lediglich 0,05 % des [^{18}F]Galacto-RGD internalisierten (Abb.6).

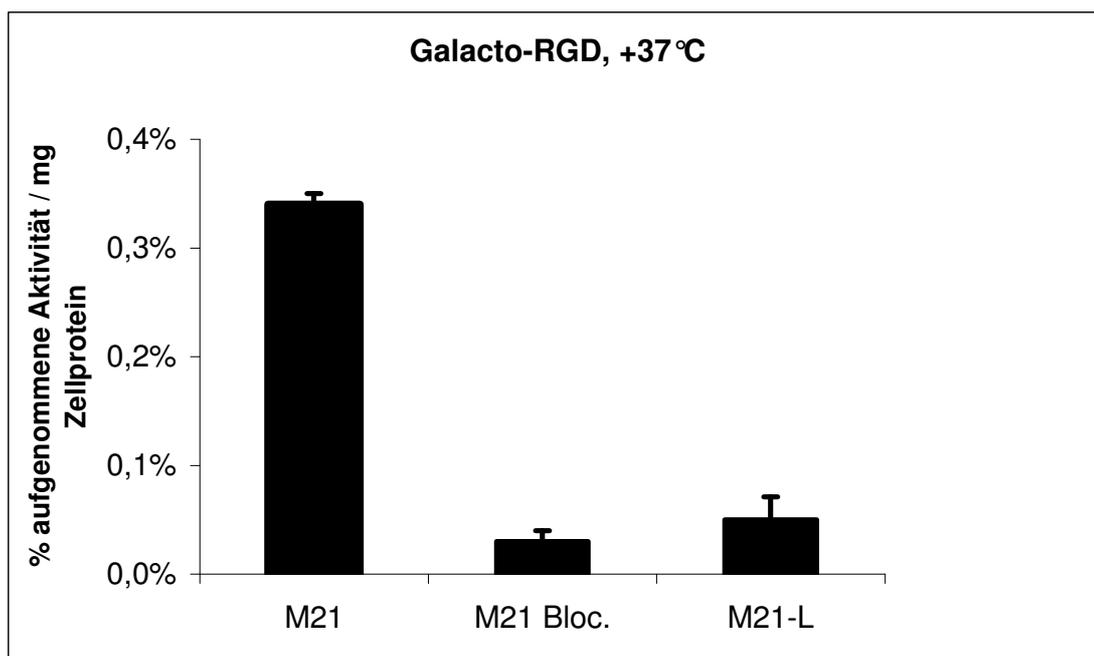


Abb.6 Internalisierung des [^{18}F]Galacto-RGD durch M21 und M21-L Melanomzellen sowie Blockierung der M21 Zellen mit kaltem Peptid bei +37°C, MW \pm SD, n=5

3.1.6 Internalisierung des [^{18}F]Galacto-RGD nach Mischung von M21 und M21-L Zellen

Um die Genauigkeit der Internalisierung *in vitro* zu untersuchen, wurden M21 mit die M21-L Zellen gemischt. Der definierte Anteil von 0 bis 100% (0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%) der M21 Zellen wurde mit den M21-L Zellen pro Ansatz ad 1 Million Zellen gemischt. Es zeigte sich, dass M21-L Zellen 0,03% des Galacto-RGD-Peptides internalisierten. Von den Zellmischungen mit dem Anteil 10%, 25%, 50%, 75%, 100% der M21 Zellen wurden entsprechend 0,12 %, 0,15%, 0,25%, 0,33%, 0,52% des Galacto-RGD-Peptides internalisiert (Abb.7).

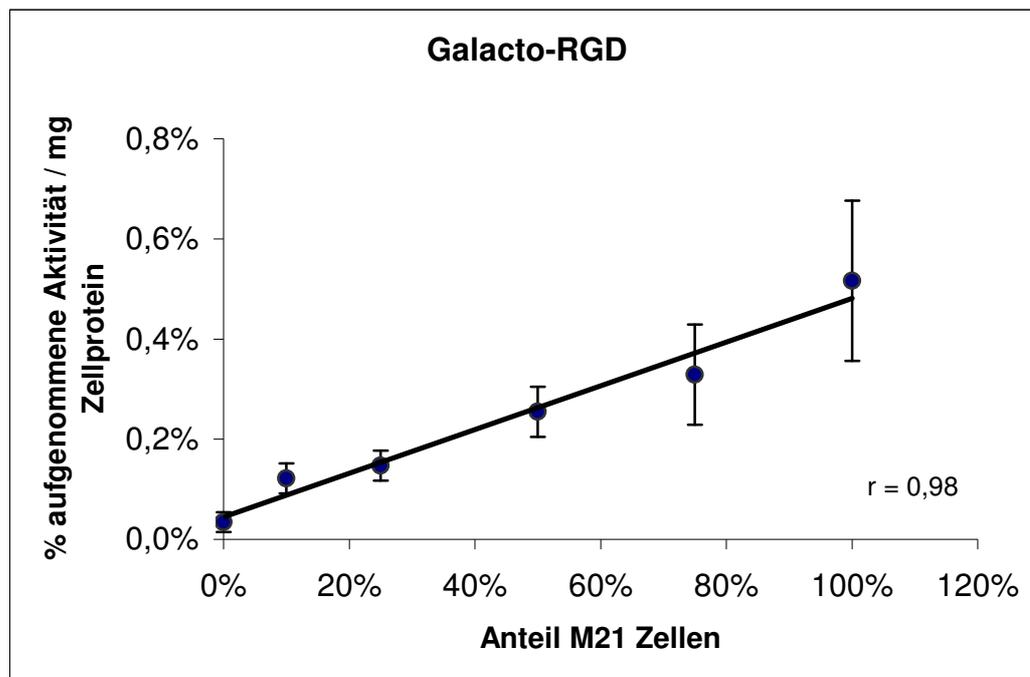


Abb.7 Internalisierung des [^{18}F]Galacto-RGD durch Zellmischungen von M21 und M21-L bei +37°C. Der Anteil der M21 Zellen pro Probe betrug 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, MW \pm SD, n=3

3.1.7 Ermittlung der Expression des αv Integrins in den Zellenmischungen mittels Western Blot

Um die quantitative Expression des αv Integrins in M21 und M21-L Zellen sowie in den Mischungen der beiden auswerten zu können, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Der Anteil der M21 Zellen wurde auf 0 %, 10%, 25%, 50%, 75%, 100% pro Probe (3 000 000 Zellen) eingestellt. Die Zellen wurden lysiert und damit wie in 2.3.6 beschrieben ein Western Blot durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigten die hohe Expression des αv Proteins von M21 Zellen (Abb.8). In der Spur der M21-L Zellen (0% M21 Zellen) ist bei 25 kDa Molekulargewicht, das der Größe des reduzierten αv Integrins entspricht, keine Bande zu erkennen. In den Spuren der Zellenmischungen sieht man eine Steigerung der Intensität der Bande bei 25 kDa proportional dem Anteil der M21 Zellen in den Proben. Die Verwendung eines mit ^{125}I markiertem sekundären Antikörpers ermöglichte die quantitative Auswertung des Western Blots.

Nach der Hintergrundkorrektur wurden die Banden vom reinen M21 Zelllysate als Standard zur quantitativen Auswertung verwendet. So wurde eine Korrelation zwischen dem Anteil der M21 Zellen und der Expression des αv Protein mittels Western Blot festgestellt (Abb.9).

In weiteren Versuchen sollte in einem *in vivo* Tumormodell mit unterschiedlichem Anteil von M21 Zellen überprüft werden, ob die *in vitro* gefundene Korrelation auch in einem komplexeren biologischen System zu finden ist.

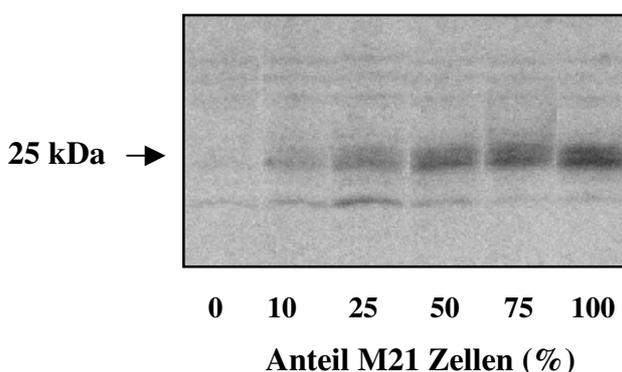


Abb.8 Western Blot von M21 und M21-L Zellmischungen mit verschiedenem Anteil der M21 Melanomzellen. Die Bande mit einer molekularen Masse von 25 kDa entspricht der Größe des αv Integrins unter reduzierenden Bedingungen



Abb.9 Darstellung der Korrelation zwischen dem Anteil der M21 Zellen und der Expression des αv Integrins in den M21 und M21-L Zellenmischungen mittels Western Blot

3.2 Mischtumoren Modell

3.2.1 Maustumormodell

Als Tumormodell wurde ein auf Nacktmäuse xenotransplantiertes menschliches M21 Melanom verwendet. Durch Injektion einer Mischung von M21 und M21-L Zellen wurden Tumoren mit unterschiedlicher Dichte von $\alpha v\beta 3$ positiven Zellen erzeugt. Die Menge der jeweils injizierten M21 und M21-L Zellen ist in Tabelle 3 (siehe 2.2.2.2) aufgeführt. Nach einer Wachstumszeit von 4 Wochen entwickelten sich Tumoren mit 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100% $\alpha v\beta 3$ positiven Zellen insgesamt 32 Tumoren (3 Tumoren mit dem 0% Anteil der M21 Zellen (M21-L Tumoren); 4 Tumoren mit dem 10% Anteil der M21 Zellen; je 5 Tumoren mit dem 25%, 50%, 75% Anteil der M21 Zellen; 10 Tumoren mit dem 100% Anteil der M21 Zellen).

3.2.2 Darstellung der Verteilung von [^{18}F]Galacto-RGD in Mischtumoren mittels Kleintier-PET (MADPET)

Die Aufnahme des [^{18}F]Galacto-RGD in menschlichen M21 und M21-L xenotransplantierten Melanomen auf Nacktmäuse ist von Haubner et al. untersucht worden (Haubner 2001).

Mit dem hochauflösenden PET-Scanner MADPET (Munich Avalanche Diode PET) (Ziegler S.I. 2001) wurde 90 min nach i.v. Injektion von 0,74 MBq (200 μCi) die Aufnahme des [^{18}F]Galacto-RGD in den Tumoren ermittelt (Abb.10). Es wurde pro Maus eine transaxiale Schnittaufnahme durch die Mitte der Tumorregion durchgeführt. Um die relative Höhe der Anreicherung des Tracers abschätzen zu können, ist eine Farbskala beigefügt.

Während der reine M21 Tumor als deutliche Anreicherung zur Darstellung kommt, läßt sich der M21-L Tumor kaum vom Untergrund abgrenzen. In der PET Aufnahme des Tumors mit einem erwarteten M21 Zellanteil von 25% sieht man die leicht erhöhte Aufnahme von [^{18}F]Galacto-RGD im Vergleich zum M21-L Tumor. Das Fehlen des Tracers im Zentrum des Tumors mit einem erwarteten M21 Zellen Anteil von 75% (Abb.10), erklärt man mit Nekrose des Tumorgewebes. Im nekrotischen Bereich wird der Tracer nicht gebunden. Die Nekrose des Tumors bestätigte sich bei der Präparation. Bei der Auswertung der PET-Bilder wurde das Tumor / Untergrundverhältnis ausgerechnet.

