

Testung neuer molekularer Sonden für die Bildgebung von Enzymaktivitäten und der Apoptose

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
- doctor rerum naturalium -

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Dipl.-Biologin Franziska Appler
aus Berlin
2014

Die Arbeit wurde angefertigt am:

Universitätsklinikum der Charité
Experimentelle Radiologie
Arbeitsgruppe Prof. E. Schellenberger
Charitéplatz 1
10117 Berlin

Zeitraum: Februar 2008 bis September 2014

Erster Gutachter: Prof. Schellenberger

Zweiter Gutachter: Prof. Mutzel

Disputation am: 23. 01. 2015

für meine drei Liebsten

Marco, Tim, Lilian

Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Eyk Schellenberger bedanken, der mich an seinem immensen Wissensschatz über die Vielseitigkeit der molekularen Bildgebung teilhaben ließ, die Möglichkeiten, die sich durch Nutzung des großen Repertoires an Bildgebungssystemen ergab und die stete Unterstützung bei kleinen und großen Problemen.

Ebenso geht mein Dank an Dr. Jörg Schnorr, der mich behutsam und geduldig in den tierexperimentellen Bereich eingeführt hat.

Mein Dank richtet sich außerdem an alle Kollegen der experimentellen Radiologie für die freundliche Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die vielen leckeren Kuchen. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Akvile Häckel für ihre Aufmunterungen, bei Dr. Ines Gemeinhardt für die pädagogisch wertvollen Gespräche beim morgendlichen Kaffee, bei Dr. Lena Figge und Constantin Scharlach für viel Ironie und kritische Denkanstöße, bei Dr. Angela Ariza für ihre Ratschläge, bei Yuske Kobayashi fürs zum Lachen bringen, bei Dr. Carsten Warmuth für die Runden am MRT, bei Dr. Ralf Hauptmann für die unendliche Geduld beim Berechnen von Konzentrationen und bei Gesche Genter für die Zuarbeiten im Labor.

Ein ganz liebes Dankeschön sei meiner Freundin Dr. Celine Kretschmer gesagt, die mich immer wieder motiviert und angespornt hat.

Bei meiner gesamten Familie möchte ich mich fürs Durchhalten, Vertrauen schenken und die „Du schaffst das!“-Parolen bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Zielstellung	1
1.2. Bildgebung.....	1
1.2.1. Magnetresonanztomographie.....	2
1.2.1.1. Grundlagen.....	2
1.2.1.2. Signalintensität und Bildkontrast	4
1.2.1.3. Sequenzen	4
1.2.1.4. Kontrastmittel	5
1.2.1.5. Superparamagnetische Kontrastmittel	6
1.2.1.6. Target-spezifische Bildgebungssonden	7
1.2.2. Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie	9
1.2.3. Computertomographie	10
1.2.4. Optische Bildgebung	10
1.3. Krebserkrankungen	11
1.4. Die extrazelluläre Matrix	12
1.4.1. Matrixmetalloproteinasen	13
1.4.1.1. MMP-2 und MMP-9	15
1.5. Apoptose, Nekrose und Autophagie	16
1.5.1. Annexine	21
1.6. Wirkstoffträger: Vergleich von Polyethylenglycol und XTEN	22
2. Materialien	27
2.1. Geräteliste	27
2.2. Chemikalien und Puffer	28
2.3. Primäre Antikörper	30
2.4. Sekundäre Antikörper	30
2.5. Größenstandards	30
2.6. Enzyme.....	30
2.7. Aminosäuresequenz von XTEN288-AnxA5.....	31

3. Methoden	33
3.1. Zellkultur	33
3.1.1. Eukaryotische Zellen	33
3.1.2. Kryokonservierung, Lagerung und Auftauen von Zelllinien	33
3.1.3. Zellzahlbestimmung	34
3.1.4. Bestimmung der Vitalität von Zellen	34
3.1.5. Mycoplasmen-Nachweis	34
3.2. Größenmessungen am Zetasizer	35
3.3. Expressionsanalyse	36
3.3.1. RNA-Isolierung	36
3.3.2. Konzentrationsbestimmung	36
3.3.3. cDNA-Synthese	36
3.3.4. Real-Time PCR	37
3.4. Histologie	38
3.4.1. In situ Zymographie	38
3.4.2. Berliner-Blau-Färbung	39
3.4.3. Immunhistochemie	39
3.5. Durchflusszytometrie	40
3.6. Proteinexpression und Aufreinigung	41
3.6.1. Bakterienstamm und Vektor	41
3.6.2. Transformation	42
3.6.3. Bakterienkultur	42
3.6.4. Bakterienaufschluss	42
3.6.5. Proteinreinigung	42
3.6.6. SDS-Page und Coomassie-Färbung	43
3.6.7. Proteinkonzentrationsbestimmung	44
3.7. Tierexperimentelle Methoden	44
3.7.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	44
3.7.2. Subkutane Injektion von Tumorzellen	44
3.7.3. Chemotherapeutische Behandlungen	45

3.8. Bildgebung.....	46
3.8.1. Magnetresonanztomographie.....	46
3.8.2. SPECT-CT-Messungen.....	48
3.8.3. Nahinfrarot-Messungen.....	49
4. Ergebnisse	51
4.1. Protease-spezifische Eisenoxidnanopartikel	51
4.1.1. Charakterisierung von MMP-spezifischen Eisenoxidpartikeln	51
4.1.2. Tumorevaluation.....	56
4.1.3. Magnetresonanztomographie nach der in vivo Applikation von PSOP	58
4.1.4. Histologische Auswertungen nach Injektion von PSOP	60
4.2. Untersuchungen von AnxA5-VSOP mittels MRT	62
4.2.1. Ermittlung der in vivo Signalintensitätshalbwertszeit von AnxA5-VSOP	63
4.2.2. MRT von Chemotherapie-Effekten und Chemoresistenz mittels AnxA5-VSOP	65
4.2.3. Histologische Auswertungen	66
4.3. Apoptose-Bildgebung mit XTEN-AnxA5	71
4.3.1. Synthese und Reinigung von XTEN-AnxA5	71
4.3.2. In vitro Analysen mit XTEN-AnxA5.....	73
4.3.3. In vivo Analysen von XTEN-AnxA5	74
5. Diskussion	79
5.1. Aktivierbare Matrixmetalloproteinase-spezifische Eisenoxidpartikel	79
5.1.1. In vitro Analysen zur Funktionalität.....	79
5.1.2. Expression von Matrixmetalloproteinasen	83
5.1.3. Evaluation der in vivo MRT-Bildgebung mit PSOP	84
5.1.4. Histologische Analysen von PSOP in Tumoren.....	85
5.2. Annexin A5 als Apoptosemarker.....	88
5.2.1. MRT-Analysen unter Anwendung von Annexin A5-VSOP.....	88
5.2.2. Stabilitätsuntersuchungen und in vitro Anwendung der AnxA5-VSOP	88
5.2.3. Tumor-Mausmodell und chemotherapeutische Behandlung	88

5.2.4. Untersuchungen der AnxA5-VSOP zur Verlängerung der Blutzirkulationszeit und Anreicherung im Tumorgewebe	89
5.2.5. Histologische Auswertungen	90
5.2.6. Anwendung der AnxA5-VSOP an einem Myokardinfarkt-Mausmodell	91
5.3. XTEN-AnxA5	93
5.3.1. In vitro und in vivo Anwendung von XTEN-AnxA5 als Apoptose-Marker ..	93
5.3.2. Vorteile der Anwendung von XTEN im Vergleich zu PEG	97
5.3.3. Ausblick: Kompensation der unspezifischen Bioverteilung mittels nicht-bindender Kontrollsonde	99
6. Zusammenfassung	103
7. Abstract	105
Literaturverzeichnis	107
Abkürzungen.....	119
Publikationsliste.....	121
Eidesstattliche Erklärung	123

1. Einleitung

1.1. Zielstellung

Ziel der durchgeführten Arbeiten war die Entwicklung molekularer Sonden zur Bildung von Proteaseaktivitäten und des programmierten Zelltodes (Apoptose) mit verschiedenen bildgebenden Systemen, insbesondere deren funktionelle Testung *in vitro* und *in vivo*.

Aktive Matrixmetalloproteinasen sind entscheidend am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt. Ihre Dysregulation spiegelt sich in verschiedenen Krankheiten wider. Die Beurteilung von abweichenden Enzymaktivitäten kann einen entscheidenden Hinweis auf pathologische Veränderungen geben.

Die Apoptose ist ebenfalls an vielen Prozessen auf zellulärer Ebene beteiligt. Die Detektion von apoptotischen Zellen ist für präklinische und therapeutische Zwecke ein wertvolles Hilfsmittel, so z. B. um die Effektivität von chemotherapeutischen Behandlungen frühzeitig beurteilen und gegebenenfalls anpassen zu können.

1.2. Bildgebung

Die Visualisierung von inneren Körperstrukturen stellt einen wichtigen Teil der medizinischen Diagnostik dar und ist daher auch ein bedeutsames Forschungsgebiet in der Medizin. Für die Weiterentwicklung müssen viele wissenschaftliche Disziplinen, wie Biologie, Chemie, Pharmazie, Physik und Informatik, zusammenarbeiten. Das erste breit angewendete bildgebende Verfahren wurde 1895 mit der Entdeckung der Röntgenstrahlung von Wilhelm Conrad Röntgen geschaffen [1]. Aufgrund des technologischen Fortschrittes stehen uns heute verschiedenste bildgebende Systeme zur Verfügung. Neben der Röntgenbildgebung liefert heute die Bilderzeugung mittels Magnetresonanztomographie, Computertomographie, Positronen-Emissions-Tomographie oder Ultraschall anatomische und funktionelle Einblicke in die klinische Routine. Der Einsatz dieser Techniken ist nicht nur Grundlage für viele Diagnosen, sondern reduziert oder ersetzt viele invasive Eingriffe. Außerdem spielen bildgebende Verfahren eine wichtige Rolle bei der Überwachung und Kontrolle von Therapien. Neue Therapien können mit Hilfe der Bildgebung entwickelt und standardisiert wer-

den. Für die präklinische Forschung wurden in den letzten Jahren neue Bildgebungstechniken entwickelt, die Signale von Nahinfrarotfluoreszenz, Biolumineszenz und Optoakustik für die Bildgebung verwenden. Auf die in dieser Arbeit verwendeten Bildgebungsverfahren wird im Weiteren genauer eingegangen.

1.2.1. Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein bildgebendes Verfahren, bei dem Schnittbilder von menschlichen, tierischen oder unbelebten Körpern erzeugt werden (griech. tomé = das Schneiden und gráphein = schreiben, zeichnen). Dies ermöglicht Einblicke und Beurteilungen von Körperregionen, die ohne invasive Eingriffe oft unerreichbar wären. Im Gegensatz zu anderen bildgebenden Verfahren, wie Computertomographie oder Positronen-Emissions-Tomographie, kommt die MRT ohne den Einsatz von ionisierender Strahlung aus.

Die Magnetresonanztomographie begründet sich auf dem Prinzip der Kernspinresonanz, die von Felix Bloch [2] und Edward Purcell [3] entdeckt worden ist. Die Weiterentwicklung der MRT wurde ab 1973 vor allem von Paul Lauterbur (erstes NMR-Bild) [4] und Sir Peter Mansfield [5] vorangetrieben. Sie erhielten 2003 den Nobelpreis für Physik und Medizin. Mitte der 80er Jahre hielt die MRT Einzug in die routinemäßige medizinische Diagnostik.

1.2.1.1. Grundlagen

Atomkerne mit ungerader Anzahl von Nukleonen (Protonen und Neutronen) besitzen aufgrund des Eigendrehimpulses (Spin) ein eigenes magnetisches Moment. Diese Eigenschaft ist Grundvoraussetzung für die MRT und z. B. bei Wasserstoffatomen (H^+) gegeben. Da der menschliche Körper zu 65% aus Wasser besteht, ist der überwiegende Anteil von Atomkernen mit Kernspins das Wasserstoff-Isotop 1H . Des Weiteren sind aber auch Fluor-, Natrium- und Phosphoratome für MRT-Messungen geeignet, da sie natürlicherweise im Körper vorkommen und die am häufigsten vorkommenden Isotope eine ungeradzahlige Nukleonenzahl aufweisen [6].

Plaziert man Protonen in einem externen statischen Magnetfeld, richten sich deren magnetische Momente entweder in Feldrichtung (parallel) oder entgegengesetzt dazu (antiparallel) aus, was Zuständen unterschiedlicher Energien entspricht. Der parallele Zustand in Feldrichtung wird dabei bevorzugt eingenommen, weil es sich um

die geringfügig energieärmere Position handelt. Das Verhältnis dieser beiden Zustände liegt bei 1.000.000 antiparallel zu 1.000.007 parallel ausgerichteter Spins bei einer Feldstärke von 1 Tesla. Da sich die Magnetkräfte der antiparallelen und parallelen Spins gegenseitig aufheben, verbleiben für die messbare makroskopische Kernmagnetisierung nur die überschüssigen parallelen Spins. Die Anzahl der parallel ausgerichteten Protonen erhöht sich proportional mit zunehmender Feldstärke [7].

Zusätzlich rotieren die Spins um die Feldrichtung, was als Präzession bezeichnet wird. Die Präzessionsbewegung weist eine charakteristische Frequenz auf. Die Frequenz ist proportional zur Stärke des angelegten Magnetfeldes, d. h. je stärker das umliegende Magnetfeld ist, desto höher ist auch die Präzessionsfrequenz.

Bei Einstrahlung eines Hochfrequenz-Radioimpulses (HF-Puls), der dieselbe Frequenz wie die Präzessionsfrequenz der Protonen aufweist, nehmen parallele Spins Energie auf und wechseln in den antiparallelen Zustand. Diese Energieübertragung wird als Resonanz bezeichnet. Die so angeregten Spins sind durch den eingestrahlenen HF-Puls in der Phasenlage der Präzession synchronisiert [7].

Nach dem Abschalten des HF-Pulses kehren die Protonen wieder in ihre Ausgangsstellung zurück. Dieser Vorgang wird auch Relaxation genannt und besteht aus zwei unabhängigen Vorgängen: die longitudinale (T_1) und die transversale Relaxation (T_2). T_1 ist dabei ein Maß für die Zeit, die die Protonen benötigen um wieder in den energieärmeren parallelen Zustand zu gelangen. T_2 beschreibt dagegen die Zeit, in der die Protonen ihre zueinander synchronisierte Phasenlage verlieren, ist also ein Maß für die Geschwindigkeit der Dephasierung. Makroskopisch messbar ist nur die Summe aller magnetischen Momente, so dass eine Dephasierung zum Verlust von Messsignal führt. Die Drehung des magnetischen Gesamtmoments um einen bestimmten Winkel bei der Anregung wird durch den sogenannten Flipwinkel beschrieben [7].

Eine spezielle Empfängerspule nimmt die elektromagnetischen MR-Signale (Echos) auf, die die Protonen während der Relaxation aussenden [8]. Für die Bildzeugung müssen die Echos mit einer Ortskodierung versehen werden. Dazu werden Zusatzfelder zum statischen Magnetfeld entlang der drei Raumrichtungen generiert (Gradienten). Mit Hilfe der Frequenz- und Phasenkodierung lassen sich die MR-Signale einem Bildpunkt zuordnen. Anschließend wird mit dem mathematischen Algorithmus der Fourier-Transformation ein Bild rekonstruiert [7].

1.2.1.2. Signalintensität und Bildkontrast

Aufgrund unterschiedlicher Relaxationszeiten der Atomkerne in ungleichen Geweben werden vom MRT unterschiedliche Signalintensitäten der Gewebe und Organe gemessen. Die Signalstärke wird in Graustufen kodiert dargestellt. In einem MR-Bild wird der Gewebeanteil, der ein starkes Signal aussendet (signalreich, hyperintens) in hellen Graustufen und der Gewebeanteil mit geringerem Signal (signalarm, hypointens) in dunkleren Graustufen abgebildet. Die Farbkodierung spiegelt sich in den Voxeln, d.h. den Volumenelementen (Pixel x Schichtdicke = Voxel) wider.

Die Relaxationszeiten sind stark von dem jeweiligen Gewebe abhängig und spielen für den Bildkontrast eine entscheidende Rolle. Um ein MR-Bild zu erhalten, wird das Gewebe angeregt und vermessen. Die HF-Pulse werden in bestimmten Abständen wiederholt. Die Zeit zwischen zwei Anregungen derselben Schicht wird als Repetitionszeit (TR) bezeichnet. Spins von Geweben mit kurzer T1 relaxieren schnell und geben nach einer erneuten Anregung viel Signal, sie erscheinen im MR-Bild hell. Gewebe mit langer T1 erscheinen auf T1-gewichteten Bildern dunkel, da sie weniger schnell relaxieren und somit für eine erneute Anregung weniger Spins zur Verfügung stehen, die dementsprechend weniger Signal abgeben.

Ein weiterer Parameter, der Einfluss auf den Bildkontrast hat, ist die Echozeit (TE). Hierbei handelt es sich um die Zeitspanne, die man nach der Anregung bis zur Messung vergehen lässt. Je länger die Echozeit gewählt wird, desto stärker ist der Signalverlust, weil die Spins mehr und mehr dephasieren. Ein Gewebe mit langer T2 verliert bei langer TE nicht so schnell an Signal wie ein Gewebe mit kurzem T2. Auf T2-gewichteten Bildern mit langem TE erscheinen Flüssigkeiten, wie z. B. Liquor hell, da Flüssigkeiten lange T2-Relaxationszeiten aufweisen [6].

1.2.1.3. Sequenzen

Eine Messsequenz in der MRT setzt sich aus einer Kombination von HF-Pulsen und Magnetfeldern bestimmter Stärke und Gradientenrichtung zusammen, die in definierter Reihenfolge ein- und ausgeschaltet werden. Je nach Hersteller und Art der Bilderzeugung gibt es gleiche Ausführungen mit unterschiedlicher Namensgebung. Die Sequenzwahl ist abhängig von der jeweiligen Zielsetzung und dem Messobjekt, und muss daher diesen angepasst werden.

Die klassischen sogenannten Spinecho-Sequenzen kombinieren 90° - und 180° -Pulse. Die schnellen Gradienten-Echo-Sequenzen (GRE) verwenden hingegen keinen 180° -Puls zur Echoerzeugung, sondern erzeugen es durch Umkehr der Richtung der Magnetfeldgradienten (Gradientenecho). Nachteilig ist, dass die Bildqualität aufgrund der fehlenden Kompensation von Feldinhomogenitäten des Magnetfeldes und der Gradienten schlechter ist. Das MR-Signal zerfällt schneller, nämlich mit $T2^*$ (der totalen transversalen Relaxationszeit). Der Vorteil liegt im geringen Zeitaufwand aufgrund der schnellen Pulsfolge. Bei der Verwendung von Anregungswinkeln kleiner 90° (i. d. R. zwischen 10° und 35°) wird die Gradientenecho-Sequenz als FLASH (Fast Low Angle SHot) bezeichnet [9].

1.2.1.4. Kontrastmittel

Bei bestimmten Fragestellungen ist es notwendig einen noch stärkeren Kontrastunterschied innerhalb eines Gewebes oder zwischen ähnlichen Geweben bei der MRT zu erhalten. Um Änderungen im Bildkontrast hervorzurufen, kann man je nach Anwendung auf verschiedene Kontrastmittel (KM) zurückgreifen. Die Entwicklung neuer, besonders schneller MRT-Techniken und die Anwendung von KM führte zu einer Verbesserung der Bildgebung im Bereich vieler klinischer Anwendungen. Zur Auswahl stehen derzeit eine Vielzahl an unterschiedlichsten KM. Eine große Gruppe bilden die Gadolinium-haltigen Verbindungen, eine zweite Gruppe bilden die Eisenoxidnanopartikel-Verbindungen. Ihre Wirkung liegt in einer Verkürzung der $T1$ - und $T2$ -Relaxationszeit. Dieser Effekt wird indirekt verursacht, d. h. die Substanzen selbst liefern keine MR-Signale, beeinflussen jedoch durch Wechselwirkung mit benachbarten Protonen ihre Umgebung [10]. Hierbei wirken Eisenoxidnanopartikel meist signalmindernd durch eine starke $T2/T2^*$ -verkürzende Wirkung im Gegensatz zu Gadolinium-basierten KM, die vorwiegend die $T1$ verkürzen und dadurch signalverstärkend in $T1$ -gewichteten Sequenzen wirken. Da Gadolinium-Ionen toxisch sind, müssen sie stabil gebunden an einen Chelator wie DOTA oder DTPA verabreicht werden.

Außerdem spielt die Suszeptibilität (Empfänglichkeit für eine Magnetisierung durch ein äußeres Magnetfeld) der Substanzen eine große Rolle. Es gibt vier verschiedene Formen von Suszeptibilität: Diamagnetismus, Paramagnetismus, Superparamagnetismus und Ferromagnetismus. Da diamagnetische Substanzen lediglich eine gerin-

ge negative Suszeptibilität zeigen und ferromagnetische Substanzen nach Abschalten des äußeren Magnetfeldes eine Restmagnetisierung behalten, die zu Aggregationen führen könnten, werden nur paramagnetische und superparamagnetische Substanzen für die MRT verwendet.

1.2.1.5. Superparamagnetische Kontrastmittel

Die Eigenschaften von Eisenoxidpartikeln in Pulverform und Flüssigkeiten wurden erstmals 1952 mit der Bezeichnung des Superparamagnetismus belegt [11]. Ein Charakteristikum von superparamagnetischen Substanzen ist die Fähigkeit, sich durch ein externes Magnetfeld stark magnetisieren zu lassen. Verantwortlich dafür ist die Anordnung der Ionen im Kristallgitter, in denen alle Elektronenspins parallel ausgerichtet sind. Nach Abschalten des Magnetfeldes verschwindet diese Magnetisierung – Restmagnetisierung kann nicht nachgewiesen werden.

In die Gruppe der Eisenoxid-basierten KM gehören die USPIOs (ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles) von Größen unter 50 nm und die SPIOs mit über 50 nm Durchmesser [12].

Vor der Anwendung müssen die superparamagnetischen Partikelkerne in der Regel mit einer Beschichtung überzogen werden, das so genannte coating, um eine Stabilisierung der einzelnen Partikel sicherzustellen. Die Umhüllung gewährleistet eine kolloidale Form der Suspension während der Lagerung, Applikation und Verteilung im Organismus. Der Stabilisator isoliert den Eisenkern entsprechend vor Van-der-Waals-Kräften und magnetischen Wechselwirkungen untereinander [13]. Für diese Zwecke werden sowohl hochmolekulare als auch geladene niedermolekulare Substanzen verwendet. Aus der ersten Gruppe sind vor allem Dextran [14] und seine Derivate [15], Stärke [16], Albumin [17] und Polyethylenglycol [18] zu nennen. Bei dieser Art von Abschirmung handelt es sich um eine sterische Stabilisierung aufgrund der umfangreichen Größe der Beschichtungsmoleküle. Bei der Beschichtung mit niedermolekularen Substanzen wird die Aggregation der Eisenkerne durch eine elektrostatische Abstoßung verhindert, die durch positive oder negative Ladungen der Coatingsubstanzen erreicht werden kann. Zu diesen Stabilisatoren gehören Carbonsäuren, wie z. B. Citronensäure [19, 20], Apfelsäure [21], Weinsäure [22] und Asparaginsäure [23]. Die Citrat-stabilisierten VSOP (very small iron oxide particles) gehören mit einem Durchmesser von unter 10 nm zu den kleinsten USPIOs [24]. Die

Eisenoxidnanopartikel bestehen aus einem Gemisch von Magnetit und Maghämät. Die Citrat-beschichteten VSOP wurden als Bildgebungssonden für die kontrastmittelgestützte MR-Angiographie entwickelt. Die Eisenoxidpartikel werden überwiegend von Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems (MPS), z. B. des Knochenmarks, der Leber und der Milz, absorbiert und anschließend dem körpereigenen Stoffwechsel zugeführt [25]. VSOP bewirken durch ihre Magnetisierbarkeit eine Störung der Homogenität des externen Magnetfeldes. Die so verursachten lokalen Feldinhomogenitäten im Magnetfeld führen zur einer Verkürzung der T1- und T2-Relaxationszeiten. Besonders stark ist dieser Effekt bei T2/T2*-gewichteten Sequenzen zu beobachten, die eine entsprechend hohe Signalverminderung im Bereich des angereicherten Kontrastmittels zeigen. Allerdings werden durch Eisenoxidpartikel auch T1-gewichtete Sequenzen sichtbar beeinflusst. Hierbei führt die Verkürzung der T1-Relaxationszeit zu einer Signalsteigerung des kontrastmittelhaltigen Gewebes [26].

1.2.1.6. Target-spezifische Bildgebungssonden

Morphologische und funktionelle Veränderungen in Geweben gehen meist molekulare Abweichungen, wie Änderung in der Genexpression, veränderten Enzymkonzentrationen, vermehrter Präsentation von Rezeptoren oder Antigenen, voraus. Diese Veränderungen können als Target für die Bildgebung dienen, aber auch als therapeutisches Werkzeug eingesetzt werden. Je nach gewähltem Target ergeben sich verschiedene Ansätze für die Entwicklung von spezifischen Bildgebungssonden [27]. Durch Kopplung von spezifisch bindenden Peptidsequenzen oder Proteinen, wie z. B. Antikörpern, können bereits erprobte Sonden modifiziert werden. Durch spezifische Interaktionen oder Bindungen der gekoppelten Moleküle mit dem Zielgewebe können Anreicherungen bewirkt werden, die für die molekulare Bildgebung genutzt werden [28]. In Abbildung 1 sind Eisenoxidnanopartikel dargestellt. Die VSOP weisen einen Eisenoxidkern auf, der durch eine Citrat-Hülle elektrostatisch stabilisiert wird. Durch Kopplung von Molekülen auf der Oberfläche, z. B. mit Annexinen oder Peptidsequenzen, können die VSOP modifiziert werden. Dies ermöglicht ein aktives Targeting an bestimmten veränderten Gewebestrukturen oder Proteinen [29, 30].

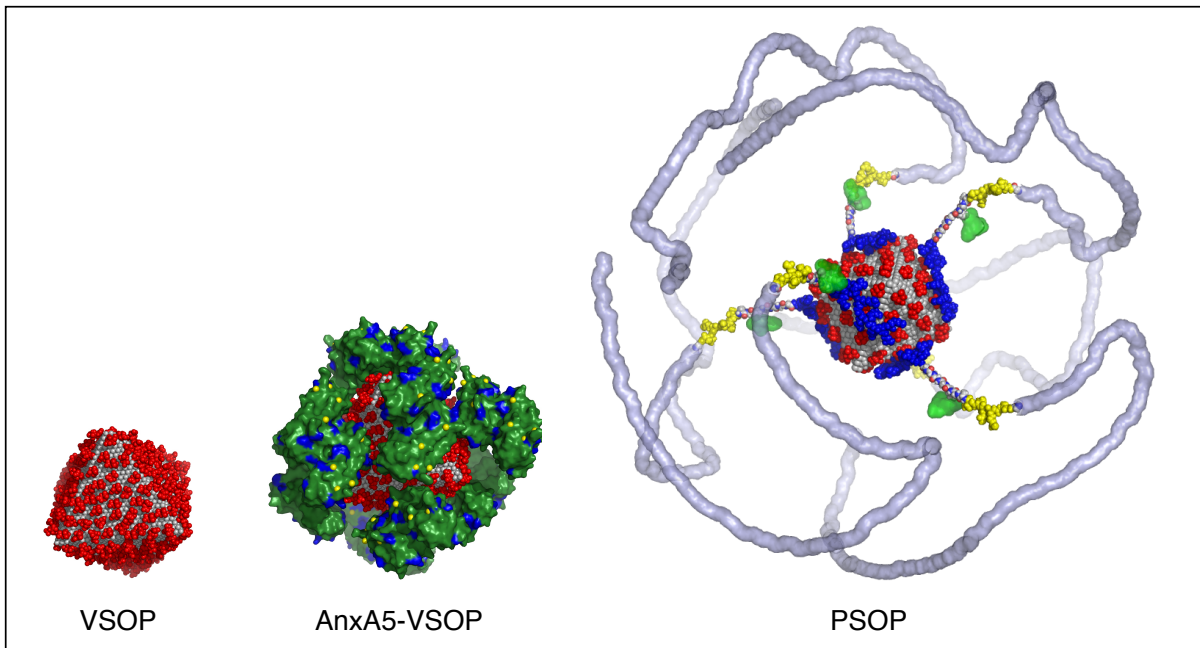


Abbildung 1: Strukturmodelle von unterschiedlichen Bildgebungssonden (zur Verfügung gestellt von Lena Figge und Prof. Eyk Schellenberger). Vergleich eines Eisencitrat-Partikels (VSOP links, 7 nm) und spezifischen Bildgebungssonden, wie zielgerichtete Annexin-beschichtete Partikel (AnxA5-VSOP Mitte, 15 nm) und aktivierbaren Partikeln mit gekoppelten Peptid-PEG-Ketten (PSOP rechts, 25 nm). Der Eisenoxidkern (grau) ist bei den abgebildeten Partikeln Citrat-beschichtet (rot). Die VSOP werden u. a. für Angiographie-Messungen eingesetzt. Die AnxA5-VSOP dienen der Apoptose-Detektion und die PSOP besitzen eine spezifische Schnittstelle, um die Aktivität von bestimmten Enzymen zu demonstrieren.

Die mit Annexinen gekoppelten VSOP sind mit einer Größe von $14,4 \pm 2,3$ nm vergleichsweise klein [30]. Die geringe Größe und die Oberflächenbeschichtung sind gute Voraussetzungen für die Extravasation der Partikel aus der Gefäßbahn und die Detektion von apoptotischem Gewebe mittels MRT [31]. Auch die PSOP wurden für die Bildgebung mittels MRT entwickelt. Eine spezifische Partikelanreicherung wird bei Anwesenheit eines Enzyms und der damit einhergehenden Enzymaktivität (Trennung des Peptid-PEGs an der spezifischen Schnittstelle) vermittelt.

Der Einsatz solcher spezifischen Sonden bei bildgebenden Verfahren bringt sowohl Vorteile für die präklinische Forschung als auch im diagnostischen Bereich durch frühzeitiges Erkennen von Veränderungen auf molekularer Ebene sowie durch zeitnahe Beurteilung der Wirksamkeit von bestimmten Therapien. Der damit verbundene

Zeitgewinn könnte gegebenenfalls durch frühe Therapieveränderung den Therapieerfolg verbessern und unnötige Behandlungsnebenwirkungen verringern.

Ein weiterer Ansatz verbindet die molekulare Bildgebung mit einem therapeutischen Aspekt. Die Kopplung von Therapeutika an spezifische Sonden kann zu einer Dosissteigerung im Zielgewebe führen. Aber auch in den Bereichen der Hyperthermie- und Stammzelltherapie ergeben sich mit Hilfe von Target-spezifischen Sonden neue Möglichkeiten [32, 33].

1.2.2. Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie

Die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT, single photon emission computed tomography) ist ein nuklearmedizinisches Verfahren, welches mit Hilfe von schwach radioaktiven Substanzen Schnittbilder eines Untersuchungsobjektes liefert. Das für die SPECT-Aufnahmen notwendige Radionuklid kann allein oder an eine Sonde gekoppelt injiziert werden. Die Verteilung, Anreicherung und Ausscheidung des Radionuklids wird über die emittierte Gammastrahlung von rotierenden Szintillationskamaras aufgenommen [34]. Die planaren Aufnahmen des Objektes aus verschiedenen Raumrichtungen, sogenannte Projektionen, werden für die Bildrekonstruktion zusammengesetzt und damit wird eine genaue Verteilung des Tracers (radioaktive Sonde) im Körperinneren sichtbar. Außerdem kann die quantitative Aktivitätsverteilung Aufschluss über die Funktionalität verschiedener Organe geben. Dynamische Untersuchungen, d. h. wiederholte Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, geben Auskunft über die Verteilung des Tracers im Organismus über einen definierten Zeitraum und können Funktionseinschränkungen einzelner Gewebe oder Organe aufdecken. Für die molekulare Bildgebung eignet sich dieses Verfahren in besonderer Weise. Durch Kopplung des Radionuklids an spezifische Sonden, die wiederum ein bestimmtes Target erkennen und binden, können Zellen aktiv markiert und detektiert werden [35]. Mit dieser Technik können sowohl Zellen erkannt werden, die pathologische Funktionsstörungen aufweisen, sowie eine Quantifizierung des aufgenommenen Tracer durchgeführt werden. Ebenso können unerwartete Anreicherungen außerhalb des Zielgewebes identifiziert und quantifiziert werden.

Dennoch sind der SPECT Grenzen gesetzt. Nachteilig ist der Einsatz von radioaktiven Tracern, die Notwendigkeit der Radionuklidmarkierung jeweils vor den Untersuchungen und die relativ langen Aufnahmezeiten der Projektionen. Eine weitere Limitierung liegt in der begrenzten Darstellung von anatomischen Details des Un-

tersuchungsobjektes, da die Verteilung des Tracers nur die Funktionalität bestimmter Gewebe anzeigt, die jedoch anschließend keineswegs immer eindeutig zugeordnet werden können. Ein Lösungsansatz gegen diese Einschränkung bietet die Kombination der SPECT mit einer anatomisch-morphologischen Bildgebungsmodalität, wie z. B. der Computertomographie (CT) [36].

1.2.3. Computertomographie

Die Computertomographie ist ein computergestütztes Röntgenverfahren. Während der Messung rotieren die Röntgenröhre und der Detektor um das Untersuchungsobjekt. Die erzeugten Projektionen werden zu Schnittbildern verrechnet und dann zu einem dreidimensionalen Bildsatz zusammengefügt. Die Einführung der Technik Anfang der 70er Jahre vereinfachte die Diagnose vieler Krankheiten. Die Vorteile gegenüber dem konventionellem Röntgen ist die überlagerungsfreie dreidimensionale Darstellung von Organen und Gewebe sowie gegenüber anderen Schnittbildverfahren die kurzen Aufnahmezeiten. Als nachteilig wird die hohe Strahlenbelastung angesehen. Durch die Entwicklung neuer Hochleistungscomputer und Software wird eine verringerte Strahlenexposition bei gleicher Bildqualität möglich (Low Dose CT) [37].

1.2.4. Optische Bildgebung

Die optische Bildgebung im nahinfraroten (NIR) Bereich verwendet Farbstoffe mit einem Absorptions- und Emissionsspektrum zwischen 600 nm und 1000 nm. Nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen Laser wird mit gekühlten, hochsensitiven CCD-Kameras (charge coupled device) die Verteilung des Farbstoffes *in vitro*, *in vivo* oder *ex vivo* detektiert. Infolge einer charakteristischen Anreicherung kann beispielsweise zwischen gesundem und entzündlichem Gewebe unterschieden werden [38]. Auch die erhöhte Genexpression von Matrixmetalloproteinasen bei Dickdarmkrebszellen konnte mit Hilfe eines NIRF(Nahinfrarotfluoreszenz)-gekoppelten Peptides *in vivo* gezeigt werden [39].

Begünstigt wird die NIRF-Bildgebung bzw. der Bildkontrast durch niedrige Lichtabsorption, geringe Autofluoreszenz und minimale Lichtstreuung in Geweben. Nahinfrarotlicht kann aufgrund dieser Gegebenheiten tiefer in biologische Strukturen eindringen bzw. aus diesen detektiert werden (bis zu 10 cm) als sichtbares Licht [40]. Um

ein breites Spektrum an pathologischen Veränderungen abdecken zu können, werden neue molekulare Sonden entwickelt, die eine spezifische Anreicherung zeigen. Dies ermöglicht biologische und physiologische Vorgänge in Geweben *in vivo* zu untersuchen ohne den Einsatz von ionisierender Strahlung [41]. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber der Verwendung kostenintensiver nuklearer Tracer ist die Möglichkeit, fertige NIRF-Sonden lange aufbewahren zu können. Weitere Vorteile bringen die einfache Handhabung des Versuchsaufbaus, schnelle Durchführung und ein geringer finanzieller Aufwand im Vergleich zur MRT und nuklearer Bildgebung. Die Möglichkeit von Mehrfachmessungen gestattet eine kinetische Auswertung und die Bestimmung der Bluthalbwertszeit. Die NIR-Fluoreszenz bietet zudem eine hohe Sensitivität bei geringen Hintergrundsignalen.

1.3. Krebserkrankungen

Unkontrolliertes Zellwachstum und Verdrängung sowie Destruktion von gesunden Gewebeanteilen sind typische Charakteristika von entarteten Körperzellen, die Krebserkrankungen verursachen. Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Jedes Jahr erkranken 490.000 Menschen an Deutschland neu, 221.000 Menschen sterben jährlich daran (Stand 2013) [42].

Maligne (bösartige) Tumore werden von benignen (gutartigen) Tumoren, die nur lokal begrenzt wachsen, abgegrenzt und gliedern sich weiter in epitheliale (Karzinome) und mesenchymale Tumore (Sarkome) auf. Krebs ist eine genetisch bedingte, multifaktorielle Erkrankung und kann durch endogene oder exogene Faktoren hervorgerufen werden. In Krebszellen liegen immer mehrere somatische Mutationen vor, die stufenweise zu einer Veränderung führen und die Krebsentwicklung vorantreiben (maligne Transformation). Die für solche Veränderungen verantwortlichen Gene sind Onkogene, Tumorsuppressor-Gene und Mutator-Gene [43, 44].

Eine weitere Eigenschaft von malignen Zellen ist die Fähigkeit zur Metastasierung. Bei diesem Prozess lösen sich Zellen aus dem Primärtumor und gelangen über das Blut- und Lymphgefäßsystem in andere Organe. Dort bilden sich Sekundärtumore, die im Gegensatz zum Primärtumor jedoch schwer zu lokalisieren sind. Tumorwachstum, d. h. das Vordringen in gesundes Gewebe, und Metastasierung korrelieren oftmals mit einer Erhöhung der Genexpression von bestimmten Proteinen. Besonders

hervorzuheben ist hierbei die Gruppe der Matrixmetalloproteinasen [45], die unter anderem für den Abbau der extrazellulären Matrix verantwortlich ist.

Die heutigen Behandlungsmöglichkeiten von Krebserkrankungen bestehen u. a. in Resektion des Tumors, Chemotherapie, Hormontherapie, Immuntherapie und Strahlenbehandlung. Die Effizienz dieser Behandlungsmöglichkeiten hängt vor allem von der Resistenz der Tumore gegenüber der Therapie ab. Solche Resistenzen können bereits vor dem Therapiebeginn vorliegen oder sich im Laufe dieser bilden. Die genaue Analyse des Tumorgewebes und der genetischen Charakteristika ist daher der erste wichtige Schritt. Im Weiteren ist eine engmaschige Kontrolle des Therapieverlaufes unabdingbar. Die Bildgebung spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Doch die aktuellen Möglichkeiten sind begrenzt und auf morphologische Untersuchungen beschränkt. Die molekularen Prozesse unter der Therapie bleiben zumeist unerkannt und werden erst mit der Reduktion, Stagnation oder Weiterwachsens des Tumors sichtbar. Das Detektieren von molekularen Vorgänge würde vielfach zu therapeutischen Nutzen führen. Besonders das frühzeitige Aufdecken von Therapieresistenzen unter Behandlung ist ein herausragendes Ziel der molekularen Bildgebung, weil es eine frühzeitige Veränderung der Therapie erlauben würde und so Zeitverlust sowie unnötige Nebenwirkungen verhindert werden könnten. Besonders bedeutsam ist in diesem Zusammenhang das Erkennen von apoptotischen Prozessen. Das Auslösen von Apoptose/Nekrose in Krebszellen, d. h. die Induktion des Zelltodes, ist, abgesehen von einer Resektion, das primäre Ziel jeder Krebsbehandlung. Der Erfolg einer solchen Therapie kann dementsprechend über die Detektion von apoptotischen Ereignissen im Zielgewebe charakterisiert werden. Gleichzeitig kann durch eine Verlaufskontrolle eine Abnahme in der Wirksamkeit der Therapie zeitnah diagnostiziert werden.

1.4. Die extrazelluläre Matrix

Die Gesamtheit der Makromoleküle, die sich außerhalb von Zellen im Interzellularraum befindet, bezeichnet man als extrazelluläre Matrix (ECM, extracellular matrix). Das komplexe Netzwerk der ECM setzt sich aus verschiedenen Bestandteilen zusammen, die von den Zellen synthetisiert und sezerniert werden. Die wichtigsten Komponenten sind unter anderem Kollagen, Glycosaminoglykane und Proteoglykane.

Die Aufgaben der ECM sind mechanische Festigkeit, Verankerung und Ernährung von Zellen, Bestimmung der genetischen Expressivität, Regeneration, Bildung neuer Blutgefäße und Nervenbahnen. Insgesamt herrscht zwischen Zellen und ECM eine wechselseitige Interaktion, die sich in Zelladhäsion, Zellmigration und Zellproliferation widerspiegelt [46]. Die ECM dient außerdem als Speicher für Wachstumsfaktoren, die bei Bedarf durch Proteasen freigesetzt werden können [47]. Der Vorteil hierbei liegt in der unnötigen Neusynthese dieser Faktoren und bedeutet eine schnelle und lokale Aktivierung zellulärer Prozesse.

Alle normalen Entwicklungsprozesse sowie die Aufrechterhaltung der Funktionalität des Organismus benötigen den ständigen Auf- und Abbau der ECM [48].

1.4.1. Matrixmetalloproteinasen

Der hoch dynamische Ab- und Umbau der ECM wird hauptsächlich durch die Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bewirkt [49]. Hierbei handelt es sich um eine große Gruppe von Endopeptidasen, die ein Zinkion in ihrem aktiven Zentrum aufweisen [50]. MMPs wurden erstmals 1962 in Vertebraten beschrieben [51]. Gross und Lapiere haben Untersuchungen zur Metamorphose der Kaulquappe zum Frosch betrieben. Sie konnten zeigen, dass ein kollagenolytisches Enzyme (heute als MMP-1 bekannt) in Hautzellen von Kaulquappenschwänzen die Kollagen-Tripelhelix degradiert.

