

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik II- Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität
München,
Direktor: Prof. Dr. B. Göke

**Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) als neues therapeutisches
Gen zur Behandlung des Malignen Melanoms**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anne-Liese Kessel
aus Rockville/Maryland (USA)

2010

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christine Spitzweg
2. Berichterstatter	Prof. Dr. Ralph A.W. Rupp
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Karsetn Spiekermann Priv. Doz. Dr. Robert Besch
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. Michael Willhauck
Dekan:	Prof. Dr.Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	22.07.2010

Auszüge dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:

A. Kessel, M.J. Willhauck, B.R. Sharif Samani, W. Münzing, C. Berking, R. Vile, B. Göke, J.C. Morris, C. Spitzweg. Image-guided radioiodine therapy of melanoma following tumor-specific sodium iodide symporter (NIS) gene transfer. **European Thyroid Association, annual meeting 2007 (Leipzig, Germany).**

“Radionuclide imaging and therapy of malignant melanoma after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter” – in Vorbereitung

Meinen Eltern und meiner Großmutter

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Maligne Melanom	1
1.1.1	Inzidenz	1
1.1.2	Pathogenese und Ätiologie	1
1.1.3	Klinische Manifestation und Diagnose	2
1.1.4	Staging	3
1.1.5	Prognose und Mortalität	4
1.1.6	Therapie	4
1.1.7	Neue Therapieansätze beim Malignen Melanom: Gentherapie	5
1.2	Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS)	7
1.2.1	Regulation von NIS	8
1.2.2	Der NIS und seine Bedeutung in der Diagnostik und Therapie von benignen Schilddrüsenerkrankungen	9
1.2.3	Der NIS und seine Bedeutung in der Diagnostik und Therapie von malignen Schilddrüsenerkrankungen	10
1.2.4	Der NIS in der Brustdrüse und seine mögliche klinische Relevanz	11
1.2.5	Der NIS und seine Bedeutung als therapeutisches Gen beim Malignen Melanom	13
1.2.6	Grundlagen und Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Molekularbiologische Methoden	17
2.1.1	Herstellung eines Expressionsplasmids	17
2.1.2	Spaltung mit Endonukleasen	18
2.1.3	Agarosegelelektrophorese	19
2.1.4	Geextraktion	19
2.1.5	Ligation	20
2.1.6	Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	20
2.1.7	DNA-Minipräparationen zur Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.1.8	DNA-Maxipräparationen zur Isolierung von Plasmid-DNA	21

2.1.9	DNA-Sequenzierung	22
2.2	Zellkultur und Zelllinie	23
2.2.1	Verwendete Zelllinie	23
2.2.2	Medium und Zellkulturbedingungen	23
2.2.3	Kryokonservierung	24
2.2.4	Proliferationsassay	24
2.2.5	Transfektion	24
	2.2.5.1 Puromycin als selektives Antibiotikum	24
	2.2.5.2 Transiente Transfektion	25
	2.2.5.3 Stabile Transfektion	25
2.3	Iod-Uptake Versuche <i>in vitro</i>	26
2.3.1	Iod-Uptake Assay	26
2.3.2	Kinetik	27
2.3.3	Iod-Efflux	27
2.4	Iod-Organifizierung	28
2.4.1	Inkubation der Zellen mit ¹²⁵ Iod	28
2.4.2	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	28
2.5	Northern Blot	28
2.5.1	Isolierung von Ribonukleinsäuren	28
2.5.2	Konzentrationsbestimmung durch Photometrie	29
2.5.3	Elektrophoretische Auftrennung der RNA	29
2.5.4	Transfer auf die Nylonmembran	30
2.5.5	Radioaktive Markierung der cDNA-Sonde	31
2.5.6	Hybridisierung	31
2.5.7	Kontroll-Hybridisierung mit einer β -Actin-Sonde	32
2.6	Western Blot	32
2.6.1	Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot-Analyse	32
	2.6.1.1 Membranpräparation der Zellen	32
	2.6.1.2 Membranpräparation aus Tumorgewebe	33
	2.6.2 Protein-Konzentrationsbestimmung (Bradford-Proteinbestimmung)	33
2.6.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.6.4	Western Blot-Analyse	34

2.7	Clonogenic Assay	34
2.7.1	Durchführung	34
2.7.2	Färbung und Auswertung	35
2.8	Iod-Uptake Versuche <i>in vivo</i>	35
2.8.1	Mäuse und Haltungsbedingungen	35
2.8.2	Etablierung der subkutanen Xenotransplantat-Tumoren	36
2.8.3	Radionuklid-Uptake Versuch <i>in vivo</i> mit ^{123}I od bzw. ^{188}Re nium	36
2.9	Immunhistochemie	37
2.10	Radionuklidtherapie mit ^{131}I od bzw. ^{188}Re nium	38
2.11	Kaplan- Meier- Überlebenskurven nach Radionuklidtherapie mit ^{131}I od bzw. ^{188}Re	38
2.12	Statistik	39
2.13	Verwendete Geräte	39
2.14	Verwendete Materialien	40
3	Ergebnisse	44
3.1	Selektion der erfolgreich mit hNIS transfizierten Zellen durch Iod-Uptake Assay	44
3.2	Charakterisierung des NIS-induzierten Iod-Uptakes durch	46
3.2.1	Iodaufnahme-Kinetik	46
3.2.2	Iod-Organifizierung	46
3.2.3	Iod-Efflux	47
3.3	Bestätigung der NIS-Expression in den transfizierten Zellen durch Nachweis von	
3.3.1	NIS-mRNA durch Northern-Blot Analyse	47
3.3.2	NIS-Protein durch Western-Blot Analyse	48
3.4	Nachweis der Zelltoxizität von ^{131}I od im <i>in vitro</i> Clonogenic Assay	49
3.5	Radionuklid-Uptake der Melanom-Xenotransplantate <i>in vivo</i>	50
3.5.1	Radioiod-Uptake	50
3.5.2	Rhenium-Uptake	51
3.6	Bestätigung der NIS-Expression <i>in vivo</i> durch Nachweis von	
3.6.1	NIS-Protein durch Western-Blot Analyse	52
3.6.2	NIS-Protein durch Immunzytochemie	53
3.7	Radionuklidtherapie	54
3.7.1	Radionuklidtherapie mit ^{131}I od	54

3.7.2	Radionuklidtherapie mit ¹⁸⁸ Rhenium	55
3.8	Überlebensrate nach Radionuklidtherapie mit ¹³¹ Iod bzw. ¹⁸⁸ Rhenium	56
4	Diskussion	58
4.1	Der Natrium-Iodid-Symporter als neues therapeutisches Gen	58
4.1.1	Der unselektive NIS-Gentransfer	58
4.1.2	Tumorselektiver NIS-Gentransfer	59
4.1.3	Erfolg unseres Tumormodells: selektiver NIS-Gentransfer unter Verwendung des Tyrosinase-Promoters in der Melanomzelllinie 1205 Lu	61
4.2	Möglichkeiten, die Effizienz der NIS-Gentherapie zu erhöhen	63
4.2.1	Organifizierung	63
4.2.2	Efflux	65
4.2.3	Alternative Radionuklide	66
4.2.4	Pharmakologische Modulation der funktionellen NIS-Expression	68
5	Zusammenfassung	69
6	Literaturverzeichnis	71
7	Danksagung	81
8	Lebenslauf	82

1. Einleitung

1.1 Das Maligne Melanom

1.1.1 Inzidenz

Beim Malignen Melanom, auch bekannt als schwarzer Hautkrebs, handelt es sich um einen von den Melanozyten ausgehenden, bösartigen Tumor. Aufgrund steigender Zahlen für Inzidenz und Mortalität gewinnt dieser Tumor immer mehr an Bedeutung. Die Zahl der Neuerkrankungen am Malignen Melanom verdoppelte sich nahezu in den letzten zwanzig Jahren⁴⁷. Das Maligne Melanom gehört heute zu den vier häufigsten Tumoren in Australien und Neuseeland^{46, 93}. In Europa ist die Inzidenz geringer, wobei Frauen häufiger erkranken als Männer. Insgesamt stellt es das siebthäufigste Malignom der Frau dar²⁹. Jedes Jahr treten weltweit 2-3 Millionen Fälle von Hautkrebs auf, von denen es sich in nur 132000 Fällen um ein Malignes Melanom handelt, das jedoch in Anbetracht seiner Mortalität die gefährlichste Form darstellt und die meisten durch Hautkrebs verursachten Sterbefälle verursacht¹³⁴.

Das jährliche Risiko, an einem Malignen Melanom zu erkranken, zeigt eine starke Variation zwischen den Bevölkerungsgruppen, wobei hellhäutige Personen ein zehnmal höheres Risiko haben als dunkelhäutige Personen²⁶. Im Durchschnitt beträgt das Erkrankungsrisiko 3-7 %³; damit zählt es zu den häufigsten Tumoren bei jungen Erwachsenen zwischen 20 und 39 Jahren⁶⁰.

1.1.2 Pathogenese und Ätiologie

Der Ursprung für die Entstehung des Malignen Melanoms liegt in den Melanozyten. Melanozyten sind Pigmentzellen, die überwiegend in den Augen und in der Basalzellschicht der Haut zu finden sind. Sie synthetisieren Melanin, welches einen wichtigen Schutz der Haut gegenüber der UV-Strahlung darstellt und in Form von Melanosomen an die umgebenden Keratinozyten abgegeben wird⁴⁷.

Das im Sonnenlicht enthaltene Ultraviolett Licht (UV Licht) mit sog. B Spektrum (UV-B, 290-320 nm Wellenlänge) erhöht die DNA Instabilität der Melanozyten²², hemmt Antioxidantien⁴¹ und supprimiert das Immunsystem⁸⁴, so dass die Entstehung eines Melanoms begünstigt wird⁹².

Besonders intermittierende, starke UV-Licht-Exposition erhöht die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Malignen Melanoms. Chronische oder geringe Exposition schützen hingegen

vor DNA Schäden ⁴⁵.

Neben den exogenen prädisponierenden Risikofaktoren gibt es auch endogene Risikofaktoren, die zur Genese des Malignen Melanoms beitragen. Einen wichtigen Risikofaktor für das Maligne Melanom stellt die Hautfarbe dar. Hellhäutige Personen, besonders mit blondem oder rotem Haar, die schnell dazu neigen, Sonnenbrände und Sommersprossen zu entwickeln, besitzen ein erhöhtes Risiko, ein Melanom zu entwickeln ¹²⁵.

Maligne Melanome treten darüber hinaus bevorzugt an Körperstellen auf, die nur intermittierend der Sonne ausgesetzt sind. Beispiele hierfür sind die gesamte Rückenpartie bei Männern und die Unterschenkel bei Frauen. Eher selten betroffene Körperstellen sind das Gesicht, Hände und Unterarme ^{8, 42, 82, 88}. Bei dunkelhäutigen Personen und Asiaten tritt das Maligne Melanom vorzugsweise an Stellen auf, die nur wenig Sonnenstrahlung erhalten. Dazu gehört z.B. das Nagelbett oder die Fußsohle ⁶⁹.

Für Personen, die schwere Sonnenbrände in ihrer Kindheit erlitten haben, besteht ein erhöhtes Risiko, ein Malignes Melanom zu entwickeln. Dies ist unabhängig von der Anzahl der Sonnenbrände im späteren Leben ^{73, 140}.

Einen weiteren Risikofaktor stellen multiple, dysplastische (atypische), melanozytische Naevi bei hellhäutigen Personen dar ⁵⁷.

Eine positive Familienanamnese gehört ebenfalls zu den Risikofaktoren eines Malignen Melanoms ⁴⁹. Greene et al. konnten feststellen, dass 5-10 % aller Malignen Melanome hereditär bedingt sind ⁴⁸.

Xeroderma pigmentosum, eine Krankheit mit einem Defekt der DNA-Reparatur, genauer der Exzisionsreparatur von UV-induzierten Thymindimeren, ist verbunden mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Malignen Melanoms schon im jungen Alter ⁵¹. Im Normalfall steigt das Risiko für die Entstehung des Malignen Melanoms erst mit zunehmendem Lebensalter. Das Statistical Information Team Cancer Research UK registrierte 2005 die höchste Rate bei 75-jährigen und älteren Personen in England ⁶⁰.

1.1.3 Klinische Manifestation und Diagnose

Eine Methode, um mikroskopische Strukturen von pigmentierten Läsionen bei Patienten genauer zu beurteilen, stellt die Epilumineszenz Mikroskopie (EML) dar, die auch Dermaskopie genannt wird. Hierbei handelt es sich um eine nicht invasive, *in vivo* Methode. Mittels eines handlichen Geräts, dessen Aufsatz eine achromatische Linse besitzt, können

oberflächliche Hautstrukturen etwa um das Zehnfache vergrößert dargestellt werden. Die Verwendung der EML erhöht die diagnostische Genauigkeit von 65 % mit bloßem Auge, auf 80 % mit dem Dermaskop^{9, 80}.

Um eine Malignität mit bloßem Auge festzustellen, kann die ABCD Methode angewandt werden. Hierbei wird bei der pigmentierten Läsion die Asymmetrie (A), Begrenzung (B), Colorierung (C) und der Durchmesser (D) beurteilt⁸⁰.

Die „Total Body Photography“ wird bei high-risk Melanompatienten eingesetzt, um die Entwicklung von Naevi im Verlauf zu dokumentieren⁹¹ und eine Veränderung im frühen Stadium festzustellen.

Um die endgültige Diagnose eines Melanoms zu stellen, muss bei allen atypischen (dysplastischen) Tumoren eine totale Exzisionsbiopsie erfolgen. Eine subtotale Entfernung würde im Falle eines positiven Befundes eine definitive und Prognose-relevante Tumordickenbestimmung verhindern¹⁰³.

1.1.4 Staging

Die wichtigsten prognostischen Faktoren beim primären Malignen Melanom ohne Metastasen sind die vertikale Tumordicke nach Breslow, das Vorhandensein einer histologisch erkennbaren Ulzeration und das Invasionslevel nach Clark. Bei der Breslow Methode wird mit einem Messokular die vertikale Ausbreitung des Melanoms bestimmt¹⁴.

Anhand klinischer und histopathologischer Merkmale erstellten Clark und Elder ein Modell für die stufenweise Progression des Malignen Melanoms. Sie sehen die Entstehung des Malignen Melanoms als einen Prozess, der wahrscheinlich über sechs Stadien der Progression verläuft, die histologisch voneinander unterscheidbar sind: I melanozytischer Naevus, II melanozytischer Naevus mit Hyperplasie, III melanozytischer Naevus mit Dysplasien, IV primäres Melanom in der radial growth Phase, V primäres Melanom in der vertical growth Phase und die Phase VI, das metastasierende Melanom. Jedes Stadium zeichnet sich durch Zelltypen mit unterschiedlichen Charakteristika für Morphologie, Wachstumsverhalten, Oberflächenmarker und Metastasierungsverhalten aus²³.

Ab einer Tumordicke von 1,2-3,5 mm empfehlen Morton et al. eine Sentinel-Lymphknotenbiopsie⁷⁹. Diese verbessert bei positivem Befund und anschließender radikaler Lymphadenektomie die Überlebensrate und ist somit wichtig für das Staging des Melanoms.

Das Melanom metastasiert zu zwei Dritteln lymphogen und zu einem Drittel hämatogen⁴⁴,

wobei die Haut, das subkutane Gewebe, die Lymphknoten, die Lunge und der Gastrointestinaltrakt häufiger und das Gehirn, die Nebenniere und die Leber seltener betroffen sind³⁸. Ungefähr 40% der Patienten mit metastasiertem Melanom zeigen isoliert pulmonale Metastasen⁷.

Zur weiteren Staging-Untersuchung eignen sich die Computertomographie (CT) des Thorax und des Abdomens, die Sonographie der Lymphknoten und bei invasiveren Tumoren (>1,5 mm) zusätzlich eine Schädel-MRT⁴⁴.

1.1.5 Prognose, Mortalität

Das Melanom macht nur vier Prozent aller Hauttumoren aus, ist jedoch für 80 % der durch Hautkrebs verursachten Sterbefälle verantwortlich². Die Tumortiefe ist dabei ein wichtiger Indikator. Patienten mit einer Tumortiefe von weniger als 0,75 mm haben eine 5-JÜR von 98 %. Dagegen haben Patienten mit einer Tiefe von 3,5 mm eine 5-JÜR von nur 36 %⁹².

Die histologischen Charakteristika des Melanoms entscheiden ebenso über die Prognose. Das Auftreten von Ulzerationen und eine hohe Mitoserate/mm² sind Zeichen für eine schlechte Prognose⁹⁴.

Ungefähr 30 % der Patienten mit einem Malignen Melanom entwickeln Metastasen. Diese Patienten haben eine mittlere Überlebenszeit von 6-8 Monaten und eine 5-Jahres Überlebensrate von weniger als 5 %^{7, 38}.

Einfluss auf die Prognose nimmt auch das Geschlecht der Patienten, wobei Frauen eine höhere Überlebensrate als Männer haben¹⁰.

Keine chirurgische oder systemische Therapie konnte bisher die Überlebensraten signifikant verbessern. Die einzige Möglichkeit, die Mortalitätsraten zu senken, liegen daher heute in der Früherkennung und frühzeitigen chirurgischen Exzision²⁴.

1.1.6 Therapie

Das Melanom stellt ein äußerst aggressives Malignom mit hohem Metastasierungsrisiko und einer hohen Resistenz gegen zytotoxische Substanzen dar⁴⁷.

Bei frühzeitiger Diagnose steht eine primär operative Therapie an erster Stelle⁴⁴, wobei 90 % der Melanome allein durch die chirurgische Exzision geheilt werden können⁶. Hierbei wird

empfohlen, das Melanom mit einem Sicherheitsabstand von 1-2 mm im Gesunden zu entfernen^{66, 98, 122}. Beim Nachweis von regionären Lymphknotenmetastasen sollte eine radikale Lymphadenektomie durchgeführt werden. Liegen Fernmetastasen vor, wird eine operative Entfernung nur angestrebt, wenn eine komplette Entfernung erreicht werden kann (Status R0)⁴⁴.

In der palliativen Therapie des metastasierten Melanoms gilt die Anwendung von Zytostatika und Immunmodulatoren als Standardtherapie, insbesondere wenn eine operative Entfernung nicht möglich ist bzw. eine disseminierte Metastasierung in mehreren Organsystemen vorliegt⁴³.

Für die Chemotherapie ist seit Jahrzehnten die Monochemotherapie mit Dacarbazin (DTIC) als First-line-Therapie etabliert³⁶. In aktuellen großen randomisierten Phase-III-Studien zeigten sich jedoch für die DTIC-Therapie objektive Remissionsraten von lediglich 5,5-12,1 % und mediane Überlebenszeiten von nur 5,6-11,6 Monaten^{5, 76, 101}. Darüber hinaus werden immer wieder lang anhaltende Remissionen und Krankheitsstabilisierungen unter DTIC beobachtet⁸⁹. Nach Versagen einer Monochemotherapie kann eine Polychemotherapie durchgeführt werden, wodurch es möglich ist, die Ansprechrate nahezu zu verdoppeln²¹. Zu nennen sind in erster Linie zwei Schemata: das DVP- (DTIC, Vindesin und Cisplatin) und das BHD-Schema (Carmustin, Hydroxyurea und DTIC)⁸⁹.

Neben den Chemotherapien können Immuntherapien beim metastasierenden Melanom eingesetzt werden. Hierzu zählt die Applikation von Interferon- α (IFN- α). Die Interferone haben *in vitro* einen antitumoralen, antiproliferativen und immunomodulatorischen Effekt auf das Melanom gezeigt⁴³. Mit IFN- α lassen sich mit den Mono-Chemotherapien vergleichbare Remissionsraten und Überlebenszeiten erzielen⁴³, wobei die Immuntherapie zu deutlich ausgeprägteren Nebenwirkungen führen kann^{90, 123}.

Insgesamt macht die infauste Prognose fortgeschrittener Stadien des Malignen Melanoms deutlich, dass die Entwicklung neuer Therapieansätze dringend erforderlich ist.

1.1.7 Neue Therapieansätze beim Malignen Melanom: Gentherapie

Keine chirurgische oder systemische Therapie konnte bisher die Überlebensraten des Malignen Melanoms in fortgeschrittenen oder metastasierenden Stadien eindeutig verbessern. So liegen heute in der Früherkennung und frühzeitigen chirurgischen Exzision die besten Chancen, die Mortalitätsraten zu senken²⁴.

Um die Mortalität auch beim fortgeschrittenen metastasierenden Melanom zu reduzieren, sind neue Therapieansätze notwendig. Hierzu zählt insbesondere die Gentherapie, die in ersten Studien viel versprechende Ergebnisse erzielte.

Ein wesentlicher Vorteil der Gentherapie ist, dass durch die Verwendung gewebespezifischer Promotoren, wie des Tyrosinase-Promoters beim Malignen Melanom, therapeutische Gene selektiv in tumorekranktem Gewebe exprimiert werden können.

Die korrektive, die zytoreduktive und die immunmodulatorische Gentherapie stellen verschiedene Formen der Gentherapie dar.

Bei der korrektiven Gentherapie wird die normale Funktion von mutierten Genen (gewöhnlich Tumorsuppressor-Gene) wiederhergestellt oder der Verlust von Genen wieder ausgeglichen. Die Unterdrückung von Onkogenen gehört ebenfalls zur korrektiven Gentherapie.

In einer Phase-I/II-klinischen Studie wurde ein spezielles Oligonukleotid gegen das antiapoptotisch wirksame B-Zell Lymphom/ Leukämie-Protein (bcl-2) eingesetzt, das beim Malignen Melanom überexprimiert ist und eine wesentliche Bedeutung in der Apoptoseresistenz im Rahmen zytostatischer Therapien hat ⁵³. Gleichzeitig wurde eine Standard-Chemotherapie mit DTIC durchgeführt. Durch die Therapie mit dem bcl-2-mRNA komplementären Oligonukleotid konnte die bcl-2 induzierte Apoptoseresistenz durchbrochen werden, was bei sechs von vierzehn Patienten zu einem antitumoralen Effekt führte ⁶¹.

Ziel der immunmodulatorischen Gentherapie ist es, die Expression von Genen zu induzieren, die die Immunantwort gegen Tumorgewebe verstärken.

Mitrus et al. untersuchten *in vivo* an murinen Melanomen, ob das Tumorstadium durch die Transduktion mit Interleukin-12 (IL-12) in Kombination mit einer Chemotherapie mit Cyclophosphamid (CTX) reduziert werden kann. Das Cytokin IL-12 stimuliert die Proliferation von T-Lymphozyten und Natural-Killer-Cells, sowie die Synthese von weiteren Cytokinen und hat genau wie CTX antiangiogenetische Eigenschaften ^{54, 120}. Die Kombination von IL-12 und CTX zeigte eine signifikante Reduktion des Tumorstadiums und verlängerte die Überlebensrate ⁷⁷.

Im Rahmen der zytoreduktiven Gentherapie werden exogene Gene verwendet, die zum Zelltod führen oder die Applikation von zytotoxischen Substanzen erlauben.

McGray et al. transduzierten murine Melanomentumoren im Mausmodell mit dem HIV-1 assoziierten Protein Vpr (viral protein R), das einen Arrest im G2 Stadium des Zellzyklus bewirkt. Dabei zeigte sich eine komplette Tumorstadiumsregression mit signifikanter Verlängerung der Überlebensrate ^{54, 74}.

Ein weiteres Beispiel für die zytoreduktive Gentherapie in Kombination mit viraler Onkolyse

entwickelten Liu et al., indem sie unter der Steuerung des Tyrosinase-Promoters einen melanomspezifischen, onkolytischen adenoviralen Vektor konstruierte. In den Vector wurde unter Steuerung des Cytomegalievirus Promoter das Hitzeschockprotein 70 (Hsp 70) ligiert, welches das Immunsystem³² aktiviert und dendritische Zellen und T-Zellen⁴ anlockt. Neben der Injektion des Konstrukts in murine Melanome wurde das Chemotherapeutikum 5-Fluorcytosin systemisch appliziert. Die Kombination wirkte *in vitro* und *in vivo* zytotoxisch und unterdrückte das Tumorwachstum. Darüber hinaus konnte gezeigt werden dass das Konstrukt melanomspezifisch repliziert wird⁷¹.

Sanchez-Perez et al. injizierten in murine Melanom-Tumoren Plasmid-DNA, das das Herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) Suizidgen unter Steuerung des Tyrosinase-Promoters enthält, ein Plasmid mit dem Hitzeschockprotein Hsp70 (CMV-Hsp70) und ein Plasmid mit dem CD40-Liganden. Der CD40-Ligand regt die T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung an. Die Kombination der drei Plasmide führte zu einer signifikanten Erhöhung der CD8⁺ T-Zellen und zu einer kompletten Regression großer Tumoren⁹⁹.

Insgesamt zeigen die bisherigen gentherapeutischen Ansätze für die Therapie des Malignen Melanoms viel versprechende Ergebnisse, die jedoch in grösseren Studien bestätigt werden müssen.

Ein weiterer innovativer, zytoreduktiver Gentherapie-Ansatz ist die tumor-spezifische Expression des Natrium/Iodid-Symporters (NIS), die die Anwendung der beim Schilddrüsen-Karzinom schon seit über 60 Jahren eingesetzten Radioiod-Therapie auch bei nicht-thyreoidalen Tumoren erlaubt.

1.2 Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS)

Der NIS vermittelt den aktiven Transport von Iod in die Schilddrüse und eine Reihe anderer Organe, wie Magen, Speichel- und Tränendrüsen, Nieren, Plazenta und insbesondere die laktierende Brustdrüse^{28, 62, 106, 111, 114, 116, 121}. 1996 klonierten Dai et al. das NIS-Gen der Ratte²⁸, gefolgt von der Klonierung des humanen NIS-Gens¹⁰⁷. Es handelt sich um ein membranständiges Glykoprotein mit 13 Transmembrandomänen, bestehend aus 643 Aminosäuren und einer Molekülmasse von etwa 70-90 kDa¹¹⁷ (siehe **Abb. 1**).

NIS hat eine Schlüsselfunktion in der Schilddrüsenhormonsynthese. Ein wesentlicher Bestandteil für die Synthese der SD-Hormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) ist das Iodid, welches über NIS an der Basolateralmembran der Schilddrüsenfollikelzelle gegen

seinen elektrochemischen Gradienten über einen aktiven Transportmechanismus zusammen mit 2 Na⁺-Ionen in das Zellinnere transportiert wird. Dadurch wird das Iodid in der Schilddrüse etwa 20-40 fach konzentriert und für die Hormonsynthese bereit gestellt. Treibende Kraft für diesen aktiven Transport ist ein ins Zellinnere gerichteter Na⁺-Gradient, der über eine Na⁺/K⁺ ATPase an der basolateralen Membran aufgebaut wird.

Dementsprechend ist der Iodidtransport durch den Na⁺/K⁺-ATPase Hemmer Ouabain oder durch die kompetitiven Inhibitoren Thiocyanat und Perchlorat hemmbar ¹¹⁷. Ist das Iodid ins Zellinnere transportiert worden, wird es apikal über Ionenkanäle an das Schilddrüsenkolloid abgegeben. Hier spielen neben unspezifischen Kanälen auch Pendrin, das Pendred-Syndrom-Genprodukt, ein Chlorid-Iodid-Transporter eine wichtige Rolle ¹¹².

Die nächste Stufe der Schilddrüsenhormonsynthese ist die Iod-Organifizierung, wobei das Iodid oxidiert und an Tyrosylreste des im Kolloid lokalisierten Thyreoglobulin gebunden wird. Katalysiert wird die Organifizierung durch die Schilddrüsenperoxidase (TPO). Durch Kopplung von Iodtyrosinresten entstehen die Schilddrüsenhormone T3 und T4, die an Thyreoglobulin gebunden und im Kolloid gespeichert werden. Besteht Bedarf an T3 und T4 im Körper wird das Thyreoglobulin in die Follikelzellen aufgenommen, die Hormone durch Hydrolyse freigesetzt und ans Blut abgegeben ¹¹⁷.

1.2.1 Regulation von NIS

Die Stimulation der Iod-Aufnahme via NIS in die Follikelzellen erfolgt vor allem über das Hormon TSH (Thyreoid-stimulierendes Hormon), welches in der Adenohypophyse produziert wird. TSH bindet an seinen, an der basolateralen Membran der Thyreozyten lokalisierten Rezeptor und erhöht über eine Aktivierung des Adenylatzyklase-cAMP-Wegs die Expression von NIS-mRNA und NIS-Protein sowie die Iod-Akkumulation ^{68, 131}. Neben TSH führt auch Adenosin über eine Verstärkung der TSH-induzierten H₂O₂-Produktion zu einer erhöhten NIS-Expression und Iodtransportaktivität ¹¹³.

