

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie  
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Geschäftsführende Direktorin: Professor Dr. med. Rita Engenhardt-Cabillic

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit  
mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Upregulation von CCK-B/Gastrin- und Somatostatin-Rezeptoren nach externer Bestrahlung  
in vitro und in vivo

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin  
dem Fachbereich der Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Michael Püsken  
aus  
Haselünne  
Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am 19. Oktober 2006

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic

Korreferent: HD Dr. A. Aigner

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Peptide und Peptidrezeptoren   | 1         |
| 1.1.1. Peptide  | 1         |
| 1.1.2. Rezeptoren   | 1         |
| 1.2. Somatostatin und Gastrin – Peptid und Rezeptor                             | 2         |
| 1.2.1. Somatostatin und Somatostatin-Rezeptoren                                 | 2         |
| 1.2.2. Cholecystokinin, Gastrin – CCK-B/Gastrin-Rezeptoren                      | 5         |
| 1.3. Rezeptorszintigraphie in vivo  | 7         |
| 1.4. Hirntumore – Astrozytome   | 9         |
| 1.4.1. Ätiologie und Einteilung der Astrozytome                                 | 9         |
| 1.4.2. Therapie des Glioblastoma multiforme (GBM)                               | 10        |
| 1.5. Zellzyklus und Radiotherapie   | 12        |
| 1.5.1. Der Zellzyklus   | 12        |
| 1.5.2. Bestrahlung und Zellzyklus   | 12        |
| 1.5.3. Strahleninduzierter Zelltod  | 14        |
| 1.6. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit                                 | 15        |
| <br>  |           |
| <b>2. Material und Methoden</b>   | <b>16</b> |
| 2.1. Zellkultur   | 16        |
| 2.1.1. Zelllinien und Kultur  | 16        |
| 2.1.2. Kryokonservierung der Zellen   | 17        |
| 2.1.3. Auftauen eingefrorener Zellen  | 18        |
| 2.1.4. Sphäroidwachstum bei LN18-Zellen   | 18        |
| 2.1.5. Stimulation von G109-Zellen mit AR42J-Medium                             | 18        |
| 2.2. Peptidmarkierung mit dem Radionuklid <sup>111</sup> In                     | 19        |
| 2.2.1. Markierung des Somatostatinanalogons Octreotid mit <sup>111</sup> In     | 19        |
| 2.2.2. Markierung von DTPA-DGlu <sup>1</sup> -minigastrin mit <sup>111</sup> In | 19        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.3. Qualitätskontrolle der Markierung  | 19        |
| 2.3. Blockierungsversuche der CCK-B/Gastrin- und SST2-Rezeptoren  | 20        |
| 2.4. Internalisierung der CCK-B/Gastrin- und SST2-Rezeptoren bei AR42J  | 21        |
| 2.5. Bestrahlung der Zellkulturen in vitro  | 22        |
| 2.5.1. Aufbau   | 22        |
| 2.5.2. Dosierung und Bestrahlungsparameter  | 24        |
| 2.5.3. Bestrahlungsexperimente der Zellkulturen in vitro  | 25        |
| 2.6. Tierexperimente  | 25        |
| 2.6.1. Injektion von AR42J-Zellen in die Maus   | 25        |
| 2.6.2. Sedierung der Maus   | 26        |
| 2.6.3. Lagerung und Bestrahlung der Maus  | 26        |
| 2.6.4. Biodistribution der markierten Radiopeptide  | 27        |
| 2.7. Histologische Aufarbeitung der Tumore  | 28        |
| 2.7.1. Fixierung in Paraformaldehyd   | 28        |
| 2.7.2. Paraffineinbettung   | 29        |
| 2.7.3. Färbung der Paraffinschnitte mit Hämalaun-Eosin  | 29        |
| 2.8. Statistik  | 30        |
| <br>  |           |
| <b>3. Ergebnisse</b>  | <b>31</b> |
| <br>  |           |
| 3.1. Qualitätskontrollen der <sup>111</sup> In markierten Peptide   | 31        |
| 3.2. CCK-B/Gastrin- und SST-Rezeptornachweis bei Glioblastomzelllinien  | 31        |
| 3.2.1. Blockierungsversuche mit <sup>111</sup> In-DTPA-DGlu <sup>1</sup> -minigastrin   | 32        |
| 3.2.2. Blockierungsversuche mit <sup>111</sup> In-Octreotid   | 32        |
| 3.2.3. Blockierungsversuch mit <sup>111</sup> In-DTPA-DGlu <sup>1</sup> -minigastrin bei LN18-Sphäroiden  | 33        |
| 3.2.4. Blockierungsversuch mit <sup>111</sup> In-DTPA-DGlu <sup>1</sup> -minigastrin und <sup>111</sup> In-Octreotid nach Kultivierung mit AR42J-Medium | 34        |
| 3.2.5. Blockierungsversuch mit <sup>111</sup> In-DTPA-DGlu <sup>1</sup> -minigastrin nach Bestrahlung   | 35        |
| 3.2.6. Blockierungsversuch mit <sup>111</sup> In-Octreotid nach Bestrahlung   | 36        |
| 3.3. CCK-B/Gastrin- und SST-Rezeptornachweis bei AR42J-Zellen in vitro  | 37        |
| 3.3.1. Blockierungsversuche bei AR42J-Zellen  | 37        |
| 3.3.1.1. Internalisierungsversuche mit <sup>111</sup> In-DTPA-DGlu <sup>1</sup> -minigastrin  | 37        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.1.2. Internalisierungsversuche mit <sup>111</sup> In-Octreotid                    | 37        |
| 3.4. Wachstumsverhalten der AR42J-Zellen nach Bestrahlung                             | 38        |
| 3.4.1. Wachstumskurve AR42J (unbestrahlt)   | 38        |
| 3.4.2. Wachstumskurve AR42J nach 4 Gy   | 39        |
| 3.4.3. Wachstumskurve AR42J nach 8 Gy   | 40        |
| 3.4.4. Wachstumskurve AR42J nach 16 Gy  | 42        |
| 3.5. CCK-B/Gastrin- und SST-Rezeptor-Regulation nach Bestrahlung                      | 43        |
| 3.5.1. CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation  | 43        |
| 3.5.1.1. CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation nach 4 Gy                                | 43        |
| 3.5.1.2. CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation nach 8 Gy                                | 44        |
| 3.5.1.3. CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation nach 16 Gy                               | 45        |
| 3.5.2. SST2-Rezeptor-Upregulation   | 46        |
| 3.5.2.1. SST2-Rezeptor-Upregulation nach 4 Gy   | 46        |
| 3.5.2.2. SST2-Rezeptor-Upregulation nach 8 Gy   | 47        |
| 3.5.2.3. SST2-Rezeptor-Upregulation nach 16 Gy  | 48        |
| 3.6. Bioverteilungsstudien nach Bestrahlung (10 Gy) bei AR42J in vivo                 | 49        |
| 3.6.1. Bioverteilungsstudie von <sup>111</sup> In-DTPA-DGlu <sup>1</sup> -minigastrin | 50        |
| 3.6.2. Bioverteilungsstudie von <sup>111</sup> In-Octreotid                           | 51        |
| 3.7. Histologie   | 53        |
| <br>  |           |
| <b>4. Diskussion</b>  | <b>56</b> |
| <br>  |           |
| 4.1. Blockierungsversuche bei Glioblastomzellen in vitro                              | 56        |
| 4.1.1. Blockierungsversuche mit Minigastrin   | 56        |
| 4.1.2. Blockierungsversuche mit Octreotid   | 58        |
| 4.1.3. Blockierungsversuche nach Bestrahlung  | 60        |
| 4.1.4. Stellenwert der SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren bei<br>Glioblastomen         | 61        |
| 4.2. AR42J-Bestrahlungsversuche in vitro und in vivo                                  | 63        |
| 4.2.1. Internalisierung von SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren                        | 63        |
| 4.2.2. Wachstumskurven der AR42J-Zellen nach Bestrahlung                              | 64        |
| 4.2.3. Upregulation von SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren                            | 65        |
| 4.2.4. Biodistribution im Tiermodell  | 67        |
| 4.2.5. Histologische Auswertung   | 70        |

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| 4.2.6. Ausblick                | 71        |
| <b>5. Zusammenfassung</b>      | <b>72</b> |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b> | <b>74</b> |
| <b>7. Anhang</b>               | <b>93</b> |

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

|           | Seite |
|-----------|-------|
| Abb. 2.1  | 23    |
| Abb. 2.2  | 24    |
| Abb. 2.3  | 27    |
| Abb. 3.1  | 39    |
| Abb. 3.2  | 40    |
| Abb. 3.3  | 41    |
| Abb. 3.4  | 42    |
| Abb. 3.5  | 44    |
| Abb. 3.6  | 45    |
| Abb. 3.7  | 46    |
| Abb. 3.8  | 47    |
| Abb. 3.9  | 48    |
| Abb. 3.10 | 49    |
| Abb. 3.11 | 51    |
| Abb. 3.12 | 52    |
| Abb. 3.13 | 53    |
| Abb. 3.14 | 54    |
| Abb. 3.15 | 55    |
| Abb. 3.16 | 55    |

### Tabellenverzeichnis

|           | Seite |
|-----------|-------|
| Tab. 1.1  | 3     |
| Tab. 1.2  | 4     |
| Tab. 1.3  | 6     |
| Tab. 1.4  | 7     |
| Tab. 3.1  | 32    |
| Tab. 3.2  | 33    |
| Tab. 3.3  | 33    |
| Tab. 3.4  | 34    |
| Tab. 3.5  | 34    |
| Tab. 3.6  | 35    |
| Tab. 3.7  | 36    |
| Tab. 3.8  | 36    |
| Tab. 3.9  | 37    |
| Tab. 3.10 | 38    |
| Tab. 3.11 | 39    |
| Tab. 3.12 | 40    |
| Tab. 3.13 | 41    |
| Tab. 3.14 | 42    |
| Tab. 3.15 | 44    |
| Tab. 3.16 | 45    |
| Tab. 3.17 | 46    |
| Tab. 3.18 | 47    |
| Tab. 3.19 | 48    |
| Tab. 3.20 | 49    |
| Tab. 3.21 | 50    |
| Tab. 3.22 | 52    |

## Abkürzungsverzeichnis

|             |                                    |
|-------------|------------------------------------|
| Abb.        | Abbildung                          |
| AGZ         | Ausgangszellzahl                   |
| ATM         | Ataxia teleangiectasia mutated Gen |
| Aqua dest.  | Aqua destillata                    |
| Bq          | Bequerel                           |
| BSA         | bovines Serumalbumin               |
| c           | Konzentration (in mol/l)           |
| °C          | Grad Celsius                       |
| CCK         | Cholezystokinin                    |
| CDK         | Cyclin-abhängige Kinase            |
| CEA         | carzinoembryonales Antigen         |
| CHK2        | human checkpoint Kinase            |
| cm          | Zentimeter                         |
| cpm         | Counts pro Minute                  |
| CT          | Computertomographie                |
| DMEM        | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| DNA         | Desoxyribonukleinsäure             |
| DTPA        | Diethylen-Triaminpentaessigsäure   |
| et al.      | und andere                         |
| FCS         | Fetales Kälberserum                |
| g           | Gramm                              |
| G-Protein   | Guaninnukleotid-bindendes Protein  |
| GBM         | Glioblastoma multiforme            |
| Gy          | Gray                               |
| h           | Stunde                             |
| H.E.        | Hämalaun-Eosin                     |
| injiz.Dosis | injizierte Dosis                   |
| i.v.        | intravenös                         |
| KG          | Körpergewicht                      |
| M           | Molar                              |
| MDM2        | murine double minute 2 Gen         |
| MeV         | Megaelektronenvolt                 |



|        |   |
|--------|---|
| mg     | Milligramm                                      |
| min    | Minute  |
| ml     | Milliliter                                      |
| mRNA   | Messenger Ribonukleinsäure                      |
| MRT    | Magnetresonanztomographie                       |
| MTC    | medulläres Schilddrüsenkarzinom                 |
| MW     | Mittelwert                                      |
| NaAc   | Natriumacetat                                   |
| NaCl   | Natriumchlorid                                  |
| NaOH   | Natronlauge                                     |
| PBS    | phosphate-buffered saline                       |
| PET    | Positronen-Emissionstomographie                 |
| RT-PCR | Reverse Transcription Polymerase-Kettenreaktion |
| SD     | Standardabweichung                              |
| SPECT  | Single-Photon Emissionstomographie              |
| SST    | Somatostatin                                    |
| SSTR   | Somatostatin-Rezeptor                           |
| t      | Zeit  |
| Tab.   | Tabelle   |
| TRH    | Thyreotropin releasing Hormon                   |
| u.a.   | unter anderem                                   |
| U/min  | Umdrehung pro Minute                            |
| VIP    | vasointestinales Peptid                         |
| WHO    | World Health Organization                       |
| wt     | Wildtyp   |
| z.B.   | zum Beispiel                                    |
| ZNS    | zentrales Nervensystem                          |



# **1. Einleitung**

## **1.1 Peptide und Peptidrezeptoren**

### **1.1.1 Peptide**

Peptide sind Botenstoffe, die ein niedriges Molekulargewicht besitzen und aus weniger als 30 - 40 Aminosäuren aufgebaut sind. Sie werden in endokrinen Organen, vorwiegend im Gastrointestinaltrakt und im ZNS, synthetisiert und entfalten ihre Wirkung an der Zielzelle über die Bindung an Peptidrezeptoren (Reubi 1997).

Aufgrund ihrer geringen Größe penetrieren sie leicht in nahezu alle Gewebe, was sie von Proteinen und Antikörpern unterscheidet, die ein deutlich höheres Molekulargewicht besitzen und sich langsamer in Tumorgewebe anreichern (Behr et al. 1998). Eine Ausnahme bildet das Gehirn, dessen Blut-Hirn-Schranke für die meisten hydrophilen Peptide nicht permeabel ist. Das ZNS und die Peripherie bilden zwei unabhängige regulatorische Systeme, in denen Peptide unterschiedliche Aufgaben übernehmen können, ohne sich gegenseitig zu beeinflussen (Behr et al. 1999). Die meisten Peptide besitzen Halbwertszeiten im Bereich von Sekunden bis zu einigen Minuten, da sie schnell von ubiquitär vorkommenden Peptidasen inaktiviert werden, um lang andauernde systemische Wirkungen zu verhindern.

Für die medizinische Nutzung der Peptide ist es notwendig, metabolisch stabile Peptidanaloga mit einer längeren Halbwertszeit zu entwickeln, um eine sichere Wirkung am Rezeptor erzielen zu können.

### **1.1.2 Rezeptoren**

Da die hydrophilen Peptide die lipophile Zellmembran nicht durchdringen können, wird ihr Signal über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen, an deren extrazelluläre Bindungsstelle sie sich anlagern, in die Zelle weitergeleitet. Intrazellulär erfolgt die Signaltransduktion über Regulation von Ionenkanälen und Enzymen.

Neben der Produktion von intrazellulären Botenstoffen (second messenger) kommt es zudem zu einer Desensibilisierung des Rezeptors, dem die Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes als ein weiterer Inaktivierungsweg folgt. Die internalisierten Rezeptoren werden entweder resensibilisiert und als funktionsfähige Rezeptoren wieder in die Zellmembran eingebaut oder intrazellulär abgebaut, was zu einer Downregulation des Rezeptors führt (Toews 2000).

Für die diagnostische und therapeutische Nutzung der Radiopeptide ist die Internalisierung wichtig, da sie zu einer intrazellulären Akkumulation des Radionuklids führt. Somit kommt es zu einer deutlichen Anhebung des szintigraphischen Signals bzw. zu einer Verstärkung des therapeutischen Effekts (Behr et al. 2001 b). Die Internalisierung ist dabei beschränkt auf agonistisch wirkende Rezeptorliganden (Hipkin et al. 1997).

## **1.2 Somatostatin und Gastrin – Peptid und Rezeptor**

### **1.2.1 Somatostatin und Somatostatin-Rezeptoren**

Somatostatin (SST) ist ein Tetradecapeptid, das physiologisch in einer Vielzahl an Organen, wie dem zentralen und peripheren Nervensystem, Pankreas, Magen, Schilddrüse, Nieren, Nebennieren sowie im Immunsystem produziert wird (Reichlin 1983, Patel 1999). Es wirkt überwiegend inhibitorisch auf die Hormonsekretion (u.a. von Insulin, Gastrin, Glucagon) und die Zellproliferation. Im zentralen Nervensystem hemmt Somatostatin als Neurotransmitter die Freisetzung des Wachstumshormons (GH) aus der Hypophyse (Brazeau et al. 1973) und von TRH aus dem Hypothalamus und zeigt zudem wichtige Effekte im kognitiven, motorischen, sensiblen und autonomen System (Epelbaum et al. 1994). Im Gastrointestinaltrakt inhibiert SST die Motilität des Magens und der Gallenblase sowie die Sekretion von Magensäure, Pepsin, Galle und Darmsekret. Ebenso hemmt es die Freisetzung von Wachstumsfaktoren (IGF1, EGF, PDGF) und von Zytokinen (IL-6,IFN- $\gamma$ ) (Patel 1999, Elliott et al. 1999).

Diese unterschiedlichen Funktionen werden durch zwei natürlich vorkommende Formen des SST, dem SST-14 und dem SST-28, bestimmt (Krenning et al. 1995, Reubi 1997). Für die biologische Aktivität von SST-14 ist die Aminosäurenreihenfolge Phe<sup>7</sup>, Trp<sup>8</sup>, Lys<sup>9</sup> und Thr<sup>10</sup>

von entscheidender Bedeutung, so dass diese Sequenz bei der Erforschung und Herstellung neuer Somatostatinanaloga, die sich von den physiologischen Formen SST-14 und SST-28 vornehmlich durch eine höhere metabolische Stabilität und eine höhere Rezeptorselektivität unterscheiden sollen, beibehalten wird (Patel 1999).

Im Jahre 1983 wurde das erste Somatostatinanalogon, das Octapeptid SMS 201-995 (SMS, Octreotid) klinisch erfolgreich zur Behandlung der Akromegalie bei Patienten mit Wachstumshormon-produzierenden Hypophysentumoren eingesetzt (Bauer et al. 1983, Lamberts et al. 1985). Eine weitere wichtige Rolle spielt das Octreotid in der Therapie des Karzinoids. Es führt zu einer Kontrolle der tumorspezifischen Symptome wie Diarrhoe und Flush-Attacken und somit zu einer Verbesserung der Lebensqualität dieser Patienten (Lamberts et al. 1996).

Eine Übersicht über die Aminosäuresequenzen der natürlichen Somatostatine und des synthetischen Analogons Octreotid gibt die Tabelle 1.1.

| <i>Peptid</i>            | <i>Aminosäuresequenz</i>  |
|--------------------------|---|
| Somatostatin-14 (SST-14) | Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys   |
| Somatostatin-28 (SST-28) | Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-<br>Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys |
| Octreotid                | DPhe-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)   |

Tab. 1.1: Aminosäuresequenz der natürlichen Somatostatine und des Somatostatinanalogons Octreotid (modifiziert nach Patel 1999).

Das an den Chelator DTPA gekoppelte und mit dem Radioliganden Indium-111 markierte Octreotid [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-Octreotid (= OctreoScan®)] war 1994 das erste zugelassene Radiopeptid, das zur Diagnostik und Lokalisation von neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltrakts eingesetzt wurde (Kwekkeboom et al. 1993, Krenning et al. 1993).

Ihre Wirkung auf die Zielzelle entfalten Somatostatin und die Analoga über spezifische Somatostatin-Rezeptoren (SSTR), die zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören. Mit molekularbiologischen Methoden wie der mRNA Analyse mittels Northern Blot (Thoss et al. 1996), der in-situ-Hybridisierung (Kong et al. 1994) sowie der RT-PCR und der Rezeptorautoradiographie (Reubi et al. 1997 a) konnten die Somatostatin-Rezeptoren in fünf Subtypen (SSTR1-5) unterteilt werden.

Somatostatinanaloga wie Octreotid, Vapreotid oder Lantreotid zeigen vor allem zu SSTR2 und (weniger zu) SSTR5 eine hohe, im nanomolaren Bereich liegende Affinität, wohingegen

die natürlichen Somatostatine SMS-14 und SMS-28 mit hoher Affinität an alle 5 Rezeptorsubtypen binden (Patel et al. 1994, Bruns et al. 1996).

Physiologisch werden SSTR im ZNS, hier besonders in der Hypophyse, im Pankreas, im Magen und in den Nieren exprimiert. Aber auch viele humane Tumoren besitzen eine hohe Dichte an SSTR, so z.B. das Hypophysenadenom, neuroendokrine gastroenteropankreatische Tumoren, Adenokarzinome der Mamma, der Prostata, der Ovarien, der Niere und des Kolons, kleinzellige Bronchialkarzinome, medulläre Schilddrüsenkarzinome sowie differenzierte Gliome und Medulloblastome (Reubi et al. 1990, 1994, 2001).

| <i>Dominanter Rezeptor-Subtyp</i>        | <i>Subtypexprimierender Tumor</i>   |
|--|---|
| Prädominanz SST2-Rezeptor                | Neuroblastom<br>Meningeom<br>Medulloblastom<br>Mammakarzinom<br>Lymphom<br>Nierenzellkarzinom<br>Kleinzelliges Bronchialkarzinom<br>Paragangliom<br>Hepatozelluläres Karzinom |
| Prädominanz SST1-Rezeptor                | Prostatakarzinom<br>Sarkom  |
| Prädominanz SST2- + SST5-Rezeptor        | Wachstumshormon-produzierendes Hypophysenadenom   |
| Prädominanz SST2- und/oder SST1-Rezeptor | Gastroenteropankreatische Tumoren   |

Tab. 1.2: Subtypspezifische SST-Rezeptorexpression in humanen Tumoren (modifiziert nach Reubi et al. 2001).

Reubi et al. stellten durch Rezeptorautoradiographie fest, dass in diesen Tumoren der SSTR2 am häufigsten exprimiert wird, seltener der SSTR5. Somit sind die mit einem Radionuklid markierten Somatostatinanaloga aufgrund der Rezeptorselektivität für den SSTR2 klinisch sehr bedeutsam und können effektiv sowohl in der Diagnostik und Lokalisation als auch in der Therapie dieser rezeptorexprimierenden Tumoren angewandt werden (Lamberts et al. 1990) (Tab. 1.2).

### 1.2.2 Cholecystokinin, Gastrin – CCK-B/Gastrin-Rezeptoren

Gastrin und Cholecystokinin (CCK) sind zwei Peptide einer Peptidfamilie, die wichtige Funktionen im gastrointestinalen System und im Gehirn erfüllen. Cholecystokinin wird in der Duodenalschleimhaut gebildet und führt zur Kontraktion der Gallenblase, zur Sekretion von Pankreasenzymen und zur Verminderung der Salzsäuresekretion des Magens. Der Produktionsort des Gastrins, das vor allem die Salzsäureproduktion der Parietalzellen des Magens, die Pepsinogensekretion sowie die Magenmotilität fördert, sind die G-Zellen des Magenantrums (Walsh 1994). Auch trophische Effekte des Gastrins an Magen und Duodenum sind bekannt (Hakanson et Sundler 1991). Aufgrund der hohen Gastrin- und CCK-Konzentration in vielen Arealen des Gehirns wird ihnen eine Funktion als Neurotransmitter zugesprochen (Hokfelt et al. 1991). Zudem ist der wachstumsstimulierende Effekt bei Kolon- und Magenkarzinomen belegt (Smith et Solomon 1988, Watson et al. 1989, Rehfeld et van Solinge 1994).

Von entscheidender Bedeutung für die Bindung dieser beiden Peptide an den spezifischen Rezeptor ist deren gemeinsame C-terminale Tetrapeptidsequenz Trp-Met-Asp-PheNH<sub>2</sub>. Zur Verbesserung der Rezeptorszintigraphie in Tumoren und in gesundem Gewebe werden viele Gastrin- und CCK-Derivate, die die Tetrapeptidsequenz Trp-Met-Asp-PheNH<sub>2</sub> enthalten, im Hinblick auf ihre Serumstabilität, ihre Rezeptoraffinität in vivo und in vitro sowie ihre Bioverteilung im Organismus untersucht (Behr et al. 1999). Dabei zeigen die Gastrinderivate aufgrund des hohen Tumoruptakes und der geringen Anreicherung in nicht-tumorösen Geweben die besten Ergebnisse. Innerhalb der Gastrinderivate besitzt das DTPA-D-Glu<sup>1</sup>-minigastrin, das sich vom CCK durch eine zusätzliche Pentaglutamatsequenz und einem Methionin (Met) in Position 6 unterscheidet, eine herausragende Position im Bezug auf die Rezeptorspezifität (Tab. 1.3).

| <i>Peptid</i>   | <i>Entscheidende Aminosäuresequenz</i>                                 |
|-----------------|--|
| Gastrin         | Glu <sub>5</sub> -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH <sub>2</sub>           |
| Cholecystokinin | -Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH <sub>2</sub>                        |
| Minigastrin     | DTPA-DGlu-Glu <sub>5</sub> -Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-PheNH <sub>2</sub> |

Tab. 1.3: Entscheidende Aminosäuresequenz der natürlichen Peptide Gastrin und Cholecystokinin sowie des synthetischen Gastrinanalogs Minigastrin (modifiziert nach Behr und Béhé 2002).

Gastrin und CCK vermitteln ihre Wirkung auf die Zielzelle über zwei verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptortypen, die CCK-A- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren. Diese unterscheiden sich in ihrer Affinität zum Gastrin, wobei der CCK-B/Gastrin-Rezeptor eine deutlich höhere Affinität zum Gastrin und den Gastrinderivaten aufweist als der CCK-A-Rezeptor (Wank et al. 1992, Behr et Béhé 2002). Die Produktion von CCK-A- und CCK-B/Gastrin-Rezeptor mRNA wird von agonistisch wirkenden Peptiden über unterschiedliche Signaltransduktionssysteme intrazellulär reguliert (Gunther et al. 2003).

Der CCK-A-Rezeptor, der eine ca. 1000-fach höhere Affinität für CCK als für Gastrin besitzt, kommt physiologisch in der Gallenblase, im gastrointestinalen System, im Pankreas (Mantyh et al. 1994) und in bestimmten Arealen des ZNS (Moran et al. 1986) vor, der CCK-B/Gastrin-Rezeptor in der Magenschleimhaut (Reubi et al. 1997 c, Nakamura et al. 1988), der Kolonschleimhaut (Singh et al. 1985), der Gallenblase, im Pankreas (Weinberg et al. 1997) sowie weitverbreitet im Gehirn (Moran et al. 1986, Wank et al. 1992).

Aber auch im Tumorgewebe werden diese Rezeptoren exprimiert. Der CCK-A-Rezeptor konnte autoradiographisch in Tumoren eher selten dargestellt werden, z.B. in den gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (38%), den Meningeomen (30%) und den Neuroblastomen (19%) (Reubi et al. 1997 b). Deutlich häufiger hingegen ist der CCK-B/Gastrin-Rezeptor exprimiert, so in 100% der stromalen Ovarialtumoren (Reubi et al. 1997 b), zu 92% in medullären Schilddrüsenkarzinomen (MTC) (Reubi et Waser 1996), zu 65% in differenzierten Astrozytomen, in kleinzelligen Bronchialkarzinomen zu 57%, nicht jedoch in nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Matsumori et al. 1995). Nur gelegentlich lassen sie sich in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren, epithelialen Ovarialtumoren, Endometriumkarzinomen und Mammakarzinomen finden (Reubi et al. 1997 b). Nicht eindeutig ist die Datenlage für das Vorkommen der CCK-B/Gastrin-Rezeptoren bei Kolonkarzinomen. Trotz der gleichen Methode zur Rezeptordarstellung durch Bindungsstudien an Tumorzellmembranen konnten Imdahl et al. keine Rezeptorexpression



nachweisen (Imdahl et al. 1995), wohingegen Upp et al. eine deutliche Rezeptorexpression beschrieben haben (Upp et al. 1989).

### 1.3 Rezeptorszintigraphie in vivo

Peptidrezeptoren werden in vielen humanen Tumoren (über-)exprimiert (Tab. 1.4). Diese Rezeptoren lassen sich mit Hilfe hochspezifischer Radiopeptide lokalisieren und repräsentieren somit neue molekulare Ziele zur Diagnostik und Therapie Rezeptor-exprimierender Neoplasien.

| <i>Peptidrezeptor</i>                  | <i>Tumor</i>  |
|--|---|
| Somatostatin-Rezeptor                  | Neuroendokrine Tumoren (Karzinoide, Gastrinome u.a.)<br>Kleinzelliges Bronchialkarzinom<br>Medulläres Schilddrüsenkarzinom<br>Tumoren des Nervensystems<br>Lymphome |
| CCK-A-Rezeptor                         | Gastroenteropankreatische Tumoren<br>Neuroblastom<br>Meningeom  |
| CCK-B/Gastrin-Rezeptor                 | Medulläres Schilddrüsenkarzinom<br>Kleinzelliges Bronchialkarzinom<br>Stromatumoren des Ovars<br>Differenziertes Astrozytom   |
| Vasointestinales Peptid (VIP)-Rezeptor | Adenokarzinome des Magens, des Darms und des Pankreas<br>Kleinzelliges Bronchialkarzinom<br>Neuroendokrine Tumoren<br>Lymphome                                      |
| Substanz-P-Rezeptor                    | Medulläres Schilddrüsenkarzinom<br>Kleinzelliges Bronchialkarzinom<br>Mammatumoren  |

Tab. 1.4: Peptidrezeptoren, die in humanen Tumoren (über-)exprimiert werden (modifiziert nach Behr et al. 2001 b).