MMPs kommen in den meisten lebenden Organismen einschließlich Bakterien vor. Sie sind an vielen physiologischen Prozessen, wie der embryonalen Entwicklung, der Organmorphogenese, der Angiogenese, der Apoptose, dem Nervenwachstum, dem Knochenumbau, an Wundheilungsprozessen etc., beteiligt [52].

Die Enzyme werden von einer großen Anzahl von Zellen wie Leukozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Chondrozyten, Hepatozyten und Osteoklasten sezerniert [53] und liegen zuerst in einer inaktiven Vorstufe (Proenzym) vor. Das Proenzym besteht aus einem Signalpeptid, einer Propeptidregion und einer katalytischen Domäne mit der hochkonservierten Zink-bindenden Region, in der drei Histidine über Wasserstoffbrückenbindungen das Zink-Ion richtig ausrichten [54]. Das Zink-Ion geht des Weiteren eine kovalente Bindung mit einem Cystein der Pro-Domäne ein. Aufgrund dieser Konformation ist die Enzymaktivität gehemmt [55]. Im Anschluss an die katalytische Domäne folgen die freibewegliche Gelenk-Region und

die Hämapexin-Domäne, die für die Substratbindung verantwortlich ist. Die schrittweise Aktivierung der MMPs erfolgt durch proteolytische Abspaltung der Pro-Domäne und einer dadurch einhergehenden Konformationsänderung [56, 57]. Dieser Vorgang ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

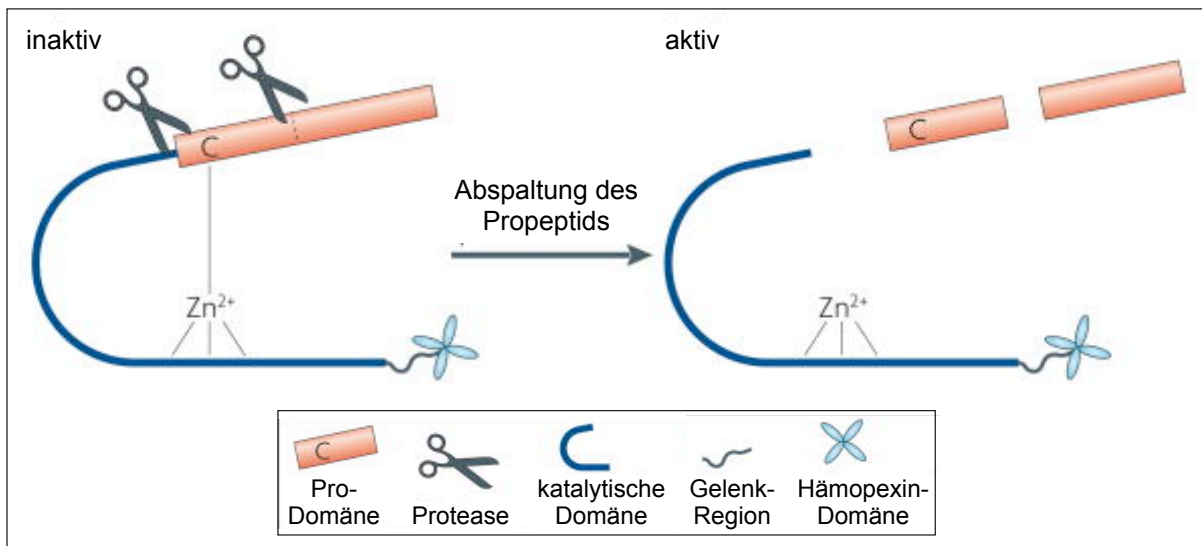


Abbildung 2: Schematische Struktur von Matrixmetalloproteinasen (verändert nach [58]). Der Aufbau der MMPs umfasst die Pro-Domäne, die katalytische Domäne und die Hämapexin-Domäne. Die Aktivierung des inaktiven Proenzym erfolgt durch proteolytische Abspaltung der Pro-Domäne, die sich aus der Propeptidregion und einem Signalpeptid zusammensetzt. Die Bindung des Zink-Ions erfolgt über ein Cystein aus der Pro-Domäne und drei Histidinen aus der katalytischen Domäne.

MMPs werden aufgrund ihrer Substratspezifität, Vorkommen und Struktur in sechs Klassen unterteilt (Gordon Research Conference on MMP, 1997, Andover, USA): Gelatinasen, Kollagenasen, Stromelysine, membransträndige MMPs, Matrilysine und nicht klassifizierbare MMPs. Nahezu alle Bestandteile der ECM sind Substrate der Mitglieder dieser verschiedenen Klassen.

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass MMPs durch den kontrollierten Abbau der ECM eine wichtige Rolle bei der Homöostase in vielen Bereichen des Körpers spielen. Somit sind MMPs auch am physiologischen Gewebeumbau (Tissue Remodeling) beteiligt. Besonders wichtig ist dies für die Entwicklung und Regeneration von Geweben. Dies wird deutlich an Prozessen wie Zelladhäsion und -migration sowie an intrazellulären Prozessen, wie Zellproliferation, -differentiation und Apoptose [59, 60].

Die Endopeptidasen haben aber auch einen entscheidenden Anteil an verschiedenen Prozessierungsschritten von Signalmolekülen, wie Cytokinen und Chemokinen, Liganden und Rezeptoren [57, 61].

Die Expression von MMPs im physiologischen Zustand ist relativ gering und wird streng reguliert. Auf Ebene der Transkription geschieht das über Wachstumsfaktoren, Cytokine, Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte [62].

Zusätzlich wird die Regulation der MMP-Enzymaktivität über spezifisch endogene Inhibitoren vermittelt, den sogenannten TIMPs (Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases) [63]. Diese ermöglichen durch Inaktivierung eine jeweilige Anpassung der MMP-Aktivität an die gegenwärtige Situation in der ECM [64].

Wird dieses Gleichgewicht gestört, kommt es zu einem unkontrollierten Auf- oder Abbau der ECM. Damit verbundene pathologische Prozesse sind Inflammation, unkontrolliertes Zellwachstum, Angiogenese oder Migration von Zellen [54, 65]. Diese Vorgänge spiegeln sich entsprechend in verschiedenen Krankheiten, wie z. B. Tumorbildung und Metastasierung, Arteriosklerose, Arthritis und Multipler Sklerose, wider [66-69].

1.4.1.1. MMP-2 und MMP-9

Invasives Wachstum und Tumormetastasierung beginnt meist mit dem Durchbruch der Basalmembran der betreffenden Gewebeschicht [70, 71]. MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B) scheinen hierbei eine besondere Schlüsselrolle zu spielen, da diese Matrixmetalloproteinasen vornehmlich Typ-IV-Kollagen spalten, aus der die Basalmembran zu einem großen Teil besteht. Begünstigt wird die Bindung von Kollagenen durch drei Fibronectin-Typ-II-Wiederholungssequenzen innerhalb der katalytischen Domäne [72].

In zahlreichen experimentellen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Krebserkrankung und erhöhter enzymatischer Aktivität von MMP-2 und -9 festgestellt werden. Dabei konnten MMP-2 und MMP-9 sowohl in den Tumorzellen selbst als auch in den angrenzenden Stromagebieten nachgewiesen werden [73-75].

Die inaktive Form von MMP-2 besitzt ein Molekulargewicht von 72 kDa, die der aktiven Form hingegen 66 kDa. Die Aktivierung der Proenzyme erfolgt über die Abspaltung der Pro-Domäne, wodurch die Bindung des Zink-Ions an ein hoch konserviertes

Cystein der Prodomäne unterbrochen wird (Abb. 2). Dieser sogenannte „cyteinswitch“ bewirkt eine Konformationsänderung und die Enzymaktivitätshemmung wird aufgehoben [55]. Das Enzym wurde erstmals 1979 von Liotta et al. beschrieben [76]. Neben der Degradierung der Basalmembran, trägt MMP-2 auch zur Zelldifferenzierung, der Apoptose, der Angiogenese, der Immunantwort und dem Tumorzellwachstum bei [77]. MMP-2 kann außerdem MMP-9 und MMP-13 aktivieren [78].

MMP-9 besitzt in der aktiven Form ein Molekulargewicht von 86 kDa und als Proenzym 92 kDa. Das Enzym ist in unzähligen humanen Krebserkrankungen nachgewiesen worden. Dabei konnte eine Korrelation zwischen vermehrter MMP-9-Expression und Tumorprogression und Metastasierung nachgewiesen werden [79, 80].

1.5. Apoptose, Nekrose und Autophagie

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein genetisch kontrolliertes Selbstmordprogramm der Zelle [81]. Dieser Mechanismus ist lebensnotwendig für die Entwicklung und Aufrechterhaltung vielzelliger Organismen. So spielt Apoptose einerseits eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung von Organsystemen und beispielsweise der Ausbildung von Gliedmaßen, andererseits auch für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase erwachsener Gewebe und Organe sowie für die schnelle und selektive Entfernung schädlicher Zellen (Tumorzellen), virusinfizierter Zellen oder antiimmunreaktiver Zellen, die sich gegen körpereigene Antigene richten [82, 83]. Apoptose wird von der betreffenden Zelle selbst aktiv ausgeführt, ist also Teil des Stoffwechsels der Zelle. Dieser biochemische, ATP-abhängige Prozess unterliegt einer strikten Kontrolle, weil Enzyme, die bei der Apoptose einen entscheidenden Beitrag leisten, wie z. B. Caspasen, in Vorstufen vorrätig vorliegen und jederzeit aktiviert werden können. Außerdem gewährleisten die Kontrollmechanismen, dass die Zelle ohne Schädigung des umliegenden Gewebes durch Entzündungsreaktionen eliminiert wird [84].

Beim nekrotischen Zelltod, der meist durch äußere Einflüsse verursacht wird, kommt es zur Auflösung der Membranintegrität, wodurch die zellulären Kompartimente in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Dies führt in der Regel zu Entzündungsreaktionen des umliegenden Gewebes. Nekrose kann durch verschie-

dene Stimuli verursacht werden, wie z. B. eine akute zelluläre Verletzung durch Hitze oder starke Strahlung, Nährstoff- und Sauerstoffmangel, eine Infektion mit Bakterien oder Viren.

Das Auslösen der Apoptose kann über verschiedene Stimuli erfolgen [85]. Es gibt zwei wesentliche Signalwege, die schematisch in Abbildung 3 gezeigt werden, über die Apoptose vermittelt werden kann: den extrinsischen (Rezeptor-vermittelten) und den intrinsischen (mitochondrialen) Aktivierungsweg [86-88].

Der extrinsische Signalweg erfordert die Bindung eines extrazellulären Liganden an einen von der Zelle präsentierten Todesrezeptor, wie z. B. den TRAIL-, FAS- oder TNF-Rezeptor [89, 90]. Diese trimerisieren nach der Ligandenbindung. Darauf folgt die Bildung eines zytosolischen Signaltransduktionskomplexes (DISC; death-inducing signaling complex) und eine signalverstärkende Aktivierung nachgeschalteter Faktoren [91]. Das Resultat ist die autokatalytische Aktivierung der Pro-Caspase-8 oder-10 (Initiator-Caspasen), die wiederum die Effektor-Caspasen-3/-6/-7 aktivieren, die dann letztendlich Apoptose auslösen [92-94].

Der intrinsische Signalweg wird beispielsweise nach Schädigung von Mitochondrien oder der DNA oder bei Anwesenheit einer hohen intrazellulären Kalziumkonzentration angeschaltet. Über Tumorsuppressoren, wie z. B. p53, werden proapoptische Faktoren der Bcl-2-Familie stimuliert, die zu einem Ungleichgewicht an der Mitochondrienmembran beitragen. Die Destabilisierung der Membran führt zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Cytochrom c bindet an APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1) und bildet zusammen mit Caspase-9 und ATP einen Komplex, das sogenannte Apoptosom [95]. Dies führt am Ende zur Aktivierung der Initiator-Caspase-9. Diese aktiviert wiederum die Effektor-Caspasen-3/6/7 [94, 96, 97].

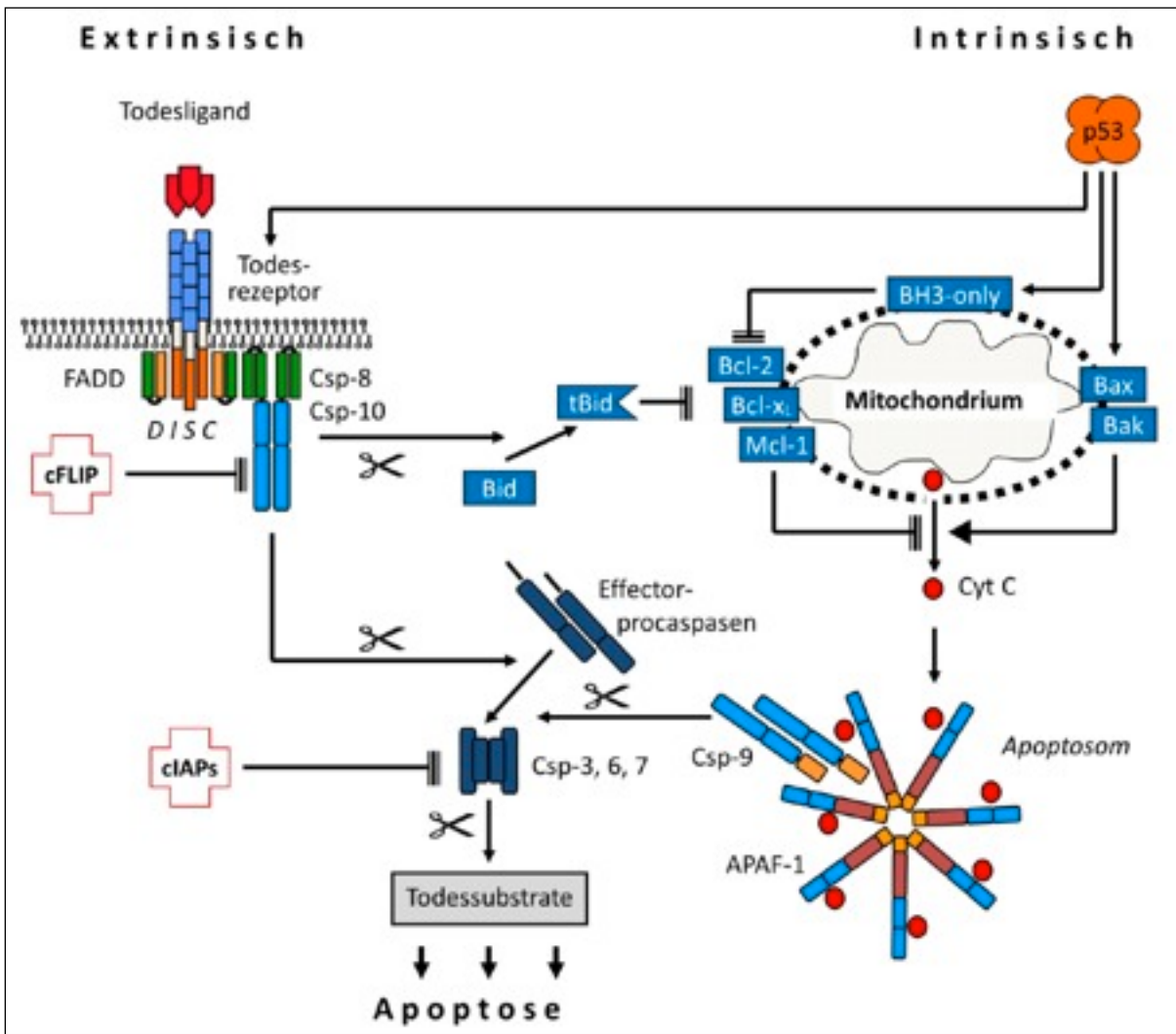


Abbildung 3: Extrinsischer und intrinsischer Apoptose-Signalweg [98]. Der extrinsische Signalweg wird über einen Todesrezeptor, wie TRAIL, FAS oder TNF, ausgelöst. Die Bindung von Liganden an die Todesrezeptoren führt zur Bildung eines Signaltransduktionskomplexes (DISC), der wiederum die Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und 10 bewirkt. Diese aktivieren die Effektor-Caspasen-3, 6, und 7.

Der intrinsische Signalweg wird über den Tumorsuppressor p53 vermittelt. p53 reguliert vor allem Faktoren, wie Bax und BH3-only-Proteine, aus der Gruppe der Bcl-2-Proteine. Eine Erhöhung der Konzentration solcher pro-apoptotischen Proteine führt zu einer Destabilisierung der Mitochondrienmembran und zur Ausschüttung von Cytochrom c. Cytochrom c bildet zusammen mit APAF-1 und Caspase-9 das Apoptosom, welches die Effektor-Caspasen-3, 6 und 7 aktiviert.

Charakteristisch für apoptotische Zellen ist eine Reduktion des Zellvolumens, Chromatin-Kondensation und enzymatische DNA-Fragmentierung in Bruchstücke der Größe von etwa 180-200 Basenpaaren (DNA-Leitern) unter Aufrechterhaltung der Membranintegrität [99]. Auch die Zytoplasmamembran weist charakteristische Ver-

änderungen auf, wie die Bildung von Membranausstülpungen (membrane blebbing). Im Verlauf der Apoptose schnüren sich exozytotische Membranvesikel von der Plasmamembran ab. Sie enthalten Fragmente der Zelle und werden als apoptotische Körperchen (apoptotic bodies) bezeichnet. Die Vesikel werden dann durch Makrophagen und Nachbarzellen aufgenommen, ohne dass es zur Freisetzung von zytosolischen Bestandteilen in den extrazellulären Raum kommt [100]. Dementsprechend werden Entzündungsreaktionen und Schädigungen benachbarter Gewebe, wie es bei der Nekrose der Fall ist, vermieden [101, 102].

Eine andere Möglichkeit den gezielten Zelltod auszulösen, ist die ER-induzierte Apoptose, die bei Stresssignalen im Endoplasmatischen Retikulum aktiviert wird [103]. Solche Stressfaktoren können die Akkumulation von falsch maturierten Proteinen im ER (unfolded protein response, UPR) [104], Glucosemangel oder Deregulation des Kalzium-Metabolismus [105] sein. Dieser Signalweg ist unabhängig vom intrinsischen oder extrinsischen Apoptosesignalweg. Eine Schlüsselrolle übernimmt dabei Caspase-12, das mit dem ER assoziiert ist und durch ER-Stress aktiviert wird [106]. Dieser Signalweg kann bei verschiedenen Erkrankungen, wie z. B. neurodegenerative Störungen, Entzündungen, viralen Infektionen und Krebserkrankungen [107, 108], zum Tragen kommen.

Ein weiterer Mechanismus, der ebenfalls mit dem Zelltod enden kann, ist die Autophagie [109]. Wie die Apoptose wird auch die Autophagie genetisch reguliert und ist evolutionär hochgradig konserviert. Der Prozess der Autophagie kommt bei kurzzeitiger Limitierung von Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren zum Tragen und hilft Zellen, kurze Zeitspannen, in denen Mangelzuständen herrschen, zu überleben. Charakteristisch für diesen Überlebensmechanismus ist der partielle Selbstverdau der Zelle, d. h. der Abbau zelleigener Bestandteile, wie Proteinen und Organellen [110]. Dabei werden die zu degradierenden Komponenten von einer Isolationsmembran umschlossen (Autophagosom) und durch saure Degradation zersetzt. Diese Vorgänge sind wichtig, um eine geregelte Zelldifferenzierung und -entwicklung sowie die allgemeine Homöostase zu gewährleisten. Änderungen dieser Vorgänge gehen daher oft mit bestimmten Krankheiten einher, wie z. B. neurodegenerativen Störungen, Immun- oder Krebserkrankungen [111, 112]. Dauerhafter Zellstress führt letztlich zum autophagischen Zelltod. Dieser kann sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-

unabhängig induziert werden und verdeutlicht die enge Verzahnung von Apoptose und Autophagie [113, 114].

Einen Überblick der charakteristischen Merkmale, Unterschiede und Funktionen von Apoptose, Nekrose und Autophagie gibt Tabelle 1 wider.

Tabelle 1: Überblick verschiedener Zelltodtypen. Zusammenfassung zelluläre Veränderungen während des Zelltodes und Funktion der unterschiedlichen Prozesse für den Organismus.

Zelltodtyp	Charakteristika	Funktion
Apoptose	Zellvolumenverkleinerung	embryonale Entwicklung Homöostase
	Chromatinkondensation	
	Abbau von Zellkompartimenten	
	Vesikelbildung	
	ATP-abhängig	
	entzündungsloser Prozess	
	genetisch kontrolliert	
Nekrose	Anschwellen und Platzen der Zelle	Alternativer Zelltod bei großen Zellschäden
	passiver Zelltod durch ATP-Mangel verursacht Entzündung	
	nicht genetisch kontrolliert	
Autophagie	Abbau zelleigener Bestandteile	Überbrückung kurzer Zeitspannen von Nährstoffmangel
	Autophagosom	
	lysosomale Proteolyse	
	ATP-abhängig	
	entzündungsloser Prozess	
	genetisch kontrolliert	

Das Hauptinteresse der Forschung an Apoptose liegt in der Analyse ihrer Bedeutung für die Pathogenese von Erkrankungen. Werden z. B. maligne entartete Zellen nicht rechtzeitig eliminiert, kann es zur Bildung von Tumoren kommen [115, 116]. Das fehlerhafte Eliminieren von selbstreaktiven Abwehrzellen begünstigt z. B. Autoimmunkrankheiten [117]. Ein Übermaß an Apoptose-Aktivität hingegen führt zur Entstehung von degenerativen Erkrankungen wie z. B. Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und anderen neurodegenerative Erkrankungen.

Um neue therapeutische Ansätze gegen diese Erkrankungen zu finden, hat die Analyse aller beteiligten Proteine und ihren Interaktionspartner sowie das Aufdecken

von Regulationsmechanismen, in den letzten Jahren einen hohen Stellenwert bekommen [118].

1.5.1. Annexine

Annexine sind eine große Gruppe von Proteinen, die Calcium-abhängig an Lipide der Zellmembran binden. Sie werden unterteilt in die Familien A (Vertebraten), B (Invertebraten), C (Pilze, einige einzellige Eukaryoten), D (Pflanzen) und E (Protisten) [119]. Annexine sind an vielen zellulären Prozessen, wie Endo- und Exozytose, Entzündungshemmung, Signaltransduktion, Zellproliferation, Apoptose, Tumorentwicklung, Invasion und Metastasierung, beteiligt [120, 121].

In gesunden Zellen befindet sich das Membranlipid Phosphatidylserin (PS) von außen unzugänglich auf der Innenseite der Zellmembran. Die Asymmetrie der Zellmembran wird durch Phospholipid-Translokasen, wie den ATP-abhängigen Flippasen (Transport zur zytoplasmatischen Seite) und Floppasen (Transport zur exoplasmatischen Seite) oder Scramblasen (beidseitiger Transport), aufrechterhalten [122]. Während der Apoptose geht diese asymmetrische Verteilung aufgrund der Inaktivierung von Flippase frühzeitig verloren [123]. Die Calcium-abhängige Scramblase hingegen wird aktiviert und bewirkt die Expositionierung von PS auf die Außenseite der Zellmembran [124]. Die Präsentation von PS auf der Außenseite der Zellmembran ist ein Erkennungsmerkmal für Phagozyten, weil diese über einen PS-Rezeptor verfügen [125]. Sie erkennen und eliminieren die von apoptotischen Zellen gebildeten „apoptotic bodies“, ohne dass sich im Weiteren Verlauf entzündliche Reaktionen einstellen [126].

Aufgrund dieser Eigenschaften kann PS als Marker benutzt werden, um apoptotische Zellen *in vitro* oder *in vivo* zu detektieren. Bei vielen pathologischen Erkrankungen spielt Apoptose eine wichtige Rolle. Das Aufspüren von apoptotischen Zellen trägt nicht nur dazu bei, Gewebestrukturen mit veränderter Apoptose-Rate zu lokalisieren, sondern auch die Entwicklung dieser Bereiche zu beobachten und zu analysieren sowie die Effizienz von Therapien zu bewerten.

Das Protein Annexin A5 (AnxA5) wurde 1985 erstmals als vaskulärer Gerinnungshemmer beschrieben [127]. Es handelt sich um eine nicht-glycosylierte Proteinkette von 319 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 35,7 kDa [128]. AnxA5

besitzt eine hohe spezifische, Calcium-abhängige Bindungsaffinität an PS-exprimierende Zellmembranen [129], welches es als Apoptose-Marker auszeichnet. Eine wichtige Rolle spielt AnxA5 bei immunmodulatorischen Effekten und als Inhibitor bei der Blutgerinnung [130].

Die Kopplung von Farbstoffen oder radioaktiven Tracern an Annexin A5 bietet die Möglichkeit, früh-apoptotische Zellen mittels verschiedenster Techniken, wie Mikroskopie, Durchflusszytometrie oder nuklearen Bildgebungsmodalitäten, nachzuweisen [131].

1.6. Wirkstoffträger: Vergleich von Polyethylenglycol und XTEN

Polyethylenglycol (PEG) ist ein wasserlösliches Polymer mit der allgemeinen Summenformel $C_{2n}H_{4n+1}O_{n+1}$. Je nach Kettenlänge liegt PEG in flüssiger oder fester Form vor. Gelöstes PEG besitzt die Fähigkeit, viel Wasser zu binden und eine Wasserhülle zu bilden. PEG findet vor allem Verwendung als Wirkstoffträger in den Bereichen Medizin, Pharmazie und der Industrie. Aufgrund seiner niedrigen Toxizitätswerte wird PEG seit Jahrzehnten in Nahrungsmitteln, Kosmetika und Medikamenten eingesetzt (erlaubte Tagesdosis nach WHO 10 mg/kg Körpergewicht). Die Ausscheidung bis zu einem Molekulargewicht von 5 kDa erfolgt über die Nieren, dieser Prozess nimmt mit steigender Molekülmasse ab. Biologisch abbaubar ist PEG hingegen nicht [132].

Die Modifizierung von Peptiden, Proteinen, Partikeln, Liposomen oder Chemotherapeutika mit PEG führt zu einer verminderten Ausscheidung über die Nieren, einer reduzierten Aufnahme durch das retikuloendotheliale System (RES) sowie einem verringerten enzymatischen Abbau. Die sich daraus ergebende Verlängerung der Blutzirkulationszeit bedingt eine erhöhte Bioverfügbarkeit der PEGylierten Wirkstoffe. Außerdem reduziert die Abschirmung mit PEG die Aggregation der Konjugate untereinander und führt durch sterische Stabilisierung zu erhöhter Stabilität während der Lagerung und Anwendung [133, 134]. Zusätzlich wirken PEGylierte Substanzen im Organismus weniger immunogen und werden langsamer abgebaut. PEGylierte Pharmaka sind beispielsweise PEG-Interferone (PegIntron®, Pegasys®) und PEGylierte Doxorubicin-Liposomen (Doxil/Caelyx®), die bereits erfolgreich klinisch angewendet werden.

Den aufgezeigten Vorteilen stehen jedoch einigen Nachteilen gegenüber. Die schlechte Abbaubarkeit kann zu Nebenwirkungen durch Hypersensitivität im Organismus führen. So wurde in Tiermodellen eine Vakuolenbildung in Nierenendothelzellen beobachtet [135]. Außerdem konnte in Mäusen und Hunden die Produktion von Antikörper gegen PEG induziert werden [136]. Des Weiteren wurden Antikörper in gesunden Blutspendern entdeckt, die wahrscheinlich auf die weite Verbreitung von PEG in Lebensmitteln und Kosmetika zurückzuführen sind. Durch Aufnahme von PEGylierten Substanzen bilden sich hauptsächlich anti-PEG IgMs. Dieser Umstand könnte die Anwendung von PEGylierten Pharmaka sowie ihre Mehrfachanwendung negativ beeinflussen, da sich die verlängerte Blutzirkulationsdauer reduzieren kann oder unerwarteten Änderungen des pharmakokinetischen Verhaltens und damit der Wirksamkeit auftreten können [137, 138].

Die Entwicklung von Alternativen zu PEG wird vor allem im Bereich der therapeutischen Anwendungen vorangetrieben. Als natürliche Polymere werden dafür unter anderem Heparin, Dextran und Chitosan untersucht. Auch synthetische Polymere, wie z. B. Polyaminosäuren oder Vinylpolymere, wurden analysiert [134]. Allerdings gibt es bisher keine hinreichenden Untersuchungen zur Biokompatibilität und Degradation dieser Polymere. Außerdem können natürliche Polymere, wie Heparin, in Interaktion mit anderen Proteinen treten [139], was sich negativ auf ihre kinetischen Eigenschaften auswirken kann. Ein weiterer Nachteil bei der Anwendung von Polymeren ist die Wechselwirkung mit dem Immunsystem und auftretende Hypersensitivitätsreaktionen [134]. Überdies können die monomeren Abbauprodukte, wie z. B. Acrylamid von Polyacrylamid, toxisch wirken. Bis auf die Polyaminosäuren sind synthetische Polymere nicht biologisch abbaubar und ihr Verbleib im Organismus unklar. Besonders in Hinblick auf Mehrfachanwendungen sind diese Punkte kritisch zu betrachten.

Eine weitere Möglichkeit für die Entwicklung von Wirkstoffträgern führt in den Bereich von Fusionsproteinen. Die Expression von zwei nacheinander liegenden Genen oder Genteilen wird normalerweise von einem Stopp-Codon getrennt. Durch die Entfernung des Stopp-Signals entsteht ein verlängertes Protein, welches sich durch neue Eigenschaften auszeichnet. Ein durch Translokation in weißen Blutkörperchen

entstehendes Fusionsprotein ist BCR-ABL, Verursacher der chronisch myeloischen Leukämie [140].

Eine durch *in vitro* Evolution erzeugte Peptidsequenz namens XTEN vereint alle genannten positiven Eigenschaften von PEG [141, 142]. Das Design der Sequenz wurde so ausgewählt, dass eine Abfolge von Aminosäuren entstand, die ein lösliches, chemisch stabiles, unstrukturiertes Polypeptid bildet, welches eine hydrodynamische Wasserhülle erzeugt. Aminosäuren, die eine Ladung tragen, die zu Struktur- bildung neigen, Interaktionen mit anderen Proteinen begünstigen oder mit dem Immunsystem assoziiert sind, wurden ausgeschlossen. Die optimierte Peptidsequenz besteht aus einer Abfolge der Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin, Prolin, Alanin, Serin und Threonin. Die Eigenschaften dieser Peptidsequenz beinhalten die Ausbildung einer Hydrathülle, welche als Barriere für proteolytische Enzyme und Immunzellen dient und folglich die Verlängerung der Blutzirkulationsdauer bewirkt. Eine Reaktion des Immunsystems auf XTEN konnte in *in vivo* Studien ausgeschlossen werden [141]. Des Weiteren bewirkt die XTEN-Sequenz eine Erhöhung der Stabilität des Fusionsproteins und ist, im Gegensatz zu PEG, biologisch abbaubar. Das Peptid konnte bisher in seiner Länge variabel zwischen 36 und 912 AS verwendet werden, um in den unterschiedlichsten Systemen eine optimale Zirkulationsdauer zu erhalten und eine optimale Wirkdauer am Zielort zu erreichen [141]. Bei der Expression in *E. coli* Zellen wird die gewünschte Peptid- oder Proteinsequenz zusammen mit der XTEN-Sequenz exprimiert. Nachträgliche Kopplungsschritte, wie bei PEG-Wirkstoffen, sind aufgrund der vereinfachten Herstellung nicht mehr notwendig. Ein weiterer Vorteil den die XTEN-Sequenz bietet, ist, dass das Endprodukt in definierter, monodisperser Form vorliegt, wohingegen bei der Synthese von den meist verwendeten längeren PEG-Molekülen ein polydisperses Größengemisch entsteht [143]. Monodispersität des Wirkstoffträgers, welche sich indirekt auch auf den Wirkstoff auswirkt, ist jedoch in Bezug auf Reproduzierbarkeit von Ergebnissen erstrebenswert. Die Reinigung von Fusionsproteinen aus den Wirtszellen gestaltet sich normalerweise schwer. Doch die hydrophilen Bindungseigenschaften der XTEN-Sequenz machen es als Protein-Tag für die Aufreinigung über ein Säulensystem nutzbar [144].

In Abbildung 4 ist eine Molekülmodell der Peptidsequenz XTEN, fusioniert an den Apoptosemarker Annexin A5, dargestellt. Das rekombinante Fusionsprotein besteht aus dem humanen AnxA5 [145] (PubMed Reference Sequence NP_001145.1), ver-

längert um 288 Aminosäuren der XTEN-Sequenz (XTEN-AnxA5). Die Form von XTEN ist allerdings in seiner Primärstruktur flexibel und nicht definiert. Zusätzlich kann ein endständiges Cystein (N-Terminus) für die Kopplung von Farbstoffen, radioaktiven Verbindungen oder anderen Reaktionspartnern genutzt werden.

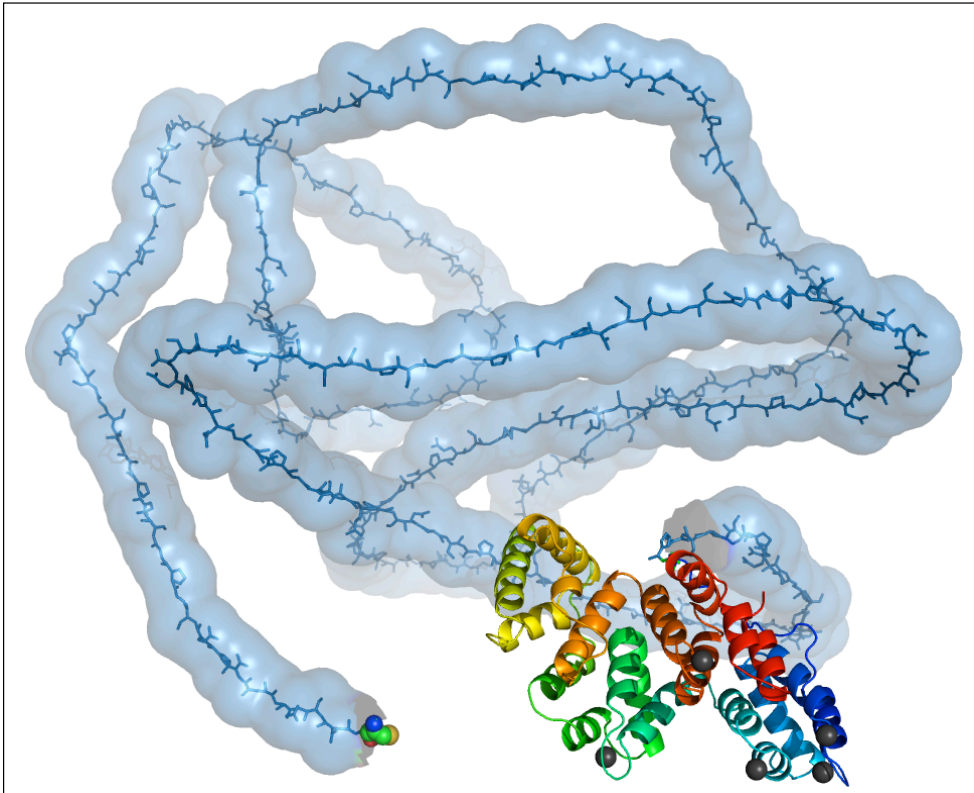


Abbildung 4: Strukturmodell des Fusionsproteins XTEN-Annexin A5 (zur Verfügung gestellt von Prof. Eyk. Schellenberger). Das Cystein am N-Terminus (farbige Kalotten) dient als Kopplungsstelle für weitere Reaktionspartner z. B. Farbstoffe. An das Cystein folgt das XTEN288 (blau). Am C-Terminus befindet sich in Tertiärstruktur Annexin A5 (farbig). Die Calciumionen (grau) sind Teil der Bindungsseite des Annexins, mit der es spezifisch an Phosphatidylserin-exponierende Zellmembranen bindet.

2. Materialien

2.1. Geräteliste

Bezeichnung	Firma	Land
1,5-Tesla-Magnetom-Sonata	Siemens	Deutschland
7-Tesla-Kleintier-MRT	Bruker	Deutschland
Aktivimeter ISOMED2010	Nucmed	Deutschland
Ausgießstation (Paraffin), EG1150H	Leica	Deutschland
Autoklav	Biomedis	Deutschland
Bakterienschüttler SI-300R	JEIO TECH	Korea
Bakterienwerkbank CaptairFlow	Erlab	Deutschland
BioLogic LP	BioRad	USA
Brutschrank, Hera cell	Hereaus Instruments	Deutschland
Durchflusszytometer, FACSCalibur	BD Biosciences	Deutschland
Eindeckautomat CV5030	Leica	Deutschland
Eismaschine	Ziegra	Deutschland
Färbeautomat, Autostainer XL	Leica	Deutschland
Feinwaage	Sartorius	Deutschland
Fluoreszenzmikroskop, Observer.Z1	Zeiss	Deutschland
Geldokumentation, G-Box	Syngene	England
Histokinette, TP1020	Leica	Deutschland
Kassettendrucker, IP C	Leica	Deutschland
Kryostat, Jung Frigocut 2800E	Leica	Deutschland
Kühlplatte, EG1140C	Leica	Deutschland
Labeldrucker xi	Leica	Deutschland
Mikroskop, Wilovert	Leica	Deutschland
Narkosebox, Matrix	Midmark	USA
Narkosesystem	Völker	Deutschland
MilliQ	Millipore	USA
PCR-Maschine, GeneAmp2400	Perkin Elmer	USA
pH-Meter	Sartorius	USA
Photometer, SPECORD	analyticjena	Deutschland
Plattenreader, Power Wave XS2	BioTek	USA
PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad	Deutschland

2. Materialien

Bezeichnung	Firma	Land
Relaxometer, Minispec	Bruker	Deutschland
Rotationsmikrotom, RI 12125RT	Leica	Deutschland
Rotationsmischer, Hula Mixer	Invitrogen	Norwegen
Schüttler, Shaker DRS-12	Elmi	Deutschland
SPECT-CT	Bioscan Europe	Frankreich
Sterilbank, Herasafe	Hereaus Instruments	Deutschland
Thermomixer	Eppendorf	Deutschland
Ultraschallbad, Sonorex	Bandelin	Deutschland
Vakuumpumpe, Laboport	KNF Lab	USA
Vortex-Genie2	Scientific Industries	USA
Waage	Kern	Deutschland
Wärmeschrank, Kendro	Hereaus Instruments	Deutschland
Wasserbad, HI 1210	Leica	Deutschland
Zellzähler, Casy	Innovatis	Deutschland
Zentrifuge, Centrifuge 5415D	Eppendorf	Deutschland
Zentrifuge, Centrifuge 5424R	Eppendorf	Deutschland
Zentrifuge, Centrifuge 5810R	Eppendorf	Deutschland
Zentrifuge, Megafuge 400R	Hereaus Instruments	Deutschland
Zetasizer, Nano ZS	Malvern Instruments	England

2.2. Chemikalien und Puffer

Alle verwendeten Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Carl Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen.

MagicMedia (#K6803, Invitrogen)

BugBuster, *E. coli* expression medium (#70584, Merck)

Inhibitor Cocktail (7#8437, Thermo Scientific)

MES

50 mM MES

50 mM Tris

0.1% SDS

1 mM EDTA

pH 7,3

SDS-Probenpuffer	62,5 mM TRIS-HCl 2,5 % (v/v) Glycerol 2 % (w/v) SDS	pH 6,8
10x PBS	1,37 M NaCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 18 mM KH ₂ PO ₄ 27 mM KCl	pH 7,4
Bindungspuffer	1,8 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES 150 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgCl ₂	pH 7,4
50x TAE in 0,5l aqua dest	2 M TRIS 50 mM EDTA 28,6 ml Eisessig	pH 8,3
DNA-Probenpuffer	30% Glycerin v/v 50 mM EDTA ≈0,001% Bromphenolblau w/v	
Equilibrierungspuffer DEAE	20 mM Tris 50 mM NaCl	pH 6.8
Gradientenpuffer DEAE	20 mM Tris 500 mM NaCl	pH 6.8
Equilibrierungspuffer UNOsphere Q	20 mM Tris 50 mM NaCl	pH 6.8
Gradientenpuffer UNOsphere Q	20 mM Tris 1000 mM NaCl	pH 6.8
Equilibrierungspuffer OctylSepharose	20 mM Tris 3200 mM NaCl	pH 7.5
Gradientenpuffer OctylSepharose	20 mM Tris 135 mM NaCl	pH 7.5

2.3. Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Reaktivität	Verdünnung	Firma
MMP-2	rabbit	mouse, human	1:333	abcam 37150
MMP-9	rabbit	mouse, human	1:1000	abcam 38898
Caspase 3	rabbit	mouse, human	1:200	abcam 13847
Caspase 7	rabbit	mouse, human	1:20	abcam 2323

2.4. Sekundäre Antikörper

Antigen	Farbstoff	Spezies	Reaktivität	Verdünnung	Firma
IgG - H&L	Rhodamine	goat	rabbit	1:200	abcam 6718
IgG - H&L	Cy5	goat	rabbit	1:200 - 1:300	abcam 6564

2.5. Größenstandards

Agarosegele wurden mit dem Ethidiumbromidersatzstoff GelRed (Biotium 41003) angefertigt.

Die Proteingele wurden aus dem SDS Gel Preparation Kit (Fluka 08091) angefertigt oder die NuPage Novex Bis-Tris Fertiggele (life technologies NP0323) benutzt. Der LDS Sample Buffer (4x) wurde ebenfalls aus der Serie NuPage verwendet. Die Gele wurden mit Coomassie Simply Blue SafeStain gefärbt.

