

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. M. Schwaiger)

Biolumineszenz Imaging zur nicht-invasiven Darstellung der Entwicklung der Peritonealkarzinose und des Erfolgs einer ²¹³Bi-Radioimmuntherapie

Hannes Matthias Buchhorn

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke
2. Priv.- Doz. Dr. A. K. Buck
3. Priv.- Doz. Dr. D. K. M. Saur

Die Dissertation wurde am 06.11.2008 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.04.2009 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	6
3. Material und Methoden	7
3.1 Chemikalien und Medikamente	7
3.2 Geräte	7
3.3 Zelllinie	8
3.3.1 Luciferase Transfizierung	8
3.3.1.1 Plasmid Konstruktion	8
3.3.1.2 Stabile Transfizierung der HSC-Zellen	8
3.3.2 Kultivierung der Zellen	10
3.4 Versuchstiere	11
3.4.1 Tierhaltung	11
3.4.2 Anästhesie	12
3.4.3 Tötung und Sektion	12
3.5 Vorbereitungen zur ^{213}Bi -Radioimmuntherapie	13
3.5.1 d9MAb	13
3.5.2 Wismut-213 (^{213}Bi)	15
3.5.3 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator	15
3.5.4 Radionuklidmarkierung von d9MAb	15
3.6 Biolumineszenz Imaging	16
3.6.1 Versuchsaufbau und Vorbereitungen	16
3.6.2 Durchführung von <i>In-vitro</i> -Aufnahmen	18
3.6.3 Durchführung von <i>In-vivo</i> -Aufnahmen	19
3.7 <i>In-vitro</i> -Versuche	23
3.7.1 Vorbereitungen	23
3.7.2 Inkubation mit ^{213}Bi -d9MAb	24
3.7.3 Auswertung	24
3.7.3.1 Klonogener Assay	24
3.7.3.2 Biolumineszenz Imaging	25
3.8 Tierexperimente	26
3.8.1 Tumorzellinjektion	26

3.8.1.1 Subkutane (s.c.) Injektion	26
3.8.1.2 Intravenöse (i.v.) Injektion	26
3.8.1.3 Intraperitoneale (i.p.) Injektion	27
3.8.2 ²¹³ Bi-Radioimmuntherapie	27
3.8.3 <i>In-vivo</i> -Biolumineszenz Imaging	28
3.8.3.1 Subkutan injizierte Tiere	28
3.8.3.2 Intravenös injizierte Tiere	28
3.8.3.3 Intraperitoneal injizierte Tiere	29
3.8.4 Biolumineszenz-Aufnahmen von malignem Aszites	29
3.8.5 <i>Post-mortem</i> -Biolumineszenz-Aufnahmen	30
3.8.6 Versuch der Quantifizierung von <i>In-vivo</i> - Biolumineszenz-Aufnahmen	30
3.8.6.1 Subkutan injizierte Maus	31
3.8.6.2 Intraperitoneal injizierte Mäuse	31
3.8.6.3 Auswertung der Messungen	32
4. Ergebnisse	33
4.1 Markierung von d9MAb mit ²¹³ Bi	33
4.2 Biolumineszenz Imaging	33
4.2.1 <i>In-vitro</i> -Aufnahmen	33
4.2.2 <i>In-vivo</i> -Aufnahmen	34
4.3 <i>In-vitro</i> -Versuche	
4.3.1 Bewertung der Biolumineszenz-Aufnahmen	36
4.3.2 Ergebnisse der Messung des Biolumineszenzsignals	37
4.3.3 Ergebnisse des klonogenen Assays	37
4.3.4 Vergleich der Ergebnisse der Biolumineszenz- Messung und des klonogenen Assays	38
4.4 Tierexperimente	39
4.4.1 Biolumineszenz Imaging von subkutan injizierten Tieren	39
4.4.2 Biolumineszenz Imaging von intravenös injizierten Tieren	39
4.4.3 Biolumineszenz Imaging von intraperitoneal injizierten Tieren	42
4.4.3.1 Tumorentwicklung der Kontrollgruppe	42
4.4.3.2 Tumorentwicklung der Therapiegruppe	44
4.4.4 Biolumineszenz Imaging von malignem Aszites	44

Inhaltsverzeichnis

4.4.5 <i>Post-mortem</i> -Biolumineszenz-Aufnahmen	46
4.4.6 Quantifizierung von <i>In-vivo</i> -Biolumineszenz-Aufnahmen	48
4.4.6.1 Subkutan injizierte Maus	49
4.4.6.2 Intraperitoneal injizierte Mäuse	50
5. Diskussion	53
6. Literaturverzeichnis	66
7. Zusammenfassung	74

Abkürzungsverzeichnis

AGMP-50	Kationenaustauscherharz
CT	Computertomographie
d	Tag
d9-E-Cadherin	Mutation des Exon 9 für die Expression des E-Cadherins
d9MAb	monoklonaler Antikörper gegen d9-Mutation des E-Cadherins
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DOTA	1,4,7,10-tetra-azacyklododecane-N,N',N'',N'''-tetra-acetic-acid
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HSC	Human Signetringcell Carcinoma
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
keV	Kiloelektronenvolt
LET	Linearer Energietransfer
M	Molar (Stoffkonzentration in mol/l)
MAb	Monoklonaler Antikörper
MeV	Megaelektronenvolt
MRT	Magnetresonanztomographie
p.i.	Post injectionem
PBS	Phosphate buffered saline without Ca ²⁺ und Mg ²⁺
PET	Positionen-Emissions-Tomographie
s	Sekunde
s.c.	Subkutan
SCN-CHX-A''-DTPA	2-(4-isothiocyanatobenzyl)diethylentriamine pentaacetic acid
t _{1/2}	Halbwertszeit

Abkürzungsverzeichnis

TUM	Technische Universität München
WHO	World Health Organization

1. Einleitung

Maligne Erkrankungen stehen seit Jahren im Mittelpunkt der medizinischen Forschung. Wie wichtig das ist, zeigt die Tatsache, dass Krebserkrankungen in Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind. Besondere Bedeutung haben dabei vier Entitäten, die von der WHO als die „big four killers“ bezeichnet werden (WHO Press Release N° 159, 2005). Neben malignen Tumoren der weiblichen Brust, Lungentumoren und kolorektalen Karzinomen wird das Magenkarzinom genannt.

Das Magenkarzinom ist die zweithäufigste Todesursache durch Malignome weltweit. Von insgesamt 6,7 Millionen Krebstoten entfallen 700000 alleine auf das Magenkarzinom. Insgesamt ist das Magenkarzinom die vierthäufigste Malignomart weltweit. Die Inzidenz des Magenkarzinoms ist allerdings in verschiedenen Regionen der Welt sehr unterschiedlich. Während zum Beispiel „high risk“-Gebiete wie Japan und China eine Inzidenz von über 20 pro 100000 Einwohnern haben, beträgt die Inzidenz in Nordamerika unter 10 pro 100000 Einwohnern. Auch das Überleben nach Diagnosestellung unterliegt großen regionalen Schwankungen. Während in Japan vor allem durch Massen-Screenings eine 5-Jahres-Überlebensrate von 52% erzielt werden konnte, beträgt diese im südlich der Sahara gelegenen Afrika nur 6%. In Westeuropa konnte vor allem durch eine gestiegene Zahl an Magenspiegelungen zumindest ein 5-Jahres-Überleben von 27% erreicht werden (Parkin et al., 2005). Wie in anderen Industrienationen auch, hat sich in Deutschland die Inzidenz von Anfang der 1970er bis Ende der 1990er Jahre etwa halbiert. Trotzdem ist das Magenkarzinom mit insgesamt etwa 19400 Neuerkrankungen jährlich in Deutschland die fünfhäufigste maligne Erkrankung bei Männern und die sechsthäufigste bei Frauen. Die Prognose des Magenkarzinoms ist weiterhin schlecht, die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt in Deutschland bei Männern 27% und bei Frauen 29% und liegt damit im westeuropäischen Durchschnitt (GEKID, 2006).

Für die schlechte Prognose des Magenkarzinoms gibt es im Wesentlichen zwei Gründe. Zum einen ist bei einer großen Anzahl von Patienten das Karzinom bei der ersten Diagnosestellung, unter anderem wegen zum Teil uncharakteristischen Frühsymptomen, bereits weit fortgeschritten und hat zum Teil sogar schon zu Fernmetastasen geführt. Zum anderen kommt es auch nach potentiell kurativer Resektion und Therapie immer wieder zum Rezidiv.

Heute zielt die Therapie des Magenkarzinoms in großen Zentren immer mehr auf Individualisierung. Das heißt, sie wird an die spezielle und spezifische Tumorsituation jedes einzelnen Patienten angepasst. Es muss dabei zwischen kurativen und palliativen Therapieansätzen unterschieden werden. Kurative Therapie hat zum Ziel, den Patienten zu heilen und Rezidive zu verhindern, während palliative Therapie nur lebensverlängernd wirkt und zum Ziel hat, dem Patienten für diese Zeit eine möglichst gute Lebensqualität zu erhalten.

Durch bessere Früherkennung wird es in Zukunft hoffentlich gelingen, bei vielen Patienten das Magenkarzinom in einem früheren Stadium zu diagnostizieren und dadurch die Prognose zu verbessern. Somit wird der Verhinderung von Rezidiven eine immer größere Bedeutung zukommen. Einige Studien zeigen hier, dass mit neoadjuvanter Chemotherapie bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen (Lordick und Siewert, 2005) und postoperativer Radiochemotherapie (Macdonald et al., 2001) Rezidive verhindert oder zumindest hinausgezögert werden und somit Erfolge bei der Überlebenszeit der Patienten erzielt werden können. Trotzdem ist die Prognose nach Resektionen des Magenkarzinoms immer noch schlecht. So gibt die Chirurgische Klinik des Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, in ihrem Krankengut eine Rezidivrate von 48% an (Bennett et al., 2005). Es wird dabei zwischen Fernmetastasen, lokoregionalen und peritonealen Rezidiven unterschieden. Im Krankengut der New Yorker Klinik hatten 29% der Rezidivpatienten eine peritoneale Beteiligung, 13,6% ein ausschließlich peritoneales Rezidiv. Bei Patienten mit diffusem Magenkarzinom war die Rate an peritonealen Rezidiven höher als bei Patienten mit anderen Subtypen (D'Angelica et al., 2004). Im Patientengut des Klinikums rechts der

Isar zeigten 34% der Rezidivpatienten eine peritoneale Beteiligung und 24% eine alleinige Peritonealkarzinose (Siewert et al., 2006).

Die Peritonealkarzinose nimmt unter den Rezidiven eine Sonderstellung ein, da sie zum einen schwierig zu diagnostizieren und sehr schlecht zu therapieren ist und zum anderen eine außerordentlich schlechte Prognose hat. Die in der gesamten Bauchhöhle verteilten Tumorknoten einer Peritonealkarzinose sind auch mit moderner Diagnostik wie Ultraschall, Computer-Tomographie (CT), Kernspin-Tomographie (MRT) oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oft schwierig zu detektieren. Besteht, besonders bei fortgeschrittenen Tumorstadien, der Verdacht auf eine Peritonealkarzinose, sollte deshalb eine Laparoskopie einschließlich Lavage zur Diagnostik durchgeführt werden (Sendler et al., 2006). Wird bei einem Patienten eine Peritonealkarzinose dokumentiert, beträgt die mediane Überlebenszeit der Patienten nur noch drei bis sechs Monate und ist sogar noch schlechter, wenn sich Aszites oder große Tumormassen (>2cm) entwickeln (Sadeghi et al., 2000). Bei Peritonealkarzinose kommen nur noch palliative Therapieoptionen in Betracht. Zur Verbesserung der Lebensqualität und zur Verlängerung der Überlebenszeit gewinnen neben Chirurgie und Chemotherapie zunehmend neue Therapieformen an Bedeutung. So zeigte sich in verschiedenen Studien, dass Patienten mit Magenkarzinom, Peritonealkarzinose oder malignem Aszites von einer Immuntherapie mit Antikörpern gegen verschiedene tumorassoziierte Antigene profitieren können (Lordick et al., 2005; Heiss et al., 2005).

Da eine Heilung der Peritonealkarzinose bisher nicht möglich ist, steht die Verhinderung ihres Auftretens weiter im Vordergrund. Werden, auch schon bei niedrigen Tumorstadien, Tumorzellen in der Peritoneallavage nachgewiesen, so deutet das auf eine schlechte Prognose für die betroffenen Patienten hin (Rosenberg et al., 2006). Die Vernichtung von nach Operationen frei in der Bauchhöhle verteilten einzelnen Tumorzellen, Tumorzellklustern und Mikrometastasen könnte somit die Prognose deutlich verbessern. Eine vielversprechende Therapieoption dafür stellt die lokoregionale Radioimmuntherapie mit Alpha-Strahlern dar, wie bereits in verschiedenen Tumormodellen und klinischen Studien gezeigt werden

konnte (Rizvi et al., 2006; Couturier et al., 2005; Qu et al., 2005; Milenic et al., 2004; Zalutsky und Pozzi, 2004; Borchardt et al., 2003; Jurcic et al., 2002).

Bei dem diffusen Magenkarzinom ist in circa 50 Prozent der Fälle das Gen für das Adhäsionsmolekül E-Cadherin mutiert, wobei es sich in etwa 10 Prozent dieser Mutationen um die Deletion des Exons 9 des E-Cadherins (d9-E-Cadherin) handelt. Gegen die mutierte Form des E-Cadherins wurde ein Antikörper (d9-MAb) entwickelt, der spezifisch an diese Mutation bindet (Becker et al., 1999). Als zytotoxisches Agens, das Zellen mit dem veränderten E-Cadherin selektiv zerstören soll, kann der Alpha-Strahler ^{213}Bi an diesen Antikörper gekoppelt (^{213}Bi -d9MAb) werden. Der Alpha-Strahler ^{213}Bi hat sich durch seine Strahlungseigenschaften mit einer kurzen Reichweite von circa $80\mu\text{m}$ in Gewebe, seiner hohen Strahlenenergie und dem daraus resultierenden hohen linearen Energietransfer als sehr effektiv in der Bekämpfung von kleinen Tumorknötchen oder Einzelzellen in der Bauchhöhle erwiesen. Zellen, an die der monoklonale Antikörper nicht bindet, sollten wegen der kurzen Reichweite des Alpha-Strahlers nicht geschädigt werden. Das beschriebene Therapiekonzept mit ^{213}Bi -d9MAb Immunkonjugaten wurde sowohl *in vitro* als auch experimentell *in vivo* an Tumorzellen eingesetzt, die das mutierte d9-E-Cadherin exprimieren, um diese abzutöten (Senekowitsch-Schmidtke et al., 2001; Miederer et al., 2003; Huber et al., 2003). Die intraperitoneale Applikation von ^{213}Bi -d9MAb erscheint daher als eine vielversprechende Therapieoption für die Verhinderung einer Peritonealkarzinose nach R0-Resektionen beim Magenkarzinom.

Bevor ein neues Therapiekonzept in einer klinischen Studie beim Menschen eingesetzt werden kann, muss es in Tierexperimenten auf Wirksamkeit und mögliche Nebenwirkungen getestet werden. Wie bereits erwähnt ist es auch im Tierexperiment sehr schwierig, eine Peritonealkarzinose mit herkömmlichen Verfahren zu diagnostizieren und deren Verlauf zu verfolgen. Daher werden Untersuchungen zum Verlauf einer Peritonealkarzinose im Tierversuch in der Regel invasiv durchgeführt. Um repräsentative Daten über die Tumorentwicklung vor und nach einer Therapie zu bekommen, ist es

nötig, eine große Zahl von Versuchstieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Tumorzellinokulation abzutöten und die Tumorausbreitung zu dokumentieren. Die Entwicklung der Peritonealkarzinose vom einzelnen kleinen Tumorknötchen bis zum disseminierten Tumorbefall in ein und demselben Tier zu verfolgen, ist auf diese Weise jedoch nicht möglich. Hier muss auf nicht-invasive, bildgebende Verfahren zurückgegriffen werden.

Eine nicht-invasive Option für die Untersuchung von Tumorwachstum *in vivo* stellt Biolumineszenz Imaging dar. Diese Methode macht sich die Lichtemission zu Nutzen, die nach Zugabe des Substrates D-Luciferin von dem Enzym Luciferase des Glühwürmchens *Photinus pyralis* unter Verbrauch von ATP und Sauerstoff produziert wird. Das abgegebene Licht kann mit Hilfe einer CCD (cooled charge-coupled device) Kamera sichtbar gemacht werden. Mit dieser Technik ist es möglich, Tumoren, die aus Zellen, welche zuvor mit dem Gen, das für Luciferase kodiert, transfiziert wurden, in der Bauchhöhle nachzuweisen und deren Wachstum im Verlauf darzustellen. Biolumineszenz Imaging wurde bereits in mehreren Studien erfolgreich zur Verlaufsbeobachtung des Wachstums verschiedener Tumoren in Versuchstieren verwendet (Saur et al., 2005; Zeamari et al., 2004; Edinger et al., 2003; Vooijs et al., 2002; Rehemtulla et al., 2000; Edinger et al., 1999; Sweeney et al., 1999). Experimentelle Studien, die die Wirksamkeit einer lokoregionalen α -Radioimmuntherapie auf die Entwicklung einer Peritonealkarzinose mittels Biolumineszenz Imaging untersuchen, wurden jedoch bisher noch nicht durchgeführt.

2. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, nicht-invasiv die Entwicklung und Ausbreitung einer Peritonealkarzinose, die von Luciferase transfizierten Zellen eines diffusen Magenkarzinoms ausgeht, vor und nach Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörpern mittels Biolumineszenz Imaging zu visualisieren.

Dazu wurde die d9-E-Cadherin exprimierende Magenkarzinomzelllinie HSC45-M2 mit dem Gen für Firefly Luciferase stabil transfiziert (HSC45-M2-luc). *In vitro* wurde die Proliferation dieser Zelllinie nach Inkubation mit ^{213}Bi -d9MAb mittels klonogenem Assay und Biolumineszenz Imaging untersucht.

Für die *In-vivo*-Versuche zur Verlaufsbeobachtung der Peritonealkarzinose wurden Nacktmäusen HSC45-M2-luc Zellen injiziert und die Entstehung der Peritonealkarzinose sowie deren Regression nach intraperitonealer Applikation von ^{213}Bi -d9MAb im Zeitverlauf mit Hilfe von Biolumineszenz Imaging visualisiert.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Medikamente

Ammoniumacetat	Sigma, Steinheim
Augensalbe, Vidisic®	Dr. Mann Pharma, Berlin
D-Luciferin (Na-Salz)	Synchem, Kassel
Dulbecco`s MEM	Biochrom, Berlin
EDTA 1% in PBS	C C Pro GmbH, Neustadt Erlangen
Ethanol 70%	Apotheke Klinikum r.d. Isar
Äther	Chinosol, Seelze
FKS (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
Geneticin 50mg/ml	Gibco, U.K.
HCL Suprapur 30%	Merck, Darmstadt
Ketavet (100mg/ml Ketaminhydrochlorid)	Pharmacia & Upjohn,
L-Ascorbinsäure	Sigma, Steinheim
NaCl-Lösung, 0,9%	Delta-Pharma, Pfullingen
NaJ	Sigma, Steinheim
PD-10 Desaltin columns	Amersham, Freiburg
Penicillin/ Streptomycin	Biochrom, Berlin
pH-Indikatorstäbchen pH4.0-7.0	Merck, Darmstadt
Rompun (2% Xylazinhydrochlorid)	Bayer, Leverkusen
Tri-Na-Citrat	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin

3.2 Geräte

Bildverstärker	Hamamatsu, Herrsching
CCD-Kamera (ORCAII, C4742-98)	Hamamatsu, Herrsching
Cell Counter, CASY®	Schärfe, Reutlingen
Darkbox, Typ 4, Model 2	Unit One Electronics, Dänemark

Gamma-Counter TYP 1480 Wizard TM 3	Wallac, Finnland
Laminar-Flow-Arbeitsbank	Heraeus, Osterode

3.3 Zelllinie

Die Siegelringzellkarzinomlinie HSC45-M2 wurde aus Aszites und Pleuraerguß einer Patientin mit diffusem Magenkarzinom isoliert (Yanagihara et al., 1993). HSC45-M2 Zellen exprimieren an der Zelloberfläche ein mutiertes E-Cadherin, bei dem das Exon 9 durch In-frame-deletion fehlt (d9-E-Cadherin). Die Expression der d9-E-Cadherin Moleküle beträgt $3,5 \times 10^5$ pro Zelle (Seidenschwang, 2006). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von K. Yanagihara vom National Cancer Center Research Institute, Chuo-ka, Tokyo für die Versuche zur Verfügung gestellt.

3.3.1 Luciferase Transfizierung

Um mit den HSC45-M2 Zellen Biolumineszenz-Versuche durchführen zu können, mussten diese stabil mit dem Gen für Firefly Luciferase transfiziert werden. Das wurde freundlicherweise von D.Saur, II. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar, München, übernommen.

3.3.1.1 Plasmid Konstruktion

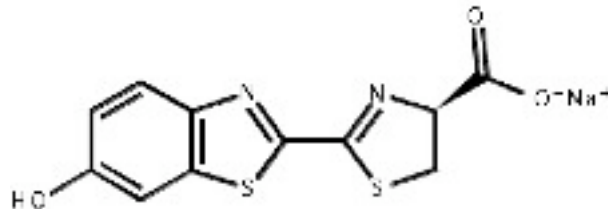
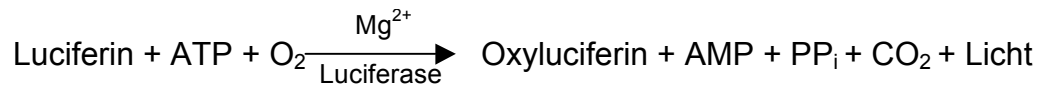
Die kodierende Sequenz der Firefly Luciferase (fLuc) wurde durch Hind III und Xba I Verdau aus pGL3-basic (Promega, Mannheim, Deutschland) herausgeschnitten. Es wurden Blunt Enden erzeugt und die Sequenz wurde in die blunt Xho I site des Plasmids pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ligiert. Die Integrität der geklonten Sequenz (pcDNA3.1-fluc) wurde durch automatisiertes DNA Sequenzieren (GATC, Konstanz, Deutschland) mit Hilfe eines ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) bestätigt.

3.3.1.2 Stabile Transfizierung der HSC-Zellen

HSC45-M2 Zellen wurden unter der Kontrolle des Zytomegalievirus Promoters stabil mit dem Expressions Vektor pcDNA3.1-fluc transfiziert. Zu diesem Zweck wurden konfluente Zellen mit 0,8g pcDNA3.1-fluc, 20µl

Effectene und 6,4µl Enhancer pro Well entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden, Deutschland) in 6-Well Platten inkubiert. HSC45-M2 Zellklone mit stabiler Fluc Expression konnten durch Behandlung mit 800 µl/ml Geneticin selektiert werden.

Die Luciferase transfizierten HSC45-M2-Zellen emittieren nun nach Zugabe von Luciferin (Abb.1), und unter Verbrauch von Sauerstoff und ATP, Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm (Abb.2) nach der Formel:



Strukturformel von *Abb.1:* D-Luciferin-Na-Salz (Molekulare Formel: $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{N}_2\text{NaO}_3\text{S}_2$).

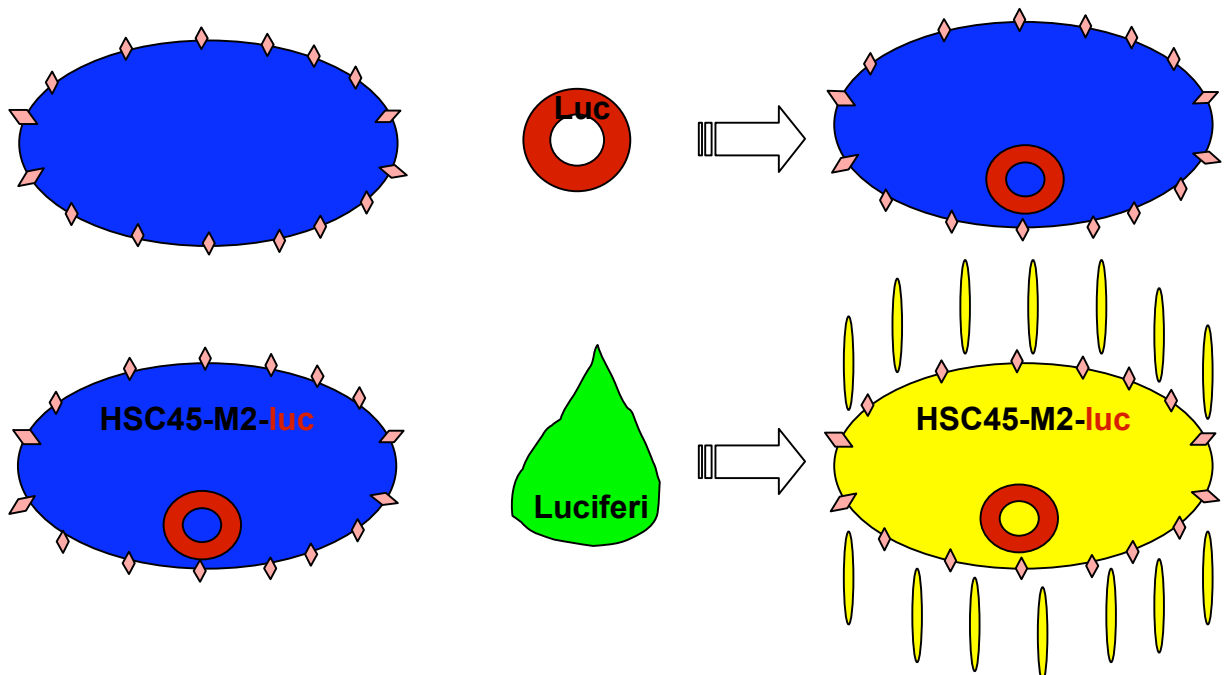


Abb.2: HSC45-M2 Zellen wurden mit dem Gen, das für Firefly Luciferase kodiert, transfiziert; die transfizierten Zellen produzieren nach Zugabe von Luciferin Licht mit einer Wellenlänge von 562nm.

3.3.2 Kultivierung der Zellen

Die HSC45-M2-luc Zellen wurden in Zellkulturflaschen (175cm²) ausgesät mit 500ml Dulbeccos Modified Eagle Medium (D-MEM, 4,5 g/l Glucose), 50ml FKS (fetales Kälberserum), 5ml Penicillin(911.E.)/Streptomycin(91 mg/ml) und Geneticin und bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO₂ gezüchtet.

Im Mittel alle sechs Tage war der gesamte Boden der Zellkulturflasche mit Zellen besetzt (entspricht ca. 1×10^7 Zellen). Die Zellen wurden je nach Bedarf auf zwei bis maximal acht neue Zellkulturflaschen aufgesplittet. Dazu wurde das alte Nährmedium abgesaugt und die Zellen zur Entfernung von abgestorbenen Zellen und Zellbruchstücken mit 5ml PBS gespült. Die Ablösung der Zellen erfolgte nach zehnminütiger Inkubation der Zellen mit 7ml PBS-EDTA im Brutschrank bei 37°C. Während dieser Zeit wurden die neuen Zellkulturflaschen vorbereitet und mit frischem Nährmedium, das zuvor auf 37°C erhitzt wurde, gefüllt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die noch haftenden Zellen durch Beklopfen der Zellkulturflasche vom Flaschenboden gelöst, in Zentrifugenröhrchen überführt und für drei Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0 Haereus). Anschließend wurde der PBS-EDTA Überstand abgesaugt, die Zellen mit Nährmedium resuspendiert und auf die vorbereiteten frischen Zellkulturflaschen verteilt. Sollten die Zellen nicht in Passage gehalten, sondern den Versuchstieren injiziert werden, wurden sie nicht mit dem üblichen Nährmedium, sondern mit reinem, FKS freien, D-MEM resuspendiert.

Die für die *In-vitro*- und *In-vivo*-Versuche nötige Bestimmung der Zellzahl wurde mit einem Zellzählgerät (CASY1, Schärfe Systems) durchgeführt. Dafür wurden die Zellsuspensionen zwischen 1:200 und 1:5000 verdünnt.

Alle Arbeiten an den Zellen wurden unter möglichst sterilen Bedingungen unter einer LaminAir HN 2472 flow bank (Haereus) durchgeführt. Alle dazu verwendeten Instrumente wurden vor und nach Benutzung mit Ethanol desinfiziert.

Gelegentlich zeigte das Nährmedium schon vor der normalen Passagezeit von etwa sechs Tagen durch Farbumschlag von rot nach gelb die Anreicherung saurer Stoffwechselmetaboliten an. In diesem Fall wurden die

Zellen schon zu einem frühen Zeitpunkt gesplittet oder nur das alte Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt.

3.4 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden weibliche Swiss nu/nu Nacktmäuse verwendet. Diese wurden aus einer pathogenfreien Zucht (Charles River, Frankreich) bezogen und hatten bei Eintreffen ein Alter zwischen 5 und 7 Wochen. Die Versuche mit den Tieren begannen frühestens zwei Wochen nach Einstellung.

Die Nacktmäuse weisen eine Thymushypoplasie auf und bilden somit kaum T-Zellen. Somit fehlt ihnen das zelluläre Immunsystem. Auch das humorale Immunsystem ist stark supprimiert. Aus diesem Grund können Nacktmäuse humane Tumoren nicht abstoßen und eignen sich deshalb gut zur Xenotransplantation solcher Tumoren. Ein weiterer Vorteil der Nacktmäuse besteht darin, dass sie sich aufgrund des fehlenden Fells für Biolumineszenz-Aufnahmen wesentlich besser eignen als Fellmäuse, bei denen es durch die Behaarung zu einer starken Abschirmung des entstehenden Lichtes kommt, so dass diese vor Biolumineszenz-Aufnahmen rasiert werden müssen.

3.4.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in einem auf 26°C temperierten Tierstall mit speziellem Lichtprogramm und 50-60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Jeweils 3 – 6 Tiere teilten sich einen Käfig, wobei später auf eine strikte Trennung von Tieren der Kontroll- und Therapiegruppe geachtet wurde. Mäuse, die Radioaktivität injiziert bekamen, wurden gegenüber den anderen Tieren im Stall mit Bleiplatten abgeschirmt. Die Tiere bekamen Mäusestandardfutter Altromin 1314 und Leitungswasser nach Belieben.

Im Umgang mit den Mäusen wurde auf weitgehende Sterilität geachtet und alle wichtigen Hygienemaßnahmen eingehalten. Alle Arbeitsflächen wurden vor und nach Benutzung mit Ethanol desinfiziert. Die Käfige wurden im Mittel alle 4 Tage ausgetauscht und gereinigt.

Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes. Die Versuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt (Az.: 55.2-1-54-2531-34-02).

3.4.2 Anästhesie

Zur Durchführung von Biolumineszenz-Aufnahmen war es nötig, die Mäuse zu narkotisieren. Dazu wurde ein Gemisch aus 8% Rompun® (2% Xylazinhydrochlorid), 10% Ketavet® (100mg/ml Ketaminhydrochlorid) und 82% physiologischer Kochsalzlösung verwendet. Pro Narkose wurden 200µl dieses Gemisches intraperitoneal (i.p.) injiziert, in Einzelfällen mussten bei Nachlassen der Narkosetiefe kleine Mengen nachgespritzt werden. Die Wirkung trat nach einer bis drei Minuten ein und hielt im Mittel für 22 Minuten an. Die Narkose war nicht antagonistisch. Um eine Auskühlung der Tiere zu verhindern, wurden sie für die Dauer der Narkose in eine Wärmekammer mit 37°C gelegt. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurde die Augensalbe Vidisic® aufgetragen. Für einige Vorversuche zur Evaluierung der Methode war nur eine Kurznarkose mit Äther nötig, für die die Tiere kurz in ein geschlossenes, Äther enthaltendes Glasgefäß gelegt wurden.

3.4.3 Tötung und Sektion

Die Tötung der Tiere erfolgte bei ausgedehntem Tumorbefall oder reduziertem Allgemeinzustand. Dazu wurden sie mit CO₂ betäubt, nach Eintritt des Atemstillstandes wurde ihr Brustkorb eröffnet und die Aorta durchtrennt.

Zur Erfassung der Tumorausbreitung wurden alle Mäuse, denen Tumorzellen injiziert wurden, seziiert. Dazu wurde die Bauchdecke vorsichtig abpräpariert und nach Inspektion des Peritoneums und der Bauchhöhle wurden die Bauchorgane entnommen. Anschließend wurde der Rest des Bauchraums einschließlich Zwerchfell begutachtet. Je nach Tumorbefall wurden einzelne Organe in 4%igem Formalin fixiert. Die toten Tiere wurden ordnungsgemäß und nach den Regeln des Strahlenschutzes entsorgt.

3.5 Vorbereitungen zur ^{213}Bi -Radioimmuntherapie

Für die ^{213}Bi -Radioimmuntherapie eines diffusen Magenkarzinoms mit mutiertem d9-E-Cadherin steht ein Antikörper zur Verfügung, der spezifisch an diese Mutation bindet. ^{213}Bi muss aus dem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator gewonnen und über ein Chelat an diesen Antikörper gekoppelt werden.

3.5.1 d9MAb

Als Antikörper für die α -Radioimmuntherapie wurde in dieser Studie d9MAb verwendet, der spezifisch an eine mutierte Form des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin bindet, bei der das Exon 9 deletiert ist (d9-E-Cadherin).

D9MAb ist ein monoklonaler Antikörper, hergestellt in Lou/C Ratten (Klon 6H8, IgG2a), der spezifisch an HSC45-M2 Zellen bindet, die d9-E-Cadherin exprimieren. Er bindet nicht an Wildtyp E-Cadherin. Der Antikörper d9MAb wurde am Institut für Pathologie der GSF entwickelt und von K.-F. Becker zur Verfügung gestellt (Becker et al., 1999).

Die Kopplung von metallischem ^{213}Bi an d9MAb erfolgt über einen geeigneten Chelator. Dabei soll die Chelatierung weder Pharmakokinetik noch Bindung des Antikörpers negativ beeinflussen.

Ein erfolgreich eingesetzter Chelator zur Kopplung von ^{213}Bi an den Antikörper ist CHX-A⁻-DTPA. Die Bindung von CHX-A⁻-DTPA an den Antikörper erfolgt in basischem, metallfreiem Milieu (pH 8,7) bei Raumtemperatur (Nikula et al., 1995). Die Markierung des chelatierten d9MAb mit ^{213}Bi sollte aufgrund der kurzen Halbwertszeit des α -Emitters ($t_{1/2}=46$ min) schnell erfolgen. Der Chelator CHX-A⁻-DTPA erfüllt auch diese Voraussetzung (Nikula et al., 1995). Mit CHX-A⁻-DTPA gekoppelten Antikörper lassen sich nach Chelatierung mit ^{213}Bi spezifische Aktivitäten bis zu 1,1 GBq/mg erzielen (Nikula et al., 1999). Mit anderen Chelatoren, wie zum Beispiel DOTA lassen sich noch bessere Stabilitäten erreichen (Camera et al., 1994). Da jedoch für eine rasche Kopplung an DOTA Temperaturen $\geq 60^\circ\text{C}$ benötigt werden, ist die Verwendung von DOTA für Antikörper limitiert.

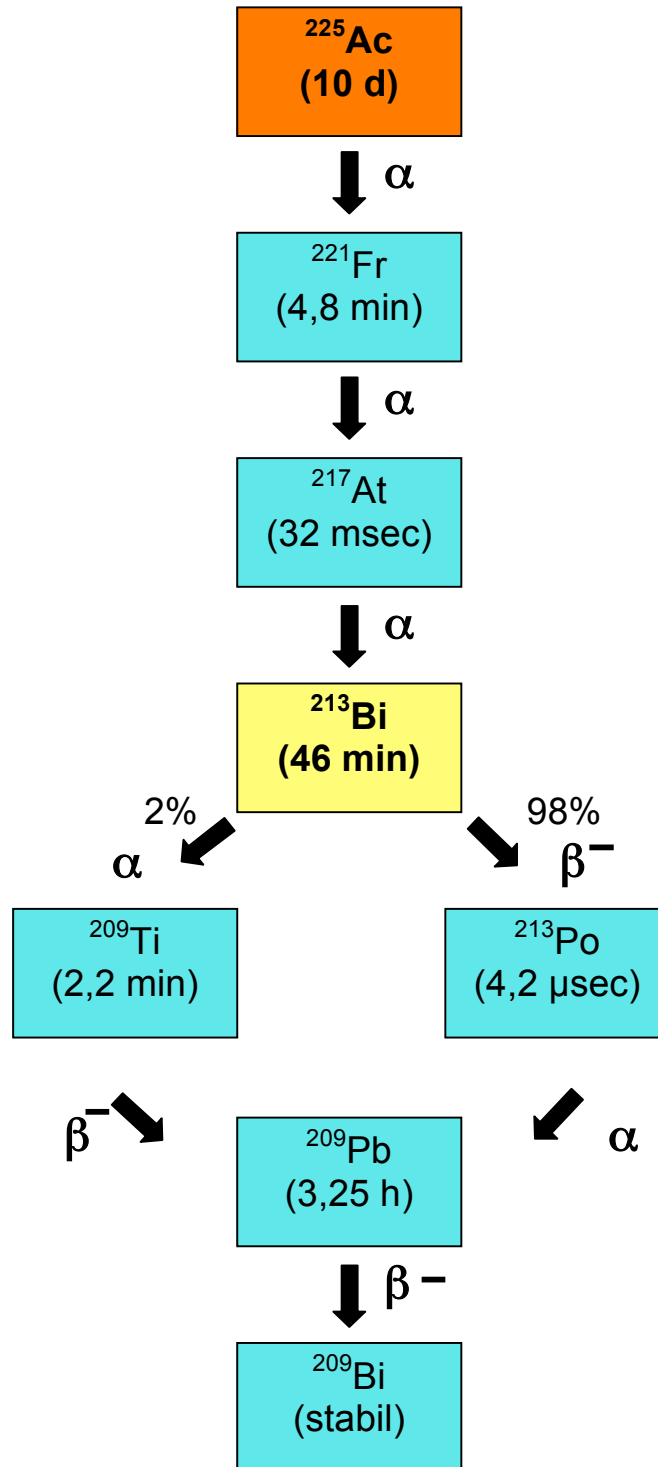


Abb. 3:
Zerfall von ^{225}Ac

3.5.2 Wismut-213 (^{213}Bi)

^{213}Bi entsteht beim Zerfall von ^{225}Ac zu stabilem ^{209}Bi (Abb.3). Mit einer Halbwertszeit von 45,6 min zerfällt ^{213}Bi zu 98% unter Elektronenabgabe (β^- -Zerfall) zu ^{213}Po , welches unmittelbar (Halbwertszeit 4,2 μs) zu ^{209}Pb zerfällt. Dabei werden α -Partikel mit einer Energie von 8,54 MeV emittiert. Diese α -Strahlung hat eine Reichweite von circa 80 μm in Gewebe und einen daraus resultierenden hohen linearen Energietransfer von etwa 100 keV/ μm (Nikula et al., 1999).

2% des ^{213}Bi zerfallen unter Emission von α -Partikeln zunächst zu ^{209}Ti und anschließend unter β^- -Emission zu ^{209}Pb . ^{209}Pb wandelt sich mit einer Halbwertszeit von 3,25 h unter β^- -Emission zu ^{209}Bi um.

Beim Zerfall von ^{213}Bi wird auch γ -Strahlung mit einem Energiemaximum von 440keV emittiert. Diese γ -Linie wird zur Detektion und Quantifizierung von ^{213}Bi im γ -Counter genutzt.

3.5.3 $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator

Das zur Markierung von d9MAb benötigte ^{213}Bi wurde aus einem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generator gewonnen, der vom Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe zur Verfügung gestellt wurde.

Zur Herstellung des $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ -Generators wird ^{225}Ac -Nitrat (ca. 740 MBq) an AGMP-50 Kationen-Austauscherharz angelagert und in eine Fluorpolymer Säule (5,5 cm, r = 3,2 mm) überführt (Apostolidis et al., 2005).

3.5.4 Radionuklidmarkierung von d9MAb

Zur Gewinnung von ^{213}Bi wird der Generator zunächst für 2 min mit einem Gemisch aus 300 μl 0,1 M HCl und 300 μl 0,1 M NaI inkubiert. Das als $\text{Bi}_4^-/\text{Bi}_5^{2-}$ eluierte ^{213}Bi wird mit ca. 100 μg chelatiertem Antikörper nach Zugabe von 100 μl 3M Ammoniumazetat ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) (zur Pufferung, pH-Wert 5,5) und 100 μl 4%iger Ascorbinsäure (zum Schutz vor Radiolyse) für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abtrennung von freiem ^{213}Bi wird das Reaktionsgemisch anschließend über eine PBS gespülte PD 10 Gelfiltrationssäule (Amersham) gereinigt. Die Bindung von ^{213}Bi an den Antikörper wird vor und nach Reinigung über die Säule mittels Papierchromatographie (ITLC SG Papier) mit TriNaCitrat (pH5,5) als

Laufmittel und Messung im γ -Counter überprüft. Bei einem Anteil von gebundenem ^{213}Bi über 90% konnte das Produkt für die Versuche verwendet werden.

Der Generator kann circa zweieinhalb Stunden nach Eluierung erneut benutzt werden, da zu diesem Zeitpunkt bereits wieder 90% des maximal verfügbaren ^{213}Bi vorliegen. Fünf Stunden nach Nutzung ist das radioaktive Gleichgewicht zwischen ^{225}Ac und ^{213}Bi erreicht und es kann die maximale Menge an verfügbarem ^{213}Bi eluiert werden.

3.6 Biolumineszenz Imaging

3.6.1 Versuchsaufbau und Vorbereitungen

Für die Biolumineszenz-Aufnahmen wurde eine auf -60°C gekühlte, digitale Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (Hamamatsu ORCA II-ER) mit Bildverstärkereinheit (Hamamatsu) verwendet. Diese ist hoch auflösend (1024 x 1024 Pixel) und bietet über das Spektrum von 350nm bis 850nm einen sehr hohen Quantenwirkungsgrad von bis zu 72% bei sehr geringem Hintergrundrauschen und ist damit für Firefly Luciferase Biolumineszenz Imaging bestens geeignet (Abb.4). Die Kamera ist auf einer Dunkelkammer angebracht, in die, auf einer zuvor festgelegten Einschubhöhe, die zu untersuchenden Objekte gelegt wurden. Die Dunkelkammer ist mit einer verstellbaren Lichtquelle ausgestattet, wodurch Aufnahmen bei gedimmtem Licht ermöglicht werden. Die Kamera gestattet Aufnahmen mit verschiedenen Belichtungszeiten, die je nach Versuch variiert wurden. Bei dem Bildverstärker kann zwischen verschiedenen Verstärkungsstufen (Gain) gewählt werden. Für diese Studie wurde für Aufnahmen bei gedimmtem Licht eine Verstärkung von 500 Gain, für Aufnahmen ohne externe Lichtquelle eine Verstärkung von 700 Gain festgelegt. Zur Bildbearbeitung ist die Kamera mit einem Windows (Microsoft) Rechner verbunden (Abb.5). Zur Bearbeitung und Auswertung der Aufnahmen wurde die Simple PCI Software (Hamamatsu) verwendet.

Das für die Versuche benötigte D-Luciferin Natriumsalz (SYNCHEM) wurde in sterilem Wasser gelöst (15mg/ml), filtersterilisiert, portioniert, eingefroren

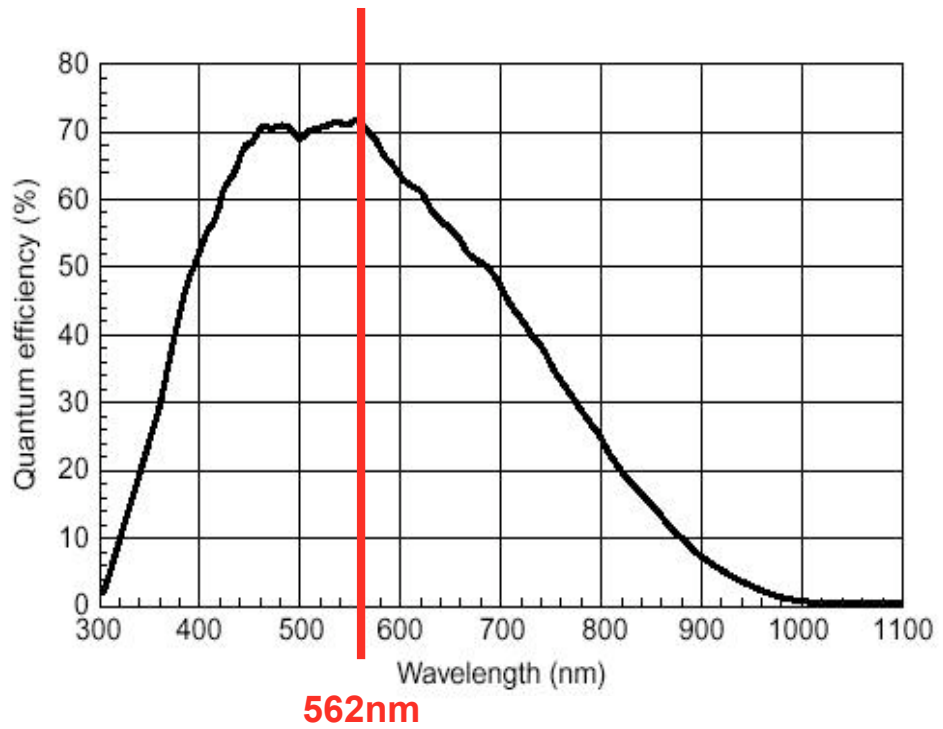


Abb.4:
Quantenausbeute der CCD-Kamera in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Das bei der Luciferase-Luciferin Reaktion entstehende Licht hat eine Wellenlänge von 562nm und liegt somit im Wellenlängenbereich, in dem die Kamera die größte Quantenausbeute hat (Hamamatsu, Herrsching).

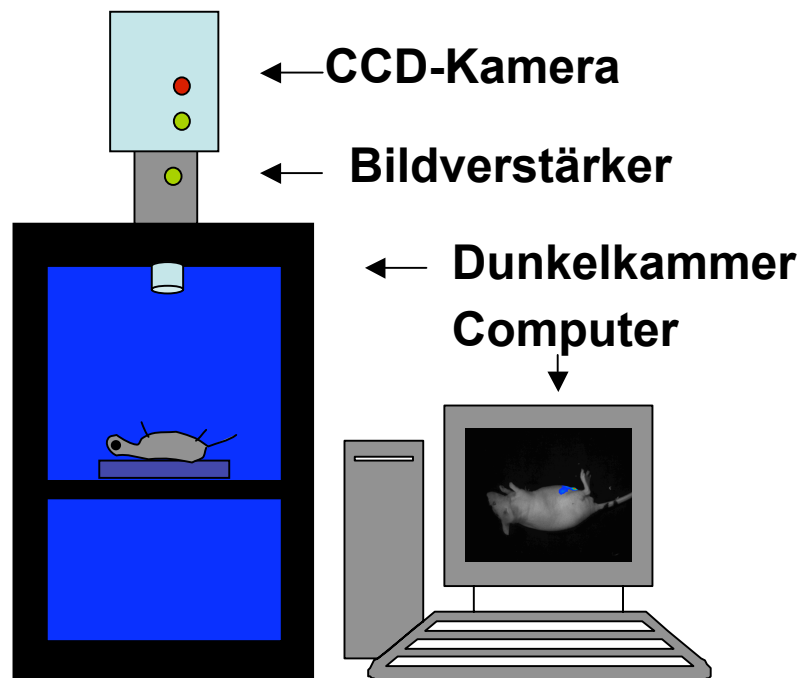


Abb.5:
Versuchsaufbau für die Biolumineszenz Aufnahmen

und bei - 70°C gelagert. Die je nach Versuch benötigte Menge wurde jeweils kurz vor dem Versuch aufgetaut und auf Körpertemperatur erwärmt. Die aufgetaute D-Luciferin Lösung wurde bis zur Verwendung lichtgeschützt gelagert.

3.6.2 Durchführung von *In-vitro*-Aufnahmen

Zur Quantifizierung von Zellproliferation bzw. Regression nach Inkubation mit ^{213}Bi -d9MAb wurden von den mit HSC45-M2-luc Zellen in verschiedenen Konzentrationen befüllten 96-Well-Platten Biolumineszenz-Aufnahmen durchgeführt.

Jede Platte wurde einzeln untersucht und bis zum Versuchsbeginn im Brutschrank belassen. Nach Entnehmen der jeweiligen Platte aus dem Brutschrank wurde in jedes mit HSC45-M2-luc Zellen gefülltes Well 10µl D-Luciferin Lösung pipetiert. Danach wurde die Platte in der Dunkelkammer auf einer zuvor festgelegten und für jede Platte gleichen Stelle positioniert. Zunächst wurde die Platte mit einer Belichtungszeit von 0,15 s bei gedimmtem Licht aufgenommen. Fünf Minuten nach Zugabe der D-Luciferin-Lösung konnten die Biolumineszenz-Aufnahmen durchgeführt werden. Dazu wurde das Licht in der Dunkelkammer ausgeschaltet und die Belichtungszeit erhöht. Bei 1×10^5 Zellen pro Well wurden Belichtungszeiten von 15 s, 30 s und 60 s benützt. Bei 1×10^3 und 1×10^4 Zellen pro Well waren die Belichtungszeiten 30 s, 60 s und 90 s und bei 1×10^2 Zellen pro Well 30 s, 60 s, 90 s und 120 s (Abb.6).

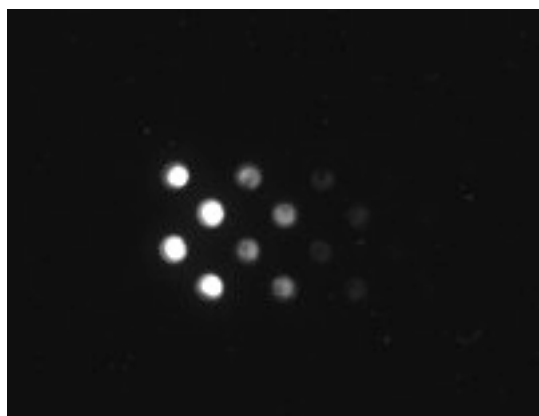


Abb.6:
Biolumineszenz-Aufnahme einer 96-Well-Platte mit einer Belichtungszeit von 60 s. Es wurden jeweils vier Well mit 1×10^5 (links), 1×10^4 (Mitte) und 1×10^3 Zellen pro Well gefüllt.

Nach Beendigung der Aufnahmen wurde das D-Luciferin enthaltende Zellkulturmedium abgesaugt, durch frisches Medium ersetzt und die Platte zurück in den Brutschrank gestellt.

3.6.3 Durchführung von *In-vivo*-Aufnahmen

Zum Nachweis von intraperitonealem Tumorwachstum, Ausbreitung oder Rückgang nach lokoregionaler ^{213}Bi -Radioimmuntherapie *in vivo* wurden Biolumineszenz-Aufnahmen von Nacktmäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach intraperitonealer Injektion von Tumorzellen durchgeführt.

In eine Insulinspritze wurden 300 μl der D-Luciferin Lösung sowie 200 μl des Rompun-Ketamin-Gemisches aufgezogen. Das Narkose-Luciferin-Gemisch wurde dem Tier i.p. gespritzt. Daraufhin wurde das Tier in eine Wärmekammer gelegt, um eine Auskühlung während der Narkose zu verhindern. Circa neun Minuten nach Injektion wurde das Tier auf einem Gelkissen gelagert und auf einer bestimmten Einschubhöhe in stets gleicher Position in die Dunkelkammer gelegt. Genau zehn Minuten nach Injektion des Luciferin-Narkose-Gemisches konnte mit den Biolumineszenz-Aufnahmen begonnen werden. Die Tiere wurden in Rückenlage, Bauchlage und in rechter und linker Seitenlage aufgenommen. In jeder dieser Positionen wurde zunächst eine Aufnahme bei gedimmtem Licht und einer Belichtungszeit von 0,15 s durchgeführt (Abb.7). Direkt im Anschluss wurde das Licht in der Dunkelkammer ausgeschaltet und Biolumineszenz-Aufnahmen mit Belichtungszeiten von 2 s und 30 s durchgeführt (Abb.8). Zum Nachweis von sehr kleinen Tumoren wurde in Einzelfällen zusätzlich noch eine Aufnahme mit einer Belichtungszeit von 60s durchgeführt.

Nach Beendigung der Aufnahmen wurden die Tiere wieder in die Wärmekammer gesetzt, bis sie sich vollständig von der Narkose erholt hatten.

Einzelne Tiere mit weit fortgeschrittenen Tumoren oder schlechtem Allgemeinzustand wurden direkt nach der letzten Biolumineszenz-Aufnahme getötet. In diesen Fällen wurde zunächst Aszites punktiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Der Aszites wurde auf die festgelegte Position in der Dunkelkammer gelegt und zunächst bei gedimmtem Licht und einer Belichtungszeit von 0,15 s aufgenommen. Fünf Minuten nach Zugabe von

Luciferin wurden dann Biolumineszenz-Aufnahmen im Dunkeln mit Belichtungszeiten von 10 s und 30 s durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zählung der Zellen im Aszites.

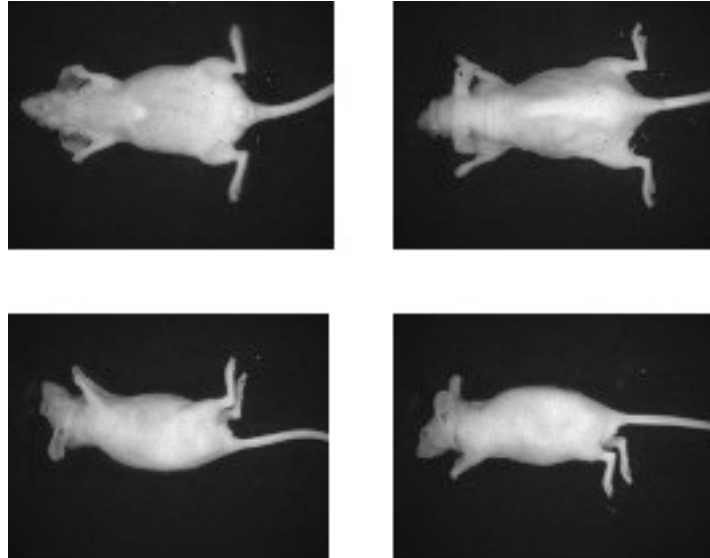


Abb.7:
Photographische Aufnahmen einer Maus in Rückenlage, Bauchlage, linker und rechter Seitenlage bei gedimmtem Licht mit einer Belichtungszeit von 0,15 s.

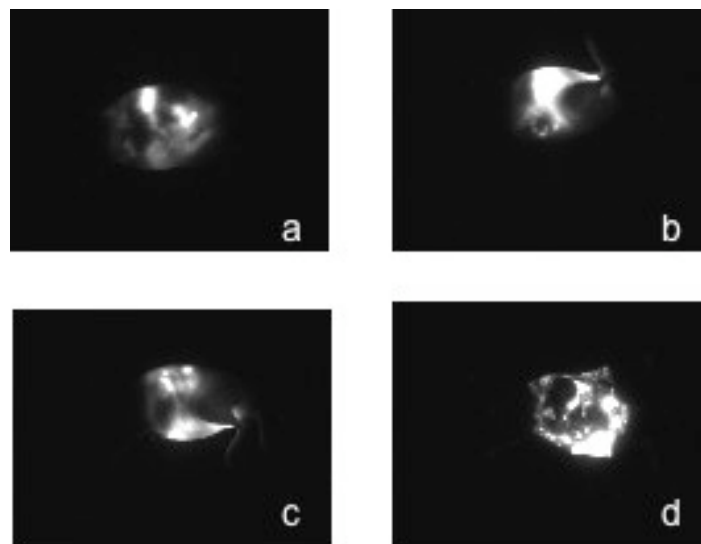


Abb.8:
Biolumineszenz Aufnahmen mit einer Belichtungszeit von 30 s: Aufnahmen von Mäusen in Rückenlage (a), linker Seitenlage (b), rechter Seitenlage (c) und Post-mortem-Aufnahme einer Maus mit abpräparierter Bauchwand (d).

Nach den Aufnahmen des Aszites wurde die Bauchdecke der Tiere abpräpariert und das Tier so in Rückenlage auf dem Gelkissen plziert. Daraufhin wurden Aufnahmen bei gedimmtem Licht sowie im Dunklen, wie oben beschrieben, durchgeführt.

Nach diesen Aufnahmen wurden einzelne Organe (Darm, Leber, Milz, Pankreas, Bauchfell) entnommen und auf einem schwarzen Karton angeordnet. Dieser wurde in die Dunkelkammer gelegt und ebenfalls bei gedimmtem Licht mit einer Belichtungszeit von 0,15 s, und bei ausgeschaltetem Licht und Belichtungszeiten von 2 s und 30 s aufgenommen.

Die getöteten Tiere sowie die entnommen Organe wurden im Anschluss ordnungsgemäß mit Formalin fixiert oder entsorgt.

Nach Beendigung einer Aufnahmeserie wurden die gewonnenen Bilder bearbeitet. Das ist besonders bei *In-vivo*-Aufnahmen hilfreich, um Aussagen über Tumorentwicklung und Tumorverteilung treffen zu können. Bei *In-vitro*-Aufnahmen ist die Bearbeitung oft wenig aussagekräftig und wurde deshalb nicht bei allen Aufnahmen durchgeführt.

Zur Bearbeitung wurden, mit Hilfe der Hamamatsu Simple PCI Software, die bei gedimmtem Licht aufgenommenen Bilder mit der dazugehörigen Biolumineszenz Aufnahme überlagert, so dass, am Beispiel einer *In-vivo*-Aufnahme, die registrierte Lichtintensität auf dem Körper der Maus sichtbar wird. Dadurch können unter Berücksichtigung der Aufnahmen in verschiedenen Positionen dieser Maus und durch den Vergleich mit früheren Aufnahmen bereits Tumorverteilung sowie Tumorentwicklung beurteilt werden. Um auch die Lichtintensität zu bewerten, und damit einen Rückschluß auf die vertikale Tumordicke beziehungsweise die Tumordichte ziehen zu können, wurde die registrierte Lichtintensität ebenfalls mit der Hamamatsu Simple PCI Software in Pseudocolors umgewandelt (Abb.9). Bereiche mit sehr hoher Lichtintensität, also sehr vielen Tumorzellen, wurden rot dargestellt, Bereiche mit mittlerer Lichtintensität grün, und Bereiche mit geringer Lichtintensität blau. Die Übergänge sind dabei fließend, es wird das ganze Farbspektrum von Rot nach Blau abgedeckt. Das ermöglicht eine sehr gute Beurteilung der Tumorentwicklung im Zeitverlauf.

Bei den *In-vitro*-Aufnahmen läuft die Bildbearbeitung identisch zu den *In-vivo*-Aufnahmen ab, ist jedoch auf Grund der kleinen Zellzahlen, die in diesen Versuchen verwendet wurden, nicht sehr aussagekräftig.

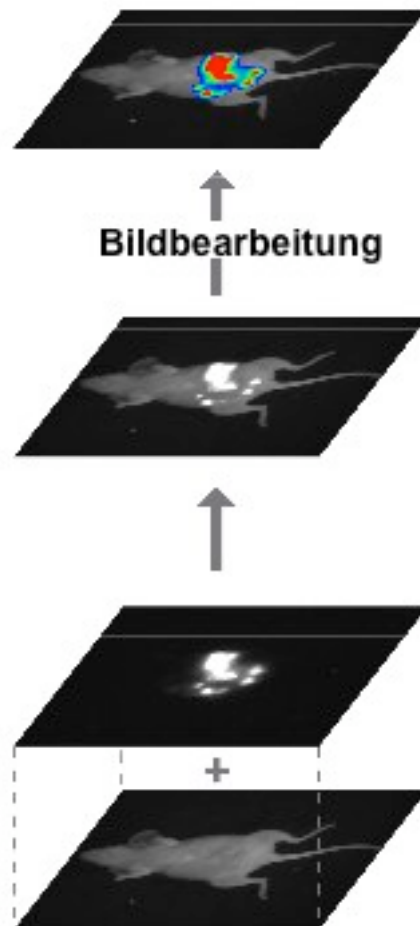


Abb.9:
Die photographische Aufnahme einer Maus wird mit der dazugehörigen Biolumineszenz-Aufnahme überlagert. Zur Veranschaulichung der Tumorgroße wird das entstandene Bild weiter bearbeitet und das Licht in Pseudocolors umgewandelt.

3.7 *In-vitro*-Versuche

3.7.1 Vorbereitungen

Für die *In-vitro*-Versuche wurden HSC45-M2-luc Zellen abgelöst, mit dem Zellzählgerät (CASY1, Schärfe Systems) gezählt und durch Verdünnungsreihen auf die gewünschte Zellzahl gebracht. Es wurden 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 Zellen, jeweils in 200 μ l Medium pro Well in schwarze 96-Well-Platten mit durchsichtigem Boden (μ Clear-Plate, Greiner Bio-one) ausgesät. Diese speziellen Platten wurden gewählt, weil sie sowohl Biolumineszenz-Aufnahmen als auch eine mikroskopische Auszählung ermöglichen. Um bei den Biolumineszenz-Aufnahmen eine Überlappung der Lichteffekte zu vermeiden, wurden auf jeder Platte nur 16 der 96 Wells nach einem bestimmten Schema (Abb.10) mit Zellen besät. Alle anderen Wells wurden mit Zellkulturmedium gefüllt, so dass mit Zellen gefüllte Wells nicht direkt nebeneinander lagen.

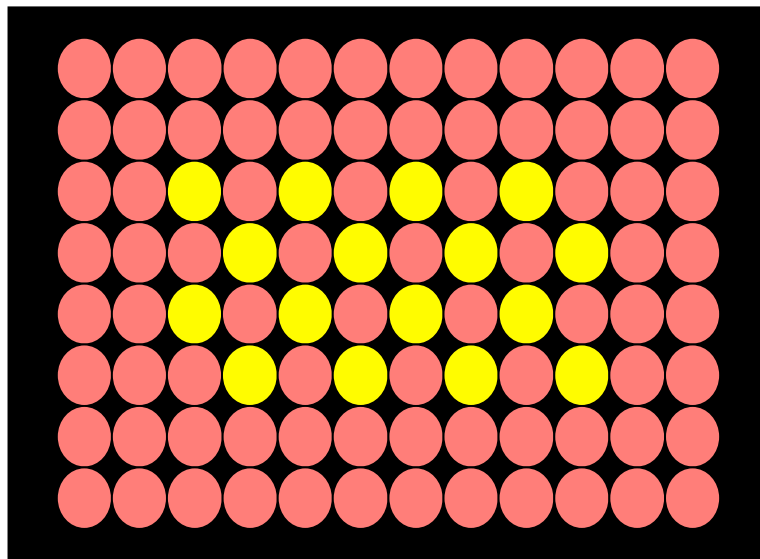


Abb10:

Schematische Darstellung einer besäten 96-Well-Platte: Nur 16 (gelb) von 96 Wells wurden mit Zellen besät, um bei den Biolumineszenz-Aufnahmen eine Überlappung von Lichteffekten zu vermeiden.

Um in den Biolumineszenz-Aufnahmen die verschiedenen Lichtintensitäten der verschiedenen Zellzahlen in einem Bild zeigen zu können, wurden auch

einige Platten mit 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 Zellen pro Well besät. Dabei wurden jeweils 4 Wells mit einer der Zellzahlen besät.

Alle Platten wurden im Brutschrank bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO_2 aufbewahrt und nur für die Dauer der Versuche entnommen.

3.7.2 Inkubation mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$

Die besäten Platten wurden für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurde jeweils die Hälfte der identisch besäten Platten mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ inkubiert, die andere Hälfte wurde zur Kontrolle mit Kochsalz behandelt. Für die ^{213}Bi Inkubation wurden $15\mu\text{l}$ $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ ($0,2 \text{ MBq/Well} = 0,2\text{MBq}/215\mu\text{l}$) jedem Well mit Zellen zugegeben, bei den Kontrollplatten entsprechend $15\mu\text{l}$ physiologische Kochsalzlösung ($0,9\% \text{ NaCl}$). Anschließend wurden die Platten wieder in den Brutschrank gebracht, wobei Therapie- und Kontrollplatten in getrennten Brutschränken aufbewahrt oder zur Abschirmung zumindest durch Bleielemente voneinander getrennt wurden.

3.7.3 Auswertung

Die Auswertung der *In-vitro*-Versuche erfolgte fünf Tage nach Behandlung der 96-Well-Platten mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ ($0,2 \text{ MBq/Well}$) bzw. Kochsalz. Bei den Platten mit 1×10^2 Zellen pro Well wurde zur Quantifizierung der Zellzahlentwicklung ein klonogener Assay durchgeführt. Alle anderen Platten wurden mittels Biolumineszenz Imaging auf Zellwachstum beziehungsweise Zelluntergang untersucht.

3.7.3.1 Klonogener Assay

Die mit 100 (1×10^2) HSC45-M2-luc Zellen besäten 96-Well Platten wurden nach sechstägiger Inkubationszeit (= fünf Tage nach Therapie) im Brutschrank mikroskopisch ausgezählt. Dabei wurde die Anzahl der pro Well gewachsenen Zellklone ermittelt. Als Kontrolle dienten die unbehandelten 96-Well Platten (100 Zellen/Well).

3.7.3.2 Biolumineszenz Imaging

Die Platten mit 1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 Zellen wurden nur mit Biolumineszenz Imaging ausgewertet, da eine Auswertung mit klonogenem Assay bei diesen Zellzahlen in 96-Well-Platten nicht mehr möglich ist.

Sechs Tage nachdem die Zellen ausgesät waren, wurden zu den Platten die Lichtintensitäten bestimmt. Mit Hilfe der Simple PCI Software (Hamamatsu) wurden ROIs (Regions of interest) über das Zentrum jedes mit Zellen besäten Wells gelegt (ROI Größe: 68 Pixel; Bild Größe: 1024x1024 Pixel). In diesen ROIs wird von der Simple PCI Software die jeweilige Lichtintensität („total grey level intensity“) ermittelt und angezeigt. Als Kontrolle dienten wiederum die unbehandelten 96-Well Platten. Zur Auswertung wurde der durchschnittliche Wert der Lichtintensitäten der unbehandelten Platten mit dem der mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ therapierten Platten verglichen (Abb.11).

Um auch den Verlauf des Zellwachstums beziehungsweise der Zellregression innerhalb ein und der selben Platte verfolgen zu können, wurden einige Platten direkt vor der Therapie mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$, und einen, drei und fünf Tagen nach der Therapie aufgenommen.

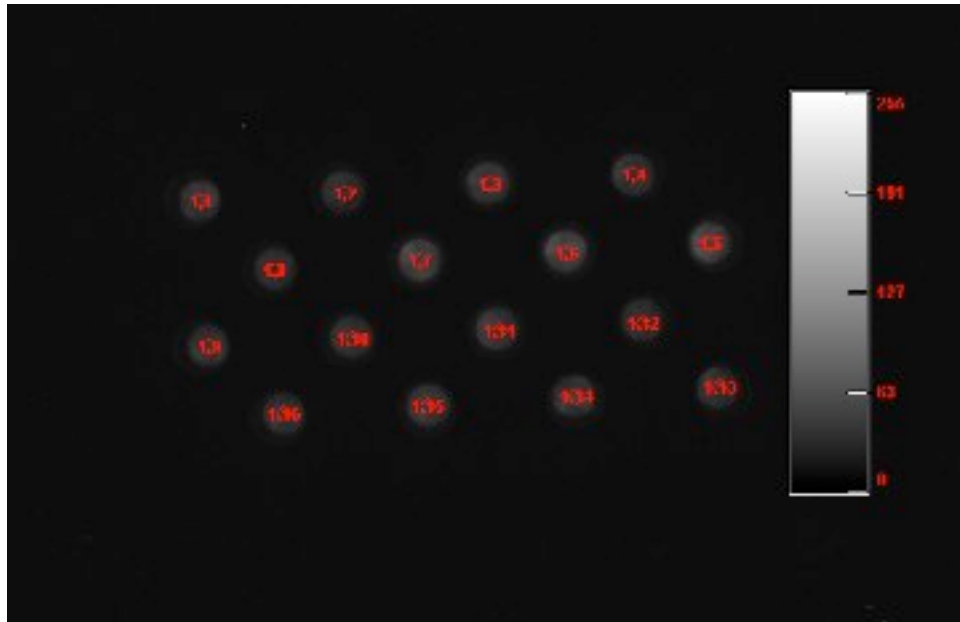


Abb.11:

96-Well Platte mit 1×10^4 HSC45-M2-luc Tumorzellen pro gefülltem Well. Über dem Zentrum jedes gefüllten Wells wurde die Lichtintensität in einem ROI (○) gemessen. Um die Auswertung zu erleichtern, wurden die ROIs nummeriert. (Skala: Lichtintensität/Pixel nach Angaben des Herstellers, Hamamatsu, Herrsching)

3.8 Tierexperimente

3.8.1 Tumorzellinjektion

Um die Tumorentwicklung in einem Mausmodell mittels Biolumineszenz Imaging verfolgen zu können, wurden Nacktmäusen HSC45-M2-luc Tumorzellen injiziert. Dazu wurden drei verschiedene Injektionslokalisationen, und zwar subkutan, intravenös und intraperitoneal, gewählt. Die dafür benötigten Zellen wurden aus mehreren Zellkulturflaschen abgelöst. Durch dreimaliges Zentrifugieren der Zellen in FKS-freiem Medium wurden Zellbruchstücke und Reste von EDTA und FKS entfernt. Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellzählers (CASY1, Schärfe Systems) gezählt und auf die jeweils zu injizierende Zellzahl verdünnt. Injiziert wurden die Zellen in reinem Zellkulturmedium (D-MEM) ohne weitere Zusätze. Um auf eventuell auftretende Komplikationen aufgrund der Zellinjektion schnell reagieren zu können, wurden die Mäuse nach der Tumorzellinjektion engmaschig überwacht.

3.8.1.1 Subkutane (s.c.) Injektion

Um zu testen, ob Biolumineszenz Imaging zur Verlaufsbeobachtung von Tumorstadium in Nacktmäusen geeignet ist, wurden mehreren Mäusen HSC45-M2-luc Zellen subkutan in beide Flanken injiziert. In die linke Flanke wurden 1×10^6 , in die rechte Flanke 2×10^6 HSC45-M2-luc Zellen, jeweils in 100 μ l reinem Zellkulturmedium, injiziert. Da die Tumorzellen somit direkt unter der Haut lagen und das entstehende Licht damit nur geringfügig abgeschirmt wurde, erschien dieses Modell als besonders geeignet für erste Versuche zum Biolumineszenz Imaging.

3.8.1.2 Intravenöse (i.v.) Injektion

Zwei Swiss nu/nu Nacktmäusen wurden jeweils 1×10^6 HSC45-M2-luc Zellen intravenös gespritzt. Die Zellen wurden dazu nicht wie bei den anderen Tumormodellen in Zellkulturmedium, sondern in PBS suspendiert. Auch wurden die Zellen vorsichtshalber mit Trypsin EDTA abgelöst und fünfmal mit PBS gewaschen, um alle potenziell für die Mäuse schädlichen Stoffe sicher zu entfernen.

Um direkt nach Injektion der Zellen erste Biolumineszenz-Aufnahmen machen zu können, wurde gleichzeitig mit den HSC45-M2-luc Zellen (1×10^6 Zellen in 200 μ l PBS) 100 μ l Luciferin (15mg/ml) injiziert.

Die Injektion des Gemisches aus Zellen und Luciferin erfolgte in die Schwanzvene. Dazu wurden die Mäuse mit Hilfe eines in Äther getränkten Papiertuches in eine Kurznarkose versetzt. Um eine bessere Durchblutung der Vene zu erreichen und damit die Injektion zu erleichtern, wurde der Schwanz der Maus in heißem Wasser erwärmt.

3.8.1.3 Intraperitoneale (i.p.) Injektion

Zum Nachweis der Entwicklung einer Peritonealkarzinose sowie deren Regression nach ^{213}Bi -d9MAb Radioimmuntherapie wurden zwölf Mäusen 1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen intraperitoneal injiziert.

Ziel war es, eine möglichst homogene Verteilung der Zellen im Bauchraum zu erreichen. Die Zellen wurden in 0,5 ml reinem Medium langsam in die Peritonealhöhle injiziert. Der Einstich erfolgte dabei auf der Linea alba, kaudal des Nabels in einem Winkel zwischen 30° und 45° , um die Leber und die anderen Bauchorgane zu schonen.

3.8.2 ^{213}Bi - Radioimmuntherapie

Sechs der zwölf intraperitoneal injizierten Mäuse wurden am Tag 8 nach Tumorzellinokulation mit 2,7 MBq ^{213}Bi -d9MAb therapiert. Die Injektion erfolgte, wie die Tumorzellinokulation, in der Linea alba, kaudal des Nabels in einem Winkel zwischen 30° und 45° .

Tag acht nach Tumorzellinokulation wurde für die Therapie gewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt in der Regel schon eine Peritonealkarzinose entwickelt hatte. So kann man mittels Biolumineszenz Imaging einen Therapieerfolg anhand des Rückgangs der Tumormasse nachweisen. Zu einem späteren Zeitpunkt ist die Peritonealkarzinose unter Umständen schon so stark ausgeprägt, dass die Therapie keinen Erfolg mehr zeigen würde. Zu einem früheren Zeitpunkt wären die Tumorzellen durch die Radioimmuntherapie eventuell komplett abgetötet, so dass mit Biolumineszenz Imaging kein Tumor mehr nachgewiesen werden könnte. Es zeigte sich in einer Studie unsere Arbeitsgruppe, dass mit einer ^{213}Bi -d9MAb Therapie am Tag 1 nach

Tumorzellinokulation die Peritonealkarzinose in 87% der Fälle verhindert wurde (Beck et al., 2007). In diesem Fall könnte mit Biolumineszenz Imaging zwar der Therapieerfolg nachgewiesen, nicht aber die weitere Entwicklung des Tumors verfolgt werden.

Die Mäuse wurden nach Injektion mit ^{213}Bi -d9MAb streng getrennt von den unbehandelten Mäusen gehalten und ihre Käfige durch Bleiplatten von den übrigen Käfigen abgeschirmt.

3.8.3 *In-vivo*-Biolumineszenz Imaging

3.8.3.1 Subkutan injizierte Tiere

Die subkutan injizierten Mäuse wurden zur Erfassung der Tumorpheriferation alle drei Tage aufgenommen. Begonnen wurde mit den Biolumineszenz-Aufnahmen dabei schon am Tag der Tumorzellinjektion. Die Aufnahmereihe wurde so lange fortgesetzt, bis die Mäuse entweder durch die Größe des Tumors in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt wurden, der Tumor Anzeichen einer Ulzeration zeigte, oder sich der Allgemeinzustand der Mäuse verschlechterte. In all diesen Fällen wurden noch letzte Biolumineszenz-Aufnahmen durchgeführt und die betroffene Maus direkt im Anschluss daran abgetötet.

3.8.3.2 Intravenös injizierte Tiere

Die intravenös injizierten Mäuse wurden sofort nach der simultanen Injektion von Tumorzellen und Luciferin das erste Mal aufgenommen. Die nächste Aufnahme erfolgte dann am Tag drei nach Tumorzellinjektion. Von da an wurden alle drei Tage Biolumineszenz-Aufnahmen durchgeführt. Als Endpunkt für die Untersuchung der intravenös injizierten Mäuse wurde entweder eine Verschlechterung des Allgemeinzustands der jeweiligen Maus oder der fehlende Nachweis von Tumor in zwei hintereinander folgenden Biolumineszenz-Aufnahmen festgelegt.

Bei den intravenös mit Tumorzellen injizierten Tieren wurde im Gegensatz zu den anderen Tieren auch das Luciferin intravenös appliziert. Die Injektion erfolgte wie oben bei der Tumorzellinjektion beschrieben, mit 100 μl Luciferin (15mg/ml) in die Schwanzvene.

3.8.3.3 Intraperitoneal injizierte Tiere

Von den zwölf intraperitoneal injizierten Tieren wurden, beginnend mit Tag vier nach Tumorzellinokulation, alle vier Tage Biolumineszenz-Aufnahmen durchgeführt. Von den sechs Mäusen, die am achten Tag nach der Tumorzellinjektion therapiert wurden, wurden an diesem Tag morgens Biolumineszenz-Aufnahmen angefertigt. Die intraperitoneale Injektion mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ erfolgte dann abends nach einer Ruhephase von circa zehn Stunden.

Als Endpunkt für die Biolumineszenz-Untersuchungen wurde auch hier eine Verschlechterung des Allgemeinzustands, erkennbar zum Beispiel an deutlichem Gewichtsverlust oder einem entstehenden Ikterus, oder aber die Entwicklung eines massiven Aszites festgelegt. In diesen Fällen wurden die Mäuse ein letztes Mal aufgenommen und danach abgetötet.

In Vorversuchen wurde die Tumorentwicklung in den ersten Tagen nach Tumorzellinjektion untersucht. Dazu wurden einige intraperitoneal injizierte Mäuse täglich aufgenommen, beginnend mit dem Tag der Injektion. Nach diesen Versuchen wurde für den Hauptversuch Tag vier als Startpunkt für die Biolumineszenz-Aufnahmen festgelegt, da erst zu diesem Zeitpunkt die Tumorzellen sicher angewachsen sind und die Entwicklung der Peritonealkarzinose beginnt. In den Tagen zuvor können zwar bereits Tumorzellen mit Biolumineszenz Imaging nachgewiesen werden, es kommt jedoch noch zu erheblichen Schwankungen der abgegebenen Lichtintensität, weshalb eine kontinuierliche Untersuchung erst ab Tag 4 als sinnvoll erscheint.

3.8.4 Biolumineszenz-Aufnahmen von malignem Aszites

Das Vorhandensein von Tumorzellen im Aszites von Mäusen mit ausgeprägter Peritonealkarzinose sollte ebenfalls mit Hilfe von Biolumineszenz-Aufnahmen nachgewiesen werden. Dazu wurde Mäusen, die massiven Aszites entwickelt hatten, direkt nach einer letzten Biolumineszenz-Aufnahme der Aszites abpunktiert. Anschließend wurde dieser in ein Eppendorf Cup gegeben und die Lumineszenz aufgenommen. Als Kontrolle diente ein zweites, nur mit Luciferin gefülltes, Eppendorf Cup.

Um die Zahl der Zellen im jeweiligen Aszites zu quantifizieren, wurden die Zellen im Anschluss in einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.8.5 *Post-mortem*-Biolumineszenz-Aufnahmen

Von einigen Mäusen wurden zur genaueren Feststellung der intraperitonealen Tumorlokalisierung nach der letzten *In-vivo*-Biolumineszenz-Aufnahme noch *Post-mortem*-Aufnahmen durchgeführt. In diesen Fällen wurden die Mäuse direkt nach der letzten *In-vivo*-Aufnahme abgetötet und Aufnahmen der Maus mit abpräparierter Bauchwand sowie Aufnahmen von einzelnen entnommen Organen durchgeführt. Dies musste möglichst schnell erfolgen, da die Intensität des abgegebenen Lichts zwanzig Minuten nach Injektion von Luciferin nachlässt, das Enzym Luciferase zur Entwicklung von Licht ATP und Sauerstoff benötigt, und beides nach dem Tod der Maus nur noch in begrenztem Umfang zur Verfügung steht. Dabei stellt der Verbrauch von ATP wohl das größere Problem dar, da bei abpräparierter Bauchwand und entnommenen Organen der Kontakt zu Sauerstoff aus der Atmosphäre besteht und dies für *Ex-vivo*-Biolumineszenz-Aufnahmen ausreichend ist (Inoue et al., 2006).

3.8.6 Versuch der Quantifizierung von *In-vivo*-Biolumineszenz-Aufnahmen

Ziel dieser Studie war es, mit Biolumineszenz Imaging die Entwicklung einer Peritonealkarzinose sowie deren Rückgang nach Therapie zu visualisieren. Darüber hinaus sollte neben der rein optischen Darstellung auch versucht werden, die Entwicklung des Tumors anhand von messbaren Daten zu zeigen. Dazu wurde die mittlere Lichtintensität („mean grey level intensity“) in ROIs („regions of interest“) über den Mäusen mit Hilfe der Hamamatsu Simple PCI Software gemessen. Untersucht wurde die Tumorentwicklung auf diese Weise bei einer subkutan mit Tumorzellen injizierten Maus und den zwölf intraperitoneal injizierten Mäusen.

3.8.6.1 Subkutan injizierte Maus

Bei der subkutan injizierten Maus (linke Flanke: 1×10^6 HSC45-M2-luc; rechte Flanke: 2×10^6 HSC45-M2-luc) wurden auf den unbearbeiteten Biolumineszenz-Aufnahmen jeweils immer gleich große ROIs über beiden Flanken so plaziert, dass der Tumor möglichst mittig zu liegen kam. Eine weitere identische ROI wurde abseits der Maus in den Bildhintergrund gelegt. Form und Größe der ROIs wurden gespeichert, um sicherzustellen, dass immer dieselben ROIs verwendet wurden.

3.8.6.2 Intraperitoneal injizierte Mäuse

Über den intraperitoneal mit 1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen injizierten Mäusen wurde auf den unbearbeiteten Biolumineszenz-Aufnahmen jeweils eine große, den ganzen Bauchraum umfassende, ROI gelegt (ROI Größe: 52425 Pixel; Bild Größe: 1024x1024 Pixel). Die gleiche ROI wurde auch hier in den Hintergrund gelegt (Abb.12). Auch diese ROI wurde gespeichert, um bei allen Aufnahmen und allen Mäusen immer eine gleich große ROI zu verwenden.

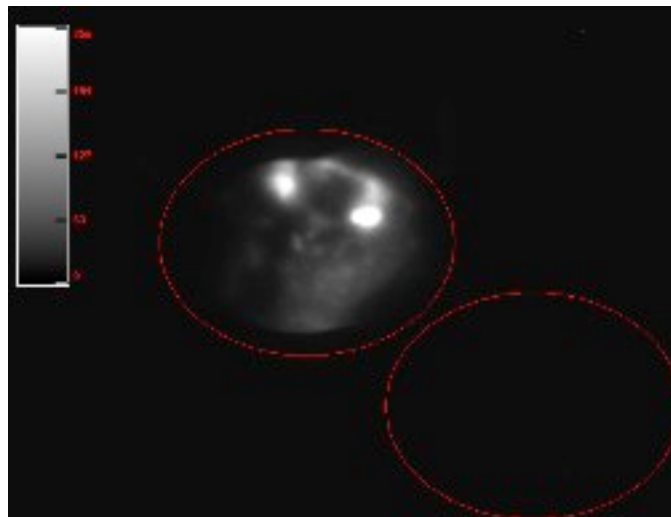


Abb.12:

Biolumineszenz-Aufnahme einer i.p. mit Tumorzellen injizierten Maus in Rückenlage: Zur Bestimmung der mittleren Lichtintensität wurde eine ROI über den gesamten, tumorbefallenen Bauchraum gelegt. Eine weitere identische ROI wurde im Bildhintergrund platziert, um die mittlere Lichtintensität des Hintergrunds zu messen. (Skala: Lichtintensität/Pixel nach Angaben des Herstellers, Hamamatsu, Herrsching)

3.8.6.3 Auswertung der Messungen

Zur Auswertung wurde in jeder ROI die mittlere Lichtintensität gemessen. Um vergleichbare Ergebnisse zu bekommen, wurde die mittlere Lichtintensität des Hintergrunds von der mittleren Lichtintensität über dem Tumor abgezogen. Anhand der Änderung der Lichtintensität über die Zeit ließ sich nun die Tumorentwicklung graphisch darstellen.

4. Ergebnisse

4.1 Markierung von d9MAb mit ^{213}Bi

Die Radionuklidmarkierung von d9MAb mit ^{213}Bi erfolgte wie unter 3.5.4 beschrieben. Bei einem Anteil von über 90% gebundenem ^{213}Bi wurde das Produkt für die Versuche verwendet. Der Anteil an gebundener Aktivität betrug bei unseren Versuchen zwischen 92,5% und 96,5%.

4.2 Biolumineszenz Imaging

4.2.1 *In-vitro*-Aufnahmen

Alle vier eingesetzten Zellzahlen (1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 Zellen pro Well) konnten mit Biolumineszenz-Aufnahmen untersucht werden. Am besten geeignet waren dabei die Platten mit 1×10^3 und 1×10^4 Zellen pro Well, da bei diesen Platten an allen Untersuchungstagen die Aufnahmen ausgewertet werden konnten.

Bei 1×10^2 Zellen pro Well war die Lichtintensität zu gering, um verwertbare Resultate zu bekommen. Im Gegensatz dazu produzierten 1×10^5 Zellen pro Well anfangs so viel Licht, dass es zu Quenching-Effekten kam. Unter Quenching-Effekt (Aufhebungs-Effekt) versteht man, dass auf einer kleinen Fläche zu viel Licht entsteht und es dadurch zu einer gegenseitigen Auslöschung der einzelnen Lichtereignisse kommt, das heißt die Kamera an dieser Stelle kein Licht mehr aufnehmen kann. Im Bild erscheint dann an der Stelle, an der die höchste Lichtintensität zu erwarten ist, in diesem Fall im Zentrum des Wells, ein dunkler Fleck. Solche Aufnahmen können nicht ausgewertet werden.

Ein weiteres Problem, das bei den Platten mit 1×10^5 Zellen pro Well auftrat, bestand darin, dass die Zellen die Nährstoffe aus dem Medium schnell verbrauchten. Aufgrund des schnellen Wachstums der Zellen kommt es zu einer Überfüllung der einzelnen Wells. Dies führt zu einem Absterben eines großen Teils der Zellen. Es konnte so nicht differenziert werden, ob die Zellen durch Therapie oder Überfüllung der Wells abgestorben sind.

Diese Probleme traten bei 1×10^3 und 1×10^4 Zellen nicht auf. Hier war stets ausreichend Medium und Wachstumsfläche vorhanden und die abgegebene Lichtintensität lag immer im auswertbaren Bereich.

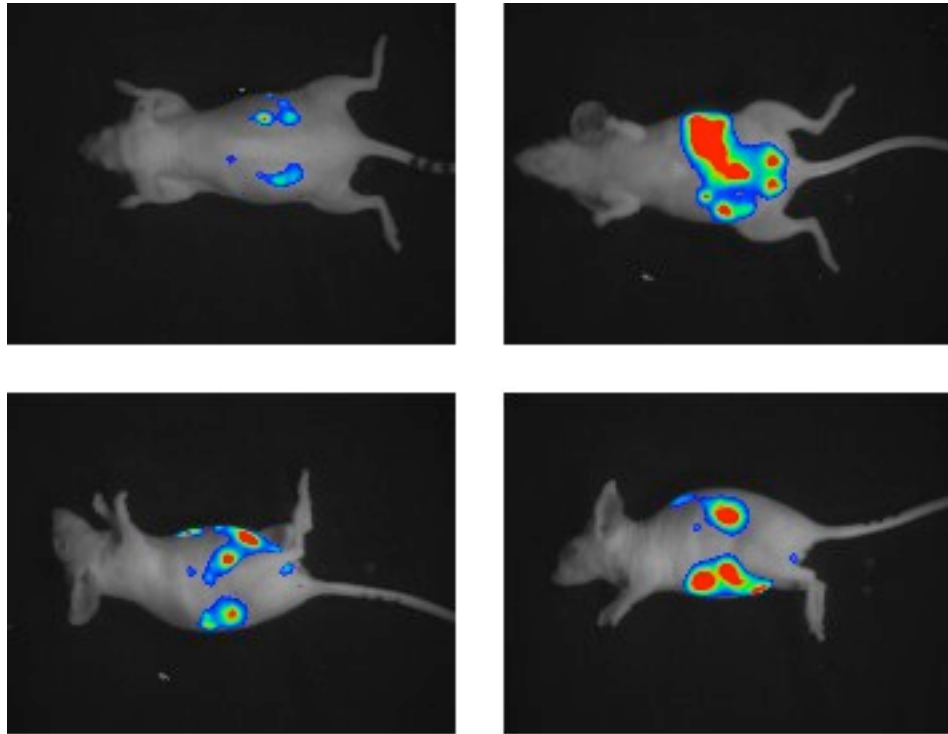
Als geeignete Belichtungszeiten für das *In-vitro*-Biolumineszenz Imaging erwiesen sich 60 s und 120 s. Mit diesen beiden Belichtungszeiten konnten bei den Platten mit 1×10^3 und 1×10^4 Zellen pro Well immer Zellen nachgewiesen werden. Die Belichtungszeit von 120 s ist dabei für die visuelle Beurteilung besser geeignet, während die Belichtungszeit von 60 s leichte Vorteile für die Messung des Biolumineszenzsignals hat, weil die Messung bei zu starken Lichtintensitäten zunehmend ungenau wird. Die Durchführung von Aufnahmen mit einer Belichtungszeit von 90 s brachte keine zusätzliche Information. Eine Belichtungszeit von 30 s erwies sich insbesondere bei 1×10^2 und 1×10^3 Zellen pro Well als nicht ausreichend lang, um eine Lichtabgabe der Zellen nachzuweisen und war deshalb für diese Versuche nicht geeignet.

4.2.2 *In-vivo*-Aufnahmen

Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde jede Maus in vier verschiedenen Positionen und mit jeweils zwei verschiedenen Belichtungszeiten (2s und 30s) aufgenommen. Diese Aufnahmetechnik hatte insbesondere bei Mäusen mit intraperitonealen Tumoren große Vorteile gegenüber Aufnahmen in nur einer Position mit nur einer Belichtungszeit.

Die Größe und Lokalisation von intraperitonealen Tumorknoten konnten durch die Aufnahme der Mäuse in verschiedenen Lagerungen gut abgeschätzt werden (Abb.13). Einzelne kleine Tumorknoten konnten je nach Lokalisation in der Bauchhöhle nur in einer der vier Lagerungen nachgewiesen werden. Ohne diese Aufnahmetechnik wären solche Tumorknoten nicht nachweisbar gewesen. Bei subkutan mit Tumorzellen injizierten Mäusen wären die Aufnahmen in verschiedenen Lagerungen hingegen nicht unbedingt nötig gewesen, da hier die Tumorkonlokalisierung bekannt war. Allerdings waren Aufnahmen in verschiedenen Lagerungen auch hier geeignet, um die Ergebnisse zu veranschaulichen.

Die Verwendung von zwei Belichtungszeiten hat dazu beigetragen, Tumorgöße und Lokalisation besser einschätzen zu können. Auch diese



*Abb.13:
Biolumineszenz-Aufnahmen (Belichtungszeit 30s) einer Maus von dorsal,
ventral und lateral (links und rechts) am Tag 8 nach i.p. Inokulation mit 1×10^7
HSC45-M2-luc Zellen.*

Technik ist besonders bei intraperitoneal mit Tumorzellen injizierten Mäusen von Vorteil. An den ersten Tagen nach Tumorzellinjektion war die relativ lange Belichtungszeit von 30 s nötig, um die kleinen sich entwickelnden Tumorknoten in der Bauchhöhle zu detektieren. Wurden die Tumoren jedoch größer, produzierten sie so viel Licht, dass sie bei einer Belichtungszeit von 30s größer erschienen als sie tatsächlich waren. Wenn sich maligner Aszites entwickelt hatte, erschien bei 30 s Belichtungszeit der ganze Bauchraum als ein großer Tumor. Durch eine zweite Aufnahme mit 2 s Belichtungszeit war es auch in fortgeschrittenen Tumorstadien noch möglich, die Lokalisation der einzelnen größeren Tumorknoten zu bestimmen. Durch die kurze Belichtungszeit wurden nur die stark leuchtenden Tumorknoten aufgenommen. Die Tumorknoten erschienen nicht wesentlich größer, als sie tatsächlich waren, und die leuchtenden Zellen im Aszites wurden praktisch

ausgeblendet. So war es durch die Verwendung dieser beiden Belichtungszeiten möglich, sowohl den malignen Aszites als auch die Verteilung und Lokalisation der einzelnen Tumorknoten im Intraoperitonealraum aufzudecken (Abb.14).

Bei den intravenös mit Tumorzellen injizierten Mäusen musste aufgrund der geringen Tumorzellzahl eine Belichtungszeit von 60 s verwendet werden. Mit Belichtungszeiten von 30 s oder gar nur 2 s konnten hier keine Tumorzellen nachgewiesen werden. Der Grund hierfür war neben der kleinen Zellzahl sicher auch die starke Abschirmung durch den knöchernen Thorax.

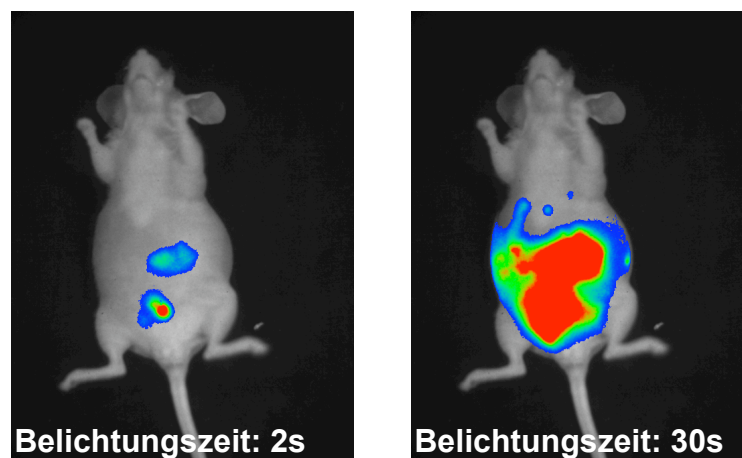


Abb.14:

Aufnahmen einer Maus in Rückenlage am Tag 16 nach i.p. Inokulation von 1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen mit Belichtungszeiten von 2s und 30s.

4.3 In-vitro-Versuche

4.3.1 Bewertung der Biolumineszenz-Aufnahmen

Durch die rein visuelle Betrachtung der Biolumineszenz Aufnahmen war es kaum möglich, Rückschlüsse auf die Entwicklung der Zellen mit und ohne ^{213}Bi -Radioimmuntherapie zu ziehen. Deshalb musste auf die Messung des Biolumineszenzsignals zurückgegriffen werden. Das Hauptproblem bei der Beurteilung der Biolumineszenz-Aufnahmen war, dass die von den Zellen

abgegebene Lichtintensität so gering war, dass sie rein visuell in den Aufnahmen schwierig zu erkennen war. Änderungen der Lichtintensität festzustellen war demnach nahezu unmöglich. Ein weiteres Problem war, dass nach der Behandlung die überlebenden Zellklone weiter wachsen und Licht abgeben. Durch das exponentielle Wachstum der Zellen steigt auch nach der Therapie die Lichtintensität wieder an. Eine Änderung der Lichtintensität bei ein und derselben Platte ist so unter Umständen nicht nachweisbar. Um den Effekt der ^{213}Bi -Radioimmuntherapie nachzuweisen, mussten also Kontroll- und Therapieplatten am selben Tag nach Tumorzellaussat verglichen werden. Dies erfolgte am sechsten Tag nach Aussat der Zellen. Doch auch hier war es wegen der geringen Zellzahlen schwierig, den Therapieeffekt rein visuell zu objektivieren. Es wurde deshalb zur Objektivierung der Ergebnisse die Lichtintensität in ROIs gemessen.

4.3.2 Ergebnisse der Messung des Biolumineszenzsignals

Mit Hilfe der Messung der total grey level Intensität über dem Zentrum jedes mit Zellen gefüllten Wells konnte der Effekt der ^{213}Bi -Radioimmuntherapie nachgewiesen werden.

Wie oben erwähnt eigneten sich zur Messung des Biolumineszenzsignals nur die Platten mit 1×10^3 und 1×10^4 HSC45-M2-luc Magenkarzinomzellen pro Well. Bei diesen Platten verringerte sich das Biolumineszenzsignal nach Inkubation mit ^{213}Bi -d9MAb auf circa 50 Prozent des Wertes für die unbehandelten Kontrollen.

4.3.3 Ergebnisse des klonogenen Assays

Durch Auszählung der Zellklone konnte der Therapieeffekt der ^{213}Bi -Radioimmuntherapie auch bei den Platten mit 1×10^2 HSC45-M2-luc Zellen pro Well objektiviert werden.

Im klonogenen Assay konnten in den therapierten Wells etwa halb so viele Zellklone gezählt werden wie in den Wells der unbehandelten Platten. Die therapierten Zellen zeigten also ein Überleben von etwa 50 Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

4.3.4 Vergleich der Ergebnisse der Biolumineszenz-Messung und des klonogenen Assays

Nach der ^{213}Bi -d9MAb Radioimmuntherapie konnte sowohl mit dem klonogenen Assay als auch mit der Biolumineszenzsignal-Messung ein Rückgang der Zellzahl auf etwa 50 Prozent im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nachgewiesen werden. Das Überleben der HSC45-M2-luc Zellen nach Therapie, gemessen mit dem klonogenen Assay, korreliert also mit der Messung des Biolumineszenzsignals (Abb.15).

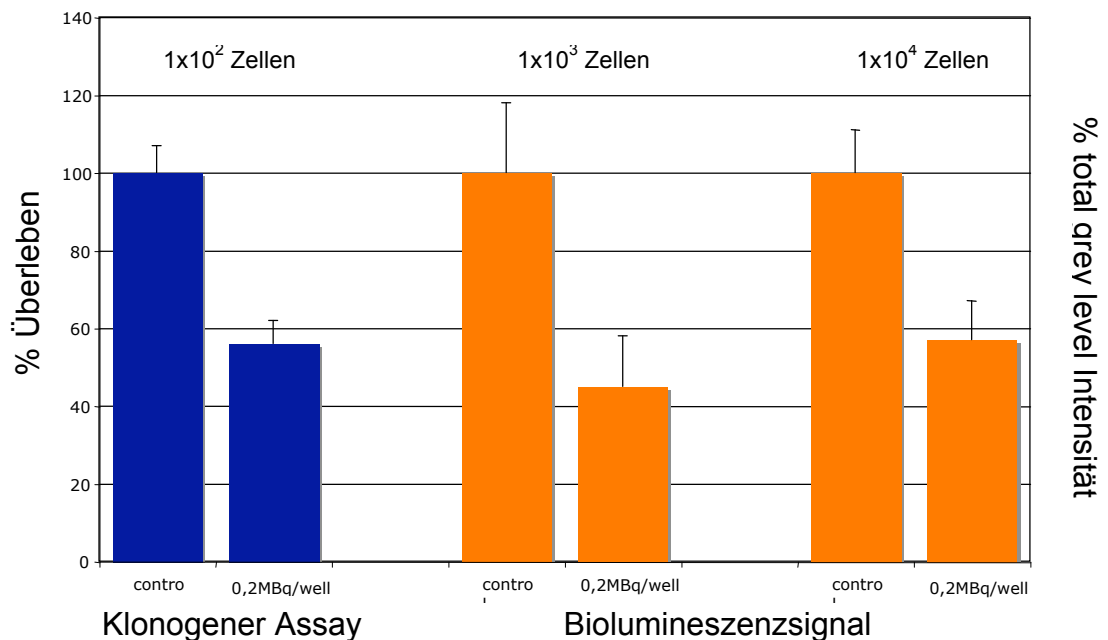


Abb.15:
Überleben der HSC45-M2-luc Zellen nach Therapie mit ^{213}Bi -d9MAb (0,2 MBq/Well) bestimmt mit klonogenem Assay (blau, für 1×10^2 Zellen) und Biolumineszenz Imaging (orange, für 1×10^3 und 1×10^4 Zellen).

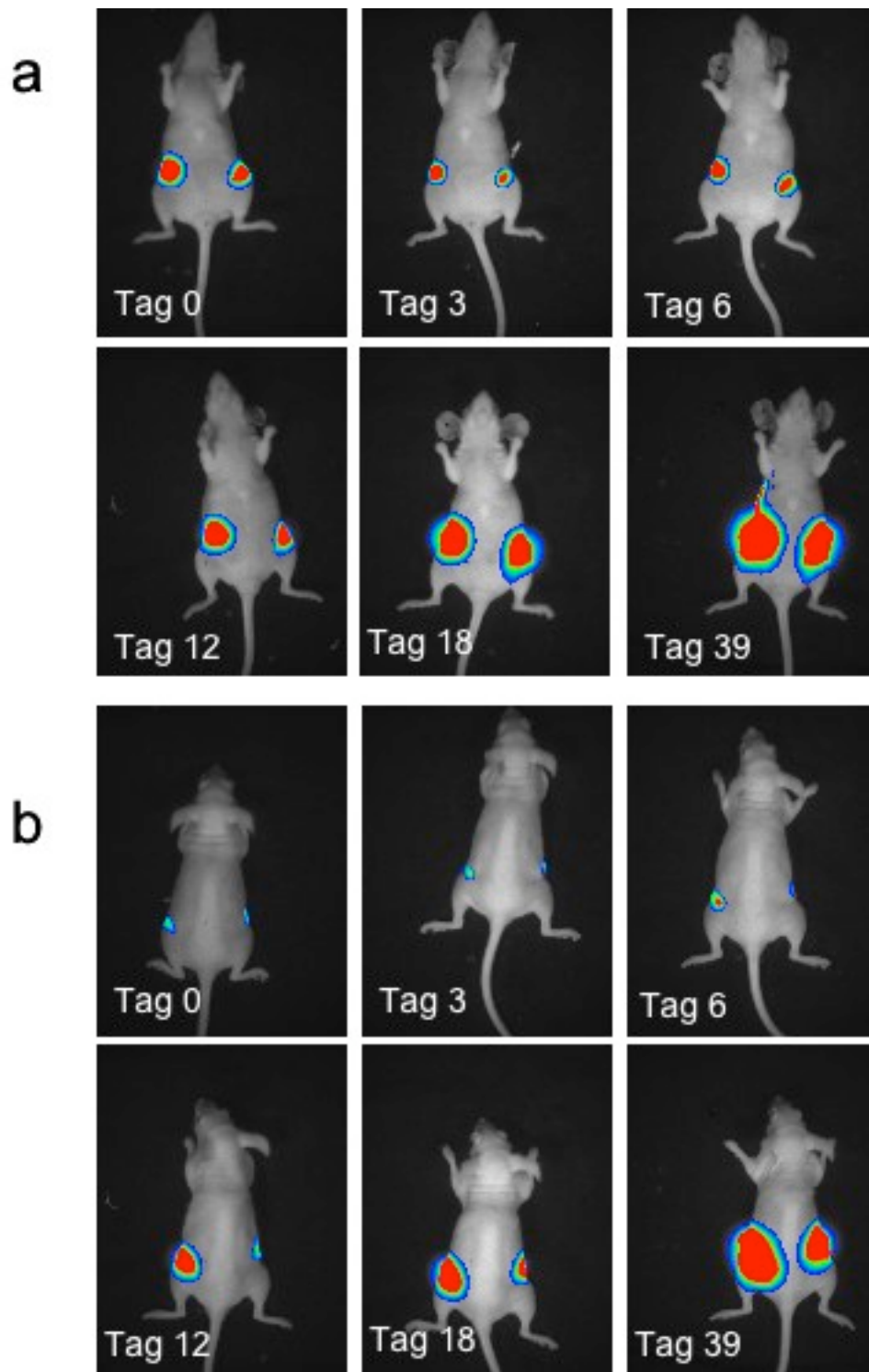
4.4 Tierexperimente

4.4.1 Biolumineszenz Imaging von subkutan injizierten Tieren

Vom Tag der Tumorzellinjektion an konnte bei den Mäusen ein Wachstum der subkutanen Tumore beobachtet werden. Für die Verlaufsbeobachtung waren die Aufnahmen der Mäuse in Rückenlage am besten geeignet. In dieser Position sind die Flanken der Maus gut einsehbar, ohne dass es zu einer Abschirmung zum Beispiel durch die Beine, insbesondere die Knochen, kommt, was bei den Seitenaufnahmen vorkommen kann. Auch die Aufnahmen der Maus in Bauchlage zeigen die Tumorentwicklung, allerdings können durch die in dieser Lage steil abfallenden Flanken Teile des Tumors nicht einsehbar sein. An den Tagen 3 und 6 nach Tumorzellinjektion erschienen die Tumoren zunächst kleiner als am Tag der Injektion selbst. Nachdem die Tumorzellen dann aber angewachsen waren, kam es ab Tag 6 zu einem kontinuierlichen Wachstum der subkutanen Knoten (Abb.16). Bei einer Maus konnte eine Metastasierung, beziehungsweise eine Ausbreitung des subkutanen Tumors entlang eines Lymphgefäßes an der Bauchwand in Richtung Thorax beobachtet werden (Abb.17). Durch diese Vorversuche konnte gezeigt werden, dass Tumorstadium *in vivo* mit Biolumineszenz Imaging beobachtet und sogar eine Metastasierung dargestellt werden kann. Die Mäuse wurden alle drei Tage aufgenommen, bis es entweder zu Bewegungseinschränkungen oder einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Mäuse durch den Tumor kam, oder die Tumoren Anzeichen einer Ulzeration zeigten. Bei Eintreten eines dieser Zeichen wurden die Mäuse nach einer letzten Biolumineszenz Aufnahme abgetötet. Im Mittel geschah das etwa 30 Tage nach Tumorzellinjektion.

4.4.2 Biolumineszenz Imaging von intravenös injizierten Tieren

In den ersten Biolumineszenz Aufnahmen, die nur Minuten nach intravenöser Tumorzellinjektion (1×10^6 HSC45-M2-luc) durchgeführt wurden, konnten bei beiden untersuchten Mäusen eine Ansammlung von Tumorzellen in beiden Lungenflügeln dargestellt werden (Abb.18). Die vielen einzelnen Lichtpunkte waren genau in der Form der Lungenflügel angeordnet, was darauf schließen lässt, dass die Tumorzellen sich in Form kleiner Embolien in der



*Abb.16:
Biolumineszenz-Aufnahmen einer Maus in Rückenlage (a) und Bauchlage (b) an den Tagen 0, 3, 6, 12, 18 und 39 nach subkutaner Injektion von HSC45-M2-luc Zellen (linke Flanke: 1×10^6 Zellen; rechte Flanke: 2×10^6 Zellen).*

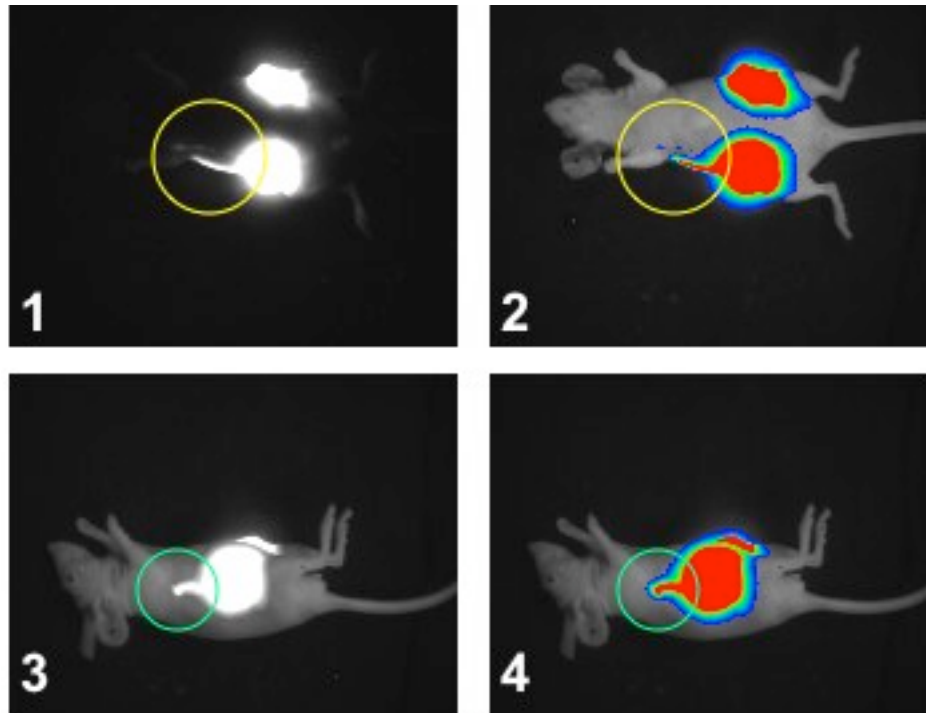


Abb.17:

Abgebildet sind eine originale (1), sowie eine bearbeitete Biolumineszenz-Aufnahme (2) einer subkutan mit HSC45-M2-luc Zellen injizierten Maus in Rückenlage am Tag 39 nach Tumorzellinjektion (linke Flanke: 1×10^6 Zellen; rechte Flanke 2×10^6 Zellen) und eine teilweise bearbeitete (3) sowie eine bearbeitete Biolumineszenz-Aufnahme (4) derselben Maus in linker Seitenlage. In den Aufnahmen der Maus in Rückenlage ist die Tumorausbreitung entlang von zwei Gefäßen, sowie die beginnende Metastasierung zu erkennen (○). In den Aufnahmen in Seitenlage ist ebenfalls das Einwachsen des Tumors in ein Blut- oder Lymphgefäß zu erkennen (○).

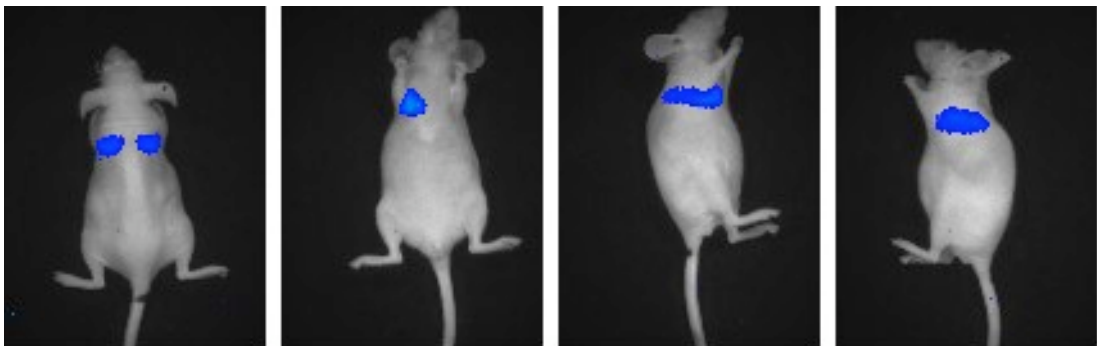


Abb.18:

Biolumineszenz-Aufnahmen einer Maus von dorsal, ventral und lateral wenige Minuten nach intravenöser Injektion von 1×10^6 HSC45-M2-luc Zellen.

Lunge festgesetzt hatten. Eine zu erwartende deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Mäuse trat jedoch nicht ein. Bei der nächsten Aufnahme drei Tage nach der Tumorzellinjektion waren nur noch bei einer der beiden Mäuse Tumorzellen nachweisbar. Diese befanden sich weiterhin im Bereich der Lunge und waren bei der nächsten Aufnahme an Tag 6 nach Tumorzellinjektion ebenfalls nicht mehr nachweisbar. Nachdem auch am Tag 9 nach Tumorzellinjektion keine Tumorzellen mehr nachgewiesen werden konnten, wurden bei beiden Mäuse nicht mehr regelmäßige Aufnahmen gemacht. Ihr Allgemeinzustand wurde weiterhin engmaschig kontrolliert, zeigte jedoch keine Verschlechterung. 14 Tage und 6 Wochen nach der intravenösen Tumorzellinjektion wurden die Mäuse noch einmal in allen Perspektiven und mit langen Belichtungszeiten (60 s) aufgenommen, ohne dass Tumoren nachgewiesen werden konnten. Daraus und aus dem guten Allgemeinzustand der Mäuse schlossen wir, dass die Tumorzellen abgestorben und die Mäuse tumorfrei waren.

4.4.3 Biolumineszenz Imaging von intraperitoneal injizierten Tieren

Im Hauptversuch sollte bei zwölf Mäusen die Entwicklung einer Peritonealkarzinose nach intraperitonealer Injektion von 1×10^7 HSC45-M2-luc Magenkarzinomzellen und deren Rückgang nach einer ^{213}Bi -Radioimmuntherapie gezeigt werden. Bei allen untersuchten Tieren konnte mit Biolumineszenz Imaging die Tumorentwicklung *in vivo* nicht-invasiv verfolgt werden.

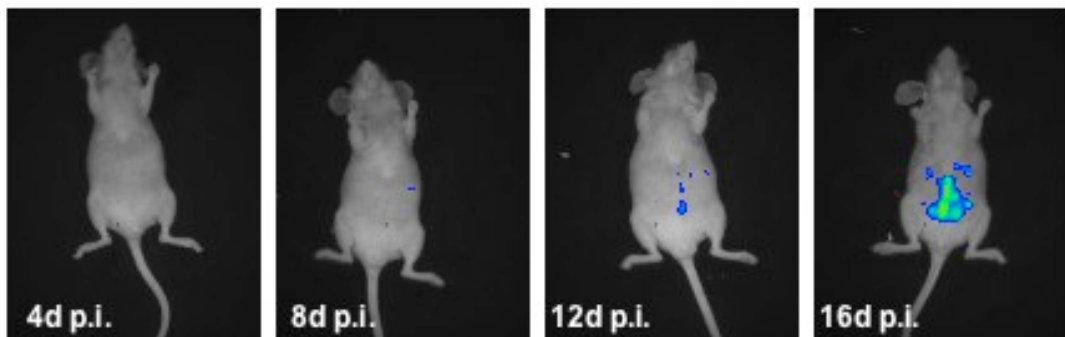
4.4.3.1 Tumorentwicklung der Kontrollgruppe

Die intraperitoneale Tumorentwicklung konnte bei den 6 Mäusen der Kontrollgruppe mit Biolumineszenz Imaging von anfangs kleinen lokalisierten Tumorknoten bis zur Entwicklung einer massiven Peritonealkarzinose mit Aszites verfolgt werden. Wie oben erwähnt war hierbei die Aufnahme der Mäuse in jeweils vier Lagerungen und mit zwei verschiedenen Belichtungszeiten (2 s, 30 s) hilfreich, um Tumorgröße und Lokalisation zu bestimmen. Für die Verlaufsbeobachtung am besten geeignet waren die Aufnahmen der Mäuse in Rückenlage, da hier der Bauchraum am besten eingesehen werden kann.

Von Tag 4 nach der intraperitonealen Tumorzellinjektion (1×10^7 HSC45-M2-luc) an konnte die Entwicklung der Peritonealkarzinose visualisiert werden (Abb. 19). Die kleinsten einzelnen Tumorknoten, die dabei in der Bauchhöhle abgebildet werden konnten, hatten einen Durchmesser von 0,5 mm (entspricht ca. $1,6 \times 10^4$ Zellen). Tumoren dieser Größe konnten allerdings nur gefunden werden, wenn sie direkt an der Bauchwand angewachsen waren oder sich in ihrer unmittelbarer Nähe befanden. Tiefer in der Bauchhöhle gelegene Tumorknoten konnten erst ab etwa 1mm im Durchmesser dargestellt werden. Wurden die Tumorknoten von pigmentierten Organen wie der Leber abgeschirmt, so konnten sie erst in einem fortgeschrittenen Stadium nachgewiesen werden. Oftmals konnten solche Tumore jedoch auf einer Aufnahme mit einer anderen Lagerung der Maus schon eher detektiert werden.

Im Durchschnitt mussten die Mäuse der Kontrollgruppe aufgrund einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinzustandes und massiven Aszites am Tag 18 nach Tumorzellinjektion abgetötet werden.

Belichtungszeit 2s



Belichtungszeit 30s

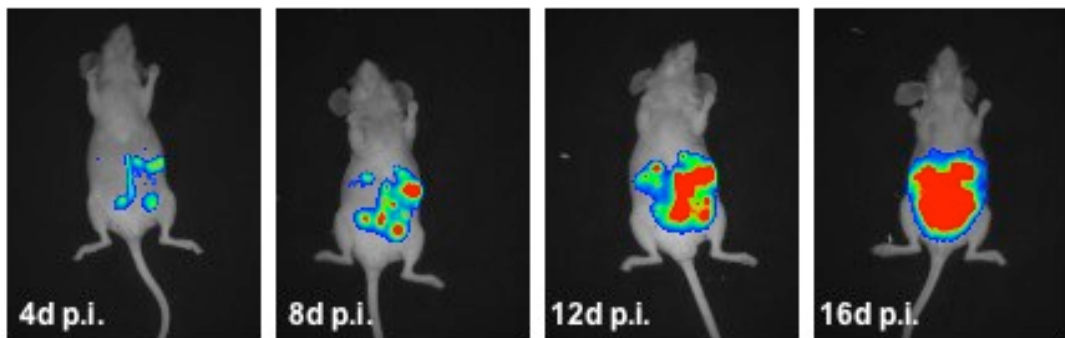


Abb.19:

Biolumineszenz-Aufnahmen einer Maus (in Rückenlage, Belichtungszeit 2 s und 30 s) an den Tagen 4, 8, 12 und 16 nach intraperitonealer Injektion von 1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen.

4.4.3.2 Tumorentwicklung der Therapiegruppe

Von den 6 Mäusen der Therapiegruppe konnte nur bei 5 Mäusen die Tumorentwicklung nach ^{213}Bi -d9MAb Therapie gezeigt werden, da eine der Mäuse kurz nach der Therapie verstarb.

Alle Tiere der Therapiegruppe hatten am Tag 4 nach der intraperitonealen Injektion von 1×10^7 HSC45-M2-luc Magenkarzinomzellen eine beginnende Peritonealkarzinose entwickelt. Am Tag der Therapie (Tag 8 p.i.) war diese in allen Fällen bereits deutlich ausgeprägt. Bis zu diesem Zeitpunkt gab es keinen Unterschied zwischen der Therapiegruppe und den Mäusen der Kontrollgruppe. Vier Tage später (Tag 12 p.i.) zeigte sich in den ersten Biolumineszenz-Aufnahmen nach der Therapie eine deutlich Reduktion der Tumormasse bei den behandelten Tieren. Diese Reduktion entstand durch eine komplette Elimination von kleinen Tumorknoten sowie einer Verkleinerung von größeren Tumorknoten. Die nicht vollständig abgetöteten Tumorknoten begannen in der Folge wieder zu wachsen und führten letztendlich zum Tod der Mäuse (Abb.20).

Aufgrund des schlechten Allgemeinzustands durch die großen intraperitonealen Tumore mussten die Mäuse der Therapiegruppe im Durchschnitt 41 Tage nach Tumorzellinokulation abgetötet werden. Eine Maus allerdings überlebte bis zum Ende der regelmäßigen Beobachtung am Tag 56 nach Tumorzellinokulation und hatte zu diesem Zeitpunkt nur einen einzelnen kleinen intraperitonealen Tumorherd.

4.4.4 Biolumineszenz Imaging von malignem Aszites

Im Aszites von abgetöteten Mäusen konnten mit Biolumineszenz Imaging in jedem Fall maligne Zellen nachgewiesen werden.

Die mit Aszites gefüllten Eppendorf Cups zeigten je nach Menge und Anzahl der enthaltenen Tumorzellen jedes Mal ein deutliches Lichtsignal. In den zur Kontrolle mit Luciferin gefüllten Eppendorf Cups kam es zu keiner Lichtentwicklung (Abb.21).

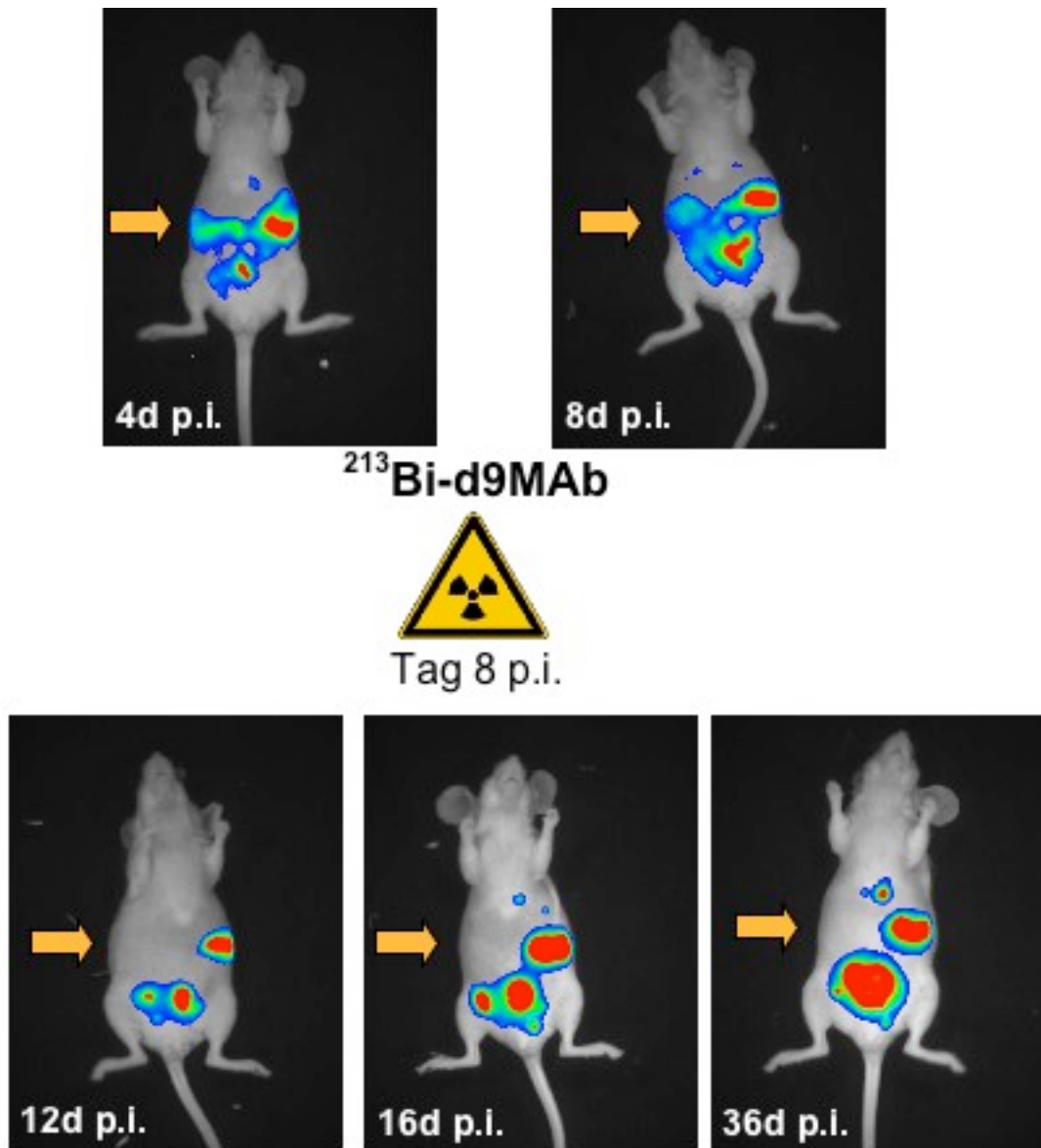


Abb.20:
Biolumineszenz Aufnahmen einer Maus (Rückenlage; Belichtungszeit 30 s) an den Tagen 4, 8, 12, 16 und 36 nach intraperitonealer Injektion von 1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen. Am Tag 8 nach Tumorzellinokulation wurde die Maus mit $2,7 \text{ MBq } ^{213}\text{Bi-d9MAb}$ therapiert. Kleine Tumorknoten (\rightarrow) wurden durch die Therapie vollständig eliminiert.

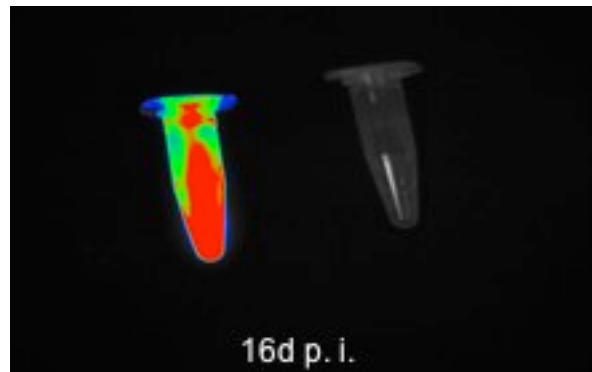


Abb.21:

Biolumineszenz-Aufnahme von Tumorzellen enthaltendem Aszites (links), einer Maus mit Peritonealkarzinose am Tag 16 nach intraperitonealer Injektion von 1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen. Daneben ist zur Kontrolle ein nur mit Luciferin gefülltes Eppendorf Cup abgebildet (rechts).

4.4.5 Post-mortem-Biolumineszenz-Aufnahmen

Wie erwartet konnte mit den *Post-mortem*-Aufnahmen der Mäuse mit abpräparierter Bauchwand die Tumorverteilung und Lokalisation in der Bauchhöhle noch besser bestimmt werden als in der lebenden Maus (Abb.22). Das liegt zum einen an der fehlenden Absorption von Licht durch die Bauchwand und zum anderen daran, dass die intraperitonealen Tumormassen nicht von dem an der Bauchwand haftenden Anteil der Peritonealkarzinose überlagert werden und somit besser als einzelne Tumorknoten erkennbar sind. Durch die Aufnahmen von einzelnen, explantierten Organen konnte exakt bestimmt werden, wo Tumorzellen an den Organen haften, beziehungsweise angewachsen sind (Abb.23). Außerdem konnten so auch sehr kleine ($< 0,5$ mm) Tumorknoten dargestellt werden, die mit bloßem Auge praktisch nicht zu erkennen waren.

In diesen Versuchen kam es trotz des Verbrauchs von ATP zu keiner Veränderung des Biolumineszenzsignals während der Untersuchungszeit.

Sauerstoff war durch die Exposition der untersuchten Objekte zur Atmosphäre ausreichend vorhanden (Inoue et al., 2006), weshalb eine Abschwächung des Biolumineszenzsignals durch Sauerstoffmangel nicht zu erwarten war und nicht eintrat.

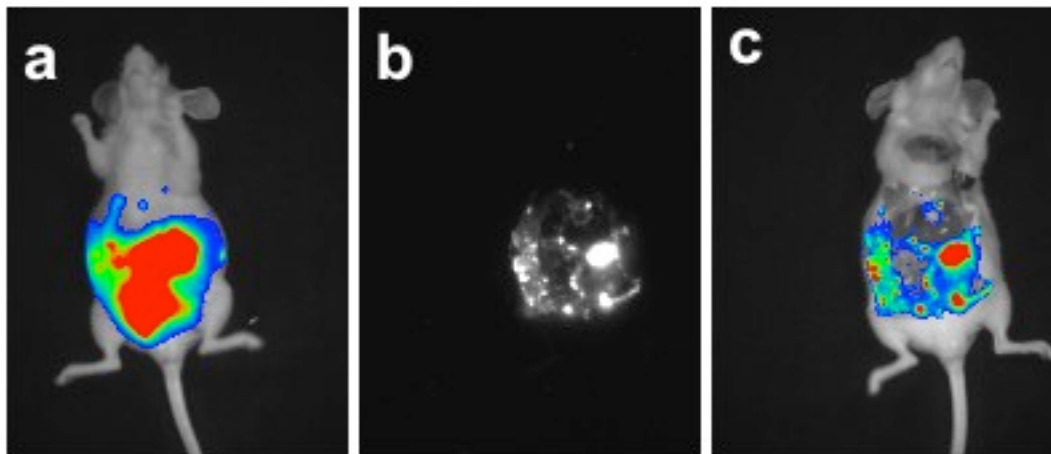


Abb.22:

Biolumineszenz-Aufnahmen einer Maus am Tag 16 nach intraperitonealer Injektion von 1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen, a.: Maus lebend. b. (Original Aufnahme) und c. (bearbeitete Aufnahme): Nach Abtötung mit abpräparierter Bauchwand. In den Post-mortem-Aufnahmen ist die Tumorausbreitung in der Bauchhöhle klar zu erkennen, da diese nicht von malignem Aszites oder Peritonealkarzinose an der inneren Bauchwand überlagert wird.

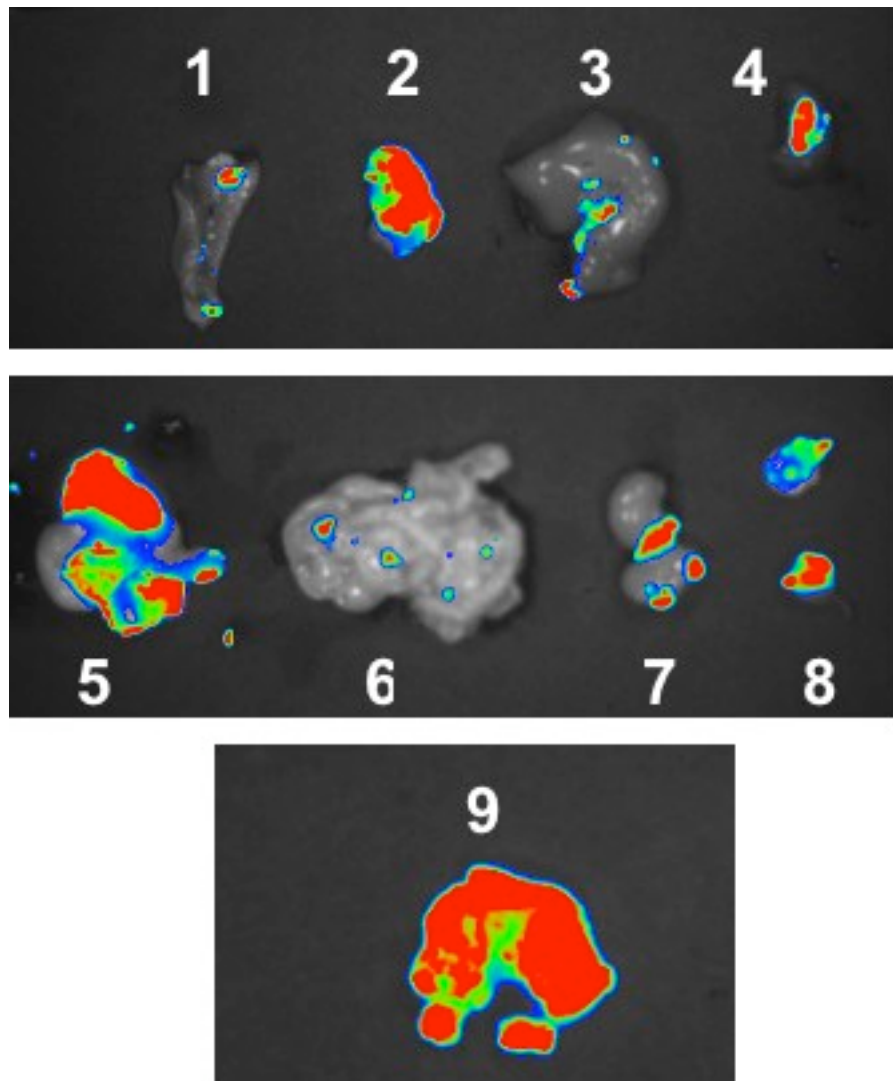


Abb.23:

Biolumineszenz-Aufnahmen von direkt nach dem Tod entnommenen einzelnen Organen. 1 =Peritoneum; 2 = Innere Bauchwand; 3 = Leber; 4 = Milz; 5 = Magen und Pankreas; 6 = Dünndarm; 7 = Nieren; 8 = Fettgewebe aus dem Bereich der Ovarien; 9 = Zwerchfell. An den einzelnen Organen ist zu erkennen, wo Tumorknoten angewachsen sind. Das Zwerchfell dieser Maus ist vollständig von Tumor durchsetzt.

4.4.6 Quantifizierung von *In-vivo*-Biolumineszenz-Aufnahmen

Durch Bestimmung des von den Tumoren abgegebenen Lichts konnte die Tumorentwicklung über die Zeit sowohl bei der subkutan mit Tumorzellen injizierten Maus, als auch bei den intraperitoneal mit Tumorzellen injizierten Mäusen graphisch dargestellt werden. Die genaue Größe der Tumoren ließ sich mit dieser Methode jedoch nicht feststellen.

4.4.6.1 Subkutan injizierte Maus

Die Entwicklung der subkutanen Tumore an beiden Flanken der Maus (linke Flanke: 1×10^6 Zellen; rechte Flanke 2×10^6 Zellen) konnten durch die alle drei Tage stattfindenden Messungen der Biolumineszenzsignale graphisch dargestellt werden. Dabei zeigte die graphischen Darstellung Lichtintensitätskurven der Tumore an den beiden Flanken, die praktisch parallel zueinander verliefen. Die Tumore wuchsen dem zufolge etwa gleich schnell. Der Tumor an der linken Flanke (1×10^6 Zellen s.c. injiziert) blieb dabei immer kleiner als der an der rechten Flanke (2×10^6 Zellen s.c. injiziert), und zeigte somit auch immer eine etwas geringere Lichtintensität. Beide Tumore zeigten am Tag 3 nach Tumorzellinjektion einen leichten Rückgang des Biolumineszenzsignals. Nachdem das Signal am Tag 6 etwa denselben Wert wie an Tag 3 zeigte, kam es danach, mit dem Wachsen der Tumore, zu einer kontinuierlichen Zunahme des Biolumineszenzsignals (Abb.24). Schwankungen in den Kurven wie an den Tagen 21, 27 und 33 sind auf die Empfindlichkeit der Untersuchungstechnik zurückzuführen, da beide Kurven an diesen Tagen exakt dieselben Veränderungen zeigten.

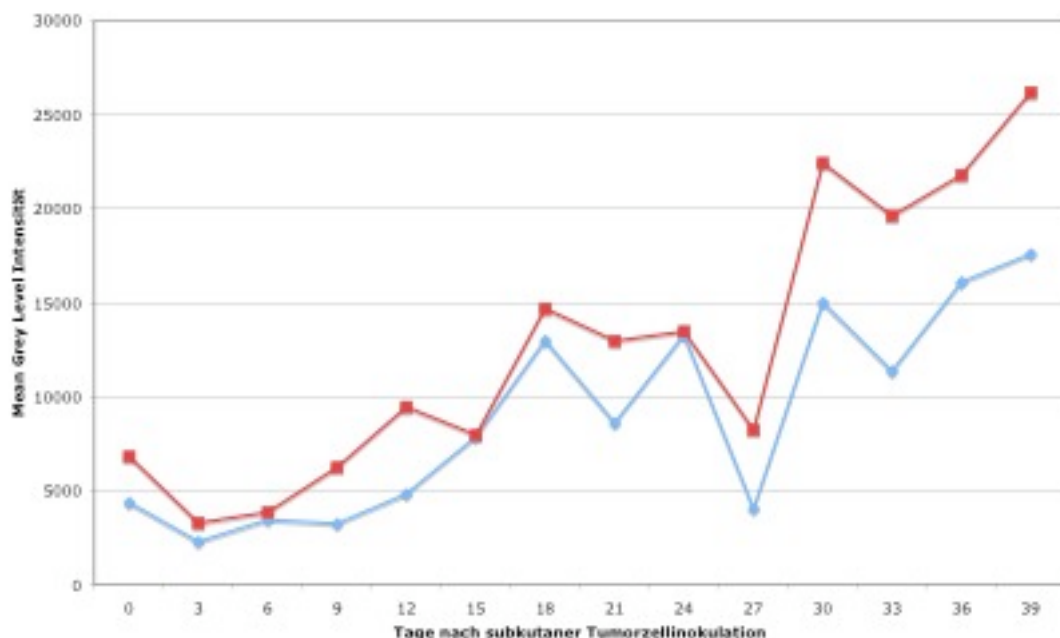


Abb.24:

Mean Grey Level Intensitäten gemessen zu verschiedenen Zeitpunkten in ROIs über beiden Flanken einer subkutan mit Tumorzellen Injizierten Maus (linke Flanke: 1×10^6 HSC45-M2-luc Zellen s.c.: *Blau*; rechte Flanke: 2×10^6 HSC45-M2-luc Zellen s.c.: *Rot*).

4.4.6.2 Intraperitoneal injizierte Mäuse

Die Ausbildung einer Peritonealkarzinose, sowie ihre Regression beziehungsweise ihr verlangsamtes Wachstum nach ^{213}Bi -Radioimmuntherapie am achten Tag nach intraperitonealer Tumorzellinjektion, konnte durch wiederholte Messungen des Biolumineszenzsignals über dem Bauchraum der Mäuse graphisch dargestellt werden.

Bei den Mäusen der Kontrollgruppe war nach einer Plateau-Phase zwischen Tag 4 und Tag 8 nach Tumorzellinokulation ein steiler Anstieg des Biolumineszenzsignals zu beobachten (Abb. 25a). Das Biolumineszenzsignal der Mäuse der Therapiegruppe verhielt sich bei den ersten beiden Messungen an den Tagen 4 und 8 nach Tumorzellinokulation identisch zu dem der Kontrollgruppe. Vom Tag der Therapie an (Tag 8 p.i.) kam es jedoch zu einer wesentlich langsameren Zunahme des Biolumineszenzsignals (Abb.25b). Bei beiden Gruppen korrelierte das Biolumineszenzsignal positiv mit der Tumorentwicklung und negativ mit dem Überleben der Mäuse.

Die exakte Größe eines Tumors konnte durch die Messung des Biolumineszenzsignals nicht bestimmt werden. Es konnten durch den Messwert jedoch Rückschlüsse auf die Tumorentwicklung gezogen werden. So lag die mean grey level Intensität bei einer beginnenden Peritonealkarzinose immer bei einem Wert um die 5000, während bei massivem Tumorbefall Werte zwischen 20000 und 30000 gemessen wurden. In Abb. 26 sind die quantifizierten Biolumineszenz Signale der Kontrollgruppe (Abb.25a) und der Mäuse, die am Tag 8 nach intraperitonealer Tumorzellinokulation mit ^{213}Bi -d9MAb behandelt wurden (Abb.25b), gemeinsam dargestellt.

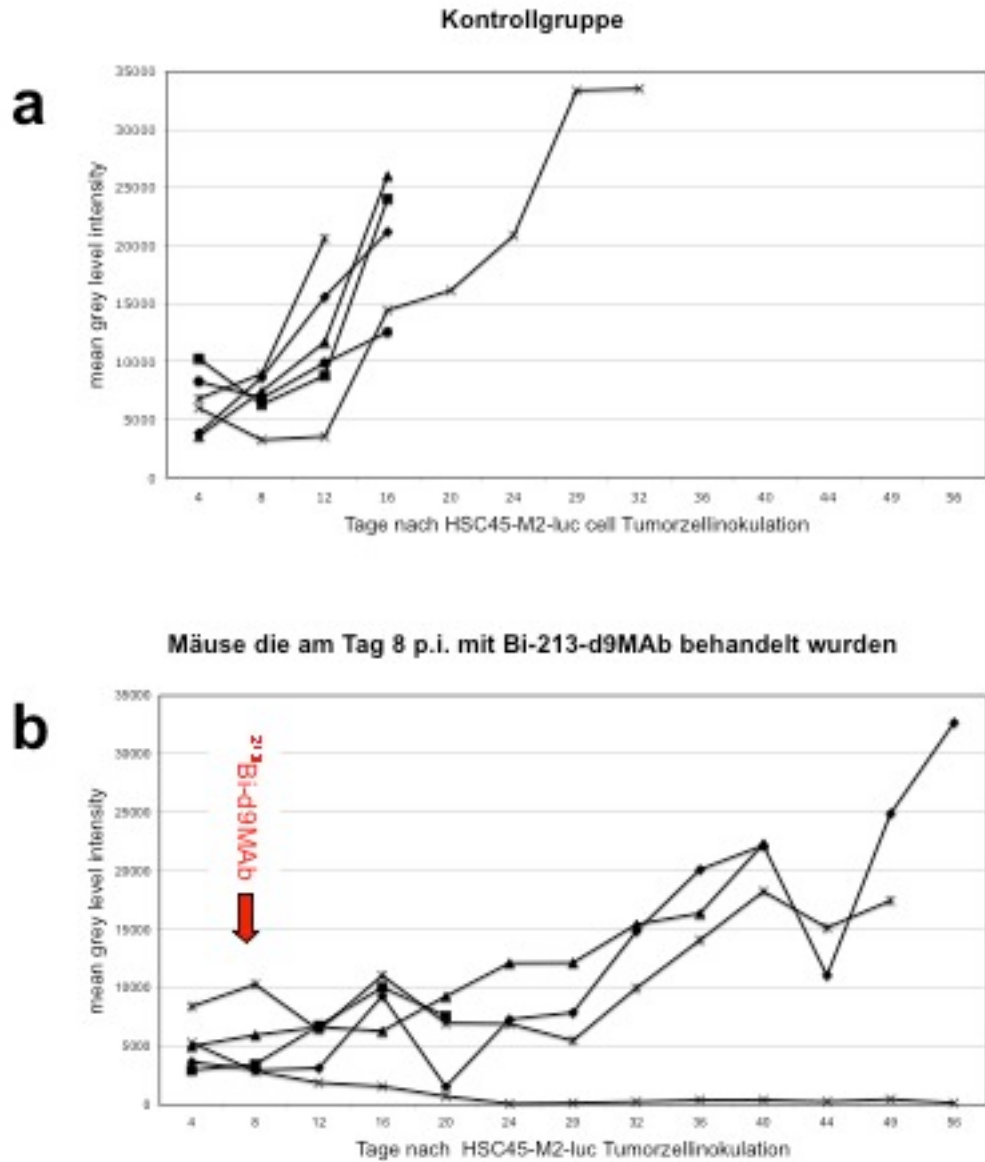


Abb.25:

Mean Grey Level Intensitäten gemessen in ROIs über dem Abdomen von Mäusen an verschiedenen Tagen nach der intraperitonealen Tumorzellinokulation (1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen). (a) unbehandelte Mäuse, (b) Mäuse, die am Tag 8 nach Tumorzellinokulation mit 2,7 MBq ^{213}Bi -d9MAb therapiert wurden.

Ergebnisse

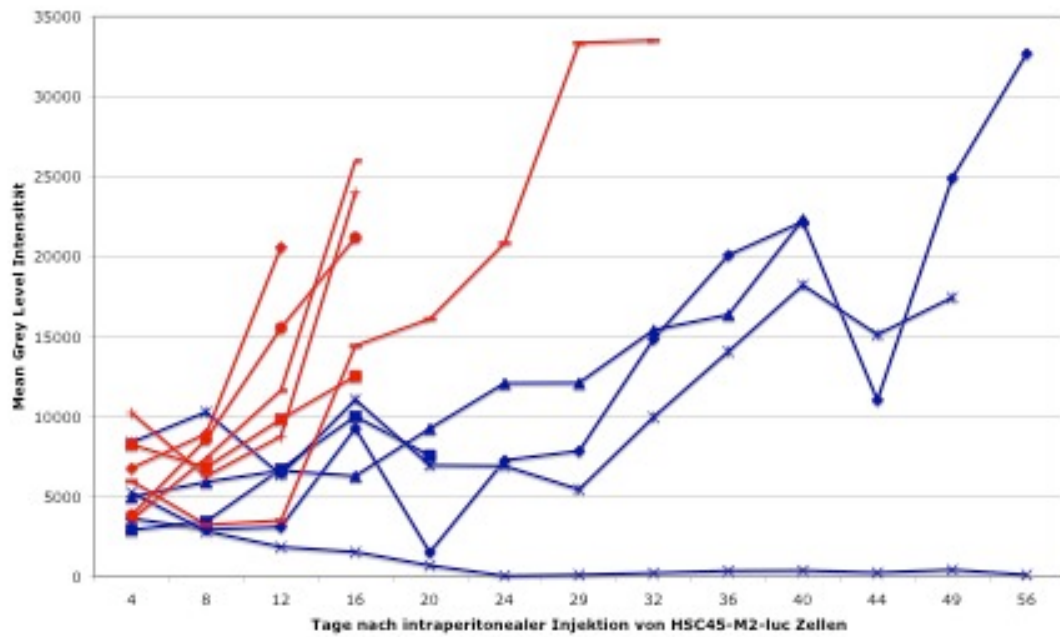


Abb.26:
Tumorentwicklung von Kontrollgruppe (rot) und Therapiegruppe (blau)

5. Diskussion

Nachweis und Therapie einer Peritonealkarzinose sind auch gegenwärtig immer noch schwierig, die Therapie meist ungenügend. Neue Ansätze für Verhinderung und Therapie der intraperitonealen Tumorausbreitung werden daher dringend benötigt. Einer dieser neuen Therapieansätze ist möglicherweise die Radioimmuntherapie mit dem Bismuth-213 markierten monoklonalen Antikörper d9-MAb, der spezifisch an mutiertes d9-E-cadherin der Magenkarzinomzelllinie HSC45-M2 bindet und diese Zellen zerstört. Diese Therapie hat sich im Tiermodell als sehr effektiv zur Behandlung intraperitonealer Tumormassen erwiesen (Senekowitsch-Schmidtke et al., 2001; Huber et al., 2003; Bloechl et al., 2005; Beck et al., 2007). Die Art des durch die ^{213}Bi -Immunkonjugate verursachten Zelltods wurde ausführlich *in vitro* untersucht (Miederer et al., 2003; Seidl et al., 2005; Seidl et al., 2007). Der Nachweis der Effizienz der ^{213}Bi -Radioimmuntherapie erfolgte durch die Bestimmung der Überlebenszeiten und die Sektion der Versuchstiere. Durch die nicht-invasive Visualisierung des Tumorwachstums zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach ^{213}Bi -d9MAb Therapie sollten die Entwicklung der Peritonealkarzinose und die Wirksamkeit der ^{213}Bi -Radioimmuntherapie auch *in vivo* analysiert werden. Ein vielversprechendes Verfahren zur nicht-invasiven Untersuchung von intraperitonealem Tumorwachstum, das schon in verschiedenen Studien zum Nachweis der Wirksamkeit verschiedener Therapieformen herangezogen wurde, ist das Biolumineszenz Imaging (Edinger et al., 1999; Sweeney et al., 1999; Edinger et al., 2003; Zeamari et al., 2004; Paroo et al., 2004).

Ein Enzym, das sich gut für nicht-invasive Aufnahmen von Tumorwachstum, Metastasierung, Therapie und anderem eignet, ist die Luciferase (Hastings, 1996; Baggett et al., 2004) des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*, Lampyridae). In Gegenwart des Substrates Luciferin produziert das Enzym Luciferase - unter Verbrauch von ATP und O_2 - Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm, das das Gewebe durchdringt und das mit hochempfindlichen Kamerasystemen erfasst werden kann (Rice et al., 2001). Eine Besonderheit der Luciferin-Luciferase Reaktion ist, dass die dabei entstehende Energie fast ausschließlich als Licht freigesetzt wird und kaum Wärme entsteht. Es

wird dabei ein Wirkungsgrad von fast 95% erreicht. Ein solcher Wirkungsgrad wird von keiner künstlichen Lichtquelle erreicht.

Zur Detektion der Proliferation und Ausbreitung der HSC45-M2 Magenkarzinomzellen mit mutiertem E-Cadherin mittels Biolumineszenz Imaging wurden diese stabil mit dem Gen, das für Firefly Luciferase codiert, transfiziert (HSC45-M2-luc). Nach Zugabe von Luciferin produzieren die HSC45-M2-luc Zellen somit Licht mit einer Wellenlänge von 562 nm und können so mit Biolumineszenz Imaging beobachtet werden.

***In-vitro*-Biolumineszenz Imaging**

Zunächst wurden das Tumorwachstum aus den HSC45-M2-luc Zellen und die Effizienz der Inkubation mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ mit Hilfe von Biolumineszenz Imaging *in vitro* untersucht. Dabei konnte bei allen eingesetzten Zellzahlen (1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5) ein Wachstum nachgewiesen werden. Die besten Ergebnisse lieferten Aussaten von 1×10^3 und 1×10^4 Zellen pro Well. Bei diesen beiden Zellzahlen war die abgegebene Lichtintensität groß genug, um mit der vorhandenen CCD-Kamera die Biolumineszenz mit sinnvollen Belichtungszeiten ($\leq 60\text{s}$) detektieren zu können. Bei kleineren Zellzahlen (1×10^2 Zellen pro Well) wären, aufgrund der geringen Lichtintensität, sehr lange Belichtungszeiten nötig gewesen. Damit wäre die Vergleichbarkeit zu größeren Zellzahlen (ab 1×10^3 Zellen pro Well) nicht gegeben gewesen, da hier bei langen Belichtungszeiten Quenching-Effekte auftreten, die eine Auswertung unmöglich machen. Die Lichtintensität blieb bei 1×10^3 und 1×10^4 Zellen pro Well immer in einem auswertbaren Bereich.

In den Biolumineszenz-Aufnahmen mittels CCD-Kamera war der Unterschied der Lichtintensitäten der verschiedenen Zellzahlen mit bloßem Auge deutlich zu erkennen. Veränderungen der Lichtintensitäten nach Therapie mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ konnten rein optisch jedoch nicht verifiziert werden. Der Unterschied der Lichtintensitäten von Zellen ohne bzw. mit Therapie mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ war demnach nicht groß genug, um ihn mit bloßem Auge sicher festzustellen. Um den Therapieeffekt nachzuweisen, mussten daher die Lichtintensitäten in Regions of Interest (ROIs) über den Zentren der mit Zellen gefüllten Wells gemessen werden. Dabei zeigte sich bei den mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ therapierten 96-Well Platten eine um circa 50% geringere Lichtintensität als bei den unbehandelten Kontrollplatten. Daraus lässt sich ableiten, dass etwa die

Hälfte der Zellen durch die Inkubation mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ abgetötet wurden. Auch im klonogenen Assay (1×10^2 Zellen pro Well) zeigte sich in der Auszählung der Zellen nach Inkubation mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ ein Überleben von etwa 50% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Somit konnte gezeigt werden, dass Biolumineszenz Imaging mit dem von uns verwendeten Kameraaufbau für den Nachweis von Tumorwachstum und Therapieeffekten im Prinzip geeignet ist. Zur exakteren Quantifizierung der Luciferase vermittelten Lichtemissionen wäre es möglich, die Zellen vor den Biolumineszenz-Aufnahmen zu lysieren, um so eine ganz homogene Verteilung der Luciferase im Well zu erreichen. Da die Untersuchung jedoch in Hinblick auf die *In-vivo*-Versuche durchgeführt wurde, sollten die Zellen vor dem Versuch nicht zerstört werden. Um auch mit intakten Zellen eine möglichst reproduzierbare Messung zu ermöglichen, wurden die Lichtintensitäten immer in identischen ROIs, jeweils genau über dem Zentrum der Wells gemessen. Eine weitere Möglichkeit, die Messung der Lichtintensitäten besser zu quantifizieren, wäre, auf ein Luminometer zurückzugreifen. Da man mit dem Luminometer jedoch nur Daten, nicht aber Aufnahmen gewinnt, und es sich somit nicht zur Visualisierung bei *In-vivo*-Versuchen eignet, haben wir uns bei der Messung der Lichtintensitäten bewusst für die CCD-Kamera entschieden.

***In-vivo*-Biolumineszenz Imaging**

Nachdem *in vitro* mit Hilfe von Biolumineszenz Imaging sowohl das proliferative Wachstum der HSC45-M2-luc Zellen als auch die Effizienz der Inkubation mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ gezeigt werden konnte, sollte die Methode auch *in vivo* eingesetzt werden. Hintergrund der Versuche war, dass mit nicht-invasivem Biolumineszenz Imaging ein kontinuierliches Monitoring der Tumorentwicklung in einem Tier möglich ist (Welsh und Kay, 2005). Zur Verfolgung der Tumorentwicklung ist es dabei nicht mehr nötig, mehrere Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tumorzellinokulation zu töten und die Tumorausbreitung zu untersuchen (Sato et al., 2004; Sadikot und Blackwell, 2005). Außerdem müssen also nicht Rückschlüsse aus den Untersuchungen verschiedener Tiere auf die Entwicklung eines Tumors gezogen werden, sondern die Tumorentwicklung kann bei jedem einzelnen

Tier im Zeitverlauf individuell beobachtet werden. Da das Tumorwachstum bei jedem Tier individuell verschieden verläuft, ist diese Art der Verlaufsbeobachtung naturgemäß erheblich genauer als die Untersuchung von vielen verschiedenen Tieren. Außerdem werden bei der Untersuchung mit Biolumineszenz Imaging deutlich weniger Tiere benötigt als mit der herkömmlichen Methode. Dies spart Kosten und ist wesentlich tierfreundlicher. Diese Vorteile des Biolumineszenz Imaging wollten wir uns zu Nutze machen und es auf die Untersuchung von Tumorwachstum und Therapieerfolg nach einer ^{213}Bi -d9MAb Behandlung anwenden.

Zur Untersuchung mittels Biolumineszenz Imaging wurde den Mäusen eine Mischung aus D-Luciferin und Anästhetikum intraperitoneal injiziert. Mit der verwendeten Narkose waren die Mäuse für etwa 20 Minuten gut anästhesiert. Um zu gewährleisten, dass sich das Luciferin gleichmäßig im Organismus verteilt hat, wurden die Aufnahmen erst zehn Minuten nach der Injektion gemacht. Nur in dem Zeitfenster zwischen den Minuten 10 und 20 nach Luciferin Injektion hat das von den Zellen abgegebene Licht die maximale Intensität. Nach 20 Minuten lässt die Lichtintensität langsam wieder nach. Daher müssen die Biolumineszenz Aufnahmen, um eine Nachinjektion von Luciferin und Anästhetikum zu vermeiden und die Vergleichbarkeit der Aufnahmen zu gewährleisten, immer innerhalb dieses Zeitfensters durchgeführt werden. Um einen guten Überblick über die Tumorausbreitung des untersuchten Tieres zu bekommen, wurden die Mäuse von ventral, dorsal, links, sowie rechts lateral aufgenommen. Dadurch ist die Lokalisation von Tumorknoten genauer zu bestimmen und sogar sehr kleine Tumorknötchen können entdeckt werden. Um möglichst viele Aufnahmen in zehn Minuten durchführen zu können, wurden kurze Belichtungszeiten (2s, 30s) gewählt, die sich in Vorversuchen als ideal für das hier verwendete Kamerasystem und *In-vivo*-Aufnahmen herausgestellt hatten. Die sehr kurze Belichtungszeit von nur 2s ermöglicht die Visualisierung der Tumorverteilung in fortgeschrittenen Tumorstadien, wenn zum Beispiel maligner Aszites vorhanden oder die ganze Bauchwand mit kleinen Tumorknoten übersät ist. Aufgrund der sehr kurzen Belichtung werden einzelne Tumorzellen im Aszites oder kleinste Tumorknoten an der Bauchwand sozusagen ausgeblendet und der Blick ist frei auf die darunter

liegenden größeren Tumorknoten. Mit der relativ langen Belichtungszeit von 30s können dagegen in frühen Tumorstadien schon kleinste Tumorknoten aufgedeckt werden. In seltenen Fällen konnten in sehr frühen Tumorstadien mit Belichtungszeiten von 60s bis 120s schon Tumorknötchen gesehen werden, die mit einer Belichtungszeit von 30s noch nicht entdeckt werden konnten. Da die Verwendung von derart langen Belichtungszeiten insgesamt jedoch eine deutliche Verlängerung der Untersuchungszeit für die Mäuse bedeutet hätte, wurden sie nicht standardmäßig durchgeführt. Eine längere Untersuchungszeit bedeutet, dass die Narkose verlängert werden muss. Dies ist mit einer verstärkten Auskühlung der Versuchstiere verbunden. Die von uns verwendete Narkose ist nicht antagonisierbar, so dass eine vorzeitige Unterbrechung der Narkose nicht möglich ist. Beides wirkt sich störend auf den normalen Stoffwechsel der Mäuse aus und könnte somit die Lichtabgabe der Tumorzellen und damit die Bildqualität beeinträchtigen. Um die Tumorsituation umfassend beurteilen zu können, braucht man zu jedem Zeitpunkt, besonders aber in fortgeschrittenen Stadien der Tumorentwicklung, Aufnahmen mit unterschiedlichen Belichtungszeiten (2s, 30s). Nur so können zum Beispiel bei Mäusen mit Peritonealkarzinose sowohl maligner Aszites als auch die intraperitoneale Tumorverteilung erfaßt werden.

Mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau für die Biolumineszenz-Aufnahmen war ein longitudinales Monitoring von Tumorwachstum und Ausbreitung möglich.

Zunächst wurde das Wachstum von Tumoren nach subkutaner Tumorzellinjektion in die Flanken von Nacktmäusen untersucht. Hier liegen die Tumoren nur unter einer relativ dünnen Hautschicht und werden nicht von anderen Strukturen überlagert. Das von den Tumoren nach Luciferininjektion produzierte Licht muß so nur eine geringe Strecke durch das Gewebe zurücklegen, wodurch die Lichtauslöschung auch relativ gering bleibt. Damit kann von der CCD-Kamera viel Licht aufgenommen werden, eine Veränderung der Lichtintensität durch Tumorwachstum kann gut bestimmt werden. Da subkutane Tumoren aufgrund ihrer exponierten Lage auch ertastet und ohne Kamera gesehen werden können, lässt sich ein

Vergleich zwischen tatsächlicher Tumorgröße und der Tumorgröße, die mit Hilfe von Biolumineszenz Imaging ermittelt wird, leicht durchführen.

Den Nacktmäusen wurden dafür in die linke Flanke 1×10^6 , in die rechte Flanke 2×10^6 HSC45-M2-luc Magenkarzinomzellen injiziert. Die Tumorentwicklung wurde, mit dem Tag der Injektion beginnend, alle drei Tage mit Biolumineszenz Imaging verfolgt. Gerade in den ersten Tagen nach der Injektion, in denen die Zellen im Gewebe anwachsen und die Tumore makroskopisch noch nicht zu sehen sind und auch das Ertasten der Tumoren noch kaum möglich ist, können diese mit Luciferase vermittelter Biolumineszenz gut verfolgt werden. Bei den von uns untersuchten Tieren zeigte sich in den ersten Tagen zunächst ein leichter Rückgang der Lichtintensität, gefolgt von einer Plateauphase. Etwa ab Tag sechs nach subkutaner Tumorzellinjektion kam es zu einer kontinuierlichen Zunahme des Biolumineszenzsignals. Der anfängliche Rückgang des Biolumineszenzsignals ist darauf zurückzuführen, dass nicht alle injizierten Zellen auch anwachsen. Diese Zellen sterben dann ab und die Lichtabgabe vermindert sich zunächst. Nachdem die Zellen angewachsen sind und sich vermehren, beginnt auch die kontinuierliche Zunahme der abgegebenen Lichtintensität.

Um die Entwicklung der subkutanen Tumoren auch graphisch darzustellen, wurden bei einer Maus bei jeder Aufnahme die Lichtintensitäten über beiden Flanken zusätzlich in ROIs gemessen. Mit dieser Methode ließ sich das Tumorwachstum gut zeigen. Die Ergebnisse waren dabei mit den durch Auswertung der Biolumineszenz-Aufnahmen gewonnenen Ergebnissen und der makroskopischen Beurteilung des Tumorwachstums vereinbar.

Ein deutlicher Vorteil von Biolumineszenz Imaging gegenüber der makroskopischen Tumorbeurteilung sowie der Autopsie und Abtötung verschiedener Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tumorzellinjektion konnte schon in diesem ersten *In-vivo*-Versuch gezeigt werden. Bei einer Maus konnte mit Biolumineszenz Imaging eine Metastasierung entlang eines Lymphgefäßes aufgedeckt werden. Durch makroskopische Inspektion der Maus wäre diese nicht zu entdecken gewesen. Dass eine solche Metatasierung durch Autopsie und nachfolgende histologische Untersuchung gefunden wird, ist möglich, aber sehr schwierig. Die Untersuchung müsste

durch einen sehr erfahrenen Pathologen durchgeführt werden, der die Metastasierungswege genau kennt und gezielt danach sucht. Mit Biolumineszenz Imaging ist es leicht, eine solche Metastasierung zu finden, sofern man immer Aufnahmen der kompletten Maus und möglichst aus allen vier Perspektiven macht. Daher wurde Biolumineszenz Imaging auch schon in mehreren Studien zur Metastasensuche und zur Untersuchung der Metastasierungswege eingesetzt (Sweeney et al., 1999; Edinger et al., 2002; Saur et al., 2005).

Sowohl die subkutanen Tumorknoten als auch die Metastasen entlang des Lymphabflusses waren bei diesem Versuch relativ oberflächlich im Körper der Mäuse gelegen. Aufgrund der dadurch geringen Lichtauslöschung waren die HSC45-M2-luc Tumoren mit der CCD-Kamera leicht zu detektieren. Pro Zentimeter Gewebstiefe vermindert sich die Photonen-Intensität um den Faktor 10. Daher erscheinen Tumoren, also Lichtquellen, die nahe an der Oberfläche liegen, generell größer und heller als Lichtquellen in der Tiefe (Weissleder R, 2001). Da dieses Problem bekannt war, wurde versucht, durch Aufnahme der Tiere mit verschiedenen Belichtungszeiten und aus vier verschiedenen Perspektiven die dadurch verursachten Schwierigkeiten zu umgehen. Nicht bekannt war allerdings, in wie weit kleine Tumorzellkluster in der Tiefe des Körpers mit unserem Versuchsaufbau überhaupt aufgenommen werden können. Deshalb wurden zwei Nacktmäusen je 1×10^6 HSC45-M2-luc Zellen in die Schwanzvene injiziert. Erwartungsgemäß waren die Tumorzellen kurz nach der intravenösen Injektion in den ersten Biolumineszenz Aufnahmen bereits in der Lunge zu sehen. Hier zeigten sich die Tumorzellen großflächig über beide Lungenflügel verteilt. Nun liegt die Lunge bei einer Nacktmaus zwar nicht sehr tief im Gewebe, sie ist jedoch durch das knöcherne Skelett gut abgeschirmt. Dass trotzdem einzelne über die Lungen verteilte Zellkluster nachgewiesen werden konnten, zeigte, dass auch gleichmäßig verteilte Tumorzellen, die tiefer im Gewebe liegen, mit Biolumineszenz Imaging aufgenommen werden können. So sind demzufolge auch Lungenmetastasen grundsätzlich einer Untersuchung mit Biolumineszenz Imaging zugänglich.

Da sich in diesen Vorversuchen der verwendete Versuchsaufbau als geeignet für die Darstellung von Tumorwachstum, die Aufnahme von

oberflächlich und tief im Gewebe gelegenen Tumorknoten, sowie für den Nachweis von Metastasen, erwiesen hatte, sollte die Entwicklung einer Peritonealkarzinose und ihre Regression nach ^{213}Bi -Radioimmuntherapie gezeigt werden.

Zu diesem Zweck wurden zwölf Nacktmäusen jeweils 1×10^7 HSC45-M2-luc Magenkarzinomzellen intraperitoneal injiziert. Bei einer Hälfte dieser Tiere wurde das Tumorstadium beobachtet, die andere Hälfte der Tiere wurde am Tag 8 nach Tumorzellinokulation intraperitoneal mit ^{213}Bi -d9MAb therapiert. Mit Biolumineszenz Imaging konnten wir dabei die Entwicklung einer Peritonealkarzinose von einzelnen kleinen Tumorknoten bis hin zu einem massiven disseminierten intraperitonealen Tumorbefall mit begleitendem malignen Aszites visualisieren. Die kleinsten Tumorknötchen, die mit Biolumineszenz Imaging entdeckt werden konnten, hatten einen Durchmesser von etwa 0,5 mm (entspricht etwa $1,6 \times 10^4$ Zellen). Solche kleinen Tumoren waren jedoch nur zu sehen, wenn sie sehr nahe oder direkt an der Bauchwand lokalisiert waren und somit nur von sehr wenig Gewebe abgeschirmt wurden. Tiefer in der Bauchhöhle gelegene Tumorknoten konnten etwa ab einem Durchmesser von 1 mm (entspricht etwa $1,2 \times 10^5$ Zellen) dargestellt werden, jedoch nur, wenn sie nicht von stark pigmentierten Organen, wie zum Beispiel der Leber, überlagert wurden. In anderen Studien wurde berichtet, dass mit Biolumineszenz Imaging 1×10^3 Zellen (Edinger et al., 1999) oder sogar nur 100 Zellen (Edinger et al., 2003) verlässlich in der Bauchhöhle nachgewiesen werden können. Das zeigt, dass die minimale Zellzahl, die nachgewiesen werden kann, sehr stark variiert. Dies liegt zum einen an der Sensitivität des verwendeten Imaging Systems, den Kameraeinstellungen und der verwendeten Belichtungszeit, zum anderen aber auch am Ausmaß der Luciferase Expression, der für den Versuch verwendeten transfizierten Zellen und der Lokalisation der Zellen im Körper des untersuchten Tieres (Wilson und Hastings, 1998). Insgesamt kann somit gesagt werden, dass sich mit Biolumineszenz Imaging unter idealen Bedingungen eine hervorragende Sensitivität erreichen lässt.

Wie erwähnt war auch mit unserem Kamerasystem und Versuchsaufbau eine Verlaufsbeobachtung der Tumorausbreitung in der Bauchhöhle möglich. Direkt nach der intraperitonealen Injektion von 1×10^7 HSC45-M2-luc

Magenkarzinomzellen schwimmen die injizierten Zellen frei in der Bauchhöhle. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die Biolumineszenz-Aufnahmen ein massives Signal über dem gesamten Bauchraum. In den folgenden 1 bis 2 Tagen kommt es zu einer starken Reduktion des Biolumineszenzsignals, bis sich allmählich kleinste Tumorknötchen entwickeln. Für die Untersuchungen wurde deshalb der vierte Tag nach intraperitonealer Tumorzellinokulation als Startpunkt gewählt, da sich zu diesem Zeitpunkt in der Regel bereits kleine, in der Bauchhöhle verteilte Tumorknoten gebildet haben. Damit beginnt auch die Ausbreitung der Peritonealkarzinose im gesamten Bauchraum. Auffällig war, dass bestimmte Lokalisationen im Bauchraum besonders häufig befallen wurden. Zum Beispiel waren die Region um das Pankreas und das die Harnblase umgebende Fettgewebe bei fast jedem Tier infiltriert. Auch der Leberhilus und das Zwerchfell waren sehr häufig betroffen.

Beginnend mit Tag 4 nach der intraperitonealen Injektion der HSC45-M2-luc Magenkarzinomzellen konnte zunächst ein lokales Wachstum der entstandenen Tumorknötchen, dann eine Ausbreitung über das Peritoneum und die gesamte Bauchhöhle visualisiert werden, bis sich schließlich eine massive Peritonealkarzinose entwickelt hatte.

Bei den Mäusen, die am Tag 8 nach der Tumorzellinokulation mit ^{213}Bi -d9MAb therapiert wurden, stellte sich die weitere Tumorentwicklung anders dar. Tag 8 nach der Tumorzellinjektion wurde als Zeitpunkt für die Therapie festgelegt, da sich bis dahin in der Regel schon einzelne Tumorknoten mit beginnender peritonealer Ausbreitung entwickelt hatten. Dieses Tumorstadium erschien zum Nachweis der therapeutischen Effizienz besonders geeignet, da die Peritonealkarzinose schon weit genug ausgeprägt ist, dass man die Therapieeffekte auch sehen kann, aber noch nicht so massiv ist, dass eine Therapie keinen Effekt mehr zeigen würde.

Wie erwartet zeigten sich nach der ^{213}Bi -d9MAb Radioimmuntherapie am Tag 8 nach Tumorzellinokulation bei den behandelten Mäusen deutliche Therapieerfolge. Kleine Tumorknötchen wurden von den α -Strahlen vollständig zerstört, größere Tumorknoten zeigten immerhin eine Größenabnahme. Letztere fingen nach der Therapie wieder an zu wachsen

und führten schließlich zum Tod der Mäuse. Tumorknoten, die durch die einmalige $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ Therapie nicht abgetötet wurden, zeigten jedoch auch in der Folge nur ein lokales Wachstum und breiteten sich nicht über das ganze Peritoneum aus. Aus diesem Grund könnte eine fraktionierte Therapie mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ eine bessere therapeutische Wirksamkeit erzielen. Dies wurde bereits in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Blöchl et al., 2005).

Die Ergebnisse der Biolumineszenz Aufnahmen stimmten auch gut mit den Befunden überein, die bei den Autopsien der Mäuse erhoben wurden. Das Peritoneum von unbehandelten Mäusen zeigte sich hier von kleinen Tumorknötchen durchsetzt und vollständig zugewachsen, während bei Mäusen, die am Tag 8 nach Tumorzellinokulation mit $^{213}\text{Bi-d9MAb}$ therapiert worden waren, nur einzelne, größere Tumorknoten in einem ansonsten glatten, tumorfreien Peritoneum gefunden wurden. Diese Ergebnisse belegen, dass die Therapie mit α -Strahlen sehr effektiv bei der Bekämpfung von kleinen Tumorknoten und Mikrometastasen ist.

Post-Mortem-Biolumineszenz Imaging

Um die Verteilung von sehr kleinen Tumorknoten in der Bauchhöhle darzustellen, wurden von einigen Mäusen *Post-mortem*-Aufnahmen durchgeführt. Dazu wurden die Tiere direkt im Anschluß an die letzten *In-vivo*-Biolumineszenz-Aufnahmen abgetötet. Den toten Mäusen wurde daraufhin umgehend die Bauchwand entfernt und es wurden erneut Biolumineszenz-Aufnahmen durchgeführt. Aufgrund der fehlenden Abschirmung durch die Bauchwand konnten dabei sehr kleine Tumorknoten in der Bauchhöhle dargestellt werden. In Biolumineszenz-Aufnahmen von einzelnen, nach dem Tod der Mäuse entnommenen Organen, konnten noch kleinere, den Organen anhaftende Tumorknötchen (< 0,5 mm) abgebildet werden. Auch im Aszites dieser Tieren konnten Tumorzellen mittels Biolumineszenz Imaging nachgewiesen werden. Die *Post-mortem*-Aufnahmen sind also sehr hilfreich für den Nachweis von kleinsten Tumoren in der Peritonealhöhle. Die Aufnahmen müssen jedoch sehr schnell nach der Abtötung der Tiere erfolgen, da das für die Licht erzeugende Luciferin-

Luciferase Reaktion essentielle ATP in toten Tieren sehr schnell verbraucht ist und nicht mehr produziert wird.

Limitationen von Biolumineszenz Imaging und Vergleich mit anderen bildgebenden Verfahren

Biolumineszenz Imaging ist, wie dargestellt, eine sehr gute Methode zur Verlaufsbeobachtung von Vorgängen in lebenden Zellen, Geweben und Versuchstieren (Welsh und Kay, 2005). Der Einsatz dieser Technik ist jedoch aus verschiedenen Gründen derzeit noch limitiert.

Für longitudinale Studien mit Biolumineszenz Imaging ist die optimale Platzierung der zu untersuchenden Objekte in der Dunkelkammer extrem wichtig. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, muss zudem der Abstand zwischen dem Objektiv der Kamera und dem zu untersuchenden Objekt bei jeder Aufnahme gleich sein. Ein Unterschied von nur wenigen Millimetern bei zwei aufeinander folgenden Aufnahmen führt bereits zu Fehlern bei der Auswertung der Aufnahmen. Mit zunehmendem Objektiv-Objekt Abstand verringert sich die von der Kamera aufgenommene Lichtintensität. Das untersuchte Objekt erscheint dadurch kleiner. In unserer Studie bedeutet dies, dass die wahre Größe und Ausdehnung des Tumors falsch eingeschätzt werden könnte. Aber nicht nur eine vertikale, sondern auch eine horizontale Verschiebung des untersuchten Objekts führt zu Fehlmessungen, da sich hier der Winkel zum Objektiv der Kamera ändert, und das Licht wiederum einen weiteren Weg zurücklegen muss (Virostko et al., 2004).

Die Anwendung von Biolumineszenz Imaging wird zu einem nicht unerheblichen Teil durch die eingeschränkte Durchdringtiefe von Licht durch Gewebe limitiert (Zeamari et al., 2004; Doubrovin et al., 2004). So erscheinen tief in der Bauchhöhle lokalisierte große Tumorknoten wegen der starken Abschirmung durch das darüber liegende Gewebe im Bild relativ klein, während direkt unter der Bauchdecke liegende kleine Tumorknoten sehr groß erscheinen. Andere, gut abgeschirmte Tumore werden unter Umständen gar nicht detektiert. Um die tatsächliche Tumorausbreitung beurteilen zu können, muss deshalb auf Hilfstechiken, wie die Verwendung von verschiedenen Belichtungszeiten und die Aufnahme der Tiere in verschiedenen Lagen, zurückgegriffen werden.

Ein weiteres Problem ist, dass die Versuchstiere mit zunehmendem Tumorbefall an Gewicht verlieren und die Dicke ihres Fettgewebes schrumpft. Damit durchdringt das von den Tumoren abgegebene Licht das darüber liegende Gewebe besser als bei normalgewichtigen Mäusen. Die abgebildeten Tumoren erscheinen dadurch größer. Bei gesunden Tieren dagegen sind die Bauchorgane zum Teil zusätzlich mit Nahrung bzw. Stuhl gefüllt. Das führt zu einer vermehrten Abschirmung des abgegebenen Lichts. Befinden sich kleine Tumoren hinter stark pigmentierten Organen wie zum Beispiel der Leber, so können sie zum Teil kaum abgebildet werden (Zeamari et al., 2004). All diese Überlegungen müssen bei der Auswertung von Biolumineszenz-Aufnahmen berücksichtigt werden und stellen einen Nachteil der Methode im Vergleich zu bildgebenden Verfahren mit Schnittbildtechnik (CT, MRT) dar, bei denen diese Probleme nicht auftreten. Trotz allem können die meisten dieser Limitationen mit Hilfstechniken, wie der Verwendung von verschiedenen Belichtungszeiten und der Abbildung der untersuchten Objekte aus verschiedenen Blickwinkeln, minimiert werden.

Biolumineszenz Imaging kann bisher noch nicht für die Diagnostik beim Menschen eingesetzt werden. In Zukunft könnte Biolumineszenz Imaging jedoch zum Beispiel bei Operationen zum Auffinden der Lymphabflußwege und des Sentinellymphknotens genutzt werden, ähnlich der bereits angewendeten Injektion von Farbstoff bzw. Radioisotopen. Der Lymphabfluss könnte damit „live“ gefilmt werden. So könnten wertvolle Informationen über die Metastasierungswege von Tumoren gewonnen werden. Ein weiteres mögliches Einsatzgebiet dieser Technik beim Menschen wäre die Untersuchung von Stoffwechselprozessen. Ein bisher ungelöstes Problem stellt hier jedoch die starke Lichtauslöschung durch Gewebe, insbesondere Knochen und stark pigmentierte Organe dar.

Trotz dieser Einschränkungen ist Biolumineszenz Imaging ein viel versprechendes Hilfsmittel zur Evaluation der Effizienz von therapeutischen Verfahren bei *In-vivo*-Studien und hat hier zum Teil eindeutige Vorteile gegenüber anderen nicht-invasiven Verfahren wie PET, MRT oder CT. So sind die Untersuchungszeiten beim Biolumineszenz Imaging kürzer als bei der MRT und der PET (Dobrovic et al., 2004). Dadurch wird der Stress für

tumortragende Tiere möglichst gering gehalten. Lichtsignale werden beim Biolumineszenz Imaging nur von Luciferase transfizierten Tumorzellen abgegeben und sind daher eindeutig zuzuordnen, während zum Beispiel bei der MRT die Unterscheidung von Tumorgewebe und nekrotischem Gewebe oft schwer gelingt (Rehemtulla et al., 2000; Vooijs et al., 2002). Bei der PET kommt es oft zu einer unspezifischen Akkumulation der verwendeten Tracer in normalen Organen oder entzündlich verändertem Gewebe. Einige Tumorentitäten können mit PET derzeit gar nicht ausreichend aufgefunden werden.

Zusammenfassend ist Biolumineszenz Imaging im Vergleich mit anderen bildgebenden Verfahren wie Tier-PET, MRT oder CT einfacher zu bedienen, es wird weniger Ausrüstung benötigt und es ist billiger in der Anschaffung (Sadikot und Blackwell, 2005).

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Biolumineszenz Imaging eine leistungsfähige und aussagekräftige Methode für die nicht-invasive Verlaufsbeobachtung des Wachstums einer Peritonealkarzinose im Tierversuch ist. Die therapeutische Effizienz der ^{213}Bi -d9MAb Radioimmuntherapie beim diffusen Magenkarzinom konnte mit Biolumineszenz Imaging nicht-invasiv nachgewiesen werden. Somit erweist sich die Methode als geeignet zur experimentellen Untersuchung von Malignomen mit diffuser Ausbreitung sowie zur Verlaufskontrolle nach Therapie.

6. Literaturverzeichnis

- Apostolidis C, Molinet R, Rasmussen G, Morgenstern A. Production of Ac-225 from Th-229 for targeted alpha therapy. *Anal Chem.* 2005; 77:6288-91.
- Baggett B, Roy R, Momen S, Morgan S, Tisi L, Morse D, Gillies RJ. Thermostability of firefly luciferases affects efficiency of detection by in vivo bioluminescence. *Mol Imaging* 2004; 3:324-32.
- Beck R, Seidl C, Pfost B, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Baum H, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. ^{213}Bi -radioimmunotherapy defeats early-stage disseminated gastric cancer in nude mice. *Cancer Sci.* 2007; 98:1215-22.
- Becker K-F, Kremmer E, Eulitz M, Becker I, Handschuh G, Schumacher C, Müller W, Gabbert HE, Ochiai A, Hirohashi S, Höfler H. Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1999; 155:1803-1809.
- Bennett JJ, Gonen M, D'Angelica M, Jaques DP, Brennan MF, Coit DG. Is detection of asymptomatic recurrence after curative resection associated with improved survival in patients with gastric cancer? *J Am Coll Surg* 2005; 201:503-10.
- Bloechl S, Beck R, Seidl C, Morgenstern A, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Fractionated Locoregional Low-dose Radioimmunotherapy Improves Survival in a Mouse Model of Diffuse-Type Gastric Cancer Using a ^{213}Bi -Conjugated Monoclonal Antibody. *Clin Cancer Res* 2005; 11:7070s-7074s.

- Borchardt PE, Yuan RR, Miederer M, McDevitt MR, Scheinberg DA. Targeted Actinium-225 in Vivo Generators for Therapy of Ovarian Cancer. *Cancer Res* 2003; 63:5084-90.
- Camera L, Kinuya S, Garmestani K, Wu C, Brechbiel MW, Pai LH, McMurray TJ, Gansow OA, Pastan I, Paik CH, et al. Evaluation of the serum stability and in vivo biodistribution of CHX-DTPA and other ligands for yttrium labeling of monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 1994; 35:882-9.
- Couturier O, Supiot S, Degraef-Mougin M, Faivre-Chauvet A, Carlier T, Chatal JF, Davodeau F, Cherel M. Cancer radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32:601-14.
- D'Angelica M, Gonen M, Brennan Mf, Turnbull AD, Bains M, Karpeh MS. Patterns of initial recurrence in completely resected gastric adenocarcinoma. *Ann Surg* 2004; 240:808-16.
- Doubrovin M, Serganova I, Mayer-Kuckuk P, Ponomarev V, Blasberg RG. Multimodality in vivo molecular-genetic imaging. *Bioconjug Chem.* 2004; 15:1376-88.
- Edinger M, Cao YA, Hornig YS, Jenkins DE, Verneris MR, Bachmann MH, Negrin RS, Contag CH. Advancing animal models of neoplasia through in vivo bioluminescence imaging. *Eur J Cancer* 2002; 38:2128-2136.
- Edinger M, Cao YA, Verneris MR, Bachmann MH, Contag CH, Negrin RS. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* 2003; 101:640-8.

- Edinger M, Sweeney TJ, Tucker AA, Olomu AB, Negrin RS, Contag CH. Noninvasive Assessment of Tumor Cell Proliferation in Animal Models. *Neoplasia* 1999; 1:303-10.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und das RKI. Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Saarbrücken, 2006.
- Hastings JW. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene* 1996; 173:5-11.
- Heiss MM, Ströhlein MA, Jäger, Kimming R, Burges A, Schoberth A, Jauch KW, Schildberg FW, Lindhofer H. Immunotherapy of malignant ascites with trifunctional antibodies. *Int J Cancer* 2005; 117:435-43.
- Huber R, Seidl C, Schmid E, Seidenschwang S, Becker K-F, Schumacher C, Apostolidis C, Nikula T, Kremmer E, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Locoregional α -radioimmunotherapy of intraperitoneal tumor cell dissemination using a tumor specific monoclonal antibody. *Clin Cancer Res* 2003; 9:3922s-3928s.
- Inoue Y, Izawa K, Toja A, Sekine R, Okubo T, Ohtomo K. Light emission requires exposure to the atmosphere in ex vivo bioluminescence imaging. *Mol Imaging*. 2006; 5:53-56.
- Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, McDevitt MR, Finn RD, Divgi CR, Ballangrud AM, Hamacher KA, MA D, Humm JL, Brechbiel MW, Molinet R, Scheinberg DA. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* 2002; 100:1233-9.
- Lordick F, Peschel C, Siewert JR. Antibody-based targeted therapy for gastric cancer. *Gastric Cancer* 2005; 8:206-8.

- Lordick F, Siewert JR. Recent advances in multimodal treatment for gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005; 8:78-85.
- Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, Hundahl SA, Estes NC, Stemmermann GN, Haller DG, Ajani JA, Gunderson LL, Jessup JM, Martenson JA. Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 2001; 345:725-30.
- Miederer M, Seidl C, Beyer G-J, Charlton DE, Vranjes-Duric S, Comor JJ, Huber R, Nikula T, Apostolidis C, Schumacher C, Becker K-F, Senekowitsch-Schmidtke R. Comparison of the radiotoxicity of two alpha-particle-emitting immunoconjugates, Terbium-149 and Bismuth-213, directed against a tumor-specific, exon 9 deleted (d9) E-cadherin adhesion protein. *Radiat Res* 2003; 159:612-620.
- Milenic D, Garmestani K, Dadachova E, Chappell L, Albert P, Hill D, Schlom J, Brechbiel M. Radioimmunotherapy of human colon carcinoma xenografts using a ²¹³Bi-labeled domain-deleted humanized monoclonal antibody. *Cancer Biother Radiopharm* 2004; 19:135-47.
- Nikula TK, Curcio MJ, Brechbiel MW, Gansow OA, Finn RD, Scheinberg DA. A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nucl Med Biol* 1995; 22:387-90.
- Nikula TK, McDevitt MR, Finn RD, Wu C, Kozak RW, Garmestani K, Brechbiel MW, Curcio MJ, Pippin CG, Tiffany-Jones L, Geerlings MW Sr, Apostolidis C, Molinet R, Geerlings MW Jr, Gansow OA, Scheinberg DA. Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry. *J Nucl Med* 1999; 40:166-76.

- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. CA Cancer J Clin 2005; 55:74-108.
- Paroo Z, Bollinger RA, Braasch DA, Richer E, Corey DR, Antich PP, Mason RP. Validating bioluminescence imaging as a high-throughput, quantitative modality for assessing tumor burden. Mol Imaging 2004; 3:117-24.
- Qu CF, Song EY, Li Y, Rizvi SM, Raja C, Smith R, Morgenstern A, Apostolidis C, Allen BJ. Pre-clinical study of ^{213}Bi labelled PAI2 for the control of micrometastatic pancreatic cancer. Clin Exp Metastasis 2005; 22:575-86.
- Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, Ross BD. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. Neoplasia 2000; 2:491-5.
- Rice BW, Cable MD, Nelson MB. In vivo imaging of light-emitting probes. J Biomed Opt 2001; 6:432-40.
- Rizvi SMA, Li Y, Song EYJ, Qu CF, Raja C, Morgenstern A, et al. Preclinical studies of Bismuth-213 labeled plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI2) in a prostate cancer nude mouse xenograft model. Cancer Biol Ther 2006; 5:386-93.
- Rosenberg R, Nekarda H, Bauer P, Schenck U, Hoefler H, Siewert JR. Free peritoneal tumor cells are an independent prognostic factor in curatively resected stage IB gastric carcinoma. Br J Surg 2006; 93:325-31.
- Sadeghi B, Arvieux C, Glehen O, Beaujard AC, Rivoire M, Baulieux J, Fontaumard E, Brachet A, Caillot JL, Faure JL, Porcheron J, Peix JL, Francois Y, Vignal J, Gilly FN. Peritoneal carcinomatosis from non-

gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer* 2000; 88:358-63.

- Sadikot RT, Blackwell TS. Bioluminescence Imaging. *Proc Am Thorac Soc* 2005; 2:537-40.
- Sato A, Klaunberg B, Tolwani R. In vivo bioluminescence imaging. *Comp Med* 2004; 54:631-4.
- Saur D, Seidler B, Schneider G, Algul H, Beck R, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, Schmid RM. CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2005; 129:1344-7.
- Seidenschwang S. Untersuchungen zur In-Vitro-Zytotoxizität von ^{213}Bi -Immunkonjugaten. Dissertation an der TU-München, Fakultät für Medizin 2006.
- Seidl C, Port M, Gilbertz KP, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Schwaiger M, Röper B, Senekowitsch-Schmidtke R, Abend M. ^{213}Bi -induced death of HSC45-M2 gastric cancer cells is characterized by G2 arrest and up-regulation of genes known to prevent apoptosis but induce necrosis and mitotic catastrophe. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6:2346-59.
- Seidl C, Schröck H, Seidenschwang S, Beck R, Schmid E, Abend M, Becker KF, Apostolidis C, Nikula TK, Kremmer E, Schwaiger M, Senekowitsch-Schmidtke R. Cell death triggered by alpha-emitting ^{213}Bi -immunoconjugates in HSC gastric cancer cells is different from apoptotic cell death. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005; 32:274-85.
- Sendler A, Prinz C, Janetschek P, Becker K, Grützner U, Lordick F, Schuhmacher C, Zimmermann F. Magenkarzinom. *Manual Gastrointestinale Tumoren.* Tumorzentrum München, 2006.

- Senekowitsch-Schmidtke R, Schumacher C, Becker K-F, Nikula TK, Seidl C, Becker I, Miederer M, Apostolidis c, Adam C, Huber R, Kremmer E, Fischer K, Schwaiger M. Highly specific tumor binding of a ^{213}Bi -labeled monoclonal antibody against mutant E-cadherin suggests its usefulness for locoregional α - radioimmunotherapy of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res* 2001; 61:2804-2808.
- Siewert JR, Lordick F, Ott K, Brücher BL, Rosenberg R. Therapeutische Strategien bei lokoregionalen Rezidiven gastrointestinaler Tumoren. *Chirurg* 2006; 77:227-35.
- Sweeney TJ, Mailänder V, Tucker AA, Olomu AB, Zhang W, Cao YA, Negrin RS, Contag CH. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:12044-9.
- Virostko J, Chen Z, Fowler M, Poffenberger G, Powers AC, Jansen ED. Factors influencing quantification of in vivo bioluminescence imaging: application to assessment of pancreatic islet transplants. *Mol Imaging*. 2004; 3:333-42.
- Vooijs M, Jonkers J, Lyons S, Berns A. Noninvasive imaging of spontaneous retinoblastoma pathway-dependent tumors in mice. *Cancer Res*. 2002; 62:1862-7.
- Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. *Nat Biotechnol* 2001; 19:316-317.
- Welsh DK, Kay SA. Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16:73-8.
- WHO, International Agency for Research on Cancer. New European cancer figures for 2004 - Cancer experts say major efforts needed against the big four killers. Press Release N°159, 17 February 2005.

- Wilson T, Hastings JW. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14:197-230.
- Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 1993; 53:5815-5821.
- Zalutsky MR, Pozzi OR. Radioimmunotherapy with alpha-particle emitting radionuclides. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 48:289-96.
- Zeamari S, Rumping G, Froot B, Lyons S, Stewart FA. In vivo bioluminescence imaging of locally disseminated colon carcinoma in rats. *Br J Cancer* 2004; 90:1259-64.

7. Zusammenfassung

Die nicht-invasive Darstellung der Tumorentwicklung im Intrapertonealraum stellt eine Herausforderung für die Bildgebung dar. Ziel dieser Arbeit war es, sowohl die Entwicklung einer Peritonealkarzinose als auch die Effizienz einer Radioimmuntherapie mit dem α -Emitter ^{213}Bi mit Hilfe von Biolumineszenz Imaging darzustellen. Dazu wurde die Veränderung der abgegebenen Lichtintensität Luciferase transfizierter Magenkarzinomzellen, die mutiertes d9-E-Cadherin exprimieren (HSC45-M2-luc), nach Radioimmuntherapie mit ^{213}Bi markierten, tumorspezifischen Antikörpern (^{213}Bi -d9MAb) mittels einer hochauflösenden CCD-Kamera mit Bildverstärker *in-vitro* und *in-vivo* optisch dargestellt.

Für *In-vitro*-Versuche wurden 1×10^2 – 1×10^5 HSC45-M2-luc Zellen in schwarze 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde die Hälfte der Platten mit ^{213}Bi -d9MAb Konjugaten (0,2MBq/Well) inkubiert, die spezifisch an mutiertes d9-E-Cadherin binden. Die andere Hälfte der Platten diente als Kontrolle und wurde mit physiologischer NaCl-Lösung behandelt. Fünf Tage nach Behandlung wurde das Überleben der Zellen mittels klonogenem Assay bzw. Biolumineszenz Imaging nach Zugabe von D-Luciferin ermittelt.

Für die *In-vivo*-Versuche wurden Nacktmäusen 1×10^7 HSC45-M2-luc Zellen intraperitoneal injiziert. Jeweils vier und acht Tage nach der Tumorzellapplikation wurde das Tumorwachstum nach intraperitonealer Injektion von D-Luciferin mittels Biolumineszenz Imaging visualisiert. Am Tag 8 nach Tumorzellinokulation erfolgte die α -Radioimmuntherapie. Dazu wurde den Mäusen ^{213}Bi -d9MAb (2.7 MBq) intraperitoneal injiziert und die Tumorentwicklung im Abstand von vier Tagen mittels Biolumineszenz Imaging verfolgt.

In-vitro zeigte sich sowohl im klonogenen Assay als auch mittels Biolumineszenz-Messungen ein Rückgang der Zellzahl um ca. 50% nach Therapie mit ^{213}Bi -d9MAb im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

In-vivo konnte nach intraperitonealer Applikation der HSC45-M2-luc Zellen in Nacktmäuse mit Biolumineszenz Imaging sowohl die Entwicklung, als auch die Lokalisation einer Peritonealkarzinose veranschaulicht werden. Kleine Tumorknötchen wurden durch die Therapie mit ^{213}Bi -d9MAb vollständig

zerstört und ließen sich nicht mehr darstellen. Bei größeren intraperitonealen Tumoren bewirkte die Therapie mit ^{213}Bi -d9MAb eine deutliche Reduktion ihrer Größe. Im weiteren Verlauf kam es, ausgehend von den verbliebenen Tumorknötchen, zu einem erneuten Tumorwachstum. Durch Messung der „mean grey level intensity“ ließ sich die Tumorentwicklung im zeitlichen Verlauf darstellen.

Mit nicht-invasivem Biolumineszenz Imaging konnten die Entwicklung einer Peritonealkarzinose, deren Lokalisation in der Bauchhöhle und die therapeutische Effizienz der ^{213}Bi -d9MAb Radioimmuntherapie gezeigt werden. Das Verfahren eignet sich somit gut zur nicht-invasiven Verlaufsbeobachtung von Tumorwachstum sowie zur Beurteilung des Erfolgs von unterschiedlichen Therapiestrategien.

Danksagung

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Professor Dr. Dr. R. Senekowitsch – Schmidtke für die Überlassung des Themas, die immer freundliche Betreuung und Beratung, die Bereitstellung des gut ausgestatteten Arbeitsplatzes an der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München und für ihre fast grenzenlose Geduld. Besonders bedanken möchte ich mich auch dafür, dass Frau Professor Dr. Dr. R. Senekowitsch – Schmidtke es mir ermöglichte, meine Arbeit auf internationalen Kongressen vorzustellen. Das selbständige Arbeiten, das ich in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Dr. R. Senekowitsch – Schmidtke erlernen durfte, war eine sehr gute Vorbereitung für das Arbeitsleben.

Ebenso bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Christof Seidl für seine unglaublich geduldige Hilfe im Labor und bei der Vorbereitung und Korrektur von Vorträgen und Manuskripten. Außerdem danke ich ihm für viele Gespräche, die mir die Arbeit im Labor erleichterten und in schwierigen Situationen für Abwechslung sorgten.

Frau Dr. Roswitha Beck möchte ich ganz herzlich dafür danken, dass Sie mir mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in das Arbeiten im Labor und mit Versuchstieren einführte.

Allen Mitarbeitern im Labor und den anderen Doktoranden danke ich für das kollegiale Umfeld, den regen Austausch von Wissen, die tatkräftige Hilfe bei Experimenten und den Spaß der uns allen oft das Arbeiten erleichterte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Freund und Kollegen Herrn Dr. Heinrich „Heinz“ Mühlhofer, der den ersten Kontakt zwischen mir und Frau Professor Dr. Dr. R. Senekowitsch – Schmidtke herstellte, mich in die Laborarbeit einführte und mich bis zur Fertigstellung der Arbeit motivierte.

Danksagung

Herrn PD Dr. K.-F. Becker gilt mein Dank für die Bereitstellung der Antikörper.

Herrn PD Dr. Dieter Saur gilt mein Dank für die Transfizierung der HSC45-M2 Zellen sowie für die Hilfe mit der CCD- Kamera und die nützlichen Tipps zum Biolumineszenz Imaging.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, die mich während der ganzen Entstehungszeit der Arbeit unterstützt haben.

Ebenso herzlich möchte ich mich bei meiner Freundin Julia Junkert bedanken, die so manche Laune von mir ertragen musste und die es immer geschafft hat, mich in schwierigen Zeiten abzulenken.