

Aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Barkhausen

**In-vitro-Untersuchungen zum Potenzial von radioaktiv markiertem
Trastuzumab für die Diagnostik und Therapie von
Mammakarzinomen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Christina Reetz

aus Lübeck

Lübeck 2009

1. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr.rer. nat. Birgit Meller

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr.med. Martin Strik

Tag der mündlichen Prüfung: 20.08.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.08.2010

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1 EINLEITUNG	6
1.1 Bedeutung des HER2 beim Mammakarzinom	6
1.2 Biologie der ErbB-Familie	7
1.3 HER2-vermittelte Therapie	10
1.4 Radioimmunokonjugate in der Malignomtherapie	12
1.5 Kombinationstherapie	14
1.6 Fragestellungen	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Zelllinien und Zellkultur	17
2.1.1 JIMT	18
2.1.2 MX-1.....	18
2.2 Trastuzumab und Antikörpermarkierung mit ¹³¹ I	19
2.3 Qualitätskontrolle	19
2.3.1 Dünnschichtchromatographie.....	20
2.3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – HPLC	20
2.4 Messung der Aktivität.....	21
2.4.1 Aktivimeter	21
2.4.2 Bohrloch-Detektor	21
2.5 Versuche.....	21
2.5.1 Leerwertbestimmung.....	23
2.5.2 Uptake des ¹³¹ I-Trastuzumab	23
2.5.3 Spezifität der Antikörperbindung	23
2.5.4 Koinkubation von ¹³¹ I-Trastuzumab und Paclitaxel	24
2.6 Versuchsdurchführung.....	24
2.6.1 Gewinnung des Zellpellets	24
2.6.2 Bestimmung der zellgebundenen Aktivität	25
2.6.3 Bestimmung der Zellzahl.....	25
2.7 Versuchsauswertung	25
2.7.1 Standardkurve.....	25
2.7.2 Rechnungen.....	26
2.7.3 Abschätzung der Bestrahlungsdosis durch ¹³¹ I-Trastuzumab	27
2.7.4 Statistische Auswertung	28
3 ERGEBNISSE	29
3.1 Stabilität der Antikörpermarkierung.....	29
3.1.1 DC	29
3.1.2 HPLC.....	30
3.2 Standardkurve	31
3.3 Uptake	32
3.3.1 Zeitlicher Verlauf des ¹³¹ I-Trast-Uptakes von JIMT-Zellen	32
3.3.2 Zeitlicher Verlauf des ¹³¹ I-Trast-Uptake von MX-1-Zellen.....	33
3.4 Spezifität	34
3.4.1 Überprüfung der Spezifität der Antikörperbindung – JIMT	34

3.4.2 Überprüfung der Spezifität der Antikörperbindung – MX-1	35
3.5 Paclitaxel und Uptake	36
3.5.1 Einfluß von Paclitaxel auf den ¹³¹ I-Trast-Uptake in JIMT-Kulturen	36
3.5.2 Einfluß von Paclitaxel auf den ¹³¹ I-Trast-Uptake bei MX-1	38
3.6 Paclitaxel und Proliferation	39
3.6.1 Einfluß von ¹³¹ I-Trast und Paclitaxel auf die Zellzahl – JIMT	39
3.6.2 Einfluß von ¹³¹ I-Trast und Paclitaxel auf die Zellzahl – in MX-1	41
3.7 Bestrahlungsdosis durch ¹³¹ I-Trast	42
4 DISKUSSION	43
4.1 Radioimmundiagnostik.....	43
4.2 Radioimmuntherapie.....	47
4.3 Resistenz	49
4.4 Kombinationstherapie	53
4.5 Chemo-/Immuntherapie und Bestrahlung	55
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	57
LITERATURVERZEICHNIS	58
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	67
DANKSAGUNG	68
LEBENS LAUF	69
PUBLIKATIONEN.....	70

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
A(0)	Aktivität zum Zeitpunkt Null
A(t)	Aktivität zum Messzeitpunkt
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
CISH	chromogene In-situ-Hybridisierung
cpm	counts per minute (Zähler pro Minute)
CO ₂	Kohlendioxid
¹³⁷ Cs	Caesium-Isotop
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA/DNS	Deoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTPA	Diethylentriaminpentaacetat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMEA	European Medicines Agency
ErbB2	Aviäres Erythroblastose Onkogen 2 (synonym zu HER2)
et al.	et alii
exp.	Exponent
FBS	fetales bovines Serum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GBq	Gigabequerel
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland
heißer Antikörper	radioaktiv markierter Antikörper
HER 1 - 4	humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren Typ 1 - 4
HERA	HerceptinAdjuvant-Studie
HPLC	high performance liquid chromatography
HWZ	Halbwertszeit
I ⁻	Iodid
IgG	Immunglobulin G

^{111}In	Indium-Isotop; diagnostisches Radionuklid
$^{123/124}\text{I}$	Iodisotope; diagnostische Radionuklide
^{131}I	Iodisotop: kombinierter β^- - und γ -Strahler; therapeutisches Radionuklid
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography
kalter Antikörper	nicht radioaktiv markierter Antikörper
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektronenvolt
KOF	Körperoberfläche
^{177}Lu	Lutetium-Isotop; β^- -Strahler; Therpieradionuklid
m	Mittelwert
M	Median
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase
MBq	Megabecquerel
mRNA	messenger ribonucleic acid/ Boten-Ribonukleinsäure
MUC4	Mucin 4
n	Anzahl der Proben
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natrium-Chlorid
NaI	Natrium-Iodid
Pacli	Paclitaxel
PBS	Phosphat-Puffer
PET	Positronenemissionstomographie
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Q	Quartil
R^2	Bestimmtheitsmaß
^{188}Re	Rhenium-Isotop; β^- -Strahler; Therpieradionuklid
RIT	Radioimmuntherapie
rpm	rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
SOCTA	Succinimidy-3,6-diaza-5-oxo-3-[2-((tri-phenylmethyl)thio)ethyl]-8-[(triphe- nylmethyl)thio]octanoate)]
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
t	Zeitpunkt

^{99m}Tc	Technetium-Isotop; γ -Strahler für die nuklearmedizinische Diagnostik
Tab.	Tabelle
TBq	Terabecquerel
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor Nodes Metastasen; Klassifikation maligner Tumoren
Trast	Trastuzumab
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
UV	Ultraviolettstrahlung
^{90}Y	Yttrium-Isotop (therapeutisches Radionuklid)
°C	Grad Celsius

1 EINLEITUNG

1.1 Bedeutung des HER2 beim Mammakarzinom

Weltweit ist Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. In Deutschland erkranken jedes Jahr ca. 57000 Frauen an Brustkrebs. Mit 17592 Sterbefällen im Jahr 2004 ist Brustkrebs die am häufigsten zum Tode führende Krebserkrankung bei Frauen. Während die Zahl der Neuerkrankungen jährlich weiter ansteigt, sinkt die Zahl der auf Brustkrebs zurückzuführenden Todesfälle (Robert-Koch-Institut/GEKID, 2008). Dies ist das Ergebnis von Aufklärung, Diagnostik und Therapie.

Ein wichtiges Differenzierungsmerkmal in Hinblick auf Therapie und Prognose dieser Erkrankung ist der HER2-Status. Die Abkürzung HER2 steht für „Human Epidermal Growth Factor Receptor Typ 2“ und dieser gehört zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren. 1985 wurde ein Protoonkogen entdeckt, welches auf dem langen Arm des Chromosoms 17(q21) lokalisiert ist (Coussens et al. 1985, King et al. 1985). Dessen Genprodukt, der Tyrosinkinase-Rezeptor HER2 mit einem Molekulargewicht von 185 kDa (p185^{HER2}), ist in 25-30% aller Mammakarzinome überexprimiert (Slamon et al. 1989). Die geläufigsten Synonyme ErbB – abgeleitet vom aviären Erythroblastose Onkogen B – und NEU – abgeleitet von einer Neuroglioblastom-Zelllinie in Ratten – entstanden, bevor molekulargenetisch erkannt wurde, dass es sich um den gleichen Rezeptor handelte (Shih et al. 1981, Schechter et al. 1984, Hynes et al. 1994).

Es stellte sich heraus, dass dieses HER2-Gen prognostischen Wert für eine Krebserkrankung hat. Bei den Patientinnen, in deren Tumor-DNA multiple Genkopien des HER2-Genes nachgewiesen werden konnte, fand sich eine 10-100-fache Überexpression des entsprechenden Rezeptors gegenüber Frauen, deren Tumoren dieses Gen nicht aufwiesen (Slamon et al. 1989, Shepard et al. 2008). Eine andere Ursache der Überexpression des HER2-Rezeptors liegt in fehlerhaften Transkriptionsprozessen begründet. Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Überexpression und der Aggressivität und der Prognose der Erkrankung festgestellt. Hinsichtlich der Prognose bedeutet

der positive HER2-Status eine aggressivere Erkrankung mit deutlich höherer Rezidiv- bzw. Metastasierungsneigung (Slamon et al. 1987,1989).

1.2 Biologie der ErbB-Familie

Die ErbB-Familie umfasst vier im Aufbau ähnliche Rezeptor-Tyrosinkinase, ErbB bzw. HER1-4, welche durch verschiedene Wachstumsfaktoren in unterschiedlicher Ausprägung aktiviert werden können (Plowman et al. 1993, Hynes et al. 1994).

Mitglieder der Wachstumsfaktorrezeptorfamilie liegen als Monomere in der Plasmamembran vor. Durch Bindung diverser Liganden werden HER1 und HER4 aktiviert. Bis heute ist für den HER2-Rezeptor kein nachweislicher Ligand bekannt. Im Rahmen der HER2-Aktivierung kommt es zur Rezeptor-Dimerisierung, bei welcher HER-Rezeptoren Paare bilden (Sliwkowski et al. 2003). Zum einen können Homodimere, bei denen sich zwei gleichartige Rezeptoren verbinden, entstehen. Zum anderen können Heterodimere entstehen, bei denen zwei verschiedene Rezeptortypen ein Paar bilden. HER3 besitzt keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Deshalb haben HER3-Homodimere keine Bedeutung für die Aktivierung der Signalkaskaden. HER2 ist der bevorzugte Dimerisierungspartner für die anderen Mitglieder der HER-Familie (Tzahar et al. 1996). Für Heterodimere mit HER2 als Bindungspartner konnte nachgewiesen werden, dass daraus folgende Signalkaskaden länger und stärker aktiv waren. Dies wird auf verlangsamte bzw. durch Rückkehr an die Zelloberfläche wiederholte Internalisierung dieser Heterodimere zurückgeführt (Karunagaran et al. 1996, Pinkas-Kramarski et al. 1996). Eine andere Theorie besagt, dass bei HER2-Beteiligung an Heterodimeren Liganden verlangsamt dissoziieren. Dies bedingt ebenfalls ein verlängertes Signal (Rubin et al. 2001). Bei Überexpression von HER2 wird die Möglichkeit der HER2-Beteiligung bei Paarbildung vergrößert und daraus folgt eine gesteigerte HER2-vermittelte Signaltransduktion. Diesem Phänomenen wird bei der Entstehung maligner Tumoren eine große Bedeutung zugesprochen. (Abb. 1)

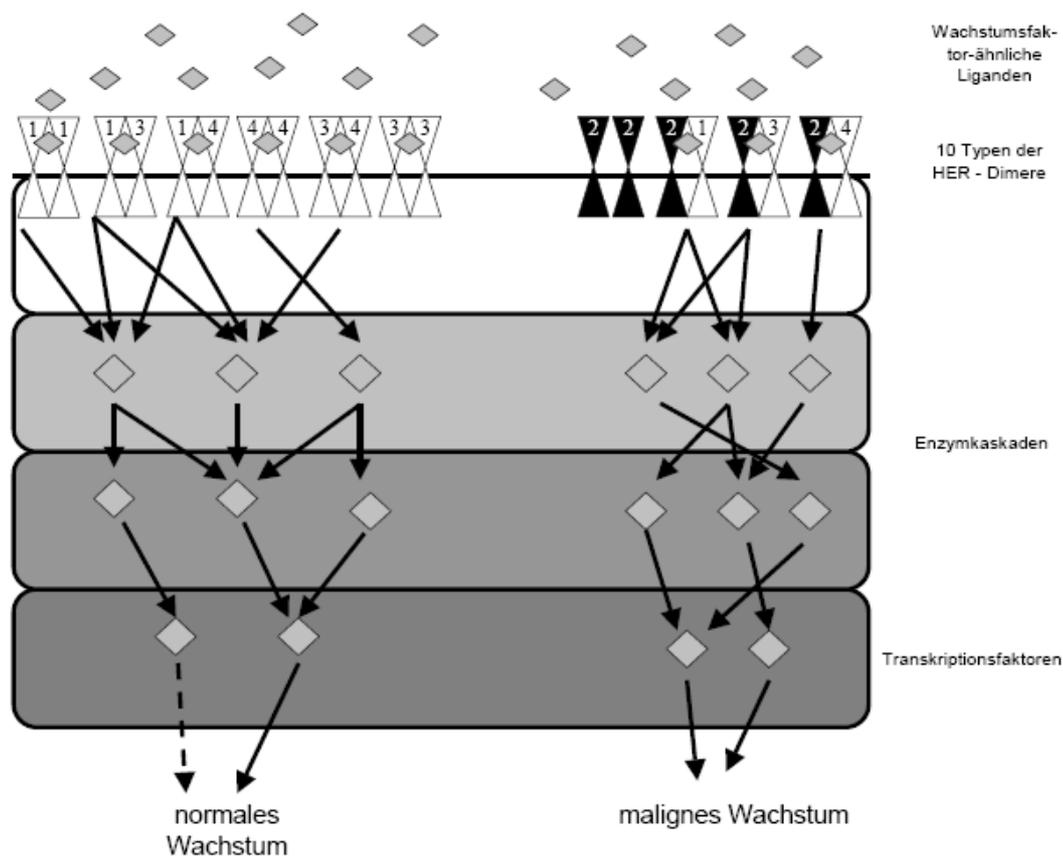


Abb. 1: HER-Rezeptoren und Wachstum (modifiziert nach Klapper et al. 1999). Die Zahlen symbolisieren die vier HER-Rezeptoren. Für HER2 ist kein direkter Ligand nachgewiesen; HER3 besitzt keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Die Rauten und Pfeile stellen die verschiedenen beteiligten Enzymkaskaden zwischen Rezeptoraktivierung und daraus resultierendem Wachstum schematisch dar. Bei Beteiligung von HER2 sind entsprechende Signale länger und stärker aktiv. Daraus kann gesteigertes oder sogar malignes Wachstum folgen.

Der HER2 besteht aus 1255 Aminosäuren (Coussens et al. 1985, King et al. 1985). Dieser Rezeptor kann – wie die anderen Mitglieder der Wachstumsfaktorrezeptorfamilie – in drei Abschnitte unterteilt werden (Abb. 2). An einen extrazellulären Anteil, welcher mögliche Liganden binden kann, schließt ein lipophiles Transmembransegment an und auf der zytoplasmatischen Seite setzt sich ein intrazellulärer Anteil mit Tyrosinkinaseaktivität fort (van der Geer et al. 1994). Eine terminale Carboxylregion führt nach Rezeptoraktivierung über Autophosphorylierung der Tyrosinreste zu ihrer Aktivierung. Die Signalweiterleitung erfolgt nun durch Phosphorylierung auf dem Second-messenger-Weg über die MAP-Kinase-, die antiapoptotische Kinase- und PI3K-Kaskaden zu diversen Transkriptionsprozessen. Am Ende dieser Kaskaden wird die Genexpression von an Proliferation und Differenzierung beteiligter Gene beeinflusst (Ullrich et al. 1990).

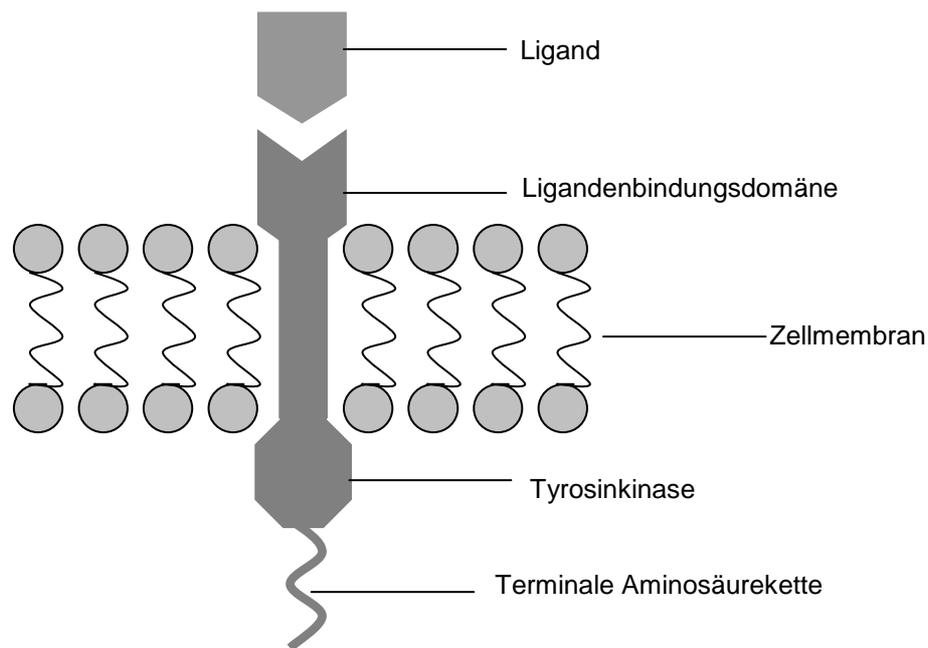


Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Rezeptors der HER-Familie. Der extrazelluläre Anteil bindet mögliche Liganden. An diesen schließt ein lipophiles Transmembransegment an und auf der zytoplasmatischen Seite setzt sich bei HER1, HER2 und HER4 ein intrazellulärer Anteil mit Tyrosinkinaseaktivität und terminaler Aminosäurekette fort (Modifiziert nach „Antikörpertherapie des Mammakarzinoms“).

Der Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2 ist auf einigen menschlichen Geweben zu finden und ist dort an Proliferations- und Differenzierungsvorgängen beteiligt. Beispiele dafür sind die neuronale und kardiale Entwicklung, aber auch die Thelarche (Kornblum et al. 2000, Olayioye et al. 2001, Press et al. 1990, Stern et al. 2003, Negro et al. 2004).

Bei Überexpression ist eine gesteigerte Proliferation die Folge. Eine weitere Beobachtung zeigte, dass die Apoptose, welche über den Tumornekrosefaktor vermittelt wird, bei HER2-Überexpression abnimmt (Zhou et al. 2000). Nach Aktivierung werden wachstumsfördernde Signale an den Zellkern gesendet, wodurch es zu einer Verstärkung dieser Signale und infolge dessen zu einer gesteigerten, unkontrollierten Zellteilung kommt. Dies konnte sowohl in Brustkrebs, aber auch Endometrium-, Ovarial- und Magenkarzinomen nachgewiesen werden (Slamon et al. 1987, Santin et al. 2005, Vermeij et al. 2008, Liang et al. 2008).

1.3 HER2-vermittelte Therapie

Herkömmliche Chemotherapeutika wirken auf alle schnell proliferierenden Gewebe, auf maligne wie auf physiologische. Dies zeigt sich in entsprechenden unerwünschten Nebenwirkungen. Mit dem Ziel speziell die Tumorzellen therapeutisch zu erreichen und dabei unerwünschte Wirkungen zu senken erlangen rezeptorvermittelte Therapieformen bei unterschiedlichen Tumorentitäten zunehmend Bedeutung (Tab.1). Der HER2-Rezeptor wurde nach seiner Entdeckung Mittelpunkt neuer Therapieoptionen des Mammakarzinoms. Hierbei werden Antikörper gegen den extrazellulären Anteil des Rezeptors eingesetzt, um so die zur ungehemmten Zellteilung führenden Signale zu blockieren (Roskoski et al. 2004).

Antikörper	Handelsname	Typ	Zielantigen	Indikation
Alemtuzumab	MabCampath®	humanisiert	CD52	chronisch-lymphatische Leukämie
Bevacizumab	Avastin®	humanisiert	EGFR	Kolonkarzinom
Cetuximab	Erbix®	chimär	EGFR	Kolonkarzinom
Ibritumomab - Tiuxetan	Zevalin®	Murin,	CD20	Non-Hodgkin-Lymphome
Rituximab	MabThera®	chimär	CD20	Non-Hodgkin-Lymphome
Trastuzumab	Herceptin®	humanisiert	HER-2	Mammakarzinom

Tab. 1: Auswahl in Deutschland zur Immuntherapie maligner Erkrankungen zugelassener Antikörper

Der Fokus dieser Arbeit richtet sich auf den monoklonalen Antikörper Trastuzumab. Im Jahr 1990 wurde erstmals an HER2-positiven Mäusen das Zellwachstum durch einen HER2-Antikörper inhibiert, zwei Jahre später gelang es, diesen Antikörper zu humanisieren (Carter et al. 1992). Dieser humanisierte IgG-Antikörper mit dem Wirkstoffnamen „Trastuzumab“ bindet spezifisch an der Extrazellulärdomäne des HER2 und führt dort zu verstärkter Internalisierung und Abbau des Rezeptors und blockiert damit die Zellteilung (Baselga et al. 2001, Shepard et al. 2008). Zudem wirkt Trastuzumab positiv auf die zelluläre Zytotoxizität sowie stark Angiogenese-hemmend, ist jedoch selbst nicht zytotoxisch (Izumi et al. 2002, Liang et al. 2003, Shepard et al. 2008).