Bei der Entwicklung dieser Radiopeptide ist es einerseits wichtig, eine hohe Anreicherung des Radiopeptids im Tumor zu erreichen, andererseits jedoch einen minimalen Uptake im gesunden Gewebe. Das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis (Tumor-zu-Nichttumor-Ratio) sollte demnach möglichst hoch sein.

Das einzige bisher zur klinischen Anwendung zugelassene Radiopeptid ist das  $^{111}\text{In}(\text{DTPA-D-Phe}^1)\text{-Octreotid}$  (= OctreoScan®), das eine hohe Rezeptoraffinität zu SSTR2, eine geringere Rezeptoraffinität zu SSTR3 und 5, aber keine Affinität zu SSTR1 und 4 aufweist (Reubi et al. 2003). Die SSTR-Szintigraphie wird klinisch vor allem zur Detektion, zum Staging und zur Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren (Karzinoide) und deren Metastasen eingesetzt (Krenning et al. 1989, Lamberts et al. 1990, Krenning et al. 1993). 95% dieser Tumoren werden hiermit szintigraphisch erkannt. Diese Ergebnisse konnten auch in vitro immunhistochemisch durch Janson et al. bestätigt werden (Janson et al. 1998). Aber auch Hypophysenadenome, Paragangliome, Phäochromozytome und Neuroblastome werden durch die  $^{111}\text{In}$ -Octreotid-Szintigraphie sehr gut diagnostiziert (Behr et al. 2001 b).

Bei anderen Tumoren wie dem medullären Schilddrüsenkarzinom (MTC) ist der  $^{111}\text{In}$ -Octreotid Uptake vom Differenzierungsgrad des Tumors abhängig. So konnten Behr et al. zeigen, dass in sehr differenzierten Formen des MTC der Radiopeptid Uptake in vivo sehr hoch, jedoch in klinisch sehr aggressiven und rasch progredienten MTC der Uptake und somit die SSTR-Expression komplett verloren war (Behr et al. 1997). Reubi et al. konnten durch Autoradiographie diese Ergebnisse schon vorher in vitro nachweisen (Reubi et al. 1991). Ein ähnliches Uptakeverhalten zeigt das kleinzellige Bronchialkarzinom. Mit einer Sensitivität von über 90% lassen sich nahezu alle Primärtumoren in der  $^{111}\text{In}$ -Octreotid-Szintigraphie diagnostizieren, jedoch geht dieser hohe Uptake in Metastasen verloren, so dass diese Läsionen nicht mehr lokalisiert werden können (Bohuslawitzki et al. 1996). Ein Verlust der SSTR2-Expression ist auch bei undifferenzierten Kolon- und Pankreaskarzinomen bekannt (Buscail et al. 1996).

Ein anderes klinisch relevantes Radiopeptid zur szintigraphischen Tumordiagnostik und zur Tumortherapie ist das CCK-/Gastrinderivat  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$ . Beim MTC konnten bei Patienten mit bekannten Metastasen alle Läsionen, bei Patienten mit okkulten Metastasen, die durch erhöhte Calcium- oder CEA-Werte auffällig geworden sind, 90% der Läsionen szintigraphisch dargestellt werden (Behr et al. 2001 a). Der physiologische Uptake des Peptids ist auf den Magen als Organ mit der höchsten CCK-B-Rezeptordichte und den

Nieren als Ausscheidungsorgan beschränkt (Behr et al. 1999). Ein großer Vorteil des DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrins gegenüber anderen CCK-Derivaten besteht in dem minimalen Leber- und Milzuptake, so dass dort lokalisierte Metastasen deutlich besser und sicherer identifiziert werden können (Behr et Béhé 2002). Auch erste Therapieversuche mit <sup>90</sup>Y-DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin bei Patienten mit metastasierten MTC zeigen sehr positive Resultate wie den deutlichen Rückgang von mediastinalen Lymphknotenmetastasen und einen Übergang von einem Status der raschen Progression in eine Phase der Stabilisierung. Nachteile dieser Therapie sind die radiotoxische Schädigung der Niere mit der Folge eines chronischen Nierenversagens sowie die Knochenmark-schädigende Wirkung, die zu einem myelodysplastischen Syndrom und zur Thrombopenie führen kann (Behr et al. 2001 b). Ebenfalls lassen sich Karzinoide, Astrozytome und kleinzellige Bronchialkarzinome durch die <sup>111</sup>In-DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin Rezeptorszintigraphie diagnostizieren (Behr et Béhé 2002). Durch die Entwicklung metabolisch stabilerer und rezeptorspezifischerer (Radio-) Peptide sowie aus der Kenntnis Rezeptor-exprimierender Tumoren werden sich in Zukunft hoffnungsvolle diagnostische und therapeutische Möglichkeiten ergeben.

## **1.4 Hirntumore – Astrozytome**

### **1.4.1 Ätiologie und Einteilung der Astrozytome**

Die Astrozytome, die sich von den Astrozyten, den größten Neurogliazellen, ableiten, haben einen Anteil von etwa 40% an den primären Hirntumoren (Kleihues 1995). Sie werden nach der WHO in vier Malignitätsgrade eingeteilt. Als low-grade (niedrig maligne) Astrozytome werden das pilozytische Astrozytom (WHO°I) und das fibrilläre Astrozytom (WHO°II) bezeichnet. Das pilozytische Astrozytom ist der häufigste Hirntumor des Kindes mit einem Altersgipfel zwischen dem 8. und 13. Lebensjahr. Das Astrozytom °II findet sich im jungen Erwachsenenalter mit einem Erkrankungsgipfel in der 3 – 4 Lebensdekade (Kleihues 1995). Das anaplastische Astrozytom (WHO°III) sowie das Glioblastoma multiforme (GBM) (WHO°IV) werden den high-grade (hoch malignen) Astrozytomen zugeordnet. Diese unterscheiden sich von den niedrig-malignen Astrozytomen durch ein diffuses infiltratives Wachstum in das umliegende Hirnparenchym und eine hohe mitotische Tumorzellaktivität.

Der Erkrankungsgipfel liegt mit 50 - 60 Jahren deutlich höher als der der niedrig malignen Astrozytome (Kleihues et Cavenee 2000). Beim GBM sind zwei Entstehungsmechanismen bekannt: das primäre GBM entsteht de novo ohne vorheriges Auftreten eines niedrig malignen Typs und macht 60% aller GBM aus (Codd et Kurland 1985), das sekundäre GBM entsteht durch Progression eines schon bestehenden WHO°II oder °III Tumors. Eine histologische Unterscheidung zwischen primären und sekundären GBM ist nicht möglich (Burger et Green 1987).

Die Einteilung nach der WHO stützt sich auf das histopathologische Bild: je höher die Tumorzelldichte und mitotische Aktivität und je mehr Zell- und Kernpolymorphien vorhanden sind, desto maligner ist der Tumor einzustufen. Der Nachweis von Endothelproliferationen und Tumorzellnekrosen hat für das GBM entscheidende diagnostische Bedeutung (Kleihues 1995).

Während bei Patienten mit niedrig malignen Astrozytomen die mittlere Überlebenszeit 5 Jahre beträgt, haben die Patienten mit einem GBM nur eine mittlere Überlebenszeit von 5 - 12 Monaten nach Diagnosestellung (Kleihues et Cavenee 2000).

#### **1.4.2 Therapie des Glioblastoma multiforme (GBM)**

Das hochmaligne GBM gehört zu den bösartigsten Tumoren des Menschen. Es macht 15 - 23% aller intrakraniellen Tumoren aus (Van den Berg 1992). Aufgrund seines diffus infiltrativen Wachstums in das umliegende Hirnparenchym ist die Therapie des GBM problematisch und wenig aussichtsreich, so dass sich die Prognose in den letzten Jahren nicht entscheidend verbessert hat.

Nach Diagnosestellung, zu der entscheidend eine kontrastmittelverstärkte kraniale Magnetresonanztomographie (MRT) beiträgt, wird zunächst die mikrochirurgische Resektion angestrebt. Eine radikale Operation trägt dabei entscheidend zur Lebensverlängerung bei (Hess 1999) und verbessert die neurologische Symptomatik. Eine komplette Resektion ist jedoch aufgrund der diffusen Tumordinfiltration nicht möglich.

Die zweite wichtige Therapiesäule stellt die postoperative perkutane Strahlentherapie mit einer Herddosis von 60 Gy dar, die ebenfalls lebensverlängernd wirkt (Walker et al. 1978). Die konventionell fraktionierte Bestrahlung wird mit einer Einzeldosis zwischen 1,8 und 2 Gy durchgeführt. Dabei erholen sich Gehirn und Rückenmark von der strahleninduzierten Schädigung relativ gesehen besser als das Tumorgewebe. Durch eine radiochirurgische

Dosisaufsättigung kann jedoch keine entscheidende Verbesserung der Überlebenszeit erreicht werden (Engenhart-Cabillic 2003). Andere Arbeitsgruppen konnten mit einer radiochirurgischen Dosisaufsättigung bis 20 Gy eine mittlere Überlebenszeit von 10 - 26 Monaten erzielen (Löffler et al. 1992, Masciopinto et al. 1995, Sarkaria et Mehta 1995). Diese positiven Ergebnisse sind jedoch sehr wahrscheinlich überwiegend Folge der Patientenselektion. Der zusätzliche Einsatz einer Brachytherapie (Suh et Barnett 1999), die Implantation von <sup>125</sup>I-Seeds in das Tumorbett (Videtic et al. 1999) und der Einsatz radiosensibilisierender Pharmaka (Werner-Wasik et al. 1996, Mirabell et al. 1999) bringen keinen Überlebensvorteil.

Der Nutzen einer systemischen Chemotherapie zusätzlich zur Strahlentherapie wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Die NOA-01 Studie zeigt, dass mit einer Kombination aus Ara-C/ACNU (Cytarabin/Nimustin) oder VM-26/ACNU (Teniposid/Nimustin) postoperativ während und nach der perkutanen Bestrahlung eine mediane Überlebenszeit von 18 Monaten erreicht werden kann (Kortmann et al. 2003). In der Primär- wie in der Rezidivsituation ist die Substanz Temozolomid, die den Patienten oral verabreicht wird und nebenwirkungsarm ist, indiziert und zeigt eine Verdopplung der 2-Jahres-Überlebensrate (Yung et al. 1999, Stupp et al., 2004). Viele andere Mono- oder Kombinationstherapien haben keinen positiven Einfluss auf die Überlebenszeit. Einen neuen interessanten Ansatz stellt die Gentherapie dar: der Einsatz neuronaler Stammzellen lieferte in Tierexperimenten erste vielversprechende Ergebnisse (Aboody et al. 2000, Benedetti et al. 2000).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Injektion eines Radiopeptids in den Tumor (z.B. markiertes Octreotid), die zu einer schnellen Verteilung der Substanz im Tumorgebiet führt (Merlo et al. 2003).

Trotz dieser Therapieoptionen bleibt die Prognose der Patienten infaust, da der Tumor aggressiv infiltrierend wächst und trotz aller Therapiemaßnahmen regelmäßig rezidiert.

## **1.5 Zellzyklus und Radiotherapie**

### **1.5.1 Der Zellzyklus**

Der Zellzyklus, der zu einer Kopie einer somatischen Zelle führt, wird in vier Phasen eingeteilt. Die Phaseneinteilung beruht auf autoradiographische Untersuchungen von Howard und Pelc aus dem Jahr 1953 (Howard et Pelc 1953). Die erste Phase unmittelbar nach einer abgelaufenen Mitose wird als G<sub>1</sub>-Phase bezeichnet, in der die neu entstandene Zelle durch Proteinsynthese und Aufbau von Zytoplasmastrukturen wächst. Einigen Zellen wie den Nervenzellen ist es möglich, aus dieser G<sub>1</sub>-Phase in die G<sub>0</sub>-Phase überzutreten, in der sie nicht mehr aktiv am Zellzyklus teilnehmen und sich nicht mehr teilen. Nach Abschluss der G<sub>1</sub>-Phase folgt die Synthese(S)-Phase, die zur Replikation und Verdopplung der DNA führt. Hiernach durchläuft die Zelle die G<sub>2</sub>-Phase, die zur Vorbereitung der Zelle für die nächste Phase, die Mitose(M)-Phase, in der sich die Zelle in zwei identische Tochterzellen teilt, dient. Die Länge des Zellzyklus ist stark von der untersuchten Zellart abhängig. Dabei ist der Unterschied in der Länge der G<sub>1</sub>-Phase (wenige Stunden bis Tage) zwischen verschiedenen Zellarten am größten, wohingegen die S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase zeitlich nur eine geringe Variationsbreite zwischen 8 und 20 Stunden aufweisen.

Die Progression innerhalb des Zyklus wird vor allem durch die periodische Aktivierung der cyclinabhängigen Kinasen (CDK's) und der Cycline, die gemeinsame Komplexe bilden, sehr sensibel und genau reguliert.

Der Zellzyklus kann an sogenannten G<sub>1</sub>- oder G<sub>2</sub>-Checkpoints für eine gewisse Zeit angehalten werden, um Zellgröße, extrazelluläre Signale und Genomintegrität zu bewerten und um der Zelle zugeführten Schaden, wie zum Beispiel einen strahleninduzierten DNA-Schaden, zu reparieren. Diese Kontrollpunkte werden durch die molekularen Checkpointgene reguliert und kontrolliert (Hall 2000).

### **1.5.2 Bestrahlung und Zellzyklus**

Durch eine Bestrahlung von außen wird der Zellzyklus, abhängig von der augenblicklichen Phase der Zelle während der Strahleneinwirkung, sehr stark beeinflusst (Sinclair et Morton 1963). Die Radiosensitivität ist während der M- und der G<sub>2</sub>-Phase am höchsten, weniger

sensitiv in der G<sub>1</sub>-Phase und am wenigsten in der späten S-Phase (Sinclair et Morton 1966). Das bedeutet, dass in der späten S-Phase deutlich mehr Zellen eine Bestrahlung überleben als in der G<sub>2</sub>- oder M-Phase.

Die Zellen nutzen komplizierte Proteinsignalsysteme, um einen strahleninduzierten Schaden an der DNA und der Zellmembran zu erkennen. Bei Detektion des Schadens wird durch intrazelluläre Signalkaskaden die Aktivität der Gene moduliert, die zur Apoptose, zum Zellzyklusarrest oder zur Reparatur des DNA-Schadens führen. Für eine adäquate Antwort ist daher die Aktivierung und Inhibierung vieler zellulärer Moleküle notwendig (Lewanski et Gullick 2001).

Der durch die Bestrahlung induzierte DNA-Schaden führt zu einer Aktivierung von Checkpoint-Genen und zu einem Stopp der Progression innerhalb des Zellzyklus. Das heißt, es kommt zu einem kontrollierten zeitlichen Arrest in einer bestimmten Zellzyklusphase, in der eine Reparatur des gesetzten Schadens durch DNA-Reparatursysteme möglich ist, bevor die Zelle durch Mitose geteilt wird (Hartwell et Weinert 1989). Es werden der G<sub>1</sub>- und der G<sub>2</sub>-Checkpoint unterschieden. Die Aktivierung des G<sub>1</sub>-Checkpoints verhindert die Replikation zerstörter DNA vor Eintritt der Zelle in die S-Phase, die Aktivierung des G<sub>2</sub>-Checkpoints verhindert die Trennung aberranter Chromosomen während der Mitosephase (Kaufmann et Paules 1996).

Ein entscheidendes Protein, das am Anfang der Checkpoint-Aktivierungskaskade steht, ist das Ataxia teleangiectasia mutated-Gen (ATM) (Samuel et al. 2002). Es wird nach strahleninduzierter Schädigung der DNA aktiviert und führt zur Phosphorylierung von nachgeschalteten Proteinen wie p53, MDM2 und CHK2 (human checkpoint-Kinase 2) (Bakkenist et Kastan 2003). Die Bedeutung von ATM für den Zellzyklus-Arrest nach Bestrahlung konnten Paules et al. 1995 feststellen, indem sie bei Zellen von Patienten, die an Ataxia teleangiectatica litten, einen defekten G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Arrest zeigen konnten (Paules et al. 1995). Die Aktivierung von CHK2 durch ATM führt über eine Hemmung cyclinabhängiger Kinasen zu einem G<sub>2</sub>-Arrest, der Aktivierung von p53 durch ATM folgt eine Aktivierung von p21, die ebenfalls über Inhibierung cyclinabhängiger Kinasen in einem G<sub>1</sub>-Arrest endet. Die Zyklusverzögerung in der G<sub>2</sub>-Phase scheint dabei im Hinblick auf einen möglichen Eintritt in die Apoptose die bedeutendste zu sein (Cohen-Jonathan et al. 1999; Pawlik et Keyomarsi 2004).

Mutationen in den Zellzyklus-regulierenden Genen finden sich häufig in humanen Tumoren, was zu einer erhöhten Resistenz der Tumorzellen gegenüber ionisierenden Strahlen führen kann (Teyssier et al. 1999).

### 1.5.3 Strahleninduzierter Zelltod

Der Bestrahlung einer Zelle folgt neben der Zellmembranschädigung vor allem der Einzel- oder Doppelstrangbruch der nukleären DNA, so dass daraus der Tod der Zelle resultieren kann. Hierbei werden 2 Formen unterschieden: die Apoptose und die Nekrose (Pawlik et Keyomarsi 2004).

Die Apoptose ist die Antwort der Zelle auf einen entdeckten DNA-Schaden oder auf eine Schädigung der Zellmembran und beschreibt den aktiven, programmierten Zelltod. Sie verhindert das Fortbestehen einer Zelle mit genetischen Mutationen und besitzt somit schützende Eigenschaften für den Organismus. Histologisch kennzeichnend für diesen Prozess ist die DNA-Fragmentierung des Kerns, die Chromatinkondensierung, die membrangebundenen Apoptosekörperchen sowie die Eosinophilie des Zytoplasmas (Cohen-Jonathan et al. 1999; Pawlik et Keyomarsi 2004).

Im Gegensatz dazu ist die Nekrose ein passiver Prozess. Sie ist die häufigste Form des Zelltods nach Bestrahlung. Zwar passieren geschädigte Zellen noch die M-Phase, jedoch kommt es durch die Doppelstrangbrüche der DNA zu Chromosomenaberrationen der Tochterzelle, die somit letale chromosomale Fehler aufweist (Revell 1983; Bryant 1984). Charakteristisch für die Histologie der Nekrose ist die Zellschwellung, die Dilatation zytoplasmatischer Vesikel sowie der zufällige DNA-Abbau (Cohen-Jonathan et al. 1999, Pawlik et Keyomarsi 2004).

Ein entscheidendes Protein für die Aktivierung der strahleninduzierten Apoptose ist das Tumorsuppressorgen p53. Es reguliert die Expression vieler Proteine, die in den Apoptoseweg involviert sind. Unter anderem phosphoryliert es das BAX, das einen direkten apoptotischen Effekt auf die Zelle besitzt (Fei et El-Deiry 2003). Ein anderes durch p53 induzierbares Protein ist der FAS-Rezeptor an der Zellmembran (Owen-Schaub et al. 1995). p53 kann also sowohl zum G1-Zellzyklus-Arrest als auch zur Apoptose führen. Welcher dieser beiden Wege eingeschlagen wird, ist von der Menge an p53 sowie von bestimmten posttranslationalen Modifikationen abhängig (Pawlik et Keyomarsi 2004). Mutationen im p53-Gen die in vielen humanen Tumoren zu finden sind, sind häufig mit einer raschen Tumorprogression sowie mit einer Resistenz gegen die Radiojodtherapie assoziiert (Lewansi et Gullick 2001).



## 1.6 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

In der radiobiologischen Forschung wird die strahleninduzierte intrazelluläre Signaltransduktion, Genregulation sowie Proteintranskription sehr genau untersucht. Jedoch ist wenig bekannt darüber, wie sich der Rezeptorstatus auf der Zellmembran als Folge der veränderten intrazellulären Abläufe verändert. Das ist deshalb interessant, weil dadurch eventuell Aussagen über die Vitalität der Zelle nach Bestrahlung getroffen werden können. Diese auf der Zellmembran exprimierten Rezeptoren lassen sich mit einem radioaktiv markierten rezeptorspezifischen Peptid szintigraphisch darstellen. Es ist beispielsweise nach einer Bestrahlung von Hirntumoren radiologisch nur schwer möglich zwischen nekrotischem und vitalem Tumorgewebe zu unterscheiden, was die Nachsorge dieser Patienten deutlich erschwert. Zudem könnten durch Bestrahlung vermehrt exprimierte Rezeptoren ideale Angriffspunkte für eine nuklearmedizinische Peptidtherapie darstellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst das Vorhandensein von CCK-B/Gastrin-Rezeptoren und Somatostatin-Rezeptoren bei sechs Glioblastomzelllinien und einer exokrinen Pankreastumorzelllinie *in vitro* untersucht werden. Im Gegensatz zu den Glioblastomzelllinien ist der positive Rezeptorstatus bei der exokrinen Pankreastumorzelllinie AR42J sowohl für das CCK-B/Gastrin als auch für das Somatostatin eindeutig belegt (Scemama et al. 1987; Seva et al. 1990; Gunther et al. 2003; Viguerie et al. 1988; Vidal et al. 1994; Froidevaux et al. 1999; Hofslis et al. 2002).

Bei positivem CCK-B/Gastrin- und/oder SST-Rezeptorstatus sollte das Verhalten und die Regulation der Rezeptorexpression auf externe Bestrahlung *in vitro* untersucht werden. Dabei wurde die Änderung der Rezeptorexpression in Abhängigkeit von der Zeit nach der externen Bestrahlung besonders beobachtet.

Als nächster Schritt sollten die *in vitro*-Ergebnisse in *in vivo*-Experimenten bei tumortragenden Nacktmäusen bestätigt werden. Dafür wurde in Bioverteilungsstudien die Anreicherung von mit einem Radiometall markierten Gastrin- und Somatostatin-Derivat ( $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin und  $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-Octreotid) in den Organen sowie in dem subkutan wachsenden Tumoren zu einem bestimmten Zeitpunkt nach externer Bestrahlung untersucht, um somit von dem Radiopeptiduptake auf die Rezeptorexpression schließen zu können.

## **2. Material und Methoden**

Die Materialien wurden, falls nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: die Materialien für die Zellkultur von der Firma Greiner, Frickenhausen, Deutschland; die Kulturmedien RPMI 1640 und DMEM von der Firma PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland; die Kulturzusätze von der Firma PAA, Pasching, Österreich; die unmarkierten Peptide SMS-14 und Minigastrin von der Firma Bachem, Heidelberg, Deutschland; die Chemikalien von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte am Gamma-Counter COBRA II der Firma Packard, Groningen, Niederlande. Die Bestrahlungen wurden mit dem Linearbeschleuniger PRECISE (Elekta Oncology Systems) durchgeführt.

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Zelllinien und Kultur**

Die Versuche wurden an folgenden Glioblastomzelllinien durchgeführt: G109 (human, sekundäres GBM), G139 (human, de novo GBM), C6 (Ratte); LN 18, LN 229, LN 308 (human).

Die G109- und G139-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin, die C6-, LN18-, LN229- und LN308-Zellen in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) unter Zusatz von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin, sowie zusätzlich 1% L-Glutamin bei C6, in 550 ml Zellkulturflaschen kultiviert.

Ein kompletter Wechsel des Nährmediums erfolgte alle 2 - 3 Tage.

Bei einer Konfluenz von 80 - 90% wurden diese als adhärenter Monolayer wachsenden Zellen passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium aus der Flasche abgesaugt, 5 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und bei 37°C im Brutschrank für 5 Minuten inkubiert.

Die nun abgelösten Zellen wurden in Einmalröhrchen pipettiert, mit 10 ml frischem Medium versetzt und bei 1200 U/min 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischem Medium gelöst. G109-, G139-, LN18-, LN229- und LN308-Zellen wurden im Verhältnis 1:3 – 1:5, die C6-Zellen im Verhältnis 1:20 – 1:30 auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt.

Ebenfalls wurden Experimente mit der exokrinen Pankreastumorzelllinie der Ratte AR42J durchgeführt. Diese adhärent wachsenden Zellen wurden in DMEM-Medium unter Zusatz von 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% BME-Vitaminen in 550 ml Zellkulturflaschen kultiviert und bei einer Konfluenz von 60 - 70% im Verhältnis 1:4 subkultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage.

Der Mediumwechsel sowie das Passagieren der Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Workbench durchgeführt und die Zellen in einem Brutschrank (beides Firma Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C in einer mit 5% CO<sub>2</sub> angereicherten Luft gelagert.

### **2.1.2 Kryokonservierung der Zellen**

Als Einfriermedium diente das für die jeweilige Zelllinie hergestellte Medium (siehe 2.1.1.) mit einem Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Fluka, Buchs, Schweiz). Zunächst wurden die einzufrierenden Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA versetzt, 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, danach die gelösten Zellen mit 10 ml frischem Medium in ein Einmalröhrchen gegeben und bei 1200 U/min 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml des frisch hergestellten und steril filtrierten Einfriermediums gelöst und jeweils 1 ml davon in ein Kryoröhrchen pipettiert. Diese wurden umgehend in einem Styroporbehälter (Wanddicke 3 - 4 cm) gegeben und direkt in einen Tiefgefrierschrank (-80°C) gestellt. Dort konnten die Zellen entweder zur Kurzzeitkonservierung für 2 - 4 Monate gelagert oder zur Langzeitkonservierung nach 24 h in den Flüssigstickstoffbehälter (-196°C) überführt werden.

### **2.1.3 Auftauen eingefrorener Zellen**

Die im Tiefgefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  oder im Flüssigstickstoffbehälter bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagerten Kryoröhrchen wurden sofort nach Herausnahme im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt und, sobald der gesamte Inhalt flüssig war, in eine Zellkulturflasche (250 ml) mit 12 ml auf  $37^{\circ}\text{C}$  angewärmtem Medium pipettiert.

Nach 24 h folgte ein Mediumwechsel zur Entfernung des DMSO-haltigen Einfriermediums.

### **2.1.4 Sphäroidwachstum bei LN18-Zellen**

LN18 Zellen wurden im Verhältnis 1:5 in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 Tage durchgeführt, jedoch erfolgte trotz eines absolut dichten Monolayers und einer Konfluenz von 100% keine Subkultivierung der Zellen. Es kam zur Überwucherung des Flaschenbodens und folglich zur Ablösung vieler zuvor adhärenter Zellen. Diese wurden beim Mediumwechsel entfernt. Die weiterhin adhärenen Zellen begannen nach circa 3 Wochen, sich sphäroidartig zusammenzulagern und im Laufe der Zeit an Größe und Durchmesser zuzunehmen.

### **2.1.5 Stimulation von G109-Zellen mit AR42J-Medium**

Zunächst wurde das Medium von RPMI 1640 auf DMEM unter Zusatz von 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin umgestellt. Nachdem kein Unterschied in der Morphologie und im Wachstumsverhalten der Zellen zu den in RPMI 1640 kultivierten Zellen zu erkennen war, wurden sie 1 Woche lang mit 1 - 2 Tage in AR42J-Kultur benutztem und nach dem Abpipettieren steril filtriertem Medium weiter kultiviert. Durch die von AR42J-Zellen in das Medium sezernierten Proteine sollte SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression der Glioblastomzelllinie G109 initiiert werden.

## 2.2 Peptidmarkierung mit dem Radionuklid $^{111}\text{In}$

### 2.2.1 Markierung des Somatostatinanalogons Octreotid mit $^{111}\text{In}$

Die Markierung erfolgte mittels eines vorgefertigten Kits der Firma Mallinckrodt (Petten, Niederlande).

1,1 ml Lösung enthielt  $^{111}\text{In}$  als Indium(III)-chlorid  $15 \times 10^{-6}$  mg (0,68 nmol) entsprechend 122 MBq am Aktivitätsreferenzzeitpunkt. Diese wurde in ein Fläschchen, das 10  $\mu\text{g}$  Octreotid in 18 mg Trockensubstanz enthielt, zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubationsphase entstand gebrauchsfertiges  $^{111}\text{In}$ -Octreotid, das mit 2 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) verdünnt wurde, um ein leichter zu handhabendes Volumen zu erhalten.

### 2.2.2 Markierung von DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin mit $^{111}\text{In}$

Zu 1  $\mu\text{l}$  DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin ( $c = 7 \times 10^{-5}$  mol/l) wurde 100  $\mu\text{l}$  eines 0,5 M Natriumacetat-Puffers (pH 5,4) in ein Eppendorff-Gefäß gegeben. Anschließend wurden 18,5 MBq frisches  $^{111}\text{InCl}_3$  dazu pipettiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

### 2.2.3 Qualitätskontrolle der Markierung

Eine Sep-Pak C-18-Kartusche (Waters, Milford, Massachusetts, USA) wurde zunächst mit 2 ml Methanol, dann mit 2 ml 0,5 M Natriumacetat-Puffer pH 5,4 (NaAc-Puffer) durchspült. 1  $\mu\text{l}$  vom  $^{111}\text{In}$  markierten DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin bzw.  $^{111}\text{In}$ -Octreotid wurde auf die Kartusche gegeben und diese erst mit 2 ml NaAc-Puffer, danach mit 2 ml Methanol durchspült und jede Fraktion in einem Röhrchen aufgefangen, so dass das unmarkierte  $^{111}\text{In}$  (im Puffer) von  $^{111}\text{In}$  markierten DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin (im Methanol) getrennt wurde. Die Kartusche wurde in ein drittes Röhrchen gegeben.

Die drei Röhrchen wurden im Bohrlochmessplatz gemessen (in cpm).

