

Technische Universität München

Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik  
Klinikum rechts der Isar

Hals-Nasen-Ohren-Klinik und Poliklinik  
Klinikum rechts der Isar

## **Untersuchungen zur therapeutischen Wirkung von $\alpha$ - Strahlern bei Plattenepithelkarzinomzellen**

Samuel Paul Kopping

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:     1. Univ.-Prof. Dr. St. E. Combs  
  2. Univ.-Prof. Dr. M. Essler

Die Dissertation wurde am 15.09.2014 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.04.2015 angenommen.



# Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	5
2. Einleitung .....	7
2.1. Plattenepithelkarzinome des Kopf-/Halsbereichs .....	7
2.1.1. Stand der Forschung .....	7
2.1.2. Therapie .....	8
2.1.3. Immuntherapie.....	8
2.2. Zelluläre Mechanismen.....	9
2.2.1. EGF-Rezeptor.....	9
2.2.2. Zellzyklusarrest.....	11
2.2.3. Apoptose .....	13
2.2.3.1. Vom Doppelstrangbruch zur Apoptose.....	13
2.2.3.2. Die Signalwege der Apoptose .....	14
2.2.4. Doppelstrangbrüche.....	14
2.2.5. $\gamma$ H2Ax.....	15
2.3. Strahlungsarten .....	15
2.3.1. $\alpha$ -Emitter .....	16
2.3.2. Röntgenstrahlen .....	17
3. Ziel der Arbeit.....	18
4. Material und Methoden.....	19
4.1. Materialliste .....	19
4.2. Zellkultur der HNSCC-Zellen .....	22
4.3. Antikörper-Bindungstest .....	24
4.4. Versuchsdurchführung Immunfluoreszenz.....	24
4.4.1. Bindung zwischen $^{213}\text{Bi}$ und EGFR-Antikörper .....	24
4.4.1.1. Chelatierung des Anti-EGFR Antikörpers Matuzumab mit CHX-A <sup>4</sup> -DTPA .....	24
4.4.1.2. Markierung des chelatierten EGFR-Antikörpers mit dem $\alpha$ -Emitter $^{213}\text{Bi}$ .....	25
4.4.2. Behandlung der Zellen mit $\alpha$ -Emittern.....	27
4.4.3. Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlen .....	28
4.4.4. Immunfluoreszenzfärbung.....	28
4.4.5 Erstellen der Fotos mit Fluoreszenzmikroskop und Bildanalyse .....	29
4.5. Western Blot.....	32
4.5.1. Proteinisolierung.....	32
4.5.2. Bradford-Assay .....	32

4.5.3. SDS-Gelelektrophorese .....	33
4.5.4. Blotting.....	34
4.6. Colony Formation Assay .....	34
4.7. Flow Zytometrie .....	35
4.8. Statistik.....	35
5. Ergebnisse .....	36
5.1. Quantifizierung der Bindung von <sup>213</sup> Bi-anti-EGFR-MAb-Immunkonjugaten .....	36
5.2. Proliferationsanalyse nach Behandlung mit Röntgen- und α-Strahlern .....	37
5.3. Colony-Formation Assay .....	39
5.3.1. Behandlung mit α- bzw. Röntgenstrahlung.....	39
5.3.2. Kombinierte Bestrahlung (37kBq/2Gy) .....	41
5.4. Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen mit Immunfluoreszenz.....	43
5.4.1. UDSCC5 in Einzelbehandlung und Kombination für 37kBq/ml und 2Gy.....	43
5.4.2. Vergleich nach 2h bei Dosiserhöhung auf 4 bzw. 8Gy .....	46
5.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Immunfluoreszenzassay .....	47
5.5. Zellzyklusanalyse .....	48
5.6. Western-Blot-Analyse .....	50
6. Diskussion.....	53
6.1. Zusammenfassung des Vorgehens bei den Versuchen .....	54
6.2. Analyse der Ergebnisse .....	54
6.2.1. Wirkung des Immunkonjugats und Überlebensassay .....	54
6.2.2. Colony-Formation-Assay, Immunfluoreszenz und Zellzyklusanalyse .....	55
6.2.3. Western-Blot und Rolle von p53 in der Apoptose .....	56
6.3. Ergebnisvergleich von clonogenem Assay, Immunfluoreszenz und Western-Blot.....	60
6.4. Vergleich von UDSCC5 mit der Zelllinie Cal27 am Beispiel der Immunfluoreszenz ...	61
6.5. Unterschiede in der G1/G2-Phase.....	62
6.6. Qualität der Doppelstrangbrüche .....	63
6.7. Ausblick .....	64
7. Zusammenfassung .....	65
8. Anhang.....	66
8.1. Abbildungsverzeichnis .....	66
8.2. Tabellen- und Diagrammverzeichnis.....	67
8.4. Literaturverzeichnis.....	69
9. Danksagung .....	75
10. Erklärung.....	76
11. Curriculum vitae .....	77

## 1. Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung

AKT = protein kinase B

ATM = Ataxia-Telangiectasiamutated

ATR = ATM- und Rad3-related

C-Terminus = Carboxy-Terminus

CDC25/45 = cell division cycle 25/45

CDK = cyclin-dependent-kinase

DAG = Diacylglycerol

E2F = E2-Faktor (Transkriptionsfaktor beteiligt am Zellzyklus)

EGF = epidermal growth factor

EGFR = epidermal growth factor receptor

ErbB 1-4 = erythroblastic leukemia viral oncogene 1-4

ERK = extracellular signal-regulated kinase

EXTREME = Erbitux® in 1st-line treatment of recurrent or metastatic head and neck cancer

GTP = Guanosintriphosphat

Grb2 = Growth factor receptor-bound protein 2

H1, H2A, H2B, H3, H4 =

HB-EGF = heparine-binding epidermal growth factor

HER 1-4 = human epidermal growth factor receptor 1-4

HNSCC = head and neck squamous cell carcinoma

HPV = humanes Papillomavirus

IP3 = Inositoltriphosphat

keV = Kiloelektronenvolt

µm = Mikrometer

MAb = Matuzumab

MAK = mitogen-activated protein kinase

MAPKKK = Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase

MEK1/2 = Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 1/2

MPF = Zyklin B/CDK1 = Maturation promoting Factor

MRN-Komplex (MRE<sub>11</sub>/RAD<sub>50</sub>/NBS<sub>1</sub>) =

mTOR = mammalian Target of Rapamycin

mTORC2 = mammalian target of rapamycin complex 2

N-Terminus = Amino-Terminus

NLS = nuclear localization signal (Kernlokalisierungssignal)  
nm = Nanometer  
p21 = CDK-Inhibitor 1 (Maturation promoting Factor)  
PDK1 = Phosphoinositid-abhängige Kinase 1  
PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase  
PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat  
PIP3 = Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat  
PKC = Proteinkinase C  
PLC $\gamma$  = Phospholipase C $\gamma$   
Raf = v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1  
Ras = rat sarcoma viral oncogene homolog  
Rb = Retinoblastoma-Protein  
SEER = surveillance, epidemiology and end results  
SH2 = Src Homologie 2  
Src = cellular und sarcoma  
Sos = guanine nucleotide exchange factor (Son-of-sevenless)  
Tab. = Tabelle  
TGF $\alpha$  = Transforming Growth Factor  
TNM = tumor, nodes, metastases (international gebräuchliche Klassifikation für Tumore)  
VEGF = vascular endothelial growth factor

## **2. Einleitung**

### **2.1. Plattenepithelkarzinome des Kopf-/Halsbereichs**

#### **2.1.1. Stand der Forschung**

In den USA führen in der Mortalität der Patienten unter 85 Jahren trotz großen Fortschritts die Krebsleiden vor den kardiovaskulären Erkrankungen die Statistik an (Jemal, Siegel et al. 2009). Weltweit gesehen kommen auf 12,7 Millionen Neuerkrankungen 7,6 Millionen Krebstote im Jahre 2008. Während es sich mit 1,7 Millionen beim Lungenkrebs um die häufigste Krebsform handelt, folgen danach Brust- und Darmkrebs (Ferlay, Shin et al. 2010). Verglichen hiermit spielt die Gruppe der Plattenepithelkarzinome des Kopf/Halsbereiches (HNSCC= head and neck squamous cell carcinomas) eine untergeordnete Rolle. Jedoch stellen sie mit einer weltweiten Neuerkrankungsrate von ungefähr 630.000 Menschen und 350.000 Toten pro Jahr eine Hochrisikoerkrankung dar und rangieren damit bei der Sterberate noch vor dem viel häufigeren Brustkrebs. 4-5% aller Todesfälle durch maligne Tumorerkrankungen werden durch HNSCC-Tumore verursacht (Ferlay, Shin et al. 2010). Zu 90% handelt es sich bei Kopf/Hals-Tumoren um die HNSCC und beim Rest überwiegend um Speicheldrüsentumore (Sturgis and Cinciripini 2007), wobei sich eine Einteilung in Tumoren der Mund-/Nasenhöhle, Lippe, Pharynx, Larynx und die paranasalen Sinus vornehmen lässt. Aufgrund der Lokalisationsmöglichkeiten des Primärtumors ist es schwierig, Prognosen für die 5-Jahres-Überlebensrate für die gesamte Gruppe zu übernehmen. So wurde in den USA eine Analyse der SEER(= Surveillance, Epidemiology and End Results)-Datenbank zwischen 1973 und 1999 durchgeführt, die trotz medizinischen Fortschritts deutliche Unterschiede in der 5-Jahres-Prognose für die verschiedenen Subtypen zu Tage förderte (Carvalho, Nishimoto et al. 2005). Als Grundprobleme für die Entstehung dieser Plattenepithelkarzinome gelten zu 80-90% Nikotin- und Alkoholabusus, während die anderen 10-20% sich überwiegend auf virale Infektionen besonders hierbei auf das humane Papillomavirus (HPV) zurückführen lassen (Sturgis and Cinciripini 2007). Andere Ursachen des HNSCC wie z.B. Kautabak oder Schnupftabak wurden auch bereits unter die Lupe genommen, können aber nur für einen geringen Teil als ursächlich angesehen werden (Goldenberg, Lee et al. 2004). In Fall-Kontroll-Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass das Kauen von Betelnüssen der Arekapalme in südostasiatischen Ländern ursächlich ist für eine vermehrte Expression von HNSCC des Ösophagus (Akhtar 2013).

### **2.1.2. Therapie**

Für die Therapie der HNSCC muss der Tumor diagnostisch anhand der TNM-Klassifikation kategorisiert werden. Die Früherkennung dieser Tumore ist besonders wichtig für die Prognose, da herausgefunden wurde, dass im Stadium I die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 91% und im Stadium IV bei 31% liegt (Iro and Waldfahrer 1998). Die klassische Therapie beinhaltet chirurgische Intervention, lokale Strahlentherapie und Chemotherapie und wird in verschiedenen Kombinationen angewandt. Der chirurgische Eingriff stellt bei lokal begrenzten Tumoren eine sehr häufige kurative Therapieform dar, ist jedoch bei weiter Streuung in andere Bereiche des Körpers oder schwieriger Lokalisation des Primärtumors nicht mehr alleine ausreichend. Dabei kann oft eine Radiochemotherapie die Komplikationen des Tumors senken und für ein längeres Überleben sorgen. Eine Vollremission des Tumors kann auch bei lokoregionaler Bestrahlung entweder in Kombination mit chirurgischer Resektion oder auch alleine bei kleinen Tumoren erreicht werden. Aufgrund der Varianz lässt sich kein einheitliches Schema für die Therapie innerhalb der HNSCC ableiten. Probleme der Radiotherapie von HNSCC zeigen sich bei Behandlung hypoxischer Areale des Tumors. Da dort sekundär nicht genug freie Sauerstoffradikale gebildet werden können, wird das Tumorgewebe nicht ausreichend geschädigt (Toustrup, Sorensen et al. 2012). Tumore mit großen hypoxischen Arealen haben daher eine schlechtere Prognose (Nordmark, Bentzen et al. 2005).

### **2.1.3. Immuntherapie**

Nicht nur das frühe Stadium der Kopf/Hals-Plattenepithelkarzinome bei Diagnose trägt entscheidend zur Verbesserung der Prognose bei, sondern nun auch seit 1992 die zielgerichtete Therapie gegen Zelloberflächenmoleküle (Al-Sarraf 2002). Diese rückt mittlerweile als vierte Säule der Behandlung immer mehr in den Vordergrund, wobei der Fokus auf den EGF-Rezeptor (EGFR = epidermal growth factor receptor) als Zielmolekül gelegt wird. Nachgewiesen wurde eine Überexpression des EGF-Rezeptors bei den HNSCC von über 90% bei Analyse durch Immunhistochemie (Tejani, Cohen et al. 2010). Die Prognose für die EGFR-überexprimierenden Kopf/Hals-Plattenepithelkarzinome ist deutlich schlechter und lässt auf einen aggressiveren Tumor schließen (Frampton 2011), weshalb EGFR-inhibierende Substanzen wie Cetuximab und Matuzumab eine große Rolle spielen. Matuzumab, welches in den Versuchen als Antikörper zur Verfügung stand, wird eine bessere Verträglichkeit als bei Cetuximab in Aussicht gestellt (Vanhoefer, Tewes et al. 2004). Ihm wurde ebenfalls bereits eine große Wirksamkeit als Immunkonjugat mit <sup>213</sup>Bi-anti-

EGFR nachgewiesen (Wulbrand, Seidl et al. 2013). In dieser Studie konnten CAL33-Zellen unter steigender Konzentration von  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb abgetötet werden.

## **2.2. Zelluläre Mechanismen**

In den Versuchen wurden der EGF-Rezeptor mit dem Konjugat von Matuzumab (MAb) und  $^{213}\text{Bi}$  ( $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb) als Angriffspunkt gewählt. Doppelstrangbrüche, Zellzyklusarrest und Apoptose wurden untersucht. Die beteiligten zellulären Mechanismen und die betreffenden Substanzen werden erläutert.

### **2.2.1. EGF-Rezeptor**

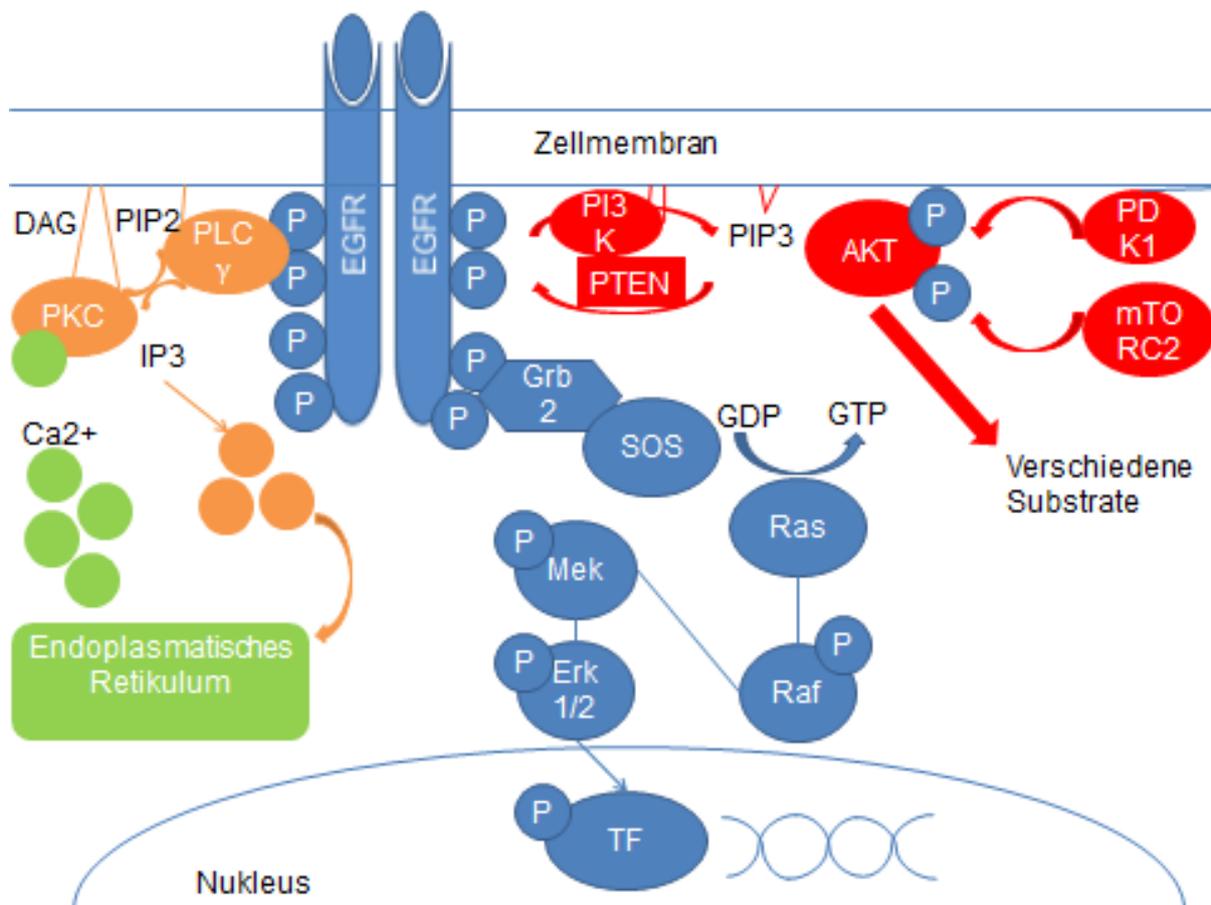
Dem schnellen Wachstum geschuldet benötigen Tumorzellen Mechanismen, um weiter proliferieren und gleichzeitig eine Versorgung ihres Zellclusters gewährleisten zu können. HNSCC weisen für ungehemmtes Wachstum den EGF-Rezeptor in erhöhter Ausprägung auf. Für die Angiogenese wird vermehrt VEGF (= vascular endothelial growth factor) ausgeschüttet, der an Endothelrezeptoren von Gefäßen bindet und diese zur Neubildung eines tumorversorgenden Gefäßnetzes veranlasst (Aldoss and Ganti 2009).

Der EGF-Rezeptor ist ein Glykoprotein, gehört zu den ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen und stellt ein Merkmal dar, das sich an allen Zellen des menschlichen Körpers findet. Zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehören außerdem auch EGFR (ErbB1/HER1), HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4) (Brand, Iida et al. 2011). Unter normalen Bedingungen wird die Rezeptoraktivität über die Verfügbarkeit von Liganden reguliert und gesteuert. In seiner Funktion als Transmembranrezeptor besitzt er einen extrazellulären Teil aus den Domänen I-IV mit Bindungsstellen unter anderem sowohl für den Epidermal Growth Factor (EGF), den Transforming Growth Factor (TGF $\alpha$ ) als auch für Amphiregulin, Epiregulin, Betacellulin und den Heparin-bindenden EGF-like growth factor (HB-EGF). Danach folgt der hydrophobe Transmembranabschnitt, an den die zytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne anschließt, über den eine Signalkaskade (Abb.1) in Gang gesetzt wird (Tejani, Cohen et al. 2010). An der Membran anliegend findet sich noch das Kernlokalisierungssignal (NLS) (Brand, Iida et al. 2011). Sobald passende Liganden an die leucinreichen Domänen I und III binden, exponiert der Rezeptor seine Domäne II für andere Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Baselga and Swain 2009). Diese Konformationsänderung ermöglicht die Homo- bzw. Heterodimerisation mit anderen Rezeptoren der HER-Familie, um die Signalkaskade im Zellinneren zu aktivieren. Am C-Terminus des intrazellulären Rezeptoranteils findet bei

Dimerisierung eine Autophosphorylierung der domäneeigenen Tyrosinanteile (Y) vor allem der Y992, Y1045, Y1068, Y1148 und Y1173 statt (Downward, Parker et al. 1984). Diese phosphorylierten Anteile können als Andockstellen für mehrere Proteine genutzt werden, die Src Homologie 2 (SH2) und phosphotyrosinbindende Domänen besitzen (Brand, Iida et al. 2011). Von dort aus können mehrere Signalwege aktiviert werden, wobei zu den wichtigsten primären Signalwegen in der Untersuchung von Tumoren die RAS/RAF/MEK/ERK-, die PI3K/AKT- und die PLC $\gamma$ /PKC-Kaskade gehören. Der RAS/RAF/MEK/ERK-Weg ist für die Zellproliferation zentral, was daher auch in vielen Tumoren untersucht wurde (Sebolt-Leopold and Herrera 2004). Das Protein Grb2 bindet zuerst mit seiner SH2-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinrest des C-Terminus und bringt den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor SOS mittels seiner SH3 Domäne ins Spiel, der die Bindung von GTP an das kleine G-Protein Ras triggert. Ras aktiviert die sogenannte MAPK Kaskade, indem es die Raf-Kinase aktiviert (MAPKKK), was wiederum an MEK bindet und es phosphoryliert. Dieses MEK (MAPKK) phosphoryliert ERK1/2 (MAPK), das in den Zellkern transferiert wird, indem es weitere Kinasen aktiviert und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, die zu einer verstärkten Expression zellproliferativer Gene führen.

Zudem wird auch der PI3K/AKT/mTOR Signalweg über phosphorylierte Tyrosinreste induziert (Engelman 2009). Aus dem membrangebundenen Molekül PIP2 (=Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) entsteht über Phosphorylierung durch PI3K der „second messenger“ Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat (= PIP3). Die Serin/Threonin Proteinkinase AKT heftet sich an das PIP3 und wird in seinen aktiven Zustand überführt durch Phosphorylierung der Phosphoinositid-abhängigen Kinase 1 (PDK1) und mTORC2 (= mammalian target of rapamycin complex 2). Aktives AKT steuert verschiedene weitere Substrate, die Einfluss haben auf Zellüberleben, Proliferation und den Zellmetabolismus (Brand, Iida et al. 2011).

Außerdem vermittelt der Proteinkinase-C(PKC)-Signalweg die Signale des aktivierten EGFR in das Zellinnere. An das phosphorylierte Tyrosin bindet die Phospholipase C mittels der SH2 Domäne, wird ebenfalls phosphoryliert, spaltet sich wieder ab und interagiert als aktive Form mit der Plasmamembran, indem sie PIP2 zu Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) auftrennt (Carpenter and Ji 1999). Während IP3 den Fluss von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum in die Zelle verursacht, aktiviert membranständiges DAG die Proteinkinase C, die mehrere Substrate konsumiert. Schlussendlich führen beide Mechanismen zu Prozessen, die auf Proliferation, Apoptose, Zellüberleben und Zellwanderung Einfluss haben (Brand, Iida et al. 2011).



**Abb. 1: Schematische Darstellung des PLC $\gamma$ /PKC-, RAS/RAF/MEK/ERK- und des PI3K/AKT-Signalwegs modifiziert nach (Brand, Iida et al. 2011)**

Ein weiterer noch nicht so ausführlich und genau beschriebener Signalweg wurde im Bereich der EGFR-Internalisation und dessen direkter Wirkung innerhalb des Zellkerns als Transkriptionsfaktor in Tumorzellen gefunden (Lin, Makino et al. 2001).

Genauere Informationen und ein sehr ausführliches Bild über die Signalwege des EGF-Rezeptors können der Arbeit von Herrn Oda, K. et al. entnommen werden (Oda, Matsuoka et al. 2005).

### 2.2.2. Zellzyklusarrest

Jede eukaryotische Zelle durchläuft während der ersten Teilung den Zellzyklus mit seinen vier Phasen (G1-Phase, S-Phase, G2-Phase, M-Phase). Um einen fehlerfreien Ablauf des Zyklus bis zur Teilung zu gewährleisten, sind im Zellzyklus Restriktions-/Kontrollpunkte eingerichtet, die sich in der späten G1-Phase, in der S-Phase, am Ende der G2-Phase und in der Metaphase (während der Mitose) befinden (Rassow 2006).

G1-Phase: Dort findet das Wachstum der Zelle und die Synthese der Proteine für die bevorstehende Verdopplung des Genoms in der darauffolgenden Phase statt. Am hier befindlichen Kontrollpunkt wird entschieden, ob die Zelle überhaupt in die Teilung eintritt oder in einen Arrest übergeht. Zyklin D1, D2 oder D3 müssen für die Fortsetzung des Zellzyklus synthetisiert werden und binden an CDK4 (CDK = cyclin-dependent-kinase) oder CDK6 (Rassow 2006), die das Retinoblastoma-Protein (Rb) phosphorylieren. Dies hat eine vermehrte Zyklin-E-Expression zur Folge, das CDK2 aktiviert. Diese bewirkt dann bei Hyperphosphorylierung von Rb die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, der die Produktion der für die S-Phase notwendigen Proteine ankurbelt. Für Zyklin D1 wurde nachgewiesen, dass ein aktivierter EGF-Rezeptor eine vermehrte Transkription dieses Moleküls induzieren kann (Lin, Makino et al. 2001). CDK-Inhibitorproteine wie p21 verhindern die Stimulierung der CDKs.

S-Phase: Hier wird die DNA repliziert.

G2-Phase: In dieser Phase werden hauptsächlich zellteilungsspezifische Proteine synthetisiert und die DNA auf Fehlpaarungen überprüft. Der M-Phase-stimulierende Faktor (= Maturation promoting Factor, MPF = Zyklin B/CDK1) wird durch die CDC25-Phosphatase aktiviert und es folgt der Eintritt in die Mitose (Rassow 2006).

M-Phase: Die eigentliche Mitose geschieht hier. Als Kontrolle fungiert dabei der Metaphasenrestriktionspunkt.

Für den Mechanismus des Arrests ist wichtig, dass der bei Doppelstrangbrüchen entstandene MRN-Komplex (MRE<sub>11</sub>/RAD<sub>50</sub>/NBS<sub>1</sub>) ATM, ATR und DNA-PK rekrutiert, welche als Antwort auf die DNA-Läsionen verschiedene Substrate phosphorylieren (z.B.: H2AX->γH2Ax). Drei wichtige Funktionen werden ATM/ATR zugeordnet: Regulation und Stimulation des Reparaturvorgangs, Aktivierung von Checkpoints des Zellzyklus und Signalisierung des Einleitens des Apoptosevorgangs (Roos and Kaina 2012). ATM, ATR und DNA-PK aktivieren Chk2 und Chk1 und steuern gemeinsam zur Phosphorylierung und Aktivierung von p53 bei, das p21, ein CDK-Inhibitorprotein, aktiviert. P21 inhibiert die Zykline CDK2 und CDK4, was zum G1-Arrest und damit zur Behinderung der DNA-Replikation führt (Su 2006). Weiter blockiert p21 nach seiner Aktivierung durch p53 die Phosphorylierung von CDC2 und induziert damit den G2-Arrest. 14-3-3, das auch durch p53 aktiviert wird, führt zur Rekrutierung von Wee1, eine Tyrosinkinase, die ebenfalls CDC2 blockiert und damit den Eintritt in die Mitose verhindert. Chk2 und Chk1 sind wichtig zur Phosphorylierung von CDC-25A für den proteasomalen Abbau. Dieser Verlust führt zum S-Arrest, da kein CDC45 für die Replikation zur Verfügung steht (Hakem 2008).