Neben den Aktivatoren konnten auch einige Inhibitoren von NIS identifiziert werden. Dazu gehören eine Reihe von Cytokinen, die eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von autoimmunen Schilddrüsenenerkrankungen und des „Euthyroid Sick Syndroms“ spielen: Transforming growth factor-β1 (TGFβ1), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-α, Interleukin (IL)-1α, Interferon (IFN)γ, IL-1β und IL-6. Zusätzlich inhibieren Glukokortikoide und Östradiol die funktionelle NIS-Expression in der Schilddrüse ^{113, 117}. Ein weiterer Inhibitor ist das Iodid

selbst. Wolff-Chaikoff et al. haben schon 1948 in tierexperimentellen Untersuchungen gezeigt, dass eine erhöhte Iodkonzentration im Plasma zu einer Blockierung der thyreoidalen Organifizierung von Iod und damit der Schilddrüsenhormonsynthese führt. Dabei handelt es sich jedoch nur um ein vorübergehendes Phänomen, da die Schilddrüse an einen langanhaltenden Iodexzess adaptiert, die Organifizierung wieder in Gang gesetzt wird und sich die Hormonsynthese wieder normalisiert (Escape-Phänomen) ¹³⁹.

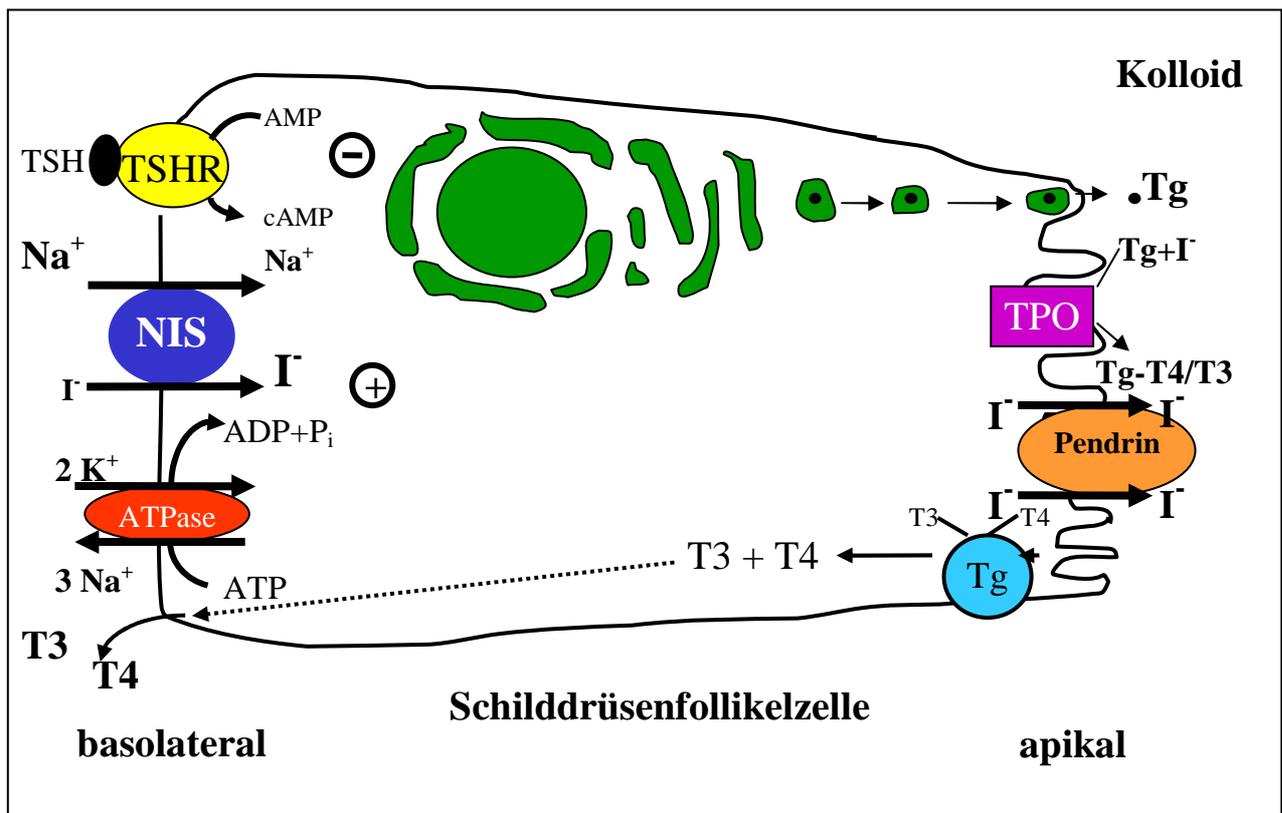


Abb.1: Schematische Darstellung der Iod-Aufnahme und Organifizierung in Schilddrüsenzellen ¹¹². NIS: Natrium-Iodid-Symporter, TSHR: TSH-Rezeptor, Tg: Thyroglobulin, TPO: Thyroperoxidase (aus: Spitzweg *et al.*, 2001a).

1.2.2 Der Natrium-Iodid-Symporter und seine Bedeutung in der Diagnostik und Therapie von benignen Schilddrüsenerkrankungen

Eine zentrale Rolle in der Schilddrüsendiagnostik spielt die Schilddrüsenzintigraphie, insbesondere für die Differentialdiagnostik von Schilddrüsenknoten. Die

Schilddrüsenszintigraphie wird durch die funktionelle Expression von NIS in den Schilddrüsenfollikelzellen ermöglicht, da über NIS ^{131}I od, ^{123}I od oder $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetat aufgenommen wird. Für die routinemäßige diagnostische Schilddrüsenszintigraphie wird in erster Linie $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetat eingesetzt, da es aufgrund der geringen Halbwertszeit (6 h) und der reinen γ -Emission Vorteile in der diagnostischen Anwendung bietet. Aufgrund der langen Halbwertszeit von 8 Tagen und der Emission von β -Strahlen wird ^{131}I od hauptsächlich zur Ermittlung der therapeutischen Aktivität vor geplanter Radioiodtherapie, bei der Ganzkörperszintigraphie zum Nachweis Iod-speichernder Metastasen und zur Radioiodtherapie eingesetzt ¹⁰⁸.

In normalem Schilddrüsengewebe ist die NIS-Expression vorwiegend an der basolateralen Membran einzelner Schilddrüsenfollikelzellen immunhistochemisch nachweisbar ^{15, 18}, während Schilddrüsengewebe von Patienten mit Morbus Basedow charakterisiert ist durch eine stark erhöhte basolaterale NIS-Expression in nahezu allen Schilddrüsenfollikelzellen ^{15, 18, 97}, was mit der charakteristischen, diffus vermehrten Radionuklidaufnahme in der Schilddrüsenszintigraphie korreliert. Die erhöhte NIS-Expression beim Morbus Basedow wird erklärt durch die Stimulation der TSH-regulierten NIS-Expression durch die TSH-Rezeptor-stimulierenden Antikörper im Serum der Patienten ⁹⁷.

Ein erhöhter Technetium-Uptake konnte auch in autonomen Adenomen festgestellt werden, was durch eine erhöhte NIS-RNA- und Protein-Expression zu erklären ist ^{63, 96}. Die hohe Technetium- bzw. Iodidakkumulation beim M. Basedow und bei autonomen Adenomen wird nicht nur zur Diagnostik genutzt, sondern ermöglicht auch deren effektive und nebenwirkungsarme Therapie mittels ^{131}I od ¹⁰⁹.

Im Gegensatz hierzu weisen „kalte“ Schilddrüsenknoten eine stark verminderte NIS-RNA und Protein-Expression und zusätzlich ein zum Teil defektes Membran-Targeting von NIS auf, was die verminderte Radionuklidaufnahme bedingt ^{63, 96, 124}.

1.2.3 Der Natrium-Iodid- Symporter und seine Bedeutung in der Diagnostik und Therapie von malignen Schilddrüsenerkrankungen

Bei der Behandlung differenzierter Schilddrüsenkarzinome ist die durch NIS vermittelte Iodaufnahmeaktivität Grundlage für die Ganzkörperszintigraphie und Therapie mit ^{131}I od nach totaler Thyreoidektomie. Die funktionelle NIS-Expression in Schilddrüsenkarzinomzellen sowie Schilddrüsenkarzinommetastasen ermöglicht dabei im

Rahmen der Nachsorge die Erkennung und Eliminierung von noch verbliebenem Schilddrüsenkarzinomgewebe und bereits ausgestreuten Metastasen¹⁰⁸. Dabei nutzt man die in der Regel verminderte, aber durch TSH oft noch ausreichend stimulierbare funktionelle NIS-Expression in den Tumorzellen. Die verminderte Radioiodaufnahmeaktivität in den meisten Schilddrüsenkarzinomen ist durch reduzierte NIS-RNA- und Proteinexpression sowie auf ein defektes Membran-Targeting im Rahmen der malignen Transformation zu erklären, wie zahlreiche Untersuchungen in den letzten Jahren gezeigt haben^{19, 20, 31, 62, 107, 117}. Um die NIS-vermittelte Radioiodakkumulation in Schilddrüsenkarzinomen und Metastasen zu steigern, wird eine endogene TSH-Stimulation durch Induktion einer Hypothyreose nach Absetzen der Schilddrüsenhormonsubstitution oder exogene TSH-Stimulation durch die Applikation von rekombinantem humanen TSH durchgeführt.

1.2.4 Der Natrium-Iodid-Symporter in der Brustdrüse und seine mögliche klinische Relevanz

Neben der Schilddrüse konnte der NIS auch in der laktierenden Brustdrüse nachgewiesen werden^{28, 62, 106, 114, 115, 117, 121}. Die funktionelle Bedeutung von NIS in der laktierenden Brustdrüse besteht darin, Iodid in der Muttermilch aktiv anzureichern und so dem Neugeborenen zur Schilddrüsenhormonsynthese zur Verfügung zu stellen. Der NIS in der laktierenden Brustdrüse ist identisch mit dem thyreoidalen NIS, wobei es sich um ein 75 kDa großes Glykoprotein handelt, das an der basolateralen Membran der Alveolarepithelzellen lokalisiert ist¹²¹.

In vivo Untersuchungen an Ratten zeigten, dass NIS in der Brustdrüse physiologisch nur während der späten Gestation und Laktation exprimiert wird und durch Saugen stimuliert werden kann. Eine maximale hormonelle Stimulation der NIS-Expression erfolgt durch eine Kombination von Östrogen, Prolaktin und Oxytocin, in Abwesenheit von Progesteron¹²¹.

Eine funktionell aktive NIS-Expression konnte nicht nur in der laktierenden Brustdrüse, sondern auch in malignem Brustdrüsengewebe verschiedener Mammakarzinom-Mausmodelle, mittels Szintigraphie, Western-Blot-Analyse und Immunohistochemie nachgewiesen werden^{67, 121}. In malignem Brustdrüsengewebe ist der NIS nicht nur membranös, sondern v.a. auch intrazellulär lokalisiert¹²¹.

Die hohe NIS-Expression in humanen Mammakarzinomen eröffnet neben der Möglichkeit, NIS als neuen diagnostischen Marker beim Mammakarzinom zu verwenden¹⁰⁸ auch eine

interessante Perspektive für den diagnostischen und therapeutischen Einsatz von Radioiod beim Mamma-Ca in Anlehnung an die seit mehr als 60 Jahren praktizierte Radioiodtherapie beim Schilddrüsenkarzinom.

In einer Studie beobachteten Moon et al. bei 5 von 25 Mammakarzinom-Patientinnen eine ^{99m}Tc -Pertechnetat-Aufnahme im Tumor, wobei die ^{99m}Tc -Pertechnetat positiven Tumoren eine höhere NIS-RNA-Expression aufwiesen ⁷⁸.

Wapnir et al. konnten in einer ersten klinischen Studie bei 25 % der Patientinnen mit NIS-positiven Mammakarzinom-Metastasen, nach medikamentöser Suppression der thyreoidalen NIS-Expression mittels T3 alleine oder in Kombination mit Methiamazol, eine signifikante ^{99m}Tc -Pertechnetat bzw. ^{131}I -Akkumulation in den Metastasen nachweisen, die aufgrund der dosimetrischen Berechnungen einen therapeutischen Effekt von ^{131}I erwarten lässt ¹³⁰.

Dadachova et al. konnten in einem transgenen Mammakarzinom-Mausmodell, eine signifikante Radioiodaufnahme im Mammakarzinomgewebe nachweisen, wobei nach Applikation einer therapeutischen ^{131}I -Aktivität eine Verlangsamung des Tumorwachstums erzielt werden konnte. Diese *in vivo* Experimente zeigten erstmals, dass das Ausmaß endogener NIS-Expression in Mammakarzinomen für einen therapeutischen Effekt von ^{131}I ausreichen kann ²⁷.

Die pharmakologische Modulation funktionelle NIS-Expression in Mammakarzinomzellen könnte dabei die Sensitivität bzw. Spezifität der diagnostischen und therapeutischen Applikation von Radioiod beim Mammakarzinom erhöhen.

Diesbezüglich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die funktionelle NIS-Expression in den östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomzellen MCF-7 durch die Kombination von all-trans-Retinsäure (atRA) und Dexamethason signifikant gesteigert werden kann. Der selektive zytotoxische Effekt von ^{131}I nahm von nur 17 % durch alleinige Gabe von atRA, auf 80 % durch zusätzliche Gabe von Dexamethason zu ¹²⁶. Kürzlich durchgeführte *in vivo* Studien am Mausmodell zeigten nach systemischer Behandlung mit atRA und Dexamethason eine signifikante ^{123}I -Akkumulation in MCF-7-Tumoren im Vergleich zu Kontrolltumoren. Diese Ergebnisse sprechen für eine Stimulation der NIS-Expression in Mammakarzinom-Tumoren durch atRA und Dexamethason und eröffnen die Perspektive einer diagnostischen und therapeutischen Anwendung von Radioiod beim Mamma-Ca nach gezielter pharmakologischer Stimulation der funktionellen NIS-Expression

138

1.2.5 Der Natrium-Iodid-Sympporter und seine Bedeutung als therapeutisches Gen beim Malignen Melanom

Funktionelle Expression des NIS in der Schilddrüse bildet die Grundlage der diagnostischen Schilddrüsenszintigraphie sowie der therapeutischen Anwendung von Radioiod für die Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen und ihren Metastasen. Die Klonierung und Charakterisierung des NIS-Gens vor 13 Jahren eröffnete die Möglichkeit zur Entwicklung eines innovativen zytoreduktiven gentherapeutischen Ansatzes für die Behandlung thyreoidaler und extrathyreoidaler Tumoren. Die gezielte NIS-Expression in extrathyreoidalen Tumoren, beispielsweise durch die Verwendung gewebespezifischer Promotoren, würde die Anwendung der sicheren und im Rahmen von Schilddrüsenerkrankungen routinemäßig eingesetzten Radioiodtherapie auch außerhalb der Schilddrüse ermöglichen.

Um die Tumor-spezifische Zytotoxizität zu erhöhen und das gesunde Gewebe zu schonen, hat sich das transkriptionelle Targeting unter Verwendung gewebespezifischer Promotoren etabliert. Die Zellen erwerben die Fähigkeit zur Iod-Akkumulation, die diagnostisch und therapeutisch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* genutzt werden kann.

Spitzweg et al. konnten erstmals unter Steuerung des PSA-Promoters in humanen Prostataadenokarzinomzellen durch gewebespezifische NIS-Expression eine Iodaufnahmeaktivität induzieren, die trotz fehlender Organifizierung des aufgenommenen Radioiods einen signifikanten therapeutischen Effekt von ^{131}I sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erlaubte. Der PSA-Promoter ist für die prostataspezifische, androgenabhängige Expression von PSA (prostataspezifisches Antigen) verantwortlich ^{118,119}.

Bei Tumoren mit geringer NIS-Expression bzw. raschem Iod-Efflux nach NIS-Genstransfer könnte durch die Applikation alternativer Radionuklide an Stelle von ^{131}I eine Steigerung der therapeutischen Effizienz erreicht werden. $^{188}\text{Rhenium}$, das ebenfalls über NIS transportiert wird, ist charakterisiert durch eine im Vergleich zu ^{131}I (Halbwertszeit 8 d, $E=0,134\text{ MeV}$, therapeutische Reichweite bis zu 2,4mm) deutlich kürzeren Halbwertszeit von 16,7 h und höheren Beta-Energie ($E=0,764\text{ MeV}$) mit entsprechend größeren maximalen therapeutischen Reichweite von 10,4mm (MW 3,1mm). Dies lässt aufgrund der mittels $^{188}\text{Rhenium}$ erzielten höheren Bestrahlungsdosis eine Steigerung des therapeutischen Effektes erwarten ¹⁰⁹.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren die Effektivität des NIS-Genstransfers untersucht, wobei sich folgende Vorteile für NIS als neues therapeutisches Gen herauskristallisiert haben (siehe **Abb.2**) ¹⁰⁹:

- Das NIS-Protein ist ein normales, nicht-toxisches, nicht-immunogenes Protein.
- Die Doppelfunktion von NIS als diagnostisches und therapeutisches Gen erlaubt direktes, nicht-invasives Imaging funktioneller NIS-Expression im Zielgewebe mittels diagnostischer ^{99m}Tc - oder ^{123}I -Szintigraphie sowie genaue dosimetrische Berechnungen vor therapeutischer Applikation von ^{131}I .
- NIS-Gentransfer ist aufgrund des „Crossfire-Effektes“ des β -Strahlers ^{131}I mit einer therapeutischen Reichweite von bis zu 2,4mm mit einem signifikanten „Bystander-Effekt“ assoziiert, d.h. nicht nur NIS-exprimierende Zellen, sondern auch NIS-negative Zellen werden durch die β -Strahlen zerstört.
- NIS-Gentransfer erlaubt die Durchführung der Radioiodtherapie, die ein schon zugelassenes und sicheres Therapieverfahren mit nur geringem Nebenwirkungspotential darstellt und seit über 60 Jahren mit großem Erfolg und viel Erfahrung bei der Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome eingesetzt wird.

Insgesamt wurde an verschiedenen Tumormodellen, insbesondere am Prostatakarzinom, erstmals das enorme Potential des NIS-Gens als neuem therapeutischem Gen aufgezeigt, und durch die Möglichkeit des gewebespezifischen NIS-Gentransfers in extrathyreoidalen Tumoren die Perspektive für die Anwendung der sicheren und nebenwirkungsarmen Radioiodtherapie auch außerhalb der Schilddrüse eröffnet.

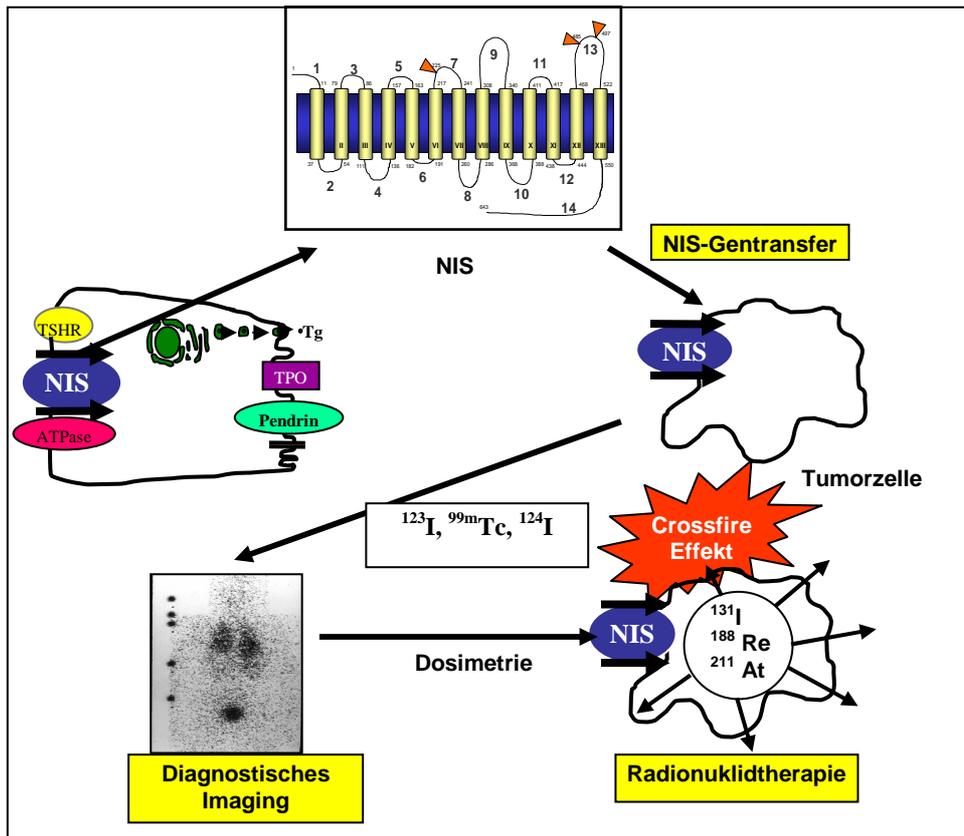


Abb. 2 : Die Rolle des NIS-Gens als diagnostisches und therapeutisches Gen (aus: Spitzweg *et al.*, 2007)

1. 2. 6. Grundlagen und Ziele der Arbeit

Die Inzidenz des Malignen Melanoms steigt weltweit stärker an als die Inzidenz jeder anderen Tumor-Erkrankung ⁷⁰. Zudem ist laut „Cancer Facts & Figures“ das Melanom für 80 % der durch Hautkrebs verursachten Sterbefälle verantwortlich ². Obwohl das Melanom in frühen Stadien durch chirurgische Entfernung geheilt werden kann, verbessern die derzeit verfügbaren Therapien nicht die Überlebensraten weiter fortgeschrittener oder metastasierter Stadien ⁹⁵, deren Prognose weiterhin infaust ist.

Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben erstmals eindrücklich gezeigt, dass NIS-Gentransfer in Tumorzellen die Akkumulation einer therapeutisch wirksamen ¹³¹Iod- oder ¹⁸⁸Rhenium-Aktivität erlaubt, und damit die NIS-vermittelte Radionuklidtherapie als sicheren und potentiell kurativen Therapieansatz auch bei extrathyreoidalen Tumoren, insbesondere im metastasierten, meist nicht mehr therapierbaren Stadium, ermöglichen könnte.

Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin, einen neuen Therapieansatz für das Maligne

Melanom auf dem Boden eines tumor-spezifischen NIS-Gentransfers durch die Verwendung des Melanom-spezifischen Tyrosinase-Promoters zu entwickeln. Durch gezielten NIS-Gentransfer soll eine Radionuklidakkumulation (^{131}I od bzw. ^{188}R henium) in Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* induziert werden, die mit der dadurch möglichen Radionuklidtherapie mit ^{131}I od bzw. ^{188}R henium, eine sichere, nebenwirkungsarme neue Behandlungsmöglichkeit für das Melanom ermöglicht.

Nach dem Tyrosinase-Promoter-vermittelten Gentransfer von NIS in die humane Melanomzelllinie 1205 Lu soll die Gewebespezifität des NIS-Gentransfers sowie die Expression von NIS mit Hilfe von Northern- und Western-Blot Analyse sowie Immunhistochemie untersucht und schließlich der therapeutische Effekt von ^{131}I mittels *in vitro* Clonogenic Assay ermittelt werden.

Um die Radionuklidaufnahme (^{123}I od bzw. ^{188}R henium) von NIS-positiven 1205 Lu Tumoren im Mausmodell *in vivo* zu ermitteln, wird ein diagnostisches Imaging mittels γ -Kamera durchgeführt, welches dann genaue dosimetrische Berechnungen als Grundlage einer individualisierten ^{131}I od- bzw. ^{188}R henium-Therapie erlauben soll. Darüber hinaus wird mittels Western-Blot Analyse und Immunhistochemie die NIS-Expression in 1205 Lu Xenotransplantat-Tumoren untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

Alle Versuche wurden im Labor von Frau Prof. Dr. C. Spitzweg in der II. Medizinischen Klinik

des Klinikums Großhaderns durchgeführt. Bezugsquellen sind in Klammern angegeben.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Herstellung eines Expressionsplasmids

Die full-length NIS-cDNA wurde über einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* (Roche, Penzberg, Germany) aus dem CMV-NIS-pcDNA3 Expressionsplasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. S. M. Jhiang, Ohio State University, Columbus, OH, USA) ausgeschnitten, aufgereinigt und in den pGL3-Vektor ligiert (Clontech, Heidelberg).

Der Tyrosinase-Promoter (Tyr) mit den angehängten Schnittstellen *MluI* und *NheI* ist mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)-Amplifikation (Expand High Fidelity PCR System, Roche) aus dem pBLCAT6-Vektor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. D. Schadendorf, Klinikum Mannheim, Deutschland; mit bestem Dank an Prof. R. Vile, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA) ausgeschnitten worden. Zur Durchführung der PCR wurde 1 µl der pBLCAT6-Vektor-DNA mit 0,2 mM dNTPs, 5,2 U/100 µl der high fidelity PCR-Polymerase, 1x PCR-Buffer (mit 1,5 mM MgCl₂) und jeweils 0,3 pmol upstream und downstream Primer mit H₂O auf 100 µl eingestellt. Die Bedingungen für die PCR wurden Primer-abhängig optimiert. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 6 min (min.), gefolgt von einem erneuten Denaturierungsschritt bei 94°C für 45 Sekunden (s); die Anlagerung der Primer fand bei 55°C für 45 s statt; danach erfolgte die DNA-Synthese für 1,15 min bei 72°C. Diese Zyklen wurden 35mal wiederholt. Zum Abschluss erfolgte eine Endsynthese für 10min bei 72°C. Die PCR-Produkte konnten einige Stunden bei 4°C oder langfristig bei -20°C gelagert werden, bevor sie mittels DNA-Gelelektrophorese analysiert wurden. Nach der Gelelektrophorese wurde die Bande ausgeschnitten und aufgereinigt. Für die Ethanol (EtOH)-Fällung wurde die DNA-Probe mit 3M Natrium-Acetat (1/10 des Volumens) und 100%-Ethanol (2,5fache DNA-Menge) vermischt und 1h bei -20°C inkubiert. Danach wurde das Gemisch 30min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend 500µl 70%-EtOH auf das Pellet pipettiert und 15min zentrifugiert. Zum Abschluss wurde der Überstand abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und in H₂O

aufgenommen.

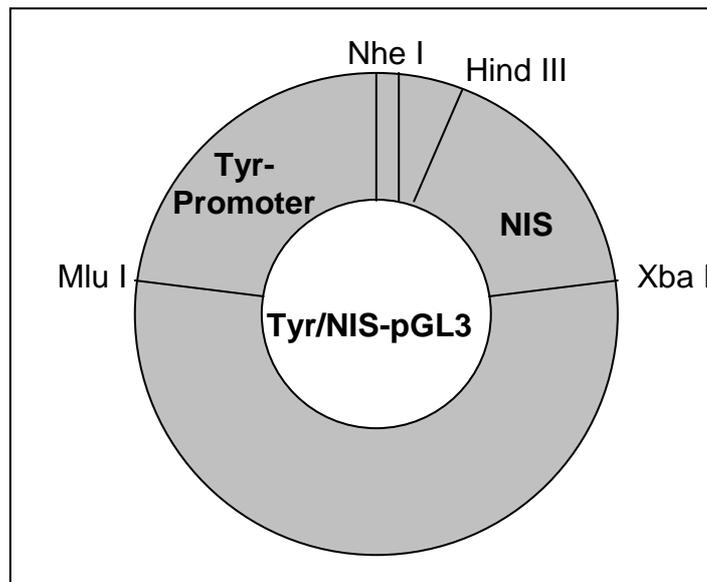


Abb. 3: Schematische Darstellung des NIS-Expressionsvektors Tyr/NIS-pGL3 unter Verwendung des Tyrosinase-Promotors.

Aus dem pGL3-Vektor war zuvor, ebenfalls mit Hilfe der Enzyme *HindIII* und *XbaI*, die Luciferase-cDNA (1700 bp) ausgeschnitten worden. Nach einem Restriktionsverdau des NIS-cDNA enthaltenden pGL3-Vektors (NIS-pGL3) mit *MluI* und *NheI* (Roche) wurde der Tyr-Promoter (870 bp) in NIS-pGL3 hineinligiert. Der resultierende Expressionsvektor Tyr/NIS-pGL3 (siehe **Abb. 3**) wurde aufgereinigt und mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

Die Herstellung der Kontrollvektoren, welche nur die cDNA des Tyrosinase-Promotors ohne die NIS-cDNA (Tyr-pGL3) bzw. nur die NIS-cDNA ohne den Tyrosinase-Promoter (NIS-pGL3) enthält, erfolgte nach dem gleichen Prinzip.