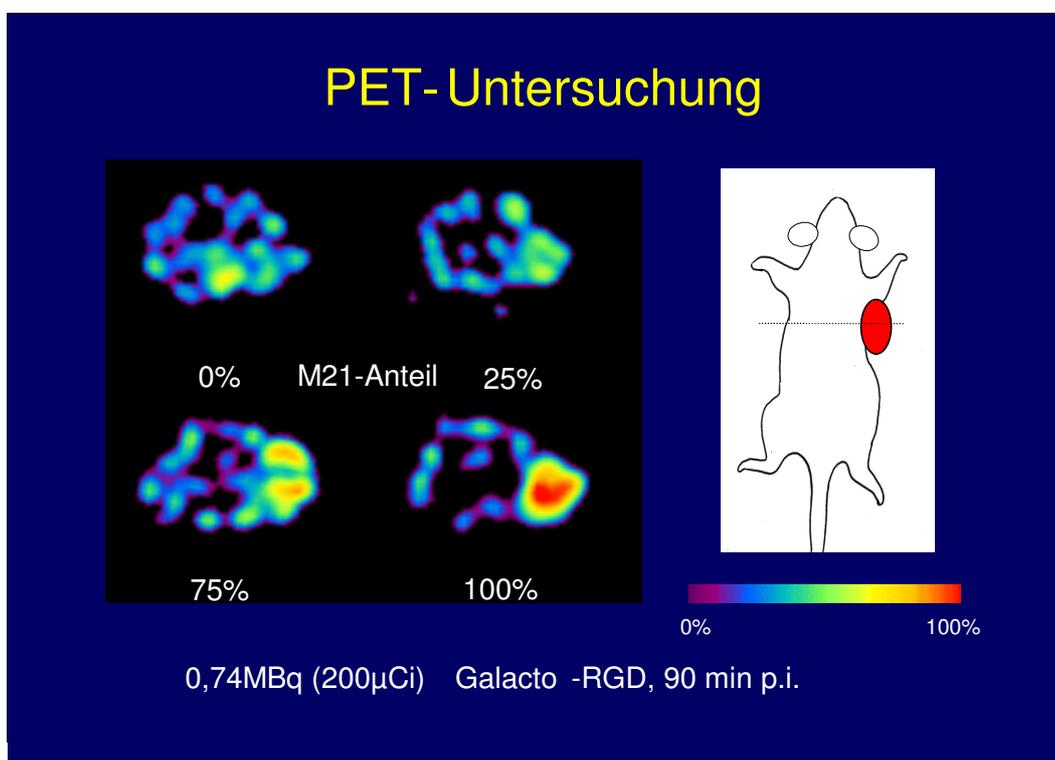


Abb.10 [^{18}F]Galacto-RGD -PET von Tumoren mit einem erwarteten Anteil M21 Zellen von 0%, 25%, 75%, 100% (transaxiale Schnitte, Messzeit 10s)

3.2.3 Traceraufnahme in Melanommischtumoren

Im Anschluß an die PET Aufnahme (circa 120 min p.i.) wurden die Mäuse getötet und die Aktivität in Mischtumoren, Blut und Muskel im Gamma-counter (Typ 1480 Wizard TM 3) bestimmt. Die Höhe der Anreicherung des Tracers in den Mischtumoren mit dem erwarteten Anteil von M21 Zellen von 0% bis 100% zeigt, dass die Tumoren während des Wachstums die erwarteten Anteile von M21 Melanom Zellen beibehalten haben (Abb.11).

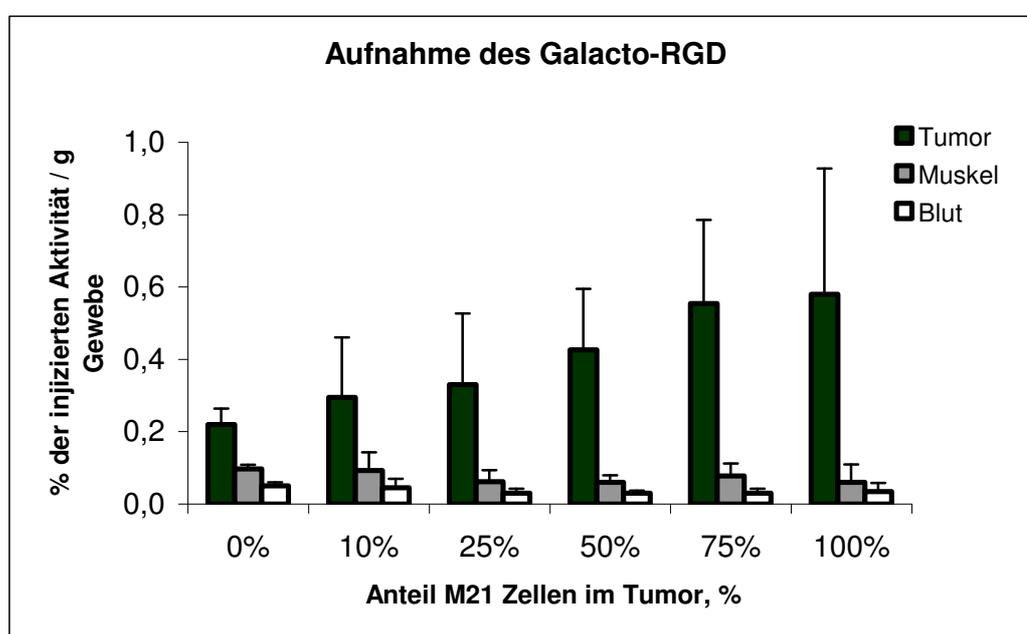


Abb.11 Darstellung der [^{18}F]Galacto-RGD Konzentration in Mischtumoren mit dem Anteil M21 Zellen von 0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100% so wie in Muskel und Blut MW \pm SD, (120 min p.i.)

Nach der Präparation wurden die Mischtumoren halbiert. Ein Teil wurde für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendet. Das andere Stück des Tumors wurde für die Western Blot Analyse eingesetzt.

3.2.4 H&E Färbung von M21 und M21-L Tumoren

Um die morphologische Struktur der menschlichen M21 und M21-L Melanomen darzustellen, wurden die Kryoschnitte zuerst mit Hämalaun und Eosin gefärbt. In der Abbildung 12 sieht man die Zellkerne der Melanomen, die sich lila-blau darstellen. Das Zytoplasma und das Tumorstroma sind rosa angefärbt.

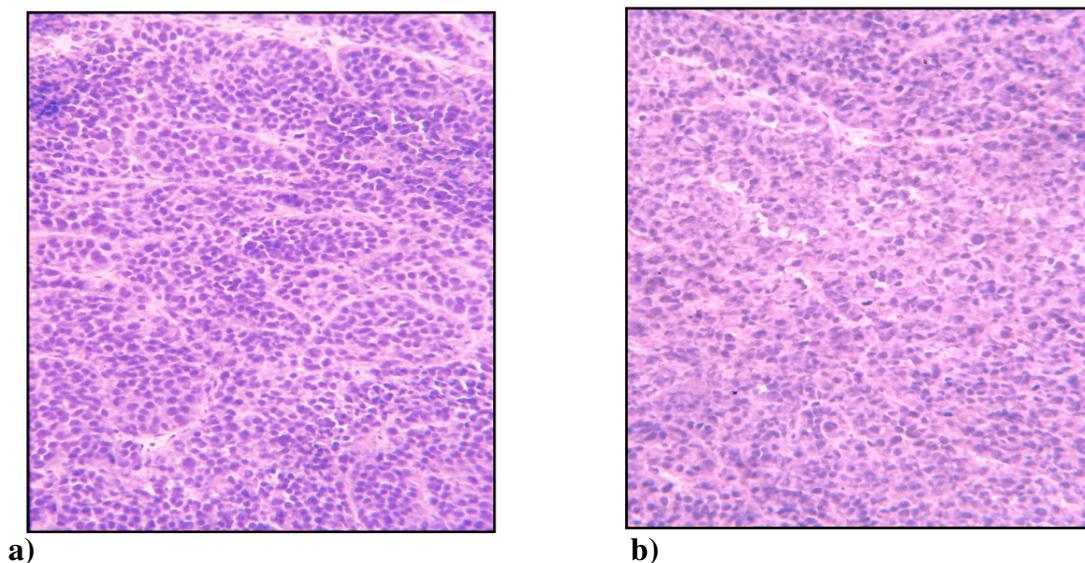


Abb.12 H&E gefärbte Kryoschnitte a) M21 Melanom, b) M21-L Melanom (320-fach. Vergrößerung)

3.2.5 Immunhistochemische Darstellung der Expression des $\alpha\beta 3$ Integrins in den Mischtumoren

In den immunhistochemischen Untersuchungen der Kryoschnitte wurden die $\alpha\beta 3$ positiven M21 Zellen mit dem monoklonalen biotinylierten Maus anti-human Integrin $\alpha\beta 3$ Antikörper rot-braun gefärbt. In der Abbildung 13f sieht man einen eindeutig positiv gefärbten Kryoschnitt des M21 Tumors. Der $\alpha\beta 3$ Integrin negative M21-L Tumor ist immunhistochemisch negativ gefärbt (Kerne der Zellen sind blau mit Hämalaun gefärbt) (Abb.13a). Die Tumoren mit einem erwarteten Anteil von 10 %, 25%, 50% und 75% an M21

Zellen wurden um so intensiver rot-braun gefärbt je größer der entsprechende Anteil an M21 Zellen war.

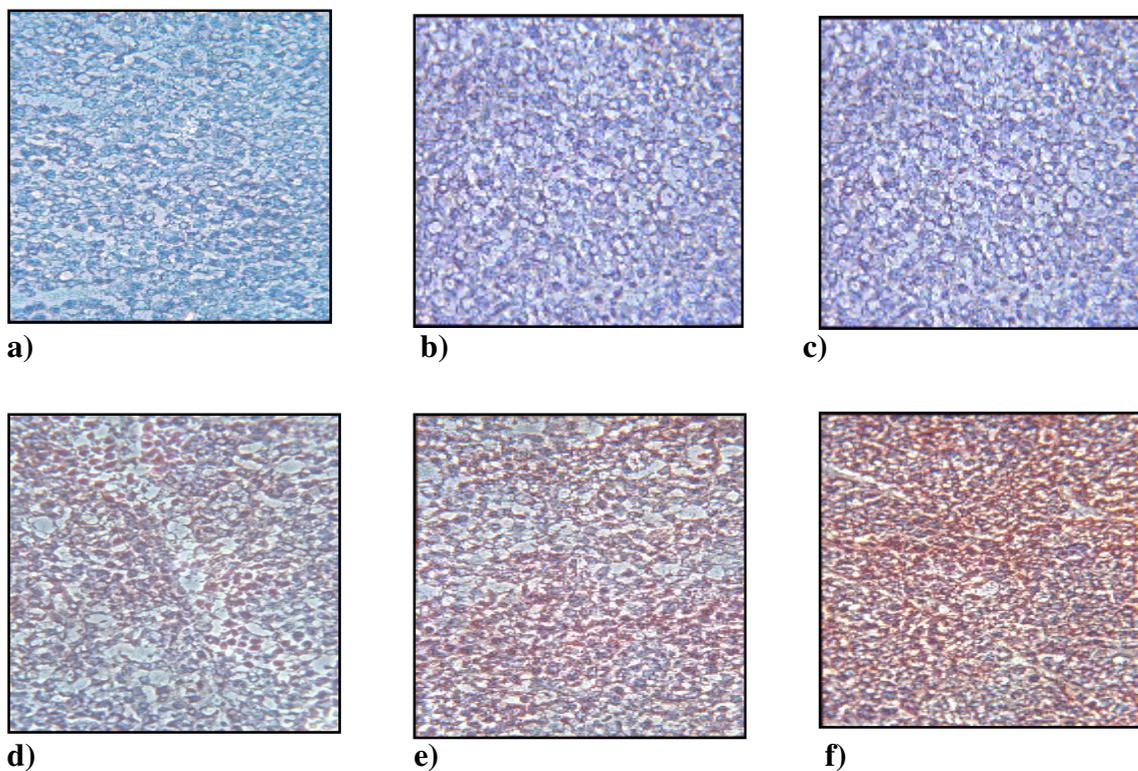


Abb.13 Immunhistochemische Darstellung der Expression von $\alpha\beta 3$ Integrin an Mischtumoren mit einem Anteil von menschlichen M21 Melanomzellen von a) 0% (M21-L Tumor), b) 10 % , c) 25%, d) 50%, e) 75%, f) 100% (M21 Tumor) mittels der monoklonalen biotinylierten Maus anti-human Antikörper (320-fache Vergr.)