Sobald ein Zellzyklusarrest nicht mehr aufgehoben werden kann, also ein irreversibler Stopp des Zellzyklus vorliegt, geht die Zelle entweder in die Apoptose (Chipuk and Green 2006) (meist p53 getriggert) oder in die Seneszenz (Collado, Blasco et al. 2007) über.

### **2.2.3. Apoptose**

Die Apoptose kann über zwei Hauptsignalwege (extrinsisch, intrinsisch) initialisiert werden. Daneben existiert noch der Perforin/Granzym-Signalweg, der sich in Granzym-A- und Granzym-B-Signalweg spaltet. Die extrinsischen, intrinsischen und Granzym-B-Kaskaden münden gemeinsam in die Aktivierung von Caspase-3, wo der Exekutionssignalweg startet, der in DNA-Fragmentation, Abbau von Zellproteinen, Bildung apoptotischer Körper, Expression von Liganden für phagozytische Zellrezeptoren und Aufnahme durch Phagozyten mündet (Elmore 2007). Granzym-A stellt einen Sonderweg im Rahmen des caspaseunabhängigen Zelltods über Einzelstrangbrüche dar (Martinvalet, Zhu et al. 2005).

#### **2.2.3.1. Vom Doppelstrangbruch zur Apoptose**

Die durch ionisierende Strahlung hervorgerufenen Schäden an der DNA lösen den extrinsischen und/oder intrinsischen Signalweg aus (Roos and Kaina 2012). Als Basis für beide Wege kann die vermehrte Transkription von p53 gesehen werden. ATM (Ataxia-Telangiectasia-mutated) und ATR (ATM- und Rad3-related) erkennen Läsionen, im Falle von ionisierender Strahlung werden die ATM sogar direkt aktiviert und aktivieren p53. Dieses Protein kann direkt an Serin 15 phosphoryliert werden und so die Aktivität erhöhen (Canman, Lim et al. 1998). Die Bindungsaffinität von p53 an die DNA nimmt zu und seine Zielgene, die pro- und antiapoptotisch sein können, werden vermehrt transkribiert. Proapoptotische Gene sind unter anderem PUMA, Noxa, Apaf-1, Fas-R und BAX, während den antiapoptotischen Genen zum Beispiel DDB2, XPC, Fen1, MGMT und MSH2 zuzuordnen sind. Für die Schädigung von Erbgut durch ionisierende Strahlung wurde im Gegensatz zu hervorgerufenen Läsionen durch Cisplatin oder methylierende Stoffe festgestellt, dass p53 vermehrt Noxa transkribiert (Oda, Ohki et al. 2000). Die Ausbildung des Fas-R durch p53 spielt eine Rolle im extrinsischen Teil der Apoptosekaskade, während BAX einen wichtigen Platz im intrinsischen Weg einnimmt (Roos and Kaina 2012).

### **2.2.3.2. Die Signalwege der Apoptose**

Um den extrinsischen Signalweg am besten zu beschreiben, gilt der „FasL/FasR-Pathway“ als gutes Modell. Nach Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor wird das Adapterprotein FADD rekrutiert. FADD dimerisiert mit Procaspase-8 zu einem todinduzierenden Signalkomplex (DIS-Komplex), der Procaspase-8 zu Caspase-8 aktiviert. Nun tritt die Zelle in den Exekutionssignalweg über (Elmore 2007).

Der intrinsische Signalweg führt zur Bildung von p53, welches die Expression proapoptotisch wirkender Mitglieder der Bcl-2-Familie (z. B. BAX, Bad) stimuliert. Generell gibt es pro- und antiapoptotische Vertreter der Bcl-2-Proteine, die entscheiden, ob eine Zelle in die Apoptose übergeht oder nicht. BAX führt zu einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran und wirkt somit proapoptotisch (Elmore 2007). Daraufhin werden zwei Hauptgruppen proapoptotischer Proteine aus den Mitochondrien freigelassen (u.a. Cytochrom C), die den caspase-abhängigen mitochondrialen Signalweg aktivieren. Cytochrom C formt das Apoptosom, indem es Apaf-1 sowie Procaspase-9 bindet. Dieses Apoptosom initialisiert die Caspasekaskade, die zu Protein- und DNA-Inaktivierung führt (Roos and Kaina 2012).

Der Exekutionssignalweg beginnt mit Caspase-3. Caspasen besitzen proteolytische Aktivität und sind in der Lage Proteine an Aspartatsäureresten zu spalten. Es scheint so zu sein, dass, sobald erst einmal die Aktivierung der Caspasen stattgefunden hat, keine Möglichkeit mehr besteht, den Zelltod zu umgehen (Cohen 1997). Bis heute wurden zehn wichtige Caspasen entdeckt, die eingeteilt werden in Initiator- (Caspase-2, -8, -9, -10), Exekutions- (Caspase-3, -6, -7) und Entzündungscaspasen (Caspase-1, -4, -5) (Rai, Tripathi et al. 2005).

### **2.2.4. Doppelstrangbrüche**

Als bester Marker für eine Zerstörung von Zellen gelten DNA-Doppelstrangbrüche, die den Zelltod induzieren können, da sie bei fehlerhafter bzw. gar nicht vorhandener Reparatur den signifikant größten Schaden in der DNA darstellen (Jeggo and Lobrich 2007). Aus diesem Grund wurde über die Anzahl an Doppelstrangbrüchen auf den in der Therapie verursachten Schaden an Tumorzellen geschlossen. Energiereiche elektromagnetische Strahlung (z.B. Röntgen-Strahlung) und Teilchenstrahlung (z.B.  $\alpha$ -Strahlung) sind fähig die Bildung von Kationen hervorzurufen, indem Elektronen aus dem Molekülverband befreit werden, die lokale chemische Reaktionen nach sich ziehen. Indirekt wird durch Bildung freier aggressiver Sauerstoffradikale der Doppelstrangbruch induziert. Darüber hinaus führt die Bestrahlung mit Röntgen- bzw.  $\alpha$ -Strahlung auch zu direkter Auslösung von Doppelstrangbrüchen (Rassow

2006 ). Wird nun ein solcher Doppelstrangbruch hervorgerufen, stoppt die Zelle den Zyklus an den Kontrollpunkten (Checkpoints) und versucht den Schaden zu beheben, was falls nicht möglich zu Instabilität, Apoptose oder Zellzyklusarrest führt (Hakem 2008).

### **2.2.5. $\gamma$ H2Ax**

H2Ax gehört zu einer der fünf Gruppen von Histonen (H1, H2A, H2B, H3, H4), die für die Verpackung und Ordnung von eukaryoter DNA in Chromatin zuständig sind (Bonner, Redon et al. 2008). Aus DNA und Histonen sind die Nukleosomen organisiert, die die Basisuntereinheit des Chromatins bilden. Sie sind 11nm im Durchmesser und bestehen im Kern aus insgesamt acht Proteinen (H2A, H2B, H3 und H4), von denen jedes zweimal vorkommt (Bartova, Krejci et al. 2008). Um dieses Histonoktamer schlingt sich ein 146bp langes Stück der DNA-Doppelhelix, die so gegen Scherkräfte geschützt ist und im Zellkern bequem Platz findet. Durch die positive Ladung der Histone, die aus einem hohen Anteil der basischen Aminosäuren Lysin und Arginin resultiert, wird eine Anlagerung der negativ geladenen Phosphatreste der DNA an den Histonkomplex erreicht. Die ein- und ausgehende DNA zwischen den Nukleosomen aus ca. 80 bp wird Linker-DNA genannt und durch die Histonklasse H1 organisiert. N-terminale Aminosäuren am Ende des Histonoktamers können z.B. phosphoryliert, acetyliert und methyliert werden, um eine Regulation der Chromatinstruktur zu ermöglichen (Rassow 2006 ). H2Ax ist ein Histon, das im Zuge von DNA-Doppelstrangbrüchen phosphoryliert und zum  $\gamma$ H2Ax wird. Dadurch findet ein Chromatinstrukturierungsprozess statt und weitere reparaturspezifische Proteine werden aktiviert. Als Ursache lässt sich dies zurückführen auf ionisierende Strahlung, die das Histon am Serin 139 phosphoryliert oder auf Phosphorylierung durch die rekrutierten Proteine ATM, DNA-PK und ATR (Hakem 2008). Es lässt sich mit dem  $\gamma$ H2Ax- Antikörper nachweisen und kann so als guter Marker für den Nachweis von Doppelstrangbrüchen eingesetzt werden (Rogakou, Pilch et al. 1998), was in den Versuchen zur Quantifizierung der DNA-Schäden genutzt wurde.

## **2.3. Strahlungsarten**

Röntgen-,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Strahlung sind mittlerweile gut untersuchte Strahlungsarten, wobei Röntgen- und  $\alpha$ -Strahler hier näher erläutert werden.

### 2.3.1. $\alpha$ -Emitter

Die Gruppe der  $\alpha$ -Emitter, deren Partikel aus zwei Protonen und zwei Neutronen also Heliumkernen bestehen, geraten nun ebenfalls zunehmend in den Fokus der Forschung und bieten ein weites Feld an interessanten Nukliden für einen therapeutischen Einsatz (Kim and Brechbiel 2012). Diese Substanzen, wie  $^{213}\text{Bi}$  (Bismut) und  $^{211}\text{At}$  (Astat), unterscheiden sich von den  $\beta$ -Partikeln in einer geringeren Reichweite im Gewebe (ca. 50-100 $\mu\text{m}$ ) und einem höheren linearen Energietransfer (ca. 100keV/ $\mu\text{m}$ ). In diesen Eigenschaften wurde ein Vorteil in der Erzielung von Doppelstrangbrüchen in der DNA festgestellt, da bei niedrigem linearem Energietransfer viel höhere Dosen für vergleichbare Ergebnisse appliziert werden müssen (Sgouros, Roeske et al. 2010). Daneben wurde im Vergleich zwischen  $^{213}\text{Bi}$  und dem  $\beta$ -Strahler  $^{177}\text{Lu}$  (Lutetium), die an das Somatostatin-Analogon DOTATOC gekoppelt wurden, in vitro bei SSTR-positiven Capan-2 Zellen für das  $^{213}\text{Bi}$  eine ungefähr viermal so hohe Auslösung von Apoptose beobachtet (Nayak, Norenberg et al. 2005). 10-50  $\alpha$ -Partikel können schon bei Durchquerung des Zellkerns ausreichen letale DNA-Schäden zu verursachen (Sgouros 2008), sodass trotz vorhandener Resistenzen gegen Radio- und Chemotherapie Tumorzellen abgetötet werden können (Friesen, Glatting et al. 2007). Dies gilt besonders für disseminierte Tumorzellen und kleine Tumorzellcluster (Sgouros 2008). An verschiedenen malignen Neoplasieformen liegen präklinische Untersuchungen über die Wirkungsweise von  $^{213}\text{Bi}$  Peptid- oder Antikörperkonjugaten vor, wie beim Magenkrebs vom Typ HSC45-M2 (Seidl, Schrock et al. 2005), beim Blasenkarzinom (Pfof, Seidl et al. 2009), bei Peritonealkarzinose (Drecoll, Gaertner et al. 2009) oder bei Leukämie (Friesen, Glatting et al. 2007). Das Einsatzgebiet von  $^{213}\text{Bi}$  beschränkt sich nicht nur auf Tumore, wie beim Einsatz von  $^{213}\text{Bi}$  im Rahmen einer Radioimmuntherapie gegen bakterielle, virale, parasitäre oder fungoide Infektionen am Mausmodell gezeigt wurde (Dadachova and Casadevall 2006). Auch in klinischen Studien wurde die Tauglichkeit verschiedener  $\alpha$ -Strahler beim Melanom (Raja, Graham et al. 2007), dem malignen Gliom (Zalutsky, Reardon et al. 2008) und beim Ovarialkarzinom (Andersson, Cederkrantz et al. 2009) erfolgreich geprüft.

Für die Zukunft der Therapie mit  $\alpha$ -Strahlern sind die Substanzen  $^{225}\text{Ac}$  (Actinium) mit einer Halbwertszeit von 10d und das Tochternuklid  $^{213}\text{Bi}$  mit einer Halbwertszeit von 46min als besonders erfolgversprechend zu bezeichnen (Apostolidis, Molinet et al. 2005).  $^{225}\text{Ac}$  kann im Institut für Transurane (Karlsruhe, Deutschland) aus  $^{229}\text{Th}$  gewonnen werden und in Form des Generators als Quelle für die  $\alpha$ -Therapie genutzt werden, die  $^{213}\text{Bi}$  produzieren kann.  $^{225}\text{Ac}$  zerfällt über  $\alpha$ -Emittierung zu  $^{221}\text{Fr}$  (Francium; HWZ: 4,8min), aus dem wiederum unter  $\alpha$ -Zerfall  $^{217}\text{At}$  mit der Halbwertszeit 32ms entsteht. Nach diesem folgt bei  $\alpha$ -Abgabe  $^{213}\text{Bi}$  (HWZ: 46min).  $^{213}\text{Bi}$  zerfällt unter  $\alpha$ -Emission zu  $^{209}\text{Tl}$  (Thallium; HWZ: 2,2min) und  $\beta$ -Zerfall

zu  $^{213}\text{Po}$  (Polonium; HWZ:  $42\mu\text{s}$ ). Aus diesen beiden Elementen wird im umgekehrten Zerfallsmuster  $^{209}\text{Pb}$  (Blei, HWZ: 3,25h). Unter Freisetzung von  $\beta$ -Strahlen ergibt sich stabiles  $^{209}\text{Bi}$  (Abb.2).

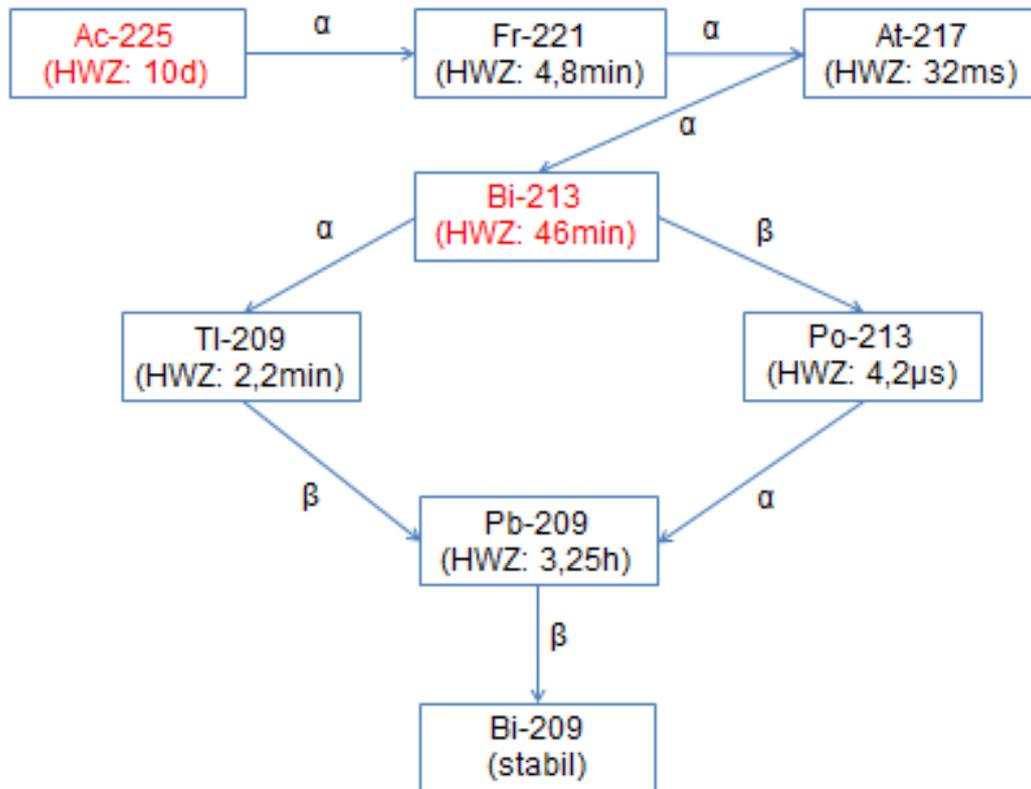


Abb. 2: Schematische Darstellung des Zerfalls von  $^{225}\text{Ac}$  über  $^{213}\text{Bi}$  zu  $^{209}\text{Bi}$  modifiziert nach C.Seidl (Nuklearmedizinische Klinik München)

### 2.3.2. Röntgenstrahlen

Röntgenstrahlen gehören im klinischen Alltag innerhalb der Diagnostik und Therapie zum Standardrepertoire jedes Krankenhauses. Die Kombination von Radiotherapie mit  $\alpha$ -Strahlern wurde an peripheren Blutlymphozyten durchgeführt, wobei ein synergistischer Effekt nachgewiesen werden konnte (Staaf, Brehwens et al. 2012). Im Vergleich mit Röntgenstrahlung wurde bei Anfärben der Doppelstrangbrüche (DSB) für die  $\alpha$ -Qualität eine langsamere Reparatur mithilfe des Histons  $\gamma\text{H2Ax}$  (Schmid, Dollinger et al. 2010) und eine höhere Komplexität der Doppelstrangbrüche festgestellt (Goodhead 2006). In der Tat wurde auch schon in Glioblastomzellen ein langsamerer Rückgang der  $\gamma\text{H2Ax}$ -Foci bei  $\alpha$ -Strahlern als bei Strahlen mit niedrigem Energietransfer beobachtet (Barazzuol, Jena et al. 2012).

### 3. Ziel der Arbeit

Bei Patienten mit Karzinomen im Kopf-/Halsbereich ist die Behandlung limitiert durch die Resistenz der Tumorzellen gegenüber Bestrahlung und dem Nebenwirkungsprofil konventioneller Heilmethoden, weswegen neu entwickelte Kombinationstherapien hier weiterhelfen können.  $\alpha$ -Emitter werden in der Forschung immer interessanter aufgrund ihres starken linearen Energietransfers und ihrer kurzen Reichweite im Gewebe. Zielgerichtete Therapie und die geringe Reichweite machen sie auch zur Option im Bereich von Tumoren mit sensiblen Nachbarstrukturen wie bei HNSCC. Den Angriffspunkt der Therapie stellt der EGF-Rezeptor dar, an den die Antikörper Matuzumab bzw. Cetuximab binden.

In dieser Arbeit wurde bei der Zelllinie UDSCC5 untersucht, inwiefern Matuzumab gekoppelt an das  $\alpha$ -emittierendes Isotop  $^{213}\text{Bi}$  in vitro eine Wirkungsverbesserung im Vergleich zur Behandlung mit Röntgenstrahlung zeigt. Nach Behandlung mit den Immunkonjugaten wurden daher Zelltod, Zellüberleben, Doppelstrangbrüche, Proliferation und Zellzyklusarrest analysiert. Daneben wurde die Expression von Schlüsselproteinen im EGFR-Signalweg, der DNA-Reparatur und der Apoptose im Western-Blot untersucht. Ziel war die Analyse des  $\alpha$ -Emitters als Behandlungsart hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung sowie der Vergleich von  $\alpha$ - und Röntgenstrahlung.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Materialliste

Antikörper:

EGFR-Antikörper: Matuzumab (EMD72000, MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland)

Fluoresceinithiocyanat (=FITC) IgG: Goat x Mouse IgG Fluor  
(Millipore, Merck, Darmstadt, Deutschland)

$\gamma$ H2Ax-Antikörper: Mouse monoclonal IgG1 (Millipore, Merck, Darmstadt, Deutschland)

Auswertungsprogramme:

Definiens Enterprise Image Intelligence Suite (Definiens, München, Deutschland)

Axiovision Zeiss (AXIOVision Rel. 4.8, Zeiss, Jena, Deutschland)

FACSDiva software (Ver. 6.1.1, BD Biosciences)

Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation)

Microsoft Office Word (Microsoft Corporation)

Chemikalien:

Ethanol: Merck, Darmstadt, Deutschland

Methanol: Merck, Darmstadt, Deutschland

DAPI: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2% Paraformaldehyd: Fischer, Saarbrücken, Deutschland

4% Formaldehyd/PBS: Fischer, Saarbrücken, Deutschland

Chelator: CHX-A<sup>-</sup>-DTPA (Macrocyclics, USA, cGMP)

Reinstwasser (18,2 MOhm), gewonnen aus der Anlage Milli-Q UF-Plus (Millipore) mit dem Aufbereitungsmodul der Fa. 'MembraPure' (#193-0005)

<sup>213</sup>Bi gewonnen aus <sup>225</sup>Ac/<sup>213</sup>Bi Generator des Instituts für Transurane der Europäischen Kommission

HCL

NaI (NaI: 98,5% A.C.S Reagenz, Aldrich)

Ascorbinsäure (40 mg/ml) (L-ascorbic acid Sigma-Ultra):

Ammonium-Acetat ( $C_2H_7NO_2$ , min. 98%, Sigma-Ultra) Tri-Na-Citrat: (Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck)

Geräte:

Apotome (Zeiss Vision, Jena, Deutschland)

Zentrifuge (Megafuge 1.0 R Heraeus, Hanau, Deutschland)

Amicon Rührzelle (Modell 8003 - Millipore)

N<sub>2</sub>-Flasche

<sup>225</sup>Ac/<sup>213</sup>Bi Generator des Instituts für Transurane der Europäischen Kommission

Gamma-Counter Typ 1480 Wizard TM 3 (Wallac, Finnland)

Handcontamat

Röntgengerät der Strahlentherapie im Zentrum für präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Firma Gulmay)

Konfokales Immunfluoreszenzmikroskop Helmholtzzentrum (Axio Imager.Z1, Zeiss, Jena, Deutschland)

FACSCanto-II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)

Medium:

DMEM (Biochrom, Berlin, Deutschland)

FKS Fötales Bovines Serum (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Trypsin (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Accutase (PAA Laboratories, Österreich)

Gefriermedium (Recovery Cell Culture Freezing Medium, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Sephadex G-25 Medium

Vectashield: Vector (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA)

Puffer:

PBS: Dulbecco PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

NaCl/NaHCO<sub>3</sub> + NaCl/NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

EDTA Lösung

#### Sonstiges:

ITLC-Papierstreifen (Instant Thin Layer Chromatography; Silica Gel Impregnated Glass Fiber, Pall)

PD-10 Gelfiltrationssäule: (GE Healthcare)

Steribox

Kühlpads

Petrischalen (Greiner Bio-one, Österreich)

Parafilm (Menasha, WI, USA)

Nagellack (P2 Color, Victim, DM Drogerie)

Objekträger: Superfrost plus (Menzel, Braunschweig, Deutschland)

#### Statistik:

Excel (Microsoft Corporation)

GraphPad Prism5 (Graphpad Software, Inc)

#### Zellen:

UDSCC5: Universität Düsseldorf, Professor Dr. Bier, Hals-Nasen-Ohren-Klinik

#### Zellkultur:

Kulturflaschen mit Filterdeckel: Cellstar (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

2ml, 5ml, 10ml, 25ml-Pipetten (Greiner, Bio-one, Frickenhausen, Deutschland)

Aspirationspipette 2ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Einfriertubus: Cryo Tubes (Nunc, Deutschland)

Zentrifugengeeignete Cups (Cups Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Deckgläser: 18x18 mm (Marienfeldt, Deutschland)

Six-Well-Platten: Cellstar (Greiner, Bio-one, Deutschland)

Zellcounter (Countess, Invitrogen)

## 4.2. Zellkultur der HNSCC-Zellen

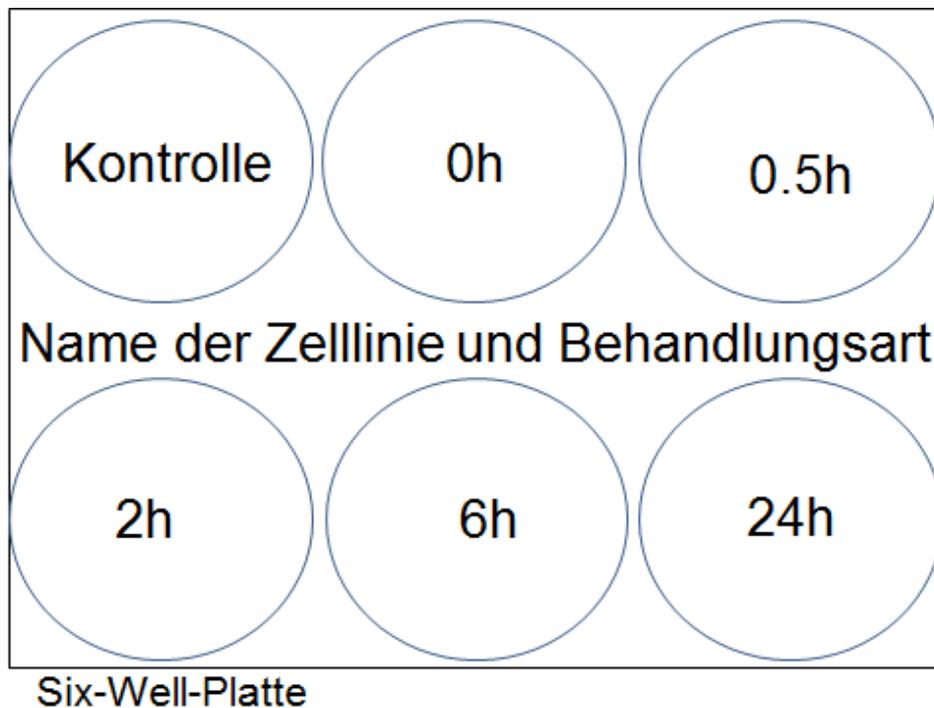
Die Zelllinie UDSCC5 wurde verwendet und mit dem Medium DMEM mit zehn Prozent FKS in Kulturflaschen vor Beginn eines Versuches mehrfach passagiert. Zur Zellkultur wurden Kulturflaschen mit Filterdeckel verwendet, die in einem Zellinkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchtigkeit gelagert wurden. Sterile 2ml, 5ml, 10ml und 25ml-Pipetten wurden benutzt. Alle Arbeiten fanden ausschließlich an einer sterilen Werkbank mit konstantem laminarem Luftstrom statt.

Sobald ein gleichmäßiger Zellrasen bei Kontrolle unter dem Mikroskop erreicht war, wurde bei den Zellen das alte Medium mit 2ml-Pipetten abgesaugt und mit PBS bei 37°C einmal gewaschen. Dabei wurden neue vorbeschriftete Kulturflaschen mit 25ml Medium und zentrifugengeeignete 50ml Cups vorbereitet, in die 10ml Medium vorgegeben wurde. Mit 10ml Accutase bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellen innerhalb von 10-15 Minuten vom Flaschenboden abgelöst, durch Zugabe von 20ml Medium (DMEM mit zehn Prozent FKS) geblockt, durchgemischt und in die Cups resuspendiert. Die Cups wurden im Milieu von 37°C bei 1300 U/min drei Minuten lang zentrifugiert. Hierauf wurde das Medium der Cups bis auf das Zellpellet abgesaugt und 4ml frisches Medium hinzugegeben. Das ganze wurde gemischt, resuspendiert und jeweils 1ml daraus in die neuen Kulturflaschen pipettiert. Die Kulturflaschen wurden dann im Brutschrank der Zellkultur bei 37°C inkubiert.