2.1.2 Spaltung mit Endonukleasen

Doppelsträngige DNA wurde wie bereits oben erwähnt mit Restriktionsendonukleasen sequenzspezifisch gespalten. Dieser Restriktionsverdau erfolgte jeweils unter Einhaltung der vom Hersteller (Roche) empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen. Bei Verdau der DNA-Probe mit mehreren Enzymen wurde jeweils ein Puffer gewählt, in dem jedes der

Enzyme eine möglichst hohe Aktivität aufweist. Pro 1 µg zu schneidender DNA wurden 1 bis 2 Einheiten Enzym in 200 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug bei 37 °C mindestens 3 Stunden, in den meisten Fällen wurde jedoch über Nacht inkubiert. Der Erfolg des enzymatischen Verdau wurde jeweils anhand einer gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente kontrolliert.

2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Das Agarosegel zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde aus 0,7 g Agarose (Life Technologies, Bochum) und 100 ml 1x TBE-Puffer sowie 6 µl Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt) hergestellt. Die DNA-Proben wurden mit jeweils 2 µl Loading Buffer (10x Blue Juice Gel Loading Buffer, Invitrogen, Karlsruhe) ebenso wie 6-8 µl einer DNA-Leiter (Ready Load 1 Kb DNA Ladder, Invitrogen) auf das Gel zur elektrophoretischen Trennung aufgetragen (1 Stunde bei 68 Volt). Danach wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und die DNA-Fragmente anhand des mitgelaufenen Markers nach Anzahl ihrer Basenpaare identifiziert.

2.1.4 Gelextraktion

Die Gelextraktion erfolgte unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Protokolls (Qiagen, Hilden, Germany). Dabei wurden zuerst die zu isolierenden DNA-Fragmente nach Auftrennung und Identifizierung mittels Gelelektrophorese mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel herausgetrennt. Dann wurde dem Gelstück zuerst die 3fache Menge seines Gewichts an QG-Puffer (Quiagen) hinzugefügt und die entstandene Mischung für mindestens 10 min unter wiederholtem vorsichtigem Mischen bei 50 °C inkubiert, bis sich das Gel vollständig im Puffer gelöst hatte. Im Anschluss daran wurde die dem Gel-Gewicht entsprechende Menge an Isopropanol (Merck) hinzugefügt und die Flüssigkeit in die bereitgestellte QIAquick Spin Aufreinigungssäule (Qiagen) überführt, für 1 Minute bei Maximalgeschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Nach Hinzupipettieren von weiteren 500 µl QG-Puffer (Qiagen) wurde erneut zentrifugiert und verworfen, gefolgt von zwei weiteren Zentrifugationen mit je 750 µl PE-Puffer (Qiagen), um alle Ethidiumbromidreste gründlich zu entfernen. Dann wurde die Säule für 2 min bei

Maximalgeschwindigkeit trocken zentrifugiert und in ein neues, steriles Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe von 50 µl H₂O (pH 8) wurde erneut für 10 min inkubiert und im Anschluss daran noch einmal 2 min, wiederum bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. In dem Eluat befanden sich die zu isolierenden DNA-Fragmente.

2.1.5 Ligation

Die full-length NIS-cDNA sowie die Tyrosinase-Promoter-cDNA wurden im Rahmen zweier Ligationen in den pGL3-Expressionsvektor ligiert. Das molare Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA betrug je nach Versuchsansatz 1:1, 3:1 und 10:1. Die Reaktion fand in 20 µl Gesamtvolumen in DNase freiem H₂O nach Zugabe von insgesamt 100 ng Vektor- und Insert-DNA und 1 Einheit T4-Ligase (Rapid DNA Ligation Kit, Roche) während einer 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur statt. Der Ligationsansatz wurde danach direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien benutzt.

2.1.6 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Vektor-DNA wurde nach dem MAX Efficiency DH5αTM Competent Cells-Protokoll (Life Technologies) im Rahmen einer Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien (Life Technologies) transferiert und vermehrt. Dabei wurden jeweils 100 µl Bakterien und 5 ng verdünnte Plasmid-DNA in einem vorgekühlten Propylen-Reagenzröhrchen gemischt, 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss daran für 45 s bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach Inkubation für 2 min auf Eis wurden 900 µl SOC-Medium (Invitrogen) zu den Bakterien gegeben und diese für 1 Stunde bei 225 U und 37°C geschüttelt. Im Anschluss daran folgte das Ausplattieren der Bakterien in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:1, 1:10, 1:100) auf LB (QBIogene, Heidelberg, Germany)/Ampicillin (Sigma)-Platten, welche dann bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden.

2.1.7 DNA-Minipräparationen zur Isolierung von Plasmid-DNA

Die DNA-Minipräparationen wurden unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep-Kits (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde zunächst eine mit dem gewünschten Plasmid transformierte und über Nacht gewachsene Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium unter Zusatz von 12,5 µl Ampicillin gelöst und für 8 h bei 225 U und 37 °C geschüttelt. Im Anschluss wurden 2 ml der Bakteriensuspension bei 6000 U für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl P1-Puffer (Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 250 µl P2-Puffer (Qiagen) und vorsichtigem Mischen wurde für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 350 µl N3-Puffer (Qiagen) hinzugefügt und erneut gemischt wurde. Nach 10 min Zentrifugation bei 13.000 U, in welcher die in den vorherigen Schritten lysierten Bakterien abgetrennt wurden, wurde der die DNA enthaltende Überstand in eine bereitgestellte QUIA-Prep-Säule (Qiagen) transferiert. Nach einer 60sekündigen Trockenzentrifugation wurde die Säule noch zweimal für je 1 Minute zentrifugiert, zuerst nach Zugabe von 500 µl PB-Puffer (Qiagen) und danach nach Zugabe von 750 µl PE-Puffer (Qiagen). Diese Schritte dienten der Reinigung der Plasmid-DNA von Endonukleasen und Salzen. Einer erneuten Trockenzentrifugation folgte die Überführung der Säule in ein neues steriles Reaktionsgefäß und der Zusatz von 50 µl EB-Puffer (Qiagen). Nach einer 10minütigen Inkubationszeit, in welcher die Plasmid-DNA durch den Puffer aus dem Filter herausgelöst wurde, erfolgte eine 2minütige Abzentrifugation. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde durch mehrfache diagnostische Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese auf ihre Korrektheit hin überprüft. Nach der nachgewiesenen erfolgreichen Transformation wurde das Plasmid in einer DNA-Maxipräparation in größerer Menge isoliert.

2.1.8 DNA-Maxipräparationen zur Isolierung von Plasmid-DNA

Die DNA-Maxipräparationen wurden unter Verwendung des EndoFree Plasmid Maxi-Kits (Qiagen) durchgeführt. Dafür wurden 2 ml der bereits für die Minipräparation verwendeten Bakteriensuspension in 100 ml LB-Medium unter Zusatz von 250 µl Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (225 U). Die Bakteriensuspension wurde danach bei 4 °C und 3000 U (= 6000 g) für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das geerntete Pellet in 10 ml P1-Puffer (Qiagen) unter Zusatz von 10 µl RNase A (Qiagen)

gründlich resuspendiert. Im Anschluss an die Zugabe von 10 ml P2-Puffer (Qiagen) erfolgte eine 5minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Dann wurden 10 ml eiskalter P3-Puffer (Qiagen) zu der Suspension gegeben, sofort vorsichtig gemischt und das Reaktionsgefäß für 20 min auf Eis gestellt, wodurch die Präzipitation von unerwünschter genomischer Bakterien-DNA, denaturierten Proteinen sowie Resten der Bakterienzellwand verstärkt wurde. Durch eine folgende Zentrifugation für 30 min bei 11 000 U (= 20 000 g) und 4 °C wurde die im Überstand gelöste Plasmid-DNA vom Präzipitat abgetrennt. Nach Überführung dieses Überstandes in ein neues sterilisiertes Reaktionsgefäß wurde die Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen für 15 min wiederholt. Währenddessen wurde eine Qiagen Tip 500-Säule (Qiagen) mit 10 ml QBT-Puffer (Qiagen) äquilibriert. Dann wurde der durch die Zentrifugation erhaltene klare Überstand über die Säule gefiltert und diese im Anschluss daran zweimal mit je 30 ml QC-Puffer (Qiagen) gewaschen, um die Kontamination der Plasmid-DNA zu reduzieren. Durch 15 ml des Elutions-Puffers QT (Qiagen) wurde im Folgenden die superhelikale Plasmid-DNA herausgewaschen und mit 10,5 ml Isopropanol (Merck) bei Raumtemperatur gefällt. Nach Abzentrifugation des Präzipitats für 30 min bei 11 000 U (= 20 000 g) und 4 °C und Waschen des Pellets mit 5 ml 70%igem RNase freiem Ethanol, wurde erneut für 10 min zentrifugiert (4 °C, 11 000 U). Die erhaltene isolierte DNA wurde nach Verwerfen des Überstandes für ca. 10 min unter dem Abzug getrocknet und in 150 µl H₂O (pH 8) aufgenommen. Im Anschluss wurde eine erneute Überprüfung des Plasmids mit Hilfe eines diagnostischen Restriktionsverdau und folgender Gelelektrophorese vorgenommen.

2.1.9 DNA-Sequenzierung

Vor Durchführung der Transfektion wurde der korrekte Aufbau des hergestellten Plasmids durch eine DNA-Sequenzierung nochmals bestätigt. Diese Sequenzierung erfolgte bei der Firma „Medigenomix“ in München.

2.2 Zellkultur und Zelllinie

2.2.1 Verwendete Zelllinie

Bei den in dieser *in vitro* Versuchsreihe verwendeten Zellen handelte es sich um die primäre, humane Melanomzelllinie 1205 Lu, die metastasiert und zu den aggressivsten Melanomzelllinien gehört (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. Carola Berking, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Universität München – Innenstadt, Deutschland).

2.2.2 Medium und Zellkulturbedingungen

Alle Zellkultur-Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung von sterilen Materialien, Geräten, Lösungen und Medien. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und unter Anreicherung der Luft mit 5 % CO₂ kultiviert.

Die 1205 Lu Zellen wurden in 150 mm bzw. 100 mm Petrischalen mit 25 bzw. 10 ml Medium bei 70%iger Konfluenz kultiviert. Als Medium wurde MCDB153-Medium (GibcoBRL, Karlsruhe, Germany) - supplementiert mit 20 % Leibovitz, 2 % fetalem Kälberserum (Invitrogen), 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco), 0,1 % Insulin und 0,08 % Natriumpyruvat - verwendet. Dem Medium der stabil transfizierten 1205 Lu Klone wurde noch das Selektivantibiotikum Puromycin in einer Konzentration von 0,5 µg/ml beigefügt. Das Medium wurde jeden 2.- 3. Tag gewechselt und die Zellen bei mehr als 70 % Konfluenz wie folgt passagiert.

Im Falle der 1205 Lu Zellen wurde zuerst das Kulturmedium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 5 ml hinzugefügtem 1 x PBS-Puffer durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken der Petrischale gewaschen. Danach wurde der Puffer wieder abgesaugt, die Zellen mit 1-2 ml 0,5 g Trypsin/0,2 g EDTA (Life Technologies, Inc., Karlsruhe) benetzt und für 20 S im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurden die vollständig vom Untergrund gelösten Zellen vom Flaschenboden abgewaschen und in 6-8 ml DMEM (high glucose) Medium (GibcoBRL, Karlsruhe, Germany)- supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (Invitrogen)- in einem Falcon-Röhrchen aufgenommen. Nachdem durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren eine gleichmäßige Zellsuspension erhalten worden war, wurden die gelösten Zellen entweder auf neue Petrischalen verteilt oder für die verschiedenen Experimente in 6-Well Platten mit der erforderlichen Zellzahl unter Zuhilfenahme einer

Neubauer-Zählkammer ausgesät.

2.2.3 Kryokonservierung

Rückzufrierende Zellen der jeweiligen Passagen wurden ebenfalls zuerst mit 5 ml 1 x PBS-Puffer gewaschen und im Anschluss daran mit 2 ml Trypsin/EDTA für 20 Sekunden im Brutschrank inkubiert. Nach Abwaschen der Zellen vom Schalenboden, wurde die Suspension 5 min lang bei 1200 U zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde dann im Einfriermedium, bestehend aus 95 %igem fetalem Kälberserum und 5 %igem DMSO (Sigma), resuspendiert und im Anschluss an eine 24-stündige Zwischenlagerung bei -80 °C im Isopropanol-Behälter, im Stickstofftank bei -180 °C aufbewahrt.

2.2.4 Proliferationsassay

Der Proliferationsassay wurde unter Verwendung des kommerziell erhältlichen MTS-Assay (Promega Corp., Mannheim, Germany) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Am Tag vor dem Versuch wurden die Zellen in einer Dichte von 15×10^4 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Nach Absaugen des Mediums wurde den Zellen zunächst 0,5 ml Phenol-freies RPMI-Medium (Gibco) zugegeben. Im Anschluss daran wurden in jedes Well 100 µl des frisch hergestellten MTS (3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)/PMS (phenazine methosulfate solution)-Reagenz (Promega)-Gemischs hinzupipettiert und die Zellen bei 37 °C für 1,5 h inkubiert. Die Absorption des entstandenen Formazan-Produkts wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt, die direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist.

2.2.5 Transfektion

2.2.5.1 Puromycin als selektives Antibiotikum

Zur Selektion der erfolgreich mit oben angegebenem Plasmid (Tyr/NIS-pGL3) transfizierten Zellen wurde eine stabile Simultantransfektion mit einem Puromycin-Resistenzplasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. R. Vile, Mayo Clinic, Rochester,

Minnesota, USA) durchgeführt. Das Selektions-Antibiotikum Puromycin (Sigma) wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/ml eingesetzt. Die benötigte Puromycin-Konzentration, die zu einer Absterberate von >75% der 1205 Lu Wildtypzellen führte, war zuvor durch einen Proliferationsassay ermittelt worden.

2.2.5.2 Transiente Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden die verwendeten 1205 Lu Zellen und die Kontrollzelllinien MCF-7 und LNCaP nach dem oben genauer erläuterten Protokoll trypsiniert und in einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen pro Well in 12-Well-Platten ausgesät, um am nächsten Tag eine 60-70%ige Zellkonfluenz zu erreichen. Daraufhin wurden die Zellen entweder mit dem NIS/Tyr-pGL3 Vektor oder den Kontrollvektoren transfiziert, und zwar eine Hälfte mittels LipofectAMINE Plus Reagenz - (Invitrogen/Life Technologies, Inc., Karlsruhe) und die andere Hälfte mittels Fugene HD Transfection Reagenz (Roche, Mannheim). Beide Versuchsansätze wurden im Medium (Invitrogen) ohne Serum- oder Antibiotikazusatz und nach den genauen Empfehlungen der Hersteller durchgeführt, wobei verschiedene Verhältnisse von eingesetzter DNA-Menge und jeweils verwendetem Transfektionsreagenz ausgetestet wurden. Die genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung erfolgt in Abschnitt 2.2.5.3. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Iod-Uptake Assay (siehe 2.3.1) auf den Transfektionserfolg gescreent, und aus jeder der beiden Versuchsreihen die Versuchsbedingungen mit der höchsten erzielten Iod-Aufnahme für die stabile Transfektion ausgewählt.

2.2.5.3 Stabile Transfektion

Die 1205 Lu Zellen wurden 24 Stunden vor Beginn der stabilen Transfektion wie bereits oben beschrieben ausgesät.

Bei der Verwendung von LipofectAMINE Plus (Invitrogen) wurden 1 µg des oben angegebenen NIS/Tyr-pGL3 Plasmids und 0,05 µg (= 1/20 der eingesetzten Plasmidmenge) des Puromycin-Plasmids vorsichtig mit 8 µl Plus Reagenz (Invitrogen), einem die Komplexbildung anregenden Enhancer, sowie 50 µl reinem Medium (d.h. ohne Serum- oder Antibiotikazusatz) gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurden 6 µl LipofectAMINE in weiteren 50 µl Medium zugegeben, und das Gemisch für weitere 20 min inkubiert. Vor Verteilung des Reagenzgemisches auf die Zellen, sind die Zellen ca. 1-3 min mit serumfreien Medium inkubiert worden. Anschließend wurde das serumfreie Medium abgesaugt und 100 µl des Reaktionsgemisches pro Well gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach 15 min Inkubation mit dem Reaktionsgemisch allein wurden 400 µl serumfreies Medium zusätzlich auf die Zellen gegeben und 3,5 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 500 µl Medium- supplementiert mit 4 % fetalem Kälberserum- auf die Zellen gegeben und 24 h im Brutschrank inkubiert.

Gleichzeitig wurden unter Verwendung von Fugene (Roche) 1 µg des NIS/Tyr-pGL3 Plasmids sowie 0,05 µg (= 1/20 der eingesetzten Plasmidmenge) des Puromycin-Plasmids in reines Medium mit einem Endvolumen von 50 µl aufgenommen und vorsichtig vermischt. Danach wurden dem Reaktionsgemisch 1,5 µl oder 3 µl Fugene Reagenz (Roche) hinzugefügt, gevortext und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zu unterstützen. Währenddessen wurde das Medium der 1205 Lu Zellen abgesaugt, die Zellen mit 1 x PBS-Puffer kurz gewaschen und 500 µl Medium vorgelegt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch gleichmäßig auf die Zellen verteilt und im Brutschrank für 48 h inkubiert.

Nach einer 24- bzw. 48-stündigen Inkubation unter Normalbedingungen wurde das jeweilige Transfektionsmedium abgesaugt und durch 1 ml Kompletmedium, welches mit 0,5 µg/ml Puromycin (Sigma, Taufkirchen) als Selektivantibiotikum supplementiert worden war, ersetzt. Die überlebenden, d.h erfolgreich transfizierten Klone wurden nach 4-8 Wochen, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit, mittels Zylindertechnik isoliert, hochgezogen und einem Screening per Iod-Uptake Assay unterworfen.

2.3 Iod-Uptake Versuche *in vitro*

2.3.1 Iod-Uptake Assay

Der Iod-Uptake Assay wurde nach der von Weiss et al. etablierten Methode durchgeführt¹³². Am Tag vor dem Versuch wurden die Zellen in einer Dichte von 15×10^4 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Im ersten Versuchsschritt wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Inkubationspuffer (HBSS (Gibco), mit 10 µM Natriumiodid (Sigma) und 10 mM HEPES (Merck) supplementiert und auf einen pH von 7,3 eingestellt) kurz gewaschen. Dann wurden zu jedem Well 1 ml Inkubationspuffer, welchem zuvor 0,1 µCi Na ¹²⁵I/ml

(Amersham, Braunschweig) hinzugefügt worden war, hinzupipettiert. Den Kontroll-Well wurde zusätzlich 100 μM KClO_4 , welches selektiv die NIS-vermittelte Iod-Aufnahme in die Zellen hemmt, zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin für 35 – 60 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde das radioaktiv versetzte HBSS abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem HBSS kurz gewaschen, um das nicht von den Zellen aufgenommene Iod zu entfernen. In einer 20minütigen Inkubation der Zellen in 1 N NaOH (Merck) unter Schütteln bei ca. 300 U wurden die Zellen lysiert und die Radioaktivität im Zell-Lysat im γ -Counter gemessen.

2.3.2 Kinetik

Zur Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Iod-Akkumulation in den NIS-transfizierten Zellen wurde eine Zeitkinetik für den Iod-Uptake durchgeführt. Der Versuch entsprach dem unter Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Iod-Uptake Assay, mit dem Unterschied, dass jede 6-Well Platte für eine unterschiedliche Zeitspanne inkubiert wurde (2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 oder 60 min). Dann wurde die Reaktion jeweils, wie oben bereits beschrieben, gestoppt, und mit Hilfe des γ -Counters die Radioaktivität bestimmt. Die so ermittelte Inkubationszeit, die zur höchsten Iodakkumulation führte, wurde im Folgenden für alle Iod-Uptake Experimente als optimale Inkubationsdauer verwendet.

2.3.3 Iod-Efflux

Um die Geschwindigkeit, mit welcher die Zellen das zunächst akkumulierte ^{125}I wieder verlieren, genau bestimmen zu können, wurde ein Iod-Efflux-Assay nach der Methode von Weiss et al. durchgeführt¹³³. Am Tag zuvor in 6-Well Platten ausgesäte Zellen (15×10^4 Zellen/Well) wurden, wie bereits unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben, für 45 min bei 37 °C mit Inkubationskuffer, supplementiert mit Na^{125}I inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Medium 120 min lang alle 5 min durch frisches HBSS (ohne ^{125}I) ersetzt. Der ^{125}I -Gehalt des jeweiligen Überstandes, der dem Iod-Verlust der Zellen in den vorangegangenen 5 min entsprach, wurde im γ -Counter gemessen. Nach Ablauf der 120 min wurde das noch in den Zellen akkumulierte ^{125}I nach einer 20minütigen Inkubation der Zellen mit 10 N NaOH mittels γ -Counter gemessen.

2.4 Iod-Organifizierung

2.4.1 Inkubation der Zellen mit ^{125}I

Am Tag vor dem Experiment wurden die Zellen in einer Dichte von 15×10^4 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Am nächsten Morgen wurde dann zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Inkubationspuffer (siehe 2.3.1) kurz gewaschen. Dann wurden zu jedem Well 1 ml Inkubationspuffer, welchem zuvor $0,1 \mu\text{Ci Na } ^{125}\text{I/ml}$ hinzugefügt worden waren, hinzupipettiert. Den Kontroll-Wellen wurde zusätzlich $100 \mu\text{M KClO}_4$, welches selektiv die Iod-Aufnahme über NIS in die Zellen hemmt, zugegeben. Die Zellen wurden im Anschluss für 35 min bis drei Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Brutschrank inkubiert.

2.4.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationsdauer wurde der HBSS-Überstand abgenommen und die darin enthaltene Konzentration an freiem, d.h. nicht von den Zellen aufgenommenem ^{125}I im γ -Counter gemessen. Die Organifizierung wurde dann im folgenden mit der von Urabe et al. etablierten Methode anhand der Trichloressigsäure-Präzipitation bestimmt ¹²⁷. Dabei wurden die Zellen zuerst mit eiskaltem $1 \times \text{PBS}$ -Puffer kurz gewaschen, und dann nach Hinzugabe von $100 \mu\text{l } 0,1 \text{ M NaOH}$ zu jedem Well 10 min lang bei ca. 300 U geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die erhaltenen Zelllysate von je zwei Wells in einem speziellen γ -Counter Röhrchen zusammenpipettiert und mit 1 ml TCA (Trichloressigsäure)/BSA (Sigma)-Lösung versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Lösung für eine Stunde bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, wodurch es zu einem Ausfall der ^{125}I -bindenden Proteine kam. Diese wurden im folgenden bei Maximalgeschwindigkeit und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min lang abzentrifugiert, mit kaltem $1 \times \text{PBS}$ gewaschen, und im Anschluss das präzipitierte, an Proteine gebundene ^{125}I nach Abnahme des Überstandes im γ -Counter gemessen.

2.5 Northern Blot

2.5.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren

Die RNA aus mit dem NIS-Expressionsvektor bzw. dem Kontrollvektor stabil transfizierten Zellen wurde mit Hilfe des Rneasy Mini Kits (Quiagen) gewonnen. Die Zellen wurden in 100

mm-Petrischalen ($1,5 \times 10^6$ Zellen/Schale) ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70 %, wie unter 2.2.2 bereits ausführlich beschrieben, abtrypsiniert. Das Zelllysat wurde im Anschluss daran abzentrifugiert und das entstandene Pellet in 600 μ l RLT-Puffer (Qiagen) gründlich resuspendiert. Nach Zugabe von 600 μ l 70 % Ethanol erfolgte eine Zentrifugation für 1 Minute bei 13.000 U in der Rneasy Minisäule (Qiagen). Nachdem 700 μ l RW1-Puffer (Qiagen) auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert worden war, wurde die Säule zweifach mit 500 μ l RPE-Puffer (Qiagen) für 2 min bei 13.000 U gewaschen. Durch Zugabe von 30 μ l RNase-freiem Wasser auf die Gelmembran der Säule, Inkubation für 5 min und eine letzte zweiminütige Zentrifugation wurde dann die RNA eluiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung durch Photometrie

Die RNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde mit einem Spektralphotometer über die UV-Absorption der Ribonukleinsäuren bestimmt. Die Extinktion von 500 μ l Lösung wurde in einer Quarzküvette über einen Bereich der Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Die Verdünnung der RNA-Lösung wurde dabei so gewählt, dass die Werte im Bereich der größten Messgenauigkeit lagen (1: 200). Anhand des Quotienten der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktionen konnte der Reinheitsgrad der RNA in Bezug auf Proteinverunreinigungen gemessen werden. Der E260/280 Wert sollte bei reiner RNA um die 1,7 liegen. Die Konzentration der Lösung ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde dann im Folgenden nach der Formel (Verdünnung x RNA-Faktor x Wert der 260 nm-Messung) / Küvettenvolumen berechnet, wobei der RNA-Faktor einem Wert von 40 entspricht.

2.5.3 Elektrophoretische Auftrennung der RNA

Im ersten Schritt wurde das RNA-Gel aus 1,5 g Agarose, 108 ml DEPC H_2O , 15 ml (10 x) MOPS, 27 ml Formaldehyd und 3 μ l Ethidiumbromid hergestellt. Die RNase freie vorbehandelte Gelapparatur wurde im Folgenden für den gesamten Versuch auf einer Magnetröhre platziert, um damit eine kontinuierliche Zirkulation des Puffers während des Versuches zu gewährleisten.

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrten RNA-Proben wurden zuerst vorsichtig auf Eis aufgetaut, um im

Anschluss für 5 min in einem Heizblock bei 60 °C denaturiert zu werden. Je 10 µg der RNA-Proben bzw. 6 µl eines RNA Markers (Bio-Rad) wurden im folgenden mit 17 µl RNA sample loading buffer (Sigma) vermischt. Alle Proben inklusive der Marker wurden bei 65 °C für 15 min denaturiert und im Anschluss daran auf das Agarosegel, welches zuvor bereits ca. 30 min vorgelaufen war, aufgetragen und bei 52 Volt für 4 Stunden laufen gelassen. Dabei kam es zur elektrophoretischen Auftrennung der RNA-Fragmente.

2.5.4 Transfer auf die Nylonmembran

Nach Beendigung der 4-stündigen Elektrophorese wurde das Gel unter einer UV-Kamera fotografiert und mit einem Skalpell auf die richtige Größe zurechtgeschnitten. Daraufhin wurde das Gel vorsichtig auf ein mit dem Transferpuffer (20 x SCC) vorbefeuchtetes Whatman-Filterpapier gelegt und glattgestrichen. Auf die Oberfläche des Gels wurde eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham, Freiburg) in Gelgröße sowie ein weiteres Whatman-Filterpapier und ein Stapel Papiertücher gelegt und die Gesamtkonstruktion mit 2 kg über Nacht beschwert (**Abb. 4**). Dabei wurde sichergestellt, dass es zu einer ständigen Befeuchtung der Membranen mit dem Transferpuffer kam. Am nächsten Morgen wurde die Nylonmembran, auf welcher sich nun die transferierte RNA befand, sofort mit einem UV-Stratalinker von beiden Seiten cross-gelinkt, unter der UV-Kamera fotografiert, noch feucht in Frischhaltefolie eingeschweisst und eingewickelt in Aluminiumfolie bei Raumtemperatur gelagert.

