

Aus der Universitäts-Frauenklinik mit Poliklinik Tübingen

Abteilung Allgemeine Geburtshilfe und Frauenheilkunde

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Wallwiener

**Analyse der proliferationshemmenden Effekte einer  
Therapie mit Anthracyclinen und Taxanen beim  
Mamma- Karzinom durch Bestimmung der zellulären  
Fluoro-Thymidin-Speicherung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

vorgelegt von

Ajnur Jusufoska

aus Stuttgart- Bad Cannstatt

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. N. Fersis

2. Berichterstatter: Professor Dr. E.- F. Solomayer

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>3</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1 Zur Epidemiologie des Mammakarzinoms .....	9
1.2 Bedeutung der Früherkennung .....	9
1.3 Chemotherapie beim Mammakarzinom.....	9
1.4 Neoadjuvante Therapie und Therapiemonitoring .....	10
1.5 Bedeutung des Therapiemonitoring .....	10
1.6 Schwierigkeiten bei konventioneller Bildgebung .....	11
1.7 Bedeutung der Positronen-Emissions-Tomographie (PET).....	11
1.8 FDG-PET beim Mammakarzinom und diagnostische Probleme .....	12
1.9 Probleme von FDG.....	13
1.10 FLT- Ein neuer Tracer? .....	13
<b>2 Fragestellung der Arbeit .....</b>	<b>15</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
3.1 Material für das Zellkultursystem.....	16
3.1.1 Zellen .....	16
3.1.2 Kulturmedium .....	16
3.1.3 Fetales Kälberserum ( FCS).....	17
3.1.4 Trypsin .....	17
3.1.5 Phosphatgepufferte Salzlösung( „Phosphate Buffered Saline“ - PBS)....	17
3.1.6 Brutschrank .....	18
3.1.7 Keimfreiheit .....	18
3.1.8 Kultivierung / Subkultivierung der MCF7 .....	18
3.1.9 Kryokonservierung .....	19
3.1.10 Das Auftauen von Zellen .....	19
3.1.11 Kulturbedingungen der Mammakarzinomzelllinien.....	20
3.2 Methoden für das Zellkultursystem .....	20
3.2.1 Kolonie-Bildungs-Assay (KoBi) .....	20
3.2.2 Methodik der Durchflußzytometrie (FACS).....	22

3.2.3	FLT-Speicherung-Tracerinkubation.....	27
3.2.4	Tritium-Proliferationstest .....	28
3.2.5	Zellzahlbestimmung und Proliferationskinetik .....	29
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
4.1	Ergebnisse der Koloniebildungstests .....	30
4.1.1	Konzentrationsabhängigkeit des antiproliferativen Effekts der Chemotherapie.....	30
4.1.2	Statistische Auswertung der Koloniebildungstests : .....	30
4.1.3	Darstellung der Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung der Wachstumshemmung für Adriamycin (rot) und Taxotere (grün ).....	32
4.2	Ergebnisse der Proliferationskinetik: .....	33
4.2.2	Korrelation von Proliferationsrate mit FLT-Versuchen bei Taxotere.....	35
4.2.3	Korrelation von Proliferationsrate PD mit FLT(Gesamt-Uptake in ccpm) bei Taxotere.....	36
4.2.4	Korrelation von Proliferationsrate PD [%K] mit FLT [%K] bei Adriamycin .....	37
4.2.5	1.6.5 Korrelation von Proliferationsrate PD mit FLT (Gesamt-Uptake in ccpm) bei Adriamycin .....	38
4.3	Ergebnisse der FACS-Analyse und Durchflusszytometrie .....	39
4.3.1	Darstellung der Effekte von Taxotere und Adriamycin auf die S-Phase-Fraktion der MCF-7 Zellen .....	41
4.3.2	Statistische Darstellung der S-Phase.....	42
4.4	Ergebnisse der Tritium-Thymidin- Proliferationstests .....	47
4.4.1	Statistische Auswertung: .....	47
4.5	Ergebnisse der FLT-Versuche .....	50
4.5.1	Statistische Auswertung der FLT- Versuche .....	50
4.5.2	Darstellung der [ <sup>18</sup> F] FLT-Aufnahme in der Gesamtkultur und in 10 <sup>5</sup> Zellen in Abhängigkeit der Behandlung mit Adriamycin und Taxotere in verschiedenen Konzentrationen .....	53
4.5.3	FLT-Uptake nach Chemotherapie mit Taxotere und Adriamycin.....	54
4.6	Korrelation der FLT-Aufnahme mit der Tritium-Thymidin-Aufnahme (Tdr-Einbau).....	57
4.6.1	Streudiagramme mit Polygonzügen- durch die geometrischen Mittel der Werte zu den verschiedenen Konzentrationen über die Zeit.....	57
4.6.2	Diagramm der Korrelation des Tdr-Einbaus und der FLT-Aufnahme .....	59
4.6.3	Graphische elliptische Darstellung der Korrelation der FLT-Aufnahme und des Tdr-Einbaus .....	60
4.6.4	Streudiagramm mit 90%-Höhenlinien der bivariaten Normalverteilungen .....	60

4.6.5	Darstellung des FLT-Uptakes und der Tritium-Thymidin-Aufnahme bei Taxotere und Adriamycin bei den verschiedenen Konzentrationen..	61
4.6.6	Effekte von Adriamycin auf die FLT- und Tritium-Thymidin- Aufnahme der MCF7-Zellen bei den unterschiedlichen IC über der Zeit.....	62
4.6.7	Effekte von Taxotere auf die FLT-und Tritium-Thymidin- Aufnahme der MCF7-Zellen bei den unterschiedlichen IC über der Zeit.....	64
4.6.8	Zusammenfassung der Ergebnisse über die Änderungen der FLT-Aufnahme, des Tdr-Einbaus und der S-Phase-Fraktion nach Behandlung.....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
5.1	Allgemeines.....	71
5.2	Bedeutung von nuklearmedizinischen Verfahren .....	72
5.3	Nachteile des FDG-PET?.....	72
5.4	Der Proliferationsmarker Thymidin .....	73
5.5	Einführung von FLT .....	73
5.6	Weitere Arbeiten mit FLT .....	74
5.7	Korrelationen von FLT mit anderen Proliferationsmarkern.....	75
5.8	Verhalten von FLT nach Therapie.....	75
5.9	Bedeutung der Thymidinkinase im Salvage-Pathway .....	76
5.10	Gebrauch von Tritium-Thymidin: <sup>3</sup> H-Thymidin Assay.....	78
5.11	Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen .....	80
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>88</b>
	<b>Erklärung</b> .....	<b>101</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wachstumsinhibition mit Taxotere und Adriamycin .....	31
Abbildung 2: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung .....	32
Abbildung 3: Darstellung der Zellzahlen .....	34
Abbildung 4: Korrelation der Proliferationsrate mit den FLT- Versuchen bei Taxotere.....	35
Abbildung 5: Korrelation der Proliferationsrate mit FLT-Gesamt-Uptake/ Taxotere.....	36
Abbildung 6: Korrelation der Proliferationsrate mit FLT bei Adriamycin .....	37
Abbildung 7: Korrelation der Proliferationsrate mit dem FLT-Gesamt-Uptake/ Adriamycin.....	38
Abbildung 8: S-Phase und G2/ M -Phasenverteilung [%K] unter Behandlung mit Adriamycin und Taxotere .....	41
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase[%K], P= 0.9.....	42
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase [%K], P= 0.5.....	42
Abbildung 11: Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase [%K] , P= 0.9, zentriert .....	43
Abbildung 12: Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase[%K], P= 0.9, zentriert.....	43
Abbildung 13: Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase[%K], zentriert.....	44
Abbildung 14: Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase[%K], P= 0.95.....	44
Abbildung 15: Korrelation der FLT-Aufnahme bei 10000 Zellen mit der G2M-Phase[%K], P= 0.95, Adriamycin .....	45
Abbildung 16: Korrelation der FLT-Aufnahme bei 10000 Zellen mit der G2M-Phase [%K] , P= 0.95, Taxotere.....	45
Abbildung 17: Korrelation der FLT-Aufnahme bei 10000 Zellen mit der G2M-Phase [%K] , P= 0.95, Adriamycin .....	46
Abbildung 18: Korrelation der FLT-Aufnahme bei 10000 Zellen mit der S-Phase[%K], P= 0.95, Taxotere.....	46
Abbildung 19: Tdr-Aufnahme [%K] unter Behandlung mit Adriamycin nach 1 Stunde Pulse-Zeit .....	47
Abbildung 20: Tdr-Aufnahme [%K] unter Behandlung mit Adriamycin nach 4 Stunden Pulse-Zeit .....	48
Abbildung 21: Tdr-Aufnahme[%K] unter Behandlung mit Taxotere nach 1 Stunde Pulse-Zeit .....	49

Abbildung 22: Tdr-Aufnahme[%K] unter Behandlung mit Taxotere nach 4 Stunden Pulse-Zeit .....	49
Abbildung 23: FLT-Aufnahme[%K] unter Behandlung mit Adriamycin .....	51
Abbildung 24: FLT-Aufnahme[%K] unter Behandlung mit Taxotere .....	52
Abbildung 25: [18F] FLT-Aufnahme [%K] unter Behandlung mit Adriamycin und Taxotere bezogen auf die Zellzahl $10^5$ und auf die Gesamtkultur...	53
Abbildung 26: Streudiagramm über die Korrelation von FLT und Tdr bei mit Adriamycin und Taxotere behandelten MCF-7 Zellen zu verschiedenen Konzentrationen. - Übereinstimmung nach Bland & Altman (Lancet 1986) .....	57
Abbildung 27: Korrelation der FLT-Aufnahme und des Tdr- Einbaus bei mit Adriamycin und Taxotere behandelten MCF-7 Zellen zu verschiedenen Konzentrationen, 1h Pulse-Zeit .....	59
Abbildung 28: Korrelation FLT und Tdr bei mit Adriamycin und Taxotere behandelten MCF-7 Zellen zu verschiedenen Konzentrationen , 1h Pulse-Zeit.....	60
Abbildung 29: Streudiagramm der Korrelation der FLT-Aufnahme und des Tdr- Einbaus bei mit Adriamycin und Taxotere behandelten MCF-7 Zellen zu verschiedenen Konzentrationen. ....	60
Abbildung 30: Streudiagramme mit Polygonzügen- durch die geometrischen Mittel der Werte von FLT (rot) und Tdr (grün) zu den verschiedenen Konzentrationen über die Zeit.....	61
Abbildung 31: Die Übereinstimmung des FLT- Uptakes und des Tdr- Einbaus (oben) und FLT und S-Phase (unten) in mit Taxotere oder Adriamycin behandelten Mammakarzinomzelllinien. ....	68
Abbildung 32. FLT-Aufnahme, Tdr- Einbau und S-Phase-Fraktion in Abhängigkeit der Behandlung entweder mit Adriamycin (a.) oder Taxotere (b.) zu verschiedenen Konzentrationen (IC 25-95). Die Daten sind als Mittelwerte wiederholter Versuche - stets auf die Kontrolle bezogen - dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. ....	70

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konzentrationserfassung mit Hilfe von Adriamycin bzw. Taxotere ..	31
Tabelle 2: Inhibitorische Konzentrationen .....	32
Tabelle 3: Ergebnisse der FACS- Analyse nach dem Einsatz von TAXOTERE .....	39
Tabelle 4. Korrelation der FLT-Aufnahme mit dem Tdr-Einbau nach Bland-Altman, $r=0,91$ .....	58
Tabelle 5: Logarithmierte Korrelation der Ergebnisse des Streudiagramms ....	58

---

Tabelle 6. Korrelation des FLT-Uptake mit dem Tdr- Einbau und der S-Phase Fraktion bei mit Adriamycin und Taxotere behandelten MCF-7 Zellen zu verschiedenen Konzentrationen. Die Werte repräsentieren Korrelationskoeffizienten des ANOVA bei IC 25-95.....	68
--	----

## **Einleitung**

### **1.1 Zur Epidemiologie des Mammakarzinoms**

Das Mammakarzinom ist in der westlichen Welt der häufigste zum Tode führende maligne Tumor bei der Frau (Parkin et al.1997). Es stellt eines der großen Probleme der Gesundheitsversorgung in Deutschland dar. Epidemiologische Studien belegen, dass heutzutage etwa jede 8.-10. Frau in der Bundesrepublik an einem Mammakarzinom erkrankt. Die Prognose einer Frau mit Mammakarzinom hängt neben einer Vielzahl von klinischen, pathomorphologischen und immunhistochemisch definierten Faktoren (z.B. Alter der Patientin, klinischer Befund, Tumorgrading, Gefäßinvasion, Multifokalität bzw. -zentrität und Hormonrezeptorstatus sowie Expression von diversen Faktoren wie z. B. Ki 67, c-erbB1-3, p 53) weiterhin entscheidend von der Tumorgröße und dem Lymphknotenbefall ab.

### **1.2 Bedeutung der Früherkennung**

Demnach ist die Früherkennungsuntersuchung mit dem Ziel, bereits präinvasive Carcinomata in situ bzw. frühinvasive Karzinome unter 1 cm Tumorgröße zu entdecken, histologisch abzuklären und zu behandeln, der zurzeit wichtigste Beitrag zur Senkung der Sterblichkeit und einer erfolgreichen Behandlung. Unbestreitbar ist ferner, dass die frühe Erkennung eines Tumorrezidivs und das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen einen signifikanten Einfluss auf die Therapie haben. Jedoch ist mit herkömmlichen Methoden die Identifikation von Tumorgewebe speziell in Weichteilen schwierig.

### **1.3 Chemotherapie beim Mammakarzinom**

Wichtige therapeutische Ansätze bei diesem biologisch heterogenen Tumor stellen die adjuvanten Hormon- und Chemotherapien dar. Sie sind neben der Radiatio und der Operation die wichtigste therapeutische Maßnahme in der Behandlung des Mammakarzinoms. In der adjuvanten Therapie dient der Einsatz

einer zytostatischen Therapie insbesondere bei jungen Patientinnen mit Lymphknotenbefall und anderen Hochrisikopersonen der Prophylaxe einer späteren Rezidivierung oder Metastasierung. Anthrazykline gelten als Standard-Chemotherapie. Aktuelle Daten zeigen, dass durch den Einsatz von Taxanen zusätzlich zu anthrazyklinhaltigen Schemata eine signifikante Verbesserung des Überlebens erreicht werden kann.

#### **1.4 Neoadjuvante Therapie und Therapiemonitoring**

Die neoadjuvante Therapie zählt zu den etablierten Therapiemodalitäten beim lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom und wird auch bei Tumoren im Frühstadium der Erkrankung durchgeführt. Veronesi und Bonadonna (1995) konnten nachweisen, dass das Ansprechen des Primärtumors auf die neoadjuvante Therapie direkt mit der Prognose korreliert. Durch die neoadjuvante Behandlungssituation ist es erstmals möglich, Therapieeffekte das Ansprechen der systemischen Therapie bei Patienten beim Menschen *in vivo* zu beobachten. Das *in-vivo*-Modell der neoadjuvanten Therapie erlaubt die rasche Beurteilung innovativer Therapiekonzepte und die Untersuchung neuer prädiktiver Faktoren (Konecny et al., 2000). Die neoadjuvante Chemotherapie beim operablen Mammakarzinom hat die Erhöhung der Rate brusterhaltender Chirurgie sowie eine Verbesserung des rezidivfreien und des Gesamtüberlebens zum Ziel. Es gelingt die chirurgischen und radiotherapeutischen Optionen zu verbessern und das Risiko eines Rezidivs zu verringern (Kim et al., 2005). Es ist derzeit nicht möglich, die Sensitivität des Mammakarzinoms auf bestimmte Substanzen exakt vorherzusagen, denn auf Morphologie-basierte Therapiekonzepte eignen sich wenig dafür, prädiktive Aussagen über das Ansprechen der Therapie zu treffen.

#### **1.5 Bedeutung des Therapiemonitoring**

Neben der Klassifikation des Mammakarzinoms, ist ein effektives Monitoring des Tumoransprechens während der neoadjuvanten Therapie von großem klinischem Interesse. Neuere Ansätze konzentrieren sich auf das individuelle Anpassen der Therapieoptionen gemäß dem Tumoransprechen in der Frühphase

der Behandlung. Aktuelle klinische Studien konnten durch Anpassen und Wechsel der Therapie einen Überlebensvorteil aufzeigen (Thomas et al., 2006, Baer et al., 2003)

### **1.6 Schwierigkeiten bei konventioneller Bildgebung**

Mit dem erweiterten Gebrauch und der erhöhten Sensitivität der Mammographie und des Ultraschalls hat sich die Zahl der klinisch erfassten Brustkrebsläsionen, die einer weitergehenden Charakterisierung bedürfen, erhöht. Pathologische Befunde werden mit Hilfe der Sonographie, CT, MRT, MIBI- Szintigraphie und evtl. auch mit Hilfe einer Biopsie erhärtet oder ausgeschlossen (Henderson et al. 1989; Moore u. Kinne 1996; Mintun et al. 1988; Kallinowski et al. 1989) Obwohl zahlreiche nicht-invasive Techniken wie die Magnetresonanztomographie oder die MIBI-Szintigraphie gut funktionieren, hat keine der beiden eine höhere Spezifität als die Biopsie zeigen können. Trotz dieser Verfahren bestehen aber immer noch diagnostische „Lücken“ – etwa bei sehr dichtem Brustdrüsengewebe, bei der Frage der Metastasierung oder auch bei der frühzeitigen Beurteilung des Therapieerfolges etwa einer hochdosierten Chemotherapie. Verschiedene bildgebende Verfahren wurden evaluiert, aber die Daten bezüglich der praktischsten oder verlässlichsten Methode sind umstritten. Gewöhnlich sind die Mammographie und der Ultraschall die routinemässig angewandten Methoden. Weil beide Techniken von morphologischen Veränderungen abhängig sind, ist die Tumorantwort verzögert, denn diese treten in der Regel erst nach längerer Behandlungsdauer auf. Klinisch wünschenswert ist jedoch eine frühzeitige Erfassung der Therapieresponse. Folglich sind bildgebende Verfahren notwendig, die die biologische Antwort früher und präziser darstellen.

### **1.7 Bedeutung der Positronen-Emissions-Tomographie (PET)**

Für diese und andere Fragestellungen stehen nuklearmedizinische Verfahren, wie die Mammaszintigraphie oder die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), zur Verfügung. Letztere ist ein quantitatives nuklearmedizinisches Schnittbildverfahren, welches es ermöglicht, nicht-invasiv die Verteilung einer radioaktiv markierten Substanz, so genannte Tracer durch regionale Anreiche-

rung in vivo zu bestimmen. Der Vorteil der PET liegt in der Möglichkeit, physiologische Stoffwechselfvorgänge mit Hilfe von radioaktiv markierten Substanzen von aussen sichtbar zu machen. Die Quantifizierbarkeit dieser Stoffwechselfvorgänge erschließt weit reichende Möglichkeiten für Therapie und Diagnostik. Mit der PET lassen sich erstmalig Stoffwechselprozesse in vivo beobachten, quantifizieren und anatomisch exakt zuordnen. Dies eröffnet die Möglichkeit, Gewebarten in Abhängigkeit von ihrem Metabolismus zu unterscheiden. So können zum Beispiel die zelluläre Aufnahme von Glucose oder Sauerstoff einen Hinweis auf den Aktivitätsgrad des Gewebes liefern. Durch die Quantifizierung mit Hilfe der PET verspricht man sich in der Onkologie die Möglichkeit beispielsweise eines biologischen Gratings oder der eindeutigen Differenzierung von Benignität und Malignität. Auch in der Therapie- und Verlaufskontrolle wären quantitative Werte von großer Bedeutung. Für die Onkologie kam der Durchbruch mit der Verwendung von 2-(18 F)-Fluoro-2- deoxy-D-Glucose (FDG) als Tracer. Mit Hilfe dieses Glucoseanalogons, das nach Aufnahme in die Zelle phosphoryliert wird und anschließend in der Zelle „gefangen“ bleibt, war es möglich, sich die Glucoseutilisation von malignen Tumoren zu deren Darstellung zunutze zu machen.

### **1.8 FDG-PET beim Mammakarzinom und diagnostische Probleme**

Die FDG-PET wurde von Danforth et al. und Bomanji et al. für die Darstellung verschiedener maligner Tumore verwendet, unter anderem auch beim Mammakarzinom, mit einer Sensitivität von 90-95% und Spezifität von 88-92% im Vergleich zu anderen Verfahren. Die FDG-PET beim Mammakarzinom ist ein neues, viel versprechendes Verfahren, das die Möglichkeit bietet, primäre Mammakarzinome, regionale Metastasen, Fernmetastasen, Lymphknotenbefall und Lokalrezidive zu entdecken. Außerdem ergibt sich mittels FDG-PET eine Möglichkeit, zwischen einer Narbe und vitalem Tumorgewebe zu differenzieren sowie der früheren Vorhersage des Therapieansprechens und der Kontrolle des Therapieerfolgs. In der Primärdiagnostik ist der Einsatz der PET sinnvoll, wenn Mammographie und Ultraschalluntersuchung sowie eine Biopsie die Frage nach Malignität eines Knotens im Brustdrüsengewebe nicht eindeutig beantworten

konnte oder beispielsweise mehrere Knoten in beiden Brüsten vorliegen und eine operative Klärung nicht gewünscht wird oder mit Risiken verbunden ist. Gleiches gilt nach brusterhaltender Operation und nach Strahlenbehandlung der Brust, wenn ein Rezidiv in der Brust vermutet wird. Außerdem stellt sie ein zusätzliches Kriterium für die operative Indikationsstellung dar und sie sollte mit der CT als weiteres nichtinvasives Verfahren korreliert werden, um die Aussagekraft zu erhöhen und eine genauere Diagnosefähigkeit zu erreichen. Die MRT und noch mehr die FDG-PET sind dazu imstande, Veränderungen der Durchblutung oder des Metabolismus von Tumoren zu visualisieren, von denen man annimmt, dass die dem Tumor vorausgehen. Aus diesem Grunde können Veränderungen unter der Therapie innerhalb des Tumors und Metastasen viel früher entdeckt werden. Beim Gebrauch von FDG-PET für das Monitoring der Therapie wurden ebenfalls viel versprechende Ergebnisse erzielt (Bombardieri, 2001; Reske et al., 2002)

### **1.9 Probleme von FDG**

Allerdings ist FDG biochemisch kein ideales Radiodiagnostikum, weil sowohl normale als auch neoplastische Zellen Glucose metabolisieren. Bei intensiven FDG-Anreicherungen ist jedoch eine Unterscheidung zwischen Primärherd, Metastase und akuter Entzündung teilweise nicht möglich.

### **1.10 FLT- Ein neuer Tracer?**

Im Jahre 1997 führten Grierson und Shields et al. für die Darstellung von Tumoren 3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F]fluorothymidine (FLT) ein. Flour-Thymidin (=FLT) ist ein „Abfallprodukt“ aus der Forschung nach neuen Aids-Medikamenten Ende der 80er Jahre und verwand dem klinisch häufig eingesetzten AZT. Die Arbeitsgruppe Shields zeigte in einer ersten Pilotstudie mit einem 18-F markierten Thymidinanalogon (3'Deoxy- 3'-Flourothymidin, FLT) an Hunden und an einem Patienten, dass die in-vivo Proliferationsmessung mit Hilfe der PET-Technologie ein vielversprechendes neues Konzept der PET-Diagnostik darstellt. 3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F]fluorothymidine (FLT) ist demnach Radiotherapeutikum, das im Tumorgewebe akkumuliert und mit PET oder PET-CT in vivo dargestellt werden kann. Aufgrund der Ähnlichkeit des Moleküls zum natürlichen Nukleosid

Thymidin wird FLT wie dieses in die Zellen aufgenommen. Es wurde gezeigt, dass die FLT-Aufnahme der Tumorzellen stark mit der Aktivität des Enzyms Thymidinkinase 1, dem Schlüsselenzym des Pyrimidin-Salvage-Pathway der DNA-Synthese, korreliert (TK-1), welches während der S-Phase des Zellzyklus für kurze Zeit hoch aktiviert ist (Kong et al., 1992). Mammakarzinompatientinnen, bei denen eine hohe Thymidinkinase-Aktivität auftrat, wiesen frühzeitig Rezidive auf und hatten ein kürzeres Gesamtüberleben. In einer Multizenterstudie erwies sich die Thymidinkinase als unabhängiger prognostischer Parameter (Romain et al. 2000). Nach Aufnahme wird FLT analog zu Thymidin durch die Thymidinkinase 1 (TK-1) phosphoryliert und im Gewebe zurückgehalten, es wird kaum weiter verstoffwechselt, ein DNA-Einbau findet daher auch nur in sehr geringem Umfang statt. Da FLT-Phosphat die Zelle nicht wieder verlassen kann, kommt es zur zellulären Anhäufung in Abhängigkeit von der Aktivität der TK-1 (sog. metabolisches trapping). FLT wird nur sehr langsam katabolisiert und kann zur Therapieverlaufskontrolle herangezogen werden. Dieser Mechanismus ist die Rationale für den Einsatz radioaktiven FLT zur Messung der Tumorpheriferation bzw. deren Beeinflussung durch Chemotherapie. Nacheinander wurde die FLT-Speicherung innerhalb proliferierenden Gewebes sowohl bei Affen, Hunden und bei verschiedenen Tumoren beim Menschen als auch in einer größeren Reihe von Patienten mit Bronchialkarzinom demonstriert. Eine detaillierte Diskussion über den Hintergrund des biochemischen Prozesses wurde von Mier et al. veröffentlicht. In einer vorherigen Studie wurde gezeigt, dass FLT beim unbehandelten Mammakarzinom akkumuliert (Smyczek-Gargya et al., 2004), so dass es möglich war den Primärtumor und Lymphknotenmetastasen zu lokalisieren. Das zelluläre Langzeitüberleben lässt sich mit den klassischen Tests, wie klonogenes Überleben im Koloniebildungsassay, Zellzyklusverteilung, Tritiumproliferationstest und Proliferationskinetik detektieren. Wir wollen untersuchen und zeigen, dass dies auch mit einer Inkubation von FLT möglich ist.

## 2 Fragestellung der Arbeit

Mit Hilfe der Substanz (18-F)FLT soll an der Brustkrebszelllinie MCF7 das neue Radiopharmakon evaluiert und gezeigt werden, dass FLT ein spezifisches Maß für die proliferative Aktivität im Tumorgewebe darstellt und Möglichkeiten bietet frühzeitig in eine Therapie zu intervenieren.

Im Rahmen der vorliegenden Studie soll ermittelt werden, ob die FLT-Aufnahme mit der Proliferationsaktivität Östrogenpositiver Mammakarzinome korreliert. Ferner wird die zelluläre Aufnahme untersucht und mit etablierten Proliferationsassays korreliert und gezeigt, dass FLT ebenfalls ein Marker für Proliferation ist. Modellhaft für die Chemotherapie bei Patienten werden die Tumorzellen im Zellkulturexperiment mit den in der neoadjuvanten Brustkrebstherapie etablierten Chemotherapeutika Adriamycin und Taxotere behandelt. Die Arbeit analysiert die Änderungen der zellulären FLT-Aufnahme zu verschiedenen Zeitpunkten nach Chemotherapie beim Mammakarzinom in einem in vitro Modell.

In der vorliegenden Arbeit sollen demnach folgende Fragestellungen geprüft werden:

- Ist durch 3'-[18F]fluorothymidin (FLT) die frühzeitige Erfassung einer Chemotherapeutika-induzierten Proliferationshemmung möglich?
- Stellt die FLT-PET damit ein neues Konzept für das Therapiemonitoring von Mammakarzinomen dar?

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material für das Zellkultursystem**

#### **3.1.1 Zellen**

In der vorliegenden Arbeit wurden für alle Versuche humane Mammakarzinomzellen der Zelllinie MCF -7 verwendet. Diese Zelllinie wurde bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, käuflich erworben (DSMZ No ACC 115). Die Zellen der Linie MCF-7 stammen von einem Adenokarzinom der Brust, die aus einem Pleuraerguß einer 69-jährigen Patientin etabliert wurden. Bei dem Tumor dieser Patientin handelt es sich um ein metastasiertes Mammakarzinom nach Bestrahlungs- und Hormontherapie (Soule et al., 1973). In der Zellkultur adhären die rundlichen Zellen, die viel Zytoplasma besitzen. Diese Zelllinie hat sich unter den Modellen, die entwickelt wurden, um die Hormonsensitivität von menschlichen Mammakarzinomzellen zu studieren, aufgrund ihrer physiologisch hohen Konzentration verschiedener Steroidrezeptoren und Peptidhormonrezeptoren als besonders geeignet erwiesen. Die MCF-7-Zellen exprimieren eine hohe Anzahl von ER- und PR-Rezeptoren und wachsen sowohl in vivo als auch in vitro E2-abhängig (Clarke et al., 1986). Bei Behandlung mit Chemotherapeutika, wie Adriamycin und Taxotere reagieren MCF-7-Zellen in vitro mit einer Wachstumsinhibition. In der vorliegenden Arbeit wurden humane Mammakarzinomzellen der Linie MCF7 in den Versuchen eingesetzt und dabei die in Kapitel 3 beschriebenen Versuchsbedingungen eingehalten.

#### **3.1.2 Kulturmedium**

Das Kulturmedium, welches für die Ernährung der MCF-7-Zellen und Neutralisierung von Abfallprodukten über Puffersysteme im Experiment benutzt wird, besteht aus 500 ml DMEM (Dulbecco`s Minimal Essential Medium mit Gluta-

max), 10% FCS und 1 mg Insulin. In Vorversuchen zeigt sich bei dieser Zusammenstellung ein homogenes Wachstumsverhalten der MCF-7-Zellen.

### **3.1.3 Fetales Kälberserum ( FCS)**

Das FCS (Boehringer Mannheim, BR Deutschland) enthält wachstums- und proliferationsstimulierende Hormone (u.a. Platelet derived Growth Factor( PDFG), Insulin, Schilddrüsenhormone, Cortisol) und Vitamine für die MCF-7-Zellen. Es wird bei -20°C aufbewahrt und für jedes neue Medium kurz vorher aufgetaut.

### **3.1.4 Trypsin**

Das Enzym Trypsin dient der Ablösung der am Kulturfaschenboden adhärent wachsenden Zellen. Trypsin baut dabei die Adhäsionsmoleküle an, welche die Zellen untereinander und mit dem Flaschenboden verankern, so dass sich die Zellen voneinander und vom Boden der Zellkultur lösen und anschließend passagiert werden können. Die verwendete Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco BRL) enthält 0,5g/l EDTA in Pucks Salzlösung A. Die Trypsinlösung wird bei -20°C gelagert und kurz vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt (Freshney et al., 1990)

Um Schäden an der Zellwand zu vermeiden wird die Einwirkzeit des Trypsins möglichst kurz gewählt (2-4 Minuten), bevor es durch Zugabe von Kulturmedium verdünnt und inaktiviert wird. Je dichter der Zellmonolayer und je älter die Zellen, desto längere Trypsineinwirkzeiten sind nötig.

### **3.1.5 Phosphatgepufferte Salzlösung( „Phosphate Buffered Saline“- PBS)**

Da auch Reste des nach dem Absaugen in der Kulturflasche verbliebenen Mediums das frisch hinzupipettierte Trypsin in seiner Wirkung beeinträchtigen können, wird die Zellkulturflasche vor der Zugabe des Enzyms mit 5ml PBS (Gibco BRL) gewaschen, um das Kulturmedium vollständig auszuwaschen. Bezogen wird das PBS von der Firma Gibco Brl (Freshney et al., 1990).

