

Aus der Klinik für Nuklearmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Carl-Martin Kirsch

**Entwicklung und präklinische Validierung radioiodierter
L-Phenylalanine für die Endoradionuklidtherapie und für
PET-Untersuchungen von hirneigenen Tumoren**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2009

vorgelegt von

Ina Israel

geb. am: 18.06.1978 in Dresden

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2006 bis Mai 2009 in den Laboratorien für Radiochemie und Radiopharmazie der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes und der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Samuel Samnick durchgeführt.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

1. Referent: Univ.-Prof. Dr. Samuel Samnick, Dipl.-Chem., Dipl.-Ing.

2. Referent:

Datum der Abgabe: 04.08.2009

Datum der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	6
	SUMMARY	8
2	EINLEITUNG.....	10
2.1	Gliome	10
2.1.1	Nuklearmedizinische Diagnostik von Gliomen	12
2.1.2	Gegenwärtige Behandlungsmethoden von Gliomen	14
2.1.3	Therapieansatz mit <i>p</i> -[¹³¹ I]Iod-L-phenylalanin	16
3	PROBLEMSTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	18
4	MATERIAL UND METHODEN.....	20
4.1	Materialien.....	20
4.1.1	Verwendete Geräte	20
4.1.2	Verwendete Chemikalien und Lösungen.....	22
4.1.3	Versuchstiere	24
4.2	Methoden	25
4.2.1	Synthese von <i>N</i> -Boc- <i>p</i> -(tri- <i>n</i> -butylstannyl)-L-phenylalanin- methylester als Vorstufe für die Radiomarkierung	25
4.2.1.1	Synthese von <i>N</i> -Boc- <i>p</i> -iod-L-phenylalaninmethylester und <i>N</i> -Boc- <i>p</i> -brom-L-phenylalaninmethylester	25
4.2.1.2	Synthese von <i>N</i> -Boc- <i>p</i> -(tri- <i>n</i> -butylstannyl)-L-phenylalanin- methylester	26
4.2.2	Radiosynthese von <i>p</i> -[^{124/131} I]Iod-L-phenylalanin.....	27
4.2.3	Zellbiologische Arbeitsmethoden	28
4.2.3.1	Zelllinien	28
4.2.3.2	Auftauen der Zellen	28
4.2.3.3	Zellpassagierung	29
4.2.3.4	Einfrieren von Zellen.....	29
4.2.4	<i>In vitro</i> Versuche	29
4.2.4.1	Untersuchung der Zellproliferation.....	30
4.2.4.2	Untersuchungen zum Zellwachstum, zur Apoptose und Nekrose ...	31

4.2.4.3	Bestimmung induzierter DNA-Doppelstrangbrüche mittels γ -H2AX-Foci-Methode	33
4.2.5	<i>In vivo</i> Versuche.....	34
4.2.5.1	Tumorimplantation.....	35
4.2.5.2	Tumorbehandlung mit n.c.a. <i>p</i> -[¹³¹ I]Iod-L-phenylalanin	35
4.2.5.3	Tumordarstellung mittels SPECT und PET.....	37
5	ERGEBNISSE	38
5.1	Synthese von <i>N</i>-Boc-<i>p</i>-(tri-<i>n</i>-butylstannyl)-L-phenylalanin-methylester als Vorstufe für die Radioiodierung.....	38
5.1.1	Synthese von <i>N</i> -Boc- <i>p</i> -iod-L-phenylalaninmethylester und <i>N</i> -Boc- <i>p</i> -brom-L-phenylalaninmethylester	38
5.1.2	Synthese von <i>N</i> -Boc- <i>p</i> -(tri- <i>n</i> -butylstannyl)-L-phenylalanin-methylester	39
5.2	Radioiodierungen	40
5.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen	43
5.3.1	Untersuchung der Zellproliferation	43
5.3.1.1	Behandlung mit n.c.a. ¹³¹ IPA sowie c.a. ¹³¹ IPA.....	43
5.3.1.2	Perkutane Bestrahlung	45
5.3.1.3	Kombination von ¹³¹ IPA und perkutaner Bestrahlung	46
5.3.1.4	Kombination von Temozolomid, ¹³¹ IPA und perkutaner Bestrahlung	48
5.3.2	Untersuchungen des Zellwachstums-, Apoptose- und Nekroseverhaltens.....	51
5.3.3	Darstellung der Zellschädigung anhand DNA-Doppelstrangbrüchen..	54
5.3.3.1	Einfluss von Temozolomid, ¹³¹ IPA und perkutaner Bestrahlung	54
5.3.3.2	Untersuchungen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	57
5.4	<i>In vivo</i> Untersuchungen	60
5.4.1	Therapieversuch mit n.c.a. ¹³¹ IPA am Mausmodell	60
5.4.2	Erste Untersuchungen am orthotopen Ratten-Glioblastommodell	63
5.4.3	PET-Untersuchung mit n.c.a. ¹²⁴ IPA am Mausmodell	65
5.4.4	Erste klinische PET-Untersuchung mit n.c.a. ¹²⁴ IPA	66

6	DISKUSSION	67
6.1	Chemische Synthese und Radioiodierung.....	69
6.2	Bewertung von n.c.a. ¹³¹IPA in Gliomzelllinien	72
6.2.1	Beurteilung des Wachstums- und Apoptose-Nekroseverhaltens	72
6.2.2	Beurteilung der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche	76
6.3	<i>In vivo</i> Experimente	79
6.3.1	Untersuchungen am Mausmodel mit n.c.a. ¹³¹ IPA	80
6.3.2	Untersuchungen am Rattenmodel mit n.c.a. ¹³¹ IPA	82
6.3.3	Bewertung von n.c.a. ¹²⁴ IPA als PET-Tracer.....	83
7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	85
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	87
9	LITERATURVERZEICHNIS	89
	DANKSAGUNGEN	104
	PUBLIKATIONEN	105
	LEBENS LAUF	106
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	107

1 Zusammenfassung

Trotz aller Fortschritte operativer Techniken, verbesserter Strahlen- und Chemotherapien ist die Prognose von Patienten mit Hirntumoren mit etwa 12 - 15 Monaten beim Glioblastom nach wie vor schlecht. Da Tumorzellen, verglichen mit gesundem Hirngewebe und nicht-neoplastischen Veränderungen, wie Narben und Strahlennekrosen eine erhöhte Aminosäureaufnahme aufweisen, werden radioaktiv markierte Aminosäuren zur *in vivo* Diagnostik von Hirntumoren mittels Positronenemissionstomografie und Einzelphotonenemissionscomputertomografie eingesetzt. Aktuell wurde die neue Aminosäure p -[¹²³I]Iod-L-phenylalanin zur Differentialdiagnostik von Gliomen klinisch etabliert. p -[¹²³I]Iod-L-phenylalanin übertrifft sonstige in der Literatur beschriebene Radiopharmaka durch seine hohe und spezifische Anreicherungskinetik und ungewöhnlich lange Retention in Gliomen. Eine erste Untersuchung mit dem therapeutisch wirksamen Iod-131-markierten Analogon p -[¹³¹I]Iod-L-phenylalanin (¹³¹IPA) in einer Gliomzellkultur, sowie in Ratten mit zerebral implantierten C6-Gliomen, ergaben eine hohe, tumorizide Wirkung von ¹³¹IPA und ein signifikant längeres Überleben der behandelten C6-Ratten gegenüber nicht-behandelten Kontrolltieren.

In dieser Arbeit wurde zunächst eine innovative Synthese von p -[¹³¹I]Iod-L-phenylalanin für die klinische Routineanwendung entwickelt und etabliert. Diese optimierte Radiosynthese wurde auf die Markierung von p -[¹²⁴I]Iod-L-phenylalanin übertragen und somit ein neuartiges, langlebiges Radiopharmakon für die Positronenemissionstomografie zur Verfügung gestellt. Erste Bewertungen am tumortragenden Mausmodell sowie an einem Patienten mit Glioblastom bestätigten das Potential von p -[¹²⁴I]Iod-L-phenylalanin als Radiotracer für die Positronenemissionstomografie.

In weiterführenden Experimenten wurde die zytotoxische Wirkung von ¹³¹IPA alleine, sowie in Kombination mit perkutaner Bestrahlung und dem Chemotherapeutikum Temozolomid auf die primär humanen Glioblastomzelllinien A1207, T6217, T3868 sowie auf die Ratten-Gliomzellen F98 untersucht. Diese ergaben, dass eine zusätzliche externe Bestrahlung zur Endoradionuklidtherapie mit ¹³¹IPA zur Erhöhung der Zytotoxizität führte, welche durch eine noch hinzukommende Temozolomidbehandlung erheblich gesteigert werden konnte.

Des Weiteren ergaben Vergleichsuntersuchungen mit einer Mischung aus nicht-radioaktiv markiertem IPA und ^{131}I IPA (c.a. ^{131}I IPA) einen zelllinienspezifisch besseren Therapieeffekt und wiesen auf eine zusätzliche Radiosensitivierung durch nicht-radioaktives IPA hin.

In Mäusen mit primär humanen Glioblastomen konnte das Tumorstadium nach Therapie mit ^{131}I IPA verlangsamt werden. Die Kombinationsbehandlung aus ^{131}I IPA und perkutaner Bestrahlung ergab einen starken Rückgang des Tumorstadiums sowie eine verlängerte Überlebenszeit der behandelten Tiere. Erste erweiterte Untersuchungen in einem syngenischen F98-Fischerrattenmodell konnten die Überlebensraten der Ratten jedoch nicht wesentlich steigern. Daher ist eine Therapieoptimierung in fortführenden Arbeiten an diesem Rattenmodell anzustreben. Dennoch stellt die Endoradionuklidtherapie mit p - ^{131}I iod-L-phenylalanin, insbesondere in Kombination mit perkutaner Bestrahlung und Temozolomid einen vielversprechenden neuen Therapieansatz in der Behandlung von Gliomen dar.

Summary

Despite advances in surgery techniques, radiotherapy and chemotherapy, the prognosis for patients with brain tumor remains poor. Survival ranges from 12 to about 15 months for glioblastoma. The finding that malignant brain tumors accumulate amino acids more effectively than healthy brain tissue and any non-neoplastic changes including scar and radiation necrosis, has led to the development of amino acid based radiotracers for imaging brain tumors using positron emission tomography and single photon emission computed tomography. *p*-[¹²³I]iodo-L-phenylalanine is a novel amino acid, which has been used clinically to differentiate malignant gliomas. *p*-[¹²³I]iodo-L-phenylalanine accumulates specifically and with prolonged retention in gliomas. In consequence, we developed the iodine-131-labeled analog *p*-[¹³¹I]iodo-L-phenylalanine which demonstrated to be tumoricidal to glioma cells in culture and to improve survival of rats with cerebral C6-gliomas in a previous investigation.

In the present study we first developed and established an improved radiosynthesis of *p*-[¹³¹I]iodo-L-phenylalanine (¹³¹IPA) for routine clinical applications. The optimized radiosynthesis was applied to the preparation of the novel radiopharmaceutical *p*-[¹²⁴I]iodo-L-phenylalanine for positron emission tomography. Preliminary investigations of *p*-[¹²⁴I]iodo-L-phenylalanine in tumor bearing mice and in a patient with glioblastoma confirmed its potential as PET-radiotracer for studying malignant gliomas.

In further experiments, we tested the cytotoxicity of ¹³¹IPA alone as well as in combination with external irradiation or temozolomide on the primary human A1207, T6217, and T3868 glioblastoma cell lines and on rat F98 glioma cells. Results of this investigation showed that radionuclide therapy with ¹³¹IPA combined with external irradiation is more effective than the respective mono-therapies. Efficacy of the combined therapy was significantly approved after an additional treatment of tumor cells with temozolomide. A comparative investigation using carrier-added ¹³¹IPA revealed an additionally intrinsic radiosensitive effect of the non-radioactive labeled IPA in the ¹³¹IPA preparation.

In vivo, the therapeutic efficacy of ¹³¹IPA was confirmed in mice bearing primary human glioblastomas. This was documented by a diminution of tumor growth and an improved survival rate. However, combined treatment based on ¹³¹IPA and external

radiotherapy was more effective in term of local tumor control and prolonged median survival times for treated mice. A comparable investigation on a syngeneic F98-Fischer glioma model was less effective. Indicating that further optimizations are need in future validation studies on F98-Fischer glioma model. In conclusion, the present data demonstrated that radionuclide therapy with p -[¹³¹I]iodo-L-phenylalanine, especially in combination with external irradiation and temozolomide is a promising novel therapeutic approach for malignant gliomas and encourage further *in vivo* validations.

2 Einleitung

2.1 Gliome

Gliome (hirneigene Tumore) gehören zu den Tumoren, die schwer behandelbar sind und trotz Behandlung immer noch sehr schlechte Überlebensprognosen der Patienten zur Folge haben. Sie treten mit fünf bis acht Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner/Jahr auf (FRIEDMAN ET AL., 2000; OHGAKI UND KLEINHUES, 2005). Mit einem Anteil von 20 % aller Tumorerkrankungen gehören die Gliome im Kindesalter zu den häufigsten Tumorerkrankungen; ein zweiter Häufigkeitsgipfel ist im späteren Alter zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr zu beobachten (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT E.V.).

Gliome bilden mit 50 % den größten Anteil der intrakranialen Tumore. Sie werden, entsprechend ihres histologischen Befundes, in vier Klassen eingestuft, wobei WHO-Grad I und II als niedriggradig, gutartig und WHO-Grad III und IV als hochgradig und bösartig bezeichnet werden. Die am häufigsten vorkommenden Gliome sind die Astrozytome, die Oligodendrogliome und die Oligoastrozytome, die von den gleichnamigen Astrozyten oder Oligodendrozyten abstammen bzw. Eigenschaften beider Zelltypen aufweisen. Sie treten sowohl niedriggradig, als auch hochgradig auf (CHEN, 2007). Zu den niedriggradigen Gliomen zählen unter anderem die pilozytischen Astrozytome (WHO-Grad I), Astrozytome (WHO-Grad II) und Oligodendrogliome (WHO-Grad II). Den hochgradigen Gliomen werden das anaplastische Astrozytome (WHO-Grad III) und das Glioblastom (WHO-Grad IV) zugeordnet (CHEN, 2007).

Sowohl niedriggradige als auch hochgradige Gliome zeichnen sich durch eine ausgeprägte, diffuse Infiltration des umliegenden Gewebes aus (LEFRANC ET AL., 2005). Charakteristisch für die hochgradigen Gliome ist ihre Heterogenität, die sich im zellulären Phänotyp und in unterschiedlichen Malignitätsgraden innerhalb des Tumors widerspiegelt. (CLAES ET AL., 2007). Das Glioblastom (WHO-Grad IV) ist mit ca. 50 % aller Gliome am weitesten verbreitet und gilt als das maligneste Gliom. Es entsteht zu über 90 % direkt (primäre Glioblastome) oder entwickelt sich in etwa 5 % der Fälle aus einem niedriggradigen Gliom (sekundäre Glioblastome) (OHGAKI ET AL., 2004). Bei älteren Patienten im Alter von 60 - 70 Jahren treten vorwiegend primäre Glioblastome auf. Bei ihnen weisen keinerlei Anzeichen auf einen bereits vorher existierenden niedriggradigen Tumor hin. Im Unterschied dazu sind sekundäre

Glioblastome hauptsächlich bei etwas jüngeren Menschen mit einem Durchschnittsalter von 45 Jahren anzutreffen, die bereits in früheren Jahren an niedriggradigen Astrozytomen erkrankt waren (OHGAKI ET AL., 2004; MILLER UND PERRY, 2007).

Für die Entstehung von Hirntumoren werden vor allem genetische Ursachen in Betracht gezogen, deren Untersuchung Gegenstand wissenschaftlicher Forschung ist (KNUDSON, 1985; LI ET AL., 1997; ZHOU ET AL., 1999; OHGAKI ET AL., 2004). In funktionsfähigen Zellen besteht ein Gleichgewicht aus proliferationsstimulierenden Proteinen (Proteine der Protoonkogene) und proliferationshemmenden Proteinen (Proteine der Tumorsuppressorgene). In Tumorzellen hingegen verursachen Mutationen in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen die Störung dieses Gleichgewichtes, was den Verlust der Zellwachstumskontrolle zur Folge hat. Des Weiteren verlieren diese Zellen ihre Fähigkeit, sich bei irreparablen Schäden in den eigenen, programmierten Zelltod (Apoptose) zu steuern. Die Kombination beider Ereignisse führt zum unkontrollierten Wachstum der Tumorzellen (KNUDSON, 2002). Häufig beobachtet werden Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 sowie des Onkogens des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR).

Die Tumorgenese und die Progression von Gliomen wird durch meist charakteristische Chromosomen- bzw. Genmutationen hervorgerufen. (WESTERMARK UND NISTÉR, 1995; OHGAKI, 2007). In niedriggradigen Astrozytomen sind bereits p53-Mutationen sowie die Überexpression des PDGF-Wachstumsfaktors nachweisbar (HELDIN UND WESTERMARK, 1999; FOMCHENKO UND HOLLAND, 2007). Anaplastische Astrozytome zeigen typischerweise Verluste von Chromosomabschnitten (loss of heterozygosity, LOH) des Chromosoms 19 und des Chromosoms 13, sowie Deletionen des p16-Gens auf Chromosom 9 (JEN ET AL., 1994; VON DEIMLING ET AL., 1994). Die Polysomie des Chromosoms 7, mit der daraus resultierenden Überexpression des EGFR-Gens, sowie Oligosomie am Chromosom 10 wurden vorwiegend bei Glioblastomen festgestellt (HENN ET AL., 1986; BIGNER ET AL., 1988; WATANABE ET AL., 1996; BOSTRÖM ET AL., 1998). Genetische Veränderungen am p16-Gen, Verluste auf Chromosom 19 und der auf Chromosom 10 lokalisierten PTEN- und DMBT1-Gene gelten als Faktoren, die an der Progression zu malignen Gliomen beteiligt sind (VON DEIMLING ET AL., 1994; WALKER ET AL., 1995; MOLLENHAUER ET AL., 1997; BOSTRÖM ET AL., 1998; NAKAMURA ET AL., 2000). Deutliche Unterschiede wurden auch zwischen primären und sekundären Glioblastomen gefunden. Während sich

primäre Glioblastome durch eine EGFR-Überexpression, Deletionen am p16-Gen und dem Verlust der Heterozygotie (LOH) am gesamten Chromosom 10 auszeichnen, zeigen sekundäre Glioblastome, die sich aus niedriggradigen Vorstufen entwickeln, vorwiegend p53-Mutationen (WATANABE ET AL., 1996).

Der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Tumorentstehung, wie beispielsweise Karzinogene, ionisierende Strahlung, elektromagnetische Wellen oder zurückliegende Hirntraumata werden kontrovers diskutiert und können wissenschaftlich momentan nicht eindeutig bewiesen werden (KAPLAN ET AL., 1997; SAVITZ ET AL., 2000; INSKIP ET AL., 2001; CHEN ET AL., 2002; HARDELL ET AL., 2007). Lediglich nach therapeutischer Kopfbestrahlung bei Kindern mit Blutkrebs war eine erhöhte Inzidenz für spätere maligne Gliome nachweisbar. (BRÜSTLE ET AL., 1992).

2.1.1 Nuklearmedizinische Diagnostik von Gliomen

Die Computertomografie (CT) und Magnetresonanztomografie (MRT) werden heutzutage routinemäßig in der Diagnostik von Gliomen eingesetzt. Neben der Schwierigkeit bei der Unterscheidung des Tumors vom umgebenen Ödem, wird die Grenze dieser Methoden bei Tumoren erreicht, die sich gegen das normale Hirngewebe schlecht abgrenzen lassen und keine Störung der Blut-Hirn-Schranke aufweisen. Hierzu gehören in erster Linie niedriggradige Astrozytome, die in den meisten Fällen kein Kontrastmittel aufnehmen. Des Weiteren stellt posttherapeutisch die differentialdiagnostische Sicherung der Hirntumorrezidive eine große Herausforderung für beide Methoden dar. Eine anatomisch-morphologische Differenzierung zwischen Tumorrezidiv und therapiebedingten Veränderungen wie Narben, Abszesse oder Strahlennekrosen bereiten der CT und MRT mitunter große Schwierigkeiten, da diese Gewebsveränderungen kontrastmittelaffin sind (SCHWARZ UND KUWERT, 2000). Die Positronenemissionstomografie (PET) und Einzelphotonenemissionscomputer-tomografie (SPECT) liefern in der Hirntumordiagnostik daher wichtige Zusatzinformationen zur MRT bzw. CT. Die Untersuchung des Glukosestoffwechsels mit [¹⁸F]Fluordeoxyglukose (FDG) in der Positronenemissionstomografie hat sich in den letzten Jahren als wertvolles diagnostisches Verfahren erwiesen und findet breite Anwendung bei der Beurteilung von Hirntumoren. Steigende Malignität hat einen zunehmenden Glukosebedarf der Tumorzellen und damit einhergehend eine steigende FDG-Anreicherung im Tumorgewebe zur Folge. Aufgrund des bereits

hohen Glukosestoffwechsels in gesundem Hirngewebe gestaltet sich jedoch der Nachweis niedriggradiger Gliome und deren Abgrenzung zum gesunden Gewebe mittels FDG-PET häufig problematisch (CHEN, 2007). Auch die Unterscheidung von Rezidiven und nekrotischen Bestrahlungsschäden ruft mit FDG häufig Schwierigkeiten hervor (RICCI ET AL., 1998).

Angesichts der geschilderten Problematik bezüglich der Differenzialdiagnostik, kommen verstärkt radioaktiv markierte Aminosäuren zum Einsatz. Gliomzellen weisen im Vergleich zu nicht tumorösem Gewebe einen erhöhten Aminosäuretransport auf, so dass im Gegensatz zu FDG die Aufnahme von Aminosäuren in gesundem Hirngewebe deutlich niedriger ist als im Tumorgewebe (JAGER ET AL., 2001). Somit ist es möglich niedriggradige Gliome zu diagnostizieren und bessere Aussagen zur Abgrenzung von Tumoren zu treffen, die wegen ihrer Heterogenität auch niedriggradige Bestandteile enthalten können. Des Weiteren ermöglichen diese diagnostischen Aminosäuren zwischen benignem, entzündlichem Gewebe und Tumorgewebe sowie zwischen Rezidivbildung und Bestrahlungsnekrosen zu unterscheiden (JAGER ET AL., 2001; PIROTTE ET AL., 2004; PÖPPERL ET AL., 2004; SAMNICK ET AL., 2002 b; SCHWARZ UND KUWERT, 2000; SONODA ET AL., 1998).

Die Aminosäure [^{11}C]Methionin (MET) ist der am häufigsten eingesetzte Aminosäure-PET-Tracer. Klinische Studien belegen, dass PET-Untersuchungen mit MET eine sichere Tumorabgrenzung und Malignitätsgradbestimmung zulassen und MET somit zur Differenzialdiagnostik gut geeignet ist (MOSSKIN ET AL., 1989; OGAWA ET AL., 1996). Die kurze physikalische Halbwertszeit (HWZ) des ^{11}C von 20 min limitiert den Einsatz von MET jedoch auf nuklearmedizinische Zentren mit eigenem Zyklotron, so dass statt dessen radioaktiv markierte Aminosäuren mit längeren HWZ Anwendung finden. Eine der bekanntesten und sehr häufig eingesetzten Aminosäuren ist der SPECT-Tracer [^{123}I]Iod- α -methyltyrosin (IMT) (HWZ ^{123}I : 13 h). Zusätzlich wurden zahlreiche mit dem Positronenstrahler ^{18}F markierte Aminosäuren entwickelt (HWZ ^{18}F : 110 min). Einige seien nachfolgend genannt: 2- ^{18}F Fluor-L-tyrosin (WIENHARD ET AL., 1991), ^{18}F Fluor-L-phenylalanin (KUBOTA ET AL., 1996), ^{18}F 1-Amino-3-fluorocyclobutan-1-carbonsäure (SHOUP ET AL., 1999), O-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-tyrosin (FET) (Wester ET AL., 1999; WEBER ET AL., 2000, WECKESSER ET AL., 2005). Von den genannten fluorierten Aminosäuren hat FET einen weit verbreiteten Einsatz in der PET-Diagnostik von Hirntumoren gefunden. FET und IMT zeigen ein ähnliches Aufnahmeverhalten. Beide Aminosäuren werden schnell ins Tumorgewebe

aufgenommen, jedoch auch schnell wieder ausgewaschen (PAULEIT ET AL., 2004). Seit den letzten Jahren ist der Positronenstrahler ^{124}I kommerziell verfügbar, somit werden zunehmend auch klinische PET-Untersuchungen mit iodierten Verbindungen möglich (FARMAKIS ET AL., 2008).

In der hiesigen Arbeitsgruppe wurde eine weitere vielversprechende und klinisch inzwischen etablierte Aminosäure, das p -[^{123}I]Iod-L-phenylalanin (^{123}I IPA), für SPECT-Untersuchungen von Tumoren entwickelt (SAMNICK ET AL., 2000; 2001; 2002 a). IPA zeichnet sich im Vergleich zu IMT durch eine deutlich längere Verweildauer im Tumor aus (SAMNICK ET AL., 2000), wodurch die Möglichkeit der SPECT-Untersuchung Stunden nach Applikation bei abgesunkener Hintergrundaktivität besteht. Neben der ^{123}I -Markierung von IPA besteht die Möglichkeit der Radioiodierung mit dem Positronenstrahler ^{124}I . Die Halbwertszeit von ^{124}I (4,2 Tage) und die lange Verweildauer von IPA im Tumor gewährleisten eine zusätzliche postoperative Behandlungskontrolle von Gliomen bei einmaliger Applikation (FARMAKIS ET AL., 2008).

2.1.2 Gegenwärtige Behandlungsmethoden von Gliomen

Die derzeitige Standardbehandlung bösartiger Gliome sieht zunächst eine operative Entfernung des Tumors mit anschließender perkutaner Bestrahlung (RT) und Chemotherapie vor.

Da eine vollständige operative Tumorentfernung infiltrativ wachsender Gliome unmöglich ist, muss ein Kompromiss zwischen maximaler operativer Tumorresektion und minimaler Läsion lebenswichtiger Hirnbereiche gefunden werden (BÉNARD, 2003). Trotz Resektion verbleiben stets Tumorzellen im Hirngewebe, die häufig zu erneutem Tumorwachstum führen. Zusätzlich zur operativen Tumorentfernung kommt daher die perkutane, fraktionierte Bestrahlung zum Einsatz. Um umliegendes gesundes Gewebe nicht zu sehr zu schädigen, ist die Bestrahlungsdosis auf 60 Gy beschränkt (RIVA ET AL., 2000; HENSON, 2006; STUPP ET AL., 2006). Diese Dosis ist jedoch nicht ausreichend, um alle verbliebenen Tumorzellen vollständig zu zerstören, so dass keine vollständige Heilung gegeben ist (RIVA ET AL., 2000). Aus diesem Grund sieht die Standardtherapie nach radikaler Tumorresektion die Kombination aus Strahlen- und Chemotherapie vor. Die am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika bei der Behandlung von Gliomen sind die alkylierenden Substanzen Carmustin, Nimustin, Lomustin und Temozolomid. Des Weiteren werden Mitosehemmer wie z.B. Teniposid angewandt (HAFERKAMP, 2006).

Temozolomid (TMZ) hat sich wegen seiner guten Aufnahme ins Zentrale Nervensystem und seiner relativ guten Verträglichkeit als vielversprechendes Chemotherapeutikum herausgestellt. TMZ bzw. das Methyldiazoniumion eines Hydrolyseproduktes von TMZ methyliert die O6-Position am Guanin, wodurch es bei der DNA-Replikation zur falschen Basenpaarungen kommt, Thymin statt Cytosin eingebaut wird und dies schließlich zu DNA-Schäden bis hin zur Apoptose führt. Die mittlere Überlebenszeit nach Tumorresektion und alleiniger Radiotherapie liegt bei 12 Monaten, die 2-Jahres Überlebensrate bei 10 %. Mit einer zusätzlichen Temozolomidbehandlung steigt die mittlere Überlebenszeit auf 15 Monate und die 2-Jahres Überlebensrate auf 26 % an (STUPP ET AL., 2006).

Aufgrund dieser immer noch unbefriedigenden Therapieerfolge von Gliomen, sind zusätzliche Behandlungsoptionen in der Entwicklung.

In der Radioimmuntherapie werden radioaktiv markierte Antikörper intravenös (i.v.) bzw. intraarteriell (i.a.) verabreicht oder direkt in das Tumorgewebe appliziert. Anti-Tenascin-Antikörper, die an das ausschließlich von malignen Gliomzellen produzierte Glycoproteinantigen Tenascin sowie Anti-EGFR-Antikörper, die an die in Gliomzellen überexprimierten EGF-Rezeptoren binden, werden am häufigsten verwendet. Durch die Antikörper-Antigen-Bindung ist eine lokale Bestrahlung des Tumors unter Schonung des gesunden Gewebes möglich. In der Literatur wird die Radioimmuntherapie vor allem mit ^{131}I und ^{90}Y aber auch mit ^{125}I beschrieben (MIYAMOTO ET AL., 1996; RIVA ET AL., 2000; GOETZ ET AL., 2003; ZALUTSKY, 2005). Erste Ergebnisse wurden kürzlich auch mit ^{211}At vorgestellt (ZALUTSKY ET AL., 2008).

Die Gentherapie stellt eine weitere Behandlungsoption dar. Bei dieser Art der Behandlung wird versucht auf der Basis viralen Gentransfers sogenannte Suizidgene (CULVER ET AL., 1992; IMMONEN ET AL., 2004), Tumorsuppressorgene wie bspw. p53 (LI ET AL., 1999), verschiedene Caspasen (TSURUSHIMA ET AL., 2007; 2008) oder diverse Interleukine (IWADATE ET AL., 2005; DAGA ET AL., 2007) in die Tumorzellen zu übertragen und auf diese Weise zytotoxische Zellschäden hervorzurufen, apoptotische Prozesse zu aktivieren oder die Immunantwort zu stimulieren.

Zahlreiche weitere Therapien zur Behandlung von Hirntumoren sind in der Literatur beschrieben. Beispielhaft seien die Antiangiogenese-Therapie, die die Blutgefäßneubildung an den Tumoren hemmt oder die Photodynamik-Therapie, die nach Aktivierung von Photosensitizern im Tumor, selbigen zerstören sollen, genannt (KUNKEL ET AL., 2001; TÜTTENBERG ET AL., 2005; BECK ET AL., 2007). Des Weiteren

wird an der Inhibierung wichtiger Proteine oder Rezeptoren in Signalwegen oder im Zellzyklus geforscht (BUTOWSKI ET AL., 2006).

Trotz intensiver Forschung konnten bisher keine verbesserten Überlebensraten erzielt werden und so liegen die durchschnittlichen Überlebensprognosen bei einem diagnostizierten Glioblastom bis heute bei etwa 12-15 Monaten und bei einem Anaplastischen Astrozytom bei etwa 25 Monaten (RIVA ET AL., 2000; HENSON, 2006; STUPP ET AL., 2006). Weniger als 3 % der Glioblastompatienten überleben länger als 5 Jahre (OHGAKI ET AL., 2004). Einige der oben aufgeführten Behandlungsstrategien führten zwar im Vergleich zur Standardtherapie zu leicht verlängerten Überlebenszeiten, die bisherigen Ergebnisse sind jedoch weiterhin unbefriedigend, so dass zusätzliche Behandlungsoptionen dringend notwendig sind.

2.1.3 Therapieansatz mit p -[^{131}I]Iod-L-phenylalanin

Die Aminosäure ^{123}I IPA wurde in der hiesigen Arbeitsgruppe für die SPECT-Diagnostik von Hirntumoren entwickelt. IPA zeichnet sich durch eine spezifische Aufnahme in das maligne Gewebe und, im Gegensatz zu IMT, durch eine lange Retentionszeit im Tumor aus. Eine zusätzliche *in vivo* Stabilität von bis zu 24 h nach Injektion (p.i.), bewirkt eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit im Vergleich zum IMT (SAMNICK ET AL., 2000; 2002 a). Der IPA-Transport in die Tumorzellen erfolgt über die Aminosäuretransporter L1 und ASC (SAMNICK ET AL., 2000), die in Tumorzellen überexprimiert sind (ISSELBACHER, 1972; NAWASHIRO ET AL., 2005). Diese Eigenschaften von IPA sowie die Tatsache, dass IPA die intakte Blut-Hirnschranke passiert, eröffneten die Möglichkeit, diese Aminosäure nicht nur zur Diagnostik, sondern auch als Therapeutikum bei der Behandlung von Hirntumoren einzusetzen. Dafür wurde IPA mit dem therapeutisch relevanten β^- -Strahler ^{131}I markiert (^{131}I IPA). Die spezifische Aufnahme von ^{131}I IPA in Tumorzellen und die lange Verweildauer im Tumorgewebe könnte auf diese Weise die gezielte Zerstörung maligner Tumorzellen unter Schonung gesunder Gewebe bewirken.