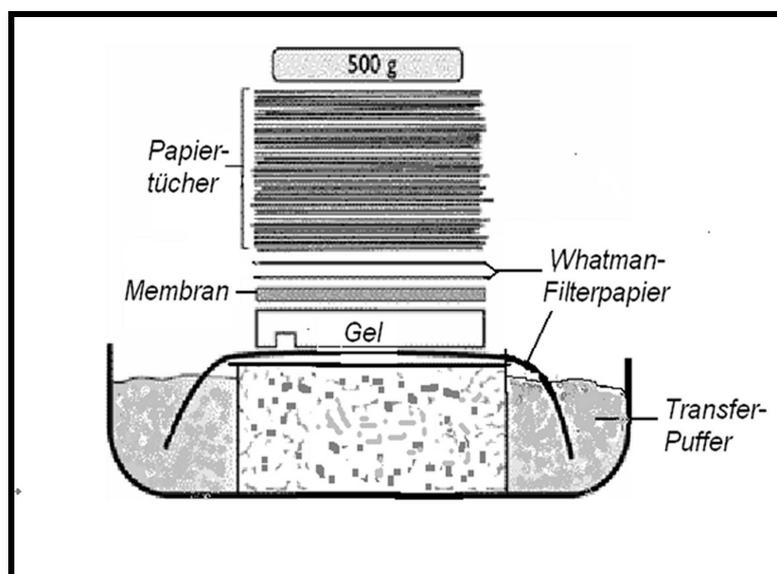


Abb. 4: Schematische Darstellung des Northern-Blot-Aufbaus

2.5.5 Radioaktive Markierung der cDNA-Sonde

Dieser Schritt erfolgte unter Verwendung des Megaprime DNA Labelling Systems (Amersham). 25 ng eines hNIS-spezifischen cDNA-Fragments (Nukleotide 1184-1667) wurden auf Eis mit 5 µl eines Random-Primers (Amersham) und DEPC-H₂O in einem Endvolumen von 26 µl gemischt, bei 95°C für 5 min denaturiert und im Anschluss sofort wieder auf Eis gestellt. Dann wurde ein zweites Reaktionsgemisch, bestehend aus 5µl des Reaktionspuffers (Amersham), jeweils 4 µl der Nukleotide dTTP, dGTP und dATP (alle Amersham), 5 µl des radioaktiven ($\alpha - P^{32}$) Deoxyadenosin- 5`- Triphosphats (CTP) sowie 2 µl der DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Amersham) hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 5 µl 0,2 M EDTA (Invitrogen) gestoppt, und das Gemisch unter Verwendung des QIAquick Nucleotid Removal Kits (Qiagen) aufgereinigt.

Hierbei wurde zuerst die 5fache Menge an PN-Puffer (Qiagen) zugegeben, das Gemisch in die Säule überführt und 1 Minute bei 6000 U zum Binden der DNA zentrifugiert. Danach wurde zweimalig nach Hinzugabe von je 500 µl PE-Puffer (Qiagen) für 1 Minute bei 6000 U, und einmal bei 13.000 U für 1 Minute trocken zentrifugiert. Nach Transfer der Säule in ein neues Reaktionsgefäß wurden 50 µl EB-Puffer (Qiagen) als Elutionsreagenz auf die Säule gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die folgende einminütige Zentrifugation bei 13.000 U wurde die entstandene radioaktiv-markierte, und somit als Hybridisierungsprobe verwendbare cDNA herausgewaschen und im Anschluss sofort bei ca. 100° C für 5 min erneut denaturiert.

2.5.6 Hybridisierung

Nun wurde die aufbewahrte Nylonmembran nach kurzem Befeuchten mit DEPC-H₂O für 30 min bei 68 °C im Hybridisierungspuffer (Express Hyb Solution, BD Clontech Laboratories, Heidelberg) vorhybridisiert. Im Anschluss erfolgte nach Absaugen des Puffers und Zugabe der zuvor in 5 ml Hybridisierungspuffer gelösten radioaktiven cDNA-Sonde die eigentliche Hybridisierung für eine Stunde bei 68° C. Dann wurden die Blots dreimal für je 10 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC (saline sodium citrate)/0,05 % SDS (sodium dodecylsulfate)-Lösung und einmal für 30 min bei 50 °C in 0,1 x SSC/0,1%SDS-Lösung gewaschen, wobei die nicht an den Blot gebundene radioaktive cDNA von der Membran entfernt wurde. Die

Blots wurden daraufhin bei -80°C für ca. 3 Wochen unter Verwendung eines KODAK X-OMAT AR Films (Sigma) exponiert.

2.5.7 Kontroll-Hybridisierung mit einer β -Actin-Sonde

Um die NIS-cDNA vor der Durchführung der Kontroll-Hybridisierung von der Membran zu entfernen, wurde diese dreimal für je 5 min bei 80°C unter Schütteln mit $0,1 \times \text{SSC}/0,1\%$ SDS- Lösung gewaschen.

Zur Qualitätskontrolle und Quantifizierung der geblotteten RNA wurde die Membran im Anschluss nach dem oben bereits beschriebenen Protokoll erneut hybridisiert unter Verwendung von 25 ng einer humanen β -Actin cDNA-Probe (Clontech), die ebenfalls nach oben beschriebenem Protokoll radioaktiv gelabelt wurde.

Anhand der Computer-gestützten densitometrischen Analyse (ImageJ-Software) der Intensitäten der einzelnen β -Actin Banden wurden die zuvor gemessenen NIS-Intensitäten normalisiert.

2.6 Western Blot

2.6.1 Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot-Analyse

2.6.1.1 Membranpräparation aus Zellen

Zuvor in 150 mm-Petrischalen ausgesäte Zellen wurden nach Verwerfen des Mediums kurz mit eiskaltem $1 \times \text{PBS}$ -Puffer gewaschen, nach Zugabe von 1 ml Puffer A (250mM Saccharose, 10 mM Hepes, 1mM EDTA, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, $10\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 1mM PMSF, pH 7,5) vom Boden der Kulturschale abgeschabt und das erhaltene Zelllysat auf Eis gut resuspendiert. Die Lösung wurde daraufhin bei 4°C und 500 g (= 2000 U) für 15 min zentrifugiert und dem erhaltenen Überstand $100\mu\text{l Na}_2\text{CO}_3/\text{ml}$ hinzugegeben, um die darin enthaltenen Proteine zu binden. Nach Inkubation bei 4°C für 45 min unter kontinuierlichem Schütteln, wurde bei 100.000 g (= 25.000 U) und 4°C für 20 min ultrazentrifugiert. Das erhaltene Pellet, in welchem sich die Membranproteine befanden, wurde nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes in $200\mu\text{l}$ Puffer B gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

2.6.1.2 Membranpräparation aus Tumorgewebe

Für die Membranpräparation wurden zunächst die 1205 Lu Tumore nach Zugabe von Puffer A zerkleinert, um eine homogene Suspension zu erhalten. Die hergestellte Proteinlösung wurde dann 5 min bei 1500g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, und dieser erneut 10 min bei 1500g und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden pro ml Puffer A 100µl 1M Na₂CO₃ zu der Lösung dazugegeben und 45 min bei 4°C gleichmäßig geschüttelt. Anschließend wurde die Proteinlösung 25 min bei 25000U/min und 4°C zentrifugiert und das erhaltene Pellet, in welchem sich die Membranproteine befanden, wurde nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes in 200 µl Puffer B (250mM Saccharose, 10mM HEPES, 1mM MgCl, pH 7,5) gelöst und bei – 80 °C aufbewahrt.

2.6.2 Protein-Konzentrationsbestimmung (Bradford-Proteinbestimmung)

Die Konzentration der Proteinlösung wurde unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assays (Bio-Rad, München) bestimmt.

Zuerst wurde eine Proteinstandardkurve aus verschiedenen Verdünnungsstufen (0,2 – 1 mg/ml) einer BSA (bovine serum albumin, Sigma) - Stocklösung unter Zusatz des 1:5 verdünnten Biorad-Konzentrats (Bio-Rad) erstellt. Diese ergab sich aus den OD-Werten der Verdünnungen bei 595 nm nach einer vorausgehenden 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur.

Anhand dieser Standardkurve wurde im Anschluss die Konzentration der Proteinlösung bestimmt.

2.6.3 SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gleiche Konzentrationen an Membranprotein (je nach Versuch 10, 15 oder 20 µg) wurden mit 10 µl Sample Puffer (NuPage, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 4 µl Reducing Agent (NuPage, Invitrogen) und DNase-freiem Wasser vorsichtig zu einem Gesamtvolumen von 35 µl gemischt und für 10 min bei 70° C denaturiert. Im Anschluss daran wurden die Proben, und ebenso der verwendete Marker (Precision Plus Protein, All Blue Standards, Bio-Rad), in die Taschen eines 4-12%igen Bis-Tris-HCl gepufferten Polyacrylamidgels (NuPage, Invitrogen)

pipettiert und im Running Puffer bei 200 Volt für eine Stunde laufen gelassen.

2.6.4 Western Blot-Analyse

Im nun folgenden Elektroblothing (Novex Mini Cell System, Invitrogen) wurden die Proteine bei 25 Volt im Transfer Puffer für 1 h vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm, Invitrogen) transferiert. Im Anschluss an das Elektroblothing wurde die Membran für 1 h unter Schütteln mit 5%iger Milch-TBST (Tris buffered saline and tween)-Lösung geblockt und nach Zugabe eines monoklonalen Maus-Antikörpers gegen die Aminosäurereste 468-643 des NIS-Proteins (Verdünnung 1 : 3000) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. John. C. Morris, Mayo Clinic, Rochester/MN, USA) über Nacht bei 4 °C im Dunklen inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran nach Absaugen des 1. Antikörpers erneut mit TBST gewaschen (1 x für 15 min, und dann 2 x für je 5 min). Dann erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Vector Laboratories), einem mit Peroxidase-gelabeltem Antimaus-Antikörper der Ziege (Verdünnung 1:5000, 1 h bei Raumtemperatur). Im Anschluss wurde die Membran für 1 x 15 min und 4 x für je 5 min mit TBST gewaschen, bevor sie für 1 min mit dem ECL-Reagenz (Enhanced chemiluminescence Western Blot detection Reagent, Amersham, Braunschweig, Deutschland) inkubiert und im Folgenden zwischen 1 und 20 min unter Verwendung eines KODAK BIO MAX MR Films (Sigma) exponiert wurde. Anhand des im Gel mitgelaufenen Markers konnte das Molekulargewicht der Banden bestimmt werden, außerdem erlaubte er eine Abschätzung der Transfer-Effizienz.

2.7 Clonogenic Assay

2.7.1 Durchführung

Mit dem NIS-Expressionsvektor bzw. dem Kontrollvektor stabil transfizierte Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in einer Dichte von 1,5 Millionen Zellen/Flasche ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 60-70% wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und im Anschluss für 7 Stunden mit 0,8 mCi Na¹³¹I (Amersham) (in HBSS-Inkubationspuffer, supplementiert mit 10 µM NaI und 10 mM HEPES supplementiert und auf einem pH von 7,3 eingestellt), im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation mit ¹³¹I wurden die Zellen mit 1 x

PBS gewaschen, mit 0,05 %igem Trypsin-ETDA abtrypsiniert und in einer Zelldichte von 50-2000 Zellen/Well (je sechs Wells pro Konzentration) in 12-Well Platten in regulärem Wachstumsmedium ausgesät.

Parallelexperimente wurden für jede Zelllinie im HBSS-Inkubationspuffer ohne den Zusatz von radioaktivem Iod zur Kontrolle durchgeführt.

2.7.2 Färbung und Auswertung

Nachdem sich nach ca. 1-2 Wochen Zellkolonien gebildet hatten, wurden die Zellen mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und mit 500 µl 100 %igem Methanol/Well (Sigma) für 10 min im Kühlschrank fixiert. Danach folgte die 5minütige Färbung mit 1%igem Kristallviolett (Sigma) und die Auszählung der Zellkolonien unter dem Mikroskop. Dabei wurden nur Kolonien ausgezählt, die aus ca. 50 Zellen oder mehr bestanden. Die für jede Zellreihe separat bestimmte Überlebensrate entsprach dem Prozentsatz an Zellkolonien nach ¹³¹I-Behandlung verglichen mit denen nach Inkubation mit HBSS-Inkubationspuffer.

2.8 *In vivo*-Studien

2.8.1 Mäuse und Haltungsmethoden

Bei der für die Versuche eingesetzten Tierart handelt es sich um weibliche, immunsupprimierte Nacktmäuse (Stamm NMRI-nu (nu/nu)), in denen subkutan in der Flankenregion Xenotransplantate aus stabil mit NIS-cDNA transfizierten Melanomzellen etabliert wurden. Im Alter von 4 bis 6 Wochen wurden die Tiere von der Firma Janvier (München) bezogen und frühestens nach einer einwöchigen Akklimatisierung für die Versuche eingesetzt. Die Haltung erfolgte unter SPF (special pathogen free)-Bedingungen in den Tierräumen des Lehrstuhls für Pharmazeutischen Biologie-Biotechnologie, LMU München. Die Tiere wurden in klimatisierten Räumen mit 12-Stunden Tag/Nacht-Lichtrhythmus gehalten und soweit möglich wurden die Versuche nur tagsüber durchgeführt. Futter (Standarddiät) und Wasser standen ad libidum zur Verfügung. Die Besatzdichte pro Käfig betrug maximal 5 Tiere. Ab dem Zeitpunkt der Injektion der Radionuklide erfolgte die Tierhaltung in dafür vorgesehenen Tierräumen des Labors der Nuklearmedizinischen Klinik

im Klinikum Grosshadern, LMU München. Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.8.2 Etablierung von subkutanen Xenotransplantat-Tumoren

Für die Induktion von experimentellen Tumoren wurden den Nacktmäusen $1,5 \times 10^6$ Zellen (resuspendiert in Medium) subkutan injiziert, jeweils stabil mit NIS cDNA transfizierte Melanomzellen (TN-1) in die rechte Flanke und mit einem Kontrollvektor transfizierte negative Melanomzellen (T-1) in die linke Flanke. In den folgenden Wochen wurde das Tumorwachstum beobachtet und ab einer Größe von ca. 10 mm Durchmesser die Versuche durchgeführt.

2.8.3 Radionuklid-Uptake Versuch *in vivo* mit ^{123}I od bzw. ^{188}R henium

Um die ^{123}I od- bzw. ^{188}R henium-Aufnahme der NIS-positiven (TN-1) und Kontrolltumoren (T-1) *in vivo* zu ermitteln, wurde den Mäusen ca. 3-5 Wochen nach Injektion der Tumorzellen, als die Tumoren eine Größe von ca. 10 mm Durchmesser erreicht hatten, 18,5 MBq (0,5 mCi) ^{123}I od bzw. 111 MBq (3 mCi) ^{188}R henium intraperitoneal injiziert (i.p.), um dann die Zeitabhängigkeit und Höhe der Radionuklidakkumulation und dessen Retentionszeit im Tumor mittels Gamma-Kamera zu messen. Für das ^{188}R henium-Imaging wurde ein medium energy (MEAP) Collimator und für das ^{123}I od-Imaging ein ultra high resolution (UXHR) Collimator verwendet. Die Bildgebung erfolgte in Inhalationsnarkose, die mit einem üblichen Narkosegerät (halbgeschlossenes System mit Isofluran) durchgeführt wurde. Die Tiere haben bis zu 2 Stunden in Narkose verweilt, kamen anschließend in eine Sauerstoffkammer und wurden mit einer i.p. Injektion von Ringer-Glukose-Lösung rehydriert. Nach der i.p. Applikation von ^{123}I od (0,5 mCi) bzw. ^{188}R henium (3 mCi) wurde die Biodistribution der Radionuklide in tumortragenden Mäusen auf einer γ -Kamera szintigrafisch erfasst. Die Retentionszeit der Radionuklide im Tumor und in ausgewählten Organen wurde durch sequentielle Bildgebung (0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 38,5, 48 Stunden p.i.) gemessen. Regions-of-interest (ROI) wurden quantifiziert und in Relation zur applizierten Dosis in Prozent der injizierten Dosis pro Gramm Gewebe (% ID/g) angegeben. Dosimetrische Berechnungen wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. Christian Zach

(Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin, Klinikum Großhadern, München) nach dem MIRD-Konzept unter Verwendung des Dosis-Faktors der RADAR-group (www.doseinfo-radar.com) durchgeführt.

Anschließend konnten anhand dieser dosimetrischen Berechnungen die Therapiestudien optimal vorbereitet und eine therapeutische Aktivität für ^{131}I od und ^{188}Re henum ermittelt werden.

2.10 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie der 1205 Lu Tumore wurde das Vectastain Elite Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet. Dafür wurden zunächst ca. 5 μm dicke Gefrierschnitte der Tumore angefertigt, diese auf Objektträger gezogen und anschließend 5 min in 80% igem Methanol bei 4°C und 2 min in 100%igem Aceton bei -20°C fixiert.

Um unspezifische Membran-Bindungsstellen zu blocken, wurden die Gefrierschnitte zunächst 20 min bei Raumtemperatur mit Blocking Serum inkubiert, bevor sie mit dem bereits oben erwähnten NIS-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörper für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden (Ak-Verdünnung 1:1600, 1:2000 und 1:2400). Nach 3maligem Waschen mit PBS-T (PBS und Tween 0,05%) erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Ak-Verdünnung 1.2000), ein gegen den ersten Antikörper gerichtetes Biotin-gekoppelten Antimaus-Immunglobulin (Vectastain). Darauf folgte nach Wiederholung der PBS-Waschschritte die Komplexbildung des 2. Antikörpers mit einem bereits präformierten Avidin/biotinylierten-Peroxidase-Komplex (DAB-Reagenz, Vectastain) für 30 min.

Die anschließende 5minütige Färbung mit Diaminobenzidine (DAB-Reagenz, Vectastain) resultierte in einem blau-schwarzen Präzipitat, welches einen Indikator für die hNIS-spezifische Immunoreaktivität darstellte. Nach Gegenfärben mit Malachitgrün (Sigma) wurde mit Glycergel (DAKO) eingedeckelt.

Nach dem gleichen Prinzip wurden Kontroll-Färbungen durchgeführt, die statt mit den jeweiligen Antikörpern mit reinem 1x PBS-Puffer inkubiert wurden, um unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschließen.

2.11 Radionuklidtherapie mit ¹³¹Iod bzw. ¹⁸⁸Rhenium

Für die Therapiestudien mit ¹³¹Iod bzw. ¹⁸⁸Rhenium wurden Melanom-Xenotransplantate in weiblichen Nacktmäuse etabliert und nach ca. 3-5wöchigem Tumorwachstum, als das Tumolvolumen ~ 0,2 cm³ betrug, jeweils drei Gruppen gebildet je n=6. Die Therapiegruppen mit NIS-positiven TN-1 Tumoren erhielt 55,5 MBq (1,5 mCi) ¹³¹I bzw. 55,5 MBq (1,5 mCi) ¹⁸⁸Re durch eine einmalige i.p.-Injektion, je eine Kontrollgruppe mit NIS-negativen T-1 Tumoren erhielt ebenfalls 55,5 MBq (1,5 mCi) ¹³¹I bzw. 55,5 MBq (1,5 mCi) ¹⁸⁸Re und eine weitere Kontrollgruppe mit TN-1 Tumoren dagegen nur physiologische Kochsalzlösung.

Um bei verminderter Iodaufnahme in die Schilddrüse die Radionuklid Aufnahme im Tumor zu maximieren, erhielten die Mäuse vor Beginn der Therapiestudien L-Thyroxin (5 mg/l) in ihrem Trinkwasser. Nach intraperitonealer Applikation der Radionuklid-Aktivität bzw. der physiologischen Kochsalzlösung wurde der therapeutische Effekt ermittelt. Die Tumorgroße wurde vor und nach Applikation des Radionuklids bzw. der physiologischen Kochsalzlösung mindestens sechs Wochen lang mit einer Schieblehre einmal pro Woche gemessen und anschließend das Tumolvolumen nach der Formel $\text{Volumen} = \text{Länge} \times \text{Weite} \times \text{Tiefe} \times 0,52$ bestimmt. Es wurden sowohl die Tumorgößen zwischen der Therapie- und den Kontrollgruppen miteinander verglichen, als auch die Größen der NIS-exprimierenden und NIS-negativen Tumoren bei jeder Maus. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Applikation des Radionuklids wurde ein Teil der Mäuse schmerzlos in Narkose getötet, die Tumoren disseziert und histologisch aufgearbeitet. Die Nachbeobachtungszeit betrug etwa 8-10 Wochen, wobei die Mäuse, bei denen die Tumoren mehr als 10% ihres Körpergewichts eingenommen haben, die Tumoren exulzeriert waren oder Mäuse, die durch die Tumoren bzgl. Bewegung oder Nahrungsaufnahme beeinträchtigt waren, vorher schmerzlos in Narkose getötet wurden.

2.12 Kaplan-Meier-Überlebenskurven nach Radionuklidtherapie mit ¹³¹Iod bzw. ¹⁸⁸Rhenium

Um die Sterblichkeit zwischen den einzelnen Mausgruppen zu vergleichen wurde die Mortalität nach Kaplan-Meier aufgetragen. Hierzu wurde jede Maus nach Therapiebeginn als Tag Null in die Statistik aufgenommen. In den darauf folgenden Wochen wurde die Sterblichkeit der einzelnen Mäuse mit dem jeweiligen Tag des Absterbens bzw. Einschläferns

protokolliert. Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurde aus den gesammelten Ergebnissen eine Überlebenskurve nach Kaplan- Meier erstellt.

2.13 Statistik

Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit Verwendung der kommerziellen Software (Microsoft, Excel). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichung der dreifachen Ausführung dargestellt. Die Fehlerbalken in den Tabellen geben die Standardabweichung an. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des t-Tests berechnet.

2.14 Verwendete Geräte

Wasserbäder :	GFL (Labor) Köttermann (Zellkultur)
Schüttler :	IKA Vibrax VXR basic (Western) Edmund Kühler Laborgerätebau (Iod-Uptake) Edmund Kühler (Mini- und Maxipräp)
Mischer :	IKA
Vortexer :	Scientific Industries
Pipetten :	Eppendorf
Pipetus :	Hirschmann
Heizblock :	Eppendorf Thermomixer 5463
Zentrifugen :	5415 Eppendorf (Minipräp) S 60 Ultrazentrifuge Beckmann (Membranpräp) Hettich (Zellkultur) RC5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Kendro (Maxipräp) Universal 30 RF Hettich (Maxipräp) Hettich Roto Silenta (Organifizierung)

Gelelektrophoresekammer :	Biofuge pico, Heraus (Northern Blot) BioRad Power Pac 3000 als Stromquelle Invitrogen XCell Sure Lock (Western Blot) Bio-Rad Wide Mini-Sub Cell GT (Agarosegel)
Waagen :	Sartorius
PCR-System :	GeneAmp, Perkin Elmer
Mikrowelle :	Siemens
Kühlschränke :	Liebherr
γ - Counter :	Berthold
Drucker :	Epson (γ -Counter) HP Laserjet 2200dn (Computer)
Computer :	Fujitsu Computers Siemens
Brutschrank :	Hera cell 240, Heraeus (Zellkultur) Heraeus (^{131}I) Heraeus (^{125}I) Gallenkamp (Bakterien)
Hitzefixierkammer :	GFL
Geigerzähler :	Berthold
UV-Kamera :	2UV Transilluminator (UVP)
Stickstofftank :	Messer Griessheim
pH-Elektrode :	Hanna Instruments
Spektralphotometer :	Vitrospec plus, CKB Biochrom
UV-Stratalinker :	Stratagene
Mikroskop :	Olympus (Zellkultur) Axio Cam, Zeiss (Immunohisto)

2.11 Verwendete Materialien

5 x TBE-Puffer :	54 g Trispuffer (Roth, Karlsruhe) 27,5 g Borsäure (Merck) 20 ml 0.5 M ETDA (Gibco) auf einen Liter mit Millipore-Wasser auffüllen
------------------	--

Ampicillin-Agar :	1,5 g Select-Agar (Gibco BRL) 200 ml steriles LB Medium (LB-Kapseln von Q-Biogene) 100 µg/ml Ampicillin (Sigma)
TCA/BSA-Lösung :	1 ml 30%iges TCA (Merck) 0,5 ml BSA in einer Lösung von 20 mg/ml (Sigma) auf 10 ml mit RNase freiem H ₂ O auffüllen
DEPC-Wasser:	1 l Millipore zu 1 ml DEPC (Diethyl Pyrocarbonat, Sigma) geben, durch Schütteln gut mischen, 12 h bei RT inkubieren und im Anschluss autoklavieren
10 x MOPS :	41,9 g MOPS (Sigma) 6,8 g NaAc (Sigma) 10 ml 0,5 M EDTA (Gibco) mit DEPC auffüllen, auf pH 7 einstellen, steril filtrieren und im Kühlschrank dunkel lagern
Agarosegel für Northern Blot :	1,5 g Agarose (Gibco BRL) 108 ml DEPC 15 ml 10 x MOPS 27 ml Formaldehyd (Sigma) 3 µl Ethidiumbromid (Merck)
20 x SSC :	350,6 g 3 M NaCl (Merck) 176,4 g 0,3 M Natriumcitrat (Sigma) auf 2 l mit H ₂ O auffüllen, pH 7 einstellen und bei RT lagern
2 x SSC/0,05 % SDS :	50 ml 20 x SSC

	1,25 ml 20 % SDS (Sigma) auf 500 ml mit Millipore auffüllen
0,1 x SSC/0,1 % SDS :	2,5 ml 20 x SSC 2,5 ml 20 % SDS 495 ml Millipore
Puffer A (Membranpräparation) :	42,8 g 250 mM Saccharose (Merck) 1,1915 g 10 mM HEPES, auf pH 7,5 einstellen 0,186 g 1 mM EDTA (Gibco) pro 100 ml 2 Complete Tabletten (10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 1mM PMSF, Roche) auf 500 ml mit Millipore auffüllen
Puffer B (Membranpräparation) :	8,56 g 250 mM Saccharose 0,2383 g 10 mM HEPES 0,0953 g 1 mM MgCl (Merck) auf 100 ml mit Millipore auffüllen
MOPS SDS Running Puffer :	40 ml 20 x Running Buffer (NuPage MOPS SDS Running Buffer, Invitrogen) 760 ml destilliertes Wasser
Transfer Puffer :	20 ml 20 x Transfer Buffer (NuPage Transfer Buffer, Invitrogen), 380 ml destilliertes Wasser
TBST :	10 ml 1 M Tris pH 7,4 4 g NaCl 500 µl Tween-20 (Merck) auf 500 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
5 %-Milch-TBST :	1 g Milchpulver (Bio-Rad) 20 ml TBST

HSNM (horse normal serum mix) :	10 ml PBS, 3 Tropfen HNS (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA)
ABC-Reagenz :	5 ml PBS 2 Tropfen Lösung A (Vectastain Kit) 2 Tropfen Lösung B (Vectastain Kit)
DAB-Reagenz :	5 ml destilliertes Wasser 2 Tropfen Stocklösung pH 7,5 (Vectastain Kit) 4 Tropfen DAB (Vectastain Kit) 2 Tropfen H ₂ O ₂ (Vectastain Kit) 2 Tropfen Nickelsol (Vectastain Kit)
Reaktionsgefäße :	Eppendorf, Hamburg BD Falcon, Frankreich
Propylene-Röhrchen :	BD Falcon
γ-Counter Röhrchen :	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen :	Costar, Corning, USA (für Pipetus) Sarstedt Eppendorf
x-Well Platten:	BD Falcon
Petrischalen :	BD Falcon
Zellkulturflaschen :	BD Falcon
Küvetten :	Sarstedt
Ultrazentrifugen-Röhrchen :	Beckmann, Palo Alto, USA
Glasgefäße, z.B. Erlmeier :	Schott Duran, Deutschland
L-Thyroxin:	L-Thyroxin Henning inject, Sanofi-Aventis, Berlin
Tierfutter:	NM Futter, 10 mm Pellets, Ssniff, Soest
Streu:	Lignocel S8/15, Ssniff, Soest

3. ERGEBNISSE

3.1 Selektion der erfolgreich mit hNIS transfizierten Zellen durch Iod-Uptake Assay

Humane full-length NIS-cDNA wurde in den pGL3-Vektor ligiert, aus dem zuvor das 1700 bp messende Luciferase-Fragment ausgeschnitten worden war (NIS-pGL3). Ein 870 bp-Tyrosinase-Promoter wurde dann in den NIS-pGL3 ligiert und der resultierende Expressionsvektor (Tyr/NIS-pGL3) durch Sequenzierung überprüft. Zwei zusätzliche Expressionsvektoren enthielten lediglich den 870 bp-Tyrosinase-Promoter ohne NIS-cDNA (Tyr-pGL3) bzw. die NIS-cDNA ohne den Tyrosinase-Promoter (NIS-pGL3). Die humane Melanomzelllinie 1205 Lu wurde in den folgenden Transfektionsversuchen eingesetzt. Als Kontrollzelllinien ohne Tyrosinase-Expression dienten die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 und Prostatakarzinom-Zelllinie LNCaP. Zunächst wurden die oben genannte Zelllinien mit Tyr/NIS-pGL3 bzw. den Kontrollvektoren mittels LipofectAMINE und Fugene HD Transfection Reagenz unter serumfreien Bedingungen transient transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen 24 bzw. 48 h lang inkubiert und die Transfektionseffizienz durch die Bestimmung des Iod-Uptakes bestimmt.