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen mit 10ml Accutase abgelöst und die Cups bei 1300 U/min in der Zentrifuge pelletiert. Das Einfriermedium wurde schon eine Stunde vorher auf Eis aufgetaut und die Einfriertubi bereitgestellt. Diese wurden gekennzeichnet mit Namen, Zelllinie und Datum und anschließend die Beschriftung mit durchsichtigem Klebeband verstärkt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Medium wiederum abgesaugt und 1,5ml des Einfriermediums auf das Zellpellet der Cups gegeben, gemischt und in die Einfriertubi suspendiert. Die Einfriertubi wurden zuerst kurz bei -20°C gelagert bis das Medium gefroren war und über Nacht in den Gefrierschrank bei -80°C gegeben. Am darauffolgenden Tag wurden die Einfriertubi zur Endlagerung in den Stickstofftank bei -196°C gebracht.

Zur Verwendung der Zellen wurden die Einfriertubi unter warmem Wasser aufgetaut, unter der sterilen Werkbank in zentrifugengeeignete Cups umgefüllt, zentrifugiert und das überschüssige Medium abpipettiert. Frisches DMEM Medium bei 37° wurde hineingegeben, mit dem Pellet gemischt und in Kulturflaschen gefüllt, die schon mit 20-25ml Medium versehen waren. Nach 2-3 Subkultivierungen konnten die Zellen für die Versuche ausgesät werden, was angesichts der starken Adhäsion der Zellen ohne Probleme funktionierte. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen sich einschichtig und nicht zu dicht auf den

Deckgläsern anordneten. Die verschiedenen Kerben der Six-Well-Platten wurden beschriftet (Abb. 3).



**Abb. 3: Schema der Aussaat auf der Six-Well-Platte**

In jede dieser Kerben wurde ein Deckgläschen platziert. Die Deckgläschen wurden vorher mit Alkohol besprüht und mit dem Bunsenbrenner abgeflammt, um ein steriles Aussäen der Zellen zu gewährleisten. Wie beim Kultivieren wurde hierbei auch mit 10ml Accutase bzw. Trypsin die Ablösung der adhärennten Zellen aus den Kulturflaschen für die Aussaat erreicht und in 50ml Cups mit dem Verhältnis Trypsin/Accutase zu Medium von 1:2 gegeben. Auf jedem Deckglas wurden 250.000 Zellen am Vortag ausgesät, nach 2h im Brutschrank jede Kerbe der Six-Well-Platten mit 2ml frischem Medium bei 37° aufgefüllt und bis zum darauffolgenden Tag im Brutschrank inkubiert.

### **4.3. Antikörper-Bindungstest**

Um herauszufinden, wieviel von einer zugegebenen Menge an  $^{213}\text{Bi}$ -markierten EGFR-Antikörper (Matuzumab) wirklich an die Zellen bindet, bediente man sich eines Antikörperbindungstests in Dreifach-Ansätzen. Das Verfahren richtete sich hierbei nach Nikula et al., 1999 (Nikula, McDevitt et al. 1999) und wurde hier nur geringfügig modifiziert. Für jeden Ansatz wurden  $3 \times 10^6$  Zellen in 500 $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium (siehe Zellkultur 2.2.) 30 Minuten lang mit 37kBq  $^{213}\text{Bi}$ -markiertem Antikörper bei 4°C (auf Eis) gelagert. Nach der Zugabe von 500 $\mu\text{l}$  PBS zentrifugierten die Zellen bei 1200rpm für 3 min und der Überstand wurde anschließend abpipettiert. Das zurückgebliebene Zellpellet wurde wiederum mit 500 $\mu\text{l}$  PBS gewaschen, nochmal zentrifugiert und der Überstand in einen zusätzlichen Messbehälter hineingegeben. Von allen abpipettierten Überständen und Zellpellets wurde die Aktivität einzeln im  $\gamma$ -Counter Typ 1480 Wizard TM 3® (Wallac, Finnland) gemessen. Zuletzt konnte die gemessene in den Zellpellets verbliebene Aktivität als prozentualer Anteil an der Gesamtaktivität berechnet werden.

### **4.4. Versuchsdurchführung Immunfluoreszenz**

#### **4.4.1. Bindung zwischen $^{213}\text{Bi}$ und EGFR-Antikörper**

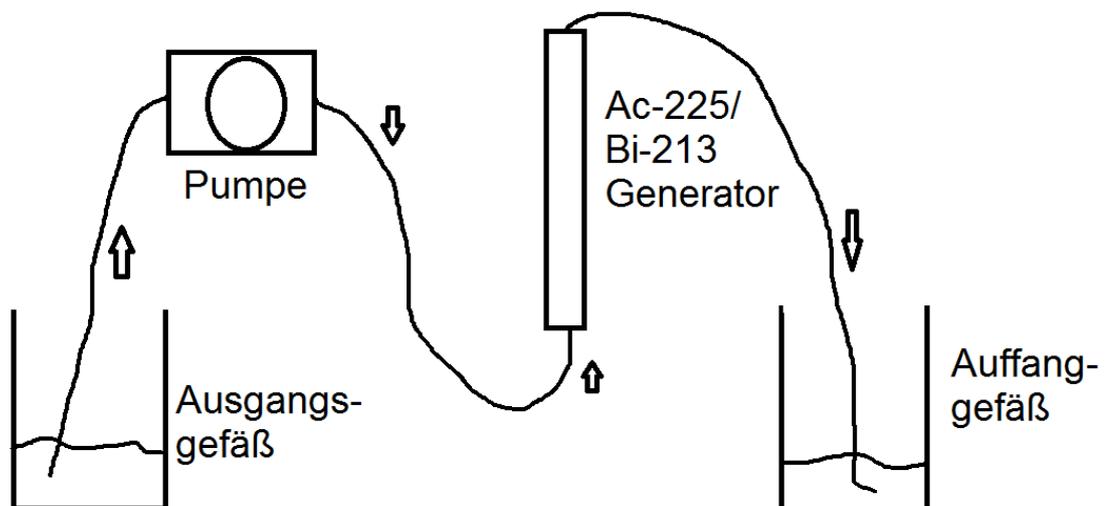
##### **4.4.1.1. Chelatierung des Anti-EGFR Antikörpers Matuzumab mit CHX-A<sup>4</sup>-DTPA**

Der EGFR-Antikörper wurde zunächst an den Chelator CHX-A-DTPA (Macrocyclics, USA, cGMP) gekoppelt. Dabei war darauf zu achten, dass mit metallfreien Pufferstammlösungen gearbeitet wurde, um eine Anlagerung von Metallionen an das Chelat zu verhindern. Die Pufferstammlösungen wurden somit in mehreren Schritten aufgereinigt und wenn erforderlich anschließend der gewünschte PH-Wert eingestellt. Zur Durchführung der Chelatierung wurden zwei Puffer (NaCl/NaHCO<sub>3</sub> + NaCl/NaC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) und eine EDTA-Lösung vorbereitet. Vor der Chelatierung wurde die Amicon Rührzelle (Modell 8003 - Millipore) bereitgestellt und alle Teile der Rührzelle, die Kontakt mit dem Antikörper bzw. Chelat hatten, von Proteinresten gereinigt. Die Rührzelle wurde in ein Druckgehäuse gestellt und ihr Deckel mit einer N<sub>2</sub>-Flasche verbunden. Nach einer kurzen Druckbefüllung mit Reinstwasser durch die Membran der Rührzelle wurde in diese eine verdünnte EDTA-Lösung gegeben und für kurze Zeit unter Rühren zur Chelatierung noch freier Metallionen inkubiert. Nach fast vollständiger Verdrängung der EDTA-Lösung mithilfe von N<sub>2</sub>-Druck wurde mit der schrittweisen Pufferung

des Antikörpers mit dem Ziel der Hinführung in ein leicht basisches Milieu, um das Risiko eines Ausfällens des Antikörpers zu senken, begonnen. Am Ende der Pufferung wurde eine Lösung mit dem Chelator CHX-A-DTPA zum hochkonzentrierten Antikörper in die Rührzelle gegeben und längere Zeit inkubiert. Daraufhin folgten noch mehrere Konzentrationsschritte und eine Pufferung in ein neutrales Milieu. Das schlussendlich hergestellte Konzentrat wurde dann in einem metallfreien Gefäß bei 4°Celsius gelagert.

#### 4.4.1.2. Markierung des chelatierten EGFR-Antikörpers mit dem $\alpha$ -Emitter $^{213}\text{Bi}$

$^{213}\text{Bi}$  wurde aus dem  $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$  Generator des Instituts für Transurane der Europäischen Kommission Karlsruhe gewonnen. Ein zu- und abführender Schlauch wurde mit dem Generator verbunden und an deren Enden zwei Gefäße angebracht. Zwischen dem Ausgangsgefäß und dem Generator wurde eine Pumpe zwischengeschaltet, um einen Durchfluss zu ermöglichen. Zum Verständnis der Eluierung anbei der Aufbau in einer schematischen Darstellung (Abb.4).



**Abb. 4: Schematischer Aufbau der Eluierung von  $^{213}\text{Bi}$  und der Bindung von  $^{213}\text{Bi}$  an Matuzumab**

Als Vorlauf wurde vor jeder neuen Eluierung 0,01M HCl zur Spülung durch den Generator 1,1GBq (30mCi)  $^{225}\text{Ac}$  gepumpt. Kurz bevor mit der Eluierung gestartet wurde, wurde das HCl über die Pumpe beseitigt. 0,6ml einer Lösung aus je 0,3ml 0,2M NaI und 0,2M HCl wurde nun angehängt und mit langsamer Geschwindigkeit von der Pumpe durch den

Generator getrieben. Das im Generator aus  $^{225}\text{Ac}$  zerfallene, freie  $^{213}\text{Bi}$  wurde so von der durchlaufenden Flüssigkeit in Form der Bi-Iodid Ionen  $\text{BiI}_4^-/\text{BiI}_5^{2-}$  herausgelöst und in das Auffanggefäß geleitet. In diesem befanden sich vor der Zugabe der gewonnenen  $^{213}\text{Bi}$ -Ionen je 0,1ml Ascorbinsäure und  $\text{NH}_4$ -Acetat. Daraufhin wurde in die 0,8ml des Gemisches im Ansatz 200 $\mu\text{l}$  des chelatierten EGFR-Antikörpers (200 $\mu\text{g}$  in ca. 25 $\mu\text{l}$  eines Puffers) zugegeben. Sieben Minuten die Kopplung zwischen dem mit dem Antikörper beladenem CHX-A-DTPA Chelat und  $^{213}\text{Bi}$  in Form des  $\text{Bi}^{3+}$ -Ions abgewartet. Zur Kontrolle der gelungenen Bindung zwischen Antikörper und Nuklid wurden 10 $\mu\text{l}$  abpipetiert und in ein Probengefäß mit 990 $\mu\text{l}$  PBS (1:100) überführt. Es wurden sechs Kunststoffröhrchen als Messproben vorbereitet, E $\gamma$ , Ea, Ee, P $\gamma$ , Pa, Pe. 2  $\mu\text{l}$  aus dem Inhalt des Probengefäßes wurden in 0,5ml PBS des Kunststoffröhrchens E $\gamma$  weiter verdünnt. In ein 50ml ‚Orange-Cap‘ Kunststoffröhrchen wurde zur Vorbereitung auf den nächsten Schritt 0,6ml Tri-Na-Citrat Laufpuffer pipettiert. Weitere 2 $\mu\text{l}$  aus dem Probengefäß wurden auf das eine vorher markierte Ende eines ITLC-Papierstreifens (0,5 x 7cm), jedoch ca. 1cm vom Ende des Papierstreifens entfernt aufgetragen, sodass der Auftragungspunkt beim anschließenden Stellen des Streifens in das ‚Orange-Cap‘ Kunststoffröhrchen nicht mit dem darin enthaltenden Laufpuffer in Berührung kam. Der Laufpuffer ließ beim Hochsteigen gebundenes  $^{213}\text{Bi}$  am Ursprungsort zurück und trieb innerhalb von vier Minuten freie  $^{213}\text{Bi}^{3+}$ -Ionen an das Ende des Papierstreifens. Der ITLC-Papierstreifen wurde in der Mitte durchtrennt, der Teil mit dem gebundenen  $^{213}\text{Bi}$  zur Messung in das Ea-Röhrchen und der Teil mit den freien  $^{213}\text{Bi}^{3+}$ -Ionen in das Ee-Röhrchen gestellt. Die Messung der mit E $\gamma$ , Ee, Ea bezeichneten Röhrchen wurde auch Messung vor der Säule genannt.

Als nächstes wurde freies  $^{213}\text{Bi}$  über eine PD-10 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) herausgefiltriert, worauf zuerst 20ml PBS zur Spülung gegeben wurde. In der Säule befand sich Sephadex G-25 Medium, das so aufgereinigt wurde. Das Sephadex G-25 Medium konnte innerhalb der Säule ein Volumen von 2500 $\mu\text{l}$  fassen. Somit wurden anschließend zusätzlich zu den ca. 800 $\mu\text{l}$  Ansatz weitere 1700 $\mu\text{l}$  PBS auf die Säule pipettiert, was zu einer Verdrängung der exakten Menge führte, die vorher in der Säule war. 2000 $\mu\text{l}$  PBS wurden wiederum auf die Säule gegeben, die zu einer Auswaschung von 2000 $\mu\text{l}$  des Ansatzes und zum größten Teil dessen hochmolekularer Substanzen (gebundenes  $^{213}\text{Bi}$ ) aus der Säule führten, was die strukturellen Eigenschaften des Säulenmediums ermöglichten. Niedermolekulares, also freies  $^{213}\text{Bi}$ , verblieb in der Säule. Analog zur Beschreibung bei den E-Röhrchen wurde nun auch aus diesem finalen Eluat 10 $\mu\text{l}$  gewonnen und zur Probe „nach der Säule“ in das P $\gamma$ -Gefäß mit 990 $\mu\text{l}$  PBS (1:100) eingebracht. Auch die ITLC-Chromatographie wurde wie vorher beschrieben analog durchgeführt und alle sechs

Röhrchen (Ey, Ea, Ee, Py, Pa, Pe) im Gamma-Counter gemessen. Der  $\gamma$ -Counter druckte die Messungen auf Papier und die Counts konnten in Aktivität umgerechnet werden.

Gemessene Counts x 0.4875 = Aktivität in mCurie

Deutliche Unstimmigkeiten bei Vergleichen zwischen den Proben wurden hierbei sofort erkannt und so ließ sich eine gute Qualitätskontrolle durchführen. Nach der Auftrennung im Sephadex G-25 Medium sollte der Anteil an  $^{213}\text{Bi}$  gebundenen Antikörpern ca. 95% betragen. Zwischen den Eluierungen wurde immer mindestens eine Stunde gewartet, um eine ausreichend hohe Aktivität des Eluats für die Versuche zu gewährleisten.

#### 4.4.2. Behandlung der Zellen mit $\alpha$ -Emittlern

Die Arbeiten fanden alle auf einer Unterlage mit Handcontamaten zur Strahlenmessung, Handschuhen und unter einer sterilen Werkbank statt. UDSCC5 wurde zur Kombination und zur alleinigen  $\alpha$ -Therapie mit  $1\mu\text{Ci/ml}$  des an  $^{213}\text{Bi}$  gekoppelten EGFR-Antikörpers behandelt. Die benötigte Konzentration des alpha-Strahlers wurde unter Berücksichtigung des Zerfallsgesetzes für eine halbe Stunde nach Messung und das Volumen von 2ml in den Kerben der Six-Well-Platten berechnet.

$0.693 \times \text{Aktivität in mCi zum Zeitpunkt (X)} = \text{Aktivität in mCi zum Zeitpunkt (X+30min)}$

-> Anschließend Umrechnung in Becquerel

Vor Beginn der Behandlung wurde immer ein Mediumwechsel bei den am Tag vorher ausgesäten Zellen durchgeführt. Das Gefäß mit dem radioaktiv-markierten Antikörper wurde in einem Bleimantel unter der sterilen Werkbank bereitgestellt. 30min nach der Messung im laboreigenen Counter wurde die berechnete Menge außer bei der Kontrolle in jede Kerbe der Lochplatten pipettiert. Beim Kombinationsversuch mit Röntgenstrahlen wurden diese 24h bei  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank für radioaktiv-markierte Substanzen inkubiert und am nächsten Tag zur Bestrahlung mit Röntgenstrahlen gebracht. Beim Versuch mit alleiniger  $^{213}\text{Bi}$ -Behandlung wurden nach 3h Inkubation auf Eis zur Ausschaltung der Reparaturmechanismen der Zelle und um der Wirkung des  $^{213}\text{Bi}$  genug Zeit zu geben, die Six-Well-Platten mit dem Zeitpunkt 0h direkt, sowie die Kontrolle wie im Immunfluoreszenzprotokoll beschrieben fixiert. Die anderen Six-Well-Platten mit den Zeitpunkten 0.5h, 2h, 6h, 24h kamen nach einem Mediumwechsel wieder für die angegebene Zeit bis zur Fixierung in den Brutschrank zurück.

#### **4.4.3. Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlen**

Die Bestrahlung aller drei Zelllinien mit Röntgenstrahlen fand entweder im alleinigen Versuch oder in Kombination mit dem  $\alpha$ -Strahler statt, hierbei aber immer 24h nach der  $^{213}\text{Bi}$ -Behandlung. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Multhof wurde die Bestrahlung am Röntgengerät der Strahlentherapie im Zentrum für präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Firma Gulmay) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die „Six-Well-Platten“ bei beiden Versuchsanordnungen aus dem Brutschrank genommen und das Medium unter der sterilen Werkbank gewechselt, bevor die Platten bei 2Gray, 4Gy, 6Gy, 8Gy und 10Gy in verschiedenen Versuchsreihen nur mit Röntgenstrahlen und nach Vorbehandlung mit  $^{213}\text{Bi}$  bestrahlt wurden. Die gewünschte Bestrahlungsintensität wurde analog zur Dauer der Bestrahlung erreicht (z.B.: 8Gy  $\rightarrow$  6min 51s). Anschließend wurden die Zellen nach 1h bei 4°C fixiert.

#### **4.4.4. Immunfluoreszenzfärbung**

Die Immunfluoreszenzfärbung basiert auf der Sichtbarmachung von Substanzen in Zellen mittels Antikörpern, die fluoreszierende Eigenschaften besitzen. Eine quantitative Auswertung durch Immunfluoreszenzmikroskopie und somit auch ein Erstellen nachvollziehbarer Bilder wird hierbei ermöglicht. Das Assay der Immunhistochemie wurde nach dem Standardprotokoll für Färbung der  $\gamma\text{H2Ax}$ -Foci durchgeführt (Johansson, Muslimovic et al. 2011).

Die in den „Six-Well-Platten“ auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden zweimal mit PBS-Lösung (2ml/Kerbe) gewaschen und anschließend in 2ml zweiprozentiger Paraformaldehydlösung 15 Minuten lang bei Raumtemperatur fixiert. Dies erfolgte jeweils zu den verschiedenen vorher festgelegten Zeitpunkten (Kontrolle, 0h, 0.5h, 2h, 6h, 24h). Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen noch dreimal mit PBS-Lösung gewaschen und anschließend die Membran mit Methanol fünf Minuten lang bei -20°C im Gefrierschrank permeabilisiert. Darauf wurde das Methanol abgesaugt, 2ml von der schon vorher vorbereiteten PBS Lösung mit zehn Prozent FKS-Zusatz in jede Kerbe der „Six-Well-Platte“ hineingegeben und über Nacht zum Blocken im Kühlschrank belassen. Dies wurde für die Zeitpunkte 0h, 0.5h, 2h, 6h und 24h durchgeführt. Währenddessen wurde Parafilmfolie und Papier in Petrischalengröße zurechtgeschnitten. Das Papier wurde zur Sättigung der Luftfeuchtigkeit im Milieu innerhalb der Petrischale in destilliertes Wasser getränkt, um antikörpersparsames Arbeiten und ein Verdampfen der nur geringen Menge der Antikörperlösung zu verhindern. Als erstes wurde das getränkte Papier auf den Boden der

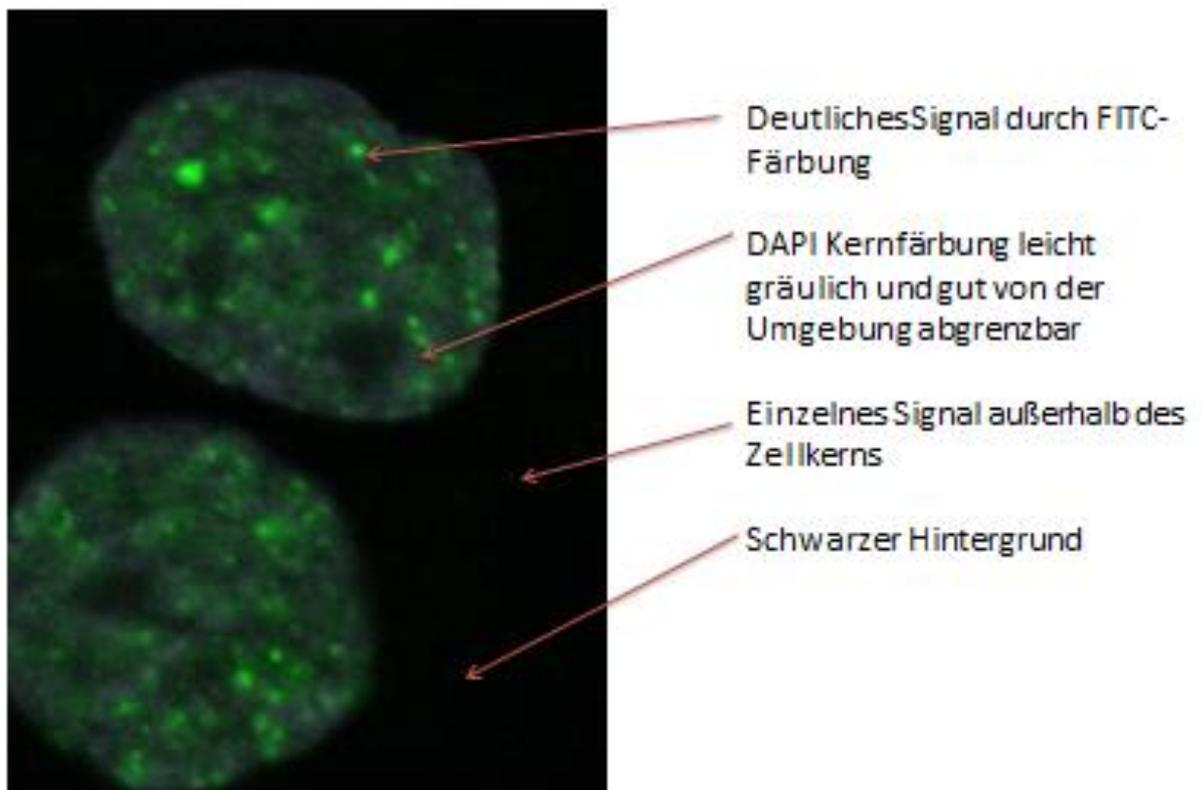
Petrischale platziert und der Parafilm mit Platz für vier Deckgläschen pro Ausschnitt darauf gelegt. Nun wurde der Mausantikörper  $\gamma$ H2Ax im Verhältnis 1:200 mit PBS, in dem zu zwei Prozent FKS enthalten war, verdünnt. Bei zwölf Ansätzen handelte es sich um die Menge von 2 $\mu$ l des Antikörpers und 400 $\mu$ l des Puffers. Tropfen von 23 $\mu$ l der Antikörperlösung wurden in der Zahl der Ansätze auf den Parafilm gegeben. Vorsichtig wurden nun die Deckgläschen aus den Six-Well-Platten mit der Seite des Zellrasens auf den Tropfen gelegt, sodass alles bedeckt war. Die Inkubationszeit betrug für diesen Teilschritt 90min. Anschließend wurden die Ansätze wieder in die Vertiefungen der Six-Well-Platten überführt und gewaschen. Der Sekundärantikörper  $\alpha$ -Mouse-IgG-FITC wurde in einer Konzentration von 11,9 $\mu$ l/ml in PBS mit zwei Prozent FKS vorbereitet. Zusätzlich wurde für die Zellkernfärbung DAPI aus einem Stock mit 0,1 $\mu$ g/ml in der Konzentration von 1 $\mu$ l/100 $\mu$ l und nach dem Schema, wie schon beim Primärantikörper  $\gamma$ H2Ax beschrieben, auf neu zugeschnittenen Parafilm aufgebracht. Die Inkubationszeit dauerte 60min und es folgte die Waschung mit PBS. Für jeweils zwei Deckgläschen wurde ein Objektträger bereitgelegt und beschriftet. Auf die Objektträger wurden danach 31 $\mu$ l des Eindeckmediums VectaShield® aufgetragen und die Deckgläschen daraufgelegt. Die Fixierung der Präparate wurde durch das Auftragen von herkömmlichem Nagellack an den Seiten erreicht.

Zum Schutz der Fluoreszenz wurden die Objektträger in lichtundurchlässigen Schachteln und bei -20°C gelagert.

#### **4.4.5 Erstellen der Fotos mit Fluoreszenzmikroskop und Bildanalyse**

Nach der Durchführung der Immunfluoreszenz wurde das Erstellen der Fotos im Helmholtzzentrum in Oberschleißheim am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1®, Zeiss, Jena, Deutschland) begonnen. Für jede Behandlungsart und jeden Zeitpunkt wurde die Anzahl von 10 Fotos mithilfe des Axiovision®-Programmes (AXIOVision Rel. 4.8®, Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen. Bei dem Objektiv handelte es sich um den C-Apochromat 40x/1.20W Korr/ DICIII beleuchtet von der Lichtquelle X-Cite 120®. Hierbei wurde auf eine repräsentative Auswahl der Fotos wertgelegt. Mithilfe des Axiovision® wurden die Filtersätze für das Zellkernsignal DAPI (blau) und für das Doppelstrangbruchsignal FITC (grün) aktiviert und die 40fache Auflösung mit Wasser als Emulsionsflüssigkeit beim Mikroskop eingestellt. Gegengefärbt wurde also mit dem Filter 49 DAPI, der Anregung 359nm und der Emission 461nm, und mit dem Filter 38 HE Green Fluorescent, der Anregung 470nm und der Emission 509nm. Das Apotome® (Zeiss Vision®, Jena, Deutschland) ermöglichte eine strukturierte Beleuchtung zum Erzeugen von Schnittbildern ähnlich konfokaler Aufnahmetechnik und wurde zur besseren Bildqualität und

Herausrechnung des Hintergrunds zugeschaltet. Für jede Versuchsanordnung wurde eine einheitliche Aufnahmezeit verwendet, die sich nach den stärksten Signalen aus den Präparaten (meistens bei 0.5h oder 2h) richtete, sodass es nicht zu einer Überbelichtung kam. Zuerst wurde auf dem FITC-Kanal ein Bild aufgenommen und anschließend im DAPI-Kanal eines erstellt. Diese beiden Bilder wurden mithilfe des Apotome® und des Axiovision® übereinandergelegt und als ZVI-Datei auf dem Computer abgespeichert (Abb.5).