^{131}I IPA kann zum einen geträgert (*carrier added*, c.a.) und zum anderen als trägerarm (*no carrier added*, n.c.a.) verwendet werden. Geträgert (c.a.) bedeutet, dass ^{131}I IPA im Gemisch mit nicht radioaktiv markiertem IPA vorliegt. Trägerarm (n.c.a.) sagt hingegen aus, dass es sich ausschließlich um ^{131}I IPA ohne nicht radioaktiven Anteil

handelt. Bisherige Untersuchungen bzgl. der Eignung von ^{131}I IPA für die Therapie von Gliomen fanden ausschließlich mit c.a. ^{131}I IPA bzw. dem nicht radioaktiven IPA statt. C.a. ^{131}I IPA zeigte sowohl in *in vitro* Versuchen als auch in ersten *in vivo* Untersuchungen vielversprechende Ergebnisse. C.a. ^{131}I IPA führte in Kombination mit RT zu deutlichen zytotoxischen Effekten an primären humanen Glioblastomzelllinien. *In vivo* konnte die durchschnittliche Überlebenszeit von Ratten mit Glioblastom nach c.a. ^{131}I IPA-Behandlung und RT signifikant gesteigert werden (LEHMANN, 2007; ROMEIKE ET AL., 2004).

Wie bereits erläutert, besteht die Standardtherapie bei Gliomen aus Tumorresektion mit anschließender Strahlen- und Chemotherapie. Eine Erweiterung der Standardtherapie um die ^{131}I IPA-Behandlung, lässt unter Berücksichtigung bisheriger Ergebnisse den Schluss zu, dass die Überlebensrate bei Gliompatienten gesteigert werden kann.

3 Problemstellung und Zielsetzung

Trotz intensiver Forschung, verbesserter chirurgischer Operationstechniken und Fortschritten in der Bestrahlung und Chemotherapie, konnten die Überlebensprognosen von Glioblastompatienten bis heute nicht wesentlich gesteigert werden. Zur Verbesserung und Unterstützung der Diagnostik mittels MRT und CT finden nuklearmedizinische Bildgebungsverfahren wie PET und SPECT in Verbindung mit radioaktiv markierten Aminosäuren in den letzten Jahren immer breitere Anwendung. Radioaktiv markierte Aminosäuren sind dem herkömmlichen FDG-PET in der Hinsicht überlegen, als dass sie Unterscheidungen zwischen Bestrahlungsschäden bzw. gutartigen entzündlichen Geweben und Rezidiven ermöglichen. Des Weiteren ist es mit Aminosäuren möglich, bereits niedriggradige Gliome zu diagnostizieren, wodurch auch eine bessere Tumorabgrenzung höhergradiger Gliome erreicht wird. Neben den etablierten PET- und SPECT-Aminosäuren FET und IMT ist ^{123}I IPA ein weiterer vielversprechender und klinisch etablierter SPECT-Tracer, der in der hiesigen Arbeitsgruppe entwickelt wurde (SAMNICK ET AL., 2000; 2001; 2002 a). IPA zeichnet sich im Vergleich zu IMT durch eine längere Verweildauer im Tumor aus (SAMNICK ET AL., 2000). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass IPA durch seine *in vitro* Stabilität von bis zu 24 h p.i., eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit als IMT aufweist (SAMNICK ET AL., 2002 a). Wegen der hervorragenden diagnostischen Eigenschaften von ^{123}I IPA, bot es sich an, die Testung nicht auf die SPECT-Diagnostik zu beschränken, sondern auch auf die PET-Diagnostik und die therapeutischen Fähigkeiten hin auszuweiten. In diesem Zusammenhang wurde in ersten Untersuchungen IPA mit dem therapeutisch relevanten β^- -Strahler ^{131}I markiert und in ersten Experimenten getestet (LEHMANN, 2007; ROMEIKE ET AL., 2004).

Ziel dieser Arbeit war die präklinische Validierung des therapeutischen Potentials von ^{131}I IPA. Die Untersuchungen sollten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stattfinden, um die Effektivität von ^{131}I IPA allein und in Kombination mit RT sowie mit dem Chemotherapeutikum Temozolomid zu bewerten. Da erste Ergebnisse früherer Untersuchungen auf gesteigerte Zytotoxizitäten von geträgertem c.a. ^{131}I IPA hinwiesen, sollte in dieser Arbeit vor allem mit trägerarmem n.c.a. ^{131}I IPA gearbeitet werden, um eine Abschätzung, bezüglich des ausschließlich durch β^- -Strahlung hervorgerufenen zytotoxischen Effektes, treffen zu können. Im ersten Teil dieser

Arbeit stand die Synthese des Vorläufermoleküls für die Radiomarkierung von n.c.a. ^{131}I IPA, sowie die Etablierung der Radioiodierung im Vordergrund. Die etablierte Radiosynthese sollte auf die Markierung mit dem Positronenstrahler ^{124}I zu n.c.a. ^{124}I IPA angewandt werden, um IPA erstmals als PET-Tracer zur Verfügung stellen zu können. Der zweite Teil beinhaltet die Anwendung von n.c.a. ^{131}I IPA *in vitro* und *in vivo*, sowie die Testung von n.c.a. ^{124}I IPA als PET-Tracer.

Folgende zu bearbeitende Schwerpunkte umfassen diese Arbeit im einzelnen:

- Chemische Synthese der Vorstufe für die n.c.a. $^{124/131}\text{I}$ IPA-Markierung
- Etablierung der Radiomarkierung von n.c.a. $^{124/131}\text{I}$ IPA
- *In vitro* Versuche zur Zytotoxizität von n.c.a. ^{131}I IPA, insbesondere in Kombination mit RT und TMZ
- Erste *in vitro* Vergleiche zwischen n.c.a. ^{131}I IPA und c.a. ^{131}I IPA ziehen
- *In vivo* Versuche zur Überprüfung der Zellkulturergebnisse am Maus- und Rattenmodell
- Erste tierexperimentelle und klinische Tests von n.c.a. ^{124}I IPA als neuen PET-Tracer

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Verwendete Geräte

Aktivimeter	Wellhofer Dosimetrie, Schwarzenbruck, Deutschland
Autoklav	Autoklav 23, Melag oHG, Berlin, Deutschland
Bohr- und Fräsgerät Fräser	Proxxon, Micromot 50 / E, Niersbach, Deutschland Proxxon, Micromot Ø 1 mm 2,35 mm, Niersbach, Deutschland
Brutschrank	Hera cell, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Einfrierbox	Nalgene Cryo Freezing Container, Fisher Scientific, Niderau, Deutschland
Elisa-Reader	Techan GENios Pro, Mainz, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Will Wetzlar, Wetzlar-Naubronn, Deutschland
Objektive	Oel 100 / 1,25, Will Wetzlar, Wetzlar-Naubronn, Deutschland Oel 50 / 0,95, Will Wetzlar, Wetzlar-Naubronn, Deutschland
Okular	8 x P, Will Wetzlar, Wetzlar-Naubronn, Deutschland
Glasgeräte	dem Laborbestand entnommen
Hamilton Spritze	SGE Micro Volume Syringes, Darmstadt, Deutschland
Heizblock	Pierce Reacti Therm, Rockford IL, USA
Heizplatte/Magnetrührwerk	IKA TC2, Staufen, Deutschland
HPLC Shimadzu SPD-10A VP	Shimadzu, Duisburg, Deutschland UV-VIS-Detektor
LC-10AT VP	Pumpsystem
SCL-10A VP	System Controller
HPLC HP1100 γ-Detektor	Hewlett-Packard, Waldbronn, Deutschland Berthold, Wildbad, Deutschland
HPLC-Säule	Nucleosil C18, 250 mm x 4 mm, 5 µm, Latek, Eppelheim, Deutschland
Kryogefäße	Nunc, Roskilde, Dänemark

Kühl-Gefrierschrank	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Lichtmikroskope	Leica DMIL, Solms, Deutschland Carl Zeiss West Germany, Oberkochen, Deutschland
Objektive	40 / Achrostigmat 40 x / 0,55 PH2, Zeiss, Deutschland Leica C Plan 10 x / 0,22 PH1, Solms, Deutschland Plan 2,5 / 0,08, Carl Zeiss West Germany, Oberkochen, Deutschland Neofluor 6,3 / 0,20, Carl Zeiss West Germany, Oberkochen, Deutschland
Okkulare	Leica 10 x / 18, Solms, Deutschland Kpl 10 x, Carl Zeiss West Germany, Oberkochen, Deutschland
MiniUVVIS-Analysenlampe	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
OP-Besteck	dem Klinikbestand des UKS entnommen
PET-Scanner	ECAT-ART PET Scanner (CTI/Siemens) Siemens, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Probenschüttler	IKA MS1 Minishaker, Staufen, Deutschland
Reaktionsgefäße 1 ml (Glas)	Latek, Eppelheim, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml (Kunststoff)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Rotationsverdampfer	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sterilbank	Hera Safe HS 12, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
sterile Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml, Corning Inc., Corning NY, USA
Sterilfilter	0,22 µm Porenweite, Millipore, Carrigtwohill Co Cork, Irland
Stickstoffcontainer	Taylor-Wharton, Theodore AL, USA
Waagen	Kern 440-47N, Kern & Sohn, Balingen, Deutschland Kern 440-35N, Kern & Sohn, Balingen, Deutschland Mettler, Toledo AT 201, Giessen, Deutschland
Wärmeplatte	Medax, Rendsburg, Deutschland

Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Zellkulturflaschen	75 cm ³ mit Filter, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugen	Universal 30F, Hettrich, Tuttlingen, Deutschland Megafuge 2.0R, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
96-Loch-Platten	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
24-Loch-Platten	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
6-Loch-Platten	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
γ -Counter	1480 Wizard, Wallac, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland
γ -Kamera	Multispect II, Siemens, Deutschland

4.1.2 Verwendete Chemikalien und Lösungen

Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Alexa-Fluor-488 goat anti mouse	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Anti-phospho-histone H2A.X	Biomol, Hamburg, Deutschland
Bisbenzimid (Hoechst 33342)	Sigma-Aldrich, Deishofen, Deutschland
Bistributylzinn	Sigma-Aldrich, Deishofen, Deutschland
<i>N</i> -Boc- <i>p</i> -brom-L-phenylalanin	ARCOS Organics, Geel, Belgien
<i>N</i> -Boc- <i>p</i> -iod-L-phenylalanin	Fluka, Buchs, Schweiz
Chloramin-T Trihydrat	Riedel de Haën, Seelze, Deutschland
4,6-Diamidino-2-phenylindoldi-hydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deishofen, Deutschland
Dimethylsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid-D6 mit 0,03 % Tetramethylsilan	ARCOS Organics, Geel, Belgien
DMEM-Zellkulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deishofen, Deutschland

Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (vergällt)	Klinikapotheke des UKW bzw. UKS (99 % Ethanol vergällt mit 1 % Methylethylketon)
Ethylacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, Deishofen, Deutschland
Fötale Kälberserum (FBS Gold)	PAA, Cölbe, Deutschland
Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
n-Hexan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>p</i> -Iod-L-phenylalanin	Sigma-Aldrich, Deishofen, Deutschland
Ketavet	Pharmacia, Karlsruhe, Deutschland
Kieselgel 60-DC-Alufolien	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kieselgel 60 (0,2 mm - 0,5 mm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mounting Medium	Vectashield, Burlingame CA, USA
Mycoblasmentest	VenorGeM, Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
Natriumchlorid (0,9 %)	Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumpentobarbital	Nacoren, Merial, Hallbergmoos, Deutschland
nicht essentielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS (1 x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA, Cölbe, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deishofen, Deutschland
Rompun 2 %	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland
RPMI 1640-Zellkulturmedium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (0)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin / EDTA (1 x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
WST-1 Zellproliferationstest	Roche, Mannheim, Deutschland
[¹²⁴ I]NaI	PET-Zentrum, Universitätsklinikum Essen

[¹³¹ I]NaI	Amersham Healthcare, Braunschweig, Deutschland
Bisbenzimid-Stammlösungen	2 mg/ml in PBS
DAPI-Stammlösung	1 mg/ml in PBS
Einfriermedium	80 % (v/v) Zellkulturmedium 20 % (v/v) DMSO
FBS/PBS-Lösung (1 %)	495 ml PBS 5 ml FBS
Formalin 4 % (v/v)	89,2 ml PBS 10,8 ml Formaldehyd (37 %)
IPA-Stammlösung	2 mg/ml in 0,1 M H ₃ PO ₄
n.c.a. ^{124/131} IPA	siehe Kapitel 4.2.2
c.a. ¹³¹ IPA	siehe Kapitel 4.2.2
Pentobarbital-Narkoselösung	300 µl Natriumpentobarbital (16 g/100 ml) 600 µl 0,9 % NaCl (isotonisch)
Propidiumiodid-Stammlösung	1 mg/ml in PBS
Rompun-Ketavet-Narkoselösung	1 ml Rompun (2 %) 0,75 ml Ketavet (100 mg/ml Ketamin) 8,25 ml 0,9 % NaCl (isotonisch)
Vorstufe für die Radioiodierung	2 mg/ml <i>N</i> -Boc- <i>p</i> -(tri- <i>n</i> -butylstannyl)-L-phenylalanin-methylester in absolutem Ethanol, Lagerung bei -25 °C

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden aus der Klinikapotheke des UKS bzw. UKW bezogen bzw. dem Laborbestand entnommen.

4.1.3 Versuchstiere

Fischer-Ratten (F-344) (männlich) 180-200 g / 7-8 Wochen	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
CD1-nu/nu Mäuse (männlich und weiblich) ca. 20 g / 8 Wochen	Charles River, Sulzfeld, Deutschland

4.2 Methoden

4.2.1 Synthese von *N*-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-*L*-phenylalaninmethylester als Vorstufe für die Radiomarkierung

4.2.1.1 Synthese von *N*-Boc-*p*-iod-*L*-phenylalaninmethylester und *N*-Boc-*p*-brom-*L*-phenylalaninmethylester

2,6 g (6,65 mmol) *N*-Boc-*p*-iod-*L*-phenylalanin (**1a**) bzw. 2,4 g (6,65 mmol) *N*-Boc-*p*-brom-*L*-phenylalanin (**1b**) wurden in 30 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und anschließend mit 0,73 g (8,7 mmol) Natriumhydrogencarbonat und 2,6 ml (27,3 mmol) Dimethylsulfat versetzt. Das resultierende Reaktionsgemisch wurde 40 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurden 90 ml Ethylacetat zur Reaktionslösung gegeben und das Gemisch drei mal mit ca. 30 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung erfolgte mittels Flüssigkeitschromatografie über eine 3,5 cm x 45 cm Säule. Als Laufmittel wurde 50:50 (v:v) Ethylacetat:n-Hexan und als feste Phase Kieselgel 60 (0,2 mm - 0,5 mm, 60 Å) verwendet. Zur Identifizierung und Charakterisierung des entstandenen *N*-Boc-*p*-iod-*L*-phenylalaninmethylesters (**2a**) bzw. *N*-Boc-*p*-brom-*L*-phenylalaninmethylesters (**2b**) kamen Dünnschichtchromatografie, ESI-Massenspektrometrie (ESI-MS) und ¹H-NMR zum Einsatz.

Rf-Werte (25:75 (v:v) Ethylacetat:n-Hexan): (**2a**) 0,56; (**2b**) 0,58

ESI-MS:

(**2a**) [M+H] berech. 406,05; gefund. 406,1 / [M+Na] berech. 428,03; gefund. 428,0

(**2b**) [M+H] berech. 358,7; gefund. 358,9; / [M+Na] berech. 380,5; gefund. 380,0 / [M+H]+[M+Na] berech. 738,11; gefund. 738,0

¹H-NMR (DMSO-d₆):

(**2a**) 7,68 (2H, m, aryl-H); 7,28 (1H, m, NH); 7,05 (2H, m, aryl-H); 4,15 (1H, m, CH); 3,61 (3H, s, O-CH₃); 2,95–2,80 (2H, m, CH₂); 1,29 (9H, s, CH₃)

(**2b**) 7,47 (2H, m, aryl-H); 7,30 (1H, m, NH); 7,20 (2H, m, aryl-H); 4,16 (1H, m, CH); 3,61 (3H, s, O-CH₃); 2,97–2,82 (2H, m, CH₂); 1,28 (9H, s, CH₃)

4.2.1.2 Synthese von *N*-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-*L*-phenylalaninmethylester

1,7 g (4,2 mmol) *N*-Boc-*p*-iod-*L*-phenylalaninmethylesters (**2a**) bzw. 1,5 g (4,2 mmol) *N*-Boc-*p*-bod-*L*-phenylalaninmethylesters (**2b**) wurden in einem ausgeheizten und unter Stickstoffatmosphäre gesetzten Kolben in 25 ml trockenem Toluol gelöst. Anschließend wurden 8,7 ml (17,2 mmol) Bistributylzinn und 82,6 mg (71,4 μ mol) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (0) zugesetzt, das Reaktionsgemisch 10 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend unter Rückfluss erhitzt, wobei die Farbe von orange nach tief schwarz wechselte. Nach 2 h wurde das Reaktionsgemisch abgekühlt, Toluol am Rotationsverdampfer entfernt, die entstandene schwarze, ölige Flüssigkeit in 15 ml *n*-Hexan sowie 5 ml Triethylamin gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, wobei ein schwarzer Niederschlag ausfiel, der anschließend abfiltriert wurde. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und die braune, ölige Flüssigkeit der Reinigung mittels Flüssigkeitschromatografie zugeführt. Dazu wurde eine 3,5 cm x 45 cm Säule und Kieselgel 60 (0,2 mm - 0,5 mm, 60 Å) als feste Phase verwendet. Überschüssiges Bistributylzinn wurde durch ein 5:95 (v:v) Ethylacetat:*n*-Hexan-Lösungsmittelgemisch entfernt. Anschließend wurde die Säule auf das Verhältnis 25:75 (v:v) Ethylacetat:*n*-Hexan umgespült, bei dem das *N*-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-*L*-phenylalaninmethylester (**3**) isoliert werden konnte. Bei der darauffolgenden zweiten Reinigung über HPLC wurde 15:85 (v:v) Ethanol:Wasser als Laufmittel verwendet.

Rf-Wert (25:75 (v:v) Ethylacetat:*n*-Hexan): 0,71

ESI-MS:

[M+H] berech. 570,26; gefund. 570,3

¹H-NMR (DMSO-*d*₆):

7,33 (2H, m, aryl-H); 7,27 (1h, m, NH); 7,19 (2H, m, aryl-H); 4,18 (1H, m, CH); 3,61 (3H s, O-CH₃); 2,89 (2H, m, CH₂); 1,48 (6H, m, CH₂); 1,26 (15H, m, CH₃/CH₂); 1,01 (6H, m, CH₂); 0,84 (9H, m, CH₃)

Zur Überprüfung der Stabilität von **3** wurden ca. 70 μ l der gelagerten Tributylzinnverbindung chromatografiert und das Chromatogramm mit dem nach der Reinigung von **3** verglichen.

4.2.2 Radiosynthese von p -[$^{124/131}$ I]Iod-L-phenylalanin

80 μ g *N*-Boc- p -(tri-*n*-butylstannyl)-L-phenylalaninmethylester (**3**) in 40 μ l Ethanol wurden am Tag der Synthese in ein konisches 1 ml Reaktionsgefäß gefüllt und nacheinander zügig mit 5 μ l 1 M HCl, 10 μ l (5,33 mM) Chloramin-T Trihydrat (CAT) und 40 μ l -100 μ l 0,01 M [$^{124/131}$ I]Natriumiodid (150 MBq - 1500 MBq) versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde verschlossen und die Reaktion für 5 min bei Raumtemperatur ablaufen gelassen.

Direkt im Anschluss wurden 30 μ l Trifluoressigsäure (TFA) zugegeben und die Reaktionslösung 10 min auf 100 °C erhitzt. Nach fünfminütiger Abkühlung wurden 30 μ l 10 M NaOH zugegeben und die Reaktionslösung 20 min auf 100 °C erhitzt. Nach erneuten 5 min Abkühlung wurde das Produktgemisch mittels HPLC gereinigt. n.c.a. p -[$^{124/131}$ I]Iod-L-phenylalanin (**4**) eluierte nach 18 min bei 1,2 ml/min Flussgeschwindigkeit und unter Verwendung eines Laufmittels der Zusammensetzung 89:10:1 (v:v:v) Wasser:Ethanol:Essigsäure.

Nach der Synthese wurde die Aktivität gemessen und die n.c.a. $^{124/131}$ IPA-Lösung mit PBS gepuffert. Für Zellkulturexperimente wurde die gepufferte Lösung mit Medium und für *in vivo* Untersuchungen mit isotonischer Kochsalzlösung auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt und steril filtriert. Zur Herstellung von c.a. 131 IPA wurden zu 25 MBq n.c.a. 131 IPA 10 μ l inaktive IPA-Stammlösung gegeben. Pufferung, Verdünnung und Sterilfiltration erfolgten wie bei n.c.a. 131 IPA.

4.2.3 Zellbiologische Arbeitsmethoden

4.2.3.1 Zelllinien

In Tabelle 4.1 sind alle untersuchten Zelllinien, die verwendeten Zellkulturmedien und die Herkunft der Zelllinien aufgeführt.

Tabelle 4.1: Verwendete Zellkulturmedien und Herkunft der untersuchten Zelllinien.

Zelllinie	Kulturmedien + Zusätze	Herkunft
A1207	Medium: RPMI 1640 300 mg/l L-Glutamin Zusätze: 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin	primär humane Glioblastomzelllinie ATCC, Manassas VA, USA
T3868	Medium: DMEM 4,5 g/l Glukose + 584 mg/l L-Glutamin Zusätze: 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin 2 mM Glutamax	primär humane Glioblastomzelllinie Etabliert am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums des Saarlandes
T6217	Medium: DMEM 4,5 g/l Glukose + 584 mg/l L-Glutamin Zusätze: 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin	primär humane Glioblastomzelllinie ATCC, Manassas VA, USA
F98	Medium: DMEM 4,5 g/l Glukose + 584 mg/l L-Glutamin Zusätze: 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamax	Rattenglioblastomzelllinie, ATCC, Manassas VA, USA

4.2.3.2 Auftauen der Zellen

Ein Kryoröhrchen wurde dem Stickstofftank entnommen, in einem 37 °C warmen Wasserbad angetaut und die Zellsuspension zügig in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei 1600 U/min für 5 min zentrifugiert und das DMSO-haltige Medium verworfen. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert, in eine 75 cm³ Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C, 5 % CO₂-Anteil sowie wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

4.2.3.3 Zellpassagierung

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37 °C, unter wasserdampfgesättigter und 5 %iger CO₂-Atmosphäre, kultiviert und die Passage sämtlicher Zelllinien alle 3 – 4 Tage durchgeführt. Hierbei wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA überschichtet. Die Kulturflasche wurde vorsichtig geschwenkt bis der gesamte Flaschenboden benetzt war. Überschüssiges Trypsin/EDTA wurde entfernt und die Zellen je nach Zelllinie bei 37 °C 2 - 5 min inkubiert. Trypsin/EDTA wurde mit 3 ml Medium inaktiviert und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Niederpipettieren vom Flaschenboden gelöst. Je nach Zelllinie wurden die Zellen 1:3 / 1:4 (T3868), 1:5 / 1:6 (T6217, A1207) sowie 1:30 (F98) verdünnt und in neuen Zellkulturflaschen ausgesät. Sämtliche Zelllinien waren mykoplasmenfrei und wurden regelmäßig diesbezüglich getestet.

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer.

4.2.3.4 Einfrieren von Zellen

Die exponentiell wachsenden Zellen wurden wie oben (Kapitel 4.2.3.3) beschrieben trypsiniert und mit frischem Medium vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei 1600 U/min 5 min zentrifugiert und in 0,75 ml eiskaltem FBS pro abgelöster Flasche resuspendiert. Pro Zellkulturflasche wurde ein Kryoröhrchen auf Eis gestellt und mit je 0,75 ml der FBS-Zellsuspension befüllt. Direkt im Anschluss wurden die Kryoröhrchen mit 0,75 ml eisgekühltem Einfriermedium aufgefüllt, gut durchmischt und in einer Einfrierbox auf –80 °C langsam abgekühlt. Am darauffolgenden Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

4.2.4 *In vitro* Versuche

In Vorversuchen wurde für jede Zelllinie und jedes verwendete Kulturgefäß je nach Versuchsbedingungen die optimale Zellzahl bestimmt. Sämtliche Inkubationen fanden in einem Inkubator bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre statt.

Die Bestrahlungsplanung und die Bestrahlung der Zellen wurde in der Klinik für Strahlentherapie der Universitätsklinik des Saarlandes bzw. der Strahlentherapie des Universitätsklinikums Würzburg vorgenommen.

Bei allen *in vitro* Versuchen wurden folgende Gruppeneinteilungen gewählt:

- Kontrolle keine Behandlung
- ¹³¹IPA verschiedene Konzentrationen
- RT verschiedene Dosen
- ¹³¹IPA + RT Kombination beider Einzelbehandlungen

Wurden die Zellen zusätzlich mit TMZ behandelt, kamen folgende Untersuchungsgruppen hinzu:

- TMZ 20 µM
- TMZ + ¹³¹IPA Kombination beider Einzelbehandlungen
- TMZ + RT Kombination beider Einzelbehandlungen
- TMZ + ¹³¹IPA + RT Kombination aller drei Einzelbehandlungen

4.2.4.1 Untersuchung der Zellproliferation

Theoretischer Hintergrund

Die Zellproliferation und –viabilität kann mit Hilfe verschiedener Messmethoden bestimmt werden. Häufig bedient man sich des Einbaus tritiummarkierten Thymidins oder fluoreszenzmarkierter Nukleinsäurebasen wie z.B. BrdU in die Zell-DNA. Alternativ dazu wird häufig die Stoffwechselaktivität bestimmt, die als indirekter Nachweis für die Zellproliferation gilt. Das hellrote WST-1 gehört zur Klasse der Tetrazoliumsals, die von metabolisch aktiven Zellen in den Mitochondrien zu tiefrotem Formazan reduziert werden. Je höher die Zahl viabler Zellen, desto mehr Tetrazolium wird in Formazan umgewandelt. Dies wiederum spiegelt sich in einer verstärkten Rotverfärbung des Mediums wieder, die photometrisch bei 420 nm - 480 nm gemessen wird. Die Wellenlänge der Referenzmessung liegt bei > 600 nm. Die gemessene Absorption ist direkt proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen und kann als indirektes Maß für die Zellproliferation herangezogen werden.

Praktische Durchführung

In 96-Loch-Platten wurden je nach Zelllinien 2000 - 4000 Zellen/Loch ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und frisches Medium aufgefüllt. Zu den Zellen, die mit Temozolomid behandelt wurden, wurde frisch hergestelltes TMZ mit einer Endkonzentration von 20 μM zugegeben. Sechs Stunden später wurde das Medium gewechselt und die Zellen erneut mit frischem TMZ gleicher Konzentration behandelt. 18 h später wurde wie zuvor eine dritte Temozolomidbehandlung durchgeführt, bevor wiederum 1 h später die n.c.a. ^{131}IPA - bzw. c.a. ^{131}IPA -Behandlung erfolgte. Dazu wurde erneut das Medium durch frisches ersetzt und anschließend frisch synthetisiertes n.c.a. ^{131}IPA bzw. c.a. ^{131}IPA verschiedener Konzentrationen auf die Zellen der n.c.a./c.a. ^{131}IPA -Behandlungsgruppen gegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen der perkutanen Bestrahlungsgruppen mit 2 Gy, 5 Gy, 10 Gy bzw. 20 Gy bestrahlt und weitere 24 h bzw. 48 h später die Zellproliferation mittels WST-1 getestet. Dazu wurde direkt vor dem Test das alte Medium verworfen, durch 90 μl frisches ersetzt und 10 μl WST-1 hinzu pipettiert. Der Test wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die folgenden Zustände wurden untersucht:

- | | |
|---|---|
| ▪ Kontrolle | keine Behandlung |
| ▪ n.c.a./c.a. ^{131}IPA | 4, 9, 19, 37 und 74 kBq/ml |
| ▪ 3 x TMZ | 20 μM |
| ▪ RT | 2 Gy, 5 Gy, 10 Gy und 20 Gy |
| ▪ n.c.a./c.a. ^{131}IPA + RT | Kombination beider Einzelbehandlungen |
| ▪ TMZ + n.c.a./c.a. ^{131}IPA | Kombination beider Einzelbehandlungen |
| ▪ TMZ + RT | Kombination beider Einzelbehandlungen |
| ▪ TMZ + n.c.a./c.a. ^{131}IPA + RT | Kombination aller drei Einzelbehandlungen |

4.2.4.2 Untersuchungen zum Zellwachstum, zur Apoptose und Nekrose

Theoretischer Hintergrund

Zur Beurteilung des Wachstums sowie der Apoptose- und Nekrotestadien von Zellen können die Fluoreszenzfarbstoffe Bisbenzimid (Höchst 33342) und Propidiumiodid verwendet werden.

Der Farbstoff Bisbenzimid durchdringt aufgrund seiner Lipophilie die intakte Zellmembran und bindet an A-T reiche DNA-Doppelstrang-Sequenzen ohne zu

interkalieren. Die Aufnahme in die Zellen erfolgt sowohl aktiv als auch passiv. Die Anregungswellenlänge (λ_{ex}) liegt bei 356 nm, die Emissionswellenlänge (λ_{em}) bei 418 nm. Mit Bisbenzimid können vor allem lebende und primär-apoptotische Zellen nachgewiesen werden, deren Zellmembran noch intakt ist.

Bei Propidiumiodid handelt es sich um einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der von Zellen mit intakter Zellmembran ausgeschlossen wird. Propidiumiodid ($\lambda_{\text{ex}} = 540 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$) ist daher zum Nachweis nekrotischer, membrangeschädigter Zellen geeignet. Nehmen Zellen beide Farbstoffe auf, so ist dies ein Nachweis für sekundär-nekrotische Zellen, Zellen, die sich in einem fortgeschrittenen Apoptosestadium befinden.

Praktische Durchführung

In 24-Loch-Platten wurden je nach Zelllinie 20.000 - 25.000 Zellen/Loch ausgesät und 24 h später mit 1 ml frischem Medium und n.c.a. ^{131}I PA bzw. c.a. ^{131}I PA verschiedener Konzentrationen versetzt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen der Bestrahlungsgruppen mit 5 Gy bzw. 20 Gy bestrahlt und erneut 24 h bzw. 48 h später mit Propidiumiodid und Bisbenzimid behandelt. Altes Medium wurde von den Zellen entfernt und mit 500 μl frischem Medium, das sowohl 2 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid als auch 2 $\mu\text{g/ml}$ Bisbenzimid enthielt, versetzt.

Nach ca. 15 min Inkubationszeit wurden an einem inversen Fluoreszenzmikroskop pro Loch zehn Ausschnitte fotografiert, wobei von jedem Ausschnitt eine Aufnahme unter Verwendung eines DAPI-Filters (Bisbenzimid) und eine Aufnahme unter Zuhilfenahme eines TRICT-Filters (Propidiumiodid) erfolgte. Die Zellen jedes Bildes wurden gezählt. Die Arbeitsschritte, bei denen mit Propidiumiodid und Bisbenzimid gearbeitet wurde, fanden im Dunkeln statt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Untersucht wurden die folgenden Parameter:

- | | |
|--|---------------------------------|
| ▪ Kontrolle | keine Behandlung |
| ▪ n.c.a./c.a. ^{131}I PA | 4 kBq, 19 kBq, 74 kBq/ml |
| ▪ RT | 5 Gy, 20 Gy |
| ▪ n.c.a./c.a. ^{131}I PA + RT | Kombination beider Behandlungen |

4.2.4.3 Bestimmung induzierter DNA-Doppelstrangbrüche mittels γ -H2AX-Foci-Methode

Theoretischer Hintergrund

Das H2AX-Protein ist eines von drei Subtypen der Histonproteinfamilie H2A, die mit drei weiteren Histonproteinfamilien die nukleosomalen Histonproteine aufbauen.

Ionisierende Strahlung induziert DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB), in deren Umgebung H2AX-Proteine am Serin-139 phosphoryliert werden. Die phosphorylierte Variante des H2AX wird als γ -H2AX bezeichnet und kann immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Der primäre Antikörper (Anti- γ -H2AX) bindet ausschließlich am phosphorylierten H2AX-Protein, der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper wiederum am primären Antikörper. Die mikroskopisch nachweisbaren Fluoreszenz-Signale werden als Foci bezeichnet und korrelieren mit der Anzahl der DNA-DSB und mit der applizierten ionisierenden Strahlendosis (ROGAKOU ET AL., 1998; 1999).