Bezeichnung	Anwendung	Firma
100 bp DNA-Leiter	DNA-Marker (10-1000 bp)	Roth T833.1
20 bp DNA-Leiter	DNA-Marker (20-200 bp)	Roth 2805.1
Novex Sharp Pre-Stained	Protein-Marker (3,5-260 kDa)	life technologies 1175261

2.6. Enzyme

Bezeichnung	Firma
Matrixmetalloproteinase 9	Calbiochem PF024, Deutschland
Matrixmetalloproteinase 2	Calbiochem PF023, Deutschland

Bezeichnung	Firma
GM 6001 (MMP Inhibitor)	Calbiochem 364205, Deutschland
MMP2 / MMP9 InhibitorII	Calbiochem 444249, Deutschland
Benzonase	Novagen 25 U/μl, USA
NdeI	BioLabs R0111S, England
XhoI	BioLabs R0146S, England
RNase-Free DNase Set	Qiagen 79254, Deutschland

2.7. Aminosäuresequenz von XTEN288-AnxA5

CGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS
EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGS
PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS
ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSE
SATPESGPGTSTEPSEGSAPMAQVLRGTVTDFPGFDERADAETLRKAMKGLGTDEESILTLTTS
RSNAQRQEISAAFKTLFGRDLLDDLKSELTGKFEKLIVALMKPSRLYDAYELKHALKGAGTNE
KVLTEIIASRTPEELRAIKQVYEEYEGSSLEDDVVGDTSGYYQRMLVLLQANRDPDAGIDEA
QVEQDAQALFQAGELKWGTDEEKFITIFGTRSVSHLRKVFDKYM TISGFQIEETIDRETSGNLE
QLLLAVVKSIRSIPAYLAETLYYAMKGAGTDDHTLIRVMVSRSEIDLNFNIRKEFRKNFATSLYSM
IKGDTSGDYKKALLLLSGEDD

3. Methoden

3.1. Zellkultur

Die Kultivierung bzw. Subkultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte unter aseptischen Bedingungen bei den üblichen zellbiologischen Bedingungen (Zellkultur-Inkubator: 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂).

Zu den Medien der entsprechenden Zelllinien wurde stets 10 bzw. 20% fötales Kälberserum (Gibco) und 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco) hinzugegeben.

Vor und nach jedem Arbeitsschritt wurde eine lichtmikroskopische Kontrolle durchgeführt.

3.1.1. Eukaryotische Zellen

Zelllinie	Spezies und Gewebetyp	Kulturmedium	Morphologie
HT-1080	humanes Fibrosarkom	EMEM, Gibco	adhärent
BT-20	humanes unspezifisch duktales Mammakarzinom	EMEM, ATCC	adhärent
H69AR	humaner kleinzelliger Lungentumor, Multidrug Resistenz z. B. Doxorubicin (Adriamycin)	RPMI 1640, Gibco	adhärent
Jurkat	humane T-Zell-Leukämie	RPMI 1640, Gibco	Suspensionszellen
EL4	murines Lymphom	DMEM, Gibco	Suspensionszellen

3.1.2. Kryokonservierung, Lagerung und Auftauen von Zelllinien

Zur langfristigen Konservierung wurden die Zellen bei -150 °C eingefroren und gelagert. Adhärente Zellen wurden zuerst trypsinisiert und die Zellsuspension bei 1000 rpm (194 rcf) für 5 min zentrifugiert. Entsprechend der Größe des Zellpellets wurden die Zellen in Medium resuspendiert und verdünnt (5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml). Im Verhältnis 1:1 wurde Zellsuspension und Einfriermedium (FCS, 10 % DMSO) in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden dann gestuft bei -20 °C und dann

bei -80 °C für jeweils 24 h abgekühlt. Im letzten Schritt wurden die Röhren dann in der Ultra-Tiefkühltruhe eingefroren.

Zum Auftauen der Zelllinien wurden die Kryoröhren aus der Ultra-Tiefkühltruhe entnommen und bei 37 °C im Wasserbad für maximal 2 min aufgetaut. Die Zellen wurden in 20 ml Medium aufgenommen, 15 min ruhen gelassen und dann bei 194 rcf 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen vorsichtig im Medium resuspendiert.

3.1.3. Zellzahlbestimmung

Die manuelle mikroskopische Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (0,1 %-ige Lösung in PBS) gemischt (1:10), davon 10 µl in die Neubauerzählkammer pipettiert und die gefärbten Zellen in vier großen Felder (ein großes Feld entspricht 4 x 4 kleinen Felder) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zahl der gezählten Zellen wurde anschließend durch vier geteilt. Die Gesamtzellzahl ergibt sich dann wie folgt: $\text{Zellzahl} = n \cdot F \cdot V \cdot 10^4$. Dabei entspricht n der Zahl der gezählten Zellen, F dem Verdünnungsfaktor und V dem Gesamtvolumen.

Im Verlauf der experimentellen Arbeit wurde ein automatisierter Zellzähler (Casy) angeschafft, der die Zellzahlbestimmung sowie Vitalitätsuntersuchung übernahm.

3.1.4. Bestimmung der Vitalität von Zellen

Tote Zellen lassen sich mit dem sauren Farbstoff Trypanblau anfärben, während bei lebenden Zellen (mit wenigen Ausnahmen) dieser Farbstoff nicht in das Zellinnere eindringen kann. Nach der Trypsinierung (adhärente Zelllinien) und Waschung in PBS wurde zur Zellsuspension Trypanblaulösung (0,5 % in PBS) zugegeben und gemischt. Nach 5 min wurde ausgewertet.

3.1.5. Mycoplasmen-Nachweis

Mycoplasmen sind prokaryotische Mikroorganismen der frühesten Entwicklungsstufe. Im Gegensatz zu anderen Bakterien besitzen sie keine Zellwand und sind bei Tier und Mensch als Erreger von Krankheiten bekannt. Sie gefährden die Vitalität kultivierter Zellen, können deren Morphologie verändern und beeinflussen nachhaltig ih-

ren Stoffwechsel. Um eine Kontamination mit diesen Prokaryoten auszuschließen, wurden die Zellkulturen regelmäßig überprüft.

Dazu wurden 0,5 - 1,0 ml des Überstandes bzw. der Suspension abgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Darauf folgte ein Zentrifugationsschritt von 1 min bei 16000 rcf. Anschließend wurden 2 µl vom Überstand zum Ansatz hinzugegeben. Zur Detektion wurde das Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR von Minerva Biolabs verwendet.

Ansatz für 1 Reaktion: 15,0 µl PCR grade Water (DEPC-Wasser)
 2,5 µl 10x Reaction Buffer
 2,5 µl Primer/Nucleotid Mix
 2,5 µl Internal Control
 0,2 µl Polymerase (5 U/µl)

PCR-Programm: 1. Schritt: 2 min 94 °C
 2. Schritt: 30 sec 94 °C
 3. Schritt: 30 sec 55 °C
 4. Schritt: 30 sec 72 °C

} 40 Zyklen

3.2. Größenmessungen am Zetasizer

Bei Messungen am Zetasizer wird die dynamische Lichtstreuung zur Bestimmung von Partikel- und Molekülgrößen ausgenutzt. Bei dieser Methode wird die Probe mit einem Laser bestrahlt und das Streulicht analysiert. Die Diffusion von Partikeln durch Brown'sche Molekularbewegung verändert das Streulicht. Abgeleitet von diesen Werten wird dann die Größe und Größenverteilung der Partikel berechnet [146].

Die Auswertung der Daten kann je nach Fragestellung Volumen-gewichtet (Größe der Partikel im Verhältnis zum Gesamtvolumen) oder Anzahl-gewichtet (Anzahl verschiedener Partikel im Verhältnis zueinander) erfolgen.

Für die Zetasizer-Messungen mit Enzymzugabe (MMP-9) wurde ein Inkubationspuffer mit 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1,3 mM CaCl₂ und 50 µM ZnCl₂ bei einem pH-Wert von 7,5 verwendet. Außerdem wurde eine Temperatur von 37 °C gewählt.

3.3. Expressionsanalyse

Die Analyse der Expression von Genen (MMP-2 und MMP-9) von ausgesuchten Zelllinien wurde mittels Real-Time PCR (RT-PCR) durchgeführt.

3.3.1. RNA-Isolierung

Der erste Schritt sah die RNA-Isolierung sowie Konzentrationsbestimmung aus den Zellen vor. Die Isolation der mRNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen). Die Zellen wurden mit 1 % 2-Mercaptoethanol aufgeschlossen und über ein Säulensystem gereinigt. Nach einem zusätzlichen DNase-Verdau wurde die RNA in 30 μ l Nuklease-freiem Wasser eluiert.

3.3.2. Konzentrationsbestimmung

Die Ermittlung der Konzentration und Bestimmung der Qualität der Proben erfolgte photometrisch über die optische Dichte. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe der Formel: $c_{[\mu\text{g/ml}]} = \text{OD}_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Multiplikationsfaktor}$. Der Multiplikationsfaktor für RNA ist definiert mit 40, weil eine Absorption von 1 OD bei 260 nm einem Wert von 40 μg RNA pro Milliliter Lösung entspricht. Für die Bestimmung von ssDNA, wie cDNA, ist der Multiplikationsfaktor mit 33 definiert und für dsDNA mit 50.

Die Beurteilung der Qualität der Probe wurde über die Quotientenbildung der Extinktion von 260/280 nm durchgeführt. Die verwendeten Proben zeigten ausschließlich einen Wert von ≥ 2 , was einer reinen RNA-Präparation entspricht.

3.3.3. cDNA-Synthese

Im zweiten Schritt wurde die mRNA durch Reverse Transkription in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurden 1000 ng RNA zum vorbereiteten Mastermix hinzugegeben. Dieser enthielt im Ansatz für eine Probe 2 μ l 10x RT-Puffer, 0,8 μ l dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 100 mM, 2 μ l Radom Primer und 1 μ l Reverse Transkriptase (MultiScribe 50 U/ μ l). Das etablierte Programm lief in einer PCR-Gerät. Im Anschluss wurde wiederum, wie im Kapitel 3.3.2. beschrieben, die Konzentration und Reinheit der cDNA bestimmt.

- Programm:
1. Schritt: 10 min 25 °C (Primer-Annealing)
 2. Schritt: 120 min 37 °C (Reverse Transkription)
 3. Schritt: 5 min 85 °C (Inaktivierung des Enzyms)

3.3.4. Real-Time PCR

Die quantitative RT-PCR wurde unter Verwendung von TaqMan® Gene Expression Assays und des ABI Prism™ 7000 HT Sequence Detection System der Firma ABI (Applied Biosystems) durchgeführt. Die vorgefertigten Assays enthielten jeweils zwei bereits getestete Primer für das entsprechende Gen sowie eine Fluoreszenzsonde (TaqMan Probe).

An die genspezifische Sonde waren zwei Farbstoffe gekoppelt, am 5'-Ende saß der Reporterfarbstoff (FAM) und am 3'-Ende der Quencherfarbstoff (TAMRA). Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Farbstoffe wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes unterdrückt. Dieses Phänomen wird als FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer) bezeichnet [147]. Während des kombinierten Annealing/Elongationsschrittes wurde die Sonde von der Taq-Polymerase verdrängt und hydrolysiert, der FRET wurde folglich unterbrochen. Das entstehende Fluoreszenzsignal wurde im Anschluss an jeden PCR-Zyklus gemessen. Die eigentliche Quantifizierung der zu untersuchenden Probe erfolgte durch die Analyse des Anstieges des Fluoreszenzsignals.

Der Ct-Wert (Threshold Cycle) ist die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet, der gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht ist. Die relativen Unterschiede in der Genexpression der untersuchten Gene wurden anhand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode ermittelt [148]. Als Referenz für die Expression des zu untersuchenden Zielgens wurden zwei Housekeeping-Gene β -Actin und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Außerdem wurden alle Proben als Triplikate untersucht.

- Ansatz für 1 Reaktion:
- 25,0 μl Universal Mastermix (Applied Biosystems)
 - 21,5 μl DEPC- H_2O
 - 2,5 μl Primer/Sonde (Assays-on-Demand, AB)
 - 1,0 μl cDNA (20 ng/ μl)

PCR-Programm: 2 min 50 °C
 10 min 95 °C
 15 sec 95 °C } 40 Zyklen
 1 min 62 °C }

3.4. Histologie

Nach Entnahme der Organe wurden die Proben entweder sofort fixiert oder durch Schockfrieren (Lagerung anschließend bei -80 °C) konserviert. Bei der Fixierung der Gewebe wurde entweder für 24 h in 4 % Paraformaldehyd oder in Zinkfixativ [149] inkubiert. Anschließend wurden die Gewebestücke in einem Einbettautomat über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraffinblöckchen eingebettet.

Das Anfertigen von Gewebeschnitten wurde dann entsprechend am Rotationsmikrotom (Paraffinschnitte) oder am Gefriermikrotom (Kryostatschnitte) durchgeführt. Einen Vorteil bieten Kryostatschnitte für die Immunhistochemie, da bei diesen die Antigenität besser erhalten bleibt. Nachteilig ist der schlechtere Erhalt der morphologischen Details. Durchlicht- und Fluoreszenzbilder wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Oberver.Z1) aufgenommen (Programm AxioVision).

3.4.1. *In situ* Zymographie

Mit Hilfe der *in situ* Zymographie können Bereiche in Gewebeschnitten mit spezifischer Enzymaktivität detektiert werden. Dazu wird ein Substrat (Gelatine) zeit- und dosisabhängig in Anwesenheit des entsprechenden Enzyms (MMP-2/9) verdaut. Der an die Gelatine gekoppelte, gequenchte Fluoreszenzfarbstoff (FITC) wird durch den Verdau freigesetzt und das entstehende Signal kann am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden [150].

Zuerst wurde 1 %ige Low Melting Agarose in PBS gelöst (60 °C). Die Gelatine (DQTM gelatin from pig skin, D12054, MoBiTec) mit einer Konzentration von 1 mg/ml in destilliertem Wasser wurde im Verhältnis 1:10 zur Agarose hinzugegeben. 100 µl der Lösung wurden auf den unfixierten Gefrierschnitt (8 µm) aufgebracht und mit einem Deckglas versiegelt. Die Proben wurden für 5 min auf 4 °C gestellt, um eine Gelierung zu bewirken. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in einer dunklen Feuchtkammer für 4 h. Anschließend wurde eine Kernfärbung mit Hoechst 33258 durchgeführt.

3.4.2. Berliner-Blau-Färbung

Zum Nachweis von dreiwertigem Eisen in Gewebe wurde eine Berliner-Blau-Färbung durchgeführt. Für diese Färbung eigneten sich Paraffinschnitte am besten, jedoch wurden auch Doppelfärbungen mit vorangehender Immunhistochemie gemacht, die dann mit Kryostatschnitten durchgeführt wurden.

- (1) Entparaffinieren der Paraffinschnitte bzw. Fixierung der Kryo-Gewebeschnitte in 4 % Paraformaldehyd und 15 min wässern
- (2) Inkubation in 1 % Kaliumhexacyanoferrat(II) (5 min)
- (3) Zugabe von 0,5 % HCl (30 min)
- (4) Spülen in dest. Wasser (2x)
- (5) Gegenfärbung mit 0,1 %iger Kernechtrot/Aluminiumsulfatlösung (10 sec)
- (6) Spülen in dest. Wasser (2x)
- (7) aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 % Ethanol je 2 min)
- (8) Xylol (10 min)
- (9) Eindecken mit Pertex

3.4.3. Immunhistochemie

Unfixierte Kryostatschnitte wurden für 5 - 10 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Bei Verwendung von Paraffinschnitten wurden diese entparaffiniert und 10 Minuten in Xylol inkubiert. Die anschließenden Inkubationen wurden bei Raumtemperatur in dunklen Feuchtkammern wie folgt durchgeführt:

- (1) waschen in 1x PBS-Puffer (2x 5 min)
- (2) Blocking mit 2 % BSA und 10% Goat Serum in 1x PBS-Puffer (1 h), Deckglas
- (3) waschen in 1x PBS-Puffer (1x 5 min)
- (4) Inkubation mit dem primären Antikörper gelöst in 1x PBS-Puffer (1 h), Deckglas
- (5) waschen in 1x PBS-Puffer (3x 5 min)
- (6) Inkubation mit dem sekundären Antikörper gelöst in 1x PBS-Puffer (über Nacht bei 4 °C), Deckglas
- (7) waschen in 1x PBS-Puffer (3x 5 min)
- (8) eventuell Zellkernfärbung mit 0,1 µg Hoechst (H33258)
- (9) eindecken mit Fluoromount, Mikroskopie
- (10) gegebenenfalls Lagerung bei -20 °C

Die Mikroskopie der *ex vivo* Tumorschnitte nach der NIRF-Bildgebung von 6S-IDCC-XTEN-AnxA5 und 6S-IDCC-AnxA5 wurde an unfixierten, 10 µm dicken Gefrierschnitten durchgeführt. Als Gegenfärbung diente eine Kernfärbung mit Hoechst 33258 (Bisbenzimid).

3.5. Durchflusszytometrie

Die Charakterisierung von apoptotischen Zellen wurde mit der sogenannten Durchflusszytometrie oder FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting)-Analyse durchgeführt. Bei der Vermessung der schnell, einzeln an einem monochromatische Laserstrahl vorbeifließenden Zellen, wird - in Abhängigkeit der zellulären Eigenschaften der Zelle - Streulicht durch Beugung und Streuung erzeugt. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle beeinflusst wird.

Außerdem besteht die Möglichkeit, durch Markierung von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Strukturen, die Zellen quantitativ zu analysieren. Dazu können Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper oder andere Farbstoff-gekoppelte Marker verwendet werden.

Die Detektion apoptotischer Zellen erfolgte über Markierung mit Farbstoff-gekoppeltem AnnexinA5 mit dem folgenden Protokoll:

- (1) Behandlung der Jurkat-Zellen (kleine Flasche, 25 cm²) bei mittlerer Dichte mit 9 µl/ml Camptothecin für 5 h
- (2) Zellen ernten, 5 min bei 194 rcf zentrifugieren
- (3) in 5 ml 1x PBS-Puffer + 10 % FCS resuspendieren
- (4) 5 min bei 194 rcf zentrifugieren
- (5) in 5 ml Bindungspuffer resuspendieren
- (6) Zellzahlbestimmung, 500 µl mit 1x 10⁶ Zellen/ml aliquotieren

Alle weiteren Schritte wurden auf Eis ausgeführt.

- (7) 15-30 min Inkubation mit 0,2 µg 6SI-DCC-XTEN-AnxA5 bzw. FITC-AnxA5 (FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences)
- (8) 5 min bei 194 rcf zentrifugieren
- (9) Zellen 30 min in 1 % Paraformaldehyd fixieren

(10) 5 min bei 194 rcf zentrifugieren und in Bindungspuffer resuspendieren

(11) bis zur FACS-Messung bei 4 °C lagern

Die Messungen wurden an einem FACSCalibur bei einer Extinktion von 488 nm (FITC) und 633 nm (NIRF-Farbstoff) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlowJo 8.7.

3.6. Proteinexpression und Aufreinigung

3.6.1. Bakterienstamm und Vektor

Bezeichnung	Firma
<i>E. coli</i> Stamm BL21 (DE3) gold	Agilent Technologies Deutschland
Vektor pET 30a(+)	Genscript USA

Der verwendete Bakterienstamm wurde speziell für die Expression von Fusionsproteinen entwickelt. Der erworbene Vektor enthielt die von uns entwickelte Sequenz von XTEN-AnxA5 und daran anschließend die Schnittstellen von NdeI und XhoI. Die DNA-Sequenz beginnt mit einem Codon für Cystein, an welches über eine Thiol-Reaktion weitere Moleküle, wie Farbstoffe, gekoppelt werden können. Ein weiteres Cystein, dass in der Annexin-Sequenz liegt, wurde durch Serin ersetzt, um unspezifische Bindungen zu verhindern (Abb. 5). Außerdem verfügte der Vektor über eine Antibiotikaresistenz gegen Kanamycin.

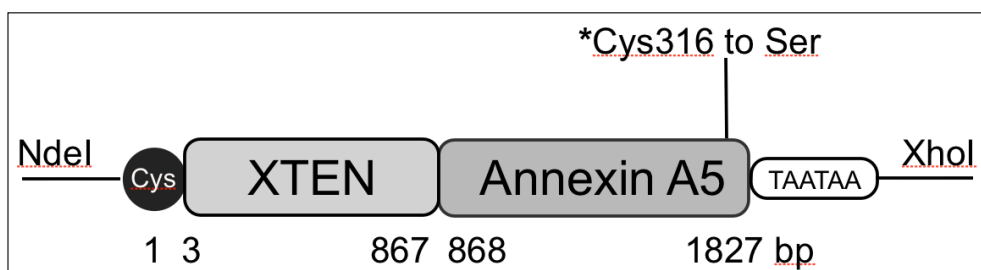


Abbildung 5: Modell der DNA-Sequenz von XTEN-Annexin A5. An das N-terminale Codon für Cystein schließt sich die XTEN-Sequenz sowie die humane Sequenz für Annexin A5 an. Am C-Terminus befindet sich das Stopp-Codon. Flankiert wird die Sequenz von Schnittstellen für die Enzyme NdeI und XhoI. Der Austausch der Aminosäure Cystein gegen ein Serin verhindert unerwünschte Thiol-Reaktionen.

3.6.2. Transformation

Die bei -80 °C eingefrorenen Hitzeschock-kompetenten Zellen wurden aufgetaut (auf Eis) und 0,5 µl des Vektors hinzugegeben. Nach 5 min Inkubation wurde über einen Hitzeschock von 50 sec bei 42 °C die Zellen transformiert. Nach einer Regenerationsphase von 4 min wurde 1 ml S.O.C. Medium hinzugegeben und die Zellen für 45 min bei 37 °C inkubiert. 100 µl der Suspension wurden auf eine Agarplatte mit 100 µg/ml Kanamycin ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C im Brutschrank aufbewahrt. Anschließend wurde die Platte mit Parafilm verschlossen und bis zu 3 Monate im Kühlschrank gelagert.

3.6.3. Bakterienkultur

Nach der Transformation wurde eine Kolonie der *E. coli* Zellen mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in 12 ml LB Medium (100 µg/ml Kanamycin) gegeben. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 30 °C bei 300 rpm geschüttelt.

2,5 ml der Vorkultur wurden dann in 100 ml MagicMedia *E. coli* Expression Medium überführt und für 6 h bei 300 rpm geschüttelt. Danach wurde die Temperatur auf 23 °C gesenkt und für weitere 24 h geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 4 °C bei 3220 rcf zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden gewogen und bei -80 °C gelagert oder sofort aufgeschlossen.

3.6.4. Bakterienaufschluss

Die Bakterienpellets wurden mittels Lysepuffer aufgeschlossen. Dieser enthielt Bug Buster (5 ml je 1 g Pellet), Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (1 Tablette auf 10 ml) und Benzonase (25 U/ml). Die Zellen wurden für 20 min im Rotationsmixer mit 90° geschwenkt. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C mit 21100 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem 0,45 µm Filter filtriert.

3.6.5. Proteinreinigung

Die Reinigung des Proteins wurde mit einer LPLC-Anlage (Low Pressure Liquid Chromatography, BioRad) über ein System mit drei verschiedenen Säulen durchgeführt.

Das Lysat wurde zuerst auf eine schwache Anionenaustauscher-Säule mit DEAE Cellulose aufgetragen. Der sich anschließende Waschschrift wurde über mehrere Säulenvolumen durchgeführt bis der UV-Detektor (Filter 280 nm) einen Wert nahe dem Ausgangsbereich anzeigte. Das gebundene Protein wurde dann über einen ansteigenden Salzgradienten wieder eluiert (von 50 auf 350 mM NaCl). Nach dem Vereinigen der relevanten Fraktionen, dem Konzentrieren mit dem Amicon Filtersystem (10.000 Da Cellulosefilter) und dem Umpuffern wurde die Probe auf eine zweite Säule, einen starken Anionenaustauscher (UNOsphere Q), aufgetragen. Auch hier wurde ein Waschschrift mit dem Equilibrierungspuffer durchgeführt bis der UV-Detektor den ungefähren Ausgangswert erreicht hatte. Die Elution des Proteins wurde über einen Gradientenlauf bewirkt (von 50 auf 500 mM NaCl). Die Bindung an das Säulenmaterial erfolgte, wie auch bei der ersten Säule, über das hydrophile XTEN selbst. Nach dem Zusammenfügen der Fraktionen, Konzentrieren und Umpuffern wurde die Probe auf eine dritte Säule aufgetragen. Das Säulenmaterial, Octyl-Sepharose, ist stark hydrophob und bindet die hydrophoben Anteile des Annexins. Nach einem Waschschrift wurde das Protein mittels Salzgradienten eluiert (von 3,2 auf 0 M NaCl). Nach der Überprüfung der Fraktionen in einem Proteingel wurden die Proben vereinigt, konzentriert und umpuffert (10 mM HEPES, 135 mM NaCl, pH 7.5). Die Proteinlösung wurde abschließend mit einem 0,22 µm Filter filtriert.

3.6.6. SDS-Page und Coomassie-Färbung

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Gradientengele (NuPage 4 - 12%), die Gelkammer Mini-Cell (XCell SureLock) und der 20x MES Laufpuffer der Firma Life Technologies verwendet. Die Proben wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und dann für 5 min bei 95 °C denaturiert. Mit einer Hamilton-Spritze wurden die Proben und der Proteinstandard in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 Volt durchgeführt. Anschließend wurden die Gele in kleinen Schalen mit dest. Wasser gespült und kurzzeitig in der Mikrowelle erhitzt (30 sec. 900 Watt). Nach 5 min Inkubation wurde der Vorgang noch zweimal mit neuem dest. Wasser wiederholt. Nach Abkippen des Wassers wurden 20 ml Simply Blue Safe Stain (Invitrogen) zugesetzt und die Gele abermals kurz erhitzt (nicht kochen). Nach 10 min wurde die Färbelösung durch Wasser ersetzt und mind. 10 min entfärbt. Die Aufnahmen der Gelbilder erfolgten mit der Software Gene Snap Version 7.09.

3.6.7. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung erfolgte mit Hilfe eines BCA-Assays (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

In eine 96-Well-Platte wurden 20 µl der Proteinlösung bzw. des BSA-Standards mit 200µl der Färbelösung vermischt und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Die Messung der Extinktion (562 nm) erfolgte in einem Plattenleser. Die Konzentration wurde anhand der ermittelten Eichkurve von BSA bestimmt. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass bei der Proteinkonzentrationsberechnung ein Korrekturfaktor von 1,3 multipliziert werden muss, der als Ausgleich für den Mangel der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bei der Sequenz von XTEN-AnxA5 dient.

3.7. Tierexperimentelle Methoden

Die Untersuchungen an den Versuchstieren wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt (Genehmigungsnummer: G 0246/08).

3.7.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche Mäuse im Alter von 5 bis 15 Wochen der Stämme CD-1 nu/nu Maus und BALB/c (Charles River, Deutschland) verwendet. Die Mäuse wurden im Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum und im Small Animal Imaging Center (SAIC) in Gruppen von zwei bis fünf Tieren in Makrolonkäfigen gehalten, welche mit einem staubarmen Holzgranulat (Altromin GmbH, Deutschland) versehen waren. Die Fütterung erfolgte durch die ständige Bereitstellung von Standard-Mäusehaltungsfutter (Altromin GmbH, Deutschland). Die Temperatur in den klimatisierten Räumen betrug 22 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 - 60% und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden.

Die Markierung der Tiere wurde mit Hilfe einer Ohrlochzange durchgeführt.

3.7.2. Subkutane Injektion von Tumorzellen

Vor der subkutanen (s. c.) Zellinjektion wurden die Mäuse in einer mit Isofluran gefluteten Narkosebox betäubt. Im weiteren Verlauf bekamen die Mäuse eine Isofluran-O₂-Inhalationsnarkose an einem offenen Narkosesystem (Völker GmbH, Deutsch-

land). Die Isofluran-Erhaltungsdosis betrug 2,0 bis 2,5% bei einem Flow von 1,5 l/min Sauerstoff.

Die geernteten und ausgezählten Zellen wurden in einem Volumen zwischen 100 und 150 µl Medium resuspendiert und mit einer sterilen 27 G-Nadel subkutan in die linke bzw. rechte Flanke appliziert. Die Kontrolle des Wachstumsverlauf der Tumore erfolgte alle drei Tage. Versuchstiere, die bereits vor Versuchsende Tumore mit maximal zulässiger Größe aufwiesen, wurden aus dem Versuch genommen.

Um optimale Wachstumsraten der Tumore zu erzielen, wurde für jede Zelllinie in einem Vorversuch die ideale zu injizierende Zellzahl und Wachstumszeit zur optimalen Größe eines Tumors ermittelt (Tab.2).

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien zur Bildung eines subkutanen Tumors sowie optimierte zu injizierende Zellzahl und Anwachszeit

Zelllinie	optimale Zellzahl	Wachstumszeit
BT-20	2×10^7	4 Wochen
HT-1080	5×10^6	10 Tage
H69AR	2×10^7	4 Wochen
HeLa	1×10^7	10 Tage
EL4	2×10^6	7 Tage

3.7.3. Chemotherapeutische Behandlungen

Nach dem Anwachsen der Tumore unter der Haut der Tiere wurde eine chemotherapeutische Behandlung durchgeführt, um Apoptose sowie Nekrose, auszulösen. Nachdem die Nacktmäuse stabile Tumore entwickelt hatten, wurden verschiedene Zytostatika getestet, um eine möglichst hohe Apoptose-Rate zu erhalten. Die ermittelten Behandlungsschemata für die verschiedenen Tumore sind hier aufgeführt.

Dosis für HT-1080/H69AR-Tumor: 10 mg/kg i. p. Doxorubicin 24 h vor der Bildgebung [151, 152]

Dosis für EL4-Tumor: 25 mg/kg Cyclophosphamid i. p. + 19 mg/kg i. p. Etoposide 24 h vor der Bildgebung [153]

Die Chemotherapeutika wurden von der Charité Klinik-Apotheke (Zytostatika-Zubereitung) angefertigt.

3.8. Bildgebung

3.8.1. Magnetresonanztomographie

Phantom-Messungen der PSOP

Die MRT-Untersuchungen von Protease-spezifischen Partikeln wurden am 1,5-T-Magnetom-Sonata (Siemens) im Institut für Experimentelle Radiologie, Charité Campus Mitte Berlin, durchgeführt. Es wurde eine Extremitätenspule verwendet. Für die Untersuchungen wurden 96-Well-Platten benutzt und die freien Lücken zwischen den Proben mit Wasser gefüllt. Während der Messung befand sich die Platte auf einem temperierten Untergrund von 37 °C. Die Gradientenechosequenz (TR: 100 ms, 12 TE zwischen 3,1-44,8 ms, Flipwinkel 40°) wurde 200x über eine Zeit von 50 min gemessen. Analysiert wurden zwei verschiedene PSOP-Varianten, mit 6- oder 12-facher Beschichtung des Peptid-PEGs auf der Partikeloberfläche in verschiedenen Konzentrationen (300 nM, 150 nM, 75 nM, 38 nM). Die Verlaufsanalyse wurde nach Enzymzugabe von 1,3 U MMP-9 durchgeführt. Außerdem wurde das Partikelverhalten nach Zugabe von MMP-2/MMP-9 Inhibitor II (30 µM) und 1,3 U MMP-9 überprüft. Des Weiteren wurde eine Inhibitorcurve nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von MMP-Inhibitor (ohne, 10^{-6} - 10^{-10} M) aufgenommen.

Phantom-Messungen der AnxA5-VSOP

Nach Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen wurden die unbehandelten und behandelten Zellen geerntet (jeweils ca. $2,5 \cdot 10^8$ Zellen) und in jeweils 30 ml Bindungspuffer aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden mit je 10 ml Bindungspuffer gewaschen und 5 min bei 445 rcf zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 7,5 ml Bindungspuffer aufgenommen und mit AnxA5-VSOP (1 µg Fe / ml) über 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml Bindungspuffer gewaschen und das Zellpellet am Ende in 100µl Bindungspuffer aufgenommen. Die Proben wurden im Kühlschrank gelagert und am Folgetag am MRT-Scanner gemessen. Kurz vor der MRT-Messung wurden die Zellpellets mit Wasser überschichtet und 5 min zentrifugiert. Als Probenmatrix diente ein 1 %iges Agarosephantom, in welches die Proberöhrchen gesteckt wurden.

Verwendet wurde eine Gradientenechosequenz mit unterschiedlich starker T2*-Wichtung mit folgenden Parameter: Repetitionszeit TR = 100 ms und zwölf verschiedenen Echozeiten von TE = 3,1 ms bis TE = 44,8 ms, Flipwinkel 40°.

In vivo Messungen

Die Bildgebung von Tieren wurden an einem 7-Tesla-Kleintier-MRT (Bruker) im Neurowissenschaftlichen Forschungshaus und einem 1,5-Tesla-Magnetom-Sonata durchgeführt.

Zuerst wurden die Tiere auf eine MRT-kompatible Wärmematte platziert, durch die Wasser mit einer Temperatur von 37 °C gepumpt wurde. Die zu untersuchenden Tiere wurden in Bauchlage positioniert. Die Verabreichung der Partikel erfolgte über einen vor der ersten Messung gelegten Zugang in der Schwanzvene der Tiere, welcher mit Hilfe eines dünnen Schlauches außerhalb der Messapparatur erreichbar war, so dass die Position der Tiere innerhalb des Versuches nicht verändert werden musste.

Die Narkose der Tiere während der MRT-Messungen wurde durch eine Isofluran-O₂-Inhalationsnarkose gewährleistet.

Um eine maximale Bildqualität bei der Bildgebung zu erzielen, wurde bei Messungen am 1,5-T-MRT eine spezielle Spule (Solenoid) für Mäuse verwendet (Abb. 6), die im DKFZ in Heidelberg entwickelt wurde. Am Kleintier-MRT wurde eine Maus-Körperspule verwendet. Die Positionierung erfolgte im Spulenmittelpunkt, etwa in Körpermitte des Tieres.

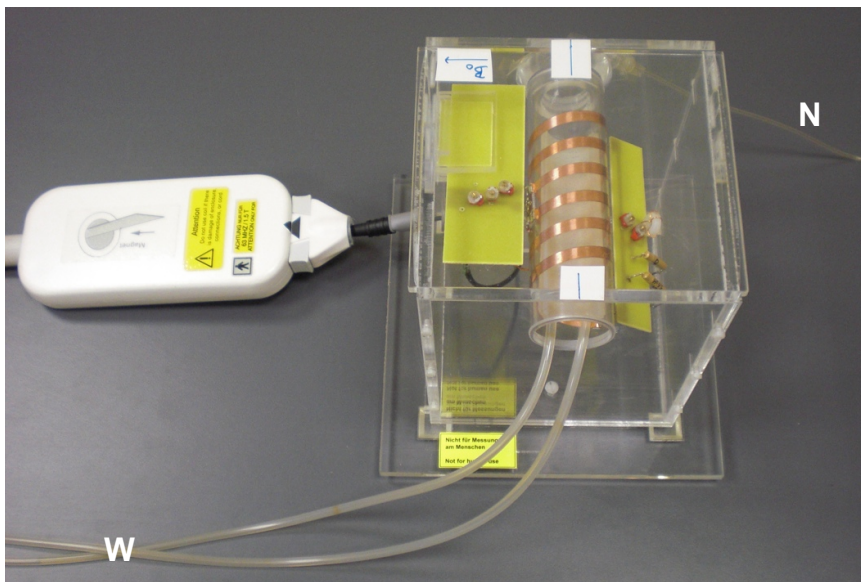


Abbildung 6: Solenoid für 1,5-Tesla-Sonata. Spezielle Maus-Ganzkörperspule mit Narkoseanschluss (N) und Wärmezufuhr (W) für Langzeitmessungen im MRT.

Zu Beginn wurde eine Lokalisierung-Sequenz in drei Ebenen angefertigt, welche Auskunft über die Position der Maus in der Spule gab. Anschließend wurde die exakte Lage der Tumore eingegrenzt, um das Field of View (FoV) auf eine geeignete Größe festzulegen.

Die Signalhalbwertszeitmessungen am 1,5-T-MRT wurden mit einer T1-gewichteten FLASH-Sequenz (TE: 2,3 ms, TR: 6,6 ms, Flipwinkel 25°) durchgeführt.

Die Tumorbildgebung am 1,5-T-MRT wurde mit zwei verschiedenen T2*-gewichteten Sequenzen aufgenommen. Die Gradientenecho-Messungen wiesen folgende Parameter auf: 1. TE: 3,8 ms, TR: 35 ms, Flipwinkel 15° und 2. TE: 10 ms, TR: 35 ms, Flipwinkel 15°.

Die Tumor-Messungen am 7-T-MRT wurden mit einer FLASH-Sequenz mit variablen Parameter durchgeführt. Die beste Signalauflösung ergab sich bei TE: 5,4 ms und TR: 892 ms.

Nachdem die entsprechenden Sequenzen für Tumor- und Angiographiemessungen vor Gabe der Partikel durchgemessen waren, wurden die Partikel injiziert. Nun erfolgte alle fünf Minuten eine Messung der Angiographiesequenz (0, 1, 3, 6, 10, 15, 20 ...120 min). Die aus den Messungen resultierenden Signalintensitäten wurden später für die Bestimmung der Zirkulationsdauer der verschiedenen Proben im Blut verwendet.

Die Auswertung der Signalintensitäten (SI) erfolgte mit dem Programm OsiriX DICOM viewer (National Institutes of health, USA). Die Untersuchungsregion (region of interest, ROI) wurde in allen Messungen an der gleichen Stellen positioniert und die Signalintensitäten mit dem Programm Prism 5 (GraphPad Software) grafisch dargestellt und die Signalhalbwertszeiten ermittelt.

3.8.2. SPECT-CT-Messungen

Die *in vivo* Messungen mit dem Radionuklid ¹¹¹Indium markierten Proben wurden am NanoSPECT-CT Kleintierimager (Bioscan Europe) am Institut für Nuklearmedizin im Small Animal Imaging Center der Charité Campus Virchow-Klinikum durchgeführt.

Die Markierung der Probe (DTPA-XTEN-AnxA5) mit dem Radionuklid ¹¹¹Indium wurde im Institut für Nuklearmedizin am Campus Virchow-Klinikum von Roger Michel durchgeführt.

Nach Injektion der Probe mit durchschnittlich 100 MBq über die Schwanzvene wurden die Tiere auf eine beheizbare Liege des Scanners platziert. Die Narkose der Tiere während der Messungen wurde durch eine Isofluran-O₂-Inhalationsnarkose gewährleistet.

Zuerst wurde ein CT-Bild des Tieres angefertigt. Daraufhin wurden die anatomischen Grenzen des Tieres festgelegt, um den Messbereich zu begrenzen. Es wurden jeweils vier Einzelmessungen (0,5 h, 1,2 h, 3,2 h und 21 h) zu je 50 min durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere euthanasiert. Für die *ex vivo* Auswertung wurden die Organe von drei Tieren einzeln in einer Feinwaage gewogen und in einem Aktivimeter (ISOMED2010) die verbleibende Gammastrahlung ermittelt.

Für die Analyse der *in vivo* Organverteilung (Biodistribution) wurden alle Schnittbilder per Hand ausgewertet (InVivoScope). Jedes Organ wurde schichtweise abgefahren und mit selbst definierten ROIs eingegrenzt. Die Signalintensitäten aller Schichten wurden dann gemittelt und anhand der injizierten Gesamtdosis eine prozentuale Verteilung bestimmt. Außerdem wurde für die Berechnungen der verschiedenen Zeitpunkte die Zerfallskonstante von ¹¹¹Indium berücksichtigt. Für Bestimmung der Bluthalbwertszeit wurden im linken Ventrikel mindestens fünf ROIs gesetzt. Die Auswertungen der Signalintensitäten wurden mit dem Programm Prism 5 durchgeführt und grafisch dargestellt.

3.8.3. Nahinfrarot-Messungen

Die *ex vivo* NIRF-Aufnahmen wurden in einer speziell angefertigten Dunkelkammer mit einem Laser-Filter-System in der Experimentellen Neurologie angefertigt. Die Anregung des benutzten Lasers lag bei 670 nm und die Emission des Hochpassfilters bei 710 nm. Als Belichtungszeit wurde 1 sec gewählt. Die Proben, 6S-IDCC-XTEN-AnxA5 bzw. die Kontrolle 6S-IDCC-AnxA5, wurden jeweils 3 h vor der Messung i.v. appliziert. Die Konzentration betrug 50 nmol Farbstoff/kg. Nach Euthanasie der Tiere wurden die Organe entnommen (Tumore, Leber, Milz, Niere und Muskel) und unverzüglich gemessen. Anschließend wurden die Proben schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Quantifizierung der NIRF-Bilder wurde mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health, USA) und die statistische Analyse mit Prism 5 (zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Protease-spezifische Eisenoxidnanopartikel

4.1.1. Charakterisierung von MMP-spezifischen Eisenoxidpartikeln

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) spielen eine entscheidende Rolle bei verschiedenen Erkrankungen, wie Atherosklerose, Multiple Sklerose, Arthritis, Tumorwachstum und Metastasierung, und sind deshalb als Target in der Molekularen Bildgebung besonders interessant.

Die verwendeten superparamagnetischen Eisenoxidpartikel - VSOP (very small iron oxide particles) - basieren auf einem elektrostatisch stabilisiertem, Citrat-beschichtetem Eisenkern (8 nm).