**Abb. 5: Originalbild der Zelle nach Behandlung beim Fotografieren mit dem Mikroskop (Axio Imager.Z1®, Zeiss, Jena, Deutschland)**

Bildtyp: 16 Bit Graustufe

Bildgröße: 1388 \* 1040 Pixel

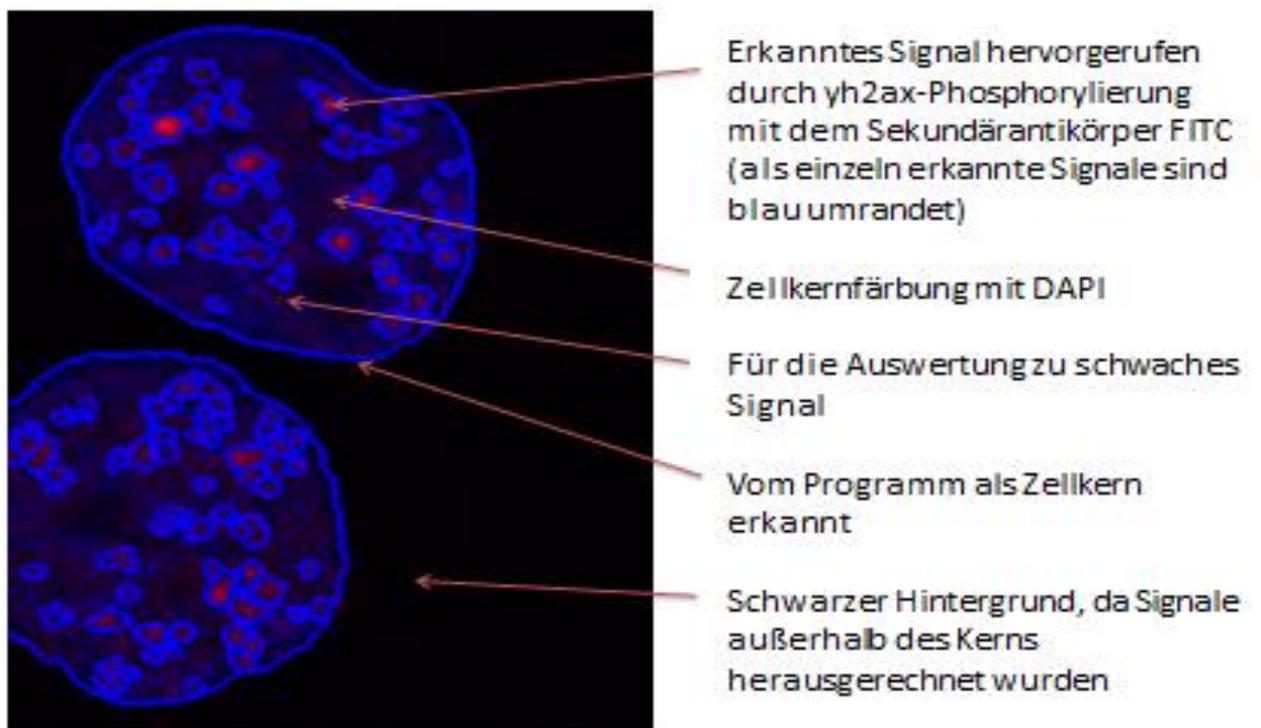
Skalierungsfaktor X: 0,16 Mikrometer/Pixel

Skalierungsfaktor Y: 0,16 Mikrometer/Pixel

Skalierungsfaktor Z: 1 Pixel/Pixel

Die Fotos wurden alle nun in das TIF-Format konvertiert und im Auswertungsprogramm Definiens Enterprise Image Intelligence Suite® (Definiens, München, Deutschland) unter der Leitung von Frau Dr. Annette Feuchtinger (Helmholtzzentrum, München, Deutschland) einer Analyse unterzogen.

Diese Technologie erlaubte eine Auswertung der Bilder anhand verschiedener Gesichtspunkte, wie eine differenzierte Skalierung, ein genau der Aufgabenstellung entsprechender Auswertungsmodus und eine merkmalsorientierte Herangehensweise (Baatz, Zimmermann et al. 2009). Definiens® quantifizierte für jedes Bild die Signalzahl, die Zellzahl, die Durchschnittssignalintensität, die Signalfäche und die gesamte Kernfläche. Aus der Zellzahl und der Signalmenge wurden anschließend die Signale pro Zelle errechnet, die dann für die finale Auswertung als Parameter unter den Bildern herangezogen wurden (Abb.6).



**Abb. 6:** Bild nach Auswertung der Signale durch das Programm Definiens Enterprise Image Intelligence Suite® (Definiens, München, Deutschland)

Die ursprünglichen Bilder wurden von Definiens in folgender Formatierung erstellt:

Breite: 1388 Pixel

Höhe: 1040 Pixel

Horizontale Auflösung: 96 dpi

Vertikale Auflösung: 96 dpi

Bittiefe: 24

## **4.5. Western Blot**

Zur Bestimmung und Untersuchung von Proteinen eignet sich besonders der Western Blot als Mittel für eine Quantifizierung und Auftrennung der aus den Zellen gewonnenen Proteinlysate.

### **4.5.1. Proteinisolierung**

Zur Proteinisolierung aus den Zellen wurde das Medium abgesaugt und mit eiskaltem PBS gespült. Nach Entfernung des PBS wurde bei einer 10cm Petrischale 500µl des frischen Zellyse-Puffers zugefügt und die Zellen nach Einwirken mittels Zellschaber abgelöst, wobei sie in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt wurden. Es erfolgte eine 15minütige Inkubation auf Eis und anschließende 15minütige Zentrifugation (10.000rpm) bei 4°C. Hierauf wurde der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß transferiert und das Lysat bei -20°C für kurze Lagerung, ansonsten bei -80°C untergebracht.

### **4.5.2. Bradford-Assay**

Die Proteine wurden auf der Grundlage des Bradford-Assays quantifiziert (Bradford 1976). Diese Methode ermöglichte mithilfe des Photometers eine Errechnung der Proteinkonzentration in den Lysaten. Dazu wurden mehrere Standardlösungen für die Kalibrierungskurve hergestellt (Tab.1).

µg BSA	µl 0,2mg/ml BSA	µl 0,01% Triton X-100
0	-	400
2	10	390
4	20	380
6	30	370
8	40	360

**Tab. 1: Western Blot - Verdünnung**

Weiter wurden die Proteinlysate in PBS 1:10 mit 100µl Volumen und das Bradford-Reagenz bestehend aus Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250, Ethanol und Phosphorsäure 1:4 in PBS mit dem Volumen abhängig von der Probenzahl verdünnt und bereitgestellt. Aus den verdünnten Proteinlysaten wurden die Probelösungen erstellt. Wie auch bei den Standardlösungen wurde hier auf ein Gesamtvolumen von 400µl geachtet, was durch die Verdünnung 20µl Lysat mit 180µl 1x PBS und die Zugabe von 200µl 0,01% Triton X-100 in 1x PBS erreicht wurde.

20µl Lysat 1:10 verd. + 180µl 1x PBS + 200µl 0,01% Triton X-100 = 400µl

600µl des 1:4 verdünnten Bradford Reagenz wurde anschließend zu den Proben- und Standardlösungen gegeben, kurz durchgemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Photometer wurde daraufhin bei den Lösungen die Extinktion bei 595nm gemessen. Anhand der Kalibrationskurve und der Berücksichtigung der Verdünnungen konnte somit die Gesamtproteinkonzentration berechnet werden.

#### **4.5.3. SDS-Gelelektrophorese**

Es folgte zur Massenauftrennung die SDS-Gelelektrophorese. Dabei wurde zur Entfaltung und negativen Aufladung der Proteine zuerst 10µg Protein mit 5x Sample Puffer (312,5mM Tris-Cl ph: 6,8, 10% SDS, 50% Glycerol, 250mM DTT, 0,05% Bromphenol-Blue) vermischt und anschließend 5min bei 98° denaturiert. Nach dem Abzentrifugieren wurde der gesamte Probenansatz auf das Polyacrylamidgel für die Elektrophorese, das in der Gelkammer aufgegossen worden war, aufgetragen und eine Spannung von maximal 120Volt angelegt. Je größer die Proteine waren, desto länger betrug die Laufzeit dieses Schrittes.

#### 4.5.4. Blotting

Nun fand ein Blotaufbau statt, bei dem über und unter dem Gel mit den Proteinen jeweils neun Whatman-Papiere gelegt wurden, die zur unteren Seite hin in Anodenpuffer und auf der oberen Seite in Kathodenpuffer getaucht wurden. Eine PVDF-Membran befand sich zwischen den unteren Whatman-Papieren und dem Gel. Die Blotzeit richtete sich nach der Größe der Proteine. Diese wurden auf die Membran mithilfe der Spannung, die senkrecht zum Blotaufbau stand, transferiert. Bei der Immundetektion wurde die PVDF-Membran mit den Proteinen nach dem Blotten und Waschen mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht auf dem Rollenmischer inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Sekundärantikörper zugegeben und für eine Stunde auf dem Rollenmischer zum Einziehen belassen. Nach mehrmaligem Waschen und Fixieren wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen. In der Dunkelkammer konnte nun die Bildgebung durchgeführt werden.

#### 4.6. Colony Formation Assay

Um den Einfluss von  $\alpha$ -Strahlern hinsichtlich Überleben und Proliferation bei einer Zelllinie untersuchen zu können, eignet sich besonders der Ansatz des Colony Formation Assay (Franken, Rodermond et al. 2006). Er gibt anhand der Koloniebildung überlebender Zellen einen Aufschluss über die Effektivität der eingebrachten ionisierenden Strahlung. Nach der Behandlung bilden proliferierende Tumorzellen Kolonien, die sich in Anzahl und Größe unterscheiden. Werden keine Kolonien gebildet, liegt diesem ein Absterben der Zelle bzw. ein Zellzyklusarrest diesem zugrunde. Die Zellen wurden von der Kulturschale, die zu 80% bedeckt war, abgelöst und gezählt, sodass die Konzentration der Zellen  $5 \times 10^3$  pro ml betrug. Aus dieser Zellsuspension wurden 100  $\mu$ l abpipettiert und die nun vorhandenen  $5 \times 10^2$  Zellen für jede Six-Well-Platte in 5ml Medium ausgesät und 24h im Brutschrank kultiviert. Eine Kontrolle wurde zur Vergleichbarkeit zusätzlich mit ausgesät. Die Behandlung der Zellen mit dem Linearbeschleuniger bzw. dem  $\alpha$ -Emitter  $^{213}\text{Bi}$ , der an den EGFR-Antikörper gekoppelt war, und der Aktivität von 37kBq pro ml erfolgte am darauffolgenden Tag, wobei davor und danach ein Mediumwechsel stattfand. Die Kombinationsbehandlung (37kBq+2Gy) wurde nur bei der Zelllinie UDSCC5 durchgeführt. Nach der Behandlung wurden die Zellen für zehn Tage im Brutschrank gelagert, um dem Effekt der Behandlung genug Zeit zu verschaffen und eine ausreichende Klonifizierung der überlebenden Zellen zu ermöglichen. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium gewechselt. Durch Zugabe von 2ml 4%igen Formalins für 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen fixiert und anschließend nach Spülung mit

2ml PBS 2ml Crystal-Violett-Lösung hinzugefügt. Die Färbung dauerte 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nun wurde die Crystal-Violett-Lösung wieder entfernt sowie die gefärbten Zellen mit Leitungswasser gewaschen. Nach Trocknen der Zellen bei Raumtemperatur wurden die Zellklone ausgezählt und die Ergebnisse ausgewertet.

#### **4.7. Flow Zytometrie**

Die Flowzytometrie war wichtig, um herausfinden zu können, in welcher Phase des Zellzyklus sich die UDSCC5-Zellen nach Behandlung befanden.

Hierzu wurden Zellen kultiviert und in den Brutschrank gelegt. Alle Analysen der Flow Zytometrie wurden mit einem FACSCanto-II flow cytometer® (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) ausgerüstet mit einem blauen (488 nm), roten (633 nm) und einem violetten (405 nm) Laser durchgeführt. Zur Datenerfassung und Analyse wurde die FACSDiva software (Ver. 6.1.1, BD Biosciences) verwendet.

Aus den kultivierten Zellen wurden nach Trypsinisierung einzellige Suspensionen herausgelöst, die dann mit eiskalten 2%-FKS-beinhaltendem PBS gewaschen wurden. Danach erfolgte eine Fixierung der Zellen und Permeabilisierung der Membran mit 70% Methanol auf Eis über 60 Minuten. Ein Verlust von Signalen bedingt durch diese Alkoholfixierung konnte aufgrund vorheriger Testexperimente ausgeschlossen werden. Zum Schluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, einer PBS-Lösung mit DAPI 1 lg/ml zugeführt und dort 15 Minuten vor der Analyse inkubiert.

#### **4.8. Statistik**

Die Immunfluoreszenzfärbung und der Colony Formation Assay wurden beide auf ihre statistische Signifikanz überprüft.

Es wurde auf eine statistische Auswertung im Sinne eines T-Tests zurückgegriffen. Dabei handelte es sich um eine zweiseitige Verteilung mit zwei Stichproben ungleicher Varianz (heteroskedastisch). Die p-Werte orientierten sich am Signifikanzniveau  $\alpha=0,05$ , d.h. sobald der p-Wert unter 5% lag wurde ein Fehler erster Art, dass nämlich die Nullhypothese irrtümlich abgelehnt wurde, ausgeschlossen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Quantifizierung der Bindung von <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-MAb-Immunkonjugaten

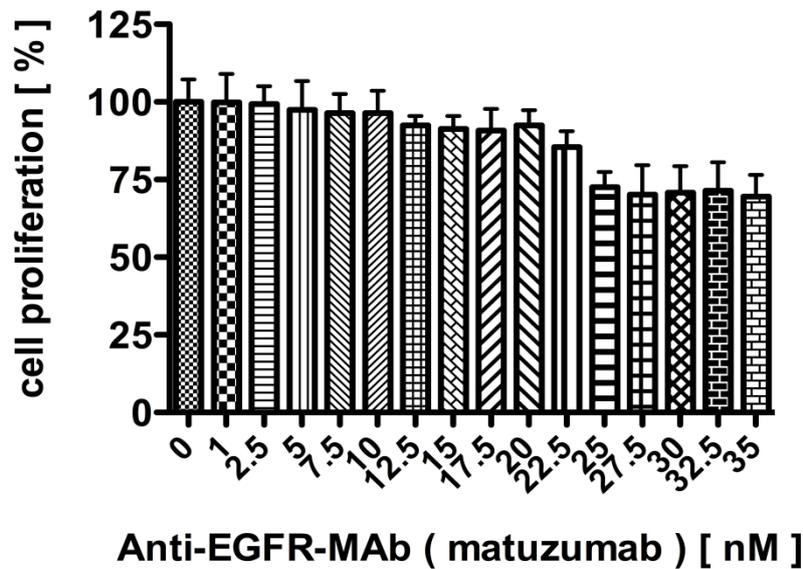
Als Erstes wurde die Bindungsfähigkeit der UDSCC5-Zellen mit <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-MAb und die Wirkungsweise von Matuzumab auf diese alleine untersucht. In einem davor durchgeführten Kontrollversuch mit unspezifischen Antikörpern und <sup>213</sup>Bi interagierten nur 1-3% mit EGF-Rezeptoren (Daten nicht anbei).

<sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-MAb-Immunkonjugate konnten mit einem Bindungsanteil von 53,7% an UDSCC5 nachgewiesen werden (Tab.2). Dies demonstriert die spezifische Bindung von <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-MAb an diese Zellen und zeigt eine vermehrte Expression von EGF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche bei diesem Tumor.

cell line	activity [ % ]
UDSCC-5	53,7

**Tab. 2: Bindungsfähigkeit der EGF-Rezeptoren von UDSCC5: <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-MAb (40ng mit einer durchschnittlichen Aktivität von 370kBq) wurde auf 3x10<sup>6</sup>-Zellen gegeben und band davon 53,7%.**

Ungelabeltes Matuzumab konnte bei UDSCC5 zwischen 1nM – 22,5nM die Proliferation der Zellen im „Crystal violet assay“ nicht signifikant beeinflussen (Tab. 3) und scheint somit kaum Wirkung auf einen Rückgang der Zellpopulation zu besitzen. Ab einer Konzentration von 25nM anti-EGFR-MAb konnte ein Rückgang der Zellproliferation beobachtet werden, der sich jedoch nicht als signifikant herausstellte. In den Experimenten wurde eine Konzentration des Matuzumabs zwischen 0,67 und 26,7nM genutzt, welche nachweislich kaum Nebeneffekte auf die Zellproliferation hatte. Somit waren die untersuchten Effekte dem <sup>213</sup>Bi zuzuschreiben.

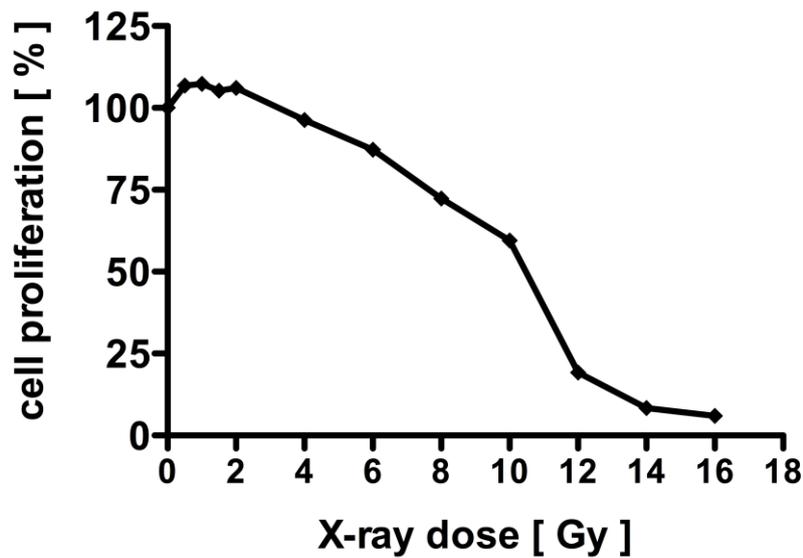


Tab. 3: Behandlung der UDSCC5-Zellen mit ungelabeltem Matuzumab.  $2.5 \times 10^4$  Zellen/well wurden in 24-well Platten 24 h vor Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von ungelabeltem Matuzumab behandelt. Zehn Tage nach der Inkubation mit anti-EGFR-MAb wurde die Proliferation anhand des Crystal violet assay untersucht.

## 5.2. Proliferationsanalyse nach Behandlung mit Röntgen- und $\alpha$ -Strahlern

Es wurde nun die grundsätzliche Frage nach der Wirkung der beiden Strahlungsarten (Röntgen-/ $\alpha$ -Strahlen) gestellt und als Basis ein „Proliferations-Assay“ durchgeführt. Dieser zeigte im „Crystal violet Assay“ bei beiden Strahlungsqualitäten nach zehn Tagen einen dosis- bzw. konzentrationsabhängigen Rückgang der Proliferation. Bei den Graphen dieser Versuchsanordnung wurde an der y-Achse das Überleben der Zellen in Prozent (cell proliferation[%]) aufgetragen und an der x-Achse die jeweilige Dosierung in Gray bzw. die Aktivität in Becquerel.

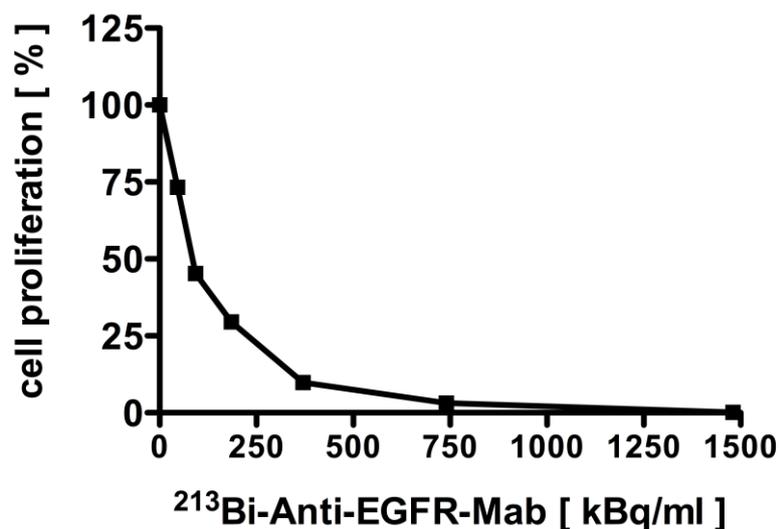
Die Behandlung mit dem Linearbeschleuniger verdeutlicht eine fast lineare Abnahme der Zellproliferation nach zehn Tagen bei Dosiserhöhung (Tab. 4). 50% der Zellen proliferierten nicht mehr zwischen 10 und 12Gy.



Tab. 4: Überleben von UDSCC5 ( $ID_{50}=11\text{Gy}$ ) nach Röntgenbestrahlung. Nach Behandlung von  $2.5 \times 10^4$  Zellen/well in 24-well-Platten wurde nach 10 Tagen die Zellproliferation im Crystal violet assay überprüft.

Anders verhielt es sich bei der Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb.

Auf der x-Achse wurde nun die Aktivität des  $\alpha$ -Emitters in kBq (=Kilobecquerel) aufgetragen. Dort fand sich bei Aktivitätserhöhung ein exponentieller Abfall der Zellproliferation nach 10 Tagen (Tab.5). Die  $ID_{50}$  lag ca. zwischen 46.25 und 92.5kBq/ml.



Tab. 5: Überleben von UDSCC5 ( $ID_{50}=100\text{kBq}$ ) nach  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb-Behandlung. Nach Behandlung von  $2.5 \times 10^4$  Zellen/well in 24-well-Platten wurde nach 10 Tagen die Zellproliferation im Crystal violet assay überprüft.

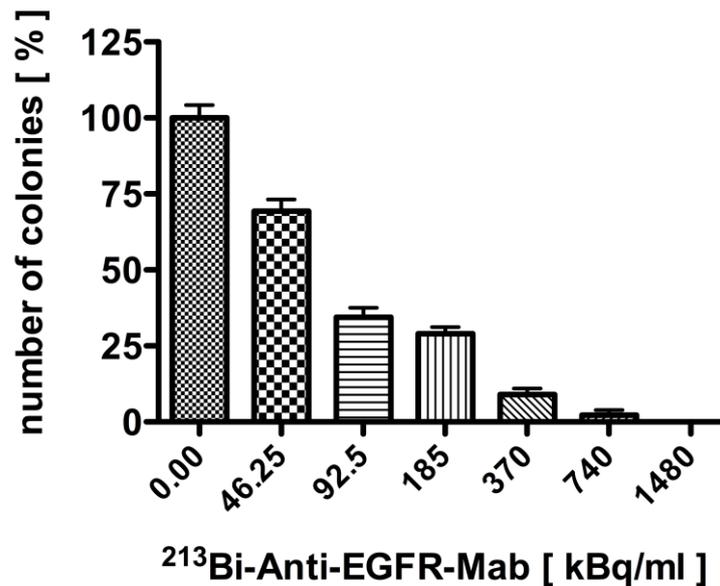
Eine Gegenüberstellung der  $ID_{50}$  von  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb-Behandlung und Röntgenstrahlung verdeutlicht die höhere Anfälligkeit von UDSCC5 auf den  $\alpha$ -Strahler: UDSCC5 ( $ID_{50}=100\text{kBq}$ ) vs. UDSCC5 ( $ID_{50}=11\text{Gy}$ )  
Insgesamt wurde ein signifikantes Ansprechen auf Röntgen- und  $\alpha$ -Strahler registriert.

### **5.3. Colony-Formation Assay**

Ähnliche Ergebnisse aus den Beobachtungen vom Proliferationsassay (5.2.) konnten im Colony-Formation Assay nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in dieser Versuchsanordnung die Kombination aus beiden Strahlungsarten angewandt. Auf der y-Achse wurde die Anzahl der Kolonien in Prozent angegeben und auf der x-Achse die jeweilige Dosis bzw. Aktivität.

#### **5.3.1. Behandlung mit $\alpha$ - bzw. Röntgenstrahlung**

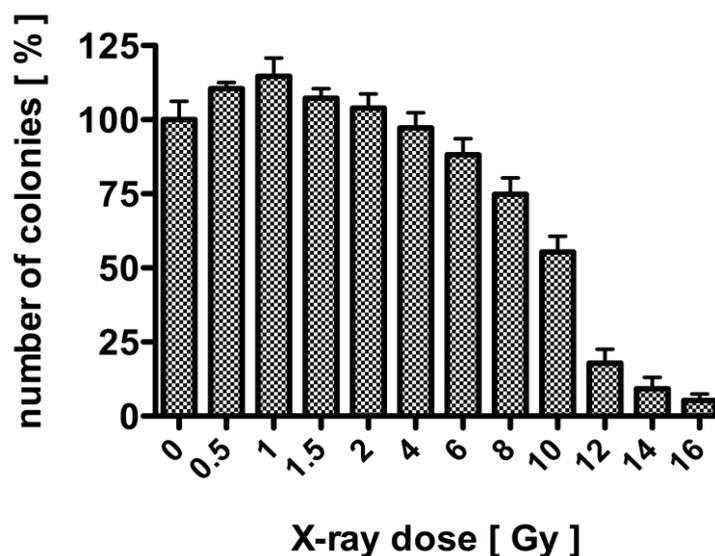
Im Colony-Formation Assay für die  $\alpha$ - und Röntgenbehandlung von UDSCC5 sind zwei Diagramme aufgeführt (Tab.6 und 7). Die Aktivität von  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb reichte von 0 kBq/ml (Kontrolle) bis zu 1480 kBq/ml (Tab. 6). Analog zum Proliferationsassay zeigte dieser Überlebensassay einen exponentiellen Rückgang der Zellkolonien im Verlauf. Bei 46,25kBq/ml überlebten 69,4% der kolonienbildenden Zellen. Bei weiterer Erhöhung der Aktivität waren ab 185kBq noch ca. 26% nachweisbar.



Tab. 6: Colony-Formation Assay für UDSCC5 nach Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb.  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Well wurden 24h vor der Behandlung ausgesät. Unterschiedliche Konzentrationen von  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb von 0 kBq/ml (Kontrolle) bis zu 1480 kBq/ml wurden benutzt. Nach zehn Tagen wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt.