Praktische Durchführung

In 24-Loch-Platten wurden 55000 Zellen von A1207 bzw. 75000 Zellen T3868 auf Glasdeckgläschen ausgesät und 48 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das alte Medium durch frisches ersetzt und die Zellen, die einer TMZ-Behandlung unterzogen wurden, mit 20 μ M TMZ behandelt. 1 h später wurde das alte Medium erneut verworfen, durch frisches ersetzt und die Zellen der 131 IPA-Behandlungsgruppen mit 150 kBq frisch hergestelltem n.c.a. 131 IPA bzw. c.a. 131 IPA behandelt. Nach 24 h wurde das Medium erneuert, die Zellen in den Bestrahlungsgruppen direkt im Anschluss mit 0,1 Gy bzw. 1 Gy bestrahlt. Die zellbewachsenen Deckgläschen wurden 15 min bzw. 2 h, 4 h, 8 h, 16 h und 24 h nach Bestrahlung bzw. Entfernung des 131 IPA-haltigen Mediums für 30 min in Methanol bei -20 °C fixiert und anschließend 1 min bei -20 °C in Aceton permeabilisiert. Die Deckgläschen wurden zweimal je 10 min und ein mal 30 min mit PBS/FBS gewaschen, mit 40 μ l 1:800 verdünnter primärer Antikörper-Lösung überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen vier Mal mit PBS/FBS jeweils 10 min gewaschen und anschließend für eine Stunde mit 80 μ l 1:500 verdünnter sekundärer Antikörper-Lösung im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen vier Mal für je 10 min mit PBS gewaschen und die

Zellkerne hinterher 3 min in 0,2 µg/ml DAPI in PBS gefärbt. Nachdem die Deckgläschen anschließend 2 min in PBS gewaschen wurden, wurden sie mit dem Zellrasen in Mounting-Medium auf Objektträger gelegt und am darauffolgenden Tag mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Ab dem Zeitpunkt der Inkubation mit dem sekundären Antikörper, wurden alle Arbeitsschritte im Dunkeln ausgeführt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden. Bei der Foci-Zählung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden mindestens 70 Zellen und mindestens 70 Foci gezählt. Folgende Zustände wurden untersucht:

- | | |
|---|---|
| ▪ Kontrolle | keine Behandlung |
| ▪ n.c.a./c.a. ¹³¹ IPA | 150 kBq/ml |
| ▪ RT | 0,1 Gy, 1 Gy |
| ▪ n.c.a./c.a. ¹³¹ IPA + RT | Kombination beider Einzelbehandlungen |
| ▪ 1 x TMZ | 20 µM |
| ▪ TMZ + RT | Kombination beider Einzelbehandlungen |
| ▪ TMZ + n.c.a./c.a. ¹³¹ IPA | Kombination beider Einzelbehandlungen |
| ▪ TMZ + n.c.a./c.a. ¹³¹ IPA + RT | Kombination aller drei Einzelbehandlungen |

4.2.5 *In vivo* Versuche

Alle Tierversuche die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, waren von der örtlichen Polizeibehörde des Saar/Pfalz-Kreises (AZ: K110/180-07,2006) sowie der Regierung Unterfranken genehmigt (AZ: 55.2-2531.01-18/08).

Für die Tierversuche wurden zum einen CD-1 nu/nu Mäuse und zum anderen F344-Fischer-Ratten verwendet. Bei den CD-1 nu/nu Mäusen handelt es sich um immundefiziente Nacktmäuse, die nicht in der Lage sind T-Zellen zu produzieren, bei den Fischer-Ratten um in Inzucht gehaltene Albinoratten ohne Immundefizienz.

Alle Tiere waren in der zentralen Versuchstierhaltung des UKS, in der Abteilung der klinisch-experimentellen Chirurgie bzw. im Tierstall der Neurologie des UKW, untergebracht (Tierschutzbeauftragte UKS: Frau Dr. med. vet. M. Frings, Tierschutzbeauftragter UKW: Herr Dr. med. vet. W. Geise).

Die heterotope Tumorumplantation an den Mäusen fand in den Laboratorien der klinischen-experimentellen Chirurgie des UKS, die orthotope Tumorumplantation bei den Ratten im Institut für experimentelle Neurochirurgie des UKS bzw. in den

Laboratorien der Neurologie des UKW, statt. Die Bestrahlungsplanung und die Bestrahlung der Tiere wurde in der Klinik für Strahlentherapie des UKS bzw. im Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung des UKW durchgeführt.

4.2.5.1 Tumorimplantation

Implantation bei CD-1 nu/nu Mäusen

Etwa acht Wochen alten CD-1 nu/nu Mäusen (19 g - 20 g) wurden subkutan, heterotop 2×10^6 - $2,5 \times 10^6$ Zellen T3868 bzw. 5×10^6 Zellen A1207 in jeweils 100 μ l PBS in die rechte Flanke im Wachzustand implantiert. Das Tumorstadium wurde wöchentlich begutachtet. Die Behandlung begann nach ca. drei Wochen, wenn die Tumoren einen Durchmesser von etwa 0,4 cm - 0,6 cm erreicht hatten.

Implantation bei Fischer-Ratten

Sieben bis acht Wochen alten Fischer-Ratten (180 g - 200 g) wurde die Rattenglioblastomzelllinie F98 stereotaktisch, orthotop in die rechte Hirnhälfte implantiert. Die Ratten wurden mit 6 mg Natriumpentobarbital je 100 g Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) narkotisiert und im Stereotaxiegerät positioniert. Anschließend wurde mit einem ca. 2 cm - 2,5 cm langen, sagittalen Schnitt die Kopfhaut so aufgeschnitten, dass die Bregma (der Schnittpunkt von Sutura coronalis und Sutura sagittalis) gut zugänglich war. Mit einem Spatel wurde die Knochenhaut vom Schädel entfernt und, ausgehend von der Bregma, die Implantationsstelle mit folgenden Koordinaten markiert: 2 mm rechts nach parietal, danach 2 mm nach frontal. An der markierten Stelle wurde mit einem Bohrer die Schädeldecke durchbohrt und anschließend 1×10^6 bzw. 1×10^4 Zellen F98 in 5 μ l PBS mit Hilfe einer Hamilton-Spritze 5 mm tief in das Gehirn implantiert. Das Loch im Schädel wurde mit Knochenwachs verschlossen und die Kopfhaut genäht. Sieben Tage nach dem operativen Eingriff wurde mit der Behandlung des Tumors begonnen.

4.2.5.2 Tumorbehandlung mit n.c.a. p -[131 I]Iod-L-phenylalanin

Am Behandlungstag wurde n.c.a. 131 IPA aus der Vorstufe *N*-Boc-4-(tri-*n*-butylstannyl)-L-phenylalaninmethylester frisch synthetisiert, gereinigt sowie mit PBS neutralisiert und anschließend steril filtriert. Dabei war darauf zu achten, dass der Ethanolanteil in der n.c.a. 131 IPA-Lösung auf etwa 2 % - 3 % gesenkt wurde.

Die zu behandelnden Tiere wurden zufällig in eine der vier nachfolgend aufgeführten Gruppen eingeteilt.

- Kontrolle keine Behandlung
- n.c.a. ^{131}I PA Ratte: 20 ± 3 MBq pro Tier
Maus: 10 ± 2 MBq pro Tier
- RT Ratte: 4 Gy am Kopf bzw.
2 x 4 Gy am Kopf
Maus: 20 Gy an der Flanke
- n.c.a. ^{131}I PA + RT Kombination beider Einzelbehandlungen

Behandlung der CD-1 nu/nu Mäuse

Vor der Behandlung wurden die Mäusen pro 10 g Körpergewicht mit 0,2 mg Rompun / 0,75 mg Ketamin i.p. narkotisiert.

Den Mäusen wurden 10 ± 2 MBq n.c.a. ^{131}I PA in maximal 100 μl Volumen intravenös (i.v.) injiziert. Die Mäuse, die die n.c.a. ^{131}I PA + RT-Behandlung bekamen wurden im Anschluss daran einmalig mit 20 Gy perkutan an der rechten Flanke bestrahlt. Tiere der Bestrahlungsgruppe erhielten ausschließlich die perkutane Bestrahlung von 20 Gy an der rechten Flanke. Das Bestrahlungsfeld beschränkte sich ausschließlich auf das Tumervolumen der Flanke.

Die visuelle Tumorkontrolle erfolgte wöchentlich. Verschlechterte sich das Wohlbefinden deutlich oder wuchs der Tumor zu stark, wurden die Tiere getötet.

Behandlung der Fischer-Ratten

Vor der Behandlung wurden die Ratten mit 6 mg Natriumpentobarbital je 100 g Körpergewicht i.p. narkotisiert.

Den Ratten der Gruppen n.c.a. ^{131}I PA bzw. n.c.a. ^{131}I PA + Bestrahlung, wurden 20 ± 3 MBq n.c.a. ^{131}I PA in 200 μl - 300 μl i.v. verabreicht. Die Ratten, die die Kombinationsbehandlung bekamen, wurden anschließend mit 4 Gy am Kopf bestrahlt. Die Ratten der Bestrahlungsgruppe erhielten am selben Tag ausschließlich eine perkutane Bestrahlung von 4 Gy. Das Bestrahlungsfeld beschränkte sich auch hier auf die Kopfregion. Erhielten die Tiere die doppelte Bestrahlungsdosis von 2 x 4 Gy, erfolgte die zweite Bestrahlung am darauffolgenden Tag.

Da der Versuch auf die Bestimmung der Überlebenszeit ausgelegt war, wurde lediglich die physische Konstitution der Tiere in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Ging es einem Tier deutlich schlechter, wurde es euthanasiert. Das Hirn der getöteten oder verstorbenen Tiere wurde in Formalin gelegt und von einem Neuropathologen histopathologisch untersucht.

4.2.5.3 Tumordarstellung mittels SPECT und PET

SPECT-Untersuchung einer CD1 nu/nu-Maus mit n.c.a. ^{131}I PA

Eine Maus mit T3868-Glioblastom wurde vor der Behandlung wie in Kapitel 4.2.5.2 beschrieben narkotisiert. Anschließend wurden einmalig 8 MBq frisch synthetisiertes n.c.a. ^{131}I PA i.v. appliziert und SPECT-Untersuchungen nach 1 h, 24 h, 48 h und 72 h durchgeführt.

PET-Untersuchung am CD1 nu/nu-Maus-Modell

Eine Maus mit A1207-Glioblastom wurde vor der Behandlung wie in Kapitel 4.2.5.2 beschrieben narkotisiert. Anschließend wurden einmalig 5 MBq frisch synthetisiertes n.c.a. ^{124}I PA i.v. appliziert und nach 1 h, 24 h sowie 48 h PET-Scans durchgeführt.

Erste klinische Bewertung von n.c.a. ^{124}I PA

Einem 73 jährigen Patienten mit Glioblastom WHO-Grad IV wurden einmalig 60 MBq frisch synthetisiertes n.c.a. ^{124}I PA i.v. injiziert. 60 min sowie 6 Tage nach Applikation erfolgten PET-Untersuchungen. Die Untersuchungen wurden im Rahmen eines Heilversuches durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 Synthese von *N*-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-L-phenylalaninmethylester als Vorstufe für die Radioiodierung

5.1.1 Synthese von *N*-Boc-*p*-iod-L-phenylalaninmethylester und *N*-Boc-*p*-brom-L-phenylalaninmethylester

N-Boc-*p*-iod-L-phenylalanin (**1a**) bzw. *N*-Boc-*p*-brom-L-phenylalanin (**1b**) wurden unter Verwendung von Dimethylsulfat zu *N*-Boc-*p*-iod-L-phenylalaninmethylester (**2a**) bzw. *N*-Boc-*p*-brom-L-phenylalaninmethylester (**2b**) umgesetzt (Abbildung 5.1). Nach Aufarbeitung und Reinigung der Produkte über Säulenchromatografie kristallisierten im Eisbad **2a** zu einem weißen, pulvrigen und **2b** zu einem weißen, flockigen Feststoff aus.

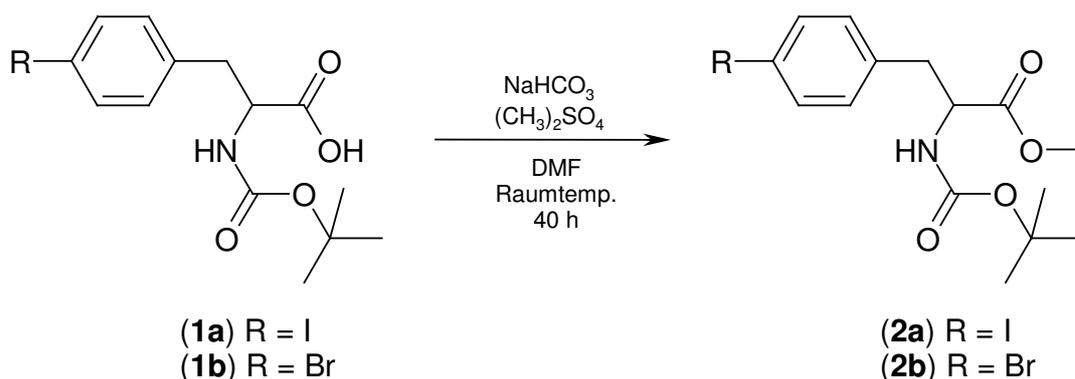


Abbildung 5.1: Reaktionsschema zur Synthese von *N*-Boc-*p*-iod-L-phenylalaninmethylester (**2a**) und *N*-Boc-*p*-brom-L-phenylalaninmethylester (**2b**). DMF: Dimethylformamid

Die Ausbeuten beider Reaktionen lagen bei 66,4 % (**2a**) bzw. 57 % (**2b**). Die Produkte wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ und massenspektrometrisch charakterisiert (vgl. Kapitel 4.2.1.1).

5.1.2 Synthese von *N*-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-*L*-phenylalaninmethylester

N-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-*L*-phenylalaninmethylester (**3**) (auch Precursor genannt) wurde einerseits aus *N*-Boc-*p*-iod-*L*-phenylalaninmethylester (**2a**) und andererseits aus *N*-Boc-*p*-brom-*L*-phenylalaninmethylester (**2b**) mit Bistributylzinn unter Verwendung von Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium (0) als Katalysator synthetisiert (Abbildung 5.2). Die Reinigung erfolgte zunächst über Flüssigchromatografie. Da das isolierte Produkt immer noch Verunreinigungen enthielt, wurde eine zweite Reinigung mit Hilfe der HPLC angeschlossen. Aus beiden Reaktionen resultierte ein farbloses Öl. Die Ausbeute der Synthese aus **2a** betrug 34 % und aus **2b** 37 %. Auch hier erfolgte die Charakterisierung durch $^1\text{H-NMR}$ und Massenspektrometrie (vgl. Kapitel 4.2.1.2).

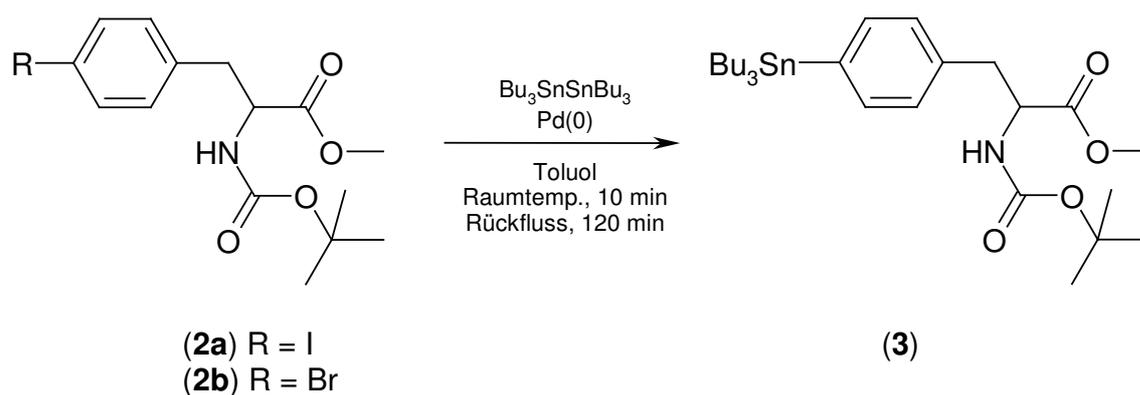


Abbildung 5.2: Reaktionsschema zur Synthese von *N*-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-*L*-phenylalaninmethylester.

Die Tributylzinn-Verbindung (**3**) war während des gesamten Versuchszeitraumes stabil und wurde in Zeiträumen von etwa 2 Monaten mittels HPLC überprüft. Da stets nur ein Peak detektiert wurde, wurde der Precursor als stabil betrachtet. Des Weiteren wurde während des gesamten Versuchszeitraumes keine Verschlechterung der n.c.a. ^{131}I -IPA-Ausbeute festgestellt; dies gilt als weiterer Beweis für die Stabilität von **3**.

5.2 Radioiodierungen

Trägerarmes p -[^{124}I]Iod-L-phenylalanin (n.c.a. ^{124}IPA) und p -[^{131}I]Iod-L-phenylalanin (n.c.a. ^{131}IPA) wurden über elektrophile Substitution der Tributylzinn-Gruppe und unter Verwendung von Chloramin-T (CAT) als Oxidationsmittel, synthetisiert. Direkt im Anschluss wurden zunächst die *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) im sauren und danach die Ester-Schutzgruppe im basischen abgespalten (Abbildung 5.3).

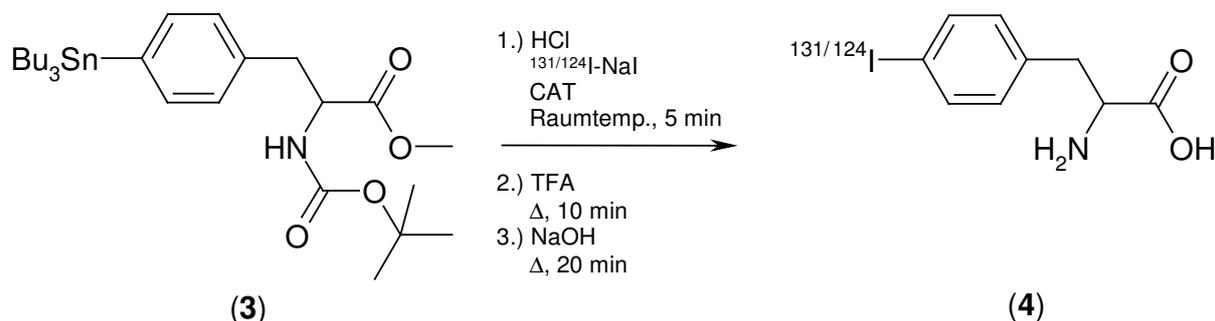


Abbildung 5.3: Reaktionsschema der Radiosynthese von n.c.a. ^{124}IPA bzw. n.c.a. ^{131}IPA . CAT: Chloramin-T, TFA: Trifluoressigsäure

Um eine maximale radiochemische Ausbeute zu erzielen, wurde die Synthese hinsichtlich der Reaktionszeiten, Reagenzienkonzentrationen und Reaktionstemperaturen optimiert.

Folgende Parameter erwiesen sich als optimale Synthesebedingungen:

- 10 μl 1,5 mg/ml Chloramin-T, 5 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur
- 30 μl TFA, 10 min Reaktionszeit bei 100 °C
- 30 μl 10 M NaOH, 20 min Reaktionszeit bei 100 °C

Wurde die Reaktionszeit der Radioiodierung kürzer gewählt, erfolgte keine vollständige Radiomarkierung, wie bei der HPLC-Reinigungen festgestellt wurde. Bei höheren CAT-Konzentrationen (5 mg/ml bzw. 10 mg/ml) verschlechterte sich die Ausbeute drastisch und fiel auf 60 % bzw. unter 40 %. Der Versuch, die Reaktionszeiten der Boc-Entschützung zu verkürzen, führte zu ebenfalls schlechteren Ausbeuten. Kürzere Reaktionszeiten für die Verseifung und niedrigere

NaOH-Konzentrationen hatten zur Folge, dass die Verseifung des Methylesters nicht vollständig ablief und die Ausbeute auf 65 % sank.

Die Radiomarkierung von *N*-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-L-phenylalanin, gewonnen aus einer vorhergehenden Verseifung von **3**, führte nur zu geringen Ausbeuten von unter 30 %. Deshalb wurde entschieden, im ersten Reaktionsschritt die Radiomarkierung und in zwei direkt anschließenden Schritten die Boc- und Methylester-Entschützung durchzuführen. Für die n.c.a. ^{124}I PA-Synthese wurden die für n.c.a. ^{131}I PA optimierten Synthesebedingungen angewandt.

N.c.a. ^{124}I PA bzw. n.c.a. ^{131}I PA wurden mittels HPLC isoliert und durch Co-Elution mit dem nicht radioaktiven, kommerziell erhältlichen Standard IPA identifiziert.

Abbildung 5.4 A zeigt ein Beispiel eines HPLC-Chromatogramms des Reaktionsgemischs mit n.c.a. ^{131}I PA nach Reaktionsende. Nach etwa 16 min - 20 min eluierte n.c.a. ^{124}I PA bzw. n.c.a. ^{131}I PA, das separat gesammelt wurde. In Abbildung 5.4 B ist das Chromatogramm der Co-Elution des gereinigten n.c.a. ^{131}I PA mit nicht radioaktivem IPA dargestellt. Die identischen Elutionszeiten beweisen, dass es sich bei dem gereinigten Reaktionsprodukt um n.c.a. ^{131}I PA handelt. Die variierenden Retentionszeiten von n.c.a. ^{131}I PA in den Chromatogrammen (Abbildung 5.4 A + B) sind auf unterschiedliche Laufmittelchargen und eine zwischenzeitlich neu erworbene HPLC-Säule zurückzuführen. Die Ausbeute der Radioiodierung nach Syntheseoptimierung lag stets bei $90 \pm 6 \%$, die radiochemische Reinheit bei $> 99 \%$ und die spezifische Aktivität bei $\geq 900 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$.

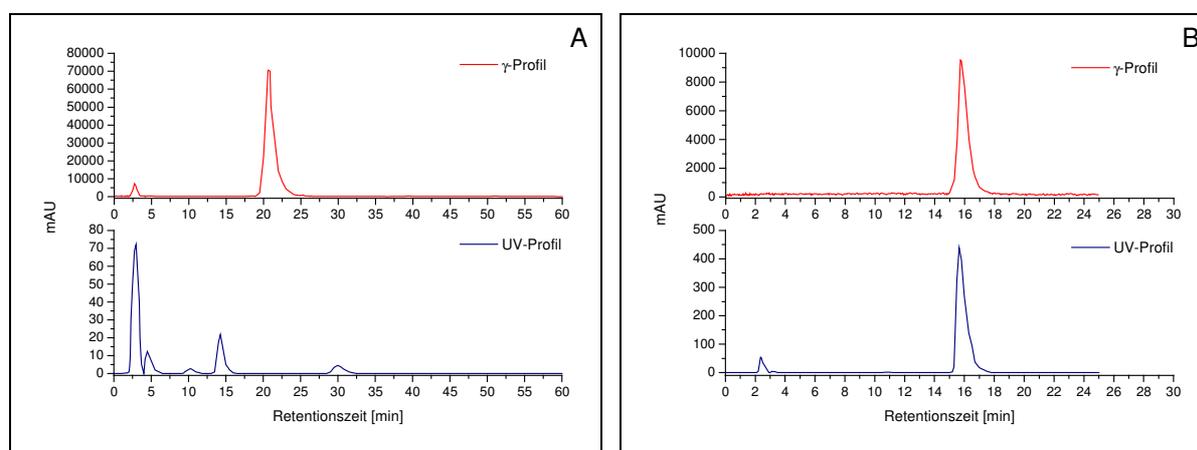


Abbildung 5.4: HPLC-Chromatogramme A: Reaktionsgemisch mit n.c.a. ^{131}I PA, B: Co-Elution von nicht radioaktiv markiertem IPA und n.c.a. ^{131}I PA

Um die *in vitro* Stabilität für spätere Zellversuche zu überprüfen, wurde n.c.a. ^{131}IPA direkt nach der Synthese injektionsfertig gelagert und 24 h später erneut chromatografiert. Das in Abbildung 5.5 dargestellte HPLC-Chromatogramm zeigt keine Metabolite, die auf Instabilität hindeuten. Die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung von n.c.a. ^{131}IPA wurden auf n.c.a. ^{124}IPA übertragen.

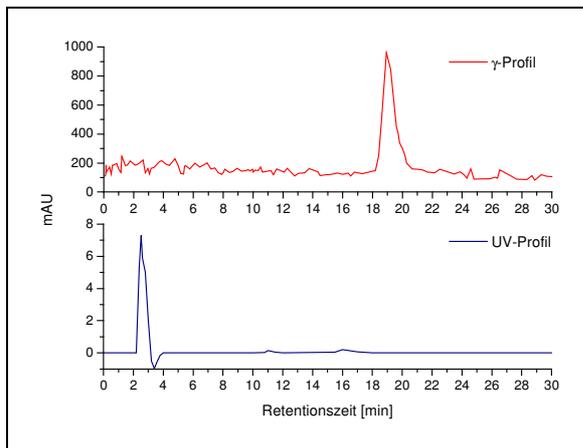


Abbildung 5.5: HPLC-Chromatogramm von n.c.a. ^{131}IPA 24 h nach Lagerung in injektionsfertiger Lösung zur Überprüfung der *in vitro* Stabilität.

5.3 *In vitro* Untersuchungen

Nach der chemischen Synthese des Vorläufermoleküls und dessen Radioiodierung zum n.c.a. ^{131}IPA wurden die Auswirkungen von n.c.a. ^{131}IPA , perkutaner Bestrahlung (RT), Temozolomid (TMZ) sowie deren Kombinationen auf die humanen Glioblastomzelllinien A1207, T3868, T6217 und die Rattenglioblastomzelllinie F98 getestet. Folgende Konzentrationen und Bestrahlungsdosen wurden untersucht.

- n.c.a./c.a. ^{131}IPA 4 Gy – 74 kBq
- RT 2 Gy – 20 Gy
- 3 x TMZ 20 μM
- n.c.a./c.a. ^{131}IPA + RT Kombination beider Einzelbehandlungen
- TMZ + n.c.a./c.a. ^{131}IPA Kombination beider Einzelbehandlungen
- TMZ + n.c.a./c.a. ^{131}IPA + RT Kombination aller drei Einzelbehandlungen

5.3.1 Untersuchung der Zellproliferation

5.3.1.1 Behandlung mit n.c.a. ^{131}IPA sowie c.a. ^{131}IPA

Zunächst wurde die alleinige Wirkung von n.c.a. ^{131}IPA untersucht. Bei A1207 war mit steigender n.c.a. ^{131}IPA -Konzentration eine stetige Verringerung der Proliferationsrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen. Dies ist bereits nach 48 h erkennbar und verstärkt sich 72 h nach der Behandlung (Abbildung 5.6 A). Ein ähnliches Verhalten konnte bei T6217 beobachtet werden. 48 h nach 74 kBq n.c.a. ^{131}IPA -Behandlung sank die Proliferationsrate um ca. 30 %. 72 h nach n.c.a. ^{131}IPA -Behandlung war keine weitere Verstärkung nachweisbar. (Abbildung 5.6 B). Die langsamwachsende Zelllinie T3868 verhielt sich anders als A1207 und T6217. Niedrige n.c.a. ^{131}IPA -Konzentrationen zeigten keinerlei Wirkung. Die Zellen verhielten sich wie die unbehandelte Kontrolle. Erst bei 74 kBq n.c.a. ^{131}IPA war sowohl nach 48 h als auch nach 72 h eine deutliche Absenkung der Proliferationsrate um etwa 50 % zu beobachten (Abbildung 5.6 C). Auf die Rattenglioblastomzelllinie F98 übte n.c.a. ^{131}IPA kein Einfluss aus. Sowohl 48 h als auch 72 h nach n.c.a. ^{131}IPA -Behandlung waren keine Änderung in der Proliferation erkennbar (Abbildung 5.6 D).

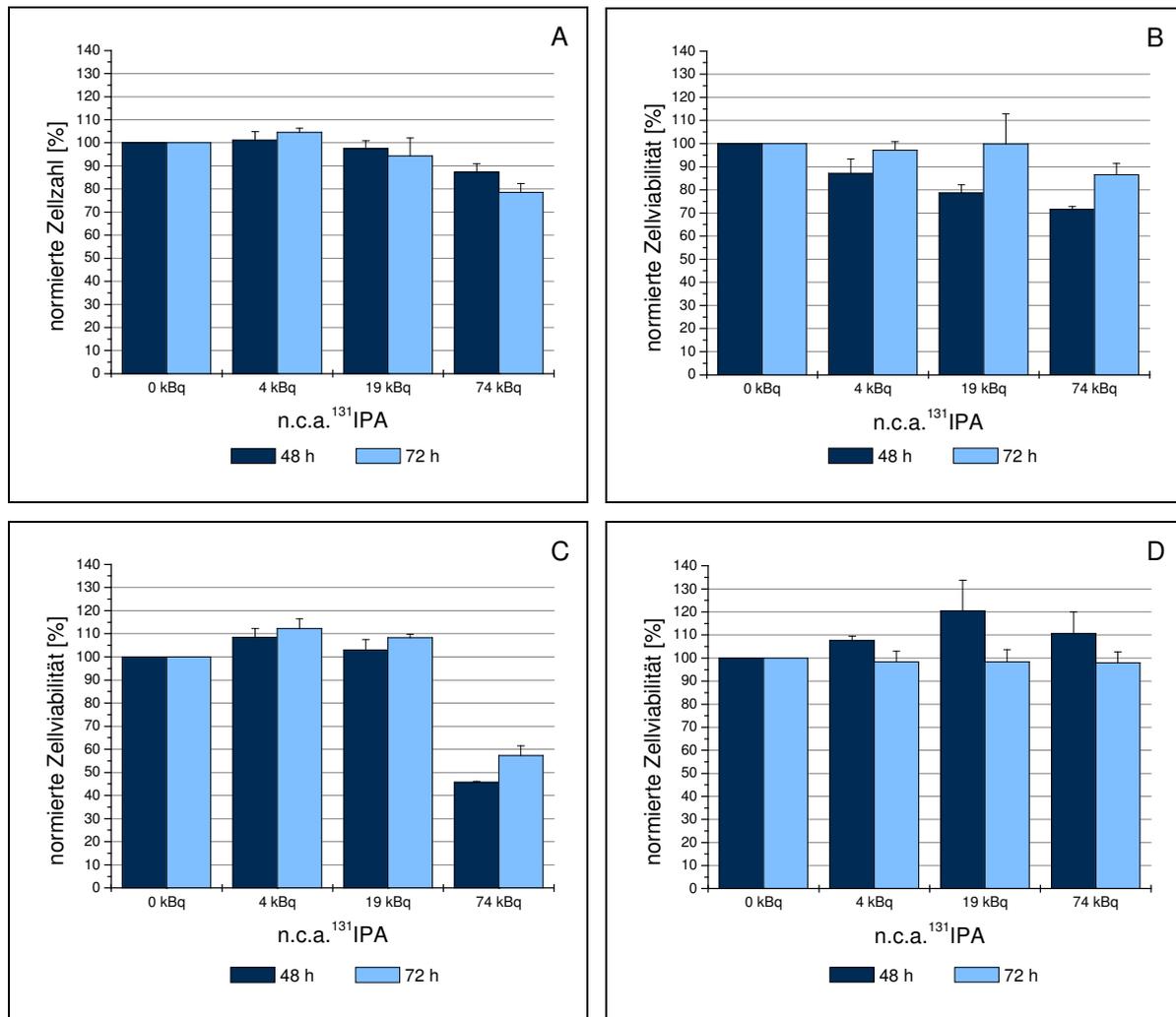


Abbildung 5.6: Zellproliferation 48 h und 72 h nach Behandlung mit n.c.a. ¹³¹I-IPA. A: A1207, B: T6217, C: T3868, D: F98

In fortführenden Untersuchungen wurde trägerarmes ¹³¹I-IPA (n.c.a. ¹³¹I-IPA) mit geträgertem ¹³¹I-IPA (c.a. ¹³¹I-IPA) verglichen. Bei keiner Zelllinie konnte ein Einfluss des Trägermaterials (nicht radioaktiv markiertes IPA) auf die Zellviabilität nachgewiesen werden. Weder 48 h noch 72 h nach Behandlung waren signifikante Unterschiede erkennbar. Exemplarisch sind die Ergebnisse in Abbildung 5.7 A + B anhand der Zelllinien A1207 und T6217 dargestellt.

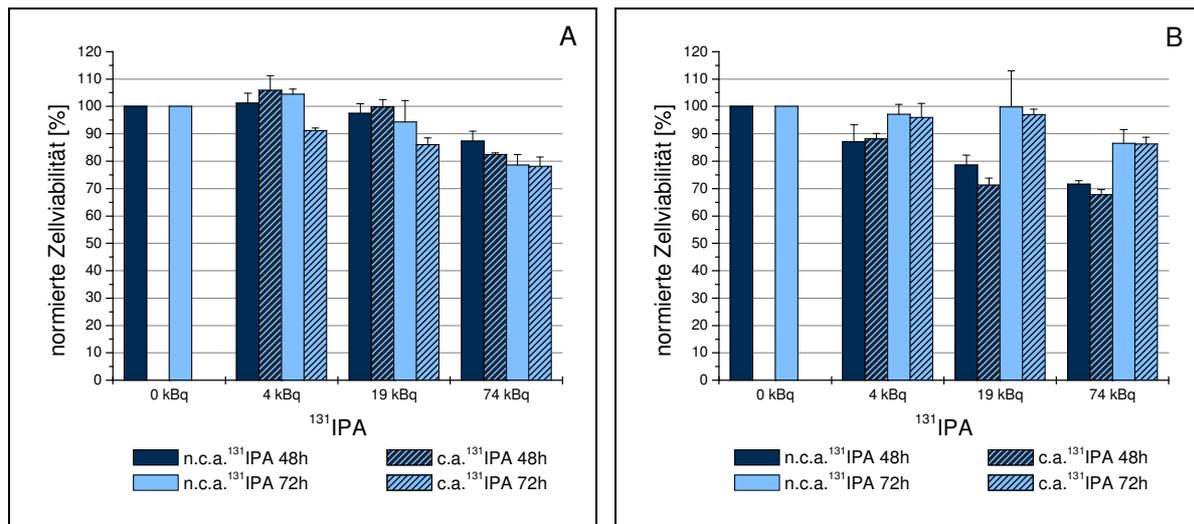


Abbildung 5.7: Vergleichsuntersuchungen der Zellproliferation zwischen n.c.a. ¹³¹I-PA und c.a. ¹³¹I-PA 48 h und 72 h nach Behandlung. A: A1207, B: T6217

5.3.1.2 Perkutane Bestrahlung

Im Folgenden werden die Ergebnisse nach alleiniger perkutaner Bestrahlung der Zellen dargestellt. Zwischen den einzelnen Zelllinien konnten wesentliche Unterschiede bezüglich ihrer Strahlensensitivität beobachtet werden. Bei A1207 senkte lediglich eine Bestrahlungsdosis von 2 Gy die Zellproliferation ab. Eine steigende Bestrahlungsdosis hingegen übte keinen weiteren Einfluss mehr auf die Proliferationsrate aus. Sie fiel 48 h nach Bestrahlung um etwa 20 % und nach 72 h um ca. 30 %, verglichen mit den unbehandelten Kontrollen. (Abbildung 5.8 A) Bei der Zelllinie T6217 war ein kontinuierliches Absinken der Proliferationsrate nach Bestrahlung mit 2 Gy und 5 Gy im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten. Die Viabilität sank nach 48 h um 28 % und nach 72 h um 31 %. Höhere Bestrahlungsdosen von 10 Gy und 20 Gy hatten ebenfalls eine Viabilitätssenkung zur Folge, allerdings nicht so stark wie bei den niedrigen Dosen von 2 Gy und 5 Gy und so war im Vergleich dazu wieder eine Erhöhung der Zellproliferation zu verzeichnen (Abbildung 5.8 B). Ähnliches war auch bei der Zelllinie T3868 zu erkennen. Bis 5 Gy konnte eine maximale Viabilitätssenkung auf 73 % nach 48 h und auf etwa 85 % nach 72 h beobachtet werden. 10 Gy und 20 Gy bewirkten auch hier wieder eine Steigerung der Proliferationsrate (Abbildung 5.8 C). Auf die Rattenglioblastomzelllinie hatte die perkutane Bestrahlung den stärksten Einfluss, der sich besonders 72 h nach Behandlung zeigte. 2 Gy regten die Zellproliferation an, so

dass die Viabilität anstieg. Höhere Bestrahlungsdosen von 5 Gy - 20 Gy führten jedoch zu deutlichen Senkungen der Zellviabilität um über 50 % (Abbildung 5.8 D).