Die Synthese der Partikel zu spezifischen PSOP (protease-specific iron oxide particles) erfolgte in zwei Schritten. Ein Peptid mit einer MMP-2/9-Schnittstelle und einem gebundenem Fluoreszenzfarbstoff (NH₂-GGPRQITAG-K(FITC)-GGGG-RRRRR-G-RRRRR-amide) wurde mit Polyethylenglycol (NHS-mPEG5000) gekoppelt. Die Reinigung der Probe erfolgte über ein P6-Gel (Größenausschluss). Anschließend wurden verschiedene Verhältnisse des erhaltenen Peptid-PEGs mit VSOP gemischt, so dass diese elektrostatisch auf der Oberfläche hafteten. Die Haftung erfolgte dabei über den positiv geladenen Arginin-reichen Peptidsequenzteil auf der negativ geladenen Oberfläche der Partikel. Die Größen der resultierenden Partikel wurden mittels dynamischer Lichtstreuung am Zetasizer ermittelt. Bei der Zugabe von mindestens 6 Peptid-PEG bildeten sich sterisch stabile PSOP mit einem erwarteten hydrodynamischen Durchmesser von etwa 24 nm. Eine Größenmessung von PSOP mit im Durchschnitt 6 Peptid-PEG im Vergleich zu unbeschichteten VSOP ist in Abbildung 7 dargestellt. Deutlich ist hier die Größenzunahme von im Durchschnitt 8 zu 25 nm durch die Beschichtung zu erkennen, die sich erwartungsgemäß in einem begrenzten Rahmen bewegte. Die sehr enge Größenverteilung nach Beschichtung belegt die Bildung von relativ einheitlichen Partikeln.

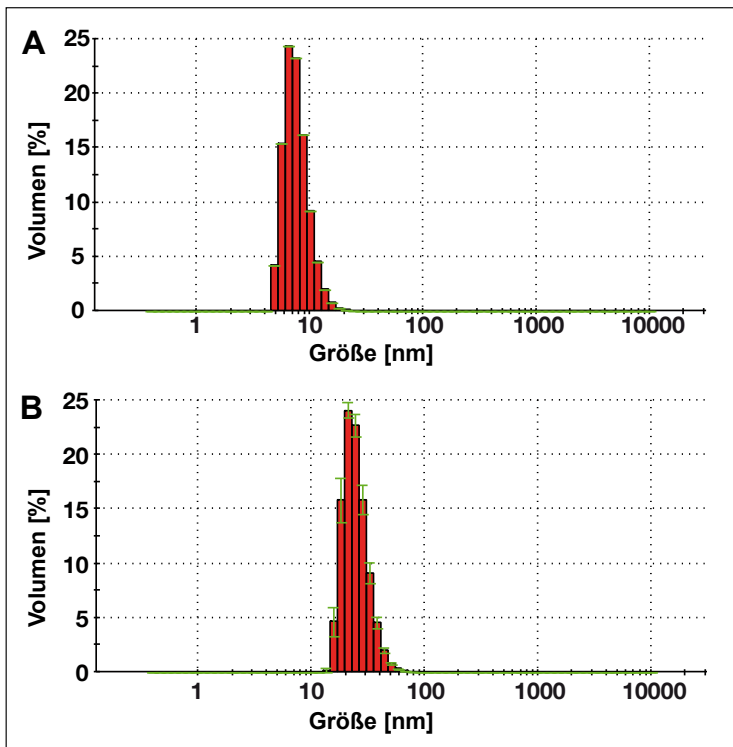


Abbildung 7: Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers von PSOP. Größenmessung von VSOP ohne (A) und mit 6fach Peptid-PEG-Beschichtung (B) am Zetasizer.

Die Auswertung von Größenmessungen verschiedener Verhältnissen von Peptid-PEG zu VSOP (Abb. 8) ergab eine stabile Bildung von PSOP bei einer Zugabe von mindestens 6 Peptid-PEG. Bei Zugabe von weniger als 6 Peptid-PEG entstanden Partikel mit einem größeren Durchmesser. Die steigende Größe spiegelt wahrscheinlich die Bildung von Dimeren oder Multimeren wider. Entsprechend diesen Ergebnissen wurden in den weiteren Versuchen eine Beschichtung von 6 bzw. 12 Peptid-PEG verwendet.

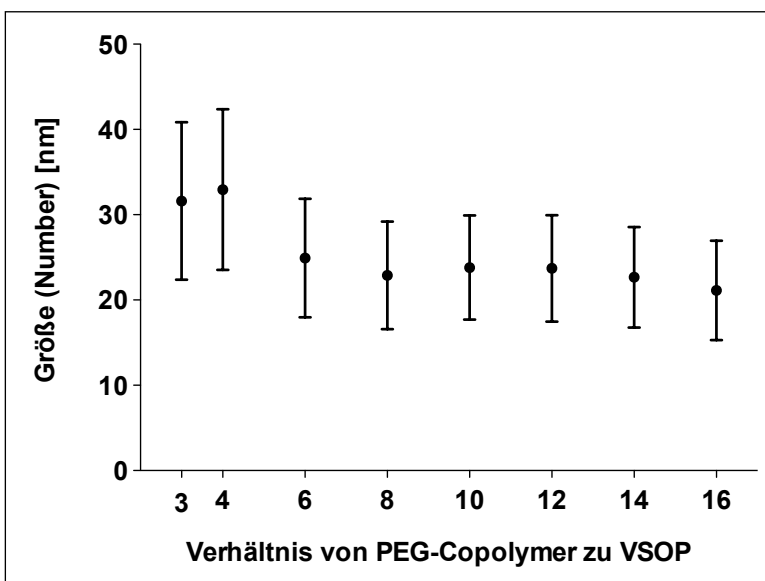


Abbildung 8: Größenmessungen der PSOP mit dem Zetasizer. Zugabe verschiedener Verhältnisse von Peptid-PEG zu VSOP.

Der nächste Schritt sah die Überprüfung der Funktion der MMP-2/9-Schnittstelle nach Kopplung an die Oberfläche der VSOP vor.

Durch spezifisches Schneiden der Schnittstelle mit MMP-9 wurde die PSOP sterisch stabilisierende Peptid-PEG abgetrennt. Dadurch verloren die Partikel zunehmend ihre sterische Stabilität. Die nun freiliegenden Oberflächen, mit negativen (Citratschicht) und positiven (Kopplungsdomäne) Ladungen, begünstigte die Anziehungskraft der Partikel untereinander, so dass diese nach kurzer Zeit zu aggregieren begannen. Die sich daraus ergebenden Größenzunahmen sind in Abbildung 9 zu erkennen. Die Aggregation war sowohl bei den im Durchschnitt 6fach als auch bei den 12fach beschichteten PSOP (0,125 nmol Partikel) zu beobachten. Hingegen blieb eine Größenzunahme bei den mit 30 μ M MMP-9-Inhibitor behandelten Proben aus.

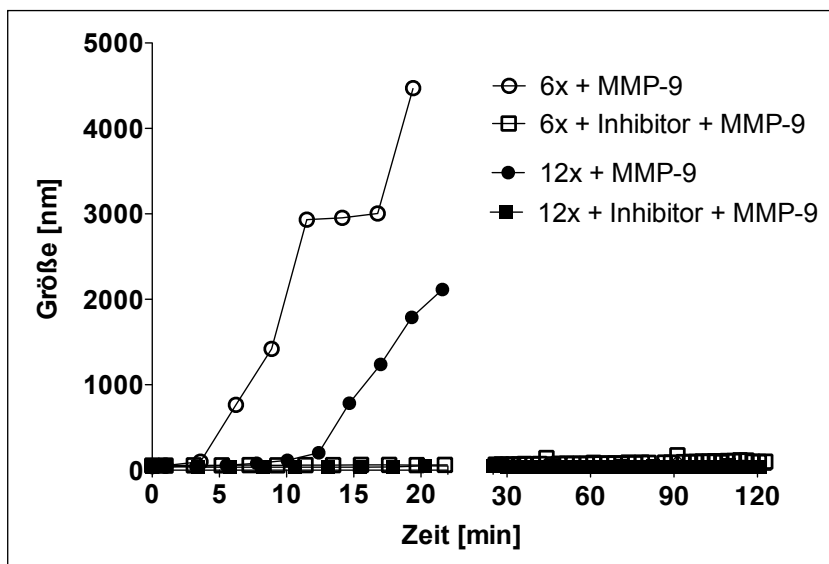


Abbildung 9: Zeitverlauf der hydrodynamischen Größe von PSOP nach MMP-9-Aktivierung. Beobachtung des Durchmessers (Größe Volumen-gewichtet) im Zetasizer von zwei PSOP-Varianten innerhalb von 120 min bei Zugabe von 1 μ M MMP-9 ohne bzw. mit MMP-9-Inhibitor.

Die aufgezeigte Aggregation der superparamagnetischen Partikel führt zu einer Erhöhung der Relaxation (R2) im Vergleich zu dispersen Partikeln. Dieses Phänomen bezeichnet man als „magnetic relaxation switch“ (MRS) [154]. Die damit verbundene Abnahme des T2-Signals (Signalreduktion) kann für die molekulare Bildgebung ausgenutzt werden. Diese MRT-Signalveränderungen wurden nach Enzymzugabe mittels T2*-gewichteter Messungen (Gradientenecho-Sequenz) in einem 1,5-T-MRT be-

obachtet (Abb. 10 und 11). Die Aufnahmen der Signalintensitäten erfolgten über 50 min alle 25 sec.

Die Aktivierung der Partikel (6x-MMP-9-VSOP) wurde unter Verwendung von unterschiedlichen Partikelkonzentrationen (300 nM, 150 nM, 75 nM und 38 nM Fe) analysiert, die mit der gleichen MMP-9-Konzentration (1,3 U) inkubiert wurden (Abb. 10). In Abhängigkeit der Konzentration verringerten sich die Signalintensitäten. Bei einer Eisenkonzentration von 300 nM wurde ein Signalminimum bei etwa 27 min erreicht, wobei hingegen die Probe mit 75 nM die geringste Signalintensität schon bei 15 min zeigte. Die Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten der Enzymaktivierung der PSOP können durch eine Substratsättigung erklärt werden. Eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration kann in diesem Fall die Reaktionsgeschwindigkeit nicht weiter steigern, da alle Enzyme in einem Enzym-Substrat-Komplex vorliegen.

Die dargestellte MRT-Momentaufnahme wurde bei 17,6 min erzeugt (siehe Pfeil). Die Aggregation der Partikel, bewirkt durch Zugabe des MMP-Enzyms, setzte die T_2^* -Relaxivität herab und verursachte damit eine Signalreduktion. Nach dem Erreichen eines Minimums stieg die Signalintensität wieder an. Verursacht wird dieser Effekt durch die Präzipitation der Eisenpartikel und das Absinken als Bodensatz. Die MRT-Messungen zum Ende hin gaben damit die Signalintensitäten der ausgedünnten Probe wider.

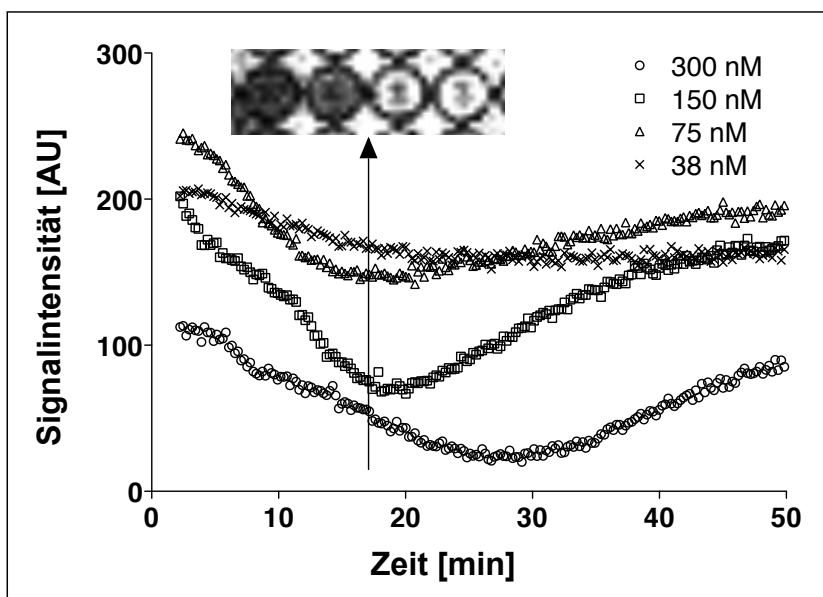


Abbildung 10: MRT-Messungen von verschiedenen PSOP-Konzentrationen bei Zugabe von MMP-9. Zeitlicher Verlauf (50 min) der Signalintensität von 6x-MMP-VSOP mit vier unterschiedlichen Eisenkonzentrationen nach Aktivierung mit MMP-9.

Abbildung 11 zeigt eine Zeitverlaufsmessung von Proben nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen eines MMP-9-Inhibitors, die 300 nM PSOP (6x-MMP-VSOP) sowie 1,3 U MMP-9 enthielten. Eine Zugabe von 10 nM Inhibitor verzögerte die Aggregation der Partikel deutlich und bei 1 μ M Inhibitor blieb die Signalabnahme während des Beobachtungszeitraumes annähernd vollständig aus, was mit einer nahezu kompletten Enzymhemmung zu erklären ist. Die Messungen der Proben ohne Inhibitor-Zugabe oder die Zugabe von geringen Konzentrationen (0,1 nM-0,001 nM) des MMP-9-Inhibitors zeigten hingegen keine Wirkung. Diese Proben wiesen nach etwa einer halben Stunde eine maximale Signalabnahme auf, passend zum MRS-Effekt. Das MRT-Bild (Aufnahme 32. Minute, siehe Pfeil) veranschaulicht die unterschiedlichen Signalintensitäten der PSOP, die durch die Enzym- bzw. Inhibitor-Wirkung verursacht wurden.

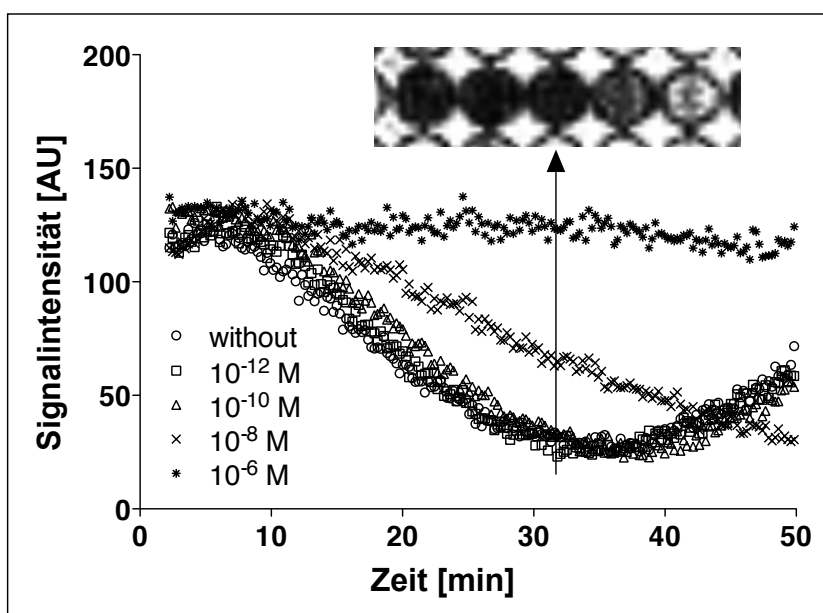


Abbildung 11: MRT-Messungen von PSOP bei Zugabe von MMP-9-Inhibitor verschiedener Konzentration. Zeitlicher Verlauf (50 min) der Signalintensität von 6x-MMP-VSOP nach Aktivierung mit MMP-9 und Zugabe von vier unterschiedlichen Konzentrationen von MMP-9-Inhibitor.

4.1.2. Tumorevaluation

Für die *in vivo* Versuche wurden zwei Zelllinien ausgesucht, die eine unterschiedliche Aktivität von MMP-2 und MMP-9 aufwiesen. Die Analyse der MMP-2/-9-Expression der Zelllinien wurde zunächst mittels quantitativer PCR untersucht und ist in Abbildung 12 dargestellt. Die Tumorzelllinie HT-1080 stammt von einem Fibrosarkom ab und zeigt eine etwa 42fach höhere Expression von MMP-2 und 44fach höhere Expression von MMP-9 im Vergleich zur Zelllinie BT-20 eines Brustkrebstumors.

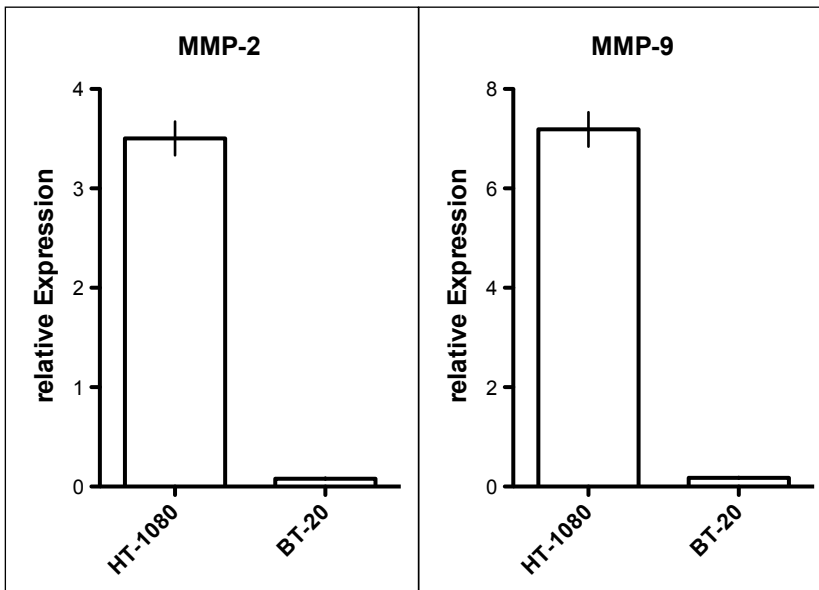


Abbildung 12: Expressionsanalyse von MMP-2 und 9. Quantitative PCR der cDNA von MMP-2 und 9 aus Zelllysaten der Zelllinie HT-1080 und BT-20.

Die weitere Charakterisierung der Tumorzelllinien erfolgte *ex vivo*. Die Tumorzellen wurden zu Beginn des Versuches s. c. in die Flanke athymischer Nacktmäuse injiziert und bis zu einer Größe von maximal 0,7 cm³ wachsen gelassen. Nach Entnahme des Tumorgewebes wurden Gefrierschnitte von 10 µm Dicke angefertigt und diese mittels Immunhistochemie und *in situ* Zymographie untersucht.

Die Antikörperfärbungen mit anti-MMP-2 und anti-MMP-9 sind in Abbildung 13 dargestellt. Als sekundärer Antikörper wurde ein fluoreszenzmarkierter Rhodamin-IgG verwendet. Die Ergebnisse verdeutlichen die stärkere Expression von MMP-2 und 9 in der Zelllinie HT-1080 (A, C) im Vergleich zu BT-20 (B, D). Außerdem ist eine verstärkte Expression hin zur Tumorperipherie zu erkennen.

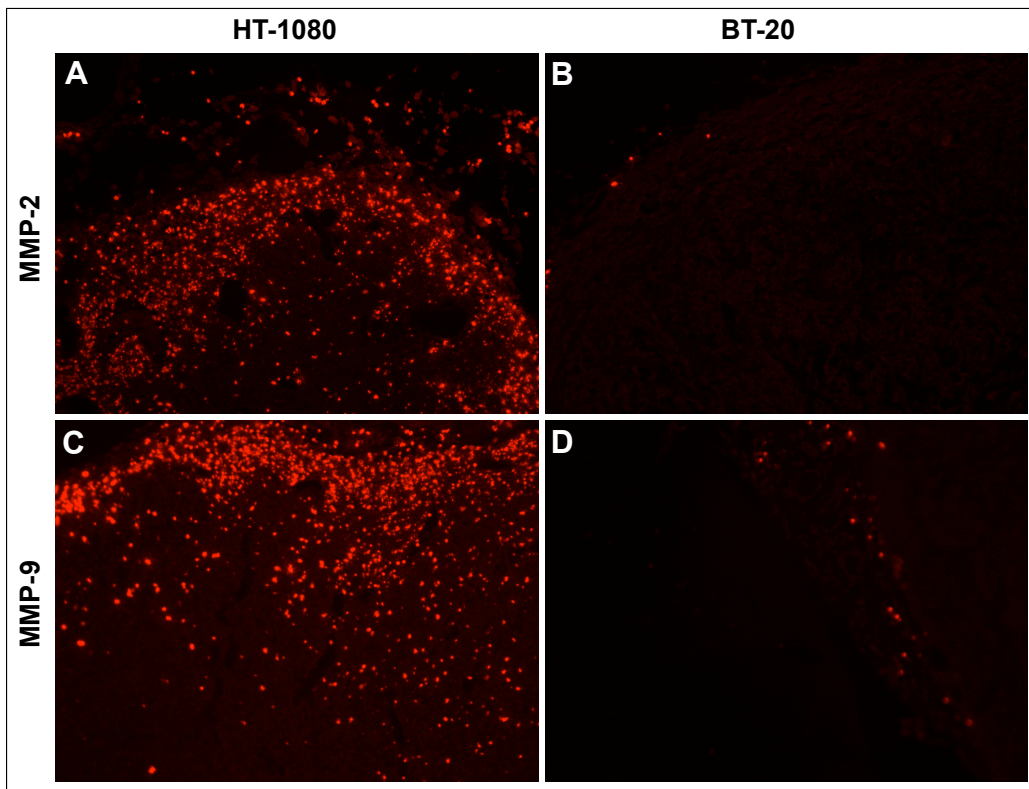


Abbildung 13: Expressionsanalyse von MMP-2/9 im Tumorgewebe. Antikörperfärbung von Gefrierschnitten gegen Anti-MMP-2 (A, B) und Anti-MMP-9 (C, D). Der MMP-positive Tumor HT-1080 (A, C) zeigt eine stärkere Expression des Targets als der MMP-negative Tumor BT-20 (B, D). 200fache Vergrößerung.

Die gleichen Resultate zeigte die durchgeführte *in situ* Zymographie, bei der durch die Spaltung der vorgelegten Gelatine mit gekoppeltem Farbstoff (FITC) eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals auftritt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der 10 µm dicken Gefrierschnitte in Abbildung 14 demonstrieren die Aktivität von MMP in den Bereichen starker Fluoreszenz vom MMP-positiven Tumor (A) im Gegensatz zum MMP-negativen Tumor (B). Diese Art des MMP-Nachweises zeigt dabei die aktive Form von Gelatinasen, das Proenzym bleibt unerkant.

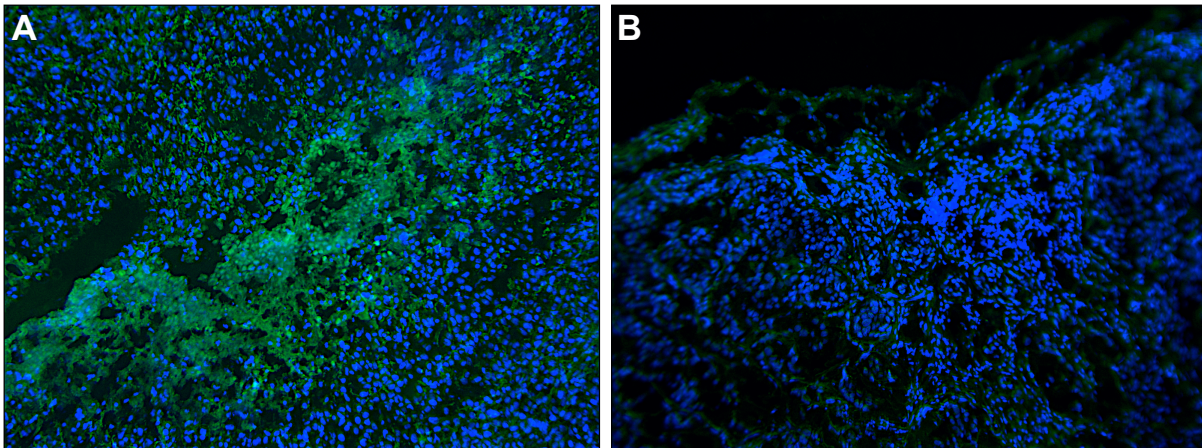


Abbildung 14: *In situ* Zymographie zum Nachweis von MMP-Aktivität. Gefrierschnitte (10 μm) des Fibrosarkoms HT-1080 (A) und des Brustkrebstumors BT-20 (B). Der gequenchte Fluoreszenzfarbstoff (FITC, grün) wurde durch proteolytische Spaltung der Gelatine freigesetzt, wodurch das Fluoreszenzsignal Bereiche mit aktivem MMP aufzeigte. Kernfärbung mit Hoechst 33258 (blau). 200fache Vergrößerung.

4.1.3. Magnetresonanztomographie nach der *in vivo* Applikation von PSOP

Die *in vivo* Untersuchungen wurden an einem Mausmodell durchgeführt. Athymischen, weiblichen Nacktmäusen wurden Tumorzellen einer MMP-positiven (HT-1080) und einer MMP-negativen Zelllinie (BT-20) in die linke und rechte Flanke s. c. injiziert. Nach Ermittlung der Anwachsraten und -zeiten wurden die Tumore in einem definierten Zeitfenster implantiert, um möglichst identische Tumore zu erhalten.

Die Bildgebung erfolgte zunächst in einem 7-T-Kleintier-MRT unter Isoflurananästhesie. Die Tumorbildgebung wurde mit einer T2*-gewichteten Sequenz durchgeführt. Nach den Leeraufnahmen wurde eine Dosis von 50 $\mu\text{mol Fe/kg}$ i. v. injiziert. Halbstündlich wurden dann weitere Messungen angefertigt, um die Signalintensitätsveränderungen des Tumors zu bewerten. Diese Veränderungen lassen dabei einen Rückschluss auf die Anreicherung der Partikel im Tumorgewebe zu verschiedenen Zeitpunkten zu. Die Analyse der Tumore ergab jedoch zu keinem gemessenen Zeitpunkt eine signifikante Signalintensitätsveränderung. In Abbildung 15 sind die MRT-Aufnahmen eines Tieres 1 min (A, C) und 2,5 h nach Injektion der PSOP (B, D) dargestellt. Da sich die beiden Tumore nicht in der gleichen Schnittebene befanden, sind jeweils zwei Schichten einer Messsequenz abgebildet, mit je einem Tumor in der größten Ausdehnung.

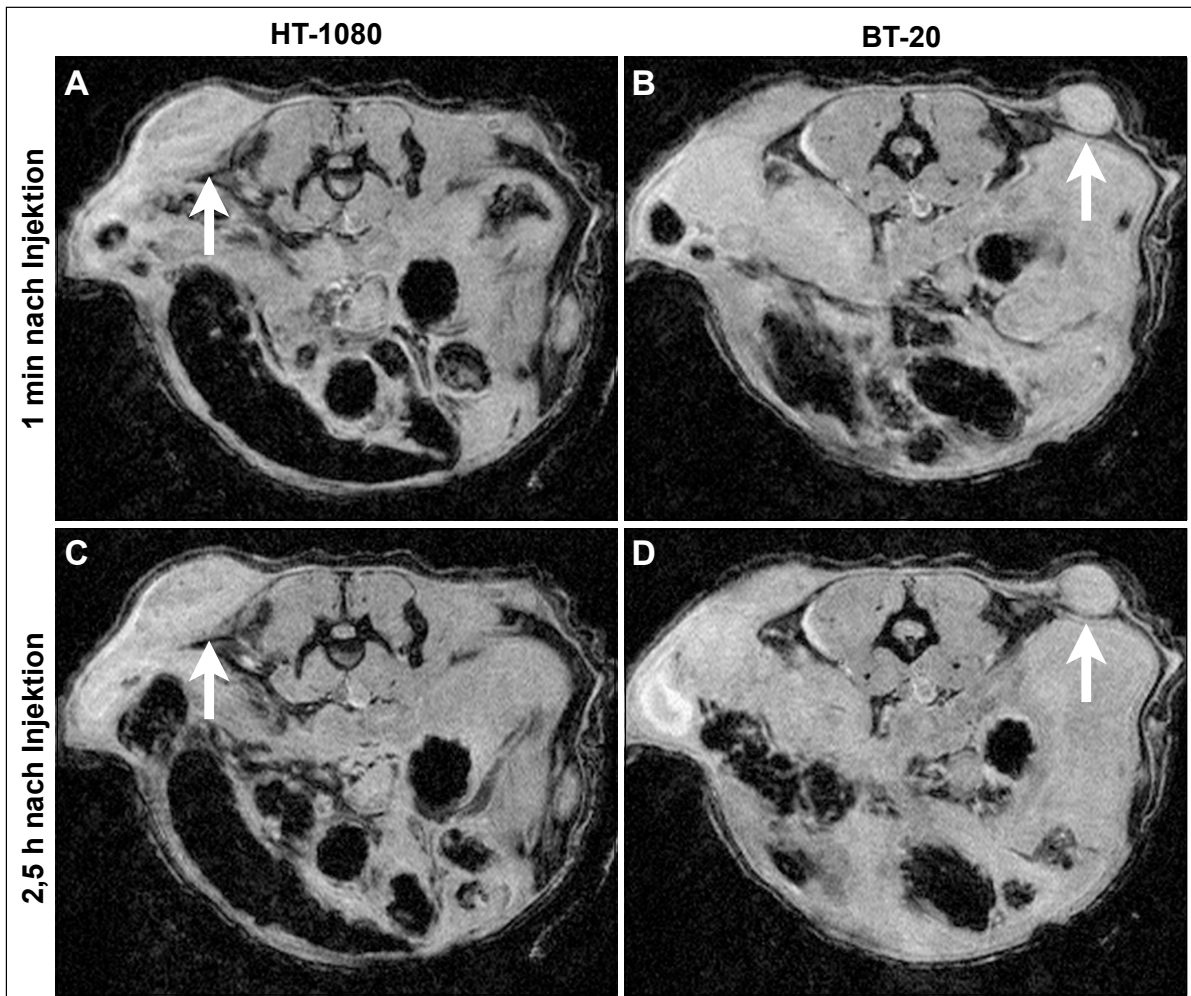


Abbildung 15: 7-T-MRT-Bildgebung eines MMP-positiven Tumors links (HT-1080, Pfeil) und MMP-negativen Tumors rechts (BT-20, Pfeil) zu zwei Zeitpunkten nach Gabe von PSOP. Darstellung in axialer Schicht bei einer T2*-gewichteten Sequenz 1 min (A, B) und 2,5 h nach i. v. Injektion (C, D) von PSOP (50 $\mu\text{molFe/kg}$).

Bei den MRT-Untersuchungen wurden verschiedene T2*-gewichtete Sequenzen eingesetzt. Parameter, wie Echozeit, Bandbreite, Bildmatrix und Flipwinkel, wurden variiert, um den besten Kontrast bei hoher Auflösung zu erhalten. Die anschließend gemessenen T2*-gewichteten Sequenzen ergaben jedoch keine signifikante Signalintensitätsveränderungen im MMP-positiven Tumor HT-1080 als auch im MMP-negativen Tumor BT-20.

Mittels einer neuen, speziell konstruierten Mausspule war es in weiteren Experimenten möglich, die Bildgebung auch an einem 1,5-T-MRT durchzuführen. In Abbildung 16 ist die Aufnahme einer Maus mit einem HT-1080-Tumor auf der linken Seite dargestellt. Die Auswertung der Aufnahmen vor (A) und 2,5 h nach Injektion der

Probe (B) ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Signalintensität des MMP-positiven Tumors.

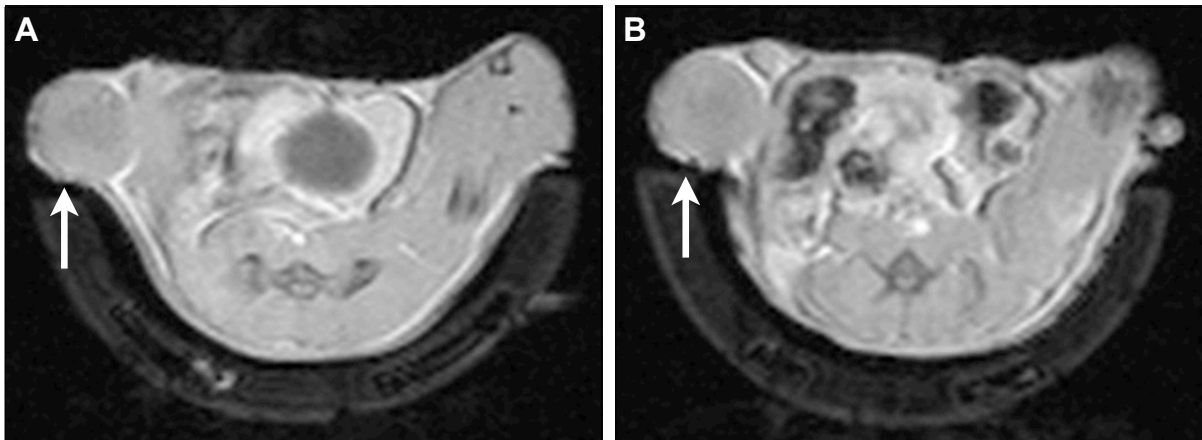


Abbildung 16: 1,5-T-MRT-Bildgebung eines HT-1080-Tumors (links, Pfeil) vor und nach Gabe von PSOP. Darstellung in axialer Schicht bei einer T2*-gewichteten Sequenz vor (A) und 2,5 h nach Injektion der PSOP (B).

4.1.4. Histologische Auswertungen nach Injektion von PSOP

Im Anschluss an die MRT-Messungen erfolgte eine histologische Beurteilung vom Tumorgewebe und weiteren Organen des Tieres (Abb. 17). Zum Nachweis der Eisenoxidnanopartikel im Zielgewebe wurde eine Berliner-Blau-Färbung von 10 µm dicken Paraffinschnitten durchgeführt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Kernechtrot kenntlich gemacht. Die Analyse der Färbung mehrerer MMP-negativer Tumore zeigte, dass die Tumore weitgehend ungefärbt waren bzw. kaum Partikelanreicherungen aufwiesen.

Hingegen waren bei MMP-positiven Tumoren oft deutliche Partikelanreicherungen an der Peripherie zu erkennen. Die Blaufärbung präsentierte sich meist extrazellulär in einem begrenzten Bereich von maximal 100 µm. In den Leberschnitten zeigte sich eine homogen verteilte Eisenfärbung, die mit der MRT-Bildgebung korrelierte. In den Lebern von Kontrolltieren wurde unter gleichen Bedingungen kein Eisen nachgewiesen. Das gleiche Bild ergab sich in den Paraffinschnitten der Milz. Die Färbungen an den Kontrolltieren zeigten kein Eisen im Gewebe, wohingegen die Tiere mit PSOP-Injektion eine Partikelanreicherung in der Milz aufwiesen. In den Nieren der Versuchstiere konnte kein Eisen nachgewiesen werden.

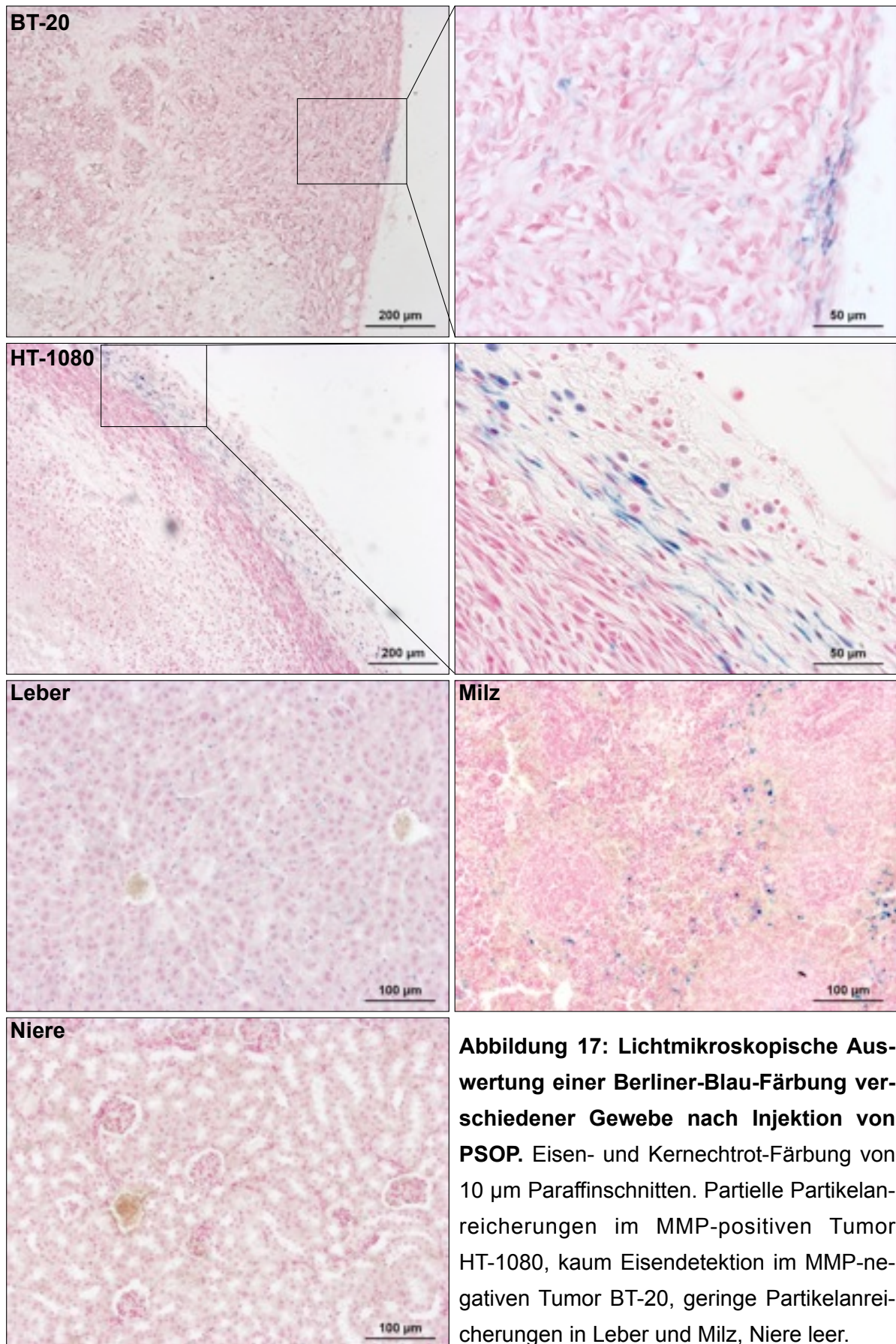


Abbildung 17: Lichtmikroskopische Auswertung einer Berliner-Blau-Färbung verschiedener Gewebe nach Injektion von PSOP. Eisen- und Kernechtrot-Färbung von 10 µm Paraffinschnitten. Partielle Partikelanreicherungen im MMP-positiven Tumor HT-1080, kaum Eisendetektion im MMP-negativen Tumor BT-20, geringe Partikelanreicherungen in Leber und Milz, Niere leer.

4.2. Untersuchungen von AnxA5-VSOP mittels MRT

Annexin besitzt eine hohe Bindungsaffinität für Phosphatidylserin (PS), welches sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle befindet. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin bindet an PS und ermöglicht somit die molekulare Bildgebung von apoptotischen Zellen.

Die Kopplung der Annexin-Moleküle an die Citrat-Hülle der VSOP erfolgte über eine kovalente Bindung. Die Partikel wiesen vor der Beschichtung einen hydrodynamischen Durchmesser von $7,5 \pm 0,2$ nm und nach der Kopplung $14,4 \pm 2,3$ nm auf. Im Durchschnitt konnten auf einen Nanopartikel 9 Annexin-Moleküle gebunden werden. Die Stabilitätsuntersuchungen bei Zugabe verschiedener Salzkonzentrationen (CaCl_2), fötalem Kälberserum oder Blut zeigten keine Veränderungen der Relaxivitäten. Diese Ergebnisse demonstrierten eine stabile Größe der AnxA5-VSOP in Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung (Analyse Lena Figge) [30].

Zur *in vitro* Charakterisierung der AnxA5-VSOP als Apoptose-Bildgebungssonde wurde, durch Behandlung mit einem Zytostatikum, in Jurkat-T-Zellen eine Apoptose-Rate von 14 %, im Vergleich zu einer unbehandelten Gruppe mit 6 % Apoptose, ausgelöst. Die Daten wurden durch eine durchflusszytometrische Analyse erhoben. Anschließend wurden die Zellen 10 min mit AnxA5-VSOP (1 μg Fe/ml) inkubiert, gewaschen und die Signalintensitäten der verschiedenen Proben im MRT untersucht (Abb. 18). Eine starke Signalreduktion, aufgrund der spezifischen Bindung der AnxA5-VSOP an PS, trat bei den Zellen mit höherer Apoptose-Rate im Vergleich zu niedrigerer auf. Zellen ohne Partikelinkubation blieben unabhängig von der Apoptose-Rate ohne Signalveränderung (Analyse Lena Figge) [30].

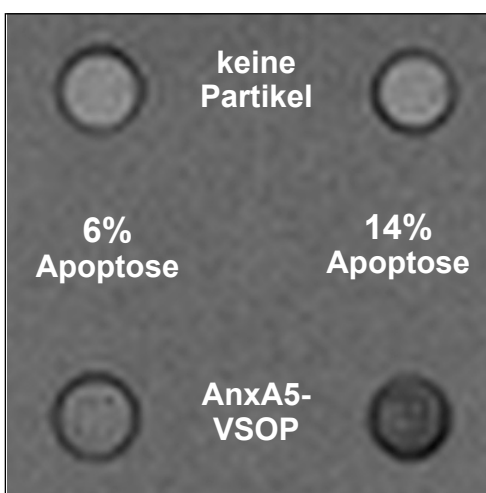


Abbildung 18: MRT-Aufnahme von Jurkat-T-Zellen mit unterschiedlichen Apoptose-Raten nach Inkubation mit AnxA5-VSOP (zur Verfügung gestellt von Lena Figge). Signalreduktion von Zellen mit größerer Apoptose-Rate aufgrund der spezifischen Bindung von AnxA5-VSOP bei einer T2*-gewichteten Messung. Keine Signalminderung bei Zellen ohne Partikelgabe.