### 3.1.6 Brutschrank

Es werden Brutschränke zur Aufbewahrung der Zellkulturen benutzt, um ein optimales Wachstumsmilieu für die Zellen zu schaffen. Damit die radioaktiven und die nicht - radioaktiven Zellkulturen sich nicht gegenseitig beeinflussen, werden sie in unterschiedlichen Brutschränken aufbewahrt. Die Zellkulturen werden bei 37%, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und einer Feuchtigkeit von >95% bebrütet und in modifiziertem Dulbecco- Medium in Zellkulturflaschen gehalten

### 3.1.7 Keimfreiheit

Um die Kontamination der Zellkulturen zu verhindern, werden die Arbeitsschritte (z.B. Medienwechsel) unter einer Laminar-Flow-Sterilbank durchgeführt, die zuvor mit 70%igem Alkohol desinfiziert wurde. Als Verbrauchsmaterial werden nur sterile Einmalpipetten und sterile Gefäße verwendet

### 3.1.8 Kultivierung / Subkultivierung der MCF7

Die Subkultivierung bzw. das Passagieren bezeichnet das Teilen und Transferieren eines subkonfluenten Zellmonolayers in eine Zellkulturflasche. Etwa jeden 4.Tag wird bei den MCF-7-Zellen eine Passagierung vorgenommen. Wenn die Zellkulturflaschen mit einer konfluierenden Zellschicht zugewachsen oder sollten die Zellen für einen Versuch ausgesät werden, so erfolgte eine Subkultivierung. Zur Routine-Passage werden die Zellen in 20 ml Medium in eine 25 cm<sup>2</sup> große Kulturflasche, mit Filter, um einen optimalen Gasaustausch zu ermöglichen, (Falcon, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. Nach vollständigem Absaugen des Medienüberstandes aus der Kulturflasche erfolgt eine einmalige Auswaschung mit 3ml sterilem PBS. Anschließend werden 3 ml Trypsin- EDTA-Lösung hinzugefügt, das den kompletten Zellrasen benetzen muss. Nach 4-5 minütiger Inkubation bei 37°C (je nach Alter und Dichte der Zellen) haben sich die Zellen in der Regel als Monolayer vom Flaschenboden gelöst. Nach 5 minütigem Zentrifugieren der in ein steriles Röhrchen überführten Zellsuspension wird das restliche Medium abgesaugt und 5 ml neues hinzugefügt. Durch mehrmaliges Resuspendieren werden die Zellen vereinzelt. Am Tag der Aus-

saat für einen wird die laufende Kultur gesplittet, d.h. es werden nach Waschvorgang und Abtrypsinisierung eine vorher berechnete für den Versuchsansatz benötigte Menge von Zellen für die Versuche von der Routine-Kultur entnommen. Dazu wird ein Teilvolumen benötigt (in der Regel 100 µl) zur Zellzahlbestimmung mittels einer elektrischen Zählhilfe (Coulter Particle Counter, Coulter®, USA). Die Angabe erfolgt in Zellzahl in einem ml Zellsuspension. Schließlich werden sie auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt und je nach Verdünnung mit Medium auf 20 ml aufgefüllt oder in 6-well bzw. 12-well Plates ausgesät. Am ersten und vierten Tag nach Neuaussaat wird ein Medienwechsel (MW) vorgenommen bzw. eine Subkultivierung (= Passage) durchgeführt um Zellkonfluenz zu vermeiden, da in einem solchen Falle die Kapazität des Mediums überschritten werden würde und sich ferner die Zellen durch Kontaktinhibition an der weiteren Vermehrung hindern. Dabei werden die Zellen vorher unter dem Durchlichtmikroskop auf Kontamination, degenerative Veränderungen und Zelldichte untersucht. Bei zufriedenstellendem Ergebnis wurde dann unter der Laminar-Flow- Sterilbank das Medium unter Verwendung von sterilen Pasteurpipetten abgesaugt, und die Kulturflasche mit PBS gespült, um Medienreste zu entfernen. Anschließend wurden 20ml des steril angesetzten, 37° C warmen, Mediums hinzupipettiert.

### **3.1.9 Kryokonservierung**

Die Zellen werden analog einer Passage abtrypsinisiert, und die Zellzahl mit Hilfe der elektronischen Zählhilfe (Coulter Particle-Counter, USA) bestimmt. Anschließend werden 100.000 Zellen der Suspension in einem Milliliter Einfriermedium in ein zuvor auf Eis gestelltes Cryo-vial transferiert und mit einer Einfrierhilfe (Handy-Freeze, Fa. Tayler-Wharton, Theodore, Alabama, USA) innerhalb einer Stunde auf -196 °C fraktioniert abgekühlt.

### **3.1.10 Das Auftauen von Zellen**

Die tiefgefrorene Zellsuspension wird in einem auf 37°C erwärmtes Wasserbad aufgetaut und unter langsamer Zugabe von 37°C warmem, sterilem Medium in

eine 25 cm<sup>2</sup>-Falcon-Flasche befördert. Die langsame Zugabe des Mediums ist notwendig, um einer osmotischen Schädigung durch das Kryoprotektivum vorzubeugen. Anschließend werden die Zellen über 5-6 Stunden im Brutschrank kultiviert, die Anwachsrate bestimmt und der erste Medienwechsel vorgenommen.

### **3.1.11 Kulturbedingungen der Mammakarzinomzelllinien**

Die Proliferationsrate von Mammakarzinomzelllinien hängt neben genetisch determinierten Faktoren auch von äußeren Wachstumsbedingungen ab. Dazu gehören Kulturmedien, Umgebungstemperatur, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>-Gehalt und Wasserdampfsättigung, sowie die Möglichkeit für die Zellen sich flächig auszubreiten. Um reproduzierbare Ergebnisse in dem künstlichen System der in-vitro-Kultivierung von Tumorzellen zu erhalten, wurden die Versuchsbedingungen möglichst konstant gehalten, Medienzusammensetzungen, Umgebungstemperatur und Gasgehalt variierten nur in geringen Grenzen.

## **3.2 Methoden für das Zellkultursystem**

### **3.2.1 Kolonie-Bildungs-Assay (KoBi)**

Der Koloniebildungstest dient der Messung des proliferativen Potentials von Tumorzellen nach Chemotherapie oder Bestrahlung. Es wird angenommen, dass nur ein kleiner Anteil an Zellen in Tumor die Kapazität zur Proliferation und Koloniebildung besitzen. Diese werden im Fall von Tumorproben als „Stammzellen“ bezeichnet. Es wird ferner angenommen, dass solche Zellen für das erneute Tumorwachstum nach Therapie verantwortlich sind. Daher sollte die Messung der „Stammzellpopulation“ den wahren therapeutischen Effekt eines Agens oder einer Bestrahlung reflektieren.

Der Koloniebildungstest kann bei adhärennten Zellen in Monolayerkulturen durchgeführt werden und reflektiert dann das zell-adhäsionsabhängige Wachstum. Es lassen sich damit Aussagen über die Proliferationsfähigkeit von Zellen machen. Ein KoBi ist in Bezug auf das veränderte Wachstumsverhalten von

durch eine Noxe geschädigten Zellen ein empfindlicherer Test als die Proliferationskinetik.

Es gibt prinzipiell zwei verschiedene Möglichkeiten einen KoBi durchzuführen: Einerseits kann man den Test parallel zur Behandlung mit FLT ablaufen lassen, andererseits kann man die Toxizität der Chemotherapie vor der Behandlung mit FLT bestimmen um auf die inhibitorischen Konzentrationen zu kommen. In unseren Versuchen führten wir die KoBis durch, um die inhibitorischen Konzentrationen IC<sub>25</sub>, 50, 75, 95 der Zytostatika zu erhalten. IC steht für inhibition of colony formation, welche die toxische Dosis darstellt, bei der ein bestimmter Prozentsatz der Zellen, z.B. bei IC 25 25% nicht mehr am Leben ist. Die Überlebensfraktion, die sog. PE (plating efficiency), stellt dabei die Anzahl der gebildeten Kolonien geteilt durch die ausgesäte Zellzahl in % dar. Diese wurde zusätzlich auf die PE der unbehandelten Kontrolle bezogen. Als eine Zellkolonie wird bei der Auswertung eine aus einer Zelle hervorgegangene Ansammlung von 50 Zellenklonen definiert.

Der Hauptvorteil der Methode ist die Messung des vermutlich wichtigsten biologischen Parameters: klonogenes Potential. Der Koloniebildungstest kann dagegen ruhende Zellen nicht erfassen, welche möglicherweise später erst wieder in den Zellzyklus eintreten. Der Test stellt das klassische Verfahren zur Toxizitätsbeurteilung dar z. B. in der Strahlenbiologie.

Praktische Durchführung: Am Tag der Aussaat wird die laufende Kultur gesplittet, d.h. es werden nach Waschvorgang und Abtrypsinisierung eine vorher berechnete für den Versuchsansatz benötigte Menge von Zellen für die Versuche von der Routine-Kultur entnommen. Dazu wird ein Teilvolumen benötigt (in der Regel 100 µl) zur Zellzahlbestimmung mittels einer elektrischen Zählhilfe (Coulter Particle Counter, Coulter®, USA). Die Angabe erfolgt in Zellzahl in einem ml Zellsuspension.

Nach Auszählung der gesplitteten Zellen wird die Zellzahl berechnet, die man braucht, um genau 500 Zellen in 2ml Medium zu bekommen. Es werden jeweils

pro well 500 Zellen der Zelllinie MCF7 auf mehrere 6-wells Kulturplatten ausgesät. Nach 24 h erfolgt die Zugabe der beiden Zytostatika Adriamycin (10mg von Sigma erhalten, Molekulargewicht 580 mg/ml, verdünnt auf Stammlösung  $5 \times 10^{-6}$ ) und Taxotere (aus der onkologischen Tagesklinik der Universitätsfrauenklinik erhalten, Konzentration: 10mg/ml, Molekulargewicht 794mg/ml). In jeweils unterschiedlichen Konzentrationen. Nach 24h nach Einwirken der Chemotherapie führt man einen Medienwechsel durch. Dazu wird das behandelte Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und erneut frisches Medium hinzugefügt. Die Zellen werden erst 14 Tage nach der Aussaat und 12 Tage nach Chemotherapiebehandlung „gestoppt“. Das Medium wird dabei abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gespült und kurz mit 70% Alkohol benetzt. Die Zellen werden daraufhin mit einer 1g% igen Kristallviolettlösung (1g in 100ml 50%igen Ethanol) gefärbt und für 40 Minuten darin inkubiert. Nach Aufnahme der Farbe werden die Zellen mit Aqua dest. gewaschen, bis die überschüssige Farbe weg ist. Die Anzahl der gebildeten Kolonien in jedem Loch der Kulturplatte wird nach dem Trocknen gezählt wobei mindestens 50 Zellen /Kolonie als Grenzwert definiert werden. Konglomerate von weniger als 50 Zellen gelten als subletal geschädigt und werden nicht gezählt.

### 3.2.2 Methodik der Durchflußzytometrie (FACS)

Die Durchflußzytometrie wurde zwischen 1960-1970 von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zur Messung von Tumorzellen, Lymphozyten und Bakterien mit Hilfe von Protein- Nukleinsäurefarbstoffen und fluoreszenzmarkierten Antikörpern, entwickelt. Crissman et al. entwickelten 1975 die Durchflußzytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting), eine etablierte Methode zur Analyse physikalischer und molekularer Eigenschaften von Säugetierzellen, die sich die Eigenschaften der Fluoreszenz zu Nutze macht. Fluoreszenz beschreibt das Phänomen, das bestimmte chemische Verbindungen, nachdem sie durch Anregung (z.B. mittels eines Lasers) auf ein höheres Energieniveau gehoben worden sind, bei ihrem Übergang in den Grundzustand einen diskreten Teil des Energieunterschiedes in Form von Licht aussenden,

das gemessen werden kann. Das emittierte Licht wird über einen Bandenfilter getrennt und von verschiedenen Photodetektoren gemessen.

Im Rahmen der Experimente werden an den chemotherapiebehandelten MCF7-Zellen durchflusszytometrische Messungen durchgeführt, um eventuelle Auswirkungen der radioaktiven Strahlung des FLT oder bzw. ihrer Behandlungskombinationen auf den Zellzyklus aufzeigen zu können. Die Durchflusszytometrie (FACS) dient der Validierung der FLT-Aufnahme in Abhängigkeit von der durch die Chemotherapie bewirkten Zellzyklusmodulation. Die jeweiligen Zellzyklusphasen der Tumorzellen können so in Abhängigkeit der Einwirkzeit der Chemotherapie sensitiv bestimmt werden.

Dieses Verfahren ist die sensitivste Methode für die Zuordnung von Zellen zu bestimmten Zellzyklusphasen einer Zellpopulation. Hierzu wird die DNA intakter Zellen durch Inkorporation eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs (z.B. Propidiumjodid) markiert, der unspezifisch mit DNA interkaliert und mit dem sich der Gesamtgehalt an zellulärer DNA darstellen lässt. Andererseits werden fluoreszierende sekundäre Antikörper gegen primäre Antikörper verwendet, die an Bromdesoxyuridin (BrdU) binden, einer Substanz, die nur in neusynthetisierte DNA eingebaut wird. Der Anti-BrdU-Antikörper ist dabei ein monoklonaler Maus-IgG-AK (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA) und der zweite AK ein monoklonaler Kaninchen-IgG-AK (Fa. Dako, Hamburg, Germany), der mit Fluoreszein Isothiocyanat markiert ist.

Mittels Detektion der hervorgerufenen Lichtemission einzelner Zellen beim Durchtritt durch einen Laserstrahl kann der DNA-Gehalt als optisches Signal erfasst werden. Nach entsprechender Dokumentation können Zellen in G1 und G2 (doppelter DNA-Gehalt) graphisch unterschieden werden. S-Phase-Zellen liegen je nach bereits synthetisierter DNA-Menge zwischen G1 und G2. Ihr Anteil an der Gesamtpopulation ist anhand des DNA-Gehaltes allein weniger genau zu erfassen. Die ergänzende spezifische S-Phase-Markierung mit dem Thymidin-Analogon Bromdeoxyuridin (BrdU) erlaubt die akkurate Messung von Zellen in S-Phase. Ein monoklonaler Antikörper gegen BrdU konjugiert mit ei-

nem anderen Fluoreszenzfarbstoff und erlaubt die simultane Detektion von Zellen in G1, G2 und S-Phase.

Verwendete Materialien :

StopMedium: Das unsterile Stop-Medium dient zur Inaktivierung des Trypsins bei der Aufarbeitung der Zellen für die Zellzyklusanalyse. Es besteht aus jeweils 45% Waymouth-(MB 752/1, Katalog-Nr.31220-023, Gibco BRL) und Nutrient Mixture F-12 Medium( Katalog-Nr.21765-029, Gibco BRL) und zu 10% aus FCS.

Bromdesoxyuridin( BrdU)-Lösung:

Durch Zugabe von DMEM zur 40 mmolaren BrdU-Lösung wird eine 10 mmolare Lösung hergestellt. Um eine Endkonzentration von 10  $\mu\text{Mol}$  in den Kulturflaschen zu erhalten, werden 10  $\mu\text{l}$  der Verdünnung zu 5 ml Medium hinzupipetiert.

PBS/BSA: Der phosphatgepufferten Salzlösung („Phosphate Buffered Saline“; PBS) wird 1%iges BSA( Albumin-Fraktion V, Serva) hinzugefügt.

Pepsinlösung: Intrazelluläre Bestandteile wie z.B. Proteine können zu unspezifischen Antikörperbindungen und somit falschen Messergebnissen führen. Deshalb müssen sie durch das Enzym Pepsin aus der Probe entfernt werden. Für die Pepsinlösung werden 0,5 g Pepsin (Merck, Darmstadt, BR Deutschland) mit einer Konzentration von 70 FIP-U/g in 1N HCl und 95 ml Aqua dest. gelöst.

Salzsäure( HCl): Die Anti-BrdU-AK kann an das in die DNA eingebaute BrdU nur dann binden, wenn die DNA in denaturierter Form vorliegt. Dazu wird eine 2N HCl verwendet.

Antikörper( AK): Die indirekte Nachweismethode des BrdU-Einbaus erfordert zwei verschiedene AK:

Der Anti-BrdU-AK, ein monoklonaler Maus-IgG-AK( Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Nj, USA) markiert das in die DNA eingebaute BrdU.

Der zweite AK, ein monoklonaler Kaninchen-IgG-AK (Fa. Dako, Hamburg, BR Deutschland), ist mit Fluoreszin Iso Thio Cyanat( FITC) versehen und kann den ersten AK markieren. Beide AK wurden mit PBS/DNA verdünnt.

Propidiumiodid-Lösung: Die Propidiumiodidstammlösung wurde durch die Zugabe von PBS auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt.

RNAse: Propidiumiodid wird in doppelsträngige RNA und in DNA gleichermaßen eingebaut und kann dadurch den DNA-Meßwert verfälschen. Aus diesem Grund wird die RNA durch das Enzym RNAse entfernt. Die Stammlösung (1mg/ml, Sigma) wird mit PBS auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt.

Propidiumiodid-RNAse: Der 1 mg/ml konzentrierten Stammlösung wird 2%ige RNAse zugesetzt.

Praktische Durchführung: Um die Zellzyklusphasen der MCF-7-Zellen beurteilen zu können, werden Zellzyklusanalysen durchgeführt an jedem Tag der FLT-Messung. Hierzu werden die Zellkulturen eine Stunde lang mit jeweils 10 µl 10mmolarer BrdU-AK Lösung im Brutschrank inkubiert. Nach einer Stunde wird das Medium mit der BrdU-AK Lösung abpipetiert, zweimal mit je 1ml PBS gespült und danach 1ml 1%ige Trypsinlösung hinzugegeben. Nach 2-3 Minuten Inkubationszeit haben sich die Zellen abgelöst. Nun wird 1ml Stop-Medium hinzugegeben. Die MCF-7-Zellen werden vereinzelt, suspendiert und in ein Sarstedt-Röhrchen überführt. Nach 3-minütigem Zentrifugieren bei 1200 Umdrehungen wird der Überstand dekantiert und der Bodensatz gut mit 3 ml PBS resuspendiert und erneut mit 3 Minuten bei 1200 Umdrehungen zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wird der Bodensatz mit 200 µl vergälltem, 70%igem Alkohol gründlich resuspendiert. Die Proben werden bei -20 Grad für die Aufbereitung aufbewahrt.

Vor der Durchführung der durchflußzytometrischen Messung werden die Zellen zuerst mit 3 ml PBS resuspendiert, gewaschen und schließlich mit 275 Umdrehungen für sechs Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen. Bei der weiteren Aufarbeitung wurden die nach jeder Zugabe von Lösungen oder Antikörpern durch einen Vortex (Reax 2000, Heidolph, Kehlheim, BR Deutschland) vereinzelt.

Zunächst werden die Zellen mit 1 ml RNase für 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, mit PBS gewaschen und für 6 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss daran werden die MCF-7-Zellen mit 1 ml Pepsin für 10 Minuten ins Wasserbad (37°C) und danach zum Stoppen der enzymatischen Verdauung für 5 Minuten bei 0 °C auf Eis gestellt. Anschließend erfolgt erneut ein Waschschrift mit PBS und Zentrifugation, worauf die Zellen mit 1 ml 2 N HCL für 10 Minuten bei Raumtemperatur( RT) inkubiert werden. Diesem Procedere schließen sich 2 Waschschrift und eine zweimalige Zentrifugation an, bevor die Zellen mit PBS/BSA gewaschen und zentrifugiert werden. Anschließend werden 200 µl des ersten AK auf die Proben pipettiert und diese bei Raumtemperatur sowie Lichtabschluss für 30 Minuten gelagert. Als Negativkontrolle wird bei einer Probe kein erster AK verwendet. Später werden wieder ein Waschschrift und eine Zentrifugation durchgeführt. Daraufhin werden 200 µl des zweiten AK unter gleichen Bedingungen( 30 Minuten bei RT und Lichtabschluss) auf die Proben pipettiert. Dann erfolgt ein erneuter Waschschrift mit 500 µl Propidiumiodid-Lösung und obligatorische Zentrifugation. Daraufhin wird mit 200-500 µl (abhängig von der Anzahl der Zellkerne) Propidiumiodid-Rnase unter Lichtabschluß bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Durch diese Schritte werden die Zellkerne isoliert, das in die DNA eingebaute BrdU indirekt mit FITC( Fluorescein-Isothiocyant) Kanin-Antimaus-Antikörpern (DAKO Hamburg, Germany) markiert und die DNA durch Propidiumiodid angefärbt. Die sich anschließende Messung erfolgt an einem FACSort-Gerät (FACSort, Beckton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) mit dem Zellanalyse-Computerprogramm Cell-Quest (Beckton Dickinson), wobei  $10^5$  Kerne mit einer Flusgeschwindigkeit von 150 Kerne/sec. gemessen werden.

### 3.2.3 FLT-Speicherung-Tracerinkubation

Das (<sup>18</sup>F)-FLT wurde mit einem 16,5 MeV Zyklotron (PETtrace, GEMS PET Systems AB, Uppsala, Sweden) produziert. FLT wurde synthetisiert, indem man 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-2,3'-anhydrothymidine als Vorstufe und ein FLT-Herstellungsmodul (Nuclear Interface, Muenster, Germany) benutzte.

Aufgrund der kurzen phys. HWZ des <sup>18</sup>F (109,8 min) musste arbeitstäglich produziert werden.

Durchführung: Die Zellen werden am Tag der Aussaat aus der laufenden Kultur nach Waschung, Abtrypsinisierung und Zählung in 12 well-plates ausgesät mit jeweils 75 000 Zellen pro well in 1 ml Medium. Nach 24 h erfolgt die Behandlung mit den beiden Zytostatika Adriamycin und Taxotere mit den statistisch errechneten Konzentrationen IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>, IC<sub>75</sub> und IC<sub>95</sub>. Nach weiteren 24h wird die Chemotherapie durch einen Medienwechsel unterbrochen, indem man die Zellen absaugt, zweimal mit PBS wäscht und neues Medium hinzufügt. Nach einer „Erholungsphase“ von jeweils 4h, 24h, 72h, 120h nach Medienwechsel nach der Chemotherapieeinwirkung erfolgt die Zugabe des Tracers FLT. Pro well werden 40 µl FLT mit der Aktivität 10kBq (2,5 MBq in 10ml NaCl werden verdünnt auf 10kBq in 40µl) hinzu gegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden danach abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und mit 1ml 0,1 M NaOH-Lösung lysiert. Unter mikroskopischer Kontrolle begutachtet man, ob sich die Zellen gut gelöst haben. Hierauf überführt man das Lysat in 5ml Sarstedt-Röhrchen. Mit je 1ml PBS wird jedes well nachgewaschen und ebenfalls in das Sarstedt Röhrchen überführt. Parallel dazu werden Aliquots hergestellt, die als Berechnungsgrundlage für 100% FLT dienen sollen. Dazu werden wie oben 40µl FLT mit der Aktivität 10kBq pipettiert und mit 10ml PBS verdünnt. Hiervon nimmt man 100µl in ein Sarstedt-Röhrchen (Verdünnung 1:100) und füllt mit PBS auf 2ml auf. Diese stellt man gemeinsam mit den anderen Proben in den Probenwechsler, ein Gamma-Counter (Wizard 1480, Wallac Oy, Turku, Finland). Die Radioaktivität in den Zellfraktionen und in den Aliquots kann jetzt bestimmt werden. Hierzu werden die Röhrchen im Bohrloch- Szintilla-

tionsdetektor gemessen. Anschließend werden die Zellzahlen im Parallelansatz durch Zählen mit dem Coulter-Counter bestimmt. Der FLT-Uptake wurde in % der totalen Aktivität der Kultur angegeben.

### 3.2.4 Tritium-Proliferationstest

Das klassische Verfahren der Proliferationsmessung ist die Zellmarkierung mit <sup>3</sup>HdR-Thymidin. Durch Gabe des radioaktiv markierten Nukleosids Thymidin wird die Substanz während der Synthese in die DNA eingebaut und die in der S-Phase befindenden Zellen radioaktiv markiert. Die Proliferation der MCF7-Zellen wurde durch den Einbau von tritiummarkiertem Thymidin (<sup>3</sup>H-TdR, Amersham Pharmacia) in die zelluläre DNA sich teilender Zellen bestimmt.

Durchführung: Aus der laufenden Kultur werden die Zellen nach Waschen mit 3ml PBS mit 3ml Trypsin 4 min im Brutschrank inkubiert. Daraufhin werden sie mit 4ml Medium inaktiviert und in einem 15ml Falconröhrchen 5min bei 900 Umdrehungen in die Zentrifuge gestellt. Nach Dekantieren werden sie in 5ml Medium resuspendiert und in der Neubauer Zählkammer gezählt. Die Anzahl an benötigten Zellen und die benötigte Zellsuspension für die 96-well Platte wird hiermit errechnet. Pro Loch wurden je 5000 Zellen in 200 $\mu$ l in einer 96-Loch-Flachbodenplatten ausgesät. Für eine Platte benötigt man somit mindestens 480 000 Zellen und etwas mehr als 20ml Zellsuspension pro Platte. Es werden bei jedem Versuchsansatz mehrere Platten ausgesät. Nach 24stündigem Anwachsen der Zellen werden die Zellen mit den beiden Zytostatika Adriamycin und Taxotere mit den verschiedenen Konzentrationen IC25, IC 50, IC 75 und IC 95 behandelt analog der FLT- Versuche. Dazu wird 100 $\mu$ l Medium entnommen und 100 $\mu$ l Chemotherapielösung hinzugefügt. Diese wird in einer Verdünnungsreihe entsprechend der Dosierung (IC 25, IC 50, IC 75, IC 95) hergestellt. Die Negativkontrolle wird nicht behandelt. Nach 24h Chemotherapieeinwirkung wird ein Medienwechsel durchgeführt. Dabei wird das gesamte Medium herauspipetiert, die Zellen jeweils zweimal mit 200 $\mu$ l PBS gewaschen und mit neuem Medium benetzt. In der Regel wurde eine achtfache Bestimmung der jeweiligen Konzentration durchgeführt. Nach einer Erholungsphase von 4h, 24h, 72h und

120h werden die Platten „gepulst“, d.h. den Platten wird jeweils 50µl Tritium-Thymidin (3H-TdR, Amersham Pharmacia) mit der Aktivität 1µCi pro Kavität zugesetzt und für 1h bzw. 4h inkubiert.

Vor der Ernte des Testes wurden die Ansätze für mindestens 24h bei -20°C gelagert, um eine Lyse der Zellen zu erwirken. Zur Messung wurde die DNA mittels einer automatisierten Erntemaschine (Microcell Harvester, Inotech) auf Glasfiber-Filtermatten (Wallac Oy, Turcu, SF) übertragen. Die Matten wurden getrocknet und zusammen mit Szintillationspuffer (Ultima-Gold, Packard-Bioscience, MA, USA) in eine Folienhülle eingeschweißt. Die Messung der eingebauten Radioaktivität erfolgte im Flüssigszintillationszähler (1450 Microbeta Plus, Wallac). Alle Werte wurden in „Zerfälle pro Minute“(counts per minute= cpm) angegeben und als Mittelwerte dargestellt. Sie repräsentieren Mittelwerte aus Achtfachansätzen.

### **3.2.5 Zellzahlbestimmung und Proliferationskinetik**

Bei Zellaussaat und zur Validierung der Therapie im Verlauf der Experimente ist eine möglichst exakte Bestimmung der Zellanzahl essentiell. Dies kann elektronisch mit einem Cell Counter wie z. B. dem Coulter Z1 erfolgen. Hierbei werden Zellen in einer Elektrolytlösung suspendiert und mittels eines Vakuums durch eine kleine Öffnung (= Apertur; dia: 100 µm) durch die ein Strom fließt gesaugt. Jede Zelle verdrängt während ihres Durchtretens durch die Öffnung die Elektrolytlösung in der Apertur und ruft eine Änderung in der Impedanz hervor, welche als Stromimpuls gemessen wird (sog. Coulter-Prinzip). Das durch die Kapillare in ein Syphonsystem gesaugte Suspensionsvolumen kann sehr präzise auf z. B. 0, 5 oder 1ml justiert werden. Obere und untere Grenzen der Zelldurchmesser können festgelegt werden, so dass nur Zellen bestimmter Größen gemessen werden. Aus den Daten lassen sich Zellteilungsraten und Verdopplungszeit bestimmen. Aus Ausgangszellzahl  $N_0$  und der Endzellzahl  $N$  kann die Anzahl der abgelaufenen Zellteilungen (Populationsverdopplungsrate PD) mit Hilfe der Formel  $= (\log N - \log N_0) / \log 2 = 2,23$  errechnet werden. Die Zellzahlen wurden dabei in einem Parallelansatz zu den FLT- Versuchen ermittelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Koloniebildungstests

#### 4.1.1 Konzentrationsabhängigkeit des antiproliferativen Effekts der Chemotherapie

Um die Effekte der einzelnen Konzentrationen der Substanzen auf die MCF 7-Zellen zu untersuchen, wurde die Proliferationsinhibition über eine breite Spanne von Dosierungen von Adriamycin und Taxotere gemessen. Beide Substanzen zeigten eine dosisabhängige Reduktion der Koloniebildung. Die Konzentrationen repräsentieren den unteren, mittleren und oberen Bereich der Toxizität. Dies ist wichtig für die Korrelation der Wachstumshemmung mit der FLT-Aufnahme. Um die inhibierenden Dosierungen der Chemotherapie für die FLT-Versuche zu erhalten, wurden die Konzentrationen bei Adriamycin und bei Taxotere benutzt. Diese wurden mittels einer Verdünnungsreihe aus den Stammlösungen  $10^{-4}$  hergestellt. Die Ergebnisse basieren auf 8 Experimenten mit Adriamycin und 7 Experimenten mit Taxotere. Versuch AA steht für den ersten Versuch mit Adriamycin usw. Dementsprechend steht TA für den ersten Versuch mit Taxotere in der Abbildung. Die pharmakologischen Konzentrationen wurden statistisch durch Logit/ Probit Analyse anhand der Koloniebildungstests ermittelt.

#### 4.1.2 Statistische Auswertung der Koloniebildungstests :

Annahmen: Kolonienzahl ("well") ist Poisson-verteilt. Die Rate folgt einer Hill-Kurve.

Schätzung: Für jedes Experiment wurde eine Kurve angepasst. Dann wurden die IC50 gemittelt und in 95%-Konfidenzintervalle geschätzt.

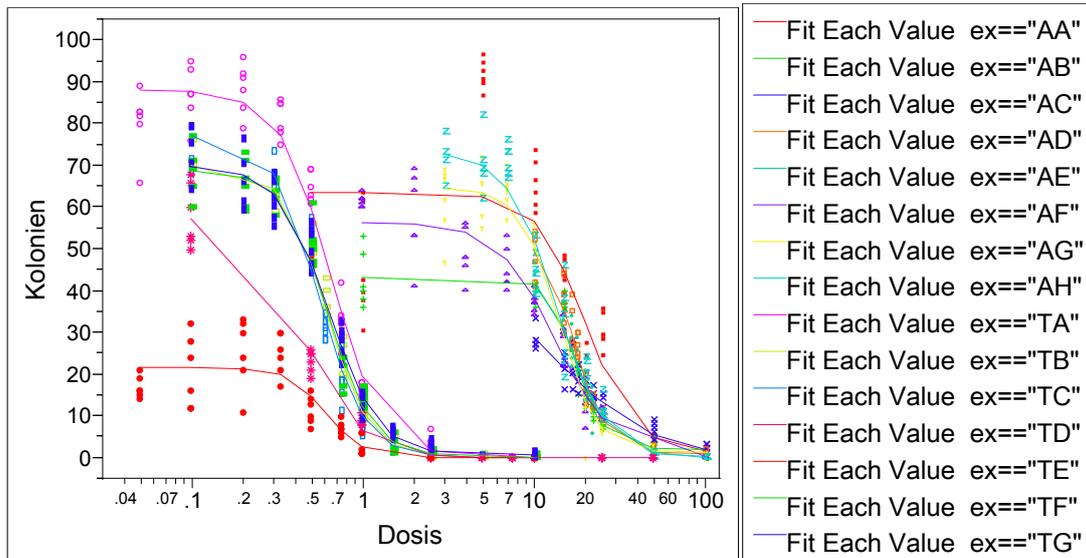


Abbildung 1: Wachstumsinhibition mit Taxotere und Adriamycin

Die Wachstumsinhibition der MCF-7 Zellen induziert durch die Chemotherapie mit Taxotere und Adriamycin in den einzelnen Experimenten. Quartile sind 0.4, 0.65, 0.9 bzw. 13, 15, 22.

drug	N Rows	IC25 Mean	IC50 Mean	IC75 Mean	IC95 Mean	IC25 Std Dev	IC50 Std Dev	IC75 Std Dev
Adriamycin	8	11.25	15.78	22.66	100	3.154	2.767	3.579
Taxotere	7	0.419	0.592	0.839	2,5	0.057	0.067	0.087

Tabelle 1: Konzentrationserfassung mit Hilfe von Adriamycin bzw. Taxotere

Die statistische Konzentrationserfassung von Adriamycin oder Taxotere resultierend in einer 25 – 95 % Inhibition (IC 25 – 95) der MCF-7 Zellproliferation gemessen durch den Koloniebildungsassay.