3.2.6 Immunhistochemische Darstellung der Expression des $\beta 3$ Integrins in den Mischtumoren

Da der anti-CD61 Hamster anti-Maus Antikörper nur das $\beta 3$ Integrin der Maus erkennen, wurden die menschliche M21 und M21-L Tumoren immunhistochemisch untersucht um Maus Gewebe in den menschlichen Tumoren zu erkennen. In der Abbildung 14 sieht man blau gefärbt die menschlichen M21 Tumorzellen und das intensiv rot gefärbte $\beta 3$ Integrin positive Blutgefäß, das von der Maus gebildet wurde.

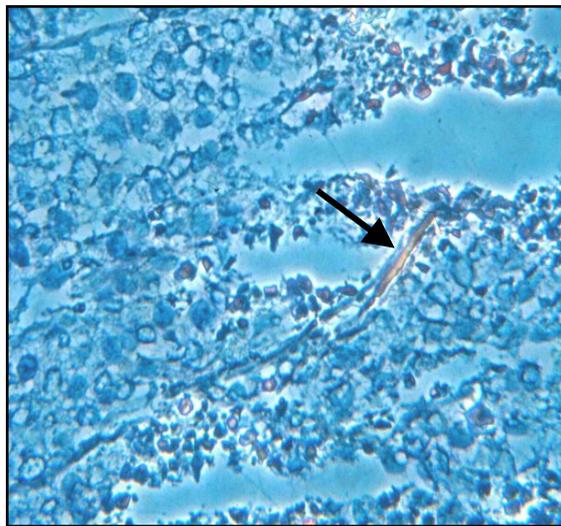


Abb.14 Immunhistochemische Darstellung von menschlichen M21 Melanomen mit Ak CD 61. Das Blutgefäß der Maus (Pfeil) ist rot gefärbt und somit $\beta 3$ Integrin positiv. (320-fache Vergr.)

3.2.7 Western Blot Analyse der αv Expression in den Mischtumoren

Die zweite Hälfte der Tumoren wurden für die Western Blot Analyse eingesetzt. Die Versuche wurden wie im Kapitel 2.3.6 geschrieben durchgeführt. Im Western Blot von Mischtumoren (Abb.15) sieht man bei der molekularen Masse von 25 kDa in allen Spuren mehr oder weniger intensiv die Banden, die der Größe des αv Integrins entsprechen. Für die quantitative Auswertung wurde als Standard die Bande von einem reinen M21 Tumor verwendet. Die Intensität dieser Bande wurde als 100% betrachtet und die anderen Banden entsprechend ausgewertet. Auf diese Weise konnte eine Korrelation zwischen dem Anteil der

erwarteten M21 Zellen in den Tumoren und der Expression des αv Proteins im Western Blot festgestellt werden. Auch im reinen M21-L Tumor läßt sich noch etwa 20 % der αv Expression von M21 Tumoren nachweisen. Dies ist offenbar durch eine αv Expression im Bindegewebe der Maus zu erklären.

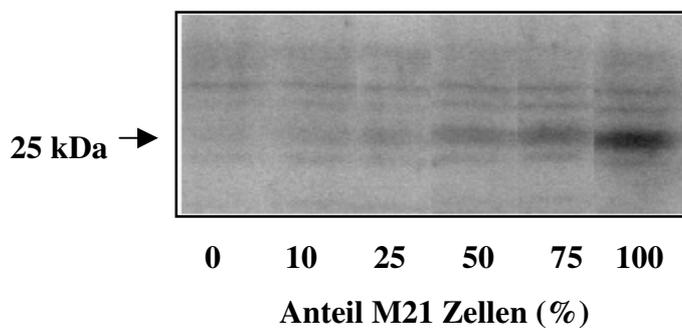


Abb.15 Western Blot Analyse von M21 und M21-L Melanommischturen mit poliklonalem αv Antikörper. Die Bande mit der molekularen Masse von 25 kD entspricht der Größe des αv Integrins unter reduzierenden Bedingungen

3.2.8 Darstellung des Tumor / Muskel Verhältnisses in Abhängigkeit von der αv Expression

Um die Korrelation zwischen der αv Expression mittels Western Blots und der Aufnahme von Galacto-RGD im Tumorgewebe festzustellen, wurden die Ergebnisse des Western Blots und der Biodistribution in der Abbildung 16 zusammengefaßt. Auf der x-Achse sind die Daten der quantitativen Auswertungen des Western Blot (relative αv Expression) dargestellt. Auf der y-Achse sind die Ergebnisse der Biodistribution als Tumor / Muskel Verhältnis aufgetragen. Es ließ sich eine gute Korrelation zwischen den beiden ermittelten Werten beobachten.

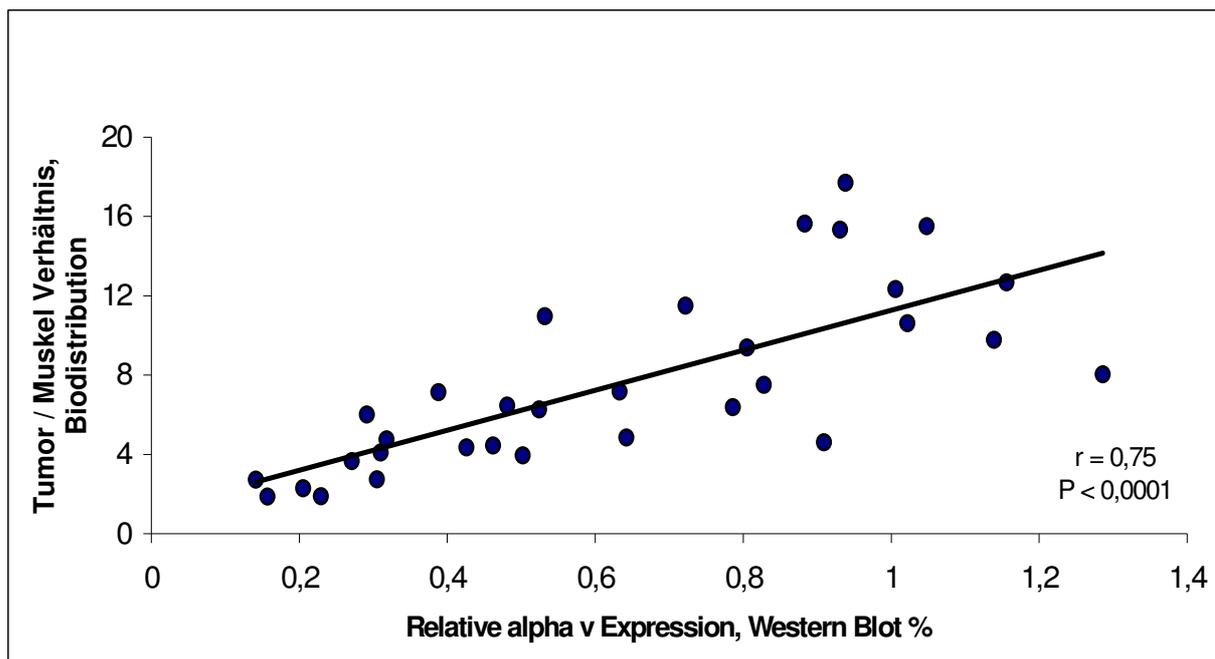


Abb.16 Darstellung der Korrelation zwischen den Biodistributionsdaten (Tumor / Muskel Verhältnis) und der αv Expression mittels Western Blot in Mischtumorgewebe

3.2.9 Darstellung der Korrelation zwischen Western Blot und PET

Zum Vergleich der Ergebnisse der nicht invasiven PET Methode und dem Western Blot, wurden in der Abbildung 17 die Daten der PET Untersuchungen und jene des Western Blots der Tumoren zusammen dargestellt. Die Streuung ist in diesem Diagramm erwartungsgemäß höher, was auf den Einfluß der Zählstatistik und auf Partialvolumeneffekte zurückzuführen ist. Es zeigt sich aber auch für das Tumor / Untergrundverhältnis eine eindeutige Korrelation mit dem Grad der αv Expression.

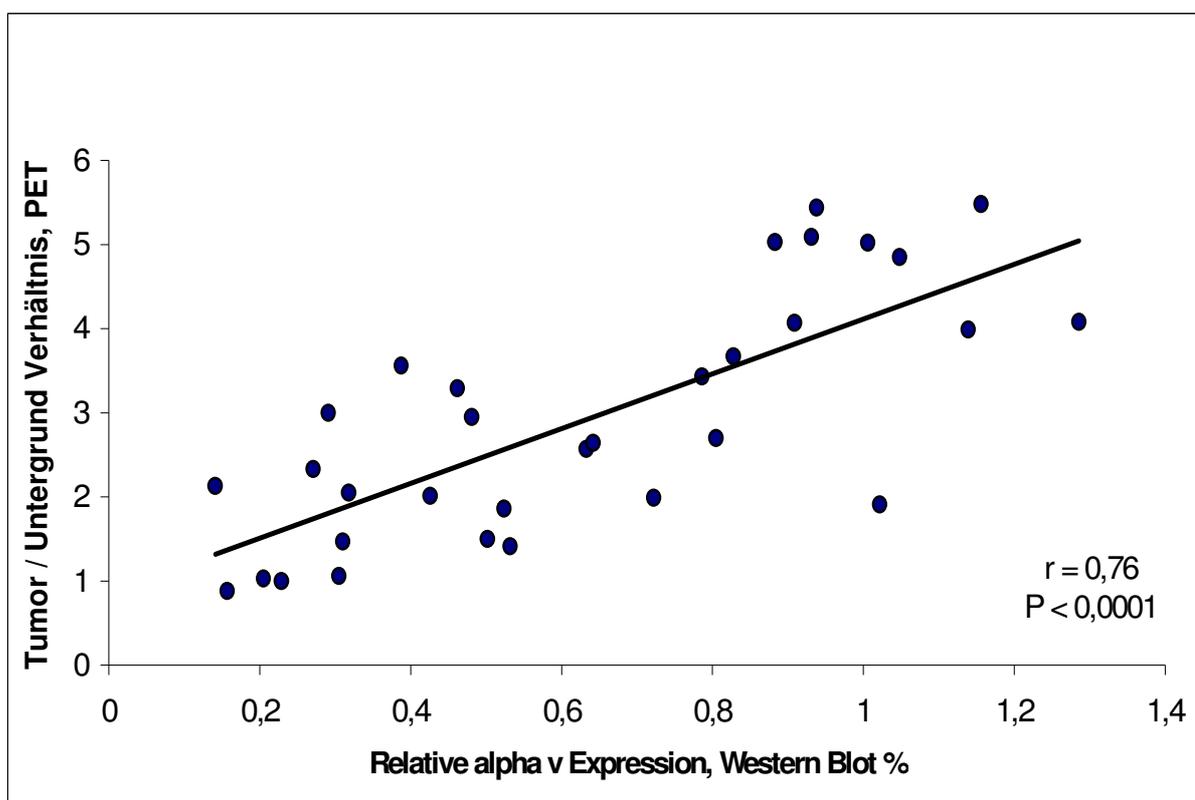


Abb.17 Darstellung der Korrelation zwischen der αv Expression mittels Western Blot und der Aufnahme von Galacto-RGD mittels PET in den Tumorgeweben

3.2.10 Darstellung der Korrelation zwischen PET und Biodistributionsdaten

In der Abbildung 18 sind die Ergebnisse vom PET und der Biodistribution (Tumor / Muskel Verhältnis) dargestellt. Dabei wurde eine gute Korrelation zwischen beiden Methoden festgestellt. Die auftretende Streuung kann damit erklärt werden, dass bei den MADPET Untersuchungen nur eine Schicht pro Tumor untersucht wurde, bei den Biodistributionsuntersuchungen aber das gesamte von den Tumoren aufgenommene [^{18}F]Galacto-RGD bestimmt wurde.