Nach Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden dann die 1205 Lu Zellen mit Tyr/NIS-pGL3 bzw. den Kontrollvektoren stabil transfiziert. Im Rahmen der stabilen Transfektion wurde eine Ko-Transfektion mit einem „Puromycin-Resistenz-Plasmid“ durchgeführt, wodurch eine Puromycin-Resistenz der erfolgreich transfizierten Zellen induziert wurde.

Alle über die nächsten 1-5 Wochen im Puromycin-Selektivmedium wachsende Zellklone wurden isoliert und in einem diagnostischen Iod-Uptake Assay auf ihre Iod-Aufnahmefähigkeit hin getestet. Die Fähigkeit zur Aufnahme von ^{125}I korrelierte dabei mit der Transfektion mit der NIS-cDNA und dem Einbau des NIS-Proteins in die Zellmembran. TN-1, die Zellreihe mit der höchsten Iod-Aufnahme, wurde für alle weiterführenden Experimente verwendet. Sie akkumulierte ^{125}I Perchlorat-abhängig bis auf das 35fache verglichen mit Zellen (T-1 bzw. N-1), die mit den Kontrollvektoren (Tyr-pGL3 bzw. NIS-pGL3) transfiziert worden waren, welche keine Perchlorat-abhängige Iod-Aufnahme zeigten (siehe **Abb. 5**).

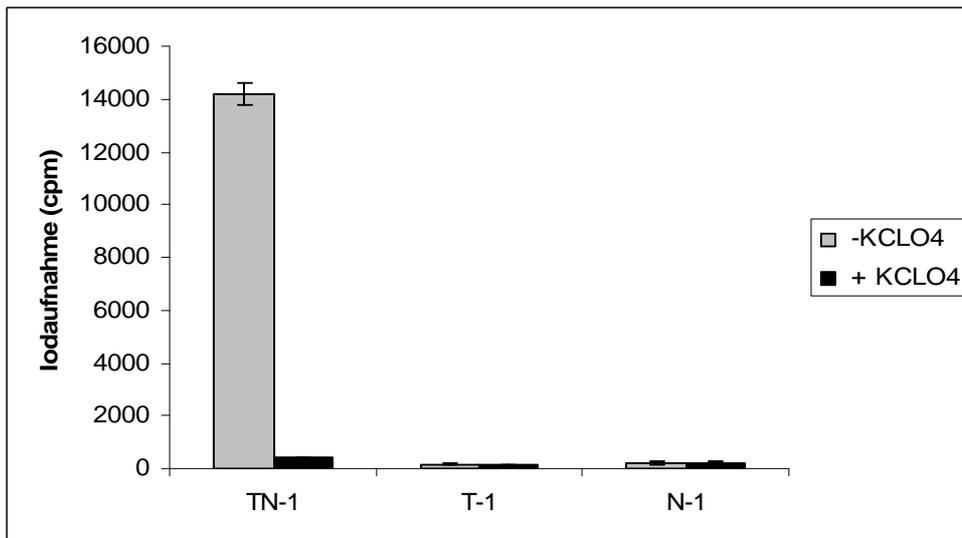


Abb.5: Iodakkumulation in stabil mit Tyr/NIS-pGL3 (TN-1) oder den Kontrollvektoren Tyr-pGL3 (T-1) bzw. NIS-pGL3 (N-1) transfizierten 1205 Lu Zellen. Die stabil transfizierte Zelllinie TN-1 konzentrierte ¹²⁵Iod ca. 35fach (*P<0,0001) Perchlorat-abhängig gegenüber der mit dem Kontrollvektor transfizierten Zelllinien T-1 bzw. N-1, die keine Iodaufnahme zeigten.

Die mit Tyr/NIS-pGL3 transient transfizierten Kontroll-Zelllinien MCF-7 und LNCaP zeigten keine Perchlorat-abhängige Akkumulation von Iod, wodurch die Tumorspezifität der Tyrosinase-Promoter gesteuerten NIS-Transfektion demonstriert werden konnte (siehe **Abb. 6**).

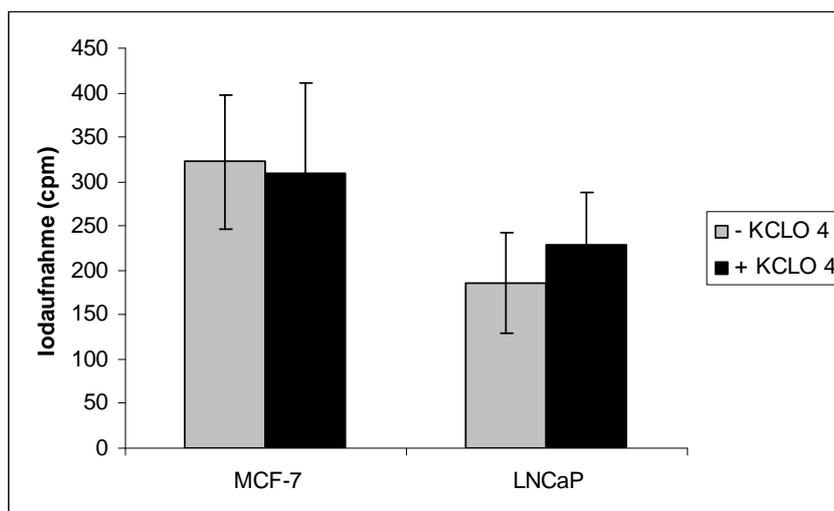


Abb. 6: In transient mit dem Tyr/NIS-pGL3 Vektor transfizierten MCF-7 und LNCaP-Zellen konnte keine Perchlorat-abhängige Iodaufnahme nachgewiesen werden.

3.2 Charakterisierung des NIS-induzierten Iod-Uptakes

3.2.1 Iodaufnahme-Kinetik

Um den Zeitpunkt der maximalen Iod-Akkumulation in den mit dem NIS-Tyr-pGL3-Vektor stabil transfizierten TN-1 Zellen genau zu bestimmen, wurde eine Zeit-Kinetik ermittelt. Diese zeigte eine Absättigung der Iod-Akkumulation in den TN-1 Zellen nach 30 min Inkubationszeit (siehe **Abb. 7**).

Somit wurden im folgenden alle weiteren Experimente mit einer konstanten ^{125}I -Inkubationszeit von 30 min durchgeführt.

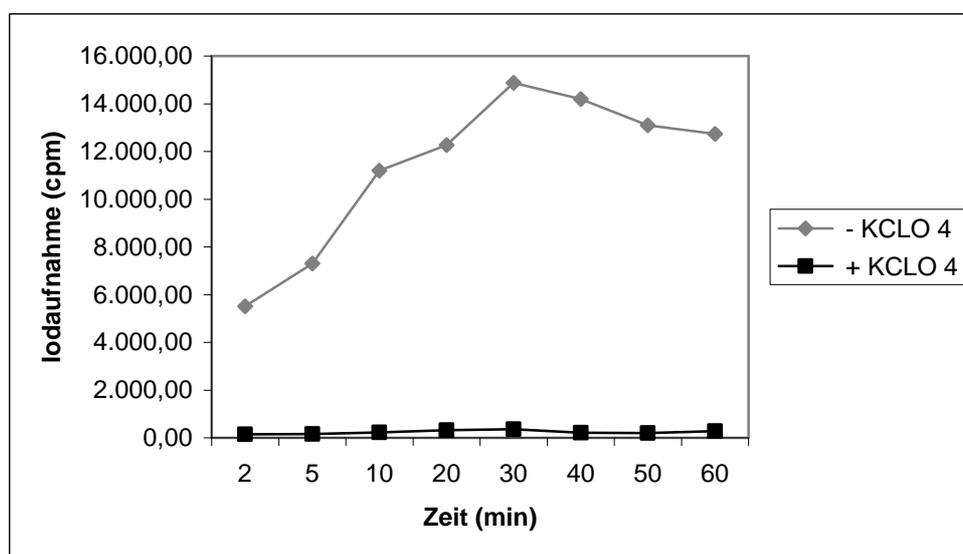


Abb.7: Zeitabhängige Iodakkumulation in stabil mit dem Tyr/NIS-pGL3 transfizierten TN-1 Zellen. Halbmaximale Iodakkumulation nach ca. 5 min, maximale Iodakkumulation nach 30-40 min.

3.2.2 Iod-Organifizierung

Um festzustellen, ob die mit NIS/Tyr-pGL3 transfizierten Zellklone (TN-1) in der Lage waren, das von ihnen aufgenommene Iod zu organifizieren, d.h. das über NIS in den Zellen akkumulierte Iod an zelleigene Proteine zu binden und damit die Iod-Retentionszeit in den Zellen zu erhöhen, wurde die Iod-Organifizierung mit Hilfe der oben beschriebenen TCA (Trichloressigsäure)-Präzipitationsmethode untersucht. Dabei konnte im gewonnen Zellpellet im γ -Counter keine Restaktivität und somit keine Organifizierung des akkumulierten Iods

nachgewiesen werden.

3.2.3 Iod-Efflux

Zwar kam es im *in vitro* Iod-Efflux-Assay in den stabil mit dem Tyr/NIS-pGL3 Vektor transfizierten TN-1 Zellen anfangs zu einem raschen Efflux von etwa 45% des akkumulierten Iods innerhalb der ersten 4 min, nach 10 min waren allerdings noch ca. 40% des Radionuklids in den Zellen verblieben und erst nach 50 min waren mehr als 90% des ursprünglich aufgenommenen Iods eliminiert (siehe **Abb. 8**). Im Gegensatz dazu zeigten mit Perchlorat blockierte TN-1 Zellen erwartungsgemäß keine Iodakkumulation.

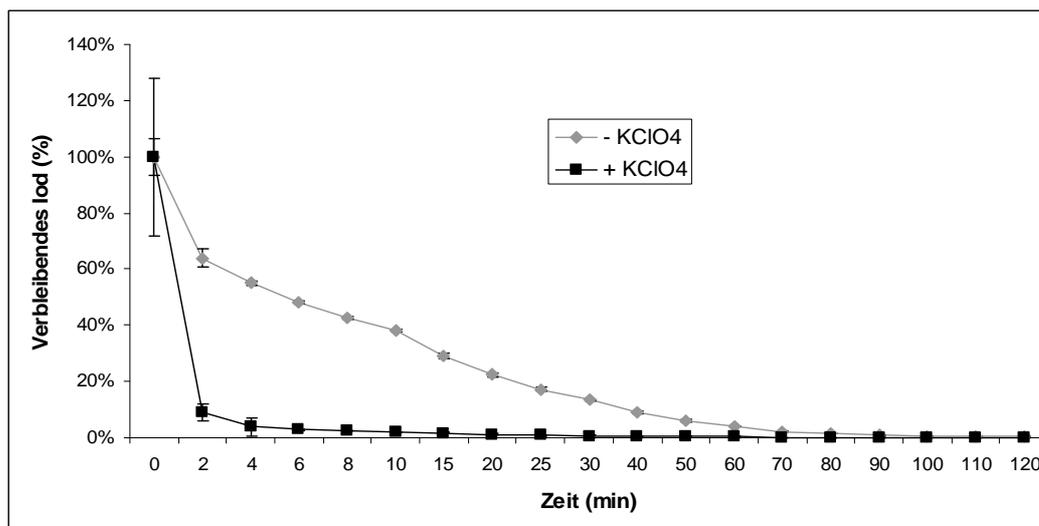


Abb. 8: In stabil mit der hNIS cDNA transfizierten TN-1 Zellen verblieben nach 10 min noch ca. 40% des ursprünglich akkumulierten Iods in den Zellen. Erst nach 50 min waren > 90% des Iods aus den Zellen eliminiert.

3.3 Bestätigung der NIS-Expression in den transfizierten Zellen durch Nachweis von

3.3.1 NIS-mRNA durch Northern-Blot Analyse

Zum Nachweis der NIS-mRNA Expression in der stabil mit Tyr/NIS-pGL3 transfizierten Zelllinie TN-1 wurde eine Northern-Blot Analyse durchgeführt. Hierfür wurde eine mit

radioaktivem ^{32}P gelabelte und für das humane NIS spezifische cDNA Sonde verwendet. In der TN-1 Zelllinie zeigte sich eine einzelne NIS-spezifische Bande von ungefähr 4 kb, wohingegen in der mit den Kontrollvektoren stabil transfizierten T-1 sowie N-1 Zelllinie keine NIS-mRNA Expression nachzuweisen war. Zur Kontrolle diente eine Hybridisierung mit einer β -Actin-Sonde kontrolliert (siehe **Abb. 9**).

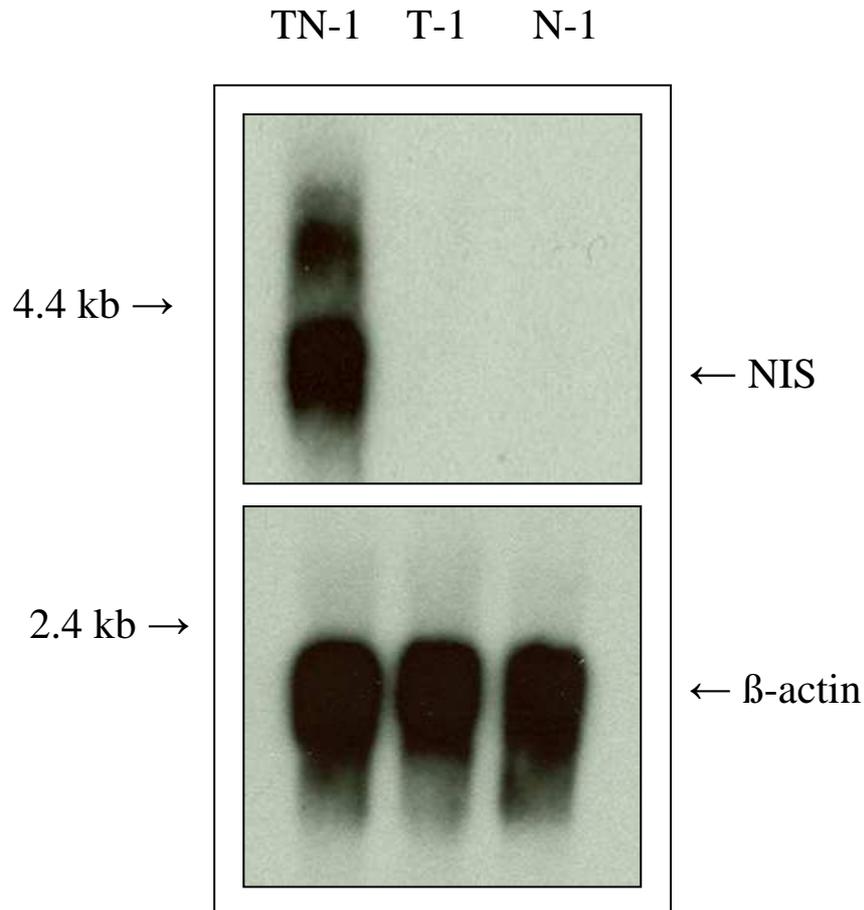


Abb. 9: Northern Blot-Analyse. Nachweis der NIS-mRNA Expression in stabil mit dem Tyr/NIS-pGL3 Vektor transfizierte TN-1 Zellen als NIS-spezifische Bande von 4 kb. In mit den Kontrollvektoren transfizierten T-1 sowie den N-1 Zellen konnte keine NIS-mRNA nachgewiesen werden. Unten: Kontroll-Hybridisierung der Blots mit einer β -Actin Sonde.

3.3.2 NIS-Protein durch Western-Blot Analyse

Unter Verwendung eines monoklonalen, gegen humanes NIS-Protein gerichteten Antikörpers der Maus wurde in einer Western-Blot Analyse die NIS-Proteinexpression in stabil mit Tyr/NIS-pGL3 transfizierten sowie mit den Kontrollvektoren transfizierten Zellen (T-1 und

N-1) untersucht. Dabei ließ sich in den aus den T-1 und N-1 Zellen isolierten Membran-Proteinen kein NIS-Protein nachweisen, während in TN-1 Zellen das NIS-Protein als Haupt-Bande von ca. 80-100 kDa nachgewiesen werden konnte (siehe **Abb. 10**).

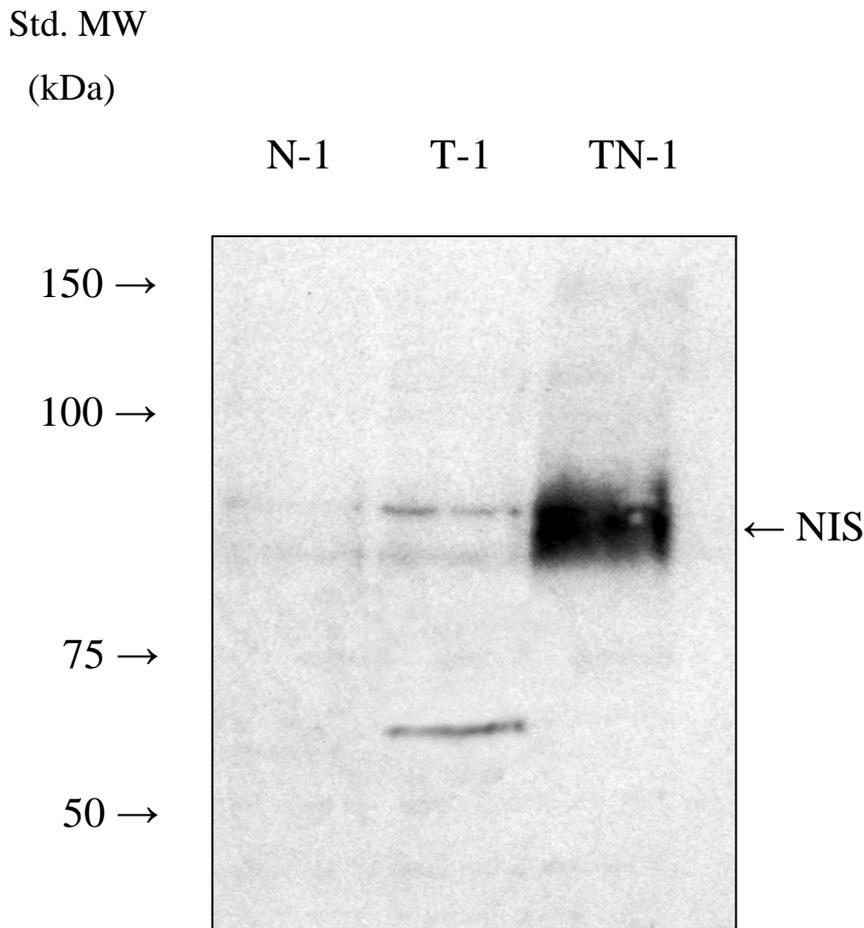


Abb. 10: Western Blot Analyse. Nachweis von NIS-Protein in stabil mit dem Tyr/NIS-pGL3 Vektor transfizierten TN-1 Zellen als Bande von 80-100 kDa. In den mit den Kontrollvektoren transfizierten N-1 und T-1 Zellen kein Nachweis einer NIS-spezifischen Bande.

3.4 Nachweis der Zelltoxizität von ^{131}I od im *in vitro* Clonogenic Assay

Um den selektiven zytotoxischen Effekt des Radionuklids ^{131}I od in der stabil mit Tyr/NIS-pGL3 transfizierten Zelllinie TN-1 und den Kontroll-transfizierten T-1 und N-1 Zellen zu vergleichen, wurde, ein *in vitro* Clonogenic Assay durchgeführt. Während hierbei etwa 75% der TN-1 Zellen durch die Behandlung mit ^{131}I od getötet wurde, starben von der T-1 Zelllinie nur etwa 5% der Zellen (siehe **Abb. 11**) ab, womit ein hoch signifikanter selektiv

zytotoxischer Effekt in 1205 Lu Zellen, die stabil mit NIS unter Steuerung des Tyrosinase-Promoters transfiziert worden waren, gezeigt werden konnte

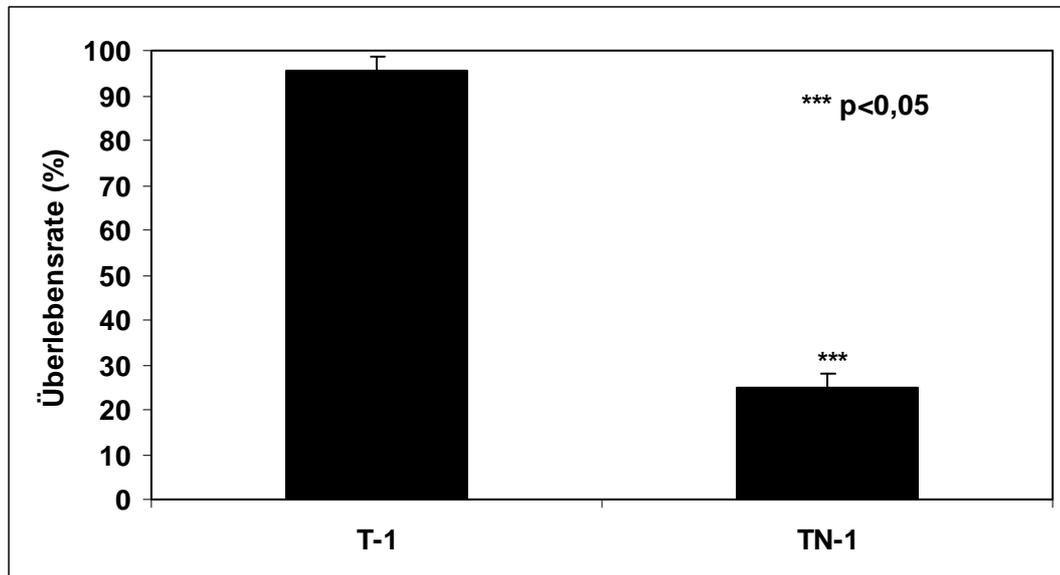


Abb. 11: Nachweis eines selektiven zytotoxischen Effektes von ^{131}I od in stabil mit NIS-transfizierten TN-1 Zellen im Gegensatz zu den mit dem Kontrollvektor transfizierten T-1 Zellen (***P < 0,05). Während nur etwa 5% der T-1 Zellen durch die Behandlung mit ^{131}I od getötet wurden, starben ca. 75% der TN-1 Zellen.

3.5 Radionuklid-Uptake der Melanom-Xenotransplantate *in vivo*

3.5.1 ^{123}I od-Uptake

Um die Radionuklidaufnahme der Tumoren zu untersuchen, wurde 3-5 Wochen nach subkutaner Injektion von transfizierten 1205 Lu Zellen in Nacktmäuse (Tumorgröße von ca. 10 mm Durchmesser), der Radioiod-Uptake mittels einer γ -Kamera nach i.p. Injektion von 18,5 MBq (0,5 mCi) ^{123}I od (n=5) ermittelt. Im Vergleich zu den T-1 Tumoren (linke Flanke), welche keinen Radionuklid-Uptake zeigten, zeigten die TN-1 Tumoren (rechte Flanke) eine signifikante ^{123}I od-Akkumulation (siehe **Abb.12**).

$13,5 \pm 0,04$ % ID/g (percentage injected dose per gram tumor) ^{123}I od wurden mit einer effektiven Halbwertszeit von 7,0 h für ^{131}I od im Tumor konzentriert. Die biologische Halbwertszeit betrug 8,5 h, so dass eine im Tumor absorbierte Dosis von 259,2 mGy pro injiziertem MBq ^{131}I od/ pro g Tumor berechnet wurde.

Neben der tumoralen Akkumulation wurde Radioiod auch physiologisch in der Schilddrüse, im Magen und der Blase akkumuliert, wobei die Schilddrüse max. 7,1 % und der Magen max. 31 % der injizierten Dosis des ^{123}I aufgenommen haben.

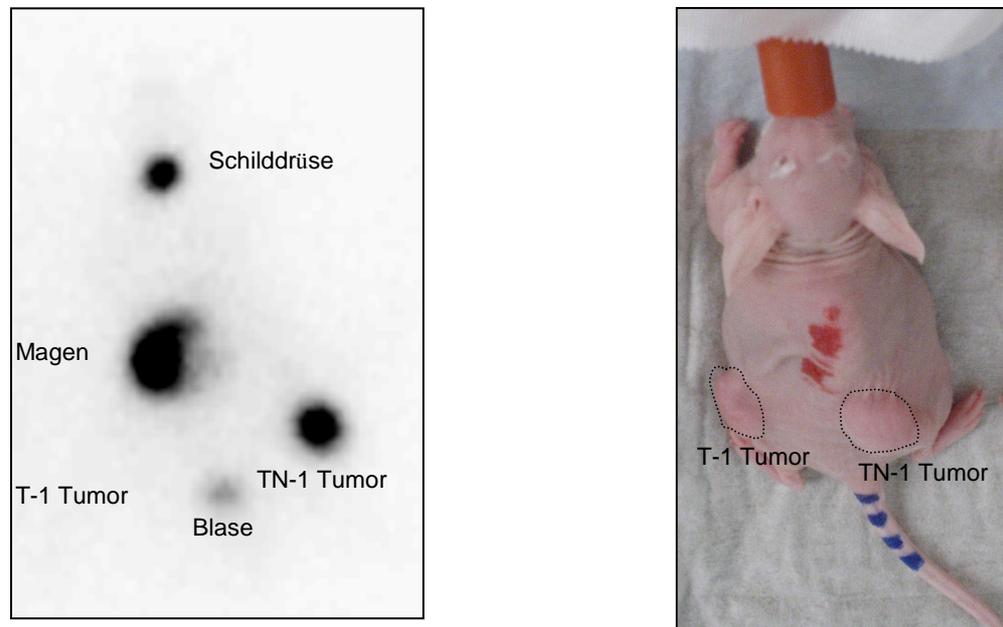


Abb. 12: ^{123}I Imaging einer Maus mit einem TN-1 und T-1 Tumor 4h nach i.p.-Injektion von 18,5 MBq ^{123}I . Während die T-1 Tumoren (linke Flanke) keinen Radioiod-Uptake zeigten, nahmen die TN-1 Tumoren (rechte Flanke) $13,5 \pm 0,04 \%$ ID/g ^{123}I auf, mit einer biologischen Halbwertszeit von 8,5 h für ^{131}I . Eine physiologische Radioiod-Akkumulation zeigte sich in auch in der Blase, im Magen und in der Schilddrüse.

3.5.2 $^{188}\text{Rhenium}$ -Uptake

Um den Rheniumuptake der ca. 10 mm großen 1205 Lu Tumoren zu untersuchen, wurde nach i.p.-Injektion von 111 MBq (3 mCi) $^{188}\text{Rhenium}$ (n=5) die Radionuklidaufnahme mit einer γ -Kamera ermittelt. Die TN-1 Tumoren zeigten eine signifikante $^{188}\text{Rhenium}$ -Akkumulation, wohingegen die NIS-negativen T-1 Tumoren kein $^{188}\text{Rhenium}$ aufnahmen (siehe **Abb. 13**). $6,2 \pm 0,01 \%$ ID/g (percentage injected dose per gram tumor) des $^{188}\text{Rhenium}$ wurden mit einer effektiven Halbwertszeit von 8,4 h im Tumor konzentriert. Die biologische Halbwertszeit betrug 19,5 h, somit eine Tumor absorbierte Dosis von 385,5 mGy pro injizierten MBq $^{188}\text{Rhenium}$ / pro g Tumor berechnet wurde. Die Tumor absorbierte Dosis für $^{188}\text{Rhenium}$ war damit im Vergleich zu ^{131}I 1,4 fach höher.

Neben der tumoralen Akkumulation wurde $^{188}\text{Rhenium}$ auch physiologisch in der

Schilddrüse, im Magen und der Blase akkumuliert, wobei die Schilddrüse max. 7,2 % und der Magen max. 26 % der injizierten Dosis des ^{123}I ods aufgenommen haben.