Jetzt ist es die Dosis IC<sub>p</sub>, mit der man einen Bruchteil p der Wirkung R erzielt: Aus der Forderung  $M - M \cdot R / (1 + (IC_{50} / IC_p)^g) = M \cdot (1 - p \cdot R)$  folgt  $IC_p = IC_{50} \cdot (p / (1-p))^g$ . Die Schätzung erfolgte in zwei Stufen, nämlich erstens für jedes Experiment getrennt nach der Maximum-Likelihood-Methode unter der Annah-

me, die Wellzahl sei Poisson-verteilt mit einer Rate, die einer verallgemeinerten abfallenden Hill-Kurve in der Dosis folgt. In der zweiten Stufe wurden die Populations-ICp als arithmetische Mittel geschätzt, was nur dann eine ML-Schätzung ist, wenn man annimmt, die Experiment-ICp seien normalverteilt.

Somit kommt man auf die inhibitorischen Konzentrationen:

Adriamycin		Taxotere	
IC 25	11.25 nMol	IC 25	0.42 nMol
IC 50	15.78 nMol	IC 50	0.59 nMol
IC 75	22.66 nMol	IC 75	0.84 nMol
IC 95	100 nMol	IC 95	2.5 nMol

Tabelle 2: Inhibitorische Konzentrationen

In der obigen Tabelle dargestellt sind die Konzentrationen von Adriamycin oder Taxotere resultierend in einer 25 – 95 % Inhibition (IC 25 – 95) der MCF-7 Zellproliferation gemessen durch den Koloniebildungsassay.

#### 4.1.3 Darstellung der Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung der Wachstumshemmung für Adriamycin (rot) und Taxotere (grün)

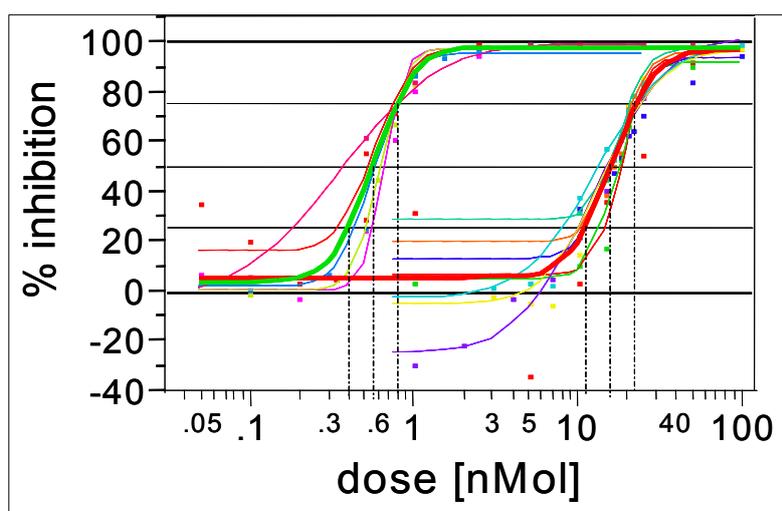


Abbildung 2: Ergebnisse der Konzentrationsbestimmung

Die Abbildung 2 stellt die Wachstumsinhibition der MCF-7 Zellen induziert durch die Chemotherapie mit Taxotere und Adriamycin dar. Die Kurven repräsentieren die Probit/logit plots für Taxotere (links) und Adriamycin (rechts).

Basierend auf den Ergebnissen der Koloniebildungstests für die jeweilige Substanz führten wir alle weiteren Versuche, mit FLT und Tritium (Tdr), mit Hilfe dieser Konzentrationen durch. Dabei entspricht die IC der Inhibition der Koloniebildung, d.h. die IC 25 ist demnach die toxische Dosis, bei der 25% der Zellen nicht mehr am Leben sind. Die IC 95 würde die Dosis sein, bei der analog nur noch 5% der Zellen am Leben sind.

Adriamycin zeigte eine Inhibition des klonogenen Überlebens bei Konzentrationen von 0.5 bis 100nM. Taxotere zeigte reduziertes Wachstum bei Dosierungen von 0.1 bis 50  $\mu$ M (Abbildung 2). Die Dosis- Wirkungskurven von wiederholten Experimenten wurden mit der Varianzanalyse getestet. Wirksame Dosierungen und Steigungen der hervorgerufenen Dosis-Wirkungskurven unterschieden sich signifikant bei beiden Substanzen ( $P < 0.0001$ ). Durch die Probit Regression wurden Mittelwerte für die IC 25-95 für beide Substanzen ermittelt (Tabelle 2).

Für eine Korrelation der Proliferationsinhibition mit der FLT-Aufnahme, wurden die Daten benutzt, um die Dosierungen zu finden, die zu einer 25-95%igen Reduktion des klonogenen Überlebens führten.

#### **4.2 Ergebnisse der Proliferationskinetik:**

Parallel zu den FLT- Versuchen wurden Zellzahlbestimmungen der MCF7-Zellen durchgeführt. Die Zu- und Abnahme der Zellzahlen nach Behandlung mit den entsprechenden Dosierungen der Chemotherapeutika wurde geschätzt. Damit wurde die Proliferationsrate (Populationsverdopplungsrate) bei allen Dosierungen bestimmt, sie gibt die Anzahl der Zellteilungen innerhalb von 24h an und ist ein Maß für die proliferative Aktivität der Zellen. Bei der Auswertung ist sie immer in Bezug auf die Kontrolle angegeben. Sie berechnete sich wie folgt: Populationsverdopplungsrate (PD) =  $(\log N - \log N_0) / \log 2$ . Die Populationsverdopplungsrate wurde ebenfalls mit FLT korreliert.

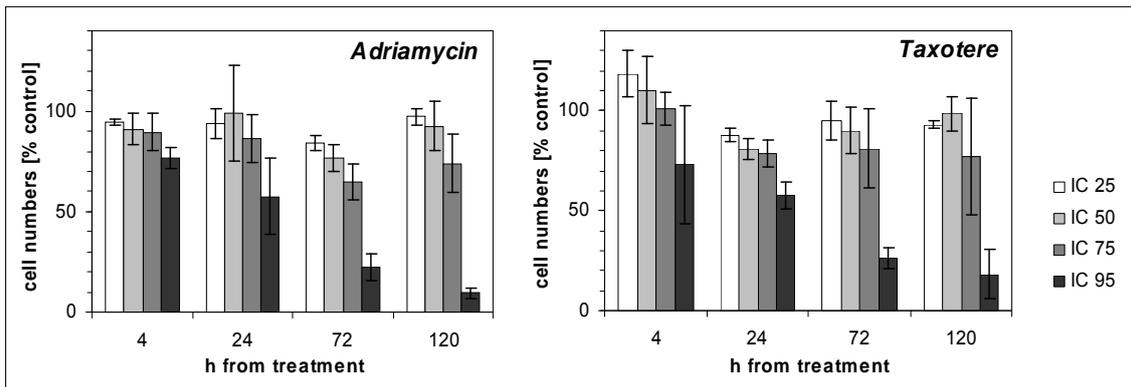


Abbildung 3: Darstellung der Zellzahlen

Der Rückgang der Zellzahlen der MCF-7 Kulturen nach Behandlung mit Taxotere und Adriamycin. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von Zellzahlen aus wiederholten Experimenten auf die unbehandelten Kontrollen bezogen mit Fehlerbalken für die Standardabweichung.

Vier Stunden nach Behandlung mit Adriamycin, waren die Zellzahlen leicht, jedoch nicht signifikant reduziert bei Behandlung mit IC 95 (Abbildung 3). Die niedrigeren Adriamycin-Konzentrationen induzierten eine viel geringere Reduktion des Zellwachstums. Bei dieser Konzentration wurde die Reduktion der Zellzahlen deutlicher je länger das Intervall nach Behandlung war, bis hin zu 10% im Vergleich zur Kontrolle nach 5 Tagen. Ein beachtenswerter Rückgang der Zellzahlen konnte nur bei IC 75 und einem langen Intervall nach Behandlung gesehen werden. Mit IC 95 konnte bei Taxotere 4 Stunden nach Behandlung ein akuter Zellverlust, dargestellt durch reduzierte Zellzahlen, detektiert werden. Beachtenswert war, dass diese frühe Zellreduktion eine auffallende Variabilität in wiederholten Experimenten aufwies (Abbildung 3). Im Gegensatz dazu, zeigten die Zellzahlen eine Tendenz die Zellzahlen der Kontrolle zu gleichen Zeitpunkten zu übersteigen, zu denen die Zellkulturen mit IC 25 oder IC 50 behandelt wurden. Ähnlich wie bei der Behandlung mit Adriamycin waren die Zellzahlen in Abhängigkeit zu Dosis und behandlungsfreien Intervallen reduziert.

## 4.2.2 Korrelation von Proliferationsrate mit FLT-Versuchen bei Taxotere

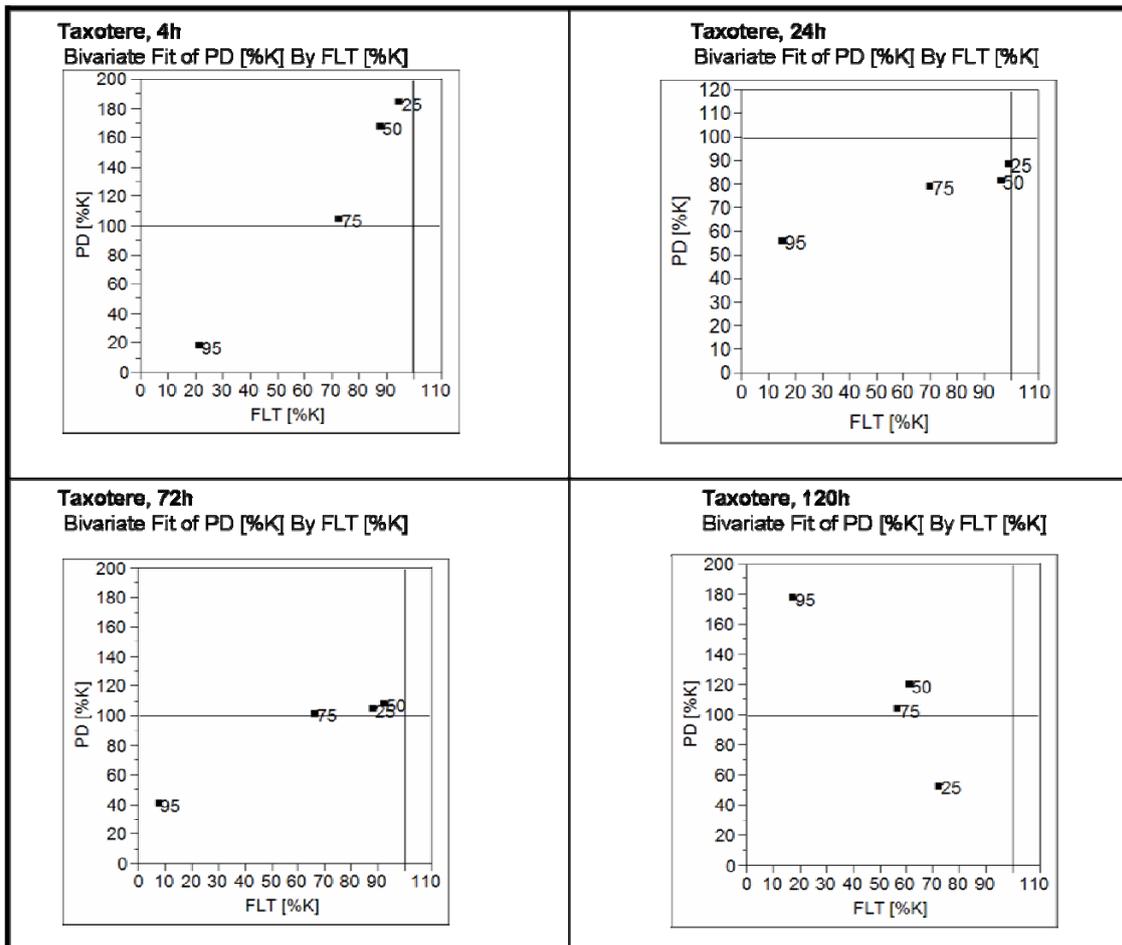


Abbildung 4: Korrelation der Proliferationsrate mit den FLT- Versuchen bei Taxotere

### 4.2.3 Korrelation von Proliferationsrate PD mit FLT(Gesamt-Uptake in ccpm) bei Taxotere

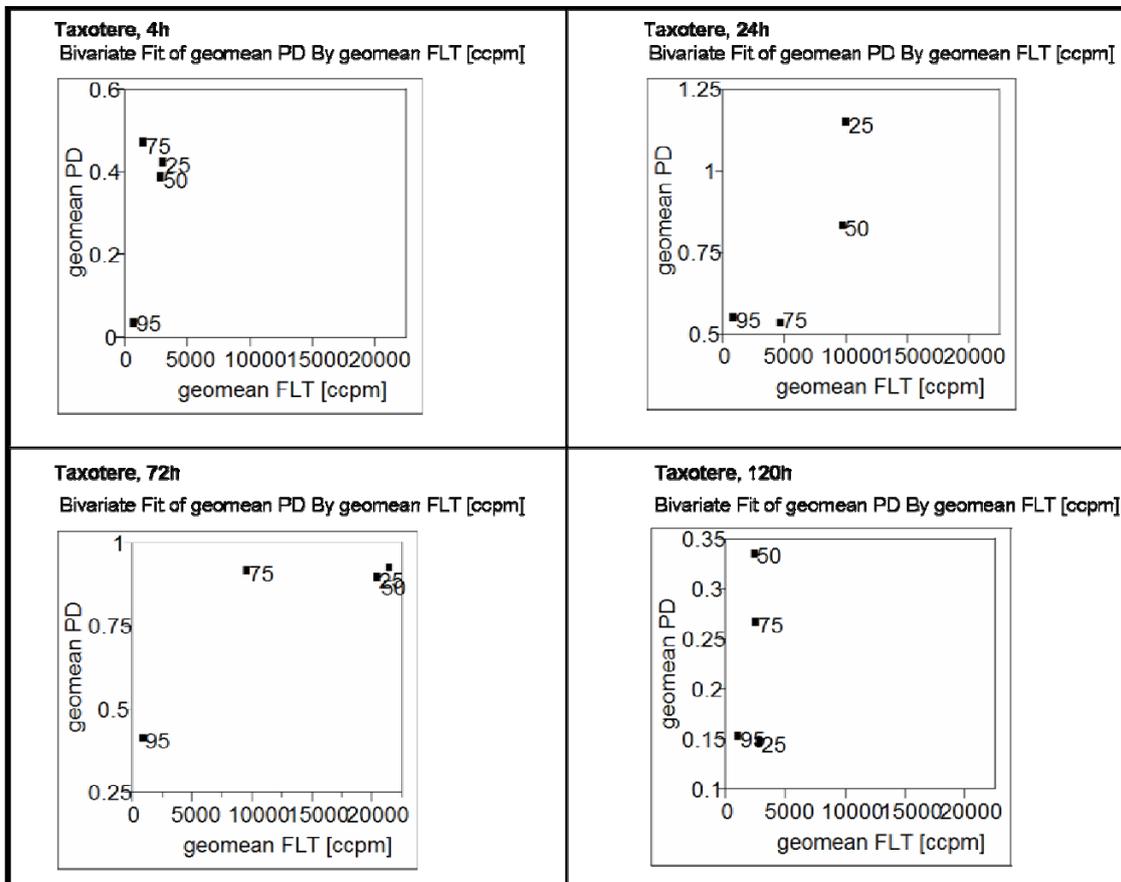


Abbildung 5: Korrelation der Proliferationsrate mit FLT-Gesamt-Uptake/ Taxotere

#### 4.2.4 Korrelation von Proliferationsrate PD [%K] mit FLT [%K] bei Adriamycin

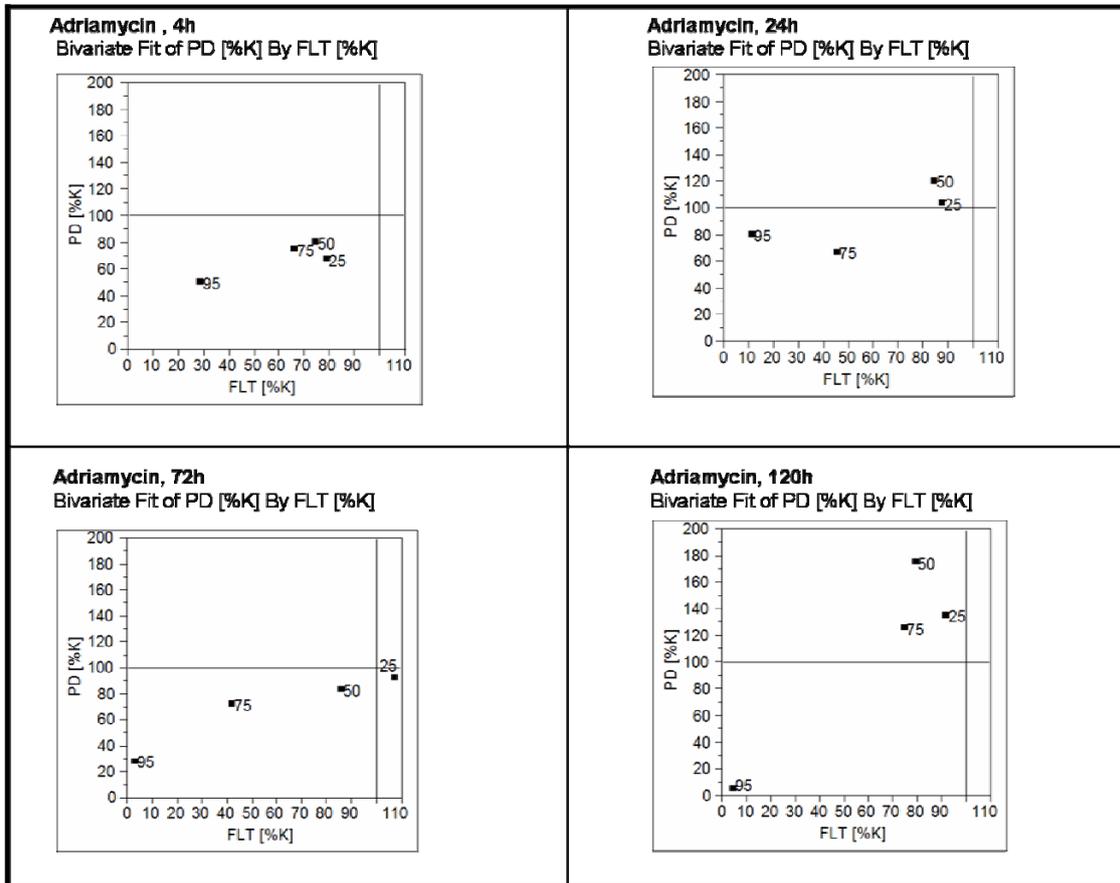


Abbildung 6: Korrelation der Proliferationsrate mit FLT bei Adriamycin

#### 4.2.5 1.6.5 Korrelation von Proliferationsrate PD mit FLT (Gesamt-Uptake in ccpm) bei Adriamycin

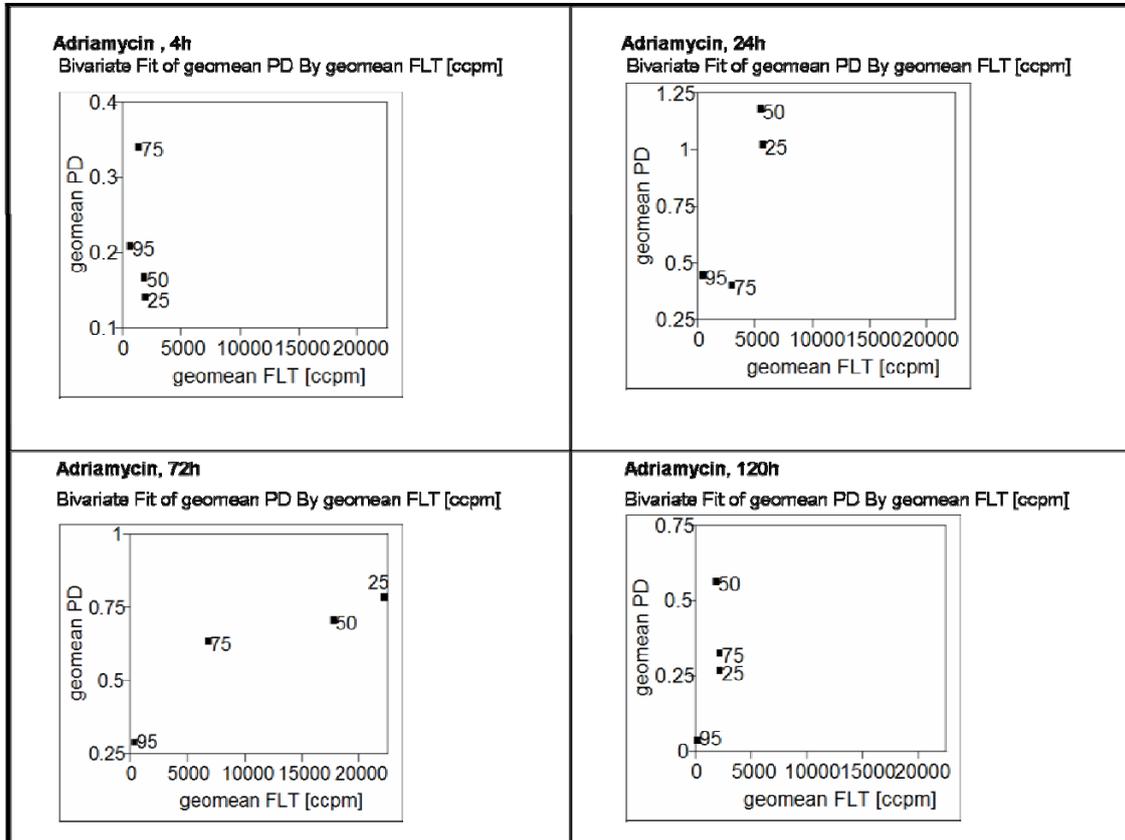


Abbildung 7: Korrelation der Proliferationsrate mit dem FLT-Gesamt- Uptake/ Adriamycin

### 4.3 Ergebnisse der FACS-Analyse und Durchflusszytometrie

Die Verteilung der MCF 7 Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus wurde mittels quantitativer Durchflusszytometrie mit Hilfe von kombiniertem Labelling mit BrDu (S-Phase-Fraktion) und Propidium iodide (DNA-Gehalt) spezifischer fluoreszierender Antikörper überprüft.

4h Taxotere	Kontrolle	IC 25	IC 50	IC 75	IC 95
S-Phase	45,83	47,06	47,81	46,88	25,74
G2/M-Phase	10,79	9,68	8,94	11,01	25,32
24h Taxotere	Kontrolle	IC 25	IC 50	IC 75	IC 95
S-Phase	49,64	49,82	48,14	43,88	21,86
G2/M-Phase	8,82	9,96	10,15	9,67	22,09
72h Taxotere	Kontrolle	IC 25	IC 50	IC 75	IC 95
S-Phase	44,57	47,11	46,49	42,45	24,93
G2/M-Phase	7,07	7,55	8,30	7,83	18,45
120h Taxotere	Kontrolle	IC 25	IC 50	IC 75	IC 95
S-Phase	25,90	29,14	28,82	21,16	27,48
G2/M-Phase	7,88	7,40	6,87	8,85	17,38

Tabelle 3: Ergebnisse der FACS- Analyse nach dem Einsatz von TAXOTERE

4h Adriamycin	Kontrolle	IC 25	IC 50	IC 75	IC 95
S-Phase	48,80	42,56	38,50	38,80	25,07
G2/M-Phase	8,96	11,72	12,86	12,89	24,17
24h Adriamycin	Kontrolle	IC 25	IC 50	IC 75	IC 95
S-Phase	51,23	49,69	46,98	42,70	11,18
G2/M-Phase	7,58	10,25	10,37	9,93	44,06
72h Adriamycin	Kontrolle	IC 25	IC 50	IC 75	IC 95
S-Phase	44,34	42,82	40,43	33,23	5,47
G2/M-Phase	6,89	8,21	9,58	10,59	43,43
120h Adriamycin	Kontrolle	IC 25	IC 50	IC 75	IC 95
S-Phase	27,21	29,52	29,28	23,95	8,84
G2/M-Phase	8,79	8,47	9,38	12,01	50,43

Tabelle 4: Ergebnisse der FACS- Analyse nach dem Einsatz von ADRIAMYCIN

### 4.3.1 Darstellung der Effekte von Taxotere und Adriamycin auf die S-Phase-Fraktion der MCF-7 Zellen

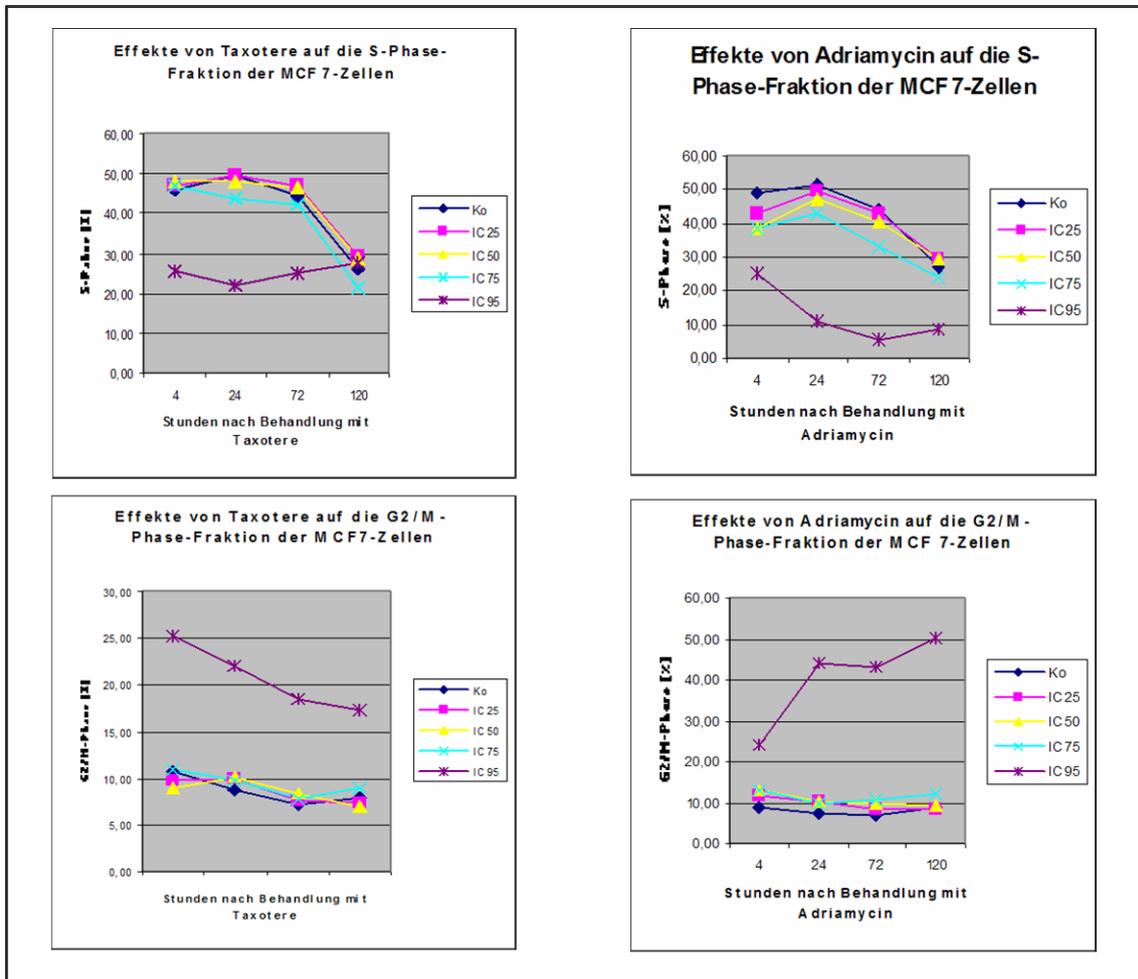


Abbildung 8: S-Phase und G2/ M -Phasenverteilung [%K] unter Behandlung mit Adriamycin und Taxotere

### 4.3.2 Statistische Darstellung der S-Phase

Bivariate Fit of FLT [%K] By S-Phase [%K]

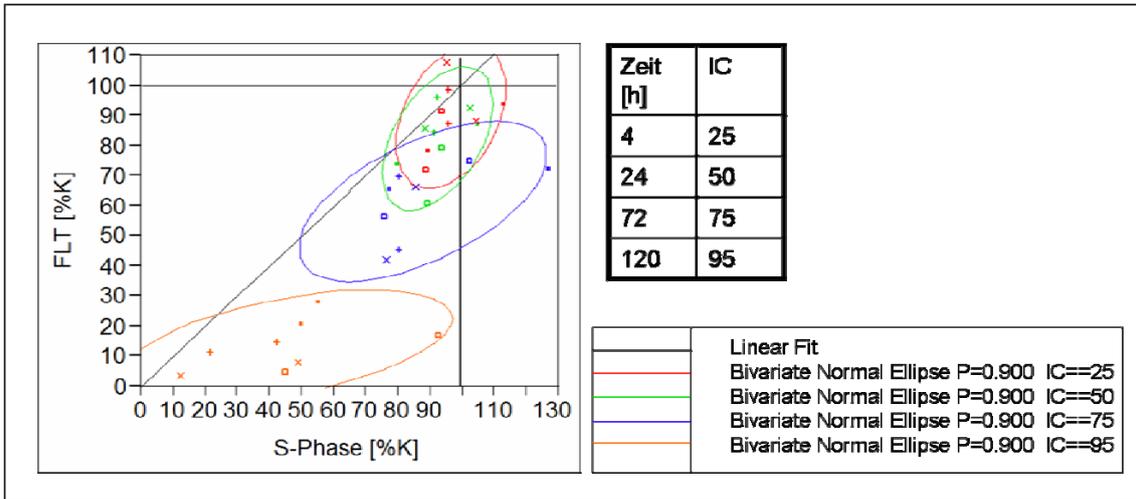


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase [%K], P= 0.9

Bivariate Fit of FLT [%K] By S-Phase [%K]