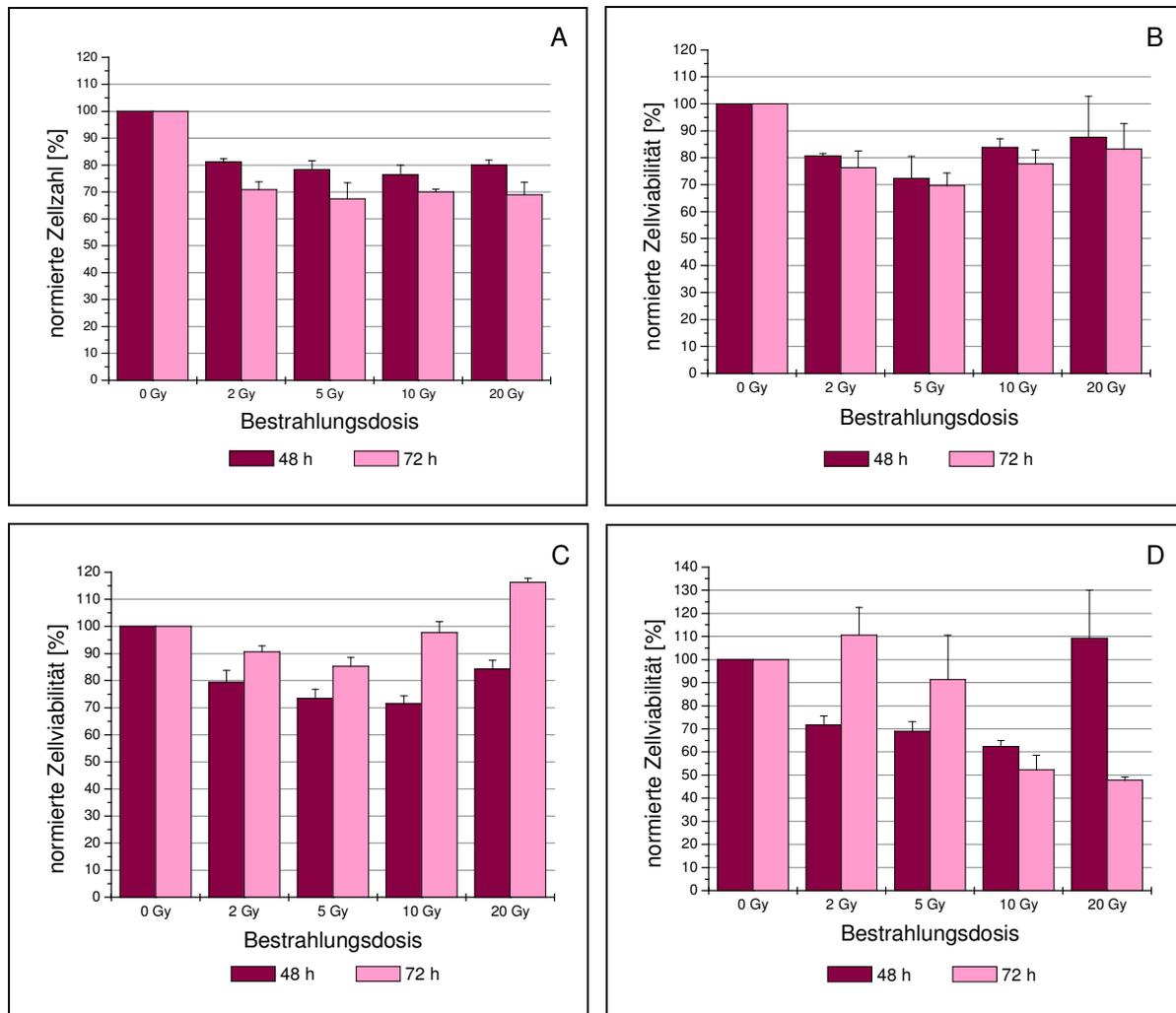


Abbildung 5.8: Zellproliferationstest 48 h und 72 h nach perkutaner Bestrahlung. A: A1207, B: T6217, C: T3868, D: F98

5.3.1.3 Kombination von ^{131}IPA und perkutaner Bestrahlung

Im nächsten Schritt wurden n.c.a. ^{131}IPA und RT miteinander kombiniert. Abbildung 5.9 stellt die Ergebnisse exemplarisch dar. Die Kombination aus beiden Einzelbehandlungen verstärkte bei A1207 die Zytotoxizität im Vergleich zu den Einzelbehandlungen. Die stärksten zytotoxischen Effekte wurden nach der Kombination n.c.a. ^{131}IPA und 2 Gy bzw. 5 Gy erzielt. 72 h nach Behandlung mit 74 kBq und 5 Gy Bestrahlung sank die Proliferationsrate um 45 %. 10 Gy und 20 Gy RT in Kombination mit n.c.a. ^{131}IPA konnten keine weitere Absenkung erzielen (Abbildung 5.9 A).

Die kombinierte Behandlung von T6217 zeigte ein ähnliches Verhalten wie die Zelllinie A1207. Nach 48 h führten vor allem die Bestrahlungsdosen 5 Gy und 10 Gy in Kombination mit der höchsten n.c.a. ^{131}I PA-Konzentration von 74 kBq zur Reduzierung der Zellproliferation auf etwa 70 %. 72 h nach Behandlung bestätigten sich diese Trends. Die Kombinationsbehandlung n.c.a. ^{131}I PA + RT hatte demzufolge auch bei T6217 eine höhere Absenkung der Zellproliferation zur Folge als nach den jeweiligen Einzelbehandlungen (Abbildung 5.9 B).

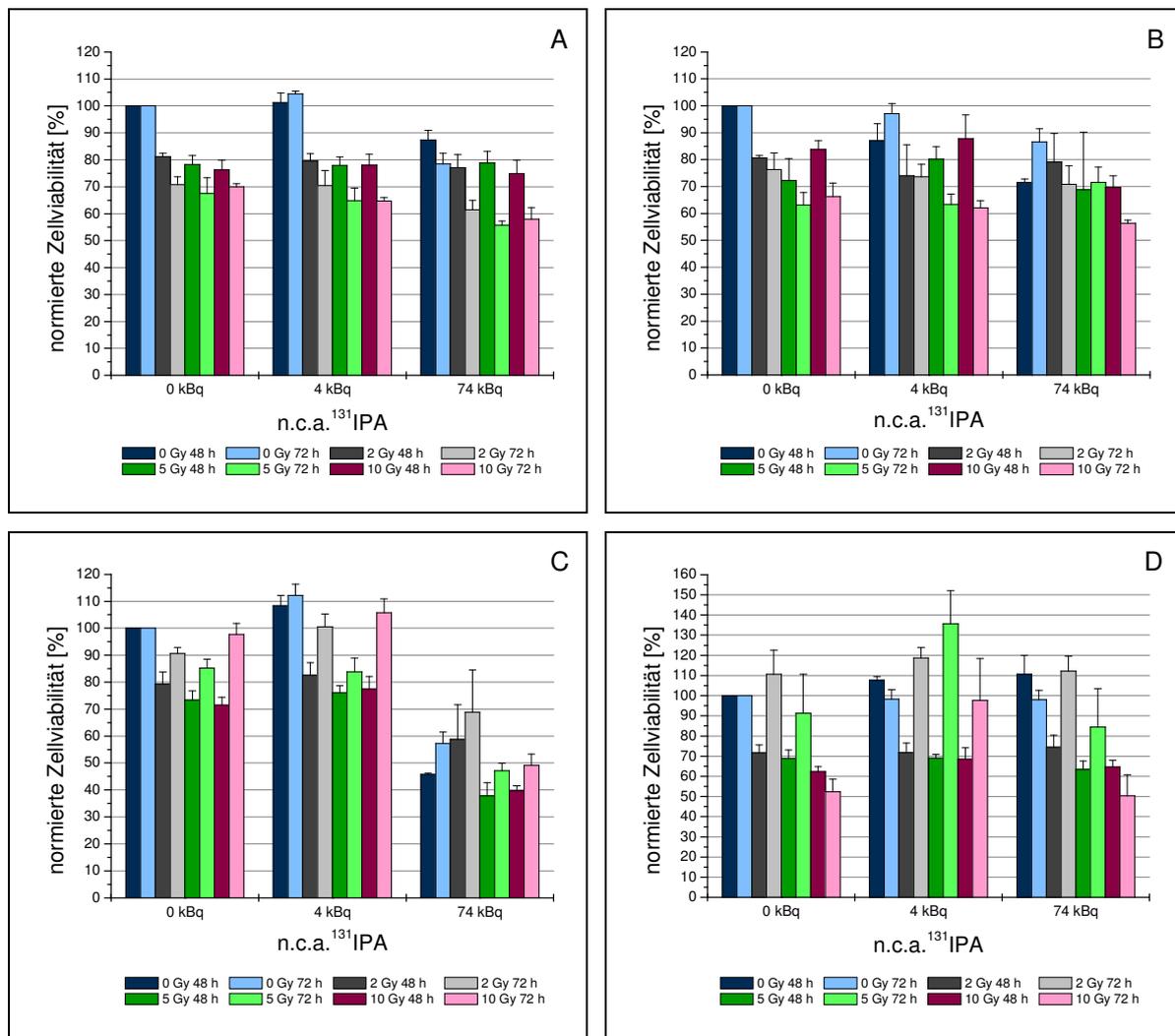


Abbildung 5.9: Zellproliferationstest 48 h und 72 h nach n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung und perkutaner Bestrahlung. A: A1207, B: T6217, C: T3868, D: F98

Wie schon die alleinige n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung bei T3868 zeigte, führte auch die kombinierte n.c.a. ^{131}I PA- und RT-Behandlung erst bei der höchsten n.c.a. ^{131}I PA-Konzentration zu einer deutlichen Zellproliferationssenkung auf 47 % nach 48 h bzw. auf 37 % nach 72 h bei 74 kBq n.c.a. ^{131}I PA + 5 Gy RT. 10 Gy RT hatten auch in

Kombination mit n.c.a. ^{131}I PA wieder eine Steigerung der Zellviabilität 72 h nach Behandlung zur Folge (Abbildung 5.9 C).

Die kombinierte ^{131}I PA + RT-Behandlung von F98 konnte die Proliferation im Vergleich zu den Monotherapien 48 h nach Behandlung nicht weiter senken. Nach 72 h war bei 2 Gy und 5 Gy sogar eine Steigerung der Zellproliferation zu verzeichnen. Besonders auffallend bei dieser Zelllinie und diesem Zeitzustand war eine deutliche Wellenbewegung der Proliferationsrate. Niedrige n.c.a. ^{131}I PA-Konzentrationen und niedrige Bestrahlungsdosen ließen die Zellproliferation ansteigen, bei höheren ^{131}I PA-Konzentrationen sank die Proliferation der Zellen wieder kontinuierlich ab. (Abbildung 5.9 D).

Zusätzlich wurden erneut Vergleichsuntersuchungen zwischen trägerarmem n.c.a. ^{131}I PA und geträgertem c.a. ^{131}I PA in Kombination mit perkutaner Bestrahlung durchgeführt. Wie schon bei der alleinigen n.c.a. ^{131}I PA bzw. c.a. ^{131}I PA-Behandlung konnten auch in Kombination mit RT keine Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen der Behandlung mit n.c.a. ^{131}I PA + RT bzw. c.a. ^{131}I PA + RT festgestellt werden.

Zur Wahrung der Übersichtlichkeit wurden diese Daten nicht grafisch dargestellt.

5.3.1.4 Kombination von Temozolomid, ^{131}I PA und perkutaner Bestrahlung

In weiterführenden Experimenten wurden die Zellen zusätzlich mit TMZ behandelt. Abbildung 5.10 gibt exemplarisch die Ergebnisse wider. Bei A1207 führte die Behandlung der Zellen mit Temozolomid zu einer Senkung der Zellproliferation von 15 % - 20 %. Wurden die Zellen zusätzlich mit n.c.a. ^{131}I PA behandelt, konnte nach 48 h keine zusätzliche Absenkung beobachtet werden, nach 72 h hingegen war eine Verminderung der Proliferation bei höchster n.c.a. ^{131}I PA-Konzentration um 40 % nachweisbar. Die Dreifachkombination bestehend aus TMZ + n.c.a. ^{131}I PA + RT zeigte 48 h nach Behandlung keine weiteren zytotoxischen Effekte. Temozolomid und Bestrahlung konnten die Zellviabilität senken, n.c.a. ^{131}I PA übte jedoch keinen weiteren Einfluss aus. Nach 72 h hingegen konnte die Dreifachkombination die Zellproliferation von A1207 mit steigender n.c.a. ^{131}I PA-Konzentration deutlich verringern. Bestrahlungsdosen von 2 Gy und 5 Gy zeigten dabei die größte Wirkung, höhere Dosen von 10 Gy und 20 Gy übten keinen weiteren Effekt mehr auf die Viabilität aus. Im dargestellten Beispiel mit 5 Gy RT war eine Verminderung der

Proliferationsrate 72 h nach Behandlung um insgesamt 53 % nachweisbar (Abbildung 5.10 A).

Auch bei T6217 rief die alleinige Temozolomidbehandlung eine Senkung der Proliferation um etwa 10 % - 15 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hervor. Eine zusätzliche n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung ließ die Zellproliferation mit steigender Konzentration 48 h nach Behandlung um bis zu 30 % sinken. Nach der Dreifachkombination war vor allem bei der höchsten n.c.a. ^{131}I PA-Konzentration (74 kBq) eine weitere Verminderung der Zellproliferation um insgesamt 36 % bzw. 45 % 48 h bzw. 72 h nach Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten (Abbildung 5.10 B).

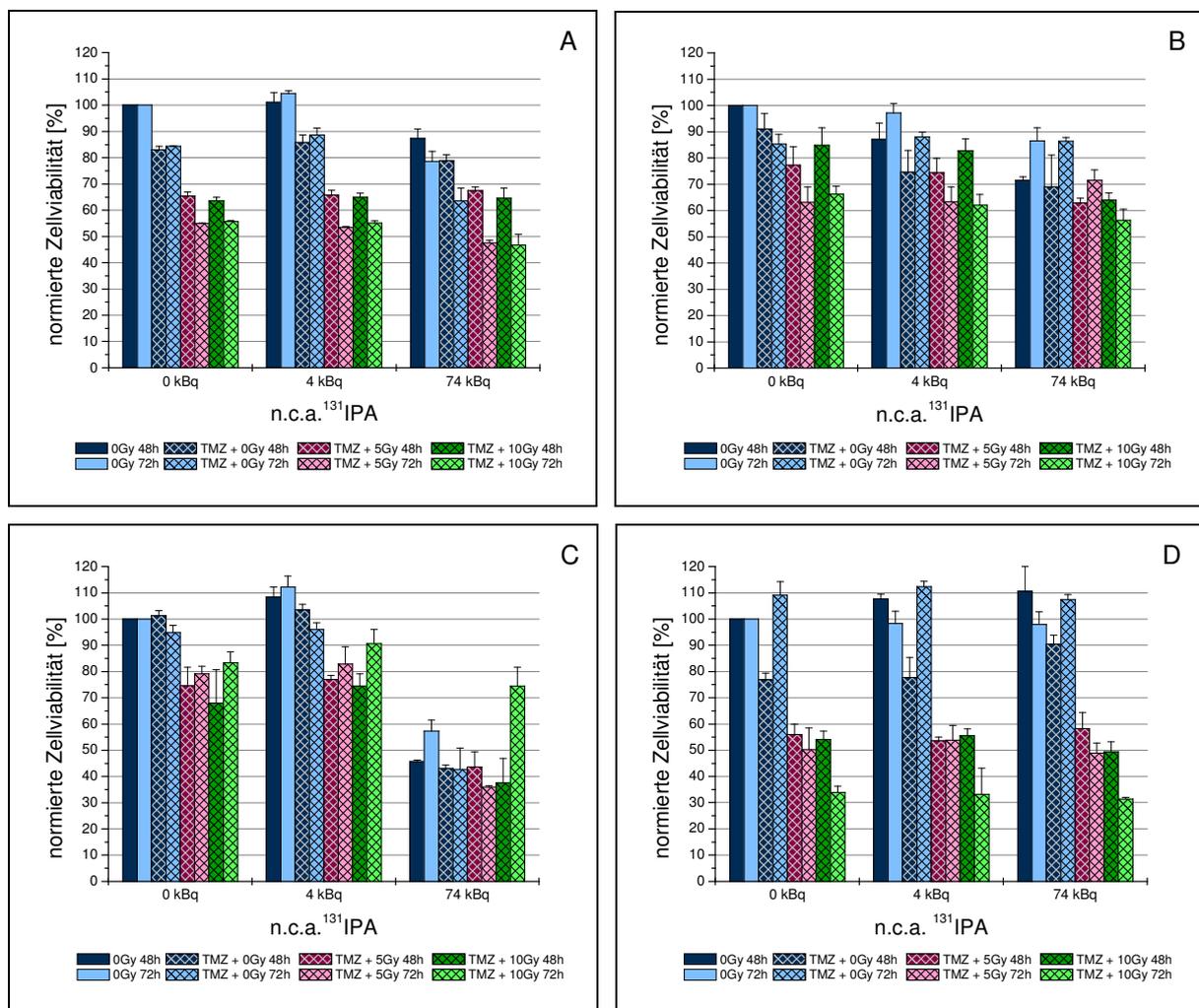


Abbildung 5.10: Zellproliferationstest nach TMZ-Behandlung, n.c.a. ^{131}I PA-Gabe und perkutaner Bestrahlung. A: A1207, B: T6217, C: T3868, D: F98. 48 h und 72 h nach Behandlung.

Bei der Zelllinie T3868 hatte die Temozolomidbehandlung 48 h und 72 h nach Behandlung verglichen mit den unbehandelten Zellen kaum Einfluss auf die Zellproliferation. Die zusätzliche n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung führte vor allem 72 h nach 74 kBq n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung zu einer Reduzierung der Zellviabilität auf 40 % im Vergleich zur Kontrolle. Dies war jedoch ausschließlich auf die n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung zurückzuführen. Die Kombination aller drei Behandlungen mit niedrigen perkutanen Bestrahlungsdosen (5 Gy) ließ die Zellviabilität zusätzlich absinken, bei höheren Bestrahlungsdosen (10 Gy) war keine weitere Absenkung der Zellproliferation zu verzeichnen. Wurden die Zellen mit TMZ und der höchsten n.c.a. ^{131}I PA-Konzentration von 74 kBq behandelt, traten bereits 48 h nach Behandlung sehr hohe zytotoxische Effekte auf. Die zusätzliche perkutane Bestrahlung zeigte nur noch geringen Einfluss auf die Zellproliferation im Vergleich zur TMZ- und n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung (Abbildung 5.10 C).

Die Temozolomidbehandlung rief bei F98 48 h nach Behandlung eine Senkung der Zellproliferation um etwa 20 % hervor. 72 h nach Behandlung konnte jedoch keine Viabilitätssenkung mehr beobachtet werden. Eine hinzukommende n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung konnte die Proliferation nicht weiter absenken verglichen mit der alleinigen TMZ-Behandlung. Lediglich nach der Kombination TMZ und RT war eine Viabilitätssenkung um 40 % - 50 % nach 48 h erkennbar. Die Kombination von TMZ + n.c.a. ^{131}I PA + RT konnte die Proliferation der Zellen nicht weiter beeinflussen (Abbildung 5.10 D).

5.3.2 Untersuchungen des Zellwachstums-, Apoptose- und Nekroseverhaltens

Neben der Untersuchung der Zellproliferation wurde eine Bisbenzimid- sowie Propidiumiodidfärbung durchgeführt, um das Wachstumsverhalten sowie das Apoptose- und Nekroseverhalten zu untersuchen. Die Zellen wurden gefärbt, unter einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und anschließend ausgezählt.

Bei A1207 waren erst nach 72 h deutliche Trends zu beobachten. Mit steigenden perkutanen Bestrahlungsdosen sank die Zellzahl um bis zu 50 % bei 20 Gy. N.c.a. ^{131}I PA alleine übte lediglich einen leichten zytotoxischen Effekt auf das Zellwachstum aus. Die kombinierte Behandlung von n.c.a. ^{131}I PA + RT verstärkte die Zytotoxizität und die Zellzahl nahm stärker ab als nach den jeweiligen Einzelbehandlungen. Dies war im 5 Gy Bestrahlungsregime besonders deutlich zu erkennen. Ein Unterschied zwischen n.c.a. ^{131}I PA und c.a. ^{131}I PA konnte bei A1207 weder in der alleinigen Anwendung noch in Kombination mit perkutaner Bestrahlung nachgewiesen werden (Abbildung 5.11 A und B).

Bei T6217 konnte gezeigt werden, dass die alleinige n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung das Zellwachstum 48 h nach Behandlung um etwa 10 % - 15 % senkte. 72 h nach Behandlung war jedoch keine Wachstumshemmung nachzuweisen. Nach alleiniger perkutaner Bestrahlung sank die Zellzahl um bis zu 40 % nach 20 Gy ab (72 h nach Behandlung); die Kombinationsbehandlung n.c.a. ^{131}I PA + RT, hatte kein zusätzliches Absinken der Zellzahl zur Folge. Der Vergleich zwischen n.c.a. ^{131}I PA und c.a. ^{131}I PA erbrachte jedoch deutliche Unterschiede. Sowohl die alleinige c.a. ^{131}I PA-Behandlung, als auch die Kombination mit Bestrahlung ließ die Zellzahl bei höchster Konzentration im Vergleich zum trägerarmen n.c.a. ^{131}I PA stark absinken. Dies war bereits nach 48 h zu beobachten und verstärkte sich nach 72 h (Abbildung 5.11 C und D).

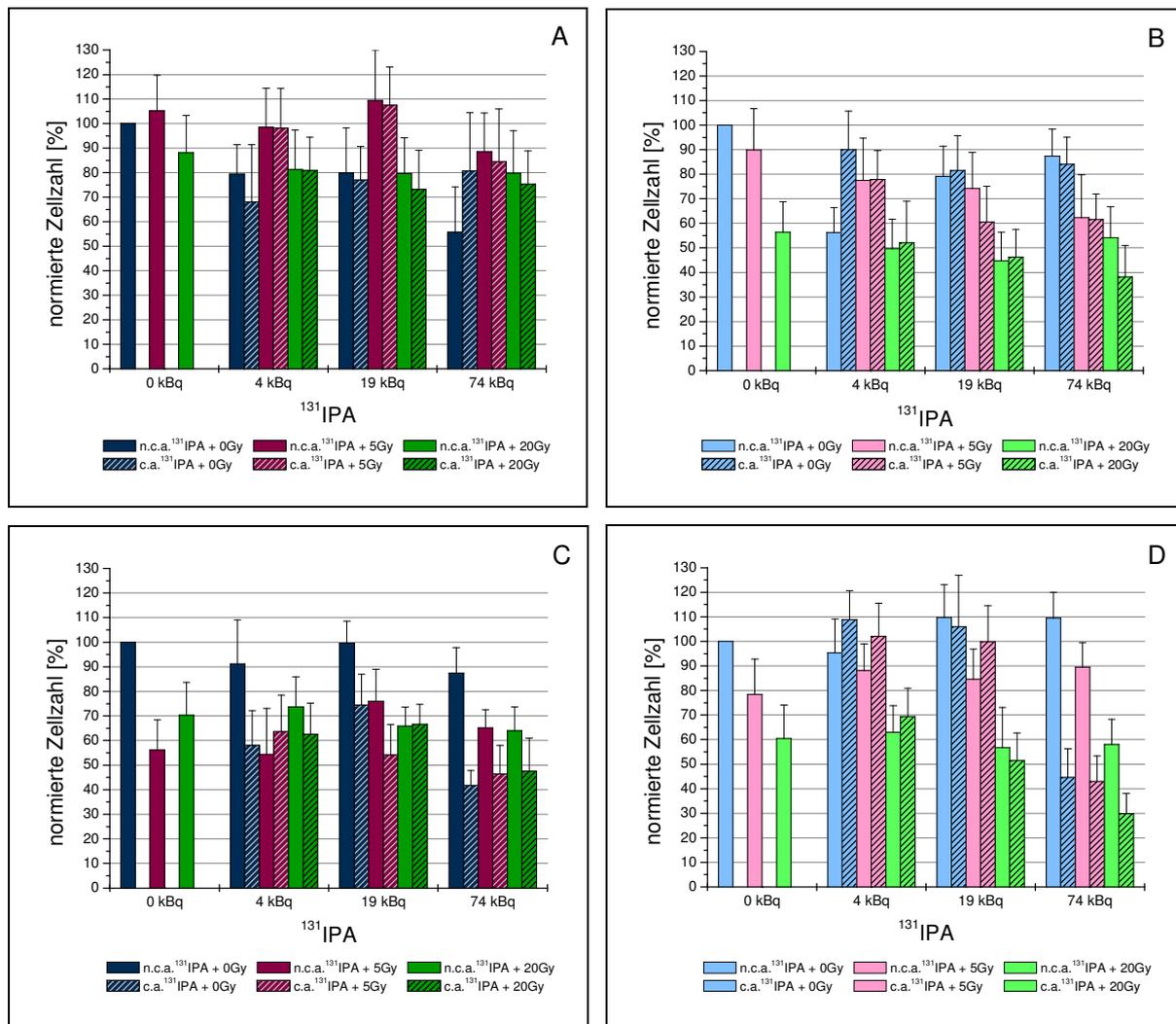


Abbildung 5.11: Untersuchung des Zellwachstums nach n.c.a. ^{131}I -PA- bzw. c.a. ^{131}I -PA-Behandlung, Bestrahlung sowie deren Kombinationen. A: A1207 48 h, B: A1207 72 h, C: T6217 48 h, D: T6217 72 h. Färbung erfolgte mit Bisbenzimid.

Zusätzlich wurden die Zellen mit Propidiumiodid angefärbt, um die sekundär apoptotischen und primär nekrotischen Zellen nachweisen zu können. In Abbildung 5.12 sind Ausschnitte des Zellrasens von T6217 nach der Färbung abgebildet. Es ist zu erkennen, dass zum einen nach ^{131}I -PA-Gabe (erste Zeile) und zum anderen mit zunehmender Bestrahlung (erste Spalte) die Zellzahl abnahm. Behandlung mit 74 kBq c.a. ^{131}I -PA + 20 Gy Bestrahlung führten zur höchsten Zytotoxizität; die Zellzahl sank am stärksten ab. Des Weiteren nahm die Zahl der sekundär apoptotischen und primär nekrotischen Zellen wiederum sowohl nach ^{131}I -PA-Gabe als auch nach perkutaner Bestrahlung zu. Nach kombinierter c.a. ^{131}I -PA- und 20 Gy RT-Behandlung waren noch mehr sekundär apoptotische und primär nekrotische Zellen nachweisbar, als nach n.c.a. ^{131}I -PA + 20 Gy RT (Abbildung 5.12).

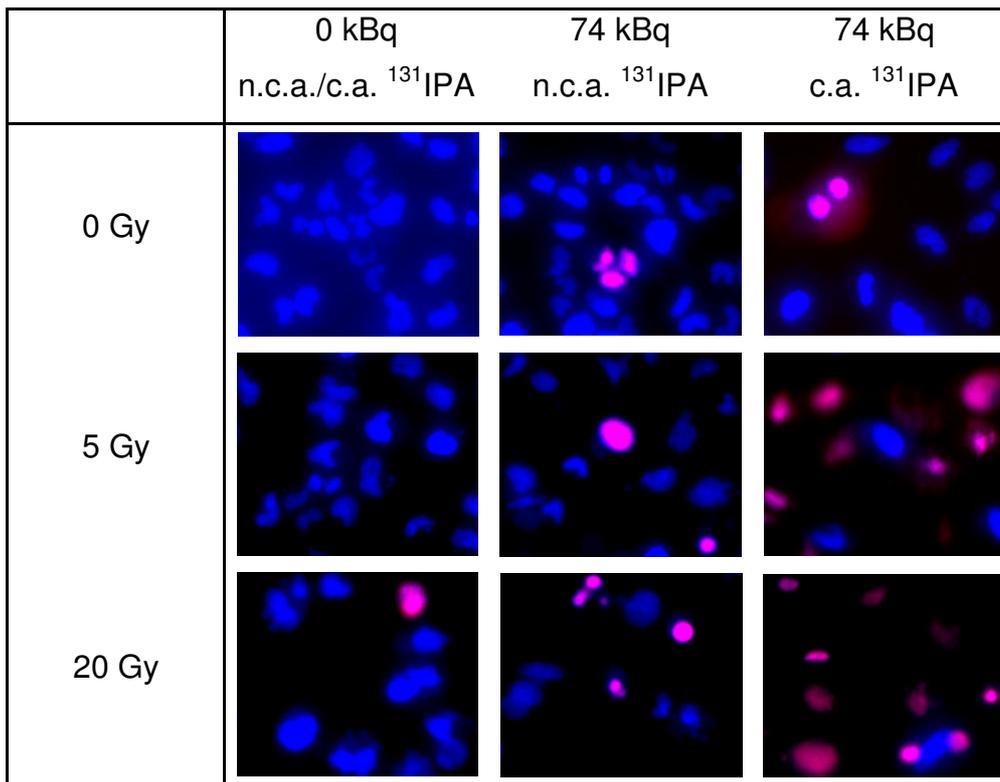


Abbildung 5.12: Ausschnitte aus dem Zellrasen von T6217 72 h nach n.c.a. ^{131}I IPA- bzw. c.a. ^{131}I IPA-Behandlung und/oder perkutaner Bestrahlung mit 5 Gy und 20 Gy. Die Färbung erfolgte mit Bisbenzimid und Propidiumiodid.

Der Anteil der sekundär apoptotischen und primär nekrotischen Zellen wurde ausgezählt und für A1207 und T6217 in Abbildung 5.13 dargestellt. A1207 zeigte nur einen geringen Anteil nekrotischer Zellen. Weder bezüglich der Zeit noch hinsichtlich steigender ^{131}I IPA Aktivität bzw. zugesetzter Trägersubstanz war ein eindeutiger Trend erkennbar. Der Anteil sekundär apoptotischer und primär nekrotischer Zellen schwankte um die 4 % - 5 %, bezogen auf die Gesamtzellzahl. Bei T6217 hingegen war nach der Behandlung mit 74 kBq c.a. ^{131}I IPA der Anteil sekundär apoptotischer und primär nekrotischer Zellen höher als nach der gleichen Behandlung mit n.c.a. ^{131}I IPA. Mit steigenden Bestrahlungsdosen stieg nach 48 h die Anzahl der propidiumiodidgefärbten Zellen noch weiter an. Nach 72 h konnte der Unterschied zwischen 74 kBq c.a. ^{131}I IPA und n.c.a. ^{131}I IPA immer noch deutlich beobachtet werden, allerdings sank der Anteil sekundär apoptotischen und primär nekrotischer Zellen nach 74 kBq c.a. ^{131}I IPA-Gabe im Vergleich zu 48 h. Dieser Umstand ist damit zu erklären, dass nach 72 h eine Vielzahl der Zellen bereits abgestorben im Kulturmedium schwammen und somit nicht mehr anfärbbar waren.