4.2.1. Ermittlung der *in vivo* Signalintensitätshalbwertszeit von AnxA5-VSOP

Die T1-gewichteten MRT-Messungen der Herzregion einer athymischen Nacktmaus sind in Abbildung 19 dargestellt. Es wurde eine Dosis von 50 $\mu\text{mol Fe/kg}$ Körpergewicht von AnxA5-VSOP nach der Leermessung (A) i. v. injiziert. In der ersten Messung nach Applikation - Start der Messung etwa 30 sec nach Injektion - war ein deutlicher Signalanstieg in der linken und rechten Herzkammer sowie in der Arteria carotis und Vena jugularis zu verzeichnen (B). Das Signal nahm während des Messverlaufs wieder ab (C, D), und das spiegelt die Konzentrationsabnahme der AnxA5-VSOP im Blutkreislauf wider.

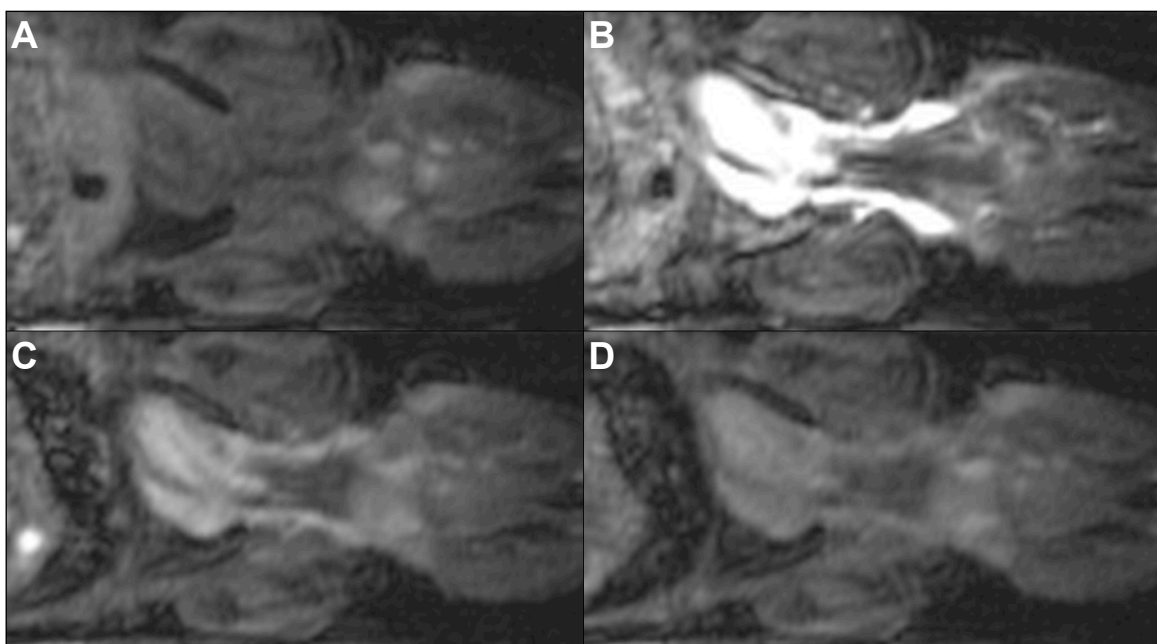


Abbildung 19: MRT-Bildgebung des Herzens einer Maus nach Injektion von AnxA5-VSOP. Coronale Schichtorientierung zu vier verschiedenen Zeitpunkten (exemplarisch) zur Bestimmung der Signalintensitätshalbwertszeit von AnxA5-VSOP. T1-gewichtete Messung vor Injektion der Sonde (A), 1 min (B), 30 min (C) und 60 min (D) nach Injektion.

Für die Ermittlung der Signalintensitätshalbwertszeiten wurden ROI's in der linken Herzkammer vermessen. In Abbildung 20 sind die ermittelten Signalintensitäten über die Zeit von etwa 1 h von 5 Tieren dargestellt. Diese Tiere erhielten jeweils die gleiche Konzentration von 50 $\mu\text{mol Fe/kg}$ des gleichen Ansatzes von AnxA5-VSOP. Die Analyseverfahren zur Auswertung im Programm GraphPad Prism Version 5.0 enthielt folgende Parameter: Normalisierung der Werte (normalize), nicht lineare Regression (nonlinear regression) mit einphasiger Zerfallsfunktion (one phase decay)

und robustem Fit (robust fit). Die durchschnittliche Bluthalbwertszeit, ermittelt aus den Signalintensitäten von den Leermessungen bis zum Erreichen des Ausgangswertes, betrug $10,6 \pm 1,1$ min ($n = 5$).

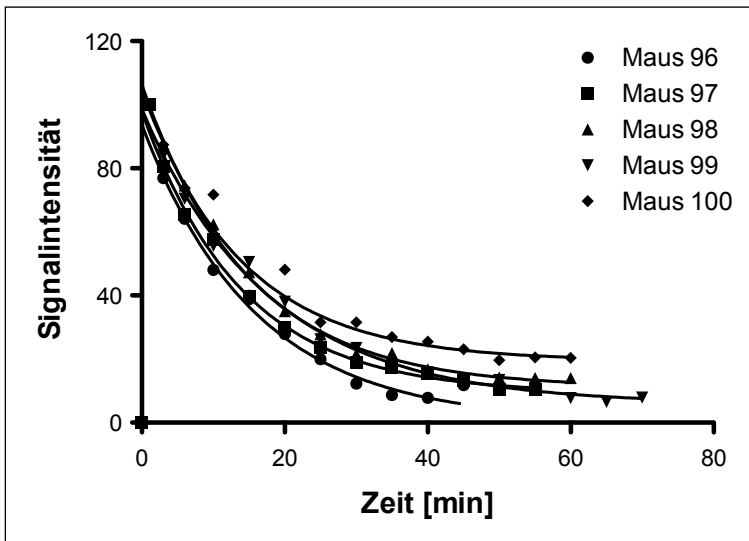


Abbildung 20: Signalintensitätshalbwertszeitbestimmung. Im MRT gemessene Signalintensität in linker Herzkammer bei 5 Mäusen nach der Injektion der gleichen Synthese von AnxA5-VSOP.

Durch Optimierung der Synthese konnte die Kopplung von Annexin-Molekülen auf der Oberfläche der Partikel maximiert werden [155]. Die verbesserte Abdeckung der VSOP mit Annexin-Molekülen ließ einen positiven Effekt auf Signalintensitätshalbwertszeit erkennen. Die MRT-Auswertung von 4 Tieren zeigte, dass die Halbwertszeit auf $20,6 \pm 3,3$ min erhöht werden konnte (Abb. 21).

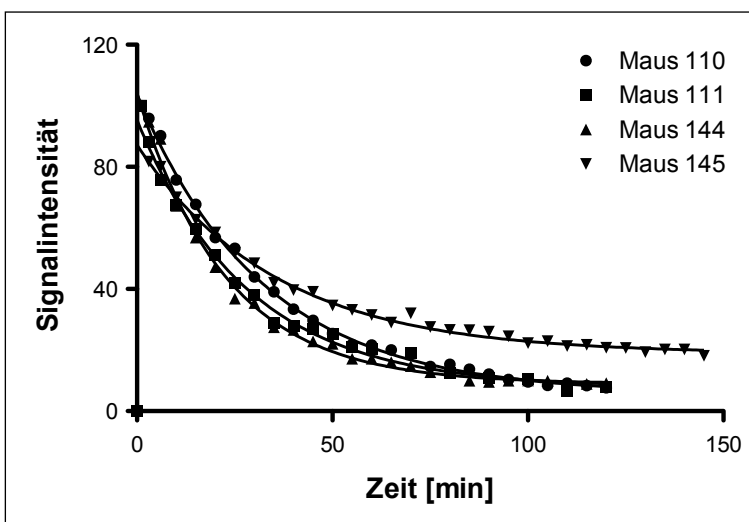


Abbildung 21: Signalintensitätshalbwertszeitbestimmung. Im MRT gemessene Signalintensität in der linken Herzkammer bei 4 Mäusen nach der Injektion der verbesserten Synthese von AnxA5-VSOP.

4.2.2. MRT von Chemotherapie-Effekten und Chemoresistenz mittels AnxA5-VSOP

Die Testung der AnxA5-VSOP für die Apoptose-Bildgebung wurde in einem Mausmodell durchgeführt. Den athymischen weiblichen Mäusen wurden zwei Tumore implantiert, von denen einer Chemotherapie-sensitiv (HT-1080) und der andere Chemotherapie-resistent (H69AR) war. Nach Induktion der Apoptose, durch eine chemotherapeutische Behandlung mit Doxorubicin, wurden die Partikel injiziert und die Mäuse für 3 h im 1,5-T-MRT untersucht.

Für die Versuchsreihe sind exemplarisch in Abbildung 22 zwei T2*-gewichtete Aufnahmen einer athymischen Maus abgebildet. Die beiden s. c. implantierten Tumore (H69AR links, HT-1080 rechts, Kennzeichnung durch weiße Pfeile) wurden in axialer Schichtorientierung aufgenommen. Der Vergleich der Signalintensitäten vor und nach der Injektion der Sonde zeigte keine Veränderungen im Bereich der Tumorperipherie oder im Inneren des Tumors. Eine deutliche Signalveränderung nach Verabreichung der Sonde war hingegen erwartungsgemäß im Knochenmark zu beobachten (schwarze Pfeile).

Die erzielten Ergebnisse zu Veränderungen der Signalintensität in den Tumoren blieben bei Messungen mit verschiedenen Syntheseansätzen gleich. Auch die Verlängerung der Blutzirkulationszeit, durch verbesserte Kopplung der Annexin-Moleküle auf der Oberfläche der VSOP, bewirkte keine Unterschiede in der Signalintensität im Zielgewebe.

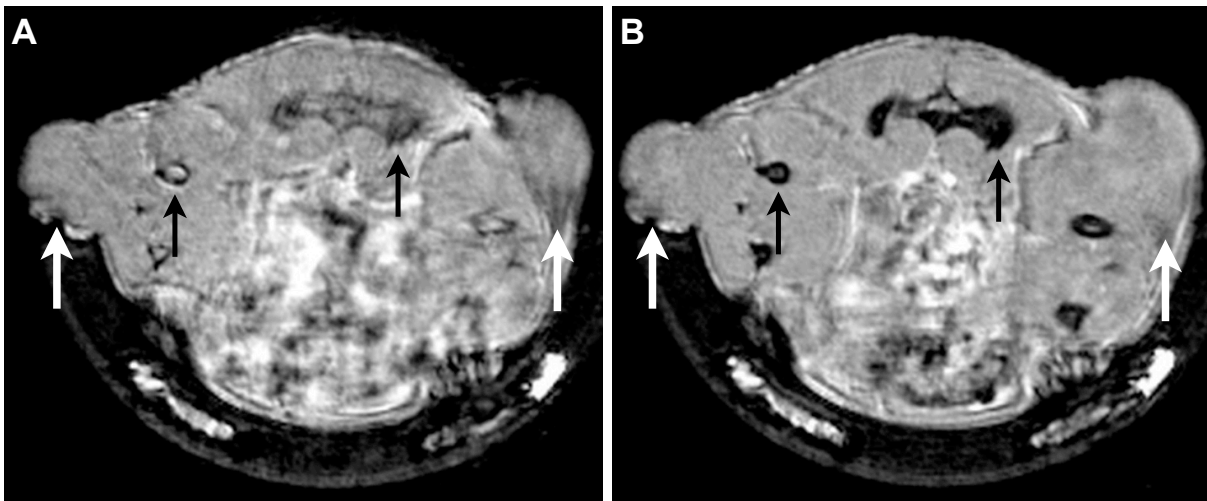


Abbildung 22: Tumor-Bildgebung mittels MRT-Messung vor und nach Gabe von AnxA5-VSOP. Axiale Schichtorientierung vom Rumpf einer Maus. Darstellung zweier Tumore (H69AR links und HT-1080 rechts, weiße Pfeile) vor (A) und 3 h nach Injektion der Probe (B). Die für Eisenoxidnanopartikel typische Signalauslöschung im Bereich des Knochenmarks ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

4.2.3. Histologische Auswertungen

Die Überprüfung der zelltoxischen Wirkung der angewandten Chemotherapie wurde mit einem immunhistologischen Nachweis von aktivierter Caspase in Zinkfixierten Gewebeschnitten durchgeführt. Die Antikörperfärbungen der entnommenen Gewebeproben wurden mit anti-active Caspase-3 durchgeführt. Als sekundärer Antikörper wurde ein fluoreszenzmarkierter Cy5-IgG verwendet.

Die mikroskopische Auswertungen (Abb. 23) zeigten in den Tumorschnitten des Fibrosarkoms HT-1080 eine Apoptose-Steigerung durch chemotherapeutische Behandlung (A, B). Die Signale waren vor allem an der Peripherie des Tumors zu finden. Außerdem fanden sich Bereiche, in denen kaum Signale detektiert werden konnten. Der resistente Lungenkrebstumor H69AR zeigte erwartungsgemäß kaum eine Veränderung der Apoptose-Rate nach der Behandlung (D) im Vergleich zu unbehandeltem Gewebe (C).

Die Gewebeschnitte der Milz wiesen stark erhöhte Signale auf, was die Wirksamkeit der Chemotherapeutika deutlich bewies (E). Gewebeschnitte von Lebergewebe zeigte hingegen kaum Veränderungen der apoptotischen Signale (F).

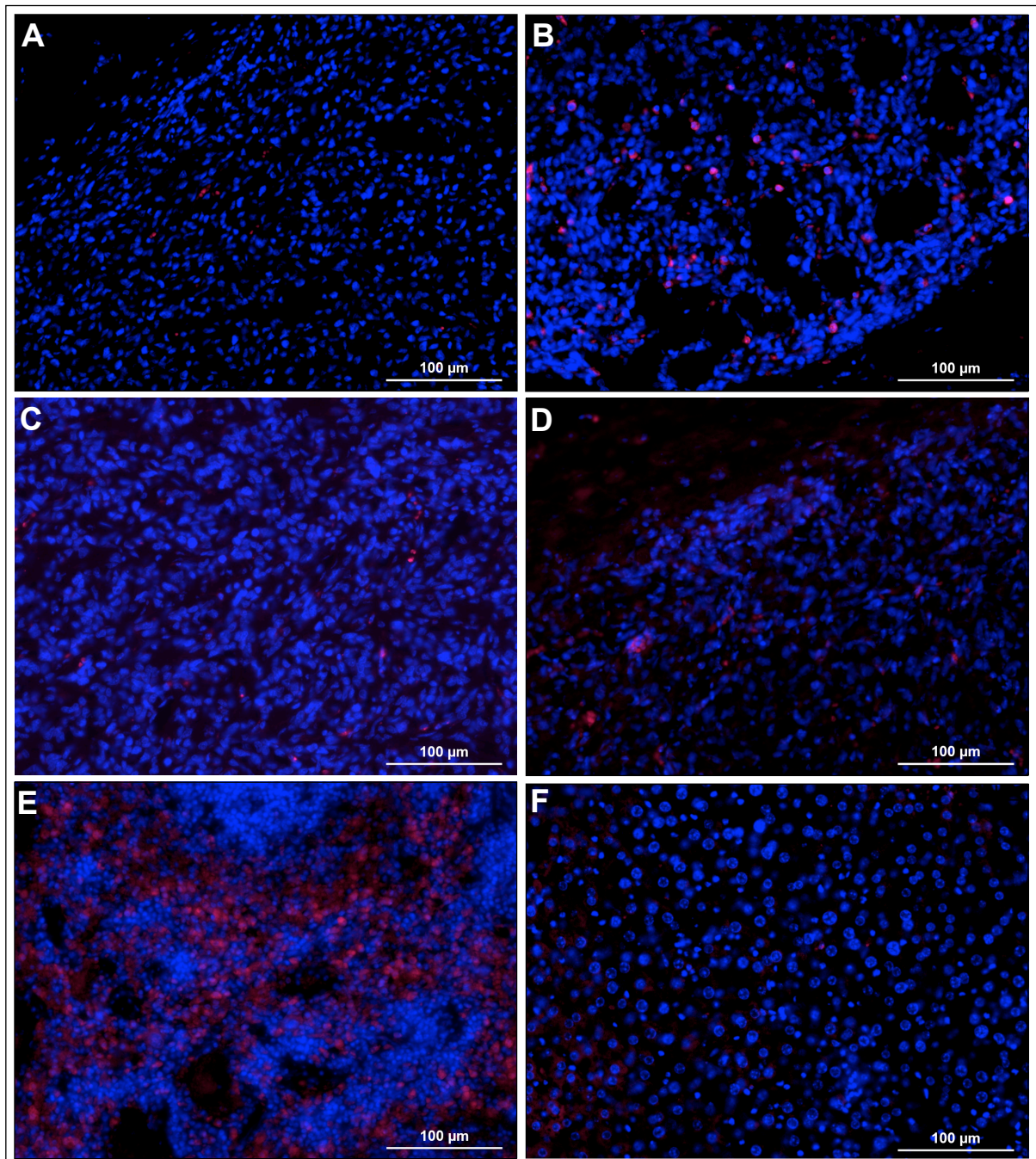


Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Apoptose nach chemotherapeutischer Behandlung. Immunhistologische Färbung gegen aktive Caspase-3 von Gefrierschnitten eines chemosensitiven, unbehandelten (A) und behandelten Tumors (B) der Zelllinie HT-1080 sowie eines chemoresistenten, unbehandelten (C) und behandelten Tumors (D) der Zelllinie H69AR. Ferner exemplarische Aufnahmen nach Behandlung von Milz (E) und Leber (F).

Die im Anschluss durchgeführte Berliner-Blau-Färbung zum Nachweis von Eisenoxidnanopartikel-Anreicherungen im Zielgewebe zeigte in Gewebeschnitten von Chemotherapie-sensitiven Tumoren nur sehr geringe Mengen von Eisen und in Ge-

webeschnitten von Chemotherapie-negativen Tumoren hingegen Anreicherungen in mehreren begrenzten Bereichen (Abb. 24). Leberschnitte zeigten, im Vergleich zu unbehandelten Proben, eine leicht erhöhte Partikelanreicherung, Milzschnitte dagegen eine starke Zunahme von Eisen im Gewebe.

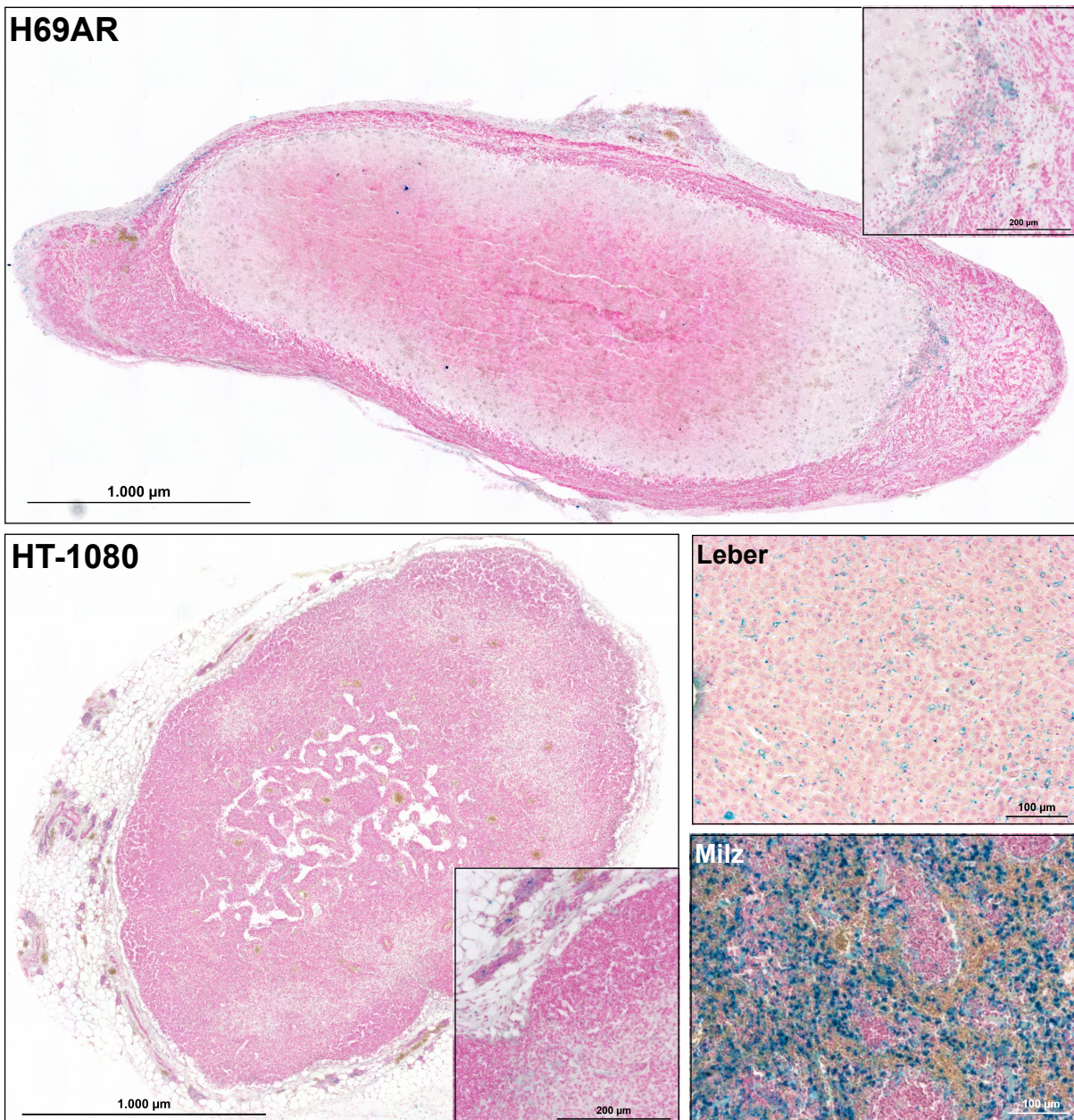


Abbildung 24: Berliner-Blau-Färbung von Gewebe chemotherapeutisch behandelter Tiere nach Injektion von AnxA5-VSOP. Kachelbildaufnahmen von Paraffinschnitte zweier Tumore (H69AR, HT-1080) sowie Aufnahmen von Leber und Milz.

Durch Anpassung der Therapie konnte in weiteren Versuchen die Apoptose-Rate erhöht werden. Das verstärkte Fluoreszenzsignal der detektierten aktiven Caspase-3 in HT-1080-Tumoren zeigte eine Korrelation mit der im Anschluss durchgeführten Berliner-Blau-Färbung. Die partielle Anreicherung von Partikeln im gleichen Abschnitt

wie das verstärkte Apoptose-Signal ist in Abbildung 25 dargestellt. Die Anreicherung befand sich jedoch nur in einem Bereich von wenigen Mikrometern entlang des Randbereichs des Tumors.

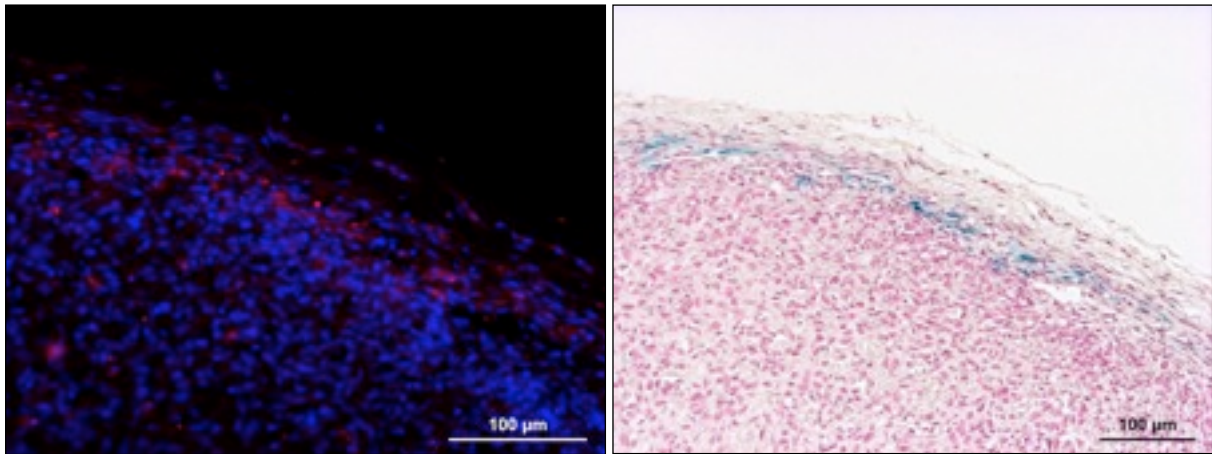


Abbildung 25: Mikroskopische Auswertung der Apoptose und Partikelanreicherung eines Gewebeschnittes des HT-1080-Tumors. Antikörperfärbung gegen aktive Caspase-3 (A) und Berliner-Blau-Färbung (B) des gleichen Gewebeschnittes. Einen Tag nach Behandlung der Maus mit dem Zytostatikum Doxorubicin erfolgte die Injektion von AnxA5-VSOP (50 µmol Fe/kg).

Die Auswertung der entsprechenden MRT-Bilder (Abb. 26) zeigten hingegen keine Signalveränderungen dieser Bereiche innerhalb der Messungen von 3,5 h am 1,5-T-MRT.

Auch die Wiederholung der Versuchsreihe am 7-T-Kleintier-MRT, welches insgesamt eine höhere Auflösung gestattet, zeigte keine signifikante Signalveränderung.

Die Ursache dieser Limitierung kann im Partialvolumeneffekt begründet sein. Die Darstellung von Signalunterschieden bei MRT-Aufnahmen im Bereich von unter 300 µm konnte nicht oder nur unzureichend aufgelöst und dargestellt werden. Die Darstellung von Anreicherungen von Eisenoxidnanopartikeln war in dieser Versuchsreihe nicht möglich.

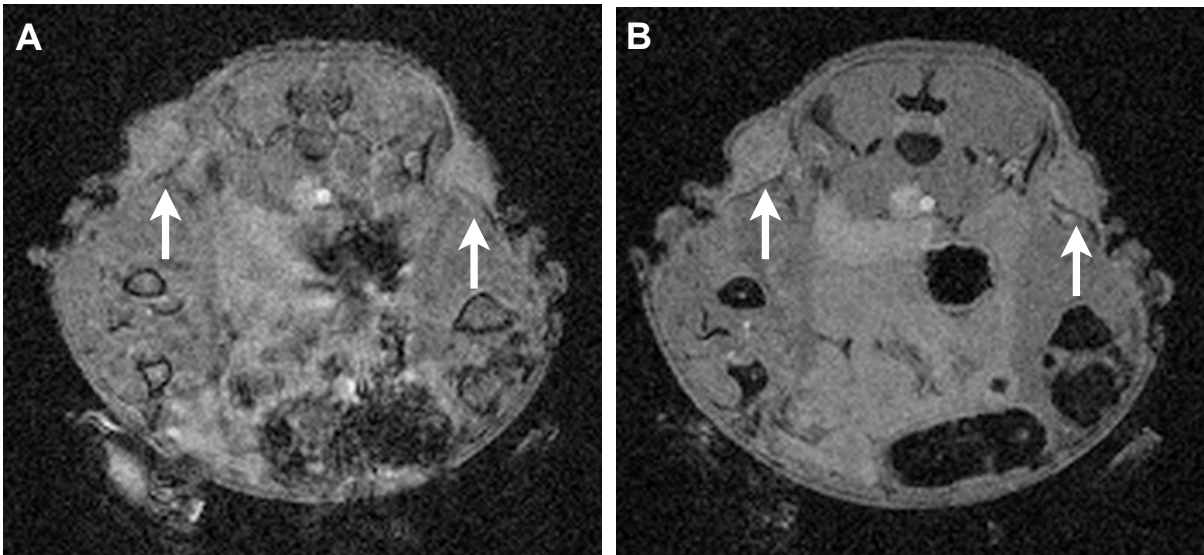


Abbildung 26: MRT-Aufnahmen vor und nach Injektion von AnxA5-VSOP. T2*-gewichtete Messung in axialer Schichtorientierung vom Rumpf einer Maus. Darstellung zweier HT-1080-Tumore nach Doxorubicin-Behandlung (Pfeile) vor (A) und 3,5 h nach Applikation der Sonde (B).

4.3. Apoptose-Bildgebung mit XTEN-AnxA5

Durch Fusion der alternativ zur PEGylierung entwickelten XTEN-Sequenz mit der Sequenz für Annexin wurde ein neues Tool für die Apoptose-Bildgebung geschaffen. Die Zirkulation von Annexin-Molekülen im Organismus einer Maus ist aufgrund seiner Größe von 35 kDa mit 7 min verhältnismäßig kurz. Die Fusion der beiden DNA-Sequenzen vor der Expression verhilft dem Konstrukt zu neuen Eigenschaften. Unter anderem soll die Blutzirkulationszeit deutlich verlängert werden, um eine erhöhte Anreicherung in gering durchbluteten Zielgewebe zu erreichen. Um die Funktionalität dieses neuen Fusionsproteins zu überprüfen, wurde es exprimiert, gereinigt, *in vitro* und *in vivo* analysiert.

4.3.1. Synthese und Reinigung von XTEN-AnxA5

Das Plasmid (pET) mit der Sequenz für das Fusionsprotein konnte erfolgreich in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und über eine Antibiotikaresistenz selektiert werden. Im Anschluss wurden die Bakterien in einer 200 ml-Kultur vermehrt und die Pellets eingefroren oder einer chemischen Lyse unterzogen. Das Zelllysate wurde über eine schwache (Abb. 27) und eine starke Anionenaustauscher-Säule mit einer LPLC (low pressure liquid chromatography)-Anlage gereinigt. XTEN selbst konnte dabei als Reinigungs-Tag verwendet werden, weil der hohe Anteil an negativ geladenen Aminosäuren, der XTEN sehr hydrophil macht, an das Säulenmaterial bindet.

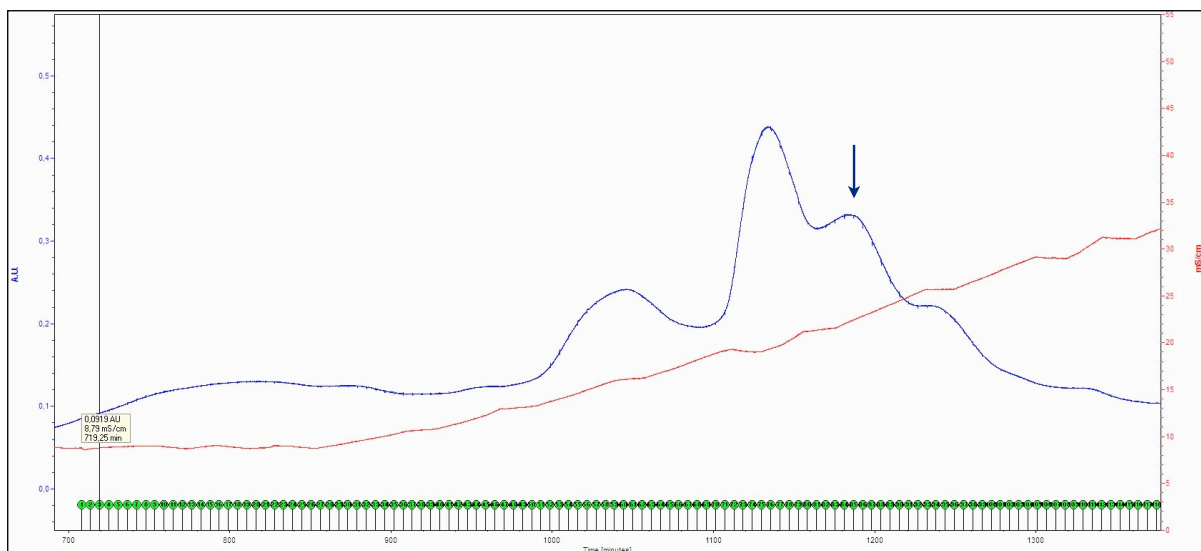
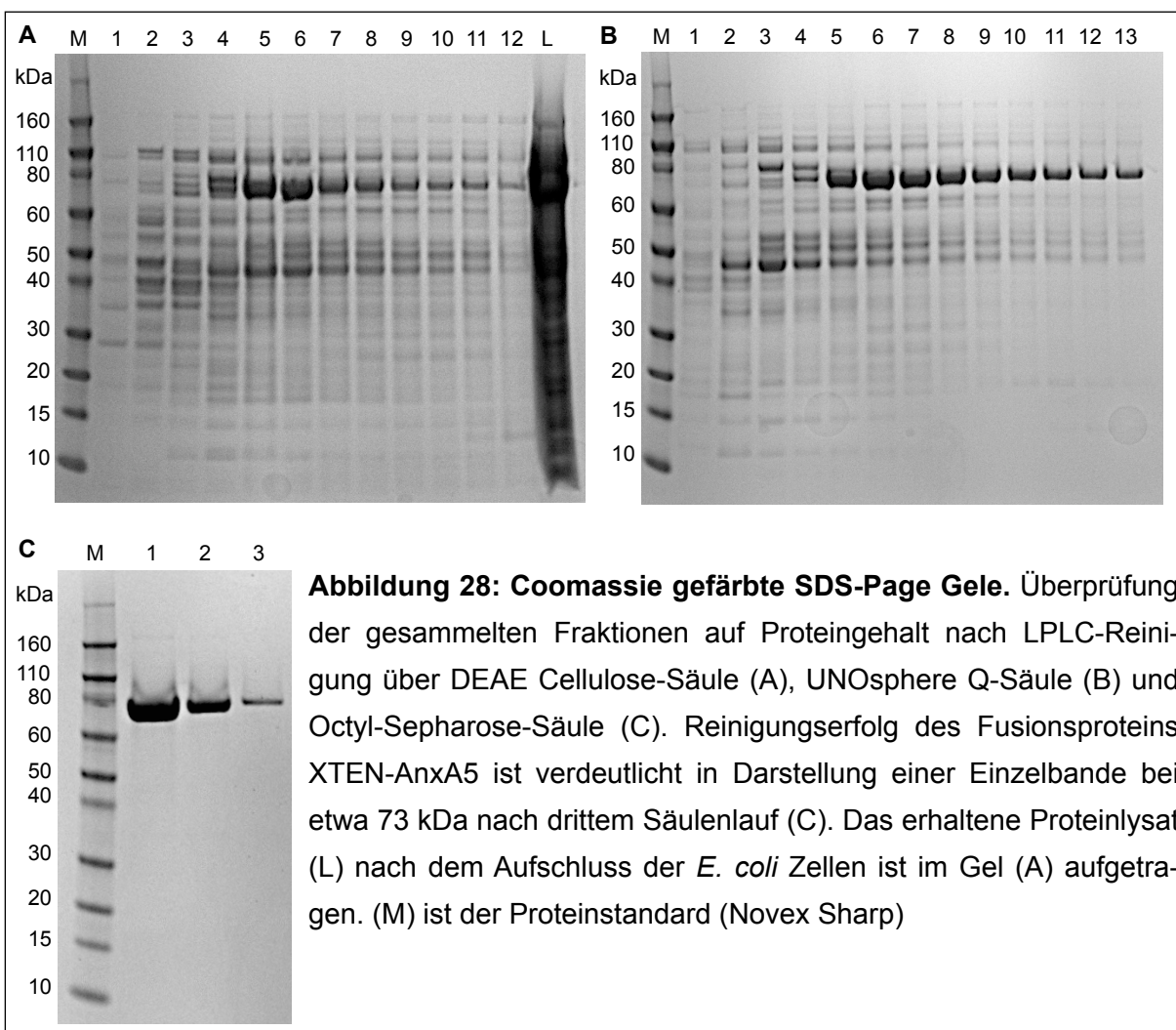


Abbildung 27: Chromatogramm eines LPLC-Laufes. Reinigung eines Bakterienlysates über eine DEAE Cellulose-Säule. Darstellung der UV-Absorption bei 280 nm (blaue Kurve), Skalierung links und Messung der elektrischen Leitfähigkeit (rote Kurve), Skalierung rechts, über die Zeit. Elution von XTEN-AnxA5 gekennzeichnet mit Pfeil. Gesammelte Fraktionen grün.

Im letzten Schritt wurde das Konstrukt über eine hydrophobe Interaktions-Säule, an die XTEN-AnxA5 über die hydrophoben Anteile des AnxA5 bindet, gereinigt. Nach jeder Reinigung über die LPLC-Anlage wurde eine SDS-Page durchgeführt (Abb. 28), um die Fraktionen mit dem gewünschten Protein zu identifizieren und die Reinheit zu überprüfen. Die tatsächliche Größe des XTEN-AnxA5 von 63 kDa weicht jedoch in den Proteingelen um etwa 10 kDa ab. Durch die Ausbildung einer Wasserhülle, aufgrund der extremen Hydrophilie des XTEN, verlangsamt sich die Flussgeschwindigkeit im Gel und das Konstrukt erscheint bei ungefähr 73 kDa.



Die Reinheit des Fusionsproteins wurde zusätzlich mittels HPLC (Analyse Gesche Genter) und MALDI-TOF/MS überprüft (Analyse Lena Figge).

4.3.2. *In vitro* Analysen mit XTEN-AnxA5

Zur Überprüfung der Funktionalität des XTEN-AnxA5-Konstruktes, wurde dieses zunächst mittels Mikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurden Jurkat-T-Zellen mit Camptothecin (9 $\mu\text{mol/ml}$) für 6 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen gleichzeitig mit FITC-gekoppeltem Wildtyp-AnxA5 und 6S-IDCC-gekoppeltem XTEN-AnxA5 inkubiert. Die resultierenden Aufnahmen in Abbildung 29 zeigen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von gefärbten apoptotischen und ungefärbten vitalen Zellen. Die Bildfusion der beiden Fluoreszenz-Kanäle zeigt, dass die selben apoptotischen Zellen detektiert wurden (Abb. 29).

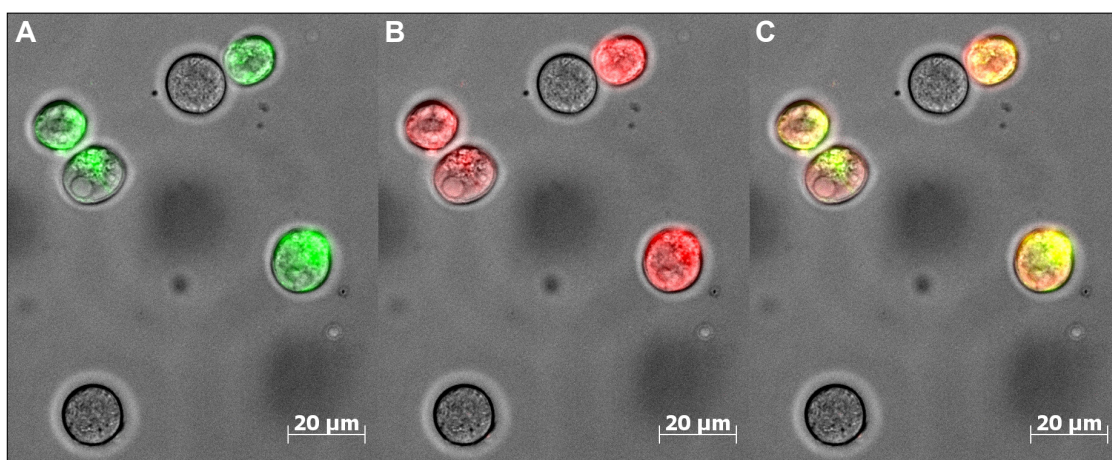


Abbildung 29: Vergleich des Bindungsvermögens von AnxA5 und XTEN-AnxA5 an apoptotischen Zellen. Fluoreszenzmikroskopie von Camptothecin-behandelten Jurkat-T-Zellen inkubiert mit FITC-AnxA5 (A) und 6SI-DCC-XTEN-AnxA5 (B). Übereinstimmung nach Überlagerung der gleichen Bereiche an apoptotischen Zellen (C).

Diese Ergebnisse zeigten sich ebenfalls bei der Analyse mittels Durchflusszytometrie (Abb. 30). Die Behandlung der Jurkat-T-Zellen bewirkte in diesem Fall eine Apoptose-Rate von 50 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-Zellen mit 2 % Apoptose. Die durchflusszytometrische Auswertung der gemessenen Zellpopulationen präsentierte bei der Gruppe von unbehandelten Zellen eine Population von ungefärbten Zellen, die für beide Farbstoff-Konstrukte negativ war (97 %). Für die Gruppe der behandelten Zellen zeigten sich hingegen zwei Zellpopulation, bei der die eine doppelt positiv (49 %) und die andere doppelt negativ (49 %) für die Farbstoffe waren. Abweichungen bei der Bindung einer Sonde an die Zellen, die durch die Anwesenheit von weiteren Subpopulationen gekennzeichnet sind, wurden nicht beobachtet.