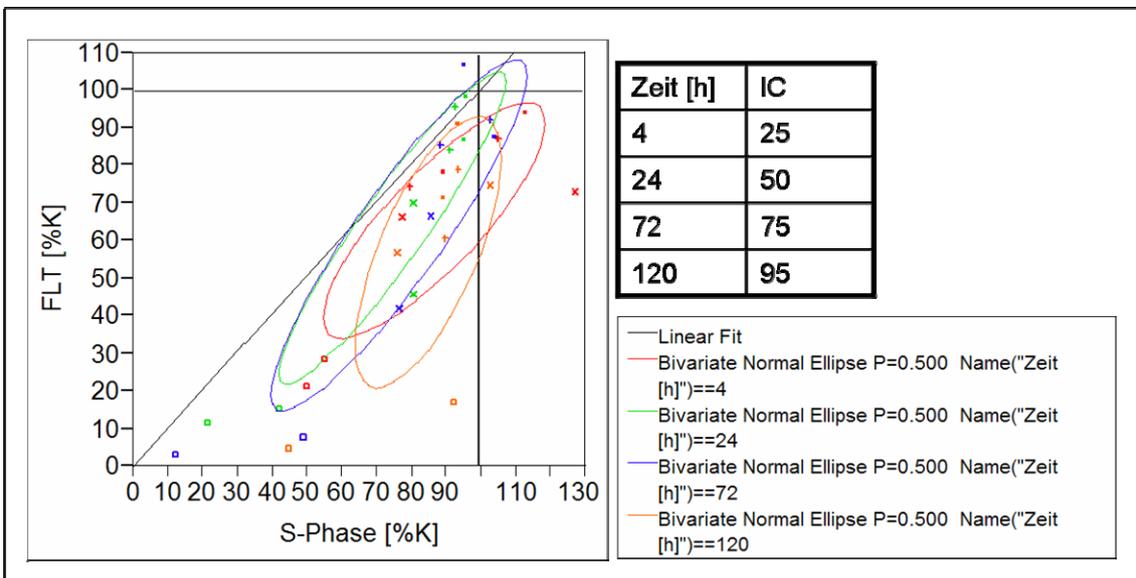


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase [%K], P= 0.5

Bivariate Fit of FLT [%K] centered by Zeit [h] By S-Phase [%K] centered

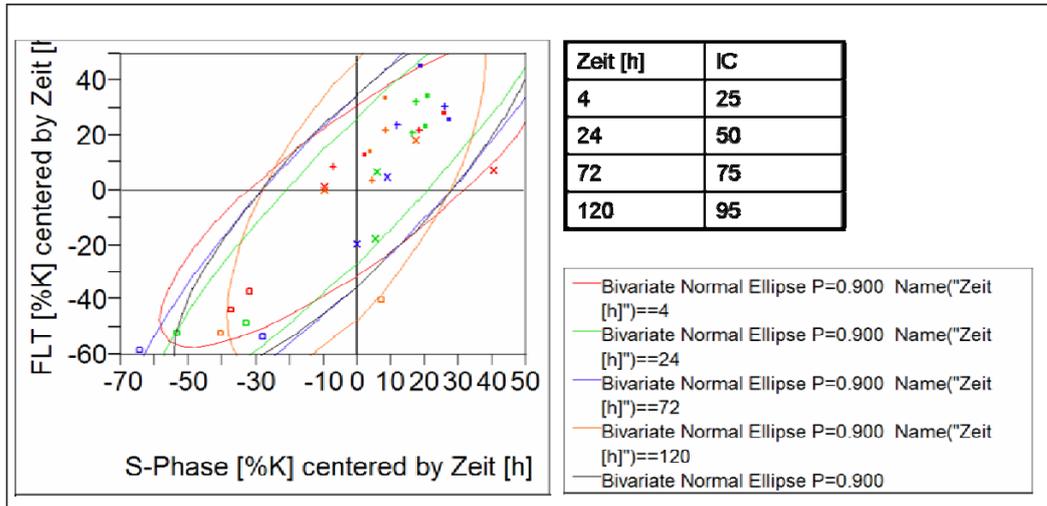


Abbildung 11: Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase [%K] , P= 0.9, zentriert

Bivariate Fit of FLT [%K] By S-Phase [%K]

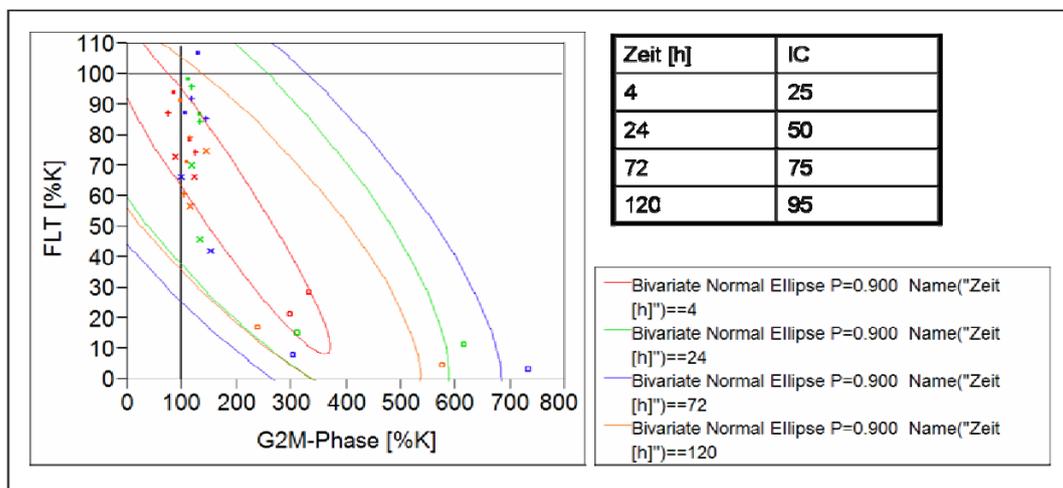


Abbildung 12: Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase [%K], P= 0.9, zentriert

Bivariate Fit of FLT [%K] centered by Zeit [h] 2 By S-Phase [%K] center

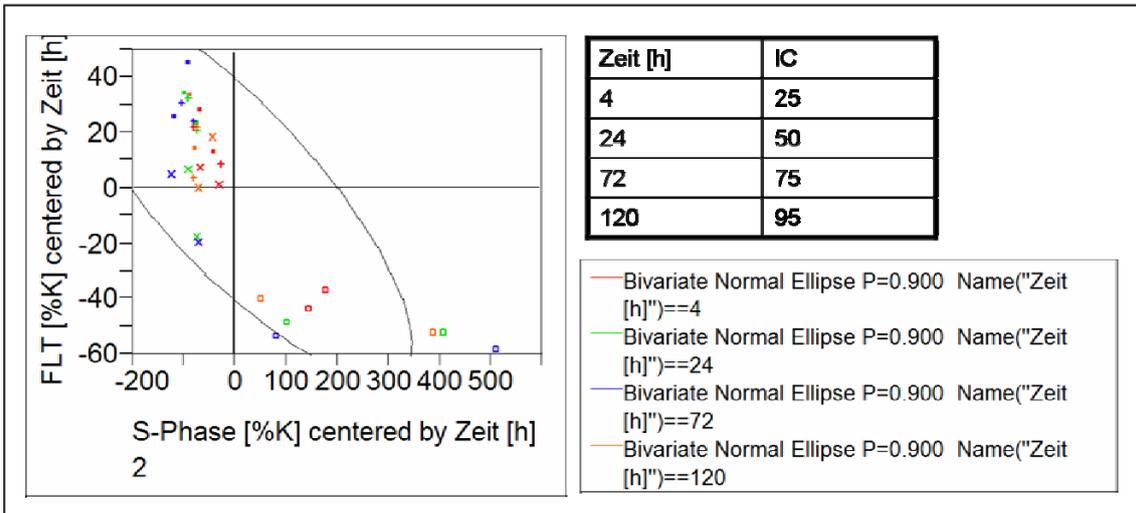


Abbildung 13: Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase[%K], zentriert

Bivariate Fit of FLT [%K] By S-Phase [%K]

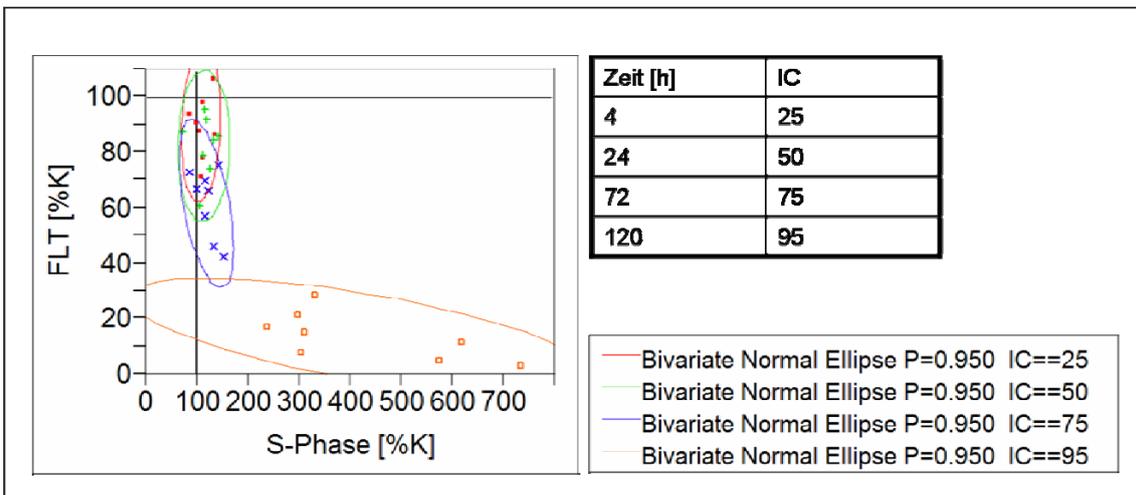


Abbildung 14: Korrelation der FLT-Aufnahme [%K] mit der S-Phase[%K], P= 0.95

Phase=G2/M-Phase, Substanz=Adriamycin

Bivariate Fit of FLT / 10000 Z By -Phase [%K]

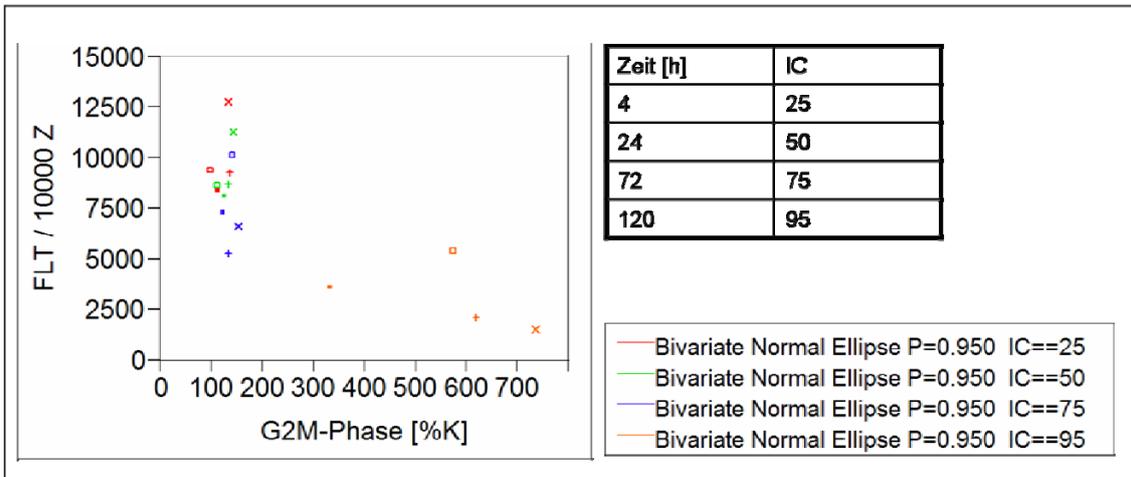


Abbildung 15: Korrelation der FLT-Aufnahme bei 10000 Zellen mit der G2M-Phase[%K], P= 0.95, Adriamycin

Phase=G2/M-Phase, Substanz=Taxotere

Bivariate Fit of FLT / 10000 Z By -Phase [%K]

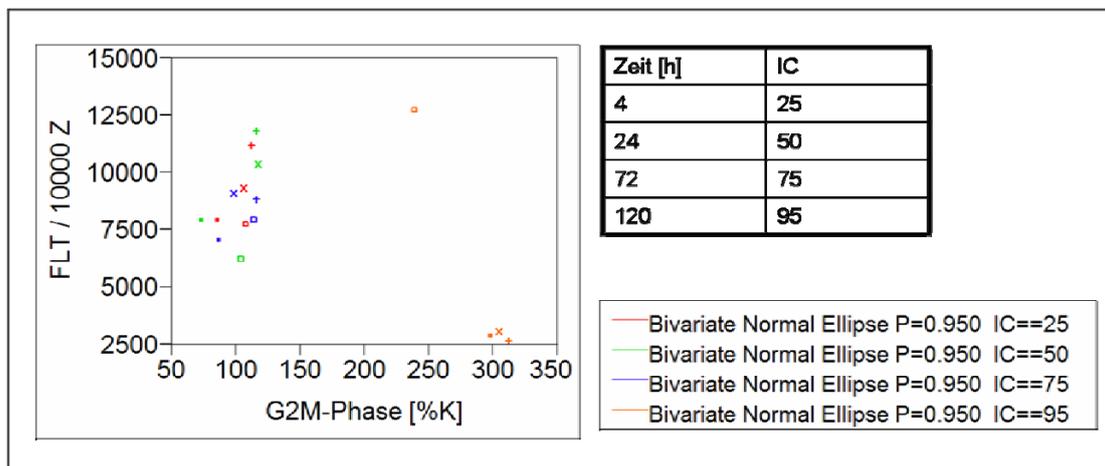


Abbildung 16: Korrelation der FLT-Aufnahme bei 10000 Zellen mit der G2M-Phase [%K] , P= 0.95, Taxotere

Phase=S-Phase, Substanz=Adriamycin

Bivariate Fit of FLT / 10000 Z By -Phase [%K]

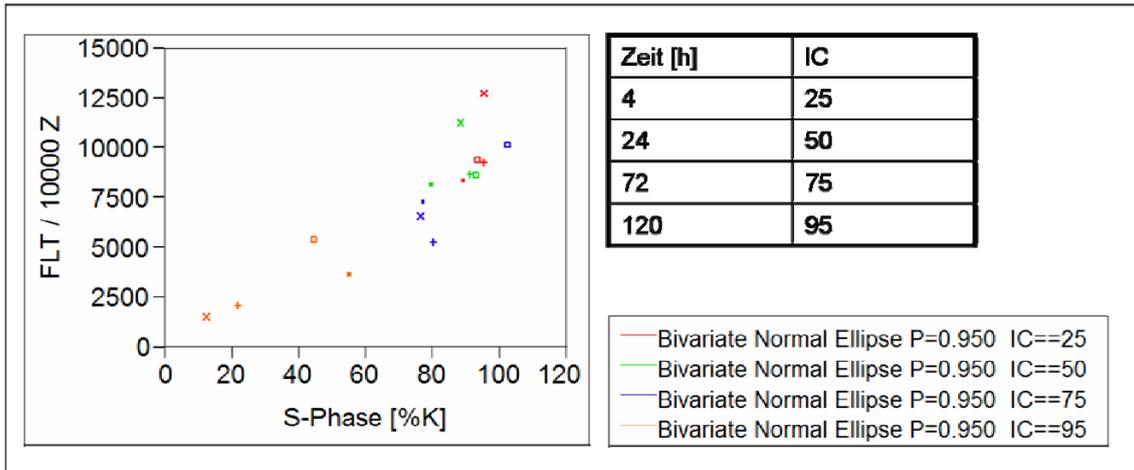


Abbildung 17: Korrelation der FLT-Aufnahme bei 10000 Zellen mit der G2M-Phase [%K] , P= 0.95, Adriamycin

Phase=S-Phase, Substanz=Taxotere

Bivariate Fit of FLT / 10000 Z By -Phase [%K]

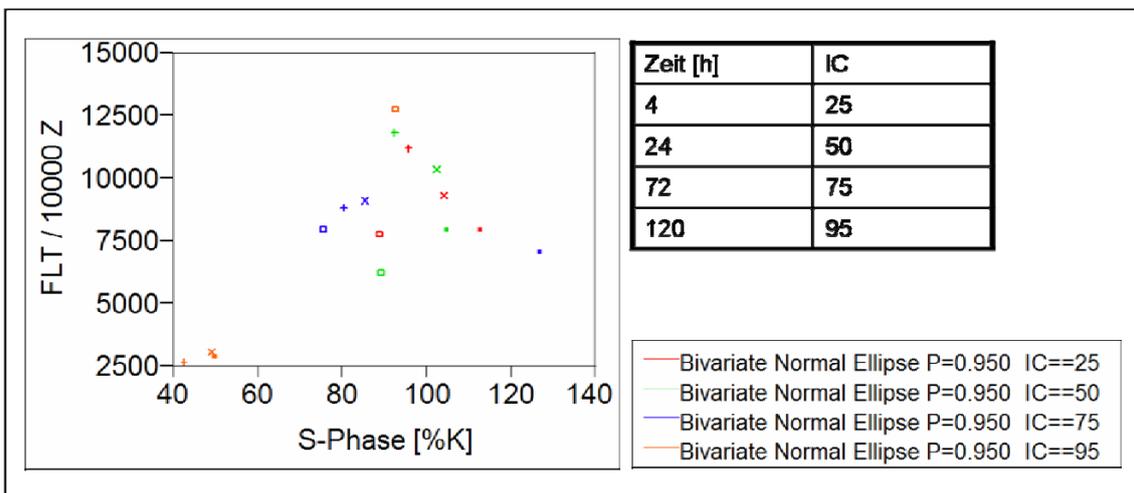


Abbildung 18: Korrelation der FLT-Aufnahme bei 10000 Zellen mit der S-Phase[%K], P= 0.95, Taxotere

#### 4.4 Ergebnisse der Tritium-Thymidin- Proliferationstests

##### 4.4.1 Statistische Auswertung:

Alle Tritium- Versuche wurden analog der FLT- Daten statistisch ausgewertet.

Bei der statistischen Auswertung der Daten handelte es sich um f-Tests aus einer Varianzanalyse (ANOVA), die mit dem JMP Programm der Version 5.0.1.2 erstellt wurden.

Dargestellt in den nachfolgenden Abbildungen werden die F-Tests der Haupteffekte IC und Zeit und der Test der Konzentrations-Zeit-Wechselwirkung in der Varianzanalyse mit außerdem noch dem zufälligen Faktor "Versuch" zur Vorhersage der relativen Veränderungen im Tritium- Uptake. Die Tritium-Aufnahme wurde immer in Bezug auf die Kontrolle in % definiert, denn die Rohwerte der cpm variierten innerhalb der Versuche.

Die Zellen wurden in den Proliferationsversuchen jeweils 1h und 4h lang mit tritiummarkiertem Thymidin inkubiert. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied innerhalb der Versuche mit 1h und 4h Inkubationszeit.

Adriamycin, Pulse-Zeit [h]=1

Bivariate Fit of Werte By Zeit [h]

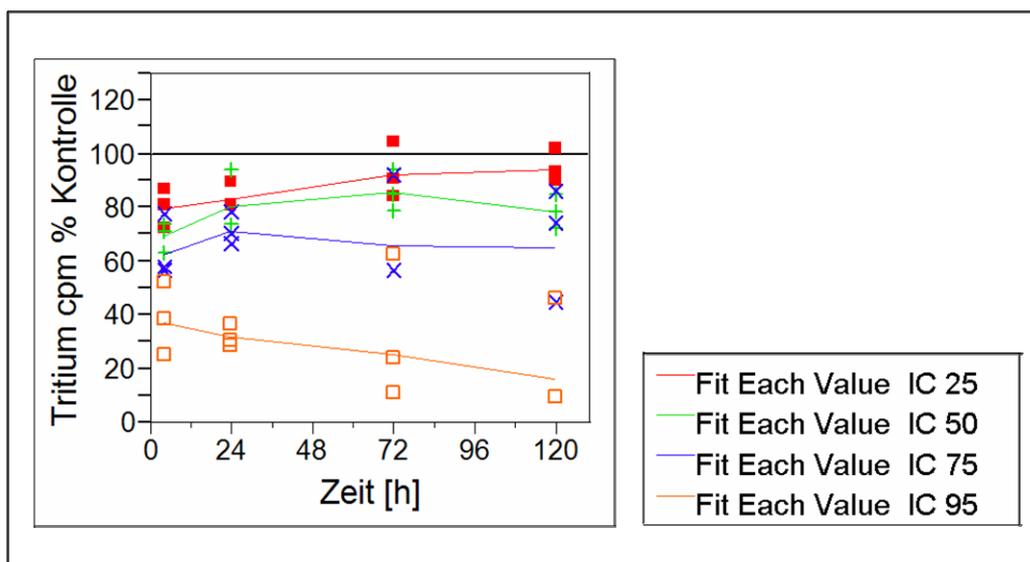


Abbildung 19: Tdr-Aufnahme [%K] unter Behandlung mit Adriamycin nach 1 Stunde Pulse-Zeit

Adriamycin, Pulse-Zeit [h]=4

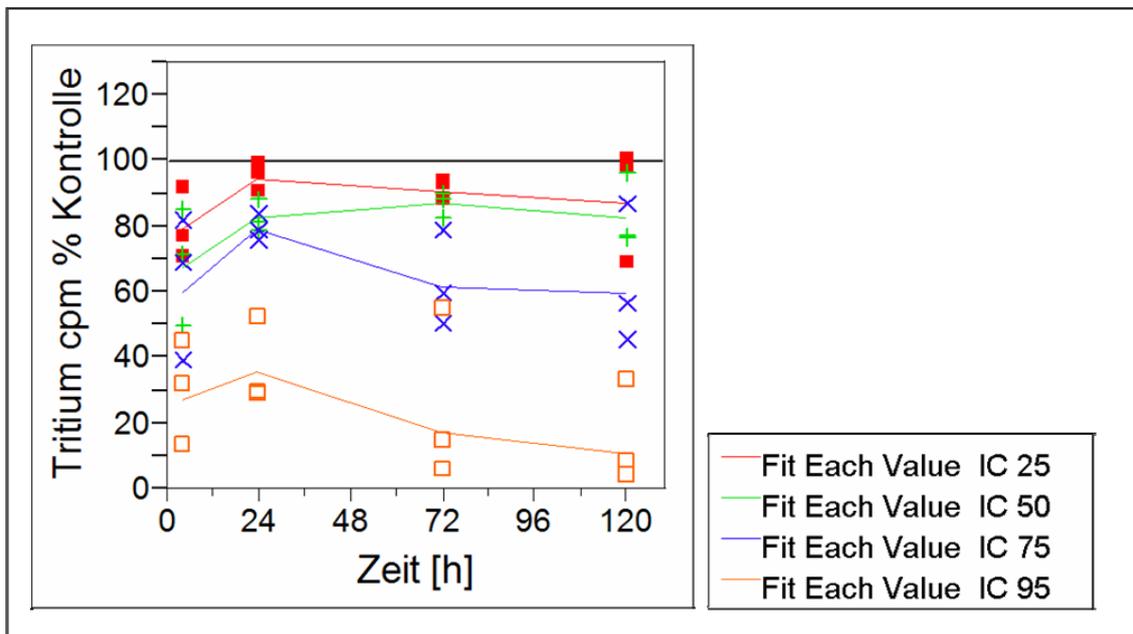


Abbildung 20: Tdr-Aufnahme [%K] unter Behandlung mit Adriamycin nach 4 Stunden Pulse-Zeit

Es gab keine systematisch mit der Zeit variierenden Tritium-Uptakes (TU). Die TU unterschieden sich je nach IC signifikant. Die Trends über die Zeit unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Konzentrationen.

Die Zellen wurden durch die verschiedenen Konzentrationen der beiden Chemotherapeutika unterschiedlich inhibiert.

Bei Adriamycin findet man eine relativ konstante Aufnahme von Tritium über der Zeit im Vergleich zu Kontrolle. Diese steigt bei IC 25, IC 50, IC 75 in den ersten Stunden nach Behandlung bis 24h an, bleibt dann konstant und fällt ab 72 h bei IC 50 wieder ab. Bei IC 75 und IC 95 bleibt sie erhalten. Bei IC95 gibt es eher eine Abnahme des Tritium- Uptakes über der Zeit. Nach 120h beträgt die Tritium-Aufnahme der IC 95 weniger als 10% der Kontrolle. Bei IC 25, IC 50, IC 75 ist dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt, jedoch erkennt man eine Abnahme des Tritium- Uptakes bis zu 60% im Vergleich zur Kontrolle.

Taxotere, Pulse-Zeit [h]=1

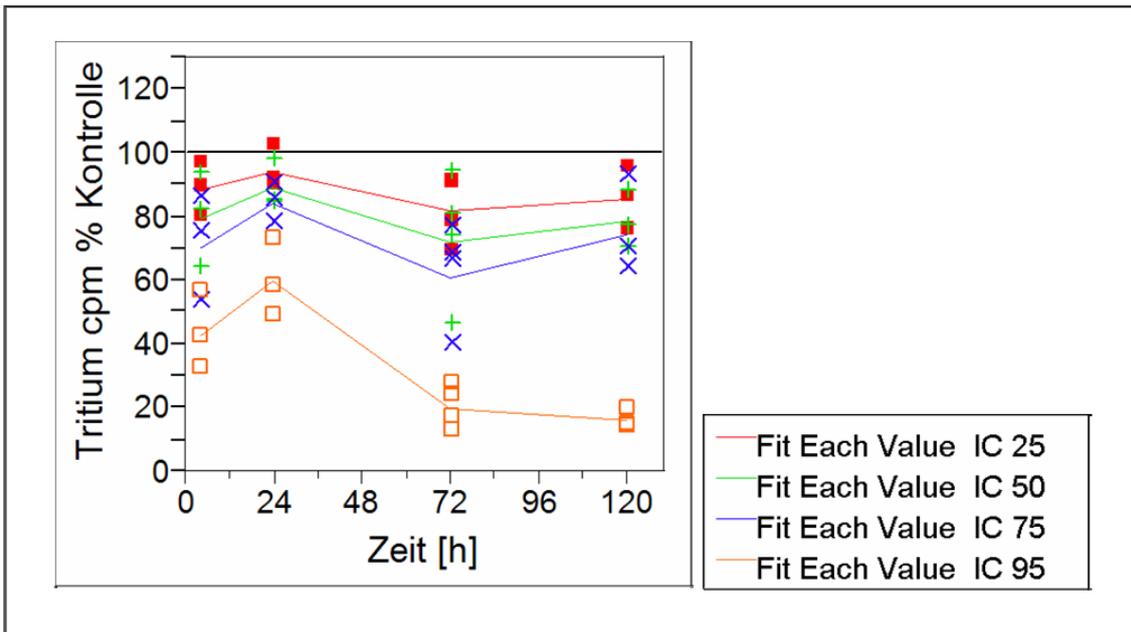


Abbildung 21: Tdr-Aufnahme[%K] unter Behandlung mit Taxotere nach 1 Stunde Pulse-Zeit

Substanz=Taxotere, Pulse-Zeit [h]=4

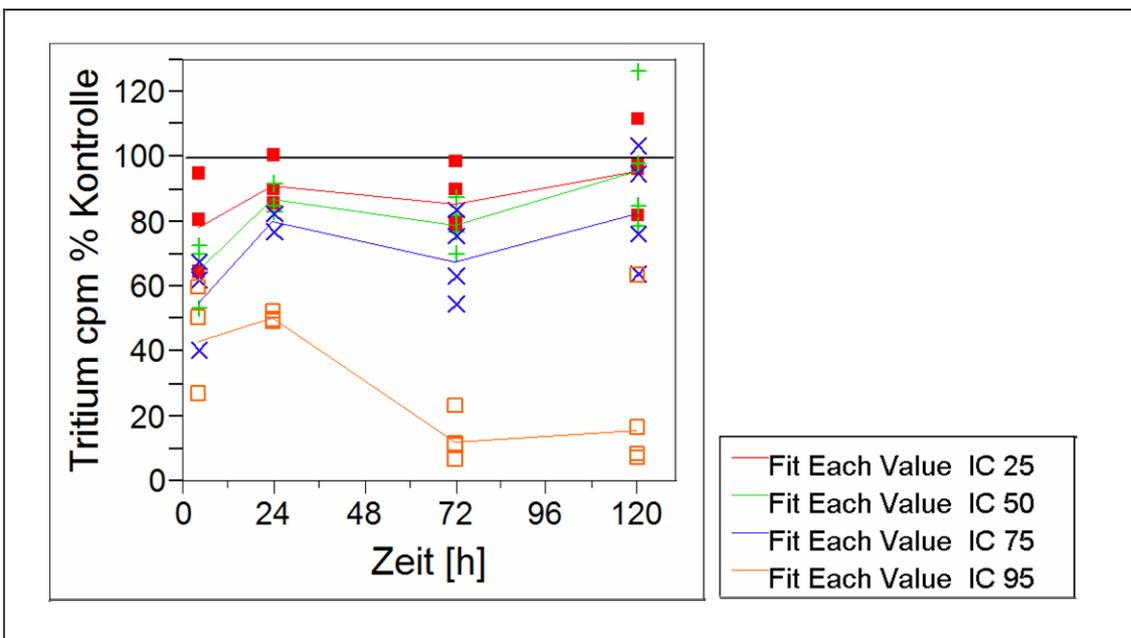


Abbildung 22: Tdr-Aufnahme[%K] unter Behandlung mit Taxotere nach 4 Stunden Pulse-Zeit

Es gab systematisch mit der Zeit variierende Tritium- Uptakes (TU) bei der Behandlung mit Taxotere und einer Pulse- Zeit von 1h. Die Tritiumuptakes unterscheiden sich je nach IC signifikant. Die Trends über die Zeit unterscheiden sich signifikant zwischen den Konzentrationen. Es gibt keine wesentlichen Unterschiede zwischen der 1h-Pulse-Zeit und der 4h-Pulse Zeit in Bezug auf die Kontrolle zu den verschiedenen Zeitpunkten unter den verschiedenen Konzentrationen. Untereinander korrelieren die Tritiumwerte von 1h-Inkubation mit denen bei 4h- Inkubation mit  $r=0.9745$ . Bei der IC 95 findet eine Abnahme des Tritium- Uptakes nach 24h statt, die bei IC 25, IC 50, IC 75 auch stattfindet jedoch in geringerem Ausmaß. Ab 72h nach Behandlung gibt es bei allen Dosierungen wieder einen prozentualen Anstieg der Tritium-Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle.

Bei der IC 75 gibt es nach 24h eine höhere Aufnahme als nach 72h und nach 120h. Diesen Effekt sieht man ebenfalls bei der IC 95 nach 24h.

## **4.5 Ergebnisse der FLT-Versuche**

### **4.5.1 Statistische Auswertung der FLT- Versuche**

Bei der statistischen Auswertung der Daten handelte es sich um f-Tests aus einer Varianzanalyse (ANOVA), die mit dem JMP Programm der Version 5.0.1.2 erstellt wurden. Die FLT- Aufnahme wurde immer in Bezug auf die Kontrolle in % definiert, denn die Rohwerte der ccpm variierten innerhalb der Versuche. Die Zellzahlbestimmung wurde parallel zu den FLT- Versuchen durchgeführt. Auch hier werden alle Werte in % der Kontrolle angegeben. Der Quotient FLT- Uptake durch die Zellzahl gibt die FLT- Aufnahme in der Zelle wieder.

## FLT-Aufnahme [%K] unter Behandlung mit Adriamycin auf Zellzahl [%K] bezogen

FLT-Uptake [%K] / Zellzahl [%K] [%]

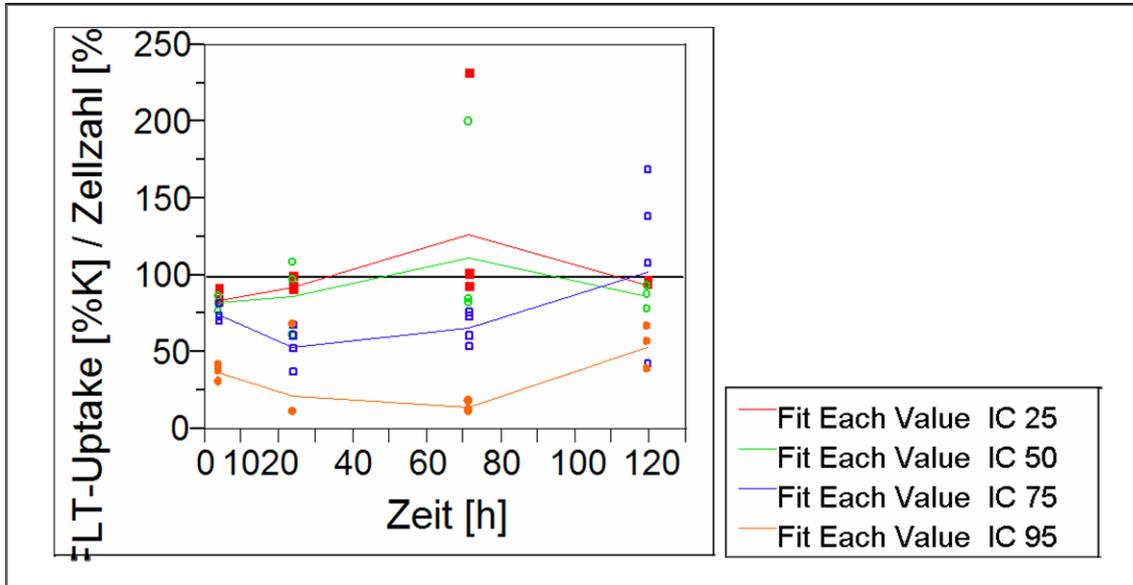


Abbildung 23: FLT-Aufnahme[%K] unter Behandlung mit Adriamycin

Die FLT- Aufnahme der MCF7-Zellen wird durch Adriamycin erniedrigt. Nach 4 h nach Behandlung beträgt sie bei IC 95 weniger als 50%. Bei der Behandlung der Zellen mit Adriamycin nimmt die FLT- Aufnahme pro Zelle bei IC 25 und IC 50 in den ersten 24 h nach Behandlung zunächst bis 72h zu, ab 72 h jedoch bei IC 25 und IC 50 wieder ab. Bei IC 75, IC 95 nimmt die FLT- Aufnahme in den ersten 24h zunächst ab, ab 72h gibt es wieder eine Zunahme der FLT- Aufnahme bei IC 75 und IC 95.