Es folgten klinische Studien bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom. Im Jahr 1998 wurde dieser humanisierte, monoklonale

Antikörper mit dem Handelsnamen Herceptin[®] zunächst in den USA und 2000 auch in Deutschland für diese Indikation zugelassen.

Im Rahmen der HERA-Studie konnte ein positiver Effekt des Trastuzumab auch bei HER2-positiven Patientinnen ohne Metastasen nachgewiesen werden. In dieser Patientengruppe konnte die Rückfallquote nachweislich gesenkt werden. Seit Mai 2006 ist Trastuzumab in der Europäischen Union auch im Rahmen der adjuvanten Therapie zugelassen (EMA 2006).

Für die Indikation des Trastuzumab muß ein dreifach-positiver HER2-Rezeptorstatus nachgewiesen sein. Der Grad der Überexpression wird anhand einer stanzbiologisch oder operativ gewonnenen Gewebeprobe molekularbiologisch durch den Nachweis des HER2-Proteins bzw. -Gen festgestellt und in Korrelation zur Rezeptordichte in einfach-, zweifach- oder dreifach-positiv unterschieden. Dies wird immunhistochemisch durch den Nachweis des HER2-Proteins semiquantitativ untersucht. Ist eine Patientin zweifach-positiv, wird zur Therapieentscheidung die Genaktivität des HER2-Gens mittels FISH-Diagnostik untersucht. Ein Ergebnis von mehr als zehn Genen pro Zelle gilt als positiv und die Patientin damit als Trastuzumab-therapiefähig (Kreienberg et al. 2008, Sauter et al. 2009). Die abgespaltene Extrazellulärdomäne des HER2 kann inzwischen auch serologisch erfaßt werden. Es konnte bisher aber keine verlässlichen Rückschlüsse auf den Grad der HER2-Expression gezogen werden (Esteva et al. 2005, Ali et al. 2008).

Die Trastuzumab-Therapie schließt im Fall der adjuvanten Therapie an eine Operation, Chemo- oder Strahlentherapie an und soll nach derzeitigem Stand der Wissenschaft als Infusionen im Abstand von jeweils drei Wochen für ein Jahr fortgeführt werden. Zur Zeit wird untersucht, inwieweit dieses Therapieregime bei HER2-positiven Patientinnen mit im Frühstadium befindlichen Tumoren Erfolg bringt. Die Zwischenergebnisse der HERA-Studie konnten nach einer einjährigen Behandlung und vierjähriger Nachbehandlung eine Verringerung des Rezidivrisikos um 25% im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen. Zudem konnte im Rahmen dieser internationalen Phase III-Studie mit mehr als 5000 Patienten eine Verringerung des Sterberisikos verzeichnet werden. Zu Beginn der Studie wurden die Patientinnen in drei Gruppen randomisiert: Zwei Gruppen erhielten alle drei Wochen Trastuzumab, eine davon über ein Jahr, die andere über zwei Jahre. Die dritte Gruppe wurde nur beobachtet. Kriterien dieser Studie sind das krankheitsfreie Überleben, das Überleben generell sowie das Vermeiden kardialer

Nebenwirkungen. Endgültige Ergebnisse werden für 2011 erwartet (Piccart et al. 2005, Smith et al. 2007).

In zwei amerikanischen Studien wurden Daten bezüglich einer Chemotherapie bestehend aus Adriamycin und Cyclophosphamid gefolgt von Paclitaxel und Trastuzumab erhoben. Die Studien NSABP B-31 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project/ Beginn Februar 2000) und NCCTG N9831 (North Central Cancer Treatment Group/ Beginn Mai 2000) wurden in Bezug auf das oben genannte ähnliche Therapieregime zusammen ausgewertet. An insgesamt 3151 Patientinnen konnte gezeigt werden, dass das krankheitsfreie Überleben bei Antikörpertherapie nach drei Jahren um 11,8% und nach vier Jahren um 18,2% gesteigert werden konnte. Das Gesamtüberleben konnte um 4,8% verbessert werden. Patientinnen, welche Trastuzumab erhalten hatten, entwickelten in 8,2% weniger Fernmetastasen. In Hinblick auf die Kombinationstherapie mit Taxanen ergab sich die Vermutung, dass eine gleichzeitige Gabe von Trastuzumab und Taxanen sinnvoller ist als eine sequenzielle, wobei die Autoren darauf hinwiesen, dass dies weiter zu untersuchen sei (Romond et al. 2005). Zwei weitere Studien untermauerten die Ergebnisse zum adjuvanten Einsatz von Trastuzumab aus den oben beschriebenen Studien, zum einen BCIRG-006 (Breast Cancer International Research Group, Pegram et al. 2004) zum anderen FinHer (Joensuu et al. 2006).

1.4 Radioimmunokonjugate in der Malignomtherapie

In den siebziger Jahren wurden von Forschungsgruppen u.a. um Primus und Mach erstmals radioaktiv markierte Antikörper für die Tumorsuche eingesetzt. Es konnten spezifische CEA-Antikörperanreicherungen in Tumor-tragenden Kleintieren nachgewiesen werden (Primus et al. 1973, Mach et al. 1980). Im Folgenden wurde dieser Ansatz therapeutisch weiterentwickelt. Es kam im Rahmen der Radioimmuntherapie von B-Zell-Lymphomen zu vielversprechenden Erfolgen (Kaminski et al. 1992, Press et al. 2001).

Radioimmunkonjugat	Handelsname	Zielantigen	Indikation
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin®	⁹⁰ Y-murines-anti-CD20 IgG + Rituximab	B-Zell-Lymphome
Tositumomab "Anti-B1"	Bexxar®	¹³¹ I-murines anti-CD20 IgG + Tositumomab	B-Zell-Lymphome

Tab. 2: Auswahl bisher zugelassener Radioimmuntherapeutika und ihre Indikationen

In soliden Tumoren konnte nur eine inhomogene Verteilung der therapeutischen Moleküle bei gezielter Antikörpertherapie gezeigt werden (Buchegger et al. 1983, Lewis et al. 2003). Diese inhomogene Verteilung kann auf die Heterogenität des Blutflusses, den erhöhten Gewebedruck im Tumor sowie weitere interstitielle Transportwege zurückgeführt werden (Jain 1990). Durch diese Eigenschaften werden nicht alle Tumorzellen erreicht und die alleinige Antikörpertherapie ist nicht ausreichend effektiv.

Daraus ergibt sich ein Vorteil der Radioimmuntherapie gegenüber der Immuntherapie – der Kreuzfeuereffekt. Von den Zellen, die an radioaktiv markierte Antikörper gebundenen sind, wird das umliegende (Tumor-)Gewebe relativ homogen bestrahlt und damit auch die Tumorzellen, die den Antikörper nicht gebunden haben, erreicht. Dabei ist die Gewebereichweite abhängig vom jeweiligen Radionuklid. So entspricht die Gewebereichweite für ⁹⁰Y maximal 8 mm und die Gewebereichweite für ¹³¹I maximal 2,3 mm. Sinnvoll kann man Radioimmunkonjugate also bei kleineren Tumorumfängen einsetzen bzw. nach chirurgischer Sanierung zur Therapie von Mikrometastasen. Liersch et al. führten hierzu eine adjuvante RIT-Studie mit ¹³¹I-Labetuzumab, einem CEA-Antikörper, bei Lebermetastasen nach kolorektalem Karzinom durch. Als Ergebnis dieser Therapie fand sich eine verbesserte mediane Überlebenszeit (Liersch et al. 2005).

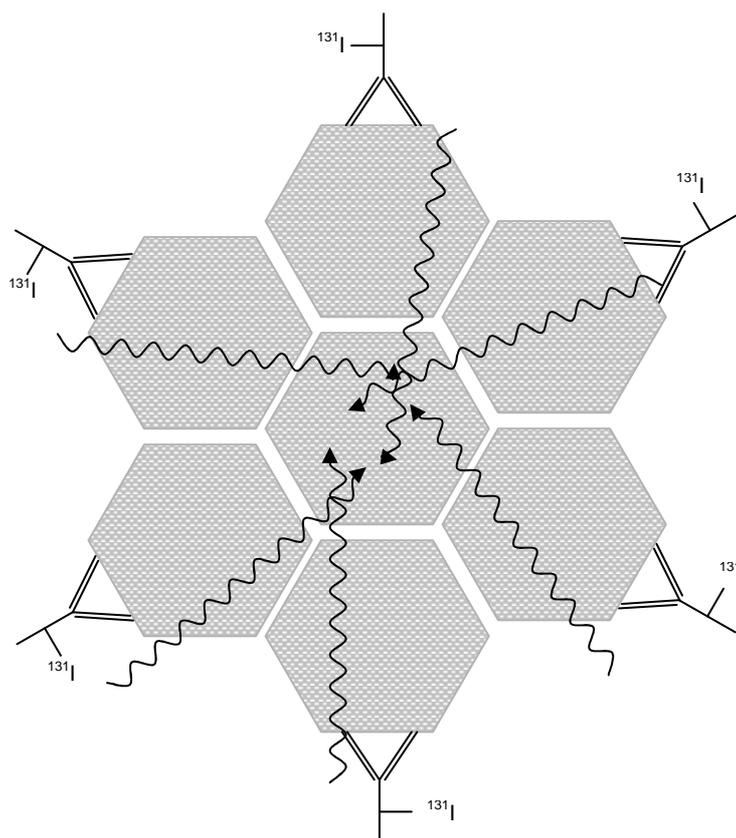


Abb. 3: Kreuzfeuereffekt. Die Überlagerung von Strahlen ausgehend von gebundenen markierten Antikörpern ist schematisch dargestellt. (Modifiziert nach „Antikörpertherapie des Mammakarzinoms“)

Da Mammakarzinomzellen als strahlensensibel gelten, könnte dieser Therapieansatz auch hier von Interesse sein.

Im klinischen Alltag häufen sich derzeit Resistenzen gegen die Immuntherapie, welche bereits in der Literatur beschrieben sind (Tanner et al. 2004, Esteva et al. 2006, Gonzalez-Angulo et al. 2007). Hierbei stellt sich die Frage, ob Antikörper dennoch gebunden werden. Wenn dies der Fall ist, ergibt sich mit der Radioimmuntherapie, also der Konjugation des Antikörpers und einem Radionuklid, eine Möglichkeit, resistente Zellen dennoch gezielt einer Therapie zuzuführen.

1.5 Kombinationstherapie

Ziel von Chemo- und Strahlentherapie ist es, die Tumorzellen irreversibel zu schädigen. Auf molekularer Ebene wird im Rahmen der Bestrahlung eine Schädigung der Tumorzell-DNA. Erhofft wird daraus resultierender Zelltod und

eine anschließende Remission.

Wenn Antikörper- und bestrahlungsresistente Zellen sowie der Antikörperbindung entgangene Zellen überleben, ist eine Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika in Erwägung zu ziehen. Im Jahr 1971 wurde die antiproliferative Wirkung der Taxane entdeckt (Wall and Wani 1995). Die Wirkung von Taxanen – z.B. Paclitaxel – besteht in einer Mitosehemmung. Es wird der Abbau der Mikrotubuli behindert, wodurch die Mitose aller proliferierenden Gewebe gehemmt wird. Eine Therapiezulassung in Deutschland besteht seit 1996. Indikationen für eine Paclitaxel enthaltende Kombinationstherapie sind neben dem Mammakarzinom das Bronchial-, Ovarial- und Prostatakarzinom. Außerdem kommt Paclitaxel in der Kardiologie im Rahmen Medikament-freisetzender Stents oder Ballons Bedeutung zu. Hierbei soll die kontinuierliche Abgabe des Mitosehemmers die Zellneubildung und damit die Restenosierung des Gefäßes gehemmt werden (Unverdorben et al. 2009, Di Lorenzo et al. 2009). Im Folgenden belegten zahlreiche Studien die Wirksamkeit des Paclitaxel in Mono- oder Kombitherapien (Hayes et al. 2007, Bullock and Blackwell 2008). In der Literatur wurde ein additiver Effekt von Herceptin und dem Mitosehemmer Paclitaxel beschrieben. Dieser Effekt wurde bei In-vitro-Versuchen an der HER2-überexprimierenden Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 beobachtet (Pegram et al. 1999).

Werden Tumorzellen diesem Stress ausgesetzt, reagieren sie auf verschiedenste Weise. Die Forschungsgruppe um Liang konnte in ihren Untersuchungen nachweisen, dass ionisierende Strahlung (^{137}Cs) in den untersuchten Zelllinien – sowohl HER2-überexprimierend als auch nicht-überexprimierend – zu keiner deutlichen Beeinflussung der HER2-Expression führt. Dagegen konnte bei mit Trastuzumab behandelten Zellen eine Verbesserung der Apoptoserate beobachtet werden. Die Autoren führten dies auf eine Hemmung der MAPK-Kaskade, vor allem aber auf die Hemmung der PI3-K-Kaskade auf den monoklonalen Antikörper zurück (Liang et al. 2003).

Desweiteren konnte durch Paclitaxel ein radiosensibilisierender Effekt erzielt werden (Liu et al. 2002/Abstract, Jin et al. 2007), dessen molekulare Ursachen noch nicht hinreichend geklärt sind. In der Literatur sind synergistische Wirkungen von Trastuzumab und Paclitaxel beschrieben, aber die hier sind die molekularen Grundlagen noch nicht geklärt. Aus diesem Grund war die Kombination aus ^{131}I -

Trastuzumab und Paclitaxel für die vorliegende Arbeit von Interesse. Das Ziel einer Kombinationstherapie dieser Art besteht in gesteigerter Effizienz bei deutlich reduzierten Nebenwirkungen gegenüber der traditionellen Chemotherapie und Bestrahlung, da gezielt die Tumorzellen in der Proliferation gehemmt und möglichst eliminiert werden sollen.

1.6 Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, den monoklonalen HER2-Antikörper Trastuzumab stabil radioaktiv zu markieren. Dazu wurde vor Beginn der Versuche die Stabilität der Markierung geprüft, welche sowohl für die durchgeführten Untersuchungen, aber auch für den potentiellen Einsatz der Substanz in Diagnostik und Therapie von entscheidender Bedeutung ist.

Eine schnellere und weniger belastende bildgebende Diagnostik des HER2-Status mit radioaktiv markiertem Trastuzumab wäre nicht-invasiv und komplementär zur invasiven Erhebung des HER2-Status für weitere Tumorlokalisationen durchführbar. Wesentlich hierfür ist die Frage, ob die Bindung des markierten Antikörpers am HER2 spezifisch ist.

Klinisch ist die Entwicklung von Therapieresistenzen, auch gegen moderne Immuntherapeutika, progredient. Für die betroffenen Patienten wäre eine weitere Therapieoption hilfreich. Die vorliegende Arbeit sollte deshalb auch potentielle therapeutische Optionen prüfen. Hierfür wurden als Trastuzumab-resistent beschriebene, HER2-überexprimierende Zellen sowie eine HER2 mäßig exprimierende Zelllinie auf ihre Bindung von HER2-affinem Radioimmunkonjugat untersucht. Zusätzlich war die Beeinflussung der Zellproliferation durch ¹³¹I-Trast im Vergleich zu unbehandelten Zellen Gegenstand der Untersuchungen.

Weiterhin sollte geprüft werden, wie sich die Gabe eines Mitosehemmers wie z.B. Paclitaxel auf die Bindung von HER2-Antikörpern auswirkt. Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen haben sowohl für die klassische Immuntherapie als auch für eine potentielle Radioimmuntherapie Bedeutung.

2 MATERIAL UND METHODEN

Sämtliche Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen unter Verwendung steriler Einwegartikel durchgeführt. Verwendete Chemikalien wurden in hochreiner Form zum Ansetzen der Lösungen eingesetzt.

2.1 Zelllinien und Zellkultur

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden mit den Mammakarzinom-Zelllinien JIMT (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, Braunschweig, Deutschland) und MX-1 (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) durchgeführt.

Für beide Zelllinien wurde Kulturmedium analoger Zusammensetzung verwendet. Dieses bestand zu 89% aus Dulbecco`s modiefied Eagle`s Medium (DMEM, high Glucose - 4,5 g/l, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland), zu weiteren 10% aus Fetalem Rinderserum (FBS, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und zu 1% aus Penicillin/Streptomycin (10 000 Units/10 mg/ml, PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland).

Die Zellkulturen wurden bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung inkubiert. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums, alle vier bis fünf Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 (MX-1) bzw. 1:5 (JIMT) geteilt.

2.1.1 JIMT

Die JIMT-Zellen wurden ursprünglich aus einer Brustwandmetastase einer 62-jährigen Patientin mit invasivem Mammakarzinom isoliert. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wurde der Tumor als Grad 3 (T2N1M0) klassifiziert. Es erfolgte eine radikale Mastektomie mit Axillaresektion. Aufgrund einer Metastase in einem der zwölf untersuchten Lymphknoten wurde eine Bestrahlung sowie eine Immuntherapie mit Trastuzumab angeschlossen. Klinisch hat diese Patientin jedoch nicht auf die Trastuzumabtherapie angesprochen. Aufgrund eines raschen Tumorprogress verstarb die Patientin zwölf Wochen nach Diagnosestellung.

Die JIMT-Zelllinie ist dafür bekannt, dass sie den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2 überexprimiert. Sowohl im Primärtumor als auch in der Pleurametastase wurde mittels CISH bzw. Amplifikation ein dreifach-positiver HER2-Status nachgewiesen. Trotzdem sind diese Zellen nachweislich resistent gegen den monoklonalen IgG-Antikörper Trastuzumab (Tanner et al. 2004).

HER1-, HER3- und HER4-mRNA dagegen werden in gleichem Maße wie in Trastuzumab-sensitiven Zellen, z.B. den SK-BR-3-Zellen, synthetisiert. JIMT-Zellen weisen weder Östrogen- noch Progesteronrezeptoren auf. Sie ähneln epithelialen Stammzellen, was immunhistochemisch durch den Nachweis von Zytokeratinen belegt werden konnte (Tanner et al. 2004).

2.1.2 MX-1

Bei den MX-1-Zellen handelt es sich ebenfalls um eine Mammakarzinom-Zelllinie. Sie wurden aus dem Tumor einer 40-jährigen Patientin mit invasivem Mammakarzinom isoliert. Im Unterschied zur JIMT-Kultur zeigen MX-1-Zellen eine normale HER-2-Expression und waren daher als Kontrollkultur geeignet (Trost 2004). Im Tumorsteckbrief wird diese Zelllinie als indifferentzellig, Östrogen- und Progesteronrezeptor-negativ sowie mit makroskopisch geringer Nekrosebildung beschrieben.

2.2 Trastuzumab und Antikörpermarkierung mit ^{131}I

Für alle Versuche wurde der humanisierte monoklonale IgG-Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®], Hoffmann LaRoche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland), im Folgenden auch als „Trast“ abgekürzt, verwendet. Dieser Antikörper ist – wie unter 1.3 beschrieben – gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2 gerichtet.

Grundlage aller Versuche war die radioaktive Markierung des Antikörpers Trastuzumab mit Natriumjodid (^{131}I , MDS Nordion S.A., Fleurus, Belgien). Die Konzentration des Natriumjodids betrug initial 7,4 GBq/ml, was einer spezifischen Aktivität von >1 TBq/mg entspricht. Für die Versuche wurde das Natriumjodid mit NaCl 0,9% (Braun Melsungen AG, Deutschland) verdünnt.

Nach der Iodogenmethode (Fraker und Speck, 1978) erfolgte die Markierung von 0,5 mg Herceptin mit 50 MBq ^{131}I . Zunächst wurde dazu 1 mg Antikörper in 100 μl NaCl 0,9% (Braun Melsungen AG, Deutschland) gelöst. Davon wurden 50 μl in ein mit 0,5 ml PBS-Puffer (pH 7,2, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) versehenes IODO-GEN[®]-beschichtetes Iodierungsgefäß (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford USA) pipettiert. Direkt im Anschluß erfolgte die Markierung durch Hinzufügen von 50 MBq ^{131}I . Dabei wurde durch IODO-GEN[®] das Jodid zum Jodoniumion, welches die Tyrosylreste des Antikörpermoleküls elektrophil substituierte, oxidiert. Das Gemisch wurde für dreißig Minuten auf einen Magnetprüher gestellt und die Reaktion danach durch Entnahme aus dem Reaktionsgefäß gestoppt. Anschließend erfolgte eine Qualitätskontrolle zur Überprüfung der Markierungsausbeute.

2.3 Qualitätskontrolle

Zur Überprüfung der Stabilität erfolgte die radioaktive Markierung von Trastuzumab wie unter 2.2 beschrieben und die erhaltene Aktivität wurde auf vier Elutionsfläschchen aufgeteilt. Zwei Fläschchen erhielten je 5 ml PBS – Puffer und die verbleibenden zwei Fläschchen erhielten je 5ml Medium. Nun wurden je eine Probe mit Puffer und eine mit Medium bei 4°C bzw. bei 37°C inkubiert. Nach 4, 24, 48, 72 und 96 Stunden erfolgten die im Folgenden beschriebenen Qualitätskontrollen.