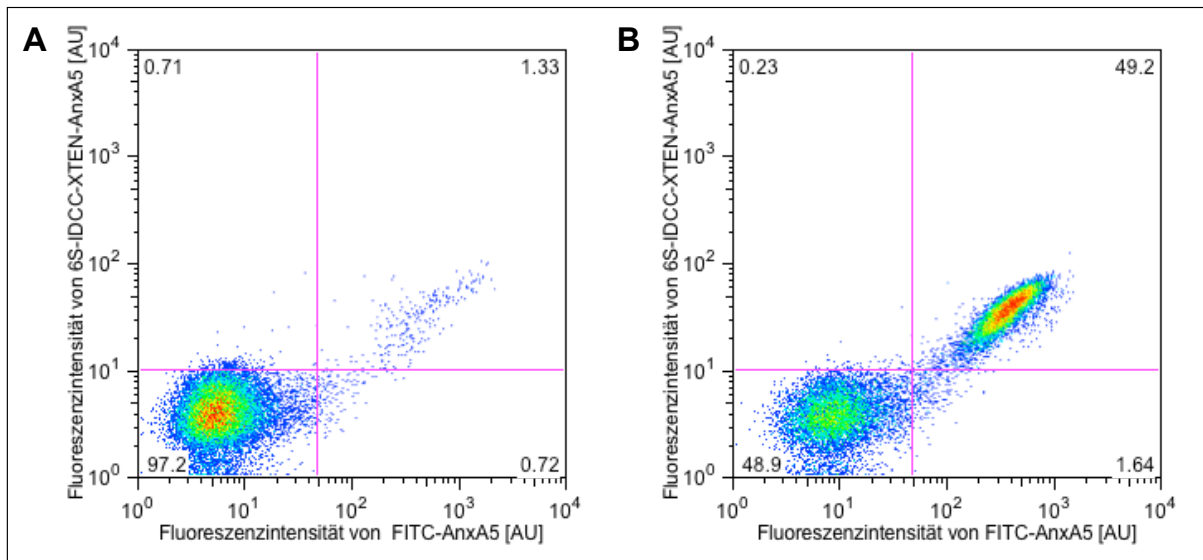


Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse zur Einschätzung der Bindungsfähigkeit von XTEN-AnxA5 im Vergleich zu AnxA5. Darstellung von unbehandelten (A) und behandelten Jurkat-T-Zellen (B) inkubiert mit FITC-gekoppeltem Wildtyp-AnxA5 (X-Achse) und 6S-IDCC-gekoppeltem XTEN-AnxA5 (Y-Achse).

4.3.3. *In vivo* Analysen von XTEN-AnxA5

Die ersten *in vivo* Versuche mit dem Fusionsprotein XTEN-AnxA5 zur Beurteilung der Biokinetik und Biodistribution wurden an einem Einzelphotonen-Emissionscomputertomographen durchgeführt. Für diesen Zweck wurde der Komplexbildner DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) an das freiliegende Cystein der Peptidsequenz gekoppelt (Durchführung Lena Figge). An diesen Chelator wurde dann im Radionuklidlabor durch ausgebildetes Personal das Radionuklid $^{111}\text{Indium}$ komplexiert. Nach den Reinigungsschritten lag die Sonde als $^{111}\text{In-DTPA-XTEN-AnxA5}$ vor [144]. Die Untersuchungen wurden an weiblichen Mäusen des Stammes BALB/c durchgeführt.

Zu Beginn der Analyse wurde eine Computertomographie (etwa 10 min) durchgeführt, um ein Übersichtsbild der anatomischen Strukturen des Tieres zu erhalten. Daran anschließend wurden die etwa 50 Minuten langen SPECT-Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten ausgeführt. In Abbildung 31 sind Aufnahmen eines Tieres nach der Injektion der Sonde 1 h, 3 h und einen Tag später dargestellt. Die Bilder geben Auskunft über die Verteilung der Sonde im Organismus. In der ersten Aufnahme, nach intravenöser Verabreichung der Probe, waren die großen Blutgefäße sowie linke und rechte Herzkammer deutlich zu erkennen. Auch die Ausscheidung des Tra-

cers über die Nieren in die Harnblase war zu sehen. Im Laufe der Zeit wurde die Sonde aus dem Blut in Organe, wie Leber, Milz und Nieren absorbiert, die eine Signalzunahme zeigten.

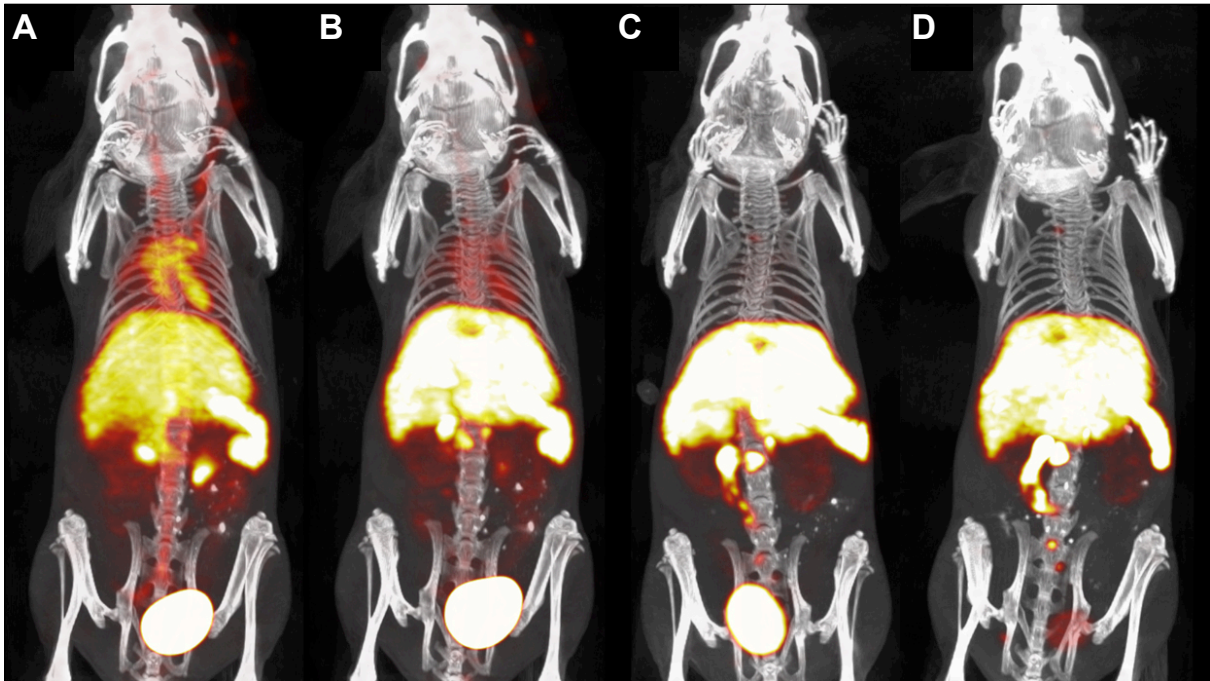


Abbildung 31: SPECT-CT-Messungen zur Bestimmung der Bluthalbwertszeit und der Organverteilung von ^{111}In -DTPA-XTEN-AnxA5. Darstellung von vier Projektionen mit maximaler Intensität einer Maus nach Injektion von ^{111}In -markiertem Fusionsprotein. (A) 0,5 h, (B) 1,2 h, (C) 3,2 h, und (D) 21 h nach Injektion.

Die Auswertung der *in vivo* Messungen in Abbildung 32 zeigt den zeitlichen Verlauf der Aktivitätsverteilung im Organismus. Innerhalb der ersten vier Stunden war ein Signal-Anstieg in Milz und Leber zu verzeichnen. Die Nieren und das Blutgefäßsystem hingegen zeigten nach der ersten Messung eine Signal-Abnahme. Eine Abnahme war auch bei Milz und Leber nach einem Tag sichtbar. In Gehirn- und Muskelgewebe war keine wesentliche Aufnahme der Probe zu erkennen. Die ermittelten Daten aus dem linken Ventrikel konnten zur Bestimmung der Bluthalbwertszeit herangezogen werden. Die Auswertung von Messungen an fünf Tieren ergab eine Bluthalbwertszeit von 63.3 ± 4.4 min.

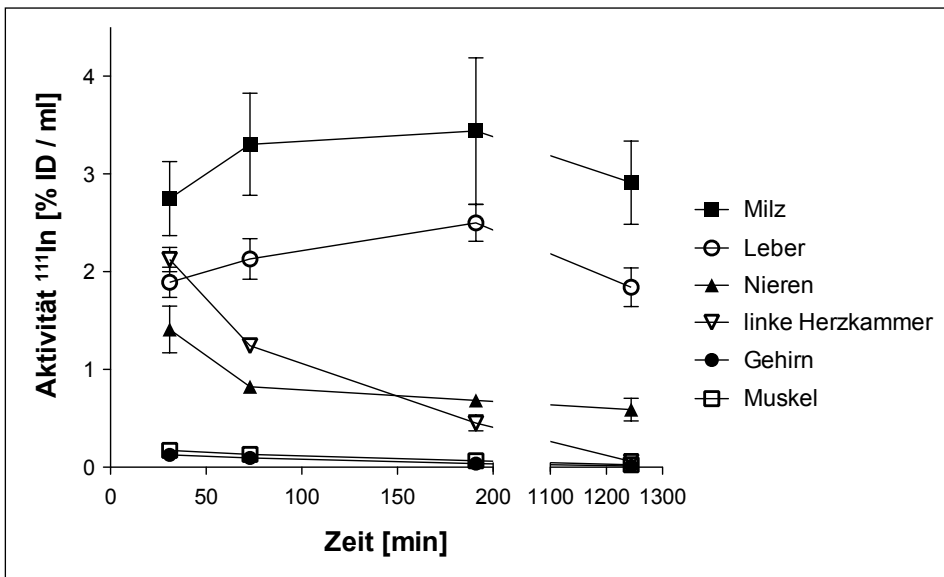


Abbildung 32: Kinetische Auswertung der Verteilung von ^{111}In -DTPA-XTEN-AnxA5 zu vier Zeitpunkten der SPECT-CT-Messungen. Aufnahme der Sonde über Ausscheidungsorgane wie Leber, Milz und Niere. Keine Absorption von Muskel- und Gehirngewebe.

Nach der letzten SPECT-CT-Messung wurden die Tiere euthanasiert und wichtige Organe entnommen. Diese wurden mit einer Feinwaage gewogen und die Aktivität des verbleibenden ^{111}In Indiums im Aktivimeter gemessen. Die ermittelten Werte sind in Abbildung 33 grafisch dargestellt. Die Auswertungen dieser Daten passen zu den Daten der letzten *in vivo* Messungen (21 h). Auch die *ex vivo* Daten lassen eine deutlich erhöhte radioaktive Aktivität in Milz (45 %), Leber (16 %) und Nieren (5,5 %) erkennen. Eine minimale Signalerhöhung zeigte sich im Darmtrakt (0,8 %). Gewebe von Herz (0,26 %), Lunge (0,25 %), Muskel (0,2 %), Magen (0,2 %) und Gehirn (0,01 %) ließen nur eine minimale Aktivität erkennen.

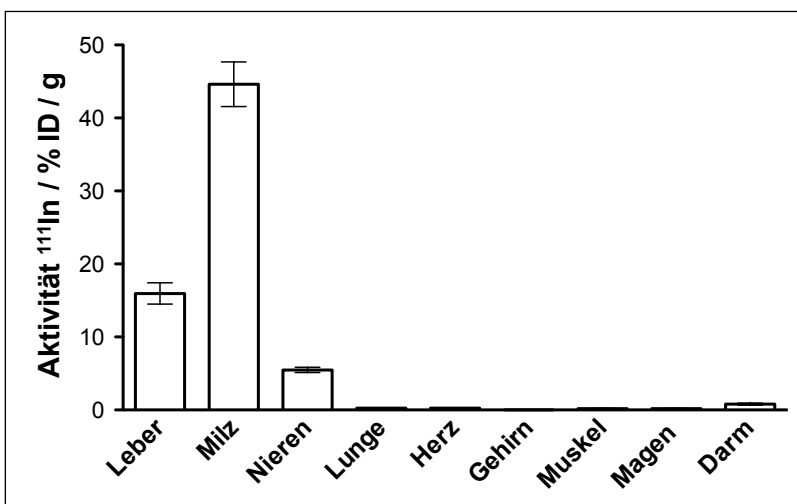


Abbildung 33: *Ex vivo* Bioverteilung von ^{111}In -DTPA-XTEN-AnxA5 einen Tag nach Injektion. Starke Akkumulation der Probe in der Milz und Leber, geringere Anreicherung in den Nieren. Kaum Signal in Lunge, Herz, Gehirn, Magen und Darm.

Die Eignung von XTEN-AnxA5 für eine verbesserte Bildgebung der Apoptose wurde in einem Tumor-Mausmodell getestet. Zellen der Linie EL4 (Maus-Lymphom) wurden athymischen, weiblichen Mäusen in die linke und rechte Flanke implantiert. Anschließend wurden die Tiere chemotherapeutisch mit Etoposid und Cyclophosphamid behandelt, um Apoptose im Tumor auszulösen. Einen Tag nach der Behandlung wurden die beiden Farbstoff-markierten Sonden (6S-IDCC-XTEN-AnxA5 oder 6S-IDCC-AnxA5) i. v. injiziert und die Tiere drei Stunden später euthanasiert. Die Tumore sowie Leber, Milz und Niere wurden entnommen und in einem NIRF-Imager untersucht (Abb. 34 A, C).

Die grafische Auswertungen der NIRF-Bilder (B, D) ergaben im Tumorgewebe signifikant höhere Sondenanreicherungen von langzirkulierendem XTEN-AnxA5 mit 2,37 AU im Vergleich zu AnxA5 mit 0,986 AU ($n = 4$, $P = 0,03$). Noch deutlicher war dieser Unterschied im Bereich von Hot Spots zu erkennen. Hier lagen die Messwerte von XTEN-AnxA5 bei 3,80 AU verglichen mit AnxA5 von 1,36 AU ($P = 0,03$).

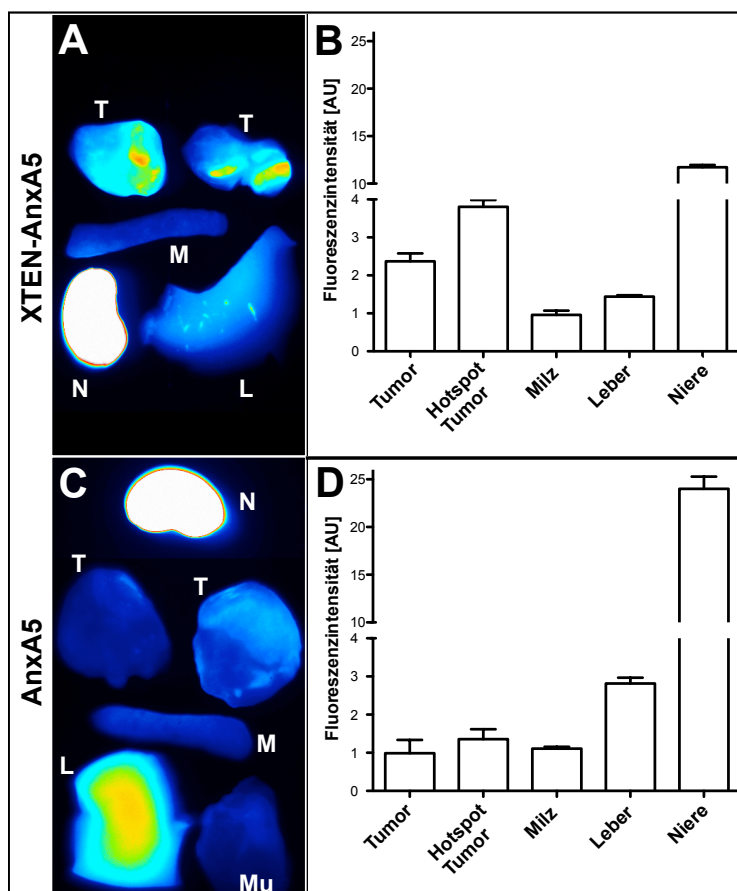


Abbildung 34: Ex vivo NIRF-Bildgebung nach Gabe von XTEN-AnxA5 (A, B) und AnxA5 (C, D). NIRF-Aufnahmen 3 h nach Injektion von je zwei Tumoren = T, Milz = M, Leber = L, Niere = N, Muskel = Mu (A, C) unter chemotherapeutischer Behandlung. Die statistische Bewertung der ex vivo NIRF-Bilder verdeutlicht eine stärkere Aufnahme XTEN-AnxA5 (B) gegenüber AnxA5 (D) in den Tumoren aufgrund der verlängerten Blut-zirkulationsdauer.

Diese Ergebnisse bestätigten sich bei der Fluoreszenzmikroskopie von unfixierten *ex vivo* Gefrierschnitten aus dem Tumorgewebe (Abb. 35). Die stärkeren Signale in Tumorgewebe mit XTEN-AnxA5-Applikation verdeutlichen die höhere Aufnahme des langzirkulierenden Annexins (A, magenta) im Vergleich zum schwächeren Signal bei AnxA5-Applikation (C, magenta). Das Verteilungsmuster hingegen war sehr ähnlich. Die immunhistologischen Färbungen gegen aktive Caspase-3 zeigten, dass die chemotherapeutische Behandlung vergleichbare Apoptose-Raten in den Tumore bewirkte (B, D, grün).

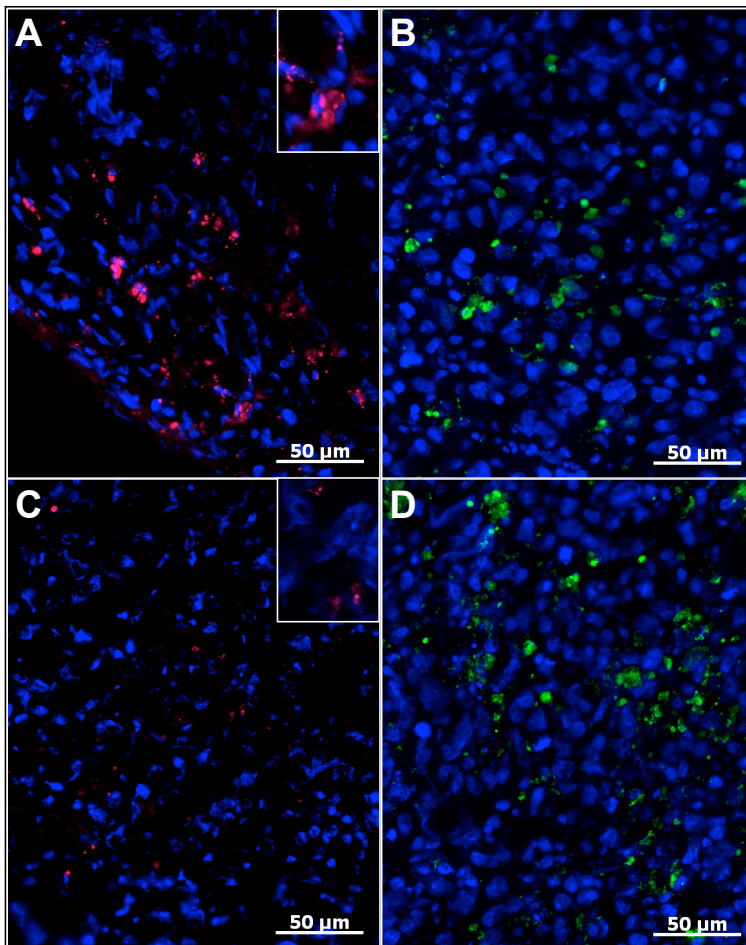


Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Auswertungen von Tumoren nach Gabe von XTEN-AnxA5 (A, B) oder AnxA5 (C, D). Gefrierschnitte zeigten deutlich mehr Signal von 6S-IDCC-XTEN-AnxA5 (A) im Vergleich zu 6S-IDCC-AnxA5 (C). Immunhistologische Färbungen gegen aktive Caspase-3 (B, D) präsentierten ähnliche Apoptose-Raten der Tumore nach der Behandlung. Kernfärbung mit Hoechst 33258.

5. Diskussion

5.1. Aktivierbare Matrixmetalloproteinase-spezifische Eisenoxidpartikel

5.1.1. *In vitro* Analysen zur Funktionalität

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden MMP-spezifische Eisenoxidpartikel auf ihre Größe, Stabilität, Aktivierbarkeit und Anreicherungsfähigkeit im Zielgewebe untersucht.

Die verwendeten Eisenoxidpartikel (VSOP) bestanden aus einem magnetischen Kern, der mit Citrat beschichtet und, aufgrund seiner negativen Ladung, elektrostatisch stabilisiert war. Der Durchmesser dieser Nanopartikel betrug im Durchschnitt 8 nm. Sie eignen sich aufgrund ihrer superparamagnetischen Eigenschaften als Kontrastmittel für die MRT [156]. Des Weiteren können Eisenoxidpartikel aufgrund ihrer geringen Größe gut verträglich und biologisch abbaubar hergestellt werden. Verwendet werden solche Nanopartikel im Bereich der Angiographie-Bildgebung [157], der Leber/Milz-Darstellung [158] und für die Kontrastierung des Abdomens unter oraler Einnahme [159]. Zugelassene Präparate im Bereich der SPIO-Kontrastmittel sind AMI-25 (Endorem®), SHU 555 A (Resovist®) und OMP (Abdoscan®) [160, 161]. Die injizierten Kontrastmittel werden größtenteils in den Leberzellen des RES-Systems phagozytiert [162]. Die Zirkulationsdauer beträgt nur wenige Minuten. Anschließend werden die Eisenoxidpartikel in den physiologischen Eisenpool aufgenommen und über den Eisenmetabolismus ausgeschieden [163].

Um eine spezifische Anreicherung der Nanopartikel im Zielgewebe für die molekulare Bildgebung zu erreichen, bedarf es einer zusätzlichen Kopplung von zielgerichteten Liganden, wie Peptid- oder Proteinmolekülen, Antikörpern oder anderen kleinen organischen Molekülen [164].

Die verwendeten VSOP wurden elektrostatisch mit Peptid-PEG-Konjugaten (PEG, Polyethylenglycol) beschichtet (Abb. 36). Die Peptidsequenz enthielt eine Schnittstelle für die Matrixmetalloproteinase-2 und 9. Die negativ geladene Oberfläche der VSOP (Citrat, rot) diente hierbei als Kopplungsstelle für den positiv geladenen Peptidbereich (Arginine, blau). Die PEG-Ketten (hellgrau) sollten den Nanopartikeln

zu einer sterischen Stabilisierung für die Lagerung, Applikation und Zirkulation im Organismus verhelfen.

Die Aktivierung der Protease-spezifischen Eisenoxidnanopartikel (PSOP) erfolgte enzymatisch. Durch Zugabe der Protease MMP-9 wurde das Peptid an der spezifischen Schnittstelle getrennt und die PEG-Konstrukte abgespalten. Dadurch verloren die Partikel ihre sterische Stabilisierung und eine gemischt geladene Oberfläche mit negativen Anteilen der Zitronensäuroberfläche der VSOP und positiven Anteilen der Argininkette wurden offen gelegt, was wiederum die Aggregation der Partikel zur Folge hatte. Die damit verbundenen Änderungen der Signalintensitäten durch Erhöhung der T2-Relaxivität („magnetic relaxation switch“-Effekt) [165] in den MRT-Messungen gaben somit über die Enzymaktivität von MMP-2/9 Auskunft.

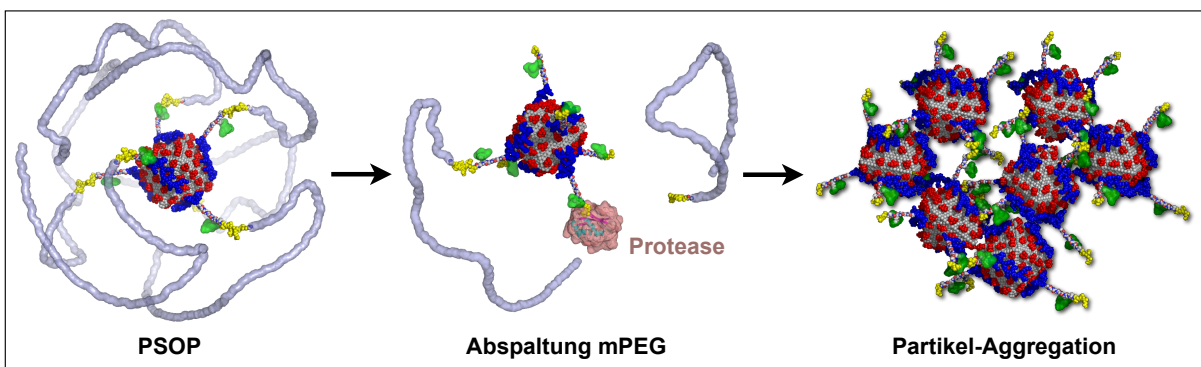


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Aggregation von PSOP bei Anwesenheit von Protease MMP-9 [28]. Die Zugabe der Protease zur PSOP-Suspension bewirkte die Abspaltung des Peptid-PEG an der MMP-2/9-Schnittstelle. Die freiliegenden Oberflächen mit dem negativen Citrat und den positiven Aminosäuren lösten die Aggregation der Partikel aus. Diese Ansammlung von Partikeln führte dann zu einem magnetic relaxation switch und verursachte bei MRT-Messungen deutliche Signaländerungen.

Legende: Eisenoxidkern = grau, Citrat = rot, Arginin = blau, MMP-Schnittstelle = gelb, Fluorescein = grün, PEG-Kette = hellgrau.

Die Größenmessungen am Zetasizer nach dem Hinzufügen von unterschiedlichen Verhältnissen des Peptid-PEG zu den VSOP zeigten, dass die Beschichtung der Partikel in erwarteter Weise erfolgte, da sich die hydrodynamischen Durchmesser veränderten. Die Oberfläche konnte bei einem Verhältnis von sechs oder mehr Peptid-PEG zu einem VSOP abgedeckt werden. Es ergab sich eine erwartete Partikelgröße von etwa 24 nm bei einer Beschichtung von 6 Peptid-PEG (Abb. 7).

Bei Verwendung von weniger als 6 Peptid-PEG pro Partikel wurden größere Durchmesser beobachtet. Dies lässt sich durch eine unvollständige Absättigung der Oberfläche mit Peptidmolekülen erklären. Die Partikel bildeten aufgrund der größeren Lücken zwischen den PEG-Ketten Dimere oder Multimere, was sich wiederum in einem höheren hydrodynamischen Durchmesser widerspiegelte (Abb. 8).

Nach der Herstellung der Partikel wurde die Aktivierbarkeit der Schnittstelle untersucht. Die Anwesenheit des Eisenoxidkerns und die Kopplung von Polyethylenglycol sollte sich nicht negativ auf das Erkennen und Schneiden der MMP-Schnittstelle durch die Protease auswirken. Die hydrodynamischen Größenmessungen der PSOP nach Zugabe von MMP-9 zeigten die erwarteten Größenzunahmen der Partikel. Die beobachtete Zunahme der Partikelgrößen am Zetasizer erklären sich aus der Aggregation der PSOP, aufgrund der Abtrennung des sterisch stabilisierenden Polyethylenglycols. Die Messungen bestätigen den erwarteten Effekt der Partikelaggregation und zeigen, dass die enzymatische Reaktion in vorgesehener Weise ablief (Abb. 9). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass sich die PSOP unter den untersuchten Bedingungen gebildet hatten.

Die Kontrollen, bei denen ein MMP-Inhibitor hinzugesetzt wurde, zeigten hingegen keine Größenzunahme. Der Effekt der Größenzunahme basierte demnach auf der Zugabe des Enzyms und der enzymatischen Abtrennung des Peptid-PEG. Hydrodynamische Größenmessungen der PSOP ohne Zugabe des Enzyms nach 24 h zeigten, dass die Größe der Partikel sich nicht veränderte, was auf eine gute Stabilität der PSOP hinwies.

Um eine optimale *in vivo* Anwendung gewährleisten zu können, müssen die Peptidkonjugate fest auf der Partikeloberfläche gebunden sein. Der Verlust würde zu einer Störung der Enzymaktivierung der Partikel und zum Ausfall der erworbenen stealth-Eigenschaften durch das Polyethylenglycol führen. Weiterfolgende Versuche zu Stabilitätsuntersuchungen in physiologischen Puffern und Medium wurden von Lena Figge durchgeführt [155].

Diese dargestellten Effekte konnten bei Phantom-Messungen im MRT bestätigt werden (Abb. 10). Auch dort kam es nach Zugabe der Protease MMP-9 zu einer Aggregation der PSOP. Für die Bildgebung konnte dabei das Phänomen des „magnetic relaxation switch“ (MRS) ausgenutzt werden [154]. Hierbei bewirkt die Aggregation der Partikel die Erhöhung der T₂-Relaxation (R₂), was besonders bei T₂*-Messungen zu einer Signalverminderung führt. Die MRT-Aufnahmen zeigten ei-

ne deutliche, zeitabhängige Signalabnahme nach Protease-Zugabe. Eine Steigerung der Partikelkonzentration bei gleicher Konzentration der Protease führte zu einer steigenden Signalabnahme, die jedoch langsamer sichtbar wurde (Abb. 10). Diese langsamere Reaktionsgeschwindigkeit wurde wahrscheinlich durch eine Substratsättigung hervorgerufen, weil alle Protease-Moleküle in einem Enzym-Substrat-Komplex vorlagen. Bei der Zugabe von steigenden Inhibitorkonzentrationen konnte die Aktivierung hingegen blockiert werden (Abb. 11). Diese Hemmung der Akkumulation der PSOP spiegelte sich in der fehlenden Signalauslöschung wider und bestätigt die enzymatische Aktivierung der Partikel.

Die Signalintensitäten bei MRT-Messungen von durchgeführten Kontrollversuchen ohne Enzym wiesen keine Veränderungen auf. Auch diese Resultate belegen das Prinzip der enzymatischen Aktivierung der PSOP.

Ein entgegengesetztes Prinzip, Enzymaktivitäten *in vitro* unter Ausnutzung des MRS im MRT darzustellen, ist die Verwendung von Aggregaten aus Nanopartikeln, welche sich bei Enzymaktivität zu Einzelpartikeln separieren. Die Auflösung der Aggregate führt hierbei zu einer Erhöhung des T2-Signals bei Verringerung der T2-Relaxivität. Die von Perez et al. verwendeten Aggregate bestanden aus vernetzten Eisenpartikeln (CLIO, cross linked iron oxide nanoparticles), die durch kurze Peptidsequenzen zusammengehalten wurden. Das Peptid war mit einer Schnittstelle versehen, die durch das Enzym Caspase-3 erkannt und geschnitten wurde. Die Zugabe des Enzyms führte zu einer Spaltung des Verbindungspeptides, so dass sich die Eisenpartikel vereinzeln und das T2-Signal sich erhöhte [154].

Die Verwendung von vernetzten CLIOs ist in Hinblick auf eine *in vivo* Anwendung kritisch zu betrachten. Aufgrund einer Größe von etwa 160 nm werden die Aggregate wahrscheinlich sehr schnell aus dem Blut in Leber und Milz ausgeschieden, so dass die Anreicherung in Caspase-reichem Gewebe nur gering ausfallen dürfte. Außerdem sind Signalveränderungen ausgehend von einem hohen T2-Kontrasteffekt der ungeschnittenen Aggregate zu einem geringeren T2-Kontrasteffekt der proteolytisch getrennten Partikel (weniger dunkel) *in vivo* schwer detektierbar.

Das umgekehrte Prinzip, nämlich die Aggregation von Partikeln bei Anwesenheit des spezifischen Enzyms und damit Erhöhung des Kontrasteffektes, erscheint hier eine vorteilhaftere Methode. Die Partikel können sich aufgrund ihrer Anziehungskräfte

te untereinander nicht mehr entfernen und tragen so zur Signaländerung bei. Die Wirkung der erhöhten T2-Relaxivität aufgrund des MRS ist dabei deutlich als Signalminderung (Zielgewebe dunkel) zu erkennen.

Die Ergebnisse der Charakterisierung der PSOP entsprachen den Erwartungen [166]. Im Weiteren schlossen sich die Vorversuche für die *in vivo* Validierung der PSOP an.

5.1.2. Expression von Matrixmetalloproteinasen

Für die *in vivo* Untersuchungen der PSOP wurde ein Tumor-Mausmodell ausgewählt. Die Versuchstiere erhielten jeweils zwei unterschiedliche Tumore. Zum einen wurden humane Fibrosarkom-Zellen einer stark MMP-exprimierenden Zelllinie (HT-1080) [167, 168] und zum anderen wurden humane Mammakarzinom-Zellen einer schwach MMP-exprimierenden Zelllinie (BT-20) [169] verwendet. Die Verwendung eines xenograft Modells bietet Vorteile zum reinen Mausmodell. Das Verhalten der Tumore reflektiert hierbei die Prozesse im Patienten und die Testung neuer Substanzen spiegelt die Verhältnisse im humanen System wider [170]. Allerdings müssen viele Prozesse aufgrund der fehlenden Immunkompetenz der Tiere kritisch betrachtet werden [171].

Die Analysen der beiden Zelllinien auf ihre unterschiedliche MMP-2 und MMP-9-Expression mittels qPCR ergaben auf RNA-Ebene einen 42fachen bzw. 44fachen Unterschied. Diese Resultate konnten in den Tumoren mittels Antikörperfärbung gegen MMP-2 und MMP-9 und *in situ* Zymographie bestätigt werden (Abb. 13, 14).

Die beiden Zelllinien erschienen nach Auswertung der Ergebnisse als geeignet, das spezifische Verhalten der PSOP *in vivo* zu untersuchen. Der MMP-positive Tumor sollte aufgrund seiner hohen Konzentration von MMP-2/9 eine spezifische Aktivierung der PSOP verursachen und die Partikel sich dadurch im Tumorbereich anreichern. Der MMP-negative Tumor fungierte hierbei als Kontrolle, um eine unspezifische Anreicherung der PSOP beurteilen zu können.

Charakteristisch für die stark MMP-exprimierende Zelllinie war ein schnelles Wachstum. Tumorstadium und Metastasierung sind stark mit der proteolytischen Auflösung der extrazellulären Matrix (ECM) des umliegenden Gewebes assoziiert [172]. Die Degradation der ECM wird durch die Überexpression von MMPs bewirkt.

Insbesondere MMP-2 und 9 weisen eine extrem hohe Aktivität in diversen Krebserkrankungen auf [173]. Die erhöhte Aktivität von MMPs erlaubt eine verstärkte Zellproliferation und Invasion, und ermöglicht auch eine schnellere Angiogenese und Metastasierung (Abb. 37). Aber auch bei anderen Erkrankungen spielt die Fehlregulation von MMPs eine entscheidende Rolle [174]. Das Erkennen von Gewebearealen, die eine verstärkte MMP-Aktivität aufweisen, ist daher ein wichtiger Schritt im Bereich der Diagnostik.

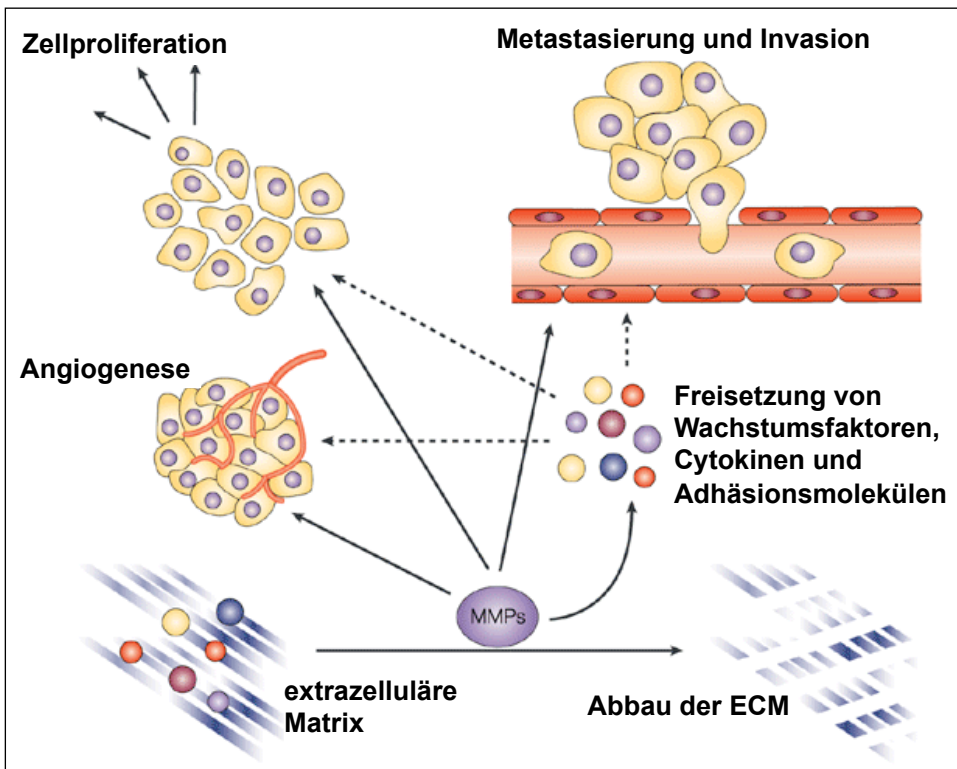


Abbildung 37: Einfluss der Matrixmetalloproteinasen auf Tumorwachstum, Angiogenese, Metastasierung und Invasion (verändert nach [175]). Der Abbau der extrazellulären Matrix durch MMPs führt zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren, Cytokinen und Adhäsionsmolekülen, die ihrerseits das Tumorwachstum, die Angiogenese und Metastasierung voran treiben.

5.1.3. Evaluation der *in vivo* MRT-Bildgebung mit PSOP

Um die Funktionalität der PSOP *in vivo* zu überprüfen, wurden diese in Tumor-tragende Tiere i. v. injiziert und im MRT untersucht. Die Tumoraufnahmen wurden mit T2*-gewichteten Sequenzen durchgeführt. In solchen Messungen wird Gewebe mit langer T2*-Relaxationszeit (Flüssigkeiten, entzündliches Gewebe) signalreich (hell)

und Gewebe mit kurzer T2*-Relaxationszeit (Muskulatur) signalarm (dunkel) dargestellt. Die Anwesenheit von superparamagnetischen Substanzen bewirkt eine starke Signalmindering durch Verkürzung T2* von Protonen in der Umgebung.

Aufgrund des stark unterschiedlichen MMP-Expressionsverhaltens der beiden implantierten Zelllinien sollte sich durch die unterschiedliche Aktivierung der PSOP ein deutlicher Signalunterschied zwischen dem MMP-positiven und -negativen Tumor nach Applikation der PSOP (50 $\mu\text{molFe/kg}$ Körpergewicht) ergeben. Die Ergebnisse der Messungen am 7-T-Kleintier-MRT ergaben jedoch keine signifikanten Signalintensitätsunterschiede zwischen den Tumoren. Es konnte ferner keine Differenz der Signalintensität in den Tumoren vor Applikation der Probe und 2,5 h nach Injektion ermittelt werden (Abb. 15). Auch die Verdoppelung der Konzentration der Probe auf 100 $\mu\text{molFe/kg}$ Körpergewicht ergab keine Veränderungen in den Signalintensitäten der Tumore.

Eine weitere Größe, die die Detektierbarkeit von Signalunterschieden bei MRT-Messungen bestimmt, ist das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR, signal-to-noise-ratio). Das SNR ist unter anderem abhängig von der Voxelgröße (Element im dreidimensionalen Raum) und der Anzahl der Signalmittelungen (also auch der Messzeit). Auch bei längerer Messung mit maximiertem SNR konnten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Tumoren oder vor und nach der Sondenapplikation festgestellt werden. Des Weiteren wurde der Parameter der Echozeit optimiert.

5.1.4. Histologische Analysen von PSOP in Tumoren

Der nächste Schritt sah die Überprüfung auf histologischer Ebene vor. Aufgrund der erfolglosen MRT-Messungen, wurde die Anreicherung von Eisenoxidnanopartikeln im Zielgewebe mit histologischen Berliner-Blau-Färbungen untersucht. Die Auswertungen der Eisen-Färbungen zeigten Eisenanreicherungen im peripheren Bereich der MMP-positiven Tumore (Abb. 17). Die Größe dieser eisenreichen Areale betrug jedoch in der Regel nicht mehr als 100 μm in der Breite und erstreckte sich im zellärmeren Randbereich des Tumors, der stark durch die Anwesenheit von extrazellulärer Matrix charakterisiert war. Die Detektion von Eisenpartikeln im Inneren blieb hingegen eine Ausnahme. In einem geringeren Umfang wiesen die MMP-negativen Tumore ebenfalls Eisenanreicherungen auf. Auch bei diesen Tumoren beschränkte

sich die Akkumulation auf die Peripherie. Die Größe dieser Areale war im Vergleich zum MMP-positiven Tumor jedoch deutlich geringer.

Das Anreicherungsverhalten der PSOP an der Peripherie des MMP-positiven Tumors wurde vermutlich durch die erhöhte Expression der Matrixmetalloproteinasen in diesem Teil des Tumors bewirkt. Diese Lokalisation korreliert mit den durchgeführten Antikörperfärbungen gegen MMP-2 und MMP-9, sowie der *in situ* Zymographie in Tumorschnitten (Abb. 13, 14). Die verstärkte Expression am Randbereich eines sich entwickelnden Tumors ist typisch und gestattet die Degradation des umliegenden Gewebes, wodurch das schnelle, infiltrierende und destruktive Wachstum des Tumors ermöglicht wird [176]. Der Abbau von Komponenten der ECM, die sich aus einem Netzwerk aus Makromolekülen zusammensetzt, hat weitreichende Folgen. Zum einen dient die ECM als stabilisierendes Gerüst, zum anderen ist sie bei der Regulation zellulärer Prozesse beteiligt. Dazu gehören unter anderem Entwicklung, Wachstum und Migration. Diese Prozesse bedingen einen permanenten Wandel der ECM, der für die Aufrechterhaltung der zellulären Kommunikation unabdingbar ist [177]. Durch die zielgerichtete Spaltung von ECM-Komponenten erlangen Tumorzellen die Fähigkeit, in das umliegende Gewebe einzudringen (Abb. 37). Dabei spielen MMP-2 und MMP-9 eine entscheidende Rolle, da sie das Kollagen, der Hauptbestandteil der Basalmembranen, degradieren und die im weiteren Verlauf aktivierten Prozesse wie Angiogenese, Invasion und Metastasierung verstärken [79].

Die vorhandene MMP-Aktivität (Abb. 13, 14) des MMP-negativen Tumors deckten sich mit den Erkenntnissen zum Expressionsverhalten der Matrixmetalloproteinasen von Stromazellen. Studien deuten auf eine kooperative Expression von MMP von Tumor- und Stromazellen hin [178, 179]. Übereinstimmend mit dieser Aussage erklärten sich die Anreicherungen von Partikeln im Randbereich des MMP-negativen Tumors. Die Tumorzellen rekrutieren stromale Zellen und induzieren durch Freisetzung von MMP-Induktoren oder Cytokine die Bildung oder bei MMP-speichernden Zellen, die Freisetzung von MMP [180]. Nichtsdestotrotz konnte insgesamt eine geringere Partikelanreicherung beim MMP-negativen im Vergleich zum MMP-positiven Tumor festgestellt werden, die jedoch in beiden Fällen zu keinem ausreichenden Bildkontrast in der MRT führten.