Beim Linearbeschleuniger fanden Behandlungen im Intervall zwischen 0.5 und 16Gy statt, was zu einer abnehmenden Kolonienzahl (Number of colonies) auf fast 0% bei 16Gy führte (Tab. 7). Bei einer Exposition mit 6Gy zeigte sich nach zehn Tagen ein Überleben von 88,2%. Im Gegensatz zur  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb-Behandlung fand hier eher ein linearer Abfall der Zellpopulation statt.

Um eine Reduktion der Zellen auf 50% zu erreichen, wurde für UDSCC5 eine Aktivität des  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb von ca. 46,25kBq/ml-92,5kBq/ml benötigt, bei der Röntgenbestrahlung eine Dosis von 10-12Gy.

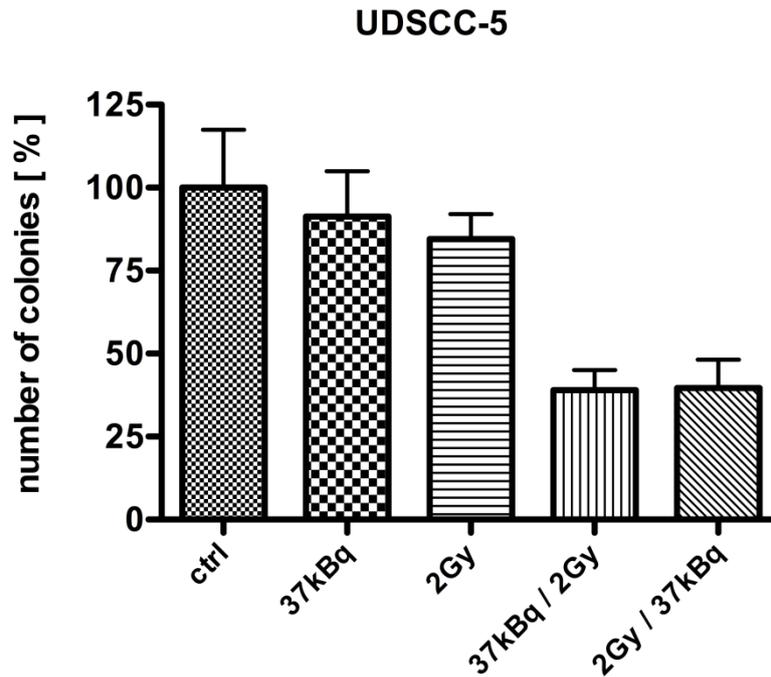


Tab. 7: Colony-Formation Assay für UDSCC5 nach Röntgenbestrahlung.  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Well wurden 24h vor der Behandlung ausgesät. Unterschiedliche Dosierungen des Röntgenstrahlers zwischen 0,5-16Gy wurden eingesetzt. Nach zehn Tagen wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt.

### 5.3.2. Kombinierte Bestrahlung (37kBq/2Gy)

Im Kombinationsversuch beider Behandlungen bei gleichbleibender Aktivität (37kBq/ml) und Dosis (2Gy) zeigte sich eine signifikante Zytotoxizitätssteigerung zu den Einzelbehandlungen (Tab. 8). Als Referenzdosis/-aktivität wurde 2Gy bzw. 37kBq eingesetzt, die einzeln keinen signifikanten Unterschied (37kBq=91,3%, 2Gy=84,45%) zur Kontrollgruppe aufwiesen (Tab.8). Die Reihenfolge der Applikation beider Behandlungen (37kBq/2Gy vs. 2Gy/37kBq) spielte keine Rolle. Sobald  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb-Konjugate mit der Aktivität von 37kBq und der Linearbeschleuniger (2Gy) 24h nacheinander appliziert wurden, sank das Überleben signifikant ( $p < 0,05$ ). Hierbei ließ sich eine Reduzierung der Kolonienzahl um mehr als die Hälfte auf 39,06% bzw. 39,65% feststellen.

Wie aus den p-Werten der Tab. 9 entnommen werden kann, waren die Abweichungen zwischen alleiniger  $\alpha$ - bzw. Röntgenbehandlung und der Kontrolle (ctrl) nicht signifikant, zwischen Kontrolle und den beiden Kombinationsvarianten aber hochsignifikant.



Tab. 8: Colony-Formation Assay als Einzel- und Kombinationsbehandlung für UDSCC5 mit der Aktivität von 37kBq/ml und Dosis von 2Gy.  $2,5 \times 10^5$  Zellen/Well wurden 24h vor der Behandlung ausgesät. Dann fand jeweils die Einzelbehandlung bei 37kBq/ml und 2Gy statt, zudem eine Kombination und umgekehrte Kombination aus beiden. Nach zehn Tagen wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt.

treatment	significant	p-value
ctrl vs 37kBq	ns	0,5731
ctrl vs 2Gy	ns	0,1864
ctrl vs 37kBq/2Gy	**	0,0063
ctrl vs 2Gy/37kBq	**	0,0096

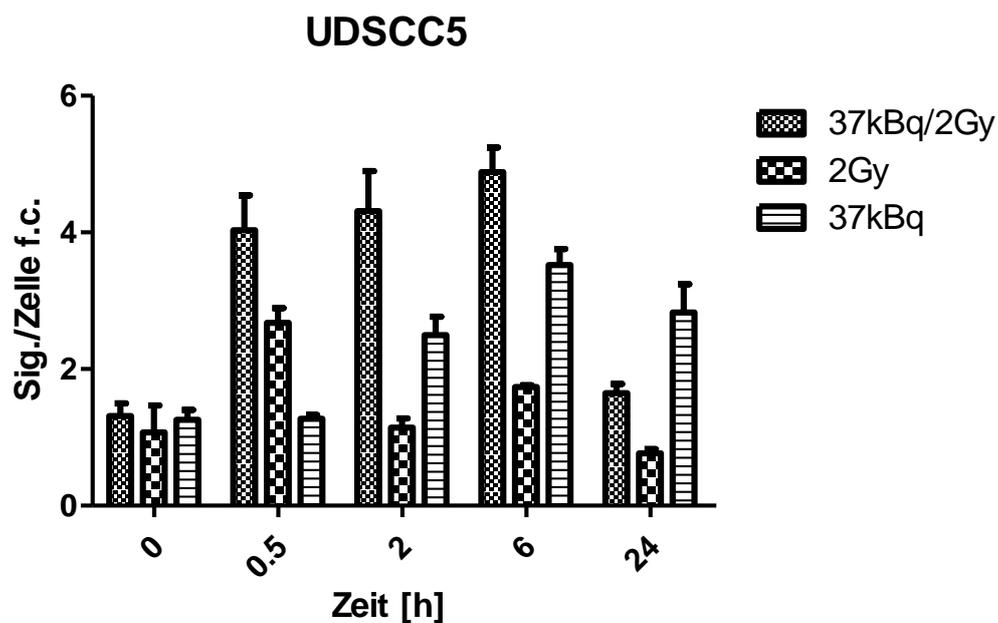
Tab. 9: p-Werte zu Tab. 8

## 5.4. Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen mit Immunfluoreszenz

Um nun in Kenntnis von Bindungsfähigkeit und Zellüberleben die Wirkungen der Strahlungsarten im Rahmen von Doppelstrangbrüchen zu quantifizieren, wurde ein Immunfluoreszenz-Assay der HNSCC-Zellen in vitro analog den Ergebnissen des Colony Formation Assay für die Einzel- und Kombinationsbehandlung durchgeführt.

Zur Erklärung der Graphen: Alle Werte sind jeweils zur Kontrolle berechnet/normiert (f.c. = fold control), d.h. die Zahlen auf der vertikalen Achse sind dimensionslos. Bei den Fehlerbereichen handelt es sich um den jeweiligen Standardfehler. Die Werte bei 0h sollten ungefähr den Kontrollen, also dem Wert 1, entsprechen.

### 5.4.1. UDSCC5 in Einzelbehandlung und Kombination für 37kBq/ml und 2Gy



Tab. 10: Immunfluoreszenz von UDSCC5 für die kombinierte Behandlung von 37kBq mit 2Gy oder Einzelbehandlung von 2Gy und 37kBq zur Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen. UDSCC5 Zellen wurden ausgesät auf 6-Well-Platten ( $2.5 \times 10^5$  Zellen/well) über Nacht. Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben behandelt und nach Inkubation für 0, 0.5, 2, 6 oder 24 h fixiert. Danach wurden via Immunfluoreszenz  $\gamma$ H2AX-Foci mittels DAPI und FITC angefärbt und anschließend am Mikroskop und mit Definiens® ausgewertet.

Bei UDSCC5 (Tab.10) wurde eine große Differenz an Doppelstrangbrüchen zwischen den Monobehandlungen und der Kombination deutlich. Das Maximum war für die Kombination (37kBq/2Gy\_6h=4,882) und die alleinige  $\alpha$ -Behandlung (37kBq\_6h=3,523) nach 6h. Bei 0,5h wurde das Maximum für die Röntgen-Bestrahlung (2Gy\_0.5h=2,679) erreicht. Die Säulen der Kombinationsbehandlung und der  $\alpha$ -Behandlung nach 24h gingen nicht auf den Kontroll- bzw. Ausgangswert von 0h zurück, sondern blieben auf dem 2,825fachen (37kBq) bzw. 1,648fachen (37kBq/2Gy) der Kontrolle. Insgesamt weniger Foci waren bei der alleinigen Röntgenbehandlung zu sehen, während bei der Kombination signifikant am meisten Doppelstrangbrüche auftraten. Die p-Werte zu den einzelnen Ergebnissen reflektieren den statistischen Zusammenhang (Tab.11 und 12).

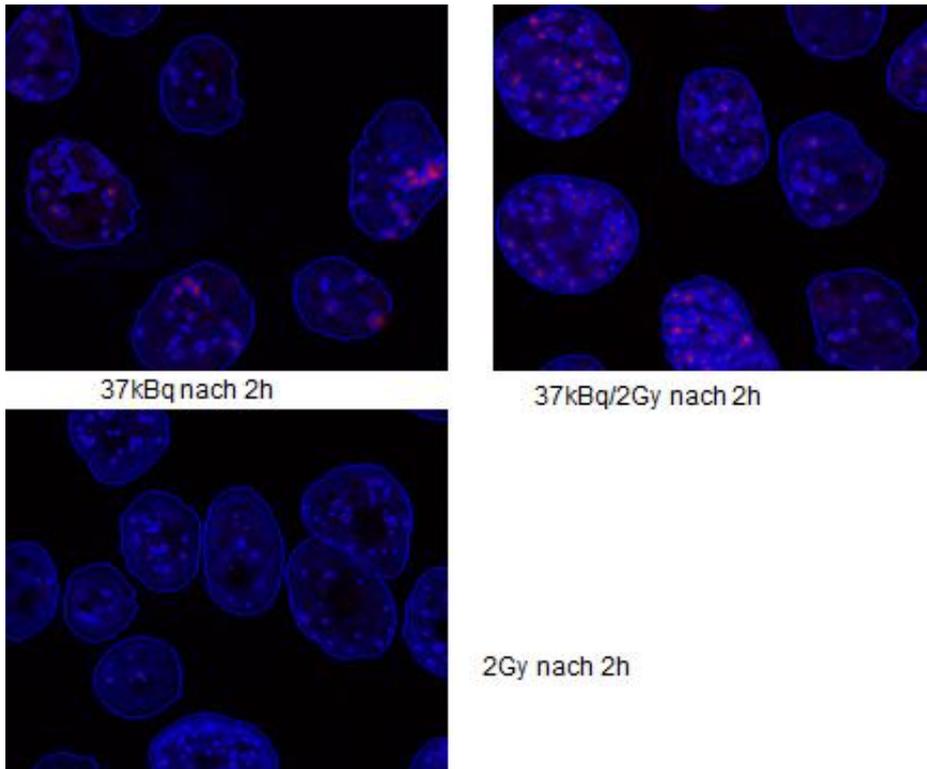
	Ttest p-wert 37kBq/2Gy	Ttest p-wert 37kBq	
2Gy	0,96895993	0,90501585	0h
2Gy	0,03318449	0,00202691	0,5h
2Gy	0,00036395	0,0010909	2h
2Gy	2,1501E-05	0,00011115	6h
2Gy	0,00014584	0,00502194	24h

**Tab. 11: p-Werte zu Tab. 10 mit  $\alpha=0,05$**

	Ttest p-wert 37kBq	
37kBq/2Gy	0,82719236	0h
37kBq/2Gy	0,00060042	0,5h
37kBq/2Gy	0,01477315	2h
37kBq/2Gy	0,00698828	6h
37kBq/2Gy	0,0282164	24h

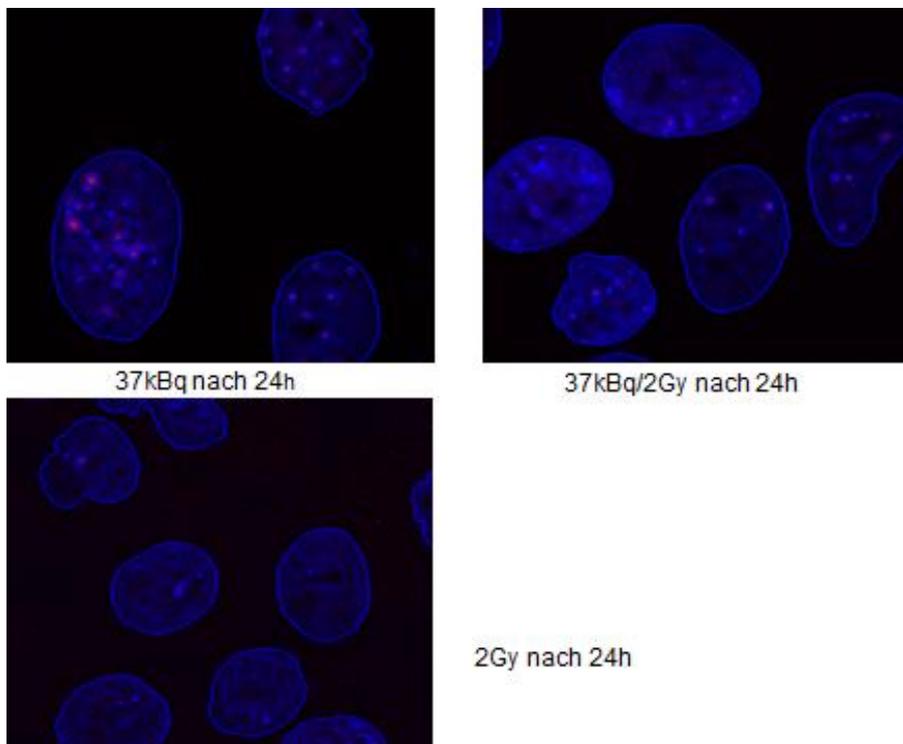
**Tab. 12: p-Werte zu Tab. 10 mit  $\alpha=0,05$**

Zur Veranschaulichung sind repräsentative Bilder zum Zeitpunkt 2h eingefügt, die qualitative Differenzen zwischen den verschiedenen Behandlungen aufzeigen (Abb. 7).



**Abb. 7: UDSCC5-Bilder bei 2h aller drei Behandlungen ausgewertet mit Definiens®**

Nach 24h ergaben sich folgende Bilder für UDSCC5 (Abb. 8).



**Abb. 8: UDSCC5-Bilder bei 24h aller drei Behandlungen ausgewertet mit Definiens®**

Zusammenfassend zeigte die Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb-Konjugaten und zusätzlicher Röntgenbestrahlung die signifikant höhere Anzahl an Doppelstrangbrüchen zu den Zeitpunkten 0,5, 2, 6 und 24h im Vergleich zu den Monobehandlungen. Am wenigsten  $\gamma\text{H2Ax}$ -Foci wurden durch die alleinige Röntgenstrahlung bedingt. Nach 24h konnte außer bei der Röntgenbehandlung keine Remission der Doppelstrangbrüche auf Ausgangsniveau beobachtet werden. Die Röntgenstrahlung war insgesamt den anderen Behandlungen unterlegen.

#### **5.4.2. Vergleich nach 2h bei Dosiserhöhung auf 4 bzw. 8Gy**

Als Ausblick wurde der gleiche Immunfluoreszenzversuch mit Kombination aus beiden Behandlungen mit gleichbleibender  $\alpha$ -Aktivität (37kBq) und Erhöhung der Röntgendosis über 4Gy auf 8Gy durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob eine höhere Schadenswirkung mit höherer Linearbeschleunigerdosis erreicht werden kann. Zum Zeitpunkt 2h wurden die verschiedenen Dosierungen in der Kombination und der Einfachbestrahlung in Beziehung gesetzt. Während sich auf der Vertikalachse die Einteilung und Normierung der Signale/Zelle auf die Kontrollen befindet, sind auf der Horizontalen die Dosierungen von 2Gy, 4Gy und 8Gy gestellt. Bei 0Gy ist zum Vergleich die alleinige  $\alpha$ -Behandlung aufgeführt (Tab.13). Zum Zeitpunkt 2h bei 37kBq/8Gy wurden signifikant mehr Doppelstrangbrüche als im Vergleich zu 37kBq/2Gy festgestellt. Die Kombination aus 37kBq und 4Gy erwies sich interessanterweise nicht als signifikant überlegen gegenüber 2Gy und 37kBq. Die höchste Zahl an Foci war bei 37kBq/8Gy zu finden. Die Bestrahlung mit dem Linearbeschleuniger zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der  $\gamma\text{H2Ax}$ -Foci bei 4Gy und 8Gy.

## UDSCC5 zum Zeitpunkt 2h



Tab. 13: Immunfluoreszenz für 37kBq/XGy, XGy und 37kBq zum Zeitpunkt 2h bei 2Gy, 4Gy und 8Gy zur Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen. UDSCC5 Zellen wurden ausgesät auf 6-Well-Platten ( $2.5 \times 10^5$  Zellen/well) über Nacht. Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben behandelt und nach Inkubation für 2h fixiert. Danach wurden via Immunfluoreszenz  $\gamma$ H2AX-Foci mittels DAPI und FITC angefärbt und anschließend am Mikroskop und mit Definiens® ausgewertet.

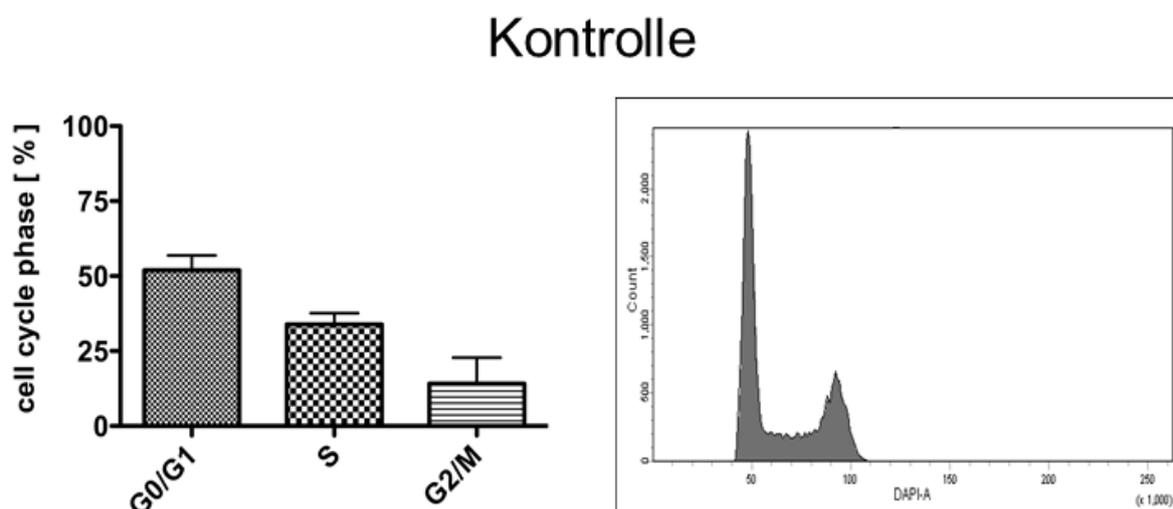
### 5.4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Immunfluoreszenzassay

Anhand der Ergebnisse des Immunfluoreszenzassay ließ sich die Kombinationsbehandlung aus  $\alpha$ -Emitter und Linearbeschleuniger als signifikant überlegen gegenüber den Monobehandlungen nachweisen. Am wenigsten Schaden verursachte der Linearbeschleuniger. Bei Steigerung der Dosis des Linearbeschleunigers auf 8Gy in der Kombination fand sich jedoch eine signifikant deutliche Erhöhung der Doppelstrangbrüche (Tab.13). Zum Zeitpunkt 24h wiesen die Kombinationsbehandlung und die alleinige  $\alpha$ -Behandlung in beiden Zelllinien die meisten noch vorhandenen Foci auf.

## 5.5. Zellzyklusanalyse

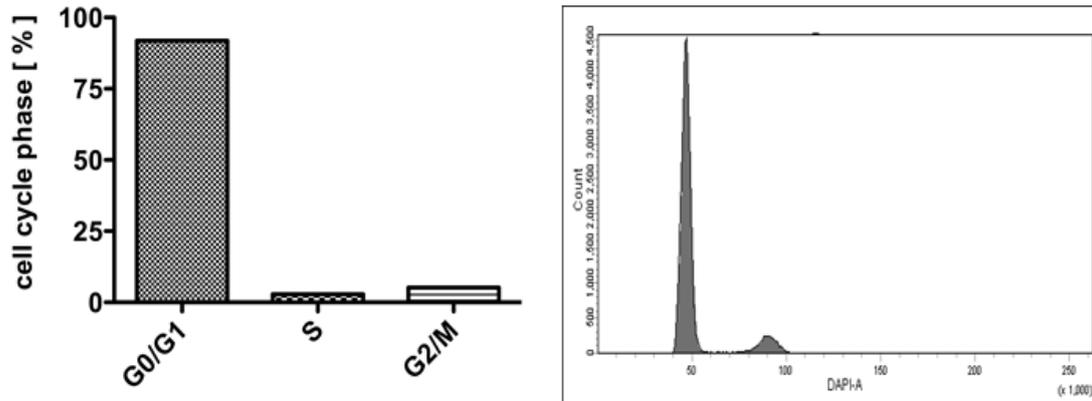
Nach Untersuchung der Schadenswirkung der Strahlungsarten hinsichtlich Zellüberleben und Doppelstrangbrüchen wurden UDSCC5 einer Zellzyklusanalyse zugeführt, dort wurde bei den Zellen zehn Tage nach Behandlung mit 2Gy, 37kBq und 2Gy/37kBq analysiert, in welcher Phase des Zellzyklus diese sich prozentual (Cell cycle phase in %) aufhielten. Zu einem früheren Fixationszeitpunkt (0-48h) ergaben sich keine Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle (Daten nicht anbei). Auf der X-Achse sind die jeweiligen Phasen des Zellzyklus dargestellt (G0/G1-Phase, S-Phase und G2/M-Phase).

Mittels Flow Zytometrie konnte 10 Tage nach den verschiedenen Behandlungen wenig Unterschied untereinander festgestellt werden. Die Kontrolle zeigte in der G0/G1-Phase 52%, in der S-Phase 33,9% und in der G2/M-Phase 14,1% der Zellen (Tab. 14). Die unterschiedlichen Therapieansätze steigerten signifikant ( $p < 0,05$ ) die Anhäufung von Zellen in der G0/G1-Phase (87,6-93,3%) und reduzierten ebenfalls signifikant ( $p < 0,05$ ) dabei die prozentuale Anzahl an Zellen in der S (2,0–3,8%)- und G2/M-Phase (4,7–8,6%) (Tab.15-17). In Zusammenschau dieser Befunde konnte zwischen den Behandlungsarten kein signifikanter Unterschied, jedoch im Gegensatz zur Kontrolle deutlich vermehrte Akkumulation der Zellen in der G0/G1-Phase beobachtet werden (Tab.15-17).



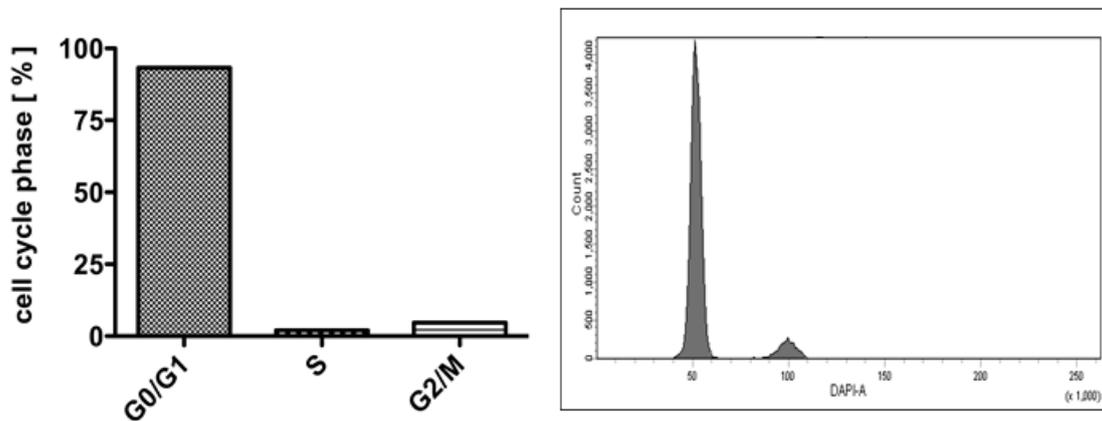
Tab. 14: Zellzyklusanalyse von UDSCC5-Zellen-Kontrolle: Die Zellen wurden ausgesät in Kulturflaschen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Flasche) über Nacht und blieben darauffolgend unbehandelt, 10 Tage danach angefärbt mit DAPI und nach dem Assay der Flow Zytometrie prozentual einer Phase des Zellzyklus zugeordnet.

## $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-Mab (37kBq/ml)



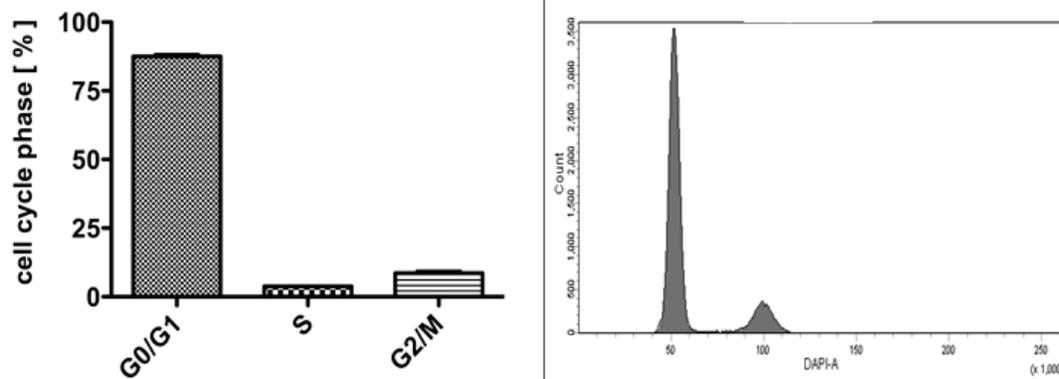
Tab. 15: Zellzyklusanalyse von UDSCC5-Zellen - Behandlung 37kBq: Die Zellen wurden ausgesät in Kulturflaschen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Flasche) über Nacht und wurden mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb (37 kBq/mL) behandelt, zehn Tage danach angefärbt mit DAPI und nach dem Assay der Flow Zytometrie prozentual einer Phase des Zellzyklus zugeordnet.