2.3.1 Dünnschichtchromatographie

Zur Qualitätskontrolle der Markierung wurden 10 µl des zuvor radioaktiv markierten Antikörpers auf Dünnschichtchromatographiepapier (Instant Thin Layer Chromatography™ SG (ITLC), silica gel impregnated fiber sheets, Pall Corporation, Dreieich, Deutschland) aufgetragen und eine aufsteigende Dünnschichtchromatographie mit NaCl 0,9% als Lösungsmittel durchgeführt. Das Prinzip dieser Art der Qualitätskontrolle besteht darin, dass der Antikörper bei stabiler Markierung nicht wie das Iodid mit dem Lösungsmittel mitläuft, sondern an der Startlinie verbleibt. Nach Erreichen der Lösungsmittelfront wurde die Aktivität des ITLC insgesamt sowie der unteren Hälfte gemessen. Die Aktivitätsmessung direkt vor Versuchsbeginn konnte wie unter 2.4.1 beschrieben mittels eines Aktivimeters (CRC-15R, Capintec) durchgeführt werden. Die Messung der Aktivität im Rahmen der Überprüfung der generellen Stabilität der Markierung erfolgte, wie unter 2.6.3 erläutert, im Bohrloch-Detektor. Sofern der Quotient der Aktivität aus unterer Hälfte und Gesamtstreifen, das heißt der Anteil des an ^{131}I gebundenen Antikörpers, größer 0,9 betrug, war die radiochemischen Reinheit >90%. Wurde eine geringere radiochemische Reinheit erreicht, mußte eine neue Markierung erfolgen.

2.3.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie – HPLC

Das Prinzip der HPLC besteht darin, dass eine mobile Phase – das Laufmittel (PBS-Puffer pH 6,8; 0,1 molar) – über eine stationären Phase – die Size-Exclusion-Harz (Bio-Sil(R) SEC 250-5, 300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) – mit 0,5 ml/min gepumpt wird und dabei die zu untersuchenden Substanzen abhängig von ihrer Größe unterschiedlich stark an dieser festen Phase retardiert werden. Große Molekulargewichte sind mit entsprechend kürzeren Retentionszeiten verbunden. Das Molekulargewicht des IgG-Antikörpers beträgt 150 kDa, das des ^{131}I 131 Da. Am Ende der Säule wurde zum einen die Radioaktivität detektiert, zum anderen wurde das UV-Signal der Substanzen bei 250 nm ermittelt. Die Untersuchungen erfolgten mittels Knauer Smartline UV-Detektor 2500 und der entsprechenden Software ClarityChrom 2.6.

2.4 Messung der Aktivität

2.4.1 Aktivimeter

Die Anfangsaktivität wurde mittels eines Aktivimeters bestimmt. Der Messvorgang beruht darauf, dass die Radioaktivität in einer gasgefüllten Kammer Ionisationen erzeugt. Diese Ionisationen werden vom Gerät als Strom, welcher sich wiederum proportional zur Aktivität eines bestimmten Isotopes verhält, gemessen.

2.4.2 Bohrloch-Detektor

Die zellgebundene Aktivität wurde durch einen Bohrloch-Detektor (Multi-Logger LB 5310, Berthold) in Impulsen pro Minute gemessen. Die Messeinheit dieses Gerätes registriert Szintillationsblitze, die durch die Energie der absorbierten Strahlung in einem NaI-Szintillationskristall entstehen. Der Ausgabewert der Zerfälle pro Minute ist proportional zur Anzahl der Lichtblitze. Diese ist wiederum abhängig von der Stoffmenge, der Aktivität und dem Isotop. Jede Probe wurde je zweimal für eine Minute gemessen und der Mittelwert berechnet.

2.5 Versuche

Zum Versuch wurden die Zellen 1:10 (MX-1) bzw. 1:5 (JIMT) in sterilen Zellkulturflaschen mit 25 cm³ Anheftungsfläche (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) angesetzt und bei 37° unter 5% CO₂-Begasung inkubiert. Es wurden Kulturen mit maximal 1/3 Konfluenz für die Versuche verwendet.

Direkt vor Versuchsbeginn wurde das Medium gewechselt. Während der drei Versuchstage erfolgte kein Mediumwechsel. Die Versuchsbedingungen und Variationen waren für beide Zelllinien identisch, alle Versuchsflaschen wurden gleich behandelt.

Für jeden der drei Versuchstage wurden zwei Kontroll-Flaschen, welche nur Zellen und Medium enthielten, zur Zellwachstumskontrolle mitgeführt. Vor Versuchsbeginn wurden 100 µl des markierten Antikörpers auf 1,5 ml Medium aufgefüllt und die Anfangsaktivität $A(0)$ im Aktivimeter bestimmt sowie der

Zeitpunkt dieser Messung $t(0)$ dokumentiert. Die Versuchsergebnisse wurden mittels des Zerfallsgesetzes auf diesen Zeitpunkt rückgerechnet.

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der durchgeführten Versuche.

	Versuch(Messzeitpunkte 24,48,72 h)	Durchführung	Ziel
1.1	^{131}I -Trast-Uptake in JIMT-Zellkulturen n = 30/d	Inkubation der Zellen mit markiertem Antikörper	Untersuchung und Kinetik der Antikörperbindung
1.2	^{131}I -Trast-Uptake in MX-1-Zellkulturen n = 30/d	Inkubation der Zellen mit markiertem Antikörper	Untersuchung und Kinetik der Antikörperbindung
2.1	Charakterisierung der Antikörperbindung / JIMT n = 8/d	Zeitgleich zu ^{131}I -Trast Koinkubation mit kaltem Antikörper	Spezifität des ^{131}I -Uptake
2.2	Charakterisierung der Antikörperbindung / MX-1 n = 12/d	Zeitgleich zu ^{131}I -Trast Koinkubation mit kaltem Antikörper	Spezifität des ^{131}I -Uptake
3.1	Beeinflussung des Uptake und der Proliferation /JIMT n = 22/d bzw. 16/d	Zeitgleich zu ^{131}I -Trast Koinkubation verschiedener Konzentrationen Paclitaxel	Einfluß von Paclitaxel auf ^{131}I -Uptake und Zellwachstum
3.2	Beeinflussung des Uptake und der Proliferation /MX-1 n = 15/d bzw. 12/d	Zeitgleich zu ^{131}I -Trast Koinkubation verschiedener Konzentrationen Paclitaxel	Einfluß von Paclitaxel auf ^{131}I -Uptake und Zellwachstum

Tab. 3: Übersicht der über 72 h durchgeführten In-vitro-Versuche

2.5.1 Leerwertbestimmung

Für jeden Versuchstag wurde eine Zellkulturflasche, die lediglich Medium, jedoch keine Zellen enthielt, analog zu den anderen Zellkulturflaschen mit ^{131}I -Trast inkubiert. Abhängig von den jeweiligen Versuchen enthielten diese Flaschen entsprechende Mengen Medium und markierten Antikörper sowie Paclitaxel. Der sich bei den Leerwertflaschen ergebende Uptake wurde von den Uptake-Ergebnissen der Versuchsflaschen abgezogen. Dies diente dazu, den Netto-Zelluptake möglichst genau zu ermitteln.

2.5.2 Uptake des ^{131}I -Trastuzumab

Der Grundversuch bestand darin, die Zellen mit einer spezifischen Aktivität von einem $7 \text{ MBq}/\mu\text{g}$ ($71,4 * 10^{12} \text{ Bq/kg}$) markiertem Herceptin über 72 Stunden zu inkubieren. Es sollte der Uptake des ^{131}I -Trastuzumab ermittelt und damit ein positiver HER2-Status nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine mögliche Proliferationshemmung durch ^{131}I -Trast gegenüber der mitgeführten Kontroll-Zellkultur untersucht. Die Messungen der Aktivität der Proben sowie das Auszählen der Zellen erfolgten jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden.

2.5.3 Spezifität der Antikörperbindung

Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörperbindung wurde in weiteren Versuchen zu einigen Versuchskulturflaschen zusätzlich zum radioaktiv markierten Antikörper zeitgleich die fünfzigfache Menge an nicht-radioaktiv markiertem Antikörper hinzugegeben. Das bedeutet bei $0,007 \text{ mg}$ markiertem Antikörper eine Konzentration von $0,35 \text{ mg}$ kaltem Trastuzumab pro Versuchsflasche und somit eine spezifische Aktivität von $1,4 * 10^{12} \text{ Bq/kg}$. Auf diese Weise sollte die Spezifität der Antikörperbindung überprüft werden.

2.5.4 Koinkubation von ^{131}I -Trastuzumab und Paclitaxel

Zur Untersuchung des Einflusses von Paclitaxel auf die Antikörperbindung erfolgte die Koinkubation mit Verschieden Konzentrationen von Paclitaxel (GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten, Deutschland) einem Mitosehemmer. Hier sollte gezeigt werden, welchen Effekt die Kombination aus radioaktiv markiertem Antikörper und dem Zytostatikum hat.

Ausgegangen wurde von der für Patienten empfohlenen Dosis von 175 mg/m^2 Körperoberfläche (Rote Liste 2007). Für den Durchschnittsmenschen von ca. 2 m^2 Körperoberfläche und ca. 70 kg Körpergewicht ergab sich daraus eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$ Paclitaxel.

In den Versuchen wurden an den JIMT-Zellkulturen Paclitaxelkonzentrationen von $2 \cdot 10^{-4} \text{ mg/ml}$, $1 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$ und $4 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$ getestet. Die Kontrollzellkultur erhielt $4 \cdot 10^{-3} \text{ mg/ml}$ Paclitaxel.

2.6 Versuchsdurchführung

2.6.1 Gewinnung des Zellpellets

Zu den definierten Messzeitpunkten nach 24, 48 und 72 Stunden wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen verworfen und der Zellrasen zweimal mit je 5 ml PBS-Puffer gespült. Um die am Flaschenboden haftenden Zellen wieder in Lösung zu bringen, wurden sämtliche Versuchsflaschen mit 1 ml Accutase (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) für zehn Minuten inkubiert. Im Anschluß an die sich selbst limitierende Reaktion wurde die Versuchsflasche mit $1,6 \text{ ml}$ Medium gespült. Die Zellsuspension wurde nach Spülen mit weiteren $1,6 \text{ ml}$ PBS-Puffer für zehn Minuten bei 4°C und 1100 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Varifuge 32RS, Heraeus Sepatch).

Dann wurde der Überstand verworfen und das Zentrifugenröhrchen auf $1,5 \text{ ml}$ mit Medium aufgefüllt. Das Zellpellet wurde nun in diesem Medium resuspendiert zum Auszählen in ein Eppendorfcube pipettiert. Die zur jeweiligen Uptake-Messung entsprechende Anzahl der Zellen – s. 2.6.3 – wurde vor oder nach der Messung

bestimmt und das gegebenenfalls reduzierte Probenvolumen zum Zeitpunkt der Messung rechnerisch berücksichtigt.

2.6.2 Bestimmung der zellgebundenen Aktivität

Die Aktivität der in den Zentrifugenröhrchen verbliebenen Zellsuspension wurde durch einen Bohrloch-Detektor (s 2.4.2) in Impulsen pro Minute gemessen. Jede Probe wurde je zweimal für eine Minute gemessen und der Mittelwert berechnet.

2.6.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte 24, 48 und 72 Stunden nach Versuchsbeginn. In Abhängigkeit von der Zelldichte wurden dazu 20-500 µl der Zellsuspension verwendet. Die Zellsuspension wurde mit 2-100 µl Farbstoff (Trypanblau 0,2%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) versetzt und dann auf einen Objektträger mit Neubauer – Zählkammer aufgebracht. Unter einem Aufsichtsmikroskop (Bx 40, Olympus-Europe, Hamburg, Deutschland) erfolgte nun die Auszählung der nicht angefärbten, also intakten Zellen. Analog wurde mit den abgestorbenen, angefärbten Zellen verfahren.

2.7 Versuchsauswertung

2.7.1 Standardkurve

Zunächst erfolgte die Erstellung einer Standardkurve. Dazu wurde eine ^{131}I -Lösung von 15,4 MBq/100ml, gemessen in einer Gasionationskammer, vorbereitet. Von dieser radioaktiven Lösung wurden 10, 25, 50, 100 und 400 µl jeweils auf 1,5 ml aufgefüllt und anschließend die Aktivität mittels Bohrloch-Detektor analog zu den späteren In-vitro-Messungen bestimmt. In Excel 2000 (Microsoft, USA) wurde dann aus der Standardkurve durch lineare Regression eine Geradengleichung ermittelt sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 .

2.7.2 Rechnungen

Zur Auswertung der Versuche wurden folgende Daten in eine Excel-Tabelle (2000) übertragen: Zunächst die Probenbezeichnung, die Uhrzeit der Aktivitätsmessung dieser Probe, die Zeitdifferenz zwischen der Zugabe der Aktivität und der Messung, die ermittelte Zellzahl für den jeweiligen Zeitraum, die gemessene Aktivität nach der jeweiligen Zeit in counts per minute.

Wurde vor der Messung der Aktivität das Probenvolumen zwecks Zellzahlbestimmung (s. 2.6.2) reduziert, mußte dies nach der Messung wieder auf ein Volumen von 1,5 ml hochgerechnet werden, um die Proben vergleichen zu können.

Die spezifische Aktivität ist von der Halbwertszeit des verwendeten Isotopes, also in diesem Fall ca. acht Tage für ^{131}I , abhängig. Daher ist der Zeitpunkt der Messung der Aktivität zu Versuchsbeginn sowie der Versuchsauswertung von Bedeutung.

Die Aktivität nach der jeweiligen Zeit $A(t)$ konnte so aus dem Zerfallsgesetz berechnet werden, wobei $A(0)$ für den Zeitpunkt des Versuchsbeginns durch die Zugabe des radioaktiv markierten Herceptins und HWZ für die physikalische Halbwertszeit des ^{131}I in Stunden (192,72h) steht:

$$A(t) = A(0) * e^{(-\ln 2 * t / \text{HWZ in h})}$$

Setzte man nun für t die entsprechende Zeitdifferenz zwischen Versuchsbeginn und Messzeitpunkt Δt ein ergab sich:

$$A\Delta t = A(0) * e^{(-\ln 2 * \Delta t / \text{HWZ in h})}$$

Dividierte man die in counts per minute gemessene Aktivität durch diesen Exponenten, erhielt man die korrigierte Aktivität.

$$\text{korrigierte Aktivität} = \text{cpm} / A(t)$$

Die bei Versuchsbeginn hinzugegebene Aktivität A_0 wurde nun auf den Milliliter Medium umgerechnet, indem man wie folgt rechnete:

$$A(0) \text{ in Bq/ml} = A(0) * 1000 * 1000$$

Nach Ermittlung der Standardkurve (s Abb. 4) wurden die Werte der Aktivität der Versuchstage nun in Bq umgeformt, indem man sie mit dem Steigungskoeffizienten $A(t) = y * \text{cpm}$ multiplizierte.

Nun konnte der prozentuale Uptake durch die Zellen berechnet werden:

$$\text{Uptake in \%} = A(t) / A(0) / \text{ml Medium}$$

Abschließend wurde der prozentuale Uptake auf die Zahl der jeweils ausgezählten Zellen bezogen und der prozentuale Uptake pro Million Zellen berechnet:

$$\text{prozentualer Uptake pro Million Zellen} = \text{Uptake in \%} / \text{Zellzahl} * 10^6$$

2.7.3 Abschätzung der Bestrahlungsdosis durch ^{131}I -Trastuzumab

Die maximale Bestrahlungsdosis der Zellen durch ^{131}I -Trastuzumab wurde nach der Marinelli-Formel berechnet:

$$\text{Energie [eV]} = E_m \times \text{mittlere Aktivität } ^{131}\text{I} \times \text{Bestrahlungszeit}$$

für β^- : $E_m = 1/3 E_{\text{max}}$ und die mittlere Aktivität von ^{131}I wurde berechnet aus der kumulativen Aktivität über die Zeit (über 24 h $\approx 95\%$ der initialen Aktivität)

$$1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$$

$$\text{Dosis [Gy]} = \text{Energie [J]} / \text{Masse [kg]}$$

Die absolute β^- Dosis wurde über die Zeit integriert.

2.7.4 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit Hilfe von SPSS 15.0. Es wurden nicht-parametrische Tests für unverbundene Stichproben durchgeführt. Als Kriterien wurden die verschiedenen Messzeitpunkte in den jeweiligen Versuchen zueinander einerseits sowie die gleichen Messzeitpunkte verschiedener Variationen andererseits festgelegt. Ein p-Wert $<0,05$ galt als signifikant.

3 ERGEBNISSE

Der Antikörper ließ sich zuverlässig mit hoher Ausbeute, die im Mittel >95% betrug, markieren.

3.1 Stabilität der Antikörpermarkierung

3.1.1 DC

Die unter 2.3.1 beschriebene Überprüfung der Stabilität der Antikörpermarkierung ergab, dass diese sowohl in PBS-Puffer als auch in Medium temperaturunabhängig (4°, 37°C) stabil war. Im Mittel konnte für die mit Puffer verdünnte Probe bei 4°C über 96 Stunden eine radiochemische Reinheit von 91,5% erreicht werden, bei 37°C betrug sie 89,5%. Für die im Medium inkubierten Proben ergab sich bei 4°C eine mittlere radiochemische Reinheit von 94,1% und bei 37°C eine von 93,2%. Auch 24 Stunden über den Versuchszeitraum hinaus konnten Werte über 90% ermittelt werden.

Bedingung	nach 4 h	nach 24 h	nach 48 h	nach 72 h	nach 96 h
Puffer 4°C	91,5	92	96,5	89,6	87,6
Puffer 37°C	82,9	86,5	93	94,1	96,3
Medium 4°C	95,2	95,5	90,2	98,8	92,8
Medium 37°C	90,9	98,3	93,9	92,7	92,0

Tab. 4: Radiochemische Reinheit in % in PBS-Puffer und Zellkultur-Medium, jeweils bei 4° und 37° über 96 h Inkubation.

3.1.2 HPLC

Unabhängig von dem Untersuchungszeitpunkt wurden mittels Size-Eclusion-HPLC 92-99% der Aktivität Antikörper-gebunden nachgewiesen. Die Retentionszeiten des radioaktiv markierten Antikörpers und des Trastuzumab waren mit ca. 8 min. identisch. Freies Iodid eluierte mit einer Retentionszeit von 12-13 min. deutlich später.

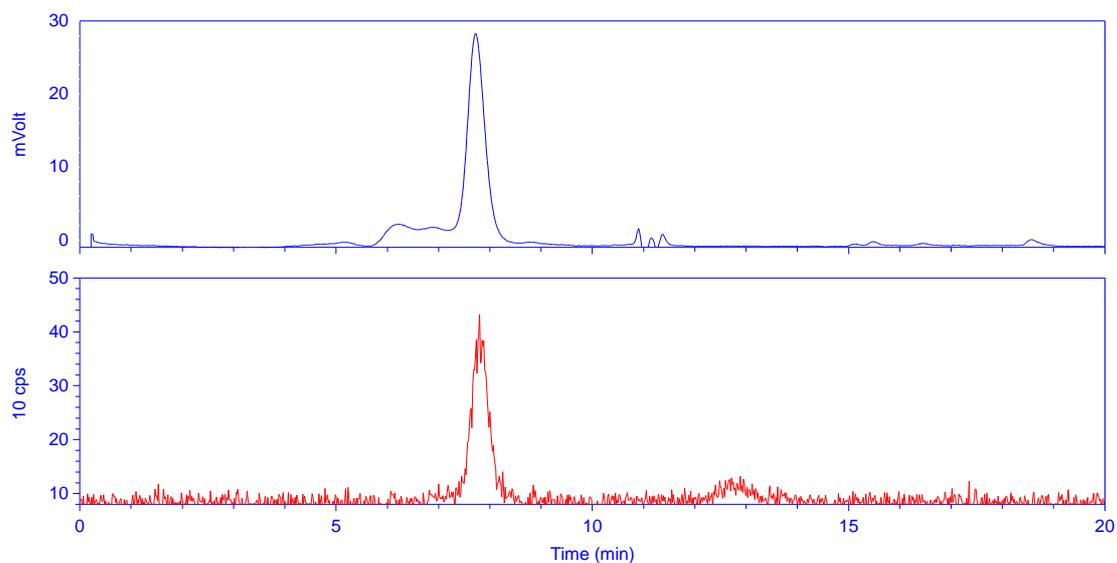


Abb. 4: Beispiel einer HPLC-Untersuchung des markierten Antikörpers nach 72 h Inkubation Zellkultur-Medium bei 37°C . Bei Koapplikation des nicht markierten und des radioaktiv markierten Antikörpers finden sich identische Retentionszeiten (ca. 8 min.) für die beiden Substanzen.

Die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen (Abb. 4) haben sich nicht signifikant von denen der Dünnschichtchromatographie unterschieden und bestätigen diese.

3.2 Standardkurve

Bei Erstellung der Standardkurve zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Aktivitätsmenge und den gemessenen Zerfällen pro Minute (cpm, Abb. 5) Durch lineare Regression wurde aus den wiederholten Messungen eine Geradengleichung ermittelt:

$$y \text{ [Bq]} = 0,0758 \times \text{[cpm]}$$

Der Steigungskoeffizient betrug 0,0758 und es ergab sich ein Bestimmtheitsmaß von $>0,99$.