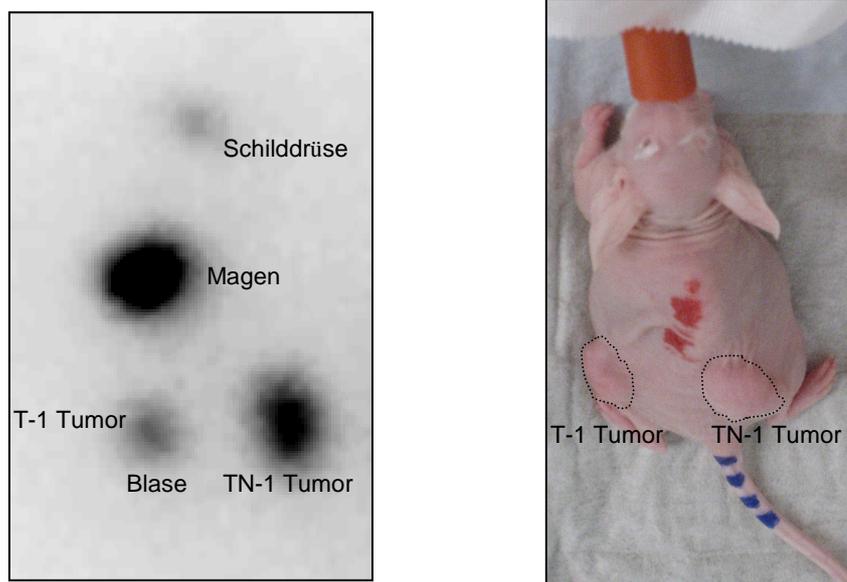


Abb. 13: $^{188}\text{Rhenium}$ Imaging einer Maus mit einem TN-1 und T-1 Tumor 4h nach i.p.-Injektion von 111 MBq $^{188}\text{Rhenium}$. Während die T-1 Tumoren (linke Flanke) keinen $^{188}\text{Rhenium}$ -Uptake zeigten, nahmen die TN-1 Tumoren (rechte Flanke) $6,2 \pm 0,01$ % ID/g ^{188}Re auf, mit einer biologischen Halbwertszeit von 19,5 h. Eine physiologische ^{188}Re -Akkumulation zeigte sich in auch in der Blase, im Magen und in der Schilddrüse.

3.6 Bestätigung der NIS-Expression in den TN-1 Tumoren durch Nachweis von

3.6.1 NIS-Protein durch Western-Blot Analyse

Unter Verwendung eines murinen monoklonalen, gegen humanes NIS-Protein gerichteten Antikörpers wurde in einem Western-Blot die NIS-Expression in TN-1 sowie in Kontrolltumoren T-1 untersucht. Dabei ließ sich in den aus den T-1 Tumoren isolierten Membran-Proteinen kein NIS-Protein nachweisen, während in TN-1 Tumoren das NIS-Protein als Haupt-Bande von ca. 80-100 kDa nachgewiesen werden konnte (siehe **Abb. 14**).

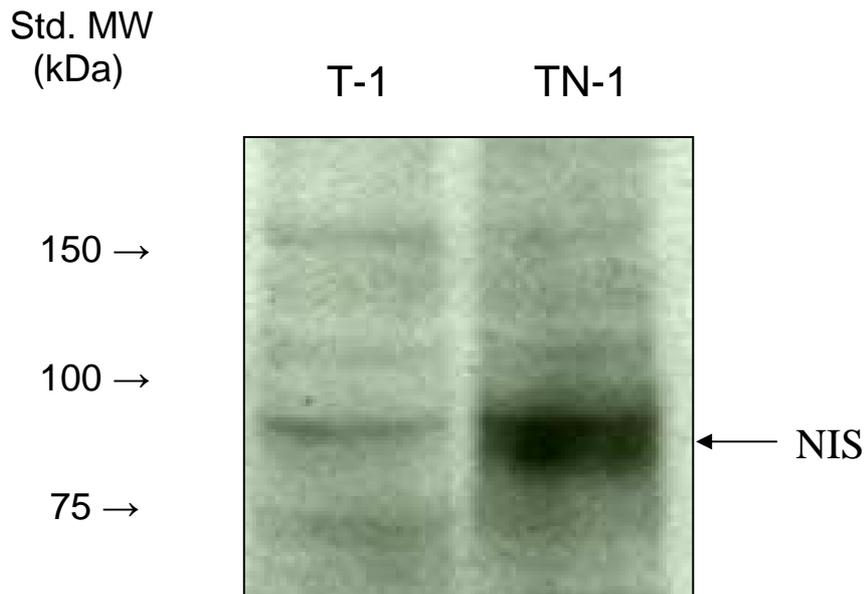


Abb. 14: Western Blot Analyse. Nachweis von NIS-Protein in TN-1 Tumoren (Tyr/NIS-pGL3) als Bande von 80-100 kDa, in den Kontrolltumoren T-1 (Tyr-pGL3) kein Nachweis einer NIS-spezifischen Bande.

3.6.2 NIS-Protein durch Immunhistochemie

Die Immunfärbung der 1205 Lu Tumor-Gefrierschnitte wurde unter Verwendung eines spezifischen, monoklonalen Antikörpers gegen das NIS-Protein ausgeführt. Hierbei zeigte sich in NIS-positiven TN-1 Tumoren eine vorzugsweise Membran-assoziierte, hNIS-spezifische Immunreaktivität. Im Gegensatz dazu war in den NIS-negativen T-1 Kontrolltumoren keine NIS-spezifische Färbung nachweisbar, wie auch in Kontroll-Gefrierschnitten, die an Stelle der 1. bzw. 2. Antikörper mit PBS-Puffer inkubiert worden waren (siehe **Abb.15**).

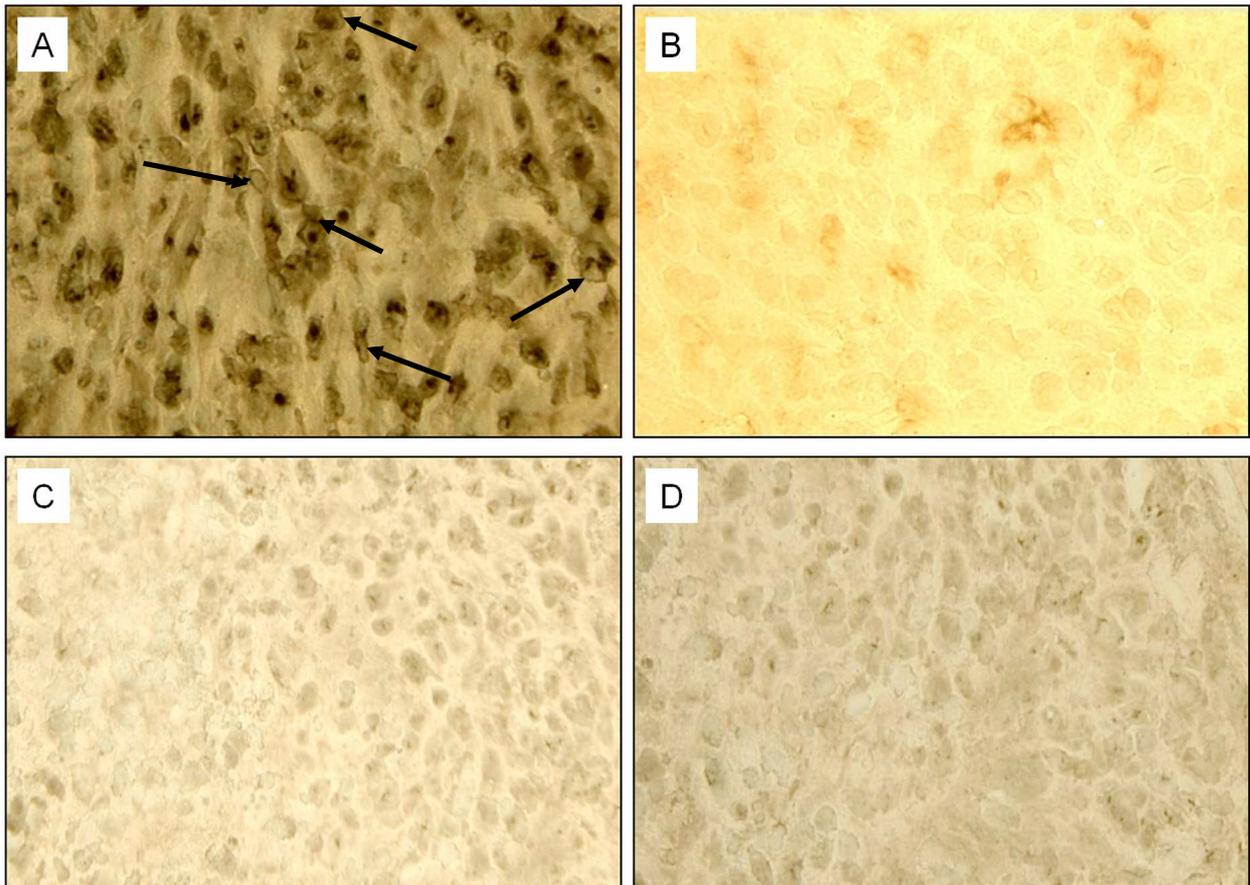


Abb.15: Immunhistochemie. Immunohistochemischer Nachweis von vorzugsweise Membran-assoziiertes NIS-spezifischer Immunreaktivität (siehe →) in NIS-positiven TN-1 Tumoren (A) im Gegensatz zu NIS-negativen Kontrolltumoren (T-1) (C). Kontrollfärbungen von TN-1 (B) bzw. T-1 Tumoren (D) ohne den 1. Antikörper.

3.7 Radionuklidtherapie

3.7.1 Radionuklidtherapie mit ^{131}I

Für die Radioiodtherapie wurden Tumor-Xenotransplantate in Nacktmäusen etabliert und drei Mausgruppen gebildet. Nach 3-5-wöchigem Tumorwachstum (Tumorvolumen $\sim 0,2\text{cm}^3$) wurden zwei Mausgruppen (TN-1, n=8; T-1, n=7) einmalig mit jeweils 55,5 MBq (1,5 mCi) ^{131}I intraperitoneal injiziert, wohingegen die Kontrollgruppe (TN-1, n=7) physiologische Kochsalzlösung erhielt.

In der Gruppe mit T-1 Tumoren, die ^{131}I erhielt, und in der Gruppe mit TN-1 Tumoren die NaCl erhielt, wurde ein kontinuierliches Tumorwachstum beobachtet, wobei die Tumore häufig ulzerierten. Dagegen konnte bei den mit ^{131}I therapierten NIS-positiven TN-1

Tumoren eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums nachgewiesen werden.

Die mit ^{131}I behandelten TN-1 Tumore (Tumorvolumen $110 \pm 69 \text{ mm}^3$) zeigte eine mittlere Tumorvolumenreduktion von 51% ($\pm 22\%$) innerhalb von 5 Wochen nach Therapiebeginn (***) $p < 0,05$), während die Kontrolltumoren ihre Größe innerhalb von 3 Wochen etwa verfünffachten (siehe **Abb.16**).

Zusätzlich ist anzumerken, dass die mit ^{131}I behandelten Tumoren im Vergleich zu den Kontrollgruppen keine Ulzerationen aufwiesen. Nach der Radioiodapplikation wurden keine Nebenwirkungen bei den Mäusen beobachtet.

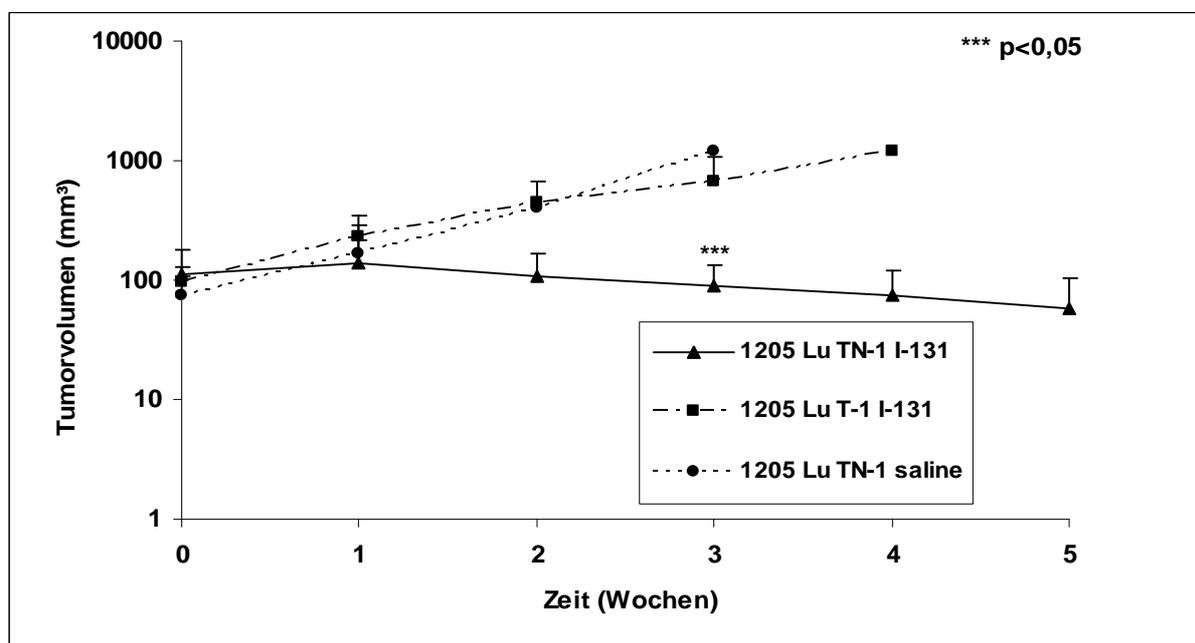


Abb.16: Tumorwachstum von TN-1 (n=8) und T-1 (n=7) Tumoren in Nacktmäusen nach i.p.-Injektion von 55,5 MBq ^{131}I oder physiologischer Kochsalzlösung (n=7).

3.7.2 Radionuklidtherapie mit ^{188}Re Rhenium

Für die Radionuklidtherapie mit ^{188}Re Rhenium wurden zwei Mausgruppen (TN-1, n=8; T-1, n=6) mit einem mittleren Tumorvolumen von $\sim 0,2 \text{ cm}^3$ gebildet, denen jeweils einmalig 55,5 MBq (1,5 mCi) ^{188}Re Rhenium i.p. injiziert wurde. Eine weitere TN-1 Gruppe (n=7) erhielt dagegen nur physiologische Kochsalzlösung i.p..

Bei den mit ^{188}Re Rhenium behandelten NIS-negativen T-1 Tumoren oder den mit

Kochsalzlösung behandelten TN-1 Tumoren wurde wie bei der Therapie mit ^{131}I ein kontinuierliches Tumorwachstum mit häufigen Ulzerationen beobachtet. Dagegen konnte bei den mit $^{188}\text{Rhenium}$ therapierten NIS-positiven TN-1 Tumoren eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums gezeigt werden. Bei den TN-1 Tumoren (Tumorvolumen $146 \pm 63 \text{ mm}^3$), ist das Tumorvolumen innerhalb von vier Wochen nach Therapiebeginn um 62% ($\pm 23\%$) reduziert worden, wobei im Vergleich zu den Kontrollgruppen keine Ulzerationen auftraten. Im Gegensatz hierzu versechzehnfachten die Kontrolltumoren in 4 Wochen ihre Größe (siehe **Abb.17**).

Nach der Rhenium-Applikation wurden keine Nebenwirkungen bei den Mäusen beobachtet.

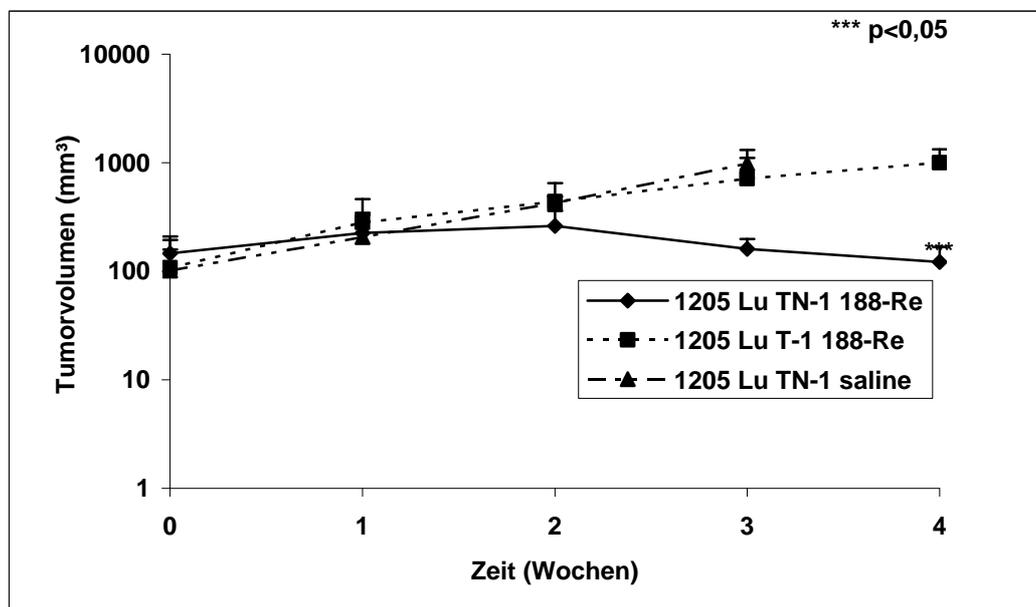


Abb.17: Tumorwachstum von TN-1 (n=8) und T-1 (n=6) Tumoren bei Nacktmäusen nach i.p.-Injektion von 55,5 MBq $^{188}\text{Rhenium}$ oder physiologischer Kochsalzlösung (n=7).

3.8 Überlebensrate nach Radionuklidtherapie mit ^{131}I Iod bzw. $^{188}\text{Rhenium}$

Um die Überlebensrate der Mäuse nach Therapie mit ^{131}I Iod bzw. $^{188}\text{Rhenium}$ zu vergleichen wurde eine Überlebenskurve nach Kaplan-Meier erstellt. Jede einzelne Maus der verschiedenen Gruppen wurde hierzu in die Auswertung einbezogen. Die einzelnen Punkte der Graphen geben den genauen Tag des Absterbens, bzw. des Einschläferns der Tiere an. Als Tag Null gilt der Therapiebeginn. Die mit $^{188}\text{Rhenium}$ therapierte TN-1 Gruppe lebte durchschnittlich 10 Tage länger als die mit Radioiod behandelte TN-1 Gruppe (**p<0,01). In

der mit $^{188}\text{Rhenium}$ therapierten Mausgruppe mit NIS-negativen Tumoren (T-1) konnte ebenfalls eine längere Überlebenszeit von etwa 6 Tagen im Vergleich zu der Radioiod Gruppe beobachtet werden. Auffallend ist, dass die $^{188}\text{Rhenium}$ -Kontroll- sowie Therapiegruppen im Vergleich zu den Radioiod-Gruppen länger lebten, was durch die geringere Schilddrüsen-schädigung durch Rhenium aufgrund der fehlenden Organifizierung erklärbar sein könnte.

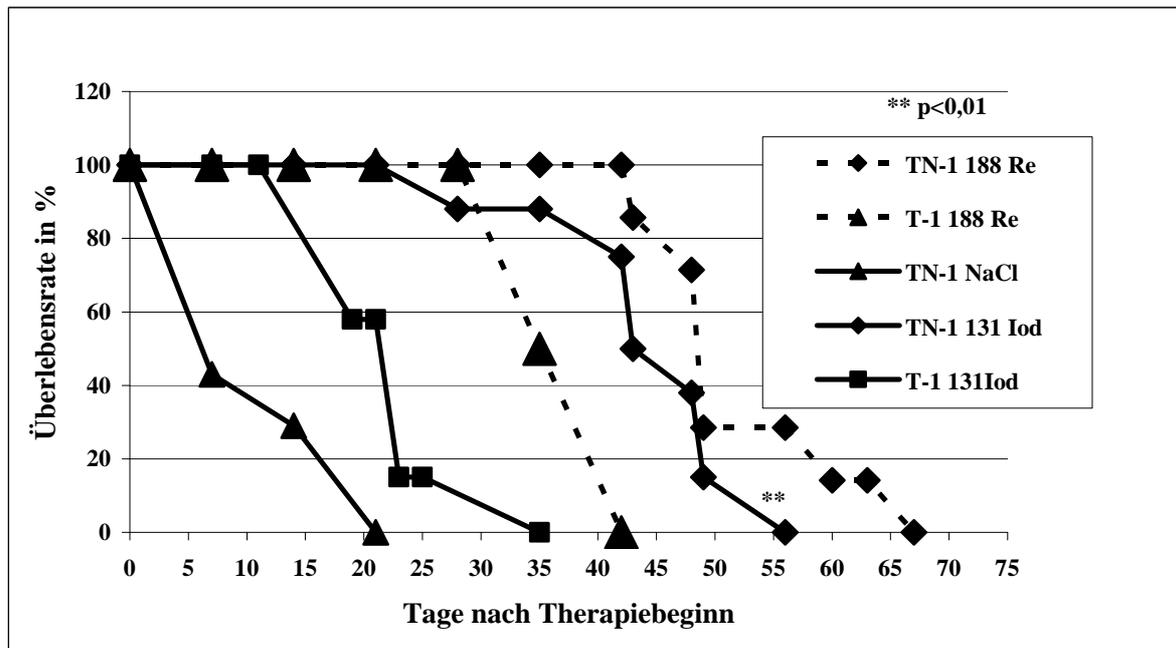


Abb. 18: Kaplan-Meier Überlebenskurven der Mäuse nach Radionuklidtherapie mit ^{131}Iod bzw. $^{188}\text{Rhenium}$ und einer Kontrollgruppe, die keine Therapie erhalten hat. Dargestellt sind die Überlebenskurven von Mäusen mit NIS-positiven TN-1 Tumoren nach Therapie mit ^{131}I bzw. ^{188}Re (n=8), von Mäusen mit T-1 Tumoren nach Therapie mit ^{131}I bzw. $^{188}\text{Rhenium}$ (n=7 bzw. 6) und einer Mausgruppe mit TN-1 Tumoren (n=7), die nur Kochsalzlösung erhalten haben.

4. DISKUSSION

4.1 Der Natrium-Iodid-Symporter als neues therapeutisches Gen

Während in der Schilddrüse die endogene Expression von NIS die Grundlage für die diagnostische und therapeutische Applikation von Radioiod darstellt, eröffnet die Klonierung und Charakterisierung des NIS-Gens vor 13 Jahren die Möglichkeit zum exogenen NIS-Gentransfer und damit zur Entwicklung eines neuen zytoreduktiven gentherapeutischen Ansatzes. Durch selektiven Gentransfer, beispielsweise unter der Steuerung eines gewebespezifischen Promoters, kann in entdifferenzierten thyreoidalen sowie extrathyreoidalen Tumoren die gezielte Expression von funktionell aktivem NIS ermöglicht werden, wodurch die Tumoren die Fähigkeit zur Iod-Akkumulation erwerben und eine Radioiodtherapie durchgeführt werden kann. Die Radioiodtherapie stellt eine sicheres, schon zugelassenes und nebenwirkungsarmes Therapieverfahren dar und wird bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen schon seit mehr als sechzig Jahren mit großem Erfolg angewandt¹⁰⁹. Darüberhinaus erlaubt die Funktion von NIS als Reporter-Gen ein genaues nicht-invasives Monitoring der NIS-Expression mittels ¹²³Iod- und ^{99m}Tc-Szintigrafie oder ¹²⁴Iod-PET-Imaging und unterscheidet sich hierdurch von einer Vielzahl anderer potentieller therapeutischer Gene.

Zusammenfassend eröffnet die Doppelfunktion von NIS als diagnostisches und therapeutisches Gen viel versprechende Perspektiven in der Endokrinologie und molekularen Onkologie für die diagnostische und therapeutische Applikation von NIS auch bei extrathyreoidalen Tumoren.

4.1.1 Der unselektive NIS-Gentransfer

Unter Verwendung verschiedener Gentransfermethoden, wie Elektroporation, Liposomen, adenovirale, retrovirale und andere virale Vektoren konnte in einer Reihe von Untersuchungen nach NIS-Transduktion die Induktion einer Iodakkumulation in verschiedensten Tumorzellen gezeigt werden.

1997 machten Shimura et al. erste Untersuchungen zum exogenen NIS-Transfer. Sie transfizierten die Ratten-Schilddrüsenkarzinomzelllinie FRTL-Tc ohne Iodtransportaktivität mit Ratten-NIS-DNA mittels Elektroporation. Das *in vitro* applizierte ¹²⁵Iod konnte dadurch

60fach konzentriert werden, was auch *in vivo* bestätigt werden konnte ¹⁰⁴.

Mandell et al. transfizierten neben Leber-, Kolon- und Ovarialkarzinomzellen, auch die Melanomzelllinie A375 mit Ratten-NIS unter Verwendung eines gewebeunspezifischen, retroviralen Vektors. In einem *in vitro* clonogenic assay konnte gezeigt werden, dass die NIS-transduzierten Zellen selektiv durch die Akkumulation von ¹³¹Iod zerstört werden. *In vivo* verglichen Mandell et al. die funktionelle NIS-Expression von NIS-positiven und NIS-negativen Melanom-Tumoren im Nacktmaus-Modell mittels γ -Kamera-Imaging nach intraperitonealer Injektion von ¹²³Iod. Dabei zeigten die NIS-positiven Tumoren eine 6,9fach höhere Radioiodakkumulation ⁷².

Über ähnliche Untersuchungen berichteten Boland et al., die mittels Adenovirus-vermitteltem Gentransfer Ratten-NIS in verschiedenen Tumorzelllinien exprimierten und damit sowohl eine Iodakkumulation als auch einen selektiv zytotoxischen Effekt von ¹³¹Iod *in vitro* erzielen konnten. Neben den *in vitro* Untersuchungen führten sie auch einen *in vivo* NIS-Gentransfer in Zervix- und Mammakarzinom-Xenotransplantaten durch, womit eine Iodaufnahme induziert werden konnte, die allerdings nach Applikation einer therapeutischen Aktivität von nur 90 μ Ci ¹³¹Iod zu keinem therapeutischen Effekt von ¹³¹Iod führte ¹³.

In einem orthotopen Leberkarzinom-Rattenmodell zeigten Faivre et al. nach intratumoraler Applikation eines gewebeunspezifischen Adenovirus sowie regionaler Applikation über die Pfortader eine beeindruckende Hemmung des Tumorwachstums bis hin zur kompletten Regression kleinerer Tumorknoten nach Gabe einer therapeutischen ¹³¹I-Aktivität von 16 mCi (592 MBq) ³⁹.

Haberkorn et al. verwendeten einen gewebeunspezifischen retroviralen Vektor für den NIS-Gentransfer in Ratten-Hepatomzellen, wobei *in vivo* im Rattenmodell in NIS-positiven Tumoren eine 6mal höhere Iodakkumulation als in Wildtyp-Tumoren gezeigt werden konnte ⁵⁰.

Insgesamt zeigen die bisherigen oben dargelegten Ergebnisse verschiener Arbeitsgruppen, dass durch NIS-Gentransfer mittels viraler und nicht-viraler Vektoren eine Radioiodakkumulation in verschiedenen extrathyreoidalen Tumoren erreicht werden kann.

4.1.2 Tumorselektiver NIS-Gentransfer

Für die Genthherapie hat sich in den letzten Jahren das transkriptionelle Targeting zur Tumorselektiven Expression therapeutischer Gene unter Verwendung gewebespezifischer

Promotoren etabliert⁵². Die Verwendung gewebespezifischer Promotoren in der Gentherapie ermöglicht es, therapeutische Gene selektiv in tumorerkranktem Gewebe zu exprimieren, und damit die Zytotoxizität in gesundem Gewebe zu minimieren.

Spitzweg et al. gelang es unter Steuerung des Prostata-Spezifischen-Antigen Promoters (PSA-Promoter) in einer Prostataadenokarzinomzelllinie (LNCaP) durch gewebespezifische NIS-Expression eine Iodaufnahmeaktivität zu induzieren, welche nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* einen therapeutischen Effekt von ¹³¹I erlaubte. Dabei kam es in Nacktmäusen nach intraperitonealer Injektion von 111 MBq ¹³¹Iod zu einer Volumenreduktion von > 90 % in den stabil mit NIS-cDNA transfizierten LNCaP-Zell-Xenotransplantaten^{118, 119}.

In der daran anschließenden Studie konnte auch durch *in vivo*-NIS-Gentransfer unter Verwendung eines replikations-defizienten Adenovirus eine Iod-Akkumulation in Prostatakarzinom-Xenotransplantaten erreicht werden, die nach Applikation einer Aktivität von 111 MBq ¹³¹I zu einer durchschnittlichen Tumorreduktion von über 80 % führte¹¹⁰.

Um auch *in vivo* einen gewebespezifischen NIS-Gentransfer beim Prostatakarzinom durchführen zu können, entwickelten Kakinuma *et al.* einen Prostata-spezifischen Adenovirusvektor unter Verwendung eines Prostata-spezifischen Probasin-Promoter Fragments (Ad5-PB-NIS)⁶⁴.

Nach weiteren Toxizitätsstudien in Ratten und Hunden wurde an der Mayo Klinik die erste klinische Phase-1-Studie zur Radioiodtherapie beim Prostatakarzinom nach lokalem adenoviralem NIS-Gentransfer genehmigt. Im Rahmen dieser Studie wurde kürzlich mit der Rekrutierung der ersten Patienten begonnen.