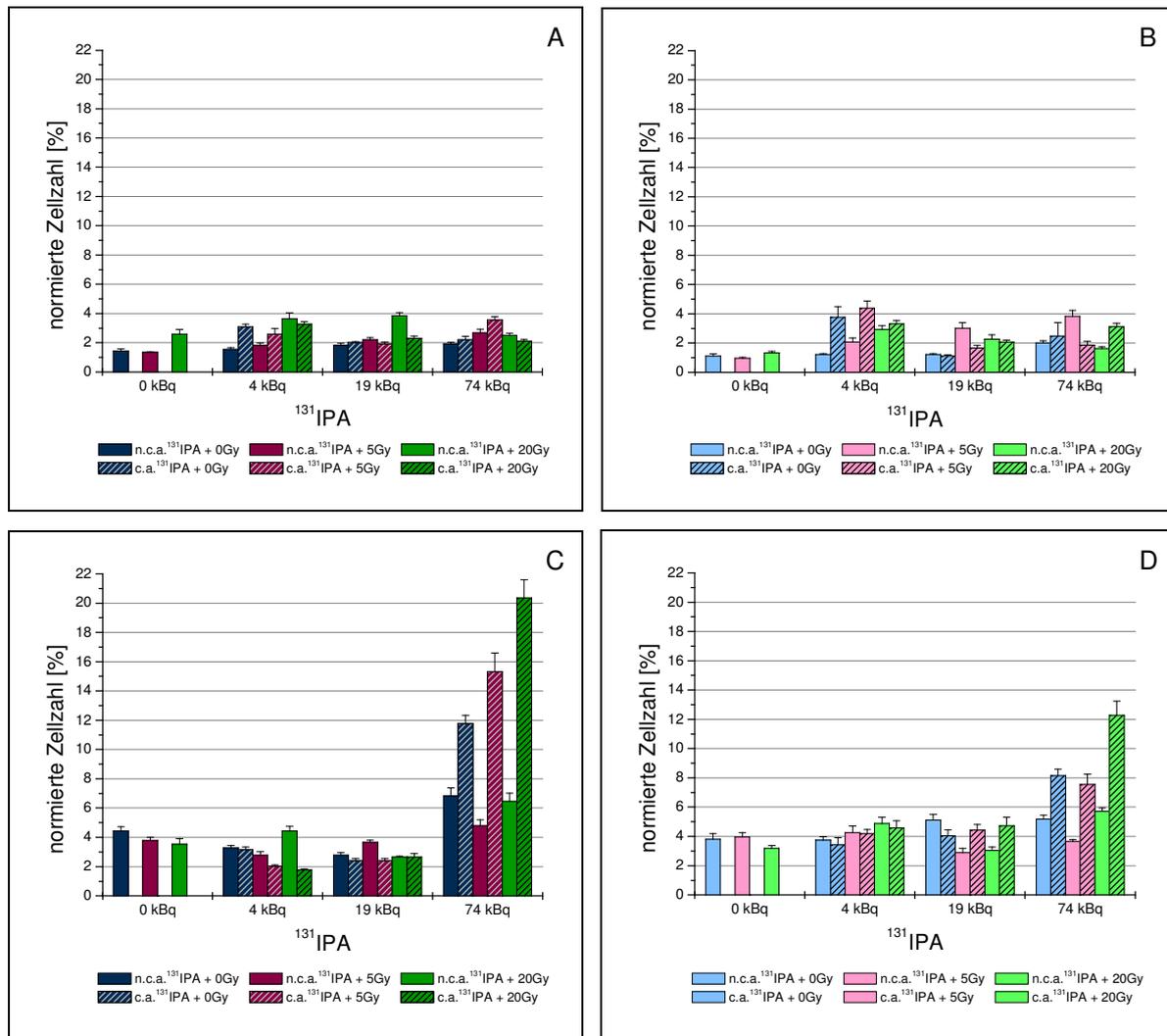


Abbildung 5.13: Bestimmung sekundär apoptotischer / primär nekrotischer Zellen nach n.c.a. ^{131}I PA- bzw. c.a. ^{131}I PA-Behandlung, perkutaner Bestrahlung sowie deren Kombinationen. A: A1207 48 h, B: A1207 72 h, C: T6217 48 h, D: T6217 72 h. Färbung erfolgte mit Bisbenzimid und Propidiumiodid. Normiert auf die Gesamtzellzahl der unbehandelten Kontrolle.

5.3.3 Darstellung der Zellschädigung anhand DNA-Doppelstrangbrüchen

In diesen Experimenten wurden DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) fluoreszenzmikroskopisch mit der γ -H2AX-Foci-Methode nachgewiesen. Ansteigende Fluoreszenzsignale, die sogenannten Foci, korrelieren mit steigenden DNA-DSB und somit mit erhöhter DNA-Schädigung in der Zelle.

5.3.3.1 Einfluss von Temozolomid, ^{131}I PA und perkutaner Bestrahlung

Zur Gewinnung weiterer Erkenntnisse, ob und in welchem Maße die ^{131}I PA-Behandlung zur Schädigung der DNA beiträgt, wurden die Zellen nach Behandlung mit TMZ, ^{131}I PA und RT hinsichtlich entstandener DNA-DSB untersucht. Wie sich in ersten Vorversuchen zeigte, wiesen bereits unbehandelte Tumorzellen einen deutlich

erhöhten Hintergrund mit vielen kleinen Foci auf. Es wurden daher zunächst die geeignetsten Tumorzelllinien mit vergleichsweise niedrigerem, homogenem Hintergrund gesucht. Diesbezüglich wurden die Glioblastomzelllinien A1207, F98, T3868 und T6217 untersucht.

Von den untersuchten Zelllinien stellten sich A1207 und T3868 als geeignet heraus, so dass sämtliche Versuche mit diesen beiden Zelllinien durchgeführt wurden. Abbildung 5.14 zeigt die Ergebnisse von A1207 und T3868 nach 20 μM TMZ, 150 kBq n.c.a. ^{131}I PA, 0,1 Gy RT, und nach den entsprechenden kombinatorischen Behandlungen. Augenscheinlich ist, dass in A1207 mehr Foci induziert wurden als in T3868, dies fiel besonders nach den Kombinationsbehandlungen auf.

Bei A1207 wurde nachgewiesen, dass sich die Focizahl/Zelle, die durch die jeweilige Einzelbehandlung hervorgerufen wurde, in Kombination mit jeder weiteren Behandlung erhöhte. T3868 zeigte diesen Effekt weniger deutlich. Während bei A1207 nach der Dreifachbehandlung TMZ + n.c.a. ^{131}I PA + 0,1 Gy RT mit 9,5 Foci/Zelle die meisten Foci nachweisbar waren, waren dies bei T3868 nur 6,2 Foci/Zelle. Zusätzlich war zu beobachten, dass die TMZ-Behandlung von T3868 zu deutlich weniger Foci/Zelle führte als bei A1207. In den Kombinationsbehandlungen mit TMZ wurde bei T3868 folglich auch keine Steigerung der Focizahlen erzielt (Abbildung 5.14). In Abbildung 5.15 sind die induzierten Foci an Hand von A1207 bildlich dargestellt.

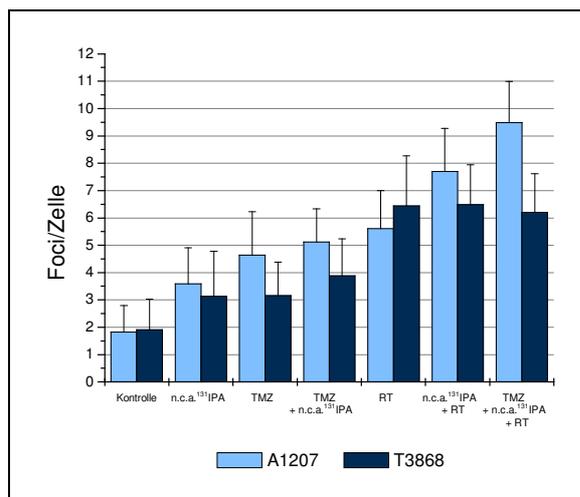


Abbildung 5.14: Untersuchung der DNA-DSB bei den der Zelllinien A1207 und T3868 nach Behandlung mit TMZ, n.c.a. ^{131}I PA sowie 0,1 Gy perkutaner Bestrahlung (RT)

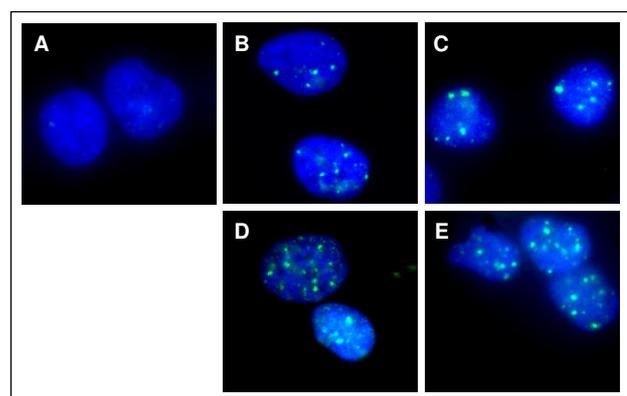


Abbildung 5.15: γ -H2AX-Foci von A1207. A: unbehandelte Kontrolle, B: n.c.a. ^{131}I PA, C: 0,1 Gy RT, D: n.c.a. ^{131}I PA + RT, E: TMZ + n.c.a. ^{131}I PA + RT

Vergleichsuntersuchungen zwischen n.c.a. ^{131}I PA und c.a. ^{131}I PA ergaben bei der Zelllinie A1207 keine nennenswerten Unterschiede. Bei T3868 war zu beobachten, dass c.a. ^{131}I PA sowohl alleine, als auch in den Kombinationen c.a. ^{131}I PA + 0,1 Gy, TMZ + c.a. ^{131}I PA sowie TMZ + c.a. ^{131}I PA + 0,1 Gy RT etwa 1 -1,5 Foci/Zelle mehr induzierte als die gleiche Behandlungen mit n.c.a. ^{131}I PA (Abbildung 5.16 A und B)

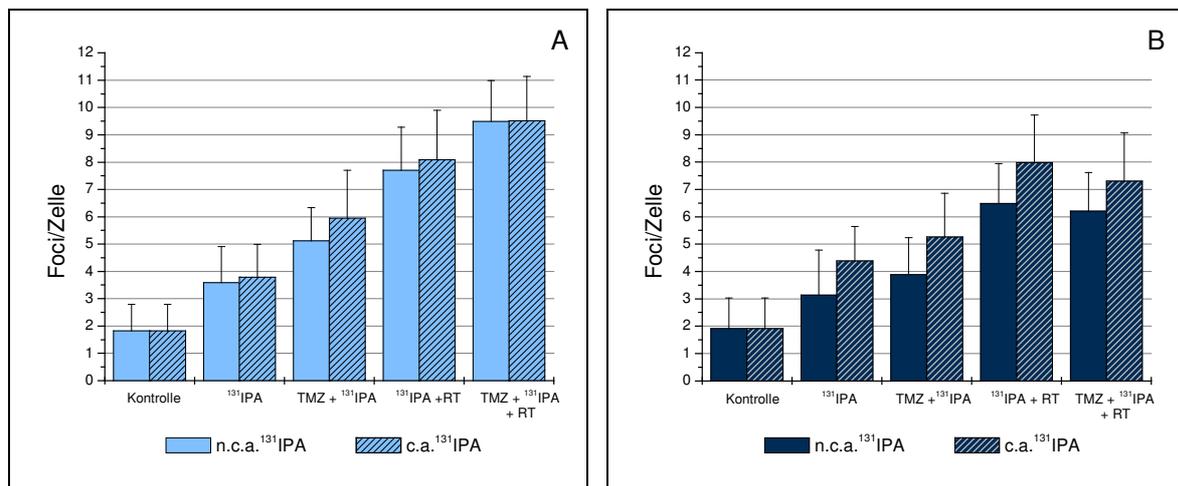


Abbildung 5.16: Vergleich zwischen alleiniger n.c.a. ^{131}I - und c.a. ^{131}I -Behandlung und in Kombination mit TMZ und RT im Bestrahlungsregime 0,1 Gy. A: A1207, B: T3868

Durch Erhöhung der perkutanen Bestrahlungsdosen von 0,1 Gy auf 1 Gy stieg die Zahl der durch RT induzierten Foci von etwa 6 Foci/Zelle bei 0,1 Gy auf ca. 17 Foci/Zelle nach 1 Gy. 1 Gy RT induzierte eindeutig die meisten Foci/Zelle. Es bestätigten sich die Resultate, die schon bei den Versuchen mit 0,1 Gy RT zu beobachten waren. Die Kombinationsbehandlungen bei A1207 führten zu mehr Foci/Zelle als die Einzelbehandlungen. Wurden alle drei Therapien (TMZ + n.c.a. ^{131}I PA + 1 Gy RT) kombiniert, konnte bei A1207 die höchste Anzahl an Foci/Zelle (ca. 19 Foci/Zelle) nachgewiesen werden. T3868 zeigte, wie schon nach 0,1 Gy Bestrahlung, die Effekte nicht in gleicher Weise. Nach Kombination von n.c.a. ^{131}I PA + 1 Gy RT erhöhte sich die Anzahl der Foci/Zelle; die Kombination aller drei Behandlungen führte jedoch zu keiner weiteren Erhöhung der Foci/Zelle und damit zu keiner weiteren Steigerung der DNA-DSB (Abbildung 5.17). Die oben beschriebenen Effekte sind exemplarisch an A1207 in Abbildung 5.18 bildlich dargestellt.

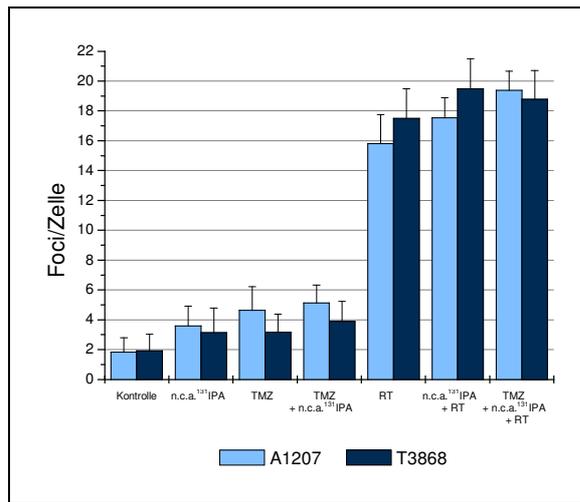


Abbildung 5.17: Untersuchung der DNA-DSB bei den Zelllinien A1207 und T3868 nach Behandlung mit TMZ, n.c.a.¹³¹IPA sowie 1 Gy RT

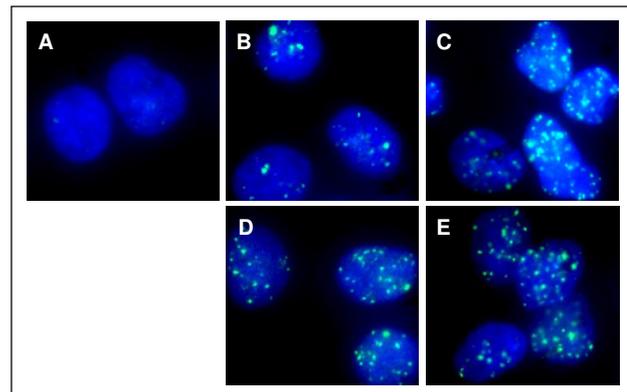


Abbildung 5.18: γ -H2AX-Foci von A1207. A: unbehandelte Kontrolle, B: n.c.a.¹³¹IPA, C: 1 Gy RT, D: n.c.a.¹³¹IPA + RT, E: TMZ + n.c.a.¹³¹IPA + RT

Erneute Vergleichsuntersuchungen zwischen n.c.a.¹³¹IPA und c.a.¹³¹IPA in Kombination mit 1 Gy RT erbrachten eine leicht erhöhte Zahl an Foci/Zelle nach c.a.¹³¹IPA-Behandlung im Vergleich zur n.c.a.¹³¹IPA-Behandlung (Abbildung 5.19).

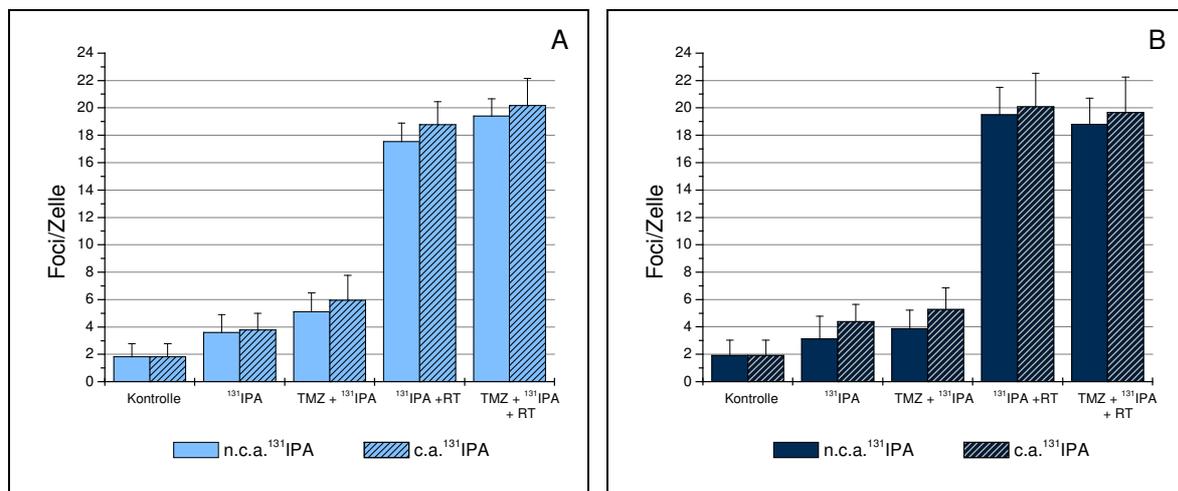


Abbildung 5.19: Vergleich zwischen alleiniger n.c.a.¹³¹IPA- und c.a.¹³¹IPA-Behandlung und in Kombination mit TMZ und RT im Bestrahlungsregime 1 Gy. A: A1207, B: T3868

5.3.3.2 Untersuchungen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Im Folgenden wurde die Reparatur der DNA-DSB bei A1207 und T3868 bis 24 h nach Behandlung untersucht (Abbildung 5.20 A - D). Je länger die Reparaturzeit dauerte, umso stärker sank die Zahl der Foci/Zelle. Betrachtet man zunächst A1207, so war zu beobachten, dass bis 4 h nach Behandlung mit n.c.a.¹³¹IPA + RT sowie mit der Dreifachkombination (TMZ + n.c.a.¹³¹IPA + RT) die Focizahl/Zelle höher war

und damit mehr unreparierte DNA-DSB zurückblieben als nach den Einzelbehandlungen. Nach 24 h Reparaturzeit blieben etwa 4 Foci/Zelle bei den mit n.c.a. ^{131}I PA + 0,1 Gy bestrahlten Proben zurück (Abbildung 5.20 A). Wurden A1207 in Kombination mit 1 Gy (n.c.a. ^{131}I PA + 1 Gy RT bzw. TMZ + n.c.a. ^{131}I PA + 1 Gy RT) behandelt, war auch nach 8 h noch eine erhöhte Focizahl/Zelle nachweisbar, die auch bis 24 h nach Behandlung erhöht blieb (Abbildung 5.20 C). Auch wenn sich zu späteren Beobachtungszeiten die DSB immer weiter reparierten, so fiel die Anzahl der Foci/Zelle über den gesamten Zeitraum nicht wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle zurück. Dies spricht für eine dauerhafte Schädigung der DNA.

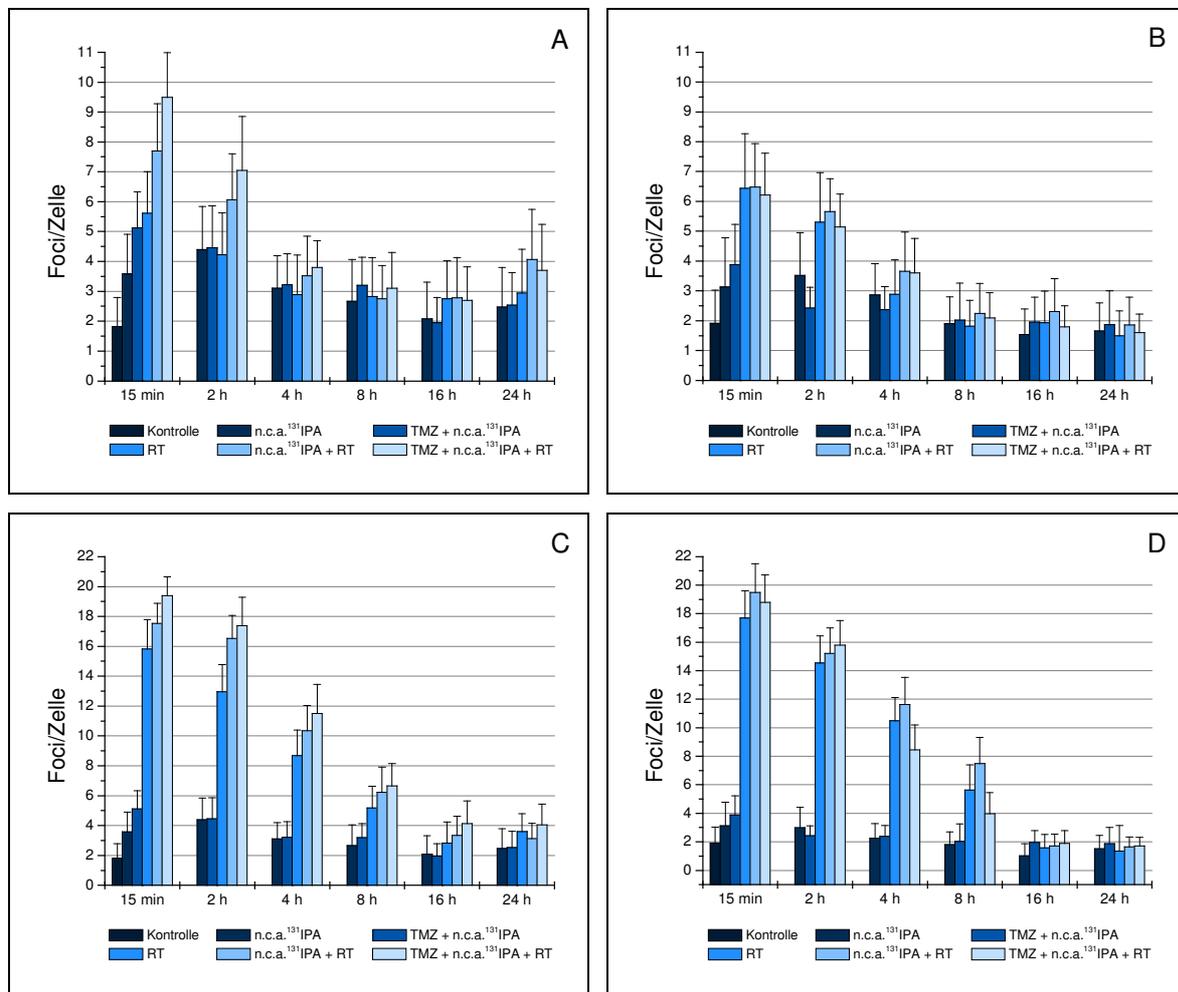


Abbildung 5.20: Untersuchungen zur Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche nach Behandlung mit TMZ, n.c.a. ^{131}I PA und RT. A: A1207, 0,1 Gy RT, B: T3868, 0,1 Gy RT, C: A1207, 1 Gy RT, D: T3868, 1 Gy RT

Wie weiter vorn in dieser Arbeit (Kapitel 5.3.3.1) gezeigt, wurden bei der Zelllinie T3868 nach der Dreifachkombination TMZ + n.c.a. ^{131}IPA + RT keine zusätzlichen Foci/Zelle, verglichen mit der Zweifachkombination n.c.a. ^{131}IPA + RT, nachgewiesen. Dies bestätigte sich auch bei den Untersuchungen zur Reparatur der DNA-DSB. Die Kombination n.c.a. ^{131}IPA + RT bei T3868 zeigte vor allem bei der Bestrahlungsdosis von 1 Gy bis 8 h nach Behandlung die höchste Anzahl zurückgebliebener Foci/Zelle im Vergleich zu allen anderen untersuchten Behandlungen (Abbildung 5.20 D). Die T3868-Zellen, die in Kombination mit 0,1 Gy bestrahlt wurden, erreichten nach 8 h wieder die Focizahl/Zelle der unbehandelten Kontrollen, in Kombination mit 1 Gy war dies erst nach 16 h zu beobachten (Abbildung 5.20 B und D).

5.4 *In vivo* Untersuchungen

Die *in vivo* Untersuchungen wurden durchgeführt, um einerseits die Zellkultur-ergebnisse von n.c.a. ^{131}I PA unter physiologischen Bedingungen zu überprüfen und andererseits n.c.a. ^{124}I PA in einer ersten PET-Untersuchung einzusetzen. Dazu wurde für die n.c.a. ^{131}I PA-Testung ein Maus- und ein Rattenmodell ausgewählt. Der neue n.c.a. ^{124}I PA-Tracer wurde ebenfalls an einem Mausmodell und in einer ersten klinischen Patientenuntersuchung getestet.

5.4.1 Therapieversuch mit n.c.a. ^{131}I PA am Mausmodell

Den CD1 nu/nu-Mäusen wurden die humanen Glioblastomzelllinien A1207 oder T3868 heterotop in die rechte Flanke implantiert. T3868 wuchs *in vivo*, anders als in der Zellkultur, deutlich schneller als A1207. Nach etwa 3 Wochen (T3868) bzw. 4 Wochen (A1207) war der Tumor auf einen Durchmesser von etwa 0,6 mm angewachsen und die Therapie wurde begonnen. Die Behandlung der Tiere erfolgte je nach Gruppeneinteilung entweder mit 10 ± 2 MBq n.c.a. ^{131}I PA, 20 Gy perkutaner Bestrahlung oder als Kombination beider Einzeltherapien.

In den unten abgebildeten, zusätzlich durchgeführten SPECT-Aufnahmen kann bis 72 h p.i. die Anreicherung von n.c.a. ^{131}I PA im Tumor der Glioblastomzelllinie T3868 nachverfolgt werden. Nach 6 h ist die gefüllte Blase noch deutlich erkennbar (Abbildung 5.21).

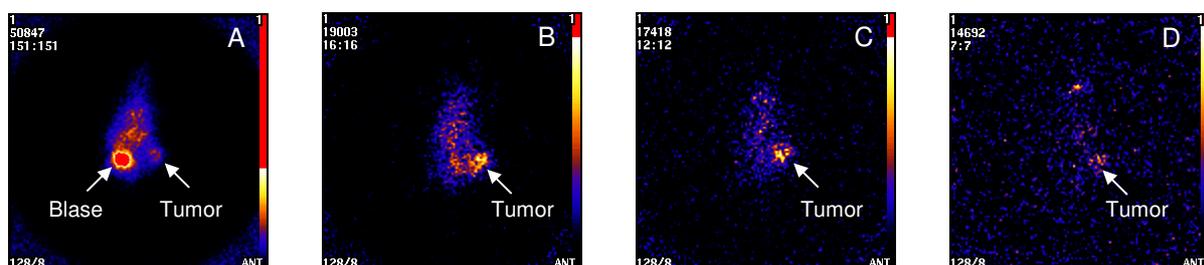


Abbildung 5.21: SPECT-Untersuchung einer CD1 nu/nu-Maus mit T3868-Glioblastom nach n.c.a. ^{131}I PA-Gabe. A: 6 h p.i., B: 24 h p.i., C: 48 h p.i., D: 72 h p.i.

Im Folgenden wird zunächst auf die Therapieergebnisse der Tiere mit A1207-Glioblastom näher eingegangen. Nach 49 Tagen waren bereits 50 % der unbehandelten Kontrolltiere verstorben, nach 54 Tagen lebten nur noch 25 % und nach 108 Tagen war keines der Kontrolltiere mehr am Leben. Die perkutane Bestrahlung

des A1207-Tumors mit 20 Gy führte zu einer Verlängerung der Überlebenszeit. Nach 113 Tagen lebten noch 55 % der bestrahlten Tiere. Zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 150 Tagen waren noch 33,3 % der Tiere am Leben. In der Gruppe der n.c.a. ^{131}I PA behandelten Tiere konnte eine weitere Steigerung der Überlebenszeit registriert werden. Nach 77 Tagen waren noch 84 % der Tiere am Leben, nach 150 Tagen immerhin noch 71 %. Gleiche Überlebensraten von 71 % nach 150 Tagen waren in der Versuchsgruppe der kombinatorisch behandelten Tiere (n.c.a. ^{131}I PA + RT) zur beobachten. Die Zeitspanne bis das erste Tier stirbt ist mit 120 Tagen in der n.c.a. ^{131}I PA + RT-Gruppe jedoch deutlich länger als in der n.c.a. ^{131}I PA-Gruppe (77 Tage) (Abbildung 5.22 A).

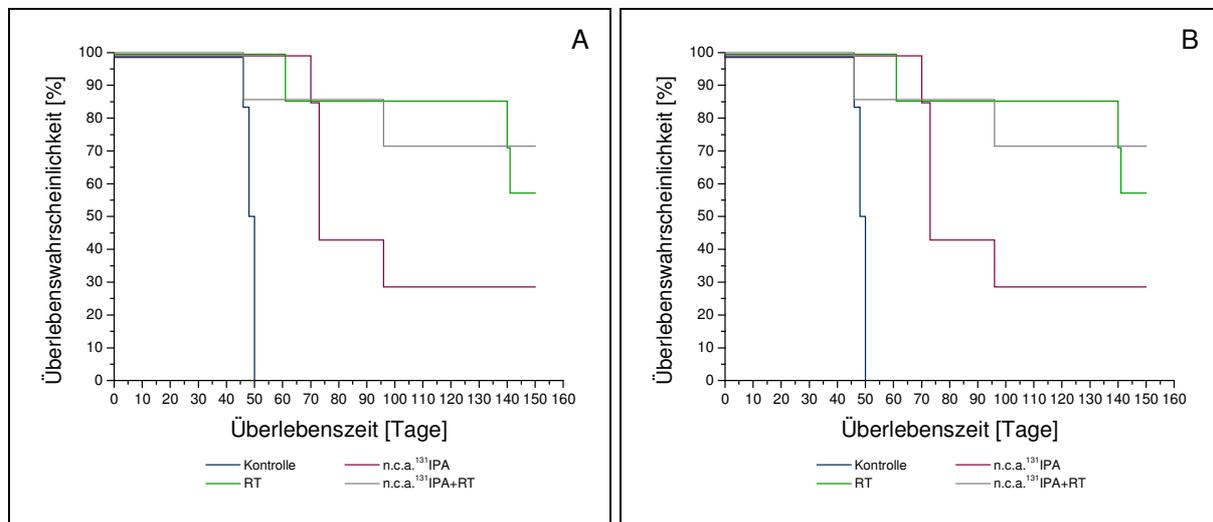


Abbildung 5.22: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von CD1 nu/nu-Mäusen mit heterotop implantiertem Glioblastom an der rechten Flanke. Behandlung mit 10 ± 2 MBq n.c.a. ^{131}I PA, 20 Gy RT bzw. n.c.a. ^{131}I PA + 20 Gy RT. A: A1207, B: T3868

Die Resultate der CD1 nu/nu-Mäuse mit T3868-Glioblastom waren wie folgt. Sämtliche unbehandelte Kontrolltiere waren bereits nach 50 Tagen verstorben. Die perkutane Bestrahlung des T3868-Tumors mit 20 Gy erhöhte die Überlebenszeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Immerhin 57 % der Mäuse in der RT-Gruppe waren am Ende des Beobachtungszeitraumes noch am Leben. In der n.c.a. ^{131}I PA-Versuchsgruppe wurden kürzere Überlebenszeiten der Tiere im Vergleich zur RT-Gruppe beobachtet. Nach 73 Tagen waren bereits 57 % der behandelten Tiere verstorben. Am Ende des Beobachtungszeitraumes, nach 150 Tagen, waren nur noch 29 % der mit n.c.a. ^{131}I PA behandelten Tiere am Leben. Wurden beide Therapien in der n.c.a. ^{131}I PA + RT-Versuchsgruppe kombiniert, konnten die

Überlebenszeiten wieder gesteigert werden. Am Ende der Beobachtungszeit waren noch 71 % der Tiere dieser Gruppe am Leben. Somit war es mit Hilfe der Kombinationstherapie n.c.a. ^{131}I PA + RT möglich, die Überlebenszeiten im Vergleich zu den Monotherapien zu steigern (Abbildung 5.22 B).

In Abbildung 5.23 und Abbildung 5.24 sind die Tumorgößen für jede Behandlungsgruppe am Ende des Beobachtungszeitraumes dargestellt. Zunächst wird auf die Tiere mit A1207-Glioblastom eingegangen.

Bei allen unbehandelten Kontrolltieren war eine Zunahme des Tumolvolumens zu beobachten. In der Gruppe der n.c.a. ^{131}I PA behandelten Tiere wuchs der Tumor in über 60 % der Fälle weiter. Bei etwa einem Viertel der Tiere wurde der Tumor kleiner und bei ca. 15 % blieb das Tumolvolumen unverändert. In der RT-Gruppe war nach perkutaner Strahlentherapie nur noch bei 11 % der Tiere ein Tumorwachstum zu beobachten. Bei etwa 20 % wurde der Tumor kleiner und bei einem Tier war der Tumor vollständig weg. Die Kombination beider Therapien konnte das Tumorwachstum komplett verhindern. Bei 43 % der Tiere in der n.c.a. ^{131}I PA + RT-Gruppe verringerte sich das Tumolvolumen und bei 28 % bildete sich der Tumor vollständig zurück (Abbildung 5.23 A).