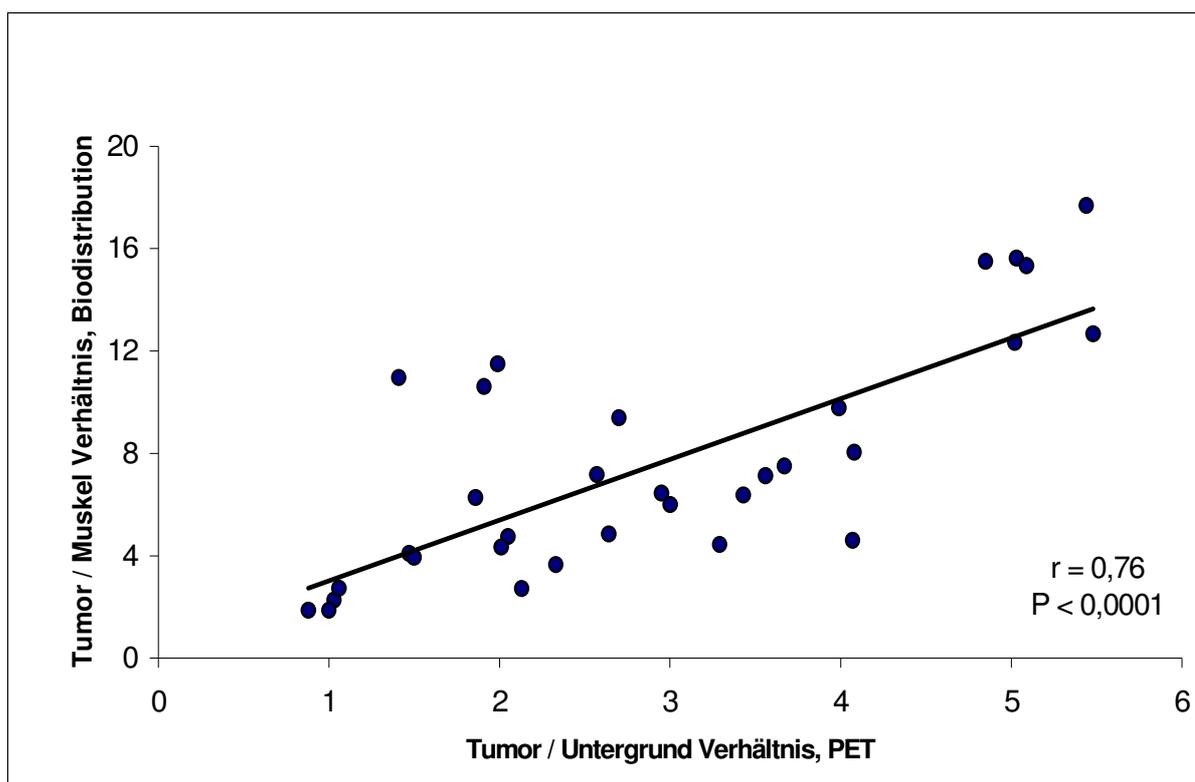


Abb.18 Darstellung der Korrelation zwischen der Aufnahme des Galacto-RGD in den Tumorgeweben ermittelt durch PET bzw. durch Biodistribution

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Korrelation zwischen dem Grad der Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins auf menschlichen Melanomzellen und der Aufnahme von radioaktiv markierten zyklischen RGD-Peptiden untersucht. Die wesentlichen Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Es wurde eine rezeptorspezifische Internalisation der glykosilierten RGD Peptide durch M21 Melanomzellen festgestellt.
2. In vitro und in vivo ergab sich eine gute Korrelation zwischen der Aufnahme von Galacto-RGD und der $\alpha_v\beta_3$ Expression.

Wie bereits in der Einleitung angesprochen, spielt das $\alpha_v\beta_3$ Integrin eine wichtige Rolle im Rahmen der Tumorangiogenese und Metastasierung. Aus diesem Grund werden bereits seit mehreren Jahren Liganden zur nicht-invasiven Darstellung dieses Rezeptors auf der Grundlage der RGD-Peptidsequenz entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeiten wurden lineare (Sutcliffe-Goulden 2002, Hirano 1993) und zyklische (Pierschbacher 1987, Pfaff 1994) Peptide synthetisiert. Um die Affinität, Spezifität und Biokinetik zu verbessern, wurden die Peptide mit hydrophilen Chelatoren wie DTPA (van Hagen 2000) und DOTA (Janssen 2002a) sowie Zuckerguppen (Haubner 2001) verbunden. Es wurden außerdem dimere (Janssen 2002b) und multimere cRGD-Peptide (Thumshirn 2003) eingesetzt.

Haubner et al. (2001a,b) haben gezeigt, dass die mit den Zuckerguppen gekoppelten RGD Peptide (Galacto- und Gluco-RGD) über mindestens 2 Stunden in $\alpha_v\beta_3$ Integrin positiven menschlichen M21 Melanomen und murinen Osteosarkomen retiniert werden. Für das DTPA-RGD Peptid (van Hagen 2000), DOTA-RGD sowie HYNIC-RGD (Janssen 2002a) wurde sogar über 24 Stunden eine signifikante Retention in $\alpha_v\beta_3$ positiven Tumoren beobachtet. Das Tumor/Blutverhältnis beträgt dabei zwischen 15 und 65. Diese Ergebnisse sind insofern unerwartet, da die RGD-Peptide nicht kovalent an den Rezeptor gebunden werden. Deshalb wäre viel mehr zu erwarten, dass parallel mit der fallenden Plasma Konzentration des Peptids auch die Konzentration in den Tumoren abnimmt. Vereinfacht läßt sich die Interaktion von $\alpha_v\beta_3$ mit RGD-Peptiden folgendermaßen darstellen:



Die Bindung des Komplexes wird dabei durch die Assoziationskonstante (K_{on}) beschrieben. Wie lange ein Ligand und ein Rezeptor in Verbindung bleiben, hängt von der Affinität zwischen dem Rezeptor und dem Ligand ab. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs beschreibt die Dissoziationskonstante K_{off} . Im Gleichgewichtszustand (stabile Konzentration des Ligandenkomplexes) gilt:

$$\frac{[\text{Ligand}] \cdot [\text{Rezeptor}]}{[\text{Ligand} \cdot \text{Rezeptor}]} = \frac{K_{off}}{K_{on}} = K_d$$

K_d ist die Konzentration des Liganden, die die Hälfte der Rezeptoren im Gleichgewicht besetzt. Je kleiner die K_d Werte sind, desto höher ist die Affinität der Bindung des Liganden an den Rezeptor (Motulsky 1995-96). Je größer die K_{on} und je niedriger K_{off} Werte sind, mit umso höherer Affinität bindet der Ligand an den Rezeptor. Um eine signifikante Traceranreicherung *in vivo* zu erreichen, sollten die K_d Werte 10^{-8} M/L oder niedriger sein, da die Konzentration typischer Rezeptoren in diesem Bereich liegt (Blankenberg 2002).

Vella et al. (2003) haben die Kinetik der Bindung von RGD-Peptiden an das $\alpha v \beta 3$ Integrin *in vitro* untersucht. Das von ihnen untersuchte RGD-Peptid zeigte eine Assoziationskonstante K_{on} von $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und eine Dissoziationskonstante von k_{off} von $1,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Andere in der szintigraphischen Diagnostik oder für die Autoradiographie eingesetzte Radiopharmazeutika zeigen typischerweise K_{off} Werte zwischen 0,001 und $0,1 \text{ min}^{-1}$. Wenn die Dissoziationskonstante größer ist, trennt sich Radioligand von dem Rezeptor schon während des Waschens ab (Motulsky 1995-6). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch für die hier untersuchten Liganden die Dissoziationsgeschwindigkeit vergleichbar mit der sonst in der Rezeptorbildgebung eingesetzten Liganden ist. Dennoch erklären diese Daten nicht die Retention von Gluco- und Galacto-RGD in $\alpha v \beta 3$ positiven Tumoren über mehrere Stunden.

Die hier dargestellten Untersuchungen zeigen, dass sowohl Gluco- als auch Galacto-RGD rezeptorspezifisch internalisiert werden. Dieser Prozess ist offenbar aktiv und energieabhängig, da er bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ um 44% reduziert wird. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Schraa et al. (2002), die eine Internalisierung und Degradierung des cRGD-Pep-Hu-Mab (cRGD Konjugat mit einem menschlichen monoklonalen Antikörper) untersucht haben. Diese Arbeitsgruppe fand eine aktive, energieabhängige Internalisierung dieses Konstruktes. Auch van Hagen et al. (2000)

beobachteten eine rezeptorspezifische Internalisation des von ihnen untersuchten DTPA-[c(Arg-Gly-D-Tyr-Lys)] Peptids.

Im Gegensatz scheinen dazu die Ergebnisse der Untersuchungen von Castel et al. (2001) zu stehen. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die Endocytose von cRGD-Peptiden und des anti- α_v Antikörpers 17E6 durch M21 und M21-L Melanom Zellen. In dieser Arbeit wurde der anti- α_v Antikörper rezeptorspezifisch, die cRGD Peptide dagegen Rezeptor *unabhängig* internalisiert. Diese Arbeitsgruppe postulierte deshalb einen sogenannten „kiss and run“ Mechanismus für die Inhibierung der Ligandenbindung des $\alpha_v\beta_3$ Integrins durch cRGD Peptide. Dieser Mechanismus besteht aus einer Konkurrenz zwischen den cRGD-Peptiden und den extrazellulären Liganden für die Bindung mit dem Integrin. Das Peptid verbleibt aber nur kurz gebunden und wird nach der Bindung nicht internalisiert. Die Aufnahme des Peptides erfolgt vielmehr über eine unspezifische Endocytose.

Die abweichenden Ergebnisse von Castel et al. (2001) lassen sich jedoch einfach darauf zurückzuführen, dass in dieser Arbeit eine mehr als 1 Million höhere Konzentrationen von cRGD Peptiden eingesetzt wurden (1 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber 98 pg/ml von Gluco-RGD und 173-340 pg/ml von Galacto-RGD dieser Arbeit). Bei dieser hohen Konzentration war auch in der hier vorliegenden Arbeit keine rezeptorspezifische Aufnahme mehr nachweisbar (Abb. 5). Der Grund dafür ist, dass in dieser Konzentration das Peptid den Rezeptor bereits komplett gesättigt hat. Die rezeptorspezifische Aufnahme ist dann bei dieser hohen Konzentration gering gegenüber der unspezifischen Aufnahme. In Tracerkonzentration ist dagegen die Aufnahme in $\alpha_v\beta_3$ positiven Tumoren höher als in $\alpha_v\beta_3$ negativen Tumoren.

In dieser Arbeit wurden von allen drei untersuchten cRGD Peptiden nach 90 min Inkubationzeit eine circa 5-fach größere Menge an der Zelloberfläche als intrazellulär gefunden (Abb.2,3,4). Diese Ergebnisse scheinen denen von van Hagen (2000) et al. zu widersprechen, die in ihrem Modell nach 120 min Inkubationzeit eine 3-fach höhere Aktivitätsmenge intrazellulär als an der Zelloberfläche gebunden fanden. Diese Arbeitsgruppe verwendete aber für das Waschen der Zellen einen PBS Puffer, der arm an bivalenten Kationen ist. Bivalente Kationen sind jedoch eine Voraussetzung für die Bindung von RGD-Peptiden an das $\alpha_v\beta_3$ Integrin (Ploew 2000). In vorliegender Arbeit wurden die Zellen mit einem Waschpuffer gespült, der 1mM Ca^{2+} , 1mM Mg^{2+} und 0,01mM Mn^{2+} Kationen enthält. Dies erklärt wahrscheinlich die höhere an der Zelloberfläche gebundene Aktivitätsmenge.

Auch Lanza et al. (1997) sowie Schraa et al. (2002) haben eine höhere Bindung von RGD-Peptiden an der Zelloberfläche in der Anwesenheit von bivalenten Kationen beobachtet.