Die Ergebnisse aus den MRT-Messungen und den Auswertungen der histologischen Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass zwar im Zielgewebe eine Anreicherung der PSOP erfolgte, jedoch in einem so geringem Umfang und einem so begrenzten Gebiet, dass diese möglicherweise durch Partialvolumeneffekte mittels MRT nicht detektiert werden konnten. Der Partialvolumeneffekt entsteht, wenn in einem vermessenen Volumenelement (Voxel) mehrere Gewebeanteile mit verschiedenen Kontrastierungen vorliegen. Bei der Bildberechnung wird ein Mittelwert für jedes Voxel bestimmt. Reichern sich nur in einem kleinen Teil des Voxels Partikel an, kann diese Veränderung im Mittelwert unterhalb des Detektionslimits liegen. Aufgrund der geringen Ausdehnung der PSOP-Anreicherung von maximal 100 µm an der Peripherie der Tumore blieben die Signalintensitäten der MRT-Messungen unverändert. Die gewählten Schichtdicken der Messungen betragen zwischen 500 und 100 µm. Die Anreicherungen blieben daher wahrscheinlich in der MRT unentdeckt. Partialvolumeneffekte können durch Verringerung der Voxelgröße minimiert werden. Allerdings muss dann die Messzeit entsprechend verlängert werden, um das gleiche SNR zu erreichen, was wiederum *in vivo* nicht beliebig möglich ist.

Die Darstellung der Anreicherung der PSOP mit der MRT im Tumormodell war bisher nicht möglich gewesen. Um eine signifikante Signaländerung zu bewirken, wäre eine vermehrte Akkumulation von PSOP nötig. Mehr superparamagnetische PSOP im Zielgebiet würden die Stärke und Ausdehnung der Magnetfeldbeeinflussung durch die Partikel vergrößern und dadurch in mehr Voxeln eine stärkere Signalverminderung verursachen. Daher wurde eine Verlängerung der Bluthalbwertszeit durch Optimierung der Abschirmung der VSOP durch die Peptid-PEG untersucht. Jedoch konnte die Abschirmung der VSOP mit unterschiedlichen Verhältnissen von Peptid-PEG die Anreicherung nicht steigern. Auch die Erhöhung der Konzentration der PSOP-Gabe zeigte keine positiven Auswirkungen.

Ungeklärt ist bisher der Einfluss von Blutbestandteilen, wie z. B. Albumin, auf die PSOP *in vivo*. Eine Analyse des Aggregationsverhaltens im Blut könnte zukünftig Aufschluss über veränderte Bedingungen der PSOP und negative Einflüsse auf die MMP-Schnittstelle geben.

5.2. Annexin A5 als Apoptosemarker

Annexin ist bereits als Apoptosemarker in der Forschung und Klinik weit verbreitet. Ein neuer Ansatz soll Annexin für ein Therapie-Monitoring bei Krebserkrankungen anwendbar machen.

5.2.1. MRT-Analysen unter Anwendung von Annexin A5-VSOP

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Eisenoxidnanopartikel verwendet, die mit Annexin A5-Molekülen beschichtet waren (AnxA5-VSOP). Zuerst wurden Untersuchungen zur Stabilität und Funktionalität der AnxA5-VSOP durchgeführt (Herstellung und Analyse Lena Figge). Anschließend wurden die Partikel *in vitro* für die Bildgebung getestet. Der letzte Schritt bestand aus der *in vivo* Anwendung in einem Tiermodell. In den durchgeführten Analysen wurde die Anreicherungsfähigkeit der AnxA5-VSOP durch aktives Targeting im apoptotischen Zielgewebe und die anschließende Detektionsmöglichkeiten dieser Gewebeareale in der MRT untersucht.

5.2.2. Stabilitätsuntersuchungen und *in vitro* Anwendung der AnxA5-VSOP

Nach der Beschichtung der VSOP mit Annexin-Molekülen wurde die Stabilität der Partikel unter physiologischen Bedingungen untersucht. Die Untersuchungen der Partikelgrößen und Relaxivitäten zeigten kaum Veränderungen über die gemessene Zeit. Die Messung des Verhältnisses von Annexin A5 zu Partikeln von ca. 9 zu 1 ergab in Modellberechnungen eine hohe Bedeckung der Partikeloberfläche, wodurch sich die geringe Wechselwirkung zu anderen Substanzen erklärt.

Die *in vitro* Analysen bestätigten die spezifische Bindung der AnxA5-VSOP an apoptotische Zellen. In der Bildgebung bestätigte sich die Funktionalität der Partikel durch deutlich sichtbare und messbare Signalintensitätsveränderungen (Abb. 18). Ein Kontrasteffekt der Partikel zeigte sich schon bei geringen Apoptose-Raten und bezeugt die erhaltene AnxA5-Aktivität und geringe unspezifische Bindung (Analysen Lena Figge) [30].

5.2.3. Tumor-Mausmodell und chemotherapeutische Behandlung

Für die Testung der AnxA5-VSOP wurde ein Mausmodell mit zwei Tumoren verwendet. Hierbei handelte es sich um die chemosensitive, humane Zelllinie HT-1080

aus einem Fibrosarkom und die chemoresistente, humane Zelllinie H69AR aus einem kleinzelligen Lungentumor.

Nach dem Anwachsen der Tumore wurde eine chemotherapeutische Behandlung der Versuchstiere durchgeführt, um Apoptose/Nekrose in den Tumoren zu induzieren. Da Tumorzellen eine erhöhte Mitoserate aufweisen und einen eingeschränkten Reparaturmechanismus haben, reagieren sie empfindlicher auf Zytostatika als gesunde Zellen. Es wurden verschiedene Zytostatikapräparate, wie Doxorubicin, Cisplatin und Cyclophosphamid getestet. Die beste Variante, bezüglich einer größtmöglichen Apoptose-Induktion im Tumor in kürzester Zeit, zeigte die Behandlung mit Doxorubicin etwa 24 h vor der MRT-Messung. Der Behandlungserfolg einer Chemotherapie hängt allerdings von verschiedenen Faktoren ab. Zum einen spielt die Zirkulationsdauer des Therapeutikums und das damit zeitliche Wirkspektrum eine Rolle. Die Länge der Wirkzeit des Therapeutikums sollte den gegebenen Umständen angepasst sein. Ein schneller Abbau bzw. eine schnelle Ausscheidung erfordert gegebenenfalls eine Erhöhung der Einzel- oder Gesamtdosis, was sich wiederum vermehrt toxisch auf den Organismus auswirken kann. Zum anderen ist das Erreichen und Eindringen des Chemotherapeutikums in das Zielgewebe entscheidend. Bei unzureichender Zugänglichkeit bleibt trotz langer Zirkulationsdauer die erwartete Anreicherung und damit die Wirkung aus. Die dritte Bedingung für eine erfolgreiche Therapie ist das Auslösen von Apoptose/Nekrose in den Tumorzellen durch die Behandlung. Das Auftreten von Resistenzen verhindert das Auslösen von Apoptose. Das zeitnahe Erkennen von solchen Resistenzen und ein rascher Therapiewechsel sind von entscheidender Bedeutung für den Therapieerfolg.

Diese Eigenschaften von Tumorzellen, Induktion von Apoptose und Resistenz, wurden im verwendeten Tiermodell ausgenutzt, um den Erfolg der chemotherapeutischen Behandlung sichtbar zu machen.

5.2.4. Untersuchungen der AnxA5-VSOP zur Verlängerung der Blutzirkulationszeit und Anreicherung im Tumorgewebe

Entscheidend für eine ausreichende Akkumulation von Substanzen im Zielgewebe ist unter anderem ihre Größe. Bei der Filtration durch die Nieren werden Moleküle kleiner als 5 nm herausgefiltert. Die Nierenschwelle eines gesunden Menschen liegt bei etwa 30 bis 50 kDa, d. h. solche Moleküle werden in den Nierenkörperchen vom

Blut abgetrennt und über den Harn ausgeschieden [181]. Die meisten Nanopartikel, wie auch das verwendete AnxA5-VSOP, liegen oberhalb der Nierenschwelle, was die Zirkulationsdauer steigern und die Anreicherung positiv beeinflussen sollte. Mit Hilfe von T1-gewichteten MRT-Messungen der Herzregion von Mäusen konnten die Signalintensitätshalbwertszeiten der verschiedenen Syntheseansätze (hergestellt von Lena Figge) von AnxA5-VSOP ermittelt werden. Die Bluthalbwertszeit der ersten *in vivo* erprobten Synthese betrug $10,6 \pm 1,1$ min ($n = 5$). Durch vollständigere Abdeckung der Partikeloberfläche mit Annexin-Molekülen sollte die Zirkulationsdauer verlängert werden, um die Partikelanreicherung im Zielgewebe zu steigern. Die Bluthalbwertszeit des letzten analysierten Ansatzes, hergestellt mit einer optimierten Synthese, betrug $20,5 \pm 3,8$ min ($n = 4$). Die Verdopplung der Blutzirkulationszeit erzielte jedoch keine verbesserte Anreicherung in chemotherapierten Tumoren. Die Auswertungen aller Tumore bis zu einem Zeitpunkt von 3 h nach Injektion der AnxA5-VSOP ergaben keine Signalintensitätsänderungen in den MRT-Aufnahmen (Abb. 22). Hingegen erfolgte erwartungsgemäß die Aufnahme der Partikel in den Zellen des RES-Systems, insbesondere des mononukleär-phagozytierenden Systems, wie der Leber, der Milz und dem Knochenmark [182]. Die zügige, gewebespezifische Anreicherung der Eisenoxidpartikel im Knochenmark, die nach der ersten MRT-Messung nach Injektion der Partikel zu beobachten war, bestätigte die sachgerechten i. v. Injektionen.

5.2.5. Histologische Auswertungen

Die Gewebeschnitte von Tumoren, Leber, Milz und Nieren wurden mit Antikörperfärbungen gegen aktive Caspase-3 zur Apoptose-Detektion und Berliner-Blau-Färbung zum Eisen-Nachweis analysiert.

Die Auswertungen von chemosensitiven Tumoren zeigten nach Behandlung mit Doxorubicin eine vermehrte Apoptose (Abb. 23). Besonders an der Peripherie des Tumors konnte erwartungsgemäß die Apoptose-Rate gesteigert werden. Bedingt wird diese Lokalisation aufgrund der mitotisch sehr aktiven Zellen, die das Wachstum des Tumors in das angrenzende Gewebe vorantreiben. Doxorubicin gehört zu den Anthracyclinen und bindet Topoisomerase II α , was die weitere DNA-Synthese verhindert. Außerdem werden Radikale gebildet, die Doppelstrangbrüche verursachen. Die Wirkung von Doxorubicin beschränkt sich dementsprechend nur auf den mitotisch aktiven Teil des Tumors, aber auch auf gesunde Zellen, die eine hohe Teilungs-

rate aufweisen. Zur Mitte des Tumors nimmt die mitotische Aktivität rapide ab. Das Innere der Tumore war oftmals bereits durch nekrotische Prozesse, wie zellarme, flüssigkeitsgefüllte Bereiche, gekennzeichnet [183]. Eine Steigerung der Apoptose fand sich zudem im Gewebe der Milz. Kaum Veränderungen ergaben sich bei Gewebeschnitten von Leber und Nieren.

Die Berliner-Blau-Färbungen der Gewebeschnitte nach Applikation von AnxA5-VSOP zeigten bei den chemosensitiven Tumoren keine Partikelanreicherungen oder nur geringe Mengen am Tumorrand (Abb. 24). Diese geringen Akkumulationen standen in keinem Mengenverhältnis zu den chemotherapeutisch bewirkten Apoptose-Raten. Es konnten einige wenige Gewebeabschnitte identifiziert werden, bei denen beide Färbungen übereinstimmende positive Bereiche zeigten. Jedoch waren die Partikelanreicherungen minimal und daher wahrscheinlich bei den MRT-Untersuchungen nicht zu erkennen. Die Ergebnisse der resistenten Tumore zeigten hingegen eine teilweise Akkumulation von Eisen, ebenfalls am Tumorrand. Es erscheint fragwürdig, ob es sich hierbei um spezifische Anreicherungen handelt. Die stellenweise starken Partikelanreicherungen korrelierten nicht mit den Caspase-Färbungen und könnten durch EPR-Effekte (Kapitel 5.3.3.) erklärt werden.

5.2.6. Anwendung der AnxA5-VSOP an einem Myokardinfarkt-Mausmodell

Insgesamt erwiesen sich die Tumore im Mausmodell als schwieriges Target um eine spezifische Anreicherung der AnxA5-VSOP im MRT zu visualisieren. Die geringen Sonden-Anreicherungen können verschiedene Ursachen haben, wie die veränderte Gefäßstruktur in Tumoren nach chemotherapeutischer Behandlung, erhöhter Gewebedruck oder weiterhin zu geringe Zirkulationsdauer der Sonde.

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. David Sosnovik (Harvard Medical School, Boston) wurden die optimierten AnxA5-VSOP an einem kardialen Ischämie-Reperfusionmodell untersucht [30]. Nach Schädigung des Myokards der linken Herzkammer einer Maus wurden die Partikel mit der Reperfusion i. v. injiziert. Nach drei Stunden wurde die Signalintensität der geschädigten Region im MRT gemessen (Durchführung Howard Chen, Martinos Center for Biomedical Imaging am General Hospital in Boston). Die Anreicherung von AnxA5-VSOP bewirkte eine deutliche Signalauslöschung im geschädigten Bereich der linken Herzkammer (Abb. 38 B, C). Bei einer Echozeit von 5 ms war der Unterschied zum nicht geschädigten Gewebe am Stärk-

sten zu erkennen. Bei den Kontrollmessungen von Mäusen mit geschädigtem Myokard ohne Partikelgabe konnten keine Signaländerungen beobachtet werden (Abb. 38 D, E).

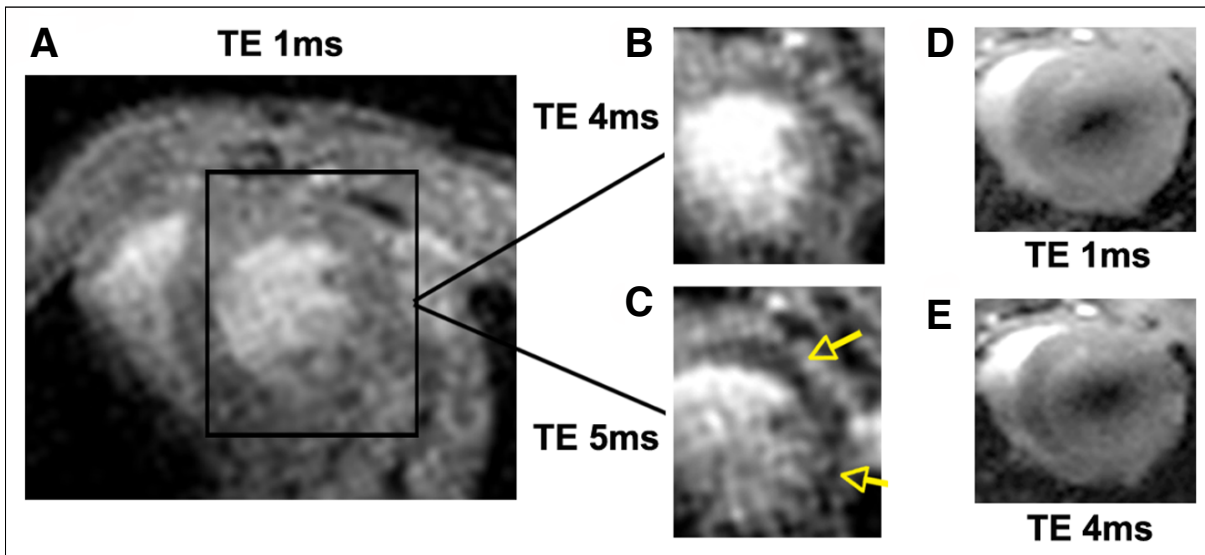


Abbildung 38: MRT-Aufnahmen des Myokards von Mäusen mit Ischämie-Reperfusion [30]. Messung der Signalintensität drei Stunden nach Applikation von AnxA5-VSOP bei unterschiedlichen Echozeiten: TE = 1 ms (A), TE = 4 ms (B) und TE = 5 ms (C). Signalauslöschung durch Partikelanreicherungen am geschädigten Herzmuskelgewebe (B), besonders deutliche Signaländerungen durch Pfeile gekennzeichnet (C). Bei Kontrollmessungen von reperfundierten Mäuseherzen ohne Applikation von Partikeln bei unterschiedlichen Echozeiten (TE = 1 ms (D), TE = (E)) konnten keine Signalveränderungen aufgezeigt werden.

5.3. XTEN-AnxA5

Die Peptidsequenz des XTEN wurde 2009 erstmals von Volker Schellenberger et al. beschrieben [141]. Es handelt sich um eine Sequenz, die sich aus sechs hydrophilen Aminosäuren zusammensetzt (Glutaminsäure, Glycin, Prolin, Alanin, Serin und Threonin) und deren Abfolge durch *in vitro* Evolution optimiert wurde. Diese Sequenz liegt unstrukturiert, ohne erkennbare Sekundär- oder Tertiärstruktur, vor. Durch Fusion mit einem Peptid oder Protein, welches als Marker fungiert, kann das Fusionsprotein rekombinant exprimiert werden. Hierbei vereinigen sich dann die Vorteile des XTEN, wie Verlängerung der Blutzirkulation, Verbesserung der Löslichkeit und Stabilität, mit denen des Fusionspartners. Es ergibt sich gegenüber der PEGylierung eine vereinfachte Herstellung des Fusionsproteins, da nachträgliche Kopplungsschritte entfallen. Zudem ist die Länge der XTEN-Sequenz variabel. Es gibt bisher Untersuchungen von einer Sequenzlänge von 36 bis 912 Aminosäuren. Je nach Zielstellung, kann die Sequenzlänge angepasst und damit die Zirkulationsdauer des Fusionsproteins optimiert werden [141].

5.3.1. *In vitro* und *in vivo* Anwendung von XTEN-AnxA5 als Apoptose-Marker

In den vorliegenden Versuchen wurde Annexin A5 (AnxA5) als Fusionspartner für XTEN mit einer Sequenzlänge von 288 Aminosäuren verwendet. AnxA5 ist ein kleines humanes Protein (35 kDa), welches als Apoptose-Marker zum Einsatz kommt. Die Funktion von AnxA5 im Organismus und die Fähigkeit der Apoptose-Detektion sind in Kapitel 1.5.1. beschrieben.

Die Expression des XTEN-AnxA5 erfolgte nach erfolgreicher Transformation mit dem XTEN-AnxA5-DNA-enthaltenden Plasmid in *E. coli*. Nach chemischer Lyse wurde das Lysat über eine schwache und eine starke Anionenaustauscher-Säule sowie eine hydrophobe Säule gereinigt und die Proteinausbeute über SDS-Page untersucht (Abb. 28). XTEN selbst diente bei der Aufreinigung über ein Säulensystem als Bindungs-Tag. Ausgenutzt wurden hierbei die negativ geladenen Glutaminsäurereste (17 % der Aminosäuren) der Sequenz. Infolgedessen wurde die Verwendung von Reinigungs-Tags, wie z. B. 6x His und eine nachfolgende enzymatische Abspaltung nach erfolgter Reinigung, überflüssig. Eine erworbene Immunogenität gegen solche Tags kann so ebenfalls vermieden werden.

Nach der erfolgreichen Reinigung des XTEN-AnxA5 konnte am N-Terminus, der ein endständiges Cystein trägt, ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden (Kopplung Lena Figge).

Die *in vitro* Analysen bestätigten die erhaltene Fähigkeit des XTEN-AnxA5 der uneingeschränkten Apoptose-Detektion. Es wurde eine Vergleichsanalyse eines kommerziell erhältlichen AnxA5-FITC und XTEN-AnxA5 durchgeführt. Die Auswertung der Zellversuche mittels Mikroskopie (Abb. 29) und Durchflusszytometrie (Abb. 30) verdeutlichten ein analoges Bindungsverhalten beider Konstrukte.

Um das XTEN-AnxA5-Konstrukt bezüglich der Bioverteilung zu charakterisieren wurden *in vivo* Versuche an einem Kleintier-SPECT-CT durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurde über das Cystein des XTEN-AnxA5 der Komplexbildner DTPA gekoppelt (Kopplung Lena Figge). An diesen Chelator konnte dann ein Radionuklid, in diesem Fall ^{111}In dium, gebunden werden (Indium-Markierung Roger Michel, Klinik für Nuklearmedizin der Charité). Der Tracer wurde dann Mäusen i. v. injiziert und die kinetische Verteilung im Organismus durch vier SPECT-CT-Messungen über 24 h beobachtet (Abb. 31).

Wildtyp-AnxA5 wird aufgrund seiner geringen Größe innerhalb weniger Minuten über die Nieren ausgeschieden. Die Bluthalbwertszeit beträgt lediglich 7 min in Mäusen [184]. Durch die Fusion von AnxA5 mit XTEN288 konnte eine deutliche Verlängerung der Blutzirkulationsdauer auf etwa 1 h erzielt werden. Eine Steigerung der Bluthalbwertszeit ermöglicht eine verbesserte Bioverfügbarkeit in weniger durchblutetem Gewebe und erlaubt eine stärkere spezifische Anreicherung im Zielgewebe. In weiteren Versuchen könnte durch Variation der XTEN-Sequenzlänge die Bluthalbwertszeit des XTEN-AnxA5 verkürzt oder verlängert werden, um es verschiedenen Anforderungen besser anzupassen.

Die Auswertung der Tracer-Verteilung ergab weiterhin eine Aufnahme des Konstruktes in Milz, Leber und Nieren. Eine unerwünschte Anreicherung in Gehirn und Muskelgewebe blieb hingegen weitestgehend aus (Abb. 32). Diese Daten spiegeln die Aussage wider, dass durch die Abschirmung des AnxA5 mit XTEN eine Verlängerung der Bluthalbwertszeit bewirkt wird. Die Ausscheidung über die Nieren wurde verlangsamt und die Aufnahme durch die Milz und Leber erhöht.

Eine quantitative *ex vivo* Untersuchung der Organverteilung des ^{111}In -DTPA-XTEN-AnxA5 mit einem Aktivimeter 24 h nach Injektion ergab vergleichbare Ergebnisse wie

die letzte SPECT-CT-Messung (Abb. 33). Eine erhöhte Aktivität konnte auch hier vor allem in der Milz, der Leber und den Nieren verzeichnet werden, die die erwarteten Ausscheidungsorgane repräsentieren. Die Messungen von Lunge, Herz, Gehirn und Magen zeigten hingegen nahezu keine Aktivität, was für eine geringe unspezifische Anreicherung in Organen ohne Apoptose spricht. Eine geringe Aktivität des Tracers konnte allerdings nach einem Tag im Darmtrakt festgestellt werden. Hierbei könnte es sich um eine spezifischen Anreicherung des ^{111}In -DTPA-XTEN-AnxA5, aufgrund der hohen Apoptose-Rate infolge der schnellen Gewebeerneuerung dieses Organs, handeln.

Um den spezifischen Bindungs-Effekt des XTEN-AnxA5 zu überprüfen und ihn mit AnxA5 zu vergleichen, wurde ein Tumor-Mausmodell gewählt. Den Tieren wurden Zellen eines Mauslymphoms injiziert und eine chemotherapeutische Behandlung mit Etoposide und Cyclophosphamid durchgeführt. Diese Kombinationstherapie wirkt vor allem auf sich schnell teilende Zellen durch Hemmung der Topoisomerase und durch Bildung von Doppel- und Einzelstrangbrüchen in der DNA.

Für die Bildgebung des XTEN-AnxA5 wurde ein Nahinfrarot-Farbstoff an das N-terminale Cystein gekoppelt (6S-IDCC-XTEN-AnxA5). Als Vergleich diente 6S-IDCC-AnxA5 (Kopplungen Lena Figge). Die Euthanasie der Tiere wurde 3 h nach i. v. Injektion durchgeführt und die Organe entnommen. Die NIRF-Bildgebung erfolgte *ex vivo* (Abb. 34), um eine genaue Zuordnung der NIRF-Signale zu den Organen und Tumoren zu erhalten. Die ungenügende Darstellung der Anatomie bei *in vivo* Aufnahmen erschwert die Auswertung von zweidimensionalen NIRF-Messungen. Zudem können nur Areale mit Signal, d. h. bei Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes, dargestellt werden. Auch unterschiedliche Streu- und Absorptionseffekte des Fluoreszenzlichtes durch unterschiedliche Dicke der darüber liegenden Haut beeinträchtigen die Vergleichbarkeit *in vivo* gegenüber *ex vivo* Messungen.

Untersucht wurden die Tumoren, Nieren, Leber und Milz. Die Auswertung der Tiere mit Applikation von 6S-IDCC-XTEN-AnxA5 ließ eine deutliche Signalsteigerung im Vergleich zum Signal von Wildtyp-ähnlichem 6S-IDCC-AnxA5 in den Tumoren erkennen. Die Anreicherung erfolgte heterogen, so dass Bereiche mit schwächerer und stärkerer Signalintensität sichtbar wurden. Ursache solcher unregelmäßigen Verteilung können die in Tumoren ungleichmäßig verteilten apoptotischen Bereiche sein. Zum einen kann Apoptose/Nekrose aufgrund von Hypoxie verursacht werden, zum anderen durch die chemotherapeutische Behandlung. Auch der unstrukturierte, chao-

tische Aufbau des Gefäßsystems, welcher zu ungleichmäßiger Durchblutung führt, könnte ein Grund für die Heterogenität sein. Charakteristisch für Tumorgewebe sind entsprechend über- und unterversorgte Tumorarealen. Die schlechte Durchblutung in den hypoxischen Arealen vermindert allerdings auch die Aufnahme von Substanzen, so dass es sich wahrscheinlich bei den signalreichen Stellen um gut durchblutete, apoptotische Bereiche handelt.

Die Analysen der Tiere mit Applikation des XTEN-freien 6S-IDCC-AnxA5 zeigten hingegen deutlich weniger Anreicherung der Sonde in den Tumoren. Auch hier konnte eine heterogene Verteilung der Probe festgestellt werden. Die verbesserte Anreicherung des 6S-IDCC-XTEN-AnxA5 ist wahrscheinlich auf die Verlängerung der Zirkulationsdauer im Blut zurückzuführen. Die durch XTEN erhöhte Größe von XTEN-AnxA5 könnte aber ebenfalls die passive Anreicherung über den EPR-Effekt verstärkt haben - also eine Steigerung der unspezifische Anreicherung. Diese unspezifische Komponente soll zukünftig durch das Signal eines nicht-bindenden XTEN-AnxA5-Konstruktes verrechnet werden, um die spezifische Anreicherung quantifizieren zu können.

Die Signalintensitäten der Milzgewebe war in beiden Versuchsgruppen annähernd gleich. Eine Erhöhung des Signals in der AnxA5-Gruppe konnte im Leber- und vor allem im Nierengewebe beobachtet werden. Grund hierfür war wahrscheinlich die schnellere Ausscheidung des AnxA5 über die Nieren ohne die Abschirmung des XTEN.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Gewebeschnitte aus den beiden Versuchsgruppen 3 h nach Injektion bestätigten die verstärkte Aufnahme von 6S-IDCC-XTEN-AnxA5 in den Tumoren im Vergleich zu 6S-IDCC-AnxA5. Dabei war das Anreicherungsmuster von 6S-IDCC-AnxA5 und 6S-IDCC-XTEN-AnxA5 sehr ähnlich, was darauf hinweist, dass die Bindung im Gewebe spezifisch war und lediglich durch die zuvor diskutierten unspezifischen Mechanismen (Blutzirkulationsdauer, EPR-Effekt) verstärkt werden (Abb. 35 A, C).

Um auszuschließen, dass die Anreicherung der Proben durch Unterschiede in der Wirkung der chemotherapeutischen Behandlung verursacht wurde und sich durch ungleiche Apoptose-Raten bedingen, wurden alle Tumore einer Caspase-3-Antikörper-Färbung unterzogen (Abb. 35 B, D). Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung in allen verglichenen Geweben eine annähernd gleiche Anzahl von apoptotischen Ereignissen bewirkte.

5.3.2. Vorteile der Anwendung von XTEN im Vergleich zu PEG

Die Vorteile der Anwendung von XTEN konnten in den ersten *in vivo* Experimenten bestätigt werden. Infolge der Fusion der hydrophilen XTEN-Sequenz bildete sich um das Annexin-Protein eine Wasserhülle, die zu einer Vergrößerung der hydrodynamischen Größe führte. Dies war unter anderem bei der Auswertung der SDS-PAGE Gele und dem veränderten Laufverhalten zu erkennen. Das 63 kDa große XTEN-AnxA5 zeigte in Proteingelen eine Größe von ungefähr 73 kDa. Dazu passend verringerte sich die Ausscheidung über die Nieren, so dass sich die Bluthalbwertszeit stark verlängerte. XTEN vereint nicht nur die Vorteile von PEG, sondern eliminiert auch die im Folgenden aufgeführten Nachteile (Tab. 3).

Tabelle 3: Vergleich wichtiger Charakteristika von PEG (Polyethylenglycol) und XTEN (verändert nach [141]).

PEG	XTEN
große Wasserhülle	+
Erhöhung der Blutzirkulationszeit	+
Erhöhung der Stabilität	+
-	als Reinigungs-Tag nutzbar
chemische Kopplung notwendig	-
Größengemisch	exakt definierte Größe
-	biologisch abbaubar
Vakuolenbildung in Nierentubuli im Tiermodell [135]	-
Nachweis von Antikörper-Induktion im Tiermodell und vorgeformte Antikörper beim Menschen [137]	-

So liegt PEG zumeist in einem Größengemisch vor, während XTEN in einer definierten Länge in monodisperser Form vorliegt. Zudem entfällt die nachträgliche chemische Kopplung von PEG, sodass ein definiertes Produkt entsteht und beispielsweise ein Cystein nicht für die ortsspezifische PEGylierung, sondern für eine ortsspezifische Kopplung von Farbstoffen oder ähnlichen Markern genutzt werden kann. Ein weiterer Nachteil der PEG-Verwendung ist die eingeschränkte biologische Abbaubarkeit. XTEN als Polypeptid ist hingegen biologisch abbaubar. Außerdem wurde

durch die Anwendung von PEG-gekoppelten Proteinen eine unerwünschte Vakuolenbildung in den Nieren festgestellt [134, 135]. Ferner wurde die Produktion von Antikörpern gegen PEG in verschiedenen Tiermodellen [137] und Patienten [185] sowie in 25 % aller gesunden Blutspender nachgewiesen [186]. Durch Aufnahme von PEGylierten Substanzen bilden sich hauptsächlich anti-PEG IgMs. Diese können wiederum die Pharmakokinetik von PEGylierten Medikamenten beeinflussen. Die Effizienz solcher Substanzen könnte folglich durch schnellere Ausscheidung verringert und die therapeutischen Erfolge reduziert werden. Die Bildung von Antikörpern scheint im Zusammenhang mit dem vermehrt universellen Einsatz von PEG in Lebensmitteln und Kosmetika zu stehen. Da die Anwendung von PEG im Bereich der Pharmakologie derzeit einen zunehmenden Anteil einnimmt, könnten von diesem therapeutisch negativen Effekt viele zukünftige Patienten betroffen sein. Die Empfehlung von Ishida und Kiwada sieht einen Test vor Therapiebeginn auf die Existenz von PEG-Antikörpern im Organismus und das Monitoring während der Therapie vor [138, 186]. Der Einsatz von XTEN bewirkt hingegen keine Immunantwort. In mehreren Studien mit Versuchstieren konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von XTEN, außer unter extremen Versuchsbedingungen, keine immunogene Aktivität auslöst [141]. Zudem ist die Gefahr von Autoimmunreaktionen aufgrund fehlender homologer Sequenzbereiche mit humanen Proteinsequenzen minimal [187].

Die erste Studie, bei der XTEN *in vivo* zur Anwendung kam, wurde 2009 veröffentlicht [141]. Als Fusionspartner für XTEN wurde das Peptid Exenatid verwendet, welches dem menschlichen Hormon Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) ähnelt. Exenatid bewirkt die Ausschüttung von Insulin und hemmt die Freisetzung von Glucagon. Einige Patienten mit Typ-2-Diabetes benötigen eine s. c. Injektion des Peptides vor den Mahlzeiten. Eine Verlängerung der Wirkzeit des Exenatides könnte die Behandlung erheblich vereinfachen. In Versuchen mit Affen konnte eine Steigerung der Wirkzeit um das 125-fache erreicht werden. Das Exenatid-XTEN864 zeigte eine Plasmahalbwertszeit von 60 h im Vergleich zum Exenatid mit 0,5 h.

Eine weitere Studie, bei der XTEN benutzt wurde, verwendete das Hormonpeptid Glucagon als Fusionspartner [142]. Das Peptid ist für die Erhöhung des Blutzuckerspiegels verantwortlich. Um einer nächtlichen Unterzuckerung während der Periode des Schlafens vorzubeugen, wurde nach einer langzirkulierenden Version des Glucagons gesucht. Während die Konzentration im Blut nach der Applikation von unmodifiziertem Glucagon nach 2 h ihren Ausgangswert wiedererlangte, konnte

durch die Fusion von XTEN288 mit Glucagon eine Verlängerung auf 10 - 12 h in Hunden erzielt werden [142]. Außerdem wurde die Anwendung von Glucagon bisher durch seine geringe Löslichkeit und Stabilität in wässriger Form erschwert. Durch Fusion des Glucagons mit XTEN288 konnte zudem eine 60fache Steigerung der Löslichkeit erreicht werden [142].

In einer weiteren *in vivo* Studie wurde XTEN in Fusion mit einem Wachstumshormon (rhGH) untersucht [141]. Die gängige Therapieform sieht bisher eine tägliche Injektion des rhGH vor. Aufgrund der starken Reduktion der Nierenfiltration des rhGH durch die Fusion mit XTEN konnte eine Steigerung der Halbwertszeit des Fusionsprotein VRS-317 in Affen auf 110 h ermittelt werden. Außerdem wurde eine 5-fache Steigerung der pharmakologische Wirksamkeit des langzirkulierenden VRS-317 bei Affen festgestellt. Im Fazit der Studie wird das Potential des Fusionsproteins als neues Therapeutikum mit lediglich einer monatliche Injektion angegeben.

Das größte Potential von XTEN liegt sicher im therapeutischen Bereich. Durch Verlängerung der Zirkulationszeit von Substanzen können Peptide oder Proteine als Depot-Wirkstoffe eingesetzt werden. Die Zirkulationszeiten können entsprechend den Anforderungen durch Wahl der Kettenlänge angepasst werden. Außerdem kann der Einsatz von XTEN als Alternative zu PEG unerwünschte Nebenwirkungen verhindern.

Insgesamt konnte in diesen ersten Versuchsreihen erstmals gezeigt werden, dass neben dem therapeutischen Anwendungsbereich sich auch mögliche Anwendungen von XTEN-Polypeptid im Bereich der Bildgebung ergeben.

5.3.3. Ausblick: Kompensation der unspezifischen Bioverteilung mittels nicht-bindender Kontrollsonde

Die Anreicherung von spezifischen molekularen Sonden kann durch eine unspezifische Bioverteilung beeinflusst werden. Dieser Effekt betrifft besonders größere Protein-basierte Sonden. Die Anreicherung des XTEN-AnxA5 erfolgte neben dem aktiven Targeting des Annexins an PS vermutlich auch über den EPR (Enhanced Permeability and Retention)-Effekt. Der EPR-Effekt beschreibt ein Phänomen, das zu einer Anreicherung von Makromolekülen in Tumorgewebe führt. Das ausschließlich passive Targeting von Makromolekülen steht dabei dem aktiven Targeting gegenüber.

Der Begriff EPR-Effekt wurde von Matsumura und Maeda 1986 eingeführt [188]. Der Prozess wird durch eine Reihe von physiologischen Veränderungen hervorgerufen. Im ersten Schritt bilden Tumore verstärkt neue Blutgefäße. Diese Angiogenese beginnt schon bei einer Tumorgröße von wenigen Millimetern und ist notwendig, um dem neuen Gewebe ausreichend Sauerstoff und Nährstoffe zukommen zu lassen. Der Aufbau der neuen Gefäße unterscheidet sich jedoch von normalen Gefäßen. So liegen die Endothelzellen in einem lockeren Verband auf der Gefäßoberfläche und lassen größere Lücken (Fenestrierungen) frei. An diesen Bereichen ist die Diffusion von Makromolekülen aus der Gefäßbahn möglich (enhanced permeability) [189]. Außerdem sezernieren die Tumorzellen weitere Faktoren, wie beispielsweise VEGF, Prostaglandin, Bradykinin und Stickstoffmonoxid, in das Gewebe, um die Durchlässigkeit weiter zu erhöhen [190].

Ein anderer Faktor, der zum EPR-Effekt beiträgt, ist die eingeschränkte Lymphdrainagefähigkeit von Tumorgewebe. Der Abtransport von Flüssigkeit aus dem Gewebe ist vor allem im Inneren des Tumors stark begrenzt. Das mangelhaft ausgebildete Lymphsystem, welches durch proliferierende Zellen zusammengedrückt wird und kollabiert, kann den Abtransport der eindiffundierten Makromoleküle nicht bewerkstelligen (enhanced retention). Nur an der Peripherie des Tumors lassen sich funktionelle Lymphgefäße finden. Aufgrund dieser Phänomene reichern sich bestimmte Moleküle, wie Liposomen, Therapeutika oder Nanopartikel, vermehrt im Tumorgewebe an [191]. Der EPR-Effekt könnte neben der verlängerten Bluthalbwertszeit zur erhöhten Anreicherung von XTEN-AnxA5 beigetragen haben. Ein schematisches Modell dieses passiven Targetings ist in Abbildung 39 abgebildet.

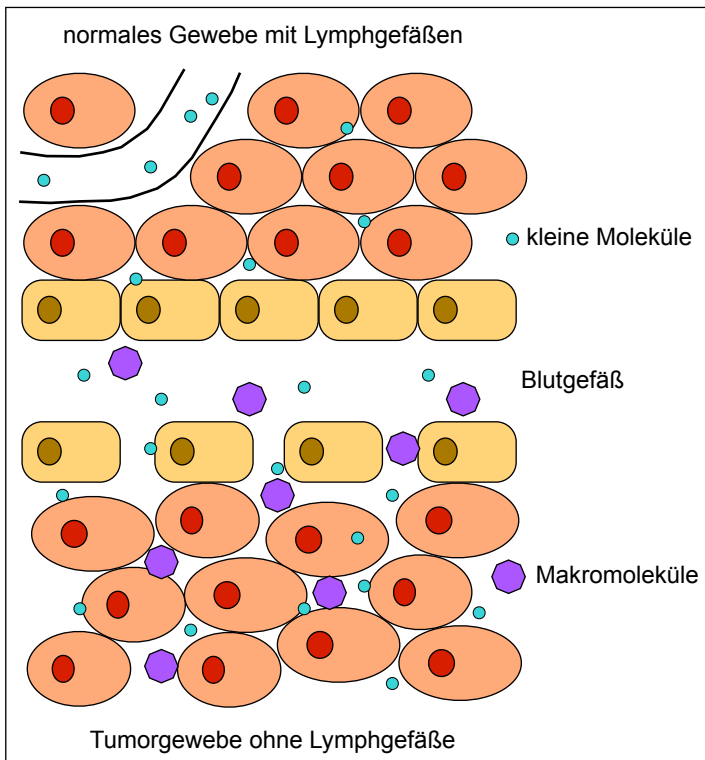


Abbildung 39: Darstellung des passiven Targetings von Makromolekülen durch den EPR-Effekt. Die Diffusion von kleinen Molekülen durch eine normale Gefäßwand ist sowohl bei Tumorzellen als auch gesundem Gewebe möglich. Hingegen ist die Aufnahme von Makromolekülen nur im Tumorgewebe aufgrund von fenestrierten Gefäßwänden möglich. Die Anreicherung dieser Makromoleküle wird außerdem wegen der eingeschränkten Lymphdrainagefähigkeit verstärkt.

Ab einer gewissen Größe treten jedoch Nachteile für ein „Drug Targeting“ auf. Das schnelle Größenwachstum des Tumorgewebes bewirkt strukturelle Veränderungen, so dass sich ein erhöhter interstitieller und reduzierter mikrovaskulärer Druck bildet. Der interstitielle Flüssigkeitsdruck (IFP, interstitial fluid pressure) liegt in normalem Gewebe bei 0 - 2 mmHg. In soliden Tumoren ist der Druck um ein Vielfaches erhöht und kann bis zu 40 mmHg betragen [192]. Zur Peripherie hin wird der Druck jedoch stets geringer. Beschrieben wurde das Phänomen des erhöhten IFP bei verschiedenen Tumorerkrankungen [193, 194]. Die Ursache liegt in der hohen vaskulären Hyperpermeabilität und der Abwesenheit der lymphatischen Drainage [195].

Diese Veränderungen erschweren die Aufnahme von Makromolekülen, wie Therapeutika, über die Blutgefäße in das Tumorgewebe. Dieser Umstand bedarf besonderer Berücksichtigung bei der Tumorthherapie und der Bildgebung, um einer verringerten Wirksamkeit von Chemotherapeutika und Kontrastmitteln vorzubeugen und eine erhöhte toxische Wirkung auf den Organismus zu verhindern [196, 197].