Willhauck et al. untersuchten am Leberkarzinommodell die NIS-Expression unter Steuerung des tumorspezifischen α -Fetoprotein (AFP) Promoters. In humanen und murinen Leberkarzinomzellen konnte *in vitro* eine tumorspezifische Iod-Akkumulation erreicht werden, die für einen zytotoxischen Effekt von ¹³¹I von bis zu 93 % in einem *in vitro* Clonogenic Assay ausreichte. *In vivo* konnte im Xenotransplantat-Mausmodell nach Applikation von 55,5 MBq ¹³¹I eine signifikante Wachstumsinhibition der Leberkarzinom-Xenotransplantate beobachtet werden¹³⁷.

Unter Verwendung des Promoters für MUC1, ein Glykoprotein, das in einer Reihe von Tumoren, wie Mamma-, Pankreas-, Prostata- und Ovarialkarzinomen überexprimiert wird, ist es Dwyer et al. mittels adenoviralem *In-vivo*-Gentransfer gelungen, NIS gezielt in Mammakarzinom-, Ovarialkarzinom-, sowie Pankreaskarzinom-Xenotransplantat-Tumoren im Nacktmausmodell zu exprimieren, wodurch eine Tumolvolumenreduktion von bis zu 83% nach Applikation von 3 mCi (111MBq) ¹³¹I erreicht werden konnte³³⁻³⁵.

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen überzeugend das enorme Potenzial des NIS-Gens als neuem therapeutischem Gen, wodurch aufgrund der Möglichkeit des gewebespezifischen NIS-Gentransfers in extrathyreoidalen Tumoren die Perspektive für die Anwendung einer sicheren und nebenwirkungsarmen Radioiodtherapie auch außerhalb der Schilddrüse eröffnet wird.

4.1.3 Ergebnisse unseres Tumormodells: Selektiver NIS-Gentransfer unter Verwendung des Tyrosinase-Promoters in der Melanomzelllinie 1205 Lu

In der vorliegenden Studie wurde ein selektiver NIS-Gentransfer in der Melanomzelllinie 1205 Lu durchgeführt, wobei eine Melanom-spezifische Expression von NIS durch den Einsatz des Tyrosinase-Promoters erreicht wurde.

Der Tyrosinase-Promoter ist schon in vorangegangenen Untersuchungen verwendet worden, um eine Melanom-spezifische Genexpression auf Transkriptionsebene zu erreichen⁸³. Er kodiert für das Schlüsselenzym der Pigment-Synthese, die Tyrosinase, und wird in Melanomzellen und Melanozyten exprimiert^{25, 56}.

Vile et al. konnten unter Steuerung der 5'-Promoter-Region des murinen Tyrosinase-Gens mittels eines rekombinanten Retrovirus eine spezifische Genexpression der Herpes-simplex-virus-thymidine-kinase (HSVtk) in Melanomzellen erzielen und diese auf mRNA- und Protein-Ebene nachweisen. Die Behandlung mit Ganciclovir *in vitro* führte in >90% der HSVtk exprimierenden Melanomzellen zum Absterben, während nur <10% der Kontrollzellen (Fibroblasten) getötet wurden¹²⁹.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der 270 bp große, murine Tyrosinase-Promoter verwendet, der an drei vorangeschaltete Enhancer-Kopien von je 200 bp gekoppelt ist, wodurch ein Gesamtkonstrukt von 870 bp entsteht. Um funktionelle NIS-Expression in Melanomzellen (1205 Lu) zu induzieren, wurden die Zellen mit einem Plasmid stabil transfiziert, in das NIS an den Tyrosinase-Promoter gekoppelt worden war. Die funktionell aktive NIS-Expression wurde mittels Iod-Uptake-Assay untersucht, wobei eine tumorspezifische Akkumulation von ¹²⁵Iod gezeigt werden konnte, die 35-fach größer war als bei den Kontrollzellen. Die Tumorspezifität der NIS-Expression wurde durch eine fehlende Iodaufnahmeaktivität in Kontrollzelllinien (Mamma- und Prostatakarzinomzellen), nach Tyrosinase-Promoter gesteuertem NIS-Gentransfer, nachgewiesen.

Desweiteren wurde in einem Northern-Blot Assay der Nachweis von NIS-mRNA erbracht

und in einem Western-Blot Assay die NIS-Protein Expression bestätigt.

Neben den *in vitro* Untersuchungen haben unsere *in vivo* Untersuchungen im Mausmodell gezeigt, dass NIS-positive 1205 Lu Xenotransplantate ^{123}I od und ^{188}R henium konzentrieren und die Akkumulation einer therapeutisch wirksamen ^{131}I od- und ^{188}R henium-Aktivität erlauben. Das diagnostische Imaging mit ^{123}I od und ^{188}R henium mittels Gamma-Kamera hat eine signifikante Aufnahme der jeweiligen Radionuklide in die TN-1 Tumore (NIS-positiv) gezeigt, während die NIS-negativen T-1 Tumoren keine Aufnahme zeigten. Die biologische Halbwertszeit für ^{131}I od im Tumor betrug 8,5 h, so dass eine im Tumor absorbierte Dosis von 259,2 mGy pro injizierten MBq / pro g Tumor erwartet werden kann, wobei die im Tumor absorbierte Dosis von ^{188}R henium mit 385,5 mGy/ MBq/ g Tumor (biologische Halbwertszeit von 19,5 h) 1,4 fach höher war, was sich auch in den vergleichenden Therapieergebnissen widerspiegelte.

Die Radionuklidtherapie mit ^{131}I od führte nach einer einmaligen i.p. Injektion von 55,5 MBq (1,5 mCi) in den TN-1 Tumoren zu einer mittleren Tumolvolumenreduktion von 51% innerhalb von 5 Wochen (n=8) nach Therapiebeginn, während bei den Kontrolltumoren ein kontinuierliches Tumorstadium mit häufig auftretenden Ulzerationen beobachtet wurde. Obwohl die ^{188}R henium-Akkumulation im Tumor mit $6,2 \pm 0,01$ % ID/g geringer war als für Radioiod ($13,5 \pm 0,04$ % ID/g), konnte in der Therapiestudie (einmalige i.p. Injektion von 55,5 MBq (1,5 mCi) ^{188}R e) eine höhere Tumorstadiumreduktion von beachtlichen 62% beobachtet werden. Die höhere Tumorstadiumreduktion und das längere Überleben für ^{188}R henium könnte durch die im Vergleich zu ^{131}I od (2,4 mm) größeren therapeutischen Reichweite bis zu 10,4 mm und den dadurch bedingten höheren „Crossfire-Effekt“ von ^{188}R henium erklärbar sein. Zudem lebten die ^{188}R henium-Kontroll- sowie Therapiegruppen im Vergleich zu den Radioiod-Gruppen länger, was durch die geringere Schilddrüsenschädigung durch Rhenium aufgrund der fehlenden Organifizierung erklärbar sein könnte.

Die funktionelle Bildgebung hat des Weiteren gezeigt, dass beide Radionuklide physiologisch in der Schilddrüse, dem Magen und der Blase akkumuliert werden. Der hohe Radionuklid-Uptake des Magens ist einerseits durch die im Vergleich zum Menschen deutlich erhöhte NIS-Expression im murinen Magen erklärbar und andererseits durch die im Rahmen der Narkose auftretende bedingte Stase des Magensaftes. Es gab trotz des hohen Radionuklid-Uptakes keine Hinweise auf gastrale Nebenwirkungen bei den Mäusen, was auch im Einklang mit der seit mehr als 60 Jahren praktizierten Radioiodtherapie beim Menschen steht. Die Schilddrüse hat in unseren Versuchsreihen 7 % der injizierten Dosis der jeweiligen

Radionuklide aufgenommen. Wir wissen aus humanen Studien, dass die Schilddrüse vor diagnostischer oder therapeutischer Radionuklid-Applikation medikamentös supprimiert werden kann und deshalb keine Beeinträchtigung der Schilddrüsenfunktion zu erwarten ist. Wapnir et al. konnten im Rahmen einer klinischen Pilotstudie NIS-positive Mammakarzinom-Metastasen szintigraphisch durch die Applikation von ^{123}I bzw. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnat nachweisen und den thyreoidalen Iod-Uptake durch die prophylaktische Gabe von Trijodthyronin (T3) auf $< 3\%$ senken, was einer Reduktion der thyreoidalen Iod-Akkumulation von 75% entspricht¹³⁰. Sollte trotz Schilddrüsen-Suppression eine Beeinträchtigung der Schilddrüsenfunktion nach Radionuklidtherapie auftreten, kann analog dem Zustand nach Thyreoidektomie I-Thyroxin (I-T4) problemlos lebenslang medikamentös substituiert werden.

Neben den Radionuklid-Uptake-Studien und den Therapiestudien ließ sich bei den TN-1 Tumoren - im Gegensatz zu den negativen T-1 - mittels Western-Blot Analyse unter Verwendung eines monoklonalen hNIS-spezifischen Antikörpers eine NIS-Protein-Expression nachweisen bzw. konnte der immunocytochemische Nachweis von NIS-spezifischer Immunreaktivität erbracht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen somit, dass NIS-Gentransfer in Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* die Akkumulation einer therapeutisch wirksamen ^{131}I od sowie auch ^{188}Re henium-Aktivität erlaubt, und damit die Radionuklidtherapie als sicheren und potentiell kurativen Therapieansatz auch beim Malignen Melanom ermöglichen könnte.

4.2 Möglichkeiten, die Effizienz der NIS- Genterapie zu erhöhen

4.2.1 Organifizierung

Die Organifizierung ist ein wichtiger, durch die Schilddrüsenperoxidase (TPO) katalysierter Schritt bei der Schilddrüsenhormonsynthese: Das Iodid wird über NIS in die Schilddrüsenzellen aufgenommen, oxidiert und an Tyrosylreste des im Kolloid lokalisierten Thyreoglobulin gebunden. Danach entstehen über Kopplung von Jodtyrosinresten die Schilddrüsenhormone. Insgesamt führt die Organifizierung zu einer Verlängerung der intrazellulären Verweildauer des aufgenommenen Iods, worauf sich die Annahme begründet, dass die Organifizierung wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Radioiodtherapie darstellt.

Untersuchungen von Fitzgerald et al. und Valenta sprechen gegen diese Hypothese, da sie bei Schilddrüsenkarzinomen und ihren Metastasen eine zerstörte Follikelzellstruktur und -

funktion sowie eine reduzierte Thyreoglobulinexpression nachwiesen^{40, 128}, wodurch die Fähigkeit zur Iod-Organifizierung und die daraus resultierende Hormonsynthese deutlich beeinträchtigt sind.

Die Untersuchungen von Spitzweg et al. in nicht-organifizierenden Prostatakarzinomzellen zeigen außerdem eindrucklich, dass eine Organifizierung des aufgenommenen ¹³¹Iod für einen therapeutischen Effekt bei genügend hoher Radioiodaufnahmekapazität nicht erforderlich ist. Trotz fehlender Organifizierung konnte durch die genügend hohe Radioiodaufnahmekapazität der Prostatakarzinomzellen eine signifikante Tumolvolumenreduktion *in vivo* erreicht werden¹¹⁸.

Im Gegensatz zur *In-vitro*-Situation wird die Radioiodverweildauer *in vivo* im dreidimensionalen Tumor bestimmt durch ein dynamisches Äquilibrium zwischen Iodaufnahme, dem Iodefflux und der Iod-Rezirkulation zwischen Blutbahn und Tumor sowie zwischen den Tumorzellen, die gleichzeitig Iod abgeben und wiederaufnehmen können³⁰. Dies erklärt die im Vergleich zu *in vitro* deutlich verlängerte Radioiod-Verweildauer *in vivo*.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte in der NIS-transfizierten Melanomzelllinie 1205 Lu keine Iod-Organifizierung nachgewiesen und im *in vitro* Iod-Efflux-Assay ein relativ rascher Efflux von etwa 45% des akkumulierten Iods innerhalb der ersten 4 min beobachtet werden. Trotzdem konnte ein eindrucklicher, therapeutischer Effekt von ¹³¹Iod im *in vitro* Clonogenic Assay erzielt werden. Während etwa 75% der NIS-positiven Zellen durch die Behandlung mit ¹³¹Iod getötet wurde, starben von den NIS-negativen Kontrollzellen nur etwa 5% ab.

Die Radionuklid-Uptake Versuche der Melanom-Xenotransplantate *in vivo* zeigten eine effektive Halbertszeit von 7 h für ¹³¹Iod und von 8,4 h für ¹⁸⁸Re im Tumor und somit eine im Vergleich zu *in vitro* eine deutlich verlängerte Radioiod-Verweildauer *in vivo*.

Entsprechend dem Prostatakarzinom-Modell unserer Arbeitsgruppe, konnte trotz fehlender Organifizierung der Melanomzellen auch in den *in vivo* Studien durch den genügend hohen Radionukliduptake der NIS-positiven 1205 Lu Tumore eine signifikante Tumolvolumenreduktion durch ¹³¹I bzw. ¹⁸⁸Re erreicht werden.

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten des Weiteren, welchen Einfluss eine Ko-Transduktion des NIS-Gens mit dem TPO-Gen in nicht-thyreoidalen Tumoren auf die Radioiodverweildauer und den therapeutischen Effekt hat.

Boland et al. konnten durch die Ko-Infektion von Zervixkarzinomzellen mit einem NIS- und einem TPO-kodierenden Adenovirus zwar eine erhöhte TPO-Aktivität und eine Iod-Organifizierung induzieren, aber trotzdem keine längere intrazelluläre Iodverweildauer in den

Tumoren nachweisen. Zu vermuten ist, dass die Stärke der Iod-Organifizierung noch zu gering war ¹².

Im Gegensatz dazu wurde nach Ko-Transduktion mit dem NIS- und TPO-Gen in einer nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie der Iodefflux deutlich vermindert, was zu einer längeren intrazellulären Radioiodverweildauer führte ⁵⁸. Nach Applikation von kaltem Kalium-Iodid *in vivo* kam es interessanterweise durch Apoptose-Induktion zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums im Mausmodell ¹⁴¹.

Weitere Untersuchungen sind daher nötig, um letztlich zu klären, ob die Kotransfektion des TPO-Gens mit dem NIS-Gen therapeutisch sinnvoll ist, und die Effektivität der Radioiodtherapie nach NIS-Gentransfer positiv beeinflussen kann.

4.2.2 Efflux

Eine andere Möglichkeit, um die Effizienz der NIS-Gentherapie in nicht-organifizierenden Tumorzellen zu erhöhen ist die Hemmung des Iod-Effluxes. Der Iod-Efflux gibt die Geschwindigkeit an, mit der die Zellen das zunächst akkumulierte Iod wieder verlieren.

Lithium ist eine Substanz, welche den Iod-Efflux aus Schilddrüsenzellen hemmt und damit zu einer längeren Radioiodverweildauer in den Zellen führt. So konnten Bogazzi et al. in einer klinischen Studie beobachten, dass der therapeutische Effekt der Radioiodtherapie bei Patienten mit Hyperthyreose durch die zusätzliche Gabe von Lithium verstärkt wurde ^{11, 81}. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Lithium den Iod-Uptake in Schilddrüsenkarzinom-Metastasen während einer Radioiodtherapie signifikant steigert und die biologische Halbwertszeit von ¹³¹Iod verlängert ⁸⁷. Zusammenfassend könnte Lithium eine interessante Substanz sein, um den Effekt der Radioiodtherapie von nicht-thyreoidalen Tumoren nach NIS-Gentransfer zu verstärken. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um den genauen molekularen Mechanismus zu verstehen und den Effekt von Lithium auf den Iod-Efflux in nicht-thyreoidalen Tumoren zu untersuchen.

In einer anderen Studie konnten Elisei *et al.* in anaplastischen (FRO) Schilddrüsenkarzinomzellen zeigen, dass die Behandlung mit Substanzen wie 17-AAG (17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin) und DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic-acid) den Iod-Efflux signifikant hemmen und daher möglicherweise auch den Therapieeffekt nach NIS-Gentransfer optimieren kann ³⁷.

4.2.3 Alternative Radionuklide

Bei Tumoren mit geringer NIS-Expression bzw. raschem Iod-Efflux nach NIS-Gentransfer kann durch die Applikation alternativer Radionuklide an Stelle von ^{131}I eine Steigerung der therapeutischen Effizienz erreicht werden.

Das ebenfalls über NIS transportierte, und in unserer Studie verwendete, sehr potente ^{188}Re ist gekennzeichnet durch eine im Vergleich zu ^{131}I (Halbwertszeit 8 d, $E = 0,134\text{ MeV}$ und eine therapeutische Reichweite von bis zu 2,4 mm) deutlich kürzere Halbwertszeit von 16,7 h, einer höheren Beta-Energie von 0,764 MeV und einer somit größeren maximalen therapeutischen Reichweite von bis zu 10,4 mm. Mit ^{188}Re kann aufgrund dieser Eigenschaften eine im Vergleich zu ^{131}I deutlich höhere Bestrahlungsdosis erreicht werden.

In unserem 1205 Lu Zell-Xenotransplantat-Modell konnte gezeigt werden, dass Tyrosinase-Promoter-gesteuerter NIS-Gentransfer auch die Akkumulation von ^{188}Re in 1205 Lu-Xenotransplantaten (TN-1) erlaubt. Obwohl die Tumoren nach Applikation von ^{188}Re nur $6,2 \pm 0,01\% \text{ ID/g}$ akkumulierten - im Vergleich zu $13,5 \pm 0,04\% \text{ ID/g}$ für ^{123}I - konnte eine 1,4 fache höhere Tumor absorbierte Dosis gemessen werden. Die einmalige i.p. Applikation von 55,5 MBq (1,5 mCi) ^{188}Re bei $\sim 0,2\text{ cm}^3$ großen NIS-positiven 1205 Lu Tumoren im Nacktmausmodell führte zu einer Tumolvolumenreduktion (MW Tumolvolumen $146 \pm 63\text{ mm}^3$) von eindrucklichen 62% ($\pm 23\%$). Die mit ^{131}I behandelten TN-1 Tumore (MW Tumolvolumen $110 \pm 69\text{ mm}^3$) zeigte dagegen eine mittlere Tumolvolumenreduktion von 51% ($\pm 22\%$).

Ein weiterer Vorteil des ^{188}Re für die *in vivo* NIS-Gentherapie könnte der Effekt auf die Schilddrüse sein. Dadachova et al. demonstrierten in ihrer Studie einen protektiven Effekt des ^{188}Re auf die Schilddrüse, da das ^{188}Re im Vergleich zum Radioiod nicht in der Schilddrüse organifiziert wird, der Bestrahlungschaden so niedriger ist und dazu der tumorale ^{188}Re Uptake durch die Elimination des „Thyroid sink Effekts“ höher ist ²⁷. In unserer Studie war der Schilddrüsen-Uptake von Radioiod bzw. Rhenium mit max. 7% der injizierten Dosis vergleichbar hoch. Die mit ^{188}Re therapierten Mäuse lebten im Vergleich zu Radioiod-therapierten Mäusen durchschnittlich 10 Tage länger, möglicherweise durch die fehlende Organifizierung von ^{188}Re in der Schilddrüse und damit geringerer Schilddrüsen-Schädigung. Um diese Theorie zu belegen, sind jedoch weiterführende Untersuchungen nötig.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass *in vivo* - trotz einer im Vergleich zum ^{131}I geringeren ID/g

im Tumor - eine Steigerung der Bestrahlungsdosis und des therapeutischen Effektes mit ^{188}Re erreicht werden kann.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch Willhauck et al. in ihren Untersuchungen zeigen. Nach tumor-spezifischen NIS-Genstransfer in Prostatakarzinom-Xenotransplantaten konnte eine ^{188}Re - Akkumulation von 8-16 % ID/g im Tumor erreicht werden (^{123}Iod : 25-30 % ID/g), welche zu einer im Tumor absorbierten Dosis von 450 mGy/MBq führte und im Vergleich zu ^{131}Iod 4,7fach höher war. Bei größeren Tumoren konnte nach Applikation von 55,5 MBq ^{188}Re eine eindruckliche Tumolvolumenreduktion von 85% beobachtet werden, welche deutlich höher war als beim ^{131}Iod (mittlere Tumolvolumenreduktion von 73%) ¹³⁶.

Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Kang et al. in einem Leberkarzinom Modell, in welchem die Biodistribution von ^{125}Iod und ^{188}Re in NIS-positiven Tumoren verglichen wurde. Die Tumoren akkumulierten $17,6 \pm 2,9$ % ID/g ^{125}Iod bzw. $12,6 \pm 3,6$ % ID/g ^{188}Re ⁶⁵.

Dadachova et al. konnten in NIS-exprimierenden Mammakarzinomzell-Xenotransplantaten im Mausmodell nach Applikation von ^{188}Re eine 4,5 fache höhere absorbierte Dosis als bei ^{131}Iod -Gabe feststellen. Für beide Radionuklide konnte eine Verlangsamung des Tumorstwachstums beobachtet werden, wohingegen die Applikation von ^{188}Re einen signifikant höheren therapeutischen Effekt erzielte ^{27, 65}.

Die eigenen Ergebnisse zeigen, dass ^{188}Re die therapeutische Effizienz in NIS-exprimierenden Tumoren erhöhen kann, insbesondere bei Tumoren mit niedriger biologischer Halbwertszeit des akkumulierten Radioiods, mit niedriger NIS-Expression oder mit raschem Iod-Efflux.

Ein weiteres Radionuklid, welches die therapeutische Effizienz in NIS-exprimierenden Tumoren verstärken kann, ist der α -Strahler ^{211}At Astatin. ^{211}At hat im Gegensatz zu ^{188}Re eine noch kürzere Halbwertszeit von nur 7,2 h, eine Energie von 6,8 MeV und wird ebenfalls über NIS transportiert ^{17, 85}. Carlin et al. konnten *in vitro* an Gliomzellen nach NIS-Transduktion einen im Gegensatz zu ^{131}Iod gesteigerten zytotoxischen Effekt nach Applikation von ^{211}At zeigen ¹⁶. Auch *in vivo* wurden diese viel versprechenden Ergebnisse bestätigt. Petrich et al. konnten in NIS-transfizierten Schilddrüsenkarzinomzellen eine um das 14fache gesteigerte Tumor-absorbierte Dosis nach Applikation von ^{211}At im Vergleich zu ^{131}Iod messen. Dies bewirkte im Xenotransplantat-Modell der Nacktmaus eine komplette Eradikation aller Tumoren und eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit ^{85, 86}. Willhauck et al. erreichten mit einer einmaligen Injektion von 1 MBq ^{211}At in stabil mit NIS-DNA transfizierten Prostatakarzinomzell-Xenotransplantaten in Nacktmäusen eine Tumolvolumenreduktion von eindrucklichen $82 \pm 19\%$ ¹³⁵.

Die beeindruckenden Ergebnisse zeigen, dass ^{188}Re und ^{211}At eine potente Alternative zu

¹³¹Iod darstellen, um nach NIS-Genstransfer auch in Tumoren mit geringer NIS-Expression oder raschem Iodefflux eine für einen therapeutischen Effekt genügend hohe Bestrahlungsdosis zu erreichen.

In dieser Arbeit konnte nach tumorspezifischem NIS-Genstransfer in 1205 Lu Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* eine Radioiod- bzw. ¹⁸⁸Rhenium-Akkumulation und ein eindrücklicher therapeutischer Effekt mit beiden Radionukliden erreicht werden, wobei die therapeutische Effizienz für Rhenium höher war als für Iod.

4.2.4 Pharmakologische Modulation der funktionellen NIS-Expression

Eine weitere Option zur Steigerung der Iod-Akkumulation im Anschluss an einen erfolgreichen, tumorspezifischen NIS-Genstransfer stellt die Stimulation der Promoter-gesteuerten NIS-Expression dar.

Spitzweg et al. konnten in einer Prostatakarzinom-Zelllinie nach PSA-Promoter-gesteuertem NIS-Genstransfer zeigen, dass eine Behandlung mit *all-trans* Retinsäure (atRA) die NIS-Expression und zytotoxische Wirkung von ¹³¹Iod signifikant erhöht. Die Stimulation der Prostatakarzinomzellen mit atRA führte zu einem 2-3fachen Anstieg der NIS-mRNA- und – Protein-Expression, was zu einer 1,45fach erhöhten Iod-Akkumulation führte. Im *in vitro* Clonogenic Assay konnte dadurch die selektiv zytotoxische Wirkung von ¹³¹Iod von 50 % auf 90 % gesteigert werden. Ein ähnlicher Effekt wurde für das Glukokortikoid Dexamethason (Dex) nachgewiesen, das zusätzlich einen eigenen antiproliferativen Effekt in Prostatakarzinomzellen aufwies¹⁰².

Eine Möglichkeit, den Iod-Uptake in den unter Steuerung des Tyrosinase-Promoters mit NIS transfizierten Melanomzellen zu stimulieren, wären das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), das Melanozyten-stimulierende Hormon (α -MSH) und das Opioid Peptid β -Endorphin. *In vitro* Untersuchungen haben gezeigt, dass die Inkubation von Melanomzellen mit ACTH, α -MSH oder β -Endorphin zu einer erhöhten Expression der Tyrosinase führt, welche das Schlüsselenzym bei der Melaninsynthese ist und die Umwandlung der Aminosäure L-Tyrosine zu L-3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) und die Oxygenierung zu L-dopaquinone katalysiert^{100, 1, 59, 66, 75, 105}.

Sphingosylphosphorylcholine (SPC) sind eine weitere Substanz, die *in vitro* die Expression der Tyrosinase, des microphthalmia-associated transcription factors-M (MITF), Schlüsselfaktor für die Melanogenese, und des stem cell factor receptors, c-kit, erhöhen⁵⁵.

Sarkar et al. konnten in *in vitro* Untersuchungen in der Melanomzelllinie B16F10 eine signifikante Steigerung der Tyrosinase- und Tyrosinase-Promoter Aktivität durch die Applikation von „placental protein/peptide fraction“ (PPPF) induzieren, welche auf Transkriptions- und Protein Ebene mittels RT-PCR und Western Blot nachgewiesen wurde¹⁰⁰.

Da in unserer Studie NIS unter Steuerung des Tyrosinase-Promoters wird, könnte daher durch diese Substanzen über eine Stimulation der Promoteraktivität eine gesteigerte Transkription von NIS erreicht werden, was in weiteren Studien untersucht werden soll.

5. Zusammenfassung

Die Inzidenz des Malignen Melanoms steigt weltweit stärker an als die Inzidenz jeder anderen Krebs-Erkrankung und kann nur in frühen Stadien geheilt werden. Die Prognose der weiter fortgeschrittenen oder metastasierenden Stadien bleibt weiterhin infaust.

In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Studie die Möglichkeit einer Radionuklidtherapie des Malignen Melanoms mit ¹³¹Iod oder ¹⁸⁸Rhenium im Anschluss an einen gewebespezifischen NIS-Gentransfer unter Steuerung des Tyrosinase-Promoters untersucht.

Die Melanomzellen 1205 Lu wurden stabil mit einem Expressionsvektor transfiziert, in welchem die cDNA des Natrium/Iodid-Symporter (NIS) an die des Tyrosinase-Promoters gekoppelt worden war. Der Tyrosinase-Promoter kodiert für das Schlüsselenzym der Pigment-Synthese, die Tyrosinase, und wird spezifisch in Melanomzellen und Melanozyten exprimiert.

Die stabil transfizierten 1205 Lu Zellen konzentrierten ¹²⁵Iod *in vitro* 35-fach, wohingegen die transfizierten Kontrollzelllinien MCF-7 (Mammakarzinom) und LNCaP (Prostataadenokarzinomzellen) keine Iodakkumulation zeigten. Die NIS-Expression konnte in den 1205 Lu Zellen auf RNA- und Proteinebene mittels Northern- und Western Blot, sowie immunhistochemisch nachgewiesen werden. Darüberhinaus war die Tyrosinase-Promoter gesteuerte NIS-Expression hoch genug für einen signifikanten zytotoxischen Effekt von ¹³¹Iod im *in vitro* Clonogenic Assay.