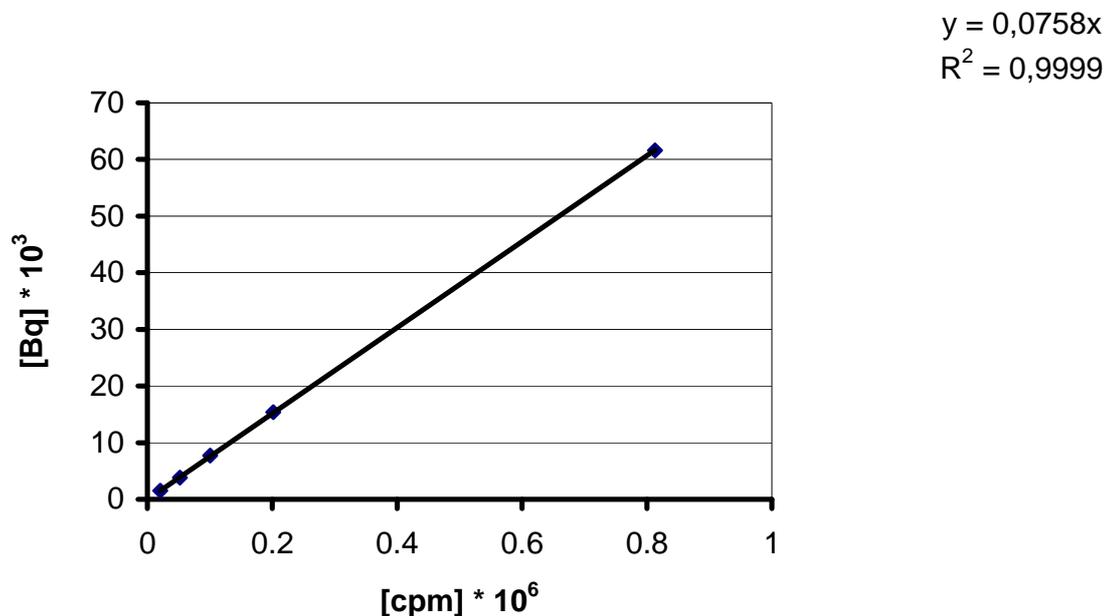


Abb. 5: Standardkurve für ^{131}I . Mit Hilfe der Standardkurve können die gemessenen counts pro Minute (cpm) in Bq konvertiert werden. Dargestellt sind die Ergebnisse von $n=3$ unabhängigen Untersuchungen.

3.3 Uptake

3.3.1 Zeitlicher Verlauf des ^{131}I -Trast-Uptakes von JIMT-Zellen

In Abb. 6 wird der Verlauf des ^{131}I -Trast-Uptake über 72 Stunden dargestellt. Dieser wies in der Zellkultur eine schnelle Kinetik auf. Bereits nach 24 Stunden erreichte der Uptake in unseren Untersuchungen ein Maximum von $M=9,9\%$. In den folgenden Tagen reduzierte sich dieser leicht auf $M=8,9\%$ nach 72 Stunden. In der statistischen Auswertung ergab sich keine signifikante Änderung des Uptake über die ersten 48 h. Zwischen der Messung nach 24h und der nach 72 Stunden zeigte sich eine leichte, aber signifikante Verminderung des Uptake ($p < 0,05$). Insgesamt zeigte sich ein relativ hoher ^{131}I -Trast-Uptake trotz der in der Literatur beschriebenen Trastuzumab-Resistenz bei JIMT (Tanner et al. 2004).

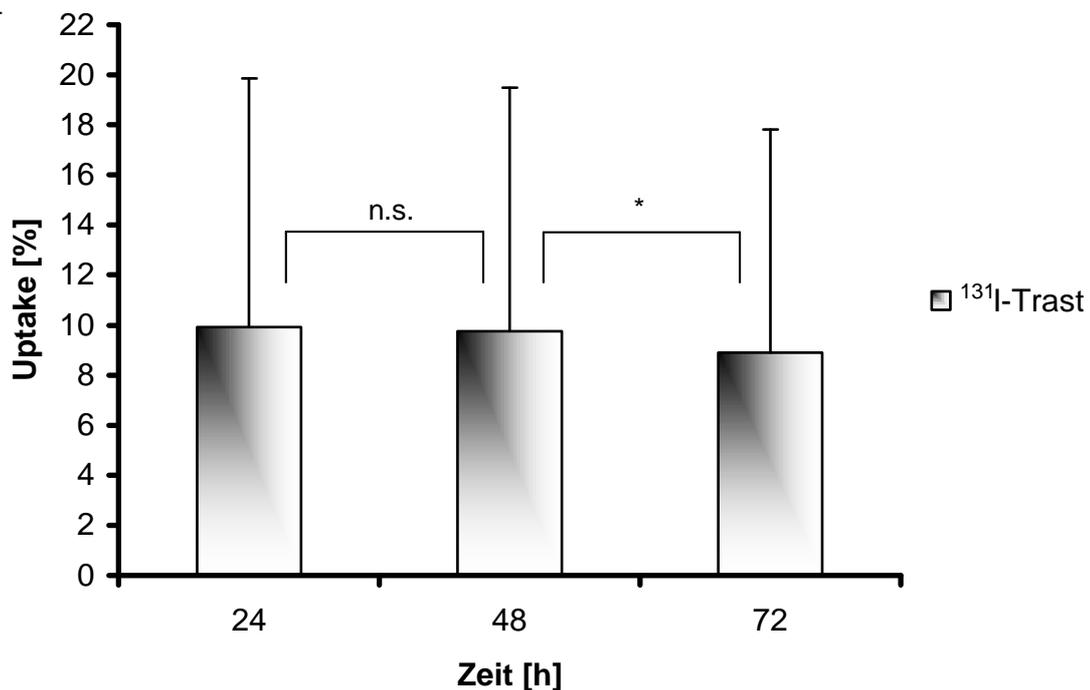


Abb. 6: Medianer prozentualer ^{131}I -Trast-Uptake über 72 h in 10^6 JIMT-Zellen. Dargestellt sind die Mediane mit entsprechenden 75. Quartilen. Es wurden 30 Versuche ausgewertet. * $p < 0,05$

3.3.2 Zeitlicher Verlauf des ^{131}I -Trast-Uptake von MX-1-Zellen

Die Kontrollzelllinie MX-1 zeigte einen geringeren Antikörper-Uptake als die HER2-überexprimierenden JIMT-Zellen (Abb. 7). Auch in dieser Zelllinie wurde bereits nach 24 h ein maximaler medianer Uptake nachgewiesen (M=6%). Im zeitlichen Verlauf ergaben sich mediane Werte zwischen 4% und 6%, wobei die Änderungen aufgrund der hohen Schwankungen nicht signifikant waren.

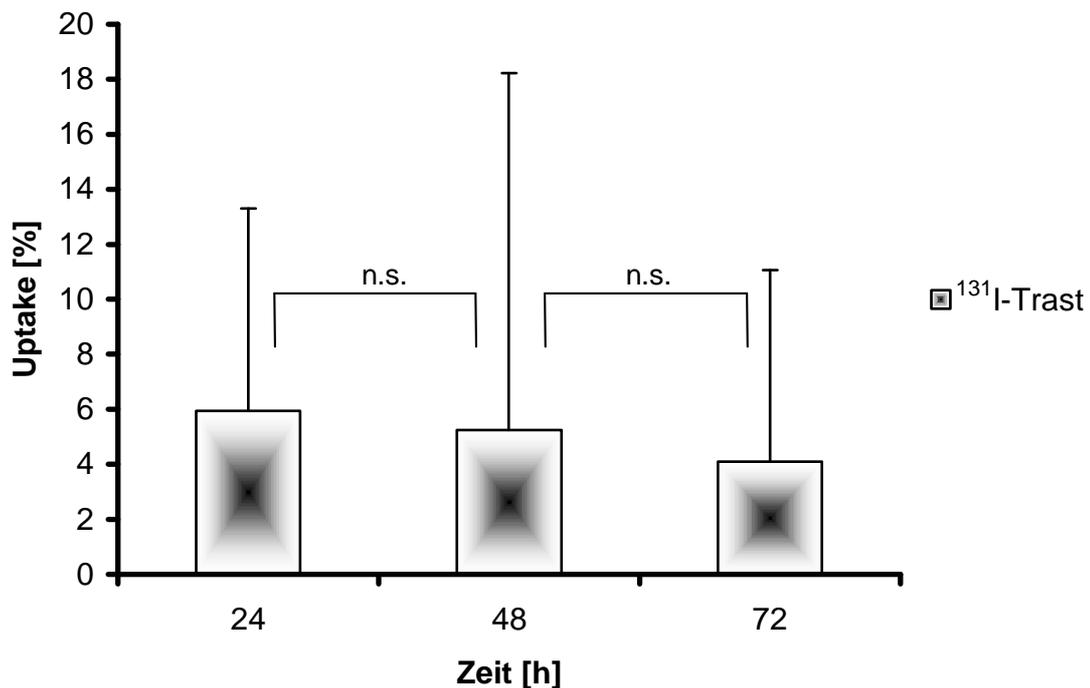


Abb. 7: Uptake von ^{131}I -Trast in 10^6 MX-1-Zellen. Dargestellt sind die Mediane mit entsprechendem 75. Quartil. Die Anzahl der über 72 h ausgewerteten Versuche beträgt n=30. Bereits nach 24 h wurde der maximale mediane Uptake ermittelt. Die Änderungen im zeitlichen Verlauf waren nicht signifikant.

3.4 Spezifität

3.4.1 Überprüfung der Spezifität der Antikörperbindung – JIMT

Um zu ermitteln, ob die Antikörperbindung der JIMT-Kultur spezifisch war, wurden die Zellen zeitgleich zur Zugabe von ^{131}I -Trast mit der fünfzigfachen Menge an nicht markiertem Antikörper inkubiert. In Abb. 8 zeigt die jeweils linke Säule den ^{131}I -Tastuzumab-Uptake der JIMT-Zellen zum jeweiligen Messzeitpunkt. Im Gegensatz dazu beschreiben die jeweils rechten Säulen den Uptake-Verlauf bei Koinkubation der fünfzigfachen Menge an nicht radioaktiv markiertem Antikörper über 72 Stunden.

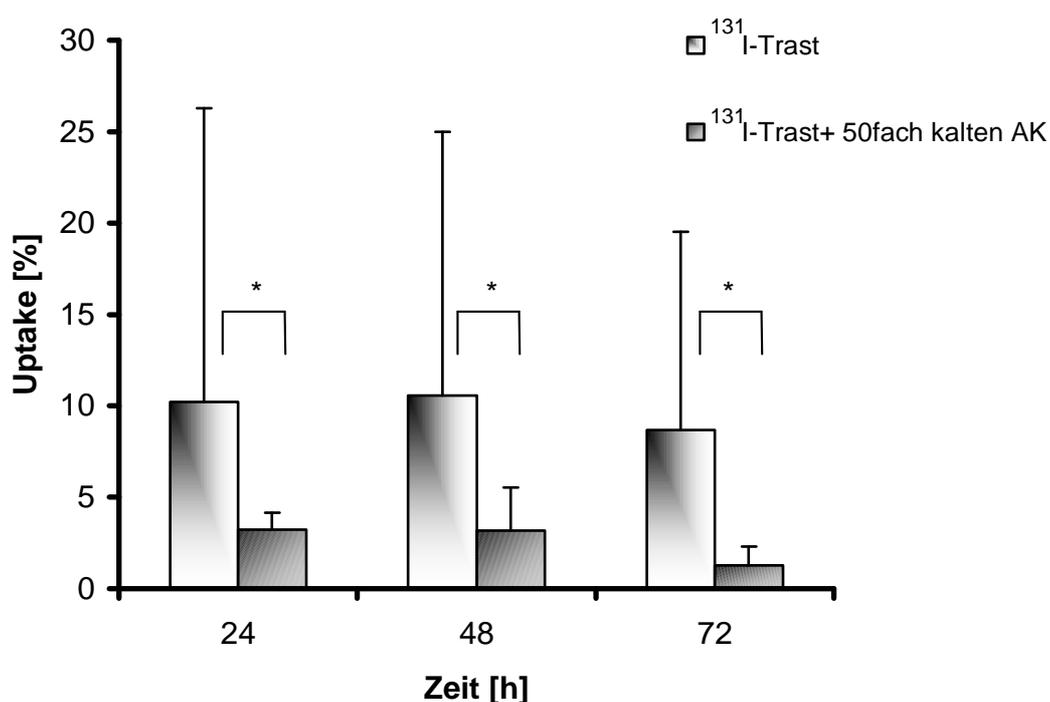


Abb. 8: Uptake von ^{131}I -Trast bzw. ^{131}I -Trast bei Koinkubation mit kaltem Antikörper in JIMT-Zellen. Es sind die Mediane mit entsprechendem 75. Quartil dargestellt. Die Anzahl der ausgewerteten Versuche beträgt 8. * $p < 0,05$

Bei Koinkubation mit kaltem Antikörper konnte ein reduzierter Uptake – um bis zu 80% nach 72 Stunden – beobachtet werden. Für die Auswertungen nach 48 und 72 Stunden ist diese Verringerung signifikant ($p < 0,05$). Der mit ^{131}I markierte Antikörper und der nicht markierte konkurrieren um die gleichen Bindungsstellen

und in Folge dessen kommt es zu einer Reduktion des Uptake. Daraus ergibt sich, dass die beobachtete Antikörperbindung spezifisch ist und damit die spezifische Bindung ^{131}I -Trast an JIMT-Zellen belegt ist.

3.4.2 Überprüfung der Spezifität der Antikörperbindung – MX-1

Bei Koinkubation der fünfzigfachen Menge kalten Antikörpers fiel auch bei der Kontrollzelllinie eine Verminderung des Uptake um ca. 40% nach 48 Stunden auf (Abb. 9). Die statistische Auswertung ergab für alle Messzeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen dem Uptake des ^{131}I -Trast und ^{131}I -Trast unter Koinkubation mit kaltem Antikörper ($p < 0,05$).

Es konnte daher auch hier eine spezifische Antikörperbindung nachgewiesen werden, allerdings in geringerem Maße als bei der HER2-überexprimierenden Zelllinie JIMT.

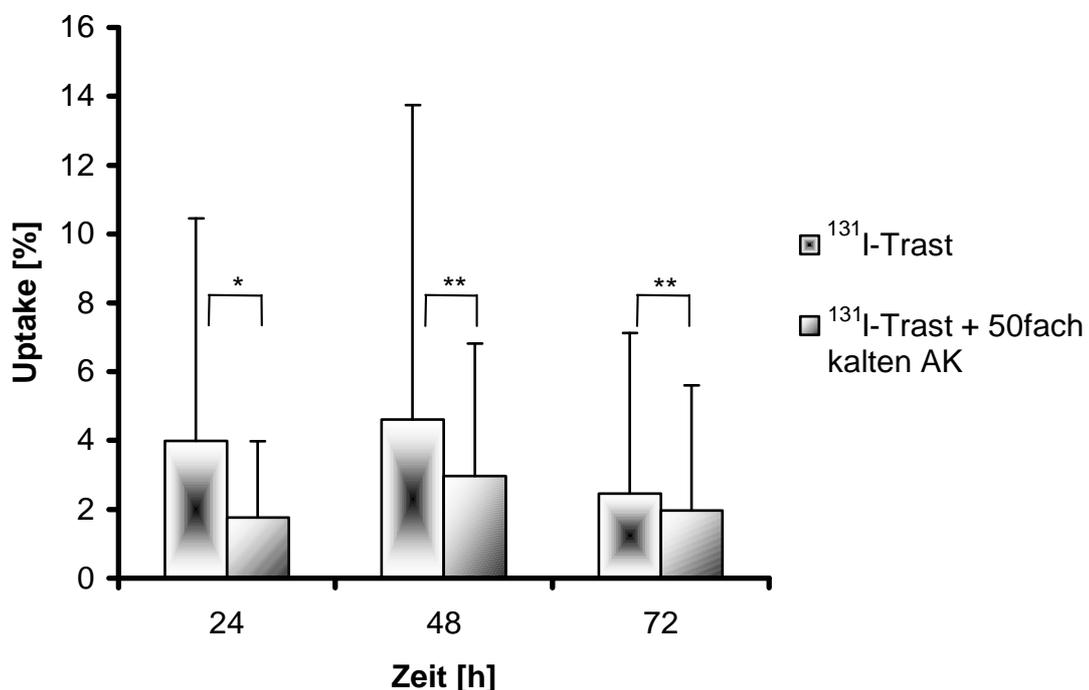


Abb. 9: Uptake von ^{131}I -Trast bzw. ^{131}I -Trast bei Koinkubation mit kaltem Antikörper durch MX-1-Zellen: Dargestellt sind die Mediane der aus 12 Parallelversuchen über 72 h beobachteten Uptake-Werte sowie die entsprechenden 75. Quartile. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Bei Koinkubation mit der 50fachen Menge an kaltem Antikörper konnte eine signifikante Verminderung der ^{131}I -Trast-Aufnahme nachgewiesen werden.

3.5 Paclitaxel und Uptake

3.5.1 Einfluß von Paclitaxel auf den ^{131}I -Trast-Uptake in JIMT-Kulturen

Um den Einfluß des Taxan Paclitaxel auf den ^{131}I -Trast-Uptake zu untersuchen, wurde von der für Patienten empfohlenen Dosis von 175 mg/m^2 KOF, entsprechend $0,005 \text{ mg/ml}$, ausgegangen. Die Versuchsdurchführung erfolgte mit zur empfohlenen Tagesdosis verglichen reduzierten Dosierungen von $0,004 \text{ mg/ml}$, $0,001 \text{ mg/ml}$ und $0,0002 \text{ mg/ml}$ Paclitaxel.

Die Koinkubation von Paclitaxel führte zu einer deutlichen Erhöhung des ^{131}I -Trast-Uptake (Abb. 10). Dieser Effekt ließ bereits für die geringste Dosierung nachweisen. Für die Kombination mit der Patientendosis-äquivalente Dosierung von $0,004 \text{ mg/ml}$ wurde nach 24 Stunden im Vergleich zur Monobehandlung mit ^{131}I -Trast ein nahezu vervierfachter Uptake ermittelt. Nach 48 Stunden war dieser im Median versiebenfacht. Der Uptake unter dieser Paclitaxel-Dosis war signifikant höher als unter ^{131}I -Trast-Monoinkubation ($p < 0,05$).

Bei der Zugabe von 25% der für Patienten empfohlenen Dosis Paclitaxel, also $0,001 \text{ mg/ml}$, konnte nach 24 Stunden eine Verdreifachung des Uptake gezeigt werden, nach 48 Stunden eine Versiebenfachung. Diese Ergebnisse sind ebenfalls signifikant. (nach 24 h: $p < 0,05$; nach 48 h und 72 h: $p < 0,01$).

Auch für die geringste in den Versuchen gewählte Dosierung von $0,0002 \text{ mg/ml}$ Paclitaxel, was etwa 5% der empfohlenen Patientendosis entspricht, zeigte sich eine Verdreifachung des Uptake nach 24 Stunden, eine Verfünffachung nach 48 Stunden und ebenfalls eine Verfünffachung nach 72 Stunden. Das bedeutet, dass auch diese, im Vergleich zur empfohlenen Dosis geringe, Konzentration zu einer signifikanten Steigerung des Uptake führt ($p < 0,05$).

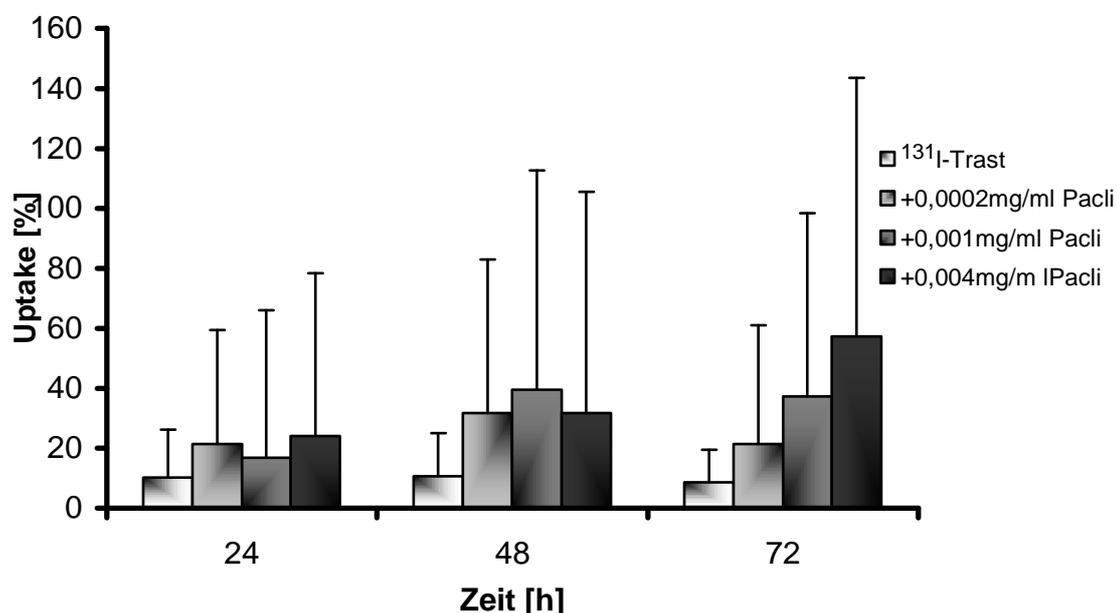


Abb. 10: Einfluß von Paclitaxel auf den ¹³¹I-Trast-Uptake in JIMT-Kulturen. Dargestellt sind die im Median über 72 h beobachteten Uptake-Werte von Kulturen die mit ¹³¹I-Trast alleine oder zusätzlich mit Paclitaxel über 72 h inkubiert wurden und deren 75. Quartile. Die Anzahl der ausgewerteten Versuche beträgt 22. Für die drei gewählten Paclitaxel-Dosierungen ergibt sich gegenüber ¹³¹I-Trast-Mono-Behandlung ein signifikanter Unterschied der Antikörperaufnahme: $p < 0,05$.