Die Möglichkeit einer erhöhten unspezifischen Anreicherung und generell für alle Bildgebungssonen wichtige Bioverteilung soll in weiteren Versuchen mit nahezu identischen Kontroll-Konstrukten berücksichtigt werden. Um die Menge an unspezifischer Anreicherung in Tumoren zu quantifizieren, wird das an PS bindende XTEN-

AnxA5 sowie ein nicht-bindendes XTEN-AnxA5 in ein Versuchstier appliziert. Die Bindungsunfähigkeit wird dabei lediglich durch vier Punktmutationen (XTEN-M1M2M3M4) verursacht [198]. Die beiden Konstrukte sollten in ihrer Größe nahezu identisch sein, damit sich andere Parameter nicht ebenfalls auf die Bioverteilung auswirken können. Außerdem werden zwei verschiedene Farbstoffe oder zwei verschiedene Radionuklide an die Konstrukte gekoppelt, damit die Verteilung und Anreicherung in einem Tier getrennt voneinander beobachtet werden kann. Die Daten der unspezifischen Verteilung und Anreicherung können dann verrechnet und das rein spezifische Signal ermittelt werden.

6. Zusammenfassung

Die molekulare Bildgebung nutzt das Prinzip des aktiven Targeting, um zelluläre und biochemische Vorgänge zu visualisieren [199]. Dabei können nicht nur morphologische Veränderungen erkannt werden, sondern auch Kenntnisse zu spezifischen molekularen Gewebeveränderungen gewonnen werden. Für diesen Vorgang werden Substanzen verwendet, die eine spezifische Bindung oder Aktivierung im Zielgewebe aufweisen und somit spezifisch Veränderungen aufdecken können. Ziel dieser Arbeit war die Analyse und Testung neuer molekularer Bildgebungssonden. Im Mittelpunkt standen die spezifische Detektion der Enzymaktivitäten von aktiven Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und von apoptotischen Zellen.

Im ersten Teil der Arbeit bildeten die VSOP (very small iron oxide nanoparticles) die Basis für die molekularen Bildgebungssonden. Die VSOP besitzen einen superparamagnetischen Kern, der sie als starkes Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MRT) auszeichnet. Die auf VSOP basierenden Protease-spezifische Eisenoxidnanopartikel (PSOP) werden proteolytisch aktiviert und die mit dem Protein Annexin beschichteten VSOP (AnxA5-VSOP) binden spezifisch an apoptotische Zellen. Für die Herstellung der PSOP wurde die Oberfläche der elektrostatisch stabilisierten VSOP mit Peptid-PEG-Konjugaten beschichtet (PEG, Polyethylenglycol). Das Peptid enthielt eine spezifische Schnittstelle für die MMP-2/9. Bei enzymatischer Spaltung verloren die Nanopartikel ihre sterische Stabilisierung, welche durch die PEG-Hülle hervorgerufen wurde. Die aus der enzymatischen Aktivierung resultierende Aggregation der Partikel konnte *in vitro* in MRT-Messungen dargestellt werden. Eine Signalveränderung *in vivo* in stark MMP-exprimierenden Tumoren konnte hingegen nicht gezeigt werden. Die Apoptose-Detektion mit AnxA5-VSOP wurde an chemotherapeutisch behandelten, tumortragenden Mäusen durchgeführt. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten eine Steigerung der Apoptose nach der Behandlung. In den MRT-Messungen konnten allerdings keine signifikanten Signalveränderungen beobachtet werden. Die histologischen Auswertungen zeigten eine Anreicherung von AnxA5-VSOP im Tumorgewebe, jedoch konnte dieser begrenzte Bereich im MRT nicht dargestellt werden. Die optimierten Anx-VSOP konnten hingegen erfolgreich *in vivo* an einem Myokardinfarktmodell angewendet werden [30].

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Fusionsprotein XTEN-AnxA5 mit dem Ziel einer verlängerten Bluthalbwertszeit für die Apoptose-Bildgebung entwickelt. Als erstes wurde das Protein erfolgreich in *E. coli* exprimiert und chromatographisch aufgereinigt. Anschließend wurde das Bindungsvermögen von XTEN-AnxA5 an apoptotische Zellen untersucht. Im Vergleich mit dem Wildtyp-AnxA5 wurde, wie erwünscht, kein Unterschied der Bindungsfähigkeit des XTEN-AnxA5 festgestellt. Außerdem wurde die Organikinetik von radioaktiv markiertem XTEN-AnxA5 *in vivo* untersucht und eine Verlängerung der Blutzirkulationshalbwertszeit um das Neunfache auf ca. 1 h ermittelt. Die NIRF-Bildge-

bung von chemotherapierten Tumoren zeigte eine deutliche Signalsteigerung, d. h. eine erhöhte Anreicherung von XTEN-AnxA5, im Vergleich zum Wildtyp AnxA5. Für die molekulare Bildgebung der Apoptose erscheint XTEN-AnxA5 daher vielversprechend.

7. Abstract

Molecular imaging uses the principle of active targeting to visualize cellular and biochemical processes [199]. In this way, molecular changes not only recognizes morphological changes but also provides information on specific molecular tissue changes. Specific changes are identified by using molecules with specific binding or activation in target tissue. The goal of this project was to analyze and test new molecular imaging probes, focussing on the specific detection of enzymatic activity of active matrix metalloproteinases (MMPs) and apoptotic cells.

In the first part of this work, molecular imaging probes on the basis of very small iron oxide nanoparticles (VSOP) were used. VSOP have a superparamagnetic core, making them a strong contrast agent for magnetic resonance imaging (MRI). Protease-specific iron oxide nanoparticles (PSOP) based on VSOP are activated in target tissue, and VSOP coated with the protein annexin (AnxA5-VSOP) bind specifically to apoptotic cells. PSOP were produced by coating electrostatically stabilized VSOP with peptide-PEG-conjugates (PEG, polyethylene glycol). This peptide contained a specific cleavage site for MMP-2/9. The steric stability provided by the PEG was lost upon enzymatic cleavage. This enzymatic activation resulted in aggregated particles, which in turn were detected by *in vitro* MRI. However, *in vivo* imaging revealed no change in signal intensity in tumors with high MMP-9 expression. Detection of apoptosis using AnxA5-VSOP was investigated in tumor-bearing mice treated with chemotherapy. While immunohistochemical studies showed increased apoptosis after treatment, no significant changes in signal intensity were observed in MRI. The histological examination showed some accumulation of AnxA5-VSOP in tumor tissue. In contrast, an optimized version of Anx-VSOP was successfully applied and visualized by MRI in a myocardial infarction mouse model [30].

In the second part of this work, a fusion protein called XTEN-AnxA5 was developed with the aim of a prolonged blood half-life for apoptosis imaging. As a first step, the protein was successfully expressed in *E. coli* and purified chromatographically. Subsequently, the binding capability of XTEN-AnxA5 was investigated. As desired, the binding capability of XTEN-AnxA5 was not found to differ from that of wild-type AnxA5. Furthermore, organ distribution of radioactively labeled XTEN-AnxA5 was investigated *in vivo*, revealing a longer blood circulation time of approximately 1 h, which is nine times that of wild-type annexin. Nearinfrared fluorescence (NIRF) imaging of chemotherapeutically treated tumors using XTEN-AnxA5 showed an increase in signal intensity compared to wild-type AnxA5. These results suggest that XTEN-AnxA5 is a promising candidate for molecular imaging of apoptosis.

Literaturverzeichnis

- [1] W. C. Röntgen, (1898) Über eine neue Art von Strahlen. *Annalen der Physik und Chemie* , 1-11
- [2] F. Bloch, (1953) The Principle of Nuclear Induction. *Science* 118, 425-30
- [3] E. M. Purcell, H. C. Torrey, H C, R. V. Pound, R V (1946) Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys Rev* 69, 37-8
- [4] P. C. Lauterbur, (1989) Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. *Clin Orthop Relat Res* , 3-6
- [5] P. Mansfield, A. A. Maudsley (1977) Medical imaging by NMR. *Br J Radiol* 50, 188-94
- [6] H. H. Schild (1997) Schering Aktiengesellschaft, Berlin.
- [7] (1997) Magnetresonanztomographie.. *Springer, Berlin [u.a.]*
- [8] L. L. Seeger, (1989) Physical principles of magnetic resonance imaging. *Clin Orthop Relat Res* , 7-16
- [9] J. Frahm, A. Haase, D. Matthaei (1986) Rapid NMR imaging of dynamic processes using the FLASH technique. *Magn Reson Med* 3, 321-7
- [10] K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz, A. Z. Wilczewska, H. Car (2012) Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine. *Adv Med Sci* 57, 196-207
- [11] N. I. Kobozev, V. B. Evdokimov, I. A. Zubovich, A. N. Maltsev (1952) Magnetic and catalytic properties of dilute layers. *Zhur Fiz Khim* 26, 1349-73
- [12] C. Corot, P. Robert, J. M. Idée, M. Port (2006) Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 58, 1471-504
- [13] T. V. Bartolotta, M. Midiri, M. Galia, A. Carcione, M. De Maria, R. Lagalla (2001) Benign hepatic tumors: MRI features before and after administration of superparamagnetic contrast media. *Radiol Med* 101, 219-29
- [14] W. Cheng, Y. Ping, Y. Zhang, K. H. Chuang, Y. Liu (2013) Magnetic resonance imaging (MRI) contrast agents for tumor diagnosis. *J Healthc Eng* 4, 23-45
- [15] F. Roohi, J. Lohrke, A. Ide, G. Schütz, K. Dassler (2012) Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 7, 4447-58
- [16] C. Burtea, S. Laurent, I. Mahieu, L. Larbanoix, A. Roch, M. Port, O. Rousseaux, S. Ballet, O. Murariu, *et al.* (2011) In vitro biomedical applications of functionalized iron oxide nanoparticles, including those not related to magnetic properties. *Contrast Media Mol Imaging* 6, 236-50
- [17] E. Cheraghipour, S. Javadpour (2013) Cationic albumin-conjugated magnetite nanoparticles, novel candidate for hyperthermia cancer therapy. *Int J Hyperthermia* 29, 511-9
- [18] A. Ruiz, G. Salas, M. Calero, Y. Hernández, A. Villanueva, F. Herranz, S. Veintemillas-Verdaguer, E. Martínez, D. F. Barber, M. P. Morales (2013) Short-chain PEG molecules strongly bound to magnetic nanoparticle for MRI long circulating agents. *Acta Biomater* 9, 6421-30
- [19] J. Schnorr, S. Wagner, H. Pilgrim, B. Hamm, M. Taupitz (2002) Preclinical characterization of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as a blood pool contrast medium for MR angiography. *Acad Radiol* 9 Suppl 2, S307-9

- [20] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R. N. Muller (2008) Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev* 108, 2064-110
- [21] C. Huang, K. G. Neoh, L. Wang, E. T. Kang, B. Shuter (2011) Surface functionalization of superparamagnetic nanoparticles for the development of highly efficient magnetic resonance probe for macrophages. *Contrast Media Mol Imaging* 6, 298-307
- [22] J. Wu, S. Mao, Z. G. Ye, Z. Xie, L. Zheng (2010) Room-temperature weak ferromagnetism induced by point defects in alpha-Fe₂O₃. *ACS Appl Mater Interfaces* 2, 1561-4
- [23] H. M. Yang, C. W. Park, T. Ahn, B. Jung, B. K. Seo, J. H. Park, J. D. Kim (2013) A direct surface modification of iron oxide nanoparticles with various poly(amino acid)s for use as magnetic resonance probes. *J Colloid Interface Sci* 391, 158-67
- [24] M. Taupitz, J. Schnorr, C. Abramjuk, S. Wagner, H. Pilgrim, H. Hünigen, B. Hamm (2000) New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as contrast medium for MR angiography: preclinical results in rats and rabbits. *J Magn Reson Imaging* 12, 905-11
- [25] J. Schnorr, M. Taupitz, E. A. Schellenberger, C. Warmuth, U. L. Fahlenkamp, S. Wagner, N. Kaufels, M. Wagner (2012) Cardiac magnetic resonance angiography using blood-pool contrast agents: comparison of citrate-coated very small superparamagnetic iron oxide particles with gadofosveset trisodium in pigs. *Rofo* 184, 105-12
- [26] N. Kaufels, R. Korn, S. Wagner, T. Schink, B. Hamm, M. Taupitz, J. Schnorr (2008) Magnetic resonance imaging of liver metastases: experimental comparison of anionic and conventional superparamagnetic iron oxide particles with a hepatobiliary contrast medium during dynamic and uptake phases. *Invest Radiol* 43, 496-503
- [27] M. Rudin, R. Weissleder (2003) Molecular imaging in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2, 123-31
- [28] E. Schellenberger, (2010) Bioresponsive nanosensors in medical imaging. *J R Soc Interface* 7 Suppl 1, S83-91
- [29] E. Schellenberger, F. Rudloff, C. Warmuth, M. Taupitz, B. Hamm, J. Schnorr (2008) Protease-Specific Nanosensors for Magnetic Resonance Imaging *Bioconjugate Chem* 19, 2440-5
- [30] L. Figge, F. Appler, H. H. Chen, D. E. Sosnovik, J. Schnorr, O. Seitz, M. Taupitz, B. Hamm, E. Schellenberger (2014) Direct coupling of annexin A5 to VSOP yields small, protein-covered nanoprobe for MR imaging of apoptosis. *Contrast Media Mol Imaging* 9, 291-9
- [31] E. Schellenberger, J. Schnorr, C. Reutelingsperger, L. Ungethüm, W. Meyer, M. Taupitz, B. Hamm (2008) Linking proteins with anionic nanoparticles via protamine: ultrasmall protein-coupled probes for magnetic resonance imaging of apoptosis. *Small* 4, 225-30
- [32] B. Thiesen, A. Jordan (2008) Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 24, 467-74
- [33] L. Liao, (2014) Nanoparticle-dependent labeling of mesenchymal stem cell. *J Nanosci Nanotechnol* 14, 958-68
- [34] U. Büll, C. M. Kirsch, H. D. Roedler (1983) Die Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT) *Fortschr. Röntgenstr.* 138, 391-402
- [35] M. Kartachova, R. L. Haas, R. A. Olmos, F. J. Hoebbers, N. van Zandwijk, M. Verheij (2004) In vivo imaging of apoptosis by ^{99m}Tc-Annexin V scintigraphy: visual analysis in relation to treatment response. *Radiother Oncol* 72, 333-9

- [36] A. Sowa-Staszczak, R. Chrzan, M. Tomaszuk, A. Urbanik, M. Buziak-Bereza, W. Lenda-Tracz, B. Głowa, A. Hubalewska-Dydejczyk (2010) Fusion SPECT/CT in clinical practice. *Przegl Lek* 67, 314-7
- [37] J. M. Fuentes-Orrego, D. V. Sahani (2013) Low-dose CT in clinical diagnostics. *Expert Opin Med Diagn* 7, 501-10
- [38] R. Weissleder, V. Ntziachristos (2003) Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* 9, 123-8
- [39] C. M. Lee, D. Jang, S. J. Cheong, M. H. Jeong, E. M. Kim, D. W. Kim, S. T. Lim, M. H. Sohn, H. J. Jeong (2012) Optical imaging of MMP expression and cancer progression in an inflammation-induced colon cancer model. *Int J Cancer* 131, 1846-53
- [40] K. Licha, C. Olbrich (2005) Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 1087-108
- [41] B. Ballou, L. A. Ernst, A. S. Waggoner (2005) Fluorescence imaging of tumors in vivo. *Curr Med Chem* 12, 795-805
- [42] (2013) Deutsche Krebshilfe e.V..
- [43] T. Severi, H. van Malenstein, C. Verslype, J. F. van Pelt (2010) Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin* 31, 1409-20
- [44] S. Negrini, V. G. Gorgoulis, T. D. Halazonetis (2010) Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 220-8
- [45] L. Yadav, N. Puri, V. Rastogi, P. Satpute, R. Ahmad, G. Kaur (2014) Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 15, 1085-91
- [46] W. P. Daley, K. M. Yamada (2013) ECM-modulated cellular dynamics as a driving force for tissue morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 23, 408-14
- [47] Y. Y. Du, X. Wang, W. Kong (2008) [Extracellular matrix, matrix-degrading proteases and vascular calcification]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 39, 203-8
- [48] S. Löffek, O. Schilling, C. W. Franzke (2011) Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J* 38, 191-208
- [49] L. M. Matrisian, (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14, 455-63
- [50] S. Das, M. Mandal, T. Chakraborti, A. Mandal, S. Chakraborti (2003) Structure and evolutionary aspects of matrix metalloproteinases: a brief overview. *Mol Cell Biochem* 253, 31-40
- [51] J. GROSS, C. M. LAPIERE (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48, 1014-22
- [52] E. Hadler-Olsen, J. O. Winberg, L. Uhlin-Hansen (2013) Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. *Tumour Biol* 34, 2041-51
- [53] J. Westermarck, V. M. Kähäri (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 13, 781-92
- [54] H. Nagase, R. Visse, G. Murphy (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562-73

- [55] H. E. Van Wart, H. Birkedal-Hansen (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5578-82
- [56] K. M. Murphy, U. N. Streips, R. B. Lock (1999) Bax membrane insertion during Fas(CD95)-induced apoptosis precedes cytochrome c release and is inhibited by Bcl-2. *Oncogene* 18, 5991-9
- [57] M. D. Sternlicht, Z. Werb (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516
- [58] A. Page-McCaw, A. J. Ewald, Z. Werb (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221-33
- [59] N. Ortega, Z. Werb (2002) New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J Cell Sci* 115, 4201-14
- [60] P. M. Comoglio, L. Trusolino (2005) Cancer: the matrix is now in control. *Nat Med* 11, 1156-9
- [61] P. Van Lint, C. Libert (2007) Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol* 82, 1375-81
- [62] H. Nagase, J. F. Woessner (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-4
- [63] R. Visse, H. Nagase (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92, 827-39
- [64] W. C. Parks, C. L. Wilson, Y. S. López-Boado (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4, 617-29
- [65] C. J. Malemud, (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 11, 1696-701
- [66] S. Curran, G. I. Murray (2000) Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36, 1621-30
- [67] S. A. Siefert, R. Sarkar (2012) Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular* 20, 210-6
- [68] T. Adachi, N. Hattori, T. Ishihara, H. Iida, T. Saito, S. Miyashima, A. Shimatsu (2013) Possible involvement of matrix metalloproteinase-3 in the pathogenesis of macroprolactinaemia in some patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Endocrinol* 169, 203-9
- [69] M. A. Javaid, M. N. Abdallah, A. S. Ahmed, Z. Sheikh (2013) Matrix metalloproteinases and their pathological upregulation in multiple sclerosis: an overview. *Acta Neurol Belg*
- [70] T. Sreenath, L. M. Matrisian, W. Stetler-Stevenson, S. Gattoni-Celli, R. O. Pozzatti (1992) Expression of matrix metalloproteinase genes in transformed rat cell lines of high and low metastatic potential. *Cancer Res* 52, 4942-7
- [71] S. D. Shapiro, (1998) Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. *Curr Opin Cell Biol* 10, 602-8
- [72] W. Hornebeck, G. Bellon, H. Emonard (2005) Fibronectin type II (FnII)-like modules regulate gelatinase A activity. *Pathol Biol (Paris)* 53, 405-10
- [73] H. Ura, R. D. Bonfil, R. Reich, R. Reddel, A. Pfeifer, C. C. Harris, A. J. Klein-Szanto (1989) Expression of type IV collagenase and procollagen genes and its correlation with the tumorigenic, invasive, and metastatic abilities of oncogene-transformed human bronchial epithelial cells. *Cancer Res* 49, 4615-21

- [74] T. Itoh, M. Tanioka, H. Yoshida, T. Yoshioka, H. Nishimoto, S. Itohara (1998) Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58, 1048-51
- [75] M. Durlík, K. Gardian (2012) Metalloproteinase 2 and 9 activity in the development of pancreatic cancer. *Pol Przegl Chir* 84, 377-82
- [76] L. A. Liotta, S. Abe, P. G. Robey, G. R. Martin (1979) Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2268-72
- [77] L. J. McCawley, L. M. Matrisian (2000) Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today* 6, 149-56
- [78] P. Basset, A. Okada, M. P. Chenard, R. Kannan, I. Stoll, P. Anglard, J. P. Bellocq, M. C. Rio (1997) Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol* 15, 535-41
- [79] N. Velinov, G. Poptodorov, N. Gabrovski, S. Gabrovski (2010) The role of matrix metalloproteinases in the tumor growth and metastasis. *Khirurgiia (Sofiia)*, 44-9
- [80] B. Bauvois, (2012) New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1825, 29-36
- [81] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.
- [82] A. Strasser, L. O'Connor, V. M. Dixit (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-45
- [83] D. Brenner, P. H. Krammer, R. Arnold (2008) Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 66, 52-64
- [84] R. C. Taylor, S. P. Cullen, S. J. Martin (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-41
- [85] K. Ariga, K. Yonenobu, T. Nakase, N. Hosono, S. Okuda, W. Meng, Y. Tamura, H. Yoshikawa (2003) Mechanical stress-induced apoptosis of endplate chondrocytes in organ-cultured mouse intervertebral discs: an ex vivo study. *Spine (Phila Pa 1976)* 28, 1528-33
- [86] J. C. Reed, (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157, 1415-30
- [87] S. Fulda, K. M. Debatin (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798-811
- [88] G. M. Matthews, A. Newbold, R. W. Johnstone (2012) Intrinsic and extrinsic apoptotic pathway signaling as determinants of histone deacetylase inhibitor antitumor activity. *Adv Cancer Res* 116, 165-97
- [89] S. R. Wiley, K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-82
- [90] C. Yao, H. Zhuang, P. Du, W. Cheng, B. Yang, S. Guan, Y. Hu, D. Zhu, M. Christine, *et al.* (2013) Role of Fas-associated death domain-containing protein (FADD) phosphorylation in regulating glucose homeostasis: from proteomic discovery to physiological validation. *Mol Cell Proteomics* 12, 2689-700
- [91] I. Lavrik, A. Golks, P. H. Krammer (2005) Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118, 265-7
- [92] S. H. MacKenzie, A. C. Clark (2008) Targeting cell death in tumors by activating caspases. *Curr Cancer Drug Targets* 8, 98-109

- [93] C. Pop, G. S. Salvesen (2009) Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 284, 21777-81
- [94] P. Hensley, M. Mishra, N. Kyprianou (2013) Targeting caspases in cancer therapeutics. *Biol Chem* 394, 831-43
- [95] S. B. Bratton, G. S. Salvesen (2010) Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* 123, 3209-14
- [96] S. E. Logue, S. J. Martin (2008) Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 36, 1-9
- [97] M. Olsson, B. Zhivotovsky (2011) Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 18, 1441-9
- [98] F. K. H. Braun, (2011) Klärung der Ursachen der Apoptoseresistenz von kutanen T-Zell-Lymphomen und Entwicklung therapeutischer Konzepte. *Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Humboldt Universität Berlin*
- [99] R. E. Ellis, J. Y. Yuan, H. R. Horvitz (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 7, 663-98
- [100] K. Lauber, E. Bohn, S. M. Kröber, Y. J. Xiao, S. G. Blumenthal, R. K. Lindemann, P. Marini, C. Wiedig, A. Zobywalski, *et al.* (2003) Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113, 717-30
- [101] M. O. Hengartner, (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-6
- [102] H. Harada, S. Grant (2003) Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol* 7, 117-38
- [103] B. M. Gardner, D. Pincus, K. Gotthardt, C. M. Gallagher, P. Walter (2013) Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a013169
- [104] E. Szegezdi, S. E. Logue, A. M. Gorman, A. Samali (2006) Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7, 880-5
- [105] K. F. Ferri, G. Kroemer (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3, E255-63
- [106] T. Nakagawa, J. Yuan (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150, 887-94
- [107] V. H. Cornejo, C. Hetz (2013) The unfolded protein response in Alzheimer's disease. *Semin Immunopathol* 35, 277-92
- [108] R. Sano, J. C. Reed (2013) ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1833, 3460-70
- [109] K. R. Parzych, D. J. Klionsky (2013) An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal*
- [110] B. Loos, A. M. Engelbrecht, R. A. Lockshin, D. J. Klionsky, Z. Zakeri (2013) The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions. *Autophagy* 9, 1270-85
- [111] N. Mizushima, B. Levine, A. M. Cuervo, D. J. Klionsky (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-75
- [112] J. Yang, S. Carra, W. G. Zhu, H. H. Kampinga (2013) The regulation of the autophagic network and its implications for human disease. *Int J Biol Sci* 9, 1121-33
- [113] M. C. Maiuri, E. Zalckvar, A. Kimchi, G. Kroemer (2007) Self-eating and self-killing: cross-talk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 741-52

- [114] W. Bursch, A. Karwan, M. Mayer, J. Dornetshuber, U. Fröhwein, R. Schulte-Hermann, B. Fazi, F. Di Sano, L. Piredda, *et al.* (2008) Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology* 254, 147-57
- [115] C. B. Thompson, (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-62
- [116] A. H. Wyllie, (1997) Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol* 73, 189-97
- [117] C. J. Hackett, H. B. Dickler (1999) Immunologic tolerance for immune system-mediated diseases. *J Allergy Clin Immunol* 103, 362-70
- [118] U. Fischer, K. Schulze-Osthoff (2005) Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1, 942-61
- [119] S. E. Moss, R. O. Morgan (2004) The annexins. *Genome Biol* 5, 219
- [120] S. Mussunoor, G. I. Murray (2008) The role of annexins in tumour development and progression. *J Pathol* 216, 131-40
- [121] L. Fatimathas, S. E. Moss (2010) Annexins as disease modifiers. *Histol Histopathol* 25, 527-32
- [122] K. Munk (2008) Georg Thieme Verlag KG.
- [123] V. A. Fadok, D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton, P. M. Henson (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-16
- [124] S. C. Frasch, P. M. Henson, J. M. Kailey, D. A. Richter, M. S. Janes, V. A. Fadok, D. L. Bratton (2000) Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 275, 23065-73
- [125] K. S. Ravichandran, (2011) Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 35, 445-55
- [126] R. F. Zwaal, P. Comfurius, E. M. Bevers (2005) Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 62, 971-88
- [127] C. P. Reutelingsperger, G. Hornstra, H. C. Hemker (1985) Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem* 151, 625-9
- [128] H. O. van Genderen, H. Kenis, L. Hofstra, J. Narula, C. P. Reutelingsperger (2008) Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta* 1783, 953-63
- [129] J. H. Walker, C. M. Boustead, J. J. Koster, M. Bewley, D. A. Waller (1992) Annexin V, a calcium-dependent phospholipid-binding protein. *Biochem Soc Trans* 20, 828-33
- [130] F. G. Blankenberg, (2008) In vivo detection of apoptosis. *J Nucl Med* 49 Suppl 2, 81S-95S
- [131] F. G. Blankenberg, (2009) Imaging the molecular signatures of apoptosis and injury with radiolabeled annexin V. *Proc Am Thorac Soc* 6, 469-76
- [132] M. Schlapschy, U. Binder, C. Börger, I. Theobald, K. Wachinger, S. Kisling, D. Haller, A. Skerra (2013) PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. *Protein Eng Des Sel* 26, 489-501
- [133] J. V. Jokerst, T. Lobovkina, R. N. Zare, S. S. Gambhir (2011) Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)* 6, 715-28

- [134] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert (2010) Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 6288-308
- [135] A. Bendele, J. Seely, C. Richey, G. Sennello, G. Shopp (1998) Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. *Toxicol Sci* 42, 152-7
- [136] T. Suzuki, M. Ichihara, K. Hyodo, E. Yamamoto, T. Ishida, H. Kiwada, H. Ishihara, H. Kikuchi (2012) Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes containing doxorubicin upon repeated administration to dogs. *Int J Pharm* 436, 636-43
- [137] R. P. Garay, R. El-Gewely, J. K. Armstrong, G. Garratty, P. Richette (2012) Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin Drug Deliv* 9, 1319-23
- [138] T. Ishida, M. Ichihara, X. Wang, K. Yamamoto, J. Kimura, E. Majima, H. Kiwada (2006) Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release* 112, 15-25
- [139] I. Capila, R. J. Linhardt (2002) Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 391-412
- [140] G. Grosveld, A. Hermans, A. De Klein, D. Bootsma, N. Heisterkamp, J. Groffen (1987) The role of the Philadelphia translocation in chronic myelocytic leukemia. *Ann N Y Acad Sci* 511, 262-9
- [141] V. Schellenberger, C. W. Wang, N. C. Geething, B. J. Spink, A. Campbell, W. To, M. D. Scholle, Y. Yin, Y. Yao, *et al.* (2009) A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner. *Nat Biotechnol* 27, 1186-90
- [142] N. C. Geething, W. To, B. J. Spink, M. D. Scholle, C. W. Wang, Y. Yin, Y. Yao, V. Schellenberger, J. L. Cleland, *et al.* (2010) Gcg-XTEN: an improved glucagon capable of preventing hypoglycemia without increasing baseline blood glucose. *PLoS One* 5, e10175
- [143] M. Schlapschy, I. Theobald, H. Mack, M. Schottelius, H. J. Wester, A. Skerra (2007) Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life. *Protein Eng Des Sel* 20, 273-84
- [144] A. Haeckel, F. Appler, L. Figge, H. Kratz, M. Lukas, R. Michel, J. Schnorr, M. Zille, B. Hamm, E. Schellenberger (2014) XTEN-annexin A5: XTEN allows complete expression of long-circulating protein-based imaging probes as recombinant alternative to PEGylation. *J Nucl Med* 55, 508-14
- [145] R. Huber, J. Römisch, E. P. Paques (1990) The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J* 9, 3867-74
- [146] R. M. Murphy, (1997) Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: what can we learn? *Curr Opin Biotechnol* 8, 25-30
- [147] T. Förster, (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 55-75
- [148] K. J. Livak, T. D. Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method. *Methods* 25, 402-8
- [149] A. Haeckel, L. Schoenzart, F. Appler, J. Schnorr, M. Taupitz, B. Hamm, E. Schellenberger (2012) Combined in situ zymography, immunofluorescence, and staining of iron oxide particles in paraffin-embedded, zinc-fixed tissue sections. *Mol Imaging* 11, 383-8

- [150] W. M. Frederiks, O. R. Mook (2004) Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: review and protocols. *J Histochem Cytochem* 52, 711-22
- [151] S. J. Mandl, C. Mari, M. Edinger, R. S. Negrin, J. F. Tait, C. H. Contag, F. G. Blankenberg (2004) Multi-modality imaging identifies key times for annexin V imaging as an early predictor of therapeutic outcome. *Mol Imaging* 3, 1-8
- [152] C. Zhang, Y. Feng, S. Qu, X. Wei, H. Zhu, Q. Luo, M. Liu, G. Chen, X. Xiao (2011) Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis in mice through SIRT1-mediated deacetylation of p53. *Cardiovasc Res* 90, 538-45
- [153] F. Al-Ejeh, J. M. Darby, C. Tsopelas, D. Smyth, J. Manavis, M. P. Brown (2009) APOMAB, a La-specific monoclonal antibody, detects the apoptotic tumor response to life-prolonging and DNA-damaging chemotherapy. *PLoS One* 4, e4558
- [154] J. M. Perez, L. Josephson, T. O'Loughlin, D. Högemann, R. Weissleder (2002) Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions. *Nat Biotechnol* 20, 816-20
- [155] L. Figge, (2014) Synthese molekularer Bildgebungssonden für die molekulare Magnetresonanztomographie *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität Berlin*
- [156] M. Taupitz, S. Wagner, J. Schnorr, I. Kravec, H. Pilgrimm, H. Bergmann-Fritsch, B. Hamm (2004) Phase I clinical evaluation of citrate-coated monocrySTALLINE very small superparamagnetic iron oxide particles as a new contrast medium for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 39, 394-405
- [157] L. Krug, (2007) Ein neues nanopartikuläres Kontrastmittel für die MR-Angiographie: Erste klinische Verträglichkeits- und Wirksamkeitsprüfungen *Institut für Radiologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin*
- [158] B. Hamm, T. Staks, M. Taupitz, R. Maibauer, A. Speidel, A. Huppertz, T. Frenzel, R. Lawaczek, K. J. Wolf, L. Lange (1994) Contrast-enhanced MR imaging of liver and spleen: first experience in humans with a new superparamagnetic iron oxide. *J Magn Reson Imaging* 4, 659-68
- [159] L. Vlahos, A. Gouliamos, A. Athanasopoulou, G. Kotoulas, W. Claus, A. Hatzioannou, A. Kalovidouris, C. Papavasiliou (1994) A comparative study between Gd-DTPA and oral magnetic particles (OMP) as gastrointestinal (GI) contrast agents for MRI of the abdomen. *Magn Reson Imaging* 12, 719-26
- [160] B. Hamm, T. Staks, M. Taupitz (1994) SHU 555A. A new superparamagnetic iron oxide contrast agent for magnetic resonance imaging. *Invest Radiol* 29 Suppl 2, S87-9
- [161] Y. X. Wang, S. M. Hussain, G. P. Krestin (2001) Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol* 11, 2319-31
- [162] J. W. Bulte, D. L. Kraitchman (2004) Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed* 17, 484-99
- [163] M. Taupitz, S. Schmitz, B. Hamm (2003) Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development. *Rofo* 175, 752-65
- [164] P. B. Santhosh, N. P. Ulrich (2013) Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promising tools in cancer theranostics. *Cancer Lett* 336, 8-17
- [165] A. Tsourkas, O. Hofstetter, H. Hofstetter, R. Weissleder, L. Josephson (2004) Magnetic relaxation switch immunosensors detect enantiomeric impurities. *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 2395-9

- [166] E. Schellenberger, F. Rudloff, C. Warmuth, M. Taupitz, B. Hamm, J. Schnorr (2008) Protease-specific nanosensors for magnetic resonance imaging. *Bioconjug Chem* 19, 2440-5
- [167] S. Rasheed, W. A. Nelson-Rees, E. M. Toth, P. Arnstein, M. B. Gardner (1974) Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33, 1027-33
- [168] M. Heisel, W. E. Laug, P. A. Jones (1983) Inhibition by bovine endothelial cells of degradation by HT-1080 fibrosarcoma cells of extracellular matrix proteins. *J Natl Cancer Inst* 71, 1183-7
- [169] L. Ozzello, B. Sordat, C. Merenda, S. Carrel, J. Hurlimann, J. P. Mach (1974) Transplantation of a human mammary carcinoma cell line (BT 20) into nude mice. *J Natl Cancer Inst* 52, 1669-72
- [170] J. Mattern, M. Bak, E. W. Hahn, M. Volm (1988) Human tumor xenografts as model for drug testing. *Cancer Metastasis Rev* 7, 263-84
- [171] L. R. Kelland, (2004) Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40, 827-36
- [172] M. Pytliak, V. Vargová, V. Mechírová (2012) Matrix metalloproteinases and their role in oncogenesis: a review. *Onkologie* 35, 49-53
- [173] E. I. Deryugina, J. P. Quigley (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25, 9-34
- [174] C. Amălinei, I. D. Căruntu, S. E. Giușcă, R. A. Bălan (2010) Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 51, 215-28
- [175] J. S. Rao, (2003) Molecular mechanisms of glioma invasiveness: ... [Nat Rev Cancer. 2003] - PubMed - NCBI *Nat Rev Cancer* 3, 489-501
- [176] C. Gialeli, A. D. Theocharis, N. K. Karamanos (2011) Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J* 278, 16-27
- [177] S. L. Bowers, I. Banerjee, T. A. Baudino (2010) The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol* 48, 474-82
- [178] M. Polette, B. Nawrocki-Raby, C. Gilles, C. Clavel, P. Birembaut (2004) Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 49, 179-86
- [179] T. Nakamura, T. Kuwai, J. S. Kim, D. Fan, S. J. Kim, I. J. Fidler (2007) Stromal metalloproteinase-9 is essential to angiogenesis and progressive growth of orthotopic human pancreatic cancer in parabiont nude mice. *Neoplasia* 9, 979-86
- [180] J. Fernandez-Gomez, S. Escaf, L. O. Gonzalez, A. Suarez, S. Gonzalez-Reyes, J. González, O. Miranda, F. Vizoso (2011) Relationship between metalloprotease expression in tumour and stromal cells and aggressive behaviour in prostate carcinoma: Simultaneous high-throughput study of multiple metalloproteases and their inhibitors using tissue array analysis of radical prostatectomy samples. *Scand J Urol Nephrol* 45, 171-6
- [181] K. H. Bae, H. J. Chung, T. G. Park (2011) Nanomaterials for cancer therapy and imaging. *Mol Cells* 31, 295-302
- [182] S. Saini, D. D. Stark, P. F. Hahn, J. Wittenberg, T. J. Brady, J. T. Ferrucci (1987) Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology* 162, 211-6
- [183] H. Kobayashi, R. Watanabe, P. L. Choyke (2013) Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? *Theranostics* 4, 81-9

- [184] F. G. Blankenberg, J. Tait, K. Ohtsuki, H. W. Strauss (2000) Apoptosis: the importance of nuclear medicine. *Nucl Med Commun* 21, 241-50
- [185] C. Zhang, K. Fan, X. Ma, D. Wei (2012) Impact of large aggregated uricases and PEG diol on accelerated blood clearance of PEGylated canine uricase. *PLoS One* 7, e39659
- [186] T. Ishida, H. Kiwada (2013) Anti-polyethyleneglycol antibody response to PEGylated substances. *Biol Pharm Bull* 36, 889-91
- [187] J. L. Cleland, N. C. Geething, J. A. Moore, B. C. Rogers, B. J. Spink, C. W. Wang, S. E. Alters, W. P. Stemmer, V. Schellenberger (2012) A novel long-acting human growth hormone fusion protein (VRS-317): enhanced in vivo potency and half-life. *J Pharm Sci* 101, 2744-54
- [188] Y. Matsumura, H. Maeda (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46, 6387-92
- [189] H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang (2013) The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 71-9
- [190] H. Maeda, J. Fang, T. Inutsuka, Y. Kitamoto (2003) Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int Immunopharmacol* 3, 319-28
- [191] I. K. Kwon, S. C. Lee, B. Han, K. Park (2012) Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors. *J Control Release* 164, 108-14
- [192] I. Tufto, E. K. Rofstad (1999) Interstitial fluid pressure and capillary diameter distribution in human melanoma xenografts. *Microvasc Res* 58, 205-14
- [193] R. K. Jain, T. Stylianopoulos (2010) Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat Rev Clin Oncol* 7, 653-64
- [194] S. J. Lunt, N. Chaudary, R. P. Hill (2009) The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clin Exp Metastasis* 26, 19-34
- [195] Y. Boucher, L. T. Baxter, R. K. Jain (1990) Interstitial pressure gradients in tissue-isolated and subcutaneous tumors: implications for therapy. *Cancer Res* 50, 4478-84
- [196] A. V. Salnikov, V. V. Iversen, M. Koisti, C. Sundberg, L. Johansson, L. B. Stuhr, M. Sjöquist, H. Ahlström, R. K. Reed, K. Rubin (2003) Lowering of tumor interstitial fluid pressure specifically augments efficacy of chemotherapy. *FASEB J* 17, 1756-8
- [197] R. K. Jain, (1987) Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 47, 3039-51
- [198] J. P. Mira, T. Dubois, J. P. Oudinet, S. Lukowski, F. Russo-Marie, B. Geny (1997) Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin V in differentiated permeabilized HL-60 cells. Evidence of crucial importance of domain I type II Ca²⁺-binding site in the mechanism of inhibition. *J Biol Chem* 272, 10474-82
- [199] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O. C. Farokhzad (2013) Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*

Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
cDNA	complementary DNA
CT	Computertomographie
Ct	Schwellenwert (Threshold Cycle)
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
DISC	death-inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat
DTT	Dithiothreitol (1,4-Dithiol-2,3-dihydroxybutan)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FAM	6-Carboxy-Fluoreszin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fetales Kälberserum (Foetal Calf Serum)
FLASH	Pulssequenz (Fast Low Angle SHot)
FoV	Field of View
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter)
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase
GRE	Gradientenecho
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin aus der Klasse der Gammaglobuline
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KM	Kontrastmittel
LPLC	Niederdruckflüssigkeitschromatographie (Low Pressure Liquid Chromatography)
Lsg.	Lösung
MBq	MegaBecquerel

MRT	Magnetresonanztomographie
NIRF	Nahinfrarotfluoreszenz
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
RES	retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	gewählter Analysebereich (region of interest)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT-PCR	Real-Time-PCR
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	subkutan
SI	Signalintensität
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (single-photon emission computed tomography)
SSC	Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter)
T	Tesla
T1	longitudinale (Spin-Gitter) Relaxationszeit
T2	transversale (Spin-Spin) Relaxationszeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TE	Echozeit (time to echo)
TR	Repetitionszeit (time of repetition)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VSOP	very small iron oxide particles

Publikationsliste

F. Appler, A. Haeckel, L. Figge, H. Kratz, M. Lucas, R. Michel, J. Schnorr, M. Zille, B. Hamm, E. Schellenberger **(2014)** XTEN-Annexin A5: XTEN allows complete expression of long- circulating protein-based imaging probes as recombinant alternative to PEGylation. *J Nucl Med.* 55, 508-514.

L. Figge, **F. Appler**, H. H. Chen, D. E. Sosnovik, J. Schnorr, O. Seitz, M. Taupitz, B. Hamm, E. Schellenberger **(2014)** Direct coupling of annexin A5 to VSOP yields small, protein-covered nanoprobe for MR imaging of apoptosis. *Contrast Media Mol Imaging.* 9, 291-9.

A. Haeckel, L. Schoenzart, **F. Appler**, J. Schnorr, M. Taupitz, B. Hamm, E. Schellenberger **(2012)** Combined in situ zymography, immunofluorescence, and staining of iron oxide particles in paraffin-embedded, zinc-fixed tissue sections. *Mol Imaging.* 11, 383-8.

E. Schellenberger, **F. Rudloff**, C. Warmuth, M. Taupitz, B. Hamm, J. Schnorr **(2008)** Protease-specific nanosensors for magnetic resonance imaging. *Bioconjug Chem.* 12, 2440-5.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit ist zuvor in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung des Doktorgrades vorgelegt worden.

F. Appler