Das Ergebnis der Markierung wird als Anteil des nicht markiertes  $^{111}\text{In}$  dargestellt.

$$\frac{\text{cpm (Puffer)} \times 100}{\text{cpm (Puffer)} \times \text{cpm (Methanol)} \times \text{cpm (Kartusche)}} = \% \text{ nicht markiertes } ^{111}\text{In}$$

### 2.3 Blockierungsversuche der CCK-B/Gastrin- und SST2-Rezeptoren

Die Blockierungsversuche von  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin an den CCK-B/Gastrin-Rezeptor wurden an den AR42J-Zellen, den sechs in 2.1.1. aufgeführten Glioblastomzelllinien, den LN18-Sphäroiden, den mit AR42J-Medium stimulierten G109-Zellen, den mit 8 und 16 Gy bestrahlten G109- und LN229-Zellen nach 40 und 60 Stunden sowie bei den mit 4, 8, bzw. 16 Gy bestrahlten AR42J Zellen jeweils nach 24, 48, 72, 96, 120 und 168 Stunden durchgeführt.

Die Blockierungsversuche von  $^{111}\text{In}$ -Octreotid an den SST2-Rezeptor erfolgten auf die gleiche Weise an den AR42J-Zellen, den Glioblastomzelllinien G109, G139, LN 18, LN 229 und C6, den mit AR42J-Medium stimulierten G109-Zellen, den mit 8 und 16 Gy bestrahlten G109-Zellen nach 40 und 60 Stunden und den mit 4,8 oder 16 Gy bestrahlten AR42J-Zellen jeweils nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 und 168 Stunden.

Die jeweiligen Zellen wurden 2 - 3 Tage vor Versuchs- bzw. Bestrahlungsbeginn (außer LN18-Sphäroide, s. 2.1.4.) in 6-Well-Platten (Durchmesser 3 cm pro Well) ausgesät.

Vor Versuchsbeginn wurde die Platte in zwei Gruppen à 3 Wells eingeteilt, das Nährmedium, das 24 h zuvor gewechselt wurde, abgesaugt und in jedes Well 1 ml Reaktionsmedium, bestehend aus DMEM- bzw. RPMI/1640-Medium (je nach Zelllinie) unter Zusatz von 1% BSA (bovines Serumalbumin; Fluka, Buchs, Schweiz) hinzugegeben. In die drei Wells der zweiten Gruppe wurde nun als Blocksubstanz unmarkiertes Somatostatin-14 (Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-**Phe-Trp-Lys-Thr**-Phe-Thr-Ser-Cys) bzw. unmarkiertes humanes Minigastrin (Leu-(Glu)<sub>5</sub>-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe) in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-6}$  M pipettiert. Danach wird in alle Wells annähernd 16 kBq  $^{111}\text{In}$ -Octreotid bzw.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin (Markierung s. 2.2.2.) zugegeben und für 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und zwei Mal mit je 1 ml PBS gewaschen, um ungebundene Liganden zu entfernen.

Mit 1 ml 1M Natronlauge (NaOH) pro Well wurden die Zellen lysiert, das Zelllysat in ein Röhrchen überführt und in einem Gamma-Counter gemessen.

Bei den Bestrahlungsversuchen mit den AR42J-Zellen wurde sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den mit 4, 8 bzw. 16 Gy bestrahlten Zellen ein Well für die Bestimmung der Zellzahl genutzt. Dazu wurde nach den zwei Waschschritten mit PBS in ein Well 1 ml Trypsin/EDTA pipettiert und 5 Minuten inkubiert, bis alle Zellen vom Boden abgelöst waren. Diese wurden in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl pro Well bestimmt, um den Peptiduptake pro Zelle zu ermitteln.

Der spezifische Peptiduptake wurde folgendermaßen berechnet:

Mittelwert Gruppe 1 (Radiopeptid) – Mittelwert Gruppe 2 (Radiopeptid + Blocksubstanz)

#### **2.4 Internalisierung der CCK-B/Gastrin- und SST2-Rezeptoren bei AR42J**

Die AR42J-Zellen wurden 3 Tage vor Versuchsbeginn in zwei 6-Well-Platten ausgesät und 24 Stunden vorher ein Mediumwechsel durchgeführt.

Zunächst wurden die zwei 6-Well-Platten in 4 Gruppen á 3 Wells eingeteilt. Jedes Well wurde mit 1 ml PBS gewaschen und 1 ml DMEM unter Zusatz von 1% BSA als Reaktionsmedium zugesetzt. In die Wells der Gruppen 3 und 4 wurde als Blocksubstanz wie bei den Blockierungsversuchen (s.2.3) unmarkiertes Somatostatin-14 bzw. unmarkiertes humanes Minigastrin in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-6}$  M zugegeben. Dann wurde, nach Zugabe von ca. 16 kBq  $^{111}\text{In}$ -Octreotid bzw.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin in jedes Well, bei 37°C für 20 Minuten inkubiert, um die Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe zu initiieren. Nach Absaugen des Überstandes wurde den Gruppen 1 und 3 je 1 ml PBS, den Gruppen 2 und 4 je 1 ml saurer 0,05 M NaAc-Puffer (pH 3) zum Ablösen der nicht internalisierten Rezeptoren von der Zelloberfläche zugesetzt und 6 min auf Eis inkubiert, um die Internalisierung zu stoppen. Anschließend wurde jedes Well mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und 1 ml 1 M NaOH zur Zelllyse in jedes Well hineingegeben. Das Zelllysat wurde in ein Röhrchen überführt und im Gamma-Counter gemessen.

Zur Auswertung wurde der Mittelwert (MW) der jeweiligen Gruppe gebildet und die Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{MW 2 (Radiopeptid + NaAc)} - \text{MW 4 (Radiopeptid + NaAc + Blocksubstanz)} \times 100}{\text{MW 1 (Radiopeptid)} - \text{MW 3 (Radiopeptid + Blocksubstanz)}}$$

= % internalisierte Rezeptoren

Die Puffer und das Reaktionsmedium wurden sowohl bei den Blockierungs- als auch bei den Internalisierungsversuchen am Versuchstag neu hergestellt.

## **2.5 Bestrahlung der Zellkulturen in vitro**

### **2.5.1 Aufbau**

Die 6-Well-Platten mit den zu bestrahlenden adhären Monolayerzellen wurden auf einer 1,2 cm hohen Platte (40x40 cm), die dem Aufbaueffekt dient, in die Mitte des Linearbeschleunigers positioniert. Auf die 6-Well-Platte wurden 5 jeweils 1 cm hohe Platten (40x40 cm) als Rückstreumaterial gelegt. Durch die Tischplattenhöhe von 1 mm, die 12 mm hohe Platte für den Aufbaueffekt und den 2 mm Abstand des Monolayers vom Boden der 6-Well-Platte ergab sich eine Höhe von 15 mm von der Unterseite des Tisches bis zu den Zellen. Der Fokus-Herd-Abstand betrug 98,5 cm (Abb. 2.1.).



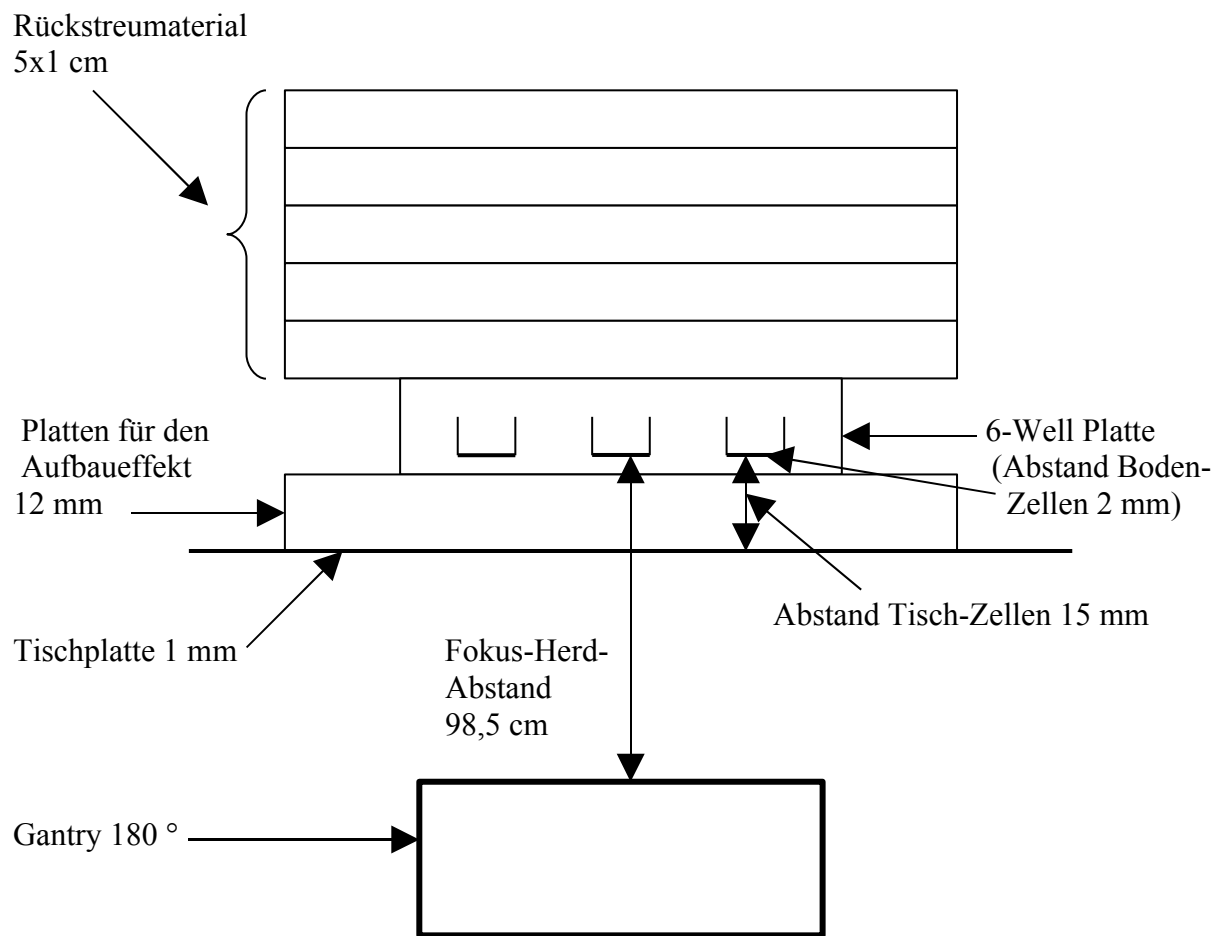


Abb. 2.1: Skizze zum Aufbau der Zellbestrahlungsexperimente in vitro

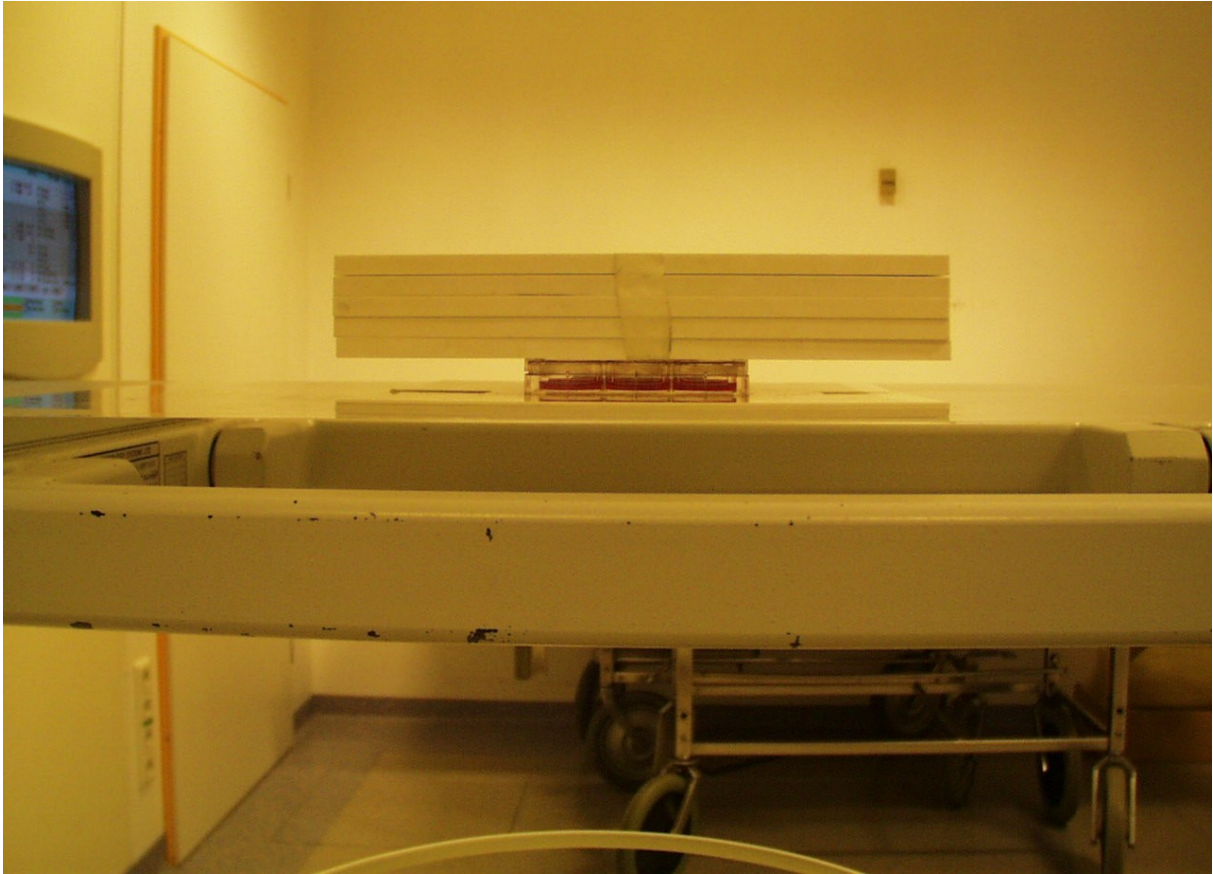


Abb. 2.2: Foto zum Aufbau der Zellbestrahlungsexperimente in vitro

### 2.5.2 Dosierung und Bestrahlungsparameter

Die Zellen wurden am Linearbeschleuniger PRECISE (Elekta) mit einer Energie von 6 MeV Photonen bestrahlt.

Die Dosierung erfolgte auf eine Tiefe von 15 mm, das Maximum der Einzellherddosis (EHD), lag mit 100% in 15 mm.

Die Gantrystellung betrug  $180^\circ$ , die Collimatorrotation  $0^\circ$ . Die Herdtiefe (HT) lag bei 15 mm, der Fokus-Herd-Abstand (FHA) bei 98,5 cm. Keile wurden nicht verwendet.

Die Feldform wurde mit  $X = 40$  cm und  $Y = 40$  cm symmetrisch gewählt. Die Größe des Feldes entsprach der Größe der Platten für den Aufbaueffekt und der Rückstreuplatten.

Aus den oben genannten Parametern ergaben sich für eine Dosis von 2 Gy 175,43 Monitoreinheiten (ME) am Linearbeschleuniger PRECISE, das entsprach für 4 Gy 350,86 ME, für 8 Gy 701,72 ME und für 16 Gy 1403,33 ME.

Der Fehler bei der Bestrahlung betrug jeweils maximal  $\pm 2\%$  der applizierten Dosis (Gy).

### **2.5.3 Bestrahlungsexperimente der Zellkulturen in vitro**

Die Glioblastomzelllinien G109 und LN 229 wurden mit 8 und 16 Gy bestrahlt und nach 40 und 60 Stunden ein Rezeptorblockversuch (wie in 2.3 beschrieben) sowohl mit  $^{111}\text{In}$ -Octreotid als auch mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-Dlu<sup>1</sup>-minigastrin durchgeführt.

Die AR42J-Zellen wurden mit 4, 8 bzw. 16 Gy bestrahlt und Blockversuche für beide Peptide zwischen 4 und 168 Stunden durchgeführt.

Bei jedem Versuch wurde parallel der Peptiduptake für unbestrahlte Zellen gemessen.

Zudem wurden AR42J-Zellen zur Ermittlung der Wachstumskurven ebenfalls mit 4, 8 bzw. 16 Gy bestrahlt und die Zellen pro Well nach 24, 48, 72, 96, 120 und 168 h ausgezählt.

## **2.6 Tierexperimente**

Um die Resultate des Peptiduptakes nach Bestrahlung der AR42J-Zellen in vivo zu bestätigen, wurden subkutan in Nacktmäusen gewachsene AR42J-Tumoren mit 10 Gy bestrahlt und nach 42 Stunden der spezifische Peptiduptake des Tumors und der Organe für  $^{111}\text{In}$ -Octreotid und für  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin gemessen (jeweils 3 Mäuse). Parallel dazu wurde der Peptiduptake bei Mäusen mit unbestrahlten Tumoren ermittelt (für jedes Peptid ebenfalls je 3 Mäuse).

### **2.6.1 Injektion von AR42J-Zellen in die Maus**

Pro Nacktmaus wurden etwa 1 Million AR42J-Zellen aus einer in vitro Zellkultur subkutan injiziert. Nach 4 - 6 Wochen war ein deutlich abgrenzbarer Tumor sichtbar. Dieser sollte möglichst an der Hinterflanke lokalisiert sein, um die Maus bei der Bestrahlung so zu lagern, dass der Zentralstrahl unter maximaler Schonung der umliegenden Gewebe und Organe optimal auf den Tumor eingestellt werden kann.

### **2.6.2 Sedierung der Maus**

Zur Sedierung der Maus während der Bestrahlung diente eine physiologische NaCl Lösung (0,9%) mit einem Anteil von 12% Hostaket® (Ketamin) und 8% Rompun 2%® (Xylazin). Es wurden 0,1 ml pro 10 g/KG subkutan in die Maus injiziert; die Sedierung hielt etwa 30 - 45 min an.

### **2.6.3 Lagerung und Bestrahlung der Maus**

Um die Maus während der Bestrahlung optimal zu fixieren wurde eine Plexiglasvorrichtung angefertigt.

Zwischen die jeweils 1,2 cm breiten, senkrecht stehenden und verschiebbaren Plexiglaswände wurde auf den Boden ein Pappkarton zur Lagerung der Maus gelegt, so dass der innere Abstand zwischen den Plexiglaswänden 5,9 cm betrug. Die Maus wurde so gelagert, dass der an der Hinterflanke lokalisierte Tumor an exponierter Stelle oben lag. Um die Maus wurde ein zum Halbkreis geformtes Maskenmaterial, das zur Anfertigung von Kopfmasken zur Schädelbestrahlung verwendet wird, gelegt und an den Tumor anmodelliert. Auf das Maskenmaterial wurden mit Wasser gefüllte Luftballons gelegt, um die durch die Luft verursachte Dosisabweichung minimal zu halten. Durch das Maskenmaterial wurde das Gewicht der Ballons abgefangen und nicht auf die sedierte Maus übertragen.

Die Bestrahlung des Tumors erfolgte am Linearbeschleuniger PRECISE mit 6 MeV Photonen. Der Zentralstrahl wurde auf den Tumor gerichtet. Der Tumor wurde mit zwei opponierenden Feldern und einer Dosis von jeweils 5 Gy pro Feld (entsprechend 255,75 ME pro Feld) bestrahlt. Die Gantrydrehung betrug 90° bzw. 270°.

Die Berechnungen der Monitoreinheiten erfolgten unter Einbeziehung der Abmessungen zum Versuchsaufbau mit Hilfe des Programms HELAX.

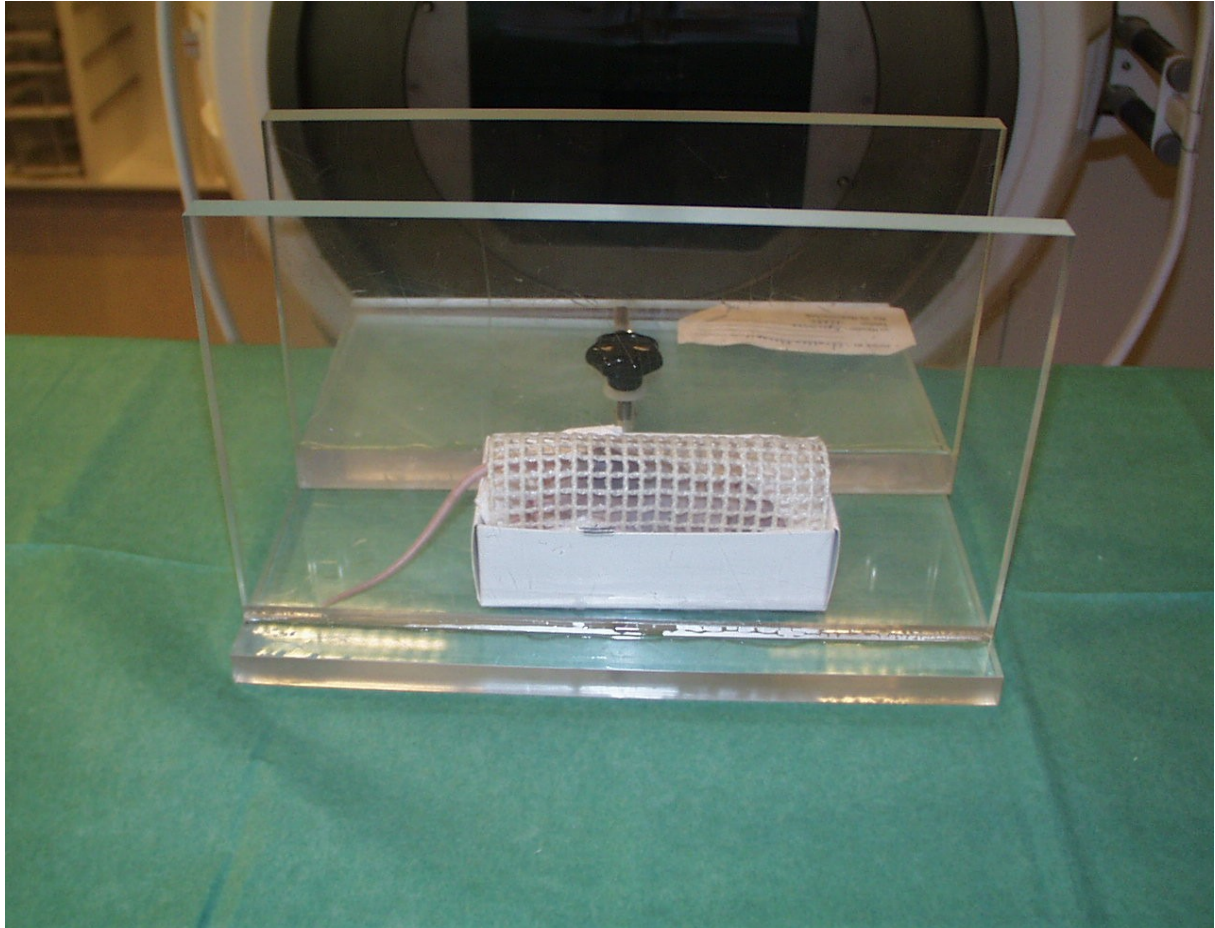


Abb. 2.3: Lagerung der Maus für die Bestrahlung

#### 2.6.4 Biodistribution der markierten Radiopeptide

48 Stunden nach der Einzeitbestrahlung des Tumors mit 10 Gy wurden zur Bestimmung des  $^{111}\text{In}$ -Octreotid- bzw.  $^{111}\text{In}$ -Minigastrin-Uptakes der einzelnen Organe und des Tumors 0,37 MBq  $^{111}\text{In}$ -Octreotid bzw. 0,37 MBq  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin, verdünnt auf 100  $\mu\text{l}$  mit physiologischer Kochsalzlösung, in die Schwanzvene der Maus injiziert. Pro Peptid wurden drei bestrahlte und drei unbestrahlte AR42J-tumortragende Mäuse untersucht (insgesamt 12 Nacktmäuse).

Drei Stunden nach der Injektion wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, der Tumor, Herz, Lunge, Milz, Pankreas, Magen, Leber, Niere, Nebenniere, Dünndarm, Muskel und Knochen freipräpariert und entnommen; Blut wurde in einem Kapillarröhrchen aus der Aorta entnommen (0,075g). Anschließend wurde das Gewicht bestimmt und der Peptiduptake im Gamma-Counter gemessen. Zudem wurde die Aktivität der drei Standardmesswerte,

jeweils 10% der in die Schwanzvene injizierten Lösung, bestimmt. Um die injizierte Gesamtaktivität zu erhalten, musste der Mittelwert der Standards noch mit dem Faktor 10 multipliziert werden.

Zur Darstellung der Resultate wurde die von dem Tumor und den Organen aufgenommene Aktivität als % der injizierten Dosis pro Gramm Organgewicht (%injiz.Dosis/g) berechnet.

$$\frac{\text{Organuptake} \times 100}{(\text{Mittelwert Standard} \times 10) \times \text{Organgewicht (g)}} = \% \text{ injiz.Dosis/g}$$

## **2.7 Histologische Aufarbeitung der Tumore**

Nach der Gewichtsbestimmung und der Messung des Peptiduptakes wurden sowohl die bestrahlten als auch die unbestrahlten Tumoren und Organe sofort in Paraformaldehydlösung fixiert und, nach dem Einbetten der Tumoren in Paraffin und Schneiden der Paraffinblöcke mit dem Mikrotom, mit Hämalaun-Eosin (H.E) gefärbt.

### **2.7.1 Fixierung in Paraformaldehyd**

Zunächst wurde ein zweifach konzentrierter Sörensen-Puffer (0,1 M ; pH 7,4) hergestellt. Dazu wurden in 500 ml Aqua dest. 3,08 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ) und 14,3 g Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) gelöst. Für die Paraformaldehydlösung wurden 4 g Paraformaldehyd und 50 ml Aqua dest. in einem Erlenmeyerkolben erhitzt, 2 Tropfen 1 M NaOH zugegeben und solange gerührt, bis die Lösung klar wurde.

Es wurden 50 ml Sörensen-Puffer dazugegeben, die Lösung auf Eis abgekühlt und der pH-Wert mit Indikatorstäbchen überprüft und bei Bedarf korrigiert (pH 7,4).

Die herauspräparierten Tumoren und Organe wurden 24 Stunden bei 4°C in der gepufferten Paraformaldehydlösung fixiert. Anschließend wurde die Paraformaldehydlösung durch einen einfach konzentrierten Sörensen-Puffer ersetzt und dieser noch einmal gewechselt. Darin blieben die Organe und Tumoren über Nacht gelagert. Danach wurden die Tumoren und Organe zuerst für 30 Minuten in 50% Isopropanol-, dann in 70% Isopropanollösung gelegt.

Diese wurde noch zweimal gewechselt. Die Tumoren und Organe konnten bis zur Einbettung in Paraffin darin gelagert werden.

### **2.7.2 Paraffineinbettung**

Vor der Paraffineinbettung wurden die Tumoren und Organe zuerst für 2 Stunden in 90% Isopropanol-, dann für 1 Stunde in 90% Isopropanollösung, 3 x 1,5 Stunden in 100% Isopropanol und 3 x 2 Stunden in Methylbenzoat gewaschen. Die Paraffineinbettung erfolgte daraufhin für 2 x 3 Stunden in Paraplast. Die Paraffinblöcke konnten danach mit dem Mikrotom geschnitten und auf Objektträgern fixiert werden.

### **2.7.3 Färbung der Paraffinschnitte mit Hämalaun-Eosin**

Die Paraffinschnitte wurden zunächst für 2 x 15 Minuten in Xylol gelegt, dann für 2 x 3 Minuten in 100% Isopropanol und jeweils 3 Minuten in 96%-, 90%-, 80%-, 70%- und 50% iger Isopropanollösung. Dann wurden die Schnitte mit Aqua dest. gespült, 2 Minuten in Mayers Hämalaunlösung gefärbt, wieder mit Aqua dest. gespült und 2 Minuten in Leitungswasser gebläut.

Nun folgte die Eosinfärbung, wozu die Schnitte für 10 Sekunden in Eosin G 1%-Lösung gelegt und daraufhin mit Aqua dest. gespült wurden. Nach diesem Schritt war eine Kontrolle der Färbung unter dem Mikroskop möglich.

Es folgten Waschschrte erst für einige Sekunden, dann für 1 Minute in 96% Isopropanollösung, 2 x 1 Minute in 100% Isopropanol und 2 x 3 Minuten in Xylollösung, ehe die Paraffinschnitte mit Eukitt® eingedeckt werden konnten.

## 2.8 Statistik

Die Bestimmung einer spezifischen oder unspezifischen Peptidbindung wurde mit dem Student t-Test durchgeführt. Dabei spricht ein p-Wert  $>0,05$  für eine unspezifische, ein p-Wert  $< 0,05$  für eine spezifische Peptidbindung an den jeweiligen Rezeptor.



## 3. Ergebnisse

### 3.1 Qualitätskontrollen der <sup>111</sup>In markierten Peptide

Zu Beginn der Versuche wurden Qualitätskontrollen des mit <sup>111</sup>In markierten Octreotid bzw. DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin durchgeführt. Voraussetzung für den Einsatz in den Versuchen war ein Anteil von mehr als 90% <sup>111</sup>In markiertem Peptid in der Lösung und weniger als 10 % freiem Nuklid.

### 3.2 CCK-B/Gastrin- und SST-Rezeptornachweis bei Glioblastomzelllinien

Das Ziel der Blockierungsversuche bestand darin, eine spezifische Rezeptorbindung von Peptiden an Zelloberflächen darzustellen, um somit das Vorhandensein von Rezeptoren zu beweisen.

In den nachfolgend aufgeführten Versuchen wurde das Vorhandensein von zwei Rezeptoren untersucht: der CCK-B/Gastrin-Rezeptor und der Somatostatin-Rezeptor (Subtyp 2) [SSTR2]. Zur CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Untersuchung wurde ein Teil der Zellen mit <sup>111</sup>In-DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin allein, der andere Teil zusätzlich mit dem unmarkierten humanen Minigastrin zur Blockierung eventuell vorhandener Rezeptoren inkubiert. Für die SSTR2 Bestimmung wurde als radioaktiv markiertes Peptid das <sup>111</sup>In-Octreotid und als Blocksubstanz unmarkiertes Somatostatin-14 eingesetzt. Die Konzentration der eingesetzten Blocksubstanzen betrug ca.  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ , da hierbei alle für das Peptid spezifischen Rezeptoren durch das unmarkierte Peptid besetzt werden. Somit blieben dem markierten Peptid keine freien Bindungsstellen. Die Aktivität der zugegebenen markierten Peptide betrug in allen Versuchen annähernd 16 kBq. Der Uptake der Zellen wurde in einem Gammacounter gemessen und als counts pro Minute (cpm) berechnet.