## FLT-Aufnahme [%K] unter Behandlung mit Taxotere auf Zellzahl [%K] bezogen

FLT-Uptake [%K] / Zellzahl [%K] [%]

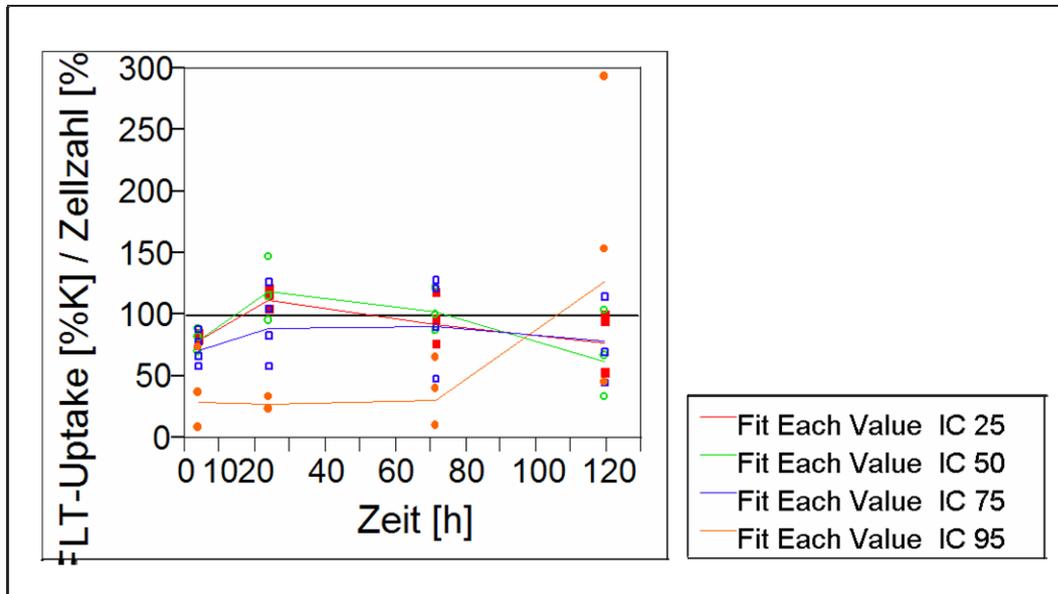


Abbildung 24: FLT-Aufnahme[%K] unter Behandlung mit Taxotere

Bei der Behandlung der Zellen mit Taxotere gibt es in den frühen Zeiten bis 24h bei IC 25, IC 50, IC 75, IC 95 erst eine Zunahme des FLT- Uptake pro Zelle danach nimmt die Aufnahme ab, unterscheidet sich aber innerhalb der Konzentrationen nicht wesentlich. Bei IC95 bleibt die Aufnahme konstant bis 72 h nach Behandlung, um danach stark zuzunehmen.

#### 4.5.2 Darstellung der [ $^{18}\text{F}$ ] FLT-Aufnahme in der Gesamtkultur und in $10^5$ Zellen in Abhängigkeit der Behandlung mit Adriamycin und Taxotere in verschiedenen Konzentrationen

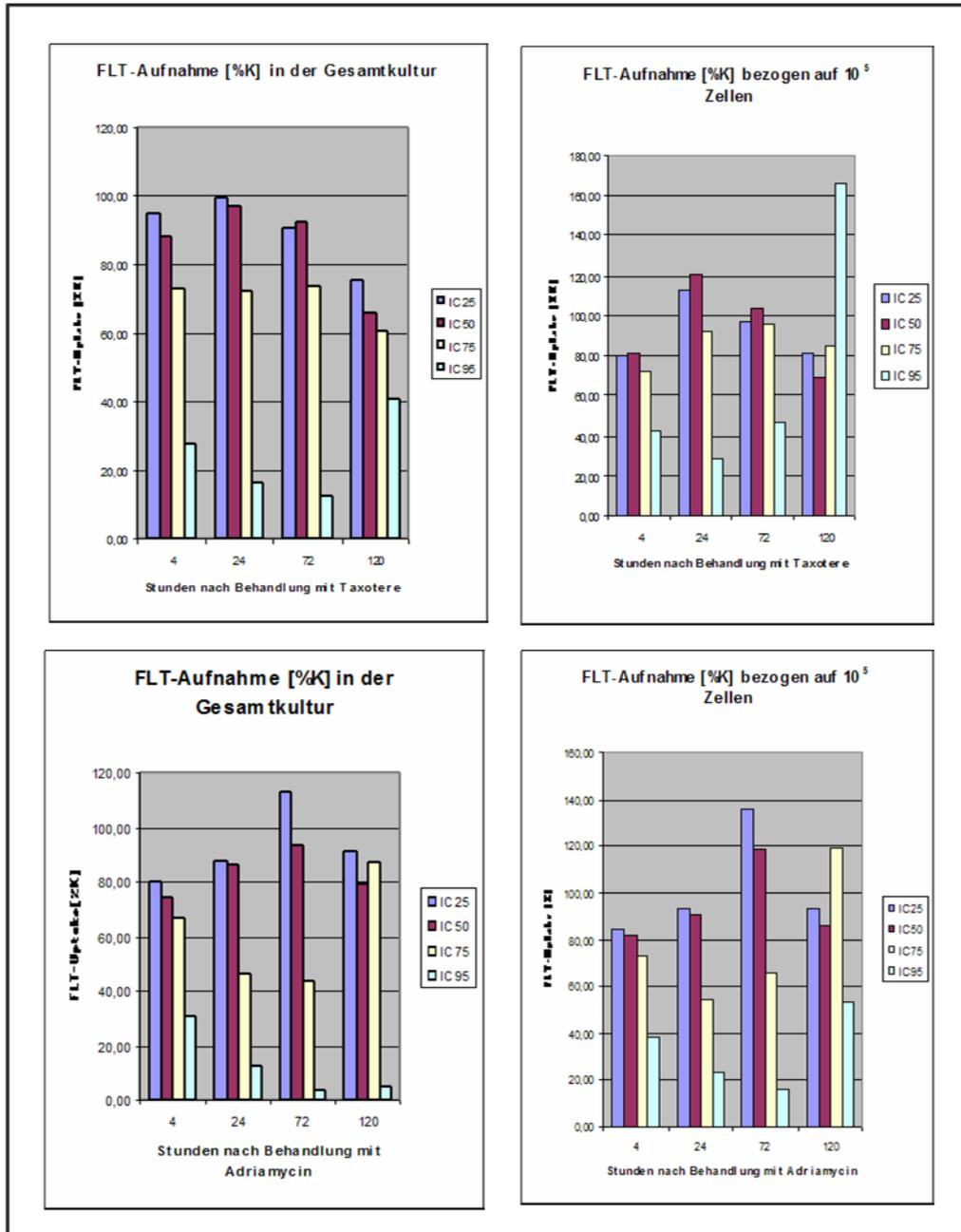


Abbildung 25: [ $^{18}\text{F}$ ] FLT-Aufnahme [%K] unter Behandlung mit Adriamycin und Taxotere bezogen auf die Zellzahl  $10^5$  und auf die Gesamtkultur

### 4.5.3 FLT-Uptake nach Chemotherapie mit Taxotere und Adriamycin

Bei der Behandlung der MCF7-Zellen mit der IC 25 betrug die FLT- Aufnahme in der Gesamtkultur in mit Taxotere behandelten Zellen nach 4h nach Behandlung 94,9 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h betrug sie 99,29% der Kontrolle. Nach 72 h betrug sie 90,7 % der Kontrolle. Erst nach 120h nach Behandlung betrug sie noch 75,1% der Kontrolle.

Nach Anpassung der FLT- Aufnahme auf die Zellzahl von  $10^5$  Zellen, betrug die FLT- Aufnahme nach 4h nach Behandlung 80%, nach 24h 113%, nach 72h 97% und nach 120h 81% im Vergleich zur Kontrolle.

Bei der Behandlung der MCF7-Zellen mit der IC 50 betrug die FLT- Aufnahme in der Gesamtkultur in mit Taxotere behandelten Zellen nach 4h nach Behandlung 88 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h betrug sie 97% der Kontrolle. Nach 72 h betrug sie 92% der Kontrolle. Nach 120h nach Behandlung betrug sie noch 66% der Kontrolle.

Nach Anpassung der FLT- Aufnahme auf die Zellzahl von  $10^5$  Zellen, betrug die FLT- Aufnahme nach 4h nach Behandlung 81%, nach 24h 121%, nach 72h 103% und nach 120h 69% im Vergleich zur Kontrolle.

Bei der Behandlung der MCF7-Zellen mit der IC 75 betrug die FLT- Aufnahme in der Gesamtkultur in mit Taxotere behandelten Zellen nach 4h nach Behandlung 73 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h betrug sie 72% der Kontrolle. Nach 72 h betrug sie 73% der Kontrolle. Nach 120h nach Behandlung betrug sie noch 61% der Kontrolle.

Nach Anpassung der FLT- Aufnahme auf die Zellzahl von  $10^5$  Zellen, betrug die FLT- Aufnahme nach 4h nach Behandlung 72%, nach 24h 92%, nach 72h 96% und nach 120h 85% im Vergleich zur Kontrolle.

Bei der Behandlung der MCF7-Zellen mit der IC 95 betrug die FLT- Aufnahme in der Gesamtkultur in mit Taxotere behandelten Zellen nach 4h nach Behandlung 27 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h betrug sie 17% der Kontrolle. Nach 72 h betrug sie 12% der Kontrolle. Nach 120h nach Behandlung betrug sie noch 41% der Kontrolle.

Nach Anpassung der FLT- Aufnahme auf die Zellzahl von  $10^5$  Zellen, betrug die FLT- Aufnahme nach 4h nach Behandlung 43%, nach 24h 29%, nach 72h 46% und nach 120h 166% im Vergleich zur Kontrolle.

### **Zusammenfassung:**

Innerhalb der verschiedenen Zeiträume gab es also keinen großen Unterschied in der FLT- Aufnahme, außer bei der höheren Dosierung mit IC 95. Hier nimmt die FLT- Aufnahme mit der Zeit ab bis 72h nach Behandlung. 120h nach Behandlung jedoch wieder zu. Innerhalb der Dosierungen gibt es Unterschiede in der FLT- Aufnahme.

Die Abnahme der FLT- Aufnahme war abhängig von der eingesetzten Konzentration. Je höher die Konzentration IC desto geringer ist die FLT- Aufnahme in der Gesamtkultur

### **FLT-Uptake nach Chemotherapie mit Adriamycin**

Bei der Behandlung der MCF7-Zellen mit der IC 25 betrug die FLT- Aufnahme in der Gesamtkultur in mit Adriamycin behandelten Zellen nach 4h nach Behandlung 80 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h betrug sie 88% der Kontrolle. Nach 72 h betrug sie 113 % der Kontrolle. Erst nach 120h nach Behandlung betrug sie noch 91% der Kontrolle.

Nach Anpassung der FLT- Aufnahme auf die Zellzahl von  $10^5$  Zellen, betrug die FLT- Aufnahme nach 4h nach Behandlung 85%, nach 24h 94%, nach 72h 136% und nach 120h 94% im Vergleich zur Kontrolle.

Bei der Behandlung der MCF7-Zellen mit der IC 50 betrug die FLT- Aufnahme in der Gesamtkultur in mit Adriamycin behandelten Zellen nach 4h nach Behandlung 75 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h betrug sie 86% der Kontrolle. Nach 72 h betrug sie 93% der Kontrolle. Nach 120h nach Behandlung betrug sie noch 79% der Kontrolle.

Nach Anpassung der FLT- Aufnahme auf die Zellzahl von  $10^5$  Zellen, betrug die FLT- Aufnahme nach 4h nach Behandlung 82%, nach 24h 91%, nach 72h 119% und nach 120h 86% im Vergleich zur Kontrolle.

Bei der Behandlung der MCF7-Zellen mit der IC 75 betrug die FLT- Aufnahme in der Gesamtkultur in mit Adriamycin behandelten Zellen nach 4h nach Behandlung 67 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h betrug sie 46% der Kontrolle. Nach 72 h betrug sie 43% der Kontrolle. Nach 120h nach Behandlung betrug sie noch 87% der Kontrolle.

Nach Anpassung der FLT- Aufnahme auf die Zellzahl von  $10^5$  Zellen, betrug die FLT- Aufnahme nach 4h nach Behandlung 73%, nach 24h 55%, nach 72h 66% und nach 120h 120% im Vergleich zur Kontrolle.

Bei der Behandlung der MCF7-Zellen mit der IC 95 betrug die FLT- Aufnahme in der Gesamtkultur in mit Adriamycin behandelten Zellen nach 4h nach Behandlung 31 % im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h betrug sie 12% der Kontrolle. Nach 72 h betrug sie 4% der Kontrolle. Nach 120h nach Behandlung betrug sie noch 5% der Kontrolle.

Nach Anpassung der FLT- Aufnahme auf die Zellzahl von  $10^5$  Zellen, betrug die FLT- Aufnahme nach 4h nach Behandlung 38%, nach 24h 24%, nach 72h 16% und nach 120h 58% im Vergleich zur Kontrolle.

#### **Zusammenfassend:**

Innerhalb der verschiedenen Zeiträume gibt es bei Adriamycin einen Unterschied in der FLT- Aufnahme. Sie nimmt mit der Erholungszeit nach Behandlung bis 72 h zu. Ab 120h wieder ab. Dies aber nur bei den niedrigen Dosierungen IC 25 und IC 50. Bei den höheren Dosierungen nimmt der FLT- Uptake mit der Zeit nach Behandlung stetig ab. Hier verhält sich Adriamycin wie Taxotere. Je höher die Konzentration desto niedriger ist die FLT- Aufnahme nach der Erholungszeit.

Innerhalb der Dosierungen gibt es ebenfalls Unterschiede in der FLT- Aufnahme. Die Abnahme der FLT- Aufnahme ist auch hier abhängig von der eingesetzten Konzentration. Je höher die Konzentration IC desto geringer ist die FLT- Aufnahme in der Gesamtkultur. Damit ähneln sich Taxotere und Adriamycin im Hinblick auf die FLT- Aufnahme und die Dosierung.

#### 4.6 Korrelation der FLT-Aufnahme mit der Tritium-Thymidin-Aufnahme (Tdr-Einbau)

Die FLT-Aufnahme in % der Kontrolle wurde mit der Tritium-Aufnahme (Tdr-Einbau) in % der Kontrolle verglichen. Die Korrelation der beiden Tests war  $r=0.91$ . Nach Bland & Altman (Lancet 1986) ergab sich eine Übereinstimmung bis auf eine mittlere intraindividuelle Differenz von 5% (rote Linie) mit Standardabweichung 14%. Die grauen gestrichelten Linien zeigen das Referenzintervall an, in dem 95% der Versuche liegen, die roten gestrichelten Linien das 95%-Konfidenzintervall für die mittlere Differenz. Beide enthalten die Null.

##### 4.6.1 Streudiagramme mit Polygonzügen- durch die geometrischen Mittel der Werte zu den verschiedenen Konzentrationen über die Zeit

Difference: Tritium cpm % Kontrolle 1h-FLT ccpm % Kontrolle

Mean: ( FLT ccpm % Kontrolle + Tritium cpm % Kontrolle 1h)/2

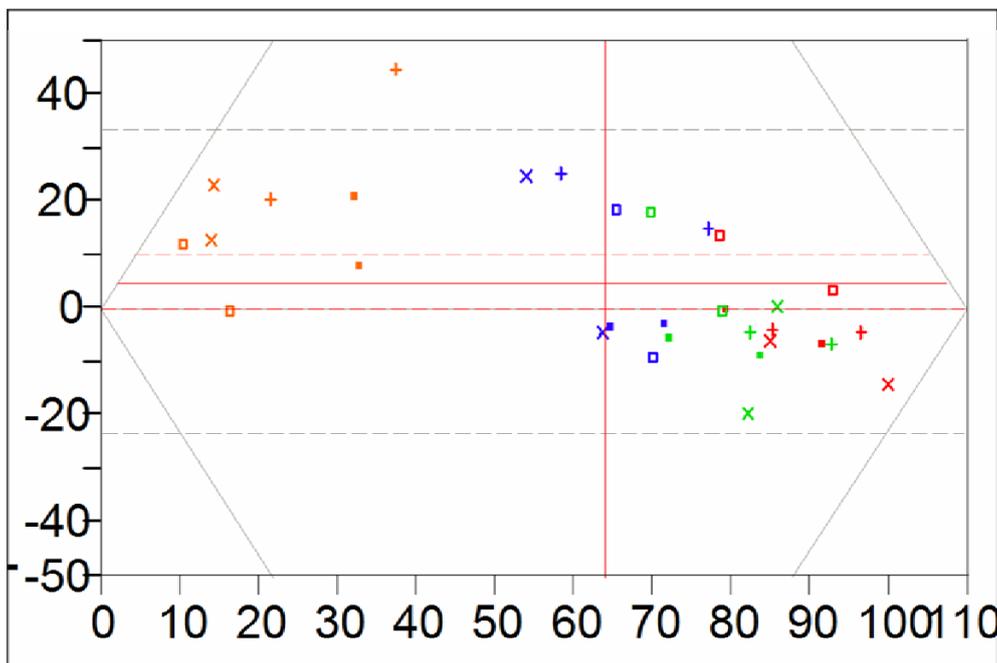


Abbildung 26: Streudiagramm über die Korrelation von FLT und Tdr bei mit Adriamycin und Taxotere behandelten MCF-7 Zellen zu verschiedenen Konzentrationen. - Übereinstimmung nach Bland & Altman (Lancet 1986)

Tritium cpm % Kontrolle 1h	66.8159	t-Ratio	1.993417
FLT ccpm % Kontrolle	61.8026	DF	31
Mean Difference	5.01329	Prob >  t	0.0551
Std Error	2.51492	Prob > t	0.0275
Upper95%	10.1425	Prob < t	0.9725
Lower95%	-0.1159		
N	32		
Correlation	0.91147		

Tabelle 4. Korrelation der FLT-Aufnahme mit dem Tdr-Einbau nach Bland-Altman,  $r=0,91$

Multivariate Korrelationen von geeignet transformierten cpm

	Ln ccpm 1	ln cpm 1	ln cpm 4
Ln ccpm 1	1.0000	0.8965	0.8998
Ln cpm 1	0.8965	1.0000	0.9745
Ln cpm 4	0.8998	0.9745	1.0000

Tabelle 5: Logarithmierte Korrelation der Ergebnisse des Streudiagramms

Die logarithmierte Korrelation von FLT (ccpm) bei 1h Inkubation und Tritium (cpm) bei 1h Inkubation beträgt 0.8965. Die Korrelation von FLT bei 1h Inkubation und Tritium bei 4h Inkubation beträgt 0.8998. Es gibt demnach keinen großen Unterschied zwischen der Korrelation von FLT und Tritium in den Inkubationszeiten von 1h und 4h. Untereinander korrelieren die Tritiumwerte von 1h-Inkubation mit denen bei 4h-Inkubation mit 0.9745.

#### 4.6.2 Diagramm der Korrelation des Tdr-Einbaus und der FLT-Aufnahme

##### Bivariate Fit of Tritium cpm % Kontrolle 1h By FLT ccpm % Kontrolle

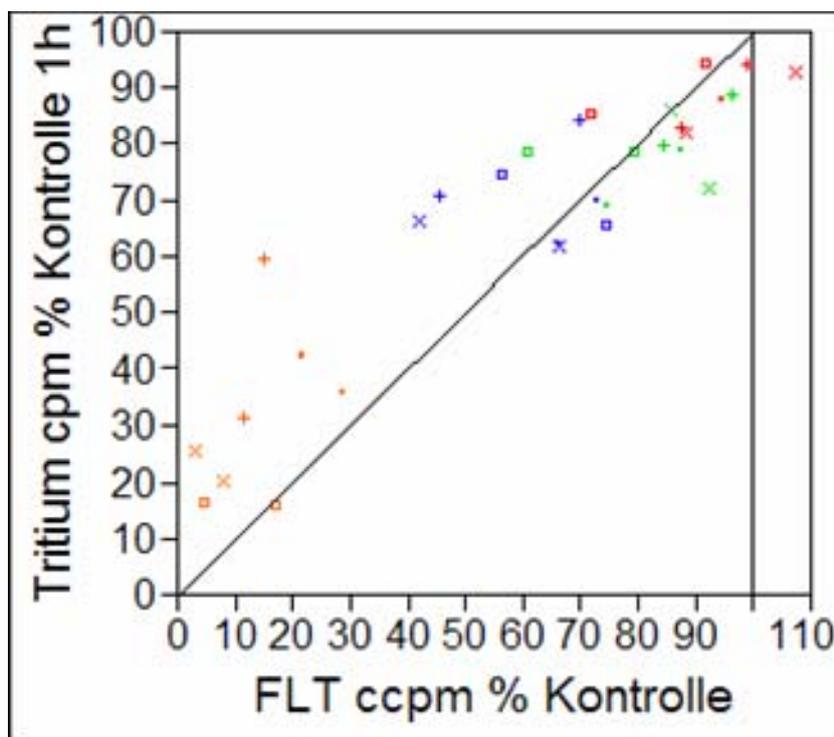


Abbildung 27: Korrelation der FLT-Aufnahme und des Tdr- Einbaus bei mit Adriamycin und Taxotere behandelten MCF-7 Zellen zu verschiedenen Konzentrationen, 1h Pulse-Zeit

#### 4.6.3 Graphische elliptische Darstellung der Korrelation der FLT-Aufnahme und des Tdr-Einbaus

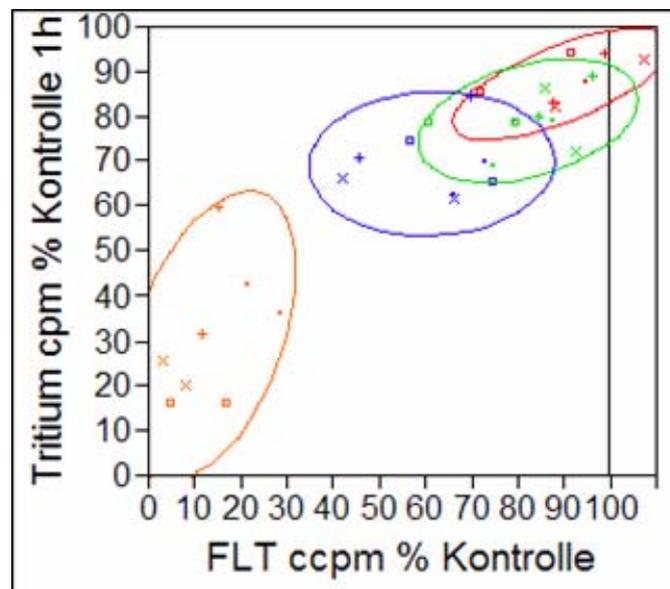


Abbildung 28: Korrelation FLT und Tdr bei mit Adriamycin und Taxotere behandelten MCF-7 Zellen zu verschiedenen Konzentrationen, 1h Pulse-Zeit

#### 4.6.4 Streudiagramm mit 90%-Höhenlinien der bivariaten Normalverteilungen

Tritium cpm % Kontrolle 1h By FLT ccpm % Kontrolle

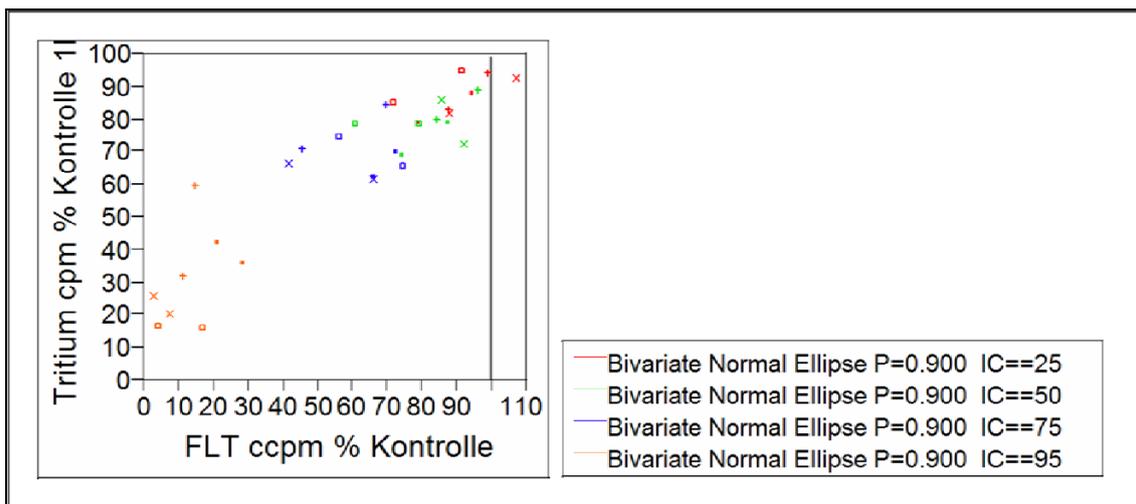


Abbildung 29: Streudiagramm der Korrelation der FLT-Aufnahme und des Tdr-Einbaus bei mit Adriamycin und Taxotere behandelten MCF-7 Zellen zu verschiedenen Konzentrationen.

### 4.6.5 Darstellung des FLT-Uptakes und der Tritium-Thymidin-Aufnahme bei Taxotere und Adriamycin bei den verschiedenen Konzentrationen

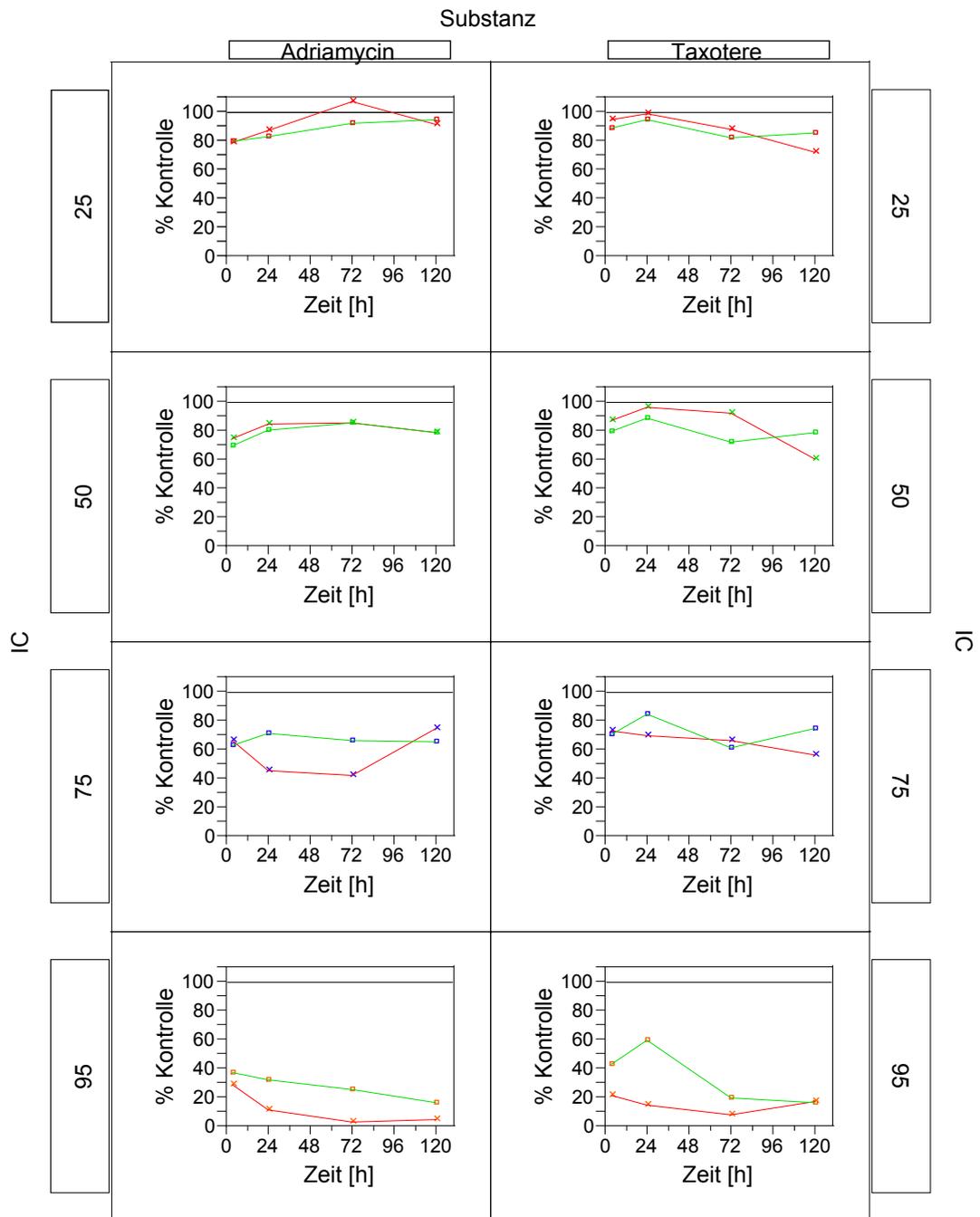


Abbildung 30: Streudiagramme mit Polygonzügen- durch die geometrischen Mittel der Werte von FLT (rot) und Tdr (grün) zu den verschiedenen Konzentrationen über die Zeit

#### **4.6.6 Effekte von Adriamycin auf die FLT- und Tritium-Thymidin-Aufnahme der MCF7-Zellen bei den unterschiedlichen IC über der Zeit**

In den oben abgebildeten Streudiagrammen sind Polygonzüge durch die geometrischen Mittel dargestellt.

Bei IC 25 ergibt sich bei den nach 4h nach 24stündiger Chemobehandlung mit FLT- inkubierten Zellen (rote Linie) für Adriamycin eine FLT-Aufnahme um 80% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die nach 24h nach Chemobehandlung leicht ansteigt. Bei 72h nach Chemobehandlung ergibt sich eine höhere FLT-Aufnahme als in der Kontrolle. Nach 120h erhalten wir eine geringere FLT-Aufnahme als nach 72h nach Chemobehandlung, jedoch immer noch mehr FLT-Aufnahme als nach 24h.

Bei IC 25 ergibt sich bei den 4h nach 24stündiger Chemobehandlung mit Tritium- Thymidin gelabelten Zellen (grüne Linie) eine ähnliche Verteilung wie beim FLT. Nach 4h erhalten wir eine Tritium-Aufnahme, die analog FLT 80% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beträgt. Die Tritium-Aufnahme nimmt nach 24h leicht zu, bleibt aber immer unter der Kontrolle. Nach 72h nimmt die Tritium-Aufnahme weiter zu und beträgt bei den Zellen, die nach 120 h mit Tritium inkubiert wurden 90% der Aufnahme im Vergleich zu Kontrolle.

