

## Zusammenfassung

---

Michael Zepp

Dr. sc. Hum

### MODIFIKATION DES OSTEOLYTISCHEN, MDA-MB-231 BASIERTEN SKELETTMETASTASEN-MODELLS DER NACKTRATTE FÜR ZWECKE DER BILDGEBUNG UND ANSÄTZE ZU DESSEN THERAPIE

Promotionsfach: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Prof. Dr. M.R. Berger

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein in der Arbeitsgruppe Toxikologie und Chemotherapie des DKFZ etabliertes Nacktrattenmodell zur Skelettmetastasierung so zu modifizieren, dass eine moderne und einfache Bildgebung zur Dokumentation des Metastasenwachstums anwendbar wurde. Dieses Tiermodell sollte dann dazu geeignet sein, das Auftreten von ossären Metastasen schon im Frühstadium nicht-invasiv zu dokumentieren. Darüber hinaus sollte die Auswirkung verschiedener Therapieformen dreier gegen Bone Sialoprotein (BSPII) gerichteter Antikörper untersucht werden. Eine weitere Aufgabe war es, biologisch abbaubare Nanopartikel als mögliche Trägerform für instabile potentielle Therapeutika zu testen.

Um die sich bildenden Metastasen bereits als Mikrometastase in vivo nachweisbar zu machen, wurde das Biolumineszenz-Reportersystem der (Firefly-) Luziferase verwendet. Es wurde ein Transportvektor kloniert, der sowohl das Reportergen der Luziferase beinhaltet, als auch das eGFP/RFP-Gen. Während eGFP dazu benötigt wurde, um die positiv transfizierten Zellen mittels einer FACS-Sortierung zu isolieren, war das eingebrachte Luziferasegen notwendig, um die Tumorzellen in vivo nicht-invasiv zu detektieren. Nach Sicherstellung, dass sich durch die Integration der Plasmid-DNA keine charakteristischen Veränderungen gegenüber der Wild-Typ-Zelllinie ergeben hatten, wurde der so entstandene Klon MDA-MB 231<sup>Luc</sup> im Tiermodell evaluiert. Durch eine Modifizierung der Implantationstechnik war es möglich, alle die Operation betreffenden Gefäßstrukturen zu erhalten. Anders als zuvor war es so möglich, die den Tumor versorgende Arterie fast beliebig oft zu punktieren, um etwaige Therapeutika (oder evtl. erneut Tumorzellen) zu injizieren. Die erreichte Angangsrate lag bei ca. 96%, wobei ausschließlich Metastasen und Läsionen im operierten Hinterbein der Nacktratte dokumentiert werden konnten. Durch die

## Zusammenfassung

---

Verwendung der Biolumineszenz als primärer Nachweismethode für das Tumorstadium konnte eine Sensitivität erreicht werden, deren Nachweisgrenze bei ca. 1000 Luziferase-positiven Zellen lag. Da den Nacktratten jeweils  $1 \times 10^5$  MDA-MB 231<sup>Luc</sup> Zellen implantiert wurden, konnte deren Verbleib unmittelbar nach der OP im Tier dokumentiert werden.

Um die Wirkung einer BSP-II-Antikörper-Therapie auf die MDA-MB 231<sup>Luc</sup> Mammakarzinomzellen und die Entwicklung von Knochenmetastasen zu beurteilen, wurden drei verschiedene Antikörper *in vitro* und *in vivo* eingesetzt.

Die Exposition der MDA-MB 231<sup>Luc</sup> Zellen *in vitro* gegenüber den Antikörpern TGC-9 und TGC-11 bewirkten keine nennenswerte Reduktion der Proliferation oder eine Hemmung der Migration. Im Gegensatz dazu verursachte der Antikörper TGC-10 in der Zellkultur eine Minderung der Proliferation und der Migration der MDA-MB 231<sup>Luc</sup> Zellen.

Die Implantation von MDA-MB 231<sup>Luc</sup> Zellen in Nacktratten führte unbehandelt in 96% aller Fälle zu einer Tumorstadium. Verglichen damit führte die Behandlung mit den anti-BSP-II Antikörpern zu zum Teil beachtlichen Erfolgen. Während TGC-11 nahezu wirkungslos blieb, zeigte TGC-10 eine über alle Studien ermittelte komplette Remissionsrate von 55% und weitere 10% der Tiere zeigten während der Therapiedauer eine stabile Erkrankung. Gleichzeitig war aber eine toxische Wirkung feststellbar, die bei 33% der Ratten ursächlich für deren Tod war. Die besten Erfolge erzielte die Therapie mit dem Antikörper TGC-9: bezogen auf alle 38 behandelten Tiere waren nach Ende des Beobachtungszeitraums 28 Tiere ohne nachweisbare Metastasen – dies entspricht einer Heilungsrate von über 73%. Bei keinem dieser Tiere zeigte sich bis zu 14 Tage nach Beendigung der Behandlung ein Rezidiv. Bei sechs weiteren Tieren (15,6%) konnte das Tumorstadium entweder gestoppt oder zumindest stark verlangsamt werden und dies ohne jegliche Anzeichen einer begleitenden Toxizität.

Der Wirkmechanismus konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Westernblot Ergebnisse legen jedoch nahe, dass BSP-II erst *in vivo* verstärkt gebildet wird, was die Wirkungslosigkeit von TGC-9 *in vitro* erklären würde. Die Banden von BSP-II

## Zusammenfassung

---

*in vivo* und das Verschwinden der BSPII-Banden nach Therapie legen einen kausalen Zusammenhang mit der therapeutischen Anwendung von TGC-9 nahe.

Im Rahmen der Versuche konnte auch gezeigt werden, dass die Anwendung von bio-abbaubaren NP in Kombination mit einer lokoregionalen Therapie eine sehr effiziente Möglichkeit bietet, hohe Konzentrationen eines Wirkstoffes zu verabreichen und gleichzeitig etwaige fragile Therapeutika vor einem zu schnellen Wirkverlust zu schützen.