Der Uptake der Zellen, die mit dem Radiopeptid inkubiert wurden, wird in den folgenden Tabellen als „Uptake heiß“ bezeichnet, „Uptake geblockt“ bedeutet Peptiduptake bei zusätzlicher Gabe des unmarkierten Peptids. Bei einem signifikanten Unterschied der

Mittelwerte dieser Messergebnisse ( $p < 0,05$ ) kann von einer spezifischen Rezeptorbindung des Peptids ausgegangen und somit der Rezeptornachweis erbracht werden. Ist die Uptakedifferenz jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ), spricht dies für eine unspezifische Peptidbindung und daraus resultierend für nicht vorhandene Peptidrezeptoren.

### 3.2.1 Blockierungsversuche mit $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$

Bei den sechs kultivierten Glioblastomzelllinien (G109, G139, LN18, LN229, LN308, C6) konnte in den Blockierungsversuchen mit  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$  kein spezifischer Minigastrin-Uptake der Zellen gemessen und somit kein CCK-B/Gastrin-Rezeptor in vitro nachgewiesen werden. Bei allen sechs Zelllinien konnte kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,05$ ) im Uptake zwischen den Zellen, die mit dem Radiopeptid inkubiert wurden und denjenigen, deren eventuell vorhandene Rezeptoren zusätzlich durch unmarkiertes kaltes Peptid blockiert wurden, gemessen werden (Tab. 3.1).

| Zelllinie | Uptake heiß | SD  | Uptake geblockt | SD |
|-----------|-------------|-----|-----------------|----|
| G109      | 208         | 17  | 186             | 30 |
| G139      | 323         | 106 | 185             | 26 |
| LN18      | 357         | 122 | 237             | 29 |
| LN229     | 183         | 16  | 163             | 22 |
| LN308     | 322         | 69  | 371             | 98 |
| C6        | 296         | 14  | 188             | 12 |

Tab. 3.1 :  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$ -Uptake (cpm) bei 6 Glioblastomzelllinien in vitro (SD = Standardabweichung)

### 3.2.2 Blockierungsversuche mit $^{111}\text{In-Octreotid}$

Bei den Glioblastomzelllinien G109, G139, LN18, LN229 und C6 ließ sich durch Blockierungsversuche mit  $^{111}\text{In-Octreotid}$  kein spezifischer Peptiduptake messen und somit kein SSTR2 nachweisen. Der Unterschied im Peptiduptake zwischen den Zellen, die mit  $^{111}\text{In-Octreotid}$  allein und den Zellen, denen zusätzlich unmarkiertes Somatostatin-14 zur Blockierung eventuell vorhandener SSTR zugesetzt wurde, war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (Tab. 3.2).

| Zelllinie | Uptake heiß | SD  | Uptake geblockt | SD |
|-----------|-------------|-----|-----------------|----|
| G109      | 643         | 133 | 737             | 95 |
| G139      | 708         | 237 | 470             | 45 |
| LN18      | 322         | 85  | 244             | 43 |
| LN229     | 235         | 13  | 233             | 69 |
| C6        | 252         | 54  | 247             | 44 |

Tab. 3.2: <sup>111</sup>In-Octreotid-Uptake (cpm) bei 5 Glioblastomzelllinien in vitro (SD = Standardabweichung)

### 3.2.3 Blockierungsversuch mit <sup>111</sup>In-DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin bei LN18-Sphäroiden

Nachdem sich die LN18-Glioblastomzellen zu Sphäroiden zusammengelagert hatten, wurden Blockierungsversuche mit <sup>111</sup>In-DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin zum Nachweis von CCK-B/Gastrin-Rezeptoren durchgeführt und der Peptiduptake mit dem von LN18-Monolayerzellen verglichen. Jedoch konnte durch das Sphäroidwachstum der LN18-Zellen keine CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression erreicht werden. Es wurde sowohl bei den LN18-Sphäroiden als auch bei den LN18-Kontrollzellen (siehe Tab.3.1) kein spezifischer Peptiduptake gemessen. Die Differenz des Peptiduptakes zwischen den Sphäroiden, die mit <sup>111</sup>In-DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin allein ( $970 \pm 38$  cpm) und den Sphäroiden, die zusätzlich mit unmarkiertem Minigastrin inkubiert wurden ( $1115 \pm 283$  cpm), war nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) (Tab .3.3).

| Zellen         | Uptake heiß | SD | Uptake geblockt | SD  |
|----------------|-------------|----|-----------------|-----|
| LN18 Sphäroide | 970         | 38 | 1115            | 283 |

Tab. 3.3: <sup>111</sup>In-DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin-Uptake (cpm) bei LN18 Sphäroiden (SD = Standardabweichung)

### 3.2.4 Blockierungsversuch mit $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$ und $^{111}\text{In-Octreotid}$ bei G109 nach Kultivierung mit AR42J-Medium

AR42J-Zellen sind Pankreastumorzellen, deren positiver CCK-B/Gastrin- und SST-Rezeptorstatus bekannt ist. Durch Einsetzen des Mediums aus einer AR42J-Kultur, in das die Proteine und Peptide der Zellen sezerniert werden, sollte untersucht werden, ob sich durch diese AR42J-spezifischen Proteine in CCK-B/Gastrin- bzw. SST-Rezeptor negativen Glioblastomzelllinien die Expression dieser Rezeptoren induzieren lässt.

Jedoch wurde durch den Einsatz des AR42J-Mediums in der Glioblastomzellkultur G109 weder der CCK-B/Gastrin- noch der SST2-Rezeptor exprimiert. Bei dem Blockierungsversuch mit  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$  war die Differenz zwischen dem Uptake heiß ( $160 \pm 96$  cpm) und dem Uptake geblockt ( $158 \pm 49$  cpm) nur minimal und somit nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Die Peptidbindung war also unspezifisch (Tab. 3.4).

| Zellen              | Uptake heiß | SD | Uptake geblockt | SD |
|---------------------|-------------|----|-----------------|----|
| G109 + AR42J Medium | 160         | 96 | 158             | 49 |

Tab. 3.4:  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$ -Uptake (cpm) bei G109 nach Kultivierung mit AR42J-Medium (SD = Standardabweichung)

Sehr ähnliche Resultate ergaben sich bei dem Blockierungsversuch mit  $^{111}\text{In-Octreotid}$ . Auch hier war die Differenz zwischen dem Uptake heiß ( $163 \pm 13$  cpm) und dem Uptake geblockt ( $170 \pm 62$  cpm) nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) und der Octreotid-Uptake somit unspezifisch (Tab. 3.5).

Zur Kontrolle wurden die Experimente an regelrecht kultivierten G109 Zellen durchgeführt.

| Zellen              | Uptake heiß | SD | Uptake geblockt | SD |
|---------------------|-------------|----|-----------------|----|
| G109 + AR42J Medium | 163         | 13 | 170             | 62 |

Tab. 3.5:  $^{111}\text{In-Octreotid}$ -Uptake (cpm) bei G109 nach Kultivierung mit AR42J-Medium (SD = Standardabweichung)

Aufgrund der negativen Ergebnisse wurde auf die Durchführung dieser Versuche bei den anderen Glioblastomzelllinien verzichtet.

### 3.2.5 Blockierungsversuch mit $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$ nach Bestrahlung

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob durch eine externe Bestrahlung die Expression von CCK-B/Gastrin- und SST2-Rezeptoren angeregt werden kann. Dazu wurden G109- und LN229-Zellen mit 8 bzw. 16 Gy bestrahlt und Blockierungsversuche nach 40 und 60 Stunden durchgeführt. Der Uptake wurde jeweils mit unbestrahlten G109-Kontrollzellen verglichen.

Nach Bestrahlung mit 8 und 16 Gy ließ sich in einem Zeitraum von 60 Stunden nach Bestrahlung keine CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression nachweisen. Die Werte für den Uptake heiß lagen bei den bestrahlten Zellen zwischen  $139 \pm 16$  cpm und  $249 \pm 46$  cpm, bei dem geblockten Uptake zwischen  $121 \pm 18$  cpm und  $255 \pm 82$  cpm. Der Unterschied zwischen den entsprechenden Messwerten war bei keinem der Experimente signifikant ( $p > 0,05$ ), die Bindung von Minigastrin an die Zellen demnach nur unspezifisch. Die Werte für die G109-Kontrollzellen lagen innerhalb der oben genannten Messwerte (Tab. 3.6).

| Zelllinie G109  | Uptake heiß | SD | Uptake geblockt | SD |
|-----------------|-------------|----|-----------------|----|
| Kontrolle       | 185         | 40 | 172             | 14 |
| 40 h nach 8 Gy  | 174         | 22 | 202             | 33 |
| 60 h nach 8 Gy  | 218         | 19 | 230             | 49 |
| 40 h nach 16 Gy | 139         | 16 | 121             | 18 |
| 60 h nach 16 Gy | 249         | 46 | 255             | 82 |

Tab. 3.6:  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$ -Uptake (cpm) bei G109 40 und 60 Stunden nach Bestrahlung mit 8 bzw. 16 Gy (SD = Standardabweichung)

Auch bei den LN229-Zellen zeigte sich in den Blockierungsversuchen mit  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$  40 und 60 Stunden nach Bestrahlung mit 8 bzw. 16 Gy ein ähnlich niedriger Uptake wie bei den G109-Zellen. Die Messwerte lagen zwischen  $284 \pm 30$  cpm und  $346 \pm 29$  cpm bei Inkubation mit  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$  (Uptake heiß), sowie zwischen  $292 \pm 21$  cpm und  $318 \pm 36$  cpm bei den zusätzlich geblockten Zellen (Uptake

geblockt). Die Kontrollzellen zeigten mit  $283 \pm 54$  cpm (Uptake heiß) bzw.  $285 \pm 51$  cpm (Uptake geblockt) einen nahezu identischen Uptake. Der Unterschied in den Mittelwerten für den Uptake heiß und den Uptake geblockt war in keinem der Experimente signifikant ( $p > 0,05$ ), so dass auch hier die Peptidbindung unspezifisch war und keine CCK-B/Gastrin-Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Tab. 3.7).

| Zelllinie LN229 | Uptake heiß | SD | Uptake geblockt | SD |
|-----------------|-------------|----|-----------------|----|
| Kontrolle       | 283         | 54 | 285             | 51 |
| 40 h nach 8 Gy  | 311         | 15 | 273             | 46 |
| 60 h nach 8 Gy  | 346         | 29 | 318             | 36 |
| 40 h nach 16 Gy | 291         | 51 | 293             | 21 |
| 60 h nach 16 Gy | 284         | 30 | 292             | 21 |

Tab. 3.7 :  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin-Uptake (cpm) bei LN229 40 und 60 Stunden nach Bestrahlung mit 8 bzw. 16 Gy (SD = Standardabweichung)

### 3.2.6 Blockierungsversuch mit $^{111}\text{In}$ -Octreotid nach Bestrahlung

Auch eine Expression des SST2-Rezeptors wurde bis zu 60 Stunden nach Bestrahlung mit 8 bzw. 16 Gy nicht induziert. Es wurde in keinem Experiment eine spezifische Bindung von Octreotid an dem SST2-Rezeptor gemessen, der Uptake war jeweils unspezifisch (Tab. 3.8).

| Zelllinie G109  | Uptake heiß | SD | Uptake geblockt | SD |
|-----------------|-------------|----|-----------------|----|
| Kontrolle       | 316         | 21 | 285             | 56 |
| 40 h nach 8 Gy  | 367         | 36 | 290             | 11 |
| 60 h nach 8 Gy  | 193         | 16 | 187             | 20 |
| 40 h nach 16 Gy | 394         | 63 | 304             | 2  |
| 60 h nach 16 Gy | 217         | 66 | 156             | 25 |

Tab. 3.8:  $^{111}\text{In}$ -Octreotid-Uptake (cpm) bei G109 40 und 60 Stunden nach Bestrahlung mit 8 bzw. 16 Gy (SD = Standardabweichung)

### 3.3 CCK-B/Gastrin- und SST-Rezeptornachweis bei AR42J-Zellen in vitro

#### 3.3.1 Blockierungsversuche bei AR42J-Zellen

Als Positivkontrolle zu den in 3.1 beschriebenen Experimenten wurden Internalisierungsversuche bei AR42J-Zellen durchgeführt.

##### 3.3.1.1 Internalisierungsversuche mit $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$

Bei AR42J-Zellen wurde ein spezifischer Uptake von Minigastrin an den CCK-B/Gastrin-Rezeptor und die Internalisierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe gemessen. Das Vorhandensein des CCK-B/Gastrin-Rezeptors konnte somit eindeutig nachgewiesen werden. Der  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$ -Uptake ließ sich bei  $7831 \pm 866$  cpm, also deutlich höher als bei allen Versuchen mit den Glioblastomzellen. Bei dem Uptake mit geblockten Rezeptoren konnten nur  $305 \pm 55$  cpm gemessen werden. Dieser Unterschied in den Mittelwerten ist signifikant ( $p < 0,05$ ). Durch das unmarkierte Minigastrin wurden demnach nahezu alle CCK-B/Gastrin-Rezeptoren besetzt. Durch die Zugabe von Acetat (mit und ohne Blocksubstanz) wurde der Anteil an internalisierten Rezeptor-Ligand-Komplexen bestimmt. Der Anteil lag bei 72% nach 20 Minuten (Tab. 3.9).

| Uptake heiß    | Acetat heiß    | Uptake geblockt | Acetat geblockt |
|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| $7831 \pm 866$ | $6603 \pm 659$ | $305 \pm 55$    | $1189 \pm 162$  |

Tab. 3.9:  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1\text{-minigastrin}$ -Uptake (cpm  $\pm$  SD) bei AR42J-Zellen

##### 3.3.1.2 Internalisierungsversuche mit $^{111}\text{In-Octreotid}$

Auch der SST2-Rezeptor konnte bei den AR42J-Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem Uptake mit  $^{111}\text{In-Octreotid}$  (Uptake heiß  $8156 \pm 864$  cpm) und dem Uptake nach Rezeptorblockierung mit unmarkiertem Somatostatin-14 (Uptake geblockt  $171 \pm 10$  cpm) gemessen. 81% der Rezeptor-Ligand-Komplexe wurden nach 20 Minuten in die Zelle internalisiert. (Tab. 3.10).

| Uptake heiß | Acetat heiß | Uptake geblockt | Acetat geblockt |
|-------------|-------------|-----------------|-----------------|
| 8156 ± 869  | 6899 ± 418  | 171 ± 10        | 371 ± 42        |

Tab. 3.10: <sup>111</sup>In-Octreotid Uptake (cpm ± SD) bei AR42J-Zellen

Zur Durchführung der Experimente mit der Frage nach dem Expressionsverhalten der CCK-B/Gastrin- und SST2-Rezeptoren auf externe Bestrahlung waren die AR42J-Zellen auf Grund des positiven CCK-B/Gastrin- und SST2-Rezeptorstatus sehr gut geeignet.

### 3.4 Wachstumsverhalten der AR42J-Zellen nach Bestrahlung

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten der AR42J-Zellen nach einer Bestrahlung mit 4, 8 bzw. 16 Gy untersucht. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Bestrahlung  $t[h] = (0; 24; 48; 72; 96; 120; 168)$  wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit dem entsprechenden Ausgangswert, der die Zellzahl zum Zeitpunkt der Bestrahlung beschreibt und in den Diagrammen als 100% der Ausgangszellen (=100% AGZ) dargestellt ist, verglichen.

#### 3.4.1 Wachstumskurve AR42J (unbestrahlt)

Bei den unbestrahlten AR42J-Zellen zeigte sich im beobachteten Zeitraum von 96 Stunden ein kontinuierliches und gleichmäßiges Wachstum, die Verdopplungszeit betrug ca. 30 Stunden. Nach 96 Stunden waren  $458,6 \pm 22,4\%$  der Ausgangszellen (AGZ) in den Wells vorhanden, das bedeutet eine Vermehrung der Zellzahl um den Faktor  $4,58 \pm 0,22$  in 96 Stunden.

Spätere Zellzählungen wurden auf Grund einer zu hohen Zelldichte pro Well nicht mehr durchgeführt (Tab. 3.11; Abb. 3.1).



| Zeit (h) | % der Ausgangszellzahl | SD   |
|----------|------------------------|------|
| 0        | 100                    | 14,6 |
| 24       | 179,8                  | 13   |
| 48       | 252,2                  | 51,2 |
| 72       | 322,1                  | 17,5 |
| 96       | 458,6                  | 22,4 |

Tab. 3.11: Zellzahlentwicklung AR42J in 96 Stunden ohne Bestrahlung

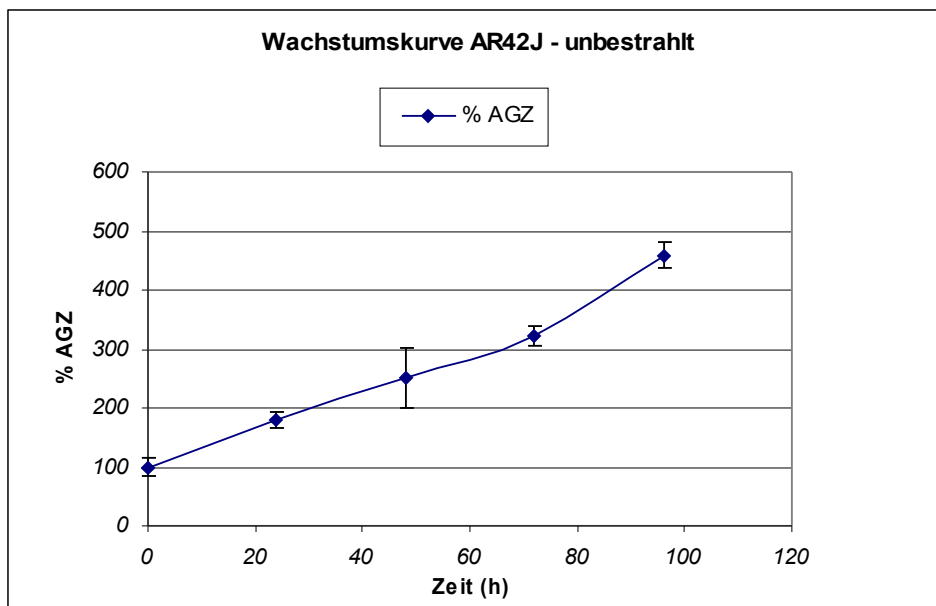


Abb. 3.1: Wachstumskurve AR42J-Zellen (unbestrahlt)

### 3.4.2 Wachstumskurve AR42J nach 4 Gy Bestrahlung

Nach einer Bestrahlung mit 4 Gy war die Zellzahl zunächst leicht rückläufig, nach 72 Stunden hat sich die Zellzahl um ca.  $\frac{1}{4}$  auf  $75,6 \pm 15,3\%$  der Ausgangszellen reduziert. In der Folgezeit begannen die Zellen zu proliferieren, zunächst eher langsam ( $94,9 \pm 6,4\%$  der Ausgangszellen nach 96 Stunden), danach mit einer Proliferationsgeschwindigkeit wie bei den unbestrahlten AR42J-Zellen. Nach einer Woche war die Zellzahl gegenüber der Ausgangszellzahl um etwa das 2,5 fache vermehrt ( $245,9 \pm 13,3\%$  der AGZ) (Tab. 3.12; Abb. 3.2).

| Zeit nach Bestrahlung (h) | % der Ausgangszellen | SD   |
|---------------------------|----------------------|------|
| 0                         | 100                  | 0    |
| 24                        | 97,6                 | 20,1 |
| 48                        | 75,1                 | 7,5  |
| 72                        | 75,6                 | 15,3 |
| 96                        | 94,9                 | 6,4  |
| 120                       | 175,7                | 15   |
| 168                       | 245,9                | 13,3 |

Tab. 3.12: Zellzahlentwicklung in einer Woche bei AR42J-Zellen nach 4 Gy

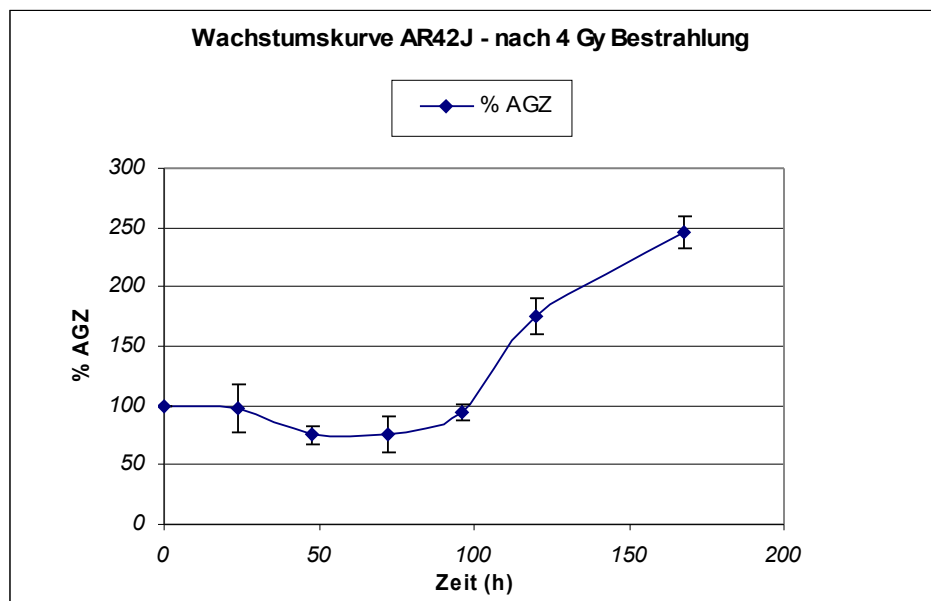


Abb. 3.2: Wachstumskurve AR42J-Zellen nach 4 Gy Bestrahlung

### 3.4.3 Wachstumskurve AR42J nach 8 Gy Bestrahlung

Nach einer Bestrahlung der Zellen mit 8 Gy fiel die Zellzahl in den ersten 72 Stunden schneller ab als nach 4 Gy, circa die Hälfte der Zellen waren in dieser Zeit abgestorben ( $52,2 \pm 6\%$  der AGZ nach 72 Stunden). In der Folgezeit begannen die verbliebenen adhärennten Zellen wieder zu proliferieren, so dass eine Woche nach Bestrahlung mit  $95,9 \pm 11,6\%$  annähernd wieder die Ausgangszellzahl erreicht war. Im Vergleich zur Bestrahlung mit 4 Gy verlief die Proliferationsphase im Anschluss an den Tiefpunkt nach 72 Stunden aber deutlich verzögerter (Tab. 3.13; Abb. 3.3).

| Zeit nach Bestrahlung (h) | % der Ausgangszellen | SD   |
|---------------------------|----------------------|------|
| 0                         | 100                  | 0    |
| 24                        | 93,8                 | 14,9 |
| 48                        | 70,3                 | 5,6  |
| 72                        | 52,2                 | 6    |
| 96                        | 67,9                 | 1,2  |
| 120                       | 67,3                 | 13,7 |
| 168                       | 95,9                 | 11,6 |

Tab. 3.13: Zellzahlentwicklung in einer Woche bei AR42J nach 8 Gy

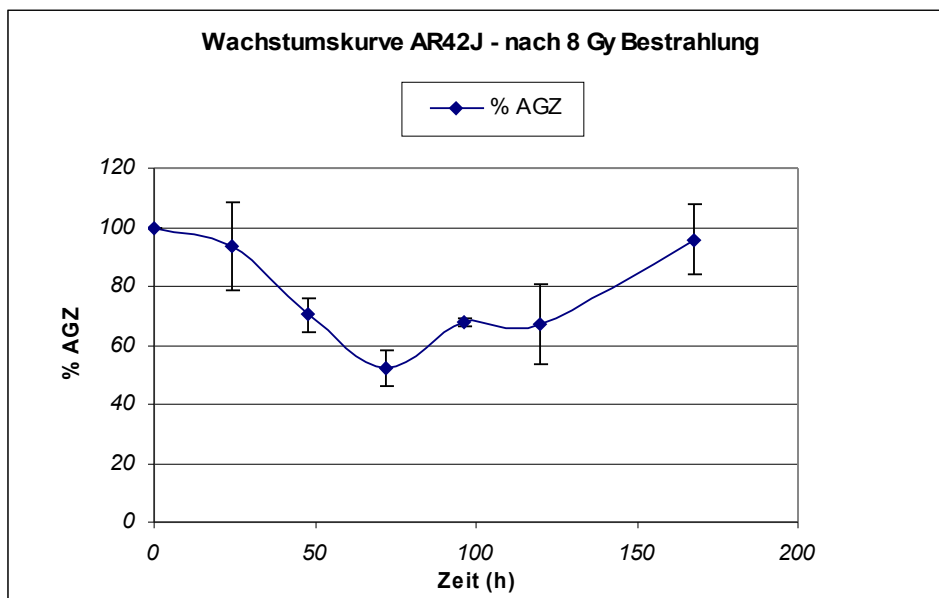


Abb. 3.3: Wachstumskurve AR42J-Zellen nach 8 Gy Bestrahlung

### 3.4.4 Wachstumskurve AR42J nach 16 Gy Bestrahlung

Die deutlichste Abnahme der Zellzahl war nach einer Bestrahlung mit 16 Gy zu sehen. Schon in den ersten Stunden nach der Bestrahlung reduzierte sich die Zellzahl rasch und deutlich, nach 48 Stunden war nur noch annähernd die Hälfte der zu Beginn gezählten Zellen in den Wells adhären (53,9 ± 10,3% nach 48h). Im weiteren Verlauf nahm die Zellzahl noch weiter ab, jedoch etwas langsamer als in den ersten 48 Stunden. Die Wachstumskurve verlief

weniger steil nach unten. Eine Woche nach der Bestrahlung waren ca. 2/3 der bestrahlten Zellen gestorben, nur ca. 1/3 der Zellen überlebten diese Strahlendosis. Jedoch blieb in dem untersuchten Zeitraum von 1 Woche ein Proliferationsschub, wie er bei den mit 4 und 8 Gy bestrahlten Zellen beobachtet wurde, aus (Tab. 3.14; Abb. 3.4).

| Zeit nach Bestrahlung (h) | % der Ausgangszellen | SD   |
|---------------------------|----------------------|------|
| 0                         | 100                  | 0    |
| 24                        | 84                   | 4,4  |
| 48                        | 53,9                 | 10,3 |
| 72                        | 48,1                 | 3,3  |
| 96                        | 40,5                 | 9,1  |
| 120                       | 35,9                 | 4,6  |
| 168                       | 32,8                 | 4,8  |

Tab. 3.14: Zellzahlentwicklung in einer Woche von AR42J-Zellen nach 16 Gy

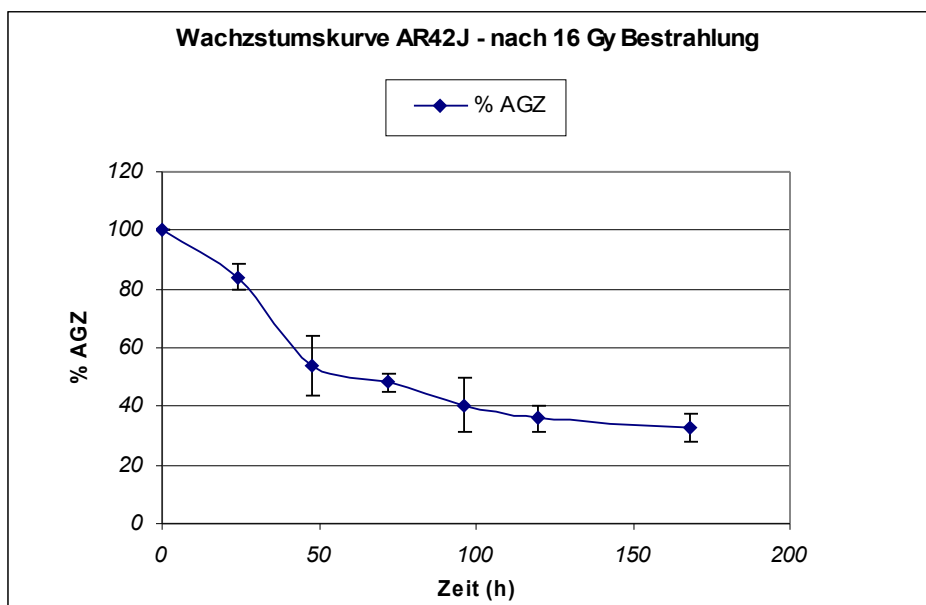


Abb. 3.4: Wachstumskurve AR42J nach 16 Gy Bestrahlung

### **3.5 CCK-B/Gastrin- und SST-Rezeptor-Regulation nach Bestrahlung**

Nach Bestrahlung der AR42J-Zellen mit 4, 8 bzw. 16 Gy wurde der Uptake von  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin und  $^{111}\text{In}$ -Octreotid nach bestimmten Zeitpunkten zwischen 0 und 168 Stunden gemessen. Die Uptakewerte wurden durch Blockierungsversuche ermittelt. Parallel dazu wurden Kontrollversuche mit unbestrahlten AR42J-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden aus dem Quotienten Uptake bestrahlt/Uptake unbestrahlt ermittelt, so dass eine Änderung der Rezeptorexpression nach Bestrahlung dargestellt werden konnte. In den folgenden Graphiken bezeichnet der Uptakewert 1 die Rezeptorexpression der Kontrollzellen, Abweichungen von diesem Wert weisen auf eine Änderung der Rezeptorexpression nach Bestrahlung hin.