Es ist bekannt, dass die Krebszellen in der Regel einen deutlich gesteigerten Glukoseumsatz aufweisen. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass die mit einer Zuckergruppe verbundenen RGD-Peptide rezeptorunspezifisch über Transporter für Glukose oder andere Zuckermoleküle internalisiert werden. Dagegen sprechen jedoch unsere Untersuchungen mit dem cRGDyV-Peptid. Dieses Peptid enthält keine Zuckergruppe und wird trotzdem von M21 Zellen im gleichem Ausmaß wie Gluko-RGD internalisiert. Außerdem zeigten M21-L Zellen, die fast kein $\alpha_v\beta_3$ Rezeptor exprimieren, eine vergleichbar niedrige Aufnahme von cRGDyV und Gluko-RGD. Diese Daten sprechen somit klar gegen eine relevante Aufnahme von Gluko- oder Galacto-RGD über einen Transporter für Zuckermoleküle.

Auffällig war jedoch, dass Gluco-RGD und RGDyV Peptide in einer 2,2 und 2,5 mal höheren Konzentration auf der Oberfläche von M21 Zellen gebunden wurden als Galacto-RGD. Dieser Unterschied ist möglicherweise auf die unterschiedliche Lipophilie von Gluco- und Galacto-RGD zurückzuführen. Der logP Wert von Gluko-RGD beträgt $-2,45$, während er für Galacto-RGD $-3,17$ beträgt.

Insgesamt war aber die an der Zelloberfläche gebundene Menge der RGD-Peptide stark variabel. Die große Standardabweichung spricht dafür, dass diese Bindung relativ instabil ist und von den Bedingungen und der Zeitdauer des Zentrifugierens, Spülens sowie Pipetierens beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu erwies sich die internalisierte Menge von Gluco- und Galacto-RGD als deutlich besser reproduzierbar. Da die internalisierte Menge des Peptids in vivo mit hoher Wahrscheinlichkeit für die in den PET-Untersuchungen gefundene Traceranreicherung in vivo verantwortlich ist, wurde dieser Parameter für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die internalisierte Menge des Galacto-RGD Peptides war in vitro eng mit der Zahl der $\alpha_v\beta_3$ positiven Tumorzellen korreliert ($r = 0,98$) (Abb.7). Dies zeigt, dass die Aufnahme von Galacto-RGD in vitro zum überwiegenden Teil Rezeptor spezifisch erfolgt. Somit erscheint es vielversprechend PET-Untersuchungen mit Galacto-RGD für die quantitative Bestimmung der Expression und funktionellen Aktivität des $\alpha_v\beta_3$ Integrins in vivo einzusetzen. Die kleine bei M21-L Tumoren nachweisbare α_v Bande (Abb. 8) spricht für eine geringe Expression des

$\alpha_v\beta_3$ Integrins in dieser Zelllinie, wie sie auch von Allman et al. beobachtet wurde (Allman et al. 2000).

Auch in den in vivo Untersuchungen war die Aufnahme von Galacto-RGD hoch signifikant mit der Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins in Melanommischstumoren korreliert (Abb. 16, 17,18). Bei diesen Untersuchungen zeigte sich erwartungsgemäß eine deutlich größere Streuung der Daten, die auf verschiedene Faktoren zurückzuführen ist, die experimentell nicht vollständig zu kontrollieren sind.

Die wahrscheinlich wichtigsten sind dabei die Tumorerogenität und die Expression von $\alpha_v\beta_3$ im Tumorstroma. Um das zu bestätigen wurde eine immunohistochemische Untersuchung des M21-L Melanomtumors mit einem monoklonalen anti-Maus Integrin β_3 Antikörper durchgeführt. Es zeigten sich hier β_3 positiv gefärbte Gefäße der Maus bei fehlender Färbung des menschlichen Tumorgewebes (Abb.14).

Weiterhin wiesen größere Tumoren häufig nekrotische Areale auf. Für die Auswertung der Biodistributionsdaten wurde die in den Tumoren gemessene Aktivität in üblicher Weise auf das Tumorgewicht bezogen. Dies führte dazu, dass für relativ große, aber nekrotische Tumoren nur eine relativ geringe Galacto-RGD-Aufnahme bestimmt wurde. Die Tumorerogenität beeinflusst auch die in den PET-Bildern gefundene Aufnahme von Galacto-RGD, da mit dem für diese Untersuchungen verwendeten PET-Scanner nur ein Schnitt des Tumors aufgenommen werden konnte. Diese einzige Schicht kann nicht immer repräsentativ für den gesamten Tumor sein. Außerdem ist der Einfluss von Partialvolumeneffekten auf die in der PET gefundene Aktivitätsanreicherung zu bedenken. In Strukturen, deren Durchmesser kleiner als die doppelte Halbertsbreite einer Linienquelle im PET-Scanner ist, kommt es zu einem partiellen Verlust des Signals. Das gemessene PET-Signal entspricht dann einer mittleren Aktivitätskonzentration innerhalb des Tumors und dem umgebenden Gewebe, die niedriger als die tatsächliche ist. Je kleiner der Durchmesser des Objekts wird, desto niedriger erscheint die Aktivitätskonzentration (Rota Kops 1999). Aufgrund der ungleichmäßigen und unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der Mischstumoren kam es dazu, dass zum Untersuchungszeitpunkt deutliche Größenunterschiede der Tumoren bestanden. Das Gewicht schwankte zwischen 0,1 und 1,2 Gramm. Somit ist davon auszugehen, dass Partialvolumeneffekte die in den PET-Bildern bestimmte Aktivitätsmenge deutlich beeinflusst haben.

Einen weiteren Faktor stellt eine variable Bindungsaffinität des $\alpha_v\beta_3$ Integrins dar (Hartving 2001). Dies konnte in unseren Untersuchungen nicht berücksichtigt werden. Es wird jedoch allgemein davon ausgegangen, dass in M21 Zellen das $\alpha_v\beta_3$ Integrin sich in einem konstitutionellen aktivierten Zustand befindet (Pilch 2002).

Man sieht außerdem in Tabelle 2, dass das RGD als Erkennungsequenz für 8 Integrine dient ($\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_{11b}\beta_3$). Es besteht deshalb die prinzipielle Möglichkeit, dass Galacto-RGD auch an diese Integrine bindet. Zur Zeit ist die Affinität von Galacto-RGD für 3 Integrine bekannt. Die IC_{50} für $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_{11b}\beta_3$ sind 5 nM, 1.000 nM und 6.000 nM (Haubner 2001). Die Bindung von Galacto-RGD an $\alpha_v\beta_5$ und $\alpha_{11b}\beta_3$ kann deshalb nicht die intratumorale Anreicherung erklären. Es ist ausserdem bekannt, dass M21 und M21-L Zellen keine $\alpha_v\beta_5$ (Allman 2000) und $\alpha_{11b}\beta_3$ (Mitjans 1995) Integrine exprimieren. Dagegen wird $\alpha_5\beta_1$ von den Melanomzellen exprimiert (Lanza 1997). Die Affinität von Galacto-RGD zu diesem Integrin ist derzeit nicht bekannt. Die Affinität des eng verwandten Peptids c(RGDfV) zu $\alpha_5\beta_1$ ist 10-mal niedriger als zu $\alpha_v\beta_3$.

Für die Korrelation zwischen Traceraufnahme und $\alpha_v\beta_3$ Expression wurde ein polyklonaler Antikörper gegen α_v eingesetzt, da keine für Western-Blots geeigneten Antikörper gegen den Komplex $\alpha_v\beta_3$ bekannt sind. Wie bereits in der Einleitung (Abb.1) angesprochen wurde, sind 5 α_v Integrine bekannt ($\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$). Diese Integrine werden physiologischerweise auf Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, glatter Muskulatur, Melanomzellen (Marschall 1996) und anderen exprimiert. Der in dieser Arbeit eingesetzte α_v Antikörper erkennt nicht nur das menschliche α_v Protein, sondern auch die murine Form. Deswegen wurde in der quantitativen Auswertungen des Western Blots von Mischtumoren nicht nur die Expression des α_v Integrins durch die M21 Melanomzellen, sondern auch durch das Tumorstroma bestimmt. Dies erklärt die relativ hohe α_v Expression in reinen M21-L Tumoren. Die Hauptquelle des α_v -Proteins war jedoch nach den Ergebnissen der Western-Blots des Tumorgewebes die Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins durch die M21 Zellen.

5 Zusammenfassung

Korrelation zwischen dem Grad der Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins auf menschlichen Melanomzellen und der Aufnahme von radioaktiv markierten zyklischen RGD-Peptiden

Das $\alpha_v\beta_3$ Integrin ist ein heterodimeres Zelladhäsionsmolekül, das eine wichtige Rolle in der Metastasierung von Tumoren und der Angiogenese spielt. Radioaktiv markierte zyklische Pentapeptide mit der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat (cRGD), ermöglichen es Tumoren, die dieses Integrin exprimieren, szintigraphisch darzustellen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Aufnahme der glykosilierten cRGD-Peptide [125 I]Gluc-RGD und [18 F]Galacto-RGD quantitativ mit dem Grad der $\alpha_v\beta_3$ Expression korreliert.

In vitro zeigte sich eine Rezeptor-spezifische Internalisierung beider Peptide in $\alpha_v\beta_3$ exprimierenden M21 Zellen. Dies konnte durch den Vergleich mit $\alpha_v\beta_3$ negativen M21-L Zellen sowie Konkurrenzexperimenten mit dem $\alpha_v\beta_3$ Liganden c(RGDfV) nachgewiesen werden. Die Menge des intrazellulär aufgenommenen [18 F]Galacto-RGD korrelierte eng mit dem Grad der α_v Expression in Western Blots ($r=0,98$). In vivo wurden als Modell für Tumoren mit unterschiedlicher $\alpha_v\beta_3$ Expression die Mischungen der Melanomzelllinien M21 ($\alpha_v\beta_3$ positiv) und M21-L (Sublinie ohne α_v Expression) eingesetzt. Die Aufnahme von Galacto-RGD in diesen Mischtumoren wurde 4 Wochen nach Tumornokulation mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Biodistributionsuntersuchungen bestimmt. Die Expression des $\alpha_v\beta_3$ Integrins wurde immunhistochemisch nachgewiesen und mittels Western Blots quantitativ erfasst. Die immunhistochemische Untersuchung bestätigte, dass die Mischtumoren deutliche Unterschiede der $\alpha_v\beta_3$ Expression aufwiesen und dass die $\alpha_v\beta_3$ positiven Zellen relativ homogen über den Tumor verteilt waren. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der α_v Expression und der intratumoralen Aktivitätskonzentration 2 h nach Tracerinjektion ($r=0,75$). Dieser Zusammenhang konnte in den PET Untersuchungen auch nicht-invasiv nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen somit die rezeptorspezifische Aufnahme der untersuchten cRGD-Peptide und sind vielversprechend für die weitere Evaluierung von PET-

Untersuchungen mit radioaktiv markierten cRGD-Peptiden zur quantitativen Bestimmung der $\alpha_v\beta_3$ Expression von Tumoren im Rahmen von klinischen Studien.