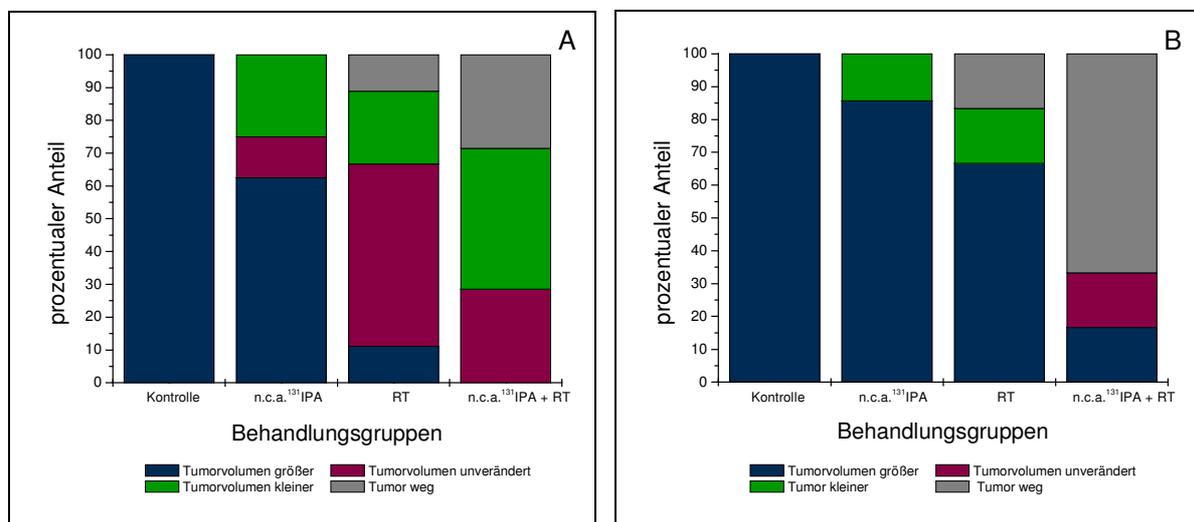


Abbildung 5.23: Tumorgöße der heterotop in CD1 nu/nu implantierten Glioblastome am Ende des Beobachtungszeitraumes von 150 Tagen. A: A1207, B: T3868

T3868 wuchs *in vivo* deutlich aggressiver als A1207. Bei den unbehandelten Tieren war ein explosionsartiges Tumorwachstum zu beobachten. Die alleinige n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung bewirkte nur bei einem Tier (14 %) eine Verringerung des Tumor-

volumens. Bei allen anderen Tieren nahm das Tumolvolumen zu. In der RT-Behandlungsgruppe wurde bei jeweils 17 % ein vollständiger Rückgang des Tumors bzw. eine Tumolvolumenverringering beobachtet. Bei 66 % der Tiere dieser Behandlungsgruppe nahm auch hier das Tumolvolumen zu. Erst die Kombination beider Einzeltherapien konnte bei 67 % der Tiere einen vollständigen Rückgang des Tumors bewirken (Abbildung 5.23 B). In Abbildung 5.24 sind Fotografien der Mäuse mit T3868-Tumor exemplarisch dargestellt. Eine alleinige n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung konnte das Tumorstadium nicht verhindern, jedoch im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verlangsamen. Die Kombination mit Bestrahlung führte hingegen nicht nur zur Stagnation des Tumorstadiums, sondern das Tumolvolumen nahm deutlich ab.

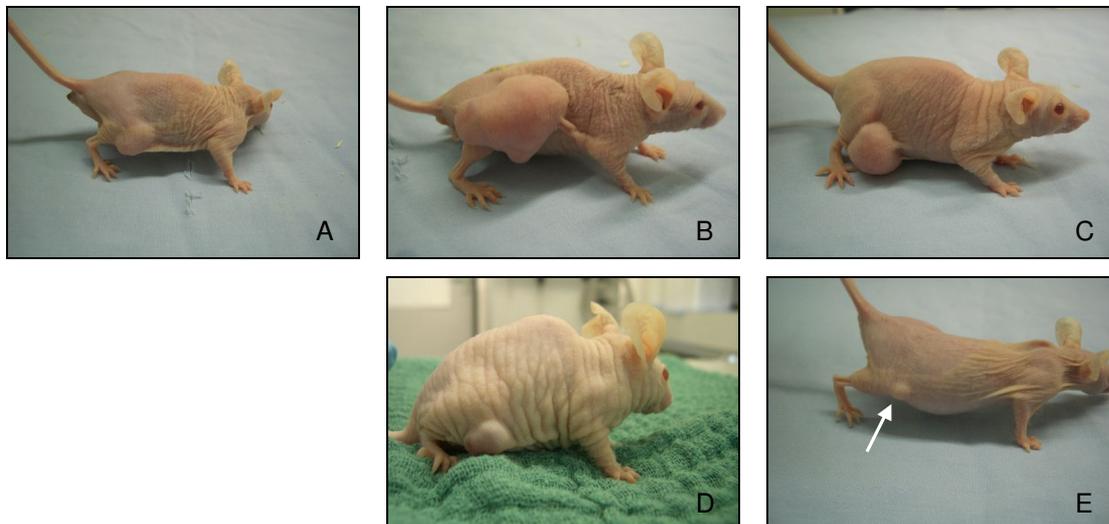


Abbildung 5.24: Mäuse mit heterotop implantiertem T3868-Glioblastom. A: Tumorgröße am Behandlungstag (21 Tage nach Implantation), B: Tumorgröße nach 39 Tagen, ohne Behandlung, C: Tumorgröße nach 39 Tagen, n.c.a. ^{131}I PA, D: Tumorgröße nach 39 Tagen, 20 Gy, E: Tumorgröße nach 39 Tagen, n.c.a. ^{131}I PA + 20 Gy

5.4.2 Erste Untersuchungen am orthotopen Ratten-Glioblastommodell

Zur Verifizierung der bisher gewonnenen Ergebnisse, wurde, die bei den Mäusen erfolgreiche, n.c.a. ^{131}I PA + RT-Therapie an Ratten mit orthotop implantiertem Glioblastom angewandt. Den Tieren wurden 1×10^6 Zellen der Zelllinie F98 in die rechte Hirnhälfte implantiert. Das Anwachsen des Tumors wurde von einem Neuropathologen bestätigt, der die Hirne dreier unbehandelter Tiere 7 Tage nach Implantation histologisch untersuchte. Der Tumor konnte sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch nachgewiesen werden (Abbildung 5.25 A und B). In Abbildung 5.25 C ist das diffuse und infiltrative Wachstum des Tumors zu erkennen.

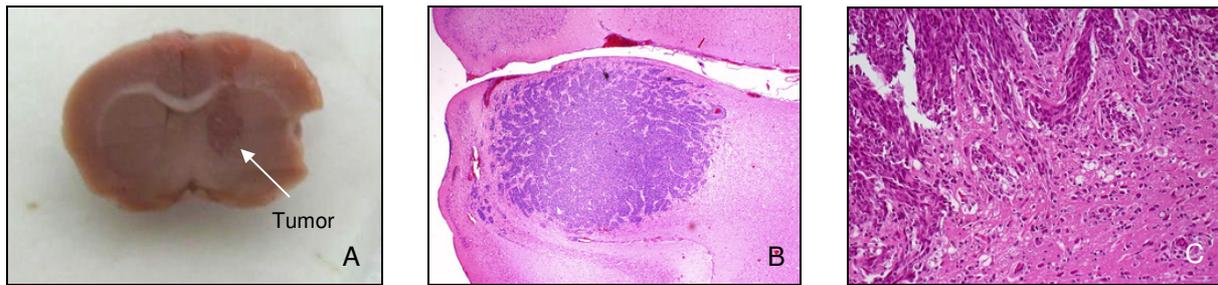


Abbildung 5.25: Histologische Untersuchung eines Rattenhirnes 7 Tage nach orthotoper F98-Implantation. A: Tumor makroskopisch, B: Tumor mikroskopisch, C: diffus wachsende Randzone des Tumors (mikroskopisch)

7 Tage nach Implantation begann die Behandlung mit 20 ± 4 MBq n.c.a. ^{131}I PA, 4 Gy RT oder n.c.a. ^{131}I PA + 4 Gy RT. Der Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 5.26 ist zu entnehmen, dass keine der Behandlungen zu einer deutlichen Lebensverlängerung führte, verglichen mit der Kontrollgruppe. 19 Tage nach Implantation waren sämtliche Kontrolltiere verstorben. In der Gruppe der Kombinationsbehandlung n.c.a. ^{131}I PA + RT waren alle Tiere nach 27 Tagen gestorben. In den Behandlungsgruppen n.c.a. ^{131}I PA bzw. RT wurden maximale Überlebenszeiten von 22 bzw. 24 Tagen beobachtet. Die Kaplan-Meier-Kurven sämtlicher Behandlungsgruppen unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

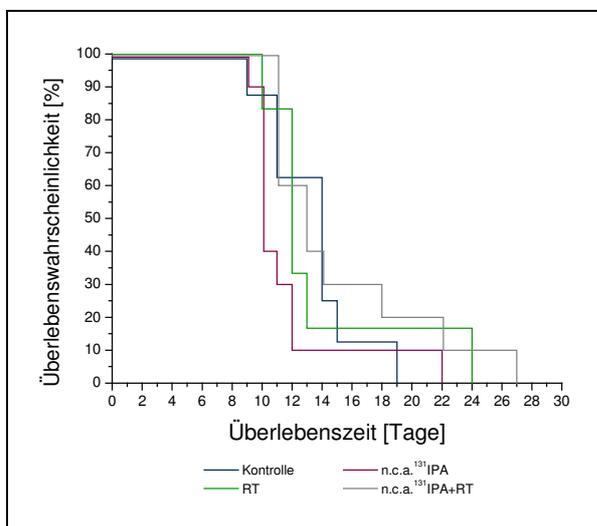


Abbildung 5.26: Kaplan-Meier-Überlebenskurve tumortragender Fischerratten mit orthotop implantiertem F98-Glioblastom. Implantation von 1×10^6 Zellen

Im weiteren Verlauf der Experimente wurde die Zellzahl auf 1×10^4 gesenkt und die Zeit zwischen Implantation und Behandlung um einen Tag verkürzt. Weder die Kontrolltiere noch die Tiere aus den drei Behandlungsgruppen zeigten eine längere

Überlebenszeit. Alle Tiere starben in den gleichen Zeiträumen wie in der Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 5.26 dargestellt. Die pathologischen Untersuchungen der nach dem Tod entnommenen Hirne ergaben, dass alle Tiere am fortgeschrittenen Stadium des Hirntumors verstarben. Infektionen oder andere Todesursachen wurden ausgeschlossen. Des Weiteren wurden bei den pathologischen Untersuchungen stets nur die Tumore, jedoch keine Behandlungseffekte nachgewiesen. Die Verdopplung der perkutanen Bestrahlungsdosis auf 2 x 4 Gy konnte ebenfalls zu keiner Steigerung der Überlebenszeiten beitragen. Sämtliche Tiere verstarben im bereits oben beschriebenen Zeitraum. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen den gleichen Verlauf wie in Abbildung 5.26 dargestellt, so dass auf eine gesonderte Darstellung verzichtet wird.

5.4.3 PET-Untersuchung mit n.c.a. ^{124}I IPA am Mausmodell

Für eine erste diagnostische PET-Untersuchung mit dem neu synthetisierten n.c.a. ^{124}I IPA wurde eine CD1 nu/nu-Maus mit heterotop implantiertem A1207-Glioblastom ausgewählt. Die PET-Scans fanden 1 h, 24 h und 48 h nach n.c.a. ^{124}I IPA-Gabe statt und sind bildlich in Abbildung 5.27 dargestellt. 1 h nach Applikation konnte keine Speicherung von n.c.a. ^{124}I IPA im Tumor nachgewiesen werden. Erst nach 24 h bzw. 48 h war eine deutliche Speicherung von n.c.a. ^{124}I IPA im Tumor erkennbar. 48 h nach n.c.a. ^{124}I IPA-Gabe wurden des Weiteren Anreicherungen in der Schilddrüse nachgewiesen.

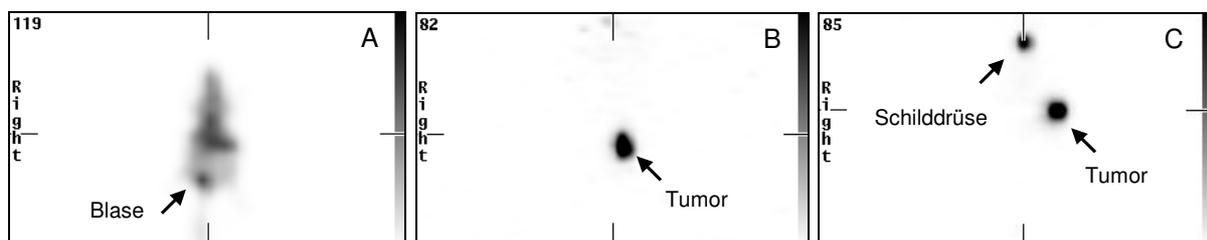


Abbildung 5.27: PET-Untersuchung einer CD1 nu/nu-Maus mit heterotop implantiertem A1207-Glioblastom nach n.c.a. ^{124}I IPA-Gabe. A: 1 h p.i., B: 24 h p.i., C: 48 h p.i.

5.4.4 Erste klinische PET-Untersuchung mit n.c.a. ^{124}I IPA

Zur Überprüfung, ob n.c.a. ^{124}I IPA zur klinischen PET-Diagnostik geeignet ist, wurde als nächstes eine PET-Untersuchung an einem Patienten mit Glioblastom durchgeführt. In Abbildung 28 A ist die Anreicherung von n.c.a. ^{124}I IPA im linken temporalen Lappen erkennbar, die auf einen Hirntumor hindeutete und im späteren histologischen Befund bestätigt wurde. Sechs Tage nach n.c.a. ^{124}I IPA-Injektion wurde ohne zusätzliche Tracergabe ein zweiter PET-Scan am selben Patienten durchgeführt, der sich zwischenzeitlich einer Tumorresektion unterzogen hatte (Abbildung 28 B). Im linken temporalen Lappen war immer noch eine Anreicherung detektierbar. Dies deutet darauf hin, dass Tumorreste im Hirn zurückblieben, die selbst sechs Tage nach n.c.a. ^{124}I IPA-Applikation noch nachweisbar waren. Demnach ist n.c.a. ^{124}I IPA für die PET-Diagnostik von Hirntumoren sehr gut geeignet.

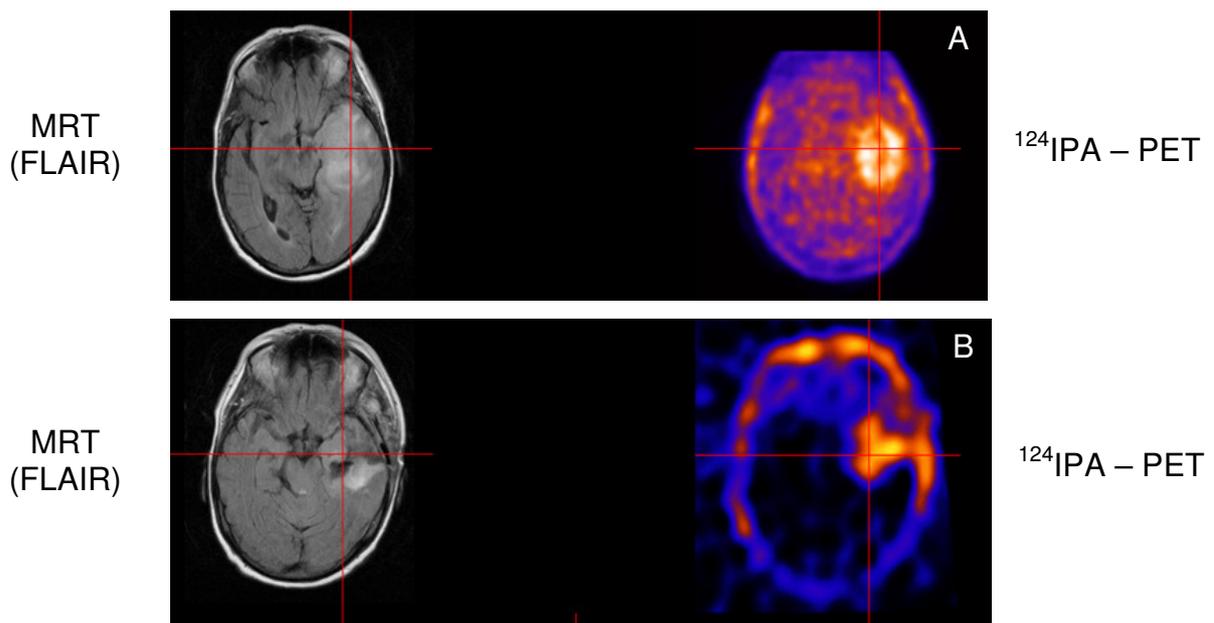


Abbildung 28: PET-Scan eines Glioblastompatienten mit n.c.a. ^{124}I IPA. A: 60 min p.i., präoperativ, B: 6 Tage p.i., postoperativ ohne weitere n.c.a. ^{124}I IPA-Gabe. Vergleichende MRT-Aufnahmen sind in den linken Bildausschnitten dargestellt.

6 Diskussion

Trotz vielfältiger und radikaler Therapieansätze bei der Behandlung von Gliomen, konnte die Überlebensprognose von Patienten mit bösartigem, hirneigenem Tumor bis heute nicht wesentlich gesteigert werden. Die durchschnittliche Überlebenszeit beim Glioblastom beträgt weiterhin etwa 12 - 15 Monate nach Diagnosestellung.

Die Schwierigkeiten der aktuellen Therapieschemata liegen im infiltrativen Wachstum dieses Tumors begründet. Bereits die Bezeichnung diffuse Gliome weist auf die ungewöhnliche Fähigkeit auch niedriggradiger Gliome hin, das umliegende Hirngewebe weiträumig zu infiltrieren ohne zunächst dessen Zyto- und Faserstruktur, sowie neuronale Funktionen zu zerstören. Dieses Fehlen klarer Tumorgrenzen ist neben der weitgehenden Chemo- und Strahlenresistenz der Grund für die Unmöglichkeit Gliome operativ restlos zu entfernen (ZANG, 2002). Aus diesem Grund wurden zahlreiche zusätzliche Behandlungskonzepte wie beispielsweise die Radioimmuntherapie, die Gentherapie, die Antiangiogenese-Therapie oder die Photodynamik-Therapie entwickelt (GOETZ ET AL., 2003; IMMONEN ET AL., 2004; JACOBI ET AL., 2005; ZALUTSKY, 2005; BECK ET AL., 2007; NORDEN ET AL., 2008). Diese adjuvanten Therapien werden als vielversprechend beschrieben, jedoch blieben durchschlagende Erfolge bislang weitgehend aus. Die Weiterentwicklung bisheriger und die Suche nach neuen Behandlungskonzepten bleiben daher eine große Herausforderung in der Bekämpfung von Hirntumoren.

In den letzten Jahren wurden auf molekularer und genetischer Ebene wichtige Erkenntnisse gewonnen, die zum besseren Verständnis hinsichtlich der Entstehung und dem Verlauf von Hirntumoren geführt haben. In diesem Zusammenhang wurden eine Anzahl von Tumormarkern entdeckt, die sich für die Entwicklung potentieller Therapeutika anbieten. Jedoch ergeben sich neue Probleme, die für jeden therapeutischen Einsatz experimentell erst geklärt werden müssen und oft die Einsatzmöglichkeiten limitieren. So bildet nach systemischer Administration die Blut-Hirn-Schranke eine natürliche Barriere. Weitere Punkte sind die Heterogenität von Gliomen, die inkonstante Antigenexpression und Rezeptordichte, der hohe interstitielle Druck, die eingeschränkte Blutversorgung, histopathologische Veränderungen (Nekrosen oder Fibrosen) sowie die biologische Halbwertszeit der Therapeutika (DEVYS ET AL.; 1999). Oft schließt auch die Größe der Moleküle ein Erreichen der ins umliegende Hirngewebe infiltrierten Tumorzellen in therapeutisch

wirksamen Mengen aus (RIVA ET AL., 2000). In diesem Zusammenhang sind in den letzten Jahren über die molekulare Bildgebung mit PET und SPECT radiomarkierte Aminosäuren in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses gerückt. Gründe hierfür sind die hohe Affinität bestimmter radioaktiv markierter Aminosäuren für Hirntumore, gepaart mit einer geringen Akkumulation im gesunden Hirngewebe, sowie in nicht-neoplastischen Veränderungen, wie Narben, Abszessen und Strahlennekrosen. Ein weiterer Vorteil der Aminosäuren ist ihre Fähigkeit die intakte Blut-Hirn-Schranke nach intravenöser Injektion zu überqueren. Eingehende Vorarbeiten zur Diagnostik von Hirntumoren wurden in unserer Arbeitsgruppe, mit einer Vielzahl radioiodierter Aminosäuren durchgeführt (BADER ET AL., 1999; SAMNICK ET AL., 2000; 2001; 2002 a; 2002 b). So wurde die radioiodierte Aminosäure *p*-[¹²³I]Iod-L-phenylalanin (¹²³IPA) zur Diagnose von Gliomen als SPECT-Tracer klinisch etabliert und aufgrund ihrer langen Retention im Tumorgewebe mit der Markierung mit ¹³¹I zu einem potentiellen Radio-Therapeutikum (¹³¹IPA) weiterentwickelt (SAMNICK ET AL., 2000; 2002 a; ROMEIKE ET AL., 2004; HELLWIG ET AL., 2005; ISRAEL ET AL., 2008). Dabei soll die im SPECT und PET nachgewiesene spezifische Aufnahme und lange Verweildauer des Radiopharmakons in Gliomen (SAMNICK ET AL., 2002 a; HELLWIG ET AL., 2005; FARMAKIS ET AL., 2008) eine gezielte Zerstörung der Tumorzellen bei einem weitgehenden Erhalt des gesunden Hirngewebes ermöglichen.

In vitro Untersuchungen in der Gliom-Zellkultur ergaben, dass die Zellzahl nach Inkubation mit ¹³¹IPA im Vergleich zu unbehandelten Zellen konzentrationsabhängig bis zu 80 % abnahm. Im gleichen Maße vielversprechend waren die *in vivo* Versuche an Ratten mit zerebral implantiertem C6-Gliom. Die Überlebenszeit der mit ¹³¹IPA behandelten Gruppe von tumortragenden Ratten waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant verlängert (ROMEIKE ET AL., 2004). In einem ersten Pilotversuch wurde ¹³¹IPA mit perkutaner Bestrahlung kombiniert. Dabei stellte sich im Zellexperiment heraus, dass mit der kombinierten Behandlung eine deutliche Zytotoxizitätssteigerung erzielt werden konnte. Auch *in vivo* ergab eine Kombinationstherapie bestehend aus ¹³¹IPA und perkutaner Bestrahlung eine Erhöhung der Überlebenszeit von tumortragenden Ratten (LEHMANN, 2007).

Alle bisherigen Versuche fanden mit sogenanntem geträgertem (*carrier added*) *p*-[¹³¹I]Iod-L-phenylalanin (c.a. ¹³¹IPA) statt, bei dem es sich um ein Gemisch aus nicht radioaktivem *p*-[¹²⁷I]Iod-L-phenylalanin (IPA) und dem radioaktiven Analogon ¹³¹IPA

handelt. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals mit trägerfreiem (*no carrier added*) p -[^{131}I]Iod-L-phenylalanin (n.c.a. ^{131}IPA) gearbeitet, um eine Abschätzung bezüglich der ausschließlich durch β^- -Strahlung hervorgerufenen Zytotoxizität treffen zu können. Dazu wurde im ersten Teil dieser Arbeit eine für die Herstellung von n.c.a. ^{131}IPA notwendige Vorstufe synthetisiert und deren Radioiodierung zu n.c.a. ^{131}IPA optimiert. In Zellversuchen wurde n.c.a. ^{131}IPA alleine und in Kombination mit perkutaner Bestrahlung und Temozolomid getestet und mit Ergebnissen aus Untersuchungen mit c.a. ^{131}IPA verglichen. Anschließend wurden an Hand zweier Tiermodelle die Zellkulturergebnisse *in vivo* überprüft. Des Weiteren setzt ein erfolgreicher Therapieeinsatz eine genaue Diagnosestellung und eine bestmögliche Selektion von Patienten voraus, die von der neuen Therapie profitieren können. In diesem Zusammenhang wurde erstmalig die Synthese von p -[^{124}I]Iod-L-phenylalanin (^{124}IPA) und eine erste Bewertung von ^{124}IPA als neuer PET-Tracer zur Diagnose und zum Therapiemonitoring von Patienten mit Gliomen beschrieben. Im Folgenden wird auf die Teilgebiete dieser Arbeit im Einzelnen eingegangen.

6.1 Chemische Synthese und Radioiodierung

Ziel war es, eine einfache Synthese von n.c.a. ^{131}IPA und n.c.a. ^{124}IPA für weitere Untersuchungen zu entwickeln und für einen späteren klinischen Einsatz zu etablieren. Um die Trägerfreiheit gewährleisten zu können, ist eine nicht iodierte Vorstufe essentiell, die in einem finalen Reaktionsschritt mit ^{124}I bzw. ^{131}I ausgetauscht werden kann. Naheliegender wäre eine Brom-Iod-Austausch-Reaktion, bei der in einem Reaktionsschritt p -Brom-L-phenylalanin zu p -[$^{124/131}\text{I}$]Iod-L-phenylalanin umgesetzt wird. Diese Reaktion erfordert jedoch harsche Reaktionsbedingungen mit Reaktionstemperaturen über $100\text{ }^\circ\text{C}$ und langen Reaktionszeiten bei teilweise geringen radiochemischen Ausbeuten. Im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung war es notwendig, eine einfache und schnell ablaufende Radioiodierungsreaktion mit hohen radiochemischen Ausbeuten zu etablieren. In diesem Zusammenhang haben sich Tributylzinnaryle als geeignete Vorstufen erwiesen, welche unter milden Reaktionsbedingungen und Reaktionszeiten von wenigen Minuten in hohen radiochemischen Ausbeuten zu den jeweiligen Iodverbindungen umgesetzt werden können (HITARA ET AL., 2006; SEEVERS UND COUNSELL, 1982). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit Tributylzinn-

phenylalanin als Vorstufe (sogenannter Precursor) für die Radioiodierungen ausgewählt. Als Ausgangsverbindung für die Synthese der Vorstufe für die Radioiodierung dienten *N*-Boc-*p*-iod-L-phenylalanin oder *N*-Boc-*p*-brom-L-phenylalanin. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Stannylierung aromatischer Systeme mit freier Carbonsäure-Gruppe in niedrigeren Ausbeuten verläuft (WILBUR ET AL., 1993). Aus diesem Grund wurden *N*-Boc-*p*-iod-L-phenylalanin und *N*-Boc-*p*-brom-L-phenylalanin im ersten Reaktionsschritt zu den jeweiligen Methylestern umgesetzt, welche anschließend mit überschüssigem Hexabutyldizinn unter Pd(0)-Katalyse (KOSUGI ET AL., 1981) zur gewünschten *p*-Tributylzinnphenylalanin-Verbindung umgesetzt wurden. Die Stannylierung von *N*-Boc-*p*-iod-L-phenylalanin und *N*-Boc-*p*-brom-L-phenylalanin verlief sowohl für die Iod- als auch für die Bromverbindung mit ähnlichen Ausbeuten ab. Zunächst wurde das überschüssige Hexabutyldizinn säulenchromatografisch mittels einer Mischung aus Ethylacetat:n-Hexan (5:95) als Eluent getrennt. Anschließend wurde die mobile Phase auf 25:75 (v:v) Ethylacetat:n-Hexan umgestellt und *N*-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-L-phenylalaninmethylester eluiert. Unter diesen Bedingungen war es jedoch nicht möglich *N*-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-L-phenylalaninmethylester von den jeweiligen Methylestern sauber zu trennen. Aus diesem Grund wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt mittels HPLC angeschlossen, der eine erfolgreiche Aufreinigung ermöglichte. Für die Radiomarkierung sollten optimale Synthesebedingungen mit dem Ziel gefunden werden, hohe radiochemische Ausbeuten von n.c.a. ^{124}IPA und n.c.a. ^{131}IPA in einer kurzen Reaktionszeit zu erlangen und somit die beiden Radiotracer für zukünftige klinische Routineanwendung zur Verfügung zu stellen. Optimiert wurden folgende Reaktionsparameter:

- Menge des Oxidationsmittels
- Precursormenge
- Reaktionstemperatur und -zeit
- Chromatografische Bedingungen

Als Oxidationsmittel wurde Chloramin-T (CAT) gewählt, dessen optimale Stoffmenge bei 15 μg lag. Chloramin-T ist ein starkes Oxidationsmittel und kann zu vielen unerwünschten Nebenprodukten führen. CAT ist daher bei der Iodierung von Peptiden nicht immer das Oxidationsmittel der Wahl (SEEVERS UND COUNSELL, 1982;

HUSSAIN ET AL., 1994). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Abnahme der radiochemischen Ausbeuten von n.c.a. ^{124}IPA und n.c.a. ^{131}IPA bei höheren CAT-Konzentrationen sein. Bei CAT-Mengen von 50 μg und 100 μg sanken die Ausbeuten um 40 - 60 % deutlich ab.

Nach 3 min war, die Reaktion noch nicht vollständig abgelaufen, wie chromatografisch nachweisbar war. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 5 min führte zum nahezu vollständigen Umsatz. Längere Reaktionszeiten brachten keine weitere Erhöhung der radiochemischen Ausbeute. Hinsichtlich der Reaktionstemperatur führte die Reaktion bei Raumtemperatur zu optimalen Ausbeuten. Höhere Temperaturen verschlechterten die Ausbeute hingegen. Nach Optimierung der Markierungsparameter führten 15 μg CAT, 5 min Reaktionszeit bei Raumtemperatur zu radiochemischen Ausbeuten von $90 \pm 6 \%$.

Im Anschluss an die Radioiodierung wurden die Schutzgruppen durch Hydrolyse abgespalten. Da die Iodierung in saurem Milieu stattfand, wurde zunächst die Boc-Schutzgruppe nach 10 minütiger Reaktion mit Trifluoressigsäure entfernt. Die Verseifung des Methylesters verlief nur vollständig, wenn mit 10 M NaOH 20 min auf 100 °C erhitzt wurde. Kürzere Reaktionszeiten und niedrigere NaOH-Konzentrationen führten zur unvollständigen Umsetzung. Eine vorherige Abspaltung der Estergruppe vor der Radioiodierung hatte eine Verschlechterung der radiochemischen Ausbeute von n.c.a. ^{124}IPA und n.c.a. ^{131}IPA von unter 30 % zur Folge.

Die Integrität von n.c.a. ^{124}IPA und n.c.a. ^{131}IPA wurde chromatografisch durch co-Elution der gereinigten Radiopharmaka mit der kommerziell erworbenen „kalten“ Referenz bestimmt. Da n.c.a. ^{124}IPA und n.c.a. ^{131}IPA trägerfrei und somit nahezu masselos sind, liegen ihre Stoffmengen unterhalb der Nachweisgrenze des UV-Detektors und können daher nur über den γ -Detektor nachgewiesen werden. Das inaktive IPA ist wiederum nicht über den γ -Detektor, sondern ausschließlich über den UV-Detektor nachweisbar. Das dargestellte Chromatogramm zeigte sowohl einen Peak am UV-Detektor als auch am γ -Detektor, womit der Beweis erbracht wurde, dass es sich bei dem Reaktionsprodukt nach der Radiomarkierung und anschließenden Schutzgruppenabspaltung um n.c.a. ^{124}IPA bzw. n.c.a. ^{131}IPA handelte.

Die *in vitro* Stabilität von n.c.a. ^{124}IPA und n.c.a. ^{131}IPA wurde ebenfalls chromatografisch bestimmt. Es wurden keine Zersetzungsprodukte 24 h nach

Lagerung in physiologischer Kochsalzlösung gefunden, wonach n.c.a. ^{124}IPA und n.c.a. ^{131}IPA im untersuchten Zeitraum als stabil betrachtet werden können. Somit stehen n.c.a. ^{124}IPA bzw. n.c.a. ^{131}IPA als neuer Radiotracer für die PET-Diagnostik bzw. für die Radionuklidtherapie von Hirntumoren zur Verfügung.

6.2 Bewertung von n.c.a. ^{131}IPA in Gliomzelllinien

Nach erfolgreicher Etablierung der Synthese von n.c.a. ^{131}IPA und n.c.a. ^{124}IPA wurde die therapeutische Wirksamkeit von n.c.a. ^{131}IPA als Monotherapie sowie in Kombination mit perkutaner Bestrahlung und Temozolomid in verschiedenen Gliomzelllinien *in vitro* getestet. Die Untersuchungen erfolgten in den primär humanen A1207, T3868 und T6217 Glioblastomzelllinien sowie in der F98 Rattengliomzelllinie in Kultur. Untersucht wurden Zellproliferation, Wachstumskinetik und Apoptose/Nekrose-Bildung. Ferner wurde die Zahl entstandener DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) ermittelt sowie deren Reparatur untersucht.

6.2.1 Beurteilung des Wachstums- und Apoptose-Nekroseverhaltens

Das Wachstumsverhalten wurde mittels WST-1-Test und Bisbenzimidfärbung qualitativ und quantitativ ermittelt. Durch kombinierte Anfärbung mit Bisbenzimid und Propidiumiodid wurden die apoptotischen / nekrotischen Zellen fluoreszenzmikroskopisch bestimmt.

Dazu wurden die Zellen 48 h und 72 h nach Behandlung mit n.c.a. ^{131}IPA (4 kBq – 74 kBq), RT (2 Gy – 20 Gy) bzw. TMZ (3 x 20 μM) sowie den jeweiligen Kombinationstherapien untersucht.