#### **3.5.1 CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation**

##### **3.5.1.1 CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation nach 4 Gy Bestrahlung**

Bis zu 96 Stunden nach einer Bestrahlung mit 4 Gy konnte keine Veränderung der CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression gemessen werden. Anschließend kam es jedoch zu einer schnellen Upregulation dieser Rezeptoren. Nach 120 Stunden war der Uptake um den Faktor  $3,358 \pm 0,486$  höher als bei den Kontrollzellen. Die Rezeptorexpression blieb auch eine Woche nach Bestrahlung erhöht ( $1,694 \pm 0,257$ ) (Abb. 3.5; Tab. 3.15).

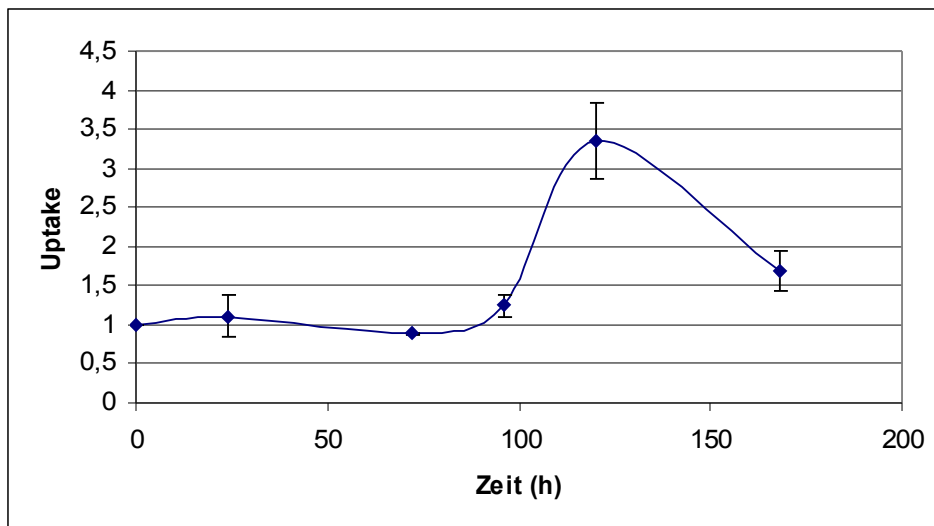


Abb. 3.5: Graphik zur Darstellung der CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation nach 4 Gy Bestrahlung

| Zeit (h) | Zellen bestrahlt (cpm) / Zellen unbestrahlt (cpm) | SD    |
|----------|---|-------|
| 24       | 1,107   | 0,269 |
| 72       | 0,889   | 0,015 |
| 96       | 1,241   | 0,135 |
| 120      | 3,358   | 0,486 |
| 168      | 1,694   | 0,257 |

Tab. 3.15: Upregulation der CCK-B/Gastrin-Rezeptoren nach 4 Gy Bestrahlung

### 3.5.1.2 CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation nach 8 Gy Bestrahlung

Eine frühere Upregulation der CCK-B/Gastrin-Rezeptoren ereignete sich bei den mit 8 Gy bestrahlten Zellen. Schon nach 48 Stunden war die höchste Upregulation erreicht, der Uptake war um den Faktor  $2,663 \pm 0,227$  höher als bei unbestrahlten Kontrollzellen. Danach fiel der Uptake langsam zurück (Faktor  $1,792 \pm 0,352$  nach 96 Stunden) und verblieb bis 144 Stunden nach Bestrahlung auf circa zweifach höherem Niveau ( $2,07 \pm 0,44$ ) (Abb. 3.6; Tab. 3.16).

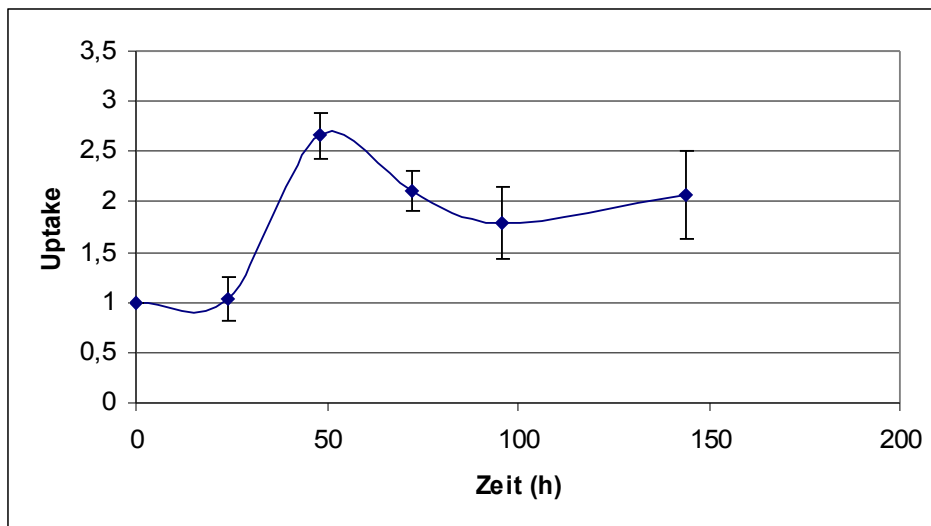


Abb. 3.6: Graphik zur Darstellung der CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation nach 8 Gy Bestrahlung

| Zeit (h) | Zellen bestrahlt (cpm) / Zellen unbestrahlt (cpm) | SD    |
|----------|---|-------|
| 24       | 1,043   | 0,219 |
| 48       | 2,663   | 0,227 |
| 72       | 2,107   | 0,199 |
| 96       | 1,792   | 0,352 |
| 144      | 2,07  | 0,44  |

Tab. 3.16: Upregulation der CCK-B/Gastrin-Rezeptoren nach 8 Gy Bestrahlung

### 3.5.1.3 CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation nach 16 Gy Bestrahlung

Nach einer 16 Gy Bestrahlung wurden die CCK-B/Gastrin-Rezeptoren innerhalb einer Woche kontinuierlich upreguliert. Die Upregulation begann schon in den ersten 24 Stunden (Faktor  $1,617 \pm 0,394$  nach 17 Stunden,  $1,721 \pm 0,428$  nach 24 Stunden), also früher als nach der 8 Gy Bestrahlung. Die höchste Dichte an CCK-B/Gastrin-Rezeptoren ( $4,043 \pm 0,583$  mal mehr Rezeptoren als bei unbestrahlten Kontrollzellen) zeigte sich nach 168 Stunden (Abb. 3.7; Tab. 3.17).

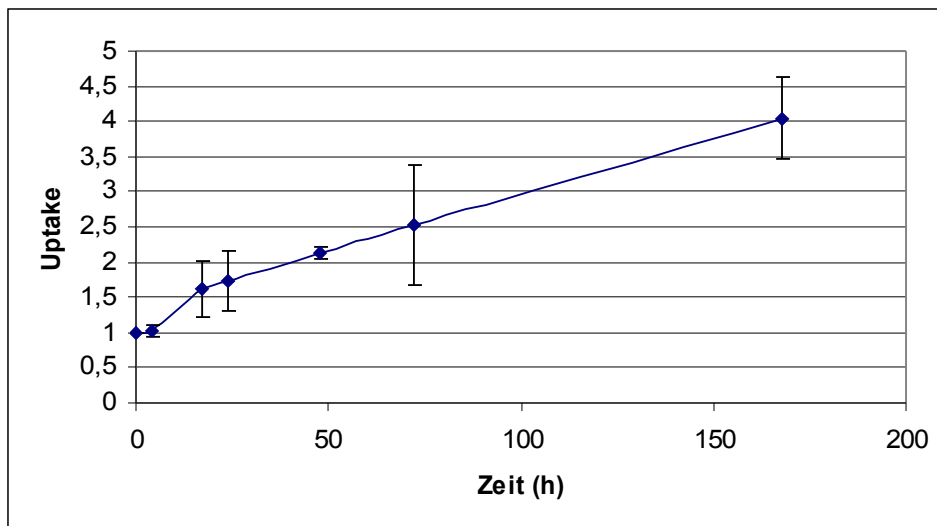


Abb. 3.7: Graphik zur Darstellung der CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation nach 16 Gy Bestrahlung

| Zeit (h) | Zellen bestrahlt (cpm) / Zellen unbestrahlt (cpm) | SD    |
|----------|---|-------|
| 4        | 1,104   | 0,087 |
| 17       | 1,617   | 0,394 |
| 24       | 1,721   | 0,428 |
| 48       | 2,132   | 0,096 |
| 72       | 2,538   | 0,855 |
| 168      | 4,043   | 0,583 |

Tab. 3.17: Upregulation der CCK-B/Gastrin-Rezeptoren nach 16 Gy Bestrahlung

### 3.5.2 SST2-Rezeptor-Upregulation

#### 3.5.2.1 SST2-Rezeptor-Upregulation nach 4 Gy Bestrahlung

Die Upregulation der SST2-Rezeptoren nach 4 Gy Bestrahlung war nach 72 Stunden zu erkennen (Faktor  $2,523 \pm 0,495$ ) und erreichte nach 96 Stunden mit einer  $3,464 \pm 0,75$ fach vermehrten Rezeptorexpression den höchsten Wert. Danach wurden die SST2-Rezeptoren wieder stark zurückreguliert. So war 24 Stunden später, also nach 120 Stunden, nahezu kein Unterschied mehr gegenüber dem Uptake der Kontrollzellen zu sehen ( $1,188 \pm 0,192$ ) (Abb. 3.8; Tab. 3.18).



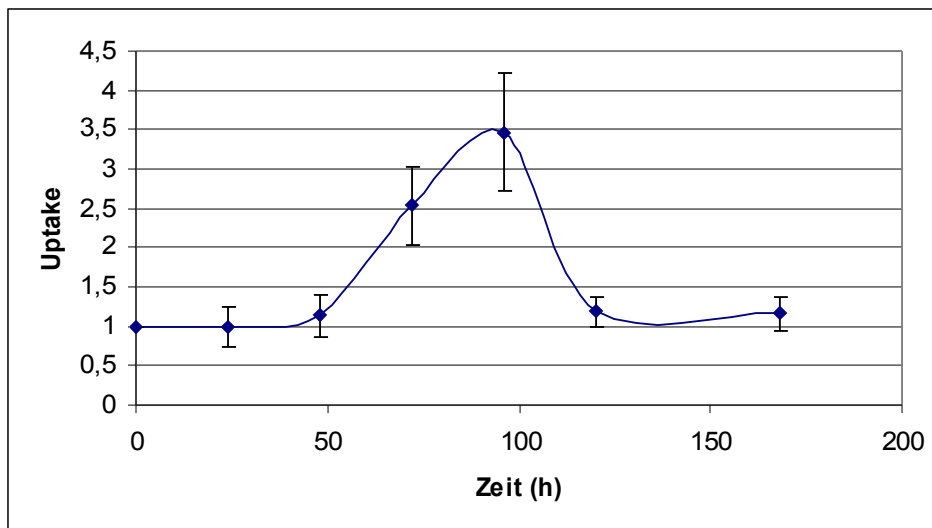


Abb. 3.8: Graphik zur Darstellung der SST2-Rezeptor-Upregulation nach 4 Gy Bestrahlung

| Zelle (h) | Zellen bestrahlt (cpm) / Zellen unbestrahlt (cpm) | SD    |
|-----------|---|-------|
| 24        | 0,955   | 0,247 |
| 48        | 1,137   | 0,272 |
| 72        | 2,523   | 0,495 |
| 96        | 3,464   | 0,75  |
| 120       | 1,188   | 0,192 |
| 168       | 1,157   | 0,209 |

Tab. 3.18: Upregulation der SST2-Rezeptoren nach 4 Gy Bestrahlung

### 3.5.2.2 SST2-Rezeptor-Upregulation nach 8 Gy Bestrahlung

Nach einer Bestrahlung mit 8 Gy begann die Upregulation der SST2-Rezeptoren früher als nach 4 Gy und erreichte schon nach 48 Stunden den Maximalwert (Faktor  $1,934 \pm 0,147$ ). Dieser Wert war jedoch um fast 50% geringer als der Maximalwert bei der 4 Gy Bestrahlung. Anschließend kam es zu einer kontinuierlichen Reduktion dieser Rezeptoren, so dass die Rezeptoren nach 144 Stunden nur noch um den Faktor  $1,311 \pm 0,118$  vermehrt exprimiert waren (Abb.3.9; Tab. 3.19).

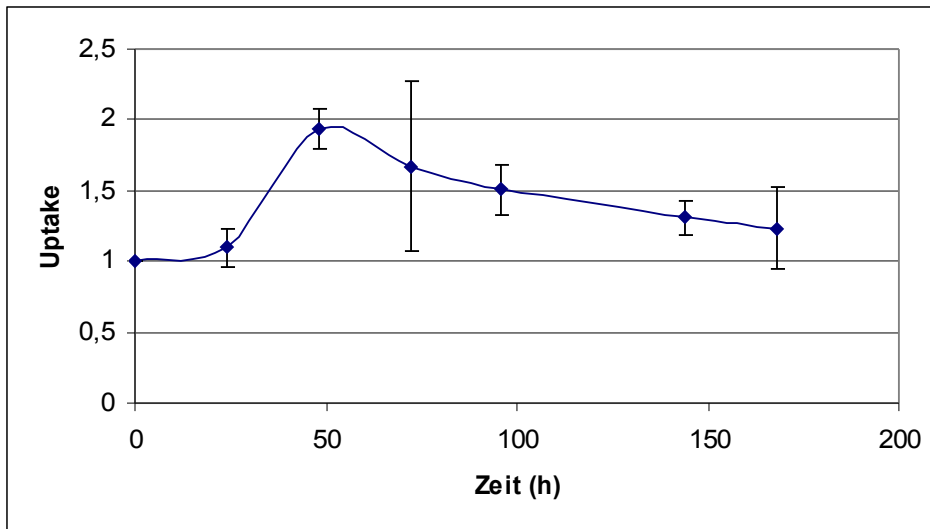


Abb. 3.9: Graphik zur Darstellung der SST2-Rezeptor-Upregulation nach 8 Gy Bestrahlung

| Zeit (h) | Zellen bestrahlt (cpm) / Zellen unbestrahlt (cpm) | SD    |
|----------|---|-------|
| 24       | 1,159   | 0,368 |
| 48       | 1,934   | 0,147 |
| 72       | 1,671   | 0,603 |
| 96       | 1,505   | 0,178 |
| 144      | 1,311   | 0,118 |
| 168      | 1,233   | 0,293 |

Tab. 3.19: Upregulation der SST2-Rezeptoren nach 8 Gy Bestrahlung

### 3.5.2.3 SST2-Rezeptor-Upregulation nach 16 Gy Bestrahlung

Nach einer 16 Gy Bestrahlung verlief die SST2-Rezeptorexpression ähnlich wie nach einer Bestrahlung mit 8 Gy. Nach 48 Stunden waren die Rezeptoren um den Faktor  $2,116 \pm 0,217$  hochreguliert. Es folgte eine kontinuierliche Rezeptorreduktion in der Folgezeit. Nach 168 Stunden waren noch annähernd so viele Rezeptoren exprimiert wie bei den Kontrollzellen ohne Bestrahlung ( $1,11 \pm 0,211$ ) (Abb.3.10; Tab.3.20).

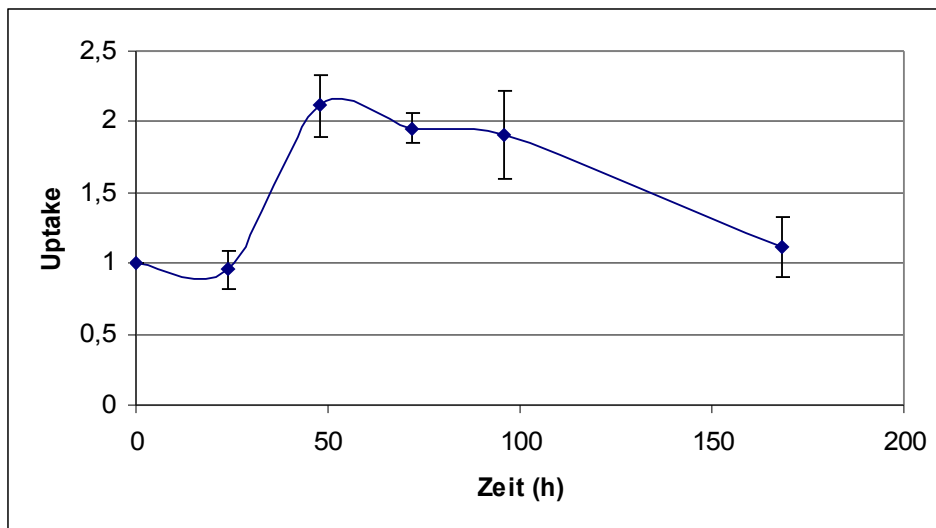


Abb. 3.10: Graphik zur Darstellung der SST2-Rezeptor-Upregulation nach 16 Gy Bestrahlung

| Zeit (h) | Zelle bestrahlt (cpm) / Zellen unbestrahlt (cpm) | SD    |
|----------|--|-------|
| 24       | 0,954  | 0,134 |
| 48       | 2,116  | 0,217 |
| 72       | 1,954  | 0,107 |
| 96       | 1,907  | 0,314 |
| 168      | 1,11   | 0,211 |

Tab. 3.20: Upregulation der SST2-Rezeptoren nach 16 Gy Bestrahlung

### 3.6 Bioverteilungsstudien nach Bestrahlung (10 Gy) bei AR42J in vivo

Die Bioverteilungsstudien von  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin und  $^{111}\text{In}$ -Octreotid in AR42J-tumortragenden Nacktmäusen wurden 48 Stunden nach Bestrahlung des Tumors mit einer Dosis von 10 Gy durchgeführt. Pro Peptid wurde bei 3 Tieren jeweils 10 $\mu\text{Ci}$  des markierten Peptids in die Schwanzvene injiziert und nach 3 Stunden das Blut, die Organe Herz, Lunge, Milz, Pankreas, Magen, Leber, Niere, Nebenniere, Muskel, Knochen und der Tumor herauspräpariert, gewogen und anschließend der Radionukliduptake im Gammacounter gemessen.

Zur Kontrolle wurden jeweils pro Peptid die gleichen Versuche an 3 unbestrahlten, AR42J-tumortragenden Nacktmäusen durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% injiz.Dosis/g) dargestellt.

### 3.6.1 Bioverteilungsstudie von $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1$ -minigastrin

In keinem der zwölf untersuchten Organe wurde ein signifikanter Unterschied in der Peptidanreicherung zwischen unbestrahlten und bestrahlten Mäusen gemessen.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression pro Gramm Gewebe zwischen dem unbestrahlten Tumor ( $3,131 \pm 0,362\%$  injiz.Dosis/g) und dem bestrahlten Tumor ( $2,926 \pm 1,398\%$  injiz.Dosis/g) gezeigt werden ( $p > 0,05$ ).

Als Ausscheidungsorgan speicherte die Niere 3 Stunden nach Injektion mit  $70,919 \pm 6,744\%$  injiz.Dosis/g (unbestrahlt) bzw.  $64,845 \pm 1,683\%$  injiz.Dosis/g (bestrahlt) noch sehr viel  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1$ -minigastrin.

Einen ähnlich hohen Uptake wie der Tumor zeigte der CCK-B/Gastrin-Rezeptor positive Magen ( $2,773 \pm 1,028\%$  injiz.Dosis/g bzw.  $3,088 \pm 1,434\%$  injiz.Dosis/g), deutlich geringer fiel die Anreicherung im ebenfalls rezeptorpositiven Pankreas aus ( $0,238 \pm 0,047\%$  injiz.Dosis/g bzw.  $0,154 \pm 0,067\%$  injiz.Dosis/g).

In den anderen Organen lag der Uptake noch unterhalb der Werte des Pankreas (Tab.3.21; Abb.3.11).

| Organ      | Mäuse unbestrahlt |       | Mäuse bestrahlt-10 Gy |       |
|------------|-------------------|-------|-----------------------|-------|
|            | MW                | SD    | MW                    | SD    |
| Blut       | 0,056             | 0,005 | 0,047                 | 0,013 |
| Herz       | 0,036             | 0,003 | 0,025                 | 0,003 |
| Lunge      | 0,083             | 0,038 | 0,076                 | 0,049 |
| Milz       | 0,154             | 0,14  | 0,064                 | 0,025 |
| Pankreas   | 0,238             | 0,047 | 0,154                 | 0,067 |
| Magen      | 2,773             | 1,028 | 3,088                 | 1,434 |
| Leber      | 0,159             | 0,007 | 0,131                 | 0,031 |
| Niere      | 70,919            | 6,744 | 64,845                | 1,683 |
| Nebenniere | 0,353             | 0,05  | 0,403                 | 0,089 |
| Dünndarm   | 0,093             | 0,004 | 0,053                 | 0,005 |
| Muskel     | 0,059             | 0,02  | 0,028                 | 0,004 |
| Knochen    | 0,123             | 0,034 | 0,241                 | 0,176 |
| Tumor      | 3,131             | 0,362 | 2,926                 | 1,398 |

Tab. 3.21:  $^{111}\text{In-DTPA-DGlu}^1$ -minigastrin-Biodistribution in AR42J-tumortragenden Nacktmäusen nach Bestrahlung mit 10 Gy und in unbestrahlten Mäusen. Pro Gruppe wurden jeweils 3 Tiere untersucht.

Alle Angaben in % injiz.Dosis/g

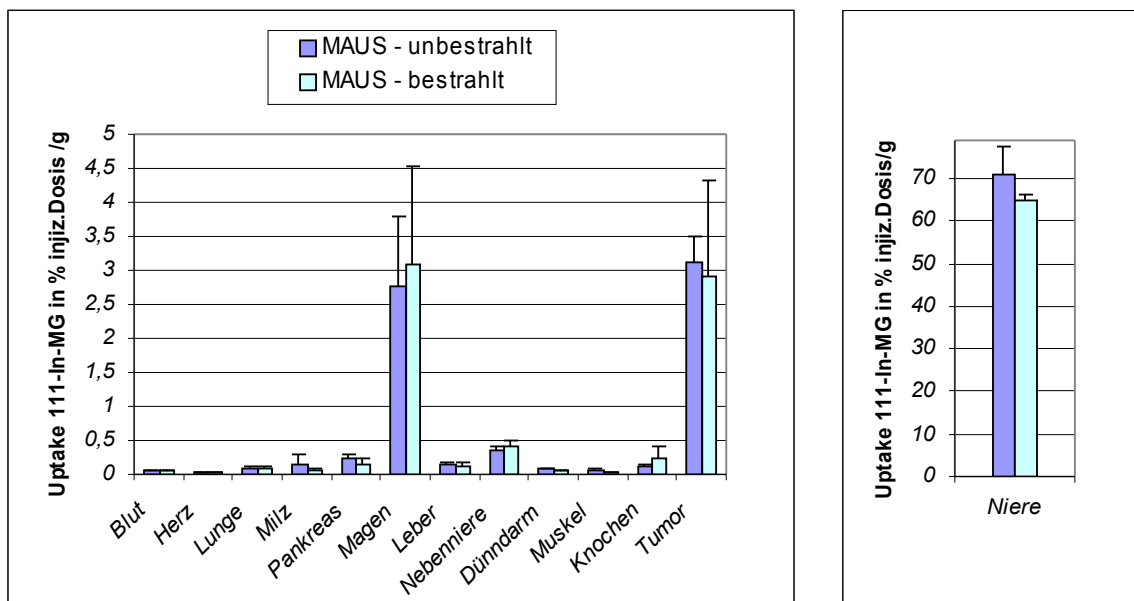


Abb. 3.11: <sup>111</sup>In-DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin-Biodistribution (Graphik)

### 3.6.2 Bioverteilungsstudie von <sup>111</sup>In-Octreotid

Bei keinem der untersuchten Organe gab es einen signifikanten Unterschied im Peptiduptake zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Mäusen.

Die Niere hatte als Ausscheidungsorgan von <sup>111</sup>In-Octreotid mit  $15,763 \pm 5,27\%$  injiz.Dosis/g bei den unbestrahlten und mit  $11,765 \pm 2,465\%$  injiz.Dosis/g bei den bestrahlten Mäusen die höchste Aktivitätsanreicherung 3 Stunden nach Injektion.

Der zweithöchste Uptake war im Tumor zu messen. Hier lag die Anreicherung in den unbestrahlten Tumoren mit  $2,145 \pm 0,372\%$  injiz.Dosis/g jedoch signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als in den bestrahlten Tumoren mit  $1,397 \pm 0,148\%$  injiz.Dosis/g. Das bedeutet, dass pro Gramm Tumorgewebe in den unbestrahlten Tumoren mehr SST2-Rezeptoren exprimiert waren als in den bestrahlten.

Einen deutlich geringeren Uptake zeigte der SST-Rezeptor positive Magen mit  $0,329 \pm 0,156\%$  injiz.Dosis/g (unbestrahlt) bzw.  $0,386 \pm 0,048$  (bestrahlt) und das ebenfalls rezeptorpositive Pankreas ( $0,131 \pm 0,006\%$  injiz.Dosis/g bzw.  $0,185 \pm 0,033\%$  injiz.Dosis/g). Eine ähnlich hohe Anreicherung wie das Pankreas zeigten die Nebennieren.

Der Peptiduptake in den übrigen untersuchten Organen war sehr gering und lag unter den Werten für das Pankreas (Tab. 3.22; Abb.3.12).

| Organ      | Mäuse unbestrahlt |       | Mäuse bestrahlt-10 Gy |       |
|------------|-------------------|-------|-----------------------|-------|
|            | MW                | SD    | MW                    | SD    |
| Blut       | 0,031             | 0,014 | 0,031                 | 0,013 |
| Herz       | 0,022             | 0,006 | 0,024                 | 0,006 |
| Lunge      | 0,055             | 0,013 | 0,079                 | 0,032 |
| Milz       | 0,07              | 0,001 | 0,086                 | 0,018 |
| Pankreas   | 0,131             | 0,006 | 0,185                 | 0,033 |
| Magen      | 0,329             | 0,156 | 0,386                 | 0,048 |
| Leber      | 0,125             | 0,02  | 0,103                 | 0,007 |
| Niere      | 15,763            | 5,27  | 11,765                | 2,465 |
| Nebenniere | 0,172             | 0,023 | 0,197                 | 0,037 |
| Dünndarm   | 0,085             | 0,076 | 0,062                 | 0,025 |
| Muskel     | 0,019             | 0,01  | 0,016                 | 0,008 |
| Knochen    | 0,068             | 0,021 | 0,04                  | 0,016 |
| Tumor      | 2,145             | 0,372 | 1,397                 | 0,148 |

Tab. 3.22:  $^{111}\text{In}$ -Octreotid-Biodistribution in AR42J-tumortragenden Nacktmäusen nach Bestrahlung mit 10 Gy und in unbestrahlten Mäusen. Pro Gruppe wurden jeweils 3 Tiere untersucht.

Alle Angaben in % injiz.Dosis/g

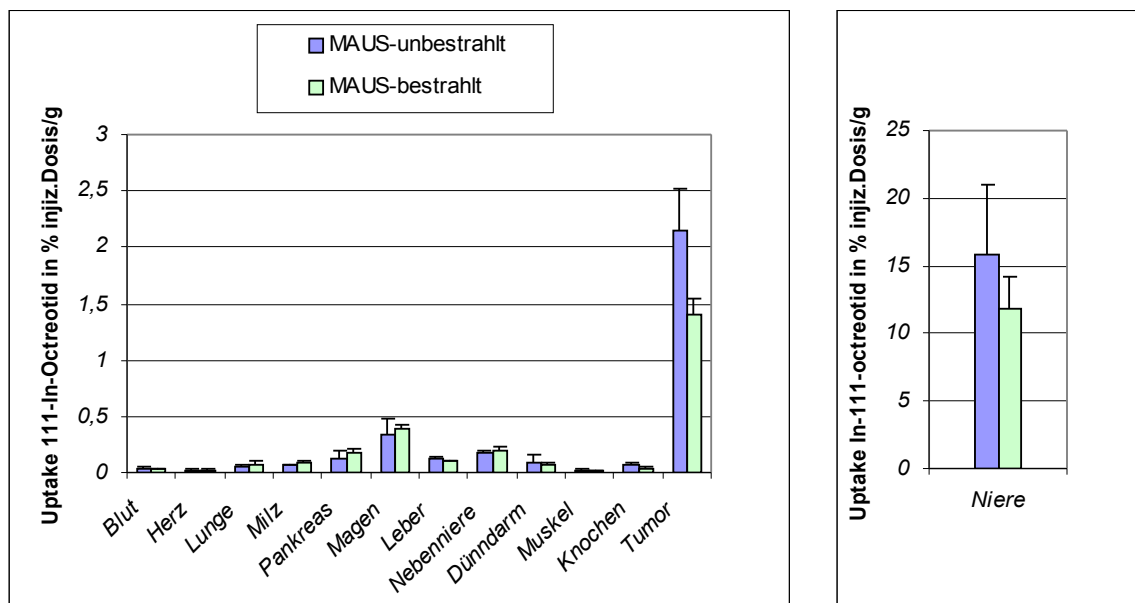


Abb. 3.12:  $^{111}\text{In}$ -Octreotid-Biodistribution (Graphik)

### 3.7 Histologie

Die histologische Aufarbeitung der Tumoren nach den Versuchen zur Bioverteilung erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der in vitro- und in vivo-Experimente im Hinblick auf die Rezeptorexpression nach Bestrahlung. Ziel der histologischen Färbungen war es, den nekrotischen Gewebeanteil im bestrahlten Tumor mikroskopisch annähernd zu bestimmen sowie den Anteil an vitalen, zur Rezeptorexpression fähigen Zellen.