Bei IC 50 ergibt sich bei den nach 4 h nach 24stündiger Chemobehandlung mit FLT- inkubierten Zellen für Adriamycin eine FLT-Aufnahme von weniger als 80% im Vergleich zur Kontrolle. Die FLT-Aufnahme steigt bei den Zellen, die 24h nach Behandlung mit der Chemotherapie wurden, auf über 80% im Vergleich zu Kontrolle an.

Beim Tritium ergeben sich bei der gleichen Konzentration ähnliche Verläufe. Zunächst gibt es 4h nach Behandlung eine geringere Aufnahme als die Kontrolle. Sie beträgt weniger als 80% analog FLT. Sie steigt dann bei 24h bis zu 80% der unbehandelten Kontrolle an. Ab 24h gibt es keine Veränderung der Aufnahme innerhalb der Zeiten.

Bei IC 75 erkennt man nach 4h nach Behandlung eine geringere FLT- Aufnahme als die Kontrolle. Sie liegt bei über 60% im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h sinkt die FLT- Aufnahme auf unter 50% ab. Nach 72h bleibt die FLT- Aufnahme ebenfalls unter 50% im Vergleich zur FLT- Aufnahme der Kontrolle. Nach 120h nach 24stündiger Chemobehandlung steigt die FLT- Aufnahme wieder auf 70% an im Vergleich zur Aufnahme der Kontrolle.

Die Tritium-Thymidin-Aufnahme bei der inhibitorischen Konzentration IC 75 verhält sich unterschiedlich der FLT- Aufnahme bei derselben Konzentration. Hier sehen wir keine deutlichen Unterschiede in der Tritium-Aufnahme über die verschiedenen Zeitpunkte hinweg. Die prozentuale Tritium-Thymidin-Aufnahme bleibt stets unter Kontrolle, bei 4h nach Chemobehandlung beträgt sie etwas mehr als 60% im Vergleich zur Kontrolle und bleibt über die Zeit hinweg konstant.

Bei der starken inhibitorischen Konzentration IC 95 erhalten wir 4h nach 24stündiger Behandlung mit Adriamycin eine FLT- Aufnahme von 30% im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h nimmt die FLT- Aufnahme weiter ab, sie beträgt nur noch 10% der FLT- Aufnahme der Kontrolle. Nach 72h liegt sie deutlich unter 10%. Nach 120h liegt sie ähnlich dem Wert bei 72h unter 10%

Bei der Tritium-Aufnahme erhalten wir bei IC 95 eine 40% Tritium-Aufnahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Tritium-Aufnahme nimmt zu den anderen Zeitpunkten kontinuierlich ab und erreicht nach 120h weniger als 20% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Damit erhalten wir für beide Parameter, FLT und Tritium bei der IC 95 ähnliche Verläufe.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich über die verschiedenen Konzentrationen hinweg ein Trend bei Adriamycin feststellen lässt: je höher die Konzentration, desto niedriger ist die FLT bzw. Tritium-Aufnahme und desto signifikanter unterscheidet es sich von der Kontrolle. Über die Zeit gesehen lässt sich dieser Trend nicht eindeutig bestätigen. Bei IC 95 und bei IC 50 haben wir den Effekt, dass je mehr Zeit nach Chemobehandlung verstreicht, desto

weniger FLT bzw. Tritium wird aufgenommen von den Zellen. Dieser Effekt ist besonders bei IC 95 vor allem beim FLT ausgeprägt. Bei den anderen Konzentrationen sieht man diesen Effekt nicht so deutlich. Bei der IC 75 scheint es einen Trend in diese Richtung zu geben bis 72h nach Chemobehandlung, danach ist eher eine höhere Aufnahme von FLT beobachtet worden.

#### **4.6.7 Effekte von Taxotere auf die FLT-und Tritium-Thymidin- Aufnahme der MCF7-Zellen bei den unterschiedlichen IC über der Zeit**

Die Effekte von Taxotere auf die Aufnahme von FLT-bzw. Tritium sind ebenfalls in den oben abgebildeten Streudiagrammen mittels Polygonzügen durch die geometrischen Mittel dargestellt.

Bei IC 25 ergibt sich bei den nach 4h nach 24stündiger Chemobehandlung mit FLT- inkubierten Zellen (rote Linie) für Taxotere eine FLT- Aufnahme um mehr als 90% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, die nach 24h nach Chemobehandlung leicht ansteigt. Bei 72h nach Chemobehandlung ergibt sich eine niedrigere FLT- Aufnahme als in der Kontrolle im Unterschied zu Adriamycin, wo man nach der gleichen Zeit eine Zunahme feststellte. Nach 120h erhält man eine geringere FLT- Aufnahme als nach 72h nach Chemobehandlung, sie liegt bei 80% im Vergleich zur Kontrolle. Es wird dieses Mal weniger FLT aufgenommen als bei 24h. Diesen Effekt hatte man bei Adriamycin nicht. Prozentual sah man bei Adriamycin eine höhere FLT- Aufnahme nach 120h als nach 24h.

Bei IC 25 ergibt sich bei den 4h nach 24stündiger Chemobehandlung mit Tritium- Thymidin gelabelten Zellen (grüne Linie) eine ähnliche Verteilung wie beim FLT. Nach 4h erhält man eine Tritium-Aufnahme von fast 90%, etwas weniger als die FLT- Aufnahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Tritium-Aufnahme nimmt nach 24h leicht zu, analog der FLT- Aufnahme, bleibt aber immer unter der Kontrolle. Nach 72h nimmt die Tritium-Aufnahme ab auf 80% und beträgt bei den Zellen, die nach 120 h mit Tritium inkubiert wurden ebenfalls 80% der Aufnahme im Vergleich zu Kontrolle.

Bei IC 50 ergibt sich bei den nach 4 h nach 24stündiger Chemobehandlung mit FLT- inkubierten Zellen für Taxotere eine FLT- Aufnahme von 80% im Vergleich zur Kontrolle. Die FLT- Aufnahme steigt bei den Zellen, die 24h nach Behandlung mit der Chemotherapie mit FLT inkubiert wurden, auf über 90% im Vergleich zu Kontrolle an. Diesen Effekt sah man ebenfalls bei Adriamycin. Nach 72h nach Chemobehandlung bleibt die FLT- Aufnahme relativ konstant im Vergleich zu der nach 24h um dann nach 120h wieder auf 60% zu sinken.

Beim Tritium ergeben sich bei der gleichen Konzentration ähnliche Verläufe bei 4h, 24h und 72h. Zunächst gibt es 4h nach Behandlung eine geringere Aufnahme als die Kontrolle. Sie beträgt 80% im Vergleich zur Kontrolle. Sie steigt dann bei 24h auf bis zu 90% der unbehandelten Kontrolle an. Bei 72h hat die Aufnahme von Tritium auf 70% der Kontrolle abgenommen und steigt geringfügig bei 120h wieder an.

Bei IC 75 erkennt man nach 4h nach Behandlung eine geringere FLT- Aufnahme als die Kontrolle. Sie liegt bei über 70% im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h bleibt die FLT- Aufnahme immer noch bei 70% der Kontrolle. Nach 72h hat sich immer noch nicht viel verändert. Die FLT- Aufnahme beträgt auch hier 70%. Nach 120h nach 24stündiger Chemobehandlung sinkt die FLT- Aufnahme leicht auf 60% der Kontrolle ab.

Die Tritium- Thymidin- Aufnahme bei der inhibitorischen Konzentration IC 75 verhält sich unterschiedlich der FLT- Aufnahme bei derselben Konzentration. Hier sehen wir Unterschiede in der Tritium-Aufnahme über die verschiedenen Zeitpunkte hinweg. Die prozentuale Tritium-Thymidin-Aufnahme bleibt stets unter Kontrolle, bei 4h nach Chemobehandlung beträgt sie etwas mehr als 70% im Vergleich zur Kontrolle. Den Trend nach 24h wieder anzusteigen erhält man hier ebenfalls. Nach 72 h ist die Tritium-Aufnahme wieder unter 70%.

Bei der starken inhibitorischen Konzentration IC 95 erhalten wir 4h nach 24stündiger Behandlung mit Taxotere eine FLT- Aufnahme von nur 20% im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24h nimmt die FLT- Aufnahme weiter ab, sie be-

trägt 15% der FLT- Aufnahme der Kontrolle. Nach 72h liegt sie deutlich unter 10%. Nach 120h steigt sie wieder an.

Bei der Tritium-Aufnahme erhalten wir bei IC 95 eine 40% Tritium-Aufnahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Diesen Effekt sah man auch bei Adriamycin. Die Tritium-Aufnahme nimmt hier jedoch zu den anderen Zeitpunkten nicht kontinuierlich ab wie bei Adriamycin, sondern steigt zunächst bei 24h auf 60% an und nach 72h beträgt sie nur noch 20% der Kontrolle. Nach 120h ändert sich daran nicht wesentlich etwas. Die Tritium-Aufnahme bleibt bei 20% der unbehandelten Kontrolle.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich über die verschiedenen Konzentrationen hinweg ein Trend bei Taxotere feststellen lässt: je höher die Konzentration, desto niedriger ist die FLT bzw. Tritium-Aufnahme und desto signifikanter unterscheidet es sich von der Kontrolle. Über die Zeit gesehen lässt sich dieser Trend nicht eindeutig bestätigen.

Bei IC 95 und bei IC 75 haben wir hier den Effekt, dass je mehr Zeit nach Chemotherapie verstreicht, desto weniger FLT bzw. Tritium wird aufgenommen von den Zellen. Dieser Effekt ist bei IC 95 sowohl beim Tritium als auch beim FLT ausgeprägt. Bei den anderen Konzentrationen sieht man diesen Effekt nicht so deutlich. Bei der IC 25 und IC 50 sieht man diesen Trend ebenfalls. Zunächst gibt es einen Anstieg der FLT- bzw. Tritium-Aufnahme, danach einen Abfall der Aufnahme je länger die Zellen wachsen nach der Chemotherapie.

#### **4.6.8 Zusammenfassung der Ergebnisse über die Änderungen der FLT-Aufnahme, des Tdr-Einbaus und der S-Phase-Fraktion nach Behandlung**

4h nach Behandlung mit Adriamycin mit IC 25-75, war der FLT-Uptake signifikant reduziert auf 20-30% wobei er deutlicher bei höheren Dosierungen zu sehen war (Abbildung 3-6 Bildchen). Bei IC 95, war die Akkumulation von FLT auf ungefähr ein Drittel der unbehandelten Kontrollgruppe reduziert. Wenn man die unbeeinträchtigten Zellzählungen zu diesem Zeitpunkt (siehe Abbildung 2- Zellzahlen) beachtet, ist der reduzierte FLT- Uptake nicht der reduzierten Zellularität zuzuschreiben, sondern der verringerten Aufnahme pro Tumorzelle. Mit längerer Zeitspanne nach Behandlung reduzierte sich die FLT-Aufnahme weiter bei hoher Adriamycindosis (IC 75- IC 95) mit einer leichten Erholung 5 Tage nach IC 75. Gleichermaßen wurde FLT 4 Stunden nach Behandlung um ca. 70% verringert. Die mit IC 95 Taxotere behandelten Zellkulturen zeigten eine starke Reduktion der FLT-Aufnahme, die sich ähnlich der FLT-Aufnahme bei Adriamycin darstellte. Im Gegensatz zu Adriamycin, kann diese Reduktion teilweise dem akuten Zelltod zugeschrieben werden, da die Zellzählungen signifikant reduziert wurden nach IC 95 Taxotere (Abbildung Zellzahlen). Niedrigere Dosierungen von Taxotere resultierten in einer leicht reduzierteren FLT- Akkumulation, die weniger deutlich war, verglichen mit der FLT-Aufnahme, die man bei Adriamycin bei denselben Konzentrationen beobachten konnte. Ähnlich zu FLT, war der Einbau von Tdr bei Behandlung mit beiden Substanzen ebenfalls in einer dosisabhängigen Weise reduziert. Im direkten Vergleich jedoch, war der Einbau von Tdr nicht so stark reduziert wie der FLT-Uptake. Wie durch die enge multivariate Korrelation (siehe Bland- Altman Difference plot; Abbildung 4) dargestellt, sind beide Tests sehr streng miteinander korreliert. Geringere Reduktion des Tdr- Einbaus war am deutlichsten der Fall bei hoher Dosis von Taxotere, der Abfall erreichte ungefähr die Hälfte des FLT. Dementsprechend war die FLT/ Tdr Korrelation bei den vergleichbaren Konzentrationen schwach ausgeprägt. (Abbildung 26)

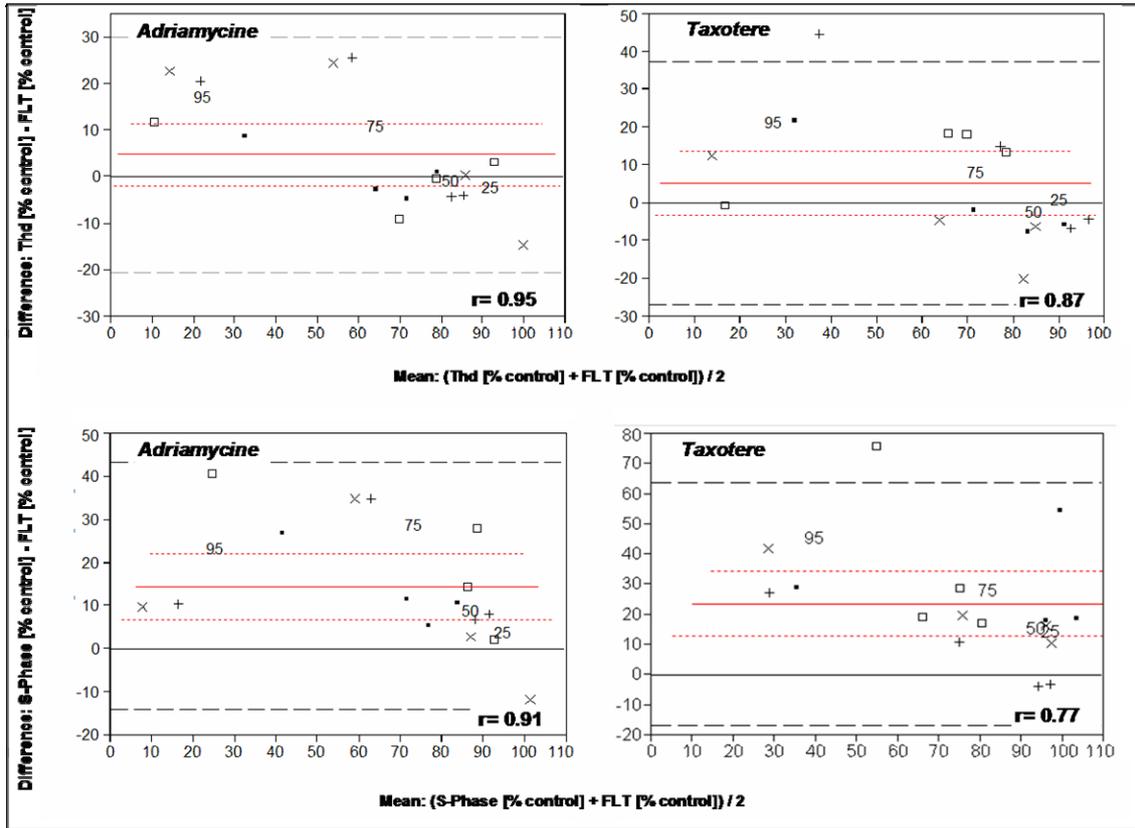


Abbildung 31: Die Übereinstimmung des FLT- Uptakes und des Tdr- Einbaus (oben) und FLT und S-Phase (unten) in mit Taxotere oder Adriamycin behandelten Mammakarzinomzelllinien.

Schlussfolgerung: Der Bland-Altman difference plot zeigt eine enge multivariante Beziehung von FLT mit beiden Proliferationsassays.

IC	Tdr		S-Phase	
	Adriamycin	Taxotere	Adriamycin	Taxotere
25	0.77	0.61	0.72	0.58
50	0.94	0.21	0.62	0.52
75	0.60	0.03	0.72	0.69
90	0.82	0.35	0.67	0.20

Tabelle 6. Korrelation des FLT-Uptake mit dem Tdr- Einbau und der S-Phase Fraktion bei mit Adriamycin und Taxotere behandelten MCF-7 Zellen zu verschiedenen Konzentrationen. Die Werte repräsentieren Korrelationskoeffizienten des ANOVA bei IC 25-95.

Vier Stunden nach Behandlung mit Adriamycin bei IC 95 war die S-Phase signifikant reduziert, jedoch nicht so deutlich wie der Tdr- Einbau oder der FLT-Uptake. Ab 24 h nach Behandlung wurden weniger Zellen während der S-Phase gezählt, die ca. 20% der Kontrolle betrug. Bei niedrigeren Konzentrationen von Adriamycin konnten nur geringe Reduktionen des BrdU labeling beobachtet werden. Im Vergleich dazu, resultierten hohe Konzentrationen von Taxotere in einer beachtlichen geringeren S-Phase- Reduktion. Eine signifikante Abnahme der S-Phase-Fraktion in Höhe von ca. 50% wurde nur bei der höchsten Dosierung verzeichnet (IC 95). Bei der Behandlung mit Adriamycin war die S-Phase eng korreliert mit den FLT- Ergebnissen. Mit Taxotere zeigte sich die Tendenz einer im Vergleich zur S-Phase-Fraktion deutlicheren Abnahme der FLT-Aufnahme, was in einer schwächeren Korrelation beider Tests resultierte. Eine signifikante Abnahme der FLT-Aufnahme konnte frühzeitig nach 4 Stunden nach Behandlung mit der höchsten Dosis detektiert werden. 4h nach Behandlung mit Adriamycin mit IC 25-75, war der FLT-Uptake signifikant reduziert auf 20-30% wobei er deutlicher bei höheren Dosierungen zu sehen war (Abbildung 3-6 Bildchen). Bei IC 95, war die Akkumulation von FLT auf ungefähr ein Drittel der unbehandelten Kontrollgruppe reduziert. Wenn man die unbeeinträchtigten Zellzählungen zu diesem Zeitpunkt (siehe Abbildung 2- Zellahlen) beachtet, ist der reduzierte FLT- Uptake nicht der reduzierten Zellularität zuzuschreiben, sondern der verringerten Aufnahme pro Tumorzelle. Mit längerer Zeitspanne nach Behandlung reduzierte sich die FLT-Aufnahme weiter bei hoher Adriamycindosis (IC 75- IC 95) mit einer leichten Erholung 5 Tage nach IC 75. Gleichermaßen wurde FLT 4 Stunden nach Behandlung um ca. 70% verringert. Die mit IC 95 Taxotere behandelten Zellkulturen zeigten eine starke Reduktion der FLT-Aufnahme, die sich ähnlich der FLT-Aufnahme bei Adriamycin darstellte. Im Gegensatz zu Adriamycin, kann diese Reduktion teilweise dem akuten Zelltod zugeschrieben werden, da die Zellzählungen signifikant reduziert wurden nach IC 95 Taxotere (Abbildung Zellzahlen). Niedrigere Dosierungen von Taxotere resultierten in einer leicht reduzierteren FLT- Akkumulation, die weniger deutlich war, verglichen mit der FLT-Aufnahme, die man bei Adriamycin bei denselben Konzentrationen beobachten konnte. Ähnlich zu FLT, war der

Einbau von Tdr bei Behandlung mit beiden Substanzen ebenfalls in einer dosisabhängigen Weise reduziert. Im direkten Vergleich jedoch, war der Einbau von Tdr nicht so stark reduziert wie der FLT-Uptake. Wie durch die enge multivariate Korrelation (siehe Bland-Altman Difference plot; Abbildung 4) dargestellt, sind beide Tests sehr streng miteinander korreliert. Geringere Reduktion des Tdr- Einbaus war am deutlichsten der Fall bei hoher Dosis von Taxotere, der Abfall erreichte ungefähr die Hälfte des FLT. Dementsprechend war die FLT/ Tdr Korrelation bei den vergleichbaren Konzentrationen schwach ausgeprägt. (Abbildung 26)

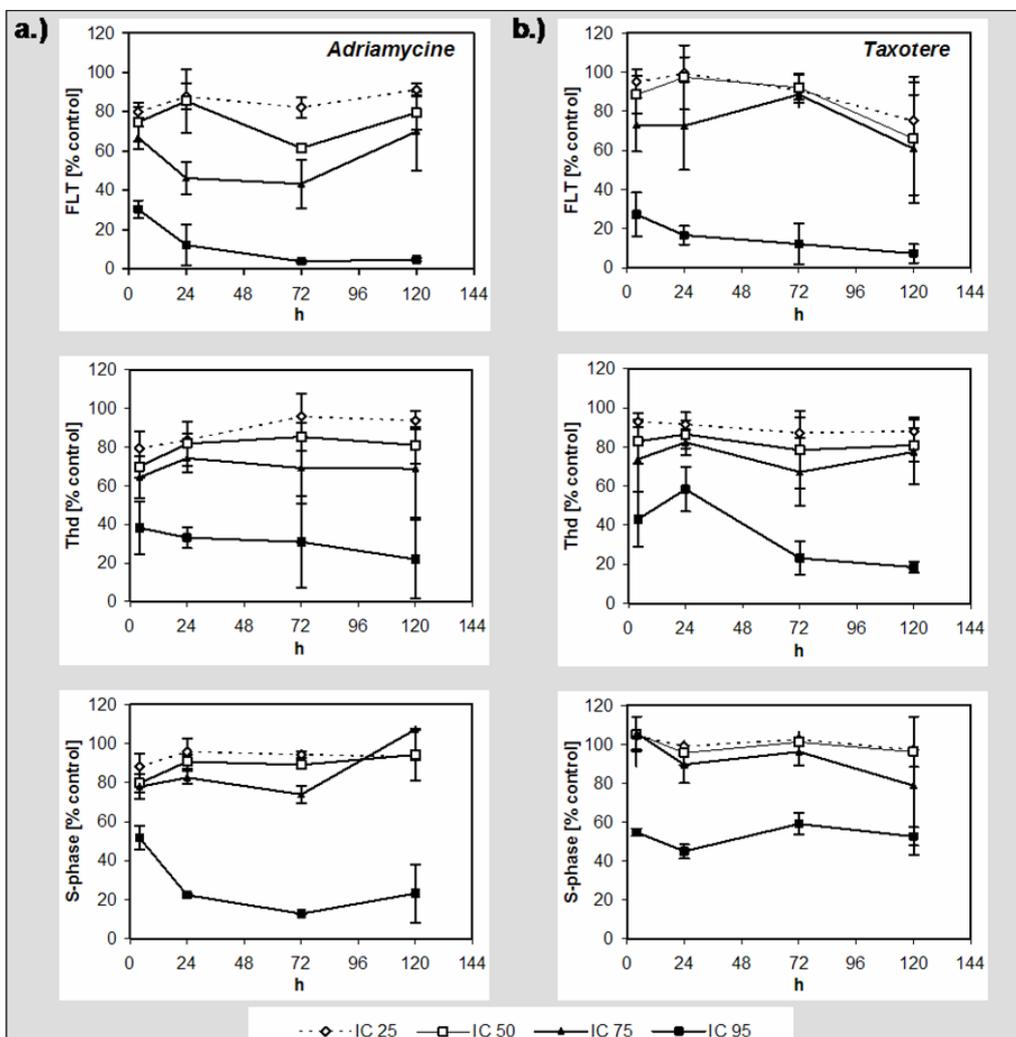


Abbildung 32. FLT-Aufnahme, Tdr- Einbau und S-Phase-Fraktion in Abhängigkeit der Behandlung entweder mit Adriamycin (a.) oder Taxotere (b.) zu verschiedenen Konzentrationen (IC 25-95). Die Daten sind als Mittelwerte wiederholter Versuche - stets auf die Kontrolle bezogen - dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

## 5 Diskussion

### 5.1 Allgemeines

Die systemische zytostatische oder endokrine Therapie gilt mittlerweile als essentieller Bestandteil der Behandlung des Mammakarzinoms und ist im metastasierten Stadium zumeist die einzige Möglichkeit, eine Remission zu erreichen. Hier stellt jedoch die Entwicklung von Resistenzen häufig ein klinisches Problem dar, welches die gezielte Wahl des geeigneten Zytostatikums aus der großen zur Verfügung stehenden Anzahl von Substanzen erschwert. Folglich gilt es, prädiktive Faktoren für das Ansprechen des einzelnen Mammakarzinoms auf zytotoxische Substanzen zu definieren.

Ein diagnostisch verwertbarer, spezifischer Unterschied der eindeutig zwischen Tumor- und Somazelle unterscheiden ließe, konnte bis heute nicht entdeckt werden. Eine Fülle von Parametern zeigen jedoch tendenzielle Unterschiede zwischen normalen und Tumorzellen und werden durch die Tumorthherapie moduliert: Hierzu gehören klassische zellbiologische Größen der Proliferation, wie Mitose-Index, Kern-Plasma-Relation, Heteroploidie aber auch viele Stoffwechselfparameter sowie diverse Genprodukte. Beim Patienten lassen sich diese Größen jedoch kaum, bzw. allenfalls invasiv aus Gewebeproben bestimmen.

Das Ansprechen auf eine Chemotherapie beim Patienten ist durch morphologische Veränderungen wie Sonographie, Röntgen, CT oder MRT messbar/darstellbar. Um die Wirksamkeit einer Therapie besser abschätzen zu können und gegebenenfalls die Therapie zu optimieren, bedarf es jedoch einer frühzeitigeren Messung/Darstellung. Stoffwechsel- und Proliferationsverhalten von Tumorzellen werden bei wirksamer Therapie rasch moduliert und könnten prädiktiv für den später auch konventionell messbaren Behandlungseffekt sein. Für die klinische Routinediagnostik stehen zur Beurteilung der Proliferationskinetik maligner Tumore bisher lediglich indirekte Methoden zur Verfügung. Diese beruhen auf aufwendigen und häufig nur wenig repräsentativen in-vitro Be-

stimmungen proliferationsassoziierter Parameter aus Tumorbiopsie- oder Resektionsmaterial, wie z. B. die Anzahl sich teilender Zellen, die Expression zellzyklusassoziierter Antigene, die quantitative Charakterisierung von Chromosomensätzen im Zellkern (DNA-Ploidie, sowie die Nukleosidinkorporation. Dazu wurde bisher am häufigsten das Bromderivat BrDU eingesetzt. Es wird als „falsches“ Nukleosid in die DNA proliferierender Zellen eingebaut und kann mittels flouorchrom-markierter, monoklonaler Antikörper immunhistologisch nachgewiesen werden (Wilson et al. 1992, Shields et al. 1987). Wesentliche limitierende Faktoren dieser in-vitro Methode stellen die beschränkte Aussagekraft einzelner Biopsieproben aus heterogenem Tumormaterial („Probengewinnungsfehler“) und die aufwendige Aufarbeitungstechnik des Probenmaterials dar.

## **5.2 Bedeutung von nuklearmedizinischen Verfahren**

Mittels nuklearmedizinischer Verfahren können Stoffwechselfvorgänge mit radioaktiv markierten Substanzen nachempfunden werden und nach dem Prinzip des so genannten Tracers von außen gemessen bzw. bildlich dargestellt werden. Anders als in der konventionellen Szintigraphie mit der Gammakamera, kann durch die Positronenemissionstomographie (PET) die Verteilung von Radiopharmakon im Körper auch quantitativ erfasst und somit die bildliche Darstellung des Tumormetabolismus möglich gemacht werden.

Eine etablierte Untersuchung beim Mammakarzinom ist die PET durch die Verwendung des Glukoseanalogon (18F)-FDG als Tracer, indem sie den Glukosestoffwechsel in vivo darstellt.

## **5.3 Nachteile des FDG-PET?**

Der Nachteil der FDG-PET ist, dass sie bei einigen Tumoren nicht tumorspezifisch ist (Liewald et al. 2000), sondern auch in entzündlichem Gewebe aufgenommen wird, und somit bis zu 20% falsch positive Befunde entstehen. Nach Higashi et al. (1999) ist die FDG-Aufnahme zwar ein exzellenter Indikator für die Anzahl lebender Tumorzellen, aber kein unmittelbarer Marker für das Wachstum von Tumorzellen. Reinhardt et. al waren die erste Arbeitsgruppe, die vor-

schlug, dass radioaktivmarkierte Pyrimidinnukleoside spezifischer als das konventionelle [18F]FDG seien, um die Tumorsprechrage unter Therapie darzustellen.

#### 5.4 Der Proliferationsmarker Thymidin

Einen direkteren Ansatz zur Proliferationsmessung stellt die Verwendung von Proliferationsmarkern dar, wie z.B. [11C]-Thymidin, welche selektiv nur in diejenigen Zellen aufgenommen und metabolisiert werden, die sich gerade in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Die Bestimmung der Zellproliferation mit radioaktiv markiertem Thymidin ist eine sehr anerkannte Methode in verschiedenen Wissenschaftszweigen. [<sup>3</sup>H] Thymidin ist seit über 40 Jahren im Gebrauch und repräsentiert immer noch den Goldstandard zur Beurteilung der Tumorzellproliferation. Seit die nicht-invasive Bestimmung dieses Parameters in klinischen Studien benötigt wird, hat man erhebliche Bemühungen in die radiopharmazeutische Forschung investiert. Diese Bemühungen führten zu einer Synthese zahlreicher Proliferationsmarker, meistens konzentriert auf Pyrimidin-Nukleoside. In den letzten Jahren wurden weitere zahlreiche Proliferationsmarker beschrieben, deren prädiktiver Wert noch nicht ausreichend validiert ist. Auch geben Kubota et al. (1992) an, dass 3H-Thymidin sensitiver in der Detektion eines frühen Rezidivs ist als FDG. Zellkinetische Parameter könnten demnach einen wichtigen Beitrag zur Erfassung der proliferativen Aktivität beim Mammakarzinoms liefern.

#### 5.5 Einführung von FLT

1998 wurde von der Arbeitsgruppe Shields et al. 3'-Deoxy-3'-[18F] Flourothymidin (18-F FLT) vorgestellt, eine Substanz, die verspricht, ein Maß für die proliferative Aktivität im Tumorgewebe darzustellen. In dieser ersten Pilotstudie mit FLT an Hunden und an einem Patienten, konnte gezeigt werden, dass die in-vivo Proliferationsmessung mit Hilfe der FLT-PET-Technologie ein vielversprechendes neues Konzept der PET-Diagnostik darstellt. Die Studie wies einen erhöhten Uptake im Tumor (SUV=6,8) und im Knochenmark (SUV=5,5); sowie in der Leber, den Nieren und der Blase auf, in denen das FLT abgebaut, bzw. ausgeschieden wird Sie fanden heraus, indem sie 11C-Thymidin-PET und

FDG-PET miteinander verglichen, dass die Veränderungen im Tumormetabolismus nach einer erfolgreichen Chemotherapie eindeutiger mit Thymidin zu erkennen sind (Shields et al. 1998b). Dies lässt sie annehmen, dass Thymidin ein sensibler Frühindikator für das Ansprechen des Tumors auf eine Therapie darstellt. Damit war (18F)-FLT als PET-Tracer und möglicher Proliferationsmarker *in vivo* entdeckt.

Unmarkiertes FLT war schon seit mehr als 10 Jahren bekannt und ist, besonders in der HIV-Behandlung, als ein antivirales Mittel untersucht worden. Bis heute wird FLT in der HIV-Therapie genutzt, da es als ein Inhibitor der DNA-Synthese dient. Das von uns benutzte markierte 18-F FLT, das schon 1991 von Wilson et al. beschrieben wurde, hat eine Halbwertszeit von 109.4 Minuten.

Der Bergungsweg der Nukleoside hängt von der hintereinander auftretenden Wirkungsweise von erleichterter passiver Diffusion und intrazellulärer Phosphorylierung ab, dem sog. „Trapping“. Diese Prozesse werden hauptsächlich über den Phosphorylierungsgrad reguliert. Nachgewiesen werden konnte, dass der Transport des FLTs in die Zellen einer biphasischen Kinetik folgt. Es gibt eine rapide initiale Anhäufung, die mit der Thymidinkinase-Aktivität korreliert, gefolgt von einer viel langsameren Anhäufungsrate, die wahrscheinlich auf einen Konkurrenzmechanismus zwischen dem Abfließen des FLT und der Phosphorylierung zurückzuführen ist. FLT überschreitet die Zellmembran sowohl durch einen carriergesteuerten Mechanismus als auch durch passive Diffusion, um dann von der im Zytosol lokalisierten Thymidinkinase TK1 phosphoryliert zu werden.