## Röntgenbestrahlung (2Gy)



Tab. 16: Zellzyklusanalyse von UDSCC5-Zellen - Behandlung 2Gy: Zellzyklusanalyse von UDSCC5-Zellen - Behandlung 37kBq: Die Zellen wurden ausgesät in Kulturflaschen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Flasche) über Nacht und wurden mit 2Gy behandelt, zehn Tage danach angefärbt mit DAPI und nach dem Assay der Flow Zytometrie prozentual einer Phase des Zellzyklus zugeordnet.

## Kombinationsbehandlung (37kBq/ml / 2Gy)



Tab. 17: Zellzyklusanalyse von UDSCC5-Zellen - Behandlung 37kBq/2Gy in Kombination: Die Zellen wurden ausgesät in Kulturflaschen ( $5 \times 10^5$  Zellen/Flasche) über Nacht und wurden mit <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-MAb (37 kBq/mL + 2Gy) behandelt, zehn Tage danach angefärbt mit DAPI und nach dem Assay der Flow Zytometrie prozentual einer Phase des Zellzyklus zugeordnet.

### 5.6. Western-Blot-Analyse

Im Western-Blot wurde untersucht, inwiefern wichtige Proteine für Zellzyklusarrest und Apoptose nach Behandlung mit alleiniger  $\alpha$ -Bestrahlung, Röntgen-Bestrahlung und der Kombination aus beiden synthetisiert wurden. Proteinlysate der Zelllinie UDSCC5 wurden untersucht und aufgeschlüsselt (Tab.18). Mit einem Plus- bzw. Minussymbol wurde kenntlich gemacht, ob <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-MAb, der Linearbeschleuniger („X-Ray“) oder beide angewandt wurden. Dies galt dann für die darunterliegenden Banden des Western-Blots. Zur Rechten der Banden wurden die analysierten Proteine aufgelistet.

Der Wachstumsrezeptor (EGFR) war nur leicht, dessen aktive Konformation (p-EGFR Tyr1086) jedoch stark erhöht nach <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-MAb-Behandlung und der kombinierten Therapie mit <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-MAb und Röntgenstrahlung. Im Gegensatz dazu fand sich in der Kontrolle und Monobehandlung mit dem Linearbeschleuniger kaum phosphorylierter EGF-Rezeptor. Das für die Proliferation wichtige p-p44/42 MAPK aus dem EGFR-abhängigen Raf/MEK/MAPK-Signalweg wurde ebenfalls in  $\alpha$ - und Kombinationsbehandlung am stärksten phosphoryliert, wobei die alleinige Röntgenbestrahlung den schwächsten Nachweis dieses Enzyms zeigte. Dieser war sogar größer als bei der unbehandelten Kontrolle.

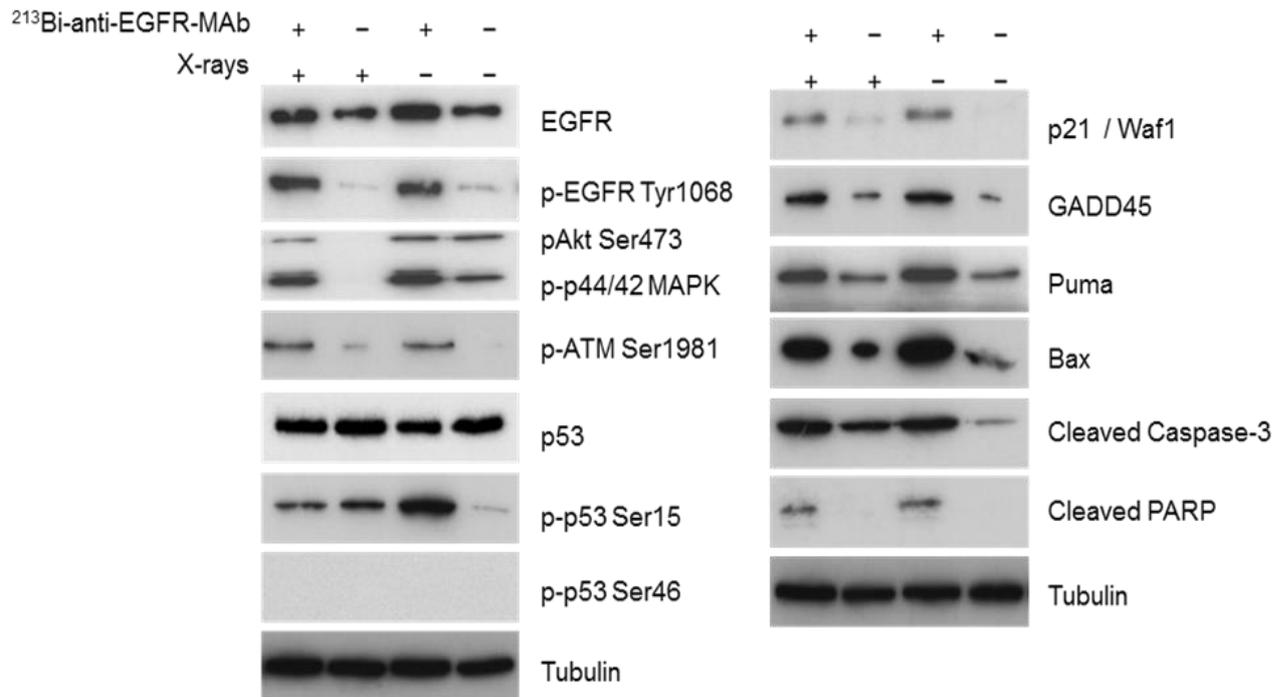
Keine gestiegene Phosphorylierung am Serin 473 konnte in der alleinigen  $\alpha$ - und der Kombinationsbehandlung bei Akt1, einem Protein des EGFR-abhängigen PI3K/Akt-

Signalwegs, nachgewiesen werden. Außerdem fand sich beim alleinigen Linearbeschleuniger weniger phosphoryliertes Akt1 als in der unbehandelten Kontrolle.

Die Proteine, welche p53-getriggert im Rahmen von Apoptose und Zellzyklusarrest aktiviert werden, stellten sich als unterschiedlich ausgeprägt in den verschiedenen Behandlungsformen heraus. ATM zeigte deutlichere Banden beim  $\alpha$ -Emitter und bei der Kombination, beim Linearbeschleuniger aber nur eine minimale Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle.

Phosphoryliertes ATM aktiviert p53 am Serin15-Rest. Die alleinige  $\alpha$ -Behandlung induzierte das stärkste p-p53-Signal bei gleicher Menge an phosphoryliertem ATM. Zusätzlich wurde bei der Monotherapie mit Röntgenstrahlung eine genauso ausgeprägte Bande an p-p53 nachgewiesen trotz deutlich weniger aktiviertem ATM. Durch die Phosphorylierung von p53 am Serin-15 wird die Expression p53-regulierter Proteine begünstigt, wie zum Beispiel von p21/Waf1 und GADD45 $\alpha$ . Das mit für den Zellzyklusarrest zuständige p21/Waf1 und das Reparaturprotein GADD45 wurden nach der alleinigen  $^{213}\text{Bi}$ -Behandlung und nach der Kombinationsbehandlung verstärkt exprimiert, während der Linearbeschleuniger alleine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur eine geringere Mehraktivierung brachte. Der Apoptosemarker PUMA zeigte sich nach  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb- und der kombinierten Anwendung dieses Immunkonjugats mit Röntgenstrahlung erhöht. Dies korrespondierte nicht mit dem Nachweis von phosphoryliertem p53 nach Behandlung mit ionisierender Strahlung, da trotz mindestens genauso starker Aktivierung von p-p53 beim Linearbeschleuniger im Vergleich zur Kombination keine Erhöhung von PUMA bei diesem im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt wurde. Es wurde jedoch für PUMA gezeigt, dass seine Aktivierung nicht streng an p-p53 gebunden ist, sondern auch p53-unabhängig geschieht (Hikisz and Kilianska 2012). Am Serin 15 phosphoryliertes p53 wurde am stärksten durch die alleinige Gabe von  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb getriggert.

BAX, welches mit der Aktivierung von PUMA korreliert und in der alleinigen  $\alpha$ - und Kombinationsbehandlung erhöht war, initiiert die Apoptose, indem es die äußere mitochondriale Membran permeabilisiert, wobei freie Proteine daraufhin die Aktivierung von Procaspase-3 zu Caspase-3 begünstigen. Aktiver Caspase-3 ist es möglich über die Freisetzung von PARP (poly ADP-ribose Polymerase) und andere Substrate Apoptose herbeizuführen. Freisetzung (cleavage) von Caspase-3 zeigte sich in allen ionisierenden Behandlungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht. Caspase-3 wurde jedoch nach  $\alpha$ -Bestrahlung und Kombinationsbehandlung häufiger in den Lysaten gefunden als nach Behandlung mit alleinigem Linearbeschleuniger. Ebenso wurde die PARP-Freisetzung nur in der Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb und der Kombination nachgewiesen.



**Tab. 18: Western-Blot der Zelllinie UDSCC5 zu allen drei Behandlungsvarianten (37kBq, 2Gy, 37kBq+2Gy) mit Analyse von Proteinen des EGFR-, Apoptose- und Zellzyklusarrestsignalwegs: Zellen wurden ausgesät in 6-well-Platten ( $2.5 \times 10^5$  pro well) über Nacht und entsprechend behandelt. Eine Stunde nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Lysate dem Western Blot zugeführt.**

## 6. Diskussion

Verschiedene Therapieformen für die Gruppe der HNSCC, wie Operation, Bestrahlung und Chemotherapie, werden in der täglichen Praxis angewandt. Die Prognose von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereichs bleibt schlecht, wobei die 5-Jahres-Prognose vor allem vom Subtyp des Karzinoms abhängt (Carvalho, Nishimoto et al. 2005). Radioimmuntherapie (RIT) bildet schon seit längerem eine Möglichkeit der Tumorbekämpfung und eröffnet neue Therapieansätze bei der Behandlung von HNSCC-Patienten. Hierbei stehen als Angriffspunkt überexprimierte Oberflächenantigene der Tumorzellen zur Verfügung (Al-Sarraf 2002). Beispielsweise liegt bei 10-20% aller HNSCC-Fälle eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) zugrunde, die virale Antigene wie das Onkoprotein E6, dessen Wirkmechanismus gut verstanden ist, exprimiert (Sturgis and Cinciripini 2007). Dieses konnte mit einem  $^{188}\text{Re}$ -labeled monoklonalen Antikörper (C1P5) in einem Tiermodell erfolgreich behandelt werden (Harris, Wang et al. 2011). Auch die Anwendung von  $\alpha$ -emittierenden Nukliden wie  $^{213}\text{Bi}$  wurde in Leukämiezellen getestet und ein Ansprechen von chemo- und strahlungsresistenten Tumorzellen auf diese nachgewiesen (Friesen, Glatting et al. 2007). Sehr vielversprechend scheint, den Oberflächenrezeptor EGF (= Epidermal Growth Factor) als Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie zu verwenden, da dieser auch von 90% aller HNSCC vermehrt gebildet wird (Tejani, Cohen et al. 2010). Ebenfalls sind HNSCC mit EGFR-Überexpression mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Frampton 2011). Dagegen wurden bereits verschiedene Antikörper, wie Cetuximab, Bevacizumab, Erlotinib und Matuzumab, entwickelt. Während der chimäre Antikörper Cetuximab schon klinisch eingesetzt wird, befand sich Matuzumab in der klinischen Erprobung und bereits in einer Phase-I-Studie (Vanhoefer, Tewes et al. 2004), ehe durch Merck KGaA die Entwicklung eingestellt wurde. In dieser Arbeit wurde  $^{213}\text{Bi}$  an den EGFR-Antikörper Matuzumab gekoppelt, um zytotoxische Effekte, molekulare Veränderungen und beteiligte Mechanismen in HNSCC-Zellen zu untersuchen. Vergleichsweise fand auch eine Kombination und alleinige Behandlung dieser Zellen mit extrakorporaler Bestrahlung unterschiedlicher Dosis statt. Unter diesem Gesichtspunkt wurde die Tumorzelllinie UDSCC5 von dieser Familie betrachtet und ihre unterschiedlichen Behandlungen jeweils mit sich selbst und untereinander verglichen. Für  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-Immunkonjugate wurde nachgewiesen, dass sie unabhängig von Oxygenierung des Tumorzellclusters wirken (Wulbrand, Seidl et al. 2013). Im Gegensatz dazu hat die konventionelle Radiotherapie einen schlechten Effekt in hypoxischen Tumorarealen. Die Hypoxie geht meist mit einer schlechteren Prognose für die Patienten

einher (Nordmark, Bentzen et al. 2005). Die Radioimmuntherapie mit  $\alpha$ -Emittern kann somit eine gute Alternative für Tumore darstellen, die aufgrund einer Hypooxygenierung resistent gegen konventionelle Bestrahlung sind.

## **6.1. Zusammenfassung des Vorgehens bei den Versuchen**

Begonnen wurde damit die alleinige Wirkung des Anti-EGFR-Antikörpers Matuzumab in verschiedenen Konzentrationen auf HNSCC-Zellen der UDSCC5-Linie zu testen (5.1.). Nachdem dabei von keiner Wirkung auf die Zellproliferation in den benutzten Dosierungen ausgegangen werden konnte, wurde eine Überlebensanalyse (5.2.) für zwei Strahlungsarten, nämlich  $\alpha$ -Emitter und Röntgenstrahlen getrennt und in verschiedenen Dosierungen durchgeführt. Beim Linearbeschleuniger handelte es sich um Dosierungen zwischen 0-16Gy und beim  $\alpha$ -Strahler zwischen 0-1500kBq. Für den darauffolgenden Colony-Formation-Assay entschied man sich zusätzlich zu den Einzelversuchen auch für einen Kombinationsversuch aus  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb (37kBq/ml) mit Röntgenstrahlung (2Gy) hinsichtlich der Frage nach Potenzierung der Apoptose und Doppelstrangbrüche (5.3.). Dies wurde daraufhin in einem Immunfluoreszenzassay (5.4.) für die Kombinationen aus 37kBq/ml und 2, 4 und 8Gy zu den Zeitpunkten 0, 0.5, 2, 6 und 24h wiederum genauer untersucht (Ergebnisse nicht alle anbei). Zuletzt wurden nicht nur die Apoptosemechanismen und beteiligten Proteine der UDSCC5-Zellen im Western-Blot (5.6.) analysiert, sondern es fand auch eine Zellzyklusanalyse statt (5.5.). Diese sollte Aufschluss geben über den Stand der Zellen im Zyklus nach den jeweiligen Behandlungen.

## **6.2. Analyse der Ergebnisse**

### **6.2.1. Wirkung des Immunkonjugats und Überlebensassay**

Zunächst wurde die Wirkung des alleinigen Immunkonjugats (Anti-EGFR-MAb) (5.1.) untersucht. Bis zu einer Konzentration von 22,5nM wurde die Zellproliferation nicht beeinträchtigt (Tab. 3). In den folgenden Versuchen wurde eine MAb-Konzentration von 0,67nM genutzt. Dies bedeutet, dass der Zellschaden auf die Kopplung des Anti-EGFR-MAb mit  $^{213}\text{Bi}$  zurückzuführen ist.

Im anschließenden Proliferationsassay konnte gezeigt werden, dass UDSCC5-Zellen bei  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb-Behandlung im Vergleich zu alleiniger Röntgenbehandlung einen exponentiellen Abfall der Proliferation bei Dosiserhöhung aufwiesen (5.2.). Die Behandlung

mit dem Linearbeschleuniger belegt auch dessen Wirksamkeit und zeigte insgesamt jeweils eine lineare Abnahme der Zellproliferation.

### **6.2.2. Colony-Formation-Assay, Immunfluoreszenz und Zellzyklusanalyse**

Im Colony-Formation-Assay wurde das Überleben der Zellkolonien bei steigender Dosis des  $\alpha$ - und Röntgenstrahlers untersucht. Um eine Reduktion der Zellen auf 50% zu erreichen, wurde für UDSCC5 eine Aktivität des  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb von ca. 46,25kBq/ml-92,5kBq/ml benötigt, bei der Röntgenbestrahlung eine Dosis von 10-12Gy. Kombiniert wurden 37kBq/ml und 2Gy, wobei im Vergleich zu den Einzelbehandlungen eine signifikante Reduktion der Kolonienzahl gesehen wurde (Tab.8). Ob zuerst 37kBq/ml und dann 2Gy oder umgekehrt appliziert wurde, machte keinen signifikanten Unterschied.

Einzelbehandlungen wurden besser toleriert als die Kombinationsbehandlung. Daraus lässt sich beispielsweise schließen, dass beide Behandlungen eine Möglichkeit besitzen, sich innerhalb ihrer Schadenswirkung gegenseitig zu potenzieren. Zum Beispiel können verschiedene Angriffspunkte des  $\alpha$ -Emitters und des Linearbeschleunigers weiterhin die für UDSCC5 festgestellte Amplifikation der Kolonienreduktion erklären.

Im Immunfluoreszenzassay (5.4.) entschied man sich aufgrund von Gründen der technischen Durchführung zuerst  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb und anschließend 2Gy zu applizieren und hinsichtlich der Entstehung von Doppelstrangbrüchen zu untersuchen. Die Schadenspotenzierung durch diese Kombinationsbehandlung wurde hierbei den Einzelbehandlungen gegenübergestellt und nachgewiesen (Tab.10). Vorteile der Kombination zeigten sich nach 0,5h, 2h und 6h. Mittels Zellzyklusanalyse (5.5.) konnte anschließend festgestellt werden, dass sich UDSCC5 nach Einzel- und Kombinationsbehandlung in der G0/G1-Phase befand und ein signifikanter Abfall der Zellen in der S- und G2-Phase erreicht wurde. Jedoch fand sich in den Einzelbehandlungen gegenüber der Kombinationsbehandlung kein signifikanter Unterschied (Tab. 15-17), worauf nach der Schadenswirkung gesehen im Colony-Formation- und Immunfluoreszenzassay zu schließen war.

Die im Colony-Formation-Assay und im Immunfluoreszenzassay gesehene reduzierte Wirkung der Einzelbehandlungen im Gegensatz zur signifikant höheren Wirkung der Kombination lässt vermuten, dass ein höherer Zellschaden nicht entscheidend für den Eintritt in die G0/G1-Phase war. Ein anschließender Western-Blot mit Analyse wichtiger Zellzyklusproteine sollte über molekulargenetische Veränderungen Auskunft geben.

### 6.2.3. Western-Blot und Rolle von p53 in der Apoptose

Im Western-Blot (5.6.) zeigten sich generell ähnliche Ergebnisse in den Lysaten nach der alleinigen  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb-Behandlung und der kombinierten Behandlung mit zusätzlicher Bestrahlung von 2Gy (Tab.18). Es wurden nach Behandlung zumeist vermehrt Proteine sowohl für Zellzyklusarrest als auch Apoptose synthetisiert, was mit den vorherigen Ergebnissen korrespondierte. Aufgrund der Tatsache, dass diese Proteine vor allem in der Kombinationsbehandlung und bei alleiniger  $\alpha$ -Emitterbehandlung exprimiert bzw. modifiziert wurden, lässt auf die wohl maßgebliche Beteiligung von  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb schließen. Wahrscheinlich spielen deswegen die für Prozesse der DNA-Reparatur und des Zelltodes wichtigen Proteine keine entscheidende Rolle in der verstärkten Wirkung der Kombinationsbehandlung im Bereich der Reduktion von Zellkolonien im Colony-Formation-Assay. Es ist nämlich nicht möglich, den starken Effekt der Kombinationsbehandlung nur mit der erhöhten Proteinexprimierung der Einzelbehandlung ( $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb) zu erklären. Die Autophosphorylierung von EGFR stieg vor allem nach der Gabe des  $\alpha$ -Emitters und der Kombinationsbehandlung (37kBq/ml an  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb mit Röntgenstrahlung von 2Gy) an. Im Gegensatz dazu ergab sich im Vergleich zur Kontrolle kein Anstieg bei alleiniger Gabe des Linearbeschleunigers. In einer vorherigen Untersuchung (Ergebnisse nicht anbei) konnte dagegen gezeigt werden, dass eine Dosis von 8Gy zu EGFR-Phosphorylierung bei den Zelllinien HN, BHY und Cal-33 führt. Somit konnte von einer dosisabhängigen Phosphorylierung des EGF-Rezeptors ausgegangen werden. Dies würde zum Versuch der Immunfluoreszenz passen, da die Kombinationsbehandlung mit einer Röntgenstrahlung von 8Gy ebenfalls mit einer deutlichen Erhöhung der Doppelstrangbrüche einherging (Tab. 13). Nichtsdestotrotz wurde in dieser Studie keiner der beiden Signalwege (RAS/RAF/MEK/ERK- und PI3K/AKT-Kaskade) aktiviert, da keine nachfolgende Phosphorylierung stattfand (Pickhard, Margraf et al. 2011).

Nach der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors wurde die Frage gestellt, welcher Signalweg durch die verschiedenen Behandlungen induziert wurde. Hierbei gibt es, wie u.a. aus Abb. 1 entnommen werden kann drei primär für die Tumortherapie wichtige Signalwege: Die RAS/RAF/MEK/ERK-, die PI3K/AKT- und die PLC $\gamma$ /PKC-Kaskade, wobei vor allem im Western-Blot die RAS/RAF/MEK/ERK- (Sebolt-Leopold and Herrera 2004) und die PI3K/AKT-Kaskade (Engelman 2009) untersucht wurden. Obwohl beide Signalwege durch Bindung des EGF-Liganden aktiviert werden können, fanden sich in der jeweiligen Behandlungsart Unterschiede bezüglich des Signalwegs. Bei allein mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb (37kBq/ml) und in der Kombination von  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb (37kBq/ml) mit Röntgenstrahlung (2Gy) behandelten UDSCC5-Zellen wurde vermehrt die

RAS/RAF/MEK/ERK-Kaskade aktiviert und nicht der PI3K/Akt Signalweg. Dies wurde bestätigt durch eine vermehrte Phosphorylierung von p44/42 MAPK und dem Fehlen der Akt1-Phosphorylierung (Tab.18). Dass  $\alpha$ -Emitter und der Linearbeschleuniger verschiedene Prozesse und Signalkaskaden der Zelle aktivieren, wurde somit in diesem Versuch beobachtet.

Auch in der Phosphorylierung von ATM am Serin 1981 gab es Unterschiede zwischen den Behandlungen (Tab.18). Im Gegensatz zur Kombination und alleinigen  $\alpha$ -Behandlung war die Autophosphorylierung nur schwach beim Linearbeschleuniger (2Gy). Die Autophosphorylierung von ATM am Serin 1981 verursacht eine Dissoziation des ATM-Dimers mit nachfolgender Aktivierung der ATM-kinaseaktivität (Bakkenist and Kastan 2003). Aktiviertes ATM phosphoryliert p53 am Serin 15, welches p53 über eine Verhinderung der MDM2-abhängigen Ubiquitinierung stabilisiert (Banin, Moyal et al. 1998). Am Serin 15 phosphoryliertes p53 wurde im Rahmen aller drei Behandlungsvarianten nachgewiesen, wobei jedoch die Stärke der Signale nicht in jedem Fall den Ergebnissen der ATM-Autophosphorylierung entsprach. Paradoxerweise fand sich nach Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb alleine eine stärkere Phosphorylierung von p53 am Serin 15 als nach der Kombination. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass phosphoryliertes ATM nicht die Aktivität und damit die Phosphorylierung des p53 am Serin 15 beeinflusst. Wahrscheinlicher dürfte eine ATM-abhängige Aktivierung von nachgeschalteten Genen ohne Berücksichtigung der p53 Funktion sein. Die in Tabelle 18 klar gezeigte vermehrte Phosphorylierung von p53 am Serin 15 bei alleiniger Behandlung mit dem  $\alpha$ -Emitter scheint eine differente Ursache zu besitzen.

Am Serin 46 phosphoryliertes p53 wurde im gesamten Blot in keiner Behandlung nachgewiesen. Jedoch wurde sowohl in der Einzelbehandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb und der Kombination aus diesem und Röntgenstrahlung deutlich mehr Apoptose beobachtet als beim Linearbeschleuniger. P53 wurde überall exprimiert. Da die Phosphorylierung von p53 am Serin 46 ein Indikator für direkten apoptotischen Zelltod bei darauffolgender Transkription hierfür benötigter Gene ist (Oda, Arakawa et al. 2000; Taira and Yoshida 2012), fand somit ohne die Miteinbeziehung von am Serin 46 phosphoryliertem p53 Apoptose statt.

Die Moleküle p21/Waf1 und GADD45 repräsentierten die Induktion des reversiblen Zellzyklusarrests.