Die Färbung der Tumorschnitte erfolgte mit Hämalaun-Eosin (H.E.), um eine gute Unterscheidung zwischen vitalen und nekrotischen Zellarealen treffen zu können.

Die unbestrahlten AR42J-Tumore stellen sich mikroskopisch als einheitliches und vitales, von bindegewebigen Septen durchzogenes Gewebe dar. Die Zellkerne waren in allen Bereichen des Tumors deutlich zu erkennen, die Kern-Plasma-Relation war zugunsten der Kerne verschoben. Zudem ließen sich zahlreiche Zellkerne in unterschiedlichen Mitosestadien erkennen, was auf eine hohe Proliferationsgeschwindigkeit der Tumorzellen hindeutet (Abb. 3.13; 3.14).

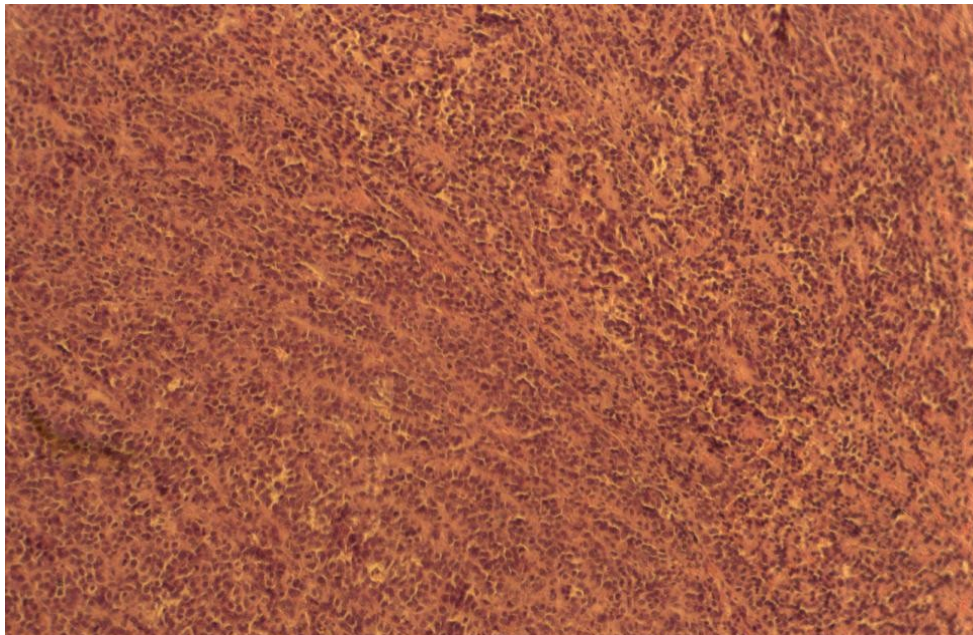


Abb. 3.13: AR42J-Tumor unbestrahlt; Vergrößerung 10fach



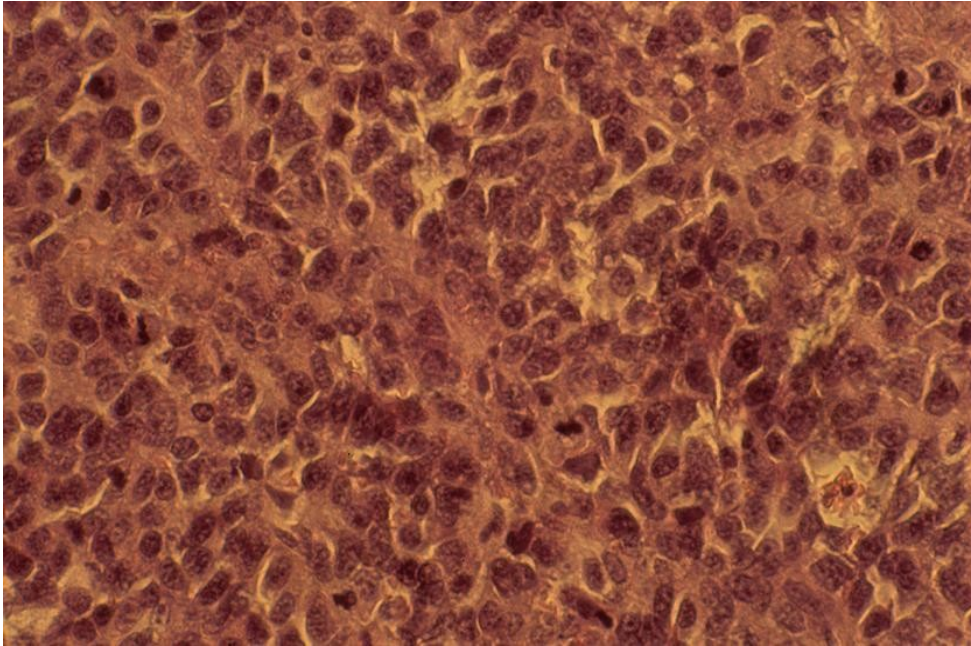


Abb. 3.14: AR42J-Tumor unbestrahlt; Vergrößerung 40fach

Der bestrahlte Tumor zeigte mikroskopisch ein sehr polymorphes Zellbild. Bereiche mit vitalen Zellen waren teilweise von großen, mit Erythrozyten gefüllten Blutlakunen durchzogen. Vor allem waren aber nekrotische Areale zu erkennen, in denen sich der Zellkern stark kondensiert oder gar nicht mehr darstellte, und die Zellgrenzen verstrichen und aufgehoben waren. Neutrophile Granulozyten waren zur Phagozytose in die nekrotischen Bereiche eingewandert. Mikroskopisch betrachtet betrug der Anteil des nekrotischen Gewebes am Gesamttumor circa 70%, nur etwa 30% war noch als vitales, zur Rezeptorexpression fähiges Gewebe zu identifizieren (Abb. 3.15; 3.16; 3.17).



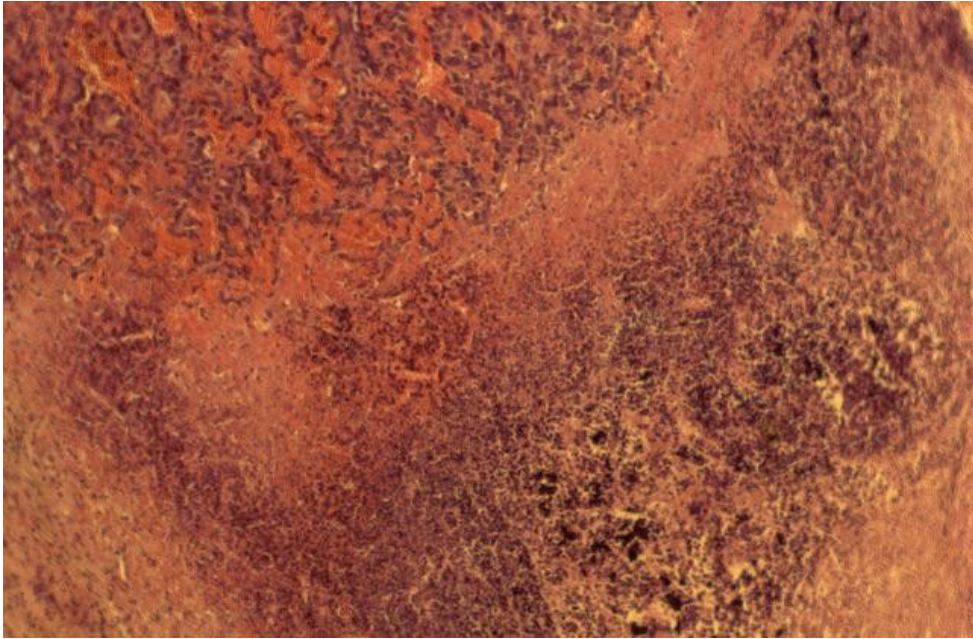


Abb. 3.15: AR42J-Tumor - mit 10 Gy bestrahlt; Vergrößerung 10fach

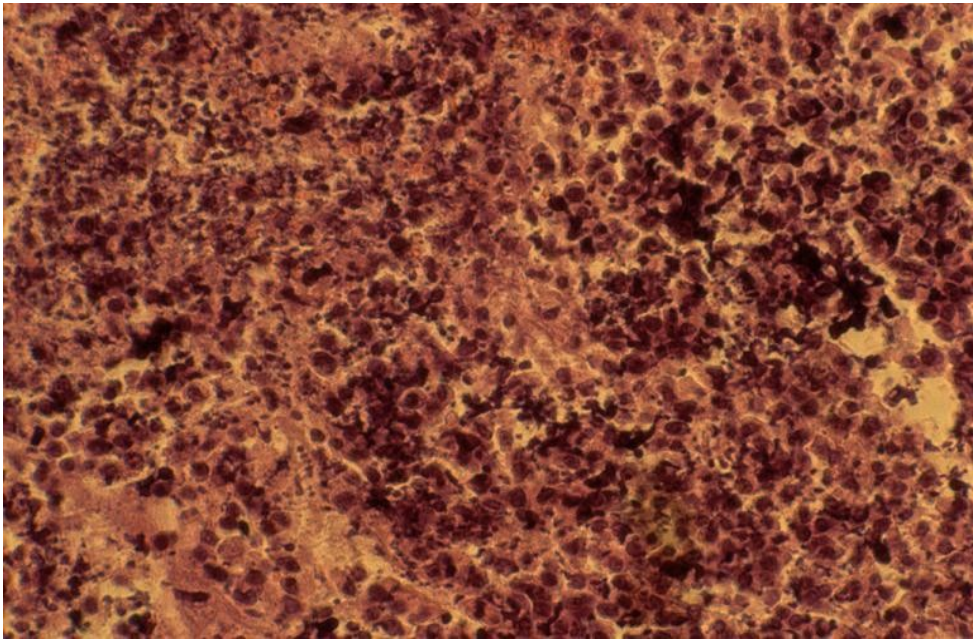


Abb. 3.16: AR42J-Tumor - mit 10 Gy bestrahlt; Vergrößerung 40fach

## 4. Diskussion

### 4.1 Blockierungsversuche bei Glioblastomzellen in vitro

#### 4.1.1 Blockierungsversuche mit Minigastrin

Die CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression bei Astrozytomen wurde bisher nur in geringem Umfang von wenigen Arbeitsgruppen untersucht. Die publizierten Daten weisen jedoch sehr unterschiedliche Resultate auf.

Reubi et al. wiesen in 65% der untersuchten differenzierten Astrozytome durch in vitro Rezeptorautoradiographie mit  $^{125}\text{I}$ -Gastrin und  $^{125}\text{I}$ -CCK an Kryoschnitten von Tumorbiopsien die Expression von CCK-B/Gastrin-Rezeptoren nach, bei undifferenzierten Glioblastomen fanden sich in keiner von zehn Glioblastombiopsien CCK-B/Gastrin-Rezeptoren (Reubi et al. 1997 b). Hiernach ist die CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression abhängig vom Differenzierungsgrad der Astrozytome. Je maligner und undifferenzierter das Astrozytom, desto weniger CCK-B/Gastrin-Rezeptoren werden exprimiert.

Im Gegensatz dazu konnte in Glioblastomzelllinien in vitro durch Zugabe von Gastrin in das Nährmedium eine Proliferationssteigerung erzielt werden, was auf ein Vorhandensein von CCK-B/Gastrin-Rezeptoren hindeuten könnte (de Hauwer et al. 1998; Camby et al. 1997). Ebenso konnte von der selben Arbeitsgruppe durch Zugabe eines CCK-B/Gastrin-Rezeptorantagonisten bei fünf von zehn Glioblastomzelllinien ein Rückgang der Zellproliferation nachgewiesen werden, bei drei Zelllinien wurde keine Änderung beobachtet (Camby et al. 1996).

In diesen Versuchen von de Hauwer et al. und Camby et al. wurde jedoch nicht direkt der CCK-B/Gastrin-Rezeptor an der Zelloberfläche nachgewiesen, sondern aufgrund einer Änderung der Proliferationsrate der Glioblastomzellen nach Zugabe von Gastrin bzw. eines Gastrinantagonisten in das Nährmedium auf eine CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression geschlossen.

Ein anderer indirekter Hinweis auf eine CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression gelang durch die RT-PCR. Es zeigte sich eine vermehrte Expression von mehr als 70 Genen nach Stimulation mit Gastrin in Glioblastomzellen, wobei einige dieser Gene für die Zellmigration verantwortlich sind (Kucharczak et al. 2001).

Auch *in vivo* wurde die Rezeptorexpression untersucht. So konnte durch die Rezeptorszintigraphie mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin bei einem Patienten mit einem anaplastischen Astrozytom (WHO°III) der Tumor bei einem sehr guten Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis eindeutig lokalisiert werden (Behr und Béhé 2002). Für die vermehrte Anreicherung im Tumor kann einerseits eine vermehrte Rezeptorexpression, andererseits ein Defekt in der Blut-Hirn-Schranke im Tumorbereich verantwortlich sein (Luyken et al. 1994, Haldemann et al. 1995).

Im Rahmen der Versuche zu dieser Arbeit ließen sich bei sechs Glioblastomzelllinien *in vitro* keine CCK-B/Gastrin-Rezeptoren nachweisen. Dabei wurden diese Experimente als Blockierungsversuche durchgeführt. Das bedeutet, dass die spezifische Bindung von  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin an den CCK-B/Gastrin-Rezeptor sowie die unspezifische Bindung durch zusätzliche Gabe von unmarkiertem Minigastrin gemessen wurde. Diese Ergebnisse gleichen demnach den *in vitro*-Resultaten durch die Rezeptorautoradiographie von Reubi et al. (Reubi et al. 1997 b).

Somit gelang bisher in keinem Experiment der Nachweis des CCK-B/Gastrin-Rezeptors auf der Zelloberfläche von Glioblastomzellen *in vitro*.

Im Gegensatz zu den Versuchen von Reubi wurden in dieser Arbeit die Versuche jedoch nicht an frischen Tumorbiopsien oder an Primärkulturen in frühen Passagen, sondern an Zellen, die sich mindestens in der 25 Passage befanden und sich somit schon vom ursprünglichen Zustand dedifferenziert haben können, durchgeführt.

Im weiteren Verlauf der Experimente sollte untersucht werden, ob sich die CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression durch Modifikationen im Versuchsaufbau induzieren läßt.

Sphäroide, bei denen die Tumorzellen *in vitro* in dreidimensionaler Struktur wachsen, kommen im Gegensatz zu den zweidimensionalen Monolayerkulturen dem Verhalten von Tumoren *in vivo* deutlich näher (Santini et al. 1999). So exprimieren Sphäroide von Meningeomzellen den Progesteronrezeptor in deutlich höherem Maße und über einen längeren Zeitraum als Monolayerkulturen (Tonn et al. 1997).

Ein Unterschied in der CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression zwischen Glioblastomzellen, die als Sphäroide und Monolayerzellen wachsen, konnte in diesen Experimenten hingegen nicht dargestellt werden. Auch in Sphäroiden war der Rezeptorstatus negativ.

Jedoch ist einschränkend darauf hinzuweisen, dass für die hier gezeigten Daten die Sphäroide nicht in den dafür vorgesehenen Apparaturen kultiviert wurden (z.B. silikonisierte Glasgefäße), sondern durch Unterlassung der Zellpassagierung in den Kulturflaschen als Sphäroide wuchsen. Demnach war die Form und Größe der einzelnen Sphäroide unterschiedlich.

Durch Zugabe eines in AR42J-Kultur benutzten und danach steril filtrierten Mediums zu der Nährlösung für eine Glioblastomzelllinie (G109) gelang es ebenfalls nicht, die CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression zu induzieren. Durch die von den SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptor positiven AR42J-Zellen in das Medium sezernierten Proteine sollte eine Expression der gleichen Rezeptoren bei den Glioblastomzellen erreicht werden.

#### **4.1.2 Blockierungsversuche mit Octreotid**

Ebenso wie die CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression wird die Expression der Somatostatin-Rezeptoren (SSTR) bei Astrozytomen, vor allem bei den Glioblastomen, seit Jahren sehr kontrovers diskutiert.

Reubi et al. zeigten *in vitro* an 14 von 17 Tumorbiopsien von Astrozytomen WHO  $\text{I-III}$  durch die Rezeptorautoradiographie mit Jod-125 markiertem Somatostatin-28 und einem Somatostatin-Octapeptid-Derivat eine deutliche Expression von SSTR, jedoch bei keiner der 20 untersuchten Biopsien von Glioblastomen. Wie die Expression des CCK-B/Gastrin-Rezeptors scheint die des Somatostatin-Rezeptors vom Differenzierungsgrad der Astrozytome abhängig zu sein (Reubi et al. 1987). Zu gleichen Resultaten gelangten auch Haldemann et al. und Luyken et al. durch Rezeptorszintigraphien mit  $^{111}\text{In}$ -Octreotid *in vivo*. Beide konnten zwar eine Anreicherung von  $^{111}\text{In}$ -Octreotid in Glioblastomen nachweisen, jedoch reichernte sich ebenfalls das unspezifisch bindende  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA im Tumor an, so dass die Octreotidanreicherung eher auf die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke als auf eine spezifische Bindung an die Tumorzellen zurückzuführen ist (Haldemann et al. 1995; Luyken et al. 1994).

In einer Vielzahl anderer Versuche wurden gegensätzliche Ergebnisse erzielt.

So konnte in fünf von sieben Astrozytombiopsien (WHO°III-IV) durch Northern-Blot Versuche deutlich mehr SST-mRNA als in normalen Hirnbiopsien nachgewiesen werden, wobei die SST2-mRNA in allen Tumorbiopsien zu finden war (Dutour et al. 1998). Weniger häufig werden SST1- und 3-mRNA und selten SST4- und 5-mRNA bei Glioblastomzellen gefunden (Lamszus et al. 1997). Hirota et al. zeigten in nur zwei von sieben Glioblastomzelllinien in vitro durch RT-PCR eine erhöhte Expression von SST-mRNA (Hirota et al. 1998).

Jedoch impliziert ein hoher Gehalt an mRNA nicht unbedingt eine hohe Membranrezeptordichte. Eine mögliche Ursache dafür ist ein posttranskriptionaler Defekt in Tumorzellen, der die Translation der Rezeptoren verändert (Fisher et al. 1998). Ebenso läßt sich bei einer erhöhten mRNA-Expression in Tumorbiopsien nicht exakt bestimmen, ob die Tumorzellen oder das umliegende Gewebe wie Blutgefäße, normale Epithelzellen oder Immunzellen für die vermehrte Expression verantwortlich sind. Auch könnten in diesen Biopsien nur wenige Zellen für die mRNA-Expression verantwortlich sein. So würde fälschlich vom Verhalten weniger Zellen auf den gesamten Tumor geschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit des SST-Rezeptornachweises ist die Bindung von Somatostatin-Gold-Konjugaten an den Rezeptor (Feindt et al. 1995; Luyken et al. 1994), wobei die Bindung der Goldkonjugate nicht spezifisch für die unterschiedlichen Rezeptorsubtypen ist.

Andere Arbeitsgruppen haben immunhistochemische Versuche durchgeführt. Dabei wurden in Glioblastomzellen in vitro die SST-Rezeptoren mit Subtyp-spezifischen Antikörpern dargestellt (Held-Feindt et al. 1999, Dutour et al. 1998). Da aber das Antikörperepitop von der Bindungsstelle des Rezeptors verschieden sein kann, zeigt eine immunhistochemische Anfärbbarkeit des Tumors nicht zwangsläufig die Fähigkeit des Rezeptors, den Liganden zu binden (Reubi et al. 2001).

In einer Studie gibt es Hinweise darauf, dass in vivo der SSTR2 in low-grade Astrozytomen, darunter auch im Glioblastoma multiforme, exprimiert werden. Dabei wurde <sup>90</sup>Y-DOTATOC in den Tumor injiziert und szintigraphisch dargestellt (Merlo et al. 1999).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Experimente weisen darauf hin, dass die vielen Nachweismethoden unterschiedliche Sensitivitäten zur Darstellung vor allem geringer Rezeptormengen besitzen. Das wird vor allem beim Vergleich zwischen den sehr sensitiven amplifizierenden Methoden wie der RT-PCR, die auch geringste Mengen mRNA in der Zelle darstellen können, und den eher gröberen Nachweismethoden wie den Proliferationsassays und

den Bindungsstudien deutlich (Fisher et al. 1998). Ebenfalls muss beachtet werden, dass, wie beim Einsatz von Antikörperepitopen, unterschiedliche Möglichkeiten zur Interaktion mit anderen Zellmembranbestandteilen bestehen und dadurch falsch positive Resultate erzielt werden können.

Im Gegensatz zu anderen Bindungsstudien, die mit Jod-125 markiertem Somatostatin-28 oder Somatostatin-14, welche an alle Subtypen (1-5) des SST-Rezeptors mit gleicher Affinität binden, durchgeführt wurden (Reubi et al. 1987, Hirota et al. 1998), wurde in dieser Arbeit das <sup>111</sup>In-Octreotid, das eine Rezeptorselektivität für den SST2-Rezeptor besitzt, verwendet. Dabei zeigten fünf Glioblastomzelllinien durch Blockierungsversuche (bei Inkubtion mit <sup>111</sup>In-Octreotid und zusätzlicher Blockierung der eventuell vorhandenen SSTR mit unmarkiertem Somatostatin-14) keine spezifische Bindung des Octreotids an den SST2-Rezeptor.

Somit lassen sich mit der hier durchgeführten Methode bei Glioblastomzelllinien keine SST2-Rezeptoren, dessen mRNA-Expression am häufigsten beschrieben wurde, nachweisen. Daraus resultiert, dass bei einem Nachweis von SST-Rezeptor-mRNA nicht zwangsläufig auf das Vorhandensein des SST-Rezeptors auf der Zellmembran geschlossen werden kann. Eine Ursache dafür ist möglicherweise ein posttranskriptionaler Defekt in Tumorzellen, der die Translation der Rezeptoren verändert (Fisher et al. 1998). Es ist aber auch denkbar, dass diese Rezeptoren zwar exprimiert sind, aber die Rezeptordichte zu gering ist, um sie mit Blockierungsversuchen oder Bindungsstudien darzustellen.

Durch Zugabe eines in AR42J Kultur benutzten und danach steril filtrierten Mediums zu der Nährlösung für die Glioblastomzelllinie (G109) gelang es ebenfalls nicht, die SST-Rezeptorexpression zu induzieren. Somit hatten die von den AR42J Zellen in das Medium sezernierten Proteine keinen Einfluß auf den SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptorstatus.

#### **4.1.3 Blockierungsversuche nach Bestrahlung**

Die postoperative Bestrahlung stellt nach der operativen Resektion des Tumors die wichtigste Säule in der Therapie des GBM dar. Daher ist es von großer Bedeutung, die Wirkung der Bestrahlung auf Glioblastomzellen in vitro und in vivo vor allem auf molekularer Ebene zu untersuchen, um so in Zukunft die Therapie des Glioblastoms zu verbessern und neue Therapieansätze zu entwickeln.

In verschiedenen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass eine externe Bestrahlung die Gentranskription, die Proteinmenge und die Rezeptorexpression der Zelle verändert. So wurden der Interleukin-4-Rezeptor und der Transferrin-Rezeptor nach Bestrahlung einer Glioblastomzelllinie mit 5 Gy upreguliert, in einer anderen Glioblastomzelllinie bei gleichen Versuchsbedingungen jedoch downreguliert (Kim et al. 2003).

Eine Bestrahlung mit einer Dosis von bis zu 8 Gy führte zu einer erhöhten Expression der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2), woraus ein vermehrt invasives Potential der Zellen resultierte (Wild-Bode et al. 2001).

Ebenfalls beeinflusste die Bestrahlung die Regulation der Apoptoseproteine in den Tumorzellen. So wurde nach einer Strahlendosis von 10 Gy der antiapoptotische Faktor bcl-2 downreguliert, hingegen der proapoptotische Transkriptionsfaktor p73 upreguliert. Folglich wurde die Zelle in einen apoptotischen Zustand überführt (Pucci et al. 2002).

Zur Beantwortung der Frage, ob die externe Bestrahlung eine Expression von SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren bewirken kann, wurde in den Versuchen zu dieser Arbeit eine Glioblastomzelllinie (G109) mit 8 bzw. 16 Gy bestrahlt. Die Auswahl der Bestrahlungsdosis erfolgte in Anlehnung an die Experimente von Pucci et. al. (2002). Die Rezeptorexpression von SST2 und CCK-B/Gastrin sollte durch Blockierungsversuche nach 40 und 60 Stunden bestimmt werden. Jedoch konnte eine Expression dieser Rezeptoren durch die externe Bestrahlung in diesem hohen und weit auseinanderliegenden Dosisbereich nicht induziert werden. Die externe Bestrahlung scheint demnach keinen Einfluss auf die Expression dieser beiden Rezeptoren bei der Glioblastomzelllinie G109 zu haben.

#### **4.1.4 Stellenwert der SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren bei Glioblastomen**

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass bei Glioblastomzelllinien eine SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression durch Blockierungsversuche weder in vitro bei unter Normalbedingungen kultivierten Zellen, noch nach einer Stimulation der Zellen mit AR42J-Medium, einem Sphäroidwachstum oder einer externen Bestrahlung der Zellen nachzuweisen war.

Einschränkend ist jedoch zu erwähnen, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche nur an Zellen in hoher Passage (ab Passage 25) durchgeführt und keine frischen Primärkulturen

von Glioblastomzellen verwendet wurden, bei denen der Rezeptorstatus dem *in vivo* Zustand näher ist. Zwar wird der Verlust der Expression für den SST-Rezeptor bei Glioblastomzellen in hohen Passagen verneint (Feindt et al. 1996). Aus eigenen Versuchen, die in dieser Arbeit nicht aufgeführt sind, ist hingegen bekannt, dass bei Meningeomzellen aus einer Primärkultur in frühen Passagen ein Verlust der Rezeptorexpression besteht.

Eine Änderung der Expression des CCK-B/Gastrin-Rezeptors in hohen Passagen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Zukünftig ist es interessant, den SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptorstatus an differenzierten Astrozytomen, deren positiver Status für beide Rezeptoren einheitlich belegt ist, nach Bestrahlung *in vitro* zu untersuchen.

Zwar gibt es *in vivo* Hinweise darauf, dass in high-grade Astrozytomen der SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptor vorhanden sein können (Behr und Béhé 2002, Merlo et al. 1999).

Auf Grund des negativen SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptorstatus bei unter Normalbedingungen wachsenden Glioblastomzellen sowie auch nach Bestrahlung der Zellen *in vitro* scheint es so, dass durch die SST2- oder CCK-B/Gastrin-Rezeptorszintigraphie von Glioblastomen *in vivo* nach einer Bestrahlung nicht auf die Vitalität des Tumorgewebes geschlossen werden kann. Somit erscheint, soweit nach den *in vitro*-Resultaten beurteilbar, der SST2- oder CCK-B/Gastrin-Rezeptorstatus als Verlaufsparemeter nach einer Bestrahlung von Glioblastomen eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Auch wenn SST- und CCK-B/Gastrin-mRNA bzw. SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren nur in sehr geringen und mit den hier angewandten Methoden nicht nachweisbaren Mengen exprimiert sind, wird der Rezeptorstatus als Verlaufsparemeter und Vitalitätsindikator eher nicht geeignet sein.

Es ist daher sinnvoll andere Membranrezeptoren zu untersuchen, die vor allem nach Bestrahlung vermehrt exprimiert werden und die deshalb mittels Rezeptorszintigraphie mit rezeptorspezifischen Peptiden eindeutig nachzuweisen sind, um daraus Hinweise über die Vitalität des Tumors nach der Bestrahlung zu gewinnen.



## 4.2 AR42J-Bestrahlungsversuche in vivo und in vitro

### 4.2.1 Internalisierung von SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren

AR42J ist eine chemisch induzierte, exokrine Pankreastumorzelllinie der Ratte (Longnecker et al. 1979), die sich durch unkomplizierte Kulturbedingungen und eine hohe Proliferationsrate auszeichnet. Wegen des positiven SST- (Viguerie et al. 1988; Vidal et al. 1994; Froidevaux et al. 1999; Hofslis et al. 2002) und CCK-B/Gastrin- (Scemama et al. 1987; Seva et al. 1990; Gunther et al. 2003) Rezeptorstatus sind diese Zellen in vielen experimentellen Modellen weitverbreitet eingesetzt.

Ob diese Zelllinie alle SST-Rezeptorsubtypen bis auf den SSTR4 (Hofslis et al. 2002) oder ausschließlich den SST2-Rezeptor exprimiert (Froidevaux et al. 1999) ist noch nicht eindeutig geklärt. Beide Arbeitsgruppen bestätigten aber die SST2-Rezeptorexpression, so dass das in den hier beschriebenen Versuchen eingesetzte Octreotid aufgrund seiner SST2-Rezeptorselektivität an die AR42J-Zellen spezifisch binden kann.

Der positive SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptorstatus wurde mit den hier durchgeführten Blockierungsversuchen bestätigt. Beide Rezeptoren ließen sich durch Zugabe eines nicht radioaktiv markierten spezifischen Peptids (Somatostatin-14 bzw. humanes Minigastrin) in hoher Konzentration ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) nahezu vollständig blockieren, so dass die Bindung der markierten Radiopeptide  $^{111}\text{In}$ -Octreotid bzw.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin an den spezifischen Rezeptor sehr stark eingeschränkt bzw. verhindert wurde.

Die AR42J-Zellen dienten als Positivkontrolle für die oben beschriebenen Blockierungsversuche an den Glioblastomzellen. So konnten sowohl Fehler bei der Durchführung der Experimente an Glioblastomzellen als auch Fehler in der Zusammensetzung der Reaktionsmedien, wie zum Beispiel die Konzentration der unmarkierten Peptide, die Aktivität der Radiopeptide und die Reinheit der Puffer, ausgeschlossen werden.