In Abb. 10 ist der prozentuale Verlauf des Uptake über 72 Stunden für die Inkubation aller für die Versuche gewählten Konzentrationen an Paclitaxel sowie für die Kontrolle mit ¹³¹I-Trast allein dargestellt. Hier wird deutlich, daß die Effekte zeit- und dosisabhängig waren. Nach 72 h wurde eine statistisch signifikante Dosisabhängigkeit nachgewiesen ($p < 0,05$).

3.5.2 Einfluß von Paclitaxel auf den ^{131}I -Trast-Uptake bei MX-1

Der prozentuale Uptake von MX-1 konnte durch Paclitaxel nur gering positiv beeinflusst werden (Abb.11). Die Werte unter Paclitaxel liegen nach 24, 48 und 72 Stunden um ca. 10% über denen der Zellen, die nur mit ^{131}I -Trast inkubiert wurden. Diese Änderung war nicht signifikant.

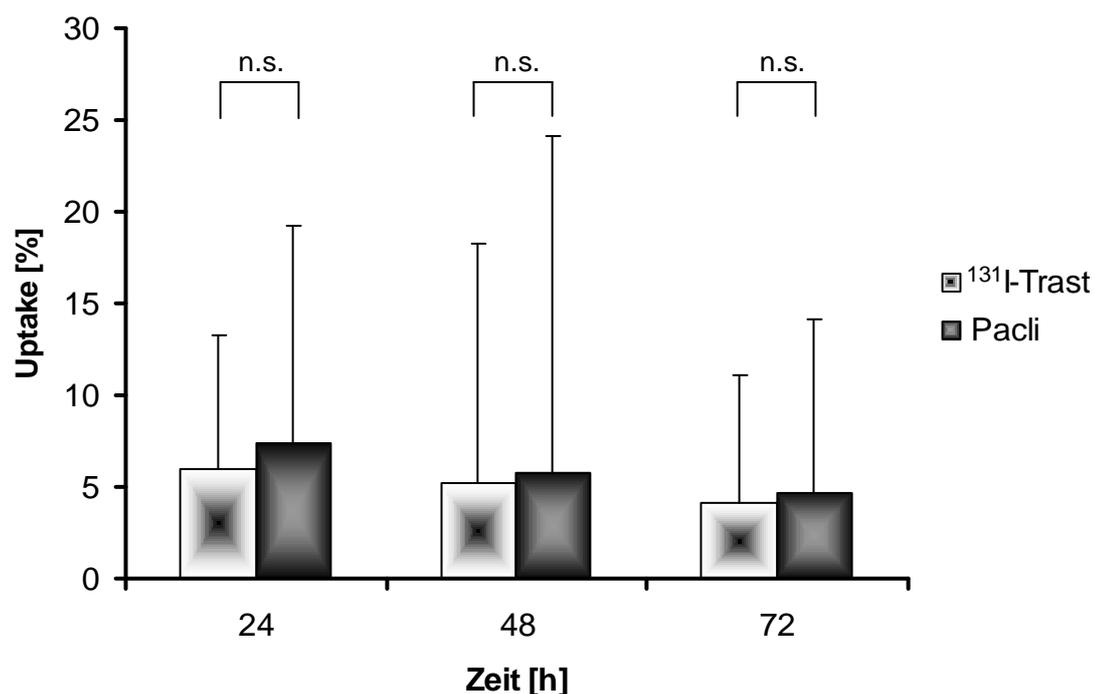


Abb. 11: Einfluß von Paclitaxel auf den ^{131}I -Trast-Uptake in MX-1-Kulturen über 72 h. Dargestellt sind die Mediane aus 15 Parallelversuchen von Kulturen die mit ^{131}I -Trast alleine oder zusätzlich mit Paclitaxel über 72 h inkubiert wurden mit entsprechenden 75. Quartilen. Es konnte kein signifikanter Effekt von Paclitaxel auf die ^{131}I -Trast-Aufnahme nachgewiesen werden.

3.6 Paclitaxel und Proliferation

3.6.1 Einfluß von ^{131}I -Trast und Paclitaxel auf die Zellzahl – JIMT

Neben der Untersuchung des Antikörper-Uptake sollten die durchgeführten Untersuchungen Aufschluß über die proliferationshemmende Potenz von ^{131}I -Trast sowie ^{131}I -Trast zusammen mit Paclitaxel geben.

Zunächst konnte im Vergleich der unbehandelten Zellen, die in jedem Einzelversuch als Kontrolle mitgeführt wurden, mit den mit ^{131}I -Trast behandelten Zellen nach 72 Stunden eine signifikante Steigerung der Wachstumshemmung durch ^{131}I -Trast ermittelt werden ($p < 0,05$).

Wird die Proliferation der mit einer ^{131}I -Trast inkubierten Zellen mit der jener Zellen, welche zeitgleich zusätzlich mit der fünfzigfachen Menge kalten Antikörpers behandelt wurden verglichen, so ergibt sich eine signifikant höhere Proliferationshemmung schon nach 24 Stunden ($p < 0,005$), dargestellt in Abb. 12.

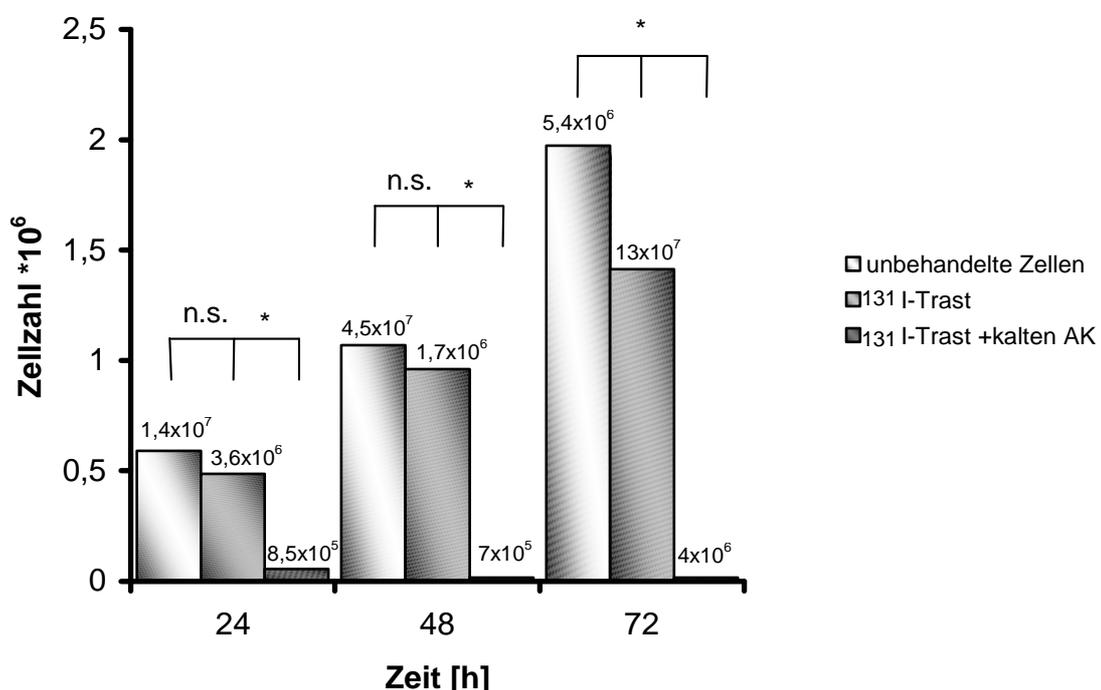


Abb. 12: Einfluss von ^{131}I -Trast und nicht markiertem Antikörper auf die Proliferation der JIMT-Kulturen über 72 h. Dargestellt sind die Mediane aus $n=8$ Versuchen. Aufgrund besserer Darstellung sind die 75. Quartile als Zahlenwerte über den entsprechenden Säulen angegeben. Hier wird die Proliferation der unbehandelten, der mit ^{131}I -Trast inkubierten und der mit ^{131}I -Trast und der 50-fachen kalten Antikörpers inkubierten Zellen abgebildet. Sowohl ^{131}I -Trast als auch ^{131}I -Trast in Kombination mit kaltem Antikörper bewirken eine signifikante Proliferationshemmung: $*p < 0,05$. Die Koinkubation von ^{131}I -Trast und kaltem Antikörper bewirkte eine deutlichere Proliferationshemmung als die ^{131}I -Trast-Monoinkubation.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Paclitaxel – bereits 5% der klinischen Dosierung – zu einer hochsignifikanten Reduktion der Zellzahl führt ($p < 0,001$). Dieser Effekt ist dosis-, zeit- und konzentrationsabhängig. Aufgrund der divergenten Zellzahlentwicklung sind die Werte der zusätzlich mit Paclitaxel behandelten Zellkulturen in einer gesonderten Abbildung dargestellt (s. Abb. 12/13).

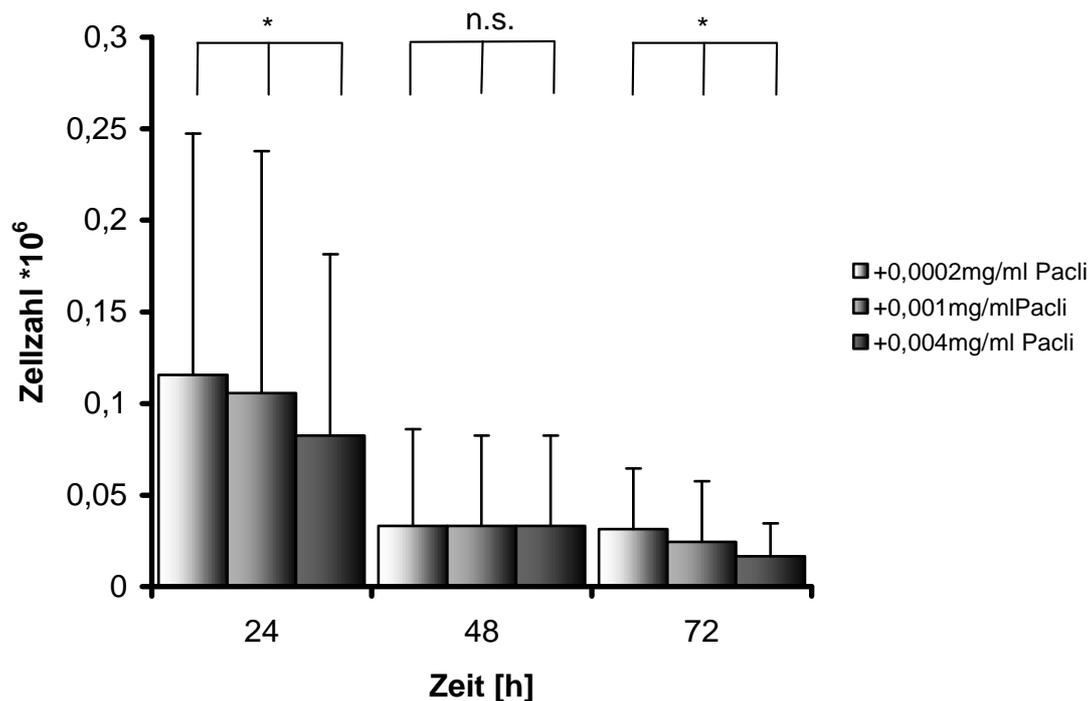


Abb. 13: Proliferation der JIMT-Kulturen über 72 h mit Paclitaxel. Dargestellt sind die Mediane und 75. Quartile von $n=16$ Parallelversuchen mit Koinkubation von ^{131}I -Trast und Paclitaxel. Zum Vergleich s. Abb. 12. Hier wird die Reduktion der Zellzahlen von den mit ^{131}I -Trast und verschiedenen Konzentrationen Paclitaxel behandelten Zellen über 72 h dargestellt. Paclitaxel reduziert die Zellzahl signifikant gegenüber der ^{131}I -Trast-Monoinkubation s. Abb. 12 ($*p < 0,001$).

3.6.2 Einfluß von ^{131}I -Trast und Paclitaxel auf die Zellzahl – in MX-1

Die Versuche mit der Kontrollzelllinie MX-1 konnten zeigen, dass das Radioimmunkonjugat alleine keine signifikante proliferationshemmende Wirkung hat (Abb. 14).

Für die Proliferation der unbehandelten Zellen und denen mit ^{131}I -Trast-Behandlung ergibt sich über 48 Stunden keinen signifikante Änderung ($p > 0,05$). Nach 48 Stunden zeigt sich eine fast verdreifachte Zellpopulation. Dagegen konnte Paclitaxel das Zellwachstum signifikant verringern. Die Zellzahl verringerte nach 48 Stunden auf 70% des 24-Stunden-Wertes und nach 72 Stunden auf 40% des 24-Stunden-Wertes. Die Zellzahl der mit Paclitaxel behandelten Zellen entsprach nach 24 Stunden 26% der normalen Proliferation, nach 48 Stunden 10% und nach 72 Stunden 3%. Diese Ergebnisse sind signifikant ($p < 0,05$).

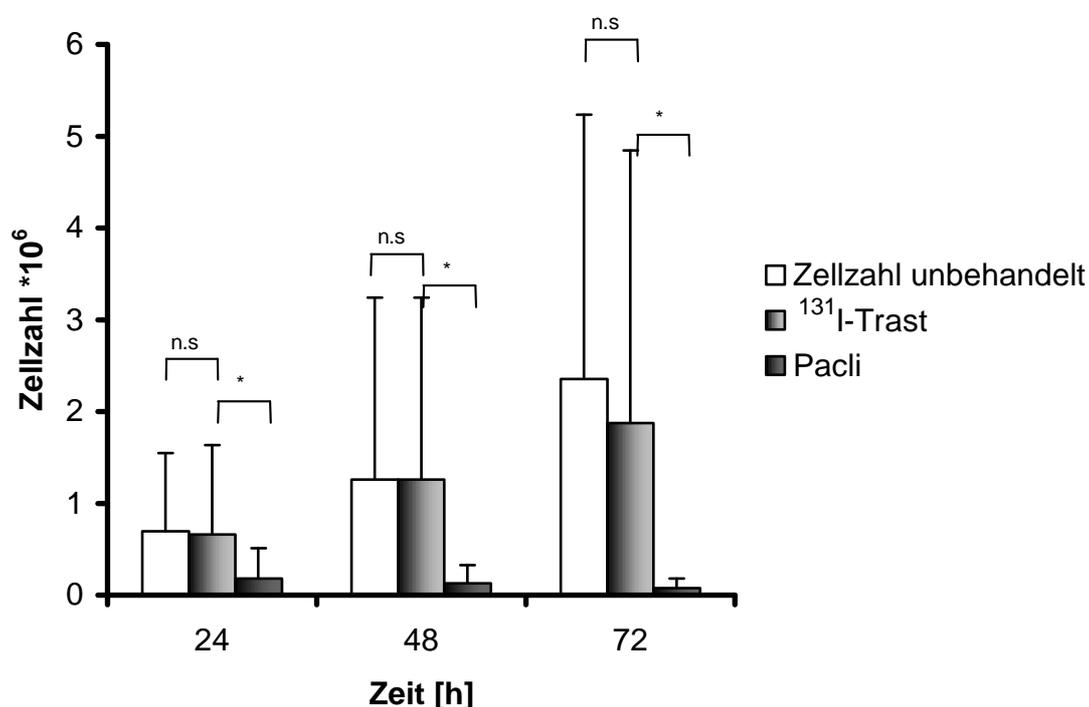


Abb. 14: Proliferation von MX-1 über 72 h. Es sind die Mediane aus 12 Versuchen dargestellt. Lediglich Paclitaxel führte zu einer signifikanten Verminderung der Proliferation * $p < 0,01$.

3.7 Bestrahlungsdosis durch ^{131}I -Trast

Um die Bestrahlungsdosen, die durch den β - Strahler ^{131}I während des Versuches auf die Zellkulturen eingewirkt haben, abschätzen zu können, wurden diese aus den bekannten Daten berechnet.

Zur Verdeutlichung sind in Abb. 15 die im Median ermittelten Zellzahlen der unbehandelten JIMT-Kulturen nach 24, 48 und 72 Stunden dargestellt. Zum jeweiligen Messzeitpunkt wurde die kumulative Bestrahlungsdosis, berechnet gemäß der Marinelli-Formel (Abschnitt 2.7.3), für die Zellkulturen wiedergegeben. Die Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen wurden bereits unter 3.6.1 in Abb. 12 graphisch aufbereitet.

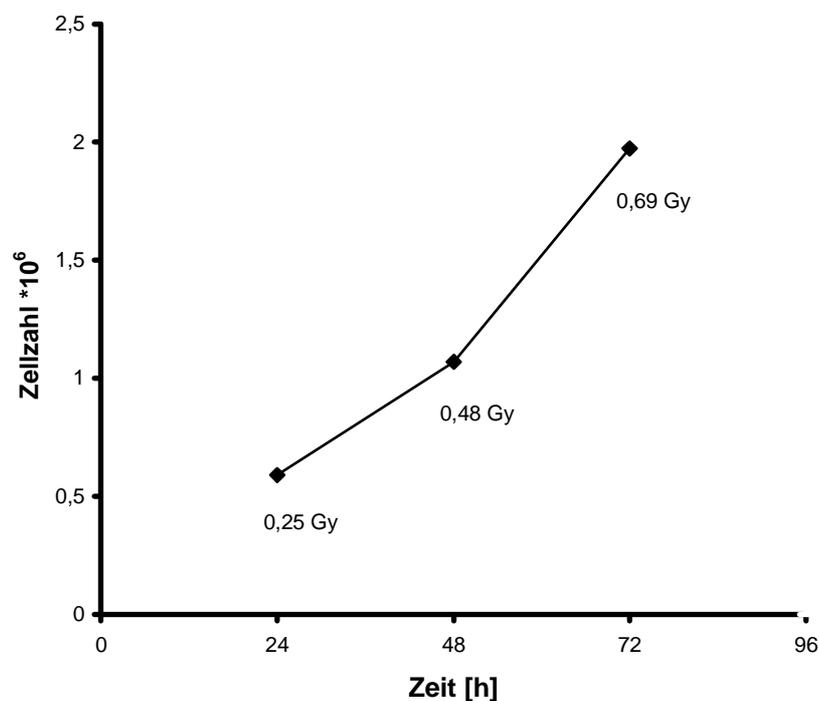


Abb. 15: Mediane der Zellzahlen in den JIMT-Zellkulturen sowie die resultierende errechnete kumulative Bestrahlungsdosis in Gray (Gy) in der Kultur zum jeweiligen Messzeitpunkt über 72 h. Dargestellt sind die Mediane aus 16 Parallelversuchen.

4 DISKUSSION

Die Überexpression des HER2 ist – s. Abschnitt 1.1 – ein bedeutender Faktor in Bezug auf Prognose und Therapie von Mammakarzinomen. Klinisch wird die Ausprägung dieses Merkmals zur Zeit semiquantitativ an invasiv gewonnenen Gewebeproben einzelner Tumormanifestationen ermittelt (Kreienberg et al. 2008, Sauter et al. 2009). Eine frühe nicht-invasive Diagnostik des HER2-Status wäre hinsichtlich der geringeren Belastung der Patientinnen und einer größeren Aussagekraft in Bezug auf mögliche andere Tumorlokalisationen wünschenswert. Diese ist besonders von Interesse, zumal bekannt ist, dass sich der Rezeptorstatus in Metastasen von dem des Primarius unterscheiden kann (Fehm et al. 2007; Tapia et al. 2007).

Die Immuntherapie solider Tumoren mit Antikörpern gelang in vivo aufgrund physiologischer Barrieren – wie unter 1.3 beschrieben – bisher nicht in dem Maße, wie die In-vitro-Studien und Resultate in der B-Zell-Lymphomtherapie es haben hoffen lassen (Kaminski et al. 1992, DeNardo 2006, Boswell et al. 2007). Zudem hat sich bei der Langzeittherapie mit HER2-Antikörpern – wie bei vielen Tumorthérapien – das Problem der Resistenzentwicklung ergeben. Bei ca. 30% der behandelten Patienten kommt es zu einer Verminderung der antitumoralen Wirkung unter Therapie. Dies zeigt sich in Rezidivbildung bzw. Krankheitsprogress (Frieboes et al. 2009). Zusätzliche Therapieoptionen sind daher wünschenswert. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst in vitro der Frage nachgegangen, ob sich radioaktiv markierte HER2-Antikörper für eine nicht-invasive Rezeptordiagnostik bzw. für die Radioimmuntherapie eignen könnten.