BAX und PUMA waren Signalmoleküle für eine Einleitung der Zelle in einen apoptotischen Untergang (Oren 2003; Hopker, Hagmann et al. 2012; Wu, Ozaki et al. 2013). Im Western-Blot (Tab.18) lag insbesondere ein vermehrter Nachweis von p21/Waf1, GADD45, BAX und PUMA in der alleinigen Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb (37kBq/ml) und in der Kombination mit dem Linearbeschleuniger der Dosis 2Gy vor. Dass Erhöhungen aller vier

Proteine beobachtet wurden, könnte an einer Induktion von leichten, reparierbaren Schäden und schweren, irreversiblen DNA-Schäden liegen. Die deutlichen durch den  $\alpha$ -Emitter bedingten Unterschiede in der Expression dieser Proteine könnten sich auf eine ineffiziente Reparatur der durch ihn hervorgerufenen Doppelstrangbrüche zurückführen lassen, woraufhin vermehrt Apoptose initiiert werden könnte. Cleaved caspase 3 und cleaved PARP sind ebenfalls gut nachweisbare Marker für die Induktion der Apoptose und waren vor allem in der alleinigen  $\alpha$ -Behandlung und der kombinierten Variante erhöht. Cleaved PARP wurde in der alleinigen Behandlung mit dem Linearbeschleuniger (2Gy) wie auch in der Kontrolle nicht nachgewiesen, obwohl nach Bestrahlung mit 2Gy eine erhöhte cleaved Caspase-3-Aktivität gefunden wurde (Tab.18). Es wurden bei der Behandlung von Zellen der UDSCC5-Zelllinie für die Behandlung mit  $\alpha$ -Emitter alleine und in Kombination hohe Mengen von cleaved PARP nachgewiesen, was für Apoptosevorgänge spricht. PARP-1 (Poly[ADP-ribose]-Polymerase 1) als Apoptosemarker wird von Caspase-3 gespalten und gilt als Enzym, welches laut kürzlich erhobener Daten an der Detektion und nachfolgenden Reparatur entstandener Doppelstrangbrüche beteiligt ist (Haince, Kozlov et al. 2007). Es katalysiert die Formation von Poly(-ADP-ribose)-Ketten, die das Andocken des MRN-Komplexes (ein Komplex aus verschiedenen Faktoren mit Exo-/Endonukleaseaktivität und DNA-Bindungsproteinen) an die Doppelstrangbrüche ermöglichen (Roos and Kaina 2012). Aus den Befunden des phosphorylierten p53 und dem vermehrten Nachweis der Apoptosemarker PUMA und BAX bei  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb beteiligten Behandlungen könnte ein p53-unabhängiger Signalweg ursächlich für die Apoptose sein (Abb.8), da im Colony-Formation-Assay eine deutlich gesteigerte Schadenswirkung in der Kombinationsbehandlung und alleinigen  $\alpha$ -Behandlung nachzuweisen war. Die klinische Relevanz in dieser Hinsicht ist kaum verkennbar, da mehr als 50% aller menschlichen bösartigen Neubildungen einen Defekt in ihrer p53-Funktion aufweisen. Wichtig für zukünftige Tumorthapeutika bei Resistenzen des p53-geschädigten Tumors gegenüber Zelltodinduktoren scheint es, den Mechanismus für einen p53-unabhängigen Zelltod zu finden (Gupta, Thakur et al. 2012). Beim extrinsischen p53-unabhängigen Zelltod geht es um die die Aktivierung des programmierten Zelltods durch Caspase-8 über die Freisetzung des pro-apoptotischen Bid aus der Familie der Bcl-2. Das entstandene Bid wird zu Mitochondrien transportiert, wo es unter anderem die Freisetzung von Cytochrom C triggert, welches schlussendlich zum apoptotischen Zelltod führt (Gupta, Thakur et al. 2012) (Abb.9).

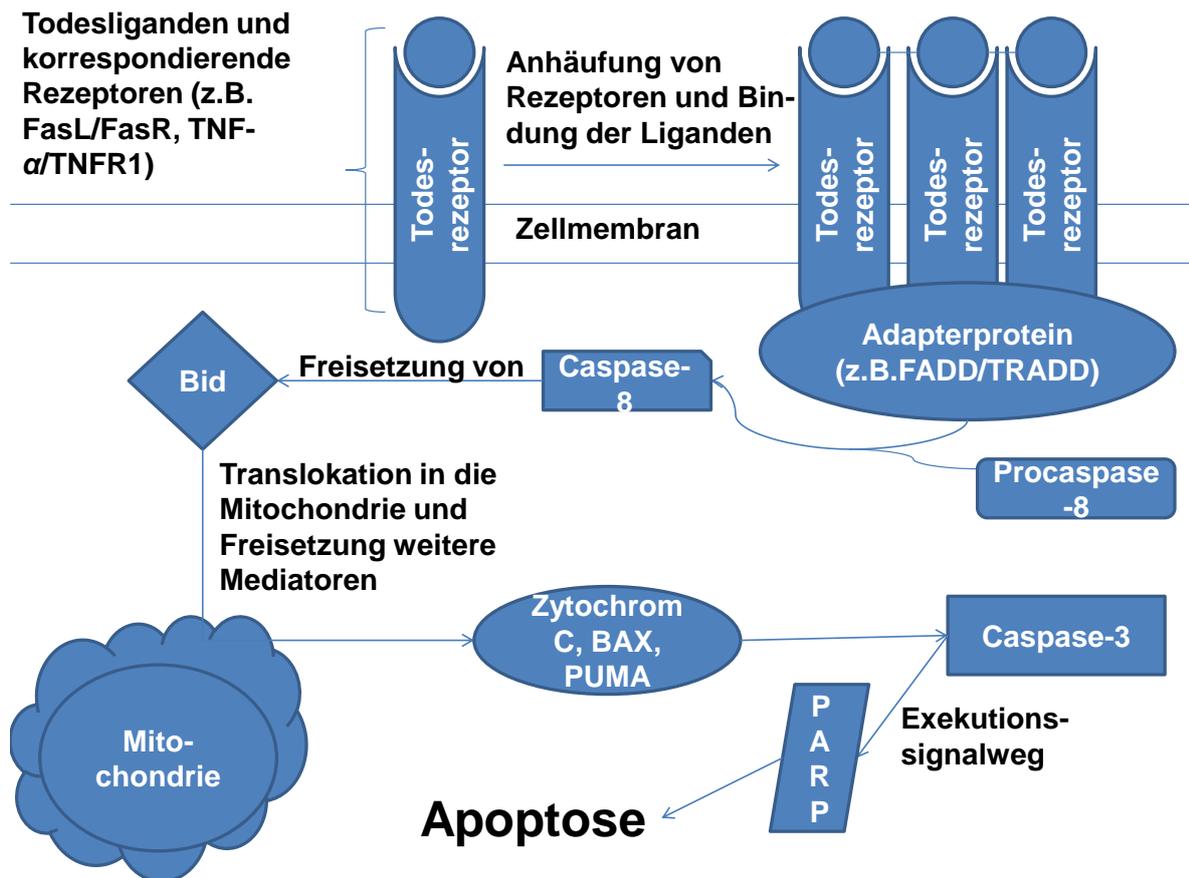


Abb. 9: Darstellung der p53-unabhängigen Apoptose. Über den extrinsischen Signalweg bildet sich ein Trimer der Todesrezeptoren und über Aktivierung der Caspase-8 und Bid, welches nach Translokation in die Mitochondrien weitere Enzyme freisetzt, wird über Caspase-3 die Apoptose eingeleitet (Elmore 2007). BAX, PUMA, Caspase-3 und PARP konnten im Western Blot im Gegensatz zu p53 im Kombinationsversuch und bei alleiniger Behandlung mit dem Immunkonjugat nachgewiesen werden.

Für den definitiven auch quantitativen Nachweis des p53-unabhängigen Zelltods sollten p53-Synthesehemmer mit den Zellen zusammen inkubiert werden. Zum Beispiel handelt es sich bei TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat) und Rottlerin um zwei Substanzen, die zu einer Hemmung der Proteinkinase C delta (PKC $\delta$ ) führen und damit eine durch DNA-Schäden bedingte Induktion der Apoptose über p53 verhindern. PKC $\delta$  greift in die p53-Transkription ein und durch seine Hemmung kann eine Synthese von p53 verhindert werden (Yoshida and Miki 2010). Über eine Inkubation der UDSCC-5-Zellen mit PKC $\delta$ -Inhibitoren TPA und/oder Rottlerin werden diese anschließend mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb alleine oder in Kombination mit Röntgenstrahlung behandelt. Bei signifikantem Nachweis einer Eradikation der Zellen, sollte der Zelltod p53 unabhängig erfolgt sein.

### **6.3. Ergebnisvergleich von clonogenem Assay, Immunfluoreszenz und Western-Blot**

Die Zelllinie UDSCC5 wurde in dieser Arbeit sehr ausführlich untersucht und es konnten Parallelen in den wichtigen Säulen der Immunfluoreszenz (5.3.) des clonogenen Assays (5.4.) und des Western-Blots (5.6.) gefunden werden.

Wenn man sich die Untersuchungen im Colony-Formation-Assay (5.4.) zu UDSCC5 anschaut, kann man feststellen, dass die Kombinationsbehandlung (37kBq/2Gy bzw. 2Gy/37kBq) deutlichere Auswirkungen als die Einzelbehandlungen hat, indem sich die Anzahl der überlebenden Zellen nach zehn Tagen auf ca. 50% reduzieren ließ (Tab. 8). Auch hat die alleinige  $\alpha$ -Behandlung ihre Überlegenheit in der Apoptosewirkung im Vergleich zur Röntgenstrahlung demonstriert (Tab. 6 und 7).

Vereinbaren lässt sich dies auch mit den Untersuchungen zur Immunfluoreszenz (5.3.), die analog zum clonogenen Assay mehr Doppelstrangbrüche bei der Kombination (37kBq/2Gy) zeigte. Insgesamt unterliegt der Linearbeschleuniger den  $^{213}\text{Bi}$ -beteiligten Behandlungen (Tab.10). In der Kombination bleiben in den aufeinanderfolgenden Zeitpunkten 0.5h, 2h und 6h die Signale konstant auf einem hohen Level, während bei 24h ein Abfall der Signale erfolgt. Hier scheint wiederum der  $\alpha$ -Strahler langsamer zur Bildung der  $\gamma\text{H2Ax}$ -Foci zu führen (Maximum nach 6h) als die Kombination (Maximum nach 0,5h) und der Linearbeschleuniger (Maximum nach 0,5h). Der Unterschied zwischen 37kBq/2Gy und 37kBq/4Gy bleibt gering und wird erst bei 37kBq/8Gy hoch signifikant (Tab.13), was anscheinend der starken Dosiserhöhung des Linearbeschleunigers geschuldet ist.

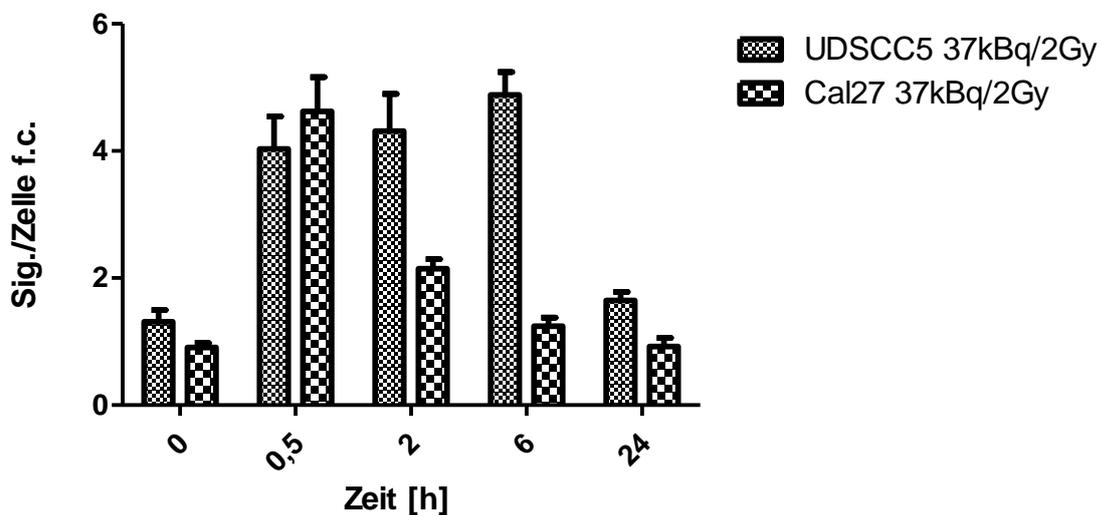
Der Western-Blot (5.6.) lässt Parallelen zwischen den beiden vorherigen Untersuchungen erkennen, da bei  $\alpha$ -involvierten Behandlungen die Apoptosemarker (PUMA, BAX, Cleaved PARP, Cleaved Caspase-3) erhöht waren (Tab.18). Ebenfalls konnte eine vermehrte Expression des Proteins p21/Waf1 bei den  $\alpha$ -beteiligten Behandlungen nachgewiesen werden, was ein Hinweis auf vermehrtes Stattfinden von Zellzyklusarrest sein könnte. Insgesamt ist im Western-Blot eindrücklich zu sehen, dass Apoptosemarker vor allem als Reaktion auf den  $\alpha$ -Emitter synthetisiert werden, was im Hinblick auf kommende therapeutische Optionen einen Vorteil in der Tumorbekämpfung für  $\alpha$ -Strahler bedeuten könnte.

Die Untersuchungen zum Zellzyklus (5.5.) zeigen auch bezüglich der Proteinexpression einen im Vergleich zur Kontrolle vermehrten Übergang in die G1/G0-Phase. Jedoch ist hierbei kein vermehrter Übertritt in die G1/G0-Phase bei  $\alpha$ -beteiligten Behandlungen gegenüber der alleinigen Röntgenbehandlung nachgewiesen worden (Tab. 15-17), wie man nach den Ergebnissen des clonogenen Assays, des Western-Blots und der

Immunfluoreszenz hätte vermuten können. So scheint die unterschiedliche Anzahl der Doppelstrangbrüche in den Behandlungsformen nicht entscheidend für einen Arrest des Zellzyklus gewesen zu sein.

#### 6.4. Vergleich von UDSCC5 mit der Zelllinie Cal27 am Beispiel der Immunfluoreszenz

In den Voruntersuchungen wurde zusätzlich zur Zelllinie UDSCC5 auch die ebenfalls aus der Gruppe der HNSCC stammende Zelllinie Cal27 (Daten nicht anbei) im Rahmen des Immunfluoreszenzassay behandelt (Tab.19). Anhand dieses Vergleichs lassen sich folgende Aussagen treffen.



Tab. 19: Gegenüberstellung von UDSCC5 und Cal27 in der Kombinationsbehandlung

Nach 2h, 6h und 24h zeigt sich eine größere Anzahl Doppelstrangbrüche bei UDSCC5, während nach 0,5h bei Cal27 kaum relevant mehr vorhanden sind. Insgesamt zeigen sich in der Immunfluoreszenz die UDSCC5-Zellen sensitiver bezüglich strahlungsabhängiger Doppelstrangbrüche als Cal27-Zellen. Ebenfalls ist aus Tabelle 19 zu entnehmen, dass auch andere Zelllinien der HNSCC-Gruppe gut auf die Kombination von 37kBq und 2Gy ansprechen.

Eine genaue Bestimmung der Zelllinie könnte sich somit in Zukunft für die Wahl der Therapie erübrigen.

## 6.5. Unterschiede in der G1/G2-Phase

Die Ergebnisse der Flow Zytometrie geben einen Denkanstoß, warum die Zellen so deutlich in der G0/G1-Phase arretieren. In anderen Studien konnte schon gezeigt werden, dass bei den HNSCC eine Präferenz für diese Phase des Zellzyklus besteht ((Lim, Lee et al. 2012), (Prasad and Katiyar 2012)). In einer Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei HNSCC nach Zugabe von aus Rachenmandeln stammenden mesenchymalen Stammzellen das Wachstum gehemmt wurde, was zu einer Akkumulation der Zellen größtenteils in die G0/G1-Phase führte. Weiter wurden im Rahmen dieser Untersuchung die Marker p21 und Caspase-3 hochreguliert vorgefunden, was auch im Western-Blot gezeigt werden konnte (Lim, Lee et al. 2012). Bei einer weiteren Studie, die sich mit den Auswirkungen von GSP („Grape Seed Proanthocyanidins“) auf die HNSCC beschäftigt hat, konnte ebenfalls ein Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase nachgewiesen werden (Prasad and Katiyar 2012). Interessanterweise gab es auch Untersuchungen, die eine ganz klare Präferenz beim Zellzyklusarrest hinsichtlich der G2-Phase herausgefunden haben (Shrotriya, Deep et al. 2012).

Im Western-Blot wurden vor allem für den Zellzyklusarrest wichtige Moleküle wie p21/Waf, p-ATM Ser1981 oder GADD45 nachgewiesen. In der alleinigen  $\alpha$ -Behandlung wurden diese hochreguliert, beim Linearbeschleuniger nur leicht und in der Kontrolle gar nicht. Obwohl in allen Behandlungen ein deutliches Arretieren in der G1/G0-Phase beobachtet wurde (Tab.15-17), unterschieden sie sich in der prozentualen Zahl der arretierten Zellen jedoch nicht, sodass hinsichtlich des Zellzyklusarrests nicht von einem Benefit der Kombinationstherapie ausgegangen werden konnte. In Abbildung 10 wird die Signalkaskade des Zellzyklusarrests mit Beteiligung von p53 beschrieben.

In Zusammenschau der Ergebnisse könnte zur Erklärung ein p53-induzierter Zellzyklusarrest und ein p53-unabhängiger Zelltod in Betracht gezogen werden.

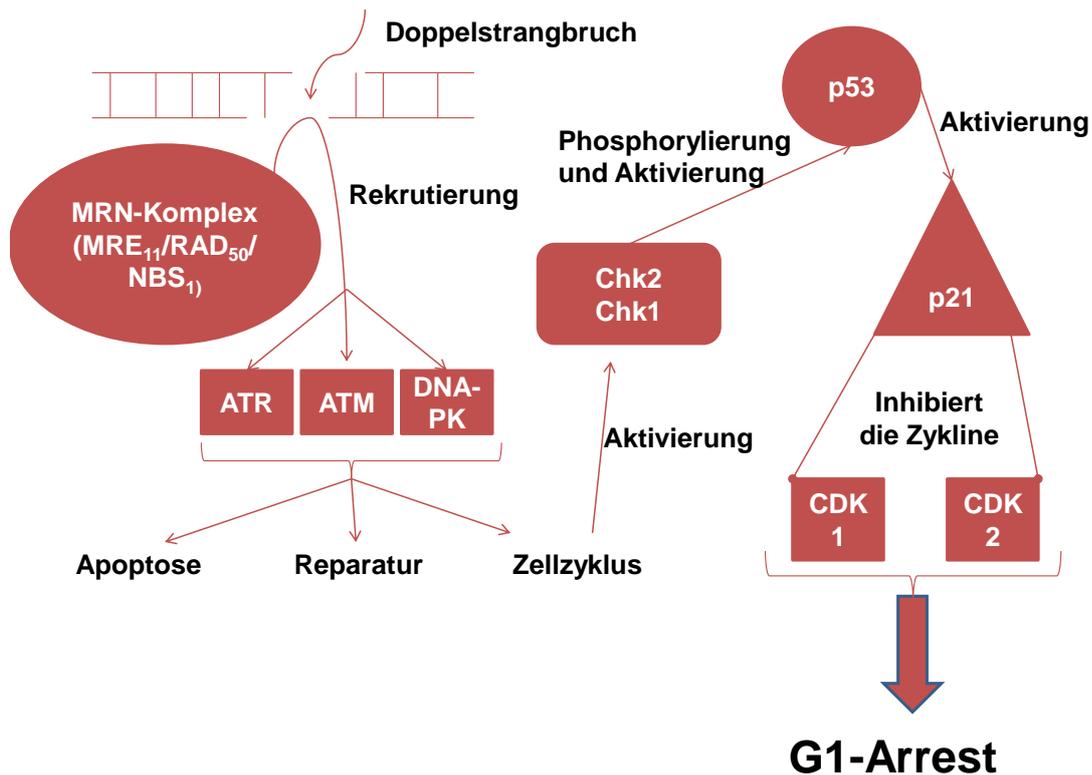


Abb. 10: Signalkaskade des Zellzyklusarrests mit Beteiligung von p53 modifiziert nach (Hakem 2008). Durch den Doppelstrangbruch wird über ATR, ATM und DNA-PK bei Einschlagen der Zellzykluskaskade p53 phosphoryliert und anschließend über p21 die Zykline CDK1 und CDK2 inhibiert, was zum G1-Arrest führt.

## 6.6. Qualität der Doppelstrangbrüche

Im Western-Blot wurden Proteine für Zellzyklus (p21/Waf1, GADD45) und Apoptose (BAX, PUMA) nach Kombinationsbehandlung und alleiniger Behandlung mit <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-MAb-Immunkonjugat nachgewiesen (Tab.18). Der häufigste Grund dafür ist ein irreparabler Schaden der Zelle. Eine große Anzahl an Doppelstrangbrüchen wurde im Immunfluoreszenzassay (5.4.) nachgewiesen. Schwieriger wird es, über die Qualität der Doppelstrangbrüche oder einen eventuell anderen für die Apoptose verantwortlichen Schaden eine Aussage zu treffen.

Dafür lohnt es sich noch einmal die Auswirkungen von ionisierender Strahlung in der Zelle unter die Lupe zu nehmen. Es ist bekannt, dass ionisierende Strahlung im Zellkern reaktive Sauerstoffradikale (ROS) generiert. Innerhalb der DNA-Schädigung werden von ionisierender Strahlung 80% basenmodifiziert, während die anderen 20% Läsionen des Zuckerphosphatskeletts bewirken (Cadet, Delatour et al. 1999). 1Gy eines

Linearbeschleunigers erzeugt ungefähr 2000 Basenmodifikationen pro Zelle (Goodhead 1994). Zusätzlich zu den Basenläsionen induziert ein Gy ebenfalls ca. 1000 (Nikjoo, Uehara et al. 1998) Einzel- und 35 Doppelstrangbrüche (Rothkamm and Lobrich 2003) pro Zelle. Doppelstrangbrüche sind also nicht die einzigen DNA-Schäden, die auftreten. Da auch die Reparaturfähigkeit der Zellen eine Rolle spielt, ist es nicht einfach festzustellen, welche DNA-Schäden definitiv nun die Zelle in die Apoptose bzw. den Zellzyklusarrest geschickt haben. Genauere Daten über die Reparaturfähigkeit von Tumorzellen und durch Ionisierung verursachte nebenbei auftretende Schäden könnten dabei in Zukunft noch untersucht werden.

## **6.7. Ausblick**

In dieser Dissertation wurde eine effiziente Möglichkeit der Eradikation von Tumorzellen am Beispiel der Behandlung von HNSCC-Zellen aufgezeigt. Die Gabe von  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb erweitert hierbei das Arsenal an effektiven Methoden gegen Tumorzellen dieser Art. Mit der noch jungen Behandlungsform der  $\alpha$ -Emitter-Immunkonjugate konnten schon in der Vergangenheit bei chemo- und strahlenresistenten, sowie hypoxischen Tumorzellen Erfolge erzielt werden (Friesen, Glatting et al. 2007; Wulbrand, Seidl et al. 2013). Daneben besteht noch die Behandlungsalternative der  $\beta$ -Emitter, welche bisher in Form der Re-188 basierten Radioimmuntherapie erfolgreich in präklinischen Studien bisher eingesetzt wurde (Harris, Wang et al. 2011). Somit könnte auch für die Zukunft eine Radioimmuntherapie mit zytotoxischen  $\alpha$ -Emittlern zu einer Verbesserung der HNSCC-Therapie und Prognose beisteuern. In Vivo-Versuche sind hierbei als nächste Stufe der Wirksamkeit von  $\alpha$ -Strahlern und Kombinationsbehandlungen bei HNSCC durchzuführen.

## 7. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war die *in vitro* Untersuchung der Interaktion von Röntgenstrahlung und  $\alpha$ -Strahlern bei der Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Halsbereiches (HNSCC). Für UDSCC5-Zellen aus der Gruppe der HNSCC wurde ein nicht einflussnehmende Konzentration von Matuzumab mit  $^{213}\text{Bi}$  gekoppelt und die Auswirkungen auf die Zellproliferation im Vergleich zum Röntgenstrahler untersucht. Hierbei zeigte sich  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb überlegen. 37kBq/ml des  $\alpha$ -Strahlers wurden nun mit 2Gy des Röntgenstrahlers kombiniert, was im Vergleich zu den Einzelbehandlungen ebenfalls die Wirkung potenzierte. Dies ließ sich in der Anzahl von Doppelstrangbrüchen und der Ausbildung von Proteinen im Western Blot bestätigen. Der Marker der Apoptose, p53, wurde in allen Behandlungen exprimiert, wohingegen p53 am Serin-46-Rest überhaupt nicht und p53 am Serin-15-Rest am deutlichsten beim  $\alpha$ -Strahler (sogar mehr als bei der Kombination) phosphoryliert wurde. Dies zeigte, dass die Behandlung mit  $^{213}\text{Bi}$ -markiertem Matuzumab Apoptose-induzierende Signalwege aktiviert, die durch die Röntgenstrahlung alleine nicht aktiviert werden. Da die Kombinationsbehandlung im clonogenen Assay mehr Apoptose bedingte, sowie PUMA und Bax hierbei erhöht nachweisbar waren, wurde die Möglichkeit eines p53-unabhängigen Signalwegs der Apoptose geäußert.

Der Zellzyklusarrest zeigte in allen Behandlungen keinen signifikanten Unterschied bei Akkumulation der Zellen in der G1-Phase. Dies verhielt sich passend zur p53- und p21-Expression im Western Blot.

Die Behandlung von UDSCC5-Zellen mit  $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb kombiniert mit Röntgenstrahlung zeigte in den Versuchen hohes zytotoxisches Potenzial auch bei vergleichsweise niedrigen Konzentrationen bzw. Dosierungen. Der kombinierte Ansatz könnte eine Alternative in der Therapie der Patienten mit HNSCC-Tumoren darstellen, da die unterschiedliche Modalität in der Wirkweise von  $\alpha$ - und Röntgenstrahlen sich gegenseitig hinsichtlich einer Tumorzelltherapie zu verstärken scheint.