Zudem wurde ein Großteil der Rezeptor-Ligand-Komplexe (81% der SST-Rezeptoren; 72% der CCK-B/Gastrin-Rezeptoren) nach 20 Minuten internalisiert. Das heißt, dass der Rezeptor und das Peptid in die Zelle aufgenommen wurde und das an das Peptid gebundene Radionuklid In-111 somit deutlich näher am Zellkern lokalisiert war. Daher ist der radiotoxische Effekt auf die Zelle deutlich höher als beim Einsatz von Radiopeptiden, die

nicht in die Zelle internalisiert werden. Das Radionuklid In-111 ist sowohl ein  $\gamma$ -Strahler als auch ein Auger-Elektronen-Emitter. Der Vorteil der Auger-Elektronen-Emission besteht in seiner hohen radiotoxischen Wirkung bei geringer Distanz zu der zu schädigenden Substanz (DNA), da die Gewebereichweite sehr gering ist. Somit ist In-111 gut zur Therapie von Mikrometastasen geeignet (Froidevaux et al. 2000) bei gleichzeitiger szintigraphischer Lokalisation.

Um das Verhalten von SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren auf externe Bestrahlung zu untersuchen, wurden die Bestrahlungsexperimente *in vitro* und *in vivo* an den AR42J-Zellen durchgeführt. Der Dosisbereich bei der Bestrahlung (4, 8 und 16 Gy) wurde sehr breit gewählt, um Strahleneffekte auf die Rezeptorregulation und Rezeptorexpression sowohl bei einer relativ geringen als auch bei einer sehr hohen Dosis zu untersuchen.

#### **4.2.2 Wachstumskurven der AR42J-Zellen nach externer Bestrahlung**

Die Wachstumskurven von AR42J-Zellen nach einer Bestrahlung mit 4, 8 und 16 Gy sowie ohne Bestrahlung wurden erstellt, um die Wirkung hochenergetischer Strahlung (6 MeV Photonen) auf das Wachstumsverhalten der AR42J-Zellen zu untersuchen.

Durch die radiotoxische Wirkung auf die Zellen, vor allem durch Schädigung der DNA durch Doppelstrangbrüche (Lewanski et Gullick 2001), reduzierte sich die Zellzahl in den ersten 72 Stunden nach der Strahlenapplikation bei allen drei Dosisstufen, nach 8 Gy und 16 Gy annähernd gleich auf ca. 50% der Ausgangszellzahl (AGZ), nach 4 Gy auf ca. 75% der AGZ. Ob der Zelltod durch Apoptose oder durch die häufigere passive Zellnekrose bedingt ist, wurde nicht bestimmt. Die toten Zellen wurden dadurch identifiziert, dass sie entweder die Adhärenz zur Kulturschale verloren haben oder sich die noch adhärennten toten Zellen mit einer Trypanblaulösung anfärbten.

In den adhärennten Zellen werden durch den gesetzten Strahlenschaden zelleigene Reparaturenzyme aktiviert und der DNA-Schaden repariert (Cohen-Jonathan et al. 1999). So ist auch der erneute Proliferationsschub der mit 4 und 8 Gy bestrahlten Zellen nach 72 Stunden zu erklären. Nach dieser Zeit ist bei einer Dosis von 4 Gy die mitotische Zellfunktion wieder soweit intakt, dass die Zellproliferation wieder gleich schnell verläuft wie bei unbestrahlten AR42J-Zellen. Zwar beginnen die Zellen nach 8 Gy auch wieder zu proliferieren, jedoch deutlich langsamer als nach 4 Gy. Dies ist dadurch zu erklären, dass der

DNA-Schaden nach 8 Gy größer ist als nach 4 Gy und somit eine längere Zeit für die Reparatur des Schadens aufgebracht werden muss. Eine Woche nach Bestrahlung ist bei einer Dosis von 8 Gy wieder die Ausgangszellzahl erreicht, bei einer 4 Gy Strahlendosis jedoch schon die 2,5fache Zellzahl im Vergleich zur Ausgangszellzahl.

Nach der 16 Gy Bestrahlung ist das Ausmaß des gesetzten Schadens so groß, dass dieser (in dem beobachteten Zeitraum) nicht mehr repariert werden kann. Die mitotische Zellfunktion wird nicht wieder hergestellt, die Zellzahl reduziert sich kontinuierlich, so dass nach einer Woche nur noch etwa 1/3 der Ausgangszellen vital sind.

#### **4.2.3 Upregulation von SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren**

Die SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression läßt sich durch verschiedene Peptide und Chemotherapeutika regulieren. Vor allem die SST2-mRNA und der SST2-Rezeptor werden durch Gastrin und Epidermal Growth Factor (EGF) in AR42J-Zellen vermehrt exprimiert. Die Upregulation des Rezeptors ist dabei zeit- und dosisabhängig (Vidal et al. 1994). Auch Dexamethason führt zu einer SST-Rezeptor-Upregulation in AR42J-Zellen (Viguerie et al. 1987). Zudem kommt es zu einer SST2-Rezeptor-Upregulation bei AR42J-tumortragenden Mäusen durch kontinuierliche Infusion des Somatostatinanalogons Octreotid über mehrere Tage. Bei kurzfristiger Octreotidzugabe wird der Rezeptor hingegen in vitro und in vivo downreguliert (Froidevaux et al. 1999). Interessant ist, dass die SST-Rezeptoren durch eine Vielzahl an Chemotherapeutika (Gemcitabine, 5-Fluorouracil, Camptothecin, Mitomycin C, Doxorubicin) downreguliert werden (Fueger et al. 2001).

Die Ergebnisse meiner Versuche zeigen, dass bei den AR42J-Zellen sowohl der SST2- als auch der CCK-B/Gastrin-Rezeptor nach externer Bestrahlung (4, 8, 16 Gy) upreguliert wird. Dabei ist die Upregulation zeit- und dosisabhängig. Es werden bis zu 3,5 mal mehr SST2-Rezeptoren (96 Stunden nach 4 Gy) und bis zu 4 mal mehr CCK-B/Gastrin-Rezeptoren (1 Woche nach 16 Gy) als bei unbestrahlten Kontrollzellen exprimiert.

Beim Vergleich der Rezeptor-Regulation mit den Wachstumskurven (nach 4, 8 und 16 Gy) zeigt sich, dass der SST2-Rezeptor in der Zeit der Zellzahlreduktion nach Bestrahlung upreguliert war. Je höher die applizierte Dosis, desto früher wird der Rezeptor hochreguliert und desto länger bleibt die Upregulation bestehen.

Bei Beginn der erneuten Zellproliferation, nachdem also die Reparaturvorgänge abgeschlossen sind, sinkt die Dichte der SST2-Rezeptoren wieder. Es ist dann bei den

bestrahlten Zellen eine annähernd gleiche SST-Rezeptordichte wie bei unbestrahlten, normal wachsenden Zellen vorhanden. Nach einer Dosis von 16 Gy bleibt der Rezeptor über eine Woche upreguliert, da die Proliferationsphase ausbleibt.

Die antiproliferative und mitosehemmende Wirkung des Somatostatins begründet die Upregulation des SST-Rezeptors, da in der Zeit nach der Bestrahlung die zellulären Schäden, vor allem die DNA-Strangbrüche, repariert und deshalb die Zellteilung gestoppt werden muss, um chromosomale Störungen bei den Tochterzellen zu verhindern.

Der erhöhte SST-Rezeptorstatus kann demnach als Indikator für die antiproliferative Phase der AR42J-Zellen *in vitro* angesehen werden.

Nach einer Bestrahlung mit 4 Gy wird der CCK-B/Gastrin-Rezeptor bei Wiederbeginn der Zellproliferation auf der Zelloberfläche bis zu 3,3 mal mehr exprimiert als bei den unbestrahlten Kontrollzellen. Diese vermehrte Expression lässt sich über die gesamte Zeit der Wachstumsphase beobachten. Die Upregulation des CCK-B/Gastrin-Rezeptors passt zu der wachstumsstimulierenden Wirkung des Gastrins auf die Zelle. Bei dieser Dosis scheinen nur die vom DNA-Schaden reparierten und proliferierenden Zellen zur CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression fähig zu sein. Während der Phase der Zellzahlreduktion und der SST-Rezeptor-Upregulation ist der CCK-B/Gastrin-Rezeptor nicht upreguliert, sondern in gleicher Menge exprimiert wie bei den unbestrahlten Kontrollzellen.

Nach einer Bestrahlung mit 8 Gy ist die Rezeptor-Upregulation nicht mehr streng auf die Wachstumsphase der Zellen beschränkt wie nach 4 Gy. Hier beginnt die Upregulation schon zu der Zeit, in der Zellreparaturmechanismen aktiviert sind und sich die Zellzahl noch weiterhin reduziert. Wie auch nach einer Dosis von 4 Gy bleibt der Rezeptor auch während der Proliferationsphase vermehrt exprimiert.

Ein gegensätzlicher Zusammenhang wird nach einer Dosis von 16 Gy beobachtet. Es erfolgt, trotz des kontinuierlichen Zelluntergangs und einer fehlenden Proliferationsphase, eine Upregulation des CCK-B/Gastrin-Rezeptors über den gesamten beobachteten Zeitraum. Je geringer die Zellzahl, desto mehr CCK-B/Gastrin-Rezeptoren werden exprimiert. Bei dieser Dosis ist folglich eine große Ähnlichkeit mit der SST-Rezeptor-Regulation zu erkennen.

In folgenden Experimenten wird es wichtig sein zu untersuchen, ob durch eine fraktionierte Bestrahlung *in vitro* und *in vivo* mit kleineren Bestrahlungsdosen zwischen 0,5 und 2 Gy ebenfalls eine Rezeptor-Upregulation erreicht werden kann.

#### 4.2.4 Biodistribution im Tiermodell

Um die *in vitro*-Ergebnisse zur Rezeptor-Upregulation zu bestätigen, wurden *in vivo*-Experimente an AR42J-tumortragenden athymischen Nacktmäusen durchgeführt.

Über die Änderung der SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptorexpression nach Bestrahlung von subkutan wachsenden AR42J-Tumoren *in vivo* sind bisher keine Daten bekannt.

Nach der Bestrahlung des Tumors mit einer Dosis von 10 Gy wurde den Mäusen 48 Stunden später  $^{111}\text{In}$ -Octreotid bzw.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin i.v. injiziert. Nach drei Stunden wurde der Peptiduptake in den Organen Blut, Herz, Lunge, Milz, Pankreas, Magen, Leber, Niere, Nebenniere, Muskel, Knochen sowie im Tumor gemessen. Die Auswahl der Strahlendosis und die Zeit der Radiopeptidinjektion nach Bestrahlung erfolgte aufgrund der deutlichen Rezeptor-Upregulation in den *in vitro*-Experimenten in diesem Dosis- und Zeitbereich nach Bestrahlung.

Das Ergebnis für den Organuptake wurde aus den Mittelwerten der bestrahlten bzw. unbestrahlten Mäuse als % der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% injiz.Dosis/g) dargestellt.

Bei der Bioverteilungsstudie mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin zeigt sowohl der bestrahlte als auch der unbestrahlte Tumor einen deutlichen Radiopeptiduptake von  $2,926 \pm 1,398$  bzw.  $3,131 \pm 0,362\%$  injiz.Dosis/g. Wie auch in der Zellkultur nehmen die AR42J-Zellen in großer Menge das Minigastrin auf. Dieses Peptid ist also gut geeignet, AR42J-Tumoren auch *in vivo* darzustellen. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Uptake zwischen den bestrahlten und den unbestrahlten Tumoren nachgewiesen werden. Diese *in vivo*-Ergebnisse konnten zunächst die *in vitro*-Resultate zur CCK-B/Gastrin-Rezeptor-Upregulation nicht bestätigen. Die Ursache dafür liegt an der unterschiedlichen histologischen Zusammensetzung der bestrahlten und unbestrahlten Tumoren. Dieser Zusammenhang wird in Abschnitt 4.2.5 näher erläutert.

Der Uptake des CCK-B/Gastrin-Rezeptor-exprimierenden Magens lag mit  $2,773 \pm 1,028\%$  injiz.Dosis/g (unbestrahlt) und  $3,088 \pm 1,434\%$  injiz.Dosis/g (bestrahlt) im Bereich des Tumoruptakes. Hieraus können sich bei der szintigraphischen Anwendung in der Klinik Nachteile ergeben, weil durch den hohen Magenuptake eine Anreicherung in CCK-B/Gastrin-Rezeptor-exprimierenden Tumoren (z.B. im Pankreas) überlagert und somit nicht sicher erkannt würde.

Ein anderer Nachteil des Minigastrins ist der sehr hohe Nierenuptake mit 70,919% injiz.Dosis/g (unbestrahlt) und  $64,845 \pm 1,683\%$  injiz.Dosis/g (bestrahlt). Somit stellt die Niere das dosislimitierende Organ beim Einsatz dieses Radiopeptids dar, was bei der klinischen Anwendung unbedingt berücksichtigt werden muss, um nephrotoxische Effekte zu vermeiden. Die Leber spielt bei der Elimination nur eine geringe Rolle, was sich am geringen Peptiduptake widerspiegelt.

Im ebenfalls CCK-B/Gastrin-Rezeptor-positiven Pankreas wurde mit  $0,238 \pm 0,047\%$  injiz.Dosis/g (unbestrahlt) und  $0,154 \pm 0,067\%$  injiz.Dosis/g nur ein leicht erhöhter Minigastrin-Uptake gemessen. In allen anderen untersuchten Organen lag der Uptake noch unter dem Wert für das Pankreas, so dass in diesen Organen der CCK-B/Gastrin-Rezeptor nur minimal exprimiert wird.

Wie zu erwarten zeigte sich in keinem der untersuchten Organe ein signifikanter Unterschied im Uptake zwischen bestrahlten und unbestrahlten Mäusen. Die Ursache dafür liegt in der exzentrischen Lage des Tumors an der Hinterflanke der Maus. So konnte der Zentralstrahl exakt auf den Tumor ohne Einschluß benachbarter Organe ausgerichtet werden.

Für die Zukunft wird es relevant sein, ein Gastrinanalogen zu entwickeln, dessen Nierenuptake deutlich geringer ist als der des Minigastrins, um so die Akkumulation des Radionuklids in der Niere zu minimieren. Für einen bis zu 90% geringeren Nierenuptake sorgt die Injektion von Polyglutaminsäuren während der Radiopeptidtherapie (Béhé et al. 2005).

Auch die Untersuchung der Bioverteilung von  $^{111}\text{In}$ -Octreotid zeigte eine Anreicherung des Peptids sowohl im bestrahlten ( $1,397 \pm 0,148\%$  injiz.Dosis/g) als auch im unbestrahlten Tumor ( $2,145 \pm 0,372\%$  injiz.Dosis/g). Der Octreotid-Uptake im AR42J-Tumor ist somit geringer als der Minigastrin-Uptake. Bei der Octreotid-Bioverteilung waren pro Gramm unbestrahlten Tumorgewebes signifikant mehr SST2-Rezeptoren exprimiert als beim bestrahlten Tumorgewebe. Diese Ergebnisse widersprechen zunächst den in vitro-Experimenten, die eine Upregulation des SST2-Rezeptors nach externer Bestrahlung gezeigt haben. Auch hier liegt die Begründung in der histologischen Zusammensetzung des Tumors (s. 4.2.5).

Der Uptake des  $^{111}\text{In}$ -Octreotid in der Niere als Ausscheidungsorgan ist mit  $15,763 \pm 5,27\%$  injiz.Dosis/g (unbestrahlt) und  $11,765 \pm 2,465\%$  injiz.Dosis/g (bestrahlt) deutlich geringer als der Nierenuptake des  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin. Zwar stellt auch die Niere bei der Octreotid-Biodistribution als Organ mit dem höchsten Uptake das dosislimitierende Organ

dar, jedoch darf bis zum Erreichen eines nephrotoxischen Effekts eine höhere Aktivitätsmenge verabreicht werden als beim Minigastrin. Die Akkumulation des Radiopeptids in der Niere kann durch Aminosäureinfusionen deutlich vermindert werden und so den nephrotoxischen Effekt verringern (Hammond et al. 1993). Annähernd gleiche Werte für den Nieren- und Tumoruption wurden auch von Froidevaux et al. 4 Stunden nach Injektion von  $^{111}\text{In}$ -Octreotid ermittelt (Froidevaux et al. 2000).

Als deutlich SST-Rezeptor-exprimierende Organe nehmen der Magen mit  $0,131 \pm 0,006\%$  injiz.Dosis/g (unbestrahlt) bzw.  $0,185 \pm 0,033\%$  injiz.Dosis/g (bestrahlt) und das Pankreas mit  $0,329 \pm 0,156\%$  injiz.Dosis/g (unbestrahlt) bzw.  $0,386 \pm 0,048\%$  injiz.Dosis/g (bestrahlt) nur relativ wenig Octreotid auf. Bei allen anderen untersuchten Organen liegt der Uptake noch unterhalb des Pankreasuptakes, so dass in diesen Organen nur von einer geringen SST2-Rezeptorexpression ausgegangen werden kann.

Ebenso wie die Minigastrin-Bioverteilung zeigte die Octreotid-Bioverteilung keinen signifikanten Unterschied im Organuptake zwischen bestrahlten und unbestrahlten Mäusen, was auch hier durch die exakte Ausrichtung des Zentralstrahls auf den Tumor unter optimaler Schonung der umliegenden Organe begründet ist.

Der im Vergleich zum Tumoruption geringe Uptake der anderen Organe kann sich bei szintigraphischen Aufnahmen als großer Vorteil erweisen, weil sich das SST2-Rezeptor-exprimierende und dadurch  $^{111}\text{In}$ -Octreotid-speichernde Tumorgewebe nahezu überlagerungsfrei darstellen läßt, so dass schon sehr kleine Tumoren entdeckt werden können. Die szintigraphische Darstellung SST2-Rezeptor-exprimierender Tumoren könnte durch eine vorherige Tumorbestrahlung und daraus resultierender SST-Rezeptor-Upregulation noch deutlich verbessert werden.

Zukünftig wird es wichtig sein, die Biodistribution nach Bestrahlung mit neuen Somatostatin- und Gastrin-Analoga zu untersuchen, die sich über einen längeren Zeitraum und in einer größeren Menge als die von mir verwendeten Peptidanaloga im Tumor anreichern und zugleich schneller aus den Nieren und anderen peptidanreichernden Organen eliminiert werden. Das Ziel dabei ist es, das Tumor-zu-Hintergrund-Verhältnis weiter zu verbessern.

Mit dem  $^{111}\text{In}$ -DOTATOC ist es zum ersten Mal gelungen ein Somatostatinanalogon zu entwickeln, dessen Tumoruption den Nierenuption übersteigt (Froidevaux et al. 2000).

#### 4.2.5 Histologische Auswertung

Die Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Experimente scheinen sich auf dem ersten Blick zu widersprechen. *In vitro* wurden die SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren nach Bestrahlung in unterschiedlichen Dosisbereichen upreguliert, *in vivo* war jedoch der Minigastrin-Uptake pro Gramm Tumorgewebe bei bestrahlten und unbestrahlten Tumoren gleich, der Octreotid-Uptake nach Bestrahlung sogar signifikant geringer.

Die Erklärung dafür liegt in der histologischen Zusammensetzung der Tumore. Die histologischen Schnitte wurden mit H.E. angefärbt, um eine gute Differenzierung zwischen vitalen und nekrotischen Zellen zu erreichen.

Bei den *in vitro*-Versuchen wurde der Peptiduptake der in den Wells adhärennten und deshalb vitalen Zellen untersucht und das Ergebnis als spezifischer Uptake pro Zelle im Vergleich zu Kontrollzellen dargestellt. Hierbei wurde demnach nur der Uptake der vitalen Zellen, sowohl bestrahlt als auch unbestrahlt, gemessen.

Bei den *in vivo*-Experimenten hingegen wurde der Uptake als Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe gemessen. Bei histologischer Betrachtung des bestrahlten Tumors stellt sich heraus, dass er sich zu circa 70% aus nekrotischen und nur zu etwa 30% aus vitalen Zellen zusammensetzt. Da nur die vitalen Zellen die SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren exprimieren, ist also lediglich ein Anteil von circa 30% der Tumormasse für den Uptake verantwortlich. Daher erscheint der Uptake, der pro Gramm Tumorgewebe gemessen wird, im Vergleich zum unbestrahlten Tumor, der fast ausschließlich aus vitalen Zellen besteht, erniedrigt. Vieles deutet somit auf eine deutlich höhere CCK-B/Gastrin- und SST2-Rezeptorexpression nach Bestrahlung auch *in vivo* und somit auf eine Bestätigung der Ergebnisse der *in vitro*-Versuche hin.

Einschränkend zu der histologischen Auswertung bei den bestrahlten Tumoren ist zu sagen, dass der prozentuale Anteil zwischen nekrotischen und vitalen Gewebe nur annähernd und keinesfalls exakt bestimmt werden konnte.

Eine präzisere Aussage hierzu wäre mit einer Single Photon Emissionstomographie (SPECT) oder mit einer Magnetresonanztomographie (MRT) des Tumors möglich. Durch Vergleich der SPECT- und MRT-Aufnahmen sind nekrotische Areale, die durch fehlende Aktivitätsanreicherung im SPECT bzw. Signalthypointensität im MRT charakterisiert sind, besser von vitalem Tumorgewebe zu differenzieren. Ebenso lassen sich die Volumina nekrotischer und vitaler Tumoranteile genauer berechnen.



#### 4.2.6 Ausblick

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren nach externer Bestrahlung sowohl in vitro als auch in vivo upreguliert werden. Der Zeitpunkt der höchsten Upregulation ist dabei abhängig von der Bestrahlungsdosis.

Es besteht deshalb die Möglichkeit, sowohl die Radiopeptiddiagnostik als auch die Radiopeptidtherapie SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptor-exprimierender Tumoren nach externer Bestrahlung zu verbessern und effektiver zu gestalten.

Die Ergebnisse sind für therapeutische Zwecke deshalb interessant, da durch die Rezeptor-Upregulation nach externer Bestrahlung neue molekulare Angriffsziele für einen anschließenden nuklearmedizinischen Einsatz rezeptorspezifischer Radiopeptide entstehen. Rezeptorexprimierende Tumorzellen können somit noch gezielter bekämpft werden unter besserer Schonung der Gewebe, die physiologisch diese Rezeptortypen exprimieren.

Zusätzlich lässt sich durch die Rezeptor-Upregulation der Tumor besser vom umgebenden Gewebe abgrenzen.

Ein weiterer interessanter Ansatz ergibt sich aus den Ergebnissen. Nach einer Tumorbestrahlung könnte durch eine anschließende SST-Rezeptorszintigraphie das Ansprechen des Tumorgewebes im Sinne einer Wachstumshemmung beurteilt werden und somit die SST-Rezeptordichte als prognostischer Marker dienen.

Die Bestimmung der CCK-B/Gastrin-Rezeptordichte im Tumorgewebe könnte sich zukünftig als szintigraphischer Parameter zur Einschätzung der Proliferationsgeschwindigkeit der Tumorzellen nach Radiotherapie nutzen lassen.

Der Vorteil der in vivo-Rezeptorszintigraphie nach Radiotherapie ist die frühe Einschätzung des Tumorstadiums und die frühe Beurteilung des Ansprechens der Tumorzellen auf die Radiotherapie, noch ehe diese Veränderungen anatomisch-morphologisch mittels CT oder MRT im Sinne von Größenveränderungen sichtbar gemacht werden können. Die Tumorbildgebung lässt sich hiermit auf zellulärer Ebene beurteilen.

Die Detektion und Visualisierung von Tumorveränderungen auf zellulärer und sogar molekularer Ebene ist das Ziel der molekularen Bildgebung. Dieses in seiner Bedeutung ständig wachsende Gebiet der Radiologie ermöglicht es mit Hilfe verschiedener Methoden (MRT mit spezifischen Kontrastmitteln, Volumen-CT, SPECT, PET, Fluoreszenzbildgebung) die Tumorbildgebung jedes einzelnen Tumors näher zu verstehen, um somit eine individuelle und zielgenaue Therapie für Tumorpatienten zu erarbeiten.

## 5. Zusammenfassung

Radioaktiv markierte Somatostatin- und Gastrin-Analoga werden erfolgreich zur Diagnose und Therapie von Rezeptor-positiven Tumoren eingesetzt. Dabei ist vor allem die Dichte der exprimierten Rezeptoren von großer Bedeutung. In dieser präklinischen Studie wurde der Einfluss einer externen Bestrahlung auf die Regulation von Somatostatin (SST2)- und Cholezystokinin/Gastrin (CCK-B/Gastrin)-Rezeptoren bei Glioblastomzelllinien *in vitro* sowie bei exokrinen Pankreastumorzellen (AR42J) *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Zunächst wurde an sechs Glioblastomzelllinien der Rezeptorstatus für SST2 und CCK-B/Gastrin *in vitro* bestimmt. Zum Nachweis einer spezifischen Rezeptorbindung wurden Blockierungsversuche mit  $^{111}\text{In}$ -DTPA-Octreotid (OctreoScan-111) bzw.  $^{111}\text{In}$ -DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin durchgeführt, wobei die Blockade unspezifischer Bindungen durch Zugabe von unmarkiertem Somatostatin-14 bzw. humanem Minigastrin erfolgte. Bei keiner der Glioblastomzelllinien wurde eine spezifische Bindung des Radiopeptids an den SST2- bzw. CCK-B/Gastrin-Rezeptor nachgewiesen. Auch durch eine externe Bestrahlung mit einer Einzeldosis von 8 bzw. 16 Gy wurden diese Rezeptoren nicht exprimiert. Zwar gibt es Hinweise darauf, dass *in vivo* die SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren bei high-grade Astrozytomen vorhanden sein können, jedoch konnten *in vitro* durch Blockierungsversuche beide Rezeptoren nicht nachgewiesen werden.

Der in der Literatur beschriebene positive SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptorstatus bei der exokrinen Pankreastumorzelllinie AR42J wurde in den *in vitro*-Versuchen durch die Blockierungsversuche bestätigt.

Eine externe Bestrahlung der AR42J-Zellen mit einer Dosis von 4, 8 bzw. 16 Gy zeigte eine Upregulation beider Rezeptoren. Das Ausmaß der Upregulation war sowohl vom Zeitintervall nach der Bestrahlung als auch von der applizierten Dosis abhängig. Es wurden bis zu 3,5 mal mehr SST2- Rezeptoren (96 Stunden nach 4 Gy) und bis zu 4 mal mehr CCK-B/Gastrin-Rezeptoren (1 Woche nach 16 Gy) als bei unbestrahlten Kontrollzellen exprimiert.

Gleichzeitig wurden Wachstumskurven der bestrahlten AR42J-Zellen erstellt. Beim Vergleich der Rezeptorexpression mit den Wachstumskurven zeigte sich, dass der SST2-Rezeptor in der

Zeit der strahlenbedingten Zellzahlreduktion upreguliert war. Je höher die applizierte Dosis war, desto früher wurde der SST2-Rezeptor hochreguliert und desto länger blieb die Upregulation bestehen. Die erhöhte SST2-Rezeptordichte kann somit als Marker für die antiproliferative Phase der AR42J-Zellen nach externer Bestrahlung *in vitro* angesehen werden.

Die Upregulation der CCK-B/Gastrin-Rezeptoren war nach einer Strahlendosis von 4 und 8 Gy in der Zeit der Zellproliferation, die nach Beendigung der Reparatur zellulärer Strahlenschäden wieder einsetzte, zu beobachten. In niedrigen und mittleren Dosisbereichen kann der CCK-B/Gastrin-Rezeptorstatus als Indikator für eine erneute Zellproliferation nach Bestrahlung dienen. Nach einer Dosis von 16 Gy ließ sich die Upregulation des CCK-B/Gastrin-Rezeptors auch während der Zellreduktionsphase nachweisen.

Daraufhin wurden *in vivo*-Experimente an AR42J-tumortragenden Nacktmäusen durchgeführt. Die Bestrahlung des an der Hinterflanke lokalisierten Tumors erfolgte mit einer Dosis von 10 Gy. Nach 48 Stunden wurden Biodistributionsstudien mit <sup>111</sup>In-DTPA-Octreotid bzw. <sup>111</sup>In-DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin durchgeführt. Durch die anschließende histologische Aufarbeitung und Anfärbung der Tumoren mit H.E. wurde eine vermehrte Expression der SST2- und CCK-B/Gastrin-Rezeptoren beobachtet. Somit konnten die *in vitro*-Resultate bestätigt werden.

Es besteht die Möglichkeit, sowohl die Radiopeptiddiagnostik als auch die Radiopeptidtherapie SST- und CCK-B/Gastrin-Rezeptor-exprimierender Tumoren nach externer Bestrahlung zu verbessern und effektiver zu gestalten. So könnte einerseits nach einer Tumorbestrahlung durch eine anschließende <sup>111</sup>In-DTPA-Octreotid bzw. <sup>111</sup>In-DTPA-DGlu<sup>1</sup>-minigastrin-Rezeptorszintigraphie das Ansprechen des Tumorgewebes im Sinne einer Proliferationshemmung bzw. Proliferationssteigerung beurteilt werden und die SST- bzw. CCK-B/Gastrin-Rezeptordichte als prognostischer Marker dienen.

Andererseits könnten durch die Upregulation der beiden Rezeptoren nach externer Bestrahlung neue molekulare Angriffsziele für einen anschließenden nuklearmedizinischen Einsatz receptorspezifischer Radiopeptide entstehen.

## 6. Literaturverzeichnis

Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, McL. Black P, Breakefield XO, Snyder EY

Neural stem cell display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas.

PNAS 2000 Nov; 97(23):12846-12851

Bakkenist CJ, Kastan MB

DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation.

Nature 2003; 421:499-506

Bauer W, Briner U, Doepfner W, Halber R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless J  
SMS 201-995: A very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action.