6 Literaturverzeichnis

- Allman R., Cowburn P., Mason M.: In vitro and in vivo effects of a cyclic peptide with affinity for the $\alpha_v\beta_3$ integrin in human melanoma cells. *Eur. J. Cancer* 2000; 36: 410 – 422
- Arnaout M.A., Goodman S.L. and Xiong J-P.: Coming to grips with integrin binding to ligands opinion. *Curr. Op. Cell Biol.* 2002; 14: 641-651
- Avantaggiati M.L.: Molecular horizons of cancer therapeutics. *Bioch. Bioph. Acta* 2000; 1470: R49-R59
- Bader B.L., Rayburn H., Crowley D., and Hynes R.O.: Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all α_v integrins. *Cell* 1998; 95: 507-519
- Balckenberg F.G., and Strauss H.W.: Nuclear medicine application in molecular Imaging. *J. Magn. Reson. Imag.* 2002; 16: 352-361
- Barillari G., Sgadari C., Palladino C., Gendelman R., Caputo A., Morris C.B., Nair B.C., Markham P., Nel A., Stürzl M., and Ensoli B.: Inflammatory cytokines synergize with the HIV-1 tat protein to promote angiogenesis and Kaposi's sarcoma via induction of basic fibroblast growth factor and the $\alpha_v\beta_3$ integrin. *J. Immunol.* 1999; 163: 1929-35
- Bello L., Lucini V., Carrabba G., Giussani C., Machluf M., Pluderi M., Nikas D., Zhang J., Tomei G., Villani R.M., Carroll R.S., Bikfalvi A., and Black P.M.: Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2. *Cancer Research* 2001; 61: 8730-8736
- Bello L., Zhang J., Nikas D.C., Strasser J.F., Villani R.M., Cheres D.A., Carroll R.S., Black P.McL.: $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrin expression in meningiomas. *Neurosurgery* 2000; 47: 1185-1195
- Blystone S.D.: Kinetic regulation of β_3 integrin tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2002; 49: 46886-46890
- Borges E., Jan Y., and Ruoslahti E.: Platelet-derived growth factor receptor β and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the β_3 integrin through its extracellular domain. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 39867-39873
- Bouvard D., Brakebusch C., Gustafsson E., Aszodi A., Bengtsson T., Berna A., Fässler R.: Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Cir.Res.* 2001; 89: 211-223
- Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254

- Brakebusch C., Bouvard D., Stanchi F., Sakai T., and Fässler R.: Integrins in invasive growth. *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 999-1006
- Brakenhielm E., Cao R. and Cao Y.: Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *FASEB* 2001; 15: 1798-1800
- Brooke B.S., Karnik S.K., and Li d.Y.: Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal. *Trends Cell Biol.* 2003; 13: 51-56
- Brooks P.C., Montgomery A.M.P., Rosenfeld M., Reisfeld R.A., Hu T., Klier G., and Chersesh D.A.: Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; 79: 1157-1164
- Buckley C.D., Pilling D., Henrinquez N.V., Parsonage G., Threlfall K., Scheel-Toellner D., Simmons D.L., Akbar A.N., Lord J.M., Salmon M.: RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature* 1999; 397: 479-480
- Buerkle M.A., Pahernik S.A., Sutter A., Jonczyk A., Messmer K., and Dellian M.: inhibition of the alpha-v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *British J. Cancer* 2002; 86: 788-795
- Carmeliet P., Collen D.: Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am. Physiol. Soc.* 1997; H2091-H2104
- Carmeliet P., Jain R.K.: Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257
- Carmeliet P.: Clotting factors build blood vessels. *Science* 2001; 293: 1602-1604
- Carmeliet P.: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Medicine.* 2000; 6: 289-395
- Carron C.P., Meyer D.M., Engleman V.W., Rico J.G., Ruminiski P.G., Ornberg R.L., Westlin W.F., and Nickols G.A.: Peptidomimetic antagonists of $\alpha_v\beta_3$ inhibit bone resorption by inhibiting osteoclast bone resorptive activity, not osteoclast adhesion to bone. *J. Endocr.* 2000; 165: 587-598
- Castel S., Pagan R., Garcia R., Casaroli-Marano R.P., Reina M., Mitjans F., Piulats J., Vilaro S.: Alpha v integrin antagonist induce the disassembly of focal contacts in melanoma cells. *Eur. J. Cell Biol.* 2000; 79: 502-512
- Castel S., Pagan R., Mitjans F., Piulats J., Goodman S., Jonczyk A., Huber F., Vilaro S. and Reina M.: RGD peptides and monoclonal antibodies, antibodies, antagonists of α_v -integrin, enter the cells by independent endocytic pathways. *Laboratory Investigation* 2001; 81: 1615-1626
- Chan W-L., Holstein-Rathlou N.-H., and Yip K-P.: integrin mobilizes intracellular Ca^{2+} in renal vascular smooth muscle cells. *Am J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 280: 593-603

- Chatziioannou A.F.: Molecular imaging of small animals with dedicated PET tomographs. *Eur. J. Nucl. Med.* 2002; 29: 98-114
- Cheresh D.A., Spiro R.C.: Biosynthetic and functional properties of an Arg-Gly-Asp-directed receptor involved in human melanoma cell attachment to vitronectin, fibrinogen, and von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 17703-17711
- Clyman R.I., Mauray F. and Kramer H.: β_1 and β_3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Exper. Cell Research* 1992; 200: 272-284
- Conway E.M., Collen D., Carmeliet P.: Molecular mechanism of blood vessel growth. *Cardiovas. Research* 2001; 49: 507-521
- Croix B.S., Rago C., Velculescu V., Traverso G., Romans K.E., Montgomery E., Lal A., Riggins G.J., Lengauer Ch., Vogelstein B., Kinzler K.W.: Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000; 289: 1197-1202
- Curley G.P., Blum H., Humphries M.J.: Integrin antagonists. *Cell. Mol. Life Sci.* 1999; 56: 427-441
- Dahm L.M. and Bowers Ch.W.: Vitronectin regulates smooth muscle contractility via α_v and β_1 integrin (s). *J. Cell Science* 1998; 111: 1175-1183
- Danen E.H.J., and Yamada K.M.: Fibronectin, integrins, and growth control. *J. Cell. Phys.* 2001; 189: 1-13
- Datta A., Huber F., and Boettiger D.: Phosphorylation of β_3 integrin controls ligand binding strength. *J. Biol. Chem.* 2002; 6: 3943-3949
- DeLisser H.M., Christofidou-Solomidou M., Strieter R.M., Burdick M.D., Robinson C.S., Wexler R.S., Kerr J.S., Garlanda C., Merwin J.R., Madri J.A. and Albelda S.M.: Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am. J. Pathology* 1997; 151: 671-677
- DeSimone D.W., Stepp M.A., Patel R.S., and Hynes R.O.: The integrin family of cell surface receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 1987; 15: 789-791
- Dresner-Pollak R., and Rosenblatt M.: Blocade of osteoclast-mediated bone resorption through occupancy of the integrin receptor: a potential approach to the therapy of osteoporosis. *J. Cell. Biochemistry* 1994; 56: 323-330
- Du X., Gu M., Weisel J.W., Nagaswami Ch., Bennett J.S., Bowditch R., and Ginsberg M.H.: Long range propagation of conformational changes in integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J. Biol. Chem.* 1993; 268: 23087-23092
- Dubey P., Su H., Adonai N., Du S., Rosato A., Braun J., Gambhir S.S., and Witte O.N.: Quantitative imaging of the T cell antitumor response by positron-emission tomography. *PNAS* 2003; 100: 1232-1237

- Ebeling O., Duczmal A., Aigner S., Geiger C., Schöllhammer S., Kemshead J.T., Möller P., Schwartz-Albiez R., and Altevogt P.: L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to $\alpha_v\beta_3$ integrin. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 2508-2516
- Eliceiri B.P., and Cheresh D.A.: The role of α_v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J. Clin. Investigation* 1999; 103: 1227-1230
- Eliceiri B.P., Cheresh D.A.: Adhesion events in angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001; 13: 563-568
- Eliceiri B.P.: Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ. Res.* 2001; 89: 1104-1110
- Faccio R., Grano M., Colucci S., Villa A., Giannelli G., Quaranta V., and Zallone A.: Localization and possible role of two different alpha v beta 3 integrin conformations in resting and resorbing osteoclasts. *J. Cell Science* 2002; 115: 2919-2929
- Fahey F.H.: Positron emission tomography instrumentation. *Radiol. Clin. Nor. America* 2001; 39: 919-929
- Falcioni R., Cimino L., Gentleschi M.P., Dágnano I., Zupi G., Kennel S.J., and Sacchi A.: Expression of β_1 , β_3 , β_4 , and β_5 integrins by human lung carcinoma cells of different histotypes. *Exper. Cell Research* 1994; 210: 113-122
- Felding-Habermann B., Habermann R., Saldivar E. and Ruggeri Z.M.: Role of β_3 integrins in melanoma cell adhesion to activated platelets under flow. *J. Biol. Chemistry* 1996; 271: 5892-5900
- Felding-Habermann B., O'Toole T.E., Smith J.W., Fransvea E., Ruggeri Z.M., Ginsberg M.H., Hughes P.E., Pampori N., Shattil S.J., Saven A., and Mueller B.M: Integrin activation controls metastasis in human breast cancer. *PNAS.* 2001; 98: 1853-1858
- Fernandez C., Clark K., Burrows L., Schofield N.R., Humphries M.J.: Regulation of the extracellular ligand binding activity of integrins. *Bioscience* 1998; 3: 684-700
- Ferrara N. & Alitalo K.: Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature Medicine* 1999; 5: 1359-1364
- Folkman J.: Incipient Angiogenesis. *J. National Can. Inst.* 2000; 92: 94-95
- Folkman J.: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* 2002; 29: 15-18
- Frouin V., Comtat C., Reilhac A., and Gregoire M-C.: Correction of partial-volume effect for PET striatal imaging: fast implementation and study of robustness. *J. Nucl. Med.* 2002; 43: 1715-1726
- Gambhir S.S.: Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nature* 2002; 2: 683-693

- Giancotti F.G. and Ruoslahti E.: Integrin Signaling. *Science*. 1999; 285: 1028-1032
- Gupta N., Price P.M., Aboagye E.O.: PET for in vivo pharmacokinetic and pharmacodynamic measurements. *Eur. J. Cancer* 2002; 38: 2094-2107
- Hallahan D., Geng L., Qu Sh., Scarfone Ch., Giorgio T., Donnelly E., Gao X., and Clanton J.: Integrin-mediated targeting of drug delivery to irradiated tumor blood vessels. *Cancer Cell* 2003; 3: 63-74
- Hanayama R., Tanaka M., Miwa K., Shinohara A., Iwamatsu A., & Nagata Sh.: Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002; 417: 182-187
- Haubner R., Wester H.J., Brukhart F., Senekowitsch-Schmidtke R., Weber W.A., Goodman S.L., Kessler H., Schwaiger M.: Glycosylated RGD-containing peptides: Tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J. Nucl. Med.* 2001; 42: 326-336
- Haubner R., Wester H.J., Reuning U., Senekowitsch-Schmidtke R., Diefenbach B., Kessler H., Stöcklin G., Schwaiger M.: Radiolabeled $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonists: A new class of tracers for tumor targeting. *J. Nucl. Med.* 1999; 40: 1061-1071
- Haubner R., Wester H.J., Weber W.A., Mang Ch., Ziegler S.I., Goodman S.L., Senekowitsch-Schmidtke R., Kessler H., Schwaiger M.: Noninvasive imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression using ^{18}F -labeled RGD-containing glycopeptide and positron emission tomography. *Cancer Research* 2001; 61: 1781-1785
- Hirano Y., Okuno., Hayashi T., Goto K. and Nakajima A.: Cell-attachment activities of surface immobilized oligopeptides RGD, RGDS, RGDV, RGDT, and YIGSR toward five cell lines. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 1993; 4: 235-243
- Hofmann U.B., Westphal J.R., Van Kraats A.A., Rüter D.J. and Van Muijen G.N.P., Expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* 2000; 87: 12-19
- Honda Sh., Tomiyama Y., Pampori N., Kashiwagi H., Kiyoi T., Tadokoro S., Kurata Y., Shattil S.J., and Matsuzawa Y.: Ligand binding to integrin $\alpha_v\beta_3$ requires tyrosine 178 in the α_v subunit. *Hem. Trom. Vasc. Biology* 2001; 97: 175-182
- Horton M.A.: The $\alpha_v\beta_3$ integrin "Vitronectin Receptor". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997; 29: 721-725
- Humphries M.J. and Mould A.P.: An antropomorphic integrin. *Science* 2001; 294: 316-317
- Humphries M.J.: Integrin Structure. *Biochem. Soc. Trans.* 2000; 28: 311-339
- Hynes R.O.: A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat. Medicine.* 2002; 8: 918-921