Um auch die Radionuklidaufnahme (¹²³Iod bzw. ¹⁸⁸Rhenium) von NIS-positiven 1205 Lu Tumoren im Mausmodell zu ermitteln, wurde ein diagnostisches Imaging mittels γ -Kamera durchgeführt. $13,5 \pm 0,04$ % ID/g für ¹²³Iod bzw. $6,2 \pm 0,01$ % ID/g für ¹⁸⁸Rhenium wurden

von den NIS-positiven Tumoren akkumuliert und erlaubten nach dosimetrischen Berechnungen die Durchführung einer Radionuklidtherapie mit ^{131}I od bzw. ^{188}R henium. Obwohl der Rhenium-Uptake im Tumor geringer als der Iod-Uptake war, betrug die errechnete Tumor absorbierte Dosis für ^{188}R henium 385,5 mGy/ MBq/ g Tumor und war somit 1,4fach höher als für ^{131}I od (259,2 mGy/ MBq/ g Tumor), was sich auch in den Therapieergebnissen widerspiegelte. Die therapeutische Applikation von 55,5 MBq ^{131}I od führte zu einer mittleren Tumolvolumenreduktion von 51% innerhalb von 5 Wochen, während bei den Kontrolltumoren ein fortschreitendes Tumorwachstum beobachtet wurde. Die Radionuklidtherapie mit ^{188}R henium (55,5 MBq) führte bei den TN-1 Tumoren innerhalb von vier Wochen zu einer eindrucklichen Tumolvolumenreduktion von 62%. Die NIS-Expression der 1205 Lu Xenotransplantate konnte auf Protein-Ebene mittels Western-Blot Analyse und immunhistochemisch nachgewiesen werden. Insgesamt lebten die ^{188}R henium-Kontroll- sowie Therapiegruppen im Vergleich zu den Radioiod-Gruppen länger, was in einer Kaplan-Meier Überlebenskurve ermittelt werden konnte.

Zusammenfassend konnte unter Steuerung des Tyrosinase-Promoters in humanen Melanomzellen durch gewebespezifische NIS-Expression eine Iodaufnahmeaktivität induziert werden, die sowohl *in vitro* und *in vivo* hoch genug war, um einen therapeutischen Effekt von ^{131}I od und ^{188}R henium zu erreichen. Damit eröffnet diese Studie in Anlehnung an die seit über 60 Jahren mit grossem Erfolg eingesetzte Radioiodtherapie beim Schilddrüsenkarzinom vielversprechende Perspektiven hinsichtlich einer gezielten, NIS-vermittelten Radionuklidtherapie beim Malignen Melanom.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdel-Malek Z, Swope VB, Suzuki I et al. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(5):1789-1793.
2. American Cancer Society, Atlanta. *Cancer facts&figures*. 2003.
Ref Type: Data File
3. Armstrong BK, Kricger A. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv* 1994; 19-20:219-240.
4. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000; 6(4):435-442.
5. Avril MF, Aamdal S, Grob JJ et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol* 2004; 22(6):1118-1125.
6. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19(16):3635-3648.
7. Balch CM, Soong SJ, Murad TM, Smith JW, Maddox WA, Durant JR. A multifactorial analysis of melanoma. IV. Prognostic factors in 200 melanoma patients with distant metastases (stage III). *J Clin Oncol* 1983; 1(2):126-134.
8. Bentham G, Aase A. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1989: associations with solar ultraviolet radiation, income and holidays abroad. *Int J Epidemiol* 1996; 25(6):1132-1138.
9. Binder M, Steiner A, Schwarz M, Knollmayer S, Wolff K, Pehamberger H. Application of an artificial neural network in epiluminescence microscopy pattern analysis of pigmented skin lesions: a pilot study. *Br J Dermatol* 1994; 130(4):460-465.
10. Bishop J. Molecular pathology of melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 1997; 16:141-154.
11. Bogazzi F, Bartalena L, Brogioni S et al. Comparison of radioiodine with radioiodine plus lithium in the treatment of Graves' hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(2):499-503.
12. Boland A, Magnon C, Filetti S et al. Transposition of the thyroid iodide uptake and organification system in nonthyroid tumor cells by adenoviral vector-mediated gene transfers. *Thyroid* 2002; 12(1):19-26.
13. Boland A, Ricard M, Opolon P et al. Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy. *Cancer Res* 2000; 60(13):3484-3492.

14. Breslow A. Prognostic factors in the treatment of cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol* 1979; 6(3):208-212.
15. Caillou B, Troalen F, Baudin E et al. Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(11):4102-4106.
16. Carlin S, Akabani G, Zalutsky MR. In vitro cytotoxicity of (211)at-astatide and (131)I-iodide to glioma tumor cells expressing the sodium/iodide symporter. *J Nucl Med* 2003; 44(11):1827-1838.
17. Carlin S, Mairs RJ, Welsh P, Zalutsky MR. Sodium-iodide symporter (NIS)-mediated accumulation of [(211)At]astatide in NIS-transfected human cancer cells. *Nucl Med Biol* 2002; 29(7):729-739.
18. Castro MR, Bergert ER, Beito TG, McIver B, Goellner JR, Morris JC. Development of monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: immunohistochemical characterization of this protein in thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(8):2957-2962.
19. Castro MR, Bergert ER, Beito TG et al. Monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: utility for immunocytochemistry of thyroid cancer. *J Endocrinol* 1999; 163(3):495-504.
20. Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, Hay ID, Morris JC. Immunohistochemical analysis of sodium iodide symporter expression in metastatic differentiated thyroid cancer: correlation with radioiodine uptake. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(11):5627-5632.
21. Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML et al. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1999; 17(9):2745-2751.
22. Cifone MA, Fidler IJ. Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(11):6949-6952.
23. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984; 15(12):1147-1165.
24. Coory M, Baade P, Aitken J, Smithers M, McLeod GR, Ring I. Trends for in situ and invasive melanoma in Queensland, Australia, 1982-2002. *Cancer Causes Control* 2006; 17(1):21-27.
25. Cormier JN, Abati A, Fetsch P et al. Comparative analysis of the in vivo expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J Immunother (1997)* 1998; 21(1):27-31.
26. Crombie IK. Racial differences in melanoma incidence. *Br J Cancer* 1979; 40(2):185-193.

27. Dadachova E, Nguyen A, Lin EY, Gnatovskiy L, Lu P, Pollard JW. Treatment with rhenium-188-perrhenate and iodine-131 of NIS-expressing mammary cancer in a mouse model remarkably inhibited tumor growth. *Nucl Med Biol* 2005; 32(7):695-700.
28. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* 1996; 379(6564):458-460.
29. de Vries E, Bray FI, Coebergh JW, Parkin DM. Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. *Int J Cancer* 2003; 107(1):119-126.
30. Dingli D, Bergert ER, Bajzer Z, O'connor MK, Russell SJ, Morris JC. Dynamic iodide trapping by tumor cells expressing the thyroidal sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325(1):157-166.
31. Dohan O, Baloch Z, Banrevi Z, Livolsi V, Carrasco N. Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na(+)/I(-) symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(6):2697-2700.
32. Dressel R, Grzeszik C, Kreiss M et al. Differential effect of acute and permanent heat shock protein 70 overexpression in tumor cells on lysability by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 2003; 63(23):8212-8220.
33. Dwyer RM, Bergert ER, O'connor MK, Gendler SJ, Morris JC. In vivo radioiodide imaging and treatment of breast cancer xenografts after MUC1-driven expression of the sodium iodide symporter. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4):1483-1489.
34. Dwyer RM, Bergert ER, O'connor MK, Gendler SJ, Morris JC. Adenovirus-mediated and targeted expression of the sodium-iodide symporter permits in vivo radioiodide imaging and therapy of pancreatic tumors. *Hum Gene Ther* 2006; 17(6):661-668.
35. Dwyer RM, Bergert ER, O'connor MK, Gendler SJ, Morris JC. Sodium iodide symporter-mediated radioiodide imaging and therapy of ovarian tumor xenografts in mice. *Gene Ther* 2006; 13(1):60-66.
36. Eggermont AM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer* 2004; 40(12):1825-1836.
37. Elisei R, Vivaldi A, Ciampi R et al. Treatment with drugs able to reduce iodine efflux significantly increases the intracellular retention time in thyroid cancer cells stably transfected with sodium iodide symporter complementary deoxyribonucleic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(6):2389-2395.
38. Essner R, Lee JH, Wanek LA, Itakura H, Morton DL. Contemporary surgical treatment of advanced-stage melanoma. *Arch Surg* 2004; 139(9):961-966.
39. Faivre J, Clerc J, Gerolami R et al. Long-term radioiodine retention and regression of liver cancer after sodium iodide symporter gene transfer in wistar rats. *Cancer Res* 2004; 64(21):8045-8051.

40. FITZGERALD PJ, FOOTE FW, Jr. The function of various types of thyroid carcinoma as revealed by the radioautographic demonstration of radioactive iodine (I131). *J Clin Endocrinol Metab* 1949; 9(11):1153-70, illust.
41. Fuchs J, Packer L. Ultraviolet irradiation and the skin antioxidant system. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1990; 7(2):90-92.
42. Gallagher RP, Ma B, McLean DI et al. Trends in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and melanoma of the skin from 1973 through 1987. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23(3 Pt 1):413-421.
43. Garbe C, Eigentler TK. [Therapy of malignant melanoma at the stage of distant metastasis]. *Hautarzt* 2004; 55(2):195-213.
44. Garbe C, Hauschild A, Volkenandt M et al. [Brief guidelines: malignant melanoma of the skin]. *J Dtsch Dermatol Ges* 2006; 4(4):344-349.
45. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999; 340(17):1341-1348.
46. Giles GG, Armstrong BK, Burton RC, Staples MP, Thursfield VJ. Has mortality from melanoma stopped rising in Australia? Analysis of trends between 1931 and 1994. *BMJ* 1996; 312(7039):1121-1125.
47. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 2007; 445(7130):851-857.
48. Greene MH FJ. The hereditary variant of malignant melanoma. In: Clark WH GLMM, editor. *Human malignant melanoma*. New York: Grune and Stratton; 1979 p. 139-166.
49. Greene MH, Clark WH, Jr., Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE, Fraser MC. High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med* 1985; 102(4):458-465.
50. Haberkorn U, Henze M, Altmann A et al. Transfer of the human NaI symporter gene enhances iodide uptake in hepatoma cells. *J Nucl Med* 2001; 42(2):317-325.
51. Harper J. Genetics and dermatoses. In: Champion RH BJBDBS, editor. *Textbook of Dermatology*. 6 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1998 p. 407-412.
52. Hart IR. Tissue specific promoters in targeting systemically delivered gene therapy. *Semin Oncol* 1996; 23(1):154-158.
53. Helmbach H, Kern MA, Rossmann E et al. Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency. *J Invest Dermatol* 2002; 118(6):923-932.
54. Hendrzak JA, Brunda MJ. Interleukin-12. Biologic activity, therapeutic utility, and role in disease. *Lab Invest* 1995; 72(6):619-637.
55. Higuchi K, Kawashima M, Ichikawa Y, Imokawa G. Sphingosylphosphorylcholine is a Melanogenic Stimulator for Human Melanocytes. *Pigment Cell Res* 2003; 16(6):670-678.

56. Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Boni R, Dummer R. Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *J Cutan Pathol* 1998; 25(4):204-209.
57. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17(3):459-468.
58. Huang M, Batra RK, Kogai T et al. Ectopic expression of the thyroperoxidase gene augments radioiodide uptake and retention mediated by the sodium iodide symporter in non-small cell lung cancer. *Cancer Gene Ther* 2001; 8(8):612-618.
59. Hunt G, Todd C, Kyne S, Thody AJ. ACTH stimulates melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Endocrinol* 1994; 140(1):R1-R3.
60. Information Resource Centre. Statistifical Information Team Cancer Research. 2005. Ref Type: Internet Communication
61. Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E et al. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* 2000; 356(9243):1728-1733.
62. Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY et al. An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology* 1998; 139(10):4416-4419.
63. Joba W SCSKHA. Analysis of human sodium/iodide symporter, thyroid transcription factor-1, and paired-box-protein-8 gene expression in benign thyroid diseases. *Thyroid* 1999; 9:455-466.
64. Kakinuma H, Bergert ER, Spitzweg C, Cheville JC, Lieber MM, Morris JC. Probasin promoter (ARR(2)PB)-driven, prostate-specific expression of the human sodium iodide symporter (h-NIS) for targeted radioiodine therapy of prostate cancer. *Cancer Res* 2003; 63(22):7840-7844.
65. Kang JH, Chung JK, Lee YJ et al. Establishment of a human hepatocellular carcinoma cell line highly expressing sodium iodide symporter for radionuclide gene therapy. *J Nucl Med* 2004; 45(9):1571-1576.
66. Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45(2):260-276.
67. Knostman KA, Cho JY, Ryu KY et al. Signaling through 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and phosphoinositide-3 kinase induces sodium/iodide symporter expression in breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(10):5196-5203.
68. Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 1997; 138(6):2227-2232.
69. Koh HK. Cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 1991; 325(3):171-182.
70. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1998. *CA Cancer J Clin* 1998; 48(1):6-29.

71. Liu Y, Ye T, Sun D, Maynard J, Deisseroth A. Tumor-specific therapeutic effect induced by an oncolytic adenoviral vector containing heat shock protein 70 and prodrug activation genes. *Gene Ther* 2006; 13(16):1235-1243.
72. Mandell RB, Mandell LZ, Link CJ, Jr. Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene. *Cancer Res* 1999; 59(3):661-668.
73. Marks R, Whiteman D. Sunburn and melanoma: how strong is the evidence? *BMJ* 1994; 308(6921):75-76.
74. McCray AN, Ugen KE, Muthumani K, Kim JJ, Weiner DB, Heller R. Complete regression of established subcutaneous B16 murine melanoma tumors after delivery of an HIV-1 Vpr-expressing plasmid by in vivo electroporation. *Mol Ther* 2006; 14(5):647-655.
75. McLeod SD, Smith C, Mason RS. Stimulation of tyrosinase in human melanocytes by pro-opiomelanocortin-derived peptides. *J Endocrinol* 1995; 146(3):439-447.
76. Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2000; 18(1):158-166.
77. Mitrus I, Delic K, Wrobel N, Missol-Kolka E, Szala S. Combination of IL-12 gene therapy and CTX chemotherapy inhibits growth of primary B16(F10) melanoma tumors in mice. *Acta Biochim Pol* 2006; 53(2):357-360.
78. Moon DH, Lee SJ, Park KY et al. Correlation between ^{99m}Tc-pertechnetate uptakes and expressions of human sodium iodide symporter gene in breast tumor tissues. *Nucl Med Biol* 2001; 28(7):829-834.
79. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ et al. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355(13):1307-1317.
80. Nachbar F, Stolz W, Merkle T et al. The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30(4):551-559.
81. Nakamoto Y, Saga T, Misaki T et al. Establishment and characterization of a breast cancer cell line expressing Na⁺/I⁻ symporters for radioiodide concentrator gene therapy. *J Nucl Med* 2000; 41(11):1898-1904.
82. Osterlind A, Hou-Jensen K, Moller JO. Incidence of cutaneous malignant melanoma in Denmark 1978-1982. Anatomic site distribution, histologic types, and comparison with non-melanoma skin cancer. *Br J Cancer* 1988; 58(3):385-391.
83. Park BJ, Brown CK, Hu Y et al. Augmentation of melanoma-specific gene expression using a tandem melanocyte-specific enhancer results in increased cytotoxicity of the purine nucleoside phosphorylase gene in melanoma. *Hum Gene Ther* 1999; 10(6):889-898.
84. Penn I. Ultraviolet light and skin cancer. *Immunol Today* 6, 206-207. 1985.
Ref Type: Abstract

85. Petrich T, Helmeke HJ, Meyer GJ, Knapp WH, Potter E. Establishment of radioactive astatine and iodine uptake in cancer cell lines expressing the human sodium/iodide symporter. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; 29(7):842-854.
86. Petrich T, Quintanilla-Martinez L, Korkmaz Z et al. Effective cancer therapy with the alpha-particle emitter [²¹¹At]astatine in a mouse model of genetically modified sodium/iodide symporter-expressing tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12(4):1342-1348.
87. Pons F, Carrio I, Estorch M, Ginjaume M, Pons J, Milian R. Lithium as an adjuvant of iodine-131 uptake when treating patients with well-differentiated thyroid carcinoma. *Clin Nucl Med* 1987; 12(8):644-647.
88. Preston DS, Stern RS. Nonmelanoma cancers of the skin. *N Engl J Med* 1992; 327(23):1649-1662.
89. Rass K, Tadler D, Tilgen W. [Therapy of malignant melanoma. First-, second- and pathogenesis-oriented third-line therapies]. *Hautarzt* 2006; 57(9):773-784.
90. Reinhold U, Hartl C, Hering R, Hoeft A, Kreysel HW. Fatal rhabdomyolysis and multiple organ failure associated with adjuvant high-dose interferon alfa in malignant melanoma. *Lancet* 1997; 349(9051):540-541.
91. Rhodes AR. Intervention strategy to prevent lethal cutaneous melanoma: use of dermatologic photography to aid surveillance of high-risk persons. *J Am Acad Dermatol* 1998; 39(2 Pt 1):262-267.
92. Rigel DS. Epidemiology and prognostic factors in malignant melanoma. *Ann Plast Surg* 1992; 28(1):7-8.
93. Rigel DS, Friedman RJ. The rationale of the ABCDs of early melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29(6):1060-1061.
94. Ronan SG, Han MC, Das Gupta TK. Histologic prognostic indicators in cutaneous malignant melanoma. *Semin Oncol* 1988; 15(6):558-565.
95. Roth JA, Cristiano RJ. Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(1):21-39.
96. Russo D, Bulotta S, Bruno R et al. Sodium/iodide symporter (NIS) and pendrin are expressed differently in hot and cold nodules of thyroid toxic multinodular goiter. *Eur J Endocrinol* 2001; 145(5):591-597.
97. Saito T, Endo T, Kawaguchi A et al. Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(10):3331-3336.
98. Salopek TG, Slade J, Marghoob AA et al. Management of cutaneous malignant melanoma by dermatologists of the American Academy of Dermatology. I. Survey of biopsy practices of pigmented lesions suspected as melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(3):441-450.

99. Sanchez-Perez L, Kottke T, Daniels GA et al. Killing of normal melanocytes, combined with heat shock protein 70 and CD40L expression, cures large established melanomas. *J Immunol* 2006; 177(6):4168-4177.
100. Sarkar C, Singh SK, Mandal SK et al. Human placental protein/peptides stimulate melanin synthesis by enhancing tyrosinase gene expression. *Mol Cell Biochem* 2006; 285(1-2):133-142.
101. Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B et al. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol* 2006; 17(4):563-570.
102. Scholz IV, Cengic N, Goke B, Morris JC, Spitzweg C. Dexamethasone enhances the cytotoxic effect of radioiodine therapy in prostate cancer cells expressing the sodium iodide symporter. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(3):1108-1116.
103. Sebastian G. [Cutaneous malignant melanoma. Excision margins and lymph node dissections]. *Hautarzt* 2006; 57(9):756-763.
104. Shimura H, Haraguchi K, Miyazaki A, Endo T, Onaya T. Iodide uptake and experimental 131I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na⁺/I⁻ symporter gene. *Endocrinology* 1997; 138(10):4493-4496.
105. Siegrist W, Eberle AN. In situ melanin assay for MSH using mouse B16 melanoma cells in culture. *Anal Biochem* 1986; 159(1):191-197.
106. Smanik PA, Liu Q, Furminger TL et al. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226(2):339-345.
107. Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* 1997; 138(8):3555-3558.
108. Spitzweg C. [The sodium-iodide symporter. Pathophysiologic, diagnostic and therapeutic significance]. *Internist (Berl)* 2003; 44(4):396-8, 410.
109. Spitzweg C. Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS): Bedeutung für die Bildgebung und therapeutische Optionen. *Nuklearmedizin* 30, 1-12. 2007.
Ref Type: Abstract
110. Spitzweg C, Dietz AB, O'connor MK et al. In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer. *Gene Ther* 2001; 8(20):1524-1531.
111. Spitzweg C, Dutton CM, Castro MR et al. Expression of the sodium iodide symporter in human kidney. *Kidney Int* 2001; 59(3):1013-1023.
112. Spitzweg C, Harrington KJ, Pinke LA, Vile RG, Morris JC. Clinical review 132: The sodium iodide symporter and its potential role in cancer therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(7):3327-3335.
113. Spitzweg C, Heufelder AE, Morris JC. Thyroid iodine transport. *Thyroid* 2000; 10(4):321-330.

114. Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(5):1746-1751.
115. Spitzweg C, Joba W, Schriever K, Goellner JR, Morris JC, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in human exocrine glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(11):4178-4184.
116. Spitzweg C, Joba W, Schriever K, Goellner JR, Morris JC, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in human exocrine glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(11):4178-4184.
117. Spitzweg C, Morris JC. The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 57(5):559-574.
118. Spitzweg C, O'connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, Morris JC. Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter. *Cancer Res* 2000; 60(22):6526-6530.
119. Spitzweg C, Zhang S, Bergert ER et al. Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 1999; 59(9):2136-2141.
120. Tandle A, Blazer DG, III, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *J Transl Med* 2004; 2(1):22.
121. Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O et al. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med* 2000; 6(8):871-878.
122. Thomas L, Tranchand P, Berard F, Secchi T, Colin C, Moulin G. Semiological value of ABCDE criteria in the diagnosis of cutaneous pigmented tumors. *Dermatology* 1998; 197(1):11-17.
123. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005; 365(9460):687-701.
124. Tonacchera M, Viacava P, Agretti P et al. Benign nonfunctioning thyroid adenomas are characterized by a defective targeting to cell membrane or a reduced expression of the sodium iodide symporter protein. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(1):352-357.
125. Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 2003; 22(20):3042-3052.
126. Unterholzner S, Willhauck MJ, Cengic N et al. Dexamethasone stimulation of retinoic Acid-induced sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of ¹³¹I in breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(1):69-78.
127. Urabe M, Hershman JM, Pang XP, Murakami S, Sugawara M. Effect of lithium on function and growth of thyroid cells in vitro. *Endocrinology* 1991; 129(2):807-814.
128. Valenta L. Metastatic thyroid carcinoma in man concentrating iodine without organification. *J Clin Endocrinol Metab* 1966; 26(12):1317-1324.

129. Vile R, Miller N, Chernajovsky Y, Hart I. A comparison of the properties of different retroviral vectors containing the murine tyrosinase promoter to achieve transcriptionally targeted expression of the HSVtk or IL-2 genes. *Gene Ther* 1994; 1(5):307-316.
130. Wapnir IL, Goris M, Yudd A et al. The Na⁺/I⁻ symporter mediates iodide uptake in breast cancer metastases and can be selectively down-regulated in the thyroid. *Clin Cancer Res* 2004; 10(13):4294-4302.
131. Weiss SJ, Philp NJ, Ambesi-Impiombato FS, Grollman EF. Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology* 1984; 114(4):1099-1107.
132. Weiss SJ, Philp NJ, mbesi-Impiombato FS, Grollman EF. Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology* 1984; 114(4):1099-1107.
133. Weiss SJ, Philp NJ, mbesi-Impiombato FS, Grollman EF. Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology* 1984; 114(4):1099-1107.
134. WHO media centre. The World Health Organization recommends that no person under 18 should use a sunbed. 2005.
Ref Type: Internet Communication
135. Willhauck MJ, Samani BR, Wolf I et al. The potential of ²¹¹Astatine for NIS-mediated radionuclide therapy in prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35(7):1272-1281.
136. Willhauck MJ, Sharif Samani BR, Gildehaus FJ et al. Application of ¹⁸⁸rhenium as an alternative radionuclide for treatment of prostate cancer after tumor-specific sodium iodide symporter gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(11):4451-4458.
137. Willhauck MJ, Sharif Samani BR, Klutz K et al. Alpha-fetoprotein promoter-targeted sodium iodide symporter gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Gene Ther* 2008; 15(3):214-223.
138. Willhauck MJ, Sharif-Samani B, Senekowitsch-Schmidtke R et al. Functional sodium iodide symporter expression in breast cancer xenografts in vivo after systemic treatment with retinoic acid and dexamethasone. *Breast Cancer Res Treat* 2007.
139. WOLFF J, CHAIKOFF IL, . The temporary nature of the inhibitory action of excess iodine on organic iodine synthesis in the normal thyroid. *Endocrinology* 1949; 45(5):504-13, illust.
140. Zanetti R, Franceschi S, Rosso S, Colonna S, Bidoli E. Cutaneous melanoma and sunburns in childhood in a southern European population. *Eur J Cancer* 1992; 28A(6-7):1172-1176.
141. Zhang L, Sharma S, Zhu LX et al. Nonradioactive iodide effectively induces apoptosis in genetically modified lung cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63(16):5065-5072.

7 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank.

Herrn **Prof. Dr. med B. Göke** danke ich für die ausgezeichneten Arbeits- und Rahmenbedingungen während meiner Forschungsarbeiten im Labor von Frau Prof. Dr. C. Spitzweg in der II. Medizinischen Klinik am Klinikum Großhadern.

Besonders möchte ich mich bei meiner Doktormutter **Frau Prof. Dr. med. Christine Spitzweg** bedanken, die es mir ermöglichte auf hohem wissenschaftlichem Niveau das Gebiet der „Molekularen Endokrinologie“ zu erforschen und das Thema meiner Promotionsarbeit „Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) als neues therapeutisches Gen zur Behandlung des Malignen Melanoms“ auszuarbeiten. Dabei profitierte ich nicht nur von Ihrer eindrucklichen Fachkompetenz und Ratschlägen, sondern konnte durch die wertvollen Vorarbeiten ihrer Arbeitsgruppe, die hochwertige Ausstattung des Labors und die finanziellen Mittel zügig und effektiv entscheidene Resultate erzielen.

Insbesondere möchte ich auch **Dr. med. Michael Willhauck** danken, der mir jederzeit mit seinen Ideen, Lösungsvorschlägen und fundiertem Fachwissen zur Seite stand und dessen Zusammenarbeit ein Meilenstein bei der Erstellung meiner Doktorarbeit war.

Ein großer Dank geht aber auch an meine Kollegen der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. C. Spitzweg, **K. Klutz, N. Wunderlich, B. Sharif-Samani und allen anderen Laborkollegen/innen**, die das reibungslose Ablaufen der Untersuchungen ermöglichten und auch bei aufwendigen Versuchen immer eine tatkräftige Unterstützung waren.

Ein weiterer Dank gilt der **Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der LMU München**, die das Durchführen des diagnostischen Imagings mittels γ -Kamera in ihren Räumlichkeiten ermöglichte und die ihre Tierställe zur Unterbringung der Mäuse zur Verfügung stellte.

Herrn **Dr. rer. Nat. C. Zach** danke ich für die kompetente Durchführung der dosimetrischen Berechnungen.

8 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Anne-Liese Kessel
D
Geburtsdatum: 15. März 1982
Geburtsort: Rockville/ Maryland (USA)

Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1988- 1992 Grundschole Bovenden
1992- 1994 Orientierungsschole Bovenden
1994- 2001 Hainberggymnasium Göttingen
2001 Allgemeine Hochschulreife

Studium

04/2002 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Georg-August- Universität in Göttingen
03/2004 Ärztliche Vorprüfung in Göttingen
08/2004 Famulatur am Institut für Diagnostische Radiologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Mödder
09/2004 Famulatur im Institut für Hals-Nasen-Ohrenkunde des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
10/2004 Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität in München
03/2005 Famulatur in der Praxis für Innere Medizin bei Herrn Dr. med. Prause in Göttingen
03/2007 Famulatur in dem Institut für Neuroradiologie des UniversitätsSpitals Zürich unter der Leitung von Prof. Dr. med. Valavanis
08-10/2007 PJ in der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikum Großhaderns
10-12/2007 PJ in der Abteilung für Unfallchirurgie des Klinikum Großhaderns
12/07-03/08 PJ Wahlfach im Institut für Klinische Radiologie des Klinikums Großhaderns
04/2008 PJ in der Medizinischen Klinik I des Klinikum Großhaderns
11/2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2009 Assistentenärztin für Radiologie im Krankenhaus Bogenhausen, München

Dissertation

10/2005

Beginn der Promotionsarbeit in der Medizinischen Klinik II
unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christine Spitzweg
Thema: „ Der Natrium/Iodid-Symporter als neues diagnostisches
und therapeutisches Gen beim Malignen Melanom“
(Experimente abgeschlossen, Publikation in Vorbereitung)

Publikationen

A. Kessel, M.J. Willhauck, B.R. Sharif Samani, W. Münzing, C. Berking, R. Vile, B. Göke, J.C. Morris, C. Spitzweg. Image-guided radioiodine therapy of melanoma following tumor-specific sodium iodide symporter (NIS) gene transfer. **European Thyroid Association, annual meeting 2007 (Leipzig, Germany).**

“Radionuclide imaging and therapy of malignant melanoma after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter” – in Vorbereitung