## **5.6 Weitere Arbeiten mit FLT**

Seitdem haben sich mehrere Untersuchungen diesem Thema gewidmet. Shields et al. zeigten weiterhin, dass sich gastrointestinale Tumoren mit FLT darstellen lassen. Sie untersuchten auch thorakale Tumoren und fanden heraus, dass auch diese gut mit FLT-PET dargestellt werden können. Hierzu gehörte auch das Ansprechen des Mammakarzinoms auf FLT. Der FLT-Uptake reichte von 4.4- 12.5 SUV (mean 6.3)

Dohmen et al. zeigten im Jahre 2000 weiter, dass FLT-PET bei Gehirntumoren effizient zur Darstellung von Läsionen genutzt werden kann. Dittmann et al. stellten Lungenkarzinome mit FLT-PET dar. 3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F]fluorothymidine (FLT) ist folglich ein Radiotherapeutikum, das im Tumorgewebe akkumuliert und mit PET oder PET-CT in vivo dargestellt werden kann. Das hat uns dazu bewegt, den Gebrauch von FLT für die Therapiekontrolle dieser Entität zu erforschen. Diese Arbeit analysiert die Änderungen der zellulären FLT-Aufnahme früh nach Chemotherapie beim Mammakarzinom in einem in vitro Modell. An Substanzen wurden Adriamycin und Taxotere ausgewählt, beides Substanzen, die unter den aktivsten Chemotherapeutika beim Mammakarzinom gelten. (Nabholtz et al., 2003)

### **5.7 Korrelationen von FLT mit anderen Proliferationsmarkern**

Seit FLT in der bildgebenden Diagnostik von Tumoren von Shields et al. eingeführt wurde, zeigten einige Studien von unbehandelten Patienten eine Korrelation der FLT-Aufnahme mit der Ki-67 Antigenexpression (Francis et al. 2003, Vesselle et al., Buck et al.) einem etablierten Marker der Zellproliferation, der ex vivo aus Tumorproben gemessen werden kann (Martinez-Arribas et al. ,2002).

### **5.8 Verhalten von FLT nach Therapie**

Erst kürzlich erprobten Untersucher den Gebrauch von FLT um Änderungen der Zellproliferation nach Therapie zu messen. Durch die Gruppe am Hammersmith Hospital wurden in einem Forschungsprojekt eine reduzierte FLT-Speicherung beim mit Chemotherapeutika behandelten Fibrosarkom gezeigt (Barthel et al., 2005). Anderen war es möglich eine Abnahme von FLT nach experimenteller Strahlentherapie nachzuweisen (Sugiyama et al., 2004)

Die Ergebnisse dieser aktuellen in vitro Studie lassen erkennen, dass der FLT-Uptake sehr früh nach der Chemotherapie der Brustkrebszellen abgenommen hatte.

Durch Variation der Dosierungen über einen breiten Bereich war es uns möglich zu zeigen, dass die FLT- Speicherung, abhängig vom Ausmaß der induzierten Wachstumshemmung, abnahm.

Dieses wurde in einer Untersuchung der Arbeitsgruppe Dittmann et al. bei zwei Mammakarzinompatientinnen bestätigt, beide zeigten eine intensive Aufnahme der Primärtumoren und eine kleine Lymphknotenmetastase an. Nach dem ersten Behandlungszyklus, nahm die FLT Speicherung im Fall des guten Ansprechens auf die Chemotherapie merklich ab. Im Falle des auf die Chemotherapie nicht ansprechenden Patienten verblieb der FLT-Uptake auf der Höhe des Grundniveaus. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen bei unbehandelten Brustkrebspatienten in einer weiteren Untersuchung der Arbeitsgruppe Smyczek-Gargya et al., 2004. Die Gruppe untersuchte selektiv den Gebrauch von [18F]FLT beim Mammakarzinom bei Patienten. Sie fanden eine erhöhte FLT- Speicherung bei allen malignen Mammakarzinomen verglichen mit dem umliegenden Brustgewebe. Aufgrund der sehr geringen FLT- Speicherung in Mediastinum, der Axilla und dem Weichteilgewebe erscheint FLT für die Brustkrebsbildung, das lokoregionale Staging und die Therapiekontrolle des Mammakarzinoms also besonders geeignet. Demnach lassen sich Brustkrebstumoren und die Lymphknotenmetastasen mit FLT mit hohem Kontrast in vivo darstellen.

### **5.9 Bedeutung der Thymidinkinase im Salvage-Pathway**

Die Rationale des Gebrauchs von FLT basiert auf der Tatsache, dass FLT Substrat der Thymidinkinase-1 ist, genau wie Tdr, was über einen langen Zeitraum für die Zellproliferationsmessung in vitro genutzt wurde.

Die Thymidinkinase ist ein wichtiges Schlüsselenzym im DNA-Salvage Pathway des Zellzyklus. Sie katalysiert die Phosphorylierung von exogenem und endogenem Deoxythymidin für die Salvage Synthese von dTMP. Studien von menschlichen neoplastischen und sich normal teilenden Geweben haben- mit einigen Ausnahmen- eine höhere Thymidinkinase-Aktivität in Tumoren gezeigt (Gordon et al., 1968). Die beobachtete hohe Thymidinkinase- Aktivität verband man mit

der Synthese des zytosolischen Isoenzym TK1 (Madec et al., 1988; O'Neill et al., 1992). Die Expression der zellzyklusregulierenden TK1 ist in normalen Zellen streng reguliert und nur erhöht in der späten G1 und S-Phase (Arner et al., 1995). Die Thymidinkinase-Aktivität scheint auch ein Marker für die Differenzierung zu sein. Die Aktivität der TK1 scheint in Blasten erhöht und in ausgereiften Zellen mit schlechtem Wachstum erniedrigt zu sein (Taylor et al., 1972). Sie ist sehr viel höher exprimiert in wachsenden malignen Zellen (Hengstschläger et al.). Hohe Werte der TK-1 wurden berichtet bei schnell wachsenden Zellen beschrieben, unter anderem auch beim Mammakarzinom (Sherley, Sakamoto, Romain et al. 2000). Zusätzlich wurde die TK-1 als ein unabhängiger Risikofaktor bei Mammakarzinompatientinnen identifiziert (Romain et al., 2000).

Die FLT-Speicherung der Zellen steht wie beschrieben in direktem Zusammenhang mit der Aktivität Thymidinkinase-1 (TK-1) (Kong et al, 1995), dem Schlüsselenzym des Pyrimidin-Salvage-Pathway der DNA-Synthese. Die Thymidinkinase katalysiert in Gegenwart von Adenosintriphosphat (ATP) die Phosphorylierung von Desoxythymidin zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP). dTMP wird weiter zum Triphosphat (dTTP) umgewandelt und dann in die DNA eingebaut. Die TK spielt deshalb eine wesentliche Rolle bei der Verwertung von Thymidin in der Zelle. Als Substrat nutzt die TK entweder exogenes Thymidin aus der Nahrung oder durch Abbaureaktionen freigesetztes endogenes Thymidin. Zwei TK-Isoenzyme sind in den menschlichen Zellen bekannt. Die Konzentration der TK2 ist während des gesamten Zellzyklus konstant niedrig. Das Isoenzym TK1 kommt in hoher Konzentration in proliferierenden Zellen und Tumorzellen vor, nicht jedoch in ruhenden Zellen. Mittels eines Radioimmuno-Assays wird TK1 im Serum bestimmt.

TK- Serumwerte innerhalb des Referenzbereichs sind allerdings kein Beweis für das Fehlen maligner oder viraler Erkrankungen. Da dieses Enzym nur in vitalen, DNA-Replikation aufweisenden Zellen aktiviert ist, ist die Aufnahme von FLT abhängig von der Zellproliferation.

Man fand heraus, dass FLT durch die Thymidinkinase 1 (TK1) phosphoryliert wird und in phosphorylierter Form in der Zelle verbleibt. Dieses so genannte

metabolische Trapping geschieht aufgrund der Tatsache, dass FLT kein 3'-OH Rest für die Polymerase Reaktionen der Oligonukleotidsynthese hat und das FLT-5'-triphosphat die DNA-Synthese unterbricht (Munch-Petersen et al., 1995) Hannigan et al. beschreiben eine erhöhte Aktivität der TK1 in der späten G1 und S-Phase des Zellzyklus. Im Gegensatz dazu, ist FLT kein Substrat der mitochondrialen Thymidinkinase 2. FLT wird auch nicht in die DNA eingebaut. Daher ist postuliert worden, dass FLT als ein nichtinvasiver Marker für die Zellproliferation angesehen werden kann.

### 5.10 Gebrauch von Tritium-Thymidin: $^3\text{H}$ -Thymidin Assay

Mit Thymidin steht ein weiteres für die PET nutzbares Molekül zur Verfügung, das während der S-Phase in die DNA eingebaut wird. Die Aufnahme von Thymidin in Tumore wird als Marker der Proliferation angesehen. Mit Hilfe der Autoradiographie konnten in der S-Phase mit Thymidin markierte Zellen dargestellt werden (Thymidin-Labeling- Index), dies erlaubte Aussagen über die Proliferationsaktivität eines Tumors und dessen Prognose (Costa et al., 1987) Tubiana et al. bestimmten den Labeling-Index bei Patienten mit Mammakarzinomen, wobei Patienten mit einem initial niedrigen Index weniger Rezidive und eine längere Überlebenszeit hatten.

An Monolayern eines Ovarialkarzinoms in unterschiedlichen Wachstumsphasen zeigten Higashi et al. (1993a), dass die Thymidin-Aufnahme in vitale Zellen mit der durch DNA- Flow- Cytometrie bestimmten Proliferationsrate korrelierte.

FLT zeigte auch ein ähnliches Aufnahmeverhalten in Zellen wie das  $^3\text{H}$ -Thymidin (Mier et al., 2001).  $^3\text{H}$ -Thymidin ist ein etablierter und oft genutzter Proliferationsmarker in vitro. Es wurde beobachtet, dass  $^{18}\text{F}$ -markierte Pyrimidine in chemotherapieempfindlichen Tumoren in weitaus größerem Masse aufgenommen werden als in therapieresistenten Tumoren, was für eine prätherapeutische Abschätzung von wesentlicher Bedeutung sein könnte. In einem Ratten-Tumormodell nahm die tumorale Aufnahme des Thymidinanalogs( $^{18}\text{F}$ )-Flourdesosyuridin während der Radiotherapie stark ab (Kubota et al. ,1991) Kubota et al. konnten zeigen, dass die Reduzierung der tumoralen ( $^{18}\text{F}$ )-

FdUrd-Aufnahme mittels PET schon wesentlich früher als eine morphologisch nachweisbare Abnahme des Tumolvolumens nachweisbar ist. In einer Vorläuferstudie mit dem Nukleosid FdUrd wurde eine sehr hohe Korrelation bei Mäusen mit Pankreaskarzinom zwischen der FdUrd-Aufnahme und dem Proliferationsindex nachgewiesen (Seitz et al., 2001).

In Zelllinien korrelierte die FLT- Retention mit dem  $^3\text{H}$ - Thymidin-Uptake ( $r=0.88$ , obwohl der DNA Einbau nur 0.2% betrug und mehr als 90% bei beiden Tracern war (Toyohara et al., 2002). In einigen Untersuchungen korrelierten die Thymidinkinasewerte mit der Zellproliferation.

Die Untersuchung von Buck et al. und eine kürzliche Studie von Vesselle et al. stimmen mit dieser Auffassung überein, indem sie zeigen konnten, dass die FLT-Aufnahme in Lungentumoren mit der Tumorphiliferation korrelierte (Buck et al., 2003; Vesselle et al., 2002).

Der durchschnittliche SUV standardized Uptake für FLT korrelierte eng mit der Ki-67 Immunhistochemie mit  $r=0.92$  bei Buck et al. und  $r=0.84$  bei Vesselle et al. Anders als Tdr, wird FLT nicht in die DNA eingebaut, sondern verbleibt nach Phosphorylierung in den Zellen.

Die Beziehung zwischen der FLT-Speicherung und dem Tdr Einbau wurde schon früher durch Variierung der Menge an TK1-Protein von Barthel et al, der Proliferationskinetik der Tumorzellen bei Schwartz et. al oder in der experimentellen Strahlentherapie von Rasey et al. erforscht.

In diesen Studien über unbehandelte Tumoren, fand man eine enge Korrelation zwischen FLT-Uptake und Tdr-Einbau.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit diesen Feststellungen überein, die darlegen, dass die durch die Chemotherapie hervorgerufene Reduktion des FLT-Uptake auch sehr eng mit der Reduktion des Tdr-Uptake verbunden ist.

So lässt sich ableiten, dass FLT für den klassischen  $^3\text{H}$ -Tdr- assay im vorliegenden Modell der Chemotherapie ein Tymidinanalogon darstellt.

### 5.11 Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen

In einer vorherigen Studie haben Dittmann et al. gezeigt, dass die FLT-Speicherung bei Tumorzellen die mit Antimetaboliten wie F-Floururacil und Methotrexat behandelt wurden, beachtenswert erhöht sein kann.

Es wurde geschlossen, dass die Erhöhung durch eine Induktion der TK1-Aktivität bedingt ist. Diese ist an der Wiederverwertung des Tdr beteiligt, einem Mechanismus bei dem die Tumorzellen den Block der de novo- DNA- Synthese kompensieren können, welcher durch die benutzte Gruppe von Chemotherapeutika hervorgerufen wird.

In diesem Fall, konnte FLT nicht als ein Maß für Zellproliferation betrachtet werden.

Ein solcher Effekt konnte bei Barthel et al. nicht beobachtet werden, der eine Abnahme der FLT- Speicherung nach Behandlung mit 5-FU in einer Studie an Mäusen gemessen hatte. Das Ergebnis der Arbeitsgruppe Barthel deckt sich jedoch mit den Feststellungen der vorliegenden Arbeit mit Taxotere und Adriamycin.

Interessanterweise wurde berichtet, dass die TK-1 Menge diejenigen der Kontrolle bei längerem Intervall nach Behandlung trotz niedrigerer FLT-Aufnahme überstiegen. Die Autoren interpretieren diese Ergebnisse infolge der Veränderungen der katalytischen Aktivität des TK-1 Enzyms.

Im in vivo-Modell von Barthel et al. spiegelt die Speicherung von [18 F] FLT den Tumorproliferationsgrad wider. Die Arbeitsgruppe zeigte weiterhin, dass das Monitoring der durchgeführten Antitumorthherapie mit [18F] FLT besser als mit [18 F] FDG gelingt. Der neue Marker sei somit viel versprechend für diese wichtige Indikation in der onkologischen Diagnostik.

In unserer vorliegenden Arbeit, resultierte weder die Behandlung mit Adriamycin noch mit Taxotere in einer erhöhten FLT oder Tdr Aufnahme in den Brustkrebszellen, wie von der Arbeitsgruppe Dittmann et al. beschrieben.

Dieses könnte weiterhin an den Mechanismen der Proliferationsinhibition liegen, über welche beide Agenzien ihre toxische Wirkung hervorrufen. Diese Wirkweise unterscheidet sich von der der Antimetaboliten.

Folglich ist die Ankurbelung der Pyrimidin- Wiederverwertung kein Mechanismus über den Zellen der Toxizität dieser Substanzen entgehen können. Adriamycin gehört zur Gruppe der Alkylanzien und wirkt durch Interkalation und Ver-netzung der DNA (Gewirtz et al., 1999).

Zusammen mit Daunorubicin stellt Doxorubicin (Adriamycin) eine der Hauptsäu-len im derzeitigen Arsenal der onkologischen Chemotherapie dar. Daunorubicin wurde als Fermentationsprodukt aus *Streptomyces peucetius*-Kulturen isoliert und gehört zur Gruppe der Anthrazyklinantibiotika mit antineoplastischen Ei-genschaften. Aus der Mutante *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* wurde spä-ter Doxorubicin (Adriamycin), das 14-Hydroxy-Analogon von Daunorubicin, iso-liert (Arcamone et al. 1969).

Adriamycin wirkt am stärksten bei exponentiell wachsenden Zellen, wobei die Wirkung in der S- und der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus am ausgeprägtesten ist (Pratt et al. 1994) Es ist direkt wirksam und bedarf keiner metabolischen Akti- vierung, um zytostatisch wirksam zu sein. Durch Spaltung der Glykosidbindung wird es inaktiviert. Der genaue Wirkmechanismus ist unklar. Diskutiert werden DNA-Bindungs-fähigkeit und daraus folgender Interkalation zwischen Basen-paa-ren (nichtkovalente Bindung an die DNA mit Hemmung von DNA und RNA- Polymerasen), was zu einer sterischen Behinderung der DNA- und RNA- Synthese führt. Ferner die Bildung freier Sauerstoffradikale, die direkte Mem-branwirkung und die Hemmung der Topoisomerase 2- Aktivität. Außerdem ist Doxorubicin für die Induktion von Apoptose verantwortlich (Ling et al. 1993). Die DNA-Bindung durch Interkalation spielt eine wesentliche Rolle für die Zytotoxizi-tät. Lankelma et al. untersuchten in einem in vitro-Modell die Auswirkungen von Adriamycin auf MCF 7-Zellen. Das von ihnen entworfene Modell korrelierte mit anderen Proliferationsassays. Es erlaubte den Vergleich der Effekte der Verän-derungen von Adriamycin im Konzentrations-Zeit Profil in vitro. Das Model konnte genutzt werden, um die Effekte von Doxorubicin in vivo vorherzusagen.

Taxane, zu denen das Therapeutikum Taxotere zählt, entfalten ihre Toxizität in der mitotischen Phase des Zellzyklus, indem sie den Zelltod induzieren (Demidenko et al., 1995). Taxotere verhindert den Abbau der zellulären Mikrotubuli-Komplexe in der Mitose, und versetzt Tumorzellen so in einen G2-Arrest. Es induziert die Polymerisation von Tubulin sowie dessen Einbau in Mikrotubuli, somit den Aufbau der Mikrotubuli und hemmt den Depolymerisationsvorgang. (Ringel et al., 1991). So entstehen stabile, funktionsuntüchtige Mikrotubulibündel, wodurch der Mitosevorgang unterbrochen und damit die Zellproliferation unterbunden wird. Docetaxel ist vor allem während der G2/M-Phase wirksam. (Hennequin et al., 1995). In der first-line Therapie des metastasierten Mammakarzinoms sind Ansprechraten von bis zu 60% beschrieben worden (Reichmann et al., 1991/Holmes et al., 1991/Fumoleau et al., 1996/Trudeau et al., 1996). Selbst bei Vorliegen einer Resistenz gegen Anthrazykline kann durch den Einsatz einer Monotherapie mit Taxanen noch bei 50% der Patientinnen ein Ansprechen des Tumors erreicht werden (Wilson et al., 1994/ Ravdin, 1996) Aufgrund der hohen Remissionsraten mit Docetaxel/ Doxorubicin- Kombinationen in der Behandlung des metastasierten Mammakarzinom wurden mehrere große internationale randomisierte Multicenterstudien eingeleitet, um die Wirksamkeit dieser Regime auch bei adjuvanter und neoadjuvanter Indikation zu prüfen. Die Kombination von Taxanen und Anthrazyklinen hat sich mit Remissionsraten von 68-94% in der first-line-Therapie bewährt (Gianni et al., 1995, Lück et al., 1997)

### **5.12 Bewertung der S-Phase-Fraktion als Proliferationsparameter**

Die Bedeutung der Mitoserate in der prognostischen Einschätzung von Brustkrebs ist eindeutig (Amadori et al., 1998).

Die für die Einschätzung der proliferativen Aktivität des Karzinoms herangezogenen Parameter DNA-Index und S-Phase-Anteil der Tumorzelle werden mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt (Dressler et al., 1990; Clark et al., 1989; O'Reilly et al., 1990; Stal et al., 1993; Campjohn et al., 1995; Brown et al., 1996; Dettmar et al., 1997), ferner durch den Mitose-Index (Clayton et al., 1991). Das dabei gewonnene DNS-Histogramm zeigt die verschiedenen Zellzy-

klusanteile der proliferierenden Zellen. Der S-Phase-Anteil kann direkt abgelesen werden (Nebe et al., 1996). Bromodesoxyuridin (BrdU) wird in der S-Phase des Zellzyklus als Thymidinanalogon in die DNA der Zellen eingebaut und lässt sich dort nach Denaturierung mit enzymmarkierten Antikörpern nachweisen (Gratzner et al., 1982). Als ein allgemein bekannter Parameter der Tumorgroße in verschiedenen Zelllinien gilt die S-Phase-Fraktion (Shapiro et al., 1986). In Zellkulturen steigt die Thymidinkinase-Aktivität während der S-Phase um das 10-15fache an (Sherley and Kelly et al., 1988). Die FLT- Aufnahme sollte damit mit dem Anteil der Zellen in der S-Phase korreliert sein. Weil dieses Enzym nur in Zellen aktiviert ist, die DNA-Replikation aufweisen, ist die Aufnahme von FLT abhängig von der Zellproliferation. In Zellkulturen korrelierte die FLT-Aufnahme mit der Aktivität der Thymidinkinase 1 die mit der DNA-Synthese korreliert ist (Rasey et al., 2002). Wir verglichen den Parameter S-Phase-Fraktion in unseren Versuchen ebenfalls mit der FLT- Speicherung. Auch hier beobachteten wir eine Korrelation der FLT- Speicherung und der S-Phase-Fraktion. Sie war abhängig von der Dosierung der Chemotherapie und bewegte sich zwischen  $r=0.7-0.9$ . Jedoch sind in Abhängigkeit vom Wirkmechanismus der Chemotherapeutika erhebliche Umverteilungen innerhalb des Zellzyklusses zu erwarten. Einige zytostatische Substanzen induzieren eine Speicherung in der S-Phase, die sowohl mit einer Zu- als auch einer Abnahme der FLT-Speicherung assoziiert sein kann (Dittmann et al., 2002). Demnach kann die Assoziation der S-Phase mit der FLT-Aufnahme zeitweilig nach Chemotherapie aufgrund des S-Phase Blocks aufgehoben sein. Weitere vorherige Arbeiten stellten eine enge Korrelation der FLT-Speicherung und der Fraktion der unbehandelten Zellen in der S-Phase des Zellzyklusses fest (Schwartz et al. 200; Rasey et al., 2001). Rasey et al. zeigten ebenfalls in einer In-vitro- Untersuchung, dass der FLT-Uptake bei den Lungenkarzinomzellen A549 mit der TK1 Aktivität korreliert ist. Sie verglichen den FLT-Uptake, die Zellproliferation (% der Zellen in der S-Phase, gemessen mittels Durchflusszytometrie) und die TK1-Aktivität mittels Thymidinphosphorylierungsassay bei der Lungenkarzinomzelllinie A549 und Kolonkarzinomzelllinie HT 29. Der FLT-Uptake korrelierte gut mit der Aktivität des zellzyklusregulierenden Enzyms TK1. Er nahm mit der TK1 –Aktivität zu und

betrug  $r^2 = 0.73$  bei A549, und  $r^2 = 0.62$  bei HAT 29. Man fand eine bessere Korrelation der TK1-Aktivität mit FLT als mit der S-Phase und FLT.

Bei der Arbeitsgruppe Wells et al. korrelierte die S-Phase Fraktion, gemessen mit Hilfe der Durchflusszytometrie, ebenfalls mit der  $^{18}\text{F}$ -FLT Aufnahme. Diese Korrelation schien besser zu sein als die zu Ki-67 und der kinetischen Messung von C-Thymidin ( $r = 0,58$ ), obwohl letztere an verschiedenen abdominalen Tumoren durchgeführt wurde (Wells et al., 2002). Toyohara et. al zeigten in ihrem Modell ähnliche Ergebnisse. Sie untersuchten FLT als einen Proliferationsmarker bei 22 verschiedenen Zelllinien und verglichen die FLT-Aufnahme mit dem  $^3\text{H}$ -Thymidin-bzw.  $^3\text{H}$ -Arabinothymidin-Uptake. Sie analysierten den Zusammenhang der beiden Proliferationsparameter und der S-Phase-Fraktion.

Der FLT-Uptake korrelierte gut mit dem  $^3\text{H}$ -Thymidin-Uptake ( $r = 0.88$ ,  $p < 0.0001$ ). Die S-Phase-Fraktion korrelierte mit dem FLT-Uptake  $r = 0.75$ ,  $p < 0.0001$  und dem  $^3\text{H}$ -Thymidin-Uptake  $r = 0.76$ ,  $p < 0.0001$ ). Die Ergebnisse decken sich beträchtlich mit unseren Ergebnissen.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Inkubation der Tumorzellen mit Taxotere in verschiedenen Dosierungen eine dosisabhängige Abnahme der FLT- Speicherung pro Zelle zur Folge hat. Je niedriger die Dosierung der Chemotherapie desto mehr FLT wurde gespeichert. 24h nach Behandlung mit der Chemotherapie war diese Abnahme abhängig von der Dosierung.

In unserer aktuellen Studie mit Brustkrebszellen, wurde ebenfalls eine enge Korrelation der FLT-Aufnahme mit der S-Phase-Fraktion beobachtet, wobei die Korrelation schwächer ausgeprägt war als die recht enge Übereinstimmung von FLT mit Tdr. Die schwächere Korrelation im Falle der Taxotere- Behandlung könnte durch die Wirkung der Taxane erklärt werden, die Zellen in den Zelltod zu treiben, indem sie während der mitotischen Phase einen Kontrollpunkt aktivieren, der das Voranschreiten des Zellzyklusses verhindert und daher Zellen während anderer Phasen nicht beeinträchtigt werden (Demidenko et al., 2005). Es gibt in menschlichen Zellen mindestens vier Kontrollpunkte, die sich jeweils zwischen Mitte und Ende der einzelnen Phasen befinden. Ist allerdings ein Kontrollpunkt

Innerhalb einer Phase überwunden und sind trotzdem Fehler vorhanden oder neue Fehler entstanden, schreitet der Zyklus bis zum nächsten Kontrollpunkt voran und der Eintritt in die nächste Phase wird nicht verhindert (Shackelford et al., 1999). Die Wirkung eines schädigenden Agens variiert dabei von Zelllinie zu Zelllinie. Die Zellzykluskontrollpunkte stellen sicher, dass richtige, komplette und vollständige Moleküle in die nächste Phase eintreten. Häufig aktivieren oder deaktivieren sie die Komplexe aus Cyclin und cyclinabhängiger Kinase (CdK) und hemmen damit den Zyklus. Unterschiede in einzelnen Zelltypen und vor allem methodische Unzulänglichkeiten erschweren die eindeutige Festlegung der Position und Anzahl vorhandener Kontrollpunkte.

Dementsprechend war in unserem Mammakarzinom-Modell die S-Phase-Fraktion nicht so starken Änderungen unterworfen wie die TK-1 Aktivität, welche wiederum in einer reduzierten FLT und Tdr- Akkumulation resultierte.

FLT hat das Potential für die nichtinvasive In-Vitro-Quantifizierung der proliferativen Kapazität eines Tumors und dessen Ansprechen auf die Therapie.

Weitere In-vivo-Untersuchungen über das metabolische und proliferative Verhalten könnten das Verständnis über den Energiestoffwechsel und die Wachstumskinetik von Tumoren erweitern und zu Verbesserungen im Therapiemonitoring führen.

Zusammenfassend, zeigte die aktuelle Studie, dass die antiproliferative Aktivität von Adriamycin und Taxotere beim Mammakarzinom mit FLT-PET dargestellt werden kann und diese Tatsache klinische Studien mit Patienten rechtfertigt.

## 6 Zusammenfassung

[<sup>18</sup>F]-FLT ist ein Substrat der Thymidinkinase-1 (TK-1). Aus diesem Grunde kann eine Abhängigkeit zwischen der FLT-Aufnahme und der Tumorproliferation angenommen werden. Das Ziel der Arbeit war herauszufinden, ob FLT die durch Chemotherapie induzierte Beeinträchtigung der Proliferation von Brustkrebszellen detektiert. Dieser Ansatz ist derzeit Gegenstand klinischer Studien in der neoadjuvanten Therapie des Mammakarzinoms. Mammakarzinomzellen der Zelllinie MCF-7 wurden mit den Chemotherapeutika Taxotere und Adriamycin behandelt. Die inhibitorischen Konzentrationen (IC<sub>25-95</sub>) der chemotherapeutischen Substanzen wurden anhand des Koloniebildungstests und der Probit/Logit fit –Analyse berechnet. Die zelluläre Aufnahme von FLT (60 min. Inkubation) wurde nach 4 Stunden, 1, 3 und 5 Tagen nach Chemotherapie gemessen. Für einen direkten Vergleich wurde der [H-3]-Thymidin (Tdr)- Einbau und die Fraktion der Zellen in der S-Phase zu gleichen Zeiten gemessen. Die statistische Datenanalyse wurde mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) und dem Differenzmodell nach Bland-Altman gefertigt. Die zelluläre FLT-Aufnahme korreliert mit der durch beide zytostatischen Substanzen hervorgerufenen Wachstumsinhibition. Bei hoher Dosierung der Chemotherapie (IC<sub>95</sub>) resultierte die Abnahme des Wachstums in einer signifikanten Reduktion der FLT-Aufnahme schon 4 h nach Behandlung. Im Allgemeinen, war die FLT-Akkumulation größer bei den Kulturen, die mit Adriamycin behandelt wurden als bei den Kulturen mit gleicher IC bei Taxotere. Die zelluläre Akkumulation von FLT korrespondierte eng mit der von Tdr (Adriamycine, Taxotere:  $r = 0.95/0.87$ ; *Bland-Altman Difference Plot*) und etwas weniger deutlich als diese mit dem Anteil der Zellen in der S-Phase. Und etwas weniger deutlich als diese mit dem Anteil der Zellen in der S- Phase (Adriamycine, Taxotere:  $r = 0.91$  and  $0.77$ ). Kurz nach Chemotherapie von Brustkrebszellen korreliert die FLT- Aufnahme sehr stark mit der induzierten Abnahme der Tumorzellproliferation. Daher scheint FLT für das Monitoring der neoadjuvanten Behandlung des Mammakarzinoms mittels PET – (CT) geeignet zu sein.

## 7 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Fersis für die Bereitstellung des Themas und das Korrekturlesen der Dissertation bedanken.

Dr. med. Smyczek-Gargya danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei organisatorischen Fragestellungen ebenso Dr. med. Helmut Dittmann für die Betreuung der Experimente.

Reinhard Vonthein danke ich für die statistische Auswertung der Ergebnisse, Rainer Kehlbach für die Betreuung der durchflusszytometrischen Experimente und Maren Pritzkow für die Einführung in die Arbeit mit Zellkulturen.