Auf die alleinige n.c.a. ^{131}IPA -Behandlung reagierten die vier Zelllinien sehr unterschiedlich. Während mit Hilfe des Proliferationstestes bei A1207 und T6217 mit steigender n.c.a. ^{131}IPA -Konzentration die Anzahl vitaler Zellen abnahm, führten bei T3868 erst höhere n.c.a. ^{131}IPA -Konzentrationen zu signifikanter Zytotoxizität. Dagegen hatte n.c.a. ^{131}IPA im untersuchten Konzentrationsbereich weder 48 h noch 72 h nach Behandlung einen nachweisbaren Effekt auf die Zelllinie F98. In weiteren Versuchen sollten für diese Zelllinie daher Untersuchungen mit höheren Aktivitäten durchgeführt werden, da die Vermutung nahe liegt, dass die eingesetzten Aktivitäten für nachweisbare Zellschädigungen nicht ausreichten. Ein Vergleich von n.c.a. ^{131}IPA

mit c.a. ^{131}I IPA ergab keinen nennenswerten Unterschied in der Proliferationsrate bei einer verwendeten spezifischen Aktivität von etwa $120 \text{ MBq}/\mu\text{mol}$ c.a. ^{131}I IPA. Betrachtet man die Wachstumskinetik und die Apoptose/Nekrose-Bildung nach Behandlung mit n.c.a. ^{131}I IPA mittels Bisbenzimid und Propidiumiodid, so zeigten die humanen A1207 und T6217 Glioblastomzelllinien einen ähnlichen Trend im Wachstumsverhalten wie beim WST-1-Test. Beim Vergleich von n.c.a. ^{131}I IPA und c.a. ^{131}I IPA konnten keine Unterschiede des Wachstumsverhaltens von A1207 48 h und 72 h nach der Tracergabe nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie T6217 waren jedoch deutliche Unterschiede zwischen trägerarmem und geträgertem ^{131}I IPA zu beobachten. Nach c.a. ^{131}I IPA-Behandlung (74 kBq) nahm die Zellzahl von T6217 deutlich stärker ab als nach n.c.a. ^{131}I IPA-Gabe. Der Anteil sekundär apoptotischer und primär nekrotischer Zellen war nach der Behandlung mit 74 kBq c.a. ^{131}I IPA deutlich höher als mit n.c.a. ^{131}I IPA. Dieser verstärkte apoptotische Effekt von c.a. ^{131}I IPA konnte lediglich bei T6217 nachgewiesen werden und spricht für die These, dass nicht radioaktiv markiertes IPA einen radiosensitivierenden Effekt ausübt, dieser aber von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Diese These wird von früheren Versuchsergebnissen gestützt, in denen Zellzytotoxizitäten nach Behandlung mit nicht radioaktivem IPA beobachtet wurden (LEHMANN, 2007).

Da die Apoptose in Folge zu starker Zellschädigungen eingeleitet wird und damit erst nach längeren Beobachtungszeiten zum Tragen kommt, ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass mit einer Verlängerung des bisherigen Beobachtungszeitraums auch für A1207 eine erhöhte Apoptoserate nachweisbar wird.

Um Aussagen zur Wirksamkeit von ^{131}I IPA sowie zur Kombinationsbehandlung ^{131}I IPA + perkutane Bestrahlung im Vergleich zur alleinigen Strahlenbehandlung treffen zu können, wurden die Zellen perkutan bestrahlt und ebenfalls 48 h bzw. 72 h nach Behandlung untersucht.

Lässt man die Zelllinie F98 zunächst außen vor, so war beim WST-1-Test bei den primären humanen Glioblastomzelllinien A1207, T6217 und T3868 nach 5 Gy Bestrahlung der stärkste Rückgang der Anzahl vitaler Zellen zu beobachten.

Eine Erhöhung der Bestrahlungsdosen auf 10 bis 20 Gy ergab im WST-1-Test keine signifikante Veränderung der Proliferationsrate.

Neuere Untersuchungen ergaben einen Zusammenhang zwischen der erhöhten EGFR-Expression im Tumor und seiner Strahlen- bzw. Chemoresistenz (BARKER ET AL., 2001; CHAKRAVARTI ET AL., 2002; 2004). Diese Hypothese wurde im Rahmen unserer Untersuchungen insbesondere mit der Zelllinie A1207 bestätigt. A1207 ist eine humane Glioblastomzelllinie mit erhöhter EGFR-Expression (MISHIMA ET AL. 2001). Eine externe Bestrahlung mit Dosen bis 20 Gy hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate von A1207 Zellen. Die relativ hohe Strahlenresistenz dieser Zelllinie könnte somit auf ihre hohe EGFR-Expression zurückgeführt werden. Bei der F98-Zelllinie konnte vor allem nach 72 h eine dosisabhängige Abnahme vitaler Zellen mittels WST-1-Tests bestimmt werden. 2 Gy erhöhten zunächst die Proliferation von F98-Zellen. Mit steigenden Bestrahlungsdosen setzte jedoch ein starkes Absterben der Tumorzellen ein. F98 ist daher deutlich strahlensensitiver, wie auch BENCOKOVA ET AL. zeigten (BENCOKOVA ET AL. , 2008).

Eine Untersuchung der behandelten Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (H33342) ergab im Gegensatz zum WST-1-Test eine dosisabhängige Strahlensensibilität. Damit stellte sich die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung als sensitiver bei der Bewertung von Therapieeffekten *in vitro* dar.

Betrachtet man die Kombination aus ^{131}I IPA und perkutaner Bestrahlung, so wirkten in beiden Testverfahren beide Behandlungen additiv und führten zu stärkeren Zytotoxizitäten, als nach den jeweiligen Einzelbehandlungen. Die additive Wirkung kann mit der ausgesandten β^- -Strahlung von ^{131}I IPA erklärt werden, die eine zusätzliche Zellschädigung zur perkutanen Bestrahlung hervorrief. Bei F98 wurde lediglich eine Abhängigkeit zwischen den verschiedenen Bestrahlungsdosen, aber nicht bezüglich steigender n.c.a. ^{131}I IPA-Konzentrationen gefunden. Da bei dieser Zelllinie bereits bei alleiniger n.c.a. ^{131}I IPA-Behandlung kein dosisabhängiger Rückgang der vitalen Zellen zu beobachten war, deckten sich die Ergebnisse der Kombinationstherapie mit den Resultaten aus den Einzelbehandlungen.

Der nicht radioaktiv markierte IPA-Anteil in c.a. ^{131}I IPA konnte, wie schon bei alleiniger ^{131}I IPA-Behandlung, auch in Kombination mit perkutaner Bestrahlung die Proliferationsrate nicht beeinflussen. Dies galt für alle untersuchten Zelllinien. Es zeigte sich jedoch nach der Färbung mit Bisbenzimid, dass die Zellzahl von T6217 nach c.a. ^{131}I IPA und perkutaner Bestrahlung deutlich stärker abnahm als nach n.c.a. ^{131}I IPA und perkutaner Bestrahlung. Der nicht radioaktiv markierte IPA-Anteil

übte demnach eine Radiosensitivierung der Zellen aus. Dass dies mittels WST-1-Test nicht nachzuweisen war, spricht erneut für die höhere Sensitivität der fluoreszenzmikroskopischen Methode.

Eine vorhergehende Untersuchung ergab bei A1207 nach der Kombinationsbehandlung c.a. ^{131}I IPA (37 kBq) + 5 Gy perkutaner Bestrahlung eine Verminderung der Zellzahl um 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (LEHMANN, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Verminderung um 20 % bei c.a. ^{131}I IPA (74 kBq) + 5 Gy Bestrahlung und gleicher Inkubationszeit bestimmt. Diese Abweichungen werden erneut auf unterschiedliche spezifische Aktivitäten des Radiopharmakons zurückgeführt.

Zusätzlich konnten bei T6217 signifikant mehr sekundär apoptotische / primär nekrotische Zellen in Kombination mit c.a. ^{131}I IPA beobachtet werden. Je weniger vitale Zellen nachweisbar waren, umso mehr sekundär apoptotische / primär nekrotische Zellen wurden gefunden. Derartige Effekte wurden lediglich bei T6217 beobachtet und sind ein weiterer Beleg dafür, dass die spezifische Aktivität von c.a. ^{131}I IPA einen entscheidenden Einfluss auf die Radiosensitivierung der Zellen ausübt und deren Optimum zelllinienabhängig ist. In weiterführenden Untersuchungen sollten daher optimierte Trägeranteile an nicht radioaktivem IPA gesucht werden, die eine maximale Radiosensitivierung ermöglichen.

Da die derzeitige Standardtherapie bei Gliomen die Tumorsektion mit anschließender Strahlen- und Chemotherapie vorsieht und bei einer möglichen klinischen Anwendung n.c.a. ^{131}I IPA bzw. c.a. ^{131}I IPA in die Standardtherapie integriert werden sollte, wurde ^{131}I IPA nicht nur alleine oder kombiniert mit RT getestet, sondern auch auf die Kombination mit dem Chemotherapeutikum TMZ hin untersucht. Weiter vorne in dieser Arbeit wurde bereits diskutiert, dass n.c.a. ^{131}I IPA in den untersuchten Konzentrationen während des Beobachtungszeitraumes die Zellviabilität um etwa 20 % bei A1207 und T6217 und um bis zu 50 % bei T3868 senkte. Die TMZ-Konzentration wurde nach Testung mit 10 μM , 20 μM und 50 μM TMZ auf 20 μM festgelegt, da in diesem Konzentrationsbereich moderate zytotoxische Effekte des TMZ zu beobachten waren und somit die Effekte des n.c.a. ^{131}I IPA nicht überdeckten. Außerdem wurden in klinischen Studien TMZ-Serumkonzentrationen zwischen 5 und 50 μM nachgewiesen, abhängig von der verabreichten TMZ-Dosis und der Zeit nach Applikation (BRADA, 1999; HAMMOND,

1999), so dass die hier gewählte TMZ-Konzentration von 20 μM eine realistische klinische Größenordnung darstellt. Auf Grund der Tatsache, dass TMZ im neutralen pH-Bereich mit einer HWZ von etwa 1,8 h und das daraus entstehende therapeutisch wirksame Methyldiazoniumion mit einer HWZ von 2 min hydrolysiert (DENNY ET AL., 1994), wurden die Zellen einer wiederholten, insgesamt dreimaligen TMZ-Behandlung unterzogen.

Wie bei ^{131}I PA-Behandlung und perkutaner Bestrahlung reagierten die Zelllinien unterschiedlich gegenüber der TMZ-Behandlung. Nach TMZ-Behandlung konnten außer bei T3868 bei allen Zelllinien verminderte Zellviabilitäten zwischen 10 % und 20 % nachgewiesen werden. Die Zelllinie T3868 erwies sich als nahezu resistent gegen TMZ. Wurden nun die einzelnen Behandlungen ^{131}I PA, perkutane Bestrahlung und TMZ miteinander kombiniert, so war ein weiteres Ansteigen der Zytotoxizitäten im Vergleich zu den Einzelbehandlungen zu beobachten. Die Zytotoxizitäten, die jede Einzelbehandlung für sich hervorrief, addierten sich, so dass die Kombination von TMZ + ^{131}I PA + RT die wirkungsvollste Behandlung von Gliomzellen darstellte.

6.2.2 Beurteilung der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche

Ionisierende Strahlung, zu der die β^- -Strahlung von ^{131}I gehört, wirkt entweder direkt auf DNA-Moleküle oder indirekt über die Bildung diverser Wasser- oder Sauerstoffradikale, die wiederum mit der DNA interagieren. Dabei entstehen einerseits Strukturveränderungen an den Basen der DNA, die die Replikation und Transkription beeinflussen, andererseits werden DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSB) hervorgerufen. Die entstandenen Doppelstrangbrüche werden entweder über Homologe Rekombination oder über Non-Homologous-End-Joining repariert. Ist die Zelle nicht in der Lage die DNA-DSB zu reparieren, leitet sie die Apoptose ein.

Neben der Überprüfung des Wachstumsverhaltens und der Apoptose-/Nekrosebildung, wurden die Gliomzellen nach Behandlung mit n.c.a. ^{131}I PA, n.c.a. ^{131}I PA + RT sowie TMZ + n.c.a. ^{131}I PA + RT hinsichtlich der entstandenen DNA-Doppelstrangbrüche untersucht. Die DNA-DSB können mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nach Antikörperfärbung als sogenannte Foci sichtbar gemacht werden. Die Anzahl der Foci sind proportional zur Anzahl der DNA-DSB (ROGAKOU ET AL., 1998, 1999). Steigende Focizahlen bedeuten demnach eine

vermehrte DNA-Schädigung über DNA-DSB. Außerdem ermöglicht diese Methode das Reparaturverhalten der DNA-DSB zu untersuchen.

Wie in der Literatur beschrieben und in ersten Vorversuchen bestätigt wurde, wiesen bereits unbehandelte Tumorzellen einen erhöhten Hintergrund mit vielen kleinen Foci auf (BANÁTH ET AL., 2004; MAHRHOFER ET AL., 2006; BURDAK-ROTHKAMM ET AL., 2007). Vorversuche ergaben, dass die alleinige Behandlung von Tumorzellen mit ^{131}I IPA in der verwendeten Konzentration von 150 kBq/ml etwa 3 - 4 Foci/Zelle induzierte. Ist der Hintergrund unbehandelter Tumorzellen zu hoch, sind die induzierten Foci der Einzelbehandlungen nicht eindeutig zu bestimmen. Aus diesem Grund wurden die DNA-DSB hauptsächlich in den humanen A1207- und T3868-Glioblastomzelllinien quantifiziert.

Die n.c.a. ^{131}I IPA-Behandlung bewirkte sowohl bei A1207 als auch bei T3868 einen Anstieg der Focizahl. Dies kann als Zeichen für die Schädigung der DNA durch Induktion von DNA-DSB gewertet werden. Dieses Ergebnis bestätigte den in vorhergehender Untersuchung ermittelten zytotoxischen Effekt von n.c.a. ^{131}I IPA in Gliomzellen. Die Behandlung der T3868-Glioblastomzellen mit c.a. ^{131}I IPA ergab eine deutliche Erhöhung der Focizahl in der Zellkultur. Dieses Ergebnis deutet erneut darauf hin, dass der nicht radioaktive Anteil in c.a. ^{131}I IPA einen möglichen radiosensitivierenden Effekt besitzt, der jedoch bei der A1207-Zelllinie wenig ausgeprägt war.

Da im Mittelpunkt der Untersuchungen ein Vergleich zwischen ^{131}I IPA, perkutaner Bestrahlung, TMZ und deren Kombinationen stand, bot sich zunächst eine Bestrahlungsdosis an, bei der die einzelnen Behandlungen mit der perkutanen Bestrahlung untereinander vergleichbar sind. Besonders bei den Kombinationsbehandlungen sollte die Anzahl der durch Bestrahlung induzierten Foci nicht die der ^{131}I IPA- oder TMZ-induzierten Foci überdecken. Daher wurde zunächst ein Bestrahlungsregime von 0,1 Gy gewählt, das auf 1 Gy ausgeweitet wurde. Nach 1 Gy Bestrahlung war der Anteil der Foci/Zelle, die durch die Bestrahlung hervorgerufen wurden (etwa 16 - 18 Foci/Zelle), erwartungsgemäß deutlich höher als nach 0,1 Gy (etwa 6 Foci/Zelle). Diese Zahlen sind vergleichbar mit denen von SHORT ET AL. in weiteren Gliomzelllinien (SHORT ET AL., 2007). In dieser Arbeit erschien T3868 ähnlich sensitiv gegenüber der Bestrahlung wie A1207.

Dagegen induzierte Temozolomid weniger DSB bei T3868 als bei A1207. Dies wurde noch deutlicher, wenn die Zellen statt der einmaligen TMZ-Behandlung mit 20 μM

einer zweimaligen TMZ-Behandlung im Abstand von 18 h unterzogen wurden. Hierbei wurde bei A1207 eine Verdreifachung der Focizahl/Zelle beobachtet (Daten sind nicht gezeigt). Die Ergebnisse der DNA-DSB-Untersuchungen korrelieren weitgehend mit den Ergebnissen der Wachstumsuntersuchungen dieser Zelllinie, wenngleich ein direkter Vergleich zwischen der Detektion entstandener DSB und der Anzahl vitaler Zellen nicht ohne weiteres möglich ist, da wachstumshemmende oder apoptotische Prozesse erst nach der Entstehung von DNA-DSB bzw. erst nach deren nicht erfolgten Reparatur eintreten.

Die Kombinationstherapien ergaben eine deutliche Zunahme der induzierten DSB in Gliomzellen. Dies bedeutet, dass die Kombinationsbehandlungen, bestehend aus TMZ + n.c.a. ¹³¹IPA, n.c.a. ¹³¹IPA + RT bzw. TMZ + n.c.a. ¹³¹IPA + RT, die DNA und damit die Tumorzellen stärker schädigten als die jeweiligen Einzelbehandlungen. Auch dieses Ergebnis bestätigte die Resultate aus den vorhergehenden Untersuchungen.

Vergleichbare Untersuchungen mit c.a. ¹³¹IPA zur Abschätzung der radiosensitivierenden Wirkung des nicht radioaktiv markiertem IPA-Anteils ergaben für T3868 im Bestrahlungsregime von 0,1 Gy eine Erhöhung der DNA-DSB. Für A1207 war, wie bereits nach den n.c.a. ¹³¹IPA- bzw. c.a. ¹³¹IPA-Einzelbehandlungen, keine radiosensitivierende Wirkung des nicht radioaktiv markierten IPA-Anteils zu beobachten. Auch hier müssten weitere grundlegende Experimente variierende spezifische Aktivitäten untersuchen und klären, welche spezifische Aktivität für einen späteren klinischen Einsatz am besten geeignet ist.

γ -H2AX initiiert eine Signalkaskade, die für die Rekrutierung und Anordnung der Reparaturkomplexe in der Nähe der DNA-DSB von Nöten sind. Auf diese Weise wird die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche eingeleitet und schließlich vollzogen. Mit zunehmender Zeit werden die DNA-DSB repariert und γ -H2AX wieder dephosphoryliert, wodurch die Zahl der Foci/Zelle wieder sinkt. Somit ermöglicht die γ -H2AX-Methode die Untersuchung des Reparaturverhaltens der DNA-DSB der Zelle. Über die Beobachtungszeit von 24 h wurde eine kontinuierliche Abnahme der Foci/Zelle unabhängig von der Zelllinie beobachtet. Während bei T3868 die Foci/Zelle nach allen Behandlungen wieder auf den Ausgangswert der unbehandelten Kontrolle fielen, blieben sie bei A1207 über den gesamten Beobachtungszeitraum erhöht. Dies deutet darauf hin, dass bei der T3868-Zelllinie

die DNA-Schäden weitestgehend repariert wurden, bei A1207 jedoch unreparierte DNA-DSB zurückblieben. Bleiben DNA-DSB zurück, die nicht repariert werden können, werden die Zellen durch Einleitung der Apoptose eliminiert. Besonders bei A1207 fiel auf, dass die Kombinationsbehandlungen bestehende aus n.c.a. ^{131}I PA + RT sowie TMZ + n.c.a. ^{131}I PA + RT die meisten Foci induzierten und diese schlechter repariert wurden als nach den Einzelbehandlungen. Da die induzierten Foci auch nach 24 h erhöht blieben, deutet dies auf eine anhaltende Zellschädigung hin. Dieses Ergebnis weist zusätzlich darauf hin, dass die Kombinationsbehandlungen zu stärkeren Therapieergebnissen bei Gliomen führen.

Jede Behandlung für sich zeigte zytotoxische Effekte, in Kombination angewandt, konnten diese verstärkt werden. N.c.a. ^{131}I PA konnte zwar keine Radiosensitivierung zugeschrieben werden, die in der Einzelbehandlung beobachteten zytotoxischen Effekte von n.c.a. ^{131}I PA hatten in den Kombinationsbehandlungen jedoch einen additiven Charakter. Unter dem therapeutischen Aspekt betrachtet, spricht dies dafür, dass die Radionuklidtherapie mit n.c.a. ^{131}I PA, in Kombination mit der perkutanen Strahlentherapie und Chemotherapie, eine vielversprechende therapeutische Option bei Gliomen darstellt. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden *in vivo* Versuche an Mäusen und Ratten durchgeführt.

6.3 *In vivo* Experimente

Ziel der *in vivo* Untersuchungen war es, Ergebnisse mit n.c.a. ^{131}I PA aus der Zellkultur unter physiologischen Bedingungen im Tiermodell zu verifizieren. Die Untersuchungen erfolgten in zwei unterschiedlichen Tiermodellen. Zum einen an CD1 nu/nu Nacktmäusen mit heterotop implantiertem humanem A1207- und T3868-Glioblastom an der rechten Flanke und zum anderen an Fischerratten mit orthotop in die rechte Hirnhälfte implantierten F98-Gliomen, ein sogenanntes syngeneses Fischer/F98-Gliommodell. Beide Modelle sind in der experimentellen Neuro-Onkologie etablierte *in vivo* Modelle und eignen sich für die Evaluierung neuer Therapieeinsätze (CANDOLFI ET AL., 2007; MATHIEU ET AL., 2007; BISTON ET AL., 2004).

Ähnlich wie in der Zellkultur wurden folgende Behandlungsschemata *in vivo* durchgeführt.

- unbehandelte Kontrolle
- n.c.a. ^{131}I PA
- perkutane Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen
- n.c.a. ^{131}I PA + perkutane Bestrahlung

Die Therapien wurden sowohl miteinander als auch mit den jeweiligen unbehandelten Kontrollen verglichen.

Des Weiteren sollte n.c.a. ^{124}I PA in ersten PET-Untersuchungen auf seine Eignung in der PET-Diagnostik von Hirntumoren getestet werden.

6.3.1 Untersuchungen am Mausmodel mit n.c.a. ^{131}I PA

CD-1 nu/nu-Mäuse mit subkutan implantiertem A1207 und T3868 Glioblastom wurden in die Untersuchung aufgenommen, wenn der Durchmesser des Tumors etwa 0,4 cm – 0,6 cm erreicht hatte. Die Tiere wurden in vier Gruppen randomisiert, bestehend aus einer n.c.a. ^{131}I PA-, einer RT-, einer n.c.a. ^{131}I PA + RT-Gruppe und einer Kontrollgruppe.

Grundsätzlich war zu beobachten, dass T3868 *in vivo*, anders als in der Zellkultur schneller und aggressiver als A1207 wuchs. In Folge dessen verstarben die unbehandelten Kontrolltiere mit T3868 deutlich früher als die Kontrolltiere mit A1207-Glioblastom. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass n.c.a. ^{131}I PA das Tumorwachstum in Mäusen hemmt. Bei T3868-tragenden Mäusen war besonders gut zu erkennen, dass der Tumor trotz der n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung zwar weiter wuchs, das Wachstum aber deutlich langsamer verlief als bei der Kontrollgruppe. Auch die Behandlung mit 20 Gy perkutaner Bestrahlung führt zur Verminderung des Tumorumfanges bzw. zur Verlangsamung der Wachstumskinetik *in vivo*.

Ein Vergleich der Behandlungsgruppen ergab, dass die Kombinationsbehandlung zu deutlich besseren Therapieerfolgen führt. Mit beiden implantierten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Kombinationsbehandlung, bestehend aus n.c.a. ^{131}I PA + RT, zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führte. Dieses Resultat bestätigte die Ergebnisse aus dem Zellexperiment und somit die hohe Effektivität der Kombi-

nationstherapie bestehend aus n.c.a. ^{131}I PA und perkutaner Bestrahlung auch im Glioblastommodell *in vivo*. Die Effektivität der Behandlung ging nicht nur mit der Erhöhung der Überlebenszeit sondern auch mit der Reduzierung der Tumorgroße in der Maus einher.

Wie von Lehmann gezeigt, sind verbesserte Therapieergebnisse bei wiederholter ^{131}I PA-Behandlung zu erwarten (LEHMANN, 2007). Demnach sollte in weiteren Experimenten eine wiederholte n.c.a. ^{131}I PA-Gabe angestrebt werden. Des Weiteren müsste in fortführenden Versuchen die perkutane Bestrahlungsdosis von 20 Gy fraktioniert verabreicht werden, wie es in der Strahlentherapie routinemäßig durchgeführt wird. Die Fraktionierung schont einerseits die gesunden Gewebszellen und führt andererseits zu einer verstärkten Schädigung der sich schnell teilenden Tumorzellen. Anhand des bereits in dieser Arbeit erzielten Therapieerfolges mit Hilfe der kombinierten Radionuklidtherapie und einmaligen perkutanen Bestrahlung ist zu erwarten, dass mit der Optimierung des Behandlungsprotokolls hinsichtlich einer wiederholten n.c.a. ^{131}I PA-Injektion und einer fraktionierten perkutanen Bestrahlung, die bisherigen Therapieerfolge noch steigerungsfähig sind.

Da für jede i.v.-Injektion von ^{131}I PA und für jede perkutane Bestrahlung die Tiere stets mit der stark belastenden Xylazin / Ketamin-Lösung narkotisiert wurden, wurde in dieser Arbeit auf die vorgeschlagene wiederholte n.c.a. ^{131}I PA-Behandlung und fraktionierte Bestrahlung verzichtet, um die Versuchstiere zu schonen. Um die Optimierungsvorschläge umzusetzen, bietet es sich an, zukünftig von der Xylazin / Ketamin-Narkose auf Isofluran zu wechseln, was wesentlich schonender für die Tiere ist und eine mehrfache Behandlung unter wiederholter Narkose erlaubt.

In den Zellkulturexperimenten sind verstärkte zytotoxische Effekte nach zusätzlicher Behandlung mit TMZ nachgewiesen worden. FIVEASH ET AL. konnten zeigen, dass die kombinierte Strahlen- und TMZ-Behandlung zu verringertem Tumorwachstum, im Vergleich zur alleinigen Strahlentherapie bei Mäusen mit subkutan implantiertem Glioblastom, führt (FIVEASH ET AL., 2008). Daher ist davon auszugehen, dass erhöhte Therapieerfolge durch die Erweiterung des n.c.a. ^{131}I PA + RT-Behandlungsregim um Temozolomid zu erwarten sind. Aus Gründen der Logistik und des Tierschutzes war eine zusätzliche Behandlung der Tiere mit Temozolomid im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Bei der angestrebten zusätzlichen TMZ-Behandlung stellte sich die Formulierung einer injektionsfähigen TMZ-Lösung, die den Tieren wiederholt verabreicht werden kann, als problematisch heraus, so dass in weiterführenden

Arbeiten eine geeignete Methode für die TMZ-Behandlung zu suchen ist, die eine Kombination aller drei Einzeltherapien ermöglicht.

6.3.2 Untersuchungen am Rattenmodell mit n.c.a. ¹³¹IPA

Da die Rattenglioblastomzelllinie F98 durch ihr biologisches Verhalten (infiltratives Wachstum, geringe Immunogenität, aggressiver und tödlicher Verlauf) (TZENG ET AL., 1991) als eine Zelllinie beschrieben wird, die dem humanen Glioblastom sehr ähnlich ist, wurden für das Rattenmodell F98-Zellen ausgewählt. Des Weiteren gilt das syngene Fischer / F98-Gliommodell derzeit als besonders geeignet für experimentelle *in vivo* Untersuchungen in der Neuroonkologie (TZENG ET AL., 1991; BISTON ET AL., 2004; MATHIEU ET AL., 2007). Wie bereits im oben stehenden Kapitel diskutiert, waren die *in vivo* Ergebnisse am heterotop implantierten Mausmodell sehr vielversprechend, so dass im nächsten, weiterführenden Schritt Tumorzellen orthotop ins Hirn implantiert wurden. Da in unserer Arbeitsgruppe bereits vielversprechende Ergebnisse mit anderen orthotopen Gliommodellen erzielt wurden (LEHMANN, 2007; ROMEIKE ET AL., 2004), sollte in Anlehnung daran und an Angaben aus der Literatur zunächst das syngene Fischer / F98-Gliommodell in unsere Arbeitsgruppe etabliert werden. Die Standardisierungsarbeit ergab eine optimale F98-Zellzahl von 1×10^4 Zellen in 5 μ l Medium. Die mittlere Überlebenszeit der in der vorliegenden Arbeit mit 1×10^4 Zellen implantierten Fischer-Ratten lag bei 19 ± 4 Tagen. Dem histologischen Befund zu Folge, war das Tumorstadium nach 12 Tagen zu weit voran geschritten, als dass die Behandlungen die weitere Tumorstadium aufhalten konnten.

Auf Grund dessen wurde die Behandlung nach 7 Tagen - 9 Tagen begonnen. Trotz des früheren Therapiebeginns war histologisch das Tumorstadium bereits so weit fortgeschritten, dass jegliche Behandlung zu keiner signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit führte. Zukünftig sollte die Anzahl der implantierten Tumorzellen weiter verringert werden. Beispielsweise auf 1×10^3 - 5×10^3 , wie es in anderen Arbeiten beschrieben wurde (EYÜPOGLU ET AL., 2006; ROUSSEAU ET AL., 2007; TZENG ET AL., 1991). Des Weiteren müsste zukünftig die Behandlung nicht erst sieben Tage nach Implantation sondern bereits weitere 2 Tage - 3 Tage früher beginnen (EYÜPOGLU ET AL., 2006). Dass sämtliche bisherige Therapiebemühungen bei den F98 orthotop implantierten Ratten zu keiner signifikanten Verlängerung des Überlebens führte, spricht für die Aggressivität dieser Gliomzelllinie auch *in vivo* in

Fischer-Ratten. Das Ergebnis korreliert weitgehend mit den vorhergehenden Ergebnissen in der F98-Zellkultur, in der die Behandlung der F98-Zellen mit n.c.a. ^{131}I PA keine signifikante Zytotoxizität gezeigt hatte. Auch die alleinige perkutane Kopfbestrahlung der Tiere rief keine Verlängerung der Überlebenszeit hervor, was das aggressive Tumorwachstum untermauert. LEHMANN, 2007 implantierte humane Glioblastomzellen orthotop und konnte durch einmalige perkutane Bestrahlung mit 4 Gy ein gesteigertes Überleben der RNU-Ratte erzielen und in Kombination mit c.a. ^{131}I PA die Überlebenszeit im Vergleich zu den Monotherapien erheblich verlängern (LEHMANN, 2007). Für die F98-Gliome war eine einmalige perkutane Bestrahlung mit 4 Gy zu gering, um das Tumorwachstum zu verlangsamen. Aufgrund dessen wurden die Ratten mit 2 x 4 Gy perkutan bestrahlt, jedoch ohne Verbesserung der Überlebenszeit im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Daten sind nicht gezeigt). ROUSSEAU ET AL., 2007 bestrahlten F98 tragende Fischerratten mit 3 x 8 Gy und erzielten damit eine Steigerung des Überlebens. Es ist daher anzunehmen, dass mit einer weiteren Erhöhung der Bestrahlungsdosis das Wachstum der F98-Tumore verlangsamt werden kann. Auch zweifach wiederholte n.c.a. ^{131}I PA-Behandlungen konnten das F98-Tumorwachstum histologisch nur geringfügig verlangsamen, was sich in der geringen Erhöhung der Überlebenszeit widerspiegelte.

Zur Etablierung des F98-Tumormodells sollte daher neben der weiteren Verringerung der Zellzahl die Tumorbehandlung intensiviert werden. Einerseits sind wiederholte n.c.a. ^{131}I PA-Behandlungen und andererseits fraktionierte perkutane Bestrahlungen mit höheren Gesamtbestrahlungsdosen anzustreben. Dazu ist es auch hier notwendig, wie bereits beim Mausmodell diskutiert, von der momentan verwendeten Pentobarbitalnarkose bei den Ratten auf die schonendere Isofluran-Narkose zu wechseln, die mehrfache Behandlungen der Tiere zulässt ohne diese zu sehr zu schwächen.

6.3.3 Bewertung von n.c.a. ^{124}I PA als PET-Tracer

Nach erfolgreicher Optimierung der Synthese von n.c.a. ^{124}I PA wurde sein Potential als PET-Tracer einerseits in einem Mausmodell sowie klinisch an einem Patienten mit gesichertem Glioblastom getestet. Da für die Mausuntersuchungen kein Kleintier-PET-Scanner zur Verfügung stand, fanden die Untersuchungen am klinischen PET-Scanner statt. Aufgrund der daraus resultierenden schlechten Auflösung der Bilder

sowie der hohen Hintergrundaktivität, war die Abgrenzung des Tumors 1 h nach i.v.-Injektion von n.c.a. ^{124}I PA nicht möglich. Dennoch konnte der Tumor 24 h und 48 h p.i. deutlich dargestellt werden. Aufgrund dieser vielversprechenden tierexperimentellen Ergebnisse wurde n.c.a. ^{124}I PA zur PET-Diagnostik eines Hirntumors an einem Patienten eingesetzt. Bereits 60 min p.i. war der Tumor deutlich abgrenzbar und wurde histologisch als Glioblastom WHO Grad IV bestätigt. In einem zweiten PET-Scan sechs Tage nach n.c.a. ^{124}I PA-Gabe waren trotz zwischenzeitlicher Tumorresektion beim Patienten immer noch Anreicherungen detektierbar. Dieser Befund zeigte, dass n.c.a. ^{124}I PA selbst sechs Tage nach Tracer-Applikation im (Rest-)Tumorgewebe gespeichert wurde. N.c.a. ^{124}I PA ist demnach für die PET-Diagnostik hervorragend geeignet und kann zudem zur Bestimmung von Resttumorgewebe postoperativ ohne erneute Tracer-Applikation eingesetzt werden (FARMAKIS ET AL., 2008).