- Illera M.J., Cullinan E., Gui Y., Yuan L., Beyler S.A., and Lessey A.: Blockade of the $\alpha_v\beta_3$ integrin adversely affects implantation in the mouse. *Biol. Reproduction* 2000; 62: 1285-1290
- Jain A., Karadag A., Fohr B., Fisher L.W., and Fedarko N.S.: Three SIBLINGs (small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins) enhance factor H's cofactor activity enabling MCP-like cellular evasion of complement-mediated attack. *J. Biol. Chem.* 2002; 16: 13700-13708
- Janssen A.P.C.A., Schiffelers R.M., ten Hagen T.L.M., Koning G.A., Schraa A.J., Kok R.J., Strom G., Molema G.: Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy. *Intern. J. Pharm.* 2003; 254: 55-58
- Janssen M.L., Oyen W.J., Dijkgraaf I., Massuger L.F., Frielink C., Edwards D.S., Rajopadhye M., Boonstra H., Corstens F.H., and Boerman O.C.: Tumor targeting with radiolabeled $\alpha_v\beta_3$ integrin binding peptides in a nude mouse model. *Canc. Research* 2002; 62: 6146-6151
- Janssen M., Oyen W.J., Massuger L.F., Frielink C., Dijkgraaf I., Edwards D.S., Rajopadhye M., Corstens F.H., Boerman O.C.: Comparison of a monomeric and dimeric radiolabeled RGD-Peptide for tumor targeting. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2002; 17: 641-644 (Abstract)
- Kageshita T., Hamby C.V., Hirai Sh., Kimura T., Ono T., Ferrone S.: $\alpha_v\beta_3$ expression on blood vessels and melanoma cells in primary lesions; differential association with tumor progression and clinical prognosis. *Cancer Immunol. Immunoth.* 2000; 49: 314-318
- Kairento A.-L., Brownell G.L., Schluederberg J., and Elmaleh D.R.: Regional blood-flow measurement in rabbit soft-tissue tumor with positron imaging using the $C^{15}O_2$ steady-state and labeled microspheres. *J. Nucl. Med.* 1983; 24: 1135-1142
- Kerbel R.S.: Tumorangiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21: 505-515
- Kerr J.S., Wexler R.S., Mousa Sh.A., Robinson C.S., Wexler E.J., Mohamed S., Voss M.E., Devenny J.J., Czerniak P.M., Gudzelak A., and Slee A.M.: Novel small molecule α_v integrin antagonists: comparative anti-cancer efficacy with known angiogenesis inhibitors. *Anticancer Research* 1999; 19: 959-968
- Knight L.C.: Radiolabeled peptide ligands for imaging thrombi and emboli. *Nuc. Med. Biol.* 2001; 28: 515-526
- Kok R.J., Schraa A.J., Bos E.J., Moorlag H.E., Asgeirsdottir S.A., Everts M., Meijer D.K.F., and Molema G.: Preparation and functional evaluation of RGD-modified proteins as $\alpha_v\beta_3$ integrin directed therapeutics. *Bioconj. Chem.* 2002; 13: 128-135
- Koo L.Y., Irvine D.J., Mayes A.M., Lauffenburger D.A., and Griffith L.G.: Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus. *J. Cell Science* 2002; 115: 1423-1433

- Kumlien E., Hartvig P., Valind S., Oye I., Tedroff J., and Langstöm B.: NMDA-receptor activity visualized with (S)-[N-methyl-¹¹C] ketamine and positronemission tomography in patients with medial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1999; 40: 30-37
- Kunicki T.J., Ely K.R., Kunicki T.C., Tomiyama Y., and Annis D.S.: The exchange of Arg-Gly-Asp (RGD) and Arg-Tyr-Asp (RYD) binding sequences in a recombinant murine Fab fragment specific for the integrin $\alpha_{11b}\beta_3$ does not alter integrin recognition. *J. Biol. Chem.* 1995; 28: 16660-16665
- Künsters B., Westphal J.R., Smits D., Wesseling P., Keilholz U. and de Waal R.M.W.: The pattern of metastasis of human melanoma to the central nervous system is not influenced by integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. *Int. J. Cancer* 2001; 92: 176-180
- Kurschat P. and Mauch C.: Mechanisms of metastasis. *Clin. Exper. Dermat.* 2000; 25: 482-489
- Lammertsma A.A.: Radioligand imaging and quantitative analysis. *Eur. Neuropsychopharmacology* 2002; 12: 513-516
- Lange U.E.W., Backfisch G., Delzer J., Geneste H., Graef C., Hornberger W., Kling A., Lauterbach A., Subkowski T., and Zechel Ch.: Synthesis of highly potent and selective hetaryl urea as integrin $\alpha_v\beta_3$ -receptor antagonists. *Bioorg. & Medic. Chem. Letters* 2002; 12: 1379-1382
- Lanza P., Felding-Habermann B., Ruggeri Z.M., Zanetti M., Billetta R.: Selective interaction of a conformationally-constrained Arg-Gly-Asp (RGD) motif with the integrin receptor $\alpha_v\beta_3$ expressed on human tumor cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 1997; 23: 230-241
- Legler D.F., Wiedler G., Ross F.P. and Imhof B.A.: Superactivation of integrin $\alpha_v\beta_3$ by low antagonist concentrations. *J. Cell Science* 2001; 114: 1545-1553
- Liu G., Eskin S.G. and Mikos A.G.: Integrin $\alpha_v\beta_3$ is involved in stimulated migration of vascular adventitial fibroblasts by basic fibroblast growth factor but not platelet-derived growth factor. *J. Cell. Biochemistry* 2001; 83: 129-135
- MacDonald T.J., Tga T., Shimada H., Tabrizi P., Zlokovic B.V., Cheresch D.A., Laug W.E.: Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an α_v integrin antagonist. *Neurosurgery* 2001; 48: 151-157
- Mans B.J., Louw A.I., and Neitz A.W.H.: Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the kunitz-BPTI fold. *J. Biol. Chem.* 2002; 24: 21371-21378
- Marme D.: Tumorangiogenese: Molekulare Fakten und therapeutische Möglichkeiten. *Chirurg* 1999; 70: 31-35
- Marshall J.F, and Hart I.R.: The role of α_v -integrins in tumor progression and metastasis. *Sem. Cancer Biol.* 1996; 7: 129-138

- Matsumura K., Bergstöm M., Onoe H., Takechi H., Westerberg G., Antoni G., Bjurling P., Jacobson G.B., Langstöm B., Watanabe Y.: In vitro positron emission tomography (PET): use of positron emission tracers in functional imaging in living brain slices. *Neuroscience Research* 1995; 22: 219-229
- Max R., Gerritsen R.R., Nooijen P.T., Goodman S.L., Sutter A., Keilholz U., Ruiter D.J., De Waal R.M.: Immunohistochemical analysis of integrin alpha v beta 3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas. *Int. J. Cancer* 1997; 72:706-7 (Abstract)
- Mechtersheimer G., Barth T., Hartschuh W., Lehnert T., Möller P.: In situ expression of β_1 , β_3 and β_4 integrin subunits in non-neoplastic endothelium and vascular tumours. *Virchows Archiv* 1994; 425: 375-384
- Mechtersheimer G., Barth T., Quentemeier A., and Möller P.: Differential expression of β_1 , β_3 , and β_4 integrin subunits in nonneoplastic neural cells of the peripheral and autonomic nervous system and in tumors derived from these cells. *Labor. Investigation* 1994; 70: 740-752
- Meerovitch K., Bergeron F., Leblond L., Grouix B., Poirier C., Bubenik M., Chan L., Gourdeau H., Bowlin T., Attardo G.: A novel RGD antagonist that targets both $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ induces apoptosis of angiogenic endothelial cells on type I collagen. *Vasc. Pharm.* 2003; 40: 77-89
- Mitjans F., Meyer T., Fittschen C., Goodman S., Jonczyk A., Marschall J.F., Reyes G., and Piulats J.: In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of α_v integrins. *Int. J. Cancer* 2000; 87: 716-723
- Mitjans F., Sander D., Adan J., Sutter A., Martinez J.M., Jäggle C-S., Moyano J.M., Kreysch H-G., Piulats J. and Goodman S.L.: An anti- α_v -integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. *J. Cell Science* 1995; 108, 2825-2838
- Mizejewski G.J.: Role of integrins in cancer: Survey of expression patterns. *Integrins expression in cancer* 1999; 124-138
- Motulsky H.: Analyzing radioligand binding data. 1995-96; GraphPad Software
- Natali P.G., Hamby C.V., Felding-Habermann B., Liang B., Nicotra M.R., Di Filippo F., Giannarelli D., Temponi M., Ferrone S.: Clinical significance of alpha (v) beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res.* 1997; 57: 1554-1560 (Abstract)
- Neufeld G., Cohen T., Gengrinovitch S., and Poltorak Z.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB* 1999; 13: 9-22
- Ogawa M., Hatano K., Oishi S., Kawasumi Y., Fujii N., Kawaguchi M., Doi R., Imamura M., Yamamoto M., Ajito K., Mukai T., Saji H., Ito K.: Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for in vivo $\alpha_v\beta_3$ integrin related tumor imaging. *Nucl. Med. Biol.* 2003; 30: 1-9

- Padhani A.R., Neeman M.: Challenges for imaging angiogenesis. *Brit. J. Radiology* 2001; 74: 886-890
- Pasco S., Monboisse J-C., and Kieffer N.: The $\alpha 3(IV)185-206$ Peptide from noncollagenous domain 1 of type IV collagen interacts with a novel binding site on the β_3 subunit of integrin J. *Biol. Chem.* and stimulates focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2000; 42: 32999-33007
- Pazouki S., Chisholm D.M., Adi M.M., Carmichael G., Farquaharson M., Ogden G.R., Schor S.L., and Schor A.M.: The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *J. Pathol.* 1997; 183: 39-43
- Petitclerc E., Ströbland S., von Schalscha T.L., Mitjans F., Piulats J., Montgomery A.M.P., Cheresch D.A. and Brooks C.: Integrin $\alpha_v\beta_3$ promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Research* 1999; 59: 2724-2730
- Pfaff M., Tangemann K., Müller B., Gurrath M., Müller G., Kessler H., Timpl R., and Engel J.: Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *J. Biol. Chem.* 1994; 32: 20233-20238
- Phelps M.E.: PET: The merging of biology and imaging into molecular imaging. *J. Nucl. Med.* 2000; 41: 661-681
- Phelps M.E.: Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *PNAS* 2000; 97: 9226-9233
- Piali L., Hammel P., Uherek Ch., Bachmann F., Gisler R.H., Dunon D. And Imhof B.A.: CD31/PECAM-1 is a ligand for $\alpha_v\beta_3$ integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J. Cell Biology* 1995; 130: 451-460
- Pierschbacher M., Ruoslahti E.: Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J. Biolog. Chemistry* 1987; 262: 17294-17298
- Plich J., Habermann R., and Felding-Habermann B.: Unique ability of integrin $\alpha_v\beta_3$ to support tumor cell arrest under dynamic flow conditions. *J Biol. Chem.* 2002; 24: 21930-21938
- Plow E.F., Haas T.A., Zhang L., Loftus J., and Smith J.W.: Ligand binding to Integrins. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 21785-21788
- Raggi C.C., Calabro A., Renzi D., Briganti V., Cianchi F., Messerini L., Valanzano R., Smith M.C., Cortesini C., Tonelli F., Serio M., Maggi M., and Orlando C.: Quantitative evaluation of somatostatin receptor subtype 2 expression in sporadic colorectal tumor and the corresponding normal mucosa. *Cl. Cancer Research* 2002; 8: 419-427
- Reynolds L.E., Wyder L., Lively J.C., Taverna D., Robinson S.D., Huang X., Sheppard D., Hynes R.O., & Hodivala-Dilke K.M.: Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking β_3 integrin or β_3 and β_3 integrins. *Nature Medicine* 2002; 8: 27-34