Besonderer Dank gilt meinem lieben Ehemann Turgay Göksu für seine Geduld und Motivation, meiner Freundin Nahide Akbulut für das Layout und die Formatierung, meinen Eltern und all denen, die mich bei der Arbeit unterstützt und fortwährend an mich geglaubt haben.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D.: (1995) Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage, VCH-Verlag, Weinheim, 1019-27
2. Amadori, D. and Silvestrini, R., (1998) Prognostic and predictive value of thymidine labelling index in breast cancer. *Breast Cancer Res.Treat.*,51,267-281
3. Arner ES, Eriksson S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther.* 1995;67(2):155-86. Review.
4. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng.* 1969 Nov;11(6):1101-10.
5. Avril N, Dose J, Ziegler S, Jänicke F, Schwaiger M. (1997) Diagnostik des Mammakarzinoms und der lokoregionären Lymphknoten mit der Positronenemissionstomographie. *Radiologe*; 37: 741-8.
6. Balu-Maestro C, Chapellier C, Bleuse A, Chanalet I, Chauvel C, Largillier R. Imaging in evaluation of response to neo-adjuvant breast cancer treatment benefits of MRI. *Breast Cancer Res Treat* 2002;72(2):145-52
7. Bakheet SM, Powe J, Kandil A, Ezzat A, Rostom A, Amartey J. F-18 FDG uptake in breast infection and inflammation. *Clin Nucl Med* 2000;25(2):100-3.
8. Barthel H, Cleij MC, Collingridge DR, Hutchinson OC, Osman S, He Q, Luthra SK, Brady F, Price PM, Aboagye EO. 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine as a new marker for monitoring tumor response to antiproliferative therapy in vivo with positron emission tomography. *Cancer Res.* 2003 Jul 1;63(13):3791-8
9. Barthel H, Perumal M, Latigo J, He Q, Brady F, Luthra SK, Price PM, Aboagye EO. The uptake of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine into L5178Y tumours in vivo is dependent on thymidine kinase 1 protein levels. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2005 Mar;32(3):257-63.
10. Basegra R. (1989) Measuring parameters of growth, in Basegra R, (Edit.): *Cell growth and division*. IRL press, Oxford, England.
11. Bear HD, Anderson S, Smith RE et al. A randomized trial comparing preoperative (preop) doxorubicin/cyclophosphamide (AC) to preop AC followed by preop doxetaxel (T) and to preop AC followed by postoperative (postop) T in patients (pts) with operable carcinoma of the breast: results of NSABP B-27. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 88: 16 (Abstr).

12. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 8476 307-10
13. Blocher A., Bieg C., Ehrlichmann W., Dohmen B. M., Machulla H.-J.: Procedure for routine synthesis of [<sup>18</sup>F]FLT in high activities. *J Nucl Med* 2001; 42:257P.
14. Bomanji JB, Costa DC, Ell PJ. Clinical role of positron emission tomography in oncology. *Lancet Oncol* 2001;2(3):157-64
15. Bombardieri E, Crippa F, Maffioli L, Greco M. Nuclear medicine techniques for the study of breast cancer. *Eur J Nucl Med* 1997; 24: 809-24
16. Bombardieri E, Crippa F. PET imaging in breast cancer. *Q J Nucl Med* 2001;45(3):245-56
17. Bonnadonna G, Zambetti M, Valagussa P: Sequential or alternating doxorubicin and CMF regimens in breast cancer with more than three positive nodes. Ten year results. *JAMA* 273:542-547, 1995
18. Buck A.K., Schirrmeister H., Hetzel M. von der Heide M, Halter G, Glatting, Mattfeldt T, Liewald F, Reske SN, Neumaier B. 3-deoxy- 3 [<sup>18</sup>F]-18]fluorothymidine- positron emission tomography for noninvasive assessment of proliferation in pulmonary nodules. *Cancer Res.* 2002; 62(12): 3331-4
19. Burcombe RJ, Makris A, Pittam M, Lowe J, Emmott J, Wong WL. Evaluation of good clinical response to neoadjuvant chemotherapy in primary breast cancer using [<sup>18</sup>F]-flourodeoxyglucose positron emission tomography. *Eur J Cancer* 2002; 38 (38): 375-79
20. Camplejohn, R.S., Ash, C.M., Gillett, C.E., Raikundalia, B., Barnes, D.M., Gregory, W.M., Richards, M.A. and Millis, R.R., The prognostic significance of DNA flow cytometry in breast cancer: results from 881 patients treated in a single centre. *Brit. J. Cancer*, 71, 140-145 (1995).
21. Clarke GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds, Oldaker T, McGurie WL: Prediction of relapse or survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. *New Engl J Med* 320:627-33, 1989
22. Costa A, Silvestrini R, Grignolio E, Clemente C, Attili A, Testori A. Cell kinetics as a prognostic tool in patients with metastatic malignant melanoma of the skin. *Cancer* 60 (1987) 2797-2800
23. Crawford EJ, Friedekin M, Wolf AP et al. (1982) 18 F-5-flourouridine, a new probe for measuring the proliferation of tissue in vivo. *Adv Enzyme Regul* 20: 3-22

24. Crissmann H. A., Mullaney P. F., Steinkamp J. A. (1975) Methods and applications of flow Systems for analysis and sorting of mammalian cells. In Prescott, D. M. (Hrsg.): *Methods in cell biology*, 9. Auflage, Academic Press New York
25. Cuzick J. Epidemiology of breast cancer. Program and abstracts of the 8th International Conference on Primary Therapy of Early Breast Cancer; March 12-15, 2003; St. Gallen, Switzerland. Abstract S12.
26. Danforth DN Jr, Aloj L, Carraquillo JA, Bacharach SL, Chow C, Zujewski J, Whatley M, Merino M, Neumann RD. The role of 18F-FDG-PET in the local/regional evaluation of women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 75(2): 135-46
27. Demidenko ZN, Halicka D, Kunicki J, McCubrey JA, Darzynkiewicz Z, Blagosklonny M, Selective Killing of Adriamycin-Resistant (G2 Checkpoint-Deficient and MRP1-Expressing) Cancer Cells by Docetaxel. *Cancer Research* 65, 4401-4407, May 15, 2005
28. Dittmann H, Dohmen BM, Kehlbach et al. Early changes in [F-18] FLT uptake after chemotherapy: an experimental study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29: 1462-9
29. Dittmann H, Dohmen BM, Paulsen F, Eichhorn K, Eschmann SM, Horger M, Wehrmann M, Machulla HJ, Bares R. [(18)F]FLT PET for diagnosing and staging of thoracic tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; Jul 26
30. Dohmen, B. M., Shields, A.F., Dittmann, H., Fersis, N., Eschmann, S. M., Philip, P., Reimold, M., Machulla, H. J., and Bares, R. Use of [F-18] FLT for breast cancer Imaging. *J. Nucl. Med.*, 42: 29, 2001.
31. Dohmen BM, Kuntzsch M, Dittmann H, Wei R, Eschmann SM, Machulla H-J, Bares R. FLT-Metabolismus beim Menschen: Konsequenzen für die [F-18]FLT-PET. *Nuklearmedizin* 2001;39:V19
32. Dohmen BM, Wei R, Grierson J, Shields AF, Reimold M, Machulla HJ, Bares R. FLT-Speicherung in malignen Tumoren: Erste Ergebnisse einer Pilotstudie. *Nuklearmedizin* 2000; 39: A44
33. Dohmen BM, Wei R, Thelen ML, Dittmann H, Reimold M, Machulla H-J, Bares R: FLT vs FDG for tumor PET: First results of a comparative study. *J Nucl Med* 41, 2000b
34. Dohmen BM, Shields AF, Grierson JR, Kuntzsch M, Reimold M, Solan A, Machulla HJ, Bares R: .[(18)F]FLT- PET in brain tumors. *J Nucl Med* 41 (Suppl): 216P (2000)

35. Faneyte IF, Schrama JG, Peterse JL, Remijnse PL, Rodenhuis S, van der Vijver MJ. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome. *Br J Cancer* 2003; 10, 88 (3): 406-12
36. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D. BLOBOCAN 2000. In: *Cancer incidence, mortality and prevention worldwide. Version 1.0. IARC Cancer BASE No. 5* IARC Press, 2001
37. Flanagan FL, Dehdashti F, Siegel BA. PET in breast cancer. *Seminars in Nuclear Medicine* 1998; 4: 290-302.
38. Francis DL, Freeman A, Visvikis D, Costa DC, Luthra SK, Novelli M, Taylor I, Ell PJ In vivo imaging of cellular proliferation in colorectal cancer using positron emission tomography. *Gut.* 2003;52(11):1602-6.
39. Freshney, R. I..Kulturbedingungen. In: *Tierische Zellkulturen: Ein Methoden-Handbuch*, de Gruyter-Verlag, Berlin, NY, 59-87, 1990
40. Freshney, R. I.. Kulturbedingungen. In: *Tierische Zellkulturen: Ein Methoden-Handbuch*, de Gruyter-Verlag, Berlin, NY, 133-34, 1990
41. Geffen DB, Man S. New drugs for the treatment of cancer, 1990-2001. *Isr Med Assoc J* 2002; 4 (12): 1124-31
42. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999 Apr 1;57(7):727-41
43. Gianni L, Pinuccia V, Zambetti M, Molierni A, Capri G, Bonadonna G. Adjuvant and neoadjuvant treatment of breast cancer. *Sem Oncol* 2001; 28: 13-29
44. Gordon HL, Bardos TJ, Chmielewicz ZF, Ambrus JL. Comparative study of the thymidine kinase and thymidylate kinase activities and of the feedback inhibition of thymidine kinase in normal and neoplastic human tissue. *Cancer Res.* 1968 Oct;28(10):2068-77.
45. Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 1982 Oct 29;218(4571):474-5.
46. Grierson JR, Schwartz JL, Muzi M, Jordan R, Krohn KA. Metabolism of 3'-deoxy-3'-[F-18]fluorothymidine in proliferating A549 cells: validations for positron emission tomography. *Nucl Med Biol.* 2004 Oct;31(7):829-37.
47. Grierson, J. R., Vesselle, H., Hofstrand, P., Chin, L., and Rasey, J. Comparative uptake and cell cycle measurements with [F-18] FLT vs [H-3]thymidine in mammalian tumor cells. *J. Nucl. Med.* 1998; 39: 229-230.

48. Grierson, J. R., and Shields, A. F. Radiosynthesis of 3'-deoxy- 3' [F-18] fluoro-thymidine: [F-18] FLT for imaging of cellular proliferation in vivo. *Nucl. Med. Biol.* 2000; 27: 143-156.
49. Grierson J, Dohmen BM, Shields T, Anderson DM, Harrington RD, Lewellen B, Glanister DD, Weyrich JT: Dosimetrie und Ganzkörperverteilung von 18F-3-deoxy-3-fluorothymidin(FLT) in Affen (*Macaca Nemestrina*). *Nuklearmedizin* 37, A17, 1998
50. Hannigan BM, Barnett YA, Armstrong DB, McKelvey-Martin VJ, McKenna PG. Thymidine kinases: the enzymes and their clinical usefulness. *Cancer Biother.* 1993 Fall;8(3):189-97.
51. Hengstschlager M, Pfeilstocker M, Wawra E. Thymidine kinase expression. A marker for malignant cells. *Adv Exp Med Biol.* 1998;431:455-60.
52. Hennequin C., Giocanti N., Favaudon V. S-Phase specificity of cell killing by docetaxel (Taxotere) in synchronised HeLa cells. *Br J Cancer* 1995; 71: 1194-1198
53. Hieken TJ, Harrison J, Herreros J, Velasco JM. Correlating sonography, mammography, and pathology in the assessment of breast cancer size. *Am J Surg* 2001; 182(4):351-4
54. Higashi K, Matsunari I, Ueda Y, Ikeda R, Guo J, Oguchi M, Tonami H, Yamamoto I. Value of whole-body FDG PET in management of lung cancer. *Ann Nucl Med.* 2003 Feb;17(1):1-14.
55. Higashi K, Clavo AC, Wahl RL. Does FDG uptake measure proliferative activity of human cancer cells? In vitro comparison with DNA flow cytometry and tritiated thymidine uptake. *J Nucl Med.* 1993 Mar;34(3):414-9.
56. Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, Pylkkanen L, Turpeenniemi-Hujanen T, Von Smitten K, Lundin J. Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: A nationwide population -based study. *Clin Cancer Res* 2003; 9(3):923-30.
57. Kim R, Osaki A, Toge T. Current and future roles of neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2005 Aug; 6 (3): 223-32
58. Kit, S., Thymidine kinase, DNA synthesis and cancer. *Mol Cell. Biochem.*, 161-182 (1976).
59. Kolb TM, Lichy J, Newhouse JH. Comparison of the performance of screening mammography, physical examination, and breast US and evaluation of factors that influence them: an analysis of 27, 825 patient evaluations. *Radiology* 2002; 225 (1): 165-75

60. Konecny G, Crohns C, Pegram M, Felber M, Lude S, Kurbacher C, Cree IA, Hepp H, Untch M. Correlation of drug response with the ATP tumorchemosensitivity assay in primary FIGO stage III ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2000 May; 77(2):258-63.
61. Kong XB, Zhu QY, Vidal PM, Watanabe KA, Polsky B, Armstrong D, Ostrander M, Lang SA, Muchmore E, Chou TC, Comparisons of anti-human immunodeficiency virus activities, cellular transport, and plasma and intracellular pharmacokinetics of 3'-fluoro-3'-deoxythymidine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:808-818.
62. Kostakoglu L, Goldsmith SJ. 18F-FDG PET evaluation of the response to therapy for lymphoma and for breast, lung, and colorectal carcinoma. *J Nucl Med* 2003; 44(2):224-39
63. Kubota R, Yamada S, Kubota K, Ishiwata K, Tamahashi N, Ido T. Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. *J Nucl Med.* 1992 Nov;33(11):1972-80.
64. Krak NC, Van Der Hoeven JJ, Hoekstra OS, Twisk JW, Van Der Wall E, Lammermsma AA. Measuring [(18)F]FDG uptake in breast cancer during chemotherapy: comparison of analytical methods. *Eur J Nucl Mol Imaging* 2003 Mar 15
65. Langen, P., Etzold, G., Hintsche, R., and Kowollick, G. 3'-deoxy- 3' fluoro-thymidine, a new selective inhibitor of DNA synthesis. *Acta. Biol. Med. Ger.*, 23: 759-766, 1969.
66. Leyton J, Latigo JR, Perumal M, Dhaliwal H, He Q, Aboagye EO. Early detection of tumor response to chemotherapy by 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine positron emission tomography: the effect of cisplatin on a fibrosarcoma tumor model in vivo. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4202-10.
67. Liewald F, Grosse S, Storck M, Guhlmann A, Halter G, Reske S, Sunder-Plassmann L. How useful is positron emission tomography for lymphnode staging in non-small-cell lung cancer? *Thorac Cardiovasc Surg.* 2000 Apr; 48(2):93-6.
68. Lindl, T., Bauer, J.: *Zell- und Gewebekultur*, 1.Auflage, G. Fischer Verlag, Stuttgart, 1987
69. Ling YH, Priebe W, Perez-Soler R. Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. *Cancer Res.* 1993 Apr 15;53(8):1845-52.
70. Longobardi-Givan, A. *Flow cytometry- First principles*, Wiley Liss, New York 1992

71. Lu I, Samuelsson L, Bergstrom M, Sato M, Fasth KJ; Langstrom B. rat-studies comparing <sup>11</sup>C-FMAU, <sup>18</sup>F-FLT, and <sup>76</sup>Br-BFU as proliferation marker. *J Nucl Med* 2002; 43(12):1688-98
72. Machulla HJ, Blocher A, Kuntzch M, Piert M, Wei R, Grierson JR. Simplified labeling approach for synthesizing 3'-deoxy- 3' [F-18] fluorothymidine ([F-18] FLT). *J Radioanal Nucl Chem* 2000; 243: 843- 846.
73. Madec A, Javre JL, Haras D, Samperez S, Jouan P. Some characteristics of fetal and adult isoenzymes of thymidine kinase in human breast cancers. *Bull Cancer*.1988;75(2):187-94.
74. Martinez-Arribas F, Nunez MJ, Piqueras V, Lucas AR, Sanchez J, Tejerina A, Schneider J. Flow cytometry vs.Ki67 labelling index in breast cancer: a prospective evaluation of 181 cases. *Anticancer Res* 2002;22(1A):295-8.
75. Mier W, Haberkorn U, Eisenhut M. [F-18] FLT; portrait of a proliferation marker. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29: 165-169.
76. Morabito A, Magnani E, Gion M, Sarmiento R, Capaccetti B, Longo R, Gattuso D, Gasparini G. Prognostic and predictive indicators in operable breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2003; 3 (6): 381- 90.
77. Munch-Petersen, B., Cloos, L., Jensen, H.K. and Tyrsted G (1995). Human Thymidine Kinase 1. Rgulation in normal and malignant cells. *Advan. Enzyme Regul.*, 35, 69-89.
78. Nabholz JM. Docetaxel-anthracycline combinations in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;79 Suppl 1:S3-9.
79. Nakamura S, Kenjo H, Nishio T, Kazama T, Doi O, Suzuki K. Efficacy of 3D-MR mammography for breast conserving surgery after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer* 2002; 9(1):15-9
80. Nebe CT. [Flow cytometry and data analysis] *Infusionsther Transfusionsmed.* 1996 Apr;23(2):111-3.
81. O'Neill, K.L., Hoper, M. and Odling-Smee, G.W., Can thymidine kinase levels in breast tumors predict disease recurrence? *J.nat.Cancer Inst.*, 84. 1825-1828 (1992)
82. O'Reilly, S.M., Camplejohn, R.S., Barnes; D.M., Millis. R.R., Rubens, R.D. and Richards, M.A., Node negative breast cancer: prognostic subgroups defined by tumor size and flow cytometry. *J.Clin.Oncology.*, 8, 2040-2046 (1990)

83. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J, eds. (1997) Cancer incidence in five continents. Vol. VII. Lyon: International Agency for Research on Cancer. (IARC Scientific Publications No 143)
84. Partridge SC, Gibbs JE, Lu Y, Esserman LJ, Sudilovsky D, Hylton NM. Accuracy of MR imaging for revealing residual breast cancer in patients who have undergone neoadjuvant chemotherapy. *Am J Roentgenol* 2002; 179(5):1193-9.
85. Pratt SE, Pollak MN. Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGF-BP3) inhibits estrogen-stimulated breast cancer cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jan 14;198(1):292-7.
86. Raffael, A., Nebe, C.T. und Valet, G. Grundlagen der Durchflusszytometrie in : Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, Schmitz, G., Rothe, G. (Hrsg.) Schattauer- Verlag, Stuttgart 1994
87. Rasey, J.S., and Grierson, J. R. 3-deoxy- 3 [F-18]fluorothymidine- predicts changes in cell proliferation. *J. Nucl. Med.* 40: 25, 1999.
88. Rasey, J. S., Grierson, J. R. Wiens, L.W., and Kolb, P. E. Uptake of labeled FLT correlates with thymidine kinase (TK1) activity in human tumor cells. *J. Nucl. Med.*, 41: 36, 2000.
89. Rasey, J. S., Grierson, J. R. , Wiens, L., Kolb, P., Schwartz, J. Validation of FLT uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in A549 carcinoma cells. *J. Nucl. Med.*, 43: 1210-7, 2002.
90. Ravdin PM (1996) Treatment of patients resistant to anthracycline therapy. *Anticancer Drugs* 7: 13-16
91. Reinhardt MJ, Kubota K, Yamada S, Iwata R, Yaegashi H. Assessment of cancer recurrence in residual tumors after fractionated radiotherapy: a comparison of fluorodeoxyglucose, L-methionine and thymidine. *J Nucl Med.* 1997 Feb;38(2):280-7.
92. Reske SN, Kotzerke J. FDG-PET for clinical use: Results of the 3rd German interdisciplinary consensus conference, "Onko-PET III", 21 July and 19 September 2000. *Konsensus-Onko-PET. Eur J Nucl Med* 2001;28:1707-23.
93. Rieber A, Brambs HJ, Gabelmann A, Heilmann V, Kreienberg R, Kuhn T. Breast MRI for monitoring response of primary breast cancer to neo-adjuvant chemotherapy- *Eur Radiol* 2002;12(7):1711-9
94. Ringel I, Horwitz SB. Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *J Natl Cancer Inst.* 1991 Feb 20; 83(4):288-91.

95. Romain, S., Christensen, L.J., Chinot, O., Balslev, I., Rose, C., Martin, P.M. and Thorpe, S.M. Prognostic value of cytosolic thymidine kinase activity as a marker of proliferation in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 61, 7-12(1995)
96. Romain S, Martin PM, Kljin JG, van Putten WL, Look MP, Guirou O, Foekens JA. DNA- synthesis enzyme activity: a biological tool useful for predicting anti-metabolic drug sensitivity in breast cancer? *Int J Cancer* 1997; 74: 156-161
97. Romain S, Spyrtos F, Descotes F, Daver A, Rostaing-Puissant B, Bougnoux P, Colonna M, Bolla M, Martin PM. Prognostic of DNA-synthesizing enzyme activities (thymidine kinase and thymidylate synthase) in 908 T1-T2, N0-N1, M0 breast cancers: a retrospective multicenter study. *Int J Cancer* 2000; 87:860-868.
98. Sakamoto S, Ebuchi M, Iwama T. Relative activities of thymidylate synthetase and thymidine kinase in human mammary tumours. *Anticancer Res* 1993; 13: 205-207.
99. Sakaki, S., Murakami, T., Ogino, T., Takahashi, M., Kawasaki, S.: Flow cytometric estimation of cell cycle parameters using a monoclonal antibody to bromdesoxyuridine. *Cytometry*, 7, 391-395, 1986
100. Schmidt-Matthiesen H, v. Fournier D. (1997) *Gynäkologische Onkologie*, in Schmidt-Matthiesen H, Hepp H: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 9.Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer, 355-408.
101. Schmidt-Matthiesen H, Bastert G. (1995) *Mammakarzinom*, in Schmidt-Matthiesen H, Hepp H: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 5.Aufl. Stuttgart, New York: Schattauer, 399-442.
102. Schwartz, J. L., Grierson, J. R., Rasey, J. S., Wiens, L., Jordan, R., and Kohli, T. Rates of accumulation and retention of 3-deoxy- 3 [F-18]fluorothymidine (FLT) in different cell lines. *J. Nucl. Med.*, 42: 283, 2001.
103. Schwartz JL, Tamura Y, Jordan R, Grierson JR, Krohn KA. Monitoring tumor cell proliferation by targeting DNA synthetic processes with thymidine and thymidine analogs. *J Nucl Med*. 2003 44(12):2027-32.
104. Sciuto R, Pasqualoni R, Bergomi S, Petrilli G, Vici P, Belli F, Botti C, Mottolese M, Maini CL. Prognostic value of ( 99m) Tc- sestamibi washout in predicting response of locally advanced breast cancer to neoadjuvant chemotherapy. *J Nucl Med* 2002; 43 (6): 745-751
105. Seitz U, Wagner M, Vogg AT, Glatting G, Neumaier B, Greten FR, Schmid RM, Reske SN. In vivo evaluation of 5-[(18)F]fluoro-2'-deoxyuridine as tracer for positron emission tomography in a murine pancreatic cancer model. *Cancer Res*. 2001 May 15;61(10):3853-7.

106. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect.* 1999 Feb;107 Suppl 1:5-24. Review.
107. Shapiro LE, Patel KR, Surks MI. The rate of appearance of thyroid hormone nuclear receptor is increased during deoxyribose nucleic acid synthesis in GC cells: analysis of thymidine-treated GC cells using dense amino acid labeling. *Endocrinology.* 1986 Nov;119(5):2076-81.
108. Sherley, J. L., and Kelly, T. J. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 263: 8350- 8358, 1988.
109. Shields, A. F., Grierson, J. R., Dohmen, B. M., Machulla, H-J., Stayanoff, J.C., Lawhorn-Crews, J.M., Obradovich, J., Muzik, O., and Mangner, T. Imaging proliferation in vivo with [F-18] FLT and positron emission tomography. *Nat. Med.*, 4: 1334-1336, 1998.
110. Shields, A. F., Grierson, Muzik, O., Stayanoff, J.C., Lawhorn-Crews, J.M., Obradovich, J., Mangner, T. Kinetics of 3-deoxy- 3 [F-18]fluorothymidine uptake and retention in dogs. *Mol Imaging Biol.* 2002; 4:83-89.
111. Shields, A.F., Dohmen, B. M., Grierson, J. R., Kuntzsch, M., Machulla, H-J., and Bares, R. Imaging with [F-18] FLT and FDG in patients with cancer. *J. Nucl. Med.*, 40: 61, 1999.
112. Shields, A.F., Dohmen, B. M., Mangner, T. J., Lawhorn-Crews, J. M., Machulla, H., Muzik, O., and Bares, R. Imaging of thoracic tumors with [F-18] FLT. *J. Nucl. Med.*, 41: 74, 2000.
113. Shields, A. F., Dohmen, B. M., Mangner, T.J., Lawhorn-Crews, J., Machulla, H. J., Muzik, O., and Bares, R. Use of [F-18] FLT for imaging gastrointestinal tumors. *J. Nucl. Med.*, 42: 29, 2001.
114. Shields, A. F., Grierson, J. R. F-18 FLT can be used to image cell proliferation in vivo. *J Nucl Med* 38: 249P, 1997
115. Shields, A. F., Grierson, J. R. Labeled AZT and FLT for imaging cell proliferation. *J Nucl Med* 38: 240P, 1996
116. Shields AF, Mankoff DA, Link JM, Graham MM, Eary JF, Kozawa SM, Zheng M, Lewellen B, Lewelle TK, Grierson JR, Krohn KA. Carbon- 11-thymidine and FDG to measure therapy response. *J Nucl Med* 1998;39(10):1757-62
117. Silvestrini, R., Feasibility and reproducibility of the [3H]-thymidine labelling index in breast cancer. The SICCAB Group for Quality Control of Cell Kinetic Determination. *Cell. Prolif.*, 24, 437-445 (1991).

118. Silvestrini R., Daidone MG, Luisi A, Mastore, M., Leutner, M. and Salvadori, B. Cell proliferation in 3,800 node-negative breast cancers: consistency over time of biological and clinical information provided by 3H-thymidine labelling index., *Int.J.Cancer*, 20, 122-127 (1997)
119. Silvestrini R, Daidone MG, Di Fronzo G: Relationship between proliferative activity and estrogen receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 44: 665-670, 1979
120. Smyczek-Gargya B, Fersis N, Dittmann H, et al. PET with [<sup>18</sup>F]fluorothymidine for imaging of primary breast cancer: a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31:720–724
121. Soule HD, Vasquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (1973) Human cell line from pleural effusion derived from a human breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1409-1416.
122. Stal O, Dufmats M, Hatschek T, Carstensen J, Klintenberg C, Rutquist LE, Skoog L, Sullivan S, Wingren S and Nordenskjold B. (1993) S-Phase fraction is a prognostic factor in stage I breast carcinoma. *J Clin. Oncol.*, 11, 1717-1721
123. St. Gallen : Adjuvant therapy of primary breast cancer, 6<sup>th</sup> international conference. Olma Messen St.Gallen. February 25-28, 1998. Abstracts. *Eur J Cancer* 34: S3-45.
124. Sugiyama M, Sakahara H, Sato K, Harada N, Fukumoto D, Kakiuchi T, Hirano T, Kohno E, Tsukada H. Evaluation of 3'-deoxy-3'-<sup>18</sup>F-fluorothymidine for monitoring tumor response to radiotherapy and photodynamic therapy in mice. *J Nucl Med*. 2004 Oct;45(10):1754-8
125. Taylor A Jr, Jones OW, Grishaver MA. Effect of 5-fluorouracil on the release of thymidine kinase from hepatoma cells in vitro. *Cancer Res*. 1981 Jan;41(1):192-6.
126. Thomas E, Holmes FA, Smith TL et al. The use of alternate, non-cross-resistant adjuvant chemotherapy on the basis of pathologic response to a neoadjuvant doxorubicin-based regimen in women with operable breast cancer: long-term results from a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2294–2302.
127. Thor, A.D., Liu, S., Moore HH, D.H. and Edgerton, S.M., Comparison of mitotic index, in vitro bromodeoxyuridine labeling, and MIB-1 assays to quantitate proliferation in breast cancer. *J. Clin.Oncol.*, 17, 470-477(1999)
128. Toyohara, J., Kto-Azuma, M., Waki, A., Takamatsu, S., Yonekura, Y., Magata, Y., and Fujibayashi, Y. Basis of FLT as a cell proliferation marker: comparative uptake studies with thymidine, arabinothymidine and FDG, and cell-

- analysis in 22 asynchronously growing tumor cell lines. *J. Nucl. Med.*, 42: 83, 2001
129. Trudeau ME. First-line treatment of metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs*. 1996 Aug;7 Suppl 2:9-12.
130. Tubiana M, Pejovic MH, Chavaudra N, Contesso G, Malaise EP : The long-term prognostic significance of the thymidine labelling index in breast cancer. *Int J Cancer* 33 (1984) 441-445
131. Veronesi U, Bonadonna G, Zurida S et al.: Conservation surgery after primary chemotherapy in large carcinomas of the breast. *Annals of Surgery* 222:612-128,1995
132. Vesselle, H., Grierson, H., Muzi, M., Schmidt, R., Peterson, L. M., Pugsley, J., Vallieres, E., Wood, D.E., and Krohn, K.A. 18-F- Fluorothymidine PET imaging of non-small cell lung cancer(NSCLC): comparison to Ki-67 proliferation index. *J. Nucl. Med.*, 42: 29, 2001.
133. Vesselle, H., Schmidt, R. A., Peterson, L. M., Pugsley, J.M, Li, M., Kohlmyer, S. G., Vallieres, E., and Wood, D.E. Lung cancer proliferation correlates with [F-18] fluorodeoxyglucose uptake by positron emission tomography. *Clin. Cancer Res*, 6: 3837-3844, 2000.
134. Vesselle, H., Grierson, H., Muzi, M., Pugsley J. M., Schmidt, R., Rabinowitz, P., Peterson, L. M., Vallieres, E., Wood, D.E. In vivo validation of 3'-Deoxy- 3'-[F-18] fluorothymidine [F-18] FLT as a proliferation imaging tracer in humans: correlation of [F-18] FLT uptake by positron emission tomography with Ki-67 immunohistochemistry and flow cytometry in human lung tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8(11): 3315-3323.
135. Warren RM, Young JR, Mclean L, Lyons K, Wilson AR, Evns A, Duffy SW, Warsi IM. Radiology review of the UKCCCR Breast Screening Frequency Trial: potential improvements in sensitivity and lead time of radiological signs. *Clin Radiol* 2003; 58 (2): 128-32
136. Wafflart, J., Daver, a., Grenier, J., Lemieux, P., Simony-Lafontaine, J., Angibeau, R.M., Trojani, M : and Richard, C. Cytosolic thymidine kinase activity as a marker of cell proliferation in primary breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 14, 135 (1989)
137. Wahl RL. (1996) Nuclear medicine techniques in breast imaging. *Seminars in Ultrasound , CT, and MRI* ; 5: 494-505.
138. Wells P, Gunn RN, Alison M, Steel C, Golding M, Ranicar AS, Brady F, Osman S, Jones T, Price P. Assessment of proliferation in vivo using 2-[(11)C]thymidine positron emission tomography in advanced intra-abdominal

- malignancies. *Cancer Res.* 2002 Oct 15;62(20):5698-702. Erratum in: *Cancer Res.* 2003 Dec 15;63(24):9057.
139. Wilson WH, Berg SL, Bryant G, Wittes RE, Bates S, Fojo A, Steinberg SM, Goldspiel BR, Herdt J, O'Shaughnessey J (1994) Paclitaxel in doxorubicin-refractory or mitoxantrone-refractory breast cancer: a phase I/ II trial of 96-hour-infusion. *J Clin Oncol* 12, 1621-1629
140. Yung WK. In vitro chemosensitivity testing and its clinical application in human gliomas. *Neurosurg Rev* 1989; 12:197-203.

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

**Lebenslauf**

Name: Ajnur Jusufoska

Geburtsdatum: 01.03.1980

Geburtsort: Stuttgart

1986- 1990: Grundschule Carl-Benz Bad Cannstatt

1990- 1999: Johannes- Kepler Gymnasium Bad Cannstatt

1999- 2005: Medizinstudium an der Universität Tübingen

August 2001: Ärztliche Vorprüfung

August 2003: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

02/ 2002- 02/ 2004: Famulaturen in der Inneren Abteilung des Griffin Hospital, Lehrkrankenhaus der Yale University, USA; an der Universitätsfrauenklinik Tübingen; in Family Practice & Emergency Room am US Army Hospital in Heidelberg und an der Universitätshautklinik Tübingen

August 2004: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/ 2004 – 08/ 2005 Praktisches Jahr am Akademischen Lehrkrankenhaus Bad Cannstatt (Klinikum Stuttgart) mit Wahlfach Dermatologie und am Bristol Royal Infirmary, University of Bristol, Grossbritannien

Dezember 2005: 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation

Seit März 2006 Assistenzärztin in der Inneren Medizin am St. Marienkrankenhaus in Lampertheim