4.1 Radioimmundiagnostik

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass durch radioaktive Markierung eines HER2-Antikörpers die Expression des entsprechenden Rezeptors nachgewiesen werden kann. In als Trastuzumab-resistent beschriebenen Zellen ließ sich zuverlässig ein hoher Uptake des radioaktiv markierten Antikörpers ermitteln. Aus allen Versuchen ergaben sich im Median Uptake-Werte um knapp 10% pro Million Zellen über 72 Stunden. Demzufolge könnte man der invasiven und für Patienten

belastenden Biopsie eine nicht-invasive Detektion möglicher HER2-Expression ihrer Tumoren vorziehen. Mittels markiertem Antikörper könnte dies semiquantitativ mit einer SPECT oder quantitativ mit einer PET gelingen. Hierfür müsste zunächst in weiteren Untersuchungen die Übereinstimmung zwischen dem derzeitigen Standard-Verfahren und der Radioimmundiagnostik durch das radioaktiv markierte Trastuzumab nachgewiesen werden.

In der Literatur sind bereits durch einige Forschungsgruppen sowohl In-vitro- als auch In-vivo-Untersuchungen zur HER2-Diagnostik mit Hilfe radioaktiv markierter Moleküle beschrieben. Orkavi et al. erzielten interessante Ergebnisse bei der Adenokarzinomdetektion der Brust am Mausmodell. Diese Untersuchungen erfolgten mittels ^{99m}Tc -markierten Peptiden gegen MUC1 und HER2 gerichtet, welche zuvor aus Antigen-Antikörper-Komplexen abgeleitet worden waren. Die markierten Peptide erwiesen sich als stabil im menschlichen Plasma (Orkavi et al. 2009). In Analogie hierzu wurde für die zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche eine temperaturunabhängige Stabilität der Antikörpermarkierung in Puffer und Medium über den Versuchszeitraum von 72 Stunden hinaus nachgewiesen – beschrieben unter 3.1. Eine analoge Stabilität auch in vivo ist aufgrund der Vergleichbarkeit der Versuchsbedingungen zum menschlichen Körper anzunehmen, müsste aber in weiteren Versuchen verifiziert werden.

Bei der Diagnostik mittels radioaktiv markierter Antikörper ergeben sich folgende Fragen und Probleme. Zunächst könnte der gemessene Uptake nicht spezifisch für das zu untersuchende Charakteristikum, in diesem Fall für den HER2, sein. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit kann die Bindung von ^{131}I -Trast in der HER2-überexprimierenden Zelllinie JIMT jedoch als spezifisch betrachtet werden. Durch die Zugabe der fünfzigfachen Menge kalten Antikörpers konnte der Uptake nach 24 Stunden und 48 Stunden um ca. 30% gesenkt werden, nach 72 Stunden sogar um ca. 90%. Damit ist die Spezifität der Antikörperbindung weitgehend nachgewiesen. Auf vergleichbare Weise untersuchten McLarty et al. die Spezifität von ^{111}In -DTPA-Trastuzumab. Diese Arbeitsgruppe untersuchte den Zusammenhang zwischen dem ^{111}In -DTPA-Trastuzumab-Uptake, der HER2-Expression und der Trastuzumab-Sensitivität. An athymischen Mäusen mit Brusttumoren unterschiedlicher HER2-Expression wurde dazu der ^{111}In -DTPA-Trastuzumab- bzw. ^{111}In -DTPA-IgG-Uptake bestimmt. Die Spezifität des Uptake wurde auf zwei Arten nachgewiesen. Zum einen bekam eine Versuchstiergruppe

24 Stunden vor Versuchsbeginn die 80-fache Menge nicht-markierten Antikörpers, woraufhin eine dreifach reduzierter Uptake festgestellt wurde. Zum anderen wurde in der IgG-Gruppe ein vierfach reduzierter Uptake gemessen. Das Ergebnis, nach einer Korrektur der unspezifischen Bindung im Hintergrund, war eine deutliche, nicht-lineare Beziehung zwischen HER2-Dichte und der Aufnahme des radioaktiv markierten Antikörpers. Der unkorrigierte ^{111}In -DTPA-Trastuzumab-Uptake stand in deutlichem Zusammenhang mit der Wirkung des Antikörpers auf den Tumor (McLarty et al. 2009). Durch Koinkubation der 80-fachen Menge kalten Antikörpers sowie den Vergleich der Uptake-Werte mit einer Kontrollgruppe konnte mit dieser Arbeit übereinstimmend die Spezifität der Antikörperbindung nachgewiesen werden.

In der Kontrollzellkultur MX-1, welche in der Literatur als HER2-negativ bzw. mäßig HER2-exprimierend gilt (Trost et al. 2004, Desai et al. 2008), wurde durch Koinkubation der fünfzigfachen Menge kalten Antikörpers ebenfalls ein spezifischer ^{131}I -Trast-Uptake nachgewiesen, jedoch auf deutlich geringerem Niveau. Nach 24 und 48 Stunden wurde ein um ca. 50% verringerter Uptake gegenüber mit reinem ^{131}I -Trast behandelten Zellkulturen gemessen, nach 72 Stunden jedoch nur noch ein um 20% geringerer. Der spezifische Uptake der MX-Zellkulturen ist geringer als jener in JIMT-Kulturen. Daraus lässt sich in Übereinstimmung zur Literatur schlussfolgern, dass MX-1-Zellen HER2 in geringerem Maße exprimieren als die JIMT-Zellen.

Ein zweites mögliches Problem der Radioimmundiagnostik ist die Metabolisierung des Antikörperkonjugates. Wenn ein mit ^{131}I konjugiertes Antikörpermolekül von Zellen aufgenommen wird, würde Iod intrazellulär durch Deiodasen freigesetzt werden. In ca. 70% der HER2-positiven Mammakarzinome konnte der Natrium-Iodid-Symporter identifiziert werden. Durch diesen wird Iodid, wenn auch in geringem Maße, in die Zelle transportiert (Renier et al. 2009). Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wäre eine durch den Symporter medierte Iodaufnahme, aber auch eine Herceptin-induzierte Rezeptorinternalisierung in die Tumorzellen von Nachteil. Dadurch könnte von den in vivo ermittelten Uptake-Werten nicht verlässlich auf die HER2-Expression rückgeschlossen werden. In den Versuchen konnte ein weitgehend stabiler Uptake über 72 Stunden festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass Trastuzumab-gebundene Rezeptordimere nicht oder zumindest wenig internalisiert werden. Eine andere mögliche Erklärung für

den stabilen Uptake ist eine verstärkte HER2-Expression als Reaktion auf den durch ^{131}I -Trast bzw. durch Paclitaxel verursachten Stress (Meller et al. 2006, Rades et al. 2009).

Die Forschergruppe um Sampath et al. erweiterte die Idee der nicht-invasiven HER2-Diagnostik, indem sie Trastuzumab sowohl mit einem Farbstoff als auch radioaktiv markierten. Für diese Untersuchungen wurde der monoklonale Antikörper mit ^{111}In -DTPA und infrarotnahen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Nach 48 Stunden wurden die Tumoren mittels SPECT und Fluoreszenzbildgebung visualisiert. In den HER2-überexprimierenden Zellen wurde ein deutlich erhöhter Uptake gegenüber den HER2-negativen Zellen gemessen (Sampath et al. 2007). Diese Ergebnisse entsprechen damit grundsätzlich denen der vorliegenden Arbeit. In Bezug auf die Fluoreszenzmarkierung ist aber zu hinterfragen, ob und in welchem Rahmen das Ausgangsmolekül hierdurch verändert wird. Dies könnte möglicherweise zu einer erniedrigten Sensitivität dieses Verfahrens führen.

Aufgrund der emittierten β^- -Strahlungskomponente sowie der ungünstigen szintigraphischen Auflösung würde man diagnostisch statt ^{131}I eher ^{123}I oder aber ^{124}I , welches im Rahmen der PET-Metastasensuche bei Schilddrüsenkarzinomen etabliert wurde, einsetzen (Freudenberg et al. 2008, Rades et al. 2009).

Ein entscheidender Vorteil dieser Art der Diagnostik wäre die Möglichkeit, zusätzlich zur Aussage über Oberflächencharakteristika des Tumors auch mögliche Absiedlungsherde darstellen zu können. Dadurch könnten ohne zusätzliche zeitintensive und belastende Untersuchungen ansonsten unentdeckte Metastasen einer Therapie zugeführt werden.

Wie unter 1.4 beschrieben ergeben sich aber physikalische und physiologische Probleme bei der Antikörperdistribution solider Tumoren, welche dies Art der Diagnostik erschweren. Die Antikörperaufnahme kann aus diesen Gründen zu langsam erfolgen als dass sie diagnostisch verwertbar wäre. Ein Ansatz zur Umgehung dieses Problems ist das Pretargeting-Verfahren. Hierbei wird dem Patienten vor der eigentlichen Diagnostik bzw. Therapie ein bispezifischer „kalter“ Antikörper verabreicht. Nach Clearing aus dem Normalgewebe erhält der Patient dann radioaktiv-markierte Haptene, welche am Rezeptorteil des bispezifischen Antikörpers binden und sich nun spezifisch am Tumor anreichern (Sharkey et al. 2008). Dieses Therapie-Prinzip kann die Nebenwirkungen auf gesundes Gewebe weiter senken und wäre für die Fortführung der durchgeführten Versuche sinnvoll.

4.2 Radioimmuntherapie

Das komplexe Thema der Therapieresistenz erfordert neue Strategien, um die Resistenzentwicklung zu verhindern oder um dieser zumindest entgegenzuwirken. Aufgrund der Tatsache, das Trastuzumab selbst nicht zytotoxisch wirkt (Izumi et al. 2002, Liang et al. 2003), sind in Hinsicht auf mögliche Resistenzbildung ergänzende Therapieoptionen sinnvoll. Nach den Erfolgen der Radioimmunkonjugate in der Lymphomtherapie (Kaminski et al. 1992, Press et al. 2001) wurden vergleichbare Resultate in der Therapie solider Tumoren erhofft. Doch aufgrund der in Kapitel 1.3 beschriebenen wesentlichen Gegensätze zu Lymphomen, wurden bisher Erfolge geringeren Ausmaßes erzielt. Dennoch ist dieser Therapieansatz ein vielversprechender Gegenstand aktueller Forschung. Ein Vorteil der Radioimmuntherapie solider Tumoren gegenüber herkömmlicher Chemotherapie ist der Kreuzfeuerteffekt. Durch Bindung der radioaktiv markierten Antikörper auf der Tumoroberfläche überlagert sich die Strahlenwirkung und dies führt so zum Zelltod oder zumindest Zellzyklusarrest auch nicht antikörperbindender Zellen (Bischof Delaloye 2003).

Abhängig vom jeweiligen Radionuklid werden unterschiedliche Gewebereichweiten erreicht. Beim β^- -Zerfall entsteht durch ungleichmäßige Verteilung der Energie auf Elektron und Antineutrino ein Spektrum polyenergetischer Strahlung. Dabei entspricht die mittlere Energie der β^- -Teilchen etwa einem Drittel ihrer Maximalenergie von 611 keV und damit besteht eine mittlere Gewebe-Reichweite von 0,3 mm für ^{131}I . Diese Art der Strahlenapplikation kann auch gesundes Gewebe schädigen. Abhängig von der Tumorlokalisierung wären mögliche Nebenwirkungen zu berücksichtigen, aber bei geringer Gewebereichweite und spezifischer Antikörperbindung als eher gering einzuschätzen.

Die Forschungsgruppe um Rasaneh untersuchte die Wirkung von ^{177}Lu -Trastuzumab auf die Mammakarzinomzelllinie MCF-7. In Analogie zur vorliegenden Arbeit wurde vor den Versuchen die radiochemische Reinheit sowie die Stabilität des markierten Antikörpers in Puffer und menschlichem Serum nachgewiesen. Daraufhin wurden die Immunreaktivität und die Toxizität des ^{177}Lu -Trast-Komplexes untersucht. Aus den Ergebnissen schlussfolgern die Autoren, dass weitere Untersuchungen vielversprechend wären (Rasaneh et al. 2009).

Chen et al. untersuchten das therapeutische Potenzial von $^{188}\text{Re(I)}$ -Trastuzumab in HER2-positiven Tumoren athymischer Mäuse. Nach 24 Stunden konnte der Tumor bei stabiler Markierung und spezifischer Antikörperbindung in der Mikro-SPECT/CT deutlich dargestellt werden (Chen et al. 2009). Die in vitro ermittelten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der HER2-überexprimierenden Zellen sind konkordant zu denen Chens. Es müssten jedoch weitere Versuche am Mausmodell folgen, um die Theorie zu belegen, dass markierte HER2-Antikörper auch in vivo als Therapeutikum geeignet ist. Nach den Ergebnissen von Chen und Rasaneh würden Patienten mit nicht oder nur mäßig HER2-exprimierenden Tumoren nicht von einer Trastuzumab-Therapie profitieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine spezifische Bindung des Antikörpers, auch an Tumorzellen mit mäßiger HER2-Expression. Daher kann es sinnvoll sein, weiter zu untersuchen, ob diese spezifische Bindung nicht auch in diesen Zellen therapeutisch ausgenutzt werden könnte.

Ein weiteres HER2-vermitteltes Radioimmunokonjugat ist ^{188}Re -SOCTA-Trastuzumab. Luo et al. untersuchten einerseits die Bindungskapazität von SOCTA-Trastuzumab im Vergleich zu unkonjugiertem Trast an HER2 in BT-474-Zellen. Der Vergleich der Immunoreaktivität konnte eine äquivalente Bindungskapazität nachweisen. Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ^{188}Re -SOCTA-Trastuzumab im Tumor wesentlich stärker angereichert wurde als im Normalgewebe. Daher wird auch dieses Radioimmunokonjugat als mögliche therapeutische Option weiter untersucht (Luo et al. 2009/ Abstract).

Die untersuchten JIMT-Zellkulturen der vorliegenden Arbeit zeigten einen signifikant spezifischen Uptake des ^{131}I -Trastuzumab. Übereinstimmend zu den Ergebnissen von Chen, Luo, McLarty sowie Rasaneh konnte die Proliferation der HER2-überexprimierenden JIMT-Zellen durch das ^{131}I -Trastuzumab signifikant gehemmt werden (Chen et al. 2009, Luo et al. 2009/ Abstract, McLarty et al. 2009, Rasaneh et al. 2009).

Berücksichtigt man diese Ergebnisse, stellt sich die Frage, wie eine potentielle therapeutische Strategie aussehen könnte. Hier kann man lediglich auf die Ergebnisse einer Studie zur Radioimmuntherapie anderer solider Tumoren verweisen. Liersch et al. veröffentlichten 2005 die Ergebnisse einer Phase-II-Studie zur adjuvanten RIT mit ^{131}I -Labetuzumab bei Lebermetastasen nach kolorektalem Karzinom. Dazu wurden 23 Patienten nach R0-Resektion der

Lebermetastasen mit einem mit ^{131}I -markierten, humanisierten monoklonalen CEA-Antikörper therapiert. Die Patienten profitierten von dieser Therapie unabhängig von der ursprünglichen Größe und der Anzahl der Lebermetastasen (bei 17 Patienten $<5\text{ cm}$) und der Beteiligung beider Leberlappen (bei 8 Patienten). Für 13 Patienten ergab sich ein TNM-Stadium von >3 , was eine schlechte Prognose sowie erhöhtes Risiko für erneute Lebermetastasen bedeutete. Alle 23 Patienten erhielten eine einmalige ^{131}I -Labetuzumab-Infusion von $1,48\text{-}2,22\text{ GBq/m}^2$, zwei Patienten erhielten nach 5 bzw. 31 Monaten aufgrund von Rezidiven eine weitere Infusion. Insgesamt konnten die mediane Überlebenszeit sowie die 5-Jahres-Überlebensrate durch die adjuvante RIT verbessert werden. (Liersch et al. 2005).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit sind vergleichbare klinische Ergebnisse denkbar und bedürfen weiterer Untersuchungen. Es wurde in dieser Arbeit ein zuverlässiger ^{131}I -Trast-Uptake durch JIMT-Kulturen nachgewiesen. Aufgrund der relativ geringen Strahlungsreichweite von ^{131}I ($2\text{-}3\text{mm}$) sind besonders kleinere Tumervolumina geeignete Ziele. So könnte ^{131}I -Trast auch bei Mammakarzinomen nach R0-Resektion des Primärtumors oder zumindest geringer verbliebener Tumorlast Mikrometastasen eliminieren und so die Überlebenszeit positiv beeinflussen.

Wie unter 4.1 beschrieben ist auch im Rahmen der Radioimmuntherapie das Pretargeting-Verfahren eine sinnvolle Möglichkeit, das Radioimmunokonjugat gezielt und schnell im Tumor anzureichern und so strahlungsbedingte Nebenwirkungen auf das Normalgewebe gering zu halten (Sharkey et al. 2009).

4.3 Resistenz

Beim diagnostischen Einsatz von HER2-Antikörpern ergibt sich eine weitere Frage, welche jedoch auch für andere Nachweismethoden gilt. Garantiert der auf diese Weise positiv nachgewiesene HER2-Status das Ansprechen des Tumors auf den nicht radioaktiv markierten Antikörper? Dies muß wegen möglicher Resistenz wenigstens für unseren Ansatz klar verneint werden.

Die JIMT-Zelllinie wurde von Tanner et al. als resistent gegen Trastuzumab beschrieben. Die Proliferation in JIMT-Zellkulturen konnte in den durchgeführten Versuchen durch ^{131}I -Trast nach 24 und 48 Stunden nur um ca. 10% gegenüber

der normalen Proliferation verringert werden, nach 72 Stunden betrug die Differenz ca. 30%. Die mit dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse zeigen aber, dass trotz Resistenz eine Proliferationsinhibition durch ^{131}I -Trast erfolgt, wenn auch in geringem Umfang. An dieser Stelle ergibt sich die Frage, ob man die erzielte Proliferationshemmung allein auf die Strahlenwirkung des ^{131}I zurückführen kann. Für die untersuchten Zellen ergab sich eine kumulative Bestrahlungsdosis von etwa 0,25 Gy nach 24 Stunden, 0,48 Gy nach 48 und 0,69 Gy nach 72 Stunden (s. Abb. 14). Demgegenüber stehen in der Strahlentherapie des Mammakarzinoms Gesamt-Bestrahlungsdosen die hundertfach höher sind. Im Rahmen der Radioiodtherapie der Schilddrüse werden nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin sogar bis 400 Gy appliziert.

Aufgrund der in den durchgeführten Versuchen verhältnismäßig gering gewählten Bestrahlungsdosis liegt der Schluß näher, dass die Trastuzumab-Resistenz der JIMT-Zellen nicht absolut ist. Die Ergebnisse bezüglich der Proliferation zeigten bei Koinkubation von kaltem und heißem Antikörper eine deutlich verbesserte Wirkung gegenüber ^{131}I -Trast-Monobehandlung. Dieser Effekt lässt sich auf die höhere Trastuzumab-Dosis zurückführen.

Mit dem Wiederauftreten bzw. Fortschreiten der Erkrankung, was in ca. 30% der Fälle zu erwarten ist (Frieboes et al. 2009), häufen sich Therapieresistenzen, die sich in Rezidiven oder Tumorprogression unter Behandlung zeigen. Ein Erklärungsansatz für die Trastuzumab-Resistenz ist, dass der Antikörper das Zielantigen nicht erkennt. Dem membranassoziierten Glykoprotein Mucin4 (MUC4) wird eine Rolle bei der Entstehung epithelialer Tumoren zugesprochen. Dieses Protein kommt in membranständiger sowie gelöster Form auf vielen Epithelien vor und dient hier physiologisch als Schutzprotein. MUC4 soll die Erkennung von Krebszellen durch das Immunsystem herabsetzen, Tumorstadium fördern und Apoptosevorgänge herunterregulieren. MUC4 besteht aus zwei Untereinheiten, ASGP-1 und ASGP-2 (Ascites-Sialo-Glykoprotein 1+2), und fungiert über die Bindung der ASGP-2-Untereinheit als Ligand am HER2-Rezeptor. Diese Interaktion erfolgt über eine EGF-ähnliche Domäne am ASGP-2 und führt über erhöhte Phosphorylierung zu gesteigerter Signaltransduktion durch den HER2-Rezeptor und damit erhöhter Zellteilung. Eine gesteigerte HER2-Expression durch MUC4 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Price-Shiavi et al. 2002).

In weiteren Untersuchungen wurde an JIMT-1-Kulturen nachgewiesen, dass die

MUC4-Expression invers zur Bindungskapazität von Trastuzumab korreliert ist. Entsprechend wird mit sinkender MUC4-Expression die Sensitivität gegenüber Trastuzumab verbessert. Dies lässt vermuten, dass MUC4 die Bindungsstelle für Trastuzumab am HER2-Rezeptor verdeckt. Hierdurch wird die Rezeptor-Antikörperbindung sterisch unmöglich und die therapeutische Wirkung kann nicht mehr erzielt werden. Ursächlich für das veränderte Bindungsvermögen werden Mutationen in dem für die extrazelluläre Domäne des HER2-Rezeptors kodierenden Genabschnitt angenommen (Nagy et al. 2005). Die Hypothese der verhinderten Antikörperbindung steht in Widerspruch zur durchgeführten Arbeit, da ein vergleichsweise sehr hoher Uptake und damit die Bindung des Antikörpers nachgewiesen werden konnte. Möglich wäre dennoch eine veränderte Bindung mit daraus resultierender veränderter Signalantwort oder aber Einschränkung oder Inhibition der Cross-Talks. Price-Schiavi et al. konnten bei steigender MUC4-Expression eine verminderte Trastuzumab-Wirkung auch bei höherer Dosierung und effektiver Bindung nachweisen. Dies legt die Vermutung nahe, dass MUC4 nicht die Antikörperbindung selbst, sondern vielmehr die Antikörper-Rezeptor-Interaktion beeinflusst. Wobei erwähnt werden muß, dass die von Price-Schiavi gewählte Zelllinie, MCF7, HER2 nicht überexprimiert und die gewonnenen Ergebnisse bezüglich Trastuzumab nur eingeschränkt verwertbar sind.