- Richards J., Miller M., Abend J., Koide A., Koide S. and Dewhurst S.: Engineered fibronectin type III domain with a RGDWXE sequence binds with enhanced affinity and specificity to human $\alpha_v\beta_3$ integrin. *J. Mol. Biol.* 2003; 326: 1475-1488
- Rodan S.B., and Rodan G.A.: Integrin function in osteoclasts. *J. Endocr.* 1997; 154: S47-S56
- Rosen L.: Antiangiogenic strategies and agents in clinical trial. *Oncologist* 2000; 5: 20-27
- Rossino P., Gavazzi I., Timpl R., Aumailley M., Abbadini M., Giacotti F., Silengo L., Marchisio P.C. and Tarone G.: Nerve growth factor induces increased expression of a laminin-binding integrin in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Exper. Cell Research* 1990; 189: 100-108
- Rota Kops E., Krause B.J.: *Partialvolumeneffekte und Korrekturmethode* 1999; PET in der klinische Onkologie; Herausgeber Wieler H.J., Steinkopff Verlag, Darmstadt
- Rundell K.: The basic Science underlying antiangiogenic therapies. *Bioch. Bioph. Acta* 1998; 1378: R27-R31
- Ruoslahti E., and Pierschbacher M.D.: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238: 491-497
- Ruoslahti E.: Integrins. *J. Clin. Invest.* 1999; 87: 1-5
- Sanz L., and Alvarez-Vallina .: The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies. *Trends Mol. Med.* 2003; 9: 256-262
- Sata Y., Matsuda K., Mihara T., Aihara M., Yagi K., and Yonekura Y.: Quantitative analysis of benzodiazepine receptor in temporal lobe epilepsy: [125 J] zomepirate autoradiographic study of surgically resected specimens. *Epilepsia* 2002; 43: 1039-1048
- Sato T., Konishi K., Kimura H., Maeda K., Yabushita K., Tsuji M., and Miwa A.: Vascular integrin beta 3 and its relation to pulmonary metastasis of colorectal carcinoma. *Anticancer Research* 2001; 21: 643-648
- Scatena M., and Giacelli C.: The $\alpha_v\beta_3$ integrin, NF- κ B, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis. *Tr. Cardio. Med.* 2002; 12: 83-88
- Schraa A.J., Kok R.J., Berendsen A.D., Moorlag H.E., Bos E.J., Meijer D.K.F., de Leij L.F.M.H., Molema G.: Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *J. Controlled Release* 2002; 83: 241-251
- Schraa A.J., Kok R.J., Moorlag H.E., Bos E.J., Proost J.H., Meijer D.K.F., De Leij L.F.M.H. and Molema G.: Targeting of RGD-modified proteins to tumor vasculature: a pharmacokinetic and cellular distribution study. *Int. J. Cancer* 2002; 102: 469-475
- Schramm K., Krause K., Bittroff-Leben A., Gold-Lang A., Thiel E. and Kreuser D.: Activated K-ras is involved in regulation of integrin expression in human colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 2000; 87: 155-164

- Sihver S., Sihver W., Bergström M., Höglund A.U., Sjöberg P., Langström B., and Watanabe Y.: Quantitative autoradiography with short-lived positron emission tomography tracers: a study on muscarinic acetylcholine receptors with N-[¹¹C] methyl-4-piperidylbenzilate. *J. Pharmacol. Exper. Therap.* 1999; 290: 917-922
- Silletti S., Kessler T., Golberg J., Boger D.L., and Cheresh D.A.: Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin $\alpha_v\beta_3$ by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *PNAS* 2001; 98: 119-124
- Sims P.J., Ginsberg M.H., Plow E.F., Shattil S.J.: Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex- *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 7345-52
- Soldi R., Mitola S., Strasly M., Defilippi P., Tarone G., and Bussolino F.: Role of $\alpha_v\beta_3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J.* 1999; 18: 882-892
- Srivatsa S.S., Fitzpatrick L.A., Tsao P.W., Reilly T.M., Holmes Jr D.R., Schwartz R.S., Mousa S.A.: Selective $\alpha_v\beta_3$ integrin blockade potently limits neointimal hyperplasia and lumen stenosis following deep coronary arterial stent injury: Evidence for the functional importance of integrin $\alpha_v\beta_3$ and osteopontin expression during neointima formation. *Cardiovasc. Research* 1997; 36: 408-428
- Stupack D.G., and Cheresh D.A.: Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Science* 2002; 115: 3729-3738
- Sturm R.A., Satyamoorthy K., Meier F., Gradiner B.B., Smit D.J., Vaidya B., and Herlyn M.: Osteonectin/SPARC induction by ectopic β_3 integrin in human radial growth phase primary melanoma cells. *Cancer Research* 2002; 62: 226-232
- Su Z-F., Liu G., Gupta S., Zhu Zh., Rusckowski., and Hnatowich D.J.: In vitro and in vivo evaluation of a technetium-99m-labeled cyclic RGD peptide as a specific marker of $\alpha_v\beta_3$ integrin for tumor imaging. *Bioconjugate Chem.* 2002;13: 561-570
- Sutcliffe-Goulden J.L., O'Doherty M.J., Marsden P.K., Hart I.R., Marshall J.F., Bansal S.S.: Rapid solid phase synthesis and biodistribution of ¹⁸F-labelled linear peptides. *Eur. J. Nucl. Med.* 2002; 29: 754-759
- Thumshirn G., Hersel U., Goodman S.L., and Kessler H.: Multimeric cyclic RGD peptides as potential Tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chem. Eur. J.* 2003; 9: 2717-2725
- Tjuvajev J.G., Avril N., Oku T., Sasajima T., Miyagawa T., Joshi R., Safer M., Beattie B., DiResta G., Daghighian F., Augensen F., Koutcher J., Zweit J., Humm J., Larson S.M., Finn R. and Blasberg R.: Imaging herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression by positron emission tomography. *Cancer Research* 1998; 58: 4333-4341
- Trikha M., Zhou Z., Timar J., Raso E., Kennel M., Emmel E., and Nakada M.T.: Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and $\alpha_v\beta_3$ integrins in tumor growth, angiogenesis, and Metastasis. *Cancer Research* 2002; 62: 2824-2833

- Tsuruta D., Gonzales M., Hopkinson S.B., Otey C., Khuon S., Goldman R.D., and Jones J.C.R.: Microfilament-dependent movement of the β_3 integrin subunit within focal contacts of endothelial cells. *FASEB J.* 2002; 16: 866-868
- Tucker G.C.: Inhibitors of integrins. *Curr. Opin. Pharm.* 2002; 2: 394-402
- Van Hagen P.M., Breman W.A.P., Bernard H.F., Schaar M., Mooij C.M., Srinivasan A., Schmidt M.A., Krenning E.P., and de Jong M.: Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD analogue for tumour imaging and radionuclide therapy. *Int. J. Cancer* 2000; 8: 186-198
- Varner J.A.: The role of vascular cell integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in angiogenesis. Regulation of angiogenesis 1997; 361-390 Bukhauser Verlag Basel Switzerland
- Vecchi A., Garlanda C., Lampugnani M.G., Restani M., Matteucci Ch., Stoppacciaro A., Schnurch H., Risau W., Ruco L., Mantovani A., Dejana E.: Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur. J. Cell Biology* 1994; 63: 247-254
- Vella F., Thielens N.M., Bersch B., Arlaud G.J., and Frchet P.: A recombinant chimeric epidermal growth factor-like module with high binding affinity for integrins. *J. Biol. Chem.* 2003; 22: 19834-19843
- Wada J., Kumar A., Liu Z., Ruoslahti E., Reichardt L., Marvaldi J. and Kanwar Y.S.: Cloning of mouse integrin α_v cDNA and Role of the α_v -related matrix receptors in metanephric development. *J. Cell Biology* 1996; 132: 1161-1176
- Walton H.L., Corjay M.H., Mohamed S.N., Mousa Sh.A., Santomena L.D. and Reilly T.M.: Hypoxia induces differential expression of the integrin receptors $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ in cultured human endothelial cells. *J. Cell. Biochemistry* 2000; 78: 674-680
- Weber G.F.: The metastasis gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1552: 61-85
- Weber W.A., Avril N., Schwaiger M.: Relevance of positron emission tomography (PET) in oncology. *Strahlenther. Onkol.* 1999; 175: 356-373
- Wierzbicka-Patynowski I., Niewiarowski S., Marcinkiewicz C., Calvete J.J., Marcinkiewicz M.M., and McLane M.A.: Structural requirements of echistatin for the recognition of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins. *J. Biol. Chem.* 1999; 53: 37809-37814
- Woods D., Chrewinski H., Venetsanakos E., Bhat A., Gysin S., Humbert M., Bray P.F., Saylor V.L. and McMahon M.: Induction of β_3 -integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated kinase signaling pathway. *Molec. and Cell. Biology* 2001; 21: 3192-3205
- Wu C. and Dedhar S.: Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J. Cell Biol.* 2001; 155: 505-510

- Xiong J-P., Stehle T., Zhang R., Joachimiak A., Frech M., Goodman S.L., Arnaout M.A.: Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp Ligand. *Science* 2002; 296: 151-155
- Xiong J-P., Zhang R., Dunker R., Scott D.L., Joachimiak A., Goodman S.L., Arnaout M.A.: Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$. *Science* 2001; 294: 339-345
- Yokoyama K., Zhang X-P., Medved L., and Takada Y.: Specific binding of integrin $\alpha_v\beta_3$ to the fibrinogen γ and α_E chain C-terminal domains. *Biochemistry* 1999; 38: 5872-5877
- Yu Y., Annala A.J., Barrio J.R., Toyokuni T., Satyamurthy N., Namavari M., Cherry S.R., Phelps M.E., Herschman H.R., & Gambhir S.S.: Quantification of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals. *Nature Medicine* 2000; 6: 933-937
- Ziegler S.I., Pichler B.J., Boening G., Rafecas M., Pimpl W., Lorenz E., Schmitz N., Schwaiger M.: A prototype high-resolution animal tomograph with avalanche photodiode arrays and LSO crystals. *Eur. J. Nucl. Med.* 2001; 28: 136-143

7 Abkürzungsverzeichnis

%ID/g	Prozent der injizierte Aktivität pro Gramm Gewebe
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-(Peroxidase)-Complex
ad	auffüllen auf
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Bq	Bequerel (1 radioaktiver Zerfall pro Sekunde)
BSA	Rinderserumalbumin
c	zyklisch
Ci	Curie
Cpm	Counts per minute
DOTA	1,4,7,10-tetraazadodecane-N,N',N'',N'''-tetraacetiksäure
DTPA	Diethyleletriamepentaacetiksäure
DTT	1,4 – Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)N, N, N', N'-tetraessigsäure
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GlucocRGD	c(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(SAA))
GalactocRGD	c(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys(SAA))
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H&E	Hämatoxlin-Eosin
i.v.	intravenös
l	Liter
m	Milli
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
min	Minute
MW	Mittelwert

n	Anzahl der Tiere
NaCl	Natriumchlorid
p.i.	nach Injektion
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
rpm	Umdrehungen pro minute (revolutions per minute)
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	Raum Temperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlauryl-sulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurat
U	Einheit (unit)
V	Volt

Ganz herzlich danke ich.....

- Herrn Univ. Prof. Dr. M. Schwaiger für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit an seinem Institut.
- Herrn Priv.-Doz. Dr. W.A. Weber für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.
- Frau Univ. Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke und Frau Dr. R. Beck für die freundliche Übernahme der Korrektur dieser Arbeit.
- Herrn Dr. R.M. Vabulas für die Hilfe beim Erlernen der eingesetzten Methoden (WB und IH).
- Frau C. Bodenstein für die exzellente Hilfe bei der Durchführung der Versuche und die freundschaftliche Zusammenarbeit.
- Herrn Dr. R. Haubner, Herrn Dr. B. Kuhnast, Herrn W. Linke der Arbeitsgruppe „Radiochemie“ für die Synthese und Markierung der eingesetzten RGD-Peptide.
- Frau Dr. S.I. Ziegler, Frau Dr. M.Rafecas-Lopes, Herrn Dr. B.J. Pichler der Arbeitsgruppe „Physik“, für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche zur in vivo Darstellung der Traceraufnahme mittels Kleintier-PET.
- Meiner Familie, der Familie meiner Schwester und meinem Freund Gerald für ihre liebevolle beständige Unterstützung.
- Auch allen anderen, die ich oben nicht genannt habe, die einen größeren oder kleineren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.