7 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und präklinische Validierung radioiodierter L-Phenylalanine für die Endoradionuklidtherapie und für PET-Untersuchungen von hirneigenen Tumoren.

Mit der Synthese eines neuen Vorläufers und dessen optimierter Radioiodierung konnten in dieser Arbeit trägerarmes ^{131}I IPA für die Therapie sowie erstmals n.c.a. ^{124}I IPA für die PET-Diagnostik von Gliomen in hohen radiochemischen Ausbeuten synthetisiert werden. Mit einer Gesamtpräparationszeit von 60 min ist die optimierte Radiosynthese von n.c.a. ^{131}I IPA und n.c.a. ^{124}I IPA für die klinische Routineanwendung geeignet.

In vitro Untersuchungen mit primär humanen Gliomzelllinien und einer Rattenglioblastomzelllinie ergaben einen zelllinienabhängigen, zytotoxischen und tumoriziden Effekt von n.c.a. ^{131}I IPA. Dieser Effekt konnte durch Kombination mit der therapeutisch etablierten RT bzw. mit TMZ erheblich gesteigert werden. Die stärksten Zytotoxizitäten wurde nach Kombinationsbehandlung der Zellen bestehend aus TMZ + n.c.a. ^{131}I IPA + RT erzielt. Vergleichsuntersuchungen mit c.a. ^{131}I IPA ergaben zelllinienspezifisch einen besseren Therapieeffekt und wiesen auf einen zusätzlichen radiosensitivierenden Effekt des nicht radioaktiven IPA hin. Es wird daher geschlossen, dass der nicht radioaktive IPA-Anteil einen wesentlichen Einfluss auf die Radiosensitivierung der Zellen ausübt. Weiterführende Untersuchungen sollten daher die optimale spezifische Aktivität von c.a. ^{131}I IPA für eine zukünftige ^{131}I IPA-basierte Endoradionuklidtherapie bestimmen.

Die in der Zellkultur erzielten Ergebnisse wurden *in vivo* in CD1 nu/nu Nacktmäusen mit heterotop implantierten humanen Glioblastomen eindrucksvoll bestätigt. Die Kombinationsbehandlung, bestehend aus n.c.a. ^{131}I IPA und perkutaner Bestrahlung führte nicht nur zu einer Verringerung des Initialtumorvolumens sondern auch zu einer erheblichen Verlängerung der Überlebenszeit der behandelten Tiere. Es ist anzunehmen, dass sich diese Ergebnisse in weiterführenden Experimenten durch fraktionierte perkutane Bestrahlung, wiederholte n.c.a. ^{131}I IPA-Gaben und zusätzliche Verabreichung von Temozolomid noch weiter steigern lassen. Erste Untersuchungen an einem orthotopen F98-Rattenmodell ergaben keine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit der Tiere, weder nach den jeweiligen Monotherapien, noch nach der

n.c.a. ^{131}I IPA + RT-Kombinationsbehandlung verglichen mit den unbehandelten Kontrollratten. Dennoch gelang die Etablierung dieses syngenen F98-Ratten-Glioblastommodells, welches in weiterführenden präklinischen *in vivo* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eingesetzt wird. Bei der Fortführung dieser Untersuchungen ist demnach eine weitere Optimierung der Gliomtherapie im F98-Ratten-Glioblastommodell in Form einer wiederholten ^{131}I IPA-Gabe, höheren perkutanen Bestrahlungsdosen und zusätzlicher Chemotherapie mit TMZ, anzustreben. Da ein höherer IPA-Trägeranteil radiosensitivierende Effekte zeigte, ist anzunehmen, dass eine Therapie mit optimierten spezifischen c.a. ^{131}I IPA-Aktivitäten, die bereits erzielten *in vivo* Therapieerfolge zusätzlich steigern kann.

Ein weiterer Punkt dieser Arbeit umfasste die Testung von n.c.a. ^{124}I IPA als PET-Tracer für eine nicht-invasive Diagnostik von Gliomen. Sowohl am tumortragenden Mausmodell, als auch in einer ersten klinischen Untersuchung am Patienten mit Glioblastom, konnte der Tumor klar dargestellt und abgegrenzt werden. Mit n.c.a. ^{124}I IPA steht somit ein neuer, aussichtsreicher Aminosäuretracer für die PET-Diagnostik von hirneigenen Tumoren zur Verfügung.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die systemische Endoradionuklidtherapie mit ^{131}I IPA, insbesondere in Kombination mit perkutaner Radiotherapie und Temozolomid ein sehr vielversprechender neuer Therapieansatz bei der Behandlung von Gliomen darstellt. Darüber hinaus konnte mit n.c.a. ^{124}I IPA ein neuer langlebiger PET-Tracer für die Differentialdiagnostik und für ein Therapie Follow-up von Gliomen zur Verfügung gestellt werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

ASC	Alanin-Serin-Cystein
Boc-	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-(Schutzgruppe)
c.a.	<i>carrier added</i> (geträgert)
CAT	Chloramin-T
DAPI	4,6-Diamin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DMBT1	<i>deleted in malignant brain tumours</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Zellkulturmedium)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure/ Etylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ESI-MS	Elektrospray Ionisations-Massenspektrometrie
FBS	<i>foetal bovine serum</i> (Fötales Kälberserum)
FDG	[¹⁸ F]Fluordeoxyglukose
FET	[¹⁸ F]Fluorethyl-L-tyrosin
HPLC	<i>high pressure (performance) liquid chromatography</i>
HWZ	Halbwertszeit
IMT	[¹²³ I]Iod- α -methyl-tyrosin
i.a.	intraarteriell
i.p.	intraperitoneal
IPA	<i>p</i> -Iod-L-phenylalanin
i.v.	intravenös
MET	[¹¹ C]-Methionin
MRT	Magnetresonanztomografie
n.c.a.	<i>no carrier added</i> (trägerarm)
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> (nicht essentielle Aminosäuren)
p.i.	<i>post injection</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte, isotonische Salzlösung)
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PET	<i>positron emission tomography</i> (Positronenemissionstomografie)
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>

p53	Tumorsuppressorgen p53
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Zellkulturmedium)
RT	Radiotherapie (perkutane Bestrahlung)
SPECT	<i>single photon emission computed tomography</i> (Einzelphotonenemissionscomputertomografie)
TFA	Trifluoressigsäure
TMZ	Temozolomid (Handelsname Temodal®)
TRICT	Tetramethylrhodamin-isothiocyanat
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
UKW	Universitätsklinikum Würzburg
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WST-1	<i>water soluble tetrazolium</i> (Zellproliferationstest)

9 Literaturverzeichnis

1. Bader JB, Samnick S, Moriglane JR, Feiden W, Schäfer A, Kremp S, Kirsch CM (1999) Evaluation of L-3- [123I]iodo-alpha-methyltyrosine SPET and [18F]fluorodeoxyglucose PET in the detection and grading of recurrences in patients pretreated for gliomas at follow-up: a comparative study with stereotactic biopsy. *Eur J Nucl Med* 26: 144-151
2. Banáth JP, MacPhail SH, Olive PL (2004) Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res* 64: 7144-7149
3. Barker FG II, Simmons ML, Chang SM, Prados MD, Larson DA, Sneed PK, Wara WA, Berger MS, Chen P, Israel MA, Aldape KD (2001) EGFR over-expression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51: 410-418
4. Beck TJ, Kreth FW, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Stepp H, Stummer W, Baumgartner R (2007) Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-Aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg Med* 39: 386-393
5. Bénard F, Romsa J, Hustinx R (2003) Imaging gliomas with positron emission tomography and single-photon emission computer tomography. *Semin Nucl Med* 33: 148-162
6. Bencokova Z, Pauron L, Devic C, Joubert A, Gastaldo J, Massart C, Balosso J, Foray N (2008) Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin. *J Neurooncol* 86: 13-21
7. Bigner SH, Mark J, Burger PC, Mahaley MS, Bullard DE, Muhlbaier LH, Bigner DD (1988) Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res* 48: 405-411

8. Biston MC, Joubert A, Adam JF, Elleaume H, Bohic S, Charvet AM, Estève F, Foray N, Balosso J (2004) Cure of fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res* 64: 2317-2323
9. Bostöm J, Cobbers JM JL, Wolter M, Tabatabai G, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G (1998) Mutation of PTEN (MMAC1) tumor suppressor gene in a subset of glioblastomas but not in meningiomas with loss of chromosome arm 10q. *Cancer Res* 58: 29-33
10. Brada M, Judson I, Beale P, Moore S, Reidenberg P, Statkevich P, Dugan M, Batra V, Cutler D (1999) Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of temozolomide (SCH 52365) for refractory or relapsing malignancies. *Br J Cancer* 81: 1022-1030
11. Brüstle O, Ohgaki H, Schmitt HP, Walter GF, Ostertag H, Kleihues P (1992) Primitive neuroectodermal tumors after prophylactic central nervous system irradiation in children. *Cancer* 69: 2385-2392
12. Burdak-Rothkamm S, Short SC, Folkard M, Rothkamm K, Prise KM (2007) ATR-dependent radiation-induced γ H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells. *Oncogene* 26: 993-1002
13. Butowski NA, Sneed PK, Chang SM (2006) Diagnosis and treatment of recurrent high-grade astrocytoma. *J Clin Oncol* 24: 1273-1280
14. Candolfi M, Curtin JF, Nichlos WS, Muhammad AKMG, King GD, Pluhar E, McNiel EA, Ohlfest JR, Freese AB, Moore PF, Lerner J, Lowenstein PR, Castro MG (2007) Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J Neurooncol* 85: 133-148

15. Chakravarti A, Chakladar A, Delaney MA, Latham DE, Loeffler JS (2002) The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner. *Cancer Res* 62: 4307-4315
16. Chakravarti A, Dicker A, Metha M (2004) The contribution of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway to radioresistance in human gliomas: a review of preclinical and correlative clinical data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 927-931
17. Chen H, Ward MH, Tucker KL, Graubard BI, McComb RD, Potischman NA, Weisenburger DD, Heineman EF (2002) Diet and risk of adult glioma in eastern Nebraska, United States. *Cancer Causes Control* 13: 647-655
18. Chen W (2007) Clinical application of PET in brain tumors. *J Nucl Med* 48: 1468-1481
19. Claes A, Idema AJ, Wesseling P (2007) Diffuse glioma growth: a guerillia war. *Acta Neuropathol* 114: 443-458
20. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM (1992) In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552
21. Daga A, Orengo AM, Gangemi RMR, Marubbi D, Perera M, Comes A, Ferrini S, Corte G (2007) Glioma immunotherapy by IL-21 gene-modified cells or by recombinant IL-21 involves antibody response. *Int J Cancer* 121: 1756-1763
22. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MFG, Tsang LLH, Slack JA (1994) NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 33: 9045-9051

23. Devys A, Kraeber-Bodère F, Chatal JF (1999) Biodistribution and pharmacokinetics of radiolabelled antibodies. In: Riva P, ed. Cancer radioimmunotherapy: present and future. Harwood Academic Publisher, London, pp 51-72
24. Eyüpoglu IY, Hahnen E, Tränkle C, Savaskan NE, Siebzehnrübl FA, Buslei R, Lemke D, Wick W, Fahlbusch R, Blümcke I (2006) Experimental therapy of malignant gliomas using the inhibitor of histone deacetylase MS-275. *Mol Cancer Ther* 5: 1248-1255
25. Farmakis G, Brandau W, Hellwig D, Wollenweber F, Schäfer A, Kirsch CM, Samnick S (2008) PET-Imaging with p-[I-124]iodo-L-phenylalanine as a new tool for diagnosis and postoperative control in patients with glioma. *Clin Nucl Med* 33: 441-442
26. Fiveash JB, Gillespie GY, Oliver PG, Zhou T, Belenky ML, Buchsbaum DJ (2008) Enhancement of glioma radiotherapy and chemotherapy response with targeted antibody therapy against death receptor 5. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71: 507-516
27. Fomchenko EI, Holland EC (2007) Platelet-derived growth factor-mediated gliomagenesis and brain tumor recruitment. *Neurosurg Clin N Am* 18: 39-58
28. Friedman HS, Kerby T, Calvert H (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res* 6: 2585-2597
29. Goetz CM, Riva P, Poepperl G, Gildehaus FJ, Hischa A, Tatsch K, Reulen HJ (2003) Locoregional radioimmunotherapy in selected patients with malignant glioma: experiences, side effects and survival times. *J Neurooncol* 62: 321-328
30. Haferkamp G (2006) Chemotherapie maligner Gliome bei Erwachsenen. *Brainstorm* 9: 22-29

31. Hammond LA, Eckardt JR, Baker SD, Eckhardt SG, Dugan M, Forral K, Reidenberg P, Statkevich P, Weiss GR, Rinaldi DA, von Hoff DD, Rowinsky EK (1999) Phase I and pharmacokinetic study of temozolomide on a daily-for-5-days schedule in patients with advanced solid malignancies. *J Clin Oncol* 17: 2604-2613
32. Hardell L, Carlberg M, Söderqvist F, Mild KH, Morgan LL (2007) Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for ≥ 10 years. *Occup Environ Med* 64: 626-632
33. Heldin CH, Westermark B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived-growth-factor. *Physiol Rev* 79: 1283-1316
34. Hellwig D, Ketter R, Romeike BFM, Sell N, Schäfer A, Moringlane JR, Kirsch CM, Samnick S (2005) Validation of brain tumour imaging with p-[123I]iodo-L-phenylalanine and SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32: 1041-1049
35. Henn W, Blin N, Zang KD (1986) Polysomy of chromosome 7 is correlated with overexpression of the erbB oncogene in human glioblastoma cell lines. *Hum Genet* 74: 106-106
36. Henson JW (2006) Treatment of glioblastoma multiforme: a new standard. *Arch Neurol* 63: 337-341
37. Hirata M, Mori T, Soga S, Umeda T, Ohmomo Y (2006) Synthesis and in vitro evaluation of iodinated derivatives of piperazine as a new ligand for sigma receptor imaging by single photon emission computed tomography. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 54: 470-475
38. Hussain AA, Jona JA, Yamada A, Dittert LW (1994) Chloramine-T radiolabeling techniques II. A nondestructive method for radiolabeling biomolecules by halogenation. *Anal Biochem* 224: 221-226

39. Inskip PD, Tarone RE, Hatch EE, Wilcosky TC, Shaprio WR, Selker RG, Fine HA, Black PM, Loeffler JS, Linet MS (2001) Cellular-telephone use and brain tumors. *N Engl J Med* 344: 79-86
40. Immonen A, Vapalahti M, Tyynelä K, Hurskainen H, Sandmair A, Vanninen R, Langford G, Murray N, Ylä-Herttuala S (2004) AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study. *Mol Ther* 10: 967-972
41. Israel I, Brandau W, Farmakis G, Samnick S (2008) Improved synthesis of no-carrier-added p-[124I]iodo-L-phenylalanine and p-[131I]iodo-L-phenylalanine for nuclear medicine application in malignant gliomas. *Appl Radiat Isot* 66: 513-522
42. Isselbacher KJ (1972) Sugar and amino acid transport by cells in culture: differences between normal and malignant cells. *N Engl J Med* 286: 929-933
43. Iwadate Y, Inoue M, Saegusa T, Tokusumi Y, Kinoh H, Hasegawa M, Tagawa M, Yamaura A, Shimada H (2005) Recombinant sendai virus induces complete remission of established brain tumors through efficient interleukin-2 gene transfer in vaccinated rats. *Clin Cancer Res* 11: 3821-3827
44. Jacobi CA, Menenakos C, Braumann C (2005) Taurolidine – a new drug with anti-tumor and anti-angiogenic effects. *Anticancer Drugs* 16: 917-921
45. Jager PL, Vaalburg W, Pruim J, de Vries EGE, Langen KJ, Piers DA (2001) Radiolabeled amino acids: basic aspects and clinical applications in oncology. *J Nucl Med* 42: 432-445
46. Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JKV, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54: 6353-6358

47. Kaplan S, Novikov I, Modan B (1997) Nutritional factors in etiology of brain tumors: potential role of nitrosamines, fat and cholesterol. *Am J Epidemiol* 146: 832-841
48. Knudson AG (1985) Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45: 1437-1443
49. Knudson AG (2002) Cancer genetics. *Am J Med Genet* 111: 96-102
50. Kosugi A, Shimizu K, Ohtani A, Migita T (1981) Palladium catalyzed reaction of hexabutyliditin with aryl bromides: preparation of negatively substituted arylbutyltin. *Chem Lett* 10: 829-830
51. Kubota K, Ishiwata K, Kubota R, Yamada S, Takahashi J, Abe Y, Fukuda H (1996) Feasibility of fluorine-18-fluorophenylalanine for tumor imaging compared with carbon-11-L-methionine. *J Nucl Med* 37: 320-325
52. Kunkel P, Ulbricht U, Bohlen P, Brockmann MA, Fillbrandt R, Stavrou D, Westphal M, Lamszus K (2001) Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res* 61: 6624-6628
53. Lefranc F, Brotchi J, Kiss R (2005) Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J Clin Oncol* 23: 2411-2422
54. Lehmann T (2007) In vitro und in vivo Untersuchungen zum zytotoxischen und radiosensitivierenden Potential von radioiodiertem Phenylalanin an experimentellen Glioblastommodellen. Dissertation, Universität des Saarlandes
55. Li H, Alonso-Vanegas M, Colicos MA, Jung SS, Lochmuller H, Sadikot AF, Snipes GJ, Seth P, Karpati G, Nalbantoglu J (1999) Intracerebral adenovirus-mediated p53 tumor suppressor gene therapy for experimental human glioma. *Clin Cancer Res* 5: 637-642

56. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parson R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-1947
57. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114: 97-109
58. Mahrhofer H, Bürger S, Oppitz U, Flentje M, Djuzenova, CS (2006) Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64: 573-580
59. Mathieu D, Lecomte R, Tsanaclis AM, Larouche A, Fortin D (2007) Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can J Neurol Sci* 34: 296-306
60. Miller CR, Perry A (2007) Glioblastoma – morphologic and molecular genetic diversity. *Arch Pathol Lab Med* 131: 397-406
61. Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungblut AA, Ji XD, Suvarna P, Volland JR, Old LJ, Huang HJ, Cavenee WK (2001) Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAB) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor. *Cancer Res* 61: 5349-5354

62. Miyamoto CT, Brady LW, Rackover MA, Emrich J, Class R, Bender H, Micaily B, Steplewski Z (1996) The use of epidermal growth factor receptor-425 monoclonal antibodies radiolabeled with iodine-125 in the adjuvant treatment of patients with high grade gliomas of the brain. *Recent Result Cancer Res* 141: 183-192
63. Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A, Poustka A (1997) DMBT1, a new member of the SRCR superfamiliy, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain tumours. *Nat Genet* 17: 32-39
64. Mosskin M, Ericson K, Hindmarsh H, von Holst H, Collin VP, Bergström M, Eriksson L, Johnström P (1989) Positron emission tomography compared with magnetic resonance imaging and computed tomography in supratentorial gliomas using multiple stereotactic biopsies as references. *Acta Radiol* 30: 225-232
65. Nakamura M, Yang F, Fujisawa H, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2000) Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 539-543
66. Nawashiro H, Otani N, Uozumi Y, Ooigawa H, Toyooka T, Suzuki T, Katoh H, Tsuzuki N, Ohnuki A, Shima K, Shinomiya N, Matsuo H, Kanai Y (2005) High expression of L-type amino acid transporter 1 in infiltrating glioma cells. *Brain Tumor Pathol* 22: 89-91
67. Norden AD, Drappatz J, Wen PY (2008) Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *Lancet Neurol* 7: 1152-1160
68. Ogawa T, Inugami A, Hatazawa J, Kanno I, Murakami M, Yasui N, Mineura K, Uemura K (1996) Clinical positron emission tomography for brain tumors: comparison of fluorodesoxyglucose F18 and L-methyl-11C-methione. *Am J Neuroradiol* 17: 345-353

69. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schüler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lütolf UM, Kleihues P (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64: 6892-6899
70. Ohgaki H, Kleihues P (2005) Population based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 479-489
71. Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170: 1445-1453
72. Pauleit D, Floeth F, Tellmann L, Hamacher K, Hautzel H, Müller HW, Coenen HH, Langen KJ (2004) Comparison of O-(2-¹⁸F-Fluoroethyl)-L-Thyrosine PET and 3-¹²³I-Iodo- α -Methyl-L-Thyrosine SPECT in brain tumors. *J Nucl Med* 45: 374-381
73. Pirotte B, Goldman S, Massager N, David P, Wikler D, Vandesteene A, Salmon I, Brotchi J, Levivier M (2004) Comparison of ¹⁸F-FDG and ¹¹C-Methionine for PET-guided stereotactic brain biopsy of gliomas. *J Nucl Med* 45: 1293-1298
74. Pöpperl G, Götz C, Rachinger W, Gildehaus FJ, Tonn JC, Tatsch K (2004) Value of O-(2-[¹⁸F]fluoroethyl)-L-tyrosine PET for the diagnosis of recurrent glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31: 1464-1470
75. Ricci PE, Karis JP, Heiserman JE, Fram EK, Bice AN, Drayer BP (1998) Differentiating recurrent tumor from radiation necrosis: time for re-evaluation of positron emission tomography? *Am J Neuroradiol* 19: 407-413
76. Riva P, Franceschi G, Riva N, Casi M, Santimaria M, Adamo M (2000) Role of nuclear medicine in the treatment of malignant gliomas: the locoregional radioimmunotherapy approach. *Eur J Nucl Med* 27: 601-609

77. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double strand breaks induce histone H2AX phosphorylation on serin 139. *J Biol Chem* 273: 5858-5868
78. Rogakou EP, Bonn C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146: 905-915
79. Romeike BFM, Hellwig D, Heimann A, Kempfski O, Feiden W, Kirsch CM, Samnick S (2004) Action and efficacy of p-[131I]iodo-L-phenylalanine on primary human glioma cell cultures and rats with C6-gliomas. *Anticancer Res* 24: 3971-3976
80. Rothkamm K, Löbrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5057-5062
81. Rousseau J, Boudou C, Barth RF, Balosso J, Estève F, Elleaume H (2007) Enhanced survival and cure of F98 glioma-bearing rats following intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation. *Clin Cancer Res* 13: 5195-5201
82. Samnick S, Richter S, Romeike BF, Heimann A, Feiden W, Kempfski O, Kirsch CM (2000) Investigation of iodine-123-labelled amino acid derivates for imaging cerebral gliomas: uptake in human glioma cells and evaluation in stereotactically implanted C6 glioma rats. *Eur J Nucl Med* 27: 1543-1551
83. Samnick S, Schäfer A, Siebert S, Richter S, Vollmar B, Kirsch CM (2001) Preparation and investigation of tumor affinity, uptake kinetic and transport mechanism of iodine-123- labelled amino acid derivates in human pancreatic carcinoma and glioblastoma cells. *Nucl Med Biol* 28: 13-23

84. Samnick S, Hellwig D, Bader JB, Romeike BF, Moringlane JR, Feiden W, Kirsch CM (2002 a) Initial evaluation of the feasibility of single photon emission tomography with p-[123I]iodo-L-phenylalanine for routine brain tumour imaging. Nucl Med Commun 23: 121-130

85. Samnick S, Bader JB, Hellwig D, Moringlane JR, Alexander C, Romeike FM, Feiden W, Kirsch CM (2002 b) Clinical value of iodine-123-alpha-methyl-L-tyrosine single-photon emission tomography in the differential diagnosis of recurrent brain tumor in patients pretreated for glioma at follow-up. J Clin Oncol 20: 396-404

86. Savitz DA, Cai J, van Wijngaarden E, Loomis D, Mihlan G, Dufort V, Kleckner RC, Nylander-French L, Kromhout H, Zhou H (2000) Case-cohort analysis of brain cancer and leukemia in electric utility workers using a refined magnetic field job-exposure matrix. Am J Ind Med 38: 417-425

87. Schwarz A, Kuwert T (2000) Nuklearmedizinische Diagnostik bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Radiologe 40: 858-862

88. Seevers RH, Counsell RE (1982) Radioiodination techniques for small organic molecules. Chem Rev 82: 575-590

89. Senatus PB, Li Y, Mandigo C, Nichols G, Moise G, Mao Y, Brown MD, Anderson RC, Parsa AT, Brandt-Rauf PW, Bruce JN, Fine RL (2006) Restoration of p53 function for selective Fas-mediated apoptosis in human and rat glioma cells in vitro and in vivo by a p53 COOH-terminal peptide. Mol Cancer Ther 5: 20-28

90. Short SC, Martindale C, Bourne S, Brand G, Woodcock M, Johnston P (2007) DNA repair after irradiation in glioma cells and normal human astrocytes. Neuro Oncol 9: 404-411

91. Shoup TM, Olson J, Hoffmann JM, Votaw J, Eshima D, Eshima L, Camp VM, Stabin M, Votaw D, Goodman MM (1999) Synthesis and evaluation of [¹⁸F]1-amino-3-fluorocyclobutane-1-carboxylic acid to image brain tumors. *J Nucl Med* 40: 331-338
92. Sonoda Y, Kumabe T, Takahashi T, Shirane R, Yoshimoto T (1998) Clinical usefulness of ¹¹C-MET PET and ²⁰¹Tl SPECT for differentiation of recurrent glioma from radiation necrosis. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 38: 342-348
93. Stupp R, Hegi ME, van den Brent MJ, Mason WP, Weller M, Mirimanoff RO, Cairncross JG (2006) Changing paradigms – an update of the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist* 11: 165-180
94. Tsurushima H, Yuan X, Dillehay LE, Leong KW (2007) Radio-responsive gene therapy for malignant glioma cells without the radiosensitive promoter: caspase-3 gene therapy combined with radiation. *Cancer Lett* 246: 318-323
95. Tsurushima H, Yuan X, Dillehay LE, Leong KW (2008) Radiation-inducible caspase-8 gene therapy for malignant brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71: 517-525
96. Tüttenberg J, Grobholz R, Korn T, Wenz F, Erber R, Vaikoczy P (2005) Continuous low-dose chemotherapy plus inhibition of cyclooxygenase-2 as an antiangiogenic therapy of glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol* 131: 31-40
97. Tzeng JJ, Barth RF, Orosz CG, James SM (1991) Phenotype and functional activity of tumor-infiltrating lymphocytes isolated from immunogenic and nonimmunogenic rat brain tumors. *Cancer Res* 51: 2373-2378
98. von Deimling A, Bender B, Jahnke R, Waha A, Kraus J, Albrecht S, Wellenreuther R, Fassbender F, Nagel J, Menon AG, Louis DN, Lenartz D, Schramm J, Wiestler OD (1994) Loci associated with malignant progression in astrocytomas: a candidate on chromosome 19q. *Cancer Res* 54: 1397-1401

99. Walker DG, Duan W, Popovic EA, Kaye AH, Tomlinson FH, Lavin M (1995) Homozygous deletions of the multiple tumor suppressor gene 1 in the progression of human astrocytomas. *Cancer Res* 55: 20-23
100. Watanabe K, Tachibana O, Sato K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6: 217-224
101. Weber WA, Wester HJ, Grosu AL, Herz M, Dzewas B, Feldmann HJ, Molls M, Stöcklin G, Schwaiger M (2000) O-(2-[18F]Fluoroethyl)-L-tyrosine and L-[methyl-11C]methionine uptake in brain tumors: initial results of a comparative study. *Eur J Nucl Med* 27: 542-549
102. Weckesser M, Langen KJ, Rickert CH, Kloska S, Straeter R, Hamacher K, Kurlemann G, Wassmann H, Coenen HH, Schober O (2005) O-(2-[18F]Fluoroethyl)-L-tyrosine PET in the clinical evaluation of primary brain tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32: 422-429
103. Wester HJ, Herz M, Weber W, Heiss P, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, Stöcklin G (1999) Synthesis and radiopharmacology of O-(2-[18F]fluoroethyl)-L-Tyrosine for tumor imaging. *J Nucl Med* 40: 2005-212
104. Westermark B, Nistér M (1995) Molecular genetics of human glioma. *Curr Opin Oncol* 7: 220-225
105. Wienhard K, Herholz H, Coenen HH, Rudolf J, Kling P, Stöcklin G, Heiss WD (1991) Increased amino acid transport into brain tumors measured by PET of L-(2-18F)Fluorotyrosine. *J Nucl Med* 32: 1338-1346
106. Wilbur DS, Hamlin DK, Srivastava RR, Burns HD (1993) Synthesis and radioiodination of *N*-Boc-*p*-(tri-*n*-butylstannyl)-L-phenylalanine derivative for peptide synthesis. *Bioconjug Chem* 4: 574-580

107. Zalutsky MR (2005) Current status of therapy of solid tumors: brain tumor therapy. *J Nucl Med* 46: 151S-156S
108. Zalutsky MR, Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, McLendon RE, Wong TZ, Bigner DD (2008) Clinical experience with α -particle-emitting ^{211}At : treatment of recurrent brain tumor patients with ^{211}At -labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J Nucl Med* 49: 30-38
109. Zang (2002) Genetik von Hirntumoren des Erwachsenenalters. *Medizinische Genetik* 14: 186-191
110. Zhou XP, Li YJ, Hoang-Xuan K, Laurent-Puig P, Mokhtari K, Longy M, Sanson M, Delattre JY, Thomas G, Hamelin R (1999) Mutational analysis of the *PTEN* gene in gliomas: Molecular and pathological correlations. *Int J Cancer* 84: 150-154

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an alle richten, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Hervorheben möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Kirsch für die freundliche Aufnahme in seine Klinik für Nuklearmedizin am Universitätsklinikum des Saarlandes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Samnick für die Bereitstellung des interessanten Themas, die sehr gute Betreuung, stete Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Reiners danken, dass er es mir ermöglichte, diese Arbeit an seiner Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums Würzburg fortzuführen.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Blaß für die Dosisberechnungen und die Unterstützung bei der Zell- und Tierbestrahlungen.

Ferner bedanke ich mich bei Herrn Dr. Romeike für die pathologischen Befunde, Frau Hirsch und Frau Franze für ihre Mithilfe bei den *in vitro* Versuchen, Herrn Hidiröglu und Herrn Dr. Geis für die logistische Unterstützung bei der stereotaktischen Tumorimplantation sowie Frau PD Dr. Djuzenova, Herrn Krug, Frau Stringl, Herrn Dr. Peters und Herrn Dr. Zapp.

Bei sämtlichen Kollegen der Kliniken für Nuklearmedizin an den Universitätskliniken des Saarlandes bzw. Würzburg möchte ich mich für die überaus herzliche Aufnahme ins Team und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein spezieller Dank richtet sich an meine Familie, die mich in meinem Vorhaben stets unterstützte und mir persönlichen Rückhalt gab.

Publikationen

Zeitschriftartikel

Israel I, Brandau W, Farmakis G, Samnick S (2008) Improved synthesis of no-carrier-added p-[124I]iodo-L-phenylalanine and p-[131I]iodo-L-phenylalanine for nuclear medicine applications in malignant gliomas. *Appl Radiat Isot* 66: 513-522

Vorträge

Israel I, Blaß G, Kirsch CM, Samnick S

Bewertung der aminosäuretransport-basierten Radionuklidtherapie mit p-131-Iod-L-phenylalanin in Kombination mit perkutaner Bestrahlung und Temozolomid bei Gliomen

46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 2008

Israel I, Blaß G, Schirbel A, Reiners C, Samnick S

Untersuchungen zum therapeutischen Potential von p-[131I]iod-L-phenylalanin in Kombination mit perkutaner Bestrahlung und Temozolomid bei hirneigenen Tumoren
16. Arbeitstagung der AG Radiochemie/Radiopharmazie, 2008

Poster

Israel I, Franze D, Kirsch CM, Samnick S

Einfache Radiosynthese von trägerfreiem p-Iod-123-, p-Iod-124- und p-Iod-131-phenyl-L-alanin zur Routineanwendung in der Diagnostik und Therapie von hirneigenen Tumoren

45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 2007

Israel I, Hirsch K, Reiners C, Samnick S

Untersuchungen zu DNA-Doppelstrangbrüchen und –Reparatur in Glioblastomzellen nach Behandlung mit p-Iod-131-L-phenylalanin, perkutaner Bestrahlung und Temozolomid mit dem γ -H2AX-Verfahren

47. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, 2009

Lebenslauf

Persönliche Angaben: Name: Ina Israel
Geburtsdatum: 18.06.1978
Geburtsort: Dresden
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

09.1985 - 07.1992 71. Polytechnische Oberschule in Dresden
09.1992 - 07.1997 Fritz-Löffler-Gymnasium in Dresden

Abschluss: Abitur

Berufsausbildung:

09.1997 - 01.2000 Ausbildung zur Reiseverkehrskauffrau bei der Deutschen
Bahn AG in Dresden

Abschluss: Reiseverkehrskauffrau

Studium:

10.2000 - 09.2005 Chemiestudium an der Technischen Universität Dresden
Diplomfach: Biochemie

Abschluss: Diplomchemikerin

Berufliche Tätigkeiten:

02.2000 - 09.2000 Reiseverkehrskauffrau beim „DER Deutsches Reisebüro“
in Frankfurt/Main

11.2005 - 04.2006 wissenschaftliche Hilfskraft an der Technischen Universität
Dresden, Institut für Biochemie

05.2006 - 11.2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum des
Saarlandes, Klinik für Nuklearmedizin

seit 12.2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum
Würzburg, Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Homburg, 31.07.2009