Die Wirkung von Trastuzumab besteht u.a. darin, die HER2-Signalkaskade über PI3K und Akt zu blockieren. Zum einen geschieht dies über Verminderung des Akt-Spiegels sowie Hemmung der Akt-Kinase, zum anderen über eine Erhöhung des PI3K/Akt-Inhibitors PTEN. (Yakes et al. 2002, Chan et al. 2005) Umgekehrt führt ein erhöhtes Vorliegen von PI3K zu einer abgeschwächten Trastuzumab-Wirkung. In HER2-überexprimierenden Zellen konnte eben dies nachgewiesen werden (Chan et al. 2005).

Eine andere Forschergruppe konnte zeigen, dass das Herunterregulieren von PTEN zu Verstärkung der PI3K/Akt Signalkaskade und damit zu einem Wirkungsverlust von Trastuzumab führte. Dies konnte auch in vivo nachgewiesen werden. Untersucht wurden dazu HER2-überexprimierende Tumoren mit und ohne PTEN-Expression. Die Ansprechrate PTEN-exprimierender Tumoren auf Trastuzumab war deutlich besser. Der Einsatz von PI3K-Hemmern bei PTEN-defizienten Zellen konnte sowohl in vitro als auch in vivo die Trastuzumab-Wirkung verbessern (Nagata et al. 2004, Fujita et al. 2006).

Nach der Charakterisierung der JIMT-Zelllinie als resistent gegenüber Trastuzumab durch Tanner et al. (2004), ist nach Nagata et al. als Ursache dafür zu vermuten, dass JIMT-Zellen PTEN-defizient sind. In weiteren Versuchen müsste geprüft werden, ob auch bei dieser Zelllinie der Einsatz von PI3K-Inhibitoren zu einer verbesserten antitumoralen Wirkung von ^{131}I -Trast führt.

Eine weitere Ursache der Trastuzumab Resistenz wird mit dem Shedding-Phänomen begründet: Die Extrazellulärdomäne des HER2 kann abgespalten werden. Der eingesetzte Antikörper wird vom zirkulierenden Teil des Antigens gebunden, der membranständige Teil signalisiert ungebremst weiter (Zabrecky et al. 1991). Die in dieser Arbeit nachgewiesene Bindung zwischen HER2 und Trastuzumab beinhaltete lediglich den membranständigen Teil, der gelöste Rezeptorpart wurde durch die Reinigungsschritte vorher entfernt. Der von uns gemessene Uptake sowie die beobachtete Proliferationsinhibition in JIMT-Kulturen durch ^{131}I -Trast lassen die Theorie von Zabrecky et al. in Frage stellen.

Der Einsatz des monoklonalen Antikörpers bei Tumoren mit geringer HER2-Expression bzw. HER2-negativen Tumoren scheint der Biologie nach weniger erfolgversprechend. In den MX-1-Zellen konnte die Proliferation durch ^{131}I -Trast nach 24 und 48 Stunden nicht nachweislich beeinflusst werden, während nach 72 Stunden maximal 25% Reduktion beobachtet wurde. Daraus ist zu schließen, dass Patientinnen mit Tumoren ohne HER2-Überexpression auch von einer Trastuzumab-enthaltenden Therapie profitieren könnten – jedoch in geringerem Maße. Dies entspricht den Ergebnissen von Arteaga (Arteaga et al. 2006). Hinsichtlich der beträchtlichen Nebenwirkungen des Radioimmunkonjugates, z.B. Kardiotoxizität, muß man die Indikation jedoch streng prüfen und die Risiken gegen den Nutzen abwägen.

Bei Trastuzumab-sensitiven sowie -resistenten Tumoren bietet sich die Kombination des β/γ -Strahlers ^{131}I und Trastuzumab therapeutisch an. Da mit dieser Arbeit die spezifische Antikörperbindung trotz Resistenz nachgewiesen werden konnte, kann man durch die Koppelung an ^{131}I die Strahlenwirkung auf den Tumor nutzen. Mittels vieler markierter Antikörpermoleküle wird die Strahlung direkt in den Tumor appliziert. Durch den Kreuzfeuereffekt könnte man so auch nicht direkt vom Antikörper gebundene Zellen erreichen (s. Kapitel 4.2).

4.4 Kombinationstherapie

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine In-vitro-Kombinationstherapie, bestehend aus dem Taxan Paclitaxel und dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab, einen additiv hemmenden Effekt auf die Proliferation der HER2-überexprimierenden Zelllinie JIMT hat. Diese Wirkung konnte durch erhöhte Paclitaxel-Dosierung verstärkt werden. Die hierzu aus der Literatur bekannten Ergebnisse sind widersprüchlich.

Zu den erhaltenen Ergebnissen konkordante Beobachtungen machten Baselga et al. 1998. Diese Forschungsgruppe wies in vitro und im In-vivo-Mausmodell eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung für eine Trastuzumab- sowie für eine Paclitaxel-Monotherapie nach. An den HER2-überexprimierenden Zellen humaner Adenokarzinome der Brust BT-474, SK-BR-3 und der Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-3 wurde außerdem ein additiver Effekt bei Kombination von Trastuzumab und Paclitaxel beschrieben. Die Wachstumshemmung konnte durch Kombination um 41-82%, abhängig von der Dosierung, gegenüber der Paclitaxel-Monotherapie verbessert werden (Baselga et al 1998). Eine Verbesserung der Proliferationsinhibition durch eine Kombinationstherapie bestehend aus ^{131}I -Trast und Paclitaxel gegenüber einer ^{131}I -Trastuzumab-Monobehandlung sowie eine positive Beeinflussung des Uptake durch Paclitaxel, konnte mit den durchgeführten Versuchen nachgewiesen werden. Es ist naheliegend, dass dies auch für nicht radioaktiv markiertes Trastuzumab zutrifft.

Demgegenüber stehen Untersuchungen von Yu und Ciardello. Beide Autoren beschrieben eine Zunahme der Paclitaxel-Resistenz in HER2-überexprimierenden Zelllinien. Yu et al. führten diese Beobachtung auf eine Behinderung der durch Paclitaxel induzierten Apoptose durch HER2-Überexpression zurück (Yu et al. 1998, Ciardiello et al 2000). Mit den zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen konnte eine Paclitaxel-Resistenz weder in den HER2-überexprimierenden noch in den mäßig exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Um diesbezüglich genauere Aussagen treffen zu können, müssten weitere Versuche folgen.

In weiteren klinischen Studien wurde der positiv verstärkende Effekt einer Kombinationstherapie bestehend aus Paclitaxel und Trastuzumab nachgewiesen.

So beschrieben Diéras et al. 2001 eine durch die Kombinationstherapie um 24% verbesserte Ansprechrate gegenüber Paclitaxel alleine. Zudem konnte die Zeit bis zum Wiederauftreten der Erkrankung von durchschnittlich 2,7 auf 6,9 Monate verlängert werden. Dieses Ergebnis war unter intensivierter Paclitaxeltherapie noch deutlicher (Diéras et al 2001). Patientinnen mit HER2-Überexpression zeigten ein besseres Ansprechen. Der positiv verstärkende Effekt von Docetaxel, ebenfalls ein Mitose-hemmendes Taxan, und Herceptin scheint umso höher, je stärker HER2 überexprimiert wird (Cobleigh et al. 1999, Merlin et al. 2002). Während bei der Kombination von Paclitaxel und Herceptin der Grad der Überexpression keine Rolle zu spielen scheint (Cobleigh et al. 1999).

2007 wurde von Hayes et al. die krankheitsfreie sowie generelle Überlebenszeit in Bezug zum HER2-Status und zur Therapie untersucht. Es wurden Patientengruppen, welche nach Vorbehandlung mit vier Zyklen Cyclophosphamid und Doxorubicin zusätzlich vier Zyklen Paclitaxel erhielten bzw. welche, die keines erhielten, verglichen. Das Patientenkollektiv war aufgeteilt in zwei Gruppen, zum einen HER2-negativ, zum anderen HER2-positiv. Für die HER2-negative Gruppe ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen HER2-Rezeptor-Status und Paclitaxel bezüglich des Wiederauftretens der Erkrankung. (HR 0,63; $p=0,15$). Deutlich war dagegen dieser Zusammenhang in der HER2-exprimierenden Gruppe (HR 0,52; $p=0,03$) (Hayes et al. 2007). Die von Hayes et al. beschriebenen Ergebnisse sind konkordant zu denen dieser Arbeit. Durch Paclitaxel wird in HER2-überexprimierenden Zellen eine proliferationshemmende Wirkung erzielt. Im Gegensatz zu Hayes Ergebnissen konnte dieser Effekt, wenn auch in geringerem Umfang, jedoch auch in der Kontrollzelllinie mit geringer HER2-Expression nachgewiesen werden. Entsprechende Beobachtungen machten Crow et al. bei der Untersuchung der Kombinationstherapie aus ^{90}Y -markierten CEA- und HER2-Antikörpern und Paclitaxel. Geringe Paclitaxel-Dosierungen verstärkten die antitumoralen Effekte (Crow et al. 2007).

Eine mögliche Ursache der ^{131}I -Trast-Uptake-Erhöhung ist in verstärkter HER2-Expression unter Therapie zu sehen. Meller et al. wiesen einen erhöhten Radioiod-Uptake nach externer Bestrahlung von Schilddrüsenzellen nach. Dieser Effekt wurde mit der Aktivierung zellulärer Transportmechanismen durch die hochenergetische Bestrahlung begründet (Meller et al. 2006). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Rades et al. nach externer Bestrahlung von mit ^{131}I -Erbitux

behandelten Kolonkarzinom-Zellen (Rades et al. 2009). Auch hier konnte eine Uptake-Erhöhung nach externer Bestrahlung festgestellt werden. Ercan et al. untersuchten den Effekt von γ -Bestrahlung von Osteosarkomen nach ^{99}Tc -Gluthation-Applikation an Mäusen. Nach 20 Minuten Bestrahlung mit 20 Gy wurde ein erhöhter Tumor-Uptake festgestellt und auf einen erhöhten Bedarf der Tumorzellen an Glutathion zurückgeführt (Ercan et al. 2000). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Zellen auf Stress, ob durch Bestrahlung oder Chemotherapeutika verursacht, mit verstärkter Expression diverser Faktoren und Transporter reagieren. Romond et al. stellten anhand zweier großer US-amerikanischer Studien – unter 1.3 beschrieben – die These auf, dass eine gleichzeitige Gabe von Trastuzumab und Taxanen sinnvoller sei als eine sequenzielle (Romond et al. 2005). Dies würde mit der oben beschriebenen Theorie der zellulären Reaktionen unter Stress, wie z.B. Chemotherapie, und dem damit verbundenen verbesserten Therapieansprechen erklärbar sein. Eine mögliche Erklärung für den stabilen ^{131}I -Trast-Uptake in den durchgeführten Versuchen ist eine verstärkte HER2-Expression als Reaktion auf den durch Paclitaxel verursachten Stress (Meller et al. 2006, Rades et al. 2009). Die verstärkte HER2-Expression kann, wie mit den durchgeführten Versuchen gezeigt, zu einer besseren Erreichbarkeit des Tumors durch die Immuntherapie und damit zu einer verbesserten antitumoralen Wirkung führen. Daher kann auch eine Kombination von Taxanen und einer HER2-vermittelten Radioimmuntherapie konkordant zur aktuellen Literatur sinnvoll sein, jedoch auch für die klassische Immuntherapie.

4.5 Chemo-/Immuntherapie und Bestrahlung

Die Strahlentherapie gehört bei der Therapie des Mammakarzinoms zur Standardtherapie. Kombinierte Radiochemotherapien konnten bereits durch verbesserte Überlebensraten belegt werden (Chakravarthy et al. 2000, Skinner et al. 2001).

Liang et al. untersuchten an HER2-transfizierten Zellen den Einfluß von Trastuzumab und Bestrahlung. Die HER2-exprimierende Zelllinie MCF-7 zeigte sowohl unter Bestrahlung als auch in Kulturen, welche nicht bestrahlt wurden, eine Verringerung der HER2-Expression durch Trastuzumab. In den Kontrollzelllinien

ohne HER2-Expression konnte dies nicht nachgewiesen werden. Durch Apoptose-Kits wurde die Apoptoserate der bestrahlten Versuchszellen mit und ohne Trastuzumab quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Trastuzumab-Monotherapie keine Apoptose der Krebszellen induzieren kann, wohl aber selbige durch Bestrahlung ausgelöst verstärken kann (Liang et al. 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ^{131}I -Trast einen antiproliferativen Effekt in JIMT-Kulturen erzielen kann. Die Verringerung des Uptake über 72 Stunden kann man nach den Ergebnissen von Liang et al. als durch bestahlungsbedingte Apoptoseinduktion verursacht deuten. Diese These wird durch Untersuchungen von Lin et al. gestützt. Diese Arbeitsgruppe konnte in HER2-exprimierenden Zelllinien in vitro einen verbesserten Anti-Tumoreffekt von ^{131}I -Trastuzumab gegenüber ^{131}I bzw. Herceptin alleine nachweisen. Dagegen sprachen HER2-negative oder nur mäßig exprimierende Zellen nicht besser auf den markierten Antikörper an (Lin et al. 2007/Abstract). Konkordant zur Literatur zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen antitumoralen Effekt von ^{131}I -Trast, welcher abhängig vom Grad der HER2-Expression zu sein scheint.

In der Literatur ist ein radiosensibilisierender Effekt von Paclitaxel beschrieben (Liu et al. 2002/Abstract, Jin et al. 2007). Dieser ist evtl. darauf zurückzuführen, dass Paclitaxel einen Arrest der Zellteilung in der G2- und Mitosephase bewirkt und die Zellen dadurch besonders strahlensensitiv werden. Zusätzlich hemmt Paclitaxel die DNA-Reparaturmechanismen und induziert Apoptose (Niero et al. 1999). Ein weiterer Grund wird in der besseren Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes nach Paclitaxelapplikation angenommen (Milas et al. 1995).

In dieser Arbeit wurde Paclitaxel mit ^{131}I -markiertem HER2-Antikörper eingesetzt, mit dem Ergebnis, dass der Mitosehemmer die Antikörperbindung in HER2-überexprimierenden Zellen sowie auch die Proliferationshemmung signifikant verstärkte. Daher kann die Wechselwirkung zwischen Trastuzumab und Paclitaxel nach unseren Ergebnissen als additiv beschrieben werden. Dies entspricht den Ergebnissen von Pegram et al. (Pegram et al. 1999) und sollte daher weiter untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Dank neuer Therapiemöglichkeiten wird bei Neoplasien der Brustdrüse eine sinkende Mortalität erreicht, jedoch ist die Inzidenz dieser Erkrankung weiter steigend. In 25-30% aller Mammakarzinome wird der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor HER2 überexprimiert. Neben einer schlechteren Prognose bietet dieses Differenzierungsmerkmal aber auch einen Angriffspunkt für gezielte Diagnostik und Therapie. Mit der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich mittels des mit ^{131}I konjugierten HER2-Antikörpers Trastuzumab der HER2-Status erheben lässt. Hierzu wurde Trastuzumab stabil mit ^{131}I radioiodiert und der Antikörper-Uptake an HER2-überexprimierenden Zellen sowie einer HER2 mäßig exprimierenden Kontrollzelllinie untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass sich der markierte HER2-Antikörper zur nicht-invasiven, semiquantitativen Diagnostik des HER2-Status potentiell eignet und daher eine mögliche diagnostische Alternative bietet, die es weiter zu untersuchen lohnt.

Um unerwünschte Wirkungen herkömmlicher Chemotherapeutika auf gesundes Gewebe zu reduzieren, sind zielgerichtete Therapien von Interesse und Bedeutung. Jedoch sind Resistenzen als Folge unzureichender Therapie häufig. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass HER2-überexprimierende Zellen trotz beschriebener Resistenz den radioaktiv markierten Antikörper spezifisch binden und die Proliferation gehemmt werden kann. Diese Effekte konnten durch eine Kombinationsbehandlung mit Paclitaxel verstärkt werden. Der Mitosehemmer bewirkte bereits bei 5% der empfohlenen Tages-Patientendosis einen signifikant höheren Uptake des ^{131}I -Trast sowie eine signifikante Proliferationshemmung. Der Antikörper-Uptake in den Kontroll-Kulturen konnte durch Paclitaxel nicht signifikant erhöht werden. In diesen Zellen konnte durch das Radioimmunokonjugat keine signifikante Proliferationshemmung nachgewiesen werden; dies war nur unter Koinkubation mit Paclitaxel zu beobachten.

Nach der vorliegenden Arbeit zu urteilen, könnte eine HER2-vermittelte Radioimmuntherapie bei HER2-überexprimierenden Tumoren, besonders in Kombination mit einem Taxan, vielversprechend sein und sollte weiter untersucht werden. Auch für die klassische Immuntherapie mit HER2-Antikörpern ist von einer höheren Wirksamkeit im Rahmen einer Kombinationstherapie auszugehen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Arteaga CL. Can trastuzumab be effective against tumors with low her2/neu (erbb2) receptors? *Journal of Clinical Oncology*, 24, 3722-3725, 2006
- Ali SM, Carney WP, Esteva FJ, Fornier M, Harris L, Köstler WJ, Lotz JP, Luftner D, Pichon MF, Lipton A; Serum HER-2/neu Study Group. Serum her-2/neu and relative resistance to trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. *Cancer*, 113, 1294-1301, 2008
- Baselga J, Albanell J. Mechanism of action of anti-her2 monoclonal antibodies. *Annals of Oncology*, 12, 35-41, 2001
- Bischof Delaloye A. The role of nuclear medicine in the treatment of non-hodgkin's lymphoma (nhl). *Leuk Lymphoma.*, 44, 29-36, 2003
- Boswell CA and Brechbiel MW. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nucl Med Biol*, 34, 757-778, 2007
- Buchegger F, Haskell CM, Schreyer M, Scazziga BR, Randi S, Carrel S, Mach JP. Radiolabeled fragments of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen for localization of human colon carcinoma grafted into nude mice. *J. EXP. MED.*, 158, 413-427, 1983
- Bühler H, Crohns C, Fuchs I, Konecny G, Lebeau A, Löhrs U, Vogel CL, Untch M. *Antikörpertherapie des Mammakrazinoms*. Uni-MED Science, 2002.
- Bullock K and Blackwell K. Clinical efficacy of taxane–trastuzumab combination regimens for her-2–positive metastatic breast cancer. *The Oncologist*, 13, 515-525, 2008
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185her2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89, 4285-4289, 1992
- Chan CT, Metz MZ, Kane SE. Differential sensitivities of trastuzumab (herceptin)-resistant human breast cancer cells to phosphoinositide-3 kinase (pi-3k) and epidermal growth factor receptor (egfr) kinase inhibitors. *Breast Cancer Research and Treatment*, 91, 187-201, 2005
- Chen KT, Lee TW, Lo JM. In vivo examination of (188)re(i)-tricarboxyl-labeled trastuzumab to target her2-overexpressing breast cancer. *Nucl Med Biol.*, 36, 355-361, 2009
- Ciardiello F, Caputo R, Pomatico G, De Laurentiis M, De Placido S, Bianco AR, Tortora G. Resistance to taxanes is induced by c-erbb-2 overexpression in human mcf-10a mammary epithelial cells and is blocked by combined treatment with an antisense oligonucleotide targeting type i protein kinase a. *Int J Cancer.*, 85, 710-715, 2000

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-her2 monoclonal antibody in women who have her2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *Journal of Clinical Oncology*, 17, 2639-2648, 1999

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, Levinson A, Ullrich A. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to egf receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230, 1132-1139, 1985

Crow DM, Williams L, Colcher D, Wong JY, Raubitschek A, Shively JE. Combined radioimmunotherapy and chemotherapy of breast tumors with y-90-labeled anti-her2 and anti-cea antibodies with taxol. *Bioconjug Chem.*, 16, 1117–1125, 2005

DeNardo SJ, Denardo GL. Targeted radionuclide therapy for solid tumors: an overview. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 66, 89–95, 2006

Desai NP, Trieu V, Hwang LY, Wu R, Soon-Shiong P, Gradishar WJ. Improved effectiveness of nanoparticle albumin-bound (nab) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel in multiple xenografts as a function of her2 and sparc status. *Anticancer Drugs*, 19, 899-909, 2008

Di Lorenzo E, De Luca G, Sauro R, Varricchio A, Capasso M, Lanzillo T, Manganelli F, Mariello C, Siano F, Pagliuca MR, Stanco G, Rosato G. The paseo (paclitaxel or sirolimus-eluting stent versus bare metal stent in primary angioplasty) randomized trial. *JACC Cardiovasc Interv*, 2, 515-523, 2009

Diéras V, Beuzeboc P, Laurence V, Pierga JY, Pouillart P. Interaction between herceptin and taxanes. *Oncology*, 61, 43-49, 2001

EMA. Questions and answers on herceptin. 2006

Ercan MT, Senekowitsch-Schmidtke R, Bernatz S. Biodistribution of 99mTc-glutathione in mice with osteosarcoma: effect of gamma irradiation on tumour uptake. *Res Exp Med (Berl)*, 199, 359-367, 2000