## 8. Anhang

### 8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des PLC $\gamma$ /PKC-, RAS/RAF/MEK/ERK- und des PI3K/AKT-Signalwegs modifiziert nach (Brand, Iida et al. 2011).....	11
Abb. 2: Schematische Darstellung des Zerfalls von $^{225}\text{Ac}$ über $^{213}\text{Bi}$ zu $^{209}\text{Bi}$ modifiziert nach C.Seidl (Nuklearmedizinische Klinik München).....	17
Abb. 3: Schema der Aussaat auf der Six-Well-Platte.....	23
Abb. 4: Schematischer Aufbau der Eluierung von $^{213}\text{Bi}$ und der Bindung von $^{213}\text{Bi}$ an Matuzumab .....	25
Abb. 5: Originalbild der Zelle nach Behandlung beim Fotografieren mit dem Mikroskop (Axio Imager.Z1®, Zeiss, Jena, Deutschland) .....	30
Abb. 6: Bild nach Auswertung der Signale durch das Programm Definiens Enterprise Image Intelligence Suite® (Definiens, München, Deutschland) .....	31
Abb. 7: UDSCC5-Bilder bei 2h aller drei Behandlungen ausgewertet mit Definiens® .....	45
Abb. 8: UDSCC5-Bilder bei 24h aller drei Behandlungen ausgewertet mit Definiens® .....	45
Abb. 9: Darstellung der p53-unabhängigen Apoptose. Über den extrinsischen Signalweg bildet sich ein Trimer der Todesrezeptoren und über Aktivierung der Caspase-8 und Bid, welches nach Translokation in die Mitochondrien weitere Enzyme freisetzt, wird über Caspase-3 die Apoptose eingeleitet (Elmore 2007). BAX, PUMA, Caspase-3 und PARP konnten im Western Blot im Gegensatz zu p53 im Kombinationsversuch und bei alleiniger Behandlung mit dem Immunkonjugat nachgewiesen werden. ....	59
Abb. 10: Signalkaskade des Zellzyklusarrests mit Beteiligung von p53 modifiziert nach (Hakem 2008). Durch den Doppelstrangbruch wird über ATR, ATM und DNA-PK bei Einschlagen der Zellzykluskaskade p53 phosphoryliert und anschließend über p21 die Zykline CDK1 und CDK2 inhibiert, was zum G1-Arrest führt. ....	63

## 8.2. Tabellen- und Diagrammverzeichnis

Tab. 1: Western Blot - Verdünnung .....	33
Tab. 2: Bindungsfähigkeit der EGF-Rezeptoren von UDSCC5: $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb (40ng mit einer durchschnittlichen Aktivität von 370kBq) wurde auf $3 \times 10^6$ -Zellen gegeben und band davon 53,7%. .....	36
Tab. 3: Behandlung der UDSCC5-Zellen mit ungelabeltem Matuzumab. $2.5 \times 10^4$ Zellen/well wurden in 24-well Platten 24 h vor Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von ungelabeltem Matuzumab behandelt. Zehn Tage nach der Inkubation mit anti-EGFR-MAb wurde die Proliferation anhand des Crystal violet assay untersucht.....	37
Tab. 4: Überleben von UDSCC5 ( $\text{ID}_{50}=11\text{Gy}$ ) nach Röntgenbestrahlung. Nach Behandlung von $2.5 \times 10^4$ Zellen/well in 24-well-Platten wurde nach 10 Tagen die Zellproliferation im Crystal violet assay überprüft. ....	38
Tab. 5: Überleben von UDSCC5 ( $\text{ID}_{50}=100\text{kBq}$ ) nach $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb-Behandlung. Nach Behandlung von $2.5 \times 10^4$ Zellen/well in 24-well-Platten wurde nach 10 Tagen die Zellproliferation im Crystal violet assay überprüft.....	38
Tab. 6: Colony-Formation Assay für UDSCC5 nach Behandlung mit $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb. $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well wurden 24h vor der Behandlung ausgesät. Unterschiedliche Konzentrationen von $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb von 0 kBq/ml (Kontrolle) bis zu 1480 kBq/ml wurden benutzt. Nach zehn Tagen wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt. ....	40
Tab. 7: Colony-Formation Assay für UDSCC5 nach Röntgenbestrahlung. $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well wurden 24h vor der Behandlung ausgesät. Unterschiedliche Dosierungen des Röntgenstrahlers zwischen 0,5-16Gy wurden eingesetzt. Nach zehn Tagen wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt.....	41
Tab. 8: Colony-Formation Assay als Einzel- und Kombinationsbehandlung für UDSCC5 mit der Aktivität von 37kBq/ml und Dosis von 2Gy. $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well wurden 24h vor der Behandlung ausgesät. Dann fand jeweils die Einzelbehandlung bei 37kBq/ml und 2Gy statt, zudem eine Kombination und umgekehrte Kombination aus beiden. Nach zehn Tagen wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt. ....	42
Tab. 9: p-Werte zu Tab. 8.....	42
Tab. 10: Immunfluoreszenz von UDSCC5 für die kombinierte Behandlung von 37kBq mit 2Gy oder Einzelbehandlung von 2Gy und 37kBq zur Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen. UDSCC5 Zellen wurden ausgesät auf 6-Well-Platten ( $2.5 \times 10^5$ Zellen/well) über Nacht. Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben behandelt und nach Inkubation für 0, 0.5, 2, 6 oder 24 h fixiert. Danach wurden via Immunfluoreszenz $\gamma\text{H2AX}$ -Foci mittels DAPI und FITC angefärbt und anschließend am Mikroskop und mit Definiens®	

ausgewertet.....	43
Tab. 11: p-Werte zu Tab. 10 mit $\alpha=0,05$ .....	44
Tab. 12: p-Werte zu Tab. 10 mit $\alpha=0,05$ .....	44
Tab. 13: Immunfluoreszenz für 37kBq/XGy, XGy und 37kBq zum Zeitpunkt 2h bei 2Gy, 4Gy und 8Gy zur Quantifizierung von Doppelstrangbrüchen. UDSCC5 Zellen wurden ausgesät auf 6-Well-Platten ( $2.5 \times 10^5$ Zellen/well) über Nacht. Die Zellen wurden dann wie oben beschrieben behandelt und nach Inkubation für 2h fixiert. Danach wurden via Immunfluoreszenz $\gamma$ H2AX-Foci mittels DAPI und FITC angefärbt und anschließend am Mikroskop und mit Definiens® ausgewertet.....	47
Tab. 14: Zellzyklusanalyse von UDSCC5-Zellen-Kontrolle: Die Zellen wurden ausgesät in Kulturflaschen ( $5 \times 10^5$ Zellen/Flasche) über Nacht und blieben darauffolgend unbehandelt, 10 Tage danach angefärbt mit DAPI und nach dem Assay der Flow Zytometrie prozentual einer Phase des Zellzyklus zugeordnet. ....	48
Tab. 15: Zellzyklusanalyse von UDSCC5-Zellen - Behandlung 37kBq: Die Zellen wurden ausgesät in Kulturflaschen ( $5 \times 10^5$ Zellen/Flasche) über Nacht und wurden mit $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb (37 kBq/mL) behandelt, zehn Tage danach angefärbt mit DAPI und nach dem Assay der Flow Zytometrie prozentual einer Phase des Zellzyklus zugeordnet. ....	49
Tab. 16: Zellzyklusanalyse von UDSCC5-Zellen - Behandlung 2Gy: Zellzyklusanalyse von UDSCC5-Zellen - Behandlung 37kBq: Die Zellen wurden ausgesät in Kulturflaschen ( $5 \times 10^5$ Zellen/Flasche) über Nacht und wurden mit 2Gy behandelt, zehn Tage danach angefärbt mit DAPI und nach dem Assay der Flow Zytometrie prozentual einer Phase des Zellzyklus zugeordnet. ....	49
Tab. 17: Zellzyklusanalyse von UDSCC5-Zellen - Behandlung 37kBq/2Gy in Kombination: Die Zellen wurden ausgesät in Kulturflaschen ( $5 \times 10^5$ Zellen/Flasche) über Nacht und wurden mit $^{213}\text{Bi}$ -anti-EGFR-MAb (37 kBq/mL + 2Gy) behandelt, zehn Tage danach angefärbt mit DAPI und nach dem Assay der Flow Zytometrie prozentual einer Phase des Zellzyklus zugeordnet. ....	50
Tab. 18: Western-Blot der Zelllinie UDSCC5 zu allen drei Behandlungsvarianten (37kBq, 2Gy, 37kBq+2Gy) mit Analyse von Proteinen des EGFR-, Apoptose- und Zellzyklusarrestsignalwegs: Zellen wurden ausgesät in 6-well-Platten ( $2.5 \times 10^5$ pro well) über Nacht und entsprechend behandelt. Eine Stunde nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und die Lysate dem Western Blot zugeführt. ....	52
Tab. 19: Gegenüberstellung von UDSCC5 und Cal27 in der Kombinationsbehandlung .....	61

#### 8.4. Literaturverzeichnis

- Akhtar, S. (2013). "Areca nut chewing and esophageal squamous-cell carcinoma risk in Asians: a meta-analysis of case-control studies." *Cancer Causes Control* **24**(2): 257-265.
- Al-Sarraf, M. (2002). "Treatment of locally advanced head and neck cancer: historical and critical review." *Cancer Control* **9**(5): 387-399.
- Aldoss, I. T. and A. K. Ganti (2009). "Targeted therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck." *J Egypt Natl Canc Inst* **21**(2): 157-166.
- Andersson, H., E. Cederkrantz, T. Back, C. Divgi, J. Elgqvist, J. Himmelman, G. Horvath, L. Jacobsson, H. Jensen, S. Lindegren, S. Palm and R. Hultborn (2009). "Intraperitoneal alpha-particle radioimmunotherapy of ovarian cancer patients: pharmacokinetics and dosimetry of (211)At-MX35 F(ab')<sub>2</sub>-a phase I study." *J Nucl Med* **50**(7): 1153-1160.
- Apostolidis, C., R. Molinet, G. Rasmussen and A. Morgenstern (2005). "Production of Ac-225 from Th-229 for targeted alpha therapy." *Anal Chem* **77**(19): 6288-6291.
- Baatz, M., J. Zimmermann and C. G. Blackmore (2009). "Automated analysis and detailed quantification of biomedical images using Definiens Cognition Network Technology." *Comb Chem High Throughput Screen* **12**(9): 908-916.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." *Nature* **421**(6922): 499-506.
- Banin, S., L. Moyal, S. Shieh, Y. Taya, C. W. Anderson, L. Chessa, N. I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh and Y. Ziv (1998). "Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage." *Science* **281**(5383): 1674-1677.
- Barazzuol, L., R. Jena, N. G. Burnet, J. C. Jaynes, M. J. Merchant, K. J. Kirkby and N. F. Kirkby (2012). "In vitro evaluation of combined temozolomide and radiotherapy using x rays and high-linear energy transfer radiation for glioblastoma." *Radiat Res* **177**(5): 651-662.
- Bartova, E., J. Krejci, A. Harnicarova, G. Galiova and S. Kozubek (2008). "Histone modifications and nuclear architecture: a review." *J Histochem Cytochem* **56**(8): 711-721.
- Baselga, J. and S. M. Swain (2009). "Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3." *Nat Rev Cancer* **9**(7): 463-475.
- Bonner, W. M., C. E. Redon, J. S. Dickey, A. J. Nakamura, O. A. Sedelnikova, S. Solier and Y. Pommier (2008). "GammaH2AX and cancer." *Nat Rev Cancer* **8**(12): 957-967.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.

- Brand, T. M., M. Iida and D. L. Wheeler (2011). "Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab." *Cancer Biol Ther* **11**(9): 777-792.
- Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J. P. Pouget, J. L. Ravanat and S. Sauvaigo (1999). "Hydroxyl radicals and DNA base damage." *Mutat Res* **424**(1-2): 9-21.
- Canman, C. E., D. S. Lim, K. A. Cimprich, Y. Taya, K. Tamai, K. Sakaguchi, E. Appella, M. B. Kastan and J. D. Siliciano (1998). "Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53." *Science* **281**(5383): 1677-1679.
- Carpenter, G. and Q. Ji (1999). "Phospholipase C-gamma as a signal-transducing element." *Exp Cell Res* **253**(1): 15-24.
- Carvalho, A. L., I. N. Nishimoto, J. A. Califano and L. P. Kowalski (2005). "Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database." *Int J Cancer* **114**(5): 806-816.
- Chipuk, J. E. and D. R. Green (2006). "Dissecting p53-dependent apoptosis." *Cell Death Differ* **13**(6): 994-1002.
- Cohen, G. M. (1997). "Caspases: the executioners of apoptosis." *Biochem J* **326** ( Pt 1): 1-16.
- Collado, M., M. A. Blasco and M. Serrano (2007). "Cellular senescence in cancer and aging." *Cell* **130**(2): 223-233.
- Dadachova, E. and A. Casadevall (2006). "Treatment of infection with radiolabeled antibodies." *Q J Nucl Med Mol Imaging* **50**(3): 193-204.
- Downward, J., P. Parker and M. D. Waterfield (1984). "Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor." *Nature* **311**(5985): 483-485.
- Drecoll, E., F. C. Gaertner, M. Miederer, B. Blechert, M. Vallon, J. M. Muller, A. Alke, C. Seidl, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, R. Senekowitsch-Schmidtke and M. Essler (2009). "Treatment of peritoneal carcinomatosis by targeted delivery of the radio-labeled tumor homing peptide bi-DTPA-[F3]2 into the nucleus of tumor cells." *PLoS One* **4**(5): e5715.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* **35**(4): 495-516.
- Engelman, J. A. (2009). "Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations." *Nat Rev Cancer* **9**(8): 550-562.
- Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *Int J Cancer* **127**(12): 2893-2917.
- Frampton, J. E. (2011). "Spotlight on cetuximab in squamous cell carcinoma of the head and neck." *BioDrugs* **25**(2): 129-133.
- Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman and C. van Bree (2006). "Clonogenic assay of cells in vitro." *Nat Protoc* **1**(5): 2315-2319.

- Friesen, C., G. Glatting, B. Koop, K. Schwarz, A. Morgenstern, C. Apostolidis, K. M. Debatin and S. N. Reske (2007). "Breaking chemoresistance and radioresistance with [213Bi]anti-CD45 antibodies in leukemia cells." *Cancer Res* **67**(5): 1950-1958.
- Goldenberg, D., J. Lee, W. M. Koch, M. M. Kim, B. Trink, D. Sidransky and C. S. Moon (2004). "Habitual risk factors for head and neck cancer." *Otolaryngol Head Neck Surg* **131**(6): 986-993.
- Goodhead, D. T. (1994). "Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA." *Int J Radiat Biol* **65**(1): 7-17.
- Goodhead, D. T. (2006). "Energy deposition stochastics and track structure: what about the target?" *Radiat Prot Dosimetry* **122**(1-4): 3-15.
- Gupta, K., V. S. Thakur, N. Bhaskaran, A. Nawab, M. A. Babcook, M. W. Jackson and S. Gupta (2012). "Green tea polyphenols induce p53-dependent and p53-independent apoptosis in prostate cancer cells through two distinct mechanisms." *PLoS One* **7**(12): e52572.
- Haince, J. F., S. Kozlov, V. L. Dawson, T. M. Dawson, M. J. Hendzel, M. F. Lavin and G. G. Poirier (2007). "Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents." *J Biol Chem* **282**(22): 16441-16453.
- Hakem, R. (2008). "DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly." *EMBO J* **27**(4): 589-605.
- Harris, M., X. G. Wang, Z. Jiang, G. L. Goldberg, A. Casadevall and E. Dadachova (2011). "Radioimmunotherapy of experimental head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with E6-specific antibody using a novel HPV-16 positive HNSCC cell line." *Head Neck Oncol* **3**(1): 9.
- Hikisz, P. and Z. M. Kilianska (2012). "PUMA, a critical mediator of cell death--one decade on from its discovery." *Cell Mol Biol Lett* **17**(4): 646-669.
- Hopker, K., H. Hagmann, S. Khurshid, S. Chen, B. Schermer, T. Benzing and H. C. Reinhardt (2012). "Putting the brakes on p53-driven apoptosis." *Cell Cycle* **11**(22): 4122-4128.
- Iro, H. and F. Waldfahrer (1998). "Evaluation of the newly updated TNM classification of head and neck carcinoma with data from 3247 patients." *Cancer* **83**(10): 2201-2207.
- Jeggo, P. A. and M. Lobrich (2007). "DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact?" *Oncogene* **26**(56): 7717-7719.
- Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu and M. J. Thun (2009). "Cancer statistics, 2009." *CA Cancer J Clin* **59**(4): 225-249.
- Johansson, P., A. Muslimovic, R. Hultborn, E. Fernstrom and O. Hammarsten (2011). "In-solution staining and arraying method for the immunofluorescence detection of gammaH2AX foci optimized for clinical applications." *Biotechniques* **51**(3): 185-189.
- Kim, Y. S. and M. W. Brechbiel (2012). "An overview of targeted alpha therapy." *Tumour Biol* **33**(3): 573-590.

- Lim, Y. S., J. C. Lee, Y. S. Lee, B. J. Lee and S. G. Wang (2012). "Growth Inhibitory Effect of Palatine Tonsil-derived Mesenchymal Stem Cells on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells." *Clin Exp Otorhinolaryngol* **5**(2): 86-93.
- Lin, S. Y., K. Makino, W. Xia, A. Matin, Y. Wen, K. Y. Kwong, L. Bourguignon and M. C. Hung (2001). "Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor." *Nat Cell Biol* **3**(9): 802-808.
- Martinvalet, D., P. Zhu and J. Lieberman (2005). "Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis." *Immunity* **22**(3): 355-370.
- Nayak, T., J. Norenberg, T. Anderson and R. Atcher (2005). "A comparison of high- versus low-linear energy transfer somatostatin receptor targeted radionuclide therapy in vitro." *Cancer Biother Radiopharm* **20**(1): 52-57.
- Nikjoo, H., S. Uehara, W. E. Wilson, M. Hoshi and D. T. Goodhead (1998). "Track structure in radiation biology: theory and applications." *Int J Radiat Biol* **73**(4): 355-364.
- Nikula, T. K., M. R. McDevitt, R. D. Finn, C. Wu, R. W. Kozak, K. Garmestani, M. W. Brechbiel, M. J. Curcio, C. G. Pippin, L. Tiffany-Jones, M. W. Geerlings, Sr., C. Apostolidis, R. Molinet, M. W. Geerlings, Jr., O. A. Gansow and D. A. Scheinberg (1999). "Alpha-emitting bismuth cyclohexylbenzyl DTPA constructs of recombinant humanized anti-CD33 antibodies: pharmacokinetics, bioactivity, toxicity and chemistry." *J Nucl Med* **40**(1): 166-176.
- Nordmark, M., S. M. Bentzen, V. Rudat, D. Brizel, E. Lartigau, P. Stadler, A. Becker, M. Adam, M. Molls, J. Dunst, D. J. Terris and J. Overgaard (2005). "Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study." *Radiother Oncol* **77**(1): 18-24.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi and N. Tanaka (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* **288**(5468): 1053-1058.
- Oda, K., H. Arakawa, T. Tanaka, K. Matsuda, C. Tanikawa, T. Mori, H. Nishimori, K. Tamai, T. Tokino, Y. Nakamura and Y. Taya (2000). "p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53." *Cell* **102**(6): 849-862.
- Oda, K., Y. Matsuoka, A. Funahashi and H. Kitano (2005). "A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling." *Mol Syst Biol* **1**: 2005 0010.
- Oren, M. (2003). "Decision making by p53: life, death and cancer." *Cell Death Differ* **10**(4): 431-442.
- Pfost, B., C. Seidl, M. Autenrieth, D. Saur, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, M. Schwaiger and R. Senekowitsch-Schmidtke (2009). "Intravesical alpha-radioimmunotherapy with <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice." *J Nucl Med* **50**(10): 1700-1708.
- Pickhard, A. C., J. Margraf, A. Knopf, T. Stark, G. Piontek, C. Beck, A. L. Boulesteix, E. Q. Scherer, S. Pigorsch, J. Schlegel, W. Arnold and R. Reiter (2011). "Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways." *BMC Cancer* **11**: 388.

- Prasad, R. and S. K. Katiyar (2012). "Bioactive phytochemical proanthocyanidins inhibit growth of head and neck squamous cell carcinoma cells by targeting multiple signaling molecules." *PLoS One* **7**(9): e46404.
- Rai, N. K., K. Tripathi, D. Sharma and V. K. Shukla (2005). "Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing." *Int J Low Extrem Wounds* **4**(3): 138-144.
- Raja, C., P. Graham, S. M. Abbas Rizvi, E. Song, H. Goldsmith, J. Thompson, A. Bosserhoff, A. Morgenstern, C. Apostolidis, J. Kearsley, R. Reinfeld and B. J. Allen (2007). "Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma." *Cancer Biol Ther* **6**(6): 846-852.
- Rassow, J. (2006 ). *Biochemie : 50 Tabellen / Joachim Rassow ...* . Stuttgart, Thieme
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova and W. M. Bonner (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* **273**(10): 5858-5868.
- Roos, W. P. and B. Kaina (2012). "DNA damage-induced apoptosis: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis." *Cancer Lett.*
- Rothkamm, K. and M. Lobrich (2003). "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5057-5062.
- Schmid, T. E., G. Dollinger, W. Beisker, V. Hable, C. Greubel, S. Auer, A. Mittag, A. Tarnok, A. A. Friedl, M. Molls and B. Roper (2010). "Differences in the kinetics of gamma-H2AX fluorescence decay after exposure to low and high LET radiation." *Int J Radiat Biol* **86**(8): 682-691.
- Sebolt-Leopold, J. S. and R. Herrera (2004). "Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(12): 937-947.
- Seidl, C., H. Schrock, S. Seidenschwang, R. Beck, E. Schmid, M. Abend, K. F. Becker, C. Apostolidis, T. K. Nikula, E. Kremmer, M. Schwaiger and R. Senekowitsch-Schmidtke (2005). "Cell death triggered by alpha-emitting 213Bi-immunoconjugates in HSC45-M2 gastric cancer cells is different from apoptotic cell death." *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **32**(3): 274-285.
- Sgouros, G. (2008). "Alpha-particles for targeted therapy." *Adv Drug Deliv Rev* **60**(12): 1402-1406.
- Sgouros, G., J. C. Roeske, M. R. McDevitt, S. Palm, B. J. Allen, D. R. Fisher, A. B. Brill, H. Song, R. W. Howell, G. Akabani, W. E. Bolch, R. F. Meredith, B. W. Wessels and P. B. Zanzonico (2010). "MIRD Pamphlet No. 22 (abridged): radiobiology and dosimetry of alpha-particle emitters for targeted radionuclide therapy." *J Nucl Med* **51**(2): 311-328.
- Shrotriya, S., G. Deep, M. Gu, M. Kaur, A. K. Jain, S. Inturi, R. Agarwal and C. Agarwal (2012). "Generation of reactive oxygen species by grape seed extract causes irreparable DNA damage leading to G2/M arrest and apoptosis selectively in head and neck squamous cell carcinoma cells." *Carcinogenesis* **33**(4): 848-858.
- Staaf, E., K. Brehwens, S. Haghdoost, S. Nievaart, K. Pachnerova-Brabcova, J. Czub, J. Braziewicz and A. Wojcik (2012). "Micronuclei in human peripheral blood

- lymphocytes exposed to mixed beams of X-rays and alpha particles." *Radiat Environ Biophys*.
- Sturgis, E. M. and P. M. Cinciripini (2007). "Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers?" *Cancer* **110**(7): 1429-1435.
- Su, T. T. (2006). "Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices." *Annu Rev Genet* **40**: 187-208.
- Taira, N. and K. Yoshida (2012). "Post-translational modifications of p53 tumor suppressor: determinants of its functional targets." *Histol Histopathol* **27**(4): 437-443.
- Tejani, M. A., R. B. Cohen and R. Mehra (2010). "The contribution of cetuximab in the treatment of recurrent and/or metastatic head and neck cancer." *Biologics* **4**: 173-185.
- Toustrup, K., B. S. Sorensen, P. Lassen, C. Wiuf, J. Alsner and J. Overgaard (2012). "Gene expression classifier predicts for hypoxic modification of radiotherapy with nimorazole in squamous cell carcinomas of the head and neck." *Radiother Oncol* **102**(1): 122-129.
- Vanhoefler, U., M. Tewes, F. Rojo, O. Dirsch, N. Schleucher, O. Rosen, J. Tillner, A. Kovar, A. H. Braun, T. Trarbach, S. Seeber, A. Harstrick and J. Baselga (2004). "Phase I study of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody EMD72000 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor receptor." *J Clin Oncol* **22**(1): 175-184.
- Wu, D., T. Ozaki, Y. Yoshihara, N. Kubo and A. Nakagawara (2013). "Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) stimulates tumor suppressor p53 protein in response to DNA damage through complex formation and acetylation." *J Biol Chem* **288**(2): 1353-1364.
- Wulbrand, C., C. Seidl, F. C. Gaertner, F. Bruchertseifer, A. Morgenstern, M. Essler and R. Senekowitsch-Schmidtke (2013). "Alpha-particle emitting <sup>213</sup>Bi-anti-EGFR immunoconjugates eradicate tumor cells independent of oxygenation." *PLoS One* **8**(5): e64730.
- Yoshida, K. and Y. Miki (2010). "The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage." *Cancer Sci* **101**(4): 831-835.
- Zalutsky, M. R., D. A. Reardon, G. Akabani, R. E. Coleman, A. H. Friedman, H. S. Friedman, R. E. McLendon, T. Z. Wong and D. D. Bigner (2008). "Clinical experience with alpha-particle emitting <sup>211</sup>At: treatment of recurrent brain tumor patients with <sup>211</sup>At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6." *J Nucl Med* **49**(1): 30-38.

## 9. Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Markus Essler für die außergewöhnliche Unterstützung bei der Konzeption und Durchführung der Promotion. Mit Engagement und stets wertvollen Ratschlägen und Anregungen sorgte er für das Gelingen meiner Arbeit. Sehr schätzte ich auch die stets zeitnahe Korrektur meines Manuskriptes.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Schwaiger für die Möglichkeit, diese Arbeit in der von ihm geführten Klinik anzufertigen.

Weiterhin danke ich besonders Frau Birgit Blechert, die mir sowohl bei den Experimenten im Labor als auch bei der Erstellung des Manuskripts mit Rat und Tat zur Seite stand. Sie unterstützte mich bei der Versuchsplanung und -durchführung sowie der Auswertung der Ergebnisse. Sie war in jeglicher Hinsicht eine große Hilfe. Ohne sie wäre die Doktorarbeit in dieser Form wohl nicht möglich gewesen. Außerdem danke ich Hans-Richard Demel für eine gute Zeit und Zusammenarbeit im Labor.

Zudem bedanke ich mich bei den Biologen Herrn Dr. Mario Vallon und Herrn Dr. Christoph Seidl der nuklearmedizinischen Klinik für ihre vor allem in fachlichen Bereichen durchweg außerordentliche Unterstützung. Hinsichtlich der Manuskripte und molekularbiologischer Fragestellungen durfte ich mich an sie wenden.

Weiter möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Anja Pickhard aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik bedanken für die gute Zusammenarbeit und einen Glückwunsch zur Habilitation aussprechen.

Bei Herrn Guido Piontek möchte ich mich besonders bedanken für seine engagierte, unkomplizierte Art und damit außergewöhnliche Hilfe vor allem am Anfang.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Molls, dem Leiter der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie für die Benutzung des Zentrums für präklinische Forschung (ZPF) und all seinen Mitarbeitern bedanken.

Zuletzt gilt auch ein besonderer Dank an die Mitarbeiter des Helmholtzzentrums München besonders Frau Dr. rer. nat. Annette Feuchtinger und Frau Ulrike Buchholz für die Genehmigung und Unterstützung bei den Auswertungen zur Fluoreszenzmikroskopie.

## 10. Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

**„Untersuchungen zur therapeutischen Wirkung von  $\alpha$ -Strahlern bei Plattenepithelkarzinomzellen“**

in der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar unter der Anleitung und Betreuung durch Univ.-Prof. Dr. M. Essler ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen.

Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich nicht einverstanden.

München, den .....

.....

## 11. Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Samuel Paul Kopping, geboren am 28.03.1988 in Würzburg, verheiratet, konfessionslos, ein Kind.

### Schulbildung:

1994-1998	Rudolf-von-Scherenberg Grundschule Dettelbach
1998-2007	Armin-Knab-Gymnasium Kitzingen mit Abitur

### Eintritt in die Bundeswehr und Hochschulstudium:

2007	Eintritt in die Bundeswehr als Sanitätsoffizieranwärter und Beginn des Medizinstudiums
2007-2013	Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München
2009	1. Staatsexamen
2012-2013	Praktisches Jahr: Rot-Kreuzklinikum München (Chirurgie) Städtisches Klinikum Bogenhausen (Innere) Klinikum rechts der Isar (Neurologie)
2013	2. Staatsexamen
2013	Erhalt der Approbation zur Ausübung des Arztberufes

### Beginn des Arbeitslebens:

2014	Beginn der Arbeitstätigkeit als Assistenzarzt der Inneren Medizin im Bundeswehrkrankenhaus Ulm
------	--