Life Sci 1982; 31:1133-1140

Bébé M, Kluge G, Becker W, Gotthardt M, Behr TM

Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys.

J Nucl Med 2005 Jun; 46(6):1012-5

Behr TM, Bébé M

Cholecystokinin-B/gastrin receptor targeting peptides for staging and therapy of medullary thyroid cancer and other cholecystokinin-B receptor expressing malignancies.

Semin Nucl Med 2002 Apr; 32(2):97-109

Behr TM, Bébé M, Angerstein C

Cholecystokinin(CCK)-B/gastrin-receptor binding peptides for diagnosis and therapy of metastatic medullary thyroid cancer.

J Nucl Med 2001(a); 42:157P (suppl.)

Behr TM, Gotthart M, Barth A, Béhé M  
Imaging tumors with peptide-based radioligands.  
Q J Nucl Med 2001(b); 45:189-200

Behr TM, Gratz S, Markus PM, Dunn RM, Hüfner M, Schauer A, Fischer M, Munz DL,  
Becker H, Becker W  
Anti-carcinoembryonic antigen antibodies versus somatostatin analogs in the detection of  
metastatic medullary thyroid carcinoma: are carcinoembryonic antigen and somatostatin  
receptor expression prognostic factors?  
Cancer 1997; 80:2436-2457

Behr TM, Jenner N, Béhé M, Angerstein C, Gratz S, Raue F, Becker W  
Radiolabeled peptides for targeting of cholecystokinin-B/gastrin receptor expressing tumors:  
from preclinical development to initial clinical results.  
J Nucl Med 1999 Jun; 40(6):1029-1044

Behr TM, Memtsoudis S, Sharkey RM, Blumenthal RD, Dunn RM, Gratz S, Wieland E,  
Nebendahl K, Schmidberger H, Goldenberg DM, Becker W  
Experimental studies on the role of antibody fragments in cancer radio-immuno-therapy:  
influence of radiation dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy.  
Int J Cancer 1998 Aug; 77(5):787-795

Benedetti S, Pirola B, Pollo B, Magrassi L, Bruzzone MG, Rigamonti D, Galli R, Selleri S, Di  
Meco F, De Fraja C, Vescovi A, Cattaneo E, Finocchiaro G  
Gene therapy of experimental brain tumor using neural progenitor cells.  
Nat Med 2000 Apr; 6(4):447-450

Bohuslavizki KH, Brenner W, Gunther M, Eberhart JU, Jahn N, Tinnemeyer S, Wolf H,  
Sippel C, Clausen M, Gatzemeier U, Henze E  
Somatostatin receptor scintigraphy in the staging of small cell lung cancer .  
Nucl Med Commun 1996; 17:191-196

Brazeau P, Vale WW, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R  
Hypothalamic peptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone.  
Science 1973; 179:77-79

Bruns C, Raulf F, Hoyer D, Schloos J, Lubbert H, Weckbecker G  
Binding properties of somatostatin receptor subtypes.  
Metabolism 1996; 45(Suppl 1):17-20

Bryant PE  
Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using Pvu II and Bam HI: evidence for the  
double-strand break origin of chromosomal aberrations.  
Br J Cancer Suppl 1984; 6:61-5

Burger PC, Green SB  
Patient age, histological features, and length of survival in patients with glioblastoma  
multiforme.  
Cancer 1987; 59:1617-1625

Buscail L, Saint-Laurent N, Chastre E, Vaillant JC, Gespach C, Capella G, Kalthoff H, Lluís  
F, Vaysse N, Susini C  
Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer.  
Cancer Res 1996; 56:1823-1827

Camby I, Nagy N, Rombaut K, Gras T, Duponchelle C, Pasteels JL, Brotchi J, Kiss R,  
Salmon I  
Influence of epidermal growth factor and gastrin on the cell proliferation of human  
meningiomas versus astrocytic tumors maintained as ex vivo tissue cultures.  
Neuropeptides 1997 Jun; 31(3):217-225

Camby I, Salmon I, Danguy A, Pasteels JL, Brotchi J, Martinez J, Kiss R  
Influence of gastrin on human astrocytic tumor cell proliferation.  
J Natl Cancer Inst 1996 May; 88(9):594-600

Codd MB, Kurland LT

Descriptive epidemiology of primary intracranial neoplasms.

Prog Exp Tumor Res 1985; 29:1-11

Cohen-Jonathan E, Bernhard E, McKenna W

How does radiation kill cells?

Curr Opin Chem Biol 1999; 3:77-83

De Hauwer C, Camby I, Darro F, Migeotte I, Decaestecker C, Verbeek C, Danguy A, Pasteels JL, Brotchi J, Salmon I, van Ham P, Kiss R

Gastrin inhibits motility, decreases cell death levels and increases proliferation in human glioblastoma cell lines.

J Neurobiol 1998; 37:373-382

De Jong M, Rolleman EJ, Bernard BF, Visser TJ, Bakker WH, Breeman WA, Krenning EP

Inhibition of renal uptake of indium-111-DTPA-octreotide in vivo.

J Nucl Med 1996; 37:1388-1392

Dutour A, Kumar U, Panetta R, Ouafik L, Fina F, Sasi R, Patel YC

Expression of somatostatin receptor subtypes in human brain tumors.

Int J Cancer 1998; 76:620-627

Elliott DE, Li J, Blum AM, Metwali A, Patel YC, Weinstock JV

SSTR2A is the dominant somatostatin receptor subtype expressed by inflammatory cells, is widely expressed and directly regulates T cell IFN-gamma release.

Eur J Immunol 1999 Aug; 29(8):2454-2463

Engenhart-Cabillic R

Lokale stereotaktische Therapiekonzepte bei primären und sekundären Hirntumoren.

2003

Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Violett C

The neurobiology of somatostatin.

Crit Rev Neurobiol 1994; 8:25-44

Fei P, El-Deiry WS

P53 and radiation responses.

Oncogene 2003; 22:5774-5783

Feindt J, Becker I, Blömer U, Hugo HH, Mehdorn HM, Krisch B, Mentlein R

Expression of somatostatin receptor subtypes in cultured astrocytes and tumors.

J Neurochem 1995; 65:1997-2005

Feindt J, Hugo HH, Mentlein R, Krisch B

Somatostatin receptor subtypes in human astrocytes and influence of cultivation process.

In: Krisch B, Mentlein R (Eds.). The petidergic neuron.

Birkhäuser-Verlag (Basel-Boston-Berlin), 1996; pp:141-150

Fisher WE, Doran TA, Muscarella P, Boros LG, Ellison EC, Schirmer WJ

Expression of somatostatin receptor subtypes 1-5 genes in human pancreatic cancer.

J Natl Cancer Inst 1998; 90:322-324

Froidevaux S, Heppeler A, Eberle A, Meier AM, Häusler M, Beglinger L, Béhé M, Powell P, Mäcke HR

Preclinical comparison in AR4-2J tumor bearing mice of four radiolabeled 1,4,7,10-tetraazacyclododecane – 1,4,7,10 tetraacetic acid-somatostatin analogs for tumor diagnosis and internal radiotherapy.

Endocrinology 2000; 141:3304-3312

Froidevaux S, Hintermann E, Török M, Mäcke HR, Beglinger L, Eberle AN

Different regulation of somatostatin receptor type 2 (sst2) expression in AR4-2J tumor cells implanted in mice during octreotide treatment.

Cancer Res 1999 Aug; 59:3652-3657

Fueger BJ, Hamilton G, Raderer M, Pangerl T, Traub T, Angelberger P, Baumgartner G, Dudczak R, Virgolini I

Effects of chemotherapeutic agents on expression of somatostatin receptors in pancreatic tumor cell lines.

J Nucl Med 2001; 42:1856-1862



Gunther R, Carstens OC, Schmidt WE, Folsch UR

Transient agonist-induced regulation of the cholecystokinin-A and cholecystokinin-B receptor mRNA levels in rat pancreatic acinar AR42J cells.

Pancreatology 2003; 3(1):47-54

Hakanson R, Sundler F

Trophic effects of gastrin.

Scand J Gastroenterol 1991; 26(Suppl.180):130-136

Haldemann AR, Rösler H, Barth A, Waser B, Geiger L, Godoy N, Markwalder R, Seiler R, Sulzer M, Reubi JC

Somatostatin receptor scintigraphy in central nervous system tumors: role of blood-brain-barrier permeability.

J Nucl Med 1995; 36:403-410

Hall EJ

Radiosensitivity and cell age in the mitotic cycle.

In: Radiobiology for the radiologist.

2000, 5<sup>th</sup> edition:51-65

Hammond PJ, Wade AF, Gwilliam ME, Peters AM, Myers MJ, Gilbey S, Bloom SR, Calam J

Amino acid infusion blocks renal tubular uptake of an indium-labelled somatostatin analogue.  
Br J Cancer 1993; 67:1437-1439

Hartwell LH, Weinert TA

Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.

Science 1989; 246:629-634

Held-Feindt J, Krisch B, Mentlein R

Molecular analysis of the somatostatin receptor subtype 2 in human glioma cells.

Brain Res Mol Brain Res 1999 Jan; 64(1):101-107

Hess KR

Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas.

J Neurooncol 1999; 42:227-231

Hipkin RW, Friedman J, Clark RB, Eppler CM, Schonbrunn A

Agonist induced desensitization, internalisation, and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor.

J Biol Chem 1997; 272:13869-13876

Hirota N, Matsumoto K, Iida M, Sakagami H, Takeda M

Expression of somatostatin messenger RNA and receptor in cultured brain tumor cells.

Anticancer Res 1998; 18(5A):3295-3298

Hofslie E, Thommesen L, Norsett K, Falkmer S, Syversen U, Sandvik AK, Laegreid A

Expression of chromogranin A and somatostatin receptors in pancreatic AR42J cells.

Mol Cell Endocrinol 2002 Aug; 194(1-2):165-73

Hokfelt T, Cortes R, Schalling M, Ceccatelli S, Peltö-Huikko M, Persson H, Villar MJ

Distribution patterns of CCK and CCK mRNA in some neuronal and non neuronal tissues.

Neuropeptides 1991 Jul; 19(Suppl):31-43

Howard A, Pelc SR

Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage.

Heredity 1953; 6(suppl.):261-273

Imdahl A, Mantamadiotis T, Eggstein S, Farthmann EH, Baldwin GS

Expression of gastrin, gastrin/CCK-B and gastrin/CCK-C receptors in human colorectal carcinomas.

J Cancer Res Clin Oncol 1995; 121:661-666

Janson ET, Stridsberg M, Gobl A, Westlin JE, Oberg K  
Determination of somatostatin receptor subtype in carcinoid tumors by immunohistochemical investigation with somatostatin receptor subtype 2 antibodies.  
Cancer Res 1998; 58:2375-2378

Kaufmann WK, Paules RS  
DNA damage and cell cycle checkpoints.  
FASEB J 1996; 10:238-247

Kim KU, Xiao J, Ni HT, Cho KH, Spellman SR, Low WC, Hall WA  
Changes in expression of transferrin, insulin-like growth factor 1, and interleukin 4 receptors after irradiation of cells of primary malignant brain tumor cell lines.  
Radiat Res 2003 Aug; 160(2):224-231

Kleihues P  
Histopathology, classification and grading of gliomas.  
Glia 1995; 15:211-221

Kleihues P, Cavenee WK (eds.)  
Pathology and genetics of tumours of the nervous system. World health organization classification of the tumours.  
Lyon, France: IARC Press, 2000

Kong H, de Paoli AM, Breder CD, Yasuda K, Bell GI, Reisine T  
Differential expression of messenger RNAs for somatostatin receptor subtypes SSTR1, SSTR2 and SSTR3 in adult rat brain: analysis by RNA blotting and in situ hybridization histochemistry.  
Neuroscience 1994; 59(1):175-184

Kopin AS, Lee Y, McBride EW, Miller LJ, Lu M, Lin HY, Kolakowski LF, Beinborn M  
Expression, cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor.  
Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:3605-3609

Kortmann RD, Jeremic B, Weller M, Plasswilm L, Bamberg M

Radiochemotherapy of malignant glioma in adults.

Strahlenther Onkol 2003; 179:219-232

Krenning EP, Bakker WH, Breeman WAP, Koper JW, Kooij PPM, Ausema L, Lameris JS, Reubi JC, Lamberts SWJ

Localization of endocrine-related tumours with radioiodinated analogue of somatostatin.

Lancet 1989; 1:242-244

Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WAP, Kooij PPM, Oei HY, van Hagen M, Postma PTE, de Jong M, Reubi JC, Visser TJ, Reijs AEM, Hofland LJ, Koper JW, Lamberts SWJ

Somatostatin receptor scintigraphy with [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]-and [<sup>123</sup>Tyr<sup>3</sup>]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients.

Eur J Nucl Med 1993; 20:716-731

Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Pauwels S, Kvols LK, Reubi JC

Somatostatin receptor scintigraphy.

In: Freeman LM, editor. Nuclear Medicine Annual 1995. New York: Raven Press, 1995:1-50

Kucharczak J, Pannequin J, Camby I, Decaestecker C, Kiss R, Martinez J

Gastrin induces over-expression of genes involved in human G373 glioblastoma cell migration.

Oncogene 2001 Oct 25; 20(48):7021-7028

Kwekkeboom DJ, Krenning EP, Bakker EH, Oei HY, Kooij PPM, Lamberts SWJ

Somatostatin analogue scintigraphy in carcinoid tumors.

Eur J Nucl Med 1993; 20:283-292

Lamberts SWJ, Bakker WH, Reubi JC, Krenning EP

Somatostatin-receptor imaging in the localization of endocrine tumours.

N Engl J Med 1990; 323:1246-1249

Lamberts SWJ, Uitterlinden P, Verschoor L, van Dongen KJ, del Pozo E  
Long term treatment of acromegaly with the somatostatin analogue SMS 201-995  
N Engl J Med 1985; 313:1576-1580

Lamberts SWJ, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ  
Octreotide.  
N Engl J Med 1996 Jan; 25:246-254

Lamszus K, Meyerhof W, Westphal M  
Somatostatin and somatostatin receptors in the diagnosis and treatment of gliomas.  
J Neurooncol 1997 Dez; 35(3):353-364

Lewanski CR, Gullick WJ  
Radiotherapy and cellular signalling.  
Lancet Oncol 2001 Jun; 2(6):366-370

Loeffler JS, Alexander E III, Shea WM, Wen PY, Fine HA, Kooy HM, Black PM  
Radiosurgery as a part of the initial management of patients with malignant gliomas.  
J Clin Oncol 1992; 10:1379-1385

Longnecker DS, Lilja HS, French J, Kuhlmann E, Noll W  
Transplantation of azaserine induced carcinomas of pancreas in rats.  
Cancer Lett 1979; 7:197-202

Luyken C, Hildebrandt G, Scheidhauer K, Krisch B, Schicha H, Klug N  
<sup>111</sup>Indium (DTPA-Octreotide) scintigraphy in patients with cerebral gliomas.  
Acta Neurochir 1994; 127:60-64

Mantyh CR, Pappas TN, Vigna SR  
Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B/gastrin receptors in the canine upper  
gastrointestinal tract.  
Gastroenterology 1994; 107:1019-1030

Masciopinto JE, Levin AB, Mehta MP, Rhode BS

Stereotactic radiosurgery for glioblastoma: a final report of 31 patients.

J Neurosurg 1995; 82:530-535

Matsumori Y, Katakami N, Ito M, Taniguchi T, Iwata N, Takaishi T, Chihara K, Matsui T  
Cholecystokinin-B/gastrin receptor: a novel molecular probe for human small cell lung cancer.

Cancer Res 1995; 55:276-279

Merlo A, Hausmann O, Wasner N, Steiner P, Otte A, Jermann E, Freitag P, Reubi JC, Müller-Brand J, Gratzl O, Mäcke HR

Locoregional regulatory peptide receptor targeting with the diffusible somatostatin analogue <sup>90</sup>Y-labeled DOTA<sup>0</sup>-D-Phe<sup>1</sup>-Tyr<sup>3</sup>-octreotide (DOTATOC): a pilot study in human gliomas.

Clin Cancer Res 1999 May; 5:1025-1033

Merlo A, Mueller-Brand J, Maecke HR

Comparing monoclonal antibodies and small peptidic hormones for local targeting of malignant gliomas.

Acta Neurochir Suppl 2003; 88:83-91

Miralbell R, Mornex F, Greiner R, Bolla M, Storme G, Hulshof M, Bernier J, Denekamp J, Rojas AM, Pierart M, van Glabbeke M, Mirimanoff RO

Accelerated radiotherapy, carbogen, and nicotinamide in glioblastoma multiforme: report of European Organization for research and treatment of cancer trial 22933.

J Clin Oncol 1999 Oct; 17(10):3143-3149

Moran TH, Robinson PH, Goldrich MS, McHugh PR

Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioural actions.

Brain Res 1986; 362:175-179

Nakamura M, Oda M, Kaneko K, Akaiwa Y, Tsukada N, Komatsu H, Tschuiya M

Autoradiographic demonstration of gastrin-releasing peptide binding sites in the rat gastric mucosa.

Gastroenterology 1988; 94:968-976

Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, Radinsky R  
Wild type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression.  
Mol Cell Biol 1995; 15:3032-3040

Patel YC  
Somatostatin and its receptor family.  
Front Neuroendocrinol 1999; 20:157-198

Patel JC, Srikant CB  
Subtype selectivity of peptide analogs for all five cloned human somatostatin receptors (hsstr1-5).  
Endocrinology 1994; 135(6):2814-2817

Paules RS, Levedakou EN, Wilson SJ, Innes CL, Rhodes N, Tlsty TD, Galloway DA, Donehower LA, Tainsky MA, Kaufmann WK  
Defective G2 checkpoint function in cells from individuals with familial cancer syndromes.  
Cancer Res 1995; 55:1763-1773

Pawlik TM, Keyomarsi K  
Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004; 59(4):928-942

Pucci B, Claudio PP, Masciullo V, Bellincampi L, Terrinoni A, Khalili K, Melino G, Giordano A  
pRb2/p130 promotes radiation-induced cell death in the glioblastoma cell line HJC 12 by p73 upregulation and Bcl-2 downregulation.  
Oncogene 2002; 21:5897-5905

Rehfeld JF, van Solinge WW  
The tumor biology of gastrin and cholecystokinin.  
Adv Cancer Res 1994; 63:295-347

Reichlin S

Somatostatin.

N Engl J Med 1983; 309:1495-1501

Reubi JC

Regulatory peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy.

Q J Nucl Med 1997; 41:63-70

Reubi JC, Chayvialle JA, Franc B, Cohen R, Calmettes C, Modigliani E

Somatostatin receptors and somatostatin content in medullary thyroid carcinomas.

Lab Invest 1991 Apr; 64(4):567-573

Reubi JC, Kvols L, Krenning EP, Lamberts SWJ

Distribution of somatostatin receptors in normal and tumor tissue.

Metabolism 1990 Sep; 39(9 Suppl 2):78-81

Reubi JC, Lang W, Maurer R, Koper JW, Lamberts SWJ

Distribution and biochemical characterization of somatostatin receptors in tumors of the human central nervous system.

Cancer Res 1987 Nov 1; 47:5758-5764

Reubi JC, Schaer JC, Markwalder R, Waser B, Horisberger U, Laissure J

Distribution of somatostatin receptors in normal and neoplastic human tissues: recent advances and potential relevance.

Yale J Biol Med 1997(a); 70:471-479

Reubi JC, Schaer JC, Waser B

Cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors.

Cancer Res 1997(b); 57:1377-1386

Reubi JC, Schaer JC, Waser B, Mengod G

Expression and localization of somatostatin receptor SSTR1, SSTR2 and SSTR3 messenger RNAs in primary human tumors using in situ hybridization.

Cancer Res 1994; 54:3455-3459



Reubi JC, Waser B

Unexpected high incidence of cholecystokinin B/gastrin receptors in human medullary thyroid carcinomas.

Int J Cancer 1996; 67:644-647

Reubi JC, Waser B

Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting.

Eur J Nucl Med 2003; 30:781-793

Reubi JC, Waser B, Läderach U, Settler C, Friess H, Haller F, Schmassmann A

Localization of cholecystokinin A and cholecystokinin B/gastrin receptors in human stomach.

Gastroenterology 1997(c); 112:1197-1205

Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA

Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands.

Eur J Nucl Med 2001; 28:836-846

Revell S

Radiation induced chromosome damage in man.

In: Ishihara T, Sasaki M, editors. Relationships between chromosome damage and cell death.

New York:Liss, 1983; pp:215-233

Sakaria JN, Mehta MP, Loeffler JS, Buatti JM, Chappell RJ, Levin AB, Alexander E III,

Friedman WA, Kinsella TJ

Radiosurgery in the initial management of malignant gliomas: survival comparison with the RTOG recursive partitioning analysis.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 32(4):931-941

Samuel T, Weber HO, Funk JO

Linking DNA damage to cell cycle checkpoints.

Cell Cycle 2002; 1:162-168

Santini MT, Rainaldi G, Indovina PL

Multicellular tumor spheroids in radiation biology.

Int J Radiat Biol 1999 Jul; 75(7):787-799

Scemama JL, Fourmy D, Zahidi A, Pradayrol L, Susini C, Ribet A

Characterization of gastrin receptors on a rat pancreatic acinar cell line AR42J. A possible model for studying gastrin mediated cell growth and proliferation.

Gut 1987; 28:233-236

Seva C, Scemama JL, Bastie MJ, Pradayrol L, Vaysse N

Lorglumide and loxiglumide inhibit gastrin-stimulated DNA synthesis in a rat tumoral acinar pancreatic cell line (AR42J).

Cancer Res 1990; 50:5829-5833

Sinclair WK, Morton RA

Variations in response during the division cycle of partially synchronized Chinese hamster cells in culture.

Nature 1963; 199:1158-1160

Sinclair WK, Morton RA

X-ray sensitivity during the cell generation cycle of cultured Chinese hamster cells.

Radiat Res 1966; 29:450-474

Singh P, Rae-Venter B, Townsend CM Jr, Khalil T, Thompson JC

Gastrin receptors in normal and malignant gastrointestinal mucosa: age-associated changes.

Am J Physiol 1985; 249:761-769

Smith JP, Solomon TE

Effects of gastrin, proglumide and somatostatin on growth of human colon cancer.

Gastroenterology 1988; 95:1541-1548

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Berlangier K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross G, Eisenhauer E, Mirimanoff RO  
Radiotherapy plus concomitant and adjuvant Temozolomide for glioblastoma.  
N Engl J Med 2005; 352(10):987-996

Suh JH, Barnett GH  
Brachytherapy for brain tumor.  
Haematol Oncol Clin North Am 1999 Jun; 13(3):635-650

Teyssier F, Bay JO, Dionet C, Verelle P  
Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation.  
Bull Cancer 1999 Apr; 86(4):345-357

Thoss VS, Perez J, Duc D, Hoyer D  
Expression of five somatostatin receptor mRNAs in the human brain and pituitary.  
Arch Pharmacol 1996; 354:411-419

Toews, ML  
Radioligand binding assays for G protein-coupled receptor internalization .  
In: Regulation of G protein-coupled receptor function and expression.  
Eds. Benovic JL, Wiley J and sons  
New York 2000; pp:199-230

Tonn JC, Ott MM, Bouterfa H, Kerkan S, Kapp M, Muller-Hermelink HK, Roosen K  
Inverse correlation of cell proliferation and expression of progesterone receptors in tumor spheroids and monolayer cultures in human meningiomas.  
Neurosurgery 1997 Nov; 41(5):1152-1159

Upp JR, Singh P, Townsend CM, Thomson JC  
The clinical significance of gastrin receptors in human colon cancers.  
Cancer Res 1989; 49:488-492

Van den Berg SR

Current diagnostic concepts of astrocytic tumors.

J Neuropathol Exp Neurol 1992 Nov; 51(6):644-57

Vidal C, Raully I, Zeggari M, Delesque N, Esteve JP, Saint-Laurent N, Vaysse N, Susini C

Up-regulation of somatostatin receptors by epidermal growth factor and gastrin in pancreatic cancer cells.

Mol Pharmacol 1994; 45:97-104

Videtic GMM, Gaspar LE, Zamorano L, Fontanesi J, Levink J, Kupsky WJ, Tekyi-Mensah S

Use of the RTOG recursive partitioning analysis to validate the benefit of iodine-125 implants in the primary treatment of the malignant gliomas.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 1999; 45:687-692

Viguerie N, Esteve JP, Susini C, Logsdon CD, Vaysse N, Ribet A

Dexamethasone effects on somatostatin receptors in pancreatic acinar AR42J cells.

Biochem Biophys Res Commun 1987; 147:942-948

Viguerie N, Tahiri-Jouti N, Esteve JP, Clerc P, Logsdon C, Svoboda M, Susini C, Vaysse N, Ribet A

Functional somatostatin receptors in a rat pancreatic acinar cell line.

Am J Physiol 1988 Jul; 255:G113-120

Walker MD, Alexander E Jr, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Norrell

HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, Strike TA

Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas: a cooperative clinical trial.

J Neurosurg 1978; 49:333-343

Walsh JH

Gastrin.

In: JH Welsh and GJ Dockray (eds.), Gut Peptides: biochemistry and physiology. New York:

Raven Press 1994:pp75-121

Wank SA, Pisegna JR, de Weerth A

Brain and gastrointestinal cholecystinin receptor family: structure and functional expression.

Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:8691-8695

Watson S, Durrant LG, Morris D

Gastrin: growth enhancing effects on human gastric and colonic tumor cells.

Br J Cancer 1989; 59:554-558

Weinberg DS, Ruggeri B, Barber MT, Biswas S, Miknyocki S, Waldmann SA

Cholecystinin A and B receptors are differently expressed in normal pancreas and pancreatic adenocarcinoma.

J Clin Invest 1997 Aug 1; 100(3):597-603

Werner-Wasik M, Scott CB, Nelson DF, Gaspar LE, Murray KJ, Fischbach JA, Weinstein AS, Curran WJ Jr

Final report of a phase I/II trial of hyperfractionated and accelerated hyperfractionated radiation therapy with carmustine for adults with supertentorial malignant gliomas. Radiation Therapy Oncology Group Study 83-02.

Cancer 1996 Apr 15; 77(8):1535-1543

Wild-Bode C, Weller M, Rimmer A, Dichgans J, Wick W

Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma.

Cancer Res 2001 Mar 15; 61:2744-2750

Yung WK, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, Albright R, Olson J, Chang SM, O'Neill AM, Friedman AH, Bruner J, Yue N, Dugan M, Zaknoen S, Levin VA

Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with anaplastic astrocytoma or anaplastic oligoastrocytoma at first relapse.

J Clin Oncol 1999 Nov; 17(9):2762-2771

Yonish-Rouach E, Grunwals D, Wilder S, Kimchi A, May E, Lawrence JJ, May P, Oren M  
P53-mediated cell death: relationship to cell cycle control.  
Mol Cell Biol 1993; 13:1415-1423

**Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren (in alphabetischer Reihenfolge):**

Alfke, Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Behr, Beyer, Bertalanffy, Bien, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Geus, Görg, Gotthardt, Gotzen, Griss, Groß, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hasilik, Höffken, Hofmann, Joseph, Jungclas, Kern, Klaus, Klenk, Klingmüller, Klose, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuni, Lammel, Lange, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mennel, Merte, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Plaul, Renschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schäfer H, Schäfer J, Schäfer M, Schnabel, Schneider, Schüffel, Seifart, Seitz, Sekundo, Seyberth, Steiniger, Straßmann, Stempel, Sure, Suske, Vacha, Vogelmeier, Vohland, Wagner H-J, Wagner U, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wolf, Wulf

**Meine akademischen Lehrer in Kassel waren die Herren (in alphabetischer Reihenfolge):**

Faß, Klammer, Raible, von Dittfurth

**Meine akademischen Lehrer in Zürich waren die Herren (in alphabetischer Reihenfolge):**

Follath, Müller, Speich, Vetter

**Meine akademischen Lehrer in Nijmegen waren die Herren (in alphabetischer Reihenfolge):**

Boerman, Corstens, Oyen, Postema

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Rita Engenhardt-Cabillic, die mir während der gesamten Zeit mit freundlicher Unterstützung und konstruktiver Kritik bei der Durchführung der Arbeit eine verlässliche Hilfe war. Ohne sie wäre die Durchführung der Arbeit in diesem Umfang nicht möglich gewesen.

Ganz besonderer Dank gebührt auch Dr. rer. nat. Martin Béhé. Durch seine ständige Diskussionsbereitschaft und seine äußerst wertvollen Ratschläge und Ideen bei der Durchführung und Auswertung der Experimente hat er entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Von ihm habe ich sowohl die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens als auch die öffentliche Präsentation der Ergebnisse erlernt.

Weiterhin gilt mein Dank PD Dr. Markus W. Groß, Martin Henzel sowie Frau Dr. Irmtraud Reitz, die mir bei der Planung und Durchführung der Bestrahlungsversuche jederzeit eine große Hilfe waren. Herrn Egermann danke ich ganz herzlich für die Konstruktion der Bestrahlungsvorrichtung.

Bei Prof. Dr. Mennel (Neuropathologie, Universitätsklinik Marburg) sowie bei Prof. Dr. Schlegel (Neuropathologie, TU München) bedanke ich mich dafür, dass sie mir die Glioblastomzelllinien zur Verfügung gestellt haben.

Weiterhin gilt mein großer Dank Birgit Herbst-Brück, die mich bei der Arbeit im Labor sowie in der Zellkultur jederzeit unterstützt hat.

Danken möchte ich auch Frau PD Dr. Veronika Grau für Ihre Hilfe bei der histologischen Auwertung.

Meiner Familie sowie meiner Freundin Ulrike bin ich zu tiefem Dank verpflichtet, da sie mich während der gesamten Jahre der Arbeit ständig motiviert und persönlich unterstützt haben.