Esteva FJ, Cheli CD, Fritsche H, Fournier M, Slamon D, Thiel RP, Luftner D, Ghani F. Clinical utility of serum her2/neu in monitoring and prediction of progression-free survival in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. *Breast Cancer Res.*, 7, 436-443, 2005

Esteva FJ, Nahta R. Her2 therapy: Molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res.*, 8, 215, 2006

Fehm T, Becker S, Duerr-Stoerzer S, Sotlar K, Mueller V, Wallwiener D, Lane N, Solomayer E, Uhr J. Determination of her2 status using both serum her2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was her2 negative or of unknown her2 status. *Breast Cancer Res.*, 9, R74, 2007

- Fraker PJ and Speck JC Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun.*, 80, 849-857, 1978
- Freudenberg LS, Antoch G, Frilling A, Jentzen W, Rosenbaum SJ, Kühl H, Bockisch A, Görges R. Combined metabolic and morphologic imaging in thyroid carcinoma patients with elevated serum thyroglobulin and negative cervical ultrasonography: role of 124i-pet/ct and fdg-pet. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 35, 950-957, 2008
- Frieboes HB, Edgerton ME, Fruehauf JP, Rose FR, Worrall LK, Gatenby RA, Ferrari M, Cristini V. Prediction of drug response in breast cancer using integrative experimental/computational modeling. *Cancer research*, 69, 4484-4492, 2009
- Friedländer E, Arndt-Jovin DJ, Nagy P, Jovin TM, Szöllosi J, Vereb G. Signal transduction of erbb receptors in trastuzumab (herceptin) sensitive and resistant cell lines: local stimulation using magnetic microspheres as assessed by quantitative digital microscopy. *Cytometry A*, 67, 161-171, 2005
- Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, Tsukuda K, Ogasawara Y, Shimizu N. Pten activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of erbb2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer.*, 94, 247–252, 2006
- Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 608, 1–22, 2007
- Gravalos,C and Jimeno, A. Her2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Annals of Oncology*, 19, 1523-1529, 2008
- Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, Weaver D, Edgerton S, Cowan D, Broadwater G, Goldstein LJ, Martino S, Ingle JN, Henderson IC, Norton L, Winer EP, Hudis CA, Ellis MJ, Berry DA; Cancer and Leukemia Group B (CALGB) Investigators. Her2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 357, 1496-1506, 2007
- Hynes NE and Stern DF. The biology of erbb-2/neu/her-2 and its role in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1198, 165-184, 1994
- Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature*, 416, 279-280, 2002
- Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res.*, 50, 814-819, 1990
- Jin C, Bai L, Guo G. Radiosensitization by the combination of sr-2508 and paclitaxel in hypoxic human tumor cells in vitro. *Journal of Radiation research*, 48, 179-185, 2007

- Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkane M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkiö S., Flander M, Helle L, Ingalsuo S, Johansson K, Jääskeläinen AS, Pajunen M, Rauhala M, Kaleva-Kerola J, Salminen T, Leinonen M, Elomaa I, Isola J, for the FinHer Study Investigators*. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *The new england journal of medicine*, 354, 809-820, 2006
- Kaminski MS, Fig LM, Zasadny KR, Koral KF, DelRosario RB, Francis IR, Hanson CA, Normolle DP, Mudgett E, Liu CP, et al. Imaging, dosimetry, and radioimmunotherapy with iodine 131-labeled anti-cd37 antibody in b-cell lymphoma. *J Clin Oncol.*, 10, 1696-1711, 1992
- Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, Chen X, Graus-Porta D, Ratzkin BJ, Seger R, Hynes NE, Yardenl Y. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of ndf and egf receptors: implications for breast cancer. *The EMBO Journal*, 15, 254-264, 1996
- King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*, 229, 974-976, 1985
- Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y. The erbB-2/her2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96, 4995-5000, 1999
- Kornblum HI, Yanni DS, Easterday MC, Seroogy KB. Expression of the egf receptor family members erbB2, erbB3, and erbB4 in germinal zones of the developing brain and in neurosphere cultures containing CNS stem cells. *Dev Neurosci.*, 22, 16-24, 2000
- Kreienberg, Kopp, Albert, Bartsch, Beckmann, Berg, Bick, du Bois, Budach, Dunst, Engel, Ernst, Geraedts, Henschler, Hölzel, Jackisch, König, Kreipe, Kühn, Lebeau, Leinung, Link, Lück, Madjar, Maiwald, Marschner, Marx, von Minckwitz, Naß-Griegolet, Possinger, Reiter, Sauerbrei, Schlake, Schmutzler, Schreer, Schulte, Schulz †, Souchon, Thomssen, Untch, Wagner, Weis, Zemmler. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. 2008
- Lewis MR, Wang Mu, Axworthy DB, Theodore L, Mallet RW, Fritzberg AR, Welch MJ, Anderson CJ. In vivo evaluation of pretargeted 64Cu for tumor imaging and therapy. *J Nucl Med.*, 44, 1284-1292, 2003
- Liang K, Lu Y, Jin W, Ang KK, Milas L, Fan Z. Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab. *Molecular cancer therapeutics*, 2, 1113-1120, 2003
- Liang Z, Zeng X, Gao J, Wu s, Wang P, Shi X, Zhang J, Liu T. Analysis of egfr, her2, and top2a gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. *BMC Cancer*, 8, 363, 2008

Liersch T, Meller J, Kulle B, Behr TM, Markus P, Langer C, Ghadimi BM, Wegener WA, Kovacs J, Horak ID, Becker H, Goldenberg DM. Phase ii trial of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with ¹³¹i-labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five-year safety and efficacy results. *J Clin Oncol.*, 23, 6763-6770, 2005

Lin A, Rugo HS. The role of trastuzumab in early stage breast cancer: current data and treatment recommendations. *Current treatment options in oncology*, 8, 47-60, 2007

Liu J and Wang J. Experimental study of taxol combining accelerated radiation on laryngeal carcinoma cells. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.*, 16, 481-483, 2002

Luo TY, Tang IC, Wu YL, Hsu KL, Liu SW, Kung HC, Lai PS, Lin WJ. Evaluating the potential of ¹⁸⁸re-socta-trastuzumab as a new radioimmunoagent for breast cancer treatment. *Nucl Med Biol.*, 36, 81-99, 2009

Mach JP, Forni M, Ritschard J, Buchegger F, Carrel S, Widgren S, Donath A, Alberto P. Use of limitations of radiolabeled anti-cea antibodies and their fragments for photoscanning detection of human colorectal carcinomas. *Oncodev Biol Med.*, 1, 49-69, 1980

McLarty K, Cornelissen B, Scollard D, Done SJ, Chun K, Reilly RM. Associations between the uptake of ¹¹¹in-dtpa-trastuzumab, her2 density and response to trastuzumab (herceptin) in athymic mice bearing subcutaneous human tumour xenografts. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 36, 81-93, 2009

Meller B, Deisting W, Wenzel BE, Pethe A, Nadrowitz R, Meller J, Richter E, Baehre M. Increased radioiodine uptake of thyroid cell cultures after external irradiation. *Strahlenther Onkol.*, 182, 30-36, 2006

Merlin JL, Barberi-Heyob M, Bachmann N. In vitro comparative evaluation of trastuzumab (herceptin) combined with paclitaxel (taxol) or docetaxel (taxotere) in her2-expressing human breast cancer cell lines. *Ann Oncol.*, 13, 1743-1748, 2002

Milas L, Hunter NR, Mason KA, Milross CG, Saito Y, Peters LJ. Role of reoxygenation in induction of enhancement of tumor radioresponse by paclitaxel. *Cancer Res.*, 55, 3564-3568, 1995

Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D. Pten activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of pten predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer cell*, 6, 117-127, 2004

Nagy P, Friedländer E, Tanner M, Kapanen A, Carraway KL, Isola J, Jovin M. Decreased accessibility and lack of activation of erbb2 in jimt-1, a herceptin-resistant, muc4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.*, 65, 473-482, 2005

Negro A, Brar BK, Lee KF. Essential roles of her2/erbb2 in cardiac development and function. *Recent Prog Horm Res.*, 59, 1-12, 2004

Niero A, Emiliani E, Monti G, Pironi F, Turci L, Valenti AM, Marangolo M. Paclitaxel and radiotherapy: sequence-dependent efficacy—a preclinical model. *Clin Cancer Res.*, 5, 2213-2222, 1999

Okarvi SM, Jammaz IA. Design, synthesis, radiolabeling and in vitro and in vivo characterization of tumor-antigen- and antibody-derived peptides for the detection of breast cancer. *Anticancer Research*, 29, 1399-1409, 2009

Olayioye. Update on her-2 as a target for cancer therapy intracellular signaling pathways of erbb2/her-2 and family members. *Breast Cancer Res*, 3, 385-389, 2001

Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, Beryt M, Sliwkowski M, Coombs D, Baly D, Kabbinavar F, Slamon D. Inhibitory effects of combinations of her-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene*, 18, 2241-2251, 1999

Pegram MD, Pienkowski T, Northfelt DW, Eiermann W, Patel R, Fumoleau P, Quan E, Crown J, Toppmeyer D, Smylie M, Riva A, Blitz S, Press MF, Reese D, Lindsay MA, Slamon DJ. Results of two open-label, multicenter phase ii studies of docetaxel, platinum salts, and trastuzumab in her2-positive advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 96, 759-769, 2004

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang CS, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Láng I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Rüschoff J, Suto T, Greatorex V, Ward C, Straehle C, McFadden E, Dolci MS, Gelber RD; Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in her2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353, 1659-1672, 2005

Pinkas-Kramarski R, Soussan L, Waterman H, Levkowitz G, Alroy I, Klapper L, Lavi S, Seger R, Ratzkin BJ, Sela M, Yarden Y. Diversification of neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *The EMBO Journal*, 15, 2452-2467, 1996

Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M. Ligand-specific activation of her4/p180erbb4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90, 1746–1750, 1993

Press MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the her-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene*, 5, 953-962, 1990

Press OW, Corcoran M, Subbiah K, Hamlin DK, Wilbur DS, Johnson T, Theodore L, Yau E, Mallett R, Meyer DL, Axworthy D. Radioimmunotherapy of cd20-expressing lymphoma xenografts a comparative evaluation of conventional and pretargete. *Blood*, 98, 2535-2543, 2001

- Price-Schiavi SA, Jepson S, Li P, Arango M, Rudland PS, Yee L, Carraway KL. Rat muc4 (sialomucin complex) reduces binding of anti-erb2 antibodies to tumor cell surfaces, a potential mechanism for herceptin resistance. *International Journal of Cancer*, 99, 783-791, 2002
- Primus FJ, Wang RH, Goldenberg DM, Hansen HJ. Localization of human gw-39 tumors in hamsters by radiolabeled heterospecific antibody to carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.*, 33, 2977-2982, 1973
- Rades D, Wolff C, Nadrowitz R, Breunig C, Schild SE, Baehre M, Meller B. Radioactive egfr antibody cetuximab in multimodal cancer treatment: Stability and synergistic effects with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. Epub 04/2009
- Rasaneh S, Rajabi H, Babaei MH, Daha FJ, Salouti M. Radiolabeling of trastuzumab with ¹⁷⁷lu via dota, a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. *Nucl Med Biol.*, 36, 363-369, 2009
- Renier C, Vogel H, Offor O, Yao C, Wapnir I. Breast cancer brain metastases express the sodium iodide symporter. *Journal of neuro-oncology*, Epub 07/2009
- Richman CM, Denardo SJ, O'Donnell RT, Yuan A, Shen S, Goldstein DS, Tuscano JM, Wun T, Chew HK, Lara PN, Kukis DL, Natarajan A, Meares CF, Lamborn KR, DeNardo GL. High-dose radioimmunotherapy combined with fixed, low-dose paclitaxel in metastatic prostate and breast cancer by using a muc-1 monoclonal antibody, m170, linked to indium-111/yttrium-90 via a cathepsin cleavable linker with cyclosporine to prevent human anti-mouse antibody. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5920-7., 11, 5920-5927, 2005
- RKI/Gekid. Krebs in Deutschland 2003 – 2004 Häufigkeiten und Trends. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2008
- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable her2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 353, 1673-1684, 2005
- Roskoski. The erb2/her receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319, 1-11, 2004
- Rubin I and Yarden Y. The basic biology of her2. *Annals of Oncology*, 12, 3-8, 2001
- Sampath L, Kwon S, Ke S, Wang W, Schiff R, Mawad ME, Sevick-Muraca EM. Dual-labeled trastuzumab-based imaging agent for the detection of human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in breast cancer. *J Nucl Med.*, 48, 1501-1510, 2007

- Santin A, Bellone S, Van Stedum S, Bushen W, Palmieri M, Siegel R, De Las Casas L, Roman JJ, Burnett A, Pecorelli S. Amplification of c-erbB2 oncogene a major prognostic indicator in uterine serous papillary carcinoma. *Cancer*, 104, 1391-1397, 2005
- Sauter G, Lee J, Bartlett JM, Slamon DJ, Press MF. Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 1323-1333, 2009
- Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA. The neu oncogene: an erb-b-related gene encoding a 185,000-mr tumour antigen. *Nature*, 312, 513-516, 1984
- Sharkey RM, Karacay H, Vallabhajosula S, McBride WJ, Rossi EA, Chang CH, Goldsmith SJ, Goldenberg DM. Metastatic human colonic carcinoma: molecular imaging with pretargeted spect and pet in a mouse model. *Radiology*, 246, 497-507, 2008
- Shepard HM, Jin P, Slamon DJ, Pirot Z, Maneval DC. Herceptin. *Handbook of Experimental Pharmacology - Therapeutic Antibodies*, 181, 183-219, 2008
- Shih C, Padhy LC, Murray M, Weinberg RA. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature*, 290, 261-264, 1981
- Skinner KA and Silverstein MJ. The management of ductal carcinoma in situ of the breast. *Endocr Relat Cancer*, 8, 33-45, 2001
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the her-2/neu oncogene. *Science*, 235, 177-182, 1987
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244, 707-712, 1989
- Sliwkowski MX. Ready to partner. *Nature structural biology*, 10, 158-159, 2003
- Smith I, Procter M, Gelber RD, Guillaume S, Feyereislova A, Dowsett M, Goldhirsch A, Untch M, Mariani G, Baselga J, Kaufmann M, Cameron D, Bell R, Bergh J, Coleman R, Wardley A, Harbeck N, Lopez RI, Mallmann P, Gelmon K, Wilcken N, Wist E, Sánchez Rovira P, Piccart-Gebhart MJ; HERA study team. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in her2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet*, 369, 29-36, 2007
- Stern DF. Erbbs in mammary development. *Experimental Cell Research*, 284, 89-98, 2003
- Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Isola J. Characterization of a novel cell line established from a patient with herceptin-resistant breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3, 1585-1592, 2004

Tapia C, Savic S, Wagner U, Schönegg R, Novotny H, Grilli B, Herzog M, Barascud AD, Zlobec I, Cathomas G, Terracciano L, Feichter G, Bubendorf L. Her2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases. *Breast Cancer Res.*, 9, R31, 2007

Trost R, Reichenbach JR, Hilger I, Fritzsche CH, Sedlacik J, Rauscher A, Kaiser WA. Molekulare MR-Bildgebung im Tierversuch mit spezifischen Nanopartikeln. 7. Jahrestreffen ISMRM – Deutsche Sektion, 2004.

Tzahar E, Watermann H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin BJ, Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Molecular and cellular Biology*, 16, 5276-5287, 1996

Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61, 203-212, 1990

Unverdorben M, Degenhardt R, Wiemer M, Horstkotte D, Schneider H, Nienaber C, Bocksch W, Gross M, Boxberger M, Vallbracht C; the PECOPS I Investigators. The paclitaxel-eluting coroflex please stent study (pecops i): The 3-year clinical follow-up. *Catheter Cardiovasc Interv*, Epub 04/2009

van der Geer P, Hunter T, Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol.*, 10, 251-337, 1994

Vermeij J, Teugels E, Bourgain C, Xiangming J, in 't Veld P, Ghislain V, Neyns B, De Grève J. Genomic activation of the egfr and her2-neu genes in a significant proportion of invasive epithelial ovarian cancers. *BMC Cancer*, 8: 3, 2008

Vogt HG und Zamboglou N. Radiosensibilisierung durch paclitaxel. in-vivo-ergebnisse bei paclitaxelemfindlichen und -resistenten tumoren. *Strahlentherapie und Onkologie*, 174, 539-547, 1998

Wall and Wani. Camptothecin and taxol: Discovery to clinic memorial award lecture'. *Cancer Research*, 55, 753-760, 1995

Yakes FM, Chinratanalab W, Ritter CA, King W, Seelig S, Arteaga CL. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin d1, and antitumor action. *Cancer Res.*, 628, 4132–4141, 2002

Yu D, Jing T, Liu B, Yao J, Tan M, McDonnell TJ, Hung MC. Overexpression of erbb2 blocks taxol-induced apoptosis by upregulation of p21cip1, which inhibits p34cdc2 kinase. *Mol Cell.*, 2, 581-91, 1998

Zabrecky JR, Lam T, McKenzie SJ, Carney W. The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, sk-br-3. *The Journal of biological chemistry*, 266, 1716-1720, 1991

Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, Hung MC. Her-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the akt/nf-kappab pathway. *The Journal of biological chemistry*, 275, 8027-8031, 2000

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: HER-Rezeptoren und Wachstum (modifiziert nach Klapper et al. 1999)....	8
Abb. 2: Schematischer Aufbau eines Rezeptors der HER-Familie.....	9
Abb. 3: Kreuzfeuereffekt.....	14
Abb. 4: HPLC-Untersuchung des markierten Antikörpers nach 72 h.....	30
Abb. 5: Standardkurve für ^{131}I	31
Abb. 6: Medianer prozentualer ^{131}I -Trast-Uptake über 72h in 10^6 JIMT-Zellen.....	32
Abb. 7: Uptake von ^{131}I -Trast in 10^6 MX-1-Zellen	33
Abb. 8: Uptake von ^{131}I -Trast bzw. ^{131}I -Trast + kaltem Antikörper in JIMT-Zellen	34
Abb. 9: Uptake durch MX-1-Zellen spezifisch?.....	35
Abb. 10: Einfluß von Paclitaxel auf den ^{131}I -Trast-Uptake in JIMT-Kulturen	37
Abb. 11: Einfluß von Paclitaxel auf den ^{131}I -TrastUptake in MX-1-Kulturen	38
Abb. 12: Proliferation der JIMT-Kulturen (1).....	39
Abb. 13: Proliferation der JIMT-Kulturen (2).....	40
Abb. 14: Proliferation von MX-1.....	41
Abb. 15: Kumulative Bestrahlungsdosis	42

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle danke ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Birgit Meller für die Überlassung des Themas und der Arbeitsplätze sowie für die geduldige Anleitung, die unermüdlichen Ratschläge, die konstruktive Kritik, die Motivation und das jederzeit offene Ohr.

Herzlich danken möchte ich meinem Kommilitonen Christian Wolff für das Empfehlen und „Teilen“ seiner Doktormutter, aber auch für die nette und geduldige Einarbeitung und die ständige Hilfsbereitschaft.

Meinen Kommilitonen Christiane Lange und Marcus Zimmermann sei für leidensgenossenschaftliche, motivierende und konstruktive Gespräche und die gegenseitige Unterstützung gedankt.

Weiterhin ist Christian Breunig, Michael Breuker, Nina Krause und Florian Rudnitzki für technische Nachhilfe und konstruktive Gespräche zu danken.

Frau Bufe, Frau Zwetschge und stellvertretend für ihre Kollegen möchte ich Frau Sandra Weber für das Teilen der Arbeitsplätze danken.

Für die moralische Unterstützung, besonders beim schriftlichen Teil der Arbeit, danke ich meiner Familie.

LEBENS LAUF

Name	Reetz, Christina
Geburtsdatum	18.06.1979
Geburtsort	Lübeck
Familienstand	verheiratet

**Schule/Ausbildung**

08.1985 - 06.1989	Grundschule, Lübeck
08.1989 - 06.1998	Gymnasium Lübeck
08.1998 - 03.1999	FSJ, Lübeck
04.1999 - 03.2002	Krankenpflegeschule Lübeck

Studium

04.2002 - 08.2004	Vorklinik LMU München Ärztliche Vorprüfung
WS 2006/2007	Beginn der experimentellen Untersuchungen zur Doktorarbeit
10.2004 - 11.2008	Klinisches Studium Universität zu Lübeck Ärztliche Prüfung
06.2008 - 07.2009	Elternzeit
seit dem 01.08.2009	Assistenzärztin, Klinik für Anästhesiologie, UK-SH, Campus Lübeck

Lübeck, den 05.11.2009 Christina Reetz

PUBLIKATIONEN

1. B. Meller, C. Reetz, D. Fischer, B. Stöckelhuber, M. Bähre (2008) Einfluss von Paclitaxel auf die Anreicherung von HER2-affinen Radioimmunkonjugaten in HER2-resistenten Zellklonen. Vortrag auf der 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 23.04.-26.04.2008 in Leipzig Kurzfassung: Nuklearmedizin **47**: A48
2. B. Meller, C. Reetz, B. M. Stoeckelhuber, D. Fischer, M. Baehre (2008) Influence of Paclitaxel (PAC) on the uptake of HER2-affine radioimmuno conjugates in anti-HER2-resistant cell cultures Kurzfassung: Eur J Nucl Med Mol Imaging **35**: S197