

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

**In vitro Studie zur Bewertung eines mit Wismuth-213
gekoppelten Antikörpers zur lokoregionalen
Radioimmuntherapie des Blasenkarzinoms**

Agnes Mühlfeldner

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. H. A. Wieder

Die Dissertation wurde am 13.07.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.11.2009 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Allgemeines.....	5
1.2 Zielsetzung.....	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Chemikalien und spezielle Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.2 Geräte.....	14
2.1.3 Lösungen und Puffer.....	14
2.1.4 Untersuchte Zelllinien.....	16
2.1.5 Antikörper.....	18
2.1.6 Eingesetzte Radionuklide.....	18
2.1.6.1 Jod-125 (¹²⁵ I).....	18
2.1.6.2 Wismuth-213 (²¹³ Bi).....	19
2.1.6.3 Indium-111 (¹¹¹ In).....	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Zellkulturen.....	21
2.2.2 Proliferationsstudien.....	23
2.2.3 Immunfluoreszenz mit Anti-MUC1-C595.....	23
2.2.4 Radionuklidmarkierung des Anti-MUC1.....	24
2.2.4.1 Markierung des Anti-MUC1-C595 mit ¹²⁵ I.....	24
2.2.4.2 Markierung des Anti-MUC1-C595 mit ²¹³ Bi.....	25
2.2.4.3 Markierung des Anti-MUC1-C595 mit ¹¹¹ In.....	26
2.2.5 Bindungsstudien mit Anti-MUC1-C595.....	26
2.2.5.1 Bindungsstudien mit ¹²⁵ I-Anti-MUC1-C595.....	26
2.2.5.2 Bindungsstudien mit ²¹³ Bi-Anti-MUC1-C595.....	26
2.2.6 Western Blot.....	27
2.2.7 Scatchard Analyse.....	28
2.2.8 Klonogener Assay.....	29
2.2.9 Immunhistochemie mit Anti-EGF-MAK.....	29

3 Ergebnisse	30
3.1 Proliferationstest der Zelllinien	30
3.1.1 Proliferation der Zelllinie 647V.....	30
3.1.2 Proliferation der Zelllinie EJ28.....	30
3.1.3 Proliferation der Zelllinie T24.....	31
3.1.4 Proliferation der Zelllinie RT112.....	31
3.1.5 Proliferation der Zelllinie J82.....	32
3.1.6 Proliferation der Zelllinie RT4.....	32
3.1.7 Proliferation der Zelllinie MBT2.....	33
3.2 Immunfluoreszenz mit Anti-MUC1-C595.....	33
3.3 Zellbindungsstudien mit Anti-MUC1-C595.....	37
3.3.1 Bindungsstudien mit ¹²⁵ I-markiertem Anti-MUC1-Antikörper.....	37
3.3.2 Bindungsstudien mit ²¹³ Bi-markiertem Anti-MUC1-Antikörper.....	41
3.4 MUC1-Rezeptornachweis mittels Western Blot.....	47
3.5 Quantifizierung der MUC1-Rezeptoren mittels Scatchard-Test.....	48
3.5.1 Scatchard Test der Zelllinie 647V mit ¹¹¹ In-C595.....	48
3.5.2 Scatchard Test der Zelllinie J82 mit ¹¹¹ In-C595.....	49
3.5.3 Scatchard Test der Zelllinie MBT2 mit ¹¹¹ In-C595.....	49
3.5.4 Scatchard Test der Zelllinie RT112 mit ¹¹¹ In-C595.....	50
3.5.5 Scatchard Test der Zelllinie T24 mit ¹¹¹ In-C595.....	50
3.5.6 Scatchard Test der Zelllinie EJ28 mit ¹¹¹ In-C595.....	51
3.6 Ergebnisse der Klonogenen Assays.....	51
3.7 Immunhistochemischer Nachweis der EGF-Rezeptor Expression	57
4 Diskussion	61
5 Zusammenfassung	71
6 Literaturverzeichnis	73

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Das Blasenkarzinom macht ca. 3% aller malignen Tumore aus und ist der zweithäufigste urologische Tumor nach dem Prostatakarzinom. Männer sind drei Mal häufiger betroffen als Frauen, bei ihnen ist es der vierthäufigste und bei Frauen der achthäufigste Tumor. Die Erstdiagnose erfolgt meist zwischen dem 65. und 70. Lebensjahr, dem jedoch eine Tumorentstehung von 10 bis 40 Jahren vorangeht. Zigaretten- und Pfeifenrauchen sowie die Exposition von Aromatischen Amininen, wie sie in der Textil, Leder-, Gummi-, Farben- und der organischen Chemieindustrie vorkommen, stellen Risikofaktoren für das Blasenkarzinom dar. Da die Exposition von kanzerogenen Substanzen in der Industrie zunehmend eingedämmt und die Schutzmaßnahmen für die Arbeiter verbessert wurden, steht heute der Zigarettenkonsum als Risikofaktor im Vordergrund. Weitere Risikofaktoren stellen chronische Harnwegsinfekte, Medikamente wie Phenacetin, Chlonaphzamin oder Cyclophosphamid sowie eine frühere Strahlenexposition dar (Hegele, A; 2008). In Entwicklungsländern, vor allem in Teilen Afrikas und den arabischen Ländern ist die Infektion mit *Schistosoma hämatobium* ätiopathogenetisch bedeutsam.

Das Leitsymptom bei Blasenkarzinom ist die schmerzlose Mikro- oder Makrohämaturie, weshalb eine Hämaturie bis zur endgültigen Diagnosesicherung immer als tumorverdächtig zu werten sei. Dysurien, Pollakisurie oder vermehrter Harndrang, die durch eine tumorbedingte Obstruktion des Harntraktes zu erklären sind, stellen ein weiteres, aber auch unspezifisches Symptom dar und werden vom Patienten oft nicht registriert oder als Zystitis fehlinterpretiert. Im fortgeschrittenen Stadium treten bedingt durch eine Harnstauung häufig Flankenschmerzen auf.

Das Blasenkarzinom geht in den meisten Fällen von der innersten Schicht der Harnblase, dem Urothel, meist von Papillomen derselbigen aus. Je nach betroffenenener Schleimhautschicht erfolgt die Stadieneinteilung. Die Harnblasenwand ist wie folgt aufgebaut: der innersten Schicht, dem Urothel folgt die Lamina propria, die das Urothel von der Tela Submucosa, meist nur Submucosa genannt, abgrenzt.

Einleitung

Darauf folgt die Tunica muscularis mit innerer Längs-, mittlerer Ring- und äußerer Längsmuskulatur. Die äußere Wand der Harnblase stellt die Nerven sowie Blut- und Lymphgefäße enthaltende Tunica adventitia dar.

Ergänzend zur Tumorklassifikation von 1973 unterscheidet die neue WHO-Tumornomenklatur von 2004 (Susani, M. et al.; 2003) zum einen zwischen invasiven und nicht invasiven Urothelkarzinomen, zum anderen aber auch zwischen genetisch stabilen Tumoren mit niedrig maligner Potenz, den sogenannten Low-grade-Tumoren, und genetisch instabilen Tumoren, den High-grade-Karzinomen. Bei den nicht invasiven Tumoren handelt es sich im engeren Sinne um eine Karzinomvorstufe. Hier werden zwei unterschiedliche histologische Typen unterschieden, zum einen die papillären Tumore (pTa) mit niedrig maligner Potenz und zum anderen das Carcinoma in situ (pTis), bei dem es sich um eine flache Läsion mit hohem zytologischen Grad (G3), um ein sogenanntes High-grade-Karzinom, handelt. In 80% der Fälle werden Blasenkarzinome in diesem Stadium diagnostiziert. Um ein infiltrierendes Karzinom handelt es sich, wenn der Tumor in Lamina propria eindringt (Stadium pT1). Je nach Infiltration der Muscularis spricht man von Stadium pT2a und pT2b, bei Infiltration des Fettgewebes von pT3a oder pT3b; werden Nachbarorgane infiltriert, spricht man von Stadium pT4. Auf molekulargenetischer Ebene werden bei den nichtinvasiven Tumoren häufiger oligoklonale, bei den invasiv wachsenden Karzinomen hingegen monoklonale Tumoren beschrieben. Verschiedene chromosomale Aberrationen sind bereits nachgewiesen worden, wobei die Aberration von Chromosom 9 am häufigsten ist.

Bleibt die Ausbreitung des Urothelkarzinoms auf die Schleimhaut beschränkt, das heißt handelt es sich um eine nicht invasive Karzinomvorstufe, besteht die Therapie aus der transurethralen Resektion des Tumorgewebes (Stief, C. et al.; 2008). Die 5-Jahres Überlebensrate von Patienten mit nicht invasiven Low-grade-Tumoren liegt nach transurethraler Resektion zwischen 81% und 96%. Bei nicht invasiven High-grade Karzinomen jedoch liegt das Rezidivrisiko nach transurethraler Resektion bei 80% und in 50 – 65% der Fälle entwickelt sich ein muskelinvasives Stadium (Soloway, MS et al.; 2002). Ursächlich hierfür ist wohl die erleichterte Implantation von solitären Tumorzellen in durch transurethrale Resektion geschädigtem Gewebe.

Einleitung

Deshalb kann zur Senkung des Rezidivrisikos nach transurethraler Resektion eine intravesikale Chemotherapie mit Mitomycin C, Adriamycin, Paclitaxel, Thiotepa, Gemcitabine, Doxorubicin, Valrubicin oder Epirubicin oder aber auch mit Immunstimulanzien wie BCG (Bacille-Calmette-Guerin) oder Keyhole-limpet hemocyanin (KLH) (McFadden, D.W. et al.; 2003) angeschlossen werden.

Als Standardtherapie bei nicht invasiven High-grade-Blasentumoren wird aktuell nach transurethraler Resektion Mitomycin C postoperativ sofort intravesikal instilliert. Das Rezidivrisiko lässt sich dadurch um bis zu 39% senken (Sylvester, RJ et al.; 2004). Die postoperative, intravesikale BCG-Instillationstherapie ist die Standardtherapie für das Carcinoma in situ oder wird bei Therapieversagen der Chemoinstillationstherapie angewendet. Handelt es sich um eine muskelinvasive Form des Blasenkarzinoms, ist häufig eine komplette Zystektomie unumgänglich, nicht selten zusammen mit den Nachbarorganen. Eine adjuvante und / oder neoadjuvante, meist cisplatinbasierende, systemische Chemotherapie (Garcia, J.A. et al.; 2006) wird je nach Staging empfohlen und senkt einerseits die Rezidivrate, führt andererseits jedoch zu erheblichen Nebenwirkungen. In einigen Fällen wird zum Erhalt der Blase eine kombinierte Radiochemotherapie empfohlen, eine alleinige Strahlentherapie ist bei Blasenkarzinomen die Therapie der Wahl bei palliativer Zielsetzung.

Probleme und Limitationen der bisher eingesetzten Therapien stellen die zum Teil sehr erheblichen Nebenwirkungen dar. Darüber hinaus ist innerhalb von 5 Jahren beim nicht muskelinvasiven High-grade-Tumor nach transurethraler Resektion und adjuvanter Mitomycin C - oder BCG-Instillationstherapie immer noch eine Rezidivrate von bis zu 40% zu verzeichnen. Nach BCG-Therapie werden grippale und zystische Symptome wie Makrohämaturie beschrieben, Prostatitis und septische Krankheitsbilder, die zum Therapieabbruch bei 10% der Patienten führen. Der Einsatz von systemischen, chemotherapeutischen Substanzen kann zu Myelosuppression mit konsekutiver Infektneigung und Erythrozytentransfusionspflichtigkeit, Blutungen, kardialen Arrhythmien, intestinalen Beschwerden, Alopezie und allergischen Reaktionen führen. Unter Strahlentherapie treten vermehrt Müdigkeit, Hautschäden, Diarrhoen und Blasenfunktionsstörungen auf.

Einleitung

Diese nur bedingt befriedigenden Ergebnisse der bisherigen Therapieansätze lassen uns nach neuen Therapieoptionen und -strategien suchen. Dabei steht in dieser aktuellen in vitro Studie die Bewertung eines radionuklidmarkierten monoklonalen Antikörpers zur Entwicklung neuer adjuvanter Therapiestrategien nach transurethraler Resektion im Vordergrund. Eine mögliche und viel versprechende Therapieoption könnte die lokoregionale, intravesikale Applikation von α -Emitter-Immunkonjugaten sein. Dabei werden α -Partikel emittierende Nuklide mithilfe eines geeigneten Chelator an einen Antikörper gekoppelt, der selektiv an tumorassoziierte beziehungsweise tumorspezifische Antigene bindet. α -Partikel-emittierende Nuklide haben ein hohes zytotoxisches Potenzial und sind deshalb hervorragend geeignet für eine zielgerichtete Radionuklidtherapie von Tumorerkrankungen (Seidl, C. et al.; 2008).

Aufgrund der großen Masse der α -Partikel ist ihre Reichweite im Gewebe nur sehr kurz und beträgt 50 – 100 μ m. Aus ihrer hohen Energie ergibt sich damit ein linearer Energietransfer (LET) von ca. 100keV/ μ m. Diese Eigenschaft bedingt das hohe Ionisationspotenzial und damit die für α -Strahler charakteristische hohe Zytotoxizität. Der lineare Energietransfer, das heißt die pro Wegstrecke abgegebene Energie von α -Partikeln, ist im Vergleich zu β -Emittern deutlich höher, woraus eine hohe relative biologische Wirksamkeit (RBW) resultiert. Zudem weisen die von α -Emittern freigesetzten ^4He -Kerne eine deutlich höhere kinetische Energie (4 – 9MeV) auf als Elektronen, die aus dem Atomkern von β -Strahlern emittiert werden (0,3 – 2,3MeV). Die starke zytotoxische Wirkung von α -Emittern führt damit zu einer hohen Rate von DNA-Doppelstrangbrüchen, die oft nur fehlerhaft repariert werden können und schließlich zum Tod der Zelle führen. Infolge dieser Eigenschaften eignen sich α -Strahler für die Therapie von Tumoren mit disseminieren Metastasen oder kleinen Tumorzellklustern, vorzugsweise nach Resektion von Primärtumoren, die zu lokoregionalen Rezidiven oder intrakavitärer Metastasierung neigen. Durch diese hohe Zytotoxizität von α -Emittern sollte ein Kontakt zu gesundem Gewebe möglichst vermieden werden. Es ist daher notwendig, geeignete Trägermoleküle für den Transport der α -Strahler an die Struktur der Zielzelle zu finden. Hierbei ist sowohl die stabile Bindung des Radionuklids an das Trägermolekül als auch eine hohe Affinität

sowie Spezifität des Carriers an die Zielzelle von hoher Bedeutung (Courturier, O. et al., 2005).

Wegen mangelnder Verfügbarkeit geeigneter α -Strahler wurden bisher für die Radioimmuntherapie in erster Linie β -Strahler verwendet. Erst seit einigen Jahren steht zur Elution von Wismuth-213 (^{213}Bi) ein Actinium (^{225}Ac) – Generator zur Verfügung. Über Zwischenprodukte zerfällt ^{225}Ac in ^{213}Bi und dieses zu Blei-209 (^{209}Pb), woraus das stabile ^{209}Bi entsteht. Eine γ -Emission mit einem Energiemaximum von 440keV ermöglicht eine Detektion der Strahlung im Gamma-Counter.

Bereits in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe (Senekowitsch-Schmitke, R. et al.; 2001, Huber, R. et al.; 2003) konnte eine selektive Bindung eines tumorspezifischen Antikörpers gegen E-Cadherin an Magentumorzellen gezeigt werden. Mittels Scatchard-Analyse zeigte sich eine selektive Bindung des monoklonalen Antikörpers d9MAB an Magenkarzinomzellen und keine Bindung an gesunde Zellen der Magenschleimhaut. Dieser Nachweis gelang sowohl bei Konjugation des Antikörpers mit Jod-125 (^{125}I) als auch mit dem Alphastrahler Wismuth-213 (^{213}Bi). Im Mausmodell konnte eine spezifische Bindung des ^{213}Bi -markierten Antikörpers an Magenkarzinomzellen im Aszites der Maus mittels Szintigrafie bestätigt werden. Ferner zeigten sich überzeugende Therapieergebnisse nach Instillation des radionuklidmarkierten Antikörpers bei Peritonealkarzinose. Könnte, analog zum Magenkarzinom, ein tumorassoziiertes Antigen auf Blasenkarzinomzellen und ein dafür spezifischer Antikörper gefunden werden, so wäre damit eine weitere Option zur intravesikalen Therapie des Harnblasenkarzinoms mit den α -Strahlern gegeben. Die relativ einfache Zugänglichkeit zur Harnblase via Harnröhre mittels eines Katheters würde eine Instillation von radiomarkiertem Antikörper direkt in die Harnblase erleichtern.

Es wurde bereits eine Überexpression des Glykoproteins MUC1 auf Blasenkarzinomzellen nachgewiesen (Murray A. et al.; 2001). Das konnte durch Konjugation des Antikörpers C595 mit Rhenium-188 (^{188}Re) sowohl in einem ex vivo Modell nach Blasenresektion als auch in vivo nach intravesikaler Instillation am

Patienten szintigrafisch bestätigt werden.

Bei dem MUC1 handelt es sich um ein mucinöses Glykoprotein, das auf den Oberflächen verschiedener glandulärer Epithelzellen von Brustdrüsen, Kolon, Niere, Leber, Lunge, Pankreas und Speicheldrüsen exprimiert wird. Bei Tumoren findet man eine vermehrte Expression bei Karzinomen der Brust, der Lunge, des Gastrointestinaltrakts, des Ovars, der Niere und Harnblase. Auf der Oberfläche von malignen Harnblasenepithelzellen wurde eine vermehrte Expression von MUC1 Mucin mit dem Peptidepitop „Arg-Pro-Ala-Pro“ beobachtet (Hughes, OD et al.; 1997). Die Funktion des MUC1-Antigens besteht vermutlich in der Inhibition der Zelladhäsion. Die Bindung von körpereigenen zytotoxischen Lymphozyten an die Tumorzelle und somit der Einsatz der körpereigenen Immunantwort wird durch das MUC1 Mucin verhindert (Sherblom et al; 1986). Der monoklonale Antikörper C595, auch bekannt als NCRC48, erkennt das tetramerische Peptidepitop des MUC1-Antigens und wurde bereits bei in vitro Versuchen an Pankreaskarzinomzellen verwendet (Qu, C.F. et al.; 2004). Der serologische MUC1-Spiegel eignet sich zur Tumorverlaufskontrolle, ist jedoch ungeeignet beim Einsatz zum Tumorscreening (Simms, M.S. et al.; 1999). In einer Studie an 20 Patienten mit Blasenkarzinom unterschiedlichen Stadiums konnte eine neue Form des Stagings mittels Immunszintigrafie entwickelt werden. Der monoklonale Anti-MUC1-Antikörper C595 gekoppelt an ^{99m}Tc zeigte bei 16 Patienten eine positive Lokalisation in der Immunszintigrafie (Simms et al.; 2001). Gekoppelt an ¹¹¹In konnte der monoklonale Anti-MUC1-Antikörper C595 für die szintigrafische Detektion primärer Blasenkarzinome, Rezidive und Fernmetastasen eingesetzt werden (Hughes, O.D. et al.; 2001). Der mit ⁶⁷Cu gekoppelte C595 wurde auf seine Bindung an Blasenkarzinomzellen nach intravesikaler Instillation bei 15 Patienten getestet. Hier zeigte sich ein im Vergleich zu tumorfreiem Gewebe erhöhter Tumor-Uptake zwei und 24 Stunden nach Instillation (Hughes et al.; 2000).

1.2 Zielsetzung

Bisherige erfolgreiche und viel versprechende Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe mit ²¹³Bi markiertem Antikörper zur Therapie disseminierter Tumorzellen ließen uns Versuche mit dem monoklonalen Anti-MUC1-Antikörper zur Therapie des

Einleitung

Blasenkarzinoms planen. Gekoppelt an ^{125}I und ^{213}Bi wurden Bindungsstudien mit verschiedenen humanen Blasenkarzinomzelllinien (EJ28, T24, 647V, J82, RT112, RT4) und der murinen Blasenkarzinomzelllinie MBT2 durchgeführt. Um eine Überexpression des MUC1-Antigens auf verschiedenen Blasenkarzinomzellen zu verifizieren, erfolgten zunächst Vorversuche. Über Immunfluoreszenztests sowie Bindungsstudien konnte die vermehrte Expression von MUC1 auf den Karzinomzellen nachgewiesen werden. Der Vorteil der Radionuklidmarkierung mit ^{125}I besteht darin, dass der Antikörper sowohl in chelatierter als auch in unchelatierter Form getestet werden kann. Die anschließenden Versuche mit dem α -Emitter ^{213}Bi stellen den Hauptanteil dieser Studie dar. Über Bindungsversuche mit ^{213}Bi -C595 und Scatchard Tests mit ^{111}In -C595 wurde sowohl Überexpression als auch Affinität des Antikörpers zum Antigen getestet. Mittels Western Blot konnte das Antigen nachgewiesen werden, mittels klonogenen Assays die Toxizität des α -Emitters. Bei den Versuchen mit dem α -Emitter ^{213}Bi wurde derselbige mittels eines geeigneten Chelators an den MUC1-Antikörper gekoppelt. Die Ermittlung des Ausmaßes der Expression und damit der Bindung des ^{213}Bi -gekoppelten Antikörpers an unterschiedliche Blasenkarzinomzelllinien stellt das Hauptaugenmerk dieser Studie dar. Studien anderer Arbeitsgruppen (Cheng, J, et al.; 2002, Bellmuth, W.A. et al.; 2003) zeigen eine weitere Expression anderer tumorspezifischer Antigene auf Blasenkarzinomzellen. So wird eine Überexpression des EGF (Epithelial Growth Factor)-Rezeptors bei über 80% der Patienten mit Blasenkarzinom beschrieben. Immunhistochemische Untersuchungen mit einem Anti-EGF-Antikörper (Anti-EGF-MAK) zeigen abschließend weitere Therapieausblicke für eine alternative, adjuvante lokoregionale Therapie des Blasenkarzinoms mit ^{213}Bi gekoppeltem Anti-EGF-MAK.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und spezielle Verbrauchsmaterialien

Acrylamid (30%) (Sigma, Deisenhofen)

Ammoniumacetat (Sigma, Deisenhofen)

Ammoniumpersulfat (Sigma, Deisenhofen)

Antihumaner CD227 Maus-Ak (Fa. Serotec Ltd, Oxford, UK)

Klon-Nr.: C595 (NCRC48)

Isotyp IgG3 (Maus)

Antigen: MUC1 mucin des Harnblasenepithels

Anti-Maus Antikörper (Sigma, Deisenhofen)

Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma, Deisenhofen)

5-Bromo-4-Chloro-3-Indol YL Phosphate (Sigma, Deisenhofen)

Casein (Sigma, Deisenhofen)

CasytonR-Lösung (Schärfe, Reutlingen)

Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Chelating Resin (Sigma, Deisenhofen)

CY 3 konjugierter Sekundär-Ak) (Chemicon international, Temecula, CA)

Gt X Rat IgG (H+L), Lot.Nr.: 22100311

DC-Platte (Sigma, Deisenhofen)

DMSO Freeze Medium (Bio Veris TM)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung (Fa.c.c.pro GmbH)

Fetal Bovine Serum (FCS) (Biochrom, Berlin)

Fibrinogen (Sigma, Deisenhofen)

Formalin (Merck, Darmstadt)

Material und Methoden

Gel Blotting Papier (Schleicher & Schuell)

L-Ascorbinsäure (Sigma, Deisenhofen)

L-Glutamin (200 mM) (Biochrom, Berlin)

Magermilchpulver (Sigma, Deisenhofen)

McCoy's 5A modified Medium (1x) (Biochrom, Berlin)
w 2.2 g/l NaHCO₃, w/o L-Glutamine

Methanol (Merck, Darmstadt)

Natriumjodid (NaJ) (Sigma, Deisenhofen)

Nitro Blue Tetrazolium (Sigma, Deisenhofen)

ITLC™ SG-Membran (Gelman Sciences, Ann Arbour)

Jodogen^R (Pierce Chem, Rotterdam),

Paraformaldehyd, 4 %ig (Merck, Darmstadt)

PD-10 Säule (Pharmacia Biosystems)

Penicillin-Streptomycin (10000 U / 10000µg/ml) (Biochrom, Berlin)

Polymehtylsulfonylflouride (PMSF) (Sigma, Deisenhofen)

Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membranen (Milipore)

Phosphate Buffered Saline (PBS-Puffer) (Biochrom, Berlin)
Dulbecco (1x) w/o Ca²⁺, Mg²⁺

Roti-Load (4x) (Roth, Karlsruhe)

RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin)
w 2.0 g/l NaHCO₃, w 0.532 g/l stable glutamine

Salzsäure (HCL suprapur 30%) (Merck, Darmstadt)

Sodiumdodecylsulfat (SDS) (Sigma, Deisenhofen)

Sodium-Pyruvat (100mM) (Biochrom, Berlin)

TBS (10x) (Merck, Darmstadt)

Temed (Sigma, Deisenhofen)

Thrombin (Sigma, Deisenhofen)

Tris/Glycin/SDS-Puffer (10x) (BioRad, USA)

Tri-Na-Citrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt)

Tris-Puffer (Sigma, Deisenhofen)

Trypsin / EDTA Lösung (Biochrom, Berlin)
0,05% / 0,02% (w/v) in PBS w/o Ca^{2+} / Mg^{2+}

Tween 20 (Merck, Darmstadt)

2.1.2 Geräte

Analysenwaage (Sartorius)

Biofuge 13 (Heraeus Sepatech, Osterode)

Blottingapparatur (Höfer, USA)

Brutschränke (Heraeus Sepatech, Osterode)

Cell Counter, CASY R (Schärfe, Reutlingen)

Fluoreszenzmikroskop (Olympus BH-2)

Gamma-Counter TYP 1480 WIZYRD TM 3 (Wallac, Finnland)

Laminar-Flow-Arbeitsbank (Heraeus Sepatech, Osterode)

Lichtmikroskop Axiovert 10 (Zeiss, Oberkochen)

Megafuge 1.0 R (Heraeus Sepatech, Osterode)

Radio-DC-Detektor

Wasserbad (Memmet Typ W 270)

2.1.3 Lösungen und Puffer

Blocking-Puffer, 5%ig und 0,1%ig:

TTBS-Puffer + Magermilchpulver

Material und Methoden

Blotting-Puffer (Glycin-MeOH-Puffer):

20mM	Tris
150mM	Glycin
20%	MeOH

BSA-PBS-Lösung, 1%ig

Dünnschichtchromatographie – Laufpuffer:

65%	Aceton
5%	H ₂ O <small>bidest</small>
20%	Butanol
20%	Ammoniak

EDTA-PBS-Lösung, 1mM

Elektrophorese-Puffer (Tris-Glycin-SDS-Puffer) (10x):

25mM	Tris
192mM	Glycin
0,1%	SDS

Sammelgel:

1,34ml	Acrylamid, 30%ig
2,5ml	Sammelgelpuffer (4x)
6,1ml	H ₂ O <small>bidest</small>
10µl	Temed
100µl	Ammoniumpersulfat

Sammelgelpuffer (4x)

Trenngel, 12%ig:

8,4ml	Acrylamid, 30%ig
5ml	Tris-SDS-Puffer (4x) Trenngel-Puffer, pH=8,8
6,4ml	H ₂ O <small>bidest</small>
20µl	Temed
200µl	Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung, 10%ig

Trenngel, 8%ig:

5,2ml	Acrylamid, 30%ig
5ml	Tris-SDS-Puffer (4x) Trenngel-Puffer, pH=8,8
9,58ml	a.d.
20µl	Temed

200µl Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung, 10%ig

TBS (10x):

10mM Tris / HCl

0,9% NaCl (154mM)

Tris-SDS-Puffer (Trenngelpuffer):

90,75g Tris

2g SDS

ad 500ml a.d.

Western-Blot-Puffer (TTBS – Tween-Tris-buffered saline), pH=7,5:

10mM Tris / HCl

0,9% NaCl (154mM)

0,1% Tween 20

Zellkulturmedien:

500ml RPMI 1640 Medium

+ 50ml FCS

+ 5ml Penicillin-Streptomycin

500ml McCoy's 5A modified Medium (1x)

+ 50ml FCS

+ 5ml Penicillin-Streptomycin

+ 5ml Sodium-Pyruvat (100mM)

+ 5ml L-Glutamin (200mM)

2.1.4 Untersuchte Zelllinien

647V

Diese Zelllinie wurde aus einem primären humanen Harnblasenkarzinom (histologischer Grad II) isoliert. Die Herkunft und der Patient sind unbekannt. Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer. Sie exprimieren den MUC1-, MUC2- und MUC7-Rezeptor (Retz et al.; 1998).

EJ28

Diese Zelllinie wurde aus einem primären Harnblasenkarzinom (Transitionalzellkarzinom, histologischer Grad III) eines Kaukasiers isoliert. Das

Geschlecht und das Alter des Patienten sind unbekannt. Die Zellen wachsen epithelial adhärenent als Monolayern.

T24

Diese Zelllinie wurde 1970 aus einem primären Harnblasenkarzinom (Transitionalzellkarzinom, histologischer Grad III) einer 81jährigen kaukasischen Frau isoliert. Die Zellen wachsen adhärenent epitheloid als Monolayer. Diese Zelllinie trägt eine p53 Mutation und sezerniert eine Vielzahl an Zytokinen, wie zum Beispiel G-CSF, IL-6 und SCF.

RT112

Diese Zelllinie wurde 1973 aus einem unbehandelten, primären Harnblasenkarzinom (Transitionalzellkarzinom, histologischer Grad II) einer weiblichen Patienten isoliert. Das Alter und die Herkunft der Patientin sind unbekannt. Die Zellen wachsen adhärenent epithelial als Monolayer.

J82

Diese Zelllinie wurde aus einem primären Harnblasenkarzinom (Transitionalzellkarzinom, histologischer Grad III) eines 58jährigen kaukasischen Mannes isoliert. Es handelt sich um eine anaplastische Harnblasenkarzinomzelllinie, die Zellen wachsen adhärenent als Monolayer.

RT4

Diese Zelllinie wurde 1968 aus einem bereits therapierten Harnblasenkarzinom (papilläres Transitionalzellkarzinom, klinisches Stadium T2, histologischer Grad I) eines 63jährigen Mannes isoliert. Es war bei diesem Patienten zwei Jahre zuvor eine Therapie mit Gold erfolgt und nach Auftreten eines Rezidivs, zehn Monate später, war eine Radiatio durchgeführt worden.

MBT2

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine murine Blasenkarzinomzelllinie. Die Zellen wachsen adhärenent epitheloid als Monolayer (Shapiro et al.; 1984).

2.1.5 Antikörper

Muriner Primärantikörper C595

Für die Versuche unserer Studie wurde der murine Anti-Human-Antikörper CD227 der Klon-Nummer C595 (NCRC48) verwendet. Es handelt sich hier um einen über Chromatografie (Price, M.R. et al.; 1991) gereinigten IgG-Antikörper, der mit einer Konzentration von 1mg/ml geliefert wurde. Der Klon C595 erkennt die Peptidpitope ARG-PRO-ALA-PRO im „core protein“ von MUC1 (Denton, G. et al.; 1995). Als Positivkontrolle werden Mammakarzinomzellen empfohlen. Auf der Zelloberfläche von gesunden Zellen bindet der Antikörper an ein mucinöses Glykoprotein (MUC1) glandulärer Epithelzellen von Brustdrüsen, Niere, Kolon, Leber, Pankreas, Lunge und Speicheldrüsen. Außerdem können glatte Muskelzellen der Gefäße und Fibroblasten im Stroma erkannt werden. Eine starke Expression findet man ferner in Tumorzellen von Karzinomen der Lunge, Mamma, Niere, Ovar, Harnblase und des Gastrointestinaltrakts. Auch Mesotheliome, synoviale Sarkome und maligne fibröse Histiozytome zeigen eine MUC1-Überexpression. Es wird sowohl eine zytoplasmatische als auch eine apikale Verteilung des Antigens beobachtet.

Anti-Maus-Sekundärantikörper CY3:

Hier handelt es sich um einen aus der Ziege stammenden fluorchromierten IgG-Zweitantikörper, der für die Methode der indirekten Immunfluoreszenz verwendet wird. Dieser subklassenspezifische Anti-Maus-Antikörper wurde mit dem Immunreagenz Indocarbocyanin konjugiert. Das stark rot fluoreszierende Carbocyanin 3 (Cy3) visualisiert beim Immunfluoreszenztest im zweiten Inkubationsschritt die spezifischen Bindungen.

2.1.6 Eingesetzte Radionuklide

2.1.6.1 Jod-125 (¹²⁵I)

¹²⁵I hat eine Halbwertszeit von 59,4 Tagen. Es zerfällt in Xenon-125 (¹²⁵Xe) und emittiert 35,5keV Gamma-Strahlung. Beta-Strahlung entsteht dabei nicht. Der therapeutische Effekt von ¹²⁵I ist auf die Wirkung der Auger-Elektronen zurückzuführen, die Energien im Bereich von 3,2 – 34,5keV aufweisen.

2.1.6.2 Wismuth-213 (^{213}Bi)

Das Radiometall ^{213}Bi ist ein Zerfallsprodukt von ^{225}Ac und hat eine Halbwertszeit von 45,6 Minuten. Sein verzweigter Zerfall erfolgt zu 98% zu ^{213}Po , welches mit einer Halbwertszeit von 4,3 μs unter α -Emission in ^{209}Pb umgewandelt wird und somit den eigentlichen α -Strahler darstellt. Die von dem α -Strahler emittierte Energie beträgt 8,4 MeV. 2% der verbleibenden ^{213}Bi -Fraktion wandeln sich zu Thallium-209 (^{209}Tl) um, welches anschließend auch zu Blei-209 (^{209}Pb) zerfällt. ^{209}Pb wird mit einer Halbwertszeit von 3,3 Stunden zu stabilem ^{209}Bi umgewandelt. Die beim Zerfall von ^{213}Bi ebenfalls freiwerdende γ -Emission hat ein Energiemaximum von 440 keV und diente uns zur Detektion von ^{213}Bi im γ -Counter.

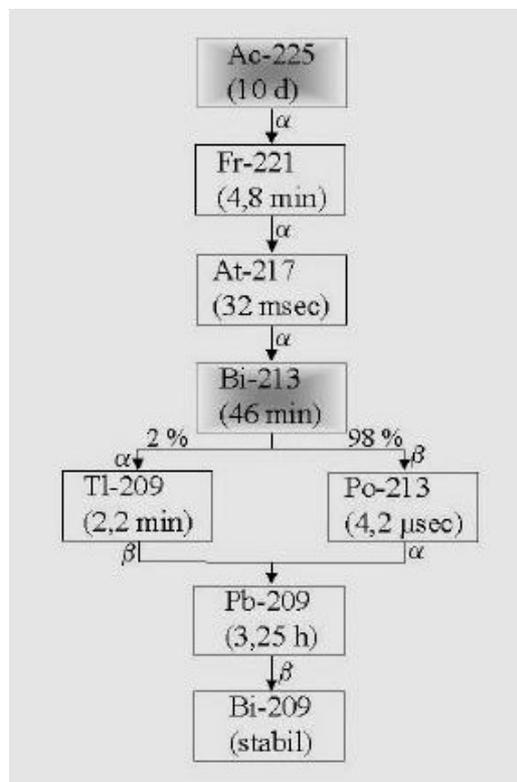


Abb. 1: Zerfallsreihe von Actinium-225

Die Gewinnung von ^{213}Bi erfolgt mittels Eluierung aus einem $^{225}\text{Ac} / ^{213}\text{Bi}$ Generator, der vom Institut für Transurane der Europäischen Kommission in Karlsruhe bezogen wird und bei dem das Mutternuklid ^{225}Ac an die anorganische Matrix AGMP-50 stabil gekoppelt ist. Voraussetzung für die Herstellung des Generators ist ^{225}Ac , welches zunächst aus einem $^{229}\text{Th} / ^{225}\text{Ac}$ -Generator eluiert wird. Daraus resultiert ein Gemisch aus ^{225}Ra , ^{226}Ra und ^{225}Ac . Via Reinigungssäule kann freies ^{225}Ac

gewonnen werden. Das gewonnene ^{225}Ac wird in Form von ^{225}Ac -Nitrat an ein Kationen-Austauschharz gebunden und anschließend in eine Flourpolymer Säule überführt. Aus dem so entstandenen $^{225}\text{Ac} / ^{213}\text{Bi}$ Generator kann über ca. 6 Wochen ^{213}Bi eluiert werden. Die Eluierung von ^{213}Bi -Anionen sowie Bindung an den entsprechenden Antikörper erfolgt wie unter Punkt 2.2.4.2 beschrieben.

2.1.6.3 Indium-111 (^{111}In)

^{111}In hat eine Halbwertszeit von 2,8 Tagen und zerfällt zu stabilem Cadmium. Es emittiert γ -Strahlung mit Energien von 171 – 245keV. Die Auger-Elektronen der unterschiedlichen Schalen haben Energien im Bereich von 0,5 – 25keV. Der ^{111}In markierte Antikörper wurde zur Bestimmung der Anzahl der Antigene auf der Blasenkarzinomzelllinie mittels Scatchard Analyse verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

Man unterscheidet bei Zellkulturen zwischen Primärkulturen und etablierten Zelllinien. Während Primärkulturen direkt aus einem Organismus entnommen und anschließend in vitro weiter gezüchtet werden, handelt es sich bei etablierten Zelllinien um bereits präparierte und kultivierte Tumorzelllinien. Sie können in flüssigem Stickstoff (-196°C) konserviert, erneut aufgetaut und kultiviert werden. Bei den in den vorliegenden Versuchen verwendeten Zellen handelt es sich um etablierte Zelllinien, die als Monolayer wachsen.

Wird eine Zelllinie nach Kryokonservierung kultiviert, wird zunächst ein verzögertes Wachstum der Zellen, die sogenannte lag-phase, beobachtet. Diese kann sich auf Stunden beschränken aber auch Tage andauern. Die darauf folgende logarithmische Wachstumsphase der Zellen wird mathematisch als Exponentialgleichung beschrieben: $y = a \cdot e^{b \cdot x}$. Y entspricht dabei der Zellzahl, a entspricht der Zellzahl, die aus der grafisch dargestellten Proliferationskinetik ermittelt wurde, e stellt die Eulersche Zahl (2,71828) dar, b entspricht dem Exponenten, der aus der grafisch dargestellten Proliferationskinetik ermittelt wurde und x stellt das Zeitintervall in Stunden dar.

Bei Zellen, die als Monolayer wachsen ist es wichtig den Zellen eine adäquat große Oberfläche zur Anhaftung zu bieten um ein Stagnieren des Wachstum zu verhindern. Durch ein ausreichendes Nährstoffangebot werden optimale Wachstumsbedingungen gewährleistet. Für die Zelllinien 647V, EJ28, T24, RT112, J82 und MBT2 wird das RPMI 1640 Medium mit dem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin-Streptomycin verwendet. Die Zelllinie RT4 benötigt McCoy's 5A Modified Medium (1x) mit dem Zusatz von 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% Natrium-Pyruvat und 1% L-Glutamin. Ein pH-Indikator im Kulturmedium kennzeichnet mittels Farbumschlag einen sinkenden pH-Wert. Bei gutem Wachstum der Zelllinien entstehen Stoffwechselprodukte, die eine Ansäuerung des Milieus zur Folge haben und eine Erneuerung des Kulturmediums notwendig machen. Die Zellkultivierung erfolgt unter 5% CO₂-Spannung, bei einer Luftfeuchtigkeit von 100%

und bei einer Temperatur von 37°C. Sterile Arbeitsbedingungen sind durch eine Laminar-Flow-Arbeitsbank sowie durch autoklavierte Instrumente und Gerätschaften gewährleistet. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe. Ein sogenanntes dichtes Zellrasenwachstum einer Kulturflasche der Größe 175 cm² entspricht etwa einer Zellzahl von 1x10⁷ Zellen. Zur weiteren Verarbeitung müssen die Zellen zunächst vom Kulturflaschenboden abgelöst werden. Nach Entfernen des Kulturmediums werden Mediumrückstände durch Spülen des Zellrasen mit PBS entfernt. Durch Inkubation bei 37° mit einer 1mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-PBS-Lösung lösen sich die Zellen in der Regel vom Kulturflaschenboden. Die Zelllinien RT4 und 647V zeigen eine stärkere Haftung, die eine Ablösung durch Trypsin-EDTA erforderlich macht. Nach vollständiger Ablösung der Zellen werden diese erneut in Zellkulturmedium aufgenommen und EDTA- bzw. Trypsinzusätze durch Zentrifugation bei 1500rpm über 5 Minuten entfernt. Das so entstandene Zellpellet kann erneut in Medium resuspendiert und auf Zellkulturflaschen aufgeteilt, kryokonserviert oder für Zellbindungsversuche verwendet werden.

Zur Kryokonservierung wird das Zellpellet, etwa 1x10⁷ Zellen enthaltend, mit 1,8ml Dimethylsulfoxid (DMSO) Freeze Medium resuspendiert und in ein spezielles Cryo-Röhrchen überführt. Nach Inkubation bei -80°C über 12 – 48 Stunden können die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt werden. DMSO nimmt bei steigender Temperatur an Toxizität zu, deshalb ist sowohl beim Einfrieren als auch beim Auftauen zügiges Arbeiten notwendig. Etablierte Zelllinien können über viele Jahre in flüssigem Stickstoff konserviert werden, dabei ist auch eine optimale Konservierung in der Gasphase bei -150°C bis -160°C des Stickstoffbehälters gewährleistet. Zum Auftauen wird das Cryo-Röhrchen zunächst im 37°C Wasserbad angewärmt, zügig in 10 Milliliter (ml) Medium überführt und DMSO-Rückstände durch Zentrifugation entfernt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt über den CASY R Cellcounter. Zu einem Volumen von 10ml CasytonR-Lösung wird ein variables Volumen Zellsuspension (z.B. 50µl) zugegeben. Anhand der jeweiligen Verdünnung (in diesem Beispiel 1:200) wird über das Gerät die entsprechende Zellzahl berechnet.

2.2.2 Proliferationsstudien

Wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben, variiert die Dauer der lag-Phase abhängig von der Zelllinie. Zur Bestimmung der Wachstumsphasen der einzelnen Zelllinien erfolgte eine Aussaat der Zellen in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen. Von jeder unter Punkt 2.1.4. genannten Zelllinie wurden jeweils $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 und $7,5 \times 10^4$ Zellen in Kulturflaschen der Größe 25cm^2 ausgesät. Das Volumen (5ml) des Zellkulturmediums, in dem die Zellen resuspendiert und ausgesät wurden, war für jede Konzentration und Zelllinie identisch. Es erfolgte die Aussaat der entsprechenden Konzentrationen in jeweils fünf Kulturflaschen. Über den Zeitraum des Versuches, der je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie zwischen 10 und 20 Tagen dauerte, erfolgte kein Mediumwechsel. Die Aufbewahrung der Kulturflaschen erfolgte für jede Zelllinie unter gleichen Bedingungen bei 37°C unter 5% CO_2 -Spannung. Es wurde von jeder Konzentration einer Zelllinie die Zellzahl pro Kulturflasche, wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben, bestimmt. Die jeweilige Zellzahl der entsprechenden Ausgangskonzentrationen wurden graphisch gegen die Zeit in Stunden (h) aufgetragen (siehe Punkt 3.1)

2.2.3 Immunfluoreszenz mit Anti-MUC1-C595

Als Vorversuch für die darauf folgenden Bindungsstudien mit dem radionuklidmarkiertem Antikörper, wurde der Antikörpers C595 zunächst mittels indirektem Immunfluoreszenztest getestet. Im Vergleich zur direkten Immunfluoreszenz, bei der ein spezifischer fluoreszenzmarkierter Primärantikörper direkt das entsprechende Antigen detektiert, erfolgt die indirekte Immunfluoreszenz-Methode über zwei Schritte. Zunächst bindet der unmarkierte Primärantikörper an das Antigen. Im zweiten Schritt wird ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, eingesetzt. Diese Methode wird im Vergleich zum direkten Immunfluoreszenztest häufiger eingesetzt, da sie zum einen mehr Flexibilität erlaubt, weil eine Vielzahl von Primärantikörpern mit den gleichen markierten Zweitantikörpern kombiniert werden kann, aber auch weil sie um ein Vielfaches empfindlicher ist und der Zweitantikörper mit den verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren kann.

Es wurden alle unter Punkt 2.1.4 genannten Zelllinien getestet. Die Zellen wurden

auf 24-well Platten ausgesät, jede Zelllinie als Doppelansatz. Um die eventuell unterschiedliche Auswirkung der Inkubationszeit zu ermitteln, wurden zwei Platten der jeweils gleichen Zelllinien vorbereitet. Ein Adhärenz aber noch kein konfluentes Wachstum der Zellen zeigte sich nach 48 Stunden. Nach Absaugen des Kulturmediums und zweimaligem Spülen der Zellen mit PBS, konnte der monoklonale Primärantikörper Anti-MUC1 C595 in einer Konzentration von 0,1mg/ml zugegeben werden.

Da bislang noch nicht geklärt ist, ob eine Interaktion von Bestandteilen des Zellkulturmediums mit dem Antikörper zu veränderten Reaktionen führt, wurde der Antikörper einerseits in Zellkulturmedium, andererseits nur mit PBS verdünnt. Bei letzterem ist die mögliche konsekutive Minderversorgung der Zellen während der Inkubation zu diskutieren. So wurde der Antikörper einerseits mit PBS als auch mit dem entsprechendem Zellkulturmedium 1:10 verdünnt und in einem Volumen von 500µl den Zellen zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über eine beziehungsweise zwei Stunden. Nach zweimaliger Spülung mit PBS erfolgte die Zugabe des konjugierten Sekundärantikörpers (CY3) in einer Konzentration von 0,5mg/ml und einem Volumen von 500µl pro well. Bei diesem Sekundärantikörper handelt es sich um einen Anti-Maus-Antikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Indiocarbocyanin konjugiert ist. Die Verdünnung (1:100) des Antikörpers erfolgte mit PBS bzw. Medium, die Inkubationsdauer betrug gleichermaßen 1 Stunde (37°C), anschließend erfolgte eine abschließende Spülung mit PBS. Unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert das rot leuchtende Substrat die spezifischen Bindungen des Primärantikörpers C595 an das MUC1-Antigen.

2.2.4 Radionuklidmarkierung des Anti-MUC1

2.2.4.1 Markierung des Anti-MUC1-C595 mit ¹²⁵I

Die Radiojodmarkierung beruht auf der seit 1978 bekannten und von Fraker und Speck entwickelten Jodogen-Methode. Dabei wird ¹²⁵I als I⁺ durch elektrophile aromatische Substitution an Tyrosin-Reste des unchelatierten Antikörpers gebunden. Iodogen wird als Oxidationsmittel verwendet. Zunächst wurden 100 – 150µg 1,3,4,6-Tetrachloro-3alpha,6alpha-Diphenylglycoluril (Jodogen^R) in 50µl Chloroform gelöst und in ein Eppendorfcup überführt. Zur Radiojodmarkierung werden 37MBq ¹²⁵I und

0,0375µg Antikörper (entsprechend einem Volumen von 50µl) mit 50µl Tris-HCl-Puffer in einem mit Jodogen^R beschichtetem Eppendorfcup für 20 Minuten inkubiert. Die Markierungsausbeute des Antikörpers wurde mittels Dünnschichtchromatographie mit Hilfe eines Laufmittelgemisches aus Butanol, Aceton, 25%igen Ammoniak und Wasser im Verhältnis von 20:65:10:5 überprüft. Die Messung erfolgte im Radio-DC-Scanner. Der Anteil des jodmarkierten Antikörpers war nach Reinigung größer als 85%.

2.2.4.2 Markierung des Anti-MUC1-C595 mit ²¹³Bi

Die Koppelung von ²¹³Bi an den Antikörper erfordert bei seiner kurzen Halbwertszeit einen schnellen Reaktionsablauf. Hierfür hat sich die Chelatierung des Antikörpers mit dem Chelator SCN-CHX-A₄-DTPA (2-(4-isothiocyanatobenzyl)-Cycohexyl-Diethylentriaminpentaessigsäure), ein Derivat von DTPA, etabliert. Der Vorteil dieses Chelators besteht einerseits darin, die Bindungskinetik des Antikörpers nicht zu beeinflussen und andererseits darin, stabile Schwefelbrückenbindungen zwischen der Thioharnstoffgruppe des Chelators und den NH₂-Gruppen des Antikörpers zu bilden. Die durchschnittliche Zahl der Chelate pro Antikörpermolekül beträgt etwa fünf bis zehn.

Für die Eluierung von ²¹³Bi aus dem ²²⁵Ac / ²¹³Bi Generator muss der Generator mindestens zwei Stunden vor Gebrauch mit 2ml 0,01molarer HCl (Salzsäure)-Lösung gespült werden. Die Flüssigkeit wird langsam aus dem Polyethylenschlauch gepresst, bevor 600µl eines NaI-HCl-Gemisch für eine Inkubationszeit von zwei Minuten im Generator verbleiben. Das Ergebnis ist ein ²¹³Bi reiches Eluat, welches durch Zugabe von 100µl Ammoniumacetat (NH₄Ac) auf einen pH von ca. 5,5 gepuffert und durch 4%ige L-Ascorbinsäure (100µl) stabilisiert wird. Der Antikörper (Zugabe von 100µg) zeigte nach einer Inkubation von 7 Minuten eine stabile Radionuklidmarkierung. Eine Aufreinigung des Eluats zur Entfernung von nicht gebundenem Radionuklid erfolgte über eine PD 10 Gelfiltrationssäule. Von diesem Produkt wurden 10µl zur Überprüfung der Markierungsausbeute entnommen (P_γ). Mit Hilfe der ITLC-Chromatografie kann freies ²¹³Bi von ²¹³Bi-C595-Konjugaten abgetrennt werden und somit einerseits die Markierungseffizienz, das heißt den Anteil der ²¹³Bi-C595-Konjugate im Vergleich zu nicht gebundenem ²¹³Bi, als auch der

Antikörper-Verlust durch die Gelfiltration berechnet werden.

2.2.4.3 Markierung des Anti-MUC1-C595 mit ^{111}In

Das metallische Radionuklid ^{111}In wird wie ^{213}Bi mit Hilfe des Chelators CHX-A'-DTPA an den Antikörper gekoppelt (Nikula, TM et al.; 1999). Analog zur Radionuklidmarkierung mit ^{213}Bi wurde 0,4 – 6,4MBq $^{111}\text{InCl}_3$ -Lösung zunächst mit 2ng chelatiertem C595 (20 μl) bei einem pH-Wert (eingestellt mit 0,2 molarer Salzsäure) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraus resultierte ein stabiles Radionuklidkonjugat. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Eluats mit Überprüfung der Markierungsausbeute.

2.2.5 Bindungsstudien mit Anti-MUC1-C595

2.2.5.1 Bindungsstudien mit ^{125}I -Anti-MUC1-C595

Es wurden die Zelllinien 647V, EJ28, T24, RT112 und J82 getestet. Jede Zelllinie wurde zunächst in einer Zahl von 3×10^6 Zellen und einem Volumen von 500 μl mit $3,7 \times 10^4$ Bq radiojodkonjugiertem Anti-MUC1-C595 (entsprechend einer Menge von 40ng und 13,4 μl Antikörper) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Separation des nicht gebundenen Radioimmunkonjugats mittels Zentrifugation (1200rpm, 3 Minuten) und zweimaligem Waschen der Zellen mit Zellkulturmedium, erfolgte die Messung der nicht gebundenen Jodaktivität im Überstandes und der an die Zellen gebundenen (Zellpellet) Aktivität mittels Gamma-Counter. Die Menge des an die Zellen gebundenen ^{125}I markierten Antikörper wird aus dem Verhältnis Aktivität des Pellets zu der im Überstand berechnet.

2.2.5.2 Bindungsstudien mit ^{213}Bi -Anti-MUC1-C595

Für die Bindungsversuche mit ^{213}Bi wurden die Zelllinien 647V, EJ28, T24, RT112 und J82 getestet. Eine Zahl von 3×10^6 Zellen in einem Volumen von 500 μl wurde für den Versuch bereit gestellt. Die Zellen wurden bis Versuchsbeginn auf Eis gelagert. Pro Ansatz wurde ca. $3,7 \times 10^4$ Bq ^{213}Bi gekoppelter Anti-MUC1-C595 (entsprechend 10 μl) zugegeben, die Zellen wurden resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Pelletierung und Waschen der Zellen erfolgte die Messung der Aktivität im Überstand und die an die Zellen gebundene Aktivität im Gamma-Counter. Analog zu 2.2.5.1. wurde der Anteil der radionuklidmarkierten Zellen berechnet.

2.2.6 Western Blot

Bei der Methode des Western Blot werden elektrophoretisch Proteine über ein Trenngel aufgetrennt und auf einen geeigneten Träger, z.B. Nitrocellulose übertragen. Diese Übertragung stellt das eigentliche "Blotting" dar. Das Blotting der Makromoleküle an Nitrocellulose erfolgt über Wasserstoff-Brücken und hydrophobe Wechselwirkungen. Diese Blotting-Technik ermöglicht einerseits qualitative und quantitative Bestimmungen singulärer Proteine in einem komplexen Proteingemisch, andererseits auch deren Identifikation. Die Western Blot-Technik wird ebenfalls zur Aufreinigung von Proteinen eingesetzt. In dieser Studie sollte das MUC1-Antigen detektiert und identifiziert werden.

Es wurden die Zelllinien 647V, EJ28, T24, RT112 und MBT2 getestet. Zur Antigengewinnung wurden die Zellen mit 100mM Tris-Puffer, 200mM Polymethylsulfonylfluoride und Ultraschallbehandlung über insgesamt 20 Sekunden vorbehandelt, anschließend wurde das Zellpellet, das 15µl Antigen enthielt (1×10^5 Zellen), mit 5µl Roti-Load (4x) inkubiert und bei -20°C gelagert. Vor dem Versuch wurden die Proben zur Denaturierung der Proteine 6 Minuten bei 95°C erhitzt, wieder abgekühlt und zentrifugiert (9000rpm, 2 Minuten). Bei auf 10°C gekühlter Elektrophoresekammer konnte die Zugabe der Proben erfolgen. Das Elektrophoresegel besteht im unteren Anteil aus Trenngel und im oberen Anteil aus Sammelgel. Die Auftrennung der Proteine im Gel erfolgte bei einer Stromstärke von 20mA und einer maximalen Spannung (400V) über etwa eine Stunde. Für das Blotting wurden die PVDF-Membranen mit Methanol und Blotting-Puffer vorbehandelt. Die untere Hälfte des Elektrophoresegels, das Trenngel, wurde zusammen mit der PVDF-Membran in die auf 4°C gekühlte Blottingapparatur eingebracht. Der Transfer der negativ geladenen Proteine des Gels via Membran erfolgte bei einer Stromstärke von 200 Milliampere (mA), einer Spannung von 200 Volt (V) und einer Leistung von 40 Watt (W) über zwei Stunden. Nach dem Blotting erfolgte nach 60 minütiger Inkubation mit 5%igem TTBS die Antikörperzugabe in unterschiedlichen Konzentrationen (Verdünnungen 1:800 und 1:500). Nach Inkubation über 1 Stunde und Waschen der Membranen wurde der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:6000 zugegeben und über 1 Stunde inkubiert. Die Membranen wurden erneut gewaschen, die Substratlösung (Nitro Blue

Tetrazolium+5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate) wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Die Blots wurden mit dieser Substratlösung in eine Plastikfolie eingeschweißt und die Farbreaktion konnte nach einer Inkubation über Nacht im Dunkeln abgelesen werden. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Western Blots eingescannt.

2.2.7 Scatchard Analyse

Mit der Methode der Scatchard Analyse kann die Zahl der Antigenbindungsstellen auf der Zelloberfläche abgeschätzt werden. Mittels unterschiedlicher Konzentrationen von radioaktiv markierten Antikörpern wird die Antikörpermenge, die zur Sättigung der zellulären Antigene notwendig ist, ermittelt und linear dargestellt.

Es wurden die Zelllinien 647V, EJ28, T24, RT112, J82 und MBT2 getestet. Eine definierte Menge an Zellen wurde mit einer variablen Menge an ^{111}In -markiertem Anti-MUC1-C595 inkubiert und sowohl der an die Zellen gebundene Antikörper als auch das freie Radioimmunkonjugat im Gamma-Counter gemessen. Der Quotient aus gebundenem und ungebundenem Antikörper wurde gegen die absolute Menge des gebundenen Antikörpers pro Antikörperkonzentration grafisch aufgetragen. Anhand der Menge des gebundenen Antikörpers konnte die Anzahl der Moleküle auf der Zelloberfläche berechnet werden.

Für die Auswertung wurde die Menge des gebundenen Antikörpers auf der Abszisse und das Verhältnis gebundener / freier Antikörper auf der Ordinate aufgetragen und eine Regressionsgerade ermittelt, deren Schnittpunkt mit der x-Achse die maximale Anzahl der gebundenen Antikörper darstellt. Die Menge des gebundenen Antikörpers wurde in die Anzahl der Antigene pro Zelle umgerechnet.

Es wurden hierfür 1×10^6 Zellen resuspendiert und in $100 \mu\text{l}$ 1%iger BSA/PBS-Lösung bereit gestellt. Den Zellen wurde ^{111}In -markierter Antikörper, ausgehend von der Konzentration $320 \text{ ng Anti-MUC1-C595}/100 \mu\text{l}$ ($0,000032\%$ ig) in geometrisch absteigenden Konzentrationen bis zu einer Konzentration von $5 \text{ ng}/100 \mu\text{l}$ zugegeben. Nach Inkubation bei 37°C über 20 Minuten wurden die Ansätze zentrifugiert (1300 rpm , 3 Minuten) und gewaschen. Die Aktivität des ungebundenen Antikörpers

im Überstand und des gebundenen Antikörpers im Pellet wurden im Gamma-Counter gemessen.

2.2.8 Klonogener Assay

Der Klonogene Assay diente zur Abschätzung der Toxizität von ^{213}Bi . Es wurden die Zelllinien 647V, EJ28, T24, RT112, J82 und MBT2 in einer Konzentration von 100 beziehungsweise 200 Zellen pro well, in einem Volumen von 500 μl auf 24-well-Platten ausgesät und nach einer 24stündigen Inkubation (5% CO_2 , 37°C) mit dem ^{213}Bi markiertem Antikörper (C595) in unterschiedlichen Aktivitäten (2 μCi , 10 μCi und 40 μCi pro well) über weitere 7 Tage inkubiert (5% CO_2 , 37°C). Die Aussaat erfolgte jeweils im Doppelansatz. Anschließend wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops die entstandenen Zellklone (50 – 100 Zellen) gezählt.

2.2.9 Immunhistochemie mit Anti-EGF-MAK

Mittels Immunhistochemie kann die Verteilung von bestimmten Antigenen an histologischen Schnitten über spezifische Antikörper sichtbar gemacht werden. Dazu eignen sich vor allem Antigene, die spezifisch nur in bestimmten Geweben oder Zelltypen auftreten. Die Klassifikation von Tumorzellen, die bestimmte Antigene exprimieren, ist über diese Methode ebenfalls möglich. Weil bekannt ist, dass Harnblasenkarzinomzellen zu 80% auch den EGF-Rezeptor exprimieren, wurden die Zelllinien 647V, EJ28, T24, RT112, J82 und MBT2 auf die Expression von EGF-Rezeptoren getestet. Für die Antikörperfärbungen wurden in Paraffin eingebettete Zellpellets verwendet. Die Zellpellets, etwa 5×10^6 Zellen enthaltend, wurden 2 x mit PBS gewaschen, zentrifugiert (4°C, 800g, 15 Minuten) und mit 5ml 10%igem Formalin resuspendiert, nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur erneut zentrifugiert (4°C, 800g, 15 Minuten), 1x mit PBS gewaschen und auf Eis inkubiert. Vor der Einbettung in Paraffin wurde 150 μl Thrombin (10 U/l), 750 μl Casein (10mg/ml; gelöst in 0,04 molarem TrisHCl, pH >8) und 600 μl Fibrinogen (25 mg/ml) zugegeben. Die in Paraffin eingebetteten Zellpellets wurden in einer Schnittdicke von 3 μm immunhistochemisch gefärbt. Die immunhistochemische Färbung der Zelllinien mit Anti-EGF-MAK erfolgte freundlicherweise durch Herrn Dr. Nährig, Institut für Pathologie der Technischen Universität München.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationstest der Zelllinien

Wie unter Punkt 2.2.2 bereits beschrieben, wurden von jeder Zelllinie $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 und $7,5 \times 10^4$ Zellen in einem identischen Volumen in Kulturflaschen der Größe 25 cm^2 ausgesät und die Proliferationscharakteristika in ihrer exponentiellen Wachstumsphase untersucht. Die Zellzahlen wurden abhängig von der Zeit grafisch aufgetragen, dabei wurde das Wachstumsplateau zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht.

3.1.1 Proliferation der Zelllinie 647V

Die Zelllinie 647V zeigte ein wie in Abbildung 2 dargestelltes Zellwachstum. Die Verdopplungszeit ergab im Durchschnitt 65 Stunden.

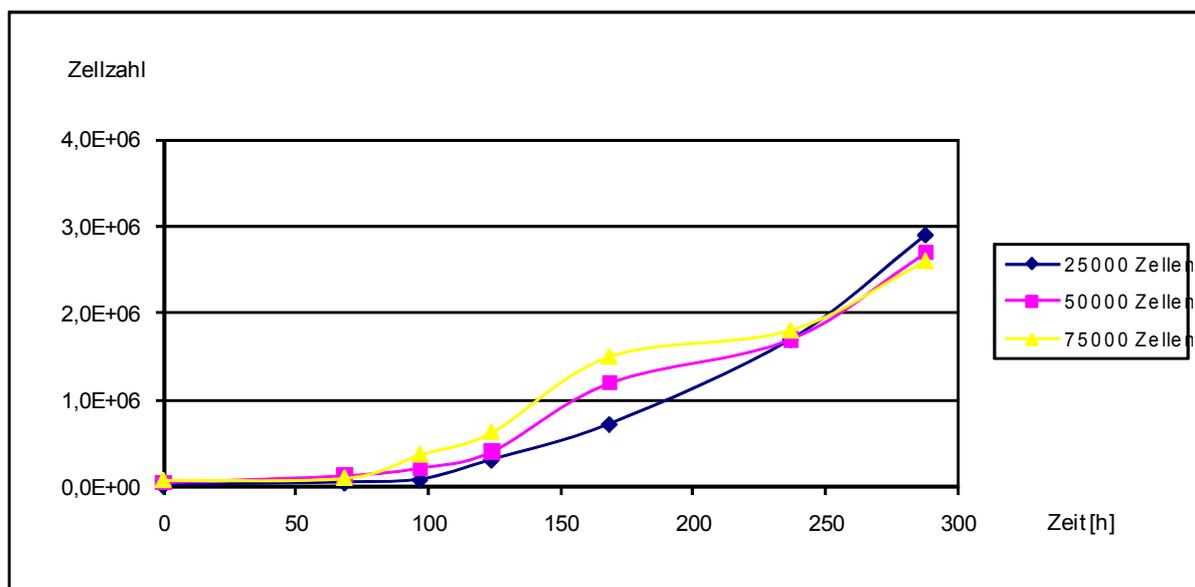


Abb. 2: Proliferation der Zelllinie 647V bei unterschiedlich eingesetzter Zellzahl

3.1.2 Proliferation der Zelllinie EJ28

Die Zelllinie EJ28 zeigte ein wie in Abbildung 3 dargestelltes Zellwachstum. Die Verdopplungszeit ergab im Durchschnitt 20 Stunden und sie stellt somit unter den getesteten Zelllinien die am schnellsten proliferierende Zelllinie dar.

Ergebnisse

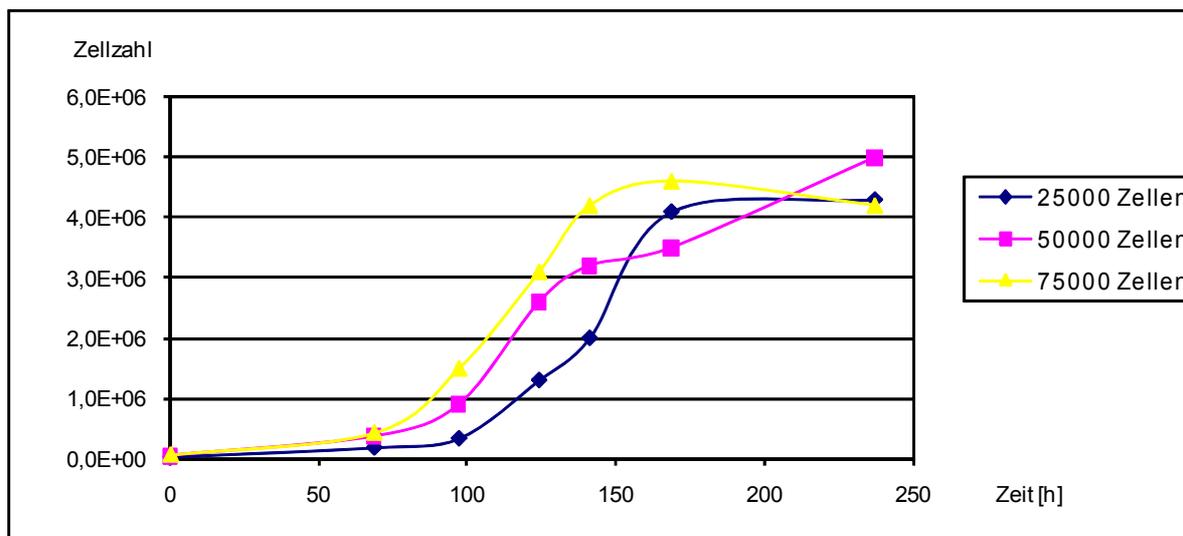


Abb. 3: Proliferation der Zelllinie EJ28 bei unterschiedlich eingesetzter Zellzahl

3.1.3 Proliferation der Zelllinie T24

Die Zelllinie T24 zeigte ein wie in Abbildung 4 dargestelltes Zellwachstum. Die Verdopplungszeit ergab im Durchschnitt 25 Stunden.

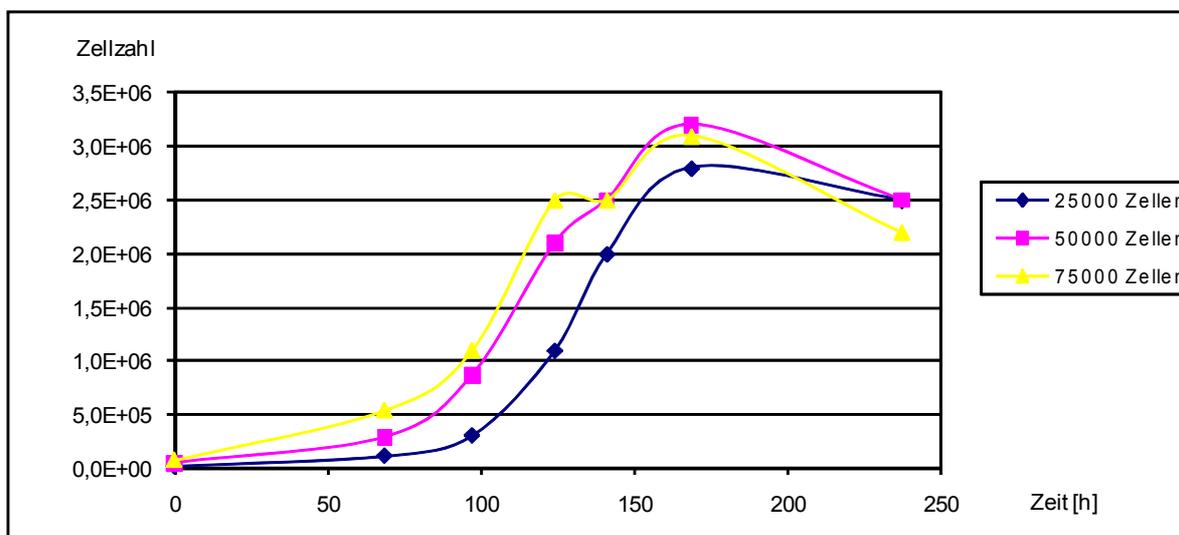


Abb. 4: Proliferation der Zelllinie T24 bei unterschiedlich eingesetzter Zellzahl

3.1.4 Proliferation der Zelllinie RT112

Die Zelllinie RT112 zeigte ein wie in Abbildung 5 dargestelltes Zellwachstum. Die Verdopplungszeit ergab im Durchschnitt 23 Stunden.

Ergebnisse

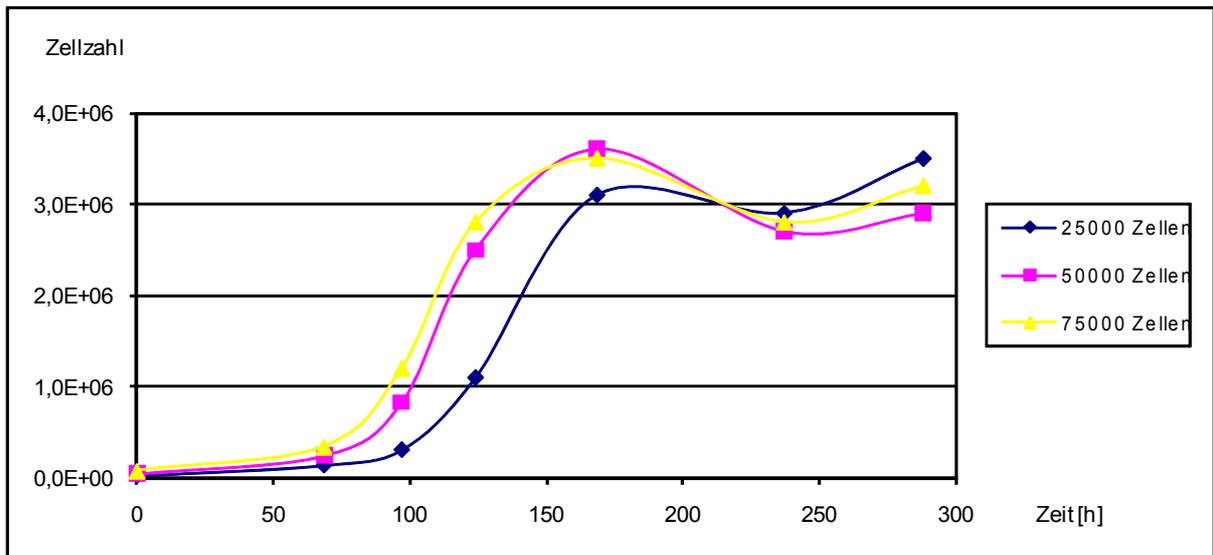


Abb. 5: Proliferation der Zelllinie RT112 bei unterschiedlich eingesetzter Zellzahl

3.1.5 Proliferation der Zelllinie J82

Die Zelllinie J82 zeigte ein wie in Abbildung 6 dargestelltes Zellwachstum. Die Verdopplungszeit ergab im Durchschnitt 50 Stunden.

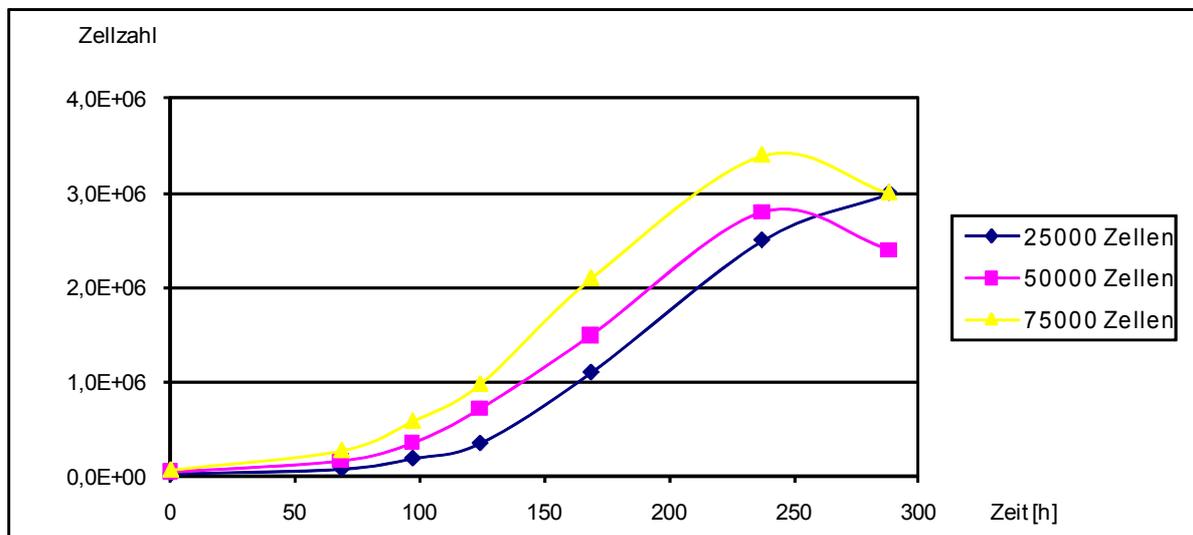


Abb. 6: Proliferation der Zelllinie J82 bei unterschiedlich eingesetzter Zellzahl

3.1.6 Proliferation der Zelllinie RT4

Die Zelllinie RT4 zeigte ein wie in Abbildung 7 dargestelltes Zellwachstum. Die Verdopplungszeit ergab im Durchschnitt 80 Stunden und sie stellt somit unter den getesteten Zelllinien die am langsamsten proliferierende Zelllinie dar.

Ergebnisse

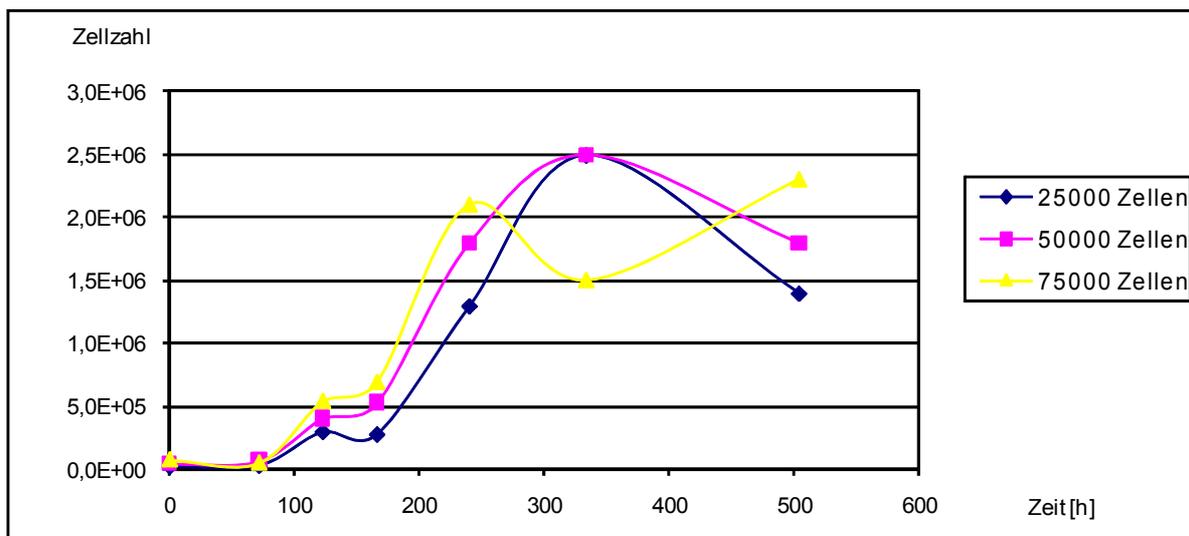


Abb. 7: Proliferation der Zelllinie RT4 bei unterschiedlich eingesetzter Zellzahl

3.1.7 Proliferation der Zelllinie MBT2

Die murine Zelllinie MBT2 zeigte ein wie in Abbildung 8 dargestelltes Zellwachstum. Die Verdopplungszeit ergab im Durchschnitt 35 Stunden.

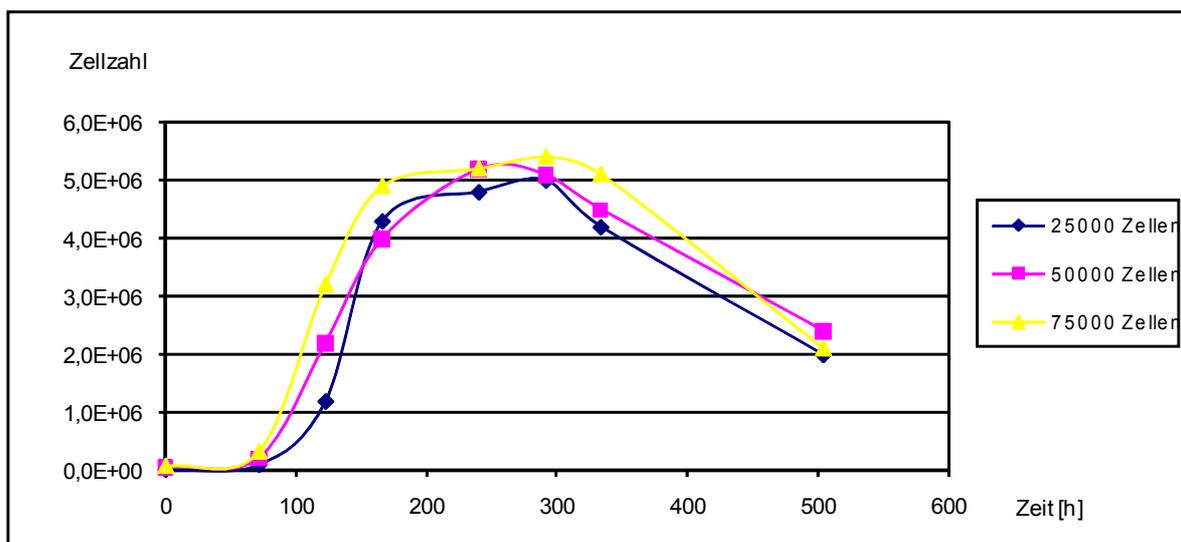


Abb. 8: Proliferation der Zelllinie MBT2 bei unterschiedlich eingesetzter Zellzahl

3.2 Immunfluoreszenz mit Anti-MUC1-C595

Wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben, wurden die Zelllinien 647V, EJ28, RT112, RT4, MBT2, J82, T24 mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung des Anti-MUC1-C595 auf MUC1-Antigen untersucht. Der rot leuchtende Fluoreszenzfarbstoff Indiocarbocyanin macht die spezifischen Bindungen des Antikörpers und damit die MUC1-Antigene auf den Tumorzellen sichtbar. Je stärker das Fluoreszenzsignal,

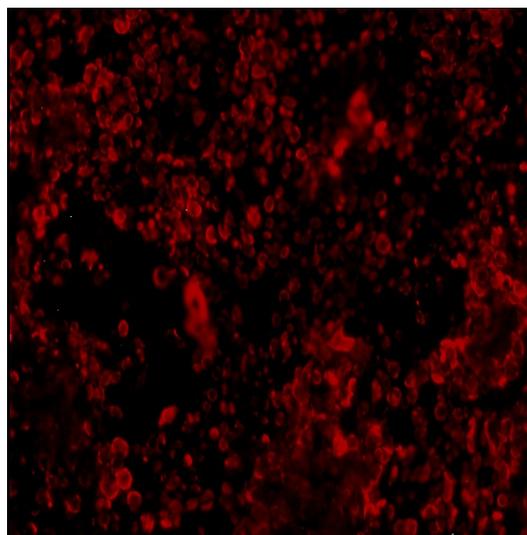
Ergebnisse

desto mehr MUC1-Oberflächenproteine lassen sich auf der Tumorzelle vermuten.

Immunfluoreszenz der Zelllinie 647V

Die rot leuchtenden Strukturen stellen Harnblasenkarzinomzellen der Zelllinie 647V dar, an die der monoklonale C595-Antikörper gebunden hat. In der Abbildung 9a wurde der Antikörper in unchelatierte Form verwendet, wohingegen in Abbildung 9b der chelatierte Antikörper verwendet wurde. Es zeigte sich kein sichtbarer Unterschied zwischen nativen (Abb. 9a) und chelatiertem Antikörper (Abb. 9b). Die Ergebnisse beider Versuche lassen auf eine hohe Expression von MUC1-Antigenen schließen.

9a)



9b)

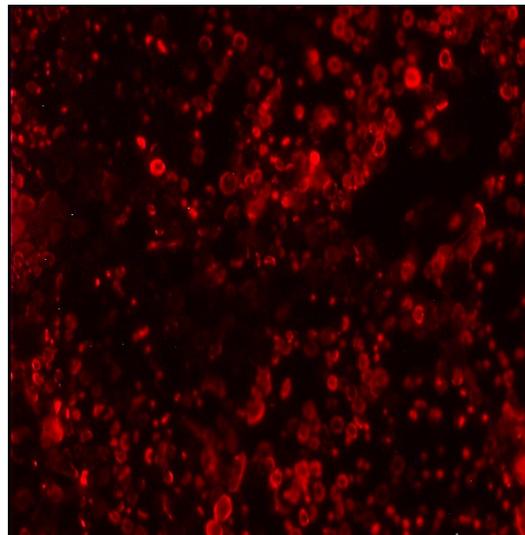


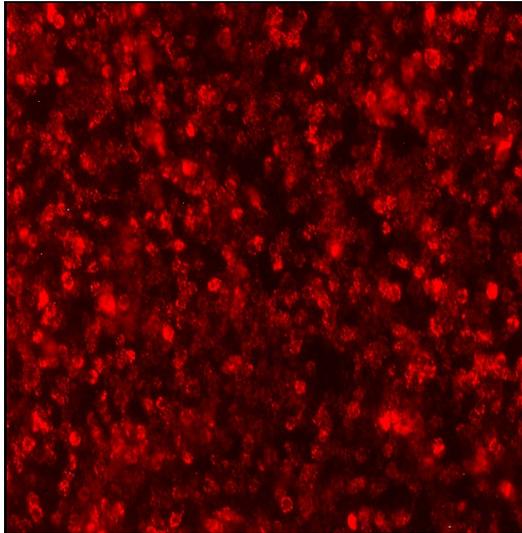
Abb. 9: Immunfluoreszenz der Zelllinie 647V mit a) nativen und b) chelatiertem Anti-MUC1-C595

Immunfluoreszenz der Zelllinie EJ28

Die Tumorzellen der Zelllinie EJ28 zeigten unter der Verwendung des nativen Antikörpers ein kräftiges Fluoreszenzsignal (Abb. 10a), mit dem chelatierten Antikörper hingegen zeigte sie ein deutlich schwächeres Fluoreszenzsignal (Abb. 10b). Dieses Ergebnis lässt einerseits auf eine hohe Expression des MUC1-Antigens schließen, andererseits lässt das nur schwach positive Ergebnis mit dem chelatierten Antikörper eine verminderte Bindungsaffinität des chelatierten Antikörpers zu den MUC1-Oberflächenantigenen vermuten.

Ergebnisse

10a)



10b)

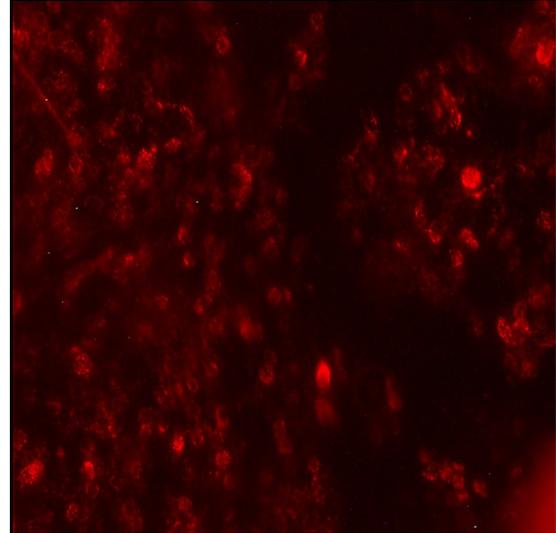
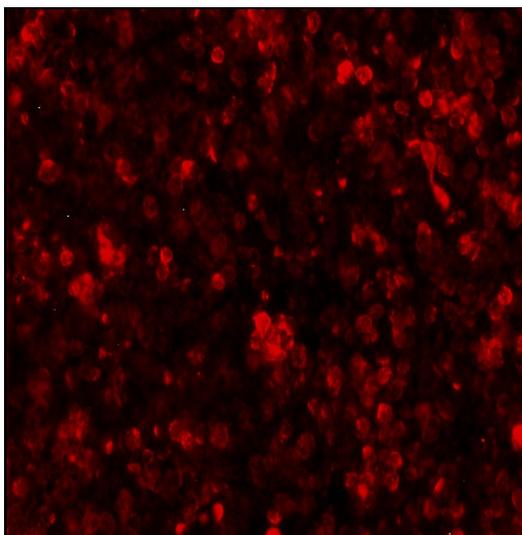


Abb. 10: Immunfluoreszenz der Zelllinie EJ28 mit a) nativen und b) chelatiertem Anti-MUC1-C595

Immunfluoreszenz der Zelllinie RT112

Hier zeigt das Ergebnis des Immunfluoreszenztest eine deutliche Immunfluoreszenz (Abb. 11a) unter Verwendung des nativen Antikörpers, jedoch ein nur schwach positives Ergebnis unter Verwendung des chelatierten Antikörpers (Abb. 11b). Somit lassen sich auch bei der Tumorzelllinie RT112 MUC1-Oberflächenproteine in hoher Anzahl vermuten, jedoch zeigt sich eine höhere Bindung des Antikörpers C595 in unchelatiertes als in chelatiertes Form.

11a)



11b)

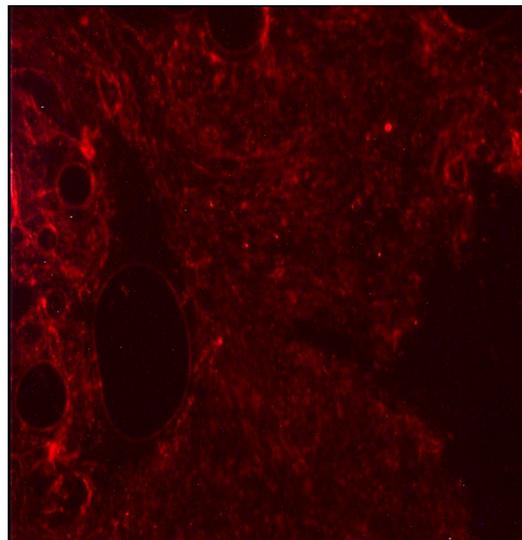


Abb. 11: Immunfluoreszenz der Zelllinie RT112 mit a) nativen und b) chelatiertem Anti-MUC1-C595

Ergebnisse

Immunfluoreszenz der Zelllinie MBT2

Bei der Tumorzelllinie MBT2 zeigte sich nur unter Verwendung des nativen Antikörpers C595 ein schwach positives Signal (Abb. 12). Die hier rot leuchtenden Strukturen sind nur im Versuch mit dem unchelatierten Antikörper zu sehen. Es ist kein Fluoreszenzsignal unter Verwendung des unchelatierten Antikörpers nachweisbar.

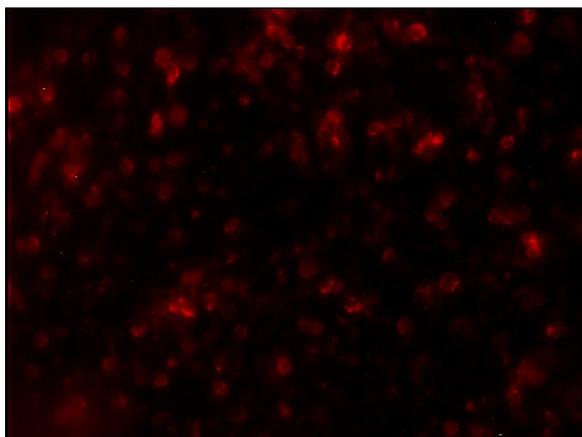


Abb. 12: Immunfluoreszenztest der Zelllinie MBT2 mit nativen Anti-MUC1-C595

Immunfluoreszenz der Zelllinie RT4

Die Immunfluoreszenztestung der Zelllinie RT4 zeigte nur bei einigen Zellen eine schwache Immunfluoreszenz unter Verwendung des nativen Antikörpers C595 (Abb. 13), allerdings keine Fluoreszenz beim chelatierten Antikörper. Dieses Ergebnis lässt auf das Vorhandensein von MUC1-Antigenen auf der Zelloberfläche schließen, jedoch in geringerer Anzahl. Keine Fluoreszenz unter Verwendung des chelatierten Antikörpers lässt auf eine schwächere Bindungsaffinität nach Chelatierung schließen.

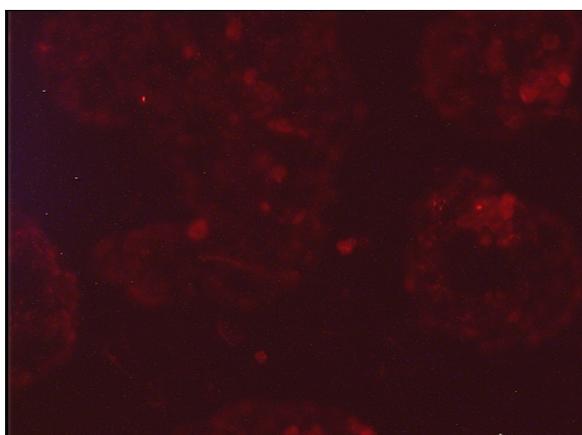


Abb. 13: Immunfluoreszenz der Zelllinie RT4 mit nativen Anti-MUC1-C595

In den hier dargestellten Versuchen zeigten die Zelllinien 647V, EJ28 und RT112 sowohl mit dem nativen als auch mit dem chelatierten C595 ein positives Ergebnis. Die Zelllinien MBT2 und RT4 zeigten nur mit dem nativen C595 positive Ergebnisse, jedoch nicht mit dem chelatierten C595 Antikörper. Die Zelllinien T24 und J82 waren beide negativ, sowohl mit dem nativen als auch chelatierten C595.

Insgesamt lassen die Ergebnisse des Immunfluoreszenztests auf eine Expression des MUC1-Antigens nahezu auf allen hier getesteten Tumorzelllinien schließen. Die verminderte Fluoreszenz unter Verwendung des chelatierten Antikörpers im Vergleich zu den Ergebnissen mit dem unchelatierten Antikörper weist jedoch darauf hin, dass die Chelatierung einen Einfluss auf die Bindung hat. Dieser Einfluss muss umso größer sein, wenn das relativ große Radionuklid ^{213}Bi zusätzlich an den Antikörper gekoppelt ist. Möglich ist aber auch, dass die Chelatierung die Bindung des zweiten Antikörpers im hier dargestellten Immunfluoreszenztest beeinflusst.

3.3 Zellbindungsstudien mit Anti-MUC1-C595

Die Zellbindungsstudien des Anti-MUC1-Antikörpers C595 wurden mit den Radionukliden ^{125}I und ^{213}Bi durchgeführt. Wie bereits unter Kapitel 2.2 beschrieben, wurde für die Markierung mit ^{125}I der Antikörper in nativer, das heißt unchelatierte Form verwendet. Für die Radionuklidmarkierung mit ^{213}Bi und ^{111}In wurde der Anti-MUC1-C595 mit dem Chelator SCN-CHX-A₄-DTPA gekoppelt. Die Bindungsstudien der Zellen wurden im Doppelansatz, zum Teil auch Vierfachansatz, durchgeführt und zeigten vor allem bei den Studien mit ^{125}I starke Abweichungen voneinander, was möglicherweise auf die Abspaltung des Radionuklids vom Antikörper zurückzuführen ist. Auch bei den Bindungsversuchen mit ^{213}Bi variierte die Bindung teilweise sehr stark.

3.3.1 Bindungsstudien mit ^{125}I -markiertem Anti-MUC1-Antikörper

Mit dem ^{125}I markierten MUC1-Antikörper C595 (^{125}I -C595) wurden insgesamt drei Bindungsversuche (Abb. 14 – 16) durchgeführt und die Bindung der einzelnen Zelllinien variierte in diesen Versuchen bei der Zelllinie T24 zwischen 1,7% und 13,8%, bei der Zelllinie EJ28 zwischen 2,1% und 17,8%, bei der Zelllinie 647V zwischen 1,6% und 12%, bei der Zelllinie J82 zwischen 1,8% und 4,3% und bei der

Ergebnisse

Zelllinie RT112 zwischen 1,3% und 3%.

Beim ersten Versuch (Abb. 14) wurde bei allen Zelllinien, außer bei der Zelllinie 647V, ein Doppelansatz durchgeführt. Bei der Zelllinie 647V konnte wegen mangelnder Verfügbarkeit von Zellen nur ein Einfachansatz durchgeführt werden. Bei dem in Abbildung 14 gezeigten Zellbindungsergebnis mit ^{125}I variierte die Bindung zwischen 1,5% bei der Zelllinie RT112 und 8% bei der Zelllinie 647V.

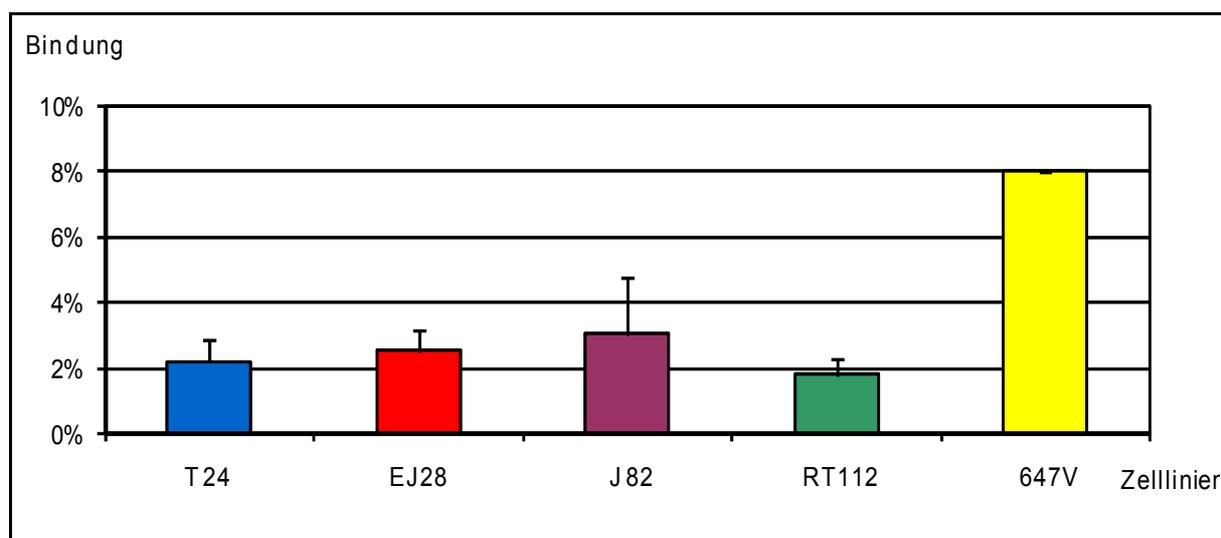


Abb. 14: Bindung von ^{125}I -C595 an die Zelllinien T24, EJ28, J82, RT112 und 647V

Die in Abbildung 15 dargestellte Grafik zeigt Zellbindungsergebnisse eines weiteren Ansatzes mit den Zelllinien 647V, EJ28, T24, RT112 und einer Ovarialkarzinomzelllinie (OV) mit ^{125}I -markiertem C595-Antikörper. Es wurde pro Zelllinie ein Dreifachansatz durchgeführt. In diesem Bindungsversuch zeigen sich Bindungsergebnisse zwischen 0,8% (Zelllinie T24) und 9,2% (Zelllinie 647V). Die Bindungen innerhalb der Zelllinien variierten bei diesem Versuch sehr stark; bei der Zelllinie 647V, zum Beispiel, zeigten sich Bindungsunterschiede zwischen 1,6% und 9,2%.

Ergebnisse

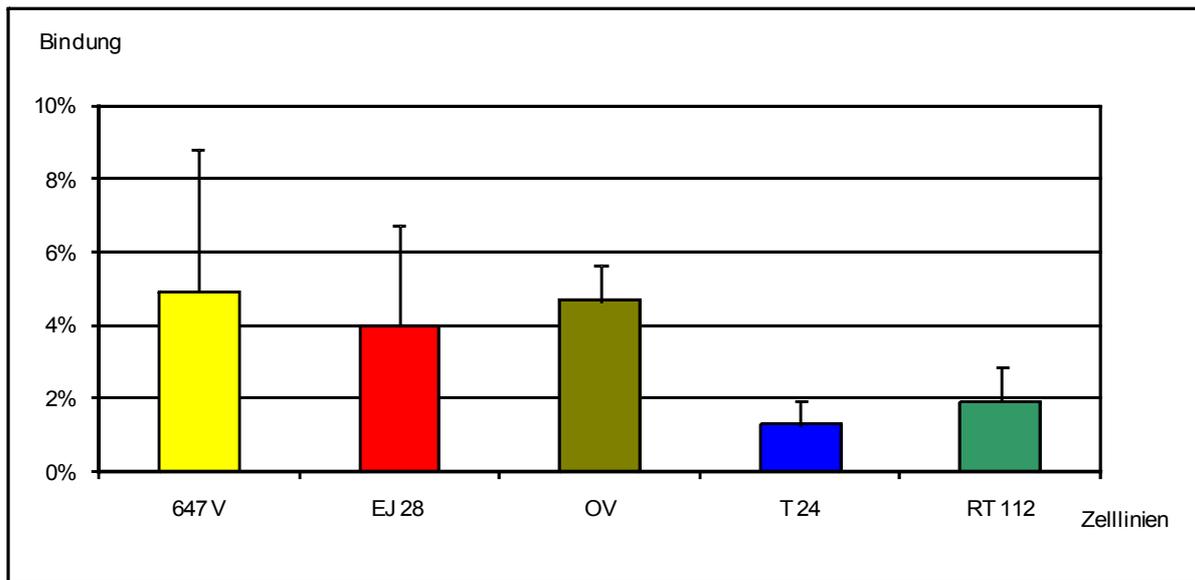


Abb. 15: Bindung von ^{125}I -C595 an die Zelllinien 647V, EJ28, Ovarialkarzinomzelllinie, T24 und RT112

In Abbildung 16 ist ebenfalls ein weiteres Bindungsergebnis der Zelllinien EJ28, 647V und T24 mit ^{125}I markiertem C595-Antikörper dargestellt. Es wurde die Zelllinie EJ28 im Dreifachansatz und die Zelllinien 647V und T24 im Vierfachansatz getestet. Die Ergebnisse zeigten variierende Bindungen zwischen 6,1% (Zelllinie T24) und 17,1% (Zelllinie EJ28). Das Ergebnis dieses Versuches wich von den Ergebnissen der Vorversuche stark ab, da der Prozentsatz des an die Zellen gebundenen C595-Antikörpers im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen Versuche höher war.

Ergebnisse

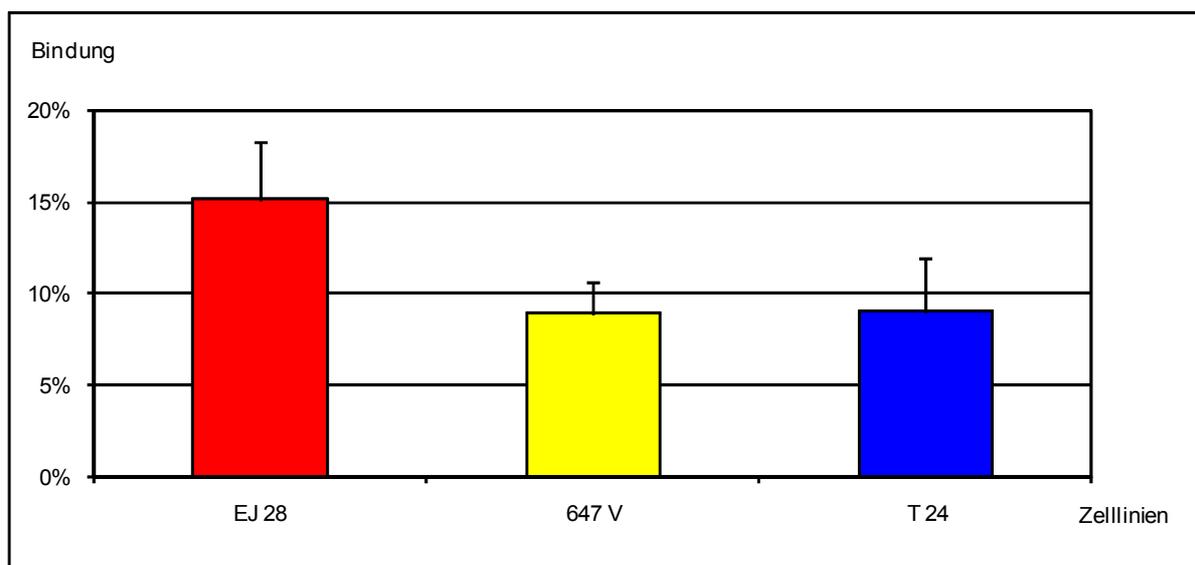


Abb. 16: Bindung von ^{125}I -C595 an die Zelllinien EJ28, 647V und T24

Zellbindung nach Blockierung mit „kaltem“ Antikörper

In dem folgenden Experiment wurden zur Überprüfung der Bindungsspezifität des Antikörpers zwei parallele Versuche durchgeführt. Die Zelllinien wurden mit „kaltem“, das heißt nicht radiomarkiertem Antikörper, über eine halbe Stunde inkubiert (geblockt). Anschließend erfolgte die Inkubation mit radiojodmarkiertem Antikörper. Im Parallelversuch wurden die gleichen Zelllinien nur mit radiojodmarkiertem Antikörper inkubiert. Somit konnte man die Bindungsspezifität des C595-Antikörpers abschätzen. Bei Überexpression von MUC1 auf der Zelloberfläche der Harnblasenkarzinomzellen und spezifischer Bindung des Antikörpers müsste der Versuch mit nur radiomarkiertem Antikörper eine signifikant höhere Bindung im Vergleich zum Versuch mit unmarkiertem Antikörper aufweisen, da der nicht markierte („kalte“) Antikörper die Bindungsstellen auf der Zelloberfläche bereits besetzt hat.

Für den Versuch wurden die Zelllinien EJ28, 647V und T24 getestet und bei allen Zelllinien war die Bindung nach Blockieren mit „kaltem“ Antikörper etwas geringer als nach alleiniger Inkubation mit dem ^{125}I markiertem Antikörper. Die Zelllinie EJ28 zeigte eine Bindung von 2,4% nach Blockierung mit „kaltem“ C595 und eine durchschnittliche Bindung von 2,5% ohne Vorinkubation mit „kaltem“ Antikörper. Die Zelllinie 647V zeigte eine Bindung von durchschnittlich 2,5% nach Vorinkubation mit

Ergebnisse

„kaltem“ Antikörper im Vergleich zur durchschnittlichen Bindung von 2,8% bei alleiniger Inkubation mit dem ^{125}I markiertem Antikörper. Die Bindungsversuche der Zelllinie T24 zeigten folgende Ergebnisse: ohne Vorinkubation mit „kaltem“ C595 wurde eine Bindung von durchschnittlich 2,3% erreicht, nach Blockierung nur eine durchschnittliche Bindung von 1,8%.

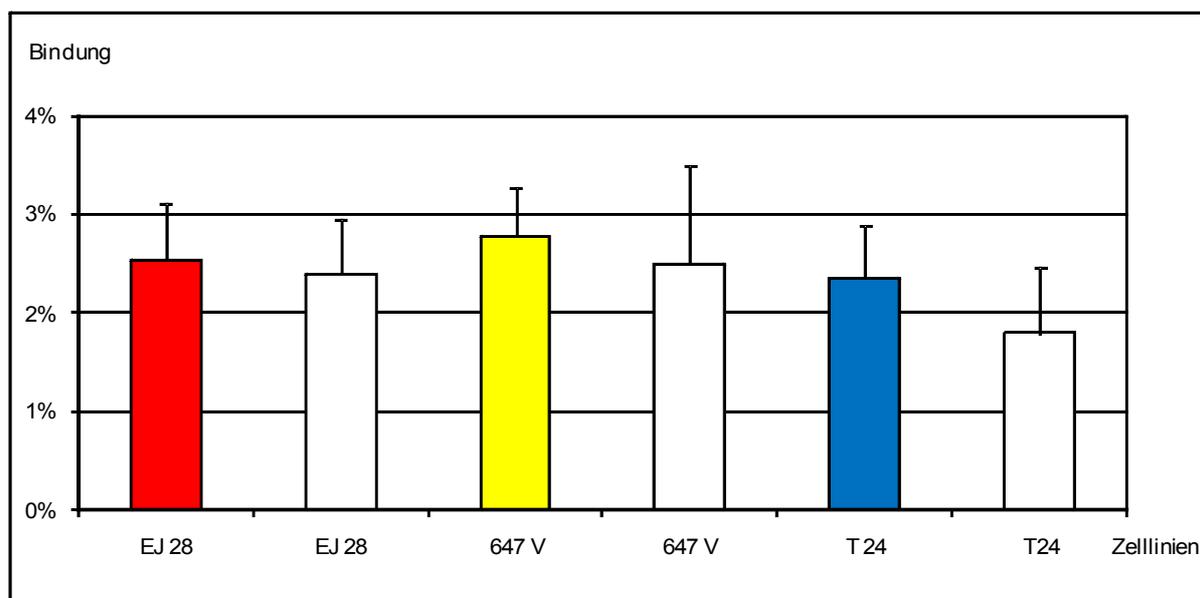


Abb. 17: Bindung von ^{125}I -C595 an die Zelllinien EJ 28, 647 V und T 24 nach Blockierung mit „kaltem“ Antikörper (weiß dargestellt) und alleiniger Inkubation mit ^{125}I -C595 (farbig dargestellt)

Nach Vorinkubation der Zellen mit einem Überschuss von „kaltem“ C595 zeigte sich zwar bei allen getesteten Zellen eine verminderte Bindung im Vergleich zu den Ergebnissen mit ^{125}I markiertem C595. Die jedoch nur gering voneinander abweichenden Ergebnisse lassen allerdings eine ungenügende Expression von MUC1-Antigenen auf der Zelloberfläche oder eine unzureichende Funktionalität des Antikörpers oder aber auch eine Internalisierung von ^{125}I markiertem C595 in die Zelle mit folgender Abspaltung von ^{125}I vermuten.

3.3.2 Bindungsstudien mit ^{213}Bi -markiertem Anti-MUC1-Antikörper

Die Bindungsversuche mit ^{213}Bi markiertem C595 wurden mit den Zelllinien EJ28, 647V, T24, RT4, RT112, T24 und J82 durchgeführt. Auch wenn Abweichungen der Ergebnisse untereinander zu verzeichnen waren, konnte doch gesehen werden, dass die Zelllinien 647V und EJ28 eine höhere Bindung im Vergleich zu den anderen getesteten Zelllinien zeigten. Die Dreifach- sowie Vierfachansätze eines einzelnen

Ergebnisse

Versuches (Abb. 18 – 20) zeigten gering voneinander abweichende Ergebnisse innerhalb einer Zelllinie. Bei der Zelllinie EJ28 variierte die Bindung mit dem ^{213}Bi markiertem Antikörper C595 zwischen 1% (Abb. 18) und 4,4% (Abb. 19), bei der Zelllinie 647V zwischen 2,5% und 7,3% und bei der Zelllinie T24 zwischen 0,7% und 1,2%.

Die in Abbildung 18 dargestellten Bindungsergebnisse wurden mit den Zelllinien EJ28, 647V und T24 durchgeführt. Von jeder Zelllinie wurden die Bindungsversuche im Vierfachansatz durchgeführt. Die Bindung variierte zwischen 1% (bei der Zelllinie T24) und 7,3% (bei der Zelllinie 647V) und zeigte somit deutlich weniger Variation im Vergleich zu den Bindungsstudien mit ^{125}I .

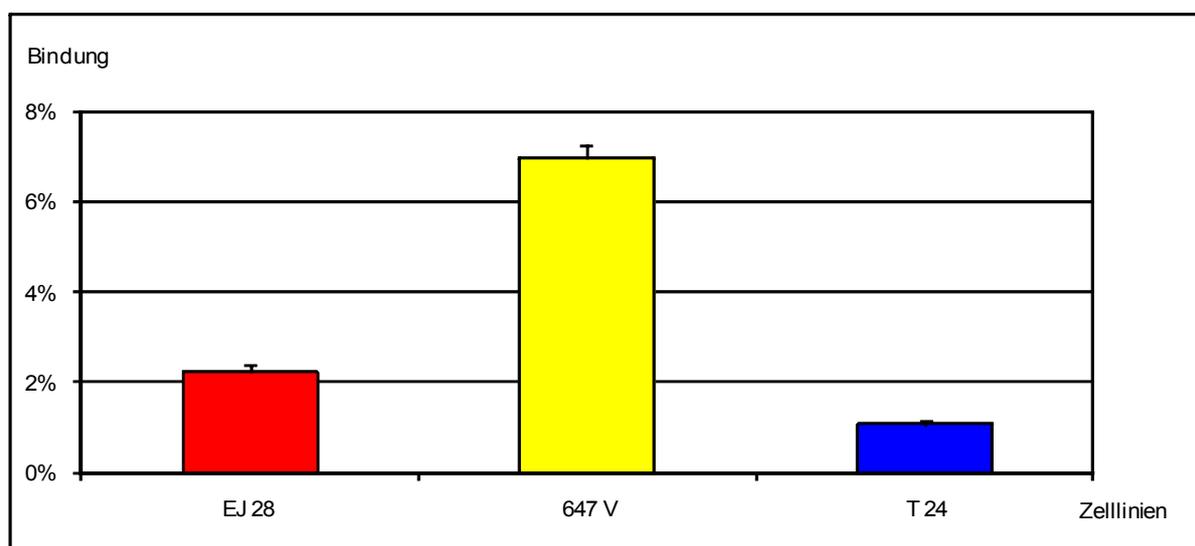


Abb. 18: Bindung von ^{213}Bi -markiertem C595 an die Zelllinien EJ28, 647V und T24.

Im folgenden Versuch wurden die Zelllinien EJ28, 647V, T24, J82 und RT112 verwendet. Es wurde bei den in Abbildung 19 getesteten Zelllinien ein Dreifachansatz durchgeführt, mit Ausnahme der Zelllinie J82, die wegen mangelnder Verfügbarkeit des Zellmaterial im Zweifachansatz getestet wurde. Das dargestellte Ergebnis zeigte im Vergleich zum Vorversuch eine geringere Bindung der Zelllinie 647V und eine stärkere Bindung der Zelllinie EJ28. Die Bindung der Zelllinie T24 zeigte ein zu den Vorversuchen weitgehend gleiches Ergebnis. Die Ergebnisse der anderen getesteten Harnblasenkarzinomzelllinien zeigten eine geringere Bindung.

Ergebnisse

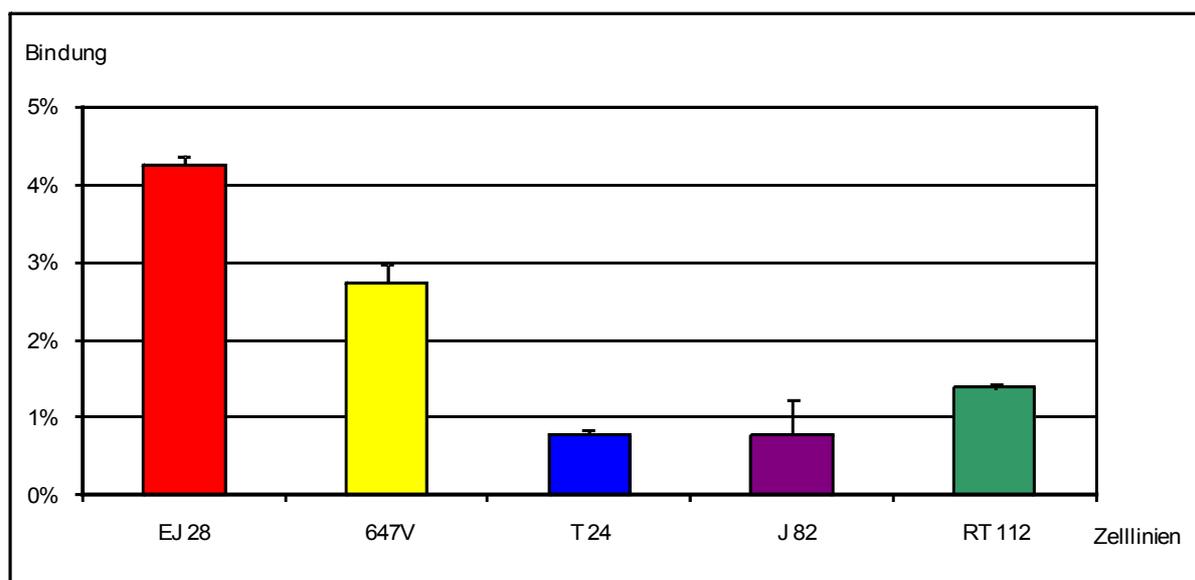


Abb. 19: Bindung von ^{213}Bi -markiertem C595 an die Zelllinien EJ28, 647V, T24, J82 und RT112.

Da die bisherigen Ergebnisse noch nicht unseren Erwartungen entsprachen, das heißt die Ergebnisse der Bindung mit radionuklidmarkiertem Antikörper schienen uns zu gering, erweiterten wir das Spektrum der im Experiment verwendeten Zelllinien. Bei Retz et al., 1984, wurde bei der Tumorzelllinie RT4 eine vermehrte MUC1-Expression beschrieben, so dass wir dieselbige in unsere Studie aufnahmen. In Abbildung 20 ist das Ergebnis der Bindung der Zelllinie RT4 (im Vierfachansatz) im Vergleich zur Zelllinie EJ28 (im Zweifachansatz) dargestellt. Hier zeigte die Zelllinie RT4 Bindungen zwischen 0,8% und 1,2%. Die im Vergleich getestete Zelllinie EJ28 zeigte eine durchschnittliche Bindung von 1%.

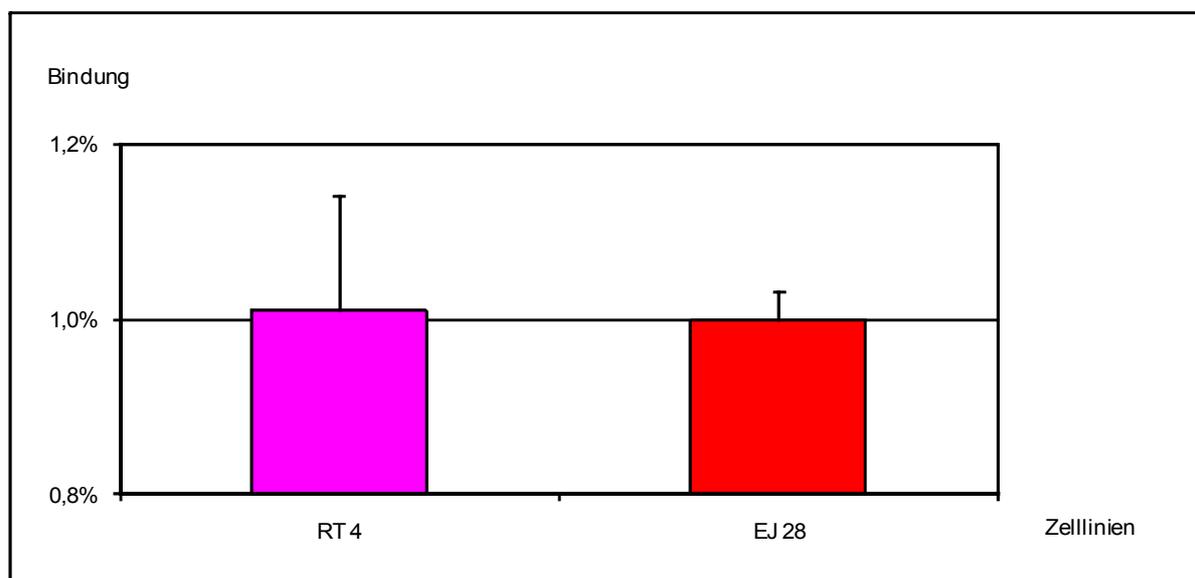


Abb. 20: Bindung mit ^{213}Bi -markiertem C595 an die Zelllinien RT4 und EJ28.

Ergebnisse

Die geringen Bindungsergebnisse mit dem radiojodmarkiertem Antikörper in den bisherigen Versuchen könnten einerseits auf eine fehlende Überexpression des MUC1-Antigens auf der Zelloberfläche oder aber auch auf eine unzureichende Bindungsaffinität des radiojodmarkierten C595-Antikörpers zurückzuführen sein. Deshalb wurden, wie schon in 3.3.1 beschrieben, auch mit ^{213}Bi -markiertem C595 Bindungsversuche zur Erfassung der Bindung des Antikörpers durchgeführt. Dazu wurden die Zelllinien mit ^{213}Bi -markiertem Antikörper inkubiert und in einem Parallelversuch mit nicht markiertem, sogenanntem „kaltem“ Antikörper geblockt und anschließend mit ^{213}Bi -markiertem C595 inkubiert. So konnten die Bindungseigenschaften des Antikörpers abgeschätzt werden, eine Expression der MUC1-Antigene auf der Zelloberfläche vorausgesetzt.

Die Zelllinien EJ28, 647V und T24 wurden jeweils im Dreifachansatz getestet. Sie wurden mit ^{213}Bi -markiertem Antikörper inkubiert und im Parallelversuch mit einem Überschuss (10µg pro Ansatz) an unmarkiertem C595, sogenannten „kalten“ Antikörper vor Zugabe des radionuklidmarkiertem Antikörpers „geblockt“. Wie in Abbildung 21 zu sehen, zeigte sich bei der Zelllinie EJ28 eine verminderte Bindung mit ^{213}Bi -C595 nach Vorinkubation mit dem „kalten“ Antikörper. Die Bindung nach Vorinkubation mit dem unmarkierten Antikörper lag durchschnittlich bei 1,2%. Mit dem markierten, sogenannten „heißen“ Antikörper, zeigte sich eine durchschnittliche Bindung von 2,7%. Die Zelllinie 647V zeigte eine durchschnittliche Bindung von 2,8% ohne Blocken und 1,5% mit Blocken durch den unmarkierten Antikörper. Eine durchschnittlich höhere Bindung nach Blockierung mit dem „kalten“ Antikörper zeigte die Zelllinie T24. Die Bindung mit markiertem Antikörper lag durchschnittlich bei 1,7%, nach Vorinkubation mit unmarkiertem C595 zeigte sich eine durchschnittliche Bindung von 2,3%.

Insgesamt war die Blockade sehr gering, deshalb ist zu schließen, dass wenig radionuklidmarkierter Antikörper gebunden hat.

Ergebnisse

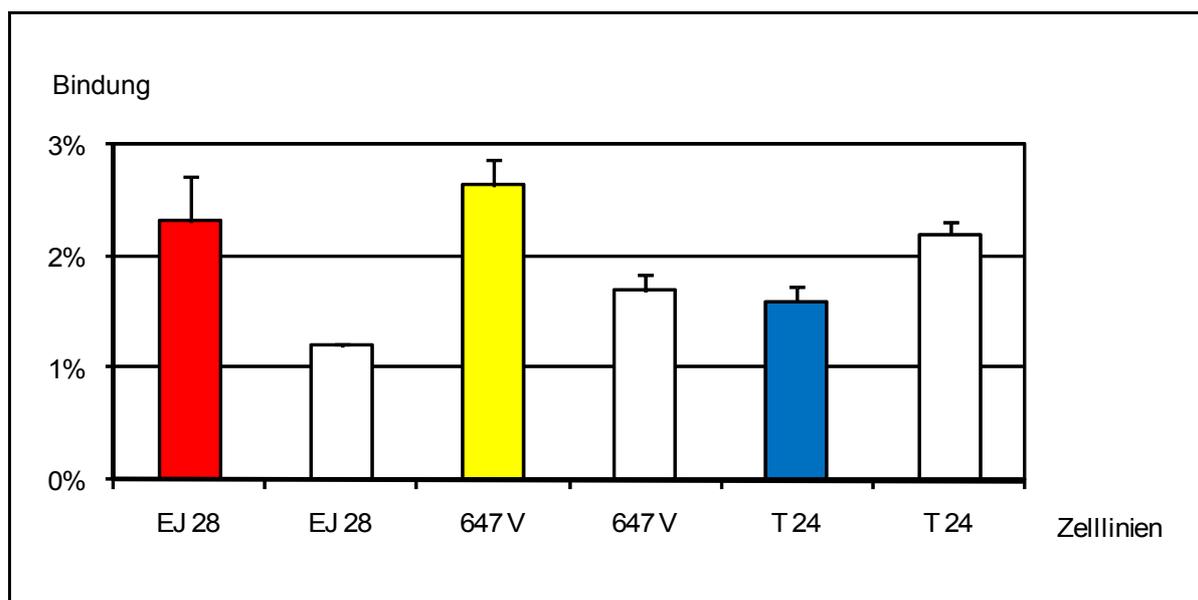


Abb. 21: Bindung von ^{213}Bi -markiertem C595 mit den Zelllinien EJ28, 647V und T24 nach Blockierung mit „kaltem“ Antikörper (weiß dargestellt) und alleiniger Inkubation mit radionuklidmarkiertem C595 (farbig dargestellt)

Da möglicherweise die Wachstumsbedingungen einer Zelle die Bindung an den radionuklidmarkierten Antikörper beeinflussen können, untersuchten wir die Bindung von ^{213}Bi -markiertem C595 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. Die Zelllinien EJ28, 647V, T24 und MBT2 wurden mit einer unterschiedlichen Konzentration von FCS in Zellkulturmedien kultiviert. Unsere Hypothese war, dass eine erniedrigte FCS-Konzentration die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen verlangsamt und sich somit der Anteil der Zellen, der sich in der proliferativen Phase befindet, erhöht. Die Zelllinien wurden jeweils im Doppelansatz unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen beziehungsweise FCS-Konzentrationen mit ^{213}Bi -markiertem C595 inkubiert. Wie in den Abbildungen 22 und 23 zu sehen, zeigte sich eine reduzierte Bindung von ^{213}Bi -markiertem C595 bei einer reduzierten FCS-Konzentration.

Ergebnisse

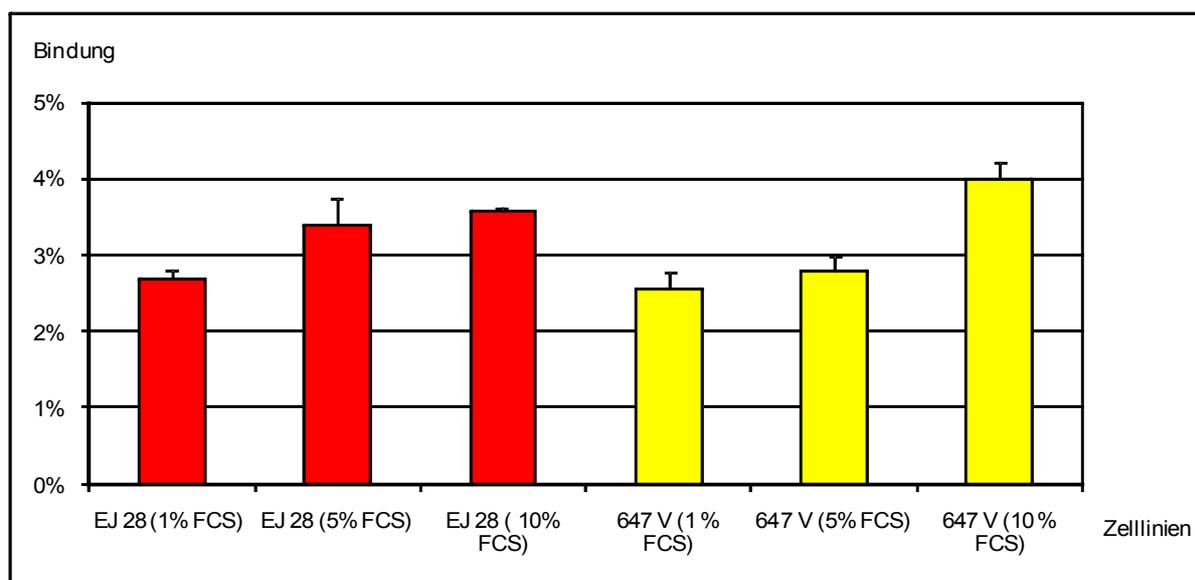


Abb. 22: Bindung von ^{213}Bi -markiertem C595 an die Zelllinien EJ28 und 647V mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen im Zellkulturmedium

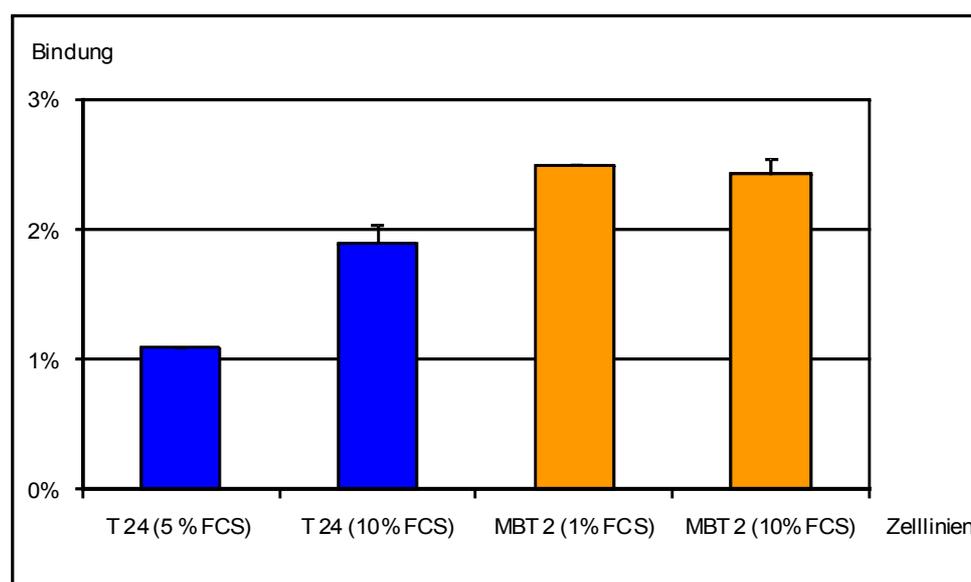


Abb. 23: Bindung mit ^{213}Bi -markiertem C595 an die Zelllinien T24 und MBT2 mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen im Zellkulturmedium.

Zusammenfassend zeigen die Versuche mit ^{213}Bi positive Bindungsergebnisse mit den getesteten Harnblasenkarzinomzelllinien mit geringen Abweichungen der Ergebnisse innerhalb der einzelnen Zelllinie. Die Ergebnisse wiesen jedoch insgesamt ein geringe prozentuale Bindung auf. So führen diese Ergebnisse zu der Annahme, dass möglicherweise die Expression des MUC1-Antigens auf den Harnblasenkarzinomzelllinien zu gering ist. In der Literatur wurde jedoch mehrfach

eine MUC1-Überexpression beschrieben, so dass wir die Bindungsaffinität des Antikörpers genauer untersuchten. Die Bindungen nach Blockieren mit unmarkiertem, „kaltem“ Antikörper zeigte eine durchschnittlich geringgradig verminderte Bindung bei den Zelllinien 647V und EJ28, jedoch nicht bei der Zelllinie T24. Die Bindungsstudien in den unterschiedlichen Wachstumsphasen der Zellen zeigten eine geringere Bindung bei geringerem FCS-Gehalt im Zellkulturmedium.

3.4 MUC1-Rezeptornachweis mittels Western Blot

Wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, werden mit der Western Blot Technik Proteine, in unserem Fall die aus den Harnblasenkarzinomzellen zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend via Blotting Technik auf einer Nitrozelluloseschicht mit Hilfe eines Sekundärantikörpers sozusagen „visualisiert“. Via Referenz konnte eine Proteinbande mit dem Molekulargewicht von annähernd 200kDa als MUC1-Antigen identifiziert werden. Diese Proteinbande zeigte sich bei den Zelllinien T24, 647V, EJ28, und J82, bei der Zelllinie RT112 zeigte sich eine fraglich positive Bande, keine Bande war jedoch sichtbar bei den Zelllinien MBT2 und RT4. Bei der Negativkontrolle ohne Zugabe des Primärantikörpers fehlte bei den Zelllinien eine entsprechende Bande, so dass die Hypothese eines existenten MUC1-Oberflächenantigens auf der Mehrzahl der von uns getesteten Harnblasenkarzinomzelllinien damit bestätigt werden konnte.

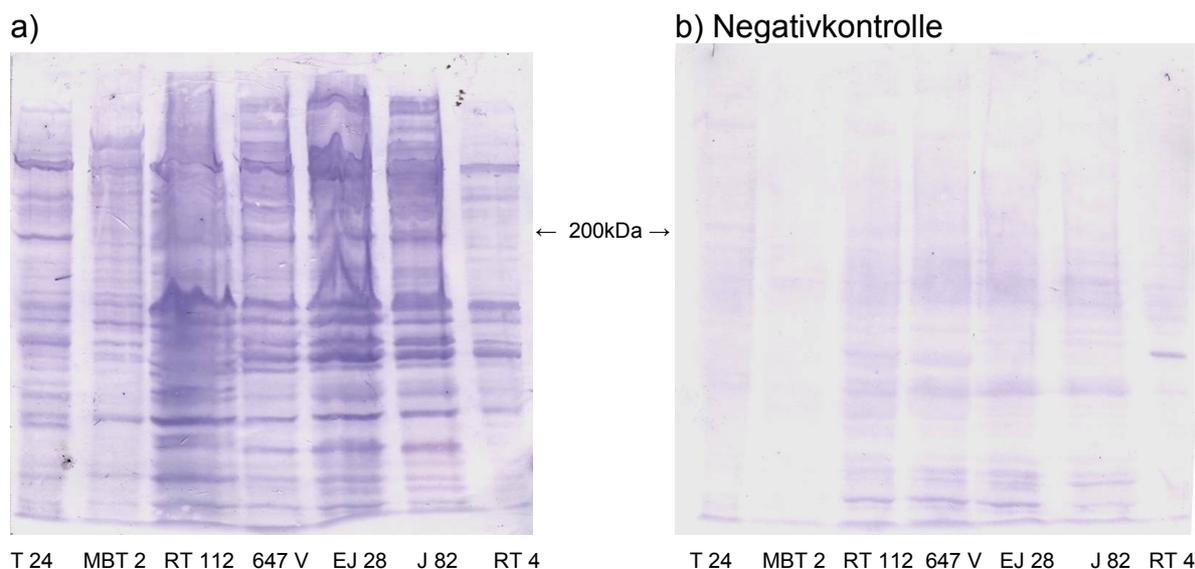


Abb. 24: Western Blot der Zelllinien T24, MBT2, RT112, 647V, EJ28, J82 und RT4 (a), mit Negativkontrolle (ohne Zugabe des Primärantikörpers) (b)

3.5 Quantifizierung der MUC1-Rezeptoren mittels Scatchard-Test

Wie in Kapitel 2.2.7 bereits beschrieben, zeigt die lineare Darstellung der Scatchard Analyse die Antikörpermenge, die zur Sättigung der zellulären Antigene notwendig ist, wodurch die Menge der Antigenbindungsstellen auf der Zelloberfläche abgeschätzt werden kann. Die Scatchard Analyse wurde für alle Zelllinien mit dem ^{111}In -markiertem Antikörper durchgeführt. Die jeweiligen Ergebnisse zeigten jedoch stark voneinander abweichende Ergebnisse.

3.5.1 Scatchard Test der Zelllinie 647V mit ^{111}In -C595

Es konnten mittels Scatchard Analyse $6,5 \times 10^4$ Antigene pro Zelle abgeschätzt werden.

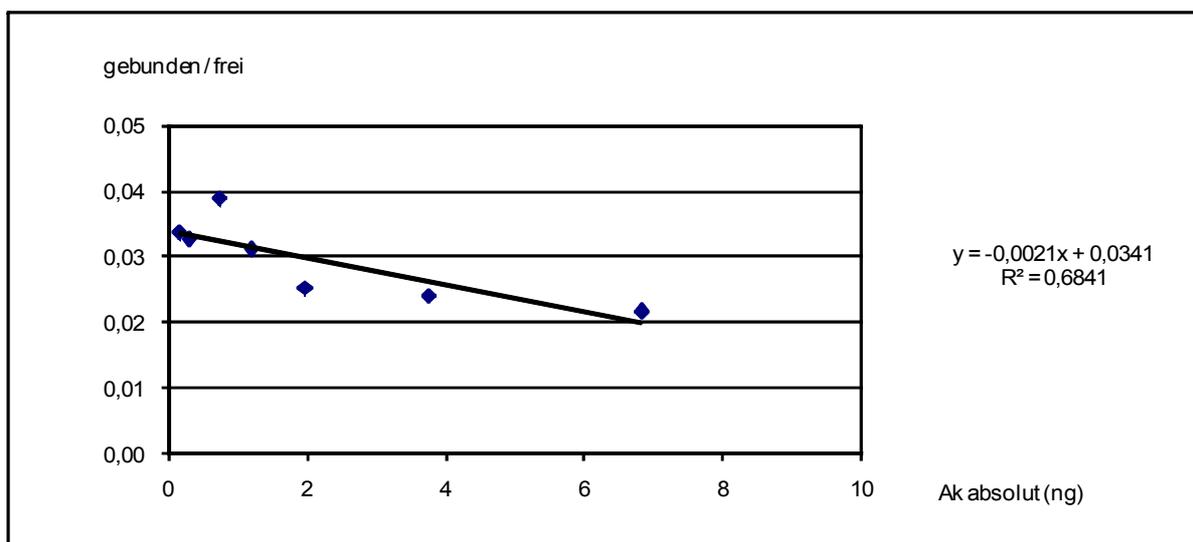


Abb. 25: Scatchard Analyse der Zelllinie 647V mit ^{111}In -C595

3.5.2 Scatchard Test der Zelllinie J82 mit $^{111}\text{In-C595}$

Es konnten mittels Scatchard Analyse $1,85 \times 10^4$ Antigene pro Zelle abgeschätzt werden.

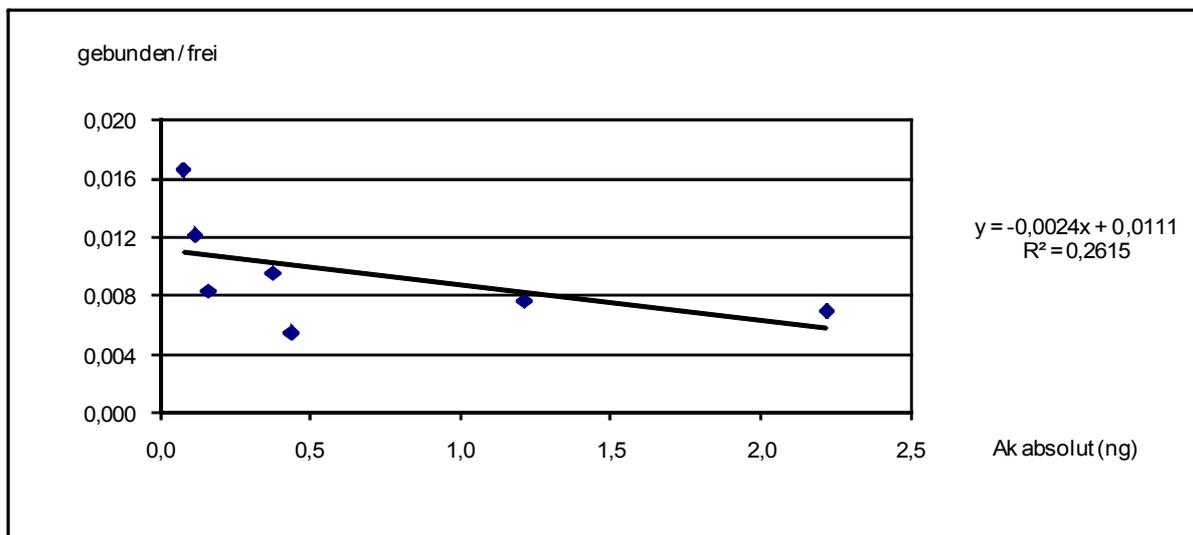


Abb. 26: Scatchard Analyse der Zelllinie J82 mit $^{111}\text{In-C595}$

3.5.3 Scatchard Test der Zelllinie MBT2 mit $^{111}\text{In-C595}$

Es konnten mittels Scatchard Analyse $2,4 \times 10^4$ Antigene pro Zelle abgeschätzt werden.

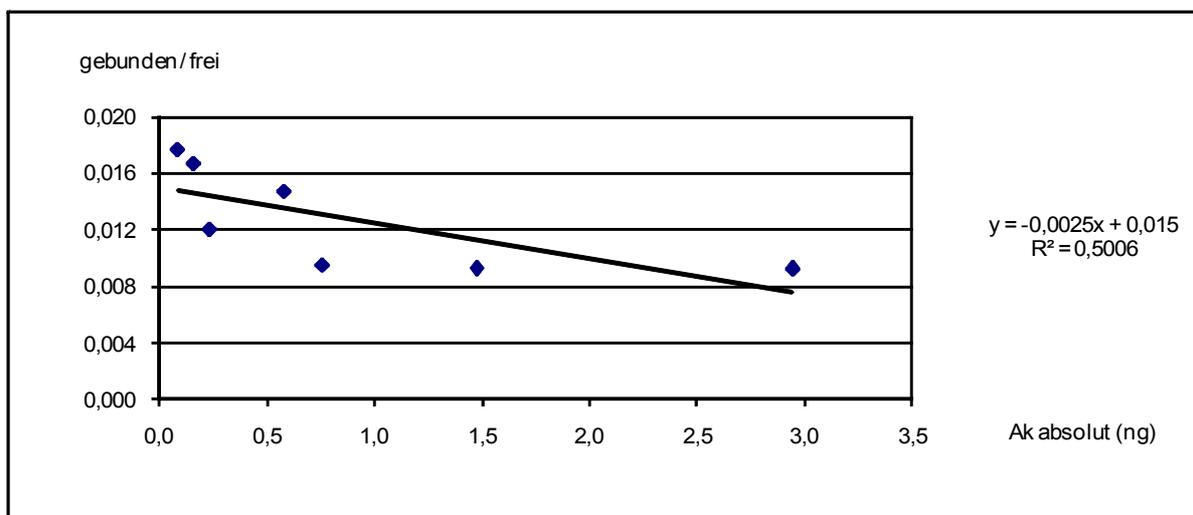


Abb. 27: Scatchard Analyse der Zelllinie MBT2 mit $^{111}\text{In-C595}$

3.5.4 Scatchard Test der Zelllinie RT112 mit $^{111}\text{In-C595}$

Es konnten mittels Scatchard Analyse $7,87 \times 10^4$ Antigene pro Zelle abgeschätzt werden.

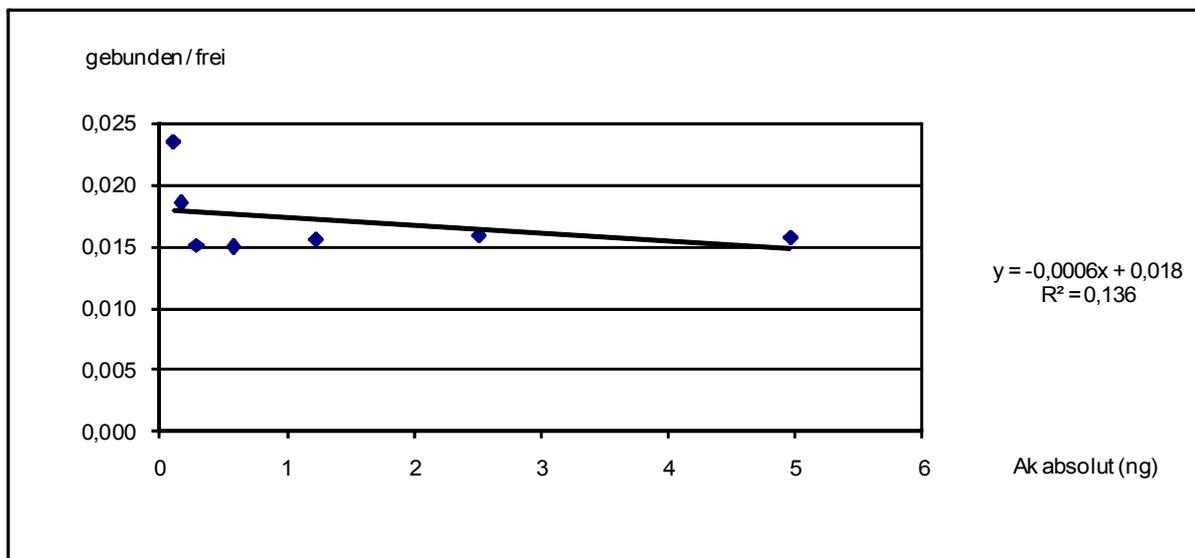


Abb. 28: Scatchard Analyse der Zelllinie RT112 mit $^{111}\text{In-C595}$

3.5.5 Scatchard Test der Zelllinie T24 mit $^{111}\text{In-C595}$

Es konnten mittels Scatchard Analyse $4,88 \times 10^4$ Antigene pro Zelle abgeschätzt werden.

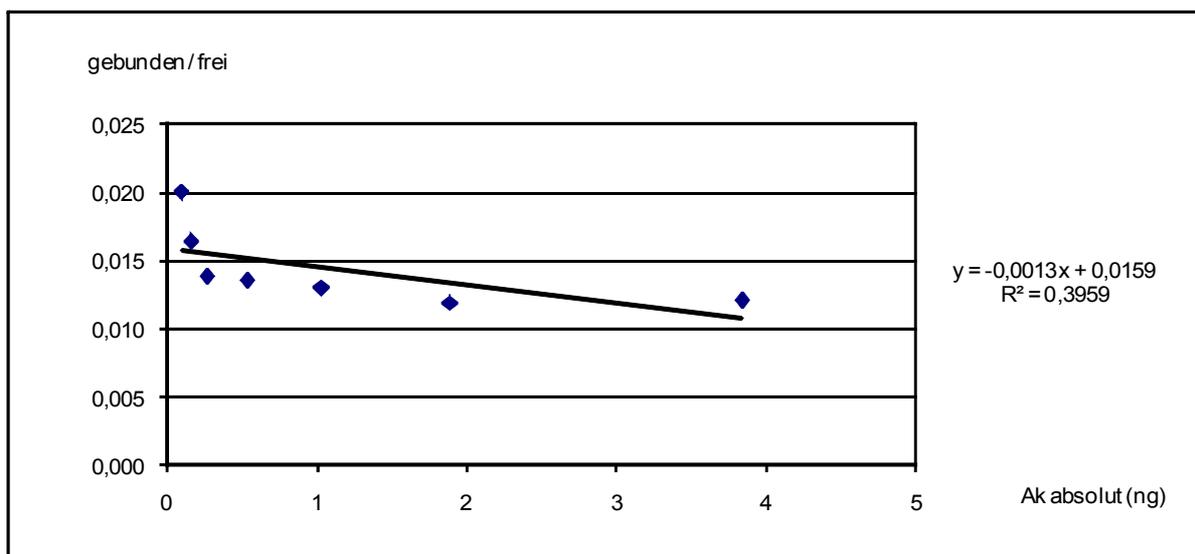


Abb. 29: Scatchard Analyse der Zelllinie T24 mit $^{111}\text{In-C595}$

3.5.6 Scatchard Test der Zelllinie EJ28 mit $^{111}\text{In-C595}$

Es konnten mittels Scatchard Analyse $1,86 \times 10^4$ Antigene pro Zelle abgeschätzt werden.

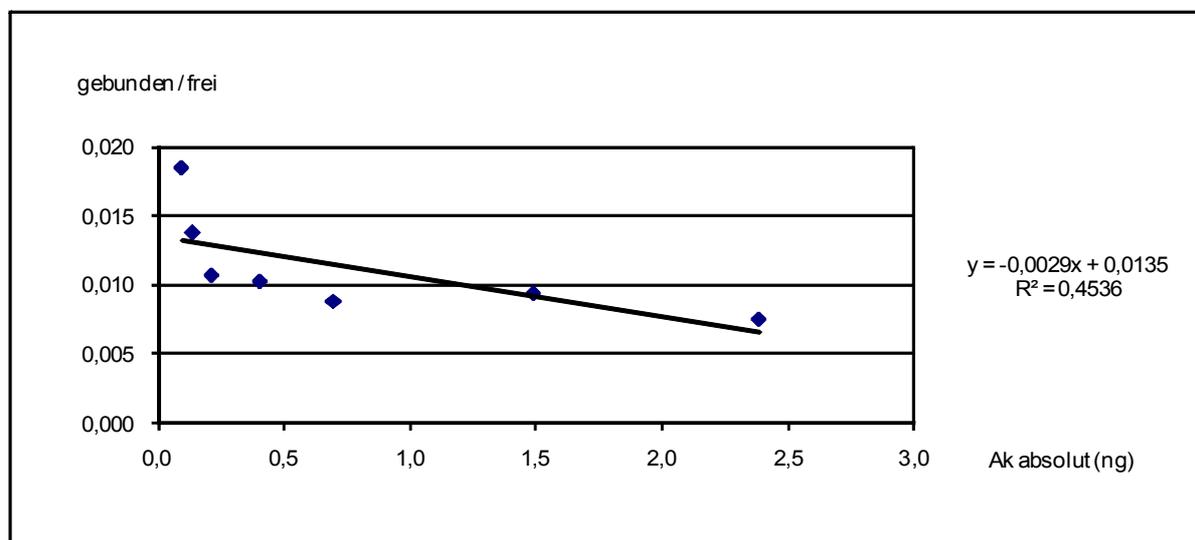


Abb. 30: Scatchard Analyse der Zelllinie EJ28 mit $^{111}\text{In-C595}$

3.6 Ergebnisse der Klonogenen Assays

Wie bereits unter Punkt 2.2.8 beschrieben, konnte anhand des Klonogenen Assays die Toxizität von ^{213}Bi abgeschätzt werden. Nach Aussaat verschiedener Zellkonzentrationen und Inkubation mit unterschiedlichen Aktivitäten von $^{213}\text{Bi-C595}$ wurden nach einer Woche die Zellklone der jeweiligen Zelllinien ausgetestet. Es wurden Klonogene Assays bei den Zelllinien EJ28, T24, MBT2, 647V, RT4, RT112 und J82 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 31 – 37 dargestellt.

Zelllinie EJ28

Es zeigte sich bei der Kontrolle (keine Zugabe von ^{213}Bi) bei einer Aussaat von 100 Zellen pro well ein Ergebnis von 31 Klonen nach 7 Tagen und ein Wachstum von 63 Klonen bei einer Aussaat von 200 Zellen pro well. Nach Zugabe von $^{213}\text{Bi-C595}$ zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle kein signifikant vermindertes Wachstum bei $3,7 \times 10^4 \text{Bq}$ (30 Klone bei einer Aussaat von 100 Zellen/well und 61 Klone bei einer Aussaat von 200 Zellen/well). Nach Zugabe einer Aktivität von $1,85 \times 10^5 \text{Bq}$ war das Wachstum der Zellen bereits vermindert. 29 Klone konnten bei einer Aussaat von 100 Zellen/well und 58 Klone bei einer Aussaat von 200 Zellen/well ausgezählt werden. Nach Zugabe von $7,4 \times 10^5 \text{Bq}$ war bei der Aussaat von 200 Zellen/well ein

Ergebnisse

Wachstum von 31 Zellklonen nachweisbar (49%ige Reduktion). Bei einer Zellaussaat von 100 Zellen pro well war nach Zugabe von $7,4 \times 10^5 \text{ Bq}$ eine 51%ige Reduktion der Zellklone zu verzeichnen.

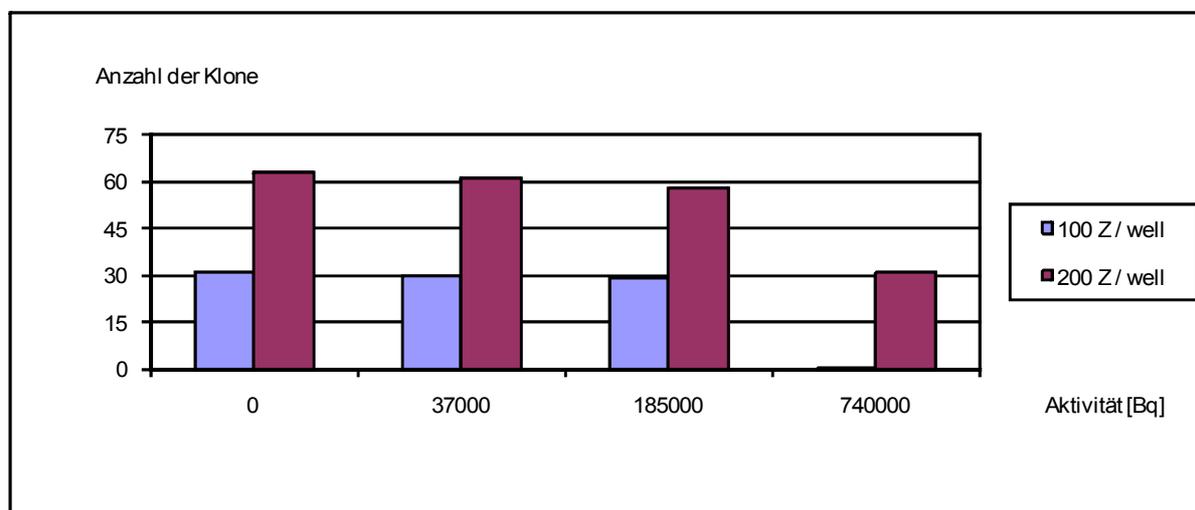


Abb. 31: Zahl der Klone der Zelllinie EJ28 nach Inkubation mit ^{213}Bi -C595 in unterschiedlicher Aktivitätskonzentration bei verschiedenen Zellausgangskonzentrationen.

Zelllinie T24

Die Kontrolle zeigte ein Wachstum von 20 (Aussaat von 100 Zellen/well) bzw. 29 Klonen (Aussaat von 200 Zellen/well). Nach Zugabe von $3,7 \times 10^4 \text{ Bq}$ ^{213}Bi markiertem Antikörper C595 waren bei einer Aussaat von 100 Zellen pro well 24 Klone und 27 Klone bei einer Aussaat von 200 Zellen quantifizierbar. Nach Zugabe von $1,85 \times 10^5 \text{ Bq}$ zeigte sich ein Wachstum von 24 Klonen (Aussaat 100 Zellen/well) und 19 Klone bei einer Aussaat von 200 Zellen/well. Nach Zugabe von $7,4 \times 10^5 \text{ Bq}$ konnten bei einer Aussaat von 100 Zellen/well 4 Klone und bei einer Aussaat von 200 Zellen/well 11 Zellklone ausgezählt werden. Es war hier eine Wachstumsreduktion im Vergleich zur Kontrolle von 80% (Bei einer Zellaussaat von 100 Zellen/well) bzw. 62% (Bei einer Zellaussaat von 200 Zellen/well) zu verzeichnen.

Ergebnisse

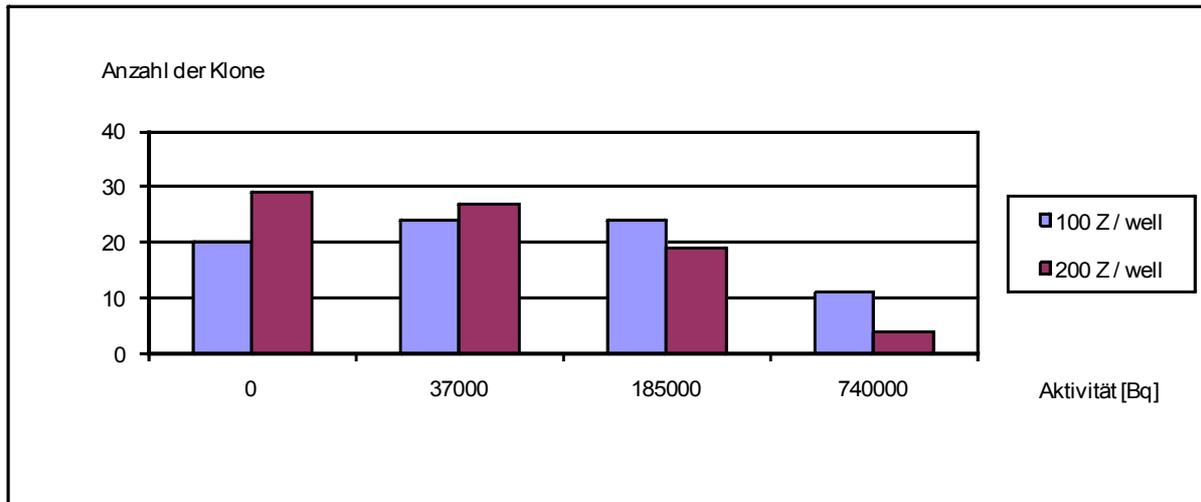


Abb. 32: Zahl der Klone der Zelllinie T24 nach Inkubation mit ^{213}Bi -C595 in unterschiedlicher Aktivität bei verschiedenen Zellausgangskonzentrationen.

Zelllinie MBT2

Die Kontrolle zeigte ein Wachstum von 36 Klonen bei einer Aussaat von 100 Zellen pro well und 72 Klonen bei einer Aussaat von 200 Zellen pro well. Nach Zugabe von $3,7 \times 10^4 \text{ Bq } ^{213}\text{Bi}$ markiertem Antikörper C595 konnten 32 Klone (Aussaat 100 Zellen/well) und 64 Klone (Aussaat 200 Zellen/well) gezählt werden. Nach Aktivitätszugabe von $1,85 \times 10^5 \text{ Bq}$ wurden bei einer Aussaat von 100 Zellen pro well 29 Klone und 59 Klone bei einer Aussaat von 200 Zellen/well gezählt. Nach einer Zugabe von $7,4 \times 10^5 \text{ Bq}$ waren 11 Klone (Aussaat 100 Zellen/well) und 34 Zellklone (Aussaat 200 Zellen/well) quantifizierbar. Es war somit bei einer Aussaat von 100 Zellen/well eine Reduktion um 39% und bei einer Aussaat von 200 Zellen/well eine Reduktion um 53% zu verzeichnen.

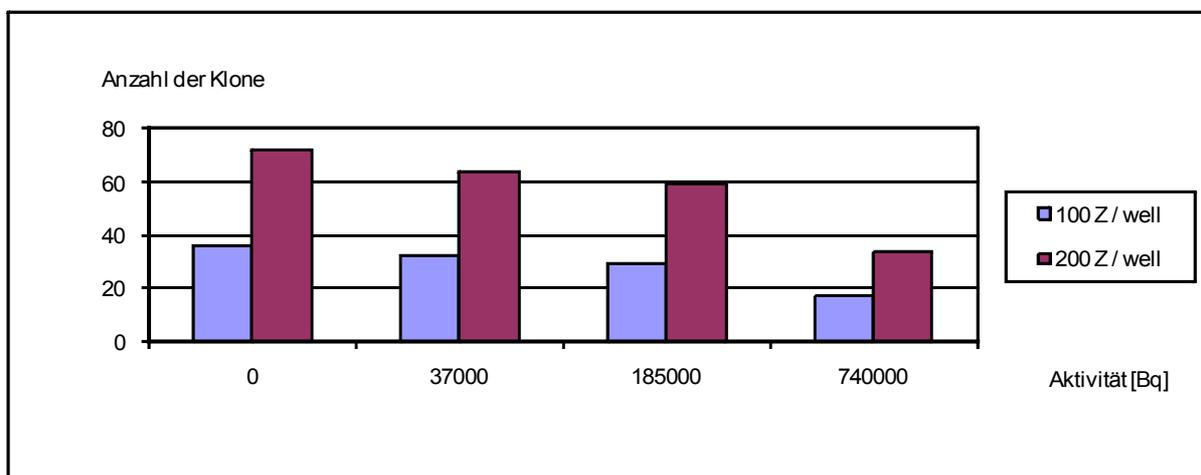


Abb. 33: Zahl der Klone der Zelllinie MBT2 nach Inkubation mit ^{213}Bi -C595 in unterschiedlicher Aktivität bei verschiedenen Zellausgangskonzentrationen.

Ergebnisse

Zelllinie 647V

Die Kontrolle zeigte ein Wachstum von 3 Klonen bei einer Aussaat von 100 Zellen pro well und 8 Klonen bei einer Aussaat von 200 Zellen pro well. Nach Zugabe von $3,7 \times 10^4 \text{ Bq}$ ^{213}Bi markiertem Antikörper wurden 4 Klone bei einer Aussaat von 100 Zellen/well und 7 Klone bei einer Aussaat von 200 Zellen/well ausgezählt. 3 Klone (Aussaat 100 Zellen/well) und 7 Klone (Aussaat 200 Zellen/well) waren nach einer Zugabe von $1,85 \times 10^5 \text{ Bq}$ quantifizierbar. 2 Klone und somit eine Reduktion um 33% waren bei einer Aussaat von 100 Zellen pro well nachweisbar, 4 Zellklone (Aussaat 200 Zellen/well) konnten nach einer Zugabe von $7,4 \times 10^5 \text{ Bq}$ ausgezählt werden, was einer 50%igen Reduktion entspricht. Bei geringer Anzahl von Klonen in der Kontrolle ist die Beurteilbarkeit der prozentualen Berechnung jedoch eingeschränkt.

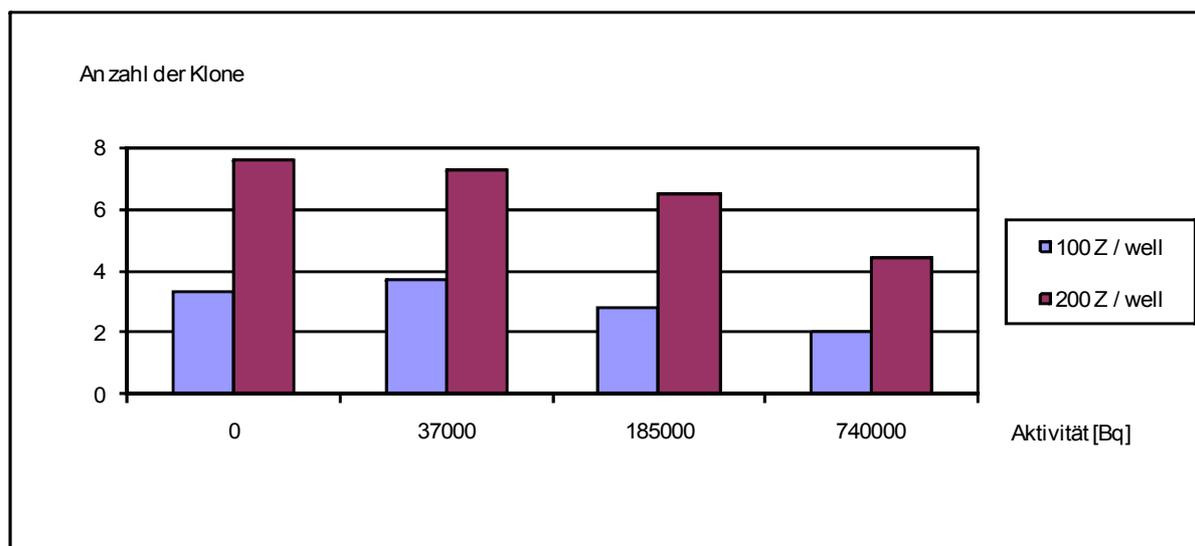


Abb. 34: Zahl der Klone der Zelllinie 647V nach Inkubation mit ^{213}Bi -C595 in unterschiedlicher Aktivität bei verschiedenen Zellausgangskonzentrationen.

Zelllinie RT4

Die Kontrolle zeigte bei einer Aussaat von 100 Zellen/well ein Wachstum von 7 Klonen und bei einer Aussaat von 200 Zellen/well ein Wachstum von 15 Klonen. Nach Zugabe von $3,7 \times 10^4 \text{ Bq}$ ^{213}Bi markiertem Antikörper wurden 6 Klone (Aussaat 100 Zellen/well) und 11 Klone (Aussaat 200 Zellen/well) gezählt. Nach einer Zugabe von bei $1,85 \times 10^5 \text{ Bq}$ waren 6 Klone (Aussaat 100 Zellen/well) und 11 Klone (Aussaat 200 Zellen/well) nachweisbar. Nach einer Zugabe von $7,4 \times 10^5 \text{ Bq}$ zeigte sich bei einer Aussaat von 100 Zellen/well eine Reduktion um 86% (1 Zellklon wurde noch ausgezählt) und bei einer Aussaat von 200 Zellen/well eine 80%ige Reduktion (3

Ergebnisse

Zellklone wurden ausgezählt). Auch bei dieser Zelllinie besteht eine geringe Anzahl von Klonen in der Kontrolle und somit eine eingeschränkte Beurteilbarkeit der prozentualen Berechnung.

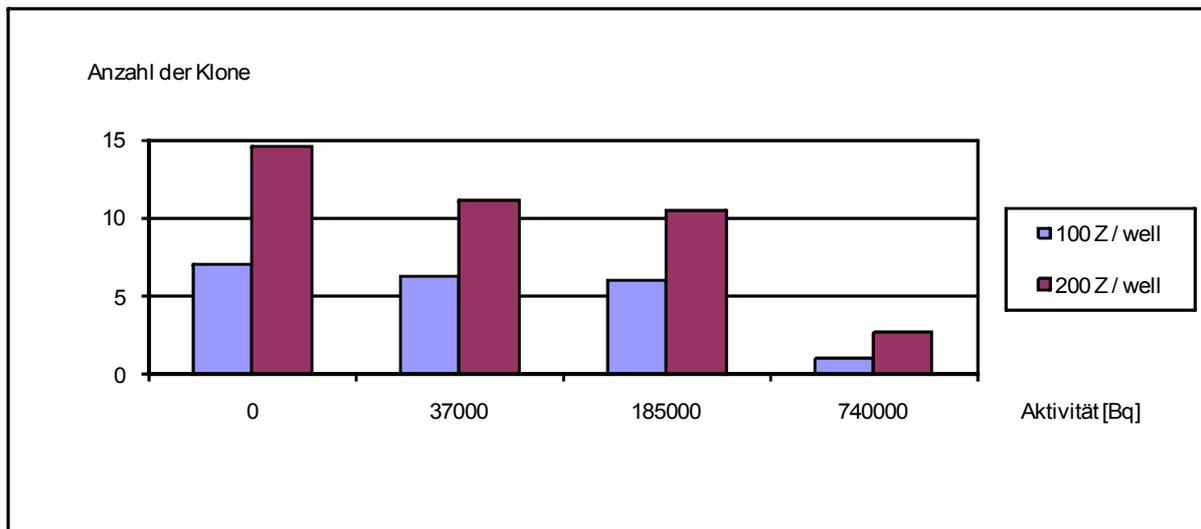


Abb. 35: Zahl der Klone der Zelllinie RT4 nach Inkubation mit ^{213}Bi -C595 in unterschiedlicher Aktivität bei verschiedenen Zellausgangskonzentrationen.

Zelllinie RT112

Die Kontrolle zeigte ein Wachstum von 27 Klonen (Aussaat 100 Zellen/well) und 44 Klone (Aussaat 200 Zellen/well). Nach Zugabe von $3,7 \times 10^4 \text{ Bq } ^{213}\text{Bi}$ markiertem Antikörper wurden bei einer Aussaat von 100 Zellen pro well 27 Klone und 38 Klone bei einer Aussaat von 200 Zellen pro well gezählt. Nach Zugabe von $1,85 \times 10^5 \text{ Bq}$ waren ebenfalls noch 27 Klone (Aussaat 100 Zellen/well) und 40 Klone (Aussaat 200 Zellen/well) quantifizierbar. Nach einer Zugabe von $7,4 \times 10^5 \text{ Bq}$ reduzierte sich bei einer Aussaat von 100 Zellen/well die Klonzahl um 33% (18 Klone) und bei einer Aussaat von 200 Zellen/well um 74% (29 Zellklone).

Ergebnisse

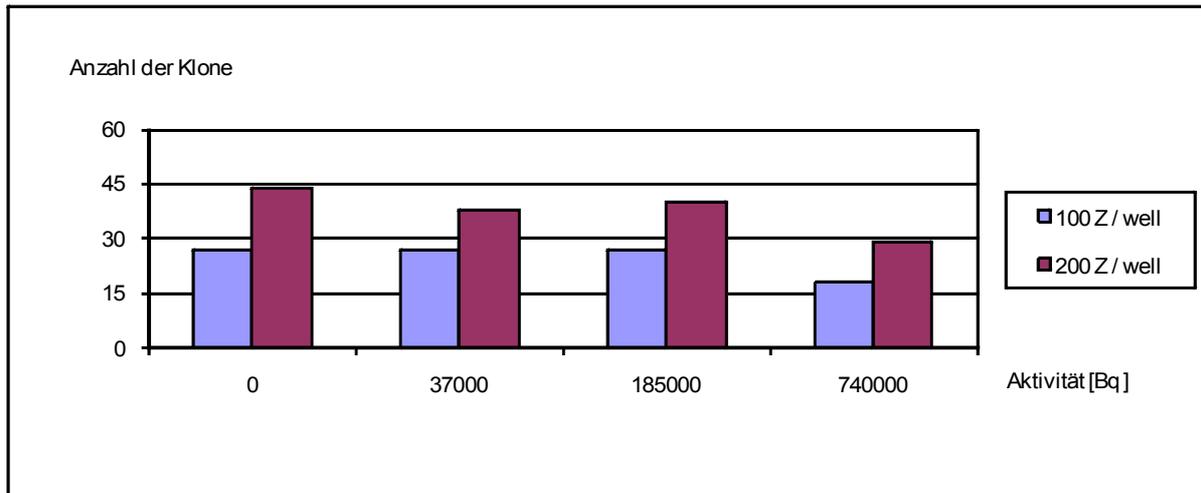


Abb. 36: Zahl der Klone der Zelllinie RT112 nach Inkubation mit ^{213}Bi -C595 in unterschiedlicher Aktivität bei verschiedenen Zellausgangskonzentrationen.

Zelllinie J82

Die Kontrolle zeigte bei einer Aussaat von 100 Zellen pro well ein Wachstum von 17 Klonen und bei einer Aussaat von 200 Zellen pro well ein Wachstum von 24 Klonen. Nach Zugabe von $3,7 \times 10^4 \text{ Bq } ^{213}\text{Bi}$ markiertem Antikörper wurden 18 Klone (Aussaat 100 Zellen/well) und 20 Klone (Aussaat 200 Zellen/well) gezählt. 13 Klone (Aussaat 100 Zellen/well) und 19 Klone (Aussaat 200 Zellen/well) wurden nach Zugabe von $1,85 \times 10^5 \text{ Bq}$ gezählt. Nach einer Zugabe von $7,4 \times 10^5 \text{ Bq}$ reduzierten sich bei einer Aussaat von 100 Zellen/well die Klone um 53% (8 Zellklone) und bei einer Aussaat von 200 Zellen/well um 50% (12 Zellklone).

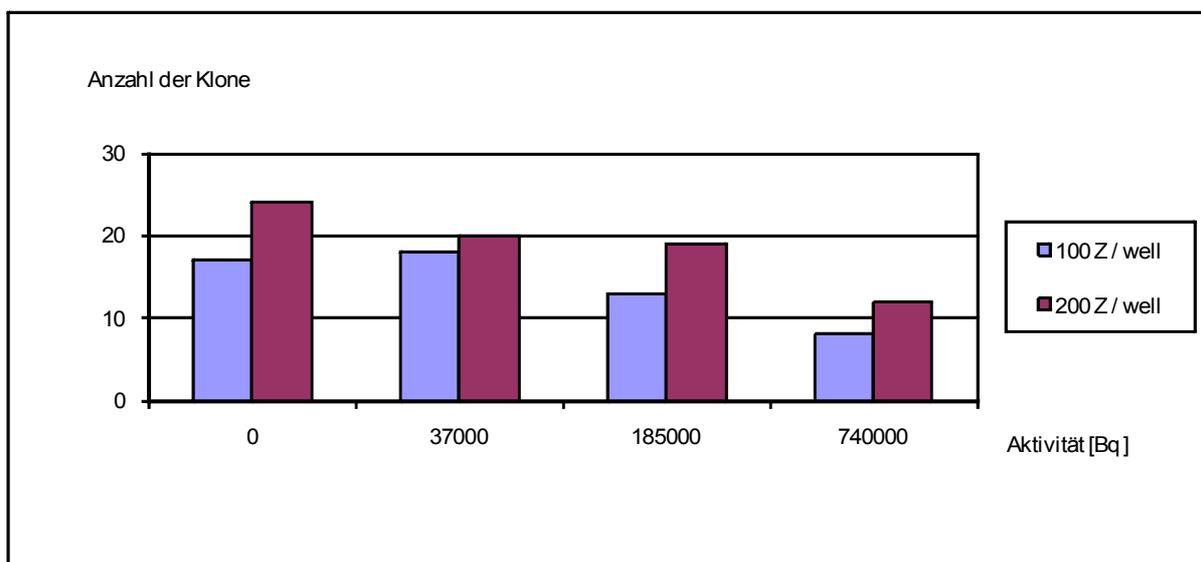


Abb. 37: Zahl der Klone der Zelllinie J82 nach Inkubation mit ^{213}Bi -C595 in unterschiedlicher Aktivität bei verschiedenen Zellausgangskonzentrationen.

3.7 Immunhistochemischer Nachweis der EGF-Rezeptor Expression

Da sich auf den meisten von uns getesteten Harnblasenkarzinomzelllinien zwar das MUC1-Antigen nachweisen ließ, jedoch nicht in erwarteter beziehungsweise gewünschter Menge und uns die Bindung mit dem zur Verfügung stehendem Antikörper nicht ausreichend erschien, suchten wir nach weiteren Möglichkeiten Harnblasenkarzinomzellen zu detektieren, vielmehr nach einem anderen Oberflächenrezeptor als Zielstruktur für die Radioimmuntherapie. Hier schien uns der bereits mehrfach in der Literatur beschriebene EGF-Rezeptor viel versprechend (Colquihoun, A.J. et al., 2002. Bellmunt, J. et al.; 2003. Rotterud, R et al.; 2005. Cheng, J et al.; 2002). Hierbei bedienten wir uns der Methode der Immunhistochemie. Wie bereits unter Punkt 2.2.9 beschrieben, erfolgte die Färbung mit Anti-EGF-MAK an Schnittpräparaten der Dicke 3µm der präparierten Zellpellets unserer Karzinomzelllinien 647V, EJ28, RT112, RT4, MBT2 und J82.

Zelllinie 647V

Bei immunhistochemischer Färbung mit Anti-EGF-MAK zeigt sich bei der Zelllinie 647V ein stark positives (+++) Ergebnis und somit ein deutlicher Hinweis auf die Expression des EGF-Rezeptors auf der Zelloberfläche.

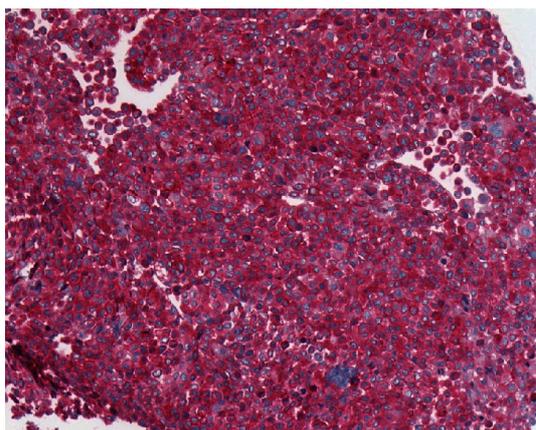


Abb.38: Immunhistochemie des Zellpellets der Zelllinie 647V mit Anti-EGF-MAK

Zelllinie EJ28

Die immunhistochemische Färbung mit Anti-EGF-MAK zeigt bei der Zelllinie EJ28 ein stark positives (+++) mit deutlichem Hinweis auf die Existenz von EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

Ergebnisse

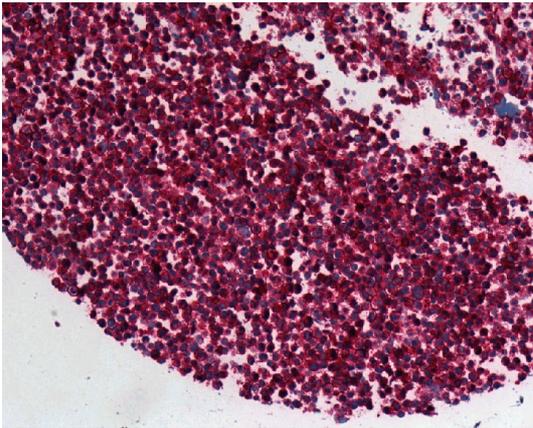


Abb.39: Immunhistochemie des Zellpellets der Zelllinie EJ 28 mit Anti-EGF-MAK

Zelllinie RT112

Die immunhistochemische Färbung mit Anti-EGF-MAK zeigt bei der Zelllinie RT112 ebenfalls ein stark positives (+++) Ergebnis. Auch hier lässt sich eine deutliche Expression des EGF-Rezeptors vermuten.

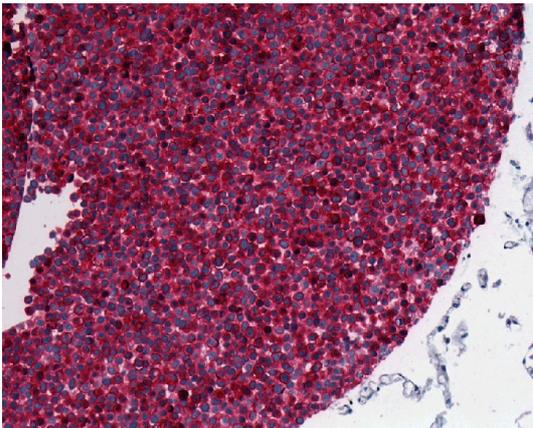


Abb.40: Immunhistochemie des Zellpellets der Zelllinie RT112 mit Anti-EGF-MAK

Zelllinie RT4

Hier zeigt die immunhistochemische Färbung mit Anti-EGF-MAK ein positives (++) Ergebnis, im Vergleich zu den vorherigen Versuchen jedoch mit deutlich abgeschwächter Färbung. Eine Expression des EGF-Rezeptors ist auch bei dieser Zelllinie wahrscheinlich, wohl jedoch nicht in hoher Quantität.

Ergebnisse

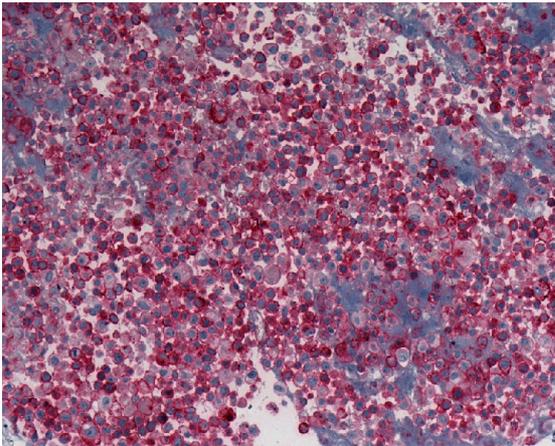


Abb.41: Immunhistochemie des Zellpellets der Zelllinie RT 4 mit Anti-EGF-MAK

Zelllinie MBT2

Hier zeigt die immunhistochemische Färbung mit Anti-EGF-MAK ein negatives Ergebnis und macht somit die Expression des EGF-Rezeptors auf dieser murinen Harnblasenkarzinomzelllinie eher unwahrscheinlich.

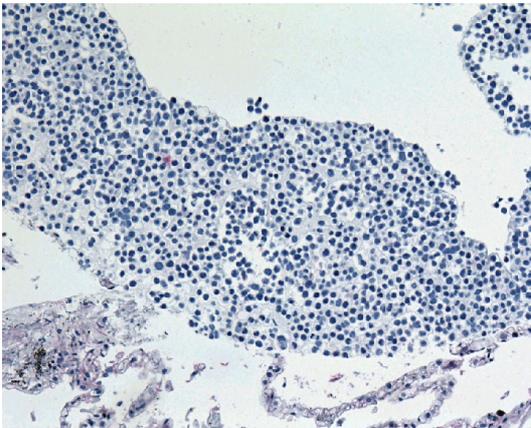


Abb.42: Immunhistochemie des Zellpellets der Zelllinie MBT 2 mit Anti-EGF-MAK

Zelllinie J82

Die immunhistochemische Färbung mit Anti-EGF-MAK liefert hier ein mäßig positives (++) Ergebnis und lässt auch hier eine EGF-Rezeptorexpression sehr wahrscheinlich erscheinen.

Ergebnisse

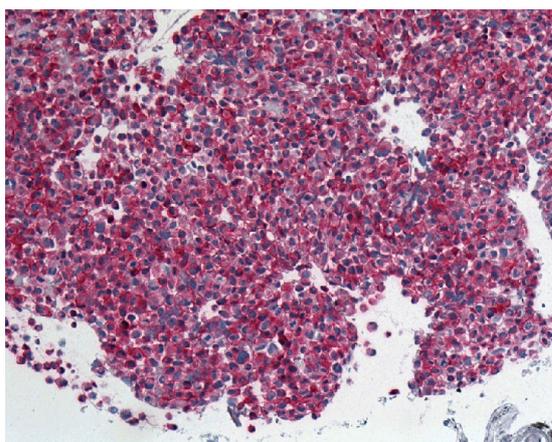


Abb.43: Immunhistochemie des Zellpellets der Zelllinie J 82 mit Anti-EGF-MAK

Zusammenfassend liefern die immunhistochemischen Färbungen der verschiedenen Harnblasenkarzinomzelllinien mit Anti-EGF-MAK zum Nachweis des EGF-Rezeptors viel versprechende Ergebnisse. Nur eine Harnblasenkarzinomzelllinie, die murine Zelllinie MBT2, lässt aufgrund des Ergebnis der Immunhistochemie die Expression des EGF-Rezeptors als unwahrscheinlich erscheinen. Alle übrigen getesteten Zelllinien weisen eine mäßige bis starke Färbereaktion auf und lassen eine hohe Expression des EGF-Rezeptors vermuten. Diese Ergebnisse liefern einen zuversichtlichen Ausblick für weitere Studien mit radionuklidmarkiertem Anti-EGF-Antikörper im Rahmen der Radioimmuntherapie des Blasenkarzinoms.

4 Diskussion

Das Harnblasenkarzinom ist eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit (Dorp F et al.; 2007). Laut WHO (World Health Organisation) betrug im Jahr 2000 die weltweite Mortalität des Harnblasenkarzinoms 132 432 Todesfälle pro Jahr (Parkin DM et al.; 2001). Die bisherige Therapie besteht je nach Stadium bei Diagnosestellung aus transurethraler Tumorsektion (TUR), lokaler oder systemischer Chemotherapie, Radiotherapie oder Zystektomie (Hegele A, 2008). Neben den unter Umständen sogar lebensbedrohlichen Komplikationen der oben genannten Therapien, stellt ein weiteres Problem derselbigen die hohe Rezidivrate dar. Dabei steht in dieser Studie die Entwicklung neuer Therapiestrategien nach transurethraler Resektion im Vordergrund. Der Zugangsweg zur Harnblase via Katheter stellt eine ideale Möglichkeit zur Instillation von Therapeutika nach transurethraler Resektion dar. Der Vorteil der lokoregionalen Therapie mit Radioimmunkonjugaten im Vergleich zu den bisherigen Behandlungsmethoden wie Chemotherapie oder externer Bestrahlung besteht vor allem in dem deutlich geringeren Nebenwirkungsprofil. Gerade bei den von Blasenkarzinom betroffenen, zumeist älteren Patienten stellt dies einen bedeutenden Faktor dar.

Hughes, O.D. et al. zeigte 1997 in einer Pilotstudie an Zystektomiepräparaten einen positiven Tumor-Uptake des mit ^{67}Cu markierten monoklonalen C595. ^{67}Cu zeigte sich hierfür bei einer Halbwertszeit von 2,6 Tagen und einer γ -Emmission von 185keV als ein geeignetes Radionuklid sowohl zur Detektion mittels Szintigrafie als auch zur Radioimmuntherapie. In der darauf folgenden Studie (Hughes, O.D. et al.; 2000) erfolgte die intravesikale Instillation von ^{67}Cu -C595 bei 15 Patienten mit Blasenkarzinom. Bei 12 Patienten war ein erhöhter Tumor-Uptake im Blasenresektat ex vivo nachweisbar. Es konnte keine immunogene Reaktion im Sinne einer Antikörperbildung gegen den intravesikal instillierten Anti-MUC1-C595 murinen Ursprungs nachgewiesen werden, zu einer systemischen Aufnahme von C595 oder des Radioimmunkonjugats kam es ebenfalls nicht. Eine therapeutische Anwendung fand der Anti-MUC1-C595 jedoch nicht.

Goldenberg und seine Arbeitsgruppe (Goldenberg, D.M. et al.; 2006) verglichen

verschiedene monoklonale Antikörper und ihre Anwendung in der Radioimmuntherapie. Nach systemischer Applikation zeigen radiomarkierte monoklonale Antikörper additiv zur Standardchemotherapie in der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen bereits Erfolg versprechende Ergebnisse. Bislang wurde noch kein vermehrtes Auftreten von Nebenwirkungen beobachtet, Langzeitstudien hierzu stehen allerdings noch aus. In der Behandlung des Glioblastoma multiforme zeigte sich die lokale Radioimmuntherapie mit einem ^{131}I - beziehungsweise ^{211}At (Astatin)-markierten Anti-Tenascin-Antikörper im Vergleich zur bisher verwendeten Brachytherapie oder stereotaktischen Bestrahlung gleichwertig (Goetz, C. et al.; 2003. Zalutsky, M.R. et al.; 2004, 2005, 2008. Riva, P. et al.; 2000).

In der Behandlung solider Tumoren allerdings stellt die Radioimmuntherapie nur bei kleinen Tumoren oder Mikrometastasen eine effektive Therapieoption dar. Weitere Versuche zur Radioimmuntherapie wurden mit Antikörperfragmenten beziehungsweise Peptiden unternommen, die jedoch ihre Limitierung in der hohen Anreicherung der radioaktiv markierten Fragmente in der Niere und somit der hohen renalen Toxizität haben.

Bisher wurden zur Therapie mit Radioimmunkonjugaten hauptsächlich Betastrahler verwendet. Der Vorteil von Alphastrahlern wie ^{213}Bi liegt zum einen in dem hohen linearen Energietransfer (LET), der bei $100\text{keV}/\mu\text{m}$ Gewebe liegt und etwa 500 mal höher als der von Betastrahlern ist (Huber, R. et al.; 2003). Der zweite Vorteil liegt in der kurzen Reichweite der Alphastrahler. Eine kurze Reichweite von $20 - 80\mu\text{m}$ verhindert den sog. „Kreuzfeuer-Effekt“, das heißt die Bestrahlung geht über das eigentliche Ziel, die den Antikörper bindende Tumorzelle hinaus, was zu einem toxischen Effekt bei den an die Tumorzellen angrenzenden Zellen führt. Um eine Schädigung des gesunden Gewebes, bedingt durch die hohe Zytotoxizität von Alphastrahlern, zu verhindern ist allerdings eine Zielstruktur im Tumor und ein spezifischer für diesen Tumor bindenden Carrier notwendig. Durch die spezifische Bindung des mit einem α -Emitter gekoppelten Carriers, tritt die gewünschte Toxizität nur an der Tumorzelle auf, wohingegen das umgebende, gesunde Gewebe weitgehend verschont bleibt.

Bei einer Anzahl von etwa 100 verschiedenen Alphastrahlern gibt es nur wenige, die zu klinischen Zwecken eingesetzt werden können und die die Kriterien der chemischen und physikalischen Reinheit gewährleisten sowie eine ausreichend lange Halbwertszeit aufweisen um als Radioimmunkonjugat eingesetzt werden zu können.

Couturier, O. und seine Arbeitsgruppe verglichen 2005 die Wirkung bisher verwendeter Alphastrahler gekoppelt an monoklonale Antikörper: Ein Alphastrahler, der aufgrund der relativ langen Halbwertszeit von 7,2 Stunden ein potenzielles Radionuklid für medizinische Zwecke darstellt, ist Astatin-211 (^{211}At). Seine LET beträgt 100keV, seine Reichweite 55 – 80 μm . Von der Arbeitsgruppe Zalutsky wurde das System der Aufreinigung von ^{211}At , welches im Zyklotron aus der Reaktion $^{209}\text{Bi}(\alpha,2n)^{211}\text{At}$ entsteht, verbessert und dadurch ^{211}At zur medizinischen Verwendbarkeit zugänglich gemacht. In Versuchen ^{211}At mit monoklonalen Antikörpern wie Rituximab (Anti-CD20) oder auch Antikörperfragmenten zu konjugieren konnte damit bereits eine selektive Tumorzelltoxizität aufgezeigt werden (Zalutsky, M.R. et al.; 1989). Ein weiterer bifunktionaler Chelator, N-succinimidyl 3-(trimethylstannyl)-benzoate, zeigte zusammen mit dem Antikörper Mab81C6 im in vitro Versuch eine Zytotoxizität an humanen Gliomzellen (Walicka, M.A. et al.; 1998). Zalutsky und seine Arbeitsgruppe applizierten 2000 erstmalig Gliompatienten nach Tumorresektion den mit ^{211}At konjugierten monoklonalen Anti-Tenascin-Antikörper 81C6 und es zeigte sich dabei in vivo eine exzellente Stabilität. In einer Studie der gleichen Arbeitsgruppe im Jahr 2008 wurden 18 Patienten mit Glioblastom, Astrozytom und Oligodendrogliom nach Resektion das Radioimmunkonjugat ^{211}At -ch81C6 lokoregional appliziert. Zusätzlich erfolgte eine systemische Chemotherapie. Bei einer mittleren Überlebenszeit von 52 Wochen bei Patienten mit Glioblastoma multiforme und Fehlen von höhergradiger Toxizität stellt die lokoregionale Applikation dieses Radioimmunkonjugats somit einen hoffnungsvollen Ausblick zur Therapie von malignen cerebralen Tumoren dar.

^{212}Bi , ein Alphastrahler mit einer Halbwertszeit von 60,55 Minuten, wurde nach Chelatierung mit DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) an einen gegen humanes Interleukin-2 gerichteten Antikörper (Anti-TAC) konjugiert. Die Bindung war in vivo

jedoch nicht stabil, während mit DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) als Chelator eine stabile Bindung erreicht werden konnte (Junghans, R.P. et al.; 1993). Gekoppelt an Anti-HER2 zeigte sich im Maus-Modell eine verlängerte Lebenszeit bei Fehlen von toxischer Knochenmarksdepression.

Der Alphastrahler ^{225}Ac (HWZ 10 Tage) wurde nach Chelatierung mit HEHA (2-(4-isothiocyanatobenzyl-1,4,7,1,13,16-hexa-azacyclohexa-decane-1,4,7,10,13,16)hexa-acetic acid) und Konjugation an den monoklonalen Antikörper MAb201B beziehungsweise MabHu-deltaCH2CC49 im Mausmodell mit pulmonal metastasiertem Mammakarzinom (EMT-6) (Kennel, S.J. et al.; 2000) und Ovarialkarzinom (LS174T) (Kennel, S.J. et al.; 2002) getestet. Hier zeigte sich beim pulmonal metastasierten Mammakarzinom eine pulmonale Anreicherung, jedoch eine letale Toxizität. Der Versuch am Ovarialkarzinommodell zeigte keinen signifikanten antitumoralen Effekt.

Der auch in dieser Arbeit verwendete Alphastrahler ^{213}Bi (HWZ 45,6 Minuten) wurde bereits mit mehreren Antikörpern gekoppelt. Vandenbulcke, K. und seine Arbeitsgruppe konnten 2003 im in vitro B-CLL-Modell einen Vorteil der Therapie mit ^{213}Bi -Rituximab gegenüber γ -Bestrahlung aufzeigen. Eine andere Studie zeigte nach Koppelung von ^{213}Bi an ein von Kolonkarzinomzellen exprimiertes Antigen (c30.6) eine hohe Tumorzellzytotoxizität in vitro und einen erhöhten Tumor-Uptake in vivo (Rizvi, S.M. et al.; 2001). Kennel, S.J. und seine Arbeitsgruppe konnten 1999 im Mausmodell im Vergleich zu einem mit ^{213}Bi gekoppelten unspezifischen Antikörper eine Reduktion pulmonaler Mikrometastasen bei Mammakarzinom und ein längeres Überleben bei dem spezifisch gegen murines Thrombomodulin gerichteten ^{213}Bi -Mab201B aufzeigen. Bei größeren Tumormassen zeigte sich jedoch der Betastrahler ^{90}Y gegenüber ^{213}Bi überlegen (Kennel, S.J. et al.; 1999).

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe (Senekowitsch-Schmidtke, R. et al.; 2003) wurde Mäusen mit Peritonealkarzinose eines Magenkarzinom bereits intraperitoneal ein mit ^{213}Bi markierter spezifischer monoklonaler Antikörper (d9Mab) appliziert. Es zeigte sich ein hoher Tumor-Uptake mit signifikant erhöhtem Überleben bei Mäusen mit fortgeschrittenem Tumorstadium, denen das Radioimmunkonjugat des

spezifischen Antikörpers (d9Mab) intraperitoneal appliziert wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe der Mäuse, die eine Injektion eines Radioimmunkonjugats mit unspezifischem monoklonalem Antikörper (d8Mab) erhielten.

Bei der ersten mit ^{213}Bi an Menschen durchgeführten Studie wurde der spezifische gegen CD33 gerichtete MabHuM195 bei Patienten mit akuter oder chronischer lymphatischer Leukämie eingesetzt (Jurcic, J.G. et al.; 2001, 2002). Es wurde eine dosisabhängige Reduktion der leukämischen Zellen im Knochenmark bei ^{213}Bi -Uptake in Leber, Milz und Knochenmark jedoch fehlendem signifikanten Uptake im übrigen Gewebe beobachtet.

Qu, C.F. und seine Arbeitsgruppe konnten 2004 aufzeigen, dass die meisten Pankreaskarzinomzellen im Vergleich zu gesunden pankreatischen Zellen eine Überexpression von MUC1 aufweisen. Aus dem Einsatz des Radioimmunkonjugats ^{213}Bi -C595 an MUC1 positiven Pankreaskarzinomzelllinien in vitro resultierte eine Inhibierung der Zellproliferation sowohl bei primären Karzinomzelllinien als auch bei Zellen aus der Metastase eines Pankreaskarzinoms. Chang, F.Q. und seine Arbeitsgruppe führten 2005 Versuche mit dem an ^{213}Bi gekoppelten monoklonalen C595 bei Pankreaskarzinomzelllinien in vitro und bei mikrometastasiertem Pankreaskarzinom in vivo durch. Die Ergebnisse zeigten ein Ansprechen der Zellkluster auf ^{213}Bi -C595 in vitro und einen erfolgreichen Einsatz in der Behandlung von Mikrometastasen im Mausmodell.

Als Ursache für die Zytotoxizität der Radioimmunkonjugate wird einerseits die Bindung von ^{213}Bi -C595-MUC1 an die Zellmembran und die konsekutiven durch α -Strahlung induzierten Doppelstrang-DNA-Brüche der Tumorzellen angesehen. Andererseits ist die mögliche Internalisierung des ^{213}Bi -C595-MUC1-Komplex der Tumorzellen und die daraus resultierende gesteigerte Apoptose als ursächlich anzusehen. Andere Faktoren wie Antigenaffinität und Antigendichte sind als zusätzliche Faktoren für Tumorzellzytotoxizität ebenfalls bedeutsam.

Zusammenfassend zeigen bisherige Studien mit an ^{213}Bi gekoppelten monoklonalen Antikörpern in vitro als auch in vivo einen erfolgreichen Einsatz bei der Behandlung

von Tumorrezidiven und Mikrometastasen im Mausmodell.

Die Ergebnisse dieser bisherigen Studien ließen uns weitere Studien mit einem ^{213}Bi -C595-Antikörper an Harnblasenkarzinomzelllinien durchführen. Der monoklonale Antikörper C595 sollte zur lokoregionalen Radioimmuntherapie des Blasenkarzinoms mit dem Alphastrahler ^{213}Bi etabliert werden. Wir erwarteten anhand der bisher publizierten Literatur sowohl eine erhöhte MUC1-Expression unserer verwendeten Blasenkarzinomzellen als auch eine Tumorzellzytotoxizität bei den in vitro Versuchen mit dem Radiokonjugat ^{213}Bi -C595.

In dieser Arbeit wurden sechs humane (647V, RT112, RT4, J82, T24, EJ28) und eine von der Maus (MBT2) stammende Zelllinie untersucht. Es wurden zunächst die Proliferationscharakteristika der einzelnen Zellen untersucht. Dabei erwies sich die Zelllinie EJ28 mit einer Verdopplungszeit von 20 Stunden als die am schnellsten wachsende Zelllinie und die Zelllinie RT4 mit einer Verdopplungszeit von 80 Stunden als die am langsamsten wachsende Zelllinie.

Zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit des Anti-MUC1-C595 einerseits und zur Ermittlung der Antikörperbindungsstellen auf der Zelloberfläche der eingesetzten Blasenkarzinomzellen andererseits erfolgten diverse Bindungsstudien. Zunächst wurden mittels Immunfluoreszenztest die einzelnen Zelllinien auf Bindungsstellen für den Anti-MUC1-Antikörper untersucht. Die Zelllinien 647V, EJ28 und RT112 zeigten eine Bindung sowohl mit dem nativen C595 als auch mit dem chelatierten C595 ein positives Ergebnis. Bei den Zelllinien MBT2 und RT4 waren nur positive Ergebnisse unter Verwendung des nativen Antikörpers zu verzeichnen. Die Immunfluoreszenztests mit dem chelatierten Antikörper waren für diese Zelllinien negativ. Die Zelllinien T24 und J82 zeigten sowohl mit dem nativen als auch mit dem chelatierten Antikörper keine Bindung. Somit lassen die Ergebnisse des Immunfluoreszenztest eine Überexpression des MUC1-Antigens auf der Oberfläche der Zelllinien 647V, EJ28, RT112, MBT2 und RT4 schließen. Die verminderte Fluoreszenz unter Verwendung des chelatierten Antikörpers lässt eine verminderte Bindungsaffinität nach Chelatierung des Antikörpers vermuten.

Weitere Bindungsstudien erfolgten mit dem radionuklidmarkiertem Anti-MUC1-Antikörper C595. Verwendet wurden die Radionuklide ^{125}I und ^{213}Bi . Hierfür wurde der Antikörper für die Markierung mit ^{125}I sowohl in chelatisierter als auch in nativer Form verwendet, um zu erfassen, ob bereits die für die Kopplung der metallischen Radionuklide erforderliche Chelatierung einen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit des Antikörpers aufweist. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass der chelatisierte Antikörper schlechter bindet als der native. Für die Chelatierung des Antikörpers zur Kopplung mit ^{213}Bi und ^{111}In wurde der Chelator SCN-CHX-A-DTPA verwendet.

Die Ergebnisse der Bindungsstudien zeigten vor allem unter Verwendung des Radionuklids ^{125}I stark voneinander abweichende Ergebnisse. Die Bindung lag zwischen 1,3% und 17,8%. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf eine Abspaltung des Radionuklids vom Antikörper zurückzuführen oder aber auch auf eine Internalisierung des radionuklidmarkierten Antikörpers in die Zelle mit darauf folgender Abspaltung des Radionuklids.

Hierfür wurde die Bindung des Antikörpers genauer untersucht. Es erfolgten Bindungsstudien indem die Zellen mit ^{125}I -markiertem C595 inkubiert wurden und im Parallelversuch vor Zugabe des ^{125}I -markiertem Antikörpers mit unmarkiertem Antikörper inkubiert und damit sozusagen „geblockt“ wurden. Bei entsprechender spezifischer Bindungsaffinität des Antikörpers beziehungsweise ausreichender Anzahl an Bindungsstellen auf der Zelloberfläche, hätte ein signifikanter Unterschied der Versuche zu verzeichnen sein müssen. Bei diesem Versuch wurden die Zelllinien EJ28, 647V und T24 getestet und die Ergebnisse zeigten zwar eine geringere Bindung nach Blockieren mit sogenanntem „kaltem“, das heißt unmarkiertem Antikörper als nach alleiniger Inkubation mit ^{125}I -markiertem C595. Die Unterschiede der Bindungen waren allerdings gering, so dass wir zunächst eine unzureichende Funktionalität des Antikörpers oder aber auch eine ungenügende Expression von MUC1-Antigenen auf der Zelloberfläche vermuteten.

Es erfolgten daraufhin Bindungsstudien mit ^{213}Bi -markiertem C595, die zwar auch noch stark voneinander abweichende Ergebnisse in den Wiederholungsversuchen aufwiesen, jedoch in wesentlich geringerem Ausmaß als bei den Bindungsstudien mit

¹²⁵I. Vor allem die Ergebnisse der Drei- und Vierfachansätze der einzelnen Versuche zeigten kaum voneinander abweichende Ergebnisse. Insgesamt waren die Ergebnisse der Bindungen jedoch verglichen mit bereits anderweitigen Studien mit ²¹³Bi mit tumorspezifischen Antikörpern gering. Die Versuche durch Blockierung der Zellen mit „kaltem“ Antikörper bestätigten weitgehend die schon mit ¹²⁵I durchgeführten Versuche. Auch hier wurden nur geringe Bindungsunterschiede verzeichnet.

Auch Bindungsstudien der Zelllinien unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, die den Anteil der sich in der proliferativen Phase befindlichen Zellen erhöhen sollte, waren nicht wegweisend.

Obwohl bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, versuchten wir zunächst einen Nachweis der MUC1-Oberflächenproteine. Dazu konnte mittels Western Blot bei den Zelllinien T24, 647V, EJ28 und J28 eindeutig und bei der Zelllinie RT112 fraglich eine Bande und somit ein Protein des entsprechenden Molekulargewichts (200kDa) nachgewiesen werden. Dadurch war die bereits vorbeschriebenen Existenz des MUC1-Antigens auf der Zelloberfläche wahrscheinlich.

Von entscheidender Bedeutung ist dabei jedoch die Antigendichte auf der Zelloberfläche. Deshalb erfolgte mit Hilfe der Scatchard Analyse die Abschätzung der Menge der Antigenbindungsstellen auf der Zelloberfläche. Die Scatchard Analyse wurde bei allen Zelllinien mit ¹¹¹In-markiertem C595 durchgeführt. Es errechneten sich folgende Antikörperbindungsstellen auf der Zelloberfläche der Blasenkarzinomzelllinien: $6,5 \times 10^4$ Bindungsstellen für die Zelllinie 647V, $7,9 \times 10^4$ Bindungsstellen für die Zelllinie RT112, $4,9 \times 10^4$ Bindungsstellen für die Zelllinie T24, $2,4 \times 10^4$ Bindungsstellen für die Zelllinie MBT2, $1,9 \times 10^4$ Bindungsstellen für die Zelllinie EJ28, $1,9 \times 10^4$ Bindungsstellen für die Zelllinie J82 und $5,6 \times 10^3$ Bindungsstellen für die Zelllinie 647V. Somit bestand eine hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein des MUC1-Oberflächenantigens auf den getesteten Harnblasenkarzinomzelllinien.

Zur Abschätzung der Toxizität von ²¹³Bi wurden klonogene Assays durchgeführt. Die Ergebnisse der klonogenen Assays zeigten nach einer Zugabe des

Diskussion

Radioimmunkonjugats ^{213}Bi -C595 mit einer Aktivität von $7,4 \times 10^5 \text{Bq}$ eine Reduktion der Zellklone im Vergleich zur Kontrolle (ohne Zugabe von ^{213}Bi -C595). Bei Zugabe der Aktivität von $7,4 \times 10^5 \text{Bq}$ zeigte die Zelllinie EJ28 eine Zellklonreduktion um 49% (bei einer Aussaat von 200 Zellen/well) beziehungsweise 51% (Aussaat von 100 Zellen/well), die Zelllinie T24 eine Zellklonreduktion um 80% beziehungsweise 62%, die Zelllinie MBT2 um 39% beziehungsweise 53%, die Zelllinie RT112 um 33% beziehungsweise 74% und die Zelllinie J82 um 53% beziehungsweise 50%. Bei den Zelllinien RT4 und 647V war nur eine geringe Anzahl von Klonen zu verzeichnen, weshalb die prozentuale Berechnung der Zellklonreduktion nicht sinnvoll ist. Die höchste Toxizität und somit das beste Ansprechen war bei der Zelllinie T24 zu verzeichnen.

Zusammenfassend zeigen sich in den einzelnen Versuchen diskrepante Ergebnisse. Die Antigendetektion mittels Western Blot zeigte das Vorhandensein des MUC1 Mucins auf den Zelllinien 647V, EJ28, T24 und J82 und fraglich bei der Zelllinie RT112. Immunfluoreszenztests zeigten sowohl mit dem chelatierten als auch mit dem nativen Antikörper nur bei den Zelllinien 647V, EJ28 und RT112 ein positives Ergebnis und die Bindungsversuche mit ^{213}Bi konnten eine deutliche Bindung bei den Zelllinien 647V und EJ28 zeigen. Bei den Scatchard Analysen konnten die meisten Antigenbindungsstellen bei der Zelllinie RT112 detektiert werden. Das beste Ansprechen beziehungsweise die höchste Toxizität von ^{213}Bi zeigte die Zelllinie RT4.

Diese Ergebnisse weisen auf das Vorliegen des MUC1 Mucins bei den Zelllinien 647V, EJ28, RT112 und T24 hin. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Bindungsstudien waren jedoch zum einen diskrepant, aber vor allem zeigte sich auch eine für das Vorliegen des MUC1 Mucins zu schwache Bindung mit dem radiomarkiertem Antikörper. Da zwar das MUC1-Oberflächenantigen auf unseren getesteten Harnblasenkarzinomzelllinien exprimiert wird, jedoch die Versuche mit dem hier getesteten Antikörper C595 eine nur unzureichende Bindung aufwiesen, kann die Ursache dieser Ergebnisse in einer schlechten Bindung liegen und / oder aber auch in der unzureichenden Bindungsaffinität des hier getesteten Antikörpers. Da es aber Ziel unserer Studie ist, einen Antikörper zu finden, der eine hohe Bindung zu Harnblasenkarzinomzellen aufweist und mit dessen Hilfe es möglich sein wird

Diskussion

durch Radionuklidmarkierung gezielt Tumorzellen zu eliminieren, schien es uns sinnvoll auf die Suche nach einem anderen Antikörper und aber auch einem anderen tumorspezifischen Oberflächenantigen zu gehen.

Der auch von vielen anderen Tumorzellen exprimierte EGF-Rezeptor (Epithelial growth factor) wird in der Literatur auch auf Blasenkarzinomzellen beschrieben (Colquihoun, A.J. et al.; 2002). 80% aller Blasenkarzinomzellen exprimieren den EGF-Rezeptor (Cheng J. et al.; 2002). Aus diesem Grund erfolgten die Verarbeitung der einzelnen Zelllinien zu histologischen Präparaten und die immunhistochemischen Färbungen mit einem gegen EGF gerichteten Antikörper. Die Ergebnisse der Immunhistochemie zeigten eine sehr deutliche (3fach positive) Reaktion bei den Zelllinien 647V, EJ28 und RT112. Die Zelllinien RT4 und J82 zeigten ebenfalls eine positive (2fach positive) und die Zelllinie MBT2 keine Reaktion. Anhand dieser Ergebnisse kann auf die Existenz des EGF-Rezeptors auf der Oberfläche der Zelllinien 647V, EJ28, RT112, RT4 und J82 geschlossen werden und liefert uns damit viel versprechende Ansatzpunkte für weitere Versuche mit einem anderen Oberflächenantigen auf Blasenkarzinomzellen und dem dafür spezifischen Antikörper. Auf dem Boden dieser hier gewonnenen Erkenntnisse wurden weitere Studien angeschlossen mit dem Ziel der gezielten Eliminierung von Tumorzellen mit Hilfe eines spezifischen ^{213}Bi -markierten Anti-EGFR-Antikörpers. Erste viel versprechende, tierexperimentelle Ergebnisse zur therapeutischen Effizienz beim Blasenkarzinom mit einem ^{213}Bi -gekoppeltem Antikörper liegen bereits vor.

5 Zusammenfassung

Bei Harnblasenkarzinomzellen wurde eine Überexpression des Glykoproteins MUC1 mit dem tetramerischen Peptidepitop „Arg-Pro-Ala-Pro“ auf der Zelloberfläche beobachtet. Möglicherweise verhindert das MUC1 Antigen die Bindung von zytotoxischen Lymphozyten an die Zelle und somit den Einsatz der körpereigenen Immunantwort. Gegen dieses tumorassoziierte Antigen wurde der monoklonale Antikörper C595 (NCRC48) entwickelt. Um den einen möglichen therapeutischen Nutzen des mit dem Alphastrahler ^{213}Bi gekoppelten Antikörpers zur lokoregionalen Therapie des Harnblasenkarzinomes einschätzen zu können, erfolgte die Durchführung von Bindungsstudien des ^{213}Bi -Immunkonjugats mit Harnblasenkarzinomzellen *in vitro* in Hinblick auf seinen möglichen Einsatz für die Radioimmuntherapie. In dieser Arbeit erfolgte die Koppelung von C595 an den α -Emitter ^{213}Bi . ^{213}Bi weist einen hohen linearen Energietransfer (LET) von $100\text{keV}/\mu\text{m}$, eine Reichweite bei $80\mu\text{m}$ im Gewebe und eine Halbwertszeit von 45,6 Minuten auf.

Es wurden sechs humane (EJ28, T24, 647V, J82, RT112, RT4) und eine murine (MBT2) Blasenkarzinomzelllinie auf die Expression des MUC1-Antigens und die Bindung von C595 an die Zellen getestet. Mittels Western Blot konnte das MUC1 Mucin bei den Zelllinien 647V, EJ28, T24, J82 und fraglich bei der Zelllinie RT112 detektiert werden, Immunfluoreszenztests zeigten bei den Zelllinien 647V, EJ28 und RT112 ein eindeutig positives Ergebnis. Bindungsstudien wiesen mit ^{125}I sehr diskrepante Ergebnisse auf, vermutlich aufgrund einer Internalisierung des Radioimmunkomplexes und Abspaltung von ^{125}I vom Antikörper. Bindungsversuche mit ^{213}Bi -Immunkonjugat wiesen eine deutliche Bindung bei den Zelllinien 647V und EJ28 auf, die Scatchard Analyse zeigte die höchste Zahl an Antigenen bei der Zelllinie RT112. Das beste Ansprechen bei den klonogenen Assays zeigten die Zelllinien EJ28 und T24. Im klonogenen Assay zeigte sich die deutlichste Wirkung nach Zugabe unterschiedlicher Aktivitätskonzentrationen für diese beiden Zelllinien.

Anhand dieser Ergebnisse ist bei den Harnblasenkarzinomzelllinien 647V, EJ28, RT112 und T24 von einem Vorliegen des MUC1-Mucins auszugehen und somit bei einem *in vivo* Modell von einem therapeutischen Nutzen des lokoregionalen

Zusammenfassung

Einsatzes eines ^{213}Bi -Immunkonjugats auszugehen. Die geringe Bindung des hier verwendeten monoklonalen C595 lässt uns jedoch nach anderen zur Radioimmunkonjugation geeigneten monoklonalen Antikörper suchen.

Ein viel versprechender Ansatz könnte die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen den EGF-Rezeptor sein. In immunhistochemischen Färbungen zeigten sich mit einem solchen Antikörper starke positive Reaktionen bei den Zelllinien 647V, EJ28, RT112, RT4 und J82.

6 Literaturverzeichnis

Bellmunt J, Hussain M, Dinney CP: Novel approaches with targeted therapies in bladder cancer. Therapy of bladder cancer by blockade of the epidermal growth factor receptor family. *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 2003; 46 (Suppl 1): 85 – 104

Böhle A, Jurczok A, Ardelt P, Wulf T, Ulmer A, Jocham D, Braunau S: Inhibition of Bladder Carcinoma Cell Adhesion by Oligopeptide Combinations in vitro and in vivo. *The Journal of Urology* 2002; Vol. 167: 357 – 363

Cheng J, Huang H, Zhang ZT, Shapiro E, Pellicer A, Sun TT, Wu XR: Overexpression of epidermal growth factor receptor in urothelium elicits urothelial hyperplasia and promotes bladder tumor growth. *Cancer Res* 2002; 62: 4157 – 4163.

Colquhoun AJ, Mellon JK: Epidermal growth factor receptor and bladder cancer. *Postgraduate Medical Journal* 2002; 78: 584 – 589

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 Nuc Med and Molecular Imaging* 2005; Vol. 32 (5): 601 – 614

Denton G, Davies GM, Scanlon MJ, Tendier SJB, Price MR: Primary sequence determination and molecular modelling of the variable region of an anti MUC1 mucin monoclonal antibody. *European Journal of Cancer* 1995; Vol. 31A: 214 – 221

Dorp F, Eisenhardt A, Goebell PJ, Gschwend J, Jäger T, Jakse G, Jocham D, Krege s, Lümmer G, Otto T, Rettenmeier A, Rödel C, Rübber H, Sauer R, Schenck M, Schmid KW, Stief C, Stöckle M, Zaak D: *Uroonkologie, Das Harnblasenkarzinom*, ISBN: 978-3-540-33847-5, 2007; 301 – 372

Garcia JA, Dreicer R: Systemic chemotherapy for advanced bladder cancer: update and controversies. *J Clin Oncol* 2006; 24 (35): 5545 – 51

Goetz C, Rachinger W, Poepperl G, Decker M, Gildehaus FJ, Stocker S, Jung G, Tatsch K, Tonn JC, Reulen HJ: Intralesional radioimmunotherapy in the treatment of malignant glioma: clinical and experimental findings; *Acta Neurochir Suppl.* 2003; 88:

69 – 75

Goetz C, Riva P, Poepperl G, Gildehaus FJ, Hischa A, Tatsch K, Reulen HJ.: Locoregional radioimmunotherapy in selected patients with malignant glioma: experiences, side effects and survival times; Journal of Neuro-Oncology, 2003 May; 62 (3): 321 – 8

Goldenberg DM, Sharkey RM: Advances in cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. Q J Nucl Med Mol Imaging 2006; Vol 50 (4): 248 – 264

Hegele A: Harnblasenkarzinom – State of the Art. Pharma Fokus Onkologie, 2008, Nr. 1: 17 – 21

Huber R: Bewertung der lokoregionalen Radioimmuntherapie disseminierter Tumorzellen des diffusen Magenkarzinoms mit einem ²¹³Bi gekoppelten tumorspezifischen Antikörper im Mausmodell, 2003

Hughes ODM, Bishop MC, Perkins AC, Frier M, Price MR, Denton G, Smith A, Rutherford R, Schubinger PA: Preclinical evaluation of copper-67 labeled anti-MUC1 mucin antibody C595 for therapeutic use in bladder cancer; Eur J Nuc Med 1997; Vol. 24 (4): 439 – 443

Hughes ODM, Bishop MC, Perkins AC, Wasie ML, Denton G, Price MR, Frier M, Denley, Rutherford R, Schubinger PA.: Targeting superficial bladder cancer by the intravesical administration of copper-67 labeled anti-MUC1 mucin monoclonal antibody C595; J Clin Oncol 2000 Jan; 18(2): 363 – 70

Hughes ODM, Perkins AC, Frier M, Wasie ML, Denton G, Price MR, Denley H, Bishop MC: Imaging for staging bladder cancer: a clinical study of intravenous ¹¹¹indium-labelled anti-MUC1 mucin monoclonal antibody C595; BJU Int 2001 Jan; 87 (1): 39 – 46

Josephson DY, Pasin E, Stein JP: Superficial bladder cancer: part 1. Update on etiology, classification and natural history. Expert Review of Anticancer Therapy 2006, Vol. 6, No. 12, 1723 – 1734

Junghans RP, Dobbs D, Brechbiel MW, Mirzadeh S, Raubischek A, Gansow OA,

Waldmann TA: Pharmacokinetics and bioactivity of 1,4,7,10-tetra-azacyclododecane off, N,N,N,N -tetraacetic acid (DOTA)-bismuth-conjugated anti-Tac antibody for alpha-emitter (^{212}Bi) therapy. *Cancer Res* 1993; 53: 5683 – 9

Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, McDevitt MR, Finn D, Divgi CR, Ballangrud AM, Hamacher A, Ma D, Humm JL, Brechbiel MW, Molinet R, Scheinberg DA: Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* 2002; 100: 1233 – 9

Jurcic JG: Antibody therapy for residual disease in acute myelogenous leukemia. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2001; 38 (1): 37 – 45

Kennel SJ, Boll R, Stabin M, Schuller HM, Mirzadeh S: Radioimmunotherapy of micrometastases in lung with vascular targeted ^{213}Bi . *Br J Cancer* 1999; 80: 175 – 84

Kennel SJ, Brechbiel MW, Milenic DE, Schlom J, Mirzadeh S: Actinium-225 conjugates of MAb CC49 and humanized delta CH2CC49. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17: 219 – 31

Kennel SJ, Chappell LL, Dadachova K, Brechbiel MW, Lankford TK, Davis IA, Stabin M, Mirzadeh S: Evaluation of ^{225}Ac for vascular targeted radioimmunotherapy of lung tumors. *Cancer Biother Radiopharm* 2000; 15 (3): 235 – 44

Kennel SJ, Stabin M, Yoriyaz H, Brechbiel M, Mirzadeh S: Treatment of lung tumor colonies with ^{90}Y targeted to blood vessels: comparison with the alpha-particle emitter ^{213}Bi . *Nucl Med Biol* 1999; 26: 149 – 57

Liedl G: Harnblasenkarzinom, *Manual urogenitale Tumoren*, 2003, 3: 43 – 76

Lindl T: Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 4., überarb. und erw. Aufl. – Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verl., 2000.

McFadden DW, Riggs DR, Jackson BJ, Vona-Davis J: Keyhole limpet hemocyanin, a novel immune stimulant with promising anticancer activity in Barrett's esophageal adenocarcinoma. *The American Journal of Surgery* 2003; 186: 552 – 555

Murray A, Simms MS, Scholfield DP, Vincent RM, Denton G, Bishop MC, Price MR, Perkins AC: Production and characterization of ^{188}Re -C595 antibody for

radioimmunotherapy of transitional cell bladder cancer. *J Nucl Med* 2001 May; 42 (5):726 – 32

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 Nuc Med* 1999; 40:166 – 176

Parkin DM, Bray FI, Devesa SS: Cancer burden in the year 2000. The global picture *European Journal of Cancer*, 2001; Vol. 37(0): Pages 4 – 66

Price MR, Sekowski M, Tendler SJ: Purification of anti-epithelial mucin monoclonal antibodies by epitope affinity chromatography. *J. Immunol., Methods* 1991; 139 (1): 83 – 90

Qu CF, Li Y, Song YJ, Rizvi SMA, Raja C, Zhang D, Samra J, Smith R, Perkins AC, Apostolidis C, Allen BJ: MUC1 expression in primary and metastatic pancreatic cancer cells for in vitro treatment by ²¹³Bi-C595 radioimmunoconjugate. *British Journal of Cancer* 2004; 91: 2086 – 2093

Qu Chong E, Song YJ, Rizvi S, Yong L, Smith R, Perkins AC, Morgenstern A, Brechbiel M, Allen BJ: In Vivo and in Vitro Inhibition of Pancreatic Cancer Growth by Targeted Alpha Therapy Using ²¹³Bi-CHX.A"-C595. *Cancer Biology & Therapy* 2005; 4(8): 848 – 853

Retz M, Lehmann J, Röder C, Plötz B, Harder J, Eggers J, Pauluschke J, Kalthoff H, Stöckle M: Differential Mucin MUC7 Gene Expression in Invasive Bladder Carcinoma in Contrast to Uniform MUC1 and MUC2 Gene Expression in Both Normal Urothelium and Bladder Carcinoma; *Cancer Research* 1998; 58: 5662 – 5666

Riva P, Franceschi G, Riva N, Casi M, Santimaria M, Adamo M: Role of nuclear medicine in the treatment of malignant gliomas: the locoregional radioimmunotherapy approach. *Eur J Nucl Med* 2000; 27: 601 – 609

Rizvi SM, Allen BJ, Tian Z, Goozee G, Sarkar S: In vitro and preclinical studies of

targeted alpha therapy (TAT) for colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2001; 3: 345 – 53

Rotterud R, Nesland JM, Berner A, Fossa SD: Expression of epidermal growth factor receptor family in normal and malignant urothelium. *BJU Int* 2005; 95: 1344 – 50

Seidl C, Senekowitsch-Schmidtke R: Treatment of Diffuse-Type Gastric Cancer Cells Using ²¹³Bi-Radioimmunoconjugates Vitro and In Vivo Following Intraperitoneal Dissemination. *Current Radiopharmaceuticals*, 2008; 1: 215 – 224

Seidl C, Senekowitsch-Schmidtke R: Zielgerichtete Radionuklidtherapie mit α -Emittern – Grundlage, experimentelle und erste klinische Studien. *Der Nuklearmediziner* 2008; 31: 81 – 82

Senekowitsch-Schmidtke R, Schumacher C, Becker KF, Nikula, Seidl C, Becker I, Miederer M, Apostolidis, Adam C, Huber R, Kremmer E, Fischer K, Schwaiger M: Highly Specific Tumor Binding of a ²¹³Bi-labeled Monoclonal Antibody against Mutant E-Cadherin Suggests Its Usefulness for Locoregional α -Radioimmunotherapy of Diffuse-Type Gastric Cancer, *Cancer Research* 2001; 61: 2804 – 2808

Shapiro A, Kelley DR, Oakley DM, Catalona WJ, Ratliff TL: Technical factors affecting the reproducibility of intravesical mouse bladder tumor implantation during therapy with Bacillus Calmette-Guérin; *Cancer Research* 1984; 44: 3051 – 3054

Sherblom AP, Moody CE: Cell surface sialomucin and resistance to natural cell-mediated cytotoxicity of rat mammary tumor ascites cells. *Cancer Res.* 1986; 46: 4543 – 4546

Simms MS, Hughes ODM, Limb M, Price MR, Bishop MC: MUC1 mucin as a tumour marker in Bladder Cancer. *BJU International* 1999-; 84: 350 – 352

Simms MS, Perkins AC, Price MR, Scholfield DP, Bishop MC: 99m Technetium-C595 radioimmunoscintigraphy: a potential staging tool for bladder cancer, *BJU Int* 2001 Nov; 88(7): 686 – 91

Soloway MS, Sofer M, Vaidya A: Contemporary management of stage T1 Transitional Cell Carcinoma Of The Bladder. *J Urol* 2002, Vol 167 (4): 1573 – 1583

Stief C, Zaak D, Stöckle M, Studer U, Knuechel R, Rödel D, Sauer R, Rubben H:

Standards und Perspektiven in der Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms. Der Urologe; Suppl 1, 2006; 45: 90 – 96

Susani, M: Harnblasenkarzinom: Was gibt es Neues aus der Sicht des Pathologen? Journal für Urologie und Urogynäkologie 2003; 10 (Sonderheft 6) (Ausgabe für Österreich): 22 – 23

Sylvester RJ, Oosterinck W, Meijden A: A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: A meta-analysis of published results of randomized clinical trials. J Urol 2004; 171: 2186 – 90

Vandenblucke K, DeVos F, Offner F, Philippé J, Apostolidis C, Molinet R, Nikula TK, Bacher K, deGelder V, Vral A, Lahorte C, Thierens H, Dierckx RA, Slegers G: In vitro evaluation of ²¹³Bi-rituximab versus external gamma irradiation for the treatment of B-CLL patients: relative biological efficacy with respect to apoptosis induction and chromosomal damage. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2003; Vol 30(10): 1357 – 1364

Walicka MA, Vaidyanathan G, Zalutsky MR, Adelstein SJ, Kassis AI: Survival and DNA damage in Chinese hamster V79 cells exposed to alpha particles emitted by DNA-incorporated astatine-211; Radiat Res 1998; 150: 263 – 268

Zalutsky MR, Garg PK, Friedman HS, Bigner DD: Labeling monoclonal antibodies and F(ab')₂ fragments with the alpha-particle-emitting nuclide astatine-211: preservation of immunoreactivity and in vivo localizing capacity. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 7149 – 53

Zalutsky MR, Cokgor I, Akabani G, Friedman HS, Coleman RE, Friedman AH: Phase I trial of alpha-particle-emitting astatine-211 labeled chimeric antitenascin antibody in recurrent malignant glioma patients. Proc Am Assoc Cancer Res 2000; 41: 54.

Zalutsky MR, Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, McLendon RE, Wong TZ, Bigner DD: Clinical experience with alpha-particle emitting ²¹¹At: treatment of recurrent brain tumor patients with ²¹¹At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. J Nucl Med. 2008 Jan; 49(1): 30 – 8

Zalutsky MR: Current status of therapy of solid tumors: brain tumor therapy. J Nucl

Literaturverzeichnis

Med. 2005 Jan; 46 Suppl 1: 151 – 6

Zalutsky MR: Targeted radiotherapy of brain tumours. Br J Cancer. 2004 Apr 19; 90(8):1469 – 73

Danksagung

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Professor Dr. Dr. R. Senekowitsch-Schmidtke für die Überlassung des Themas und ihrer einzigartigen Fähigkeit zu begeistern und zu motivieren, die intensive Betreuung und für die Bereitstellung eines gut ausgestatteten Arbeitsplatzes am Institut der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München.

Herrn Dr. Christof Seidl, der mir mit seiner stets ruhigen und geduldigen Art auf alle theoretischen und praktischen Fragen immer Antwort geben konnte, danke ich sehr herzlich.

Ebenso möchte ich Frau Dr. R. Beck danken für ihre Einweisung in den Umgang mit Zellkulturen und Handhabung von radioaktiven Stoffen und ihre wertvollen Tipps und Anregungen bei vielen Fragestellungen.

Den Mitarbeitern im Labor danke ich für das kollegiale Umfeld und regelmäßige, tatkräftige Hilfe bei der Ausführung der Experimente.

Herrn Dr. J. Nährig und seinem Laborteam des Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München danke ich für die Hilfestellung zur Durchführung und Interpretation der immunhistochemischen Methoden.

Abschließend danke ich ganz herzlich meiner Familie, meinem Freund Arnaud Scheffler und meinen Freunden, die mich während der ganzen Zeit in jeder Hinsicht unterstützt